

**T.C.**  
**İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**  
**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**  
**GIDA MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI**

**TAGUCHİ TASARIMI KULLANILARAK BUĞDAY**  
**RUŞEYİMİ PROTEİN HİDROLİZATLARININ**  
**ÜRETİLMESİ VE KARAKTERİZE EDİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ayşenur ORAKCI**

**İstanbul**  
**Eylül-2025**

**T.C.**  
**İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**  
**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**  
**GIDA MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI YÜKSEK LİSANS**  
**PROGRAMI**

**TAGUCHİ TASARIMI KULLANILARAK BUĞDAY RUŞEYİMİ**  
**PROTEİN HİDROLİZATLARININ ÜRETİLMESİ VE**  
**KARAKTERİZE EDİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tez Danışmanı**  
**Prof. Dr. İbrahim GÜLSEREN**

**İstanbul**  
**Eylül, 2025**

## TEZ ONAYI

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. İbrahim GÜLSEREN

Üye Doç. Dr. Banu METİN

Üye Doç. Dr. Mustafa YAMAN

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Erhan İÇENER  
Enstitü Müdürü

## BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Yüksek lisans tezi olarak hazırladığım “**Taguchi Tasarımı Kullanılarak Buğday Ruşeymi Protein Hidrolizatlarının Üretilmesi ve Karakterize Edilmesi**” adlı çalışmanın öneri aşamasından sonuçlandığı aşamaya kadar geçen süreçte bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle uyduğumu, tez içindeki tüm bilgileri bilimsel ahlak ve gelenek çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığımı, bu çalışmamda doğrudan veya dolaylı olarak yaptığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu beyan ederim.

Ayşenur ORAKCI

## ÖN SÖZ

Yüksek lisans tezimin araştırma sürecinde engin bilgi birikimi ve rehberliği ile bana destek olan sevgili danışmanım Prof. Dr. İbrahim GÜLSEREN'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Ayrıca araştırmam sırasında bana yardımcı olan Bilal ÇAKIR'a ve Zeynep Saliha GÜNEŞ'e, sağladıkları kaynaklar ve destekler için minnettarım. Eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olan sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışmanın gelecekteki bilimsel çalışmalara ışık tutması ve literatüre katkı sağlamasını umuyorum.

Saygılarımla,

**Ayşenur ORAKCI**  
**İstanbul, 2025**

## ÖZET

# TAGUCHİ TASARIMI KULLANILARAK BUĞDAY RUŞEYİMİ PROTEİN HİDROLİZATLARININ ÜRETİLMESİ VE KARAKTERİZE EDİLMESİ

Ayşenur ORAKCI

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim GÜLSEREN

Eylül, 2025- 163 Sayfa

Bu çalışmada buğday ruşeymi 20 kHz (200 W) ve 26 kHz (400 W) frekanslarında çalışan 2 farklı ultrasonik sistem ile muamele edilmiştir. Bunu takiben selülaz enzimi ile numunelerdeki karbonhidratların nispeten parçalanması sağlanmıştır. Bir sonraki aşamada sırasıyla Alkalaz ve Flavourzyme ile proteoliz gerçekleştirilmiştir. Enzimatik muamelelerin sonrasında, karışım filtre kağıdıyla süzülüp, santrifüj yapılmıştır. Son aşamada ultrafiltrasyon (50 kDa kaset) ile fraksiyonlama yapılarak ruşeym protein hidrolizatları fraksiyonlanmıştır. Ruşeym protein hidrolizatları L25 Taguchi tasarımına göre hazırlanıp toplam fenolik madde içeriği (TFİ), hidroliz derecesinin (%DH) belirlenmesi ve DPPH süpürme aktivitesi analizleri UV-Spektrofotometre cihazında yapılmış, birincil değerlendirme kriteri olan serbest amino asit içeriği ise uygun yöntemler ile ölçülmüştür. L25 Taguchi tasarımına göre hazırlanan 25 farklı ruşeym protein hidrolizatına uygulanan analizler sonucunda TFİ, %DH, DPPH süpürme aktivitesi ve serbest amino asit içeriği sırasıyla 207,1 mg GAE.100 g<sup>-1</sup>, %22,1, 39,3 mg TE.100 g<sup>-1</sup> ve %1,36 olarak maksimum değerlere ulaşmıştır. İstatistiksel analizler sonucunda, serbest amino asit değeri temel alınarak optimize ruşeym protein hidrolizatları hazırlanmış ve etüvde (45°C) 9,8 kat kütleli konsantrasyona ulaşacak şekilde numuneler konsantre edilmiştir. Optimize ruşeym protein hidrolizatlarına ve konsantresine uygulanan analizler sonucunda elde edilen veriler incelenmiştir. Optimize ruşeym protein hidrolizatlarına uygulanan analizlerde

numunelerin kül içeriđi %0,5, Briks deđeri %7,7, protein içeriđi %1,8, organik karbon içeriđi %4,2, %DH deđeri 17,5, TFİ deđeri 226,8 mg GAE.100 g<sup>-1</sup>, DPPH sűpürme aktivitesi deđeri 28,6 mg TE.100 g<sup>-1</sup> ve serbest amino asit içeriđi %1,2 űeklindedir. Konsantre ruűeym protein hidrolizatlarına da aynı analizler uygulanmıű ve elde edilen bulgular kül %5,1 Briks %74, protein %23,4, organik karbon %29,7, %DH 18,8, TFİ 2291,8 mg GAE.100 g<sup>-1</sup>, DPPH sűpürme aktivitesi 340,8 mg TE.100 g<sup>-1</sup> ve serbest amino asit içeriđi %9,8 űeklinde bulunmuűtur. Bu alıűmada elde edilen ruűeym protein hidrolizatlarının analiz sonuçları, literatűrde yer alan ruűeym ve protein hidrolizatlarına iliűkin alıűmaların bulgularıyla karűılaűtırılmıűtır. Literatűrde yer alan protein hidrolizatlarının uygulamaları incelenmiű olup, bu alıűmada elde edilen bulguların, ruűeym protein hidrolizatlarının deđerlendirilmesine yűnelik gelecekteki araűtırmalara katkı sađlayacađı űngűrűlmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Buđday ruűeymi, protein, hidrolizatlar, ultrasonik muamele, serbest amino asit

**ABSTRACT**

**PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF WHEAT  
GERM PROTEIN HYDROLYSATES USING TAGUCHI  
DESIGN**

**Ayşenur ORAKCI**

Master, Food Engineering

Thesis Advisor: Prof. İbrahim GÜLSEREN

September, 2025- 163 Pages

In this study, wheat germ was treated with two different ultrasonic systems operating at 20 kHz (200 W) and 26 kHz (400 W). Following this, the carbohydrates in the samples were relatively degraded with cellulase enzyme. In the next step, proteolysis was performed with Alcalase and Flavourzyme, respectively. After the enzymatic treatments, the mixture was filtered through filter paper and centrifuged. In the final step, germ protein hydrolysates were fractionated by ultrafiltration (50 kDa cassette). Germ protein hydrolysates were prepared according to the L25 Taguchi design, and total phenolic content (TFI), degree of hydrolysis (%DH), and DPPH scavenging activity analyses were performed using a UV-spectrophotometer. The primary evaluation criterion, free amino acid content, was measured using appropriate methods. As a result of the analyses applied to 25 different germ protein hydrolysates prepared according to the L25 Taguchi design, TFI, %DH, DPPH scavenging activity, and free amino acid content reached maximum values of 207,1 mg GAE.100 g<sup>-1</sup>, 22,1%, 39,3 mg TE.100 g<sup>-1</sup>, and 1,36%, respectively. As a result of statistical analyses, optimized germ protein hydrolysates were prepared based on the free amino acid value and the samples were concentrated in the oven (45°C) to reach a 9,8-fold mass concentration. The data obtained from the analyses applied to the optimized germ protein hydrolysates and concentrate were examined. In the analyzes applied to optimized germ protein hydrolyzates, the ash content of the samples was 0,5%, Brix value was 7,7%, protein content was 1,8%, organic carbon content was 4,2%, %DH value was 17,5, TFI value was 226,8 mg GAE.100 g<sup>-1</sup>, DPPH scavenging

activity value was 28,6 mg TE.100 g<sup>-1</sup> and free amino acid content was 1,2%. The same analyzes were applied to concentrated germ protein hydrolyzates and the results were found to be ash 5,1%, Brix 74%, protein 23,4%, organic carbon 29,7%, %DH 18,8, TFI 2291,8 mg GAE.100 g<sup>-1</sup>, DPPH scavenging activity value was 340,8 mg TE.100 g<sup>-1</sup> and free amino acid content was 9.8%. The analysis results of the germ protein hydrolysates obtained in this study were compared with the findings of studies on germ and protein hydrolysates in the literature. The applications of protein hydrolysates in the literature were examined, and it is anticipated that the findings obtained in this study will contribute to future research on the evaluation of germ protein hydrolysates.

**Keywords:** Wheat germ, protein, hydrolysates, ultrasonic treatment, free amino acid

# İÇİNDEKİLER

<b>TEZ ONAYI .....</b>	<b>i</b>
<b>BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ.....</b>	<b>ii</b>
<b>ÖN SÖZ .....</b>	<b>iii</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER.....</b>	<b>viii</b>
<b>TABLolar LİSTESİ.....</b>	<b>xi</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ .....</b>	<b>xiii</b>
<b>KISALTMALAR LİSTESİ.....</b>	<b>xv</b>
<b>BİRİNCİ BÖLÜM</b>	
<b>GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>İKİNCİ BÖLÜM</b>	
<b>LİTERATÜR BİLGİSİ.....</b>	<b>4</b>
2.1. Proteinler.....	4
2.1.1. Proteinlerin Yapısal ve Tekno-Fonksiyonel Özellikleri.....	6
2.1.2. Proteinlerin İzolasyonu.....	8
2.1.3. Protein Hidrolizatlarının Hidroliz Yöntemleri ve Özellikleri.....	10
2.1.4. Protein Hidrolizatları Elde Etmek için Kullanılan Kaynaklar.....	16
2.1.5. Ultrasonun Protein Hidrolizatları Oluşturmada Rolü.....	18
2.1.6. Protein Hidrolizatlarının Kullanım Alanları.....	19
2.2. Buğdayın Yapısı ve Dünya Geneline Buğday Üretim Kapasitesi .....	31
2.3. Ruşeym .....	34

2.3.1. Ruşeymin Beslenme Üzerindeki Etkisi .....	35
2.3.2. Ruşeym Proteininin ve Protein Hidrolizatlarının Özellikleri .....	36

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### **MATERYAL VE METOT .....**

**39**

3.1. AE-İÇ Metodu ile Ruşeymden Protein İzolatlarının Elde Edilmesi.....	41
3.2. Buğday Ruşeymi Protein Hidrolizatlarının Hazırlanışı .....	43
3.2.1. Buğday Ruşeymine Ultrasonik Muamelelerin Uygulaması .....	44
3.2.2. Ruşeym Dispersiyonlarının Enzimatik Hidrolizi .....	45
3.2.3. Ultrafiltrasyon Yöntemi ile Fraksiyonlama .....	48
3.3. TNBS (2,4,6-Trinitrobenzen Sülfonik Asit) Yöntemi ile Hidroliz Derecesinin Belirlenmesi.....	48
3.4. DPPH (2,2-Diphenyl-1- Picrylhydrazyl) Süpürme Aktivitesi Analizi .....	50
3.5. Toplam Fenolik İçeriği (TFİ) Analizi.....	51
3.6. Organik Karbon Analizi .....	52
3.7. Şeker Analizi .....	53
3.8. Nem ve Kül Analizi .....	54
3.9. Protein Analizi .....	55
3.10. Briks analizi .....	56
3.11. Serbest Amino Asit Analizi .....	56
3.12. Taguchi Yöntemi .....	57
3.12.1. Varyans Analizi (ANOVA) .....	61

## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

### **BULGULAR VE TARTIŞMA .....**

**62**

4.1. Ruşeymin ve Ruşeym Protein İzolatının Kompozisyonel Analizi .....	62
4.2. Ruşeym Protein Hidrolizatlarının Serbest Amino Asit İçeriği .....	68

4.3. Ruşeym Protein Hidrolizatlarının TNBS Yöntemi ile Belirlenen Hidroliz Derecesi Değerleri .....	77
4.4. Ruşeym Protein Hidrolizatlarının DPPH Süpürme Aktivitesi Değerleri .....	83
4.5. Ruşeym Protein Hidrolizatlarının Toplam Fenolik İçeriği (TFİ) .....	89
4.6. Optimize Ruşeym Protein Hidrolizatları ve Konsantresi .....	94
4.6.1. Serbest Amino Asit ve Hidroliz Derecesi Değerleri .....	95
4.6.2. DPPH Süpürme Aktivitesi ve TFİ Değerleri .....	99
4.6.3. Şeker ve Organik Karbon İçeriği .....	100

## **BEŞİNCİ BÖLÜM**

<b>SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>104</b>
-------------------------------	------------

<b>KAYNAKÇA .....</b>	<b>106</b>
-----------------------	------------

<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>143</b>
-----------------------	------------

## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Amino asitlerin isim, kısaltma, moleküler ağırlık ve pI değerlerinin tablosu.....	6
Tablo 2.2: Kimyasal protein hidroliz (alkali ve asidik hidroliz) yöntemleri ile enzimatik protein hidroliz yönteminin dezavantajlı ve avantajlı yönlerinin karşılaştırılması .....	12
Tablo 2.3: Ekmeklik buğday, kepeği ve ruşeyminin besin değerleri tablosu .....	33
Tablo 2.4: Dünya’da 2019-22 yılları arasında en çok buğday (ton) üreten ülkeler (FAO).....	34
Tablo 3.1: Taguchi analizinin optimizasyon sürecinde belirlenen faktörler ve seviyeler .....	58
Tablo 3.2: Taguchi analizine göre ruşeym protein hidrolizatlarının elde edilmesinde kullanılan L25 deneysel tasarımı .....	59
Tablo 4.1: Endüstriyel buğday ruşeyminin besin kompozisyonunun dağılımı .....	62
Tablo 4.2: Ruşeym protein izolatının nem, kül ve protein (%) içeriği .....	63
Tablo 4.3: Ultrasonik muamelelerin ardından, Alkalaz ve Flavourzyme enzimleri kullanılarak elde edilen L25 desenindeki ruşeym protein hidrolizatlarına uygulanan DPPH süpürme aktivitesi, TFI ve DH değeri analiz sonuçları .....	67
Tablo 4.4: L25 Taguchi yöntemine göre hazırlanmış ruşeym protein hidrolizatlarının serbest amino asit değerleri (%).....	70
Tablo 4.5: US 1-US 2 muamele süreleri, Alkalaz-Flavourzyme konsantrasyonları ve ultrafiltrasyon işleminde gerçekleşen hacimsel konsantrasyon oranının optimizasyonu sürecinde elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının serbest amino asit (%) içeriğine ait S/N oranlarının varyans analizi dağılımı .....	73
Tablo 4.6: US 1-US 2 muamele süreleri, Alkalaz-Flavourzyme konsantrasyonları ve ultrafiltrasyon işleminde gerçekleşen hacimsel konsantrasyon oranının optimizasyonu sürecinde elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının %DH içeriğine ait S/N oranlarının varyans analizi dağılımı .....	78
Tablo 4.7: US 1-US 2 muamele süreleri, Alkalaz-Flavourzyme konsantrasyonları ve ultrafiltrasyon işleminde gerçekleşen hacimsel konsantrasyon oranının optimizasyonu sürecinde elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının	

DPPH süpürme aktivitesi değerine ait S/N oranlarının varyans analizi dağılımı .....	85
Tablo 4.8: US 1-US 2 muamele süreleri, Alkalaz-Flavourzyme konsantrasyonları ve ultrafiltrasyon işlemi gerçekleştirilen hacimsel konsantrasyon oranının optimizasyonu sürecinde elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının TFI değerine ait S/N oranlarının varyans analizi dağılımı .....	90
Tablo 4.9: L25 Taguchi tasarımına göre hazırlanan ruşeym protein hidrolizatlarının optimize faktör seviyeleri ve aldığı maksimum değerler (Kons: Konsantrasyon, Maks: Maksimum).....	94
Tablo 4.10: Taguchi analizi sonucu elde edilen faktörlerin optimum seviyelerine göre hazırlanmış optimize ruşeym protein hidrolizatları ve hidrolizat konsantrasyonunun analiz sonuçları .....	95
Tablo 4.11: L25 Taguchi analizi sonucu elde edilen optimum faktör seviyelerine göre üretilen optimize ruşeym protein hidrolizatları ve hidrolizat konsantrasyonunun (9,8 kat kütleli olarak konsantre edilmiştir) serbest amino asit (%) analizi .....	97
Tablo 4.12: L25 Taguchi analizi sonucu elde edilen optimum faktör seviyelerine göre üretilen ruşeym protein hidrolizatları ve hidrolizatların konsantrasyonunun (9,8 kat konsantre) şeker içeriği.....	101

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Proteinlerin hidrolizinde kullanılan proteolitik enzimlerin elde edildiği hayvansal, mikrobiyal ve bitkisel kaynaklar.....	13
Şekil 2.2: Peptit zincirinin proteolitik hidrolizinde endo-peptidaz ve ekzo-peptidaz enzimleri ile proteolitik hidrolizinin gösterimi .....	14
Şekil 2.3: Proteinlerin hidrolizi sonrası monopeptit, dipeptit, tripeptit ve oligopeptitlere dönüşümünün gösterimi .....	15
Şekil 2.4: Protein hidrolizatlarının farklı sektörlerde kullanımı .....	20
Şekil 2.5: BioActio firması tarafından tavuk proteini hidrolizatlarından üretilen yemlerin karides, tilapya balığı, domuz, kedi ve köpekler tarafından tüketilmesi sonucunda bu hayvanlarda ortaya çıkacak biyolojik etkiler .....	24
Şekil 2.6: Buğday tanesinin kepek, embriyo ve ruşeymden oluşan bölümlerinin gösterimi .....	32
Şekil 3.1: Ruşeym protein hidrolizatları üretim sürecinin grafiksel özeti.....	40
Şekil 3.2: Eksun Gıda Tarım Sanayi ve Ticaret A.Ş. tesisinden sağlanan endüstriyel buğday ruşeymi fotoğrafı.....	41
Şekil 3.3: Buğday ruşeymi protein hidrolizatlarının üretim akış şeması.....	44
Şekil 3.4: Enzimatik proteoliz öncesi L25 Taguchi tasarımına göre belirlenen sürelerde ruşeym-su karışımına ultrasonik muamele 1 (US 1, 26 kHz, 200 W) ve ultrasonik muamele 2'nin (US 2, 20 kHz, 400 W) uygulanması.....	45
Şekil 3.5: Buğday ruşeymi protein hidrolizatlarının elde edilmesinde ultrasonik muameleleri sonrası uygulanan enzimatik hidroliz, filtreleme ve santrifüj işlemleri .....	47
Şekil 3.6: Ruşeym protein hidrolizatlarının 50 kDa membran filtreden geçirilerek fraksiyonlanması .....	48
Şekil 3.7: L25 deneme deseninde sırası ile bazı numunelerin ruşeym protein hidrolizatlarının TNBS yöntemi ile takip edilen renk değişimleri .....	49
Şekil 3.8: L25 deneme deseninde sırası ile kör, 1, 9 ve 19 numaralı ruşeym protein hidrolizatlarının DPPH süpürme aktivitesi değerlerinin değişimi .....	50
Şekil 3.9: L25 deneme deseninde sırası ile kör, 19, 9, 4, 3, 2, 1 numaralı ruşeym protein hidrolizatlarının TFİ değerlerinin değişimi .....	52

Şekil 3.10: Organik karbon analizinde kör (a ve b görselinde soldan 1. erlen) ve ruşeym protein hidrolizatlarının titrasyon a) öncesi ve b) sonrası değişimi .....	53
Şekil 3.11: Ruşeym protein hidrolizatlarının şeker ve serbest amino asit analizlerinin ölçümünde kullanılan HPLC sistemi .....	54
Şekil 3.12: Kül fırınından çıkarılan buğday ruşeymi protein hidrolizatları.....	55
Şekil 4.1: Ruşeym protein hidrolizatlarının hazırlanma süreci.....	65
Şekil 4.2: US 1-US 2 muamele süreleri, Alkalaz- Flavourzyme konsantrasyonları ve ultrafiltrasyon işleminde gerçekleşen hacimsel konsantrasyon oranının optimizasyonu sürecinde elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının serbest amino asit (%) içeriği için tasarım parametrelerinin ana etkilerinin değerlendirilmesi .....	75
Şekil 4.3: US 1-US 2 muamele süreleri, Alkalaz-Flavourzyme konsantrasyonları ve ultrafiltrasyon işleminde gerçekleşen hacimsel konsantrasyon oranının optimizasyonu sürecinde elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının %DH analizi için tasarım parametrelerinin ana etkilerinin değerlendirilmesi .....	80
Şekil 4.4: US 1-US 2 muamele süreleri, Alkalaz- Flavourzyme konsantrasyonları ve ultrafiltrasyon işleminde gerçekleşen hacimsel konsantrasyon oranının optimizasyonu sürecinde elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının DPPH süpürme aktivitesi için tasarım parametrelerinin ana etkilerinin değerlendirilmesi .....	86
Şekil 4.5: US 1-US 2 muamele süreleri, Alkalaz- Flavourzyme konsantrasyonları ve ultrafiltrasyon işleminde gerçekleşen hacimsel konsantrasyon oranının optimizasyonu sürecinde elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının TFİ değeri için tasarım parametrelerinin ana etkilerinin değerlendirilmesi	91
Şekil 4.6: Taguchi analizi sonucu elde edilen optimum faktör seviyelerine göre üretilen optimize ruşeym protein hidrolizatları ve hidrolizatların etüvde konsantre (45°C, 72 saat, %80 Flap açıklığı) edilmesi sonucu elde edilen örnek .....	95
Şekil 4.7: Ruşeym protein hidrolizatlarının eldesinde ve sonrasında yürütülen çalışmaların akım şeması .....	103

## KISALTMALAR LİSTESİ

m	: Mili
$\mu$	: Mikro
n	: Nano
g	: Gram
l	: Litre
Da	: Dalton
M	: Molar
N	: Normal
U	: Ünite
AU	: Alcalase Ünitesi
pH	: Hidrojen İyonu Gücü (Power of Hydrogen)
AOAC	: Amerikan Resmi Analitik Kimyacılar Birliği (Association of Official Analytical Chemists)
vb.	: ve benzeri
vd.	: ve diğerleri
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı (Revolutions Per Minute)
xg	: Yerçekimi İvmesi

# BİRİNCİ BÖLÜM

## GİRİŞ

Günümüzde artan global nüfus besin yetersizliği sorununu da beraberinde getirmiştir. Buna ek olarak kentleşmeyle birlikte tarım arazilerinin azalması da besin yetersizliğini arttıracak faktörler arasında yer almaktadır. Bu durumlar göz önüne alındığında kaynakların daha dikkatli kullanımı, sürdürülebilir bir sistem için atık veya yan ürünlerin değerlendirilmesi kritik önem taşımaktadır. Bu duruma örnek olarak, dünya genelinde temel bir tahıl olan buğdayın işlenmesi sırasında kepek ve ruşeym kısmı uzaklaştırılarak yalnızca endosperm kısmının tüketilmesi verilebilmektedir. Buğday unu üretiminde, ruşeyimde bulunan yüksek miktarda doymamış yağlar, oksijen ile reaksiyona girerek oksidatif reaksiyon ürünlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Unda oluşan oksidatif reaksiyon ürünleri, unun kullanıldığı ürünlerde acı tat vb. duyuşsal olarak istenmeyen sorunlara yol açmaktadır. Böylelikle buğday işleme endüstrilerinde, buğday tanesinden ruşeym kısmı ayrıştırılarak söz konusu risk ortadan kaldırılmaktadır (Eisenmenger vd., 2006).

FAO verilerine göre 2022 yılında dünya genelinde yaklaşık olarak 808 milyon ton buğday üretilmiştir. Buğday unu üretim tesislerinde, 1000 kg buğday işleme sonrası yaklaşık olarak 20 kg kadar ruşeym elde edilmektedir (Mızrak, 2021). Söz konusu üretim hacmi dikkate alındığında dünyada yıllık yaklaşık olarak 16 milyon ton ruşeym elde edilmektedir. Elde edilen ruşeym sıklıkla hayvan yemi olarak kullanılmaktadır (Ge vd., 2000). Buğday ruşeyminin besin kompozisyonu incelendiğinde magnezyum, çinko vb. minerallerce zengin bileşimi (toplam kül %4,6) ve yüksek lif içeriği (%16) ruşeymin zengin besin bileşiminin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Buna ek olarak buğday ruşeyminin nispeten yüksek protein içeriğine (%29,6) sahip olduğu bilinmektedir (Türkomp, 2025). Ruşeymin içerdiği söz konusu değerli bileşenler, ruşeymin hayvan yemi dışında kullanım potansiyeli olabileceğini göstermektedir. Örneğin ruşeym, ilaç ve kozmetik endüstrisinde (Barnes, 1983) uygulama alanı bulmuştur. Bunun yanı sıra ruşeymden proteoliz yoluyla ruşeym protein hidrolizatları elde edilerek ekonomik değeri artırılmış ürünler oluşturulabilmektedir (Claver ve Zhou, 2005; Zhou vd., 2013a).

Protein hidrolizatlarının sahip olduğu teknik ve fonksiyonel özellikler, onun çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanım alanına sahip olmasına olanak sağlamaktadır. Bu sektörlere örnek olarak tarım, gıda, tıbbi beslenme, hayvan beslenmesi verilebilmektedir. Aynı zamanda protein hidrolizatlarında bulunan serbest amino asidin, türü ve konsantrasyonu, söz konusu protein hidrolizatlarının gıda, tarım, hayvan beslenmesi vb. ürünlerindeki potansiyel kullanım alanlarını belirleyici bir faktör olarak öne çıkmaktadır. Literatürde protein hidrolizatlarının içerdiği serbest amino asitlerin bitki büyümesinde ve bitkinin dış etkenlere karşı korunmasında görev aldığı bildirilmiş (Sharma ve Dietz, 2006) ve bu amaç doğrultusunda bitkilerde kullanımına ilişkin çalışmalar yer almaktadır (Mpai vd., 2022; Ugolini vd., 2015). Buna ek olarak hayvan beslenmesinde, serbest amino asit içeriğine sahip protein hidrolizatlarının ilave edildiği ticari kedi ve köpek mamaları endüstriyel olarak üretilmektedir. Ayrıca, bu hayvan mamalarına serbest amino asit içeriğine sahip protein hidrolizatlarının ilavesinin, ürünlerin lezzet ve besin değerini arttırdığı ve bu mamaları tüketen hayvanlarda vücut kütle artışı gibi olumlu gelişmelerin gözlemlendiği rapor edilmiştir (Cave, 2006; Blaza vd., 1982).

Yürütülen araştırmalarda protein hidrolizatlarının eldesinde ultrasonik muamelenin, proteinlerin enzimatik hidrolizinde olumlu etki gösterdiği raporlanmıştır (Claver ve Zhou, 2005). Bu sebeple mevcut projede enzimatik hidroliz öncesi, ruşeym örneklerine ultrasonik muamele uygulanmıştır. Bu araştırmada hidroliz öncesi, ultrasonik muamele 1 (US 1, 26 kHz, 200 W) ve ultrasonik muamele 2 (US 2, 20 kHz, 400 W) olmak üzere yüksek yoğunluklu 2 farklı ultrasonik muamele kullanılmıştır.

Mevcut çalışmada ruşeym protein hidrolizatlarının eldesi ve karakterizasyonu incelenmiştir. Bu kapsamda endüstriyel olarak üretilmiş buğday ruşeymi US 1 ve US 2 işlemlerine tabi tutulmuştur. Daha sonra selülaz enzimi ile selülozları parçalanmıştır. Ardından Alkalaz ve Flavourzyme enzimleri kullanılarak, protein hidrolizatları üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada L25 Taguchi tasarımına göre üretilen ruşeym protein hidrolizatlarının başta serbest amino asit içeriği (%) olmak üzere DPPH süpürme aktivitesi, hidroliz derecesinin belirlenmesi ve toplam fenolik madde içeriği analizleri yapılmıştır. Serbest amino asit içeriği (%) birincil kriter seçilerek elde edilen veriler ile istatistiksel analiz yapılmıştır. İstatistiksel analize göre ruşeym protein hidrolizatlarının hazırlanmasında kullanılan faktörlerin seviyeleri optimize edilerek, elde edilen bulgulara göre optimize ruşeym protein hidrolizatları

hazırlanmıştır. Bir sonraki aşamada optimize ruşeym protein hidrolizatları konsantre edilmiştir. Optimize ruşeym protein hidrolizatları ve konsantresine DPPH süpürme aktivitesi, hidroliz derecesinin belirlenmesi, toplam fenolik madde içeriği, serbest amino asit içeriği, şeker, organik karbon, protein, Briks, kül analizleri yapılmıştır. Elde edilen analiz bulguları literatürdeki veriler ile kıyaslanmıştır.



# İKİNCİ BÖLÜM

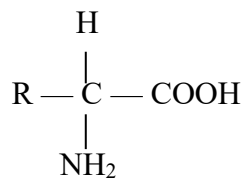
## LİTERATÜR BİLGİSİ

### 2.1. Proteinler

Protein Yunanca “*protós*” yani “birinci derece önem” anlamına gelen kelimedenden türetilmiştir (Cozzone, 2002). Vücutta pek çok yapısal ve işlevsel olarak görev alan makro besin maddesi, protein olarak adlandırılmaktadır (Loveday, 2019).

Bitkiler, karbondioksit, su, nitratlar, kükürtlü ve fosforlu organik bileşikleri hava ve topraktan alarak köklerde veya fotosentez ve ışık etkisiyle yapraklarda protein sentezlemektedir. Aynı zamanda proteinler her canlı için kendine özgü yapısal özellikler göstermektedir. Proteinler bitki, hayvan ve bütün canlı hücrelerinde bulunmaktadır. Proteinler biyolojik süreçlerin neredeyse tamamında görev alır ve bu süreçleri hızlandıran, katalizör görevi gören enzimler de protein yapısındadır (Demirci, 2016; Cozzone, 2002).

Proteinlerin yapı taşı amino asitlerdir. Amino asitler, ortadaki karbon atomuna karboksil grubu, amin grubu, H atomu ve amino asidin spesifik özelliğini belirleyecek “R Grubu” bağlanması sonucu oluşmaktadır. Yan zincir ya da radikal grup olarak da adlandırılan R grubu, farklı amino asitlerde farklı boyut, yük, şekil ve kimyasal bileşime sahiptir. Yan zincirin hidrofobik ya da hidrofilik oluşu proteinin fizikokimyasal davranışında ve üç boyutlu formda katlanmasında önemli bir etkidir. Doğada yaygınlıkla bulunan, proteinojenik olarak isimlendirilen 20 farklı amino asit çeşidi bulunmaktadır (Cozzone, 2002). Proteinojenik amino asitler dışında selenosistein, hidroksilizin, ornitin gibi 800 doğal amino asit çeşidi olduğu bildirilmiştir (Xue vd., 2018; Höning vd., 2017). Tablo 2.1’de proteinojenik amino asitlerin isimleri, kısaltmaları, moleküler ağırlığı ve pI değerleri verilmiştir. Amino asitlerin isimleri 3 harfli ve tek harfli kısaltma yapıları kullanılabılır. Amino aside bağlanan “R Grubu” değiştikçe amino asidin moleküler ağırlığı da değişmektedir. Amino asitlerin pI değerleri birbirlerinden farklıdır.



Amino asitte var olan “COOH”, grubu moleküle asidik özellik, “NH<sub>2</sub>” grubu ise bazik özellik kazandırmaktadır. Yapısında hem asidik hem de bazik grup bulundurması nedeniyle amino asitler *amfoter* özelliktedir. Bundan dolayı proteinler de amfoter özellik göstermektedir. Proteinlerin negatif ve pozitif yükleri eşit miktarda bulundurması durumunda, proteinler nötrlenir. Proteinlerin nötr pH değerine “izoelektrik nokta” (pI) denmektedir (Damodaran, 2000). Bir başka deyişle izoelektrik nokta, net elektrik yükü taşımayan molekül ya da yüzeyin sahip olduğu pH değeridir. Proteinin izoelektrik noktası bulunurken molekülün iyonize olabilen gruplarının pK<sub>a</sub> (Asit Ayrıştırma Sabiti) değerlerinin toplamının 2'ye bölünmesi sonucu elde edilmektedir (Cleaves, 2023).

Amino asitler birbirlerine peptit bağlarıyla bağlanarak farklı proteinleri oluşturmaktadır (Cozzone, 2002). Proteinler çeşitli sayı ve farklı sırayla amino asitlerin dizilip birleşmesiyle oluşan biyopolimerlerdir. Proteinler uzun zincirli ve amfoter özellikte olup makromolekül yapıdadır. Proteinlerin içerdiği atom ve atom gruplarının üç boyutlu yapıda konumlanmasına göre oluşan şekil, proteinin konformasyonu olarak adlandırılmaktadır. Proteinlerde *primer* (birincil), *sekonder* (ikincil), *tersiyer* (üçüncül) ve *kuarterner* (dördüncül) olmak üzere 4 farklı, 3 boyutlu yapı bulunmaktadır (Demirci, 2016).

**Tablo 2.1:** Amino asitlerin isim, kısaltma, moleküler ağırlık ve pI değerlerinin tablosu

Amino Asit	Kısaltma	Moleküler Ağırlığı (Da)	pI
Alanin	Ala, A	89,1	6,00
Arginin	Arg, R	174,2	10,76
Asparagin	Asn, N	132,1	5,41
Aspartik asit	Asp, D	133,1	2,77
Sistein	Cys, C	121,1	5,02
Glutamin	Gln, Q	146,1	3,24
Glutamik asit	Glu, E	147,1	5,65
Glisin	Gly, G	75,1	5,97
Histidin	His, H	155,2	7,59
İzolösin	Ile, I	131,2	6,02
Lösin	Leu, L	131,2	5,98
Lisin	Lys, K	146,2	9,82
Metionin	Met, M	149,2	5,74
Fenilalanin	Phe, F	165,2	5,48
Prolin	Pro, P	115,1	6,30
Serin	Ser, S	105,1	5,68
Treonin	Thr, T	119,1	5,64
Triptofan	Trp, W	204,2	5,89
Tirozin	Tyr, Y	181,2	5,66
Valin	Val, V	117,1	5,96

**Kaynak:** Fennema, (2008).

Proteinler kütlece ağırlık bazında %50-55 karbon, %20-23 oksijen, %12-19 azot, %6-7 hidrojen ve %0,2-3 kükürt elementlerinden oluşmaktadır (Damodaran, 2000). Karbonhidrat ve yağlar ile kıyaslandığında proteinlerde azot elementi daha fazla miktarda bulunmaktadır. Azot elementi, canlılar için temel bir elementtir ve nükleik asitlerin biyosentezi gibi önemli görevleri bulunmaktadır (Kuypers vd., 2018).

### 2.1.1. Proteinlerin Yapısal ve Tekno-Fonksiyonel Özellikleri

Ortamın pH değerine ve iyonik yoğunluğuna bağlı olarak proteinlerin yapısında anyonik ve katyonik yükler bulunmaktadır. Buna ek olarak proteinlerde bulunan hidrofobik gruplar, proteinlerin yüzey aktif özellik göstermesini sağlamaktadır (Niño ve Patino, 1998). Yüzey aktif maddeler molekül yapısında hidrofilik ve hidrofobik gruplara sahip bileşikler olarak isimlendirilmektedir. Yüzey aktif maddeler sahip

oldukları zıt kuvvetler sonucu buldukları ortamdaki polar ve apolar gruplar ile eşzamanlı olarak etkileşebilmektedir (Karsa ve Houston, 2006). Bu sayede proteinler emülsiyonlarda doğal emülgatör olarak kullanılmaktadır (Hoffmann ve Reger, 2014). Proteinler o/w (oil in water) emülsiyonlarda yağ damlacıklarına adsorbe olarak yüzey gerilimini düşürür ve homojenizasyonda yağ damlacıklarının daha kolay parçalanmasını sağlar. Proteinler homojenizasyonda parçalanmış olan damlacıkların tekrar birleşmesine engel olacak biçimde yüzeyleri kaplayarak belirli bir kalınlık sağlamaktadır. Böylelikle oluşan damlacıklar arasında elektrostatik itme sağlanmaktadır. Proteinler, yağ damlacıklarının etrafını sardığı için onların tekrar birleşmelerine engel olmaktadır (Walstra, 2002). Emülgatör olarak görev yapan proteinler elektrostatik itmenin korunumunu ve homojenizasyonun daha uzun süre kararlı kalmasını sağlamaktadır. Diğer emülgatörler bipolar yapıdayken proteinler çok kutuplu bir yapıya sahiptir (Hoffmann ve Reger, 2014).

Proteinler hidrofobik özellikleri ve hava-su ara yüzeyinde hızlı adsorpsiyona olanak tanıyan potansiyel konformasyonel yeniden düzenlemeleri sayesinde iyi köpürme niteliğine sahiptir. Proteinler gıdalarda köpük oluşumuna ve kararlılığına katkıda bulunmaktadır (Dickinson, 1992; Wilde ve Clark, 1996). Dondurma, kek, ekmek gibi pek çok gıdada köpük oluşumu kritik rol oynamaktadır (Davis vd., 2004). Bu amaçla proteinler gıdalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Beze gibi bazı gıdalarda köpük oluşumu, dondurmadan daha farklıdır. Bunun nedeni ısı etkisi ile birlikte bezedeki yumurta akının oluşturduğu köpük benzeri form pişerek sertleşir ve zamana bağlı olarak değişmez. Beze soğuma sonrası bir miktar genişleme ve çökme yaşasa da köpüğün oluşturduğu form nispeten korunmaktadır (Foegeding vd., 2006).

Proteinler sıklıkla küresel yapıdadır. Lizozim (Galkin ve Vekilov, 2000) gibi küresel proteinler iç kısımda hidrofobik kalıntıların bulunduğu, yüzeyde polar ve yüklü kalıntılara sahip proteinlerdir (McManus vd., 2016). Proteinler globüler yapı dışında fibriller ve sarmal yapı şeklinde de bulunabilir. Fibriller proteinler, uzun protein yapısına sahiptir ve genellikle demetler halinde birleşirler, fibriller proteine örnek olarak kolajen verilebilir (Jakubowski vd., 2022). Sarmal proteinler, proteinin yapısındaki amino asitlerin 3 boyutlu şekilde katlanarak oluşturduğu heliks yapılarıdır (Hartmann vd., 2016). Tropomiyozin proteininde sarmal protein yapısı bulunmaktadır (Doran vd., 2020). Fibriller ve sarmal yapılar birleşerek daha düşük protein

konsantrasyonlarında jel oluşturabilme kabiliyetine sahiptir. Fakat bazı globüler proteinler de jelleşebilmektedir (Gernandt ve Hansson, 2012).

Proteinlerin 3 boyutlu yapısı ısı denatürasyon sonucu değişmektedir. Proteinin yapısında gerçekleşen bu değişimler sıklıkla tek yönlü olup şartlar eski haline döndürüldüğünde dahi eski konformasyonel yapıya dönemez. Örneğin yumurtanın pişirilmesiyle değişen konformasyonel yapı, yumurtanın soğutulmasıyla eski formunu kazanamamaktadır (Ospinal-Jimenez ve Pozzo, 2012; Hoffmann ve Reger, 2014).

### **2.1.2. Proteinlerin İzolasyonu**

Protein içeriği yüksek olan gıdaların işlenmesiyle elde edilen ve protein konsantrasyonu yaklaşık %90 olan toz ürünlere protein izolatu denilmektedir (Garba ve Kaur, 2014). Protein konsantreleri protein izolatlarına oranla daha düşük miktarda protein içeriğine (%35-80) sahiptirler (Meganaharshini vd., 2023). Baklagiller gibi yüksek protein içeriğine sahip gıdalardan, protein izolatu elde edilerek ürünün katma değeri arttırmaktadır (Horax vd., 2004). Proteinin izolasyon yöntemi değiştikçe, protein izolatının % protein içeriği de bununla birlikte değişmektedir (Pastor-Cavada vd., 2010).

Protein izolasyonu amacıyla kullanılan yöntemlerden en yaygın olarak tercih edilen yöntem Alkali Ekstraksiyon- İzoelektrik Çöktürme (AE-İÇ) metodudur. Proteinler izoelektrik pH değerinin (örneğin alkali koşullar) üzerinde negatif yük, izoelektrik pH değerinin altında pozitif yük taşırlar. Alkali koşullarda artan yük yoğunluğu protein moleküllerinin birbirini itmesini, dolayısıyla hidrasyon sürecini ve proteinlerin çözünmesini kolaylaştırmaktadır. Bunun aksine izoelektrik noktada proteinlerin negatif ve pozitif yükleri yaklaşık olarak eşit durumdadır. Bunun sonucunda yükler arasında itme-çekme oluşturan elektrostatik etkileşimler ortadan kalkmaktadır. Sonuç olarak protein molekülleri bir araya gelerek çökme eğilimindedir. Proteinlerin izoelektrik noktaları birbirinden farklıdır. Proteinlerde pI değeri yüklü amino asitlerin (glutamat, aspartat, sistein, tirozin, histidin, lizin ve arginin) bileşimine ve dizisindeki farklılıklara göre değişmektedir (Pace vd., 2009). Genellikle proteinlerin izoelektrik pH değerinin 4,5 olduğu bilinmektedir (Nelson ve Routtenberg, 1985). İzoelektrik noktada proteinlerin çözünürlüğü oldukça azdır. Bunun aksine alkali pH düzeyinde çözünürlük maksimuma ulaşmaktadır. Birçok proteinin pH 11-12 arası değerlerde

asidik ortama nispeten çözünlüğü daha fazladır. Bu nedenle protein ekstraktı elde edilirken bu pH değerleri arasında proteinler çözümlenmektedir (Damodaran, 2000). AE-İÇ yönteminde hammadde sulu bir faza alınarak, alkali ortamda protein bileşenleri çözümlenir. Ardından çözümlenmeyen materyallerin uzaklaştırılması amacıyla santrifüj işlemi uygulanır. Santrifüj sonrası çözümlenmeyen katı kısım (pelet) atılır. Çözümlenen sıvı kısım (süpernatant) ise filtre kâğıdı ile süzülür, ardından izoelektrik pH değerine getirilerek protein molekülleri çöktürülür. Tekrar santrifüj uygulanır. Bu defa süpernatant protein dışı molekülleri içerirken, pelet proteinlerin toplanmasında kullanılmaktadır. Son olarak protein izolatu eldesi için pelet numunelerine kurutma işlemi uygulanır (Hadnağev vd., 2018).

Protein ekstraksiyonu için AE-İÇ yöntemi dışında başka yöntemler de mevcuttur. Örneğin, proteinin doğal halini koruyan miselizasyon yöntemi bu yöntemler arasında yer almaktadır (Murray vd., 1979). Miselizasyon yönteminde nötr ve tuzlu bir ortamda proteinin ekstraksiyonu amaçlanmaktadır. Bunun için öncelikle hammadde tuzlu suyun içerisinde birkaç saat karıştırılır. Ardından santrifüj ile suda çözümlenmeyen protein dışı materyaller uzaklaştırılır. Elde edilen süpernatant filtrelendikten sonra 72 saat diyaliz edilir. Bu şekilde tuz kalıntıları uzaklaştırılır. Elde edilen konsantre kurutulularak protein izolatu hazırlanır (Peng vd., 2024). Bu yöntem ile üretilen proteinlerin miselar (micellar) yapıda ve oldukça hidrofobik özellikte olduğu bildirilmiştir (Murray vd., 1979; Arntfield vd., 1985).

Proteinin gıdadan geri kazanım verimi, AE-İÇ metodunda miselizasyon yöntemine göre daha yüksektir. Yürütülen bir çalışmada kenevir tohumu unundan protein ekstraktı elde etmek için hem AE-İÇ hem de miselizasyon yöntemi kullanılmıştır. AE-İÇ metodu ile üretilen protein izolatının alkali koşullar nedeniyle kısmi olarak denatürasyona uğradığı bildirilmiştir. Sonuç olarak AE- İÇ yöntemi ile üretilen protein izolatının miselizasyon yöntemi ile üretilen protein izolatından su tutma kapasitesinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Hadnağev vd., 2018).

Protein izolasyonu esnasında bitkideki fenolik bileşikler pH değişimiyle birlikte birtakım tepkimelere girerek renk değişimine neden olmaktadır. Fenolik bileşikler bitkilerde ve bitki kaynaklı gıdalarda bulunan ikincil metabolitlerdir (Cheynier, 2012). AE-İÇ metodunda, alkali ekstraksiyonu esnasında fenolik bileşikler protein ile reaksiyona girmektedir. Yağlı tohum proteinlerinin sulu çözeltisinde, fenolik bileşikler

enzimatik ve enzimatik olmayan oksidasyona uğrarlar. Dolayısıyla yağlı tohumun fenolik asit profiline göre alkali ekstraksiyon esnasında fenolikler protein ile reaksiyona girer ve renk oluşturur. Kanola bitkisi için kinon fenolik asidi kahverengi-sarı renk verirken, ay çekirdeği bitkisinde klorojenik asit fenolik asidi yeşil renk vermektedir. Ardından tepkime ürünleri proteinler ile izoelektrik noktada birlikte çökerler. Böylelikle elde edilen protein izolatu yağlı tohumda bulunan fenolik asidin rengini almaktadır ve bu renk yıkanıp ayrıştırılamaz durumdadır (Sosulski, 1979; Sosulski ve Bakal, 1969; Xu ve Diosady, 2002). AE-İÇ metodunda proteinle birlikte fenolik bileşikler de ekstrakte edildiği için miselizasyon yöntemi ile elde edilen protein izolatından daha koyu renkli olduğu rapor edilmiştir (Hadnağev vd., 2018).

### **2.1.3. Protein Hidrolizatlarının Hidroliz Yöntemleri ve Özellikleri**

Protein hidrolizatları enzimatik, kimyasal, çimlendirme (germination) ve fermantasyon yöntemleri kullanılarak elde edilmektedir. Ayrıca bu yöntemlerin birini kullanmak yerine birkaç yöntem kombine edilerek protein hidrolizi yapılabilmektedir. Bu yöntemlerin her birinin olumlu ve olumsuz yönleri bulunmaktadır (Corte vd., 2014). Kimyasal ve enzimatik yöntemlerin yanı sıra kullanılan mikrodalga (Dong vd., 2021), yüksek hidrostatik basınç (Iturmendi vd., 2020), ultrasonik muameleler (Yang vd., 2017a), ısı işlemler (Wang vd., 2021) gibi fiziksel yöntemlerin kullanımı proteinlerin hidrolizine katkı sağlamak ve protein hidrolizatlarının fonksiyonel özelliklerini geliştirmektedir.

Protein hidrolizinde fermantasyon geleneksel olarak kullanılan bir yöntemdir. Özellikle LAB (laktik asit bakterileri) hidrolizat üretiminde kullanılarak proteinlerin oligopeptitlere, serbest amino asitlere ve bazı biyoaktif peptitlere dönüşümü sağlanmaktadır (García-Cano vd., 2019). Ancak bu yöntemde proteoliz işleminin kontrol edilmesi nispeten güçtür. Bunun nedeni fermantasyonda kullanılan besin, şeker türü, oksijen içeriği, ortamın pH değeri, ortam sıcaklığı gibi parametrelerin kontrolünün sağlanmasının güçlüğüdür ve kontrolün sağlanmayışı verimin düşmesi gibi istenmeyen sonuçlar doğurmaktadır (Melini vd., 2019). Buna ek olarak geleneksel fermantasyon yönteminde tekrarlanabilir sonuçların alınmasının enzimatik vb. diğer yöntemlere kıyasla daha güç olduğu bildirilmiştir (Toldrá vd., 2018). Bunun yanında proteinlerin yanı sıra başka maddelerin parçalanması ve yeni ürünlerin açığa çıkması söz konusu olmaktadır. Ayrıca fermantasyon yoluyla proteolitik hidrolizde açığa çıkan

amino asitler, dekarboksilasyon prosesi ile biyojenik aminlere dönüşerek fermente ürünlerin tüketimi sonrasında mide bulantısı, baş ağrısı vb. olumsuz etkilere yol açmaktadır (Alvarez ve Moreno-Arribas, 2014; Hungerford, 2010).

Kimyasal hidrolizde protein molekülleri enzimatik hidrolize kıyasla daha yüksek oranda parçalanmaktadır. Örneğin Wisuthiphaet ve diğerlerinin (2015) yürüttüğü çalışmada balık proteinleri kullanılarak enzimatik ve kimyasal (asit) hidroliz yöntemleri karşılaştırılmıştır. Kimyasal hidroliz yöntemi kullanılarak elde edilen balık protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi değerleri %30-35 aralığında olduğu, enzimatik hidroliz yöntemi kullanılarak hazırlanan hidrolizatların hidroliz derecesi değerlerinin ise yaklaşık %20-24 aralığında olduğu raporlanmıştır. Kimyasal hidroliz, alkali hidroliz ve asit hidrolizi olmak üzere 2 temel kategoriye ayrılmaktadır. Asit hidrolizi işleminde kullanılan güçlü asitler, protein moleküllerinin parçalanması sonucu elde edilen arginin ve triptofan amino asitlerine zarar vermektedir (Corte vd., 2014).

Kimyasal hidrolizde kullanılan diğer bir yöntem ise alkali hidrolizdir. Alkali hidrolizde NaOH gibi bazik çözeltilerden yararlanılarak yüksek sıcaklıkta (145°C, 4-8 saat) peptit bağları parçalanmaktadır (Lucas ve Sotelo, 1980). Alkali hidroliz, proteinin parçalanması sonucu açığa çıkan amino asitlerden bazılarını (örneğin, serin, glutamin, arginin ve asparagin) tahrip etmektedir (Hou YongQing vd., 2017).

Amino asitler doğada L-formunda bulunmaktadır. Kimyasal hidroliz sırasında yüksek sıcaklık, asidik ve alkali koşullarda rasemizasyona uğrayarak D-amino asit formuna dönüşmektedir (Brückner vd., 1989; Wan ve Blomberg, 2000). Ancak L-amino asitlerden farklı olarak D-amino asitlerin, canlılarda birtakım olumsuz veya toksik etkiler gösterebileceği önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Friedman, 1999).

Tablo 2.2’de kimyasal ve enzimatik protein hidroliz yöntemleri karşılaştırılmıştır. Buna göre protein hidrolizatları hazırlanırken kimyasal protein hidroliz yöntemlerinin bazı amino asitlerin kaybı, kontrolün zor olması ve daha düşük biyolojik değerli ürünlerin ortaya çıkması gibi dezavantajlı yönleri bulunmaktadır (Abd El-Salam ve El-Shibiny, 2017). Tüm bunlar dikkate alındığında enzimatik protein hidroliz yöntemleri nispeten daha çok tercih edilmektedir. Mevcut çalışmada proteinlerin hidrolizi için enzimatik proteoliz uygulanmıştır. Bu kapsamda spesifik ticari enzimler (Alkalaz ve Flavourzyme) seçilerek proteinlerin etkin bir şekilde parçalanması amaçlanmıştır.

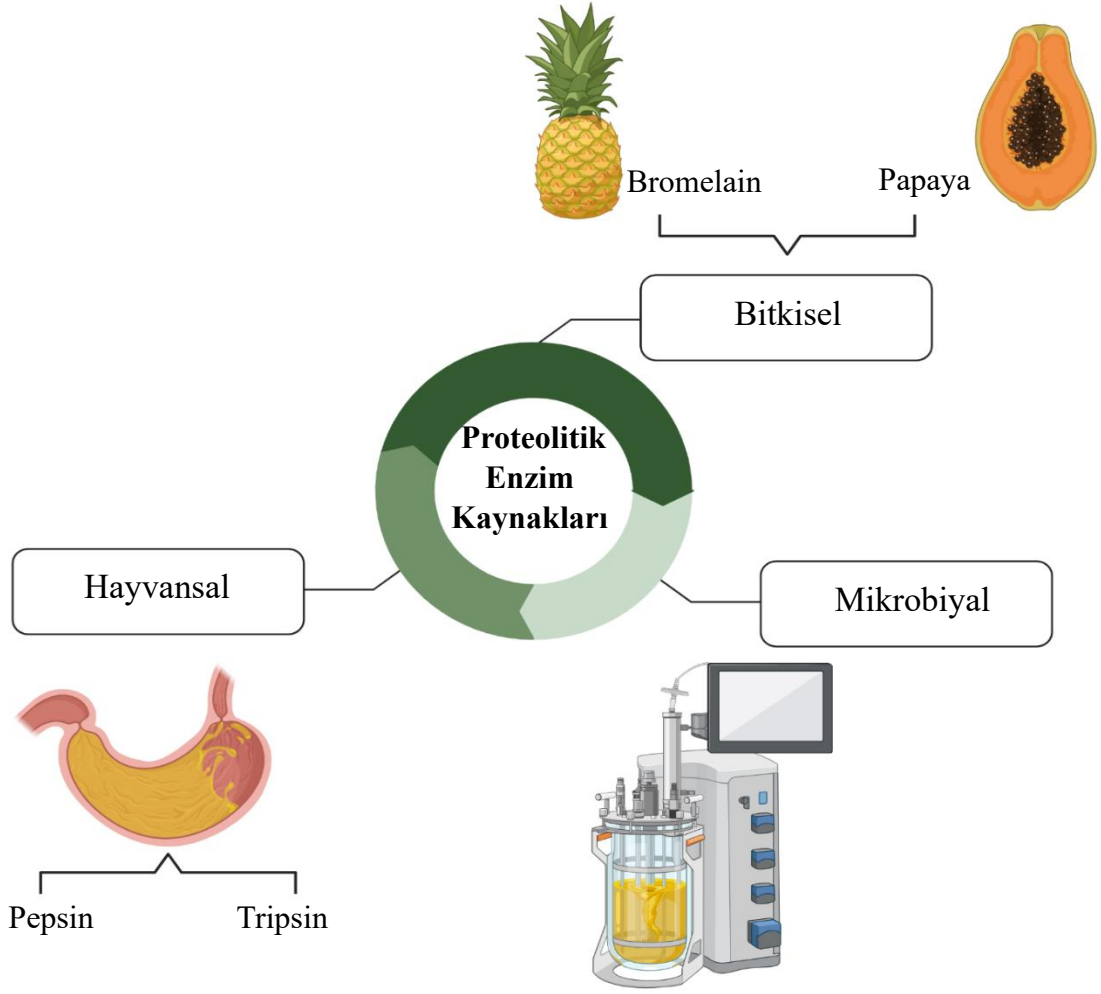
**Tablo 2.2:** Kimyasal protein hidroliz (alkali ve asidik hidroliz) yöntemleri ile enzimatik protein hidroliz yönteminin dezavantajlı ve avantajlı yönlerinin karşılaştırılması

<b>Kimyasal Protein Hidrolizi (Alkali ve Asidik Hidroliz)</b>	<b>Enzimatik Protein Hidrolizi</b>
Biyolojik kalitesi nispeten daha düşüktür	Yüksek biyolojik kaliteye sahiptir
Fazla kimyasal kullanımına sebep olur	Nispeten doğa dostu bir yöntemdir
Proteolizde tamamen amino asitlere ayrılır	Proteolizde farklı boyutta peptit fragmanları ve serbest amino asitler oluşmaktadır
Kontrolsüz bir hidroliz olur	Seçilen enzim türü ile belirli proteinlerin parçalanmasıyla ayırt edici rol oynar
Amino asitlerde rasemizasyon oluşturabilir	Amino asitlerde rasemizasyon oluşturmaz
Bazı amino asitlerin değişmesine bazı amino asitlerin kısmen yok olmasına neden olur	Amino asitlerde tahribata yol açmaz
Daha yavaş reaksiyon gerçekleşir	Daha hızlı reaksiyon gerçekleşir
Sert koşullarda gerçekleşerek, bazı olumsuz sonuçlar doğurur	Daha ılımlı koşullar altında gerçekleşerek proteinin yapısı daha iyi korunur

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Global enzim ürünlerinin %60'ını proteazlar oluşturmaktadır (Sandhya vd., 2005). Proteolitik enzimler Şekil 2.1'de gösterildiği gibi farklı kaynaklardan elde edilmektedir. Bunlar; hayvansal (tripsin, pepsin), bitkisel (bromelain, papain) ve mikrobiyal (alkalin proteaz, nötr proteaz) olarak üçe ayrılmaktadır (Wouters vd., 2016; Liu vd., 2022a). Bitkisel ve hayvansal kökenli proteolitik enzimlerin küresel talebi karşılayamaması nedeniyle mikrobiyal kökenli proteolitik enzimlere yönelik ilgi artmıştır. Günümüzde küresel enzim satışının %40' mikrobiyal kaynaklıdır. Buna ek olarak mikrobiyal proteazlar biyoteknolojik uygulamalarda, hayvansal ve bitkisel kökenli proteazlara göre talep edilen özellikleri daha iyi karşılamaktadır (Sandhya vd., 2005; Rao vd., 1998). Hayvansal proteazlar, domuz, inek, balık, tavuk vb. hayvanların vücutlarındaki mide, pankreas ve bağırsak gibi organ veya dokularından elde

edilmektedir (Gao vd., 2022; Venugopal, 2016). Örneğin polipeptit zincirinde lizin ve arginin kalıntılarının karboksil kısmını kesen serin proteaz sınıfına bazı tripsinler, domuz ve inek pankreas ve bağırsaklarından elde edilebilmektedir (Patil vd., 2023; Premetis ve Labrou, 2020). Bitkisel kaynaklı bromelain, aktinidin, fisin veya papain enzimleri sırasıyla ananas, kivi, incir ve papaya meyvelerinden üretilmiştir ve nutrasötik sektöründe bu enzimlerden yararlanılmaktadır (Patel vd., 2023).

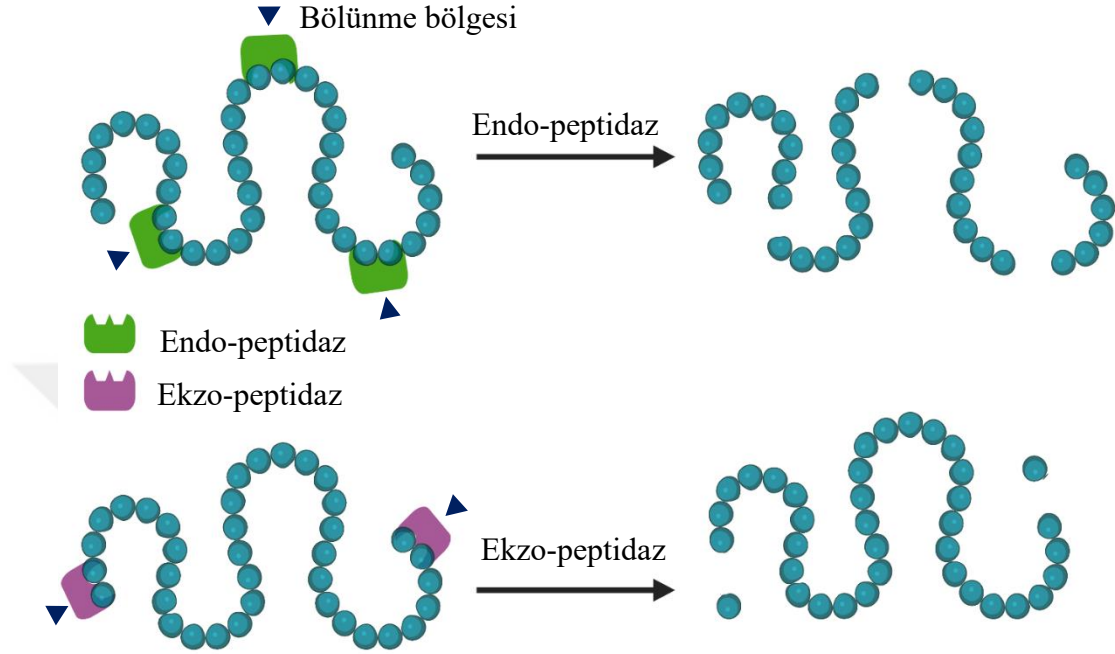


**Şekil 2.1:** Proteinlerin hidrolizinde kullanılan proteolitik enzimlerin elde edildiği hayvansal, mikrobiyal ve bitkisel kaynaklar

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Protein hidrolizinde kullanılan enzimler, polipeptit bağının kesme bölgesine göre endo-peptidaz ve ekzo-peptidaz olarak ikiye ayrılmaktadır. Şekil 2.2’de görüldüğü gibi endo-peptidazlar polipeptit zincirinde iç taraftaki peptit bağlarını keserek kısa zincirli peptitlerin oluşmasını sağlayan proteazlardır. Ekzo-peptidazlar ise polipeptit zincirinin uçlarındaki amino asitlerin bağlı olduğu peptit bağını keserek serbest amino

asitler ve uzun zincirli polipeptitler oluşturmaktadır (Song vd., 2023). Endo-peptidaz enzimlere kolejenaz, elastaz ve serin proteazları örnek olarak verilebilir (Guillaume ve Choubert, 2001). Karboksipeptidaz ve aminopeptidaz ise ekzo-peptidaz olarak görev yapmaktadır (Saborowski, 2015)



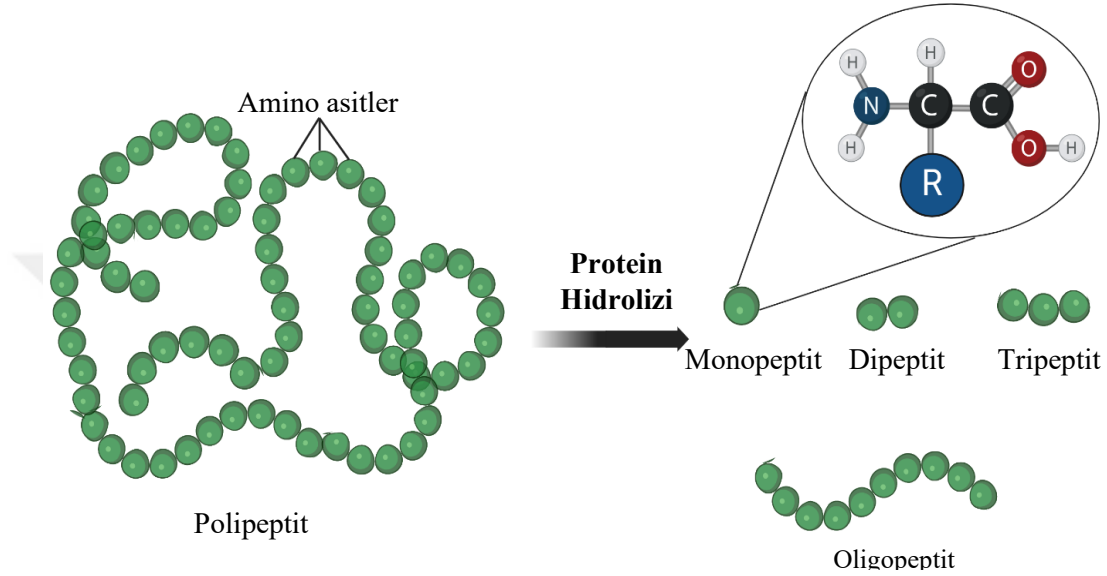
**Şekil 2.2:** Peptit zincirinin proteolitik hidrolizinde endo-peptidaz ve ekzo-peptidaz enzimleri ile proteolitik hidrolizinin gösterimi

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Proteinlerin enzimatik hidrolizini etkileyen faktörlerden bazıları, enzimin özgüllüğü, substrat ve enzim konsantrasyonu, pH, sıcaklık şeklinde sıralanabilir. Bu koşulların değişmesiyle birlikte oluşan peptit dispersiyonlarının özellikleri de değişmektedir (Cheung vd., 2024).

Şekil 2.3'te görüldüğü gibi uzun polipeptit zincirleri farklı protein hidroliz yöntemleri kullanılarak daha küçük peptit fragmanlarına ayrılmaktadır. Protein kaynaklarının kısmi hidrolize uğratılması ile elde edilen oligopeptitlerin, tripeptitlerin, dipeptitlerin ve amino asitlerin karışımına protein hidrolizatları denmektedir (Colla vd., 2017; Schaafsma, 2009, Corte vd., 2014).

Protein hidrolizatları, hayvansal (deri, iç organlar, tüyler) ve bitkisel kaynakların (küspe, bitki kabuğu, sapı vb.) uygun ön işlemlerden geçirilerek hidrolizi sonucu üretilmektedir (Colla vd., 2015). Bitkisel yan ve atık ürünlerin proteolitik hidrolizinde değerli bazı bileşikler açığa çıkmaktadır. Bu hem atık yönetimi hem de mali kazanç anlamında önemli bazı avantajlar sağlamaktadır (Tkaczewska vd., 2020; Xie vd., 2021).



**Şekil 2.3:** Proteinlerin hidrolizi sonrası mono-peptit, dipeptit, tripeptit ve oligopeptitlere dönüşümünün gösterimi

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Hidrolize protein ürünleri, proteinin sahip olmadığı bazı fonksiyonel özelliklere sahip olmaktadır. Örneğin tarım ürünlerine doğrudan protein verilmesi sonucunda, bitkinin proteini kullanım oranı düşük ve proteinin toprağa geçişi oldukça yavaştır. Ancak protein yerine protein hidrolizatları toprağa verildiğinde oligopeptitlerin, dipeptitlerin, özellikle serbest amino asitlerin bitkiye geçme hızı ve verimi oldukça yüksektir. Başka bir örnek olarak alerjik etkileri olan bir protein, uygun enzimler ile muamelesi sonrası alerjen etkileri azaltılmış (hipoalerjenik) protein hidrolizatları elde edilebilir (Maldonado vd., 1998). Protein hidrolize olduğunda gıda endüstrisinde kullanım potansiyeli ve fonksiyonelliği artabilmektedir.

Literatürde bulunan bir çalışmada  $\beta$ -laktoglobulin ile zenginleştirilmiş peynir altı suyu Corolase PP®, thermolizin enzimleri kullanılarak hidroliz edilmiştir. Bu çalışma ile elde edilen protein hidrolizatlarının BHA'ya (Bütillenmiş hidroksianizol) eşdeğer bir

antioksidan etki gösterdiği raporlanmıştır. Aynı zamanda peynir altı suyunun güvenli gıda olarak kabul edilmesi ve kullanımında sınır bulunmaması nedeni ile peynir altı suyu protein hidrolizatlarının endüstriyel gıda ürünlerinde doğal antioksidan olarak kullanım potansiyeli bulunmaktadır (del Mar Contreras vd., 2011).

Proteinlerin hidrolizini tanımlamak için genellikle hidroliz derecesi incelenmektedir (Silvestre, 1997). Hidroliz derecesi (DH, Degree Hydrolysis), proteinlerin parçalanma işlemi sonrası hidrolize olarak kopan peptit bağlarının % oranını vermektedir (Butré vd., 2014) ve %DH olarak ifade edilmektedir. Spesifik peptit bağlarının proteolitik enzimler ile parçalanmasıyla elde edilen protein hidrolizatlarının gıda endüstrisinde emülsifiyer olarak kullanımı oldukça yaygındır (Kristinsson ve Rasco, 2000; Mullally vd., 1994).

Enzimatik hidrolizin proteinlerin alerjenik özelliğini azaltmak amacıyla kullanımı güvenli teknolojik uygulama olarak kabul edilmekte olup yaygın kullanımı mevcuttur. Hidroliz esnasında proteinin sahip olduğu peptit veya disülfür bağları kısmen kırılarak protein yapısının değişimine neden olmaktadır. Bunu takiben gıda proteinin alerjen özelliği kısmen azalmakta veya tamamen ortadan kalkmaktadır (Zhou vd., 2016). Proteinlerin doğal yapılarının korunumu için disülfür bağları büyük önem taşımaktadır (Thornton, 1981; Creighton, 1988; Pace vd., 1988; Matsumura vd., 1989; Wedemeyer vd., 2000). Disülfür bağı, 2 sistein amino asit kalıntısının kükürt atomlarının yakın konumsal durumda olması sonucu oluşturduğu kovalent bağıdır (Bulleid ve Ellgaard, 2011; Sevier ve Kaiser, 2002). Disülfür bağı, proteinlerde yapıların konumunun belirlenmesi ve proteinin 3 boyutlu yapısının anlaşılmasında bilgi sağlamaktadır (Pitt vd., 2000). Enzimatik protein hidrolizinde hidroliz derecesi arttıkça disülfür bağlarının azaldığı rapor edilmiştir (Žilić vd., 2012). Protein hidrolizi esnasında disülfür bağları kopmaktadır ve proteinin üç boyutlu yapısı bozularak daha küçük peptit fragmanları oluşmaktadır.

#### **2.1.4. Protein Hidrolizatları Elde Etmek için Kullanılan Kaynaklar**

Günümüzde atıkların değerlendirilmesi önemli bir konudur. Bu kapsamda atık ve yan ürünlerden protein hidrolizatları elde edilerek bu maddelerin katma değeri yükseltilmiş olmaktadır. Üretilen protein hidrolizatları daha sonra farklı endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir (Zhang vd., 2024).

Hayvansal ve bitkisel kaynakların uygun muamelelerden sonra protein hidrolizatları üretiminde değerlendirilmesi söz konusu olabilmektedir. Tarımsal yan ürünler, gıda endüstrisinin bitkisel atık ve yan ürünleri bitki bazlı protein kaynaklarıdır. Hayvan bazlı protein kaynakları ise besi hayvanlarının derileri, atık et ürünleri, kümes hayvanları ve balık işleme tesisleri tarafından üretilen yan ürünlerdir (Colla vd., 2017; Etemadian vd., 2021).

Deri üretim tesislerinde yan ürün olarak yüksek miktarlarda ortaya çıkan kolajen ve balık üretim tesislerinin yan ürünleri proteince zengin kaynaklardır. Hayvansal kaynaklı protein hidrolizatları üretimi için özellikle bu kaynaklardan yararlanılmaktadır (Colla vd., 2015). Balık üretim endüstrisinde toplam işleme kapasitesinin %60'ı atık olarak kabul edilmektedir. Balık derileri, kırpıntıları, başları, yüzgeçleri, kemikleri, iç organları, pulları, kabuklu deniz ürünlerinin kabukları yan ürün olarak tanımlanmaktadır (Tacias-Pascacio vd., 2021). Sığır, domuz ve tavukların kesimi ve işlenmesi esnasında yaklaşık olarak %49, %44 ve %37 oranında yan ürün elde edilmektedir (Meeker, 2009). Büyük miktarda açığa çıkan söz konusu yan ürünler, doğru değerlendirilmediği takdirde ekonomik kayıplara ve çevre sorunlarına yol açabilmektedir. Atık olarak kabul edildiğinde imhası zor ve zahmetli olan bu maddeler, proteoliz ile protein hidrolizatlarına dönüştürülerek katma değerli ürünler elde edilebilir. Uygulanan bu dönüşüm hayvansal gıda işleme endüstrisi için avantajlar oluşturmaktadır.

Tarım endüstrisinde büyük miktarda yan ürün açığa çıkmaktadır. Tarım ürünlerinin kabuk, çekirdek, çiçek, kök ve tohum gibi çoğu durumda yenmeye uygun olmayan kısımları yan ürün olarak adlandırılmaktadır. Meyvelerin yaklaşık %10-50 arasındaki farklı oranlardaki kısmı tarımsal atık olarak tanımlanmaktadır (Hashempour-Baltork vd., 2022). Meyve atıklarından özellikle meyve kabuğundan değerli polifenol vb. maddeler elde edilerek değerlendirilebilir ancak atıkların tümü değerlendirilememektedir. Örneğin sıcaklık (30-85°C) ile meyve atıklarından polifenol, pektin gibi değerli bileşenlerin elde edilmesinde düşük verim ile gerçekleşmektedir (%2 çarkıfelek meyvesi kabuğu, %26 limon kabuğu) (Lucarini vd., 2021).

### 2.1.5. Ultrasonun Protein Hidrolizatları Oluşturmada Rolü

Enzimatik parçalanma verimliliğini arttırmaya yönelik çeşitli teknikler bulunmaktadır. Bu teknikler arasında, kimyasal işlem gerektirmemesi ve çevre dostu bir yaklaşım sunması ve nispeten düşük maliyeti nedeniyle ultrasonik muamele öne çıkan yöntemlerden biri olmaktadır (Wang vd., 2018b; Yao vd., 2020; Firouz vd., 2019).

Yirmi kHz'den büyük ses dalgaları, ultrasonik ses dalgaları olarak tanımlanmaktadır (Dolatowski vd., 2007). Ultrason teknolojisi düşük yoğunluklu (yüksek frekanslı) ultrason ve yüksek yoğunluklu (düşük frekanslı) ultrason şeklinde 2 temel kategoriye ayrılmaktadır. Düşük yoğunluklu ultrason 100 kHz ila 1 MHz aralığında frekansa sahip ultrason olarak tanımlanmaktadır (Hu vd., 2013a). Ultrason, sıvının içinde çözünen maddelerin kütle transferini ve konveksiyonunu kolaylaştırarak karışımın çözünürlüğünü arttırmaktadır (Pilli vd., 2011). Ultrason uygulaması gıda proteinlerinin fonksiyonel özelliklerini ve besleyici unsurlarını geliştirmede kullanılmaktadır (Zhou vd., 2013a). Yüksek yoğunluklu ultrason düşük yoğunluklu ultrasonun aksine hücre yapılarına zarar vermektedir (Pitt ve Ross, 2003). Bu sebeple gıda endüstrisinde süt ürünlerinde (Marchesini vd., 2015), meyve suları gibi mikrobiyolojik riskin yüksek olduğu sıvı gıdalarda mikrobiyal inaktivasyon amacıyla uygulanmaktadır (Santhirasegaram vd., 2013). Düşük yoğunluklu ultrason hücre yapılarına zarar vermeden gıdanın fiziksel ve kimyasal özelliklerini etkilemektedir (Chávez-Martínez vd., 2020). Örneğin peynir üretim aşamalarında peynirde gelişen reolojik değişimleri, olgunlaşmayı, doku ve kalite parametrelerinin gelişimini belirlemede düşük yoğunluklu ultrasondan yararlanılmıştır (Lee vd., 1992; Li vd., 2002; Benedito vd., 2006). Peynirin olgunlaşma aşamasında düşük yoğunluklu ultrason ile ultrasonik hız ölçülmüş ve olgunlaşmayla birlikte ultrasonik hızın arttığı belirlenmiştir (Benedito vd., 2000).

Proteinlerin sahip olduğu *tersiyer* ve *sekonder* yapılar, protein hidrolizinde verimi etkilemektedir (Li vd., 2018). Ultrasonik muamele ile kaviteasyon ve mekanik etkiler meydana gelirken bunun sonucu olarak bu etkiler proteinin, konformasyonunu değiştirebilir ve üçüncül ve dördüncül yapılarını tahrip edebilir. Bunun sonucunda proteoliz daha kolay ve hızlı şekilde gerçekleşebilmektedir (Ashraf vd., 2020). Yürütülen bir çalışmada ultrasonik muamelenin yapıldığı yumurta akı protein hidrolizatının ultrasonik muamele uygulanmayan kontrol örneğine kıyasla reaksiyon hızı sabitinin 4 kat arttığı ve bu artışın DH değerini %3,5 arttırdığı bildirilmiştir

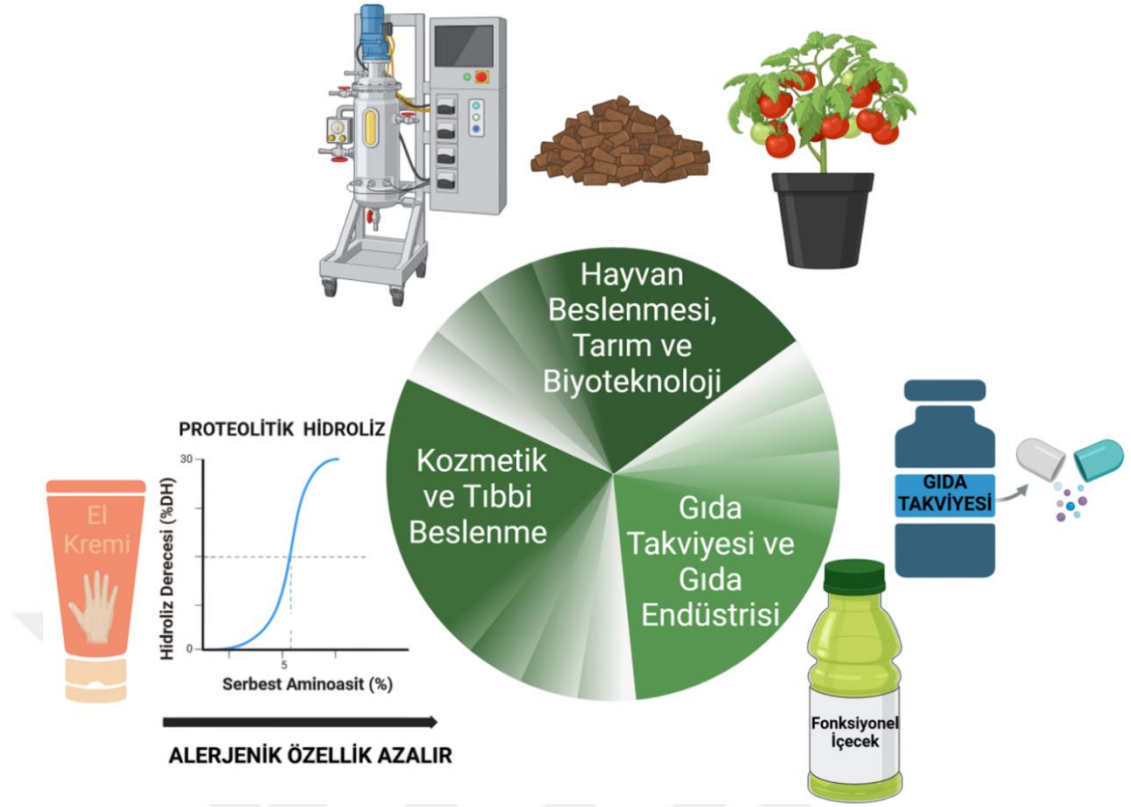
(Jovanović vd., 2016). Ayrıca ultrason herhangi bir kimyasal işleme gerek duymadan uygulanan yeşil bir teknoloji olması nedeniyle hidroliz öncesi kullanımı oldukça avantajlıdır (Yao vd., 2020).

Ultrason protein modifikasyonunda oldukça etkili bir yöntemdir. Literatürde yüksek yoğunluklu ultrason kullanımının proteinin konformasyon yapısında birtakım açılmalara neden olduğu belirtilmiştir. Dolayısıyla ultrasonik ön işlemlerin, protein yapısında meydana getirdiği değişiklikler nedeniyle proteoliz etkinliğine katkıda bulunduğu mevcut çalışmalarla kanıtlanmıştır (Gülseren vd., 2007; Güzey vd., 2006; Dong vd., 2021; Habinshuti vd., 2021).

Mevcut araştırmada ultrason uygulamasıyla birlikte proteinlerin kısmen açıldığı ve hidrofobik grupların açığa çıktığı rapor edilmiştir. Bu grupların açığa çıkmasıyla birlikte protein zinciri, enzimlere karşı daha reaktif bir hale gelmektedir. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) analizi sonuçlarına göre ultrasonik uygulamalar, pirinç proteininin mikro yapısında değişimlere neden olduğu bilinmektedir (Yang vd., 2017a). Vidal ve diğerlerinin (2018) yürüttüğü çalışmada farklı kolajen türlerine pepsin ile enzimatik hidroliz uygulamasından önce ultrason muamelesi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ultrason uygulamasının hidrolizatlarda %DH değerini arttırdığı rapor edilmiştir.

#### **2.1.6. Protein Hidrolizatlarının Kullanım Alanları**

Protein hidrolizatları endüstriyel uygulamalarda çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. Farklı endüstrilerde protein hidrolizatlarının fonksiyonel ve işlevsel özelliklerinden yararlanılmaktadır. Şekil 2.4'te görüldüğü gibi tarım, hayvan beslenmesi, biyoteknoloji, gıda, gıda takviyeleri, kozmetik ve tıbbi beslenme alanlarında protein hidrolizatları sıklıkla kullanılmaktadır. Protein hidrolizatlarının farklı alanlarda kullanım potansiyelinin bulunmasıyla birlikte protein hidrolizatları ile ilgili yapılan çalışmalar artmaktadır. Aynı zamanda protein hidrolizatlarının eldesinde yan ürünlerin kullanımı sürdürülebilirlik ve geri dönüşüm için önemlidir.



**Şekil 2.4:** Protein hidrolizatlarının farklı sektörlerde kullanımı

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

### 2.1.6.1 Protein Hidrolizatlarının Tarımda Kullanımı

Tarımsal ürünlerin üretiminde ve tarımın kalitesinin korunmasında sorunlar yaşanması, küresel iklim değişikliğinin önemli sonuçlarından biridir (Sachdev vd., 2021). Küresel iklim değişikliği, bitkilerde abiyotik stres olarak isimlendirilen tuzluluk, kuraklık, aşırı sıcaklık ve toprakta besin öğelerinin yetersizliği gibi faktörlerin artışına önemli oranda katkı sağlamaktadır (Chaudhry ve Sidhu, 2022). Küresel iklim değişikliğinin yanı sıra, tarımda mahsul verimini arttırmak amacıyla gereğinden fazla kullanılan inorganik ve organik gübreler, sucul ekosistemlerde nitrat ve fosfat kaybı gibi önemli bazı sorunları da beraberinde getirmektedir (Pizzeghello vd., 2011; Sebilo vd., 2013). Ayrıca fazlaca kullanılan inorganik- organik gübre çevre kirliliğini arttırmakta ve çevre sağlığını olumsuz olarak etkilemektedir (Ertani vd., 2014).

Dünya nüfusunun artışı ve tarımsal alanların tüm ülkelerde kısıtlı olması nedeniyle tarımsal verimliliğin artırılması gerekmektedir. Bu amaçla yüksek verime sahip tarım

ürünlerinin tarımda daha çok ekim uygulaması yetersiz kalmıştır. Daha kalıcı ve sürdürülebilir çözüm yolları gerekmektedir. Tarımsal çalışmalarda gübre ve suyun doğru kullanımı, aynı miktarda ekim ile daha verimli mahsul alımına olanak sağlamaktadır. Bu uygulamaların yanı sıra daha yenilikçi bir çözüm olarak “protein hidrolizatları” kullanımı, tarımsal verimi arttırmaktadır (Colla vd., 2017). Bu anlamda bitki büyümesini olumlu yönde teşvik eden, gübre kullanımını azaltan, düşük dozda bile etkili olan protein hidrolizatlarının tarımda kullanımı giderek artmaktadır (Ertani vd., 2014).

Protein hidrolizatları, tarımda bitkiler tarafından kolayca ayrıştırılıp kullanılabilir. Bu uygulama hem üretilen tarım ürününün kalitesini hem de verimini arttırmaktadır. Protein hidrolizatlarının üretilmesi ülke ekonomisine, çevreye katkı sağlayarak yan ve atık ürünlerin değerlendirilmesini sağlamıştır (Parrado vd., 2008; Tejada vd., 2016; Tejada vd., 2018). Bitkisel- hayvansal yan ve atık ürünler kullanılıp bu ürünlerin tarım için faydalı protein hidrolizatlarına dönüştürülmesi önemli bir “upcycling” örneğidir. Upcycling, kullanılmayan veya atık olarak tanımlanan malzeme veya nesnelerin yeniden onarılması, dönüştürülmesi ve katma değeri yüksek yeni bir ürün oluşturulması amacıyla değerlendirilmesidir (Singh vd., 2019). Tüklenen kaynaklar ve dünya nüfusunun hızlı artışı nedeniyle son zamanlarda sürdürülebilirlik ve upcycling işlemleri önem kazanmıştır (Farrant vd., 2010; Singh vd., 2019).

Protein hidrolizatlarının tarımda kullanımıyla birlikte, tarımsal faaliyetlerde kullanılan pestisit miktarı azaltılmıştır. Ayrıca protein hidrolizatları, bitkilerin dış ortamda maruz kaldığı durumlar konusunda hafifletici rol oynamaktadır (Claros Cuadrado vd., 2019; Del Buono, 2021; Zhang vd., 2024). Tarımda kullanılan protein hidrolizatları tohum çimlenmesini, kök oluşumunu, büyümeyi, verimi ve besin alımını arttırmaktadır. Tarımda protein hidrolizatları kullanımı, söz konusu olumlu sonuçları elde etmenin yanı sıra, besin kayıplarını azaltmakta ve erozyonla mücadelede rol oynamaktadır (Beare vd., 1994; Corte vd., 2014).

Bir çalışmada yarı kurak iklimi olan ve erozyonla mücadele eden bir bölgenin toprağına farklı protein hidrolizatları (hidrolize kümes hayvanı tüyü, pirinç kepeğı özütü, keçiboynuzu tohumu özütü ve yoğunlaştırılmış buğday damıtıcı enzimatik karışımı) 3 yıl süreyle uygulanmıştır. Uygulama sonrası toprağın enzimatik aktivitesi artmıştır. Ayrıca düşük moleküler ağırlığa sahip protein fragmanları toprak mikroorganizmaları tarafından kolayca emilerek topraktaki mikrobiyal gelişimi

önemli oranda arttırmıştır. Bunun yanı sıra toprağın erozyona karşı daha dirençli bir bitki örtüsü oluşturduğu sonucu rapor edilmiştir (Tejada vd., 2011). Tarımda toprağa verilen protein hidrolizatlarının yalnızca %5'i doğrudan kökler tarafından emilmektedir. Geri kalanı ise toprakta bulunan mikroorganizmalar tarafından metabolize edildikten sonra bitki tarafından kullanılmaktadır (Schiavon vd., 2008).

Protein hidrolizatlarında bulunan serbest amino asitler bitkilerin büyümesi ve dış etkenlere karşı korunmasında önemli bir rol üstlenmektedir. Protein hidrolizatlarında bulunan serbest amino asitler bitki tarafından kökleri, yaprakları vasıtasıyla kullanılmaktadır. Protein hidrolizatlarının % serbest amino asit değeri bitki gelişimi için önemli bir husustur. Amino asitler metal şelatlayıcı etki göstererek bitkilerde ağır metal toksisitesinin azaltılmasına yardımcı olmaktadır (Sharma ve Dietz, 2006). Buna ek olarak arginin amino asidinin, bitkinin maruz kaldığı biyotik ve abiyotik stres koşulları esnasında bitkide azot taşınımı ve depolanmasında görev aldığı bildirilmiştir (Flores vd., 2008).

Sebze üretiminde bitkisel kökenli amino asit ve hidrolize protein ürünlerinin kullanımı son yıllarda önemli bir artış göstermektedir (Barneix ve Causin, 1996; Bulgari vd., 2019; Khan vd., 2019; Ottaiano vd., 2021; Paul vd., 2019; Shahrajabian vd., 2021).

Tarımsal etkinliğin verimini artırması amacıyla kullanılan protein hidrolizatları sıvı ekstrakt formda, toz ya da granül yapıda değerlendirilebilir (Colla vd., 2015). Gerçekleştirilen çalışmada farklı işlemlere tabi tutulan hayvan derisi ve kılından elde edilen protein hidrolizatları bitkiler üzerinde denenmiştir. Sonuçlara göre bitkilerde fitotoksik veya genotoksik etki görülmemesi hidrolize proteinlerin güvenli olduğunu doğrulamıştır (Corte vd., 2014).

Proteinlerin proteolitik enzimler vasıtasıyla parçalanması sonucu elde edilen protein hidrolizatlarında proteine bağlı fenolik asit grupları serbest kalmaktadır. Dolayısıyla protein hidrolizatlarında serbest amino asitlerin bitkiye sağladığı yararlar dışında fenolik asitler de bitkiler için avantaj oluşturmaktadır (Damodaran ve Parkin, 2017; Hasni vd., 2011). Fenolik asitler tarımda bitkilerin metabolizmasını teşvik edici rol oynamaktadır. Silva ve diğerlerinin (2021) yürüttüğü çalışmada zeytinyağı ve endofitik mantarlardan tirozol adı verilen fenolik bileşik ekstrakta edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre soya fasulyesi tohumuna tirozol uygulamasının aspartik asit

miktarını arttırdığı ve amino asit biyosentezini olumlu yönde etkilediği rapor edilmiştir.

Literatürde bitkisel protein hidrolizatları kullanılarak tarımsal verimliliğin artırılmasına yönelik örnekler bulunmaktadır. Çalışmalar bitkisel protein hidrolizatlarının kullanım potansiyelini ortaya koymaktadır. Bitkilerde protein hidrolizatlarının metabolizmayı olumlu yönde teşvik etme, uyarma ve mahsul performansında çevresel stres koşullarına karşı avantaj sağlama potansiyeli gibi görevleri bulunmaktadır. Söz konusu avantajlar dolayısıyla tarımda protein hidrolizatlarının kullanılması ile ilgili çalışmaların son dönemde hız kazandığı anlaşılmış ve bu alandaki ilginin arttığı gözlemlenmiştir (Parrado vd., 1991; Parrado vd., 2006; Parrado vd., 2007; Parrado vd., 2008; du Jardin, 2012).

#### **2.1.6.2. Protein Hidrolizatlarının Hayvan Beslenmesinde Kullanımı**

Serbest amino asitler ve peptitler acı bir tada sahip olabilmektedir (Cho vd., 2004). Peptitte yüksek oranda bulunan hidrofobik amino asitlerin hidrofilik amino asitlere kıyasla acı tat reseptörleriyle etkileşimi daha kolaydır. Bu durum peptitin acı tat eğiliminde olmasını sağlamaktadır. Buna ek olarak prolinin yapısına bağlı olarak acı tat reseptörleriyle etkileşime girme ve acı tat sunmaktadır (Wang ve Zhou, 2020; Tong vd., 2020). Böylelikle peptitlerin acılık hissi amino asitlerin bileşimi ve hidrofobik özelliği ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Adler-Nissen, 1986). Lösin insanlar tarafından acı olarak algılanan bir amino asittir. Fakat kediler için lösin önemli bir lezzet arttırıcıdır (Solms vd., 1965; Beauchamp vd., 1977). Ticari olarak satılan kedi ve köpek mamalarına protein hidrolizatları konulmaktadır. Bu şekilde hem lezzet ve hem de besin değeri arttırılmış hayvan mamaları elde edilmektedir (Cave, 2006). Avrupa Evcil Hayvan Maması Endüstrisi Federasyonu (FEDIAF), evcil hayvan mamaları açısından proteini; büyüme, kas bakımı, sindirim ve enerji üretimi için gerekli olan temel bir bileşen olarak tanımlamıştır (Gao vd., 2021). Tükettikleri besinler hayvanların davranışlarında önemli etkiye sahiptir (Bosch vd., 2007). Bu sebeple hayvan sahiplerinin evcil hayvanları için fonksiyonel hayvan mamalarına yönelik ilgisi büyüktür. Örneğin 2021 yılında fonksiyonel evcil hayvan maması pazarı büyüklüğü 2,19 milyar ABD doları iken yıllık yaklaşık tahmini olarak %8,5 büyüme

ile 2030 yılında 4,56 milyar ABD dolarına ulaşması öngörülmektedir (Straits Research, 2023).

Protein hidrolizatları içeren hayvan yemleri ticari olarak satılmaktadır. Şekil 2.5'te BioActio firması tarafından proteolitik tavuk protein hidrolizatlarının farklı hayvanlarda yem olarak tüketimi sonucu sağladığı avantajlar verilmektedir. Tavuk protein hidrolizatlarının %15 serbest amino asit içerdiği ve bu yönüyle kolay sindirilebilir bir hayvan yemi olduğu vurgulanmıştır. BioActio firması tarafından üretilen diğer bir yem çeşidi de tavuk tüyü protein hidrolizatlarıdır. Bu ürünler de su ürünleri yetiştiriciliğinde ve domuz beslenmesinde yem olarak kullanılmıştır.



**Şekil 2.5:** BioActio firması tarafından tavuk proteini hidrolizatlarından üretilen yemlerin karides, tilapya balığı, domuz, kedi ve köpekler tarafından tüketilmesi sonucunda bu hayvanlarda ortaya çıkacak biyolojik etkiler

**Kaynak:** BioActio firmasının resmî web sitesinden alınan bilgilerle oluşturulmuştur (<https://www.brfeedingredients.com/en/animal-nutrition/bioactio-health-performance/>)

Protein hidrolizatları hayvan yemi olarak değerlendirildiğinde hayvanlarda büyüme uyarıcı özellik göstermektedir (Gildberg ve Stenberg, 2001). Yem alımına bağlı olarak hayvanlarda büyüme uyarıcı özellik vücut kütle artışı, besin alımı gibi faktörlere bakılarak ölçülmektedir (Terler vd., 2022). Protein hidrolizatları suda yetişen canlılar için değerli bir yem olma potansiyeli taşımaktadır. Gildberg ve Stenberg tarafından (2001) gerçekleştirilen çalışmada karides işleme yan ürünleri kullanılarak protein hidrolizatları elde edilmiştir ve söz konusu protein hidrolizatlarının somon balıkları için önemli bir yem olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir. Protein hidrolizatları somonun yanı sıra diğer su ürünlerinin yetiştirilmesinde de kullanılmaktadır.

Loeffler ve diğerlerinin (2004) yürüttüğü çalışmada 63 kaşıntılı köpeğe 5,5 hafta ticari tavuk hidrolizatları ve mısır nişastası diyeti (Hill's Prescription Diet Canine z/d ULTRA Allergen-Free; Hill's Pet Nutrition) verilmiştir. Verilen diyetin köpeklerin %76,2'si için lezzetinin iyi veya mükemmel düzeyde ve gastrointestinal fonksiyonu üzerinde olumlu etki gösterdiği kabul edilmiştir. Deneme diyeti bırakılıp köpekler eski diyetlerine geri döndüğünde köpeklerin altısında (6/63) olumsuz gastrointestinal belirtiler görüldüğü rapor edilmiştir.

Protein hidrolizatlarının hayvan yemi olarak değerlendirilmesi sonucu hayvanlar için gastrointestinal fonksiyonu olumlu yönde etkileyen alternatif mamalar üretilmiş olmaktadır. Ayrıca tavuk proteini tüyü gibi atık veya yan ürünlerin katma değeri yüksek yeni bir ürün olarak değerlendirilmesi de sağlanmaktadır. Hem ekonomik hem de çevresel faktörler düşünüldüğünde bu yöntemin uygulanabilirliği artmaktadır.

### **2.1.6.3. Protein Hidrolizatlarının Gıda Takviyesi Olarak Kullanımı**

Gıda takviyesi, normal beslenmeyi desteklemek amacıyla; vitamin, mineral, protein, karbonhidrat, lif, yağ asidi ve amino asit gibi besin öğelerinin ya da besleyici ya da fizyolojik etkisi bulunan bitkisel, hayvansal veya diğer kaynaklı maddelerin; yoğunlaştırılmış ya da ekstrakt hâllerinin; kapsül, tablet, pastil ve benzeri formlarda üretilerek, günlük alım dozu belirlenmiş şekilde pazarlanan ürünlerdir (AB düzenlemesi (Direktif 2002/46/EC)). Dünya genelinde yüksek kaliteli proteine sınırlı erişim nedeniyle protein ihtiyacını karşılamak ve vücudu fizyolojik açıdan desteklemek amacıyla protein hidrolizatları gıda takviyesi olarak vücuda

alınabilmektedir (Dale vd., 2018). Böylelikle doğrudan protein alımına göre protein hidrolizatlarının gıda takviyesi olarak alınması bazı avantajlar sunmaktadır.

Kalsiyum insanlar için gerekli bir mineraldir. Diyet Referans Alımlarının Bilimsel Değerlendirmesi Daimî Komitesi (1997) yetişkinler tarafından (19-50 yaş arası) günlük olarak 1000 mg kalsiyum alımı önerilmektedir. Gıda takviyesi olarak kalsiyum karbonat kullanımı şişkinlik ve gaz gibi olumsuz bağırsak hareketlerine yol açmaktadır. Kalsiyum laktat ve kalsiyum glukonat gibi takviyelerin biyoyararlanımı düşük seviyededir. Amino asit-kalsiyum kompleksinin gıda takviyesi olarak kullanımında diğer kalsiyum gıda takviyelerine göre stabilite ve biyoyararlanım açısından nispeten daha avantajlı olduğu kanıtlanmıştır (Rosado vd., 1993; Wang vd., 2018a). Buna ek olarak amino asitlerin kalsiyum metali ile oluşturduğu şelatın nispeten kararlı bir yapıda olduğu ve kullanılabilirliğinin arttığı raporlanmıştır (Ghasemi vd., 2013). Canlıların vücudunda, dışarıdan alınan kalsiyum iyonunun emilmesinin nispeten zor olduğu ve bu sebeple hücrelere kalsiyum taşımını kolaylaştırmak için kalsiyum şelat formunda vücuda alınması gerekmektedir (Lin ve Aarts, 2012; Peng vd., 2017). Bir çalışmada buğday ruşeymi protein hidrolizatlarından kalsiyum şelat oluşturan peptitler elde edilmiştir. Buğday ruşeymi proteininin biyoaktif peptit üretiminde umut vaat eden bir bitkisel protein kaynağı olduğu rapor edilmiştir (Wang vd., 2018a).

İnsan metabolizmasında Anjiyotensin I-dönüştürücü enzim (ACE, Angiotensin Converting Enzyme) hipertansif rol oynamaktadır (Cushman vd., 1982). Hipertansiyon tedavisinde kullanılan Kaptopril gibi ACE inhibitörleri öksürük, tat kaybı, böbrek yetmezliği gibi istenmeyen yan etkiler meydana getirmektedir (Kapel vd., 2006). Antihipertansif ilaçlara nispetle daha ekonomik ve güvenli bir yöntem olarak ACE inhibitörü peptitlerin, antihipertansif etki gösterebildiği bilinmektedir (Jia vd., 2010). Matsui ve diğerlerinin (2000) yürüttüğü araştırmada buğday ruşeymi enzimatik hidrolizatlarından birçok ACE inhibitör peptitin izole edildiği bildirilmiştir. Bu bağlamda ilgili diğer çalışmada yağsız buğday ruşeymi protein hidrolizatlarına proteoliz esnasında uygulanan ultrason muamelesinin hidrolizi kolaylaştırdığı ve ACE inhibitör peptitlerin salınmasında avantaj sağladığı rapor edilmiştir (Jia vd., 2010).

Kolajen vücuttaki proteininin %30'unu oluşturmaktadır. Kolajenin vücutta kemiklere-cilde, sertlik ve bütünlük kazandırması gibi çok önemli görevleri mevcuttur. Eksikliği sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Bu nedenle gıda takviyesi olarak vücuda alınan

hidrolize kolajenle birlikte bu sağlık sorunlarının önlenabilir ya da geciktirilebilir olduğu düşünölmektedir. Hidrolize kolajen glisin ve prolin amino asitlerince zengin bir bileşime sahiptir. Bu amino asitler vücutta sindirilerek, kıkırdak veya ciltte birikerek vücudun stabilitesini koruma ve rejenerasyonunu sağlama anlamında önemli rol oynama potansiyeline sahiptir (Porfirio ve Fanaro, 2016; Lupu vd., 2020).

#### **2.1.6.4. Protein Hidrolizatlarının Kozmetik Sektöründe Kullanımı**

Protein hidrolizatları sahip olduğu fonksiyonel özellikler nedeniyle kozmetik endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır (Barba vd., 2008; Li vd., 2005). Kozmetik ürönlere eklenen protein hidrolizatları bu ürönlere film oluşturma, penetrasyon, parlaklık, nem tutma gibi birçok teknik fonksiyonellik kazandırmaktadır (Teglia vd., 1993; Challoner vd., 1997). Vücut ve saç bakım ürönlерinde kullanılan protein hidrolizatlarının saçların doğal yapısını korumada yardımcı olduğu rapor edilmiştir (Teglia ve Secchi, 1994; Förster vd.,1999).

Barba ve diğerleri tarafından (2008) yürütölen araştırmada bir dispersiyonda yünden elde edilen hidrolize keratin peptitleri ve yün lipitleri lipozomal enkapsüle edilerek kullanılmıştır. Gerçekleştirilen *in vivo* çalışmaların sonucunda, tedavi edilen bölgede hidrasyon ve elastikiyette belirgin bir artış olduğu, üröünün cilt bariyerini kuvvetlendirdiği rapor edilmiştir.

Bitki sekonder metabolitleri, bitkilerin büyüme döneminde üretilen, abiyotik strese karşı bitkiye direnç kazandıran bileşik sınıfidır. Bunlar fenolik asitler, flavanoidler, terpenoidler, steroidler ve alkaloidler olarak sınıflandırılabilir (Yang vd., 2018; Noman vd., 2020). Bitkisel kaynaklar kullanılarak elde edilen protein hidrolizatlarında söz konusu sekonder metabolitler de bulunmaktadır. Bitkisel kaynaklı protein hidrolizatlarının kozmetik, farmasötik sektörlerinde kullanımının nedenlerinden biridir. Protein ve fenolik bileşikler arasında kovalent ve kovalent olmayan bağlar bulunmaktadır. Proteinin enzimatik hidrolizi esnasında genellikle fenolik bileşikler protein kompleksinden ayrılarak serbest kalırlar. Dolayısıyla enzimatik protein hidrolizinden sonra fenolik bileşiklerin serbest kalmasıyla birlikte, hidrolizatların sahip olduğu fonksiyonel özellikler nihai ürönlерde açığa çıkmaktadır (Damodaran ve Parkin, 2017; Hasni vd., 2011).

Hidrolize kolajen gıda takviyesi olarak kullanımının dışında kozmetik sektöründe de kendisine önemli bir yer bulmuştur. Hidrolize kolajen kozmetik sektöründe cilt bakım ürünlerinde doğal nemlendirici işlevi görmektedir (Sionkowska vd., 2020). İnsanlarda yaşlanmayla birlikte vücutlarında azalan kolajenin ikame edilmesi amacıyla yaşlanma karşıtı kozmetik ürünlerinde hidrolize kolajen kullanılmaktadır (Alves vd., 2017). Amnuait ve diğerlerinin (2022) yürüttüğü çalışmada Asya levreği derisinden elde edilen hidrolize kolajen tozu kullanılarak serum elde edilmiştir. Serum doğrudan insan yüzünde denenmiştir. Serumun deneylerde yaşlanma karşıtı etki gösterdiği, cildi beyazlattığı ve akne azalmasına neden olduğu rapor edilmiştir. Kolajen, hidrolizi sonrası bünyesinde pek çok biyoaktif peptit bulundurur. Bu nedenle hidrolize kolajen kullanımı doğrudan kolajen kullanılmasından daha etkili sonuçlar ortaya koymaktadır (Min vd., 2017).

#### **2.1.6.5. Protein Hidrolizatlarının Gıda Endüstrisinde Kullanımı**

Protein hidrolizatlarının gıdalarda kullanımı binlerce yıl öncesine dayanmaktadır. Günümüzde var olan soya sosunun atası hidrolize soya proteinlerinden elde edilmiştir (Shurtleff ve Aoyagi, 2012). Proteinler eklendikleri gıdalarda teknolojik olarak katkı sağlamanın yanı sıra doku, tat, renk ve diğer özellikler bakımından da gıda ürünlerinin özelliklerini etkilemektedir (Loveday, 2019). Protein hidrolizatları gıdalarda aroma verici olarak kullanılarak lezzeti arttırmada önemli bir rol üstlenmektedir. Özellikle raf ömrü kısa olan deniz ürünleri hidroliz edildikten sonra uygun işlemlerden geçirilerek deniz ürünü aroması elde edilmektedir. Bu aromalar sıklıkla kurutulmuş çorbalarda, soslarda ve atıştırmalıklarda doğal aroma verici olarak kullanılmaktadır (Shahidi, 2006; Silva vd., 2012). Lezzet dışında gıdalarda istenen önemli diğer bir özellik tekstürdür (Wilkinson vd., 2000). Özellikle yüksek proteinli barların raf ömrü boyunca çabuk sertleştiği ve tüketici tercihini olumsuz etkilediği belirtilmiştir (McMahon vd., 2009). Yüksek proteinli barlarda protein konsantrisi yerine protein hidrolizatları kullanılarak sertleşmenin önüne geçilmiştir (Li vd., 2008).

Protein hidrolizatlarının antimikrobiyal, immünomodülatör, antihipertansif, antioksidan, opioid, mineral bağlama vb. fizyolojik aktiviteleri olduğu rapor edilmiştir (Korhonen ve Pihlanto, 2003). Protein hidrolizatlarının sahip olduğu bu özellikler nedeniyle gıdaların raf ömrünü arttırmak ve gıda formülasyonlarının

zenginleştirilmesi amacıyla protein hidrolizatları kullanılabilir (Di Bernardini vd., 2011). Ek olarak emülsifiye edici aktivite, emülsiyon stabilitesini artırıcı rol oynama, köpürme kapasitesi, su tutma ve çözünürlük gibi fonksiyonel özellikleri de bulunmaktadır (Ge vd., 2000).

Gıdaların dokusunda istenilen değişikliklerin meydana gelmesi amacıyla ve emülgatör olarak kullanılan sentetik polisorbattar (Hidrofilik) ve sorbitan esterleri (Hidrofobik) kanser riskini artırması gerekçesiyle kullanımı sınırlandırılmıştır (US-FDA 2003). Proteinler (Genellikle hidrofilik grupları içerirler), bu sentetik materyallerin doğal bir muadili olarak gıda dokusunun değiştirilmesinde ve emülgatör olarak kullanım potansiyeline sahiptir (Asaithambi vd., 2023). Protein hidrolizatları ve sıklıkla proteinler hem sağlıklı olmaları hem de güvenli gıda olarak atfedilmeleri sebebi ile gıdalarda emülgatör olarak kullanılmaktadır. Emülgatör olarak kullanılan protein gıda dokularında homojen bir görünüm, stabilite gibi avantajlar sağlamaktadır.

Enzimatik protein hidrolizi ile genellikle proteinlerin alerjen özellikleri azalır ve sindirimi kolaylaşır (Wouters vd., 2016). Protein hidrolizatlarında %DH, %serbest amino asit miktarı, kullanılan hidroliz tekniği, enzim türü, protein kaynağı, pH değıştikçe protein hidrolizatlarının da emülsifiye etme gibi pek çok özelliği de bununla birlikte değışmektedir (Chalamaiah vd., 2012; Ipsen vd., 2001; Jeewanthi vd., 2015). Gıdalara protein yerine protein hidrolizatları eklenmesiyle birlikte gıdaların fizikokimyasal pek çok özelliği etkilenmektedir (Schröder vd., 2017). Proteinler parçalanarak protein hidrolizatlarına dönüştüğünde, hidrolizatta bulunan peptitler proteinin sahip olmadığı yeni özellikler kazanarak nispeten daha fonksiyonel bir materyale dönüşebilmektedir. Protein hidrolizatlarının sahip olduğu antioksidatif aktivite, emülsifiye etme özelliği, su tutma kapasitesi, çözünürlüğü artırma gibi özellikleri sayesinde gıdalarda hidrolizat kullanımı artmıştır ve gelecekte de hidrolizat kullanımının artmaya devam edeceği öngörülmektedir (Ashaolu, 2020; Wu ve Chen, 2022).

#### **2.1.6.6. Protein Hidrolizatlarının Biyoteknoloji Alanında Kullanımı**

Protein hidrolizatları hem küçük ölçekli hem de endüstriyel ölçekli biyoteknoloji laboratuvarlarında bitkiler, hayvanlar, mikrobiyal canlılar için azot kaynağı olarak kullanılmaktadır. Azotun yanı sıra protein hidrolizatlarında var olan vitamin, mineral

ve bilinmeyen diğer besleyici unsurlar biyoteknolojik uygulamalarda kullanılarak üretim verimini olumlu yönde etkilemektedir (Pasupuleti ve Schie, 1998). Biyoteknolojinin ilk yıllarında yumurta albümini, kan, vücut sıvısı gibi doğrudan protein kaynakları kullanılırken sonraki çalışmalarda protein hidrolizatlarının azot kaynağı olarak daha etkin sonuçlar verdiği keşfedilmiştir (Peters vd., 1953; Pasupuleti ve Schie, 1998).

Aşılar, canlı organizmalardan (virüs, bakteri vb.) elde edilen biyolojik preparatlardır. Bu preparatlar konakçının bağışıklık sistemini, üretildikleri belirli bir patojene karşı bağışıklık sistemini uyararak hastalıklara karşı savunma sağlamaktadır (Endale vd., 2022). Aşı üretiminde genelde hastalığa sebep olan canlı organizma kontrol fermantasyon ortamında besiyeri kullanılarak üretilir ve sonrasında canlı organizmanın toksini etkisiz hale getirilerek (Örneğin tetanos toksini formalin ile etkisiz hale getirilmektedir) aşı üretilmektedir. Literatürde, kontrol fermantasyon ortamında besiyeri olarak protein hidrolizatlarının kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır (Demain vd., 2005). Özellikle hayvanlar tarafından kullanılacak bir aşının bulunmadığı hastalıklarda hayvansal protein hidrolizatlarının kullanımı deli dana hastalığı gibi bazı riskleri de beraberinde getirmektedir. Bu sebeple aşıların yapımında hayvansal protein hidrolizatlarının yerine bitkisel protein hidrolizatları daha fazla tercih edilmektedir (Demain vd., 2005; Fang vd., 2006).

Protein hidrolizatlarının yoğurdun asitlenme miktarını arttırdığı ve fermantasyon süresinin azalmasını sağladığı yürütülen çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca süte peptit ve amino asitlerin eklenmesiyle birlikte sütün içinde var olan probiyotik mikroorganizmaların canlı kalma süresini olumlu olarak etkilediği rapor edilmiştir (Sodini vd., 2002).

#### **2.1.6.7. Protein Hidrolizatlarının Tıbbi Beslenmede Kullanımı**

İnsan beslenmesinde tüketilebilen gıdaları yemesi durumunda olumsuz sonuçlara maruz kalabilen hasta bireyler için tasarlanmış, beslenme desteği sağlayan yiyecekler “tıbbi diyet” olarak isimlendirilmektedir (Clemente, 2000). Tıbbi diyetler özellikle fenilketonüri, kistik fibrozis, Crohn hastalığı, gıda alerjisi ve intoleransı gibi farklı hastalıkların tedavisine yönelik beslenme ihtiyacının sağlıklı bir şekilde karşılanması amacıyla oluşturulmuştur (Weaver vd., 1993). Protein hidrolizatlarının, yalnızca

serbest amino asitlerin oluşturulduğu tıbbi diyetlere göre önemli avantajları bulunmaktadır. Protein hidrolizatlarının içinde serbest amino asidin yanı sıra var olan kısa peptit zincirleri, yalnızca serbest amino asit bulunan karışımlardan daha hızlı amino asit emilimi göstermektedir (Siemensma vd., 1993). Bunun sebebi peptitlerin kendilerine özgü taşıma sistemlerinin bulunması ve peptitlerin serbest amino asitlere kıyasla daha az hipertonic olması şeklinde açıklanmaktadır (Silk vd., 1980; Adibi, 1989). Bu sebeple yalnızca serbest amino asitlerden oluşan karışımlar yerine protein hidrolizatlarının tıbbi diyet bileşeni olarak kullanılmasıyla daha etkin bir sonuç elde edilmektedir.

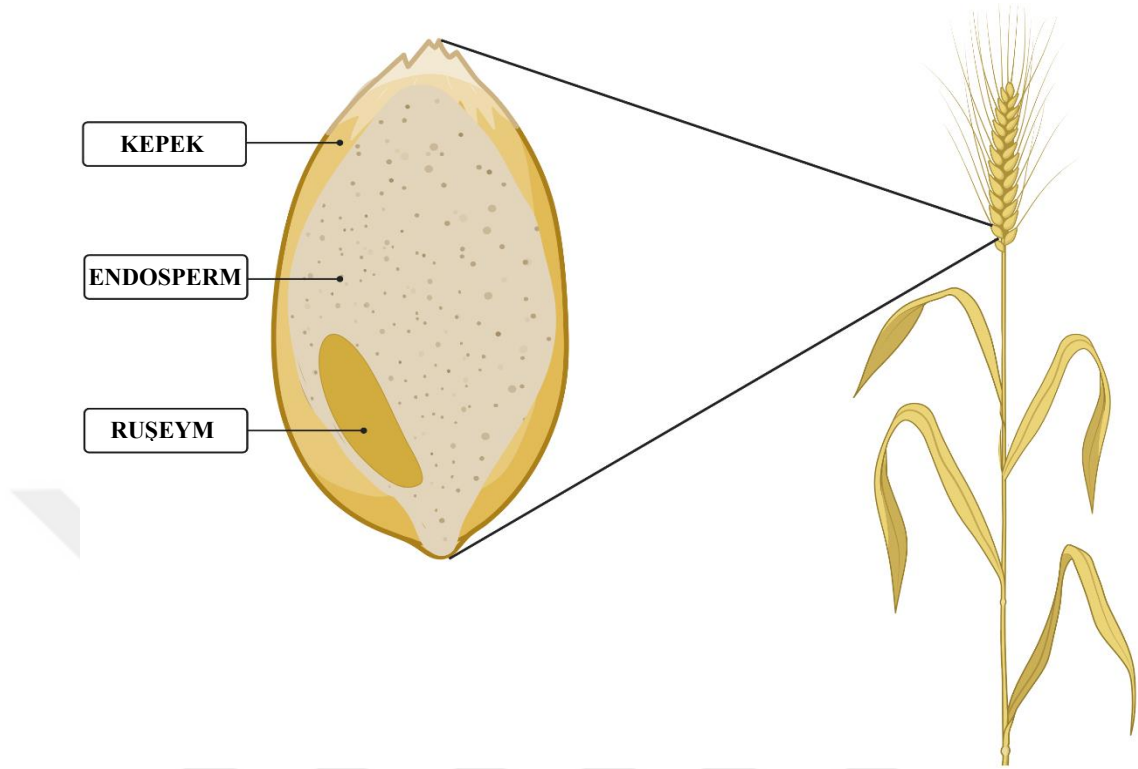
Bebeklerde anne sütünün en iyi alternatifi, inek sütü ile zenginleştirilen bebek mamalarıdır. Ancak bebeklerin yaklaşık %2-3'ünde, inek sütü alerjenik etki göstermektedir. İnek sütünde bulunan proteinler proteazlarla parçalanarak, inek sütü protein hidrolizatları elde edilmektedir. Bebekler inek sütü yerine inek sütü protein hidrolizatları ile beslendiğinde, ürünlerin alerjen etki göstermediği rapor edilmiştir (Sackesen vd., 2011; Kneepkens ve Meijer, 2009). Bebeklerin yanı sıra yetişkin bireylerde de bazı proteinlere karşı vücudun bağışıklık sistemi alerjik etki göstermektedir. Alerjik etki gösteren protein hidroliz edilerek yapısı bozulmakta ve elde edilen protein hidrolizatları, bağışıklık sisteminde alerjik reaksiyonun nispeten azaldığını bildirilmektedir (Cui vd., 2023).

## **2.2. Buğdayın Yapısı ve Dünya Geneline Buğday Üretim Kapasitesi**

Botanik olarak buğday, ot ailesine (Gramineae) aittir (Belderok, 2000). Buğday (*Triticum aestivum*) dünyanın birçok yerinde temel ürün olarak kabul edilmektedir. Aynı zamanda 2022 yılında dünyada en çok yetiştirilen üçüncü ürün olma niteliği taşımaktadır (FAO, 2022; <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>).

Şekil 2.6'da buğday tanesinin bölümleri gösterilmiştir. Olgun bir buğday tanesinin yaklaşık %83'ü endosperm, %14,5'i kepek ve %2,5'i ruşeymden (embriyo) oluşmaktadır (Mızrak, 2021). Endüstriyel olarak buğday işleme tesisinde buğdaydan elde edilen un, bütün buğday tanesini yaklaşık %73-77'si kadardır. Buğday unu ekstraksiyon verimi, kullanılan değirmene ve buğday çeşidine göre değişiklik göstermektedir (Elliott vd., 2002). Buğday ruşeyminde yüksek miktarda bulunan doymamış yağlar, oksidatif reaksiyona girmektedir. Oksidatif reaksiyon ürünlerinin

ekmek yapımında acı tat vb. etkileri olması nedeniyle ruşeym, ekme yapımında endosperm ve kepekten ayrıştırılmaktadır (Eisenmenger vd., 2006).



**Şekil 2.6:** Buğday tanesinin kepek, embriyo ve ruşeymden oluşan bölümlerinin gösterimi

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Kepek, buğdayın en dış kısmında yer alır ve yapısında yüksek oranda lif bulunmaktadır. Kepeğin çözünmeyen lif içeriği (%41,9) çözünen lif içeriğine (%2,1) göre oldukça yüksektir. Lif dışında antioksidan maddeler, demir, çinko, magnezyum minerallerince zengin bir yapıya sahiptir. Ayrıca bünyesinde bol miktarda B grubu vitaminleri barındırmaktadır (Mızrak, 2021).

Endosperm, tam bir buğdaydan kepek ve ruşeym kısmı ayrıldıktan sonra geriye kalan bölümdür (Mızrak, 2021). Buğday tanesinin öğütülmesi sonrası elde edilen beyaz un, nişastalı endospermdir. Yapısında yaklaşık olarak %80 nişasta ve %10 protein bulunmaktadır. Endospermde nişasta ve protein dışında mineraller, fitokimyasallar, az miktarda hücre duvarı bileşenleri bulunmaktadır (Shewry vd., 2013).

Ruşeym (Embriyo), buğday tanesinin bölümleri arasında besin değeri en yüksek olan kısımdır. Ruşeym, un üretimi esnasında ayrıştırılıp uzaklaştırılır (Mızrak, 2021).

Tablo 2.3'te buğdayın, buğday kepeğinin ve buğday ruşeyminin besin değerleri verilmiştir. Tablo 2.3'te sunulan veriler incelendiğinde buğday kepeğinin lif içeriği (%33,8), buğday (%12,7) ve ruşeymin lif içeriğine (%16) kıyasla oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Ruşeymin protein içeriği (%29,6) ile buğday (%11,3) ve buğday kepeğinin (%14,3) protein değerleri arasında yaklaşık 2 kata karşılık gelen farklılık söz konusudur. Kül değerleri açısından bileşenler kıyaslandığında ise buğday kepeği ve ruşeymin kül değerleri (sırasıyla %4,47 ve %4,55) benzerlik gösterirken, buğdayın kül (%1,5) kepek ve ruşeyme göre daha düşük seviyede olduğu görülmektedir. Mevcut çalışmada kullanılan ruşeym (%4 kül) ve Tablo 2.3'teki ruşeymin (%4,6) kül içeriklerinin benzer olduğu bildirilmiştir. Mevcut çalışmada kullanılan ruşeymin protein içeriğinin (%21,5), Tablo 2.3'te sunulan ruşeymin protein içeriğinden daha düşük olduğu (%29,6) belirtilmektedir. Ruşeym örneklerindeki protein bileşimi farklılığın sebebi buğdayın yetiştiği iklim, coğrafi koşullar, büyüme koşullarının farklılığı (sulama sayısı, miktarı vb.) olarak sıralanabilmektedir. Ayrıca, buğdayların nem düzeylerindeki farklılıklar, protein miktarındaki değişimlere etki eden bir diğer faktördür (Pan vd., 2006).

**Tablo 2.3:** Ekmeklik buğday, kepeği ve ruşeyminin besin değerleri tablosu

<b>Bileşenler</b>	<b>Ekmeklik Buğday (%)</b>	<b>Buğday Kepeği (%)</b>	<b>Buğday Ruşeymi (%)</b>
<b>Su</b>	10,40	7,47	7,98
<b>Kül</b>	1,52	4,47	4,55
<b>Protein</b>	11,3	14,26	29,64
<b>Yağ</b>	1,64	6,03	10,2
<b>Karbonhidrat (Lif hariç)</b>	62,48	34,02	31,65
<b>Lif</b>	12,66	33,75	15,98

**Kaynak:** Türkomp sitesinden yararlanılarak oluşturulmuştur.

TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) verilerine göre ise 2022 yılında Türkiye'de üretilen toplam buğday miktarı yaklaşık 19,8 milyon ton iken, 2023 yılında bu sayı 22 milyon tona çıkmıştır (TÜİK, 2022-23; <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Animal-Production-Statistics-June-2018-27705>). Tablo 2.4'te görüldüğü üzere FAO (Gıda ve Tarım Örgütü) verilerine göre 2022 yılında tüm dünyada toplam 808 milyon ton buğday üretilmiştir (FAO, 2022; <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>). Dünya

genelinde buğday üretim miktarı 2019'dan 2022'ye kadar artan bir trend izlemiştir. Ancak 2020 yılında buğday üretiminde bir miktar düşüş yaşanmıştır. Bunun nedeni 2020 yılında dünya genelinde yoğun bir şekilde etkisi hissedilen COVID-19 pandemisinin tarım sektöründe dalgalanmalara yol açmasıdır. Sonuç olarak dünya genelinde 2020 yılında üretilen buğday miktarı, 2019 buğday rekoltesinin altında kalmıştır. Dünya genelinde buğday üretimi oldukça fazladır ve artmaya da devam edeceği düşünülmektedir.

**Tablo 2.4:** Dünya'da 2019-22 yılları arasında en çok buğday (ton) üreten ülkeler (FAO)

Ülke	2019	2020	2021	2022
<b>Çin</b>	133.596.300	134.250.000	136.946.000	137.720.000
<b>Hindistan</b>	103.596.230	107.860.510	109.586.500	107.742.070
<b>Rusya</b>	74.452.692	85.896.326	76.060.948	104.233.944
<b>Amerika</b>	52.580.890	49.751.180	44.803.690	44.902.320
<b>Avusturya</b>	17.597.561	14.480.217	31.922.555	36.237.477
<b>Fransa</b>	40.604.960	30.181.140	36.559.450	34.632.380
<b>Kanada</b>	32.669.800	35.437.200	22.422.100	34.334.787
<b>Pakistan</b>	24.348.983	25.247.511	27.464.081	26.208.672
<b>Almanya</b>	23.062.600	22.172.100	21.459.200	22.587.300
<b>Arjantin</b>	19.459.727	19.776.942	17.644.277	22.150.287
<b>Ukrayna</b>	28.370.280	24.912.350	32.183.300	20.729.240
<b>Türkiye</b>	19.000.000	20.500.000	17.650.000	19.750.000
<b>Dünya (Toplam)</b>	<b>764.053.398</b>	<b>757.023.107</b>	<b>772.779.430</b>	<b>808.441.568</b>

**Kaynak:** FAO 2019-2022 yılları arasındaki verilerden alınmıştır.

### 2.3. Ruşeym

Buğday ruşeymi buğdayın hayat bulması için gerekli olan kısımdır. Buğday ruşeymi besin unsurları yaklaşık olarak %30 protein, %10 lipid, %53 karbonhidrat, %4,0 mineral ve bir miktar vitaminden oluşmaktadır (Niu vd., 2013). Bu oranlar buğdayın türüne, yetiştiği coğrafyaya, iklime ve yetiştirme koşullarına göre değişkenlik göstermektedir.

Buğday ruşeymi, buğday tanesinin toplam ağırlığının %2-3'ü kadardır (Brandolini ve Hidalgo, 2012). Ruşeym buğday endüstrisinin bir yan ürünüdür ve buğdayın besleyici kısmıdır. Yaklaşık olarak 1000 kg buğday işleme sonrası 20 kg kadar ruşeym elde

edilmektedir (Mızrak, 2021). Günümüzde buğday ruşeymi sıklıkla hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Buğday ruşeyminin Tablo 2.3'te sunulan besin kompozisyonu incelendiğinde %29,64 gibi nispeten yüksek protein içeriğine sahip olduğu görülmektedir. Magnezyum, demir, çinko vb. minerallerince zengin bileşimi (toplam kül %4,55) ve lif içeriği (%15,98) ruşeymi değerli kılmaktadır. Ruşeymin sahip olduğu söz konusu değerli bileşikler sebebiyle hayvan yeminden daha fazla potansiyeli olduğu anlaşılmaktadır. Buğday ruşeymi hayvan yemi dışında (Ge vd., 2000), ilaç ve kozmetik endüstrisinde (Barnes, 1983) kullanım alanı bulmuştur. Ayrıca buğday ruşeymi, ruşeym protein hidrolizatlarına dönüştürülerek katma değerli bir ürün elde edilebilmektedir (Claver ve Zhou, 2005; Zhou vd., 2013a).

### **2.3.1. Ruşeymin Beslenme Üzerindeki Etkisi**

Buğday ruşeyminde %11 oranında yağ bulunmaktadır. Yirmi kg kadar buğday ruşeymi işlenerek, 1 kg buğday ruşeym yağı elde edilmektedir (Mızrak, 2021). Ruşeym yağı, çoklu doymamış yağ asitlerince (toplam yağda çoklu doymamış yağ asidi oranı %63,71) nispeten zengin bir bileşime sahip olduğu bildirilmiştir. Ruşeym yağının sahip olduğu çoklu doymamış yağ asitlerinin başında linoleik asit (toplam yağda %55) yer almaktadır. Ruşeym yağında tekli doymamışlık içeren yağ asitlerinin oranı toplam yağda %17,22 olduğu raporlanmıştır (18:1 oleik asit, 16:1 palmitoleik asit) (Mahmoud vd., 2015).

Buğday ruşeymi proteinler, yağlar, şekerler, mineraller, vitaminler, fitosteroller ve polikozanoller gibi çok değerli bileşenler bakımından zengin bir matrise sahiptir (Pomeranz, 1988; Pietrzak ve Collins, 1996; Nyström vd., 2007; Eisenmenger ve Dunford, 2008; Hidalgo ve Brandolini, 2008). Buğday ruşeymi proteinlerinde bulunan amino asitlerin içeriği, bileşimi ve proteinlerin yapısal özellikleri ruşeym protein ürünlerinin besin değerinin yüksek olmasına katkı sağlamaktadır (Gao vd., 2023). Buğday ruşeymi, içerdiği değerli bileşenler sayesinde besleyici bir gıda takviyesi olarak kullanılma potansiyeline sahiptir (Brandolini ve Hidalgo, 2012). Bunun yanı sıra yağsız buğday ruşeymi ekmek (Çakmaklı vd., 1995), makarna (Pınarlı vd., 2004), kurabiye (Arshad vd., 2007), tarhana (Bilgiçli vd., 2006) ve kek (Turnbough ve Baldwin 1986) gibi unlu mamullerde besin zenginleştirilmesi amacıyla kullanılabilme potansiyeli taşımaktadır. Tam tahıllı buğday ununda toplam fenolik içeriğin %83'ünü

buğdayın ruşeym ve kepek kısmı içermektedir (Adom vd., 2005). Bu sebeple ekmeklerde uygulanan ruşeym besin zenginleştirilmesiyle ekmeğin fenolik madde içeriği artacağı düşünülmektedir.

### 2.3.2. Ruşeym Proteininin ve Protein Hidrolizatlarının Özellikleri

Buğday ruşeymi proteini %34,5 albümin, %15,6 globülin, %10,6 glutelin ve %4,6 prolaminde oluşmaktadır (Zhu vd., 2006a). Bu proteinler kimyasal yapısı bakımından *basit proteinlerdir (homoproteinler)*. Sadece amino asitlerden meydana gelmiş ve amino asit dışında organik ya da inorganik başka grup bulundurmeyen protein sınıfıdır (Demirci, 2016). Buğday ruşeymi proteinlerinin amino asit profili incelendiğinde sekizi esansiyel amino asit olmak üzere toplam 17 farklı amino asit içermektedir (Brestenský ve Patráš, 2019).

Buğday ununda bulunan % lizin, metiyonin ve treonin içeriğinin yaklaşık 2 katının buğday ruşeyminde bulunması, ruşeym proteinlerinin önemli bir özelliğidir. Buna ek olarak, birçok tahıl söz konusu amino asitleri içermemektedir (Ge vd., 2000). Buğday ruşeyminde yüksek miktarda valin, lösin, izolösin ve lizin bulunmaktadır. Bir protein kaynağı olarak buğday ruşeymi, FAO/WHO tarafından önerilen alım seviyelerine çok yakındır. Ayrıca buğday proteinleri yüksek oranda sindirilebilir ve kolayca emilebilir özellik göstermektedir (Boukid vd., 2018; Chen vd., 2021b).

Tahıl proteinleri hayvansal proteinlerin aksine daha büyük miktarlarda üretilmekte olan ve nispeten daha sürdürülebilir bir kaynaktır (Abdollahi vd., 2019). Bitkisel kaynaklı protein hidrolizatları, hayvansal kaynaklı protein hidrolizatlarına göre daha düşük maliyetli, daha az alerjenisiteye sahiptir ve bu nedenle bitkisel protein hidrolizatları daha çok tercih edilmektedir (Feyzi vd., 2015). Aynı zamanda bitkisel kaynaklı protein hidrolizatları vegan ürünlerin üretiminde kullanılabilir. Ruşeym protein hidrolizatları bitkisel kökenli protein hidrolizatları olarak söz konusu tüm bu avantajlara sahiptir.

Buğday ruşeymi proteini, proteazlarla parçalanarak birçok aktif amino asit dizisinin açığa çıkmasını sağlamaktadır. Hidroliz sonucunda peptit bağları kırılmakta ve çok sayıda polipeptit bileşik oluşmaktadır (Gulevskyy, 2020; Dever vd., 1994; Ogawa ve Takamatsu, 2019).

Matsui ve diğçerlerinin (1999) y¼r¼tt¼ğ¼ araştırma da, buğday ruşeymi protein hidrolizatlarında çeşitli anjiyotensin I-d¼n¼řt¼r¼c¼ enzim inhibit¼r peptitleri olduğu araştırmalar sonucunda bulgulanmıştır. Alkalaz kullanılarak baştaki protein yapısından daha fonksiyonel ve besleyici protein hidrolizatları elde edilmektedir. Alkalin bir proteaz olan Alkalaz biyoaktif peptitlerin ¼retiminde de sıklıkla kullanılmaktadır (Claver ve Zhou, 2005). Alkalazın buğday ruşeymi proteininin %85'ini ¼z¼nd¼rd¼ğ¼ rapor edilmiştir (Matsui vd., 1999). Literat¼rde protein hidrolizatlarının ¼retiminde, proteinlerin hidrolizi i¼in sıklıkla Flavourzyme ve Alkalaz gibi proteolitik enzimlerden yararlanılmaktadır. Alkalaz endo-peptidaz olarak tanımlanırken, Flavourzyme, hem endo- hem de ekzo-peptidazların bir karışımıdır (Cumby vd., 2008). Bu şekilde Alkalaz ve Flavourzyme enzimleri birlikte kullanılarak kısa s¼rede etkin bir hidroliz ger¼ekleřtirilmektedir. Literat¼rdeki bir ¼alıřmada buğday ruşeymi protein hidrolizati elde etmek amacıyla Alkalaz, Flavourzyme, Papain, Neutrase ve Protamex enzimleri kullanılmıştır. En y¼ksek hidroliz verimini (%DH değerini) sırasıyla Alkalaz ve Flavourzyme enzimlerinin verdiği rapor edilmiştir (Claver ve Zhou, 2005).

Ultrason buğday ruşeym tanelerinin par¼acık boyutunu k¼ç¼ltmektedir ve bunun sonucu olarak da enzimatik muamelelerin etkinliğini arttırmaktadır (Delgado-Povedano ve De Castro, 2015). Ultrason destekli protein hidrolizinde ultrasonik g¼ç yoğunluğu ve ultrason uygulama s¼resi parametreleri işlem etkinliğini belirlemektedir. Ultrasonik g¼c¼n değişiminin enzimatik aktiviteyi değiştirdiği ve buna bağlı olarak protein hidrolizatlarının %DH değerinin değiştiği rapor edilmiştir (Wang vd., 2016; Ma vd., 2022). ¼rneėin Wu ve diğerleri tarafından (2018) ele alınan ¼alıřmada peynir altı suyu protein hidrolizatlarına farklı frekans, g¼ç (26kHz, 0-500 W) ve s¼relerde (0-25 dk) ultrasonik muamele uygulanmıştır. Ultrasonik muamele sonrasında Alkalaz ile proteolitik hidroliz ger¼ekleřtirilmiřtir. Bařlangı¼ta ultrasonik g¼ç ve s¼renin arttırılmasıyla %DH ¼nemli oranda artmıştır. Ancak g¼ç ve s¼renin arttırılmaya devam ettirilmesiyle birlikte %DH değerinin azalmaya başladığı rapor edilmiştir. Bu parametrelerin optimizasyonu ile etkin bir hidroliz ger¼ekleřtirilebilir (Eskin vd., 2019).

Y¼r¼t¼len diğer ¼alıřmada yağı alınmış buğday ruşeym proteinlerinin, ters misellerle ekstraksiyonu yapılmıştır. Ekstraksiyon aşaması ultrason y¼ntemi ile desteklenmiştir (Zhu vd., 2009). Aynı zamanda ekstraksiyon verimi i¼in Yanıt Y¼zey Metodolojisi (RSM) kullanılarak optimizasyon ¼alıřması yapılmıştır. Bu ¼alıřmanın mevcut

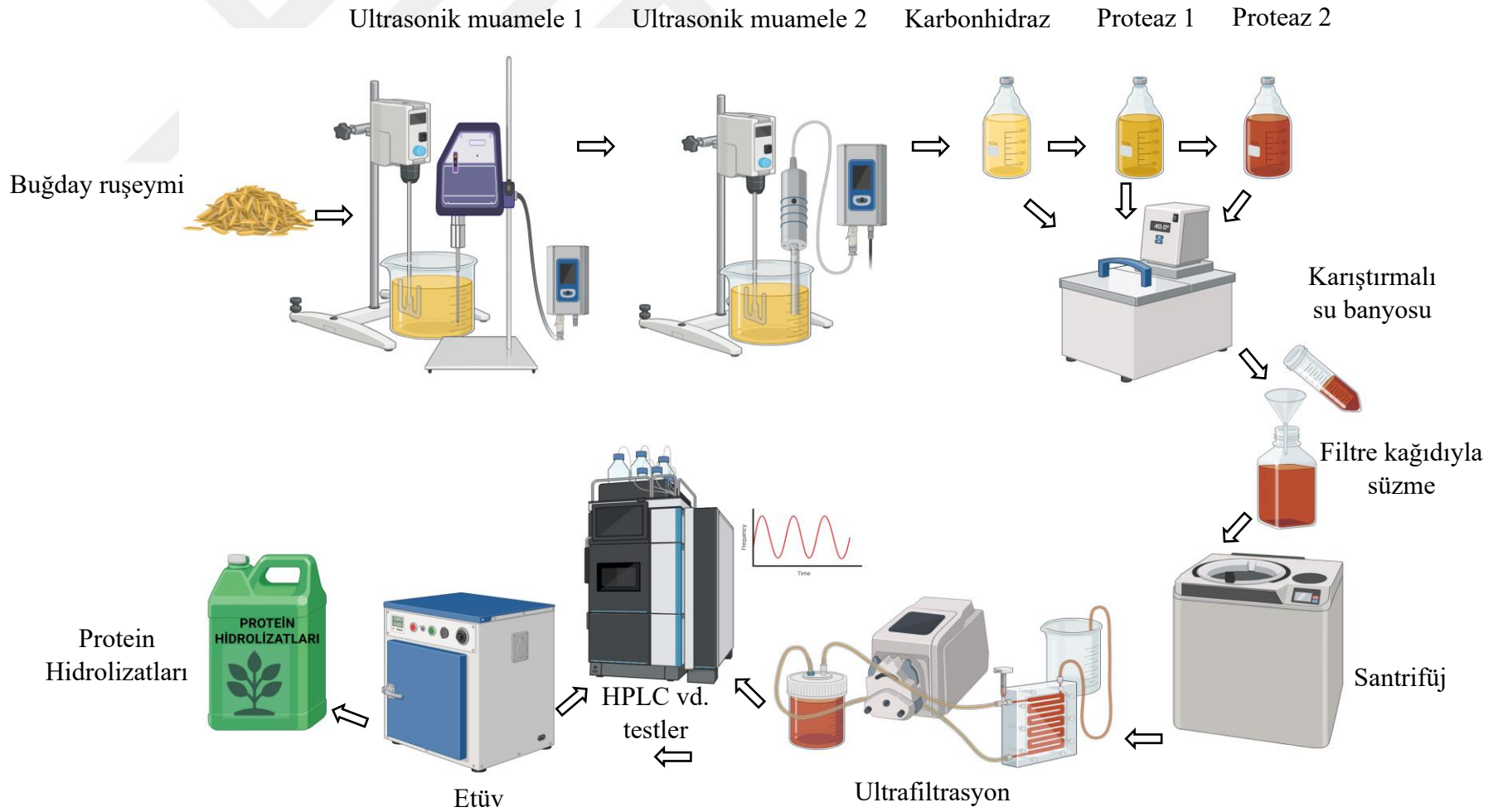
çalışmadan farklı enzimatik hidroliz yerine ters miseller ile protein ekstraksiyonu yapılması ve optimizasyon metodu olarak Taguchi yerine RSM tercih edilmesidir. Fakat her 2 çalışmada da protein ekstraksiyon verimini arttırmak için ultrason yöntemi kullanılmıştır. Mevcut çalışmada uygulanan ultrasonik muamelenin öncelikli amacı protein parçalanma verimini arttırmaktır. Söz konusu çalışmada 20 kHz'lik tek bir ultrasonik muamele ile farklı ultrasonik güçler (250, 350 ve 450 W) uygulanmıştır. Mevcut çalışmada ise 20 kHz (200 W) ve 26 kHz (400W) frekans ve güç sağlayan 2 farklı ultrasonik sistemden yararlanılmıştır.



## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### MATERYAL VE METOT

Bu çalışmanın her aşamasında distile su (Millipore Direct-Q 3, Merck, Almanya) kullanılmıştır. Endüstriyel buğday ruşeymi (*Triticum aestivum*) yerel bir firmadan (Eksun Gıda Tarım Sanayi ve Ticaret A.Ş., Tekirdağ, Türkiye) temin edildi. Mevcut çalışmada kullanılan Alkalaz (2,4 L, PLN05543) ve Flavourzyme (1000 L, HPN00581) endüstriyel enzimlerdir. Bu enzimlere ek olarak selülaz (900.094.17, %92 saflıkta, Smart Kimya, İzmir, Türkiye) enzimi kullanılmıştır. Mevcut çalışmada pikrilsülfonik asit solüsyonu (2,4,6-trinitrobenzensülfonik asit solüsyonu, TNBS, P2297-10ML, Sigma-Aldrich), L-Lösin (L8000-25G, Sigma-Aldrich), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH, D9132-5G, Sigma-Aldrich), Folin & Ciocalteu fenol reaktifi (F9252-500ML, Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Tüm kimyasallar analitik saflıkta olup enzimler dışındaki tüm malzemeler Sigma Chemical Corp'tan satın alınmıştır.



Şekil 3.1: Ruşeym protein hidrolizatları üretim sürecinin grafiksel özeti

### 3.1. AE-İÇ Metodu ile Ruşeymden Protein İzolatlarının Elde Edilmesi

Mevcut çalışmada Şekil 3.2’de görülen buğday ruşeymi kullanılarak protein hidrolizatları ve analitik testler yürütülmüştür. Buğday ruşeymi kompozisyonun belirlenmesi için nem, kül ve protein analizleri yapılmıştır. Mevcut çalışma boyunca buğday ruşeymi +4°C’de muhafaza edilmiştir.



**Şekil 3.2:** Eksun Gıda Tarım Sanayi ve Ticaret A.Ş. tesisinden sağlanan endüstriyel buğday ruşeymi

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Endüstriyel buğday ruşeyminden protein izolatu elde edilmesinde Coşkun ve diğerleri (2019) tarafından bildirilen alkali ekstraksiyon- izoelektrik çöktürme (AE-İÇ) metodu küçük değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Buğday ruşeymi laboratuvar tipi öğütücüde (EB 8011, Waring, ABD) öğütülmüştür. Öğütülmüş buğday ruşeyminin (60 g) üzerine saf su (1050 ml) eklenerek (1:17,5) bu malzemeler karıştırılmıştır. NaOH (2 M) ile ortamın pH değeri 9,5-10 arasında sabit tutularak oda sıcaklığında bir saat karıştırılıp (500 rpm), proteinlerin çözünmesi sağlanmıştır. Ardından yüksek hızlı santrifüj (Himac CR22N, Hitachi, Tokyo, Japonya) kullanılarak 10 000 x g’de, 30 dk, 17°C’de santrifüj edilip filtre kağıdından (ISOLAB 107.40.140, kalınlığı 0.15–0.25 mm, %100 selülozdan üretilmiştir) süzümüştür. Böylelikle çözünmeyen maddeler uzaklaştırılmıştır. Ardından izoelektrik çöktürme için pH 4,5’e ayarlanıp 10 000 x g’de, 30 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sırasında sürtünme ve rotor hızı ile ısınma meydana gelmektedir. Düşük sıcaklıklarda ise yoğunlaşma ve donma problemleri yaşanmaktadır. Böylelikle santrifüj işlemi 17°C’de çalıştırılarak her iki sorunun da

elimine edilmesi amaçlanmıştır. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış, protein izolatu elde edilmiştir. Elde edilen ruşeym protein izolatu Teknosem TRS 2/2 V liyofilizatör (Teknosem, İstanbul, Türkiye) cihazı (-58°C, yaklaşık 10<sup>-3</sup> mbar çalışma basıncı) kullanılarak yaklaşık 24 saatte kurutulmuştur. Üretilen ruşeym protein izolatu analizlerde kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edilmiştir.

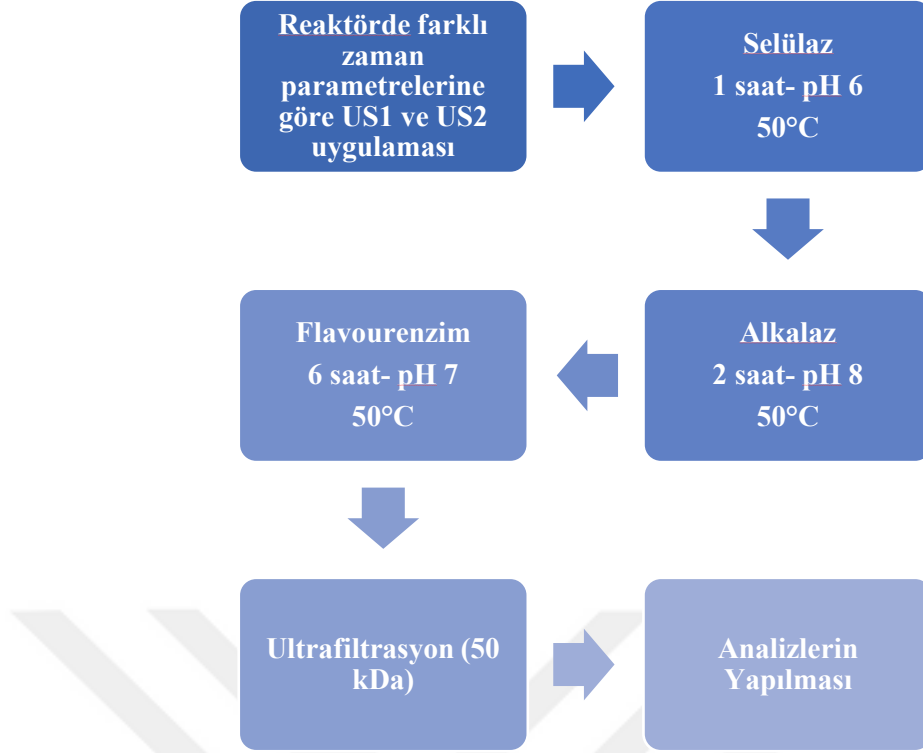
L25 deneme deseninde her bir ruşeym protein hidrolizatının hazırlanmasında, cam reaktörün içine ultrasonik prob daldırıldığında sıvı ile temasın sağlanabilmesi için minimum 120 g ruşeym, 1200 ml saf su kullanılmıştır. Mevcut çalışmada, AE-İÇ yöntemiyle buğday ruşeyminden protein izolatu hazırlanmasına yönelik denemelerde, elde edilen protein izolatu verimi kütlece %10'un altında kalmıştır. Bu durum, uygulanan yöntemin ruşeym protein hidrolizatları üretiminde sınırlı bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Deneme deseninde, ruşeym yerine ruşeym protein izolatu kullanılması durumunda, her bir numunenin hazırlanması için gerekli olan 120 g ruşeym protein izolatu elde edilmesi, yaklaşık 10 kat daha fazla ruşeym kullanımı ve ek iş yükü gerektirmektedir. Buğday ruşeymi protein izolatının düşük verimi, endüstriyel ölçekte üretiminin yüksek maliyetli ve zaman alıcı olması nedeniyle bu yöntem tercih edilmemiştir. Söz konusu gerekçeler doğrultusunda, mevcut çalışmanın devamında ruşeym protein hidrolizatları üretiminde ruşeym protein izolatu yerine ruşeym kullanımı tercih edilmiştir. Ayrıca doğrudan ruşeym kullanılarak elde edilen ürünlerin birincil değerlendirme kriteri olan serbest amino asit içeriği (sonuçlar gösterilmemiştir), literatürde protein hidrolizatlarında bulunan serbest amino asit oranlarını sağlaması da bu kararın verilmesinde etkili olmuştur.

Şekil 3.1'de yer alan grafiksel özetinde mevcut çalışma boyunca buğday ruşeymi kullanılarak gerçekleştirilen uygulamalar yer almaktadır. Bu kapsamda öncelikli olarak buğday ruşeymi 20 kHz (200 W) ve 26 kHz (400W) frekans ve güç sağlayan olmak üzere sırasıyla US 1 ve US 2 olmak üzere 2 farklı ultrasonik sistem ile muamele edilmiştir. Bunu takiben selülaz enzimi ile karbonhidratların nispeten parçalanması sağlanmıştır. Bir sonraki aşamada sırasıyla Alkalaz ve Flavourzyme ile proteolitik hidroliz gerçekleştirilmiştir. Tüm enzimatik reaksiyonlarda karıştırmalı su banyosu kullanılmıştır. Enzimatik muamelelerin sonrasında, karışım filtre kağıdıyla süzülüp, santrifüj yapılmıştır. Son aşamada ultrafiltrasyon ile fraksiyonlama yapılarak ruşeym protein hidrolizatları elde edilmiştir. Ruşeym protein hidrolizatları L25 Taguchi tasarımına göre hazırlanıp TFİ, %DH ve DPPH süpürme aktivitesi analizleri yapılmış,

birincil değerlendirme kriteri olan serbest amino asit değeri HPLC cihazında ölçülmüştür. İstatistiksel analizler sonucunda serbest amino asit değeri esas alınarak optimize ruşeym protein hidrolizatları hazırlanmış ve numuneler etüvde konsantre (9,8 kat) edilmiştir. Optimize ruşeym protein hidrolizatlarına ve konsantrelerine analizler uygulanarak elde edilen veriler incelenmiştir.

### **3.2. Buğday Ruşeymi Protein Hidrolizatlarının Hazırlanışı**

Buğday ruşeymi protein hidrolizatları hazırlanırken proteinlerin parçalanma etkinliğinin iyileştirilmesi amacıyla ultrasonik ön muameleler uygulanmıştır. Bu amaç doğrultusunda önce farklı frekanslarda olan ultrasonik muamele 1 (US1) ve ultrasonik muamele 2 (US2) uygulandı. Ardından selüloz, Alkalaz ve Flavourzyme enzimleriyle parçalanma sağlandı. Son olarak ultrafiltrasyon işlemi ile 50 kDa kasetten geçemeyen büyük polipeptit yapıları gibi safsızlıklardan arındırıldı. Bu aşamaların tümü Şekil 3.3'te gösterilen akım şemasında verilmiştir. Buğday ruşeymi kullanılarak ruşeym protein hidrolizatlarının elde edilmesinde uygulanan ultrasonik muamele süreleri, proteolitik enzimlerin miktarları ve ultrafiltrasyonda gerçekleşen hacimsel konsantrasyon oranları L25 Taguchi deney tasarımına göre belirlenmiştir.



**Şekil 3.3:** Buğday ruşeymi protein hidrolizatlarının üretim akış şeması

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

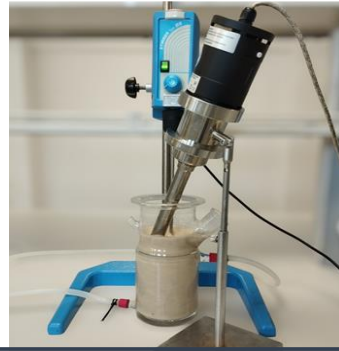
### 3.2.1. Buğday Ruşeymine Ultrasonik Muamelelerin Uygulaması

Buğday ruşeymi proteinlerinin proteoliz etkinliğinin iyileştirilmesi için ruşeym dispersiyonları öncelikle ultrasonik muamelelere tabi tutulmuştur (Zhu vd., 2009). Borosilikat cam reaktöre (çap 10 cm, yükseklik 24 cm, Çalışkan Laboratuvar Ürünleri Tic. Ltd. Şti, Ankara) buğday ruşeymi 1:10 oranında distile su ile eklendi. Ruşeym 120 g ve saf su 1200 g olacak şekilde ultrasonik muamele eşliğinde deney boyunca karıştırıldı (100 rpm, VELP, Scientifica, İtalya). Karışımlar Taguchi tasarımına göre belirlenen farklı sürelerde (0-48 dk) ultrasonikasyona tabi tutuldu. Farklı ultrasonik frekans ve yoğunlukların etkisinin incelenmesi amacıyla Şekil 3.4'te görüldüğü gibi önce Sonotrode S26d7 probu ile desteklenen Hielscher, UP200Ht (Almanya, 26 kHz, 200 W, prob çapı:7 mm) cihazı ile Ultrasonik muamele 1 (US1) ve ardından TS425 probu ile desteklenen Sonoplus, UW 400 (Berlin, Almanya, 20 kHz, 400 W, prob çapı: 25 mm) cihazı Ultrasonik muamele 2 (US2) ile ultrasonikasyon uygulandı. Darbe modu 1 saniye açık 1 saniye kapalı olacak şekilde ayarlandı. Ultrasonikasyon işleminde ruşeym-su karışımı reaktörün ceket kısmına bağlı Şekil 3.4'te görülen

sirkülasyonlu su sistemi (Labo SM3, Labo Makina San. ve Tic. A.Ş., Türkiye) tarafından reaktörün sıcaklığı 20°C’de sabitlendi.



Ruşeym- su karışımına US 1 uygulaması



Ruşeym-su karışımına US 1’den sonra US 2 uygulaması



US 1 ve US 2 uygulamasında sirkülasyonlu su sistemi ile sıcaklığın 20°C’de sabit tutulması

**Şekil 3.4:** Enzimatik proteoliz öncesi L25 Taguchi tasarımına göre belirlenen sürelerde ruşeym-su karışımına ultrasonik muamele 1 (US 1, 26 kHz, 200 W) ve ultrasonik muamele 2’nin (US 2, 20 kHz, 400 W) uygulanması

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

### 3.2.2. Ruşeym Dispersiyonlarının Enzimatik Hidrolizi

Ruşeym karışımına ultrasonikasyon işlemleri uygulandıktan sonra enzimatik muamelelere başlanmıştır. Ruşeym karışımının pH değeri önce pH 6’ya ayarlanıp, karışıma %0,1 selülaz (%92 saflıkta, 900.094.17, Smart Kimya, İzmir, Türkiye) eklenmiştir. Ardından bu karışım 1 saat karıştırılmalı su banyosunda (WBN, 14, Memmert, Büchenbach, Almanya) inkübasyona bırakılmıştır (50°C). Bu işlemden sonra ortamın pH değeri 8’e yükseltilip (2 M NaOH), ortama Alkalaz (2 AU/ml)

(Wang vd., 2018a) eklenmiştir. Daha sonra bu karışım 2 saat karıştırılmalı su banyosunda tutulmuştur (50°C). Son olarak pH 7'ye ayarlanıp (2 M HCl), ortama Flavourzyme (1 g enzim: 5 g protein) eklenmiştir. Aynı şekilde numuneler 6 saat karıştırılmalı su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır (50°C). Ardından enzimlerin ısıl inaktivasyonu için 10 dk karıştırılmalı su banyosunda tutulmuştur (90°C) ve selülozdan üretilen kaba filtre kâğıdı (kalınlığı 0.15–0.25 mm) ile süzümüştür. Son olarak 10 000 x g'de 20 dk, 17°C'de santrifüj edilmiştir. Şekil 3.5'te buğday ruşeymi protein hidrolizatlarının elde edilmesinde uygulanan enzimatik muamelelerin görselleri yer almaktadır. Ultrasonik muamele sonrası karışıma sırasıyla selülaz, Alkalaz ve Flavourzyme eklenerek uygulanan enzimatik hidroliz işlemi Şekil 3.5'te gösterilmektedir. Enzimatik hidroliz sonrası ruşeym protein hidrolizatlarına filtreleme ve santrifüj işlemi uygulanmıştır.



### 1- SELÜLAZ

Ultrason muamelesi yapılmış ruşeym-su karışımına selülaz enzimi verilerek pH 6'da 50°C'de 1 saat çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi.



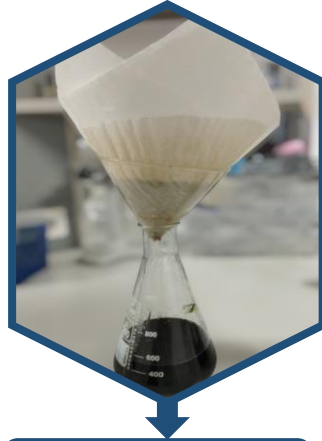
### 2- ALKALAZ

Selülaz işleminden sonra proteolitik hidroliz için Alkalaz enzimi verilerek pH 8'de 50°C'de 2 saat çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi.



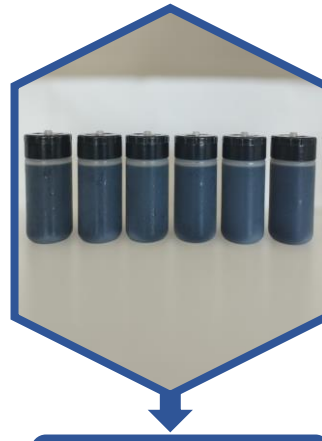
### 3- FLAVOURZYME

Alkalazdan sonra Flavourzyme ilave edilerek pH 7'de, 50°C'de, 6 saat çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi. Sonrasında enzimlerin inaktivasyonu için 90°C'de 10 dk bekletildi.



### 4- FİLTRELEME

Enzimatik işlemlerden sonra kaba filtre kâğıdı ile süzme işlemi uygulandı ve süzüntü bir sonraki adım için ayrıldı.



### 5- SANTRİFÜJ

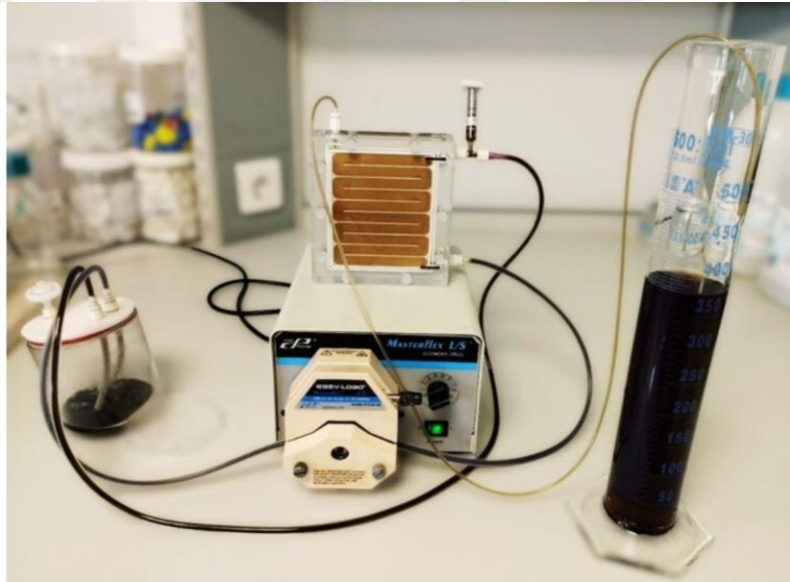
Süzüntü 17°C, 20 dk, 10 000 x g'de santrifüj edildikten sonra kalan sıvı kısım ruşeym protein hidrolizatlarını oluşturmaktadır.

**Şekil 3.5:** Buğday ruşeymi protein hidrolizatlarının elde edilmesinde ultrasonik muameleleri sonrası uygulanan enzimatik hidroliz, filtreleme ve santrifüj işlemleri

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

### 3.2.3. Ultrafiltrasyon Yöntemi ile Fraksiyonlama

Elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarından küçük moleküllerin konsantre edilmesi amacıyla ultrafiltrasyon cihazı kullanılmıştır. Ultrafiltrasyonda filtreden geçen filtrat kısmı toplanmış, filtreden geçemeyen retentant kısmı atılmıştır. Ultrafiltrasyon işlemi oda sıcaklığında,  $8 \text{ ml.dk}^{-1}$  akış hızında, yaklaşık 70 dk boyunca, 500 ml protein hidrolizatı kullanılarak ultrafiltrasyon cihazında fraksiyonlanmıştır (Hacimsel konsantrasyon oranı 0 ile 5 kat arasında değişmektedir). Bu işlemler Şekil 3.6'da gösterilen ultrafiltrasyon cihazı (Sartorius Vivaflow 200 UF sistemi) ile gerçekleştirilmiştir. Ultrafiltrasyon işlemlerinde 50 kDa MWCO por açıklığı bulunan polietersülfon (PES) membran filtre (VF20P3) kullanılmıştır.



**Şekil 3.6:** Ruşeym protein hidrolizatlarının 50 kDa membran filtreden geçirilerek fraksiyonlanması

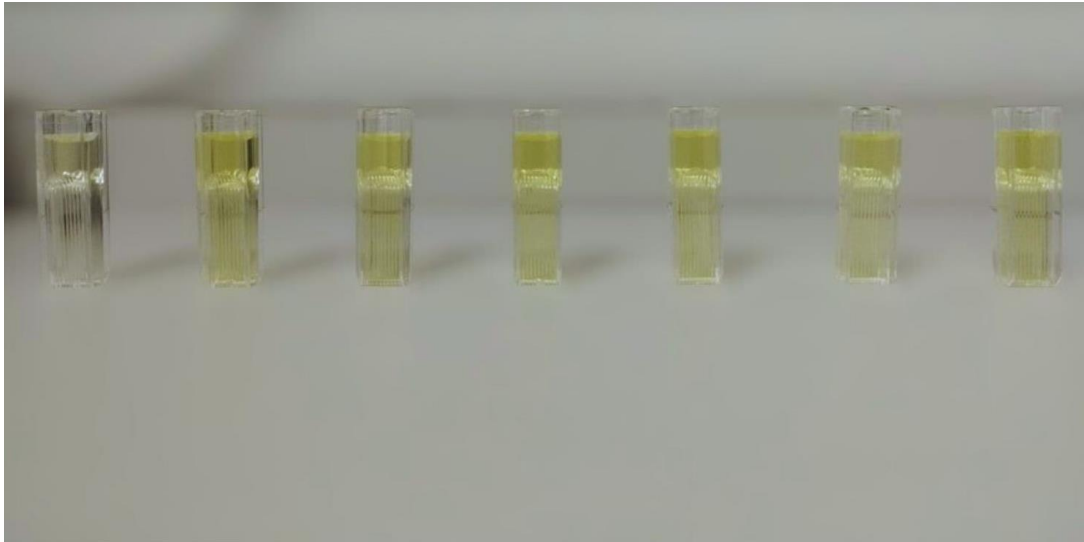
**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

### 3.3. TNBS (2,4,6-Trinitrobenzen Sülfonik Asit) Yöntemi ile Hidroliz Derecesinin Belirlenmesi

Ruşeym protein hidrolizatlarında hidroliz derecesinin (%DH) llmesi için TNBS metodu kullanılmıştır. Mevcut alışmada Adler-Nissen (1979) tarafından açıklanan

TNBS renk ölçüm metodunun protokolünde bazı değişiklikler yapılarak hidroliz derecesinin ölçümü gerçekleştirilmiştir. Saf su ile seyreltilen (1:20) ruşeym protein hidrolizatlarından 100 µl alınıp üzerine 300 µl saf su eklenmiştir. Şahit numune için cam tüpe 400 µl 0,2 M (pH 8,2) sodyum fosfat tamponu eklenmiştir ve tepkime karışımı %0,44 SDS (sodyum dodesil sülfat) ile karıştırılmıştır. Ardından 190 µl 0,2 M (pH 8,2) sodyum fosfat tamponu eklemiştir ve ortama 300 µl %0,1 TNBS çözeltisi eklenip karışım 50°C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 340 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır (UV-1280, Shimadzu, Kyoto, Japonya). Şekil 3.7’de TNBS metodu ile %DH ölçümünde ruşeym protein hidrolizatlarına ait spektrofotometrik renk değişimleri gösterilmektedir. Bu analiz sonucunda örnekteki serbest amino gruplarının miktarı ölçülerek %DH belirlenmiştir. L- lösin (0-2 mg.L<sup>-1</sup>) referans alınarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. TNBS hesaplamasında Do Evangelho ve diğerleri (2017) tarafından yazılan makale referans alınarak hesaplama yapılmıştır. Hesaplama kullanılan h<sub>tot</sub> değeri (8,3 meqv/g protein) için Zhu ve diğerleri (2015) tarafından yayınlanan makaleden yararlanılmıştır. Hidroliz derecesi değeri hesaplamaları, Denklem 3.1’de verilen formül esas alınarak yapılmıştır.

$$\%DH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 \quad (3.1)$$



**Şekil 3.7:** L25 deneme deseninde sırası ile bazı numunelerin ruşeym protein hidrolizatlarının TNBS yöntemi ile takip edilen renk değişimleri

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

### 3.4. DPPH (2,2-Diphenyl-1- Picrylhydrazyl) Süpürme Aktivitesi Analizi

Ultrasonik ve enzimatik işlemler uygulanan ruşeym protein hidrolizatlarından 50 µl alınıp bu numuneler 50 µl metanol ile seyreltilmiştir. Ardından bu karışıma 0,1 mM metanolde çözüldürülen DPPH çözeltisi (2 ml) eklenerek reaktifler tekrar karıştırılmıştır. Karışım, karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ruşeym protein hidrolizatlarında zamana bağlı olarak 517 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır (UV-1280, Shimadzu, Kyoto, Japonya). Şekil 3.8’de, DPPH süpürme aktivitesi sonuçlarına göre ruşeym protein hidrolizatlarına ait renk yoğunluğu ölçüm numuneleri gösterilmektedir. DPPH süpürme aktivitesi analizi Blois (1958) metoduna göre yapılmıştır. Bu testte Troloks [mg TE (Troloks Eşdeğeri).100 g<sup>-1</sup> numune] pozitif kontrol olarak alınmıştır. Denklem 3.2’de verilen formül esas alınarak % DPPH süpürme aktivitesi hesaplanmıştır.

$$\% \text{ DPPH süpürme aktivitesi} = \frac{(ABS_{negatif kontrol} - ABS_{örnek})}{(ABS_{negatif kontrol} - ABS_{blank})} \times 100 \quad (3.2)$$



**Şekil 3.8:** L25 deneme deseninde sırası ile kör, 1, 9 ve 19 numaralı ruşeym protein hidrolizatlarının DPPH süpürme aktivitesi değerlerinin değişimi

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

### 3.5. Toplam Fenolik İçeriği (TFİ) Analizi

Bu analiz, Folin-Ciocalteu ayırıcının indirgenmesine böylelikle fenolik madde içeriğinin belirlenmesine dayanmaktadır. Folin-Denis reaktifi kullanılarak fenolik madde içeriğinin ölçümünde analizde oluşan beyaz çökeltinin uzaklaştırılması için spektrofotometrik ölçüm öncesi filtrasyon veya santrifüj muamelesi gerekmektedir. Bu sebeple Folin-Denis reaktifi kullanımı dezavantajlı bulunmakta ve böylelikle mevcut çalışmada TFİ analizi için Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılmıştır. Alkali ortam koşullarında fenolik bileşikler, fosfotungstik ve fosfomolibdik heteropoli mavi asitler içeren Folin-Ciocalteu reaktifi ile indirgenme reaksiyonu vermekte ve spektrofotometrik yöntem kullanılarak ölçülmektedir. İndirgenme reaksiyonu sonucu oluşan mavi renkli kompleks maddenin renk yoğunluğu fenolik madde miktarı ile doğru orantılı olarak artmaktadır (Singleton ve Rossi, 1965; Singleton vd., 1999; Tutelian vd., 2004). Böylelikle renk yoğunluğu esasına göre standart eğri grafiği oluşturularak karışımda bulunan fenolik madde miktarı belirlenmektedir. Folin-Ciocalteu reaktifi fenolik bileşiklerin yanı sıra tirozin-triptofan amino asitleri ve askorbik asit gibi maddelerle indirgenme reaksiyonu vermektedir (Sánchez-Rangel vd., 2013).

Ruşeym protein hidrolizatlarında toplam fenolik madde içeriğinin ölçülmesi için Folin-Ciocalteu metodu kullanılmıştır. Önce 1:10 oranında (su; Folin-Ciocalteu reaktifi) Folin solüsyonu hazırlanmıştır. Buğday ruşeymi protein hidrolizatları saf su ile %5'e seyreltilmiştir. Hazırlanan bu karışımdan 100 µl alınarak bu numunenin üzerine Folin solüsyonundan 750 µl ve %6'luk sodyum karbonat çözeltisinden 750 µl eklenmiştir. Karışım karanlık bir ortamda ve oda sıcaklığında 90 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda spektrofotometrede (UV-1280, Shimadzu, Japonya) 750 nm'de absorbans değeri belirlenmiştir. Şekil 3.9'da TFİ sonuçlarına göre ruşeym protein hidrolizatlarına ait renk yoğunluğu ölçüm numuneleri gösterilmektedir. Standart eğri grafiği, gallik asidin standart olarak kullanılmasıyla oluşturulmuştur (konsantrasyon aralığı 0,01-0,6 mg.ml<sup>-1</sup>). Numunenin 100 gramındaki mg gallik asit eşdeğeri [mg GAE (Gallik Asit Eşdeğeri).100 g<sup>-1</sup> numune] fenolik madde miktarı olarak hesaplanmıştır. TFİ analizinde Singleton ve diğerleri (1999) tarafından belirlenen metot uygulanmıştır.



**Şekil 3.9:** L25 deneme deseninde sırası ile kör, 19, 9, 4, 3, 2, 1 numaralı ruşeym protein hidrolizatlarının TFİ değerlerinin değişimi

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

### 3.6. Organik Karbon Analizi

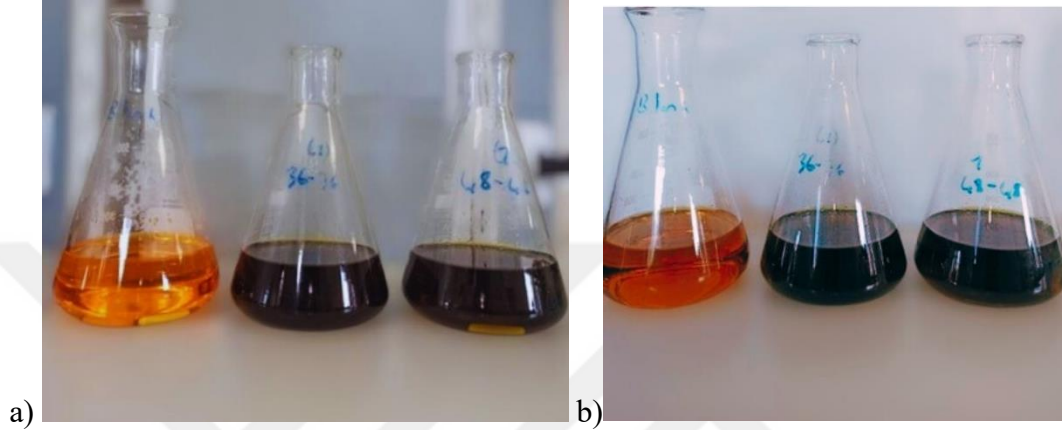
Nelson ve Sommers'ın (1982) uyguladığı şekliyle Walkley Black metodu (1934) kullanılarak ruşeym protein hidrolizatlarına organik karbon analizi uygulanmıştır. Ruşeym protein hidrolizatlarına (1 g) 10 ml 1 N potasyum dikromat eklenmiştir. Ardından karışıma 20 ml derişik sülfürik asit çözeltisi (%36,5 saflıkta) eklenip 1 dk karıştırılmıştır. Bu karışım 25 dk boyunca, 160°C'de manyetik karıştırıcılı (50 rpm) ısıtıcıda (AM4 Multi-positions Hot Plate Stirrer- VELP Scientifica, İtalya) ısıtılmıştır. Devamında karışıma 10 ml daha potasyum dikromat eklenip 160°C ısıtıcıda 5 dk ısıtılma işlemi yürütülmüştür. Karışımın oda sıcaklığına gelmesinin ardından, karışıma 200 ml saf su ilave edilmiştir. Bu işlemi takiben karışıma (saf su: fosforik asit) 1:1'lik formik asit (%85 saflıkta) çözeltisinden 10 ml eklenmiştir. İndikatör olarak baryum difenilamin sülfonat çözeltisinden 650 µl eklenmiştir. Bir sonraki aşamada 0,5 M demir (II) sülfat çözeltisi ile titre edilmiştir. Harcanan demir (II) sülfat çözeltisi hacmi not edilmiştir. Denklem 3.3'te verilen formül esas alınarak % organik karbon miktarı hesaplanmıştır. Şekil 3.10'da organik karbon analizi sonuçlarına göre ruşeym protein hidrolizatlarına ait titrasyon öncesi ve sonrası renk yoğunluğu ölçüm numuneleri gösterilmektedir.

$$\% \text{ Organik Karbon} = \frac{(A - (B \times N_k)) \times 0,337}{\text{Tartılan Örnek Miktarı (g)}} \quad (3.3)$$

A: Harcanan potasyum dikromat hacmi (ml)

B: Titrasyonda harcanan demir (II) sülfat çözeltisi hacmi (ml)

$N_k$ : Demir (II) sülfatın kesin normalitesi ( $N_k$ : 10/ Şahit numune için harcanan demir (II) sülfat çözeltisi hacmi (ml))



**Şekil 3.10:** Organik karbon analizinde kör (a ve b görselinde soldan 1. erlen) ve ruşeym protein hidrolizatlarının titrasyon a) öncesi ve b) sonrası değişimi

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

### 3.7. Şeker Analizi

Ruşeym protein hidrolizatlarına uygulanan şeker analizi pompa (LC-20AD), degazer (DGU-20A5R), termostatlı kolonu (CTO-10AS VP), oto örnekleyici (SIL-20A HT), ve kırılma indisi dedektöründen (RID-20A) oluşan Şekil 3.11’de gösterilen HPLC sistemi (Prominence LC-20A, Shimadzu Corporation, Japonya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şeker analizinde  $NH_2$  kolonu (GL Sciences Inertsil  $NH_2$  kolonu, 250 mm × 4,6 mm, 5  $\mu$ m) kullanılmıştır. Mobil faz olarak %75 asetonitril ve %25 saf su karıştırılarak izokratik akış sağlanmıştır. Kolon sıcaklığı 40°C ve mobil faz akış hızı 1 ml.dk<sup>-1</sup> olacak şekilde ayarlanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin oluşturulması amacıyla analiz edilecek şekerler (glikoz, fruktoz, maltoz ve sükröz), %0-2 aralığında ve %0,5 artışlarla hazırlanan 5 farklı konsantrasyonu karşılamak üzere Şekil 3.11’de gösterilen HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Bunu takiben ruşeym protein hidrolizatları da 40  $\mu$ l enjekte edilmiş ve standart eğri grafiğine uygun olarak numunelerde bulunan şeker

konsantrasyonları hesaplanmıştır. Coşkun ve diğerleri (2021) tarafından yazılan makale esas alınmış, ilgili çalışmadan farklı olarak diyaliz yöntemi uygulanmamıştır.



**Şekil 3.11:** Ruşeym protein hidrolizatlarının şeker ve serbest amino asit analizlerinin ölçümünde kullanılan HPLC sistemi

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

### 3.8. Nem ve Kül Analizi

Kül tayini için AOAC (2012) 942.05 protokolü referans alınmıştır. Sabit tartıma getirilen krozede endüstriyel buğday ruşeyminden elde edilmiş 2 g proteolitik hidrolizat numunesi tartılmıştır. Bu işlemde sonra krozenin içine 2 ml etanol dökülerek karışım çakmakla yakılmıştır (yakma süresi yaklaşık 5 dk). Bir sonraki adımda krozeler kül fırınında (MT-1105, Magmatherm, Türkiye) 4 saat 600°C’de yakılmıştır. Süre sonunda kül fırınından çıkarılan krozeler desikatörde (ISOLAB, vakumsuz borosilikat cam, çap 200 mm) soğutulup tartım yapılmıştır (Şekil 3.12). Oluşan farka göre % kül miktarı hesaplanmıştır.

Ruşeym örneğinin nem içeriğinin belirlenmesinde AOAC (2009) 935.29 protokolü uygulanmıştır. Cam petrielerde 2 g ruşeym numuneleri tartılarak petrieler etüvde (100–105°C) 5 saat tutulmuştur. Bu sürenin ardından numune desikatörde soğutulup

tartılmıştır. Elde edilen veriler ile ruşeym örneğinin %nem içeriği Denklem 3.4'te sunulan şekilde hesaplanmıştır.

$$\%Nem = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad (3.4)$$

A: Kurutma öncesi ruşeym kütlesi (g)

B: Kurutma sonrası ruşeym kütlesi (g)



**Şekil 3.12:** Kül fırınından çıkarılan buğday ruşeymi protein hidrolizatları

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

### 3.9. Protein Analizi

Toplam azot miktarı Kjeldahl NMKL, № 6 (2003) referans metodu kullanılarak belirlenmiştir. Bunu takiben buğday ruşeyminin protein dönüşüm faktörü (5,7) kullanılarak toplam protein miktarı bulunmuştur (Juhász vd., 2015). Ultrasonik ve enzimatik muamelelere uğratılmış ruşeym numuneleri 3 g tartılarak Kjeldahl tüpüne konulmuştur. Buğday ruşeyminden 0,25 g ve şahit numune için 1 g sükröz tartılıp başka bir Kjeldahl tüpüne eklenmiştir. Kjeldahl tüplerine birer tane Kjeldahl tableti atılmıştır. Devamında tüplere 25 ml derişik sülfirik asit (%36,5 saflıkta) eklenmiştir. Bir sonraki aşamada tüpler Kjeldahl düzeneğine (behr Labor-Technik GmbH, Almanya) yerleştirilip yakma işlemi gerçekleştirilmiştir. Yakma işlemi tüplerin içindeki sıvının rengi yeşile dönene kadar devam etmiş ve bu gözlemin ardından karışım 30 dk daha yakılıp karışımın oda sıcaklığına gelmesi için 20 dk çeker ocakta (Tura Çelik, TÇ-STAR 120, 2200x1200x750 mm, İstanbul, Türkiye) beklenmiştir. Bunu takiben erlenlere 25 ml borik asit eklenmiştir. Devamında erlenlere pasteur pipeti ile 1 damla metilen mavisi, 3 damla metilen kırmızısı eklenip karıştırma uygulanmıştır

(100 rpm, 1 dk). Distilasyon kolonunda (UDK 139, VELP Scientifica, İtalya) ilgili bölümlere erlen ve Kjeldahl tüpü yerleştirilip 5 dk distilasyon yapılmıştır. Distilasyon sonrasında erlen 0,1 M HCl asit ile titre edilmiştir. Harcanan HCl asit hacmi not edilip Denklem 3.5'te verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$P = \frac{1,401 \times (v_T - v_b) \times N_{HCl} \times F}{m} \quad (3.5)$$

P: Protein miktarı (%)

$V_T$ : Titrasyonda harcanan HCl miktarı (ml)

$V_b$ : Şahit numune için titrasyonda harcanan 0,1 M HCl miktarı (ml)

$N_{HCl}$ : Titrasyonda kullanılan HCl çözeltisinin normalitesi (0,1)

m: Numune kütlesi (g)

F: Dönüşüm faktörü (buğday ruşeymi için 5,7)

### 3.10. Briks analizi

Briks analizi amacıyla ruşeym protein hidrolizatları pasteur pipeti ile alınıp bir damla Briks cihazına (Dijital Abbe Refraktometre, WYA 2S Model) yerleştirilmiş ve Briks ölçümü yapılmıştır.

### 3.11. Serbest Amino Asit Analizi

Ruşeym protein hidrolizatlarının serbest amino asit ölçümü Kuhn ve diğerleri (2023) tarafından bildirilen yöntemde küçük değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Ruşeym protein hidrolizatları 0,45 µm gözenek çaplı PVDF (polivinilden diflorid) şırınga ucu filtre ile süzülmüştür. Ön kolon fenilizotiyosiyanat (PITC) kullanılarak türevlendirilmiştir. Amino asit kantifikasyonu için UV-VİS dedektör (SPD-M20A), pompa/solvent dağıtıcı modül (LC-20AD) ve kolon fırını (CTO-10AS VP) ile donatılmış bir sıvı kromatografisi cihazı (Prominence LC-20A, Shimadzu Corporation, Japonya) kullanılmıştır. Kolon fırını sıcaklığı 50°C olan bir Luna Phenomenex (Danaher Corporation, Torrance, ABD) ters fazlı kromatografi kolonu (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) kullanılmıştır. Mobil faz A 25 ml asetonitril ile karıştırılan 975 ml 0,07 M sodyum asetat trihidrat (pH 6,5) ile mobil faz B 450 ml asetonitril, 150

ml metanol ve 400 ml ultra saf su karıştırılarak hazırlanmıştır. Mobil fazın akış hızı 1 ml.dk<sup>-1</sup> olarak ayarlanıp, iç standart olarak aminobütirik asit kullanılmıştır. Ultraviyole (UV) dedektör kullanılarak 254 nm dalga boyunda ruşeym protein hidrolizatlarının serbest amino asit ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

### 3.12. Taguchi Yöntemi

Taguchi yöntemi, deneysel çalışmalarda uygulanan proses parametrelerinden hangisinin ya da hangilerinin daha etkili olduğunu belirlemeyi ve daha az veri ile optimum sonuca ulaşmayı hedeflemektedir. Bu yöntem zamanın ve kaynağın daha verimli kullanımına olanak sağlamaktadır (Babaki vd., 2017). Taguchi tasarım yöntemi yanıt yüzey metodolojisi, tam faktöriyel tasarım, özel model ve bileşik merkezi tasarım gibi klasik deney tasarım yöntemlerine kıyasla nispeten az sayıda test kullandığı için daha pratik bir optimizasyon yaklaşımıdır (Duran-Jimenez vd., 2014; Khanna ve Davim, 2015). Taguchi analizinde deney tasarımı, seçilen her parametrenin farklı seviyeleri test etmesine göre oluşturulmaktadır ve birbirinden bağımsız değişkenler parametre olarak belirlenmektedir. Belirlenen parametrelere göre seviye oluşturulup ortaya çıkan deney tasarımına “ortogonal dizi” adı verilmektedir (Cimbala, 2014). Taguchi yönteminde ortogonal diziyeye uygun koşullarda deneyler yapılmakta ve elde edilen veriler S/N (sinyal/gürültü, signal/noise) oranına dönüştürülerek optimum değere ulaşılmaktadır (Bilga vd., 2016). Mevcut çalışmada L25 Taguchi deney tasarımında ruşeym protein hidrolizatlarının faktörleri Tablo 3.1’de verildiği gibi US 1-US 2 muamele süreleri, Alkalaz-Flavourzyme konsantrasyonları ve ultrafiltrasyon işleminde hacimsel konsantrasyon oranı olarak seçilmiştir. US 1 ve US 2 faktörleri için 0-48 dk aralığında 12 dk’lık artışlarla 5 farklı seviye belirlenmiştir. Alkalaz ve Flavourzyme ile yürütülen ön denemelerle ruşeym protein hidrolizatlarına maksimum etki eden enzim miktarları (Alkalaz 2 AU/ml, Flavourzyme 1:5 [enzim/protein]) bulunmuştur. Maksimum etkiye sahip Alkalaz ve Flavourzyme enzim miktarları %100 olarak kabul edilerek %0-100 arasında %20’lik artışlarla 5 farklı seviye belirlenmiştir. Ruşeym protein hidrolizatları 50 kDa kasetten farklı hacimsel konsantrasyon oranları belirlenerek 5 farklı seviyede (0,4,6,8 ve 10 kat hacimsel konsantrasyon) ultrafiltrasyon işlemi yapılmıştır. Faktör ve seviyeler, literatürdeki bulgular ve gerçekleştirilen ön denemeler (sonuçlar verilmemiştir) ışığında belirlenmiştir.

**Tablo 3.1:** Taguchi analizinin optimizasyon sürecinde belirlenen faktörler ve seviyeler

Faktör	Birimler	Seviye				
		1	2	3	4	5
Ultrason 1	Dk (0-48)	0	12	24	36	48
Ultrason 2	Dk (0-48)	0	12	24	36	48
Alkalaz	2 AU/ml (%20-%100)	20	40	60	80	100
Flavourzyme	1:5 (enzim/protein) (%20-100) (v/v)	20	40	60	80	100
Ultrafiltrasyon	Hacimsel konsantrasyon (0-10 kat)	0	4	6	8	10

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Belirlenen faktör ve seviyelere göre Tablo 3.2’de görülen L25 ortogonal dizi oluşturularak ruşeym protein hidrolizatlarının elde edilmesinde uygulanmıştır. L25 ortogonal dizi ruşeym protein hidrolizatları için faktörlerin farklı seviyelerinin denenip optimum seviyelerin belirlendiği 5 faktör, 5 seviyeye sahip deney tasarımıdır. L25 Taguchi tasarımına göre elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının deney sonuçları S/N’ye dönüştürülerek analiz edilmiştir.

**Tablo 3.2:** Taguchi analizine göre ruşeym protein hidrolizatlarının elde edilmesinde kullanılan L25 deneysel tasarımı

<b>D deney No.</b>	<b>Ultrasonik muamele 1 (0-48 dk)</b>	<b>Ultrasonik muamele 2 (0-48 dk)</b>	<b>(2AU/ml) Alkalaz (0- 100%)</b>	<b>(1e/5p) Flavourzyme (0- 100%)</b>	<b>Ultrafiltrasyon Konsantrasyonu (0-10 kat)</b>
1	12	12	20	20	0
2	12	24	40	40	4
3	12	36	60	60	6
4	12	48	80	80	8
5	12	0	100	100	10
6	24	12	40	60	10
7	24	24	60	80	0
8	24	36	80	100	4
9	24	48	100	20	6
10	24	0	20	40	8
11	36	12	60	100	8
12	36	24	80	20	10
13	36	36	100	40	0
14	36	48	20	60	4
15	36	0	40	80	6
16	48	12	80	40	6
17	48	24	100	60	8
18	48	36	20	80	10
19	48	48	40	100	0
20	48	0	60	20	4
21	0	12	100	80	4
22	0	24	20	100	6
23	0	36	40	20	8
24	0	48	60	40	10
25	0	0	80	60	0

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur

Mevcut çalışmada ruşeym protein hidrolizatlarının serbest amino asit, DPPH süpürme aktivitesi, TFİ ve %DH analizlerinin istatistiksel sonuçları incelenerek optimize özelliklere sahip örnek belirlenecektir. Ruşeym protein hidrolizatları için birincil yanıt (response) parametresi olarak serbest amino asit değeri belirlenmiştir. Bu sebeple serbest amino asit değeri birincil etken olarak değerlendirilmektedir. Literatür taraması yapıldığında amino asitlerin, bitkilerde büyüme ve gelişmeyi desteklediği, stres koşullarında bitkinin dayanımına katkı sağladığı araştırmalar ile kanıtlanmıştır (Barneix ve Causin, 1996; Khan vd., 2019; Paul vd., 2019). Serbest amino asitler tarım dışında pek çok sektör için de önemli bir öğedir, örneğin hayvan beslenmesinde hayvan mamalarına serbest amino asit takviyesi yapılmaktadır. Blaza ve diğerlerinin (1982) yürüttüğü çalışmada büyüme dönemindeki Labrador cinsi köpeklerin mamalarına %0,57 veya %0,74 metiyonin ilave edilmesinin büyüme performansını (vücut ağırlığını) arttırdığı raporlanmıştır.

S/N yanıt tablosunda bulunan delta değeri bir faktörün en büyük değeri ile en küçük değeri arasındaki farkı vermektedir (Khanna ve Davim, 2015). Delta değeri en büyük olan faktör, optimum değeri diğer faktörlerden daha çok etkilemektedir. S/N, yanıtta istenen değer çıkarılması ile belirlenen bir değerdir. “S” (sinyal, signal) istenen değeri, “N” (gürültü, noise) ise istenmeyen değeri göstermektedir. S/N oranına ait 3 farklı kategori bulunmaktadır: Daha küçük olan daha iyi, daha büyük olan daha iyi ve nominal olan daha iyi şeklindedir (Kumar vd., 2015). Serbest amino asit, DPPH süpürme aktivitesi, TFİ ve %DH analizlerinin istatistiksel sonuçları incelenerek optimum örnek belirlenmiştir.

Ruşeym protein hidrolizatlarında maksimum % serbest amino asit verimi, TFİ, DPPH süpürme aktivitesi ve %DH değeri istendiği için “daha büyük olan daha iyi” kriteri uygulanmıştır. Seçilen bu kritere göre S/N oranı Denklem 3.6’da gösterilmektedir. Denklem 3.6’da sunulan “n” değeri ölçüm sayısını ifade ederken “y” ise mevcut çalışmada bağımlı değişken için ölçülen değeri göstermektedir.

$$\frac{S}{N} = -10 \log_{10} \left( \frac{\sum \left( \frac{1}{y^2} \right)}{n} \right) \quad (3.6)$$

### 3.12.1. Varyans Analizi (ANOVA)

ANOVA, faktörlerin göreceli önemini tahmin etmede kullanılmaktadır. ANOVA tablosunda serbestlik derecesi, katkı yüzdesi ve varyans değerleri yer almaktadır. Katkı yüzdesi optimum sonucu etkileme yüzdesi olarak tanımlanabilir. Katkı yüzdesi en yüksek olan faktörün, optimum değer için diğer faktörlerden daha etkili olduğu anlamına gelmektedir (Khanna ve Davim, 2015).

Faktörlerin S/N oranların hesabı “Minitab®18” (State College, PA, ABD) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Faktörlerin optimum sonuçlarını belirlemek için yanıt ve ANOVA tabloları kullanılmıştır.



## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

### BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada serbest amino asit değerinin birincil optimizasyon kriteri olarak belirlendiği ve ruşeym protein hidrolizatlarının elde edilmesinde Taguchi yaklaşımının uygulandığı bir tasarım yürütülmüş elde edilen bulgulara bu bölümde yer verilmiştir.

#### 4.1. Ruşeymin ve Ruşeym Protein İzolatının Kompozisyonel Analizi

Mevcut projede kullanılan endüstriyel buğday ruşeyminin kompozisyonel analiz sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir. Tablo 4.1’deki verilere göre buğday ruşeyminin yaklaşık olarak %5,6 nem, %21,5 protein ve %4 kül içerdiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla mevcut çalışmada ruşeym protein hidrolizatları elde etmek için kullanılan başlangıç materyali olan ruşeymin yüksek protein değerine sahip olduğu gözlenmiştir. Buğday ruşeymine ait kompozisyonel veriler literatürdeki veriler ile kıyaslandığında sonuçların benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Karami ve diğerlerinin (2019) yürüttüğü çalışmada kullandığı buğday ruşeym örneğinin nem değerinin %10,6, kül miktarının %3,6 ve protein içeriğinin %26,2 olduğu belirlenmiştir.

**Tablo 4.1:** Endüstriyel buğday ruşeyminin besin kompozisyonunun dağılımı

Buğday Ruşeymi Bileşimi (%)	
Nem	5,6±0,4
Protein	21,5±1,7
Kül	4,0±0,2

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Ruşeym kullanılarak AE-İÇ yöntemiyle elde edilen ruşeym protein izolatının kompozisyon analiz sonuçları Tablo 4.2’de yer almaktadır. Ruşeym protein izolatı %78,3 protein, %3,1 kül ve %1,4 nem içeriğine sahiptir. Rahbari ve diğerlerinin (2015) yürüttüğü çalışmada elde edilen ruşeym protein izolatının kompozisyonu %85,3

protein, %4,7 kül ve %3,2 nem değeri şeklinde olup mevcut çalışmadaki sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Buğday ruşeyminden protein izolatu elde edilmesi süreci sınırlı verimlilik göstermektedir (<%10). Bu çalışmada uygulanan AE-İÇ protein izolasyon yöntemiyle, 100 gramlık ruşeym numunesinden yaklaşık 5-10 g ruşeym protein izolatu elde edilmiştir. Ancak L25 deneme desenindeki her bir ruşeym protein hidrolizat örneklerinin hazırlanmasında kullanılan cam reaktörün ultrasonik sistemin etkin çalışabilmesi için (cam reaktörde ultrason probunun karışımın içine daldırılabilmesi için) ruşeym karışımının en az 1300 gramlık kütleyle sahip olması gerekmektedir. Bu nedenle, cam reaktör ultrasonik sistemin etkin çalışabilmesi için, en az 120 g ruşeym örneği ve 1200 ml saf su kullanılması gerekmektedir. Bu sebeple mevcut projede L25 deneme desenindeki her bir örneğin hazırlanabilmesi için 120 g ruşeym protein izolatu elde edilmesi hedeflenmekte olup, protein izolasyon yönteminde her seferinde 100 g ruşeym kullanılması durumunda, bu işlemin yaklaşık 12-24 kez tekrarlanması gerekmektedir. Cam reaktörde 120 g ruşeym yerine doğrudan ruşeym protein izolatu kullanıldığında, 25 örnekten oluşan L25 deneme deseninin her biri için yaklaşık 1200 ile 2400 g ruşeym kullanılması gerekmektedir. Bu gereklilikler dikkate alındığında, mevcut projede ruşeym protein izolatu hazırlama sürecinin zaman ve maliyet açısından dezavantaj oluşturduğu sonucuna varılmıştır.

Buna bağılı olarak hidrolizat üretimi için protein izolatları yerine doğrudan ruşeym kullanılarak cam reaktörde hidroliz denemeleri yapılmış ve serbest amino asit içeriği (%), hidroliz derecesi vb. karakteristik özelliklerin kabul edilebilir düzeyde olması nedeniyle (sonuçlar gösterilmemiştir) çalışmanın ilerleyen safhalarında ruşeym protein izolatu yerine ruşeym kullanılmıştır.

**Tablo 4.2:** Ruşeym protein izolatının nem, kül ve protein (%) içeriği

Analizin İsmi	Ruşeym Protein İzolatı (%)
Protein	78,26±0,50
Kül	3,05±0,46
Nem	1,41±0,27

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Mevcut çalışmada protein hidrolizatları eldesinde ultrason destekli enzimatik hidrolizden yararlanılmıştır. Bu amaçla öncelikle farklı sürelerde US 1 ve US 2 ultrasonik muameleleri uygulanmıştır. Ardından selüloz enzimi kullanılarak selüloz, hemiselüloz ve lignin gibi liflerin parçalanması ve proteolitik hidrolizin kolaylaşması sağlanmıştır. Bunu takiben sırasıyla Alkalaz ve Flavourzyme kullanılarak proteoliz gerçekleştirilmiştir. Bir sonraki aşamada kaba filtre kağıdıyla süzme ve santrifüj uygulanarak protein hidrolizatları dispersiyon halinde elde edilmiştir. Son aşamada ultrafiltrasyon tekniği kullanılarak protein hidrolizatları boyut dağılımlarına bağlı olarak fraksiyonlamıştır. Taguchi optimizasyon metodu kullanılarak ruşeym protein hidrolizatlarının üretimi için kullanılan ultrasonik muamele süreleri, proteolitik enzim konsantrasyonları, ultrafiltrasyon işleminde hacimsel konsantrasyon oranı parametrelerinin etkinliğinin belirlenmesi ve prosesin optimize edilmesi sağlanmıştır. L25 ortogonal dizi kullanılarak oluşturulan deney tasarımı uygulanmıştır. Elde edilen 25 farklı ruşeym protein hidrolizatına serbest amino asit (%), TFI, %DH ve DPPH süpürme aktivitesi analizleri yapılmıştır. Serbest amino asit (%) değeri, birincil değerlendirme kriteri olarak seçilmiş ve veriler istatistiksel analizlerle değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler ışığında optimum parametreler belirlenmiştir. Belirlenen parametreler yeniden uygulanarak optimize protein hidrolizatları elde edilmiştir. Oluşturulan optimize protein hidrolizatlarına ve bu hidrolizatların etüvde konsantre edilmiş (45°C, 72 saat, 9,8 kat kütleli konsantrasyon) formuna serbest amino asit (%), TFI, DH (%) ve DPPH süpürme aktivitesi ile şeker, Briks, organik karbon, kül ve protein içeriği analizleri yapılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

Literatürde farklı frekansta ultrasonik muamelelerin, protein hidrolizatları eldesinde uygulandığı çalışmalar bulunmaktadır. Dabbour ve diğerlerinin (2019) yürüttüğü çalışmada 220 W güçte çift frekanslı (20 ve 40 kHz) ultrasonik muamele ile ayçiçeği küspesi protein hidrolizatları elde edilmiştir. Çalışmada ultrasonik muamelenin ayçiçeği küspesi protein hidrolizatları antioksidatif aktiviteyi ve amino asitlerin salınmasını olumlu yönde etkilediği rapor edilmiştir. Söz konusu çalışmada, sonikasyon dalgalarının karışımında kaviteasyon etkisi oluşturduğu ve bu etkinin proteinlerin bozulmasına ve proteinin yapısında değişikliklere yol açabileceği bildirilmiştir. Ultrasonik işlem ile protein yapısında meydana gelen değişimler sonucunda proteinin hidrofobik gruplarının açığa çıkacağı ve bu şekilde proteinin çözünürlüğünü arttıracığı düşünülmektedir. Aynı zamanda ultrasonun kaviteasyon

veriminin artırılması amacıyla ultrasonik frekansların sayısı artırılabilirliği anlaşılmaktadır (Zhu vd., 2020).



**Şekil 4.1:** Ruşeym protein hidrolizatlarının hazırlanma süreci

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Jin ve diğerlerinin yürüttüğü (2014) çalışmada ise çoklu frekanslı ultrasonun mısır gluten ununun enzimolizi ve yapısal özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir. Bu amaçla önce mısır gluten ununun bulunduğu reaktörün alt ( $68\pm 2$  kHz) ve üst tabanına ( $28\pm 2$  kHz) farklı ultrasonik probalar yerleştirilmiştir. Bunu takiben Alkalaz enzimi ile proteolitik hidroliz işlemi uygulanmıştır ve çoklu frekanslı ultrasonik muamelelerin numunelerde hidroliz derecesini arttırdığı rapor edilmiştir. Literatürde çoklu frekanslı ultrasonik muamelelerin, proteolitik enzimlerin hidroliz verimini artırması amacıyla kullanımına ilişkin başka çalışmalar da yer almaktadır (Ding vd., 2022; Ge vd., 2023). Mevcut çalışmada 26 kHz (200 W) ve 20 kHz (400 W) frekans ve güç (parantez içinde verilmiştir) sağlayan olmak üzere 2 farklı ultrasonik muamele uygulanmıştır. Bu şekilde proteinlerin enzimatik hidrolizi öncesi uygulanan ultrasonik muamele ile

proteinin yapısında ve konformasyonunda değişikliklere yol açarak proteolitik enzimlerin daha etkin çalışması amaçlanmıştır. Gerçekleştirilen diğer bir çalışmada BSA (bovine serum albumin, sığır serum albümini) çözeltileri kullanılarak ultrasonik muamelenin etkisi incelenmiştir. Elde edilen verilere göre BSA'nın 90 dakikalık ultrasonik muamele sonrası parçacık boyutunun 3,4 kat arttığı ve BSA'nın ikincil yapısında değişiklik olduğu raporlanmıştır (Gülseren vd., 2007).

Proteinlere ultrasonik muamele uygulanmasıyla birlikte disülfür bağlarının kırıldığı ve numunede serbest disülfür içeriğinin arttığı bildirilmiştir. Aynı zamanda kükürt kimyasında değişiklikler ortaya çıktığı bulgulanmıştır (Gülseren vd., 2007). Ultrasonik kaviteasyon bölgesinde üretilen kesme enerjisine sahip dalgalar, proteinlerin disülfür bağlarını kırarak proteinin stabilizasyonunu azaltmaktadır. Buna ek olarak ultrasonik muamelenin hidrojen bağlarını zayıflattığı bildirilmiştir. Böylelikle protein hidrolizi öncesi uygulanan ultrasonik muamelesi, proteinin çözünürlüğünü arttırarak proteolitik hidrolizi kolaylaştırmaktadır (Hu vd., 2013b; Pan vd., 2020). Buna ek olarak proteinler ultrasonik muamele sonrası kısmi denatürasyona uğramaktadır (YanJun vd., 2014). Öte yandan, söz konusu yapısal değişikliklerin proteinlerin parçalanabilirliğinin yanında yüzey aktivitesini de iyileştirdiği anlaşılmıştır.

Mevcut çalışmada L25 deneme desenindeki ultrasonik muameleler yapılmış, Alkalaz ve Flavourzyme enzimleriyle proteinler hidrolize uğratılmış ve ultrafiltrasyon işleminde hacimsel konsantrasyon gerçekleştirilerek elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarına DPPH süpürme aktivitesi, TNBS, TFİ ve serbest amino asit analizleri (%) uygulanmıştır. Tablo 4.3 ve 4.4'te elde edilen analiz sonuçlarına yer verilmiştir.

**Tablo 4.3:** Ultrasonik muamelelerin ardından, Alkalaz ve Flavourzyme enzimleri kullanılarak elde edilen L25 desenindeki ruşeym protein hidrolizatlarına uygulanan DPPH süpürme aktivitesi, TFI ve DH değeri analiz sonuçları

<b>RUŞEYM PROTEİN HİDROLİZATLARI</b>			
<b>Deney No.</b>	<b>TFİ (mg GAE.100 g<sup>-1</sup>)</b>	<b>DPPH (mg TE.100 g<sup>-1</sup>)</b>	<b>DH (%)</b>
1	133,3±4,5	23,7±0,5	16,6±0,2
2	124,5±3,2	24,4±0,3	14,0±0,3
3	134,4±0,8	23,3±1,3	16,1±0,7
4	134,1±11,7	24,8±0,1	16,7±0,6
5	134,4±8,3	25,2±0,9	17,9±1,5
6	147,1±1,3	25,2±0,2	14,7±0,7
7	159,4±0,8	18,9±1,1	22,1±0,4
8	158,3±6,1	33,9±1,0	15,9±0,8
9	175,6±13,9	39,3±0,0	15,9±1,2
10	148,5±7,5	26,4±1,0	17,1±0,5
11	185,0±5,6	32,6±0,3	19,0±0,5
12	155,4±4,3	31,0±0,3	16,9±0,2
13	201,1±4,4	30,1±0,3	20,3±0,2
14	142,3±8,3	36,7±0,6	14,2±0,4
15	150,9±5,1	32,3±0,1	16,2±0,5
16	160,2±4,8	21,0±0,2	16,4±0,2
17	173,8±12,5	36,2±0,2	17,6±0,3
18	145,5±4,0	33,0±0,6	17,9±0,6
19	207,1±5,9	35,0±0,5	21,7±0,3
20	160,9±4,4	33,8±0,0	17,6±0,2
21	159,9±6,1	32,4±0,1	19,1±0,1
22	143,7±11,7	30,5±0,3	20,2±1,2
23	159,4±1,3	35,0±0,3	17,2±0,2
24	149,4±2,1	29,4±1,3	11,9±0,2
25	179,9±2,1	25,6±0,3	19,2±1,1

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

#### 4.2. Ruşeym Protein Hidrolizatlarının Serbest Amino Asit İçeriği

Buğday ruşeymine farklı sürelerde (0-48 dk) US 1 ve US 2 ultrasonik muameleleri uygulanmıştır. Bunu takiben selüloz (%0,1 w/w) ile selüloz, lignin ve hemiselüloz gibi karbonhidrat yapıları parçalanmış, ardından Alkalaz (2 AU/ml, %0-100) ve Flavourzyme (1g enzim/5 g protein, %0-100) ile proteolitik hidroliz gerçekleştirilmiştir. Bir sonraki aşamada protein hidrolizatlarının fraksiyonlanması amacıyla ultrafiltrasyon (0-10 kat hacmen konsantrasyon) işlemi yapılmıştır. Ruşeym protein hidrolizatları elde edilmesinde L25 Taguchi tasarım yönteminden yararlanılmıştır. Materyal-metot bölümünde Tablo 3.1’de belirtildiği şekilde US 1-US 2 ultrasonik muamele süreleri, Alkalaz-Flavourzyme konsantrasyonları ve ultrafiltrasyon yöntemiyle gerçekleştirilen fraksiyonlama işlemi faktör seçilerek, farklı seviyelerde denenmiştir. Serbest amino asit (%) analizi L25 Taguchi tasarımı doğrultusunda elde edilen 25 farklı ruşeym protein hidrolizatı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Ruşeym protein hidrolizatlarının serbest amino asit (%) sonuçlarının değerlendirilmesi amacıyla “daha büyük daha iyidir” parametresi seçilerek, her bir faktörün serbest amino asit (%) değerine katkı oranı belirlenmiştir.

Tablo 4.4’te L25 Taguchi tasarımına göre elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının serbest amino asit (%) değerlerine yer verilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda ruşeym protein hidrolizatlarının serbest amino asit değerleri %0,59-1,36 aralığında değerler almıştır. Üç numaralı deneme US 1 muamele süresi 12 dk, US 2 muamele süresi 36 dk, Alkalaz (2 AU/ml %100 olmak üzere) konsantrasyonu %60 oranında, Flavourzyme (1 g enzim/5 g protein %100 olmak üzere) konsantrasyonu %60 oranında ve ultrafiltrasyon yöntemiyle 6 kat hacmen konsantre edilerek üretilen buğday ruşeymi protein hidrolizatları en düşük serbest amino asit (%) değerini (%0,59) vermiştir. En yüksek serbest amino asit (%) değerini (%1,36) ise 19 numaralı deneme olan US 1 muamele süresi 48 dk, US 2 muamele süresi 48 dk, Alkalaz %40 oranında, Flavourzyme %100 oranında ve ultrafiltrasyon ile fraksiyonlama uygulanmamış olan ruşeym protein hidrolizatları vermiştir. Ruşeym protein hidrolizatlarında faktörlerin (US 1-US 2 muamele süreleri, Alkalaz-Flavourzyme konsantrasyonları ve ultrafiltrasyon hacimsel konsantrasyon oranı) farklı seviyelerde uygulanması sonucu elde edilen serbest amino asit (%) sonucunun en düşük ve en yüksek değerler arasında yaklaşık 2 kata karşılık gelen bir farklılık söz konusudur. Böylelikle faktörlerin optimum seviyeleri belirlenerek, ruşeym protein hidrolizatlarının hazırlanması

sonucunda serbest amino asit (%) değerinin optimize edilebileceği anlaşılmaktadır.

Tablo 4.4'te verilen ruşeym protein hidrolizatlarının serbest amino asit değerlerine bakılarak, hidrolizatlarda hidroksi prolin amino asidi bulunmadığı görülmektedir. Tablodaki veriler doğrultusunda, glutamik asit, arginin, alanin, valin ve lizin amino asitlerinin, diğer amino asit türlerine kıyasla ruşeym protein hidrolizatlarında daha yüksek oranlarda bulunduğu görülmektedir. Sistein amino asidinin 25 farklı ruşeym protein hidrolizatlarından sadece 2 örnekte (17 ve 19 numaralı örnekler) bulunduğu belirtilmiştir. Yang ve diğerlerinin (2017b) yaptığı çalışmada buğday ruşeymi protein hidrolizi öncesi 28 ve 40 kHz çift frekanslı ( $60\text{W.L}^{-1}$  ultrasonik güç yoğunluğu) ultrasonik ön işlem uygulanmıştır. Bir sonraki adımda Alkalaz ile enzimatik hidroliz gerçekleştirilerek ruşeym protein hidrolizatları elde edilmiştir. Söz konusu çalışmada toplam hidrofobik serbest amino asitlerin konsantrasyonu  $121,9\ \mu\text{g.ml}^{-1}$  olduğu bulunmuştur. Sırasıyla Ala, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Thr ve Pro serbest amino asitlerin konsantrasyonları %1,425, %0,873, %0,866, %0,676, %2,115, %1,59, %3,598 ve %1,044 şeklindedir. Söz konusu çalışmada ruşeym protein hidrolizatlarında serbest amino asit konsantrasyonunun mevcut çalışmada elde edilen konsantrasyondan daha fazla olduğu görülmektedir. Söz konusu farklılıklara kısmen protein ekstraksiyonun ve farklı ultrasonik muamelelerin etkilediği düşünülmektedir.

**Tablo 4.4:** L25 Taguchi yöntemine göre hazırlanmış ruşeym protein hidrolizatlarının serbest amino asit değerleri (%)

Amino Asit	Ruşeym Protein Hidrolizatlarının Serbest Amino Asit Değerleri (% w/w)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Hidroksi prolin	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
Histidin	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03	0,03	0,00	0,00	0,037	0,00	0,038	0,033	0,034
Asparagin	0,06	0,05	0,05	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06	0,000	0,05	0,079	0,078	0,077
Serin	0,08	0,07	0,00	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,000	0,07	0,084	0,087	0,081
Glutamin	0,07	0,09	0,08	0,08	0,08	0,10	0,01	0,08	0,000	0,09	0,041	0,021	0,035
Arginin	0,16	0,13	0,00	0,11	0,16	0,16	0,15	0,14	0,000	0,13	0,041	0,000	0,085
Glisin	0,08	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,045	0,08	0,042	0,035	0,034
Aspartik asit	0,04	0,00	0,00	0,03	0,03	0,01	0,04	0,04	0,000	0,00	0,063	0,052	0,059
Glutamik asit	0,06	0,03	0,06	0,07	0,05	0,05	0,13	0,06	0,023	0,04	0,123	0,139	0,142
Treonin	0,06	0,05	0,05	0,07	0,07	0,07	0,06	0,06	0,075	0,05	0,079	0,077	0,077
Alanin	0,13	0,11	0,11	0,13	0,13	0,13	0,12	0,12	0,117	0,11	0,115	0,120	0,113
Prolin	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,023	0,00	0,025	0,016	0,023
Sistein	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
Lisin	0,11	0,09	0,08	0,11	0,11	0,11	0,10	0,10	0,000	0,08	0,113	0,111	0,114
Tirozin	0,00	0,03	0,00	0,00	0,04	0,04	0,00	0,04	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
Metionin	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,00	0,031	0,00	0,029	0,029	0,030
Valin	0,10	0,09	0,09	0,10	0,10	0,10	0,09	0,10	0,099	0,08	0,103	0,100	0,102
Izolösin	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,067	0,00	0,069	0,067	0,067
Lösin	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,127	0,00	0,130	0,128	0,128
Fenilalanin	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,055	0,00	0,054	0,052	0,058
Triptofan	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,014	0,00	0,013	0,013	0,012
<b>Toplam</b>	<b>0,95</b>	<b>0,82</b>	<b>0,59</b>	<b>0,99</b>	<b>1,05</b>	<b>1,05</b>	<b>0,91</b>	<b>0,95</b>	<b>0,71</b>	<b>0,78</b>	<b>1,24</b>	<b>1,16</b>	<b>1,27</b>

Tablo 4.4'ün Devamı

Amino Asit	Ruşeym Protein Hidrolizatlarının Serbest Amino Asit Değerleri (% w/w)											
	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Hidroksi Prolin	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,00	0,00	0,000	0,00	0,00
Histidin	0,017	0,032	0,033	0,036	0,03	0,039	0,029	0,03	0,03	0,030	0,00	0,03
Asparagin	0,057	0,076	0,076	0,082	0,06	0,083	0,067	0,06	0,07	0,070	0,05	0,07
Serin	0,061	0,080	0,075	0,088	0,07	0,091	0,066	0,08	0,09	0,075	0,07	0,09
Glutamin	0,022	0,030	0,041	0,045	0,11	0,061	0,039	0,07	0,13	0,013	0,07	0,01
Arginin	0,043	0,027	0,054	0,063	0,14	0,026	0,042	0,08	0,17	0,094	0,13	0,14
Glisin	0,023	0,039	0,027	0,032	0,08	0,046	0,023	0,07	0,09	0,034	0,07	0,06
Aspartik asit	0,040	0,060	0,037	0,061	0,01	0,066	0,032	0,03	0,02	0,046	0,01	0,06
Glutamik asit	0,108	0,144	0,101	0,125	0,04	0,139	0,088	0,07	0,05	0,136	0,04	0,18
Treonin	0,048	0,076	0,075	0,082	0,06	0,087	0,067	0,07	0,07	0,070	0,05	0,08
Alanin	0,094	0,113	0,112	0,121	0,11	0,125	0,101	0,12	0,14	0,107	0,11	0,13
Prolin	0,016	0,024	0,018	0,017	0,00	0,030	0,015	0,00	0,00	0,018	0,00	0,02
Sistein	0,000	0,000	0,000	0,004	0,00	0,004	0,000	0,00	0,00	0,000	0,00	0,00
Lisin	0,093	0,109	0,108	0,118	0,09	0,123	0,095	0,10	0,11	0,100	0,09	0,12
Tirozin	0,000	0,000	0,000	0,000	0,04	0,000	0,000	0,00	0,04	0,000	0,03	0,00
Metionin	0,025	0,028	0,031	0,029	0,00	0,035	0,028	0,00	0,02	0,026	0,00	0,00
Valin	0,065	0,101	0,100	0,107	0,09	0,114	0,090	0,09	0,11	0,094	0,09	0,10
İzolösin	0,043	0,068	0,067	0,073	0,00	0,075	0,061	0,00	0,00	0,063	0,00	0,00
Lösin	0,109	0,126	0,131	0,136	0,00	0,139	0,120	0,00	0,00	0,120	0,00	0,00
Fenilalanin	0,044	0,054	0,053	0,054	0,00	0,064	0,049	0,00	0,00	0,050	0,00	0,00
Triptofan	0,009	0,008	0,011	0,015	0,00	0,014	0,011	0,00	0,00	0,010	0,00	0,00
<b>Toplam</b>	<b>0,92</b>	<b>1,19</b>	<b>1,15</b>	<b>1,29</b>	<b>0,92</b>	<b>1,36</b>	<b>1,02</b>	<b>0,87</b>	<b>1,13</b>	<b>1,16</b>	<b>0,81</b>	<b>1,09</b>

Tablo 4.5'te L25 Taguchi deney tasarımına göre hazırlanan ruşeym protein hidrolizatlarının serbest amino asit (%) analiz verimine ait S/N oranlarının yanıt tablosu verilmiştir. Faktörler “Varyans kaynakları”, her bir faktörün seviye sayının bir eksiği “SD” değeri (Serbestlik Derecesi), faktörün % serbest amino asit sonucunu etkileme yüzdesi “Katkı Oranı” şeklinde tanımlanmaktadır. Her bir faktöre ilişkin elde edilen sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı, “p değeri” aracılığıyla değerlendirilmektedir.

Tablo 4.5'te sunulan verilere göre buğday ruşeymi protein hidrolizatları üretilirken US 1 muamele süresi %39,7, US 2 muamele süresi %5,7, Alkalaz konsantrasyonu %15 Flavourzyme konsantrasyonu %11,9 ve ultrafiltrasyon hacimsel konsantrasyonu %19 oranında serbest amino asit (%) değerini etkilediği belirlenmiştir. Ultrasonik muamelelerde uygulanan güç ve frekans değerleri farklı olduğundan, bu faktörlerin ruşeym protein hidrolizatları üretim süreci üzerindeki etkileri de farklılık gösterdiği düşünülmektedir. Tablo 4.5'teki bulgular, ruşeym protein hidrolizatlarının üretiminde % serbest amino asit değerine US 1 muamele süresi faktörünün anlamlı düzeyde etkide bulunduğunu göstermektedir ( $p < 0,05$ ).

Ruşeym protein hidrolizatlarının üretiminde kullanılan Taguchi modelinin mevcut çalışmaya uygunluğu, Tablo 4.4'te belirtilen verilere göre %91,27 güven aralığı ( $R^2$ ) ile değerlendirilmiştir. Serbest amino asit değeri (%) esas alındığında, elde edilen sonuçlar bu modelin çalışma kapsamında geçerli ve uygun olduğunu ortaya koymaktadır.

**Tablo 4.5:** US 1-US 2 muamele süreleri, Alkalaz-Flavourzyme konsantrasyonları ve ultrafiltrasyon işleminde gerçekleşen hacimsel konsantrasyon oranının optimizasyonu sürecinde elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının serbest amino asit (%) içeriğine ait S/N oranlarının varyans analizi dağılımı

Varyans Kaynakları	SD	Katkı Oranı	F-Değeri	P-Değeri
US 1	4	39,72%	4,55	0,046
US 2	4	5,69%	0,65	0,656
Alkalaz	4	14,96%	1,71	0,307
Flavourzyme	4	11,93%	1,37	0,385
Ultrafiltrasyon	4	18,96%	2,17	0,236
Hata	4	8,73%		
<b>Toplam</b>	<b>24</b>	<b>100,00%</b>		

Sapma	R <sup>2</sup>
0,138615	91,27%

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

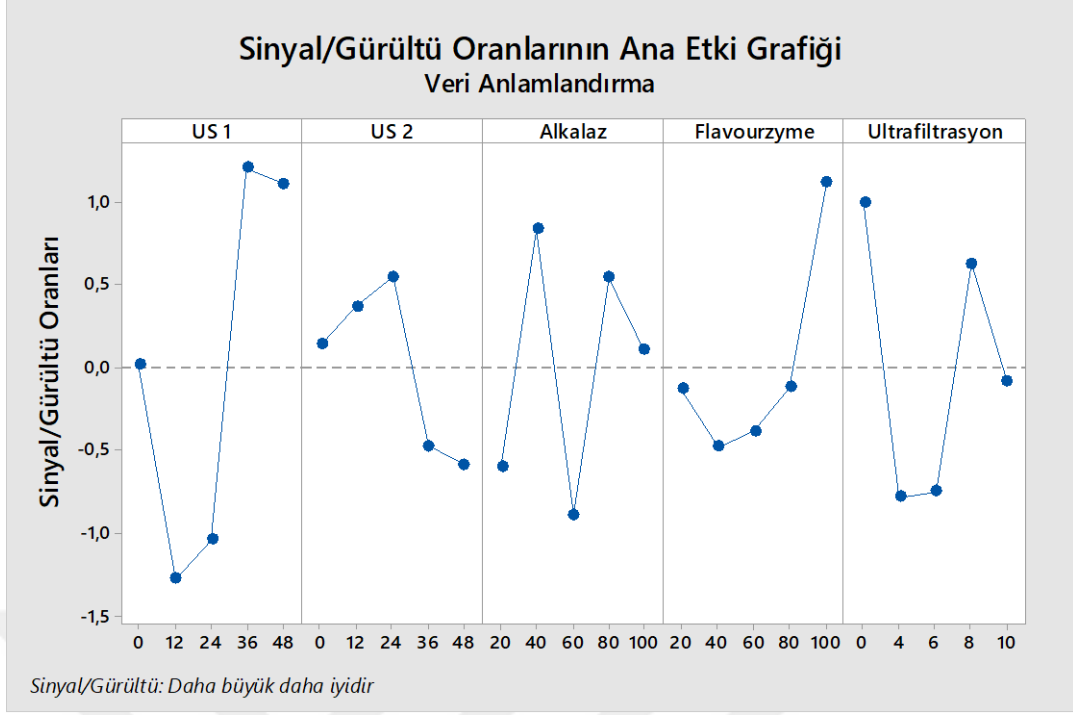
Şekil 4.2’de ruşeym protein hidrolizatlarının üretiminde serbest amino asidin (%) ana etki grafiğine yer verilmiştir. L25 deneme deseninde olan tüm ruşeym protein hidrolizatlarının serbest amino asit içeriği (%) verileri uygun istatistiksel yöntemler kullanılarak analiz edilmiş ve her bir faktörün optimum seviyesi grafikte gösterilmiştir. Serbest amino asit içeriği (%) verileri esas alınarak gerçekleştirilen optimizasyon işlemleri sonucunda, Şekil 4.2’de gösterildiği üzere US 1 muamele süresi 36 dk, US 2 muamele süresi 24 dk, Alkalaz oranı %40, Flavourzyme oranı %100 ve ultrafiltrasyon ile fraksiyonlama yapılmayan faktör seviye değerleri optimum parametreler olarak belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular doğrultusunda US 1 ve US 2 muamele süreleri arttıkça serbest amino asit içeriği (%) değerinin de arttığı ancak optimum ultrasonik muamele süresinin üzerindeki seviyelerde serbest amino asit değerinde bir azalma gözlemlendiği belirtilmiştir. US 1 ve US 2 muamele süreleri 60 dk olarak denenmiş ve 60 dakikadan daha az ultrasonik muamele süresi (0-48 dk) uygulanan hidrolizatlara

kıyasla serbest amino asit içeriđi (%) deęerinin daha dűşűk olduęu bulunmuřtur (sonuçlar gűsterilmemiřtir). Uzun sűreli ultrasonik muamelenin ruřeym protein hidrolizatlarında serbest amino asit deęerini olumsuz etkiledięi belirlenmiř; bu nedenle her 2 muamele için (US 1 ve US 2) maksimum ultrasonik muamele sűresi 48 dk ile sınırlandırılmıřtır.

Hidroliz derecesinin artıřı dolaylı olarak serbest amino asit deęerini de arttırmaktadır (Sajib vd., 2020). Bűylelikle optimum ultrasonik muamele sűresinin űzerinde uygulanması hem %DH deęerini hem de serbest amino asit deęerini olumsuz etkileyeceęi dűřűnűlmektedir (Siewe vd., 2021).

Ultrasonun proteinin ikincil ve űűncűl yapısında deęiřimlere yol açarak nispeten daha fazla parçalanma bűlgesi açıęa çıkardıęı ve enzim ile temasını kolaylařtırarak %DH'yi arttırdıęı rapor edilmiřtir (Wang vd., 2017). Ancak optimum ultrasonik muamele sűrelerinin űzerinde uygulanan ultrason seviyelerinde proteinin agregasyonuna neden olduęu bildirilmiřtir. Buna ek olarak ultrasonik muamele sűresinin optimumun űzerine çıkmasıyla birlikte proteinin yapısındaki katlanmaların deęiřtięi ve enzimatik proteoliz iřleminin bu durumdan olumsuz olarak etkilendięi űnceki çalıřmalarda raporlanmıřtır (Wu vd., 2018; Li vd., 2021; Wang vd., 2017; Jia vd., 2010)



**Şekil 4.2:** US 1-US 2 muamele süreleri, Alkalaz- Flavourzyme konsantrasyonları ve ultrafiltrasyon işleminde gerçekleşen hacimsel konsantrasyon oranının optimizasyonu sürecinde elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının serbest amino asit (%) içeriği için tasarım parametrelerinin ana etkilerinin değerlendirilmesi

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Literatürde ruşeym proteinlerinin enzimatik hidrolizine katkı sağlaması amacı ile ultrasonun kullanıldığı çalışmalar yer almaktadır (Tian vd., 2024; Qu vd.,2012; Jia vd., 2010). Örneğin kolajen proteinine enzimatik hidroliz uygulaması önce ultrasonik muamele uygulanmış ve ultrason uygulamasının hidroliz derecesini arttırdığı raporlanmıştır (Vidal vd., 2018).

Li ve diğerleri (2021) tarafından yürütülen çalışmada Plackett-Burman (PBD) ve Yüzey Yanıt Metodolojisi (Response Surface Methodology, RSM) tasarım yöntemleri kullanılarak %DH temel alınmış ve optimum sonuçlar sağlayan seviyeler belirlenmiştir. Maksimum %DH verimi %41,3 şeklinde belirlenmiştir. İstiridye protein hidrolizatlarının (nötr protez ve Flavourzyme ile proteoliz gerçekleştirilmiştir) yaklaşık 10 dk boyunca, 70 °C'de ısıtma ve ultrasonik muamele farklı sıralamalarla deneyerek serbest amino asit (%) içeriği ölçülmüştür. Söz konusu çalışmada istiridye protein hidrolizatlarının %41,3 gibi yüksek DH değerine sahip olmasına rağmen serbest amino asit değeri maksimum %0,9 olarak bulunmuştur. Mevcut çalışmada

maksimum DH değerinin %17,2 olmasına karşın maksimum serbest amino asit içeriği %1,36 olarak ölçülmüştür. Mevcut çalışmada kullanılan ham maddenin ruşeym olması, farklı optimizasyon tekniklerinin (Taguchi) uygulanması, hidroliz uygulama sıcaklığı, süresi, enzim ve diğer koşulların farklı olması mevcut çalışmadaki serbest amino asidin söz konusu çalışmadan nispeten daha yüksek olmasının sebepleri olarak düşünülmektedir.

Protein hidrolizatlarının tarım endüstrisinde kullanımı, meyve verimini arttırma, bitki büyümesini teşvik etme gibi olumlu etkiler sağlamıştır (Paskovi vd., 2024). Tarım uygulamaları sırasında ürün verimi, kritik bir önem taşımakta ve verimin artışında biyolojik uyarıcıların katkı sağladığı düşünülmektedir (Barneix and Causin, 1996; Bulgari vd., 2019; Khan vd., 2019; Ottaiano vd., 2021; Paul vd., 2019; Shahrajabian vd., 2021). Mpai ve diğerlerinin (2022) yürüttüğü araştırmada ticari olarak satılan amino asit bazlı protein hidrolizatları olan Phytostim® kullanılarak 2 farklı marul çeşidinin büyüme ve verim değişimi incelenmiştir. Çalışmada kullanılan Phytostim®, *Moringa oleifera* Lam bitkisinin enzimatik yöntemle üretilmiş protein hidrolizatlarıdır. Çalışmanın ıktılarına göre Phytostim® protein hidrolizatlarının optimum düzeyde kullanılması “Lara” ve “Elisa” şeklinde isimlendirilen 2 farklı marul çeşidi için bitki büyümesini (kök uzunluğu, gövde kalınlığı vb.) iyileştirdiği rapor edilmiştir. Söz konusu çalışmada bitki büyümesinde ve verim düzeyindeki artışın nedeni, kullanılan amino asit bileşiğinin bitkilerde büyüme ve gelişme sürecinde doğrudan katkı sağlamasına atfedilmektedir. Literatürde amino asit bazlı karışımların benzer sonuçları marul, roka gibi sebzelerde vererek büyüme ve verimin artışında rol oynadığı çalışmalar yer almaktadır (Abdelgawad vd., 2018; Carillo vd., 2019; Caruso vd., 2019; Khan vd., 2019; Shahrajabian vd., 2021). Benzer şekilde mevcut çalışmada elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının marul gibi bitkilerin büyümesini olumlu yönde teşvik edeceği ve hidrolizatlarda bulunan serbest amino asitlerin (hidrolizatlarda serbest amino asit içeriği %0,59-1,36) polipeptitlere kıyasla bitkinin kök ve yapraklarından daha hızlı emilerek bitkinin büyüme ve gelişmesine destek olacağı düşünülmektedir. Bu sebeple bu çalışmada elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının söz konusu çalışmadaki gibi marul bitkisinin yetiştirilmesinde kullanılması sonucu, bitkinin büyüme ve gelişimde olumlu etki edeceği öngörülmektedir.

### 4.3. Ruşeym Protein Hidrolizatlarının TNBS Yöntemi ile Belirlenen Hidroliz Derecesi Değerleri

L25 Taguchi tasarımına göre hazırlanan 25 farklı protein hidrolizatına TNBS yöntemi ile %DH değeri belirlenmiştir. Ruşeym protein hidrolizatlarının %DH sonuçlarının değerlendirilmesinde “daha büyük daha iyidir” parametresi seçilmiş ve her bir faktörün %DH analiz sonucuna katkı oranı belirlenmiştir.

Tablo 4.1’de L25 Taguchi tasarım yöntemi kullanılarak elde edilen 25 farklı ruşeym protein hidrolizatının %DH değerlerine yer verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre hidroliz derecesi değerleri %11,9-22,1 arasında değişkenlik göstermektedir. En düşük %DH değeri görülen 24 numaralı ruşeym protein hidrolizatları US 1 muamele süresi 0 dk, US 2 muamele süresi 48 dk, Alkalaz %60 oranında, Flavourzyme %40 oranında ve ultrafiltrasyon yöntemiyle 10 kat hacmen konsantre edilerek üretilen örnektir. En yüksek %DH değerini ise 7 numaralı deneme olan US 1 muamele süresi 24 dk, US 2 süresi 24 dk, Alkalaz %60 oranında, Flavourzyme %80 oranında ve ultrafiltrasyon uygulamasının gerçekleştirilmediği ruşeym protein hidrolizatları vermiştir. Ruşeym protein hidrolizatlarına uygulanan farklı faktör ve seviyeler sonucunda DH’nin en yüksek ve en düşük değerleri arasında yaklaşık 2 kat düzeyinde farklılığın bulunduğu gözlemlenmektedir (%11,9 ve %22,1). Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilerek optimum seviyelerin belirlenmesiyle, en yüksek %DH değerine ulaşılabileceği düşünülmektedir.

Tablo 4.1’de sunulan veriler kullanılarak bir sonraki aşamada, Tablo 4.6’da görülen ruşeym protein hidrolizatlarının %DH analiz verimine ait S/N oranlarının varyans analizi dağılım tablosu oluşturulmuştur. Ruşeym protein hidrolizatlarının elde edilmesinde faktörlerin DH değerine katkısı US 1 muamele süresi %7,4, US 2 muamele süresi %8,7, Alkalaz konsantrasyonu %4,1 Flavourzyme konsantrasyonu %25,6 ve ultrafiltrasyonda hacimsel konsantrasyonu %39,8 olarak belirlenmiştir. Tablo 4.6’da sunulan verilere göre, ruşeym protein hidrolizatlarının elde edilme sürecinde DH değerine ultrafiltrasyon etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p>0,05$ ).

Son aşamada, Tablo 4.6’de sunulan verilere göre, ruşeym protein hidrolizatlarının elde edilmesinde kullanılan Taguchi modelinin mevcut çalışmaya uygunluğu değerlendirilmiş ve %85,61 güven aralığında sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen

bulgular, %DH değeri temel alındığında söz konusu modelin mevcut çalışmaya uygun olduğunu göstermektedir.

**Tablo 4.6:** US 1-US 2 muamele süreleri, Alkalaz- Flavourzyme konsantrasyonları ve ultrafiltrasyon işleminde gerçekleşen hacimsel konsantrasyon oranının optimizasyonu sürecinde elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının %DH içeriğine ait S/N oranlarının varyans analizi dağılımı

Varyans Kaynakları	DF	Katkı Oranı	F-Değeri	P-Değeri
US 1	4	7,43%	0,52	0,731
US 2	4	8,73%	0,61	0,680
Alkalaz	4	4,08%	0,28	0,875
Flavourzyme	4	25,58%	1,78	0,295
Ultrafiltrasyon	4	39,79%	2,77	0,048
Hata	4	14,39%		
<b>Toplam</b>	<b>24</b>	<b>100,00%</b>		

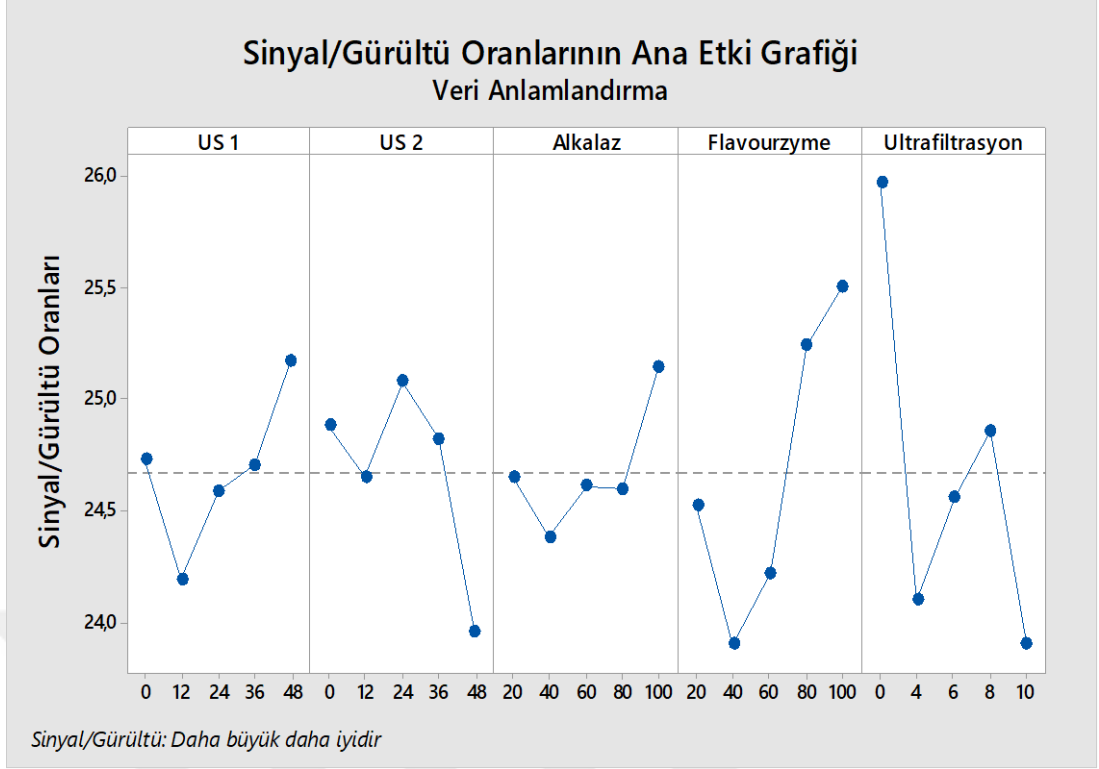
Sapma	R <sup>2</sup>
<b>2,21212</b>	<b>85,61%</b>

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Tablo 4.1’de sunulan verilere göre L25 deneme deseninde olan tüm ruşeym protein hidrolizatlarının %DH değeri değerlendirilerek bir sonraki aşamada her bir faktöre ait optimum seviyenin gösterildiği, Şekil 4.3’teki grafik oluşturulmuştur. Şekil 4.3’te Taguchi tasarım optimizasyonunda elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi bulguları için tasarım parametrelerinin ana etki grafiği görülmektedir. Elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının %DH verileri esas değerlendirildiğinde, Şekil 4.3’te gösterildiği US 1 muamele süresi 48 dk, US 2 muamele süresi 24 dk, Alkalaz konsantrasyon oranı %100, Flavourzyme konsantrasyon oranı %100 ve ultrafiltrasyon ile hacimsel konsantrasyon yapılmayan faktör seviyeleri optimum düzeyler olarak belirlenmiştir.

Ruşeym protein hidrolizatlarında %DH verileri değerlendirildiğinde Flavourzyme ve Alkalaz enzimlerinin maksimum düzeyde kullanıldığı seviyeler (%100) optimum seçilmiştir. Deneme deseni oluşturulmadan önce literatürdeki bilgiler ışığında Flavourzyme-Alkalaz enzimleri ile ön denemeler yapılmıştır (sonuçlar

gösterilmemiştir). Ön denemede Flavourzyme için 2,4 ve 6 saat inkübasyon süreleri ve farklı enzim konsantrasyonları (1 g enzim/5-10-20 g protein) değerlendirilmiştir. Benzer şekilde Alkalaz için de farklı süre (1 ve 2 saat) ve enzim konsantrasyonları (1,25-2-2,4 AU/ml) ile deneme yapılmıştır. En iyi sonuç veren enzim konsantrasyonları (Alkalaz: 2 AU/ml, 2 saat, Flavourzyme: 1 g enzim/5g protein, 6 saat) maksimum seviye şeklinde (%100) belirlenmiştir. Serbest amino asit içeriği (%) değeri temel alındığında US 1 muamele süresi 36 dk, US 2 muamele süresi 24 dk iken %DH değeri esas alındığında ise US 1 muamele süresi 48 dk, US 2 muamele süresi 24 dk olarak belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre serbest amino asit ve %DH değerleri için benzer ultrasonik muameleler gerektiği anlaşılmaktadır. Literatürde ağırlıklı olarak %DH değerinin artırılması amacıyla ultrasonik muamele yapılmaktadır (Vidal vd., 2018). Bunun nedeni %DH değerinin artması dolaylı olarak serbest amino asit içeriği de arttıracakı düşünülmektedir. Buna ek olarak %DH değerinin artışıyla birlikte oluşan küçük peptitler, protein hidrolizatlarında çözünürlüğün artışı gibi bazı fonksiyonel özellikler kazandırmaktadır (Ge vd., 2000).



**Şekil 4.3:** US 1-US 2 muamele süreleri, Alkalaz- Flavourzyme konsantrasyonları ve ultrafiltrasyon işleminde gerçekleşen hacimsel konsantrasyon oranının optimizasyonu sürecinde elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının %DH analizi için tasarım parametrelerinin ana etkilerinin değerlendirilmesi

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Hidroliz derecesinin artışı genellikle serbest amino asit miktarının da artışına neden olmaktadır. Enzimatik parçalanma etkinliğini geliştirmek için birçok farklı teknik mevcuttur. Bu teknikler arasında ultrasonik muamele ön plana çıkan uygulamalardan biridir (Wang vd., 2018b). Ultrason uygulaması diğer tekniklerden farklı olarak kimyasal işlem gerektirmeyen, yeşil teknoloji ürünüdür (Yao vd., 2020).

Opheim ve diğerlerinin (2016) yürüttüğü çalışmada balık unu, bitkisel bazlı protein (buğday, soya, mısır vb.) ve somon protein hidrolizatları (SPH) etlik piliçlerde 3 farklı diyet şeklinde uygulanarak hayvan gelişimine etkileri incelenmiştir. İlgili çalışma sonucuna göre etlik piliçlerde SPH içeren diyetlerin, balık unu ve bitkisel protein bazlı diyetlere kıyasla büyüme performansını (piliçlerin kütleli artışı) iyileştirdiği belirlenmiştir. Balık unu ve bitkisel proteinlerin hidroliz olmadığı gerekçesiyle peptitlerinin moleküler ağırlığının SPH'ye kıyasla daha büyük olduğu, bu sebeple SPH tüketen piliçlerin SPH proteinlerini daha kolay sindirerek kütle artışında etkili olduğu

düşünülmektedir. Mevcut çalışmada ruşeym protein hidrolizatlarının maksimum DH değeri %17,2 olmasına rağmen SPH'nin DH değerleri %37,3 ve %40,8'dir. Söz konusu çalışmada SPH'nin üretiminde kullanılan Atlantik somonunun iç organları enzimatik aktivasyon sebebiyle hızlı bozulabilen bir yapıya sahip olup mikrobiyolojik risk taşımaktadır. Buna karşın ruşeym, Atlantik somonunun iç organlarına kıyasla enzimatik aktivitesi daha stabil ve bu sebeple uzun raf ömrü olan bir protein kaynağıdır. Buna ek olarak balık kaynaklı yemlerle beslenen tavuklarda, tavuğun tüketilmesi esnasında balık kokusu ve tadının algılandığına yönelik çalışmalar mevcuttur (Mielnik vd., 2002; Salmon vd., 1984; Poste, 1990). Böylelikle etlik piliçlere SPH verilmesi sonucu piliçlerin etinde tüketici tarafından balık kokusu ve tadı hissedilebileceği düşünülmektedir. Bunun yerine bitkisel protein hidrolizatlarının kullanımıyla bu sorunun ortadan kalkma ihtimali bulunmaktadır.

Tuz stresi altındaki fasulye bitkilerine uygulanan kabak çekirdeği protein hidrolizatlarının etkileri incelenmiştir. Saksı deneylerinde tuzluluk stresiyle birlikte doku sağlığı ve yaprak fotosentezinde görev alan klorofil miktarı olumsuz yönde etkilenmiştir. Kabak çekirdeği protein hidrolizatlarının bitkinin yapraklarına uygulanması ile bitkilerdeki söz konusu olumsuz etkilerin azaldığı bildirilmiştir. Buna ek olarak tuz stresi uygulanan bitkilerde protein hidrolizatları uygulaması büyüme ve verimi olumlu yönde etkilediği raporlanmıştır. Kabak çekirdeği protein hidrolizatlarının hidroliz derecesinin %47 olduğu ve toplam protein içeriğinin %65'ini serbest amino asitlerin oluşturduğu bildirilmiştir (Sitohy vd., 2020). Mevcut çalışmada proteinlerin hidrolizi öncesi ultrasonik muameleler uygulanmasına rağmen ruşeym protein hidrolizatlarının %DH değerinin (%11,9-22,1) söz konusu çalışmadakine kıyasla önemli ölçüde daha az olduğu görülmektedir.

Protein hidrolizatları tarım endüstrisinde fayda sağlamanın yanı sıra alerjik etki gösteren gıdalarda alerjik etkilerin azaltılmasında veya ortadan kaldırılmasında protein hidrolizatlarından yararlanılmıştır (Kasera vd., 2015). Gıdaların içerdiği proteinlerin bir kısmı alerjik etki (İnek sütü: Alfa-kazein, Tavuk yumurtası: Ovalbümin, Karides: Tropomiyosin) göstermektedir (Francis vd., 2020). Alerjik etki gösteren proteinlerin genellikle 10-70 kDa aralığında olduğu tespit edilmiştir (Lehrer vd., 1996). Ancak Van Beresteijn ve diğerlerinin (1994) yürüttüğü çalışmada proteinlerin 3-5 kDa moleküler ağırlığın altında olan peptitlerinin genellikle alerjik etki göstermeyeceği bildirilmiştir. Buna karşın literatürde yaklaşık 1 kDa büyüklüğünde olan peptitlerin alerjik etki

gösterdiği çalışmalar yer almaktadır (Cui vd., 2023). Gıda alerjilerinin insan ve hayvanlarda azaltılmasına yönelik olarak, protein yerine protein hidrolizatları kullanımı, alerjik etkiyi tamamen ortadan kaldırmasa da bu etkinin minimize edilmesi amacıyla uygulanmaktadır. Böylelikle protein hidrolizatlarının bebek mamalarının ürün zenginleştirilmesinde, hayvan yemlerinde hipoalerjik ve besleyici diyet olarak kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Proteolizin alerjeniteyi azaltmadaki etkisine örnek olarak, Göksu ve diğerlerinin (2022) yürüttüğü çalışma gösterilebilir. Söz konusu çalışmada fındık kreması elde edilmesinde biyoaktif fındık protein hidrolizatları (%1 w/w) kullanılmış ve bu uygulama ürünün potansiyel alerjenliğini yaklaşık %80 oranında azalttığı bildirilmiştir.

Bebeklerde özellikle doğumdan itibaren ilk 12 ay, inek sütü başta olmak üzere birçok gıda alerjik etki göstermektedir. Bu etkilerin görüldüğü bebeklerin beslenmesinde, inek sütü yerine süt protein hidrolizatları verilmektedir. Hidrolize sütün kullanımına ek olarak, bebeklerde beslenmenin desteklenmesi amacıyla mama formüllerinde hidrolize bitkisel proteinler yer almaktadır (Hudson, 1995). Buğday proteini hidrolizatlarının alerjik etki gösterdiği raporlanmıştır (Bouchez-Mahiout, vd., 2010). Ruşeymin, buğday tanesinin yapısında bulunması nedeniyle ruşeym protein hidrolizatlarının da alerjik etki göstereceği öngörülmektedir. Bu sebeple mevcut çalışmada elde edilen optimize ruşeym protein hidrolizatları 3 veya 5 kDa kaset ile ultrafiltrasyon cihazından geçirilerek alerjik etkisi minimize edilmiş bir ürün elde edilebileceği düşünülmektedir. Elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarını içeren hidrolize protein ürünlerinin besleyici özellikleri ve alerjik riskin azaltılması sebebiyle gerek bebek mamalarının zenginleştirilmesinde gerekse kedi ve köpek gibi hayvan diyetlerinde alternatif bir protein kaynağı olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir. Protein hidrolizatları kullanımının veteriner hekimlikte özellikle kedi ve köpeklerin beslenmesinde gıda alerjenleri ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları ile başa çıkmada kullanılan bir tedavi yöntemi olduğu rapor edilmiştir (Marks vd., 2002).

Sağlıklı, Omega 3 ve protein içeriği zengin potansiyel bir alternatif balık bazlı atıştırılabilir ürünü elde edilmesi amacıyla Gómez-Guillén ve diğerleri (2023) tarafından bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Söz konusu çalışmada gri deniz levreğinden balık yağı ve balık protein hidrolizatları (Alkalaz enzimi kullanılmıştır) elde edilerek κ-karragenan ve yumurta akıyla karıştırılmıştır. Ardından karışım kurutulup toz forma dönüştürülerek omega 3 ve protein içeriği yüksek toz ürün elde edilmiştir. Sonraki

aşamada balık etleri tuz ilavesi, parçalama, karıştırma uygulamaları sonrası balık kıyması hamuruna dönüştürülüp daha önce elde edilen yüksek omega 3 ve protein içeriğine sahip toz ürün ile homojenize edilmiştir. Sonrasında homojenize ürün kalıplara konularak ılımlı bir ısı ile işleme tabi tutulmuştur (40 dk- 60°C). Son aşamada birkaç damla ayçiçek yağı ile 90°C’de, 1 dk pişirilerek yemeye uygun hazır ürün oluşturulmuştur. Araştırmada elde edilen omega 3 ve protein içeriği yüksek potansiyel bir alternatif balık bazlı atıştırılabilirlik ürünü ile duyu analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerine göre alternatif balık atıştırılabilirliği ürününün genel kabul edilebilirliğinin yüksek olduğu belirtilmiştir (5 üzerinden  $4,2 \pm 0,3$ ). Benzer şekilde ruşeym protein hidrolizatlarının yulaf, kuru üzüm gibi gıdalar kullanılarak protein barları elde edileceği ve sağlıklı alternatif bir atıştırılabilirlik olarak tüketilmesinin mümkün olduğu düşünülmektedir.

Ruşeym endüstride yaygın bulunan bir yan üründür. Örneğin FAO verilerine göre 2022 yılında dünyada 808 milyon ton buğday üretilmiş ve endüstriyel olarak buğdayın işlenmesi sonucunda yaklaşık 16 milyon buğday ruşeymi elde edilmektedir. Türkiye’de ise 2022 yılında yaklaşık 395 bin ton buğday ruşeymi elde edilmiştir. Yüksek miktarda elde edilebilen yan ürün olması nedeniyle, ruşeymin söz konusu amaçlar doğrultusunda kullanımı cazip hale gelmektedir.

#### **4.4. Ruşeym Protein Hidrolizatlarının DPPH Süpürme Aktivitesi Değerleri**

L25 Taguchi tasarımına göre hazırlanan 25 farklı ruşeym protein hidrolizatına DPPH süpürme aktivitesi analizi yapılmış ve elde edilen veriler değerlendirilmiştir. Ruşeym protein hidrolizatları DPPH süpürme aktivitesinin değerlendirilmesinde “daha büyük daha iyidir” yaklaşımı seçilmiştir. Böylelikle her bir faktörün DPPH süpürme aktivitesi değerine katkı oranı belirlenmiştir.

Tablo 4.1’de L25 Taguchi deney tasarımına göre hazırlanan ruşeym protein hidrolizatlarının DPPH süpürme aktivitesi değerleri yer almaktadır. Ruşeym protein hidrolizatlarının DPPH süpürme aktivitesi sonuçları 18,9-39,3 mg TE.100 g<sup>-1</sup> aralığında değişkenlik göstermektedir. Yedi numaralı deneme US 1 muamele süresi 24 dk, US 2 muamele süresi 24 dk, Alkalaz konsantrasyonu %60 oranında, Flavourzyme konsantrasyonu %80 oranında ve ultrafiltrasyon cihazı ile hacimsel konsantrasyon işlemi uygulanmayan buğday ruşeymi protein hidrolizatları en düşük

DPPH süpürme aktivitesi değerini verdiği görölmektedir. Dokuz numaralı deneme olan US 1 muamele süresi 24 dk, US 2 muamele süresi 48 dk, Alkalaz konsantrasyonu %100 oranında, Flavourzyme konsantrasyonu %20 oranında ve ultrafiltrasyon yöntemiyle 6 kat hacmen konsantre edilerek üretilen ruşeym hidrolizatları ise maksimum DPPH süpürme aktivitesi değerini vermiştir. Faktörlerin (US 1-US 2 muamele süreleri, Alkalaz-Flavourzyme konsantrasyonu, ultrafiltrasyonda hacimsel konsantrasyon oranı) farklı seviyelerde uygulanmasıyla elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarında DPPH süpürme aktivitesi analiz sonuçlarına göre en yüksek ve düşük değerleri arasında yaklaşık 2 kat düzeyinde farklılığın bulunduğu gözlemlenmektedir. Faktörlerin optimum seviyelerinin belirlenmesiyle elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarında maksimum DPPH süpürme aktivitesinin sağlanacağı anlaşılmaktadır.

L25 Taguchi tasarımına göre hazırlanan ruşeym protein hidrolizatlarının DPPH süpürme aktivitesine ilişkin S/N varyans değerleri Tablo 4.7’de sunulmuştur. Bu verilere göre ruşeym protein hidrolizatlarının üretiminde DPPH süpürme aktivitesini etkileyen faktörler arasında US 1 muamele süresi %54 ile en yüksek etkiye sahipken, Flavourzyme konsantrasyonu %18, US 2 muamele süresi %16,8, Alkalaz konsantrasyonu %14 ve ultrafiltrasyon hacimsel konsantrasyonu %13,2 oranında etkili olmuştur. Tablo 4.7’deki veriler incelendiğinde ruşeym protein hidrolizatlarının üretiminde US 1 faktörünün istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ).

Tablo 4.7’deki bulgular doğrultusunda, ruşeym protein hidrolizatlarının üretiminde kullanılan Taguchi modelinin mevcut çalışmaya uygunluğu %92,96 güven aralığı çerçevesinde değerlendirilmiştir. Modelin geçerliliği, DPPH süpürme aktivitesi değeri temel alınarak yürütölen analizlerle test edilmiş olup elde edilen sonuçlar modelin bu çalışmada uygulanabilir ve güvenilir olduğunu göstermektedir.

**Tablo 4.7:** US 1-US 2 muamele süreleri, Alkalaz- Flavourzyme konsantrasyonları ve ultrafiltrasyon işleminde gerçekleşen hacimsel konsantrasyon oranının optimizasyonu sürecinde elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının DPPH süpürme aktivitesi değerine ait S/N oranlarının varyans analizi dağılımı

Varyans Kaynakları	DF	Katkı Oranı	F-Değeri	P-Değeri
US 1	4	30,96%	4,40	0,049
US 2	4	16,84%	2,39	0,210
Alkalaz	4	14,01%	1,99	0,261
Flavourzyme	4	17,99%	2,55	0,193
Ultrafiltrasyon	4	13,16%	1,87	0,280
Hata	4	7,04%		
<b>Toplam</b>	<b>24</b>	<b>100,00%</b>		

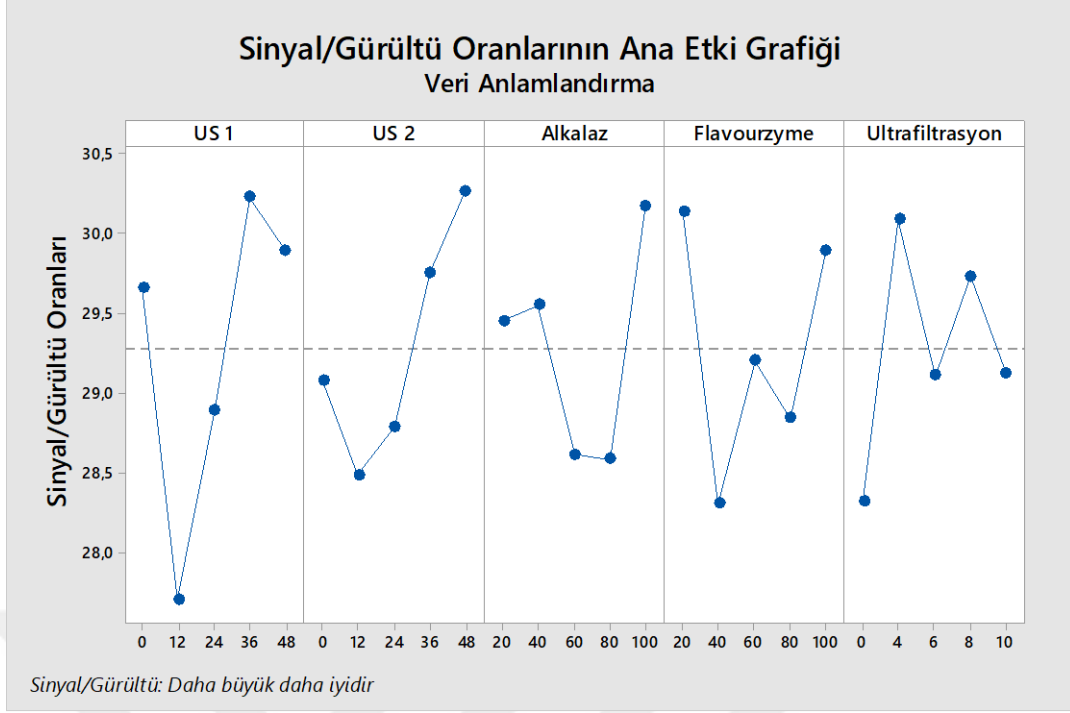
  

Sapma	R <sup>2</sup>
<b>3,51118</b>	<b>92,96%</b>

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Ruşeym protein hidrolizatlarının elde edilmesinde DPPH süpürme aktivitesinin ana etki grafiği Şekil 4.4'te sunulmuştur. DPPH süpürme aktivitesi, deneme desenindeki tüm ruşeym protein hidrolizatları için denenerek faktörlerin optimum seviyeleri belirlenmiştir. DPPH süpürme aktivitesi temel alınarak ruşeym protein hidrolizatlarının optimizasyon çalışması neticesinde US 1 muamele süresi 36 dk, US muamele 2 süresi 48 dk, Alkalaz konsantrasyonu %100, Flavourzyme konsantrasyonu %20 ve ultrafiltrasyon yöntemiyle 4 kat hacimsel konsantrasyon optimum seviye parametreleri olarak belirlenip Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

DPPH süpürme aktivitesi açısından, US 1 ve US 2 işlemlerinde uygulanan muamele süre faktörleri nispeten uzun sürede olup optimum süre seviyeleri olarak değerlendirilmiştir. Ultrason uygulaması sonucu antioksidan özellikteki maddelerin serbest kaldığı ve bunun sonucu olarak DPPH süpürme aktivitesinin arttığı düşünülmektedir.



**Şekil 4.4:** US 1-US 2 muamele süreleri, Alkalaz-Flavourzyme konsantrasyonları ve ultrafiltrasyon işleminde gerçekleşen hacimsel konsantrasyon oranının optimizasyonu sürecinde elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının DPPH süpürme aktivitesi için tasarım parametrelerinin ana etkilerinin değerlendirilmesi

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Protein hidrolizatlarının DPPH süpürme aktivitesi, numunede bulunan proteinlerin amino asitlerinin dizilimine ve bileşimine bağlı olduğu bildirilmiştir. Proteinlerin hidroliziyle birlikte, proteinin 3 boyutlu yapısında gizli kalan amino asit kalıntıları ve antioksidan aktiviteye sahip yan zincirler açığa çıkmaktadır (Chen vd., 2012; Tian vd., 2020). Böylelikle protein hidrolizatlarının proteinlere kıyasla daha yüksek DPPH süpürme aktivitesi gösterdiği düşünülmektedir. Mevcut çalışmada Flavourzyme ve Alkalaz enzimleri ile ruşeym proteinleri hidroliz edilerek DPPH süpürme aktivitesinin artış sağladığı ileri sürülmektedir. Literatürde protein hidrolizatlarının antioksidatif özelliklerini geliştirmek amacıyla ultrasonik uygulamaların yapıldığı çalışmalar yer almaktadır (Liu vd., 2022b; Fadimu vd., 2021). Mevcut çalışmada ruşeym proteinlerinin hidrolizi öncesi ultrasonik muameleler uygulanmıştır. Ultrasonik muamele ile protein hidrolizi öncesi proteinin 3 boyutlu yapısında açılmalar meydana getirilerek, proteinlerde hidrolizin kolaylaşması ve antioksidatif maddelerin açığa çıkması sağlanmıştır (Ashraf vd., 2020). Mevcut çalışmada L25 Taguchi tasarımına

göre ultrasonik muamele uygulanmayan ruşeym protein hidrolizatlarının (25 numara) DPPH süpürme aktivitesinin  $25,6 \text{ mg TE.100 g}^{-1}$  olduğu belirtilmektedir. Ruşeym protein hidrolizatlarından maksimum DPPH süpürme aktivitesi gösteren numunesine (9 numara) uygulanan US 1 ve US 2 muamele sürelerinin sırasıyla 24 dk, 48 dk olduğu belirtilmektedir ( $39,3 \text{ mg TE.100 g}^{-1}$ ). Böylelikle ultrasonik muamele uygulanan ve ultrasonik muamele uygulanmayan örnekler arasında DPPH süpürme aktivitesi açısından farklılık olduğu gözlemlenmektedir.

Tian ve diğerlerinin (2020) yürüttüğü araştırmada soya protein hidrolizatlarına 20 kHz frekansta, 140 W veya 450 W gücünde 10-30 dk arası ultrasonik muameleler uygulanmıştır. Sonrasında örneklerde DPPH süpürme aktivitesi ölçülmüştür. Hidroliz süresi arttıkça DPPH süpürme aktivitesi değerinde önemli bir artış olduğu belirtilmiştir. Maksimum DPPH süpürme aktivitesi değerini 150 W ve 10 dk ultrasonik muamelenin uygulandığı soya proteini hidrolizatları vermiştir. Mevcut çalışmada söz konusu çalışmadan farklı olarak ruşeym protein hidrolizatlarının elde edilmesinde 20 kHz (200 W) ve 26 kHz (400W) frekans ve güç sağlayan 2 farklı ultrasonik muamele uygulanmıştır. Bunun yanı sıra mevcut çalışmada ultrasonik muamele hidroliz işleminden önce gerçekleştirilirken söz konusu çalışmada hidroliz sonrası ultrasonik muamele yapılmıştır.

Hayta ve diğerlerinin yürüttüğü çalışmada (2020) ise pirinç kepeği kullanılarak ultrason (400 W, 24 kHz) destekli enzimatik protein hidrolizi yapılmıştır. RSM deneysel tasarımı kullanılarak maksimum antioksidatif etki gösteren pirinç kepeği protein hidrolizatları elde edilmesi amaçlanmıştır. Optimize pirinç kepeği protein hidrolizatlarında DPPH süpürme aktivitesi  $8,2 \text{ mg TE.100 g}^{-1}$  olduğu bildirilirken mevcut çalışmada ruşeym protein hidrolizatlarının maksimum DPPH süpürme aktivitesi  $39,3 \text{ mg TE.100 g}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Mevcut çalışmada ultrafiltrasyon ile fraksiyonlanmasında 50 kDa kasetten istifade edilmiştir. Yürütülen çalışmalarda kısa zincirli peptit fraksiyonlarının uzun zincirli peptitlere kıyasla antioksidatif aktivitesinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (He vd., 2013). Böylelikle söz konusu çalışmadaki gibi daha küçük por büyüklüğüne sahip kasetlerin (1-5-10 kDa) kullanımı, protein hidrolizatlarının DPPH süpürme aktivitesini arttırabileceği düşünülmektedir. DPPH süpürme aktivitesi gösteren biyoaktif peptitlerin genelde 1 kDa'dan daha düşük moleküler ağırlığa sahip olduğu bildirilmiştir (Sonklin vd., 2018). Pirinç kepeğinin protein içeriğinin (%10,6) düşük olması nedeniyle hidroliz öncesi protein izolasyonu

yapılmıştır. Ancak ruşeymin protein içeriği (%21,5) ile pirinç kepeğinin protein içeriğinin arasında yaklaşık olarak 2 kat düzeyinde farklılığın bulunması gerekçesiyle ve uygulanan denemeler sonucunda, ruşeym protein hidrolizatlarının elde edilmesinde ön işlem olarak protein izolasyon yöntemi tercih edilmemiştir.

Ruşeym proteinlerinin hidroliz ürünleri antioksidatif etki göstermektedir. Ruşeym protein hidrolizatlarının sahip olduğu antioksidatif etkileri farklı sektörlerde uygulanmasına olanak sağlamaktadır. Gıda sektöründe istenmeyen tat ve kokuların önlenmesinde, lipit oksidasyonunun geciktirilmesi ya da bu riskin tamamen ortadan kaldırılması amacıyla antioksidanlar kullanılmaktadır (Lin ve Liang, 2002). Gıda endüstrisinde kullanılan sentetik antioksidanların yerine ruşeym protein hidrolizatları kullanılabileceği ileri sürülmektedir. Böylelikle ruşeym protein hidrolizatlarının sahip olduğu antioksidatif etki sayesinde gıdayı koruyabileceği düşünülmektedir.

Protein hidrolizatları sahip oldukları antioksidan aktivite sebebiyle gıdalarda serbest radikallerin oluşumunu engellemek amacıyla kullanılabilmektedir (Li vd., 2019; Padiál-Domínguez vd.,2020; Zhou vd., 2013b). Yürütülen bir çalışmada kırmızı fasulye kullanılarak üretilen protein hidrolizatları, yoğurt örneğine eklenmiş ve bu işlemin lipit oksidasyonunu geciktirdiği raporlanmıştır. Kırmızı fasulye protein hidrolizatlarının sahip olduğu antioksidatif bileşiklerin yoğurttaki lipit oksidasyonu sağlayan maddeleri inhibe ederek lipit oksidasyonunu geciktirmede rol oynadığı tespit edilmiştir (Sarker vd., 2020).

Djellouli ve diğerlerinin yürüttüğü çalışmada (2020), elde edilen karides protein hidrolizatlarının glukozamin ile konjugasyonu vasıtasıyla, hidrolizatların antioksidatif ve antibakteriyel aktivitelerinin iyileştirilmesi amaçlanmıştır. Söz konusu çalışmada karides kabuğu ve karides pişirme suyu *Enterococcus faecalis* DM19 enzimi ile proteinleri hidroliz edilmiş ve sonrasında hidrolizat dispersiyonları kurutulmuştur. Ardından kurutulmuş karides protein hidrolizatlarına glukozamin ilave edilmiştir. Karides pişirme suyu protein hidrolizatlarının glukozamin ile ısıtılması sonucu elde edilen örnek yüksek antioksidan aktivite göstermiştir (yaklaşık 30 mg Eq Askorbik asit.g<sup>-1</sup>). Mevcut çalışmada elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının antioksidatif aktivitesi (Maksimum 39,30 mg TE.100 g<sup>-1</sup>) söz konusu çalışmada glukozamin ile ısıtılması sonucu elde edilen karides protein hidrolizatları ile benzer sonuç verdiği görülmektedir. Buna karşın glukozamin ile muamele yapılmayan karides protein hidrolizatlarının antioksidatif aktivitesinin (<10 mg Eq Askorbik asit.g<sup>-1</sup>) mevcut

çalışmadaki protein hidrolizatlarına kıyasla önemli ölçüde düşük olduğu anlaşılmaktadır. Karides kabuğu protein hidrolizatlarının glukozamin ile ısıtılması sonucu antimikrobiyal aktiviteye sahip bileşiklerin üretilmesine sebep olduğu bildirilmiştir. Antimikrobiyal özellikteki protein hidrolizatları endüstriyel gıda ürünlerinde sentetik antimikrobialerin yerine konulabileceği düşünülmektedir.

#### **4.5. Ruşeym Protein Hidrolizatlarının Toplam Fenolik İçeriği (TFİ)**

Buğday ruşeymi protein hidrolizatlarının üretiminde Taguchi tasarımına göre L25 ortogonal dizi uygulanarak 25 farklı örnek elde edilmiş ve örneklerin tamamına TFİ analizi uygulanmıştır. TFİ sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde “daha büyük olan daha iyi” parametresi kullanılarak faktörlerin optimum seviyeleri tespit edilmiştir.

Tablo 4.1’de L25 ortogonal dizisine göre üretilen ruşeym protein hidrolizatlarının TFİ değerlerine yer verilmiştir. Elde edilen verilere göre ruşeym protein hidrolizatlarının TFİ analiz sonuçları 124,5-207,1 mg GAE.100 g<sup>-1</sup> değerleri arasında değiştiği belirlenmiştir. İki numaralı deneme US 1 muamele süresi 12 dk, US 2 muamele süresi 24 dk, Alkalaz konsantrasyonu %40 oranında, Flavourzyme konsantrasyonu %40 oranında ve ultrafiltrasyon işleminde 4 kat hacmen konsantre edilerek hazırlanan buğday ruşeymi protein hidrolizatları en düşük TFİ değerini göstermiştir. En yüksek TFİ değerini ise 19 numaralı deneme olan US 1 muamele süresi 48 dk, US 2 muamele süresi 48 dk, Alkalaz konsantrasyonu %40 oranında, Flavourzyme konsantrasyonu %100 oranında ve ultrafiltrasyon yöntemiyle hacimsel konsantrasyonunun yapılmadığı ruşeym protein hidrolizatları vermiştir. Ruşeym protein hidrolizatlarının üretiminde faktörlerin farklı seviyelerde uygulanmasıyla TFİ değerinin önemli oranda değiştiği görülmektedir. Optimum faktör seviyeleri seçilerek en yüksek TFİ değerine sahip ruşeym protein hidrolizatları elde edilebileceği düşünülmektedir.

Proteinler ve fenolik bileşikler arasında kovalent (disülfür bağları) ve kovalent olmayan bağlar (hidrojen bağları) bulunmaktadır. Ruşeym proteinlerin hidrolizi sırasında bu bağların kopmasıyla fenolik bileşikler serbest kalmaktadır (Aydemir ve Yemenicioğlu, 2013). Tablo 4.3 ve Tablo 4.4’teki L25 Taguchi tasarımı incelendiğinde serbest amino asit içeriği (%) en yüksek olan ruşeym protein hidrolizatlarının aynı zamanda TFİ değerinin maksimum olan numune olduğu görülmektedir.

L25 Taguchi tasarımı doğrultusunda hazırlanan ruşeym protein hidrolizatlarının TFİ verilerine ilişkin S/N oranı varyans analiz bulguları Tablo 4.8'de verilmiştir. Tablo 4.8'de ruşeym protein hidrolizatlarının üretiminde faktörlerin TFİ değerine katkı oranı gösterilmektedir. Ruşeym protein hidrolizatlarının hazırlanmasında TFİ değerini US 1 muamele süresi %42,2, US 2 muamele süresi %3,2, Alkalaz konsantrasyonu %16,8, Flavourzyme konsantrasyonu %6,1 ve ultrafiltrasyon hacimsel konsantrasyonu %27,3 oranında etkilediği bildirilmiştir. Tablo 4.8'deki verilere bakılarak ruşeym protein hidrolizatlarının üretiminde US 1 muamele süresinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

Tablo 4.8'de uygulanan Taguchi analizinin, mevcut çalışmayla %95,58 uyum gösterdiği ve bu uyumun güven aralığı içerisinde değerlendirildiği belirlenmiştir. Elde edilen veriler, ruşeym protein hidrolizatlarının üretiminde TFİ analizinde Taguchi'nin yüksek düzeyde bir uyumluluk sağladığını göstermektedir.

**Tablo 4.8:** US 1-US 2 muamele süreleri, Alkalaz-Flavourzyme konsantrasyonları ve ultrafiltrasyon işleminde gerçekleşen hacimsel konsantrasyon oranının optimizasyonu sürecinde elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının TFİ değerine ait S/N oranlarının varyans analizi dağılımı

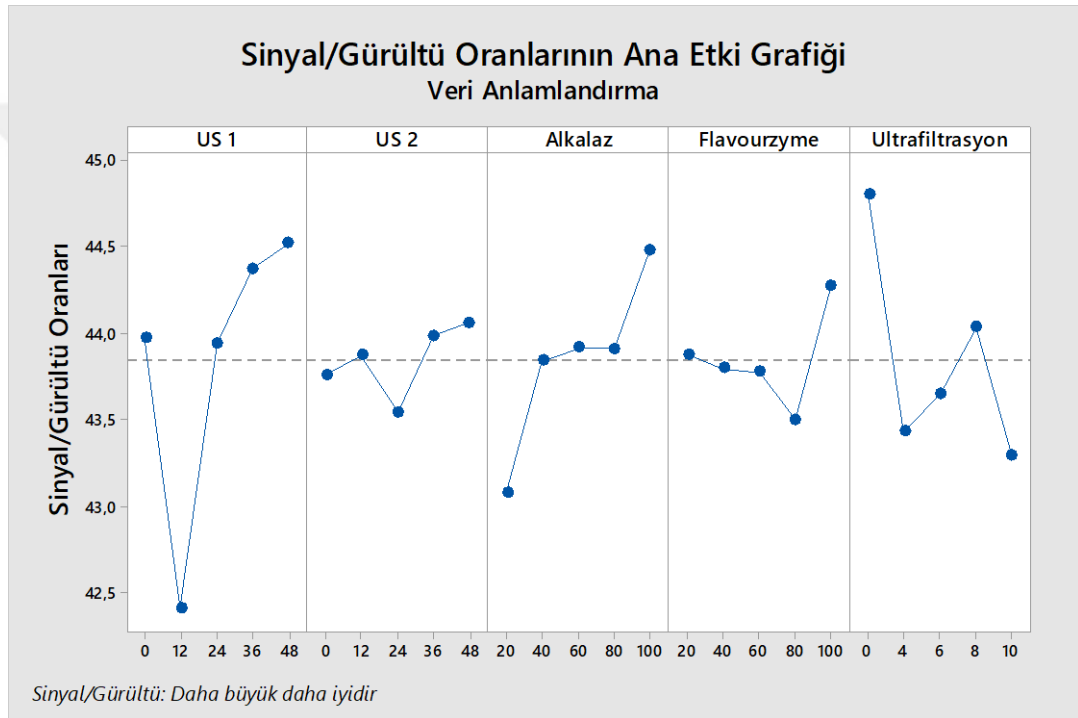
Varyans Kaynakları	DF	Katkı Oranı	F-Değeri	P-Değeri
US 1	4	42,17%	9,53	0,025
US 2	4	3,18%	0,72	0,622
Alkalaz	4	16,84%	3,81	0,112
Flavourzyme	4	6,12%	1,38	0,381
Ultrafiltrasyon	4	27,27%	6,17	0,053
Hata	4	4,42%		
<b>Toplam</b>	<b>24</b>	<b>100,00%</b>		

Sapma	R <sup>2</sup>
<b>10,7210</b>	<b>95,58%</b>

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Şekil 4.5'te ruşeym protein hidrolizatlarının elde edilmesinde TFİ değerinin ana etki grafiğine yer verilmiştir. L25 Taguchi tasarımına göre elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının TFİ değerleri analiz edilip, elde edilen verilere göre istatistiksel olarak

her bir faktörün optimum seviyesi grafikte gösterilmektedir. Ruşeym protein hidrolizatlarının elde edilmesinde TFİ değeri esas alındığında US 1 muamele süresi 48 dk, US 2 muamele süresi 48 dk, Alkalaz konsantrasyon oranı %100, Flavourzyme konsantrasyon oranı %100 ve ultrafiltrasyon yöntemiyle hacimsel konsantrasyon yapılmayan faktör seviyeleri optimum parametreler olarak belirlenmiştir. Ruşeym protein hidrolizatlarının üretiminde TFİ değeri esas alındığında US 1 ve US 2 muamele sürelerinin maksimum seviyeleri optimum parametre şeklinde belirlenmiştir. Elde edilen veriler ışığında ultrasonik muamelenin ruşeym protein hidrolizatlarında fenolik maddelerin serbest kalmasında etkili rol oynadığı düşünülmektedir.



**Şekil 4.5:** US 1-US 2 muamele süreleri, Alkalaz-Flavourzyme konsantrasyonları ve ultrafiltrasyon işleminde gerçekleşen hacimsel konsantrasyon oranının optimizasyonu sürecinde elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarının TFİ değeri için tasarım parametrelerinin ana etkilerinin değerlendirilmesi

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Proteinlerle kovalent ve kovalent olmayan bağlar oluşturan fenolik bileşikler, protein hidrolizi sırasında koparak serbest kalmaktadır. Böylelikle protein hidrolizatlarında TFİ değerinin protein izolatlarına kıyasla daha yüksek olarak bulunduğu rapor edilmiştir (Rezvankhah vd., 2021; Thamnarathip vd., 2016).

Rezvankhah ve diğeri tarafından yürütülen araştırmada (2021) mercimek proteinleri Flavourzyme ve Alkalaz enzimleri ile farklı süre-konsantrasyonlarda (%1-2 w/w enzim-substrat) uygulanarak mercimek protein hidrolizatları elde edilmiştir. Mercimek protein konsantrasyonunun TFİ değeri 171 mg GAE.100 g<sup>-1</sup> olduğu tespit edilmiştir. Mercimek proteinlerinin hidrolizi sonrası TFİ değerinin arttığı belirtilmiştir. Alkalaz enzimi %2 konsantrasyonda 180 dk uygulanarak elde edilen mercimek protein hidrolizatlarının TFİ değeri 323 mg GAE.100 g<sup>-1</sup> iken Flavourzyme %2 konsantrasyonda 180 dk uygulanarak hazırlanan hidrolizatların TFİ değeri ise 298 mg GAE.100 g<sup>-1</sup> olduğu tespit edilmiştir. Son olarak Alkalaz (2 saat) ve Flavourzyme (1 saat) %2 konsantrasyonlarda uygulanarak elde edilen mercimek protein hidrolizatlarının TFİ sonucu maksimum değer olan 384 mg GAE.100 g<sup>-1</sup> olduğu tespit edilmiştir. Mevcut projede ruşeym protein hidrolizatlarının hazırlanmasında enzimatik muamele süresi (Alkalaz 2 saat, Flavourzyme 6 saat) ilgili çalışmadan daha uzun şekilde uygulanmıştır. Buna rağmen mevcut projede hidrolizatların TFİ değerlerinin (124,5-207,1 mg GAE.100 g<sup>-1</sup>) söz konusu çalışmadaki TFİ değerine kıyasla daha düşük olduğu görülmektedir. Protein kaynaklarının farklı olması TFİ sonuçlarının farklılığına yol açtığı düşünülmektedir.

Sonbahar ananas çiçeği bitkisinin yetiştirilmesinde toprağa düşük konsantrasyonda (10<sup>-5</sup> ile 10<sup>-7</sup> M) Kahverengi alg'den (*Ecklonia maxima*) izole edilen 2 farklı fenolik madde (*floroglusinol ve eckol*) uygulanmıştır. Fenolik madde muamelesinin sonbahar ananas çiçeği bitkisinde soğan verimini, köklenmeyi arttırdığı ve bitkinin fitokimyasal içeriği üzerinde olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir (Masondo vd., 2015). Ruşeym protein hidrolizatlarında yüksek oranda fenolik içerik (maksimum 207,1 mg GAE.100 g<sup>-1</sup>) bulunmaktadır. Bu sebeple ruşeym protein hidrolizatları bitkilerin yetiştirilmesinde kullanılması numunelerde bulunan serbest amino asitlerin ve fenolik bileşiklerin bitkinin gelişimine katkı sağlayabileceği öngörülmektedir.

Elde edilen verilere göre optimum faktör seviyeleri seçilerek en yüksek TFİ değerine sahip ruşeym protein hidrolizatları elde edilebileceği düşünülmektedir. Elde edilen optimum faktör seviyeleri denenerek hazırlanan ruşeym protein hidrolizatları, bitkilerde hidrolizatların kullanımıyla büyüme ve gelişimine destek olabileceği ön görülmektedir. Buna ek olarak fenolik maddeler kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır. Chen ve diğeri tarafından yürütüldüğü (2021a) projede pirinç proteini hidrolizatlarının TFİ değeri ortalama 206 mg GAE.100 g<sup>-1</sup> olduğu belirtilmiştir. Pirinç

protein hidrolizatlarının kozmetik sektöründe kullanılabileceği bildirilmiştir. Mevcut çalışmada ruşeym protein hidrolizatlarının TFİ değerinin (124,5-207,1 mg GAE.100 g<sup>-1</sup>) pirinç protein hidrolizatlarının TFİ değeri ile benzerlik gösterdiği görülmektedir. Bu sebeple ruşeym protein hidrolizatlarının da kozmetik sektöründe kullanım potansiyeli bulunduğu anlaşılmaktadır.

L25 Taguchi tasarımına göre hazırlanan ruşeym protein hidrolizatlarında serbest amino asit, TNBS, DPPH süpürme aktivitesi ve TFİ değerleri esas alınarak faktörlerin optimum seviyelerinin gösterildiği ana etki grafikleri verilmiştir. Tablo 4.9’da sunulan verilere göre US 1 muamele süresi serbest amino asit ve DPPH süpürme aktivitesi analizi için optimum süre 36 dk iken %DH ve TFİ analizleri için maksimum ultrasonik muamele süresi olan 48 dk optimum süre olarak belirlenmiştir. US 2 muamele süresi serbest amino asit ve %DH analizleri için 24 dk, DPPH süpürme aktivitesi ve TFİ analizleri içinse 48 dk optimum süre olarak bulunmuştur. Alkalaz konsantrasyonu sadece serbest amino asit analizi için %40 iken diğer %DH, DPPH süpürme aktivitesi ve TFİ analizleri için %100 oranında kullanımı optimum konsantrasyon oranı olarak belirlenmiştir. Flavourzyme konsantrasyonu DPPH süpürme aktivitesi analizi için %20 oranında, serbest amino asit, %DH ve TFİ analizleri için %100 oranında kullanımı optimum sonucu vermektedir (Ön denemelerde, %100 enzim konsantrasyonunun üzerinde enzim kullanılmış olmasına rağmen, en yüksek serbest amino asit değeri yine %100 konsantrasyonda elde edilmiş ve bu değer birincil optimizasyon kriterini karşılamıştır). Optimize ruşeym protein hidrolizatları elde ederken serbest amino asit, %DH ve TFİ analizleri için ultrafiltrasyon işlemi ile hacimsel konsantrasyonun yapılmaması optimum sonucu verirken, DPPH süpürme aktivitesi analizi için ultrafiltrasyon yöntemiyle 4 kat hacmen konsantrasyon optimum sonucu vermektedir. Buna ek olarak ruşeym protein hidrolizatlarının elde edilmesinde serbest amino asit ve TFİ analizleri için istatistiksel olarak US 1 muamele süresi faktörü önemli iken %DH değeri için ultrafiltrasyon hacimsel konsantrasyon faktörü istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Serbest amino asit, %DH, DPPH süpürme aktivitesi ve TFİ gibi tüm analiz parametreleri için Taguchi modelinin mevcut çalışmada uygulanabilir olduğu ve modelin yüksek güven aralığı değerlerini (genellikle >%85) sağladığı görülmektedir.

**Tablo 4.9:** L25 Taguchi tasarımına göre hazırlanan ruşeym protein hidrolizatlarının optimize faktör seviyeleri ve aldığı maksimum değerler (Kons: Konsantrasyon, Maks: Maksimum)

	US 1 süresi (dk)	US 2 süresi (dk)	Alkalaz Kons. (2AU/ml)	Flavourzyme Kons. (1 g enzim/ 1 g protein)	Ultrafiltrasyon Hacmen Kons.	Maks. Değer
Serbest Amino Asit (%)	36	24	40%	100%	-	1,36
Hidroliz Derecesi (%)	48	24	100%	100%	-	22,1
DPPH (mg TE.100 g <sup>-1</sup> )	36	48	100%	20%	4	39,3
TFİ (mg GAE.100 g <sup>-1</sup> )	48	48	100%	100%	-	207,1

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

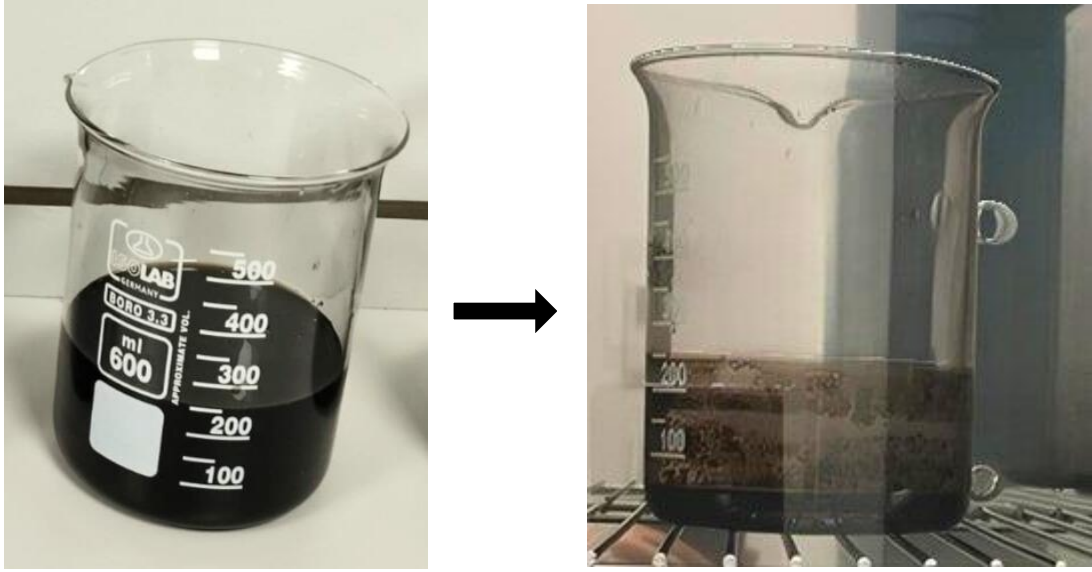
#### 4.6. Optimize Ruşeym Protein Hidrolizatları ve Konsantresi

L25 Taguchi tasarımı kullanılarak optimize ruşeym protein hidrolizatlarının hazırlanmasında serbest amino asit (%) verimi esas alınmış ve faktörlerin optimum seviyeleri belirlenmiştir. US 1 muamele süresi 36 dk, US 2 muamele süresi 24 dk, Alkalaz konsantrasyon oranı %40, Flavourzyme konsantrasyon oranı %100 ve ultrafiltrasyon ile hacimsel konsantrasyon yapılmayan faktör seviyeleri ile optimize ruşeym protein hidrolizatları hazırlanmıştır. Hazırlanan optimize ruşeym protein hidrolizatları Şekil 4.6'da gösterildiği şekilde etüvde (Memmert, doğal konveksiyonlu etüv, IN30, Almanya, Büchenbach) konsantre edilmiştir. Etüvde hava sirkülasyonu sağlaması amacıyla flap açıklığı %80 şeklinde ayarlanmıştır (72 saat, 45°C). Optimize ruşeym protein hidrolizatları etüvde 9,8 kat kütleli konsantre edilmiştir. Optimize ruşeym protein hidrolizatlarına ve hidrolizatların konsantresine kül, Briks, protein, organik karbon, TNBS, TFİ, DPPH süpürme aktivitesi ve serbest amino asit analizleri yapılmıştır. Elde edilen analiz değerler Tablo 4.10'da yer almaktadır.

**Tablo 4.10:** Taguchi analizi sonucu elde edilen faktörlerin optimum seviyelerine göre hazırlanmış optimize ruşeym protein hidrolizatları ve hidrolizat konsantresinin analiz sonuçları

	<b>Kül (%)</b>	<b>Briks (%)</b>	<b>Protein (%)</b>	<b>Organik Karbon (%)</b>	<b>DH (%)</b>	<b>TFİ (mg GAE.100 g<sup>-1</sup>)</b>	<b>DPPH (mg TE.100 g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Serbest Amino Asit (%)</b>
<b>Optimize Edilmiş Ruşeym Protein Hidrolizatları</b>	0,5±0,0	7,7±0,6	1,8±0,0	4,2±0,1	17,5±0,7	226,8±9,6	28,6±1,5	1,2±0,1
<b>Optimize Edilmiş Ruşeym Protein Hidrolizat Konsantresi</b>	5,1±0,1	74,0±4,3	23,4±3,1	29,7±0,5	18,8±1,4	2291,8±13,8	340,8±20,0	9,8±0,6

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



**Şekil 4.6:** Taguchi analizi sonucu elde edilen optimum faktör seviyelerine göre üretilen optimize ruşeym protein hidrolizatları ve hidrolizatların etüvde konsantre (45°C, 72 saat, %80 Flap açıklığı) edilmesi sonucu elde edilen örnek

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Optimize ruşeym protein hidrolizatlarının protein ve Briks değerleri sırasıyla %1,81 ve %7,7 olduğu tespit edilmiştir. Optimize ruşeym protein hidrolizatlarının konsantrininin protein ve Briks oranları sırasıyla %23,4 ve %74 olarak bulunmuştur. Buğday ruşeymi magnezyum, demir, çinko, potasyum, fosfor ve kalsiyum elementlerince zengin bir kaynaktır (Šramková vd., 2009). Böylelikle ruşeym protein hidrolizatlarının da bu mineral maddelere sahip olduğu düşünülmektedir. Optimize buğday ruşeymi protein hidrolizatlarının kül içeriği %0,48'dir. Optimize buğday ruşeymi protein hidrolizat konsantrininin kül miktarının ise %5,08 olduğu tespit edilmiştir.

#### 4.6.1. Serbest Amino Asit ve Hidroliz Derecesi Değerleri

L25 deney tasarımında Taguchi analizi sonucu elde edilen optimum faktör seviyelerine göre üretilen optimize ruşeym protein hidrolizatları ve hidrolizat konsantrilerinin serbest amino asit (%) değerleri Tablo 4.10'da yer verilmiştir. Optimize ruşeym protein hidrolizatlarının toplam serbest amino asit değeri %1,24 iken 9,8 kat kütleli konsantre edildiğinde toplam serbest amino asit değerinin %9,75 olduğu belirlenmiştir. Optimize ruşeym protein hidrolizatlarının toplam protein

kompozisyonun yaklaşık %68,5'ini serbest amino asitler oluşturmaktadır. Tablo 4.9'daki verilere göre optimize ruşeym protein hidrolizatlarının DH değeri %17,5, hidrolizatların konsantrasyonunun DH değeri ise %18,8'dir.

Tablo 4.11'de elde edilen verilere göre optimize ruşeym protein hidrolizatları ve hidrolizat konsantrasyonlarının hidroksi prolin, arginin, lizin, tirozin, izolösin serbest amino asitleri içermediği görülmektedir. Buğday ruşeyminde hidroksi prolin ve asparagin, glutamin, triptofan amino asitleri hariç diğer amino asitlerin tümünün mevcut olduğu bildirilmiştir (Brestenský ve Patráš, 2019). Ancak optimize ruşeym protein hidrolizatlarının hazırlanmasında uygulanan ultrasonik ve enzimatik muameleler sonucunda ruşeym proteininin sahip olduğu arginin, lizin, tirozin, izolösin amino asitleri serbest forma geçmediği anlaşılmaktadır. Optimize ruşeym protein hidrolizatları ve hidrolizatların konsantrasyonlarında en yüksek serbest amino asit oranını valin amino asidi verirken (sırasıyla %1,87, %0,27), en düşük serbest amino asit oranını ise glutamin amino asidi vermiştir (sırasıyla %0,019, %0,021). Buna ek olarak ılımlı ısı işlem uygulanarak enzimatik protein hidrolizi gerçekleştirilmesi sebebiyle ruşeym protein hidrolizatlarında D-amino asitlerin oluşmadığı düşünülmektedir.

Tam tahıllı buğdayın proteoliz işlemi uygulanmadan serbest amino asit içeriği ölçülmüştür. Elde edilen verilere göre yüksek serbest amino asit içeriği gösteren amino asitler sırasıyla aspartik asit, serin ve alanin (sırasıyla 227, 99, 61  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) olarak bulunmuştur (Mustafa vd., 2007). Mevcut çalışmada ruşeym protein hidrolizatları numunelerinde ultrasonik işlem ve proteoliz uygulamaları yapılması nedeniyle tam tahıllı buğday ile karşılaştırıldığında ruşeym protein hidrolizatlarının serbest amino asit değerleri (aspartik asit %0,04, serin %0,05, alanin %0,14) önemli ölçüde daha yüksek olduğu görülmektedir.

**Tablo 4.11:** L25 Taguchi analizi sonucu elde edilen optimum faktör seviyelerine göre üretilen optimize ruşeym protein hidrolizatları ve hidrolizat konsantresinin (9,8 kat kütleli olarak konsantre edilmiştir) serbest amino asit (%) analizi

Amino Asit Adı	Optimize Edilmiş Ruşeym Protein Hidrolizat Konsantresi	Optimize edilmiş Ruşeym Protein Hidrolizatları
	Serbest Amino Asit (% w/w)	Serbest Amino Asit (% w/w)
Hidroksi Prolin	0,00000	0,00000
Histidin	0,29847	0,05911
Asparagin	0,46778	0,02414
Serin	0,54988	0,05259
Glutamin	0,01907	0,02157
Arginin	0,00000	0,00000
Glisin	0,64844	0,10443
Aspartik Asit	0,62316	0,03536
Glutamik Asit	1,24716	0,18112
Treonin	0,61068	0,04639
Alanin	1,11281	0,14225
Prolin	0,39352	0,02918
Sistein	0,02729	0,00000
Lisin	0,00000	0,00000
Tirozin	0,00000	0,00000
Metiyonin	0,26387	0,02221
Valin	1,86530	0,27149
İzolösin	0,00000	0,00000
Lösin	1,08905	0,13204
Fenilalanin	0,44389	0,07704
Triptofan	0,09130	0,03817
<b>Toplam</b>	<b>9,75</b>	<b>1,24</b>

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Ugolini ve diğerlerinin (2015) yaptığı çalışmada yağsız ayçiçeği unu ve izolatu kullanılarak protein hidrolizatları (APH) elde edilip hidrolizatlar dondurarak kurutulmuştur. Tere otu ve marul bitkilerine APH eklenip hidrolizatların bitkilerdeki etkileri değerlendirilmiştir. APH muamelesi sonrası bitkilerin kuru ağırlıkları ve ana kök uzunluğu ölçülmüştür. Bitkilerde APH uygulamasının oksin benzeri etki gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre APH'nin tarımda etkili kullanıma sahip olabileceği bildirilmiştir. Mevcut çalışmada optimize ruşeym protein hidrolizatlarının konsantresinin serbest amino asit içeriği %9,75 iken söz konusu

çalışmada %16,4 olduğu bildirilmiş ve hidrolizatların hidroliz dereceleri benzer olmasına rağmen (DH: APH%17-19, optimize ruşeym protein hidrolizatları %18,8) serbest amino asit içeriğinin APH'de daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun nedeni söz konusu çalışmada başlangıç materyalin protein miktarının daha fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (protein içeriği: yağsız ayçiçeği %31,1, ruşeym %21,5). APH'de en fazla bulunan serbest amino asitler sırasıyla glutamin, arginin, lösin olurken ruşeym protein hidrolizatlarının konsantrisinde sırasıyla valin, glutamik asit ve alanin en çok bulunan serbest amino asitlerdir. Ayrıca söz konusu çalışma ile mevcut proje arasındaki önemli farklardan biri enzimatik hidroliz öncesi ultrasonik muamelenin yapılmasıdır.

Ghelich ve diğerlerinin (2022) yürüttüğü çalışmada Flavourzyme ve Alkalaz enzimleri ayrı ayrı uygulanarak farklı ruşeym protein hidrolizatları elde edilmiştir. Bunu takiben ruşeym protein hidrolizatları dondurulmuş yoğurdun hazırlanması aşamasında ilave edilip (%0-1,5), son adımda dondurulmuş yoğurda ait fizikokimyasal ve duyuşsal özellikler incelenmiştir. Ruşeym protein hidrolizatlarının dondurulmuş yoğurda ilave edilmesi ürünün dokusunu geliştirdiği, %0,5-1 oranlarında konulan hidrolizatların ürün tadının beğenisi bakımından kontrole kıyasla önemli bir fark oluşturmadığı tespit edilmiştir. Mevcut çalışmada söz konusu araştırmadan farklı olarak optimize ruşeym protein hidrolizatlarının elde edilmesinde hem Flavourzyme hem de Alkalaz enzimleri birlikte kullanılmış ve hidroliz öncesi hidrolizatlara ultrasonik muamele uygulanmıştır. Buna ek olarak mevcut çalışmada optimize ruşeym protein hidrolizatlarına uzun süreli enzimatik muamele (Alkalaz 2 saat, Flavourzyme 6 saat) uygulanmasına rağmen DH değeri %17,51 iken ilgili çalışmada hidrolizatların elde edilmesi amacıyla uygulanan kısa süreli (30 dk) Alkalaz enzimi muamelesi sonucunda %28,26 oranında yüksek DH değeri elde edilmiştir. DH değerleri arasında oluşan bu farkın nedeni, ilgili çalışmada mevcut çalışmadan farklı olarak protein izolatlarına hidroliz uygulanması olduğu düşünülmektedir.

Amino asitlerin kalsiyum ile oluşturduğu kompleksin diğer kalsiyum takviyelerine (kalsiyum laktat, kalsiyum glukonat) kıyasla daha iyi stabilite ve biyoyararlanıma sahip olduğu raporlanmıştır (Rosado vd., 1993; Wang vd., 2018a). Sentetik kalsiyum takviyelerinin biyoyararlanımının düşük olduğu ve kalsiyum emiliminin zayıf olduğu bildirilmiştir (Bronner ve Pansu, 1999). Amino asidin yanı sıra peptitler kullanılarak peptit-kalsiyum şelat oluşturulması mümkündür. Wang ve diğerlerinin (2018a)

yürüttüğü araştırmada ruşeym proteinleri Alkalaz kullanılarak hidrolize edilmiştir. Bunu takiben hidrolizatlar enstrümental cihazlarla (HPLC vb.) saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış peptitin (Phe-Val-Asp-Val-Thr) amino asit dizisi belirlenerek kalsiyum bağlama kapasitesinin hidrolizatların kalsiyum bağlama kapasitesine oranla önemli ölçüde (%86,37 oranında) arttığı rapor edilmiştir. Buna ek olarak ruşeym proteininin biyoaktif peptitlerin elde edilmesi için iyi bir kaynak olabileceği ve bu sebeple söz konusu bitkisel proteininin fonksiyonel gıda ürünlerinde değerlendirilebilecek bir bileşen olduğu öne sürülmüştür.

#### 4.6.2. DPPH Süpürme Aktivitesi ve TFİ Değerleri

L25 Taguchi tasarımına göre optimize edilen ruşeym protein hidrolizatlarının DPPH süpürme aktivitesi ve TFİ değeri sırasıyla 28,64 mg TE.100 g<sup>-1</sup>, 226,78 mg GAE.100 g<sup>-1</sup> olduğu tespit edilmiştir. Optimize ruşeym protein hidrolizatlarının konsantresinin DPPH süpürme aktivitesi 340,76 mg TE.100 g<sup>-1</sup> ve TFİ değeri 2291,77 mg GAE.100 g<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur.

Glutamik asit ve aspartik asit amino asitlerinin DPPH süpürme aktivitesi diğer amino asitlere kıyasla yüksek olup güçlü antioksidatif etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Udenigwe ve Aluko, 2011). Konsantre ruşeym protein hidrolizatlarında toplam serbest amino asit kompozisyonunun yaklaşık %20'sini glutamik asit ve aspartik asit oluşturmaktadır. Zhu ve diğerleri (2006b) tarafından yürütölen araştırmada Alkalaz enzimi ile buğday ruşeymi protein hidrolizatları elde edilerek antioksidan ve serbest radikal giderici aktiviteleri incelenmiştir. İlgili çalışmada buğday ruşeymi protein hidrolizatlarının antioksidatif aktivitesi linoleik asit emülsiyonunda ölçölerek  $\alpha$ - tokoferol ve BHT maddeleri ile kıyaslanmıştır. Söz konusu çalışmanın sonuçlarına göre ruşeym protein hidrolizatlarının antioksidatif aktivitesinin  $\alpha$ -tokoferole yakın olduğu ancak BHT'nin antioksidatif aktivitesi ile kıyaslandığında önemli ölçüde düşük olduğu bildirilmiştir.

Ruşeym albümin protein hidrolizatları papain enzimi kullanılarak, ultrasonik muamele desteğiyle hidrolizatlar elde edilmiştir. Optimum DPPH süpürme aktivitesini sağlamak için hidroliz koşulları ve ultrasonik güç değerleri (140-180 W), Box-Behnken tasarımı (BBD) ve RSM kullanılarak optimize edilmiştir. İlgili çalışmanın optimizasyon sonucunda en iyi DPPH süpürme aktivitesi değerini veren parametrelerin 180 W

ultrasonik güç, 20 dk hidroliz süresi ve %2 substrat konsantrasyonu şeklinde olduğu raporlanmıştır (Tian vd., 2024). Mevcut çalışmada ruşeym protein hidrolizatlarının elde edilmesi amacıyla 26 kHz (200 W) ve 20 kHz (400 W) frekans ve güç sağlayan olmak üzere 2 farklı güç yoğunluğuna sahip ultrasonik muamele uygulanmıştır.

Görgüç ve diğerlerinin yürüttüğü (2019) araştırmada RSM ve Merkezi Kompozit Tasarım (CCD) kullanılarak susam kepeği ile ultrason destekli (528-836 W) protein hidrolizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaç kapsamında Viskozim L ve Alkalaz enzimleri kullanılmıştır. Susam kepeği hidrolizatlarında ultrason destekli enzimatik muamele edilen örneklerde TFİ değerleri incelendiğinde 382-603 mg GAE.100 g<sup>-1</sup> arasında değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir.

#### **4.6.3. Şeker ve Organik Karbon İçeriği**

L25 Taguchi tasarımına göre optimize edilmiş ruşeym protein hidrolizatları ve hidrolizatların konsantrasyonunda şeker içeriği Tablo 4.12’de verilmiştir. HPLC-RID detektör kullanılarak analiz edilen örneklerde glikoz, fruktoz, maltoz ve sakaroz bileşenleri tespit edilmiştir. Optimize ruşeym protein hidrolizatlarında çoktan aza doğru sükröz, fruktoz, glikoz ve maltoz içerikleri sırasıyla %4,13, %0,46, %0,43, %0,08 şeklinde belirlenmiştir. Optimize ruşeym protein hidrolizatlarının konsantrasyonu için çoktan aza doğru sükröz, glikoz, fruktoz ve maltoz içerikleri sırasıyla %28,02, %0,55, %0,51, %0,30 olarak belirlenmiştir. Belirlendiği gibi optimize ruşeym protein hidrolizatlarına kıyasla hidrolizatların konsantrasyonu daha fazla şeker içeriğine sahiptir.

Başlangıçta mevcut projede ruşeym örneği yerine ruşeym protein izolatu kullanımı değerlendirilmiştir. Verim, zaman ve ekonomik sebeplerden ötürü direkt olarak ruşeym kullanılarak protein hidrolizatları elde edilmesine karar verilmiştir. Buna ek olarak ruşeymde bulunan şeker vb. bileşikler protein izolasyonu işlemiyle uzaklaştırılmaktadır. Ancak ruşeym protein hidrolizatlarının tarım endüstrisinde kullanımında şekerlerin bitki için önemli karbon-enerji kaynağı olma, toprağın mikrobiyal aktivitesini, toprak verimini ve bitki sağlığını olumlu yönde etkileme gibi özellikler taşıması nedeniyle bu bileşikler istenmektedir (Ugolini vd., 2015; Wang ve Ruan, 2013). Buna ek olarak optimize ruşeym protein hidrolizatlarının biyoteknoloji alanında kullanım potansiyeli olarak azot kaynağı olmasının yanı sıra C elementine de sahip olması önemli olduğu düşünülmektedir. Böylelikle başlangıç materyali olarak

ruşeym protein izolatu yerine, ruşeym kullanımı karbonca zengin protein hidrolizatlarının (konsantre hidrolizatta organik karbon %29,68) elde edilmesine olanak sağlamıştır. Elde edilen optimize ruşeym protein hidrolizatlarının şeker içeriğinin (konsantre hidrolizatta sükröz %28,02) yüksek olduğu görülmektedir.

**Tablo 4.12:** L25 Taguchi analizi sonucu elde edilen optimum faktör seviyelerine göre üretilen ruşeym protein hidrolizatları ve hidrolizatların konsantrisinin (9,8 kat konsantre) şeker içeriği

	<b>Glikoz (%)</b>	<b>Fruktöz (%)</b>	<b>Maltoz (%)</b>	<b>Sükröz (%)</b>
<b>Ruşeym Protein Hidrolizatu</b>	0,43±0,02	0,46±0,03	0,08±0,01	4,13±0,12
<b>Ruşeym Protein Hidrolizat Konsantrisi</b>	0,55±0,00	0,51±0,01	0,30±0,01	28,02±2,96

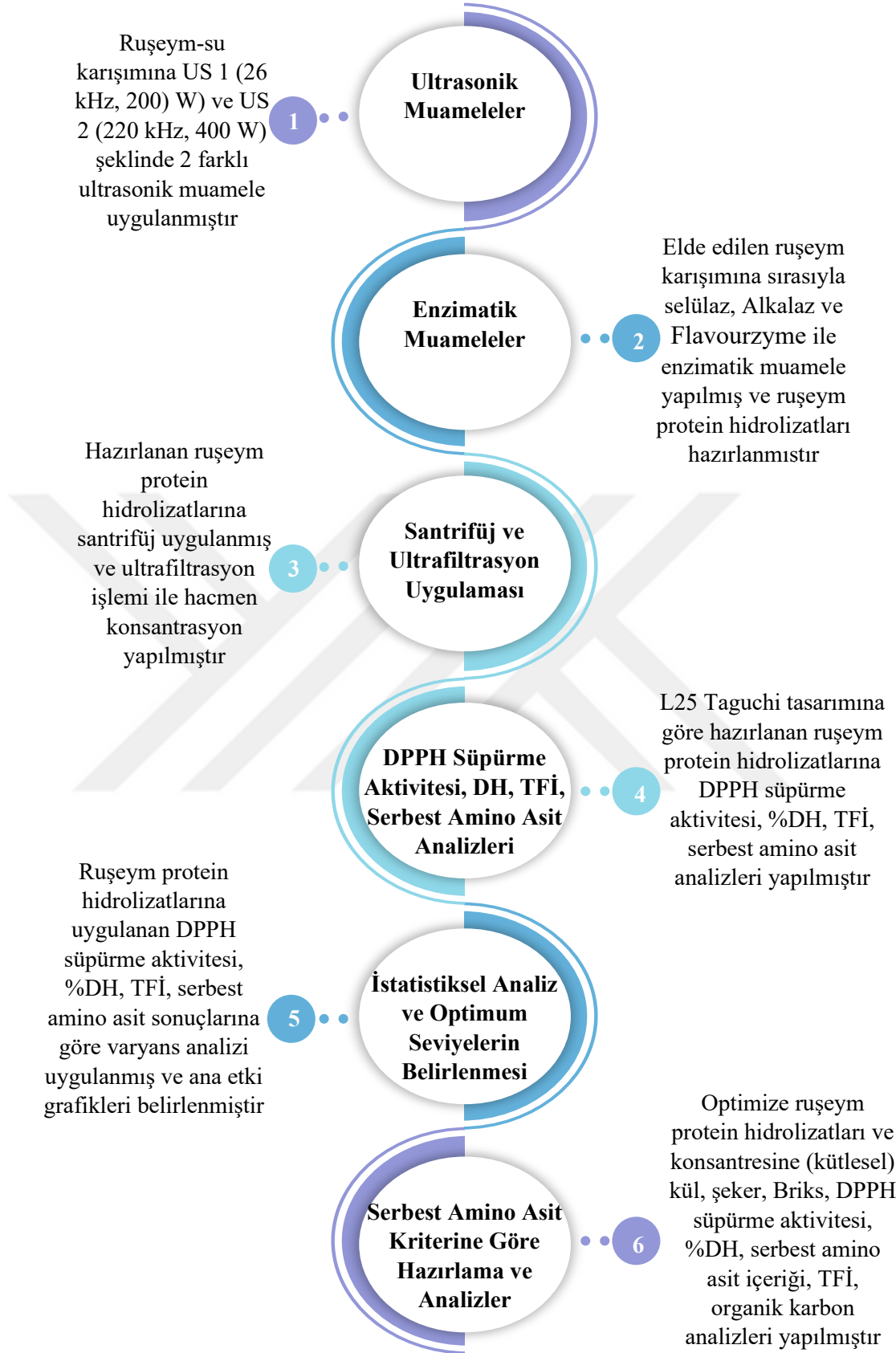
**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Maillard reaksiyonu, indirgen şekerlerin karbonil grupları ile amino asitler, proteinler veya diğer azot içeren bileşiklerde bulunan birincil amino grupları arasında meydana gelen, enzimatik olmayan bir esmerleşme şeklinde tanımlanmaktadır (Martins vd., 2000). Literatürde BSA proteini ve glikoz kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, Maillard reaksiyonu sonrası kahverengileşme kinetiğinin 60 °C’de, 100 °C’ye kıyasla yaklaşık 15 kat daha düşük olduğu ve sıcaklık artışıyla birlikte esmerleşme derecesinin arttığı belirlenmiştir (Ajandouz vd., 2008). Bu sebeple mevcut çalışmada Protein hidrolizatlarının etüvde konsantre edilmesi sürecinde 45°C sıcaklıkta Maillard reaksiyonu ürünlerinin oluşmayacağı ya da oluşsa bile ihmal edilebilecek düzeyde düşük miktarlarda oluşacağı öngörülmektedir.

Şekil 4.6’da buğday ruşeyminden ruşeym protein hidrolizatlarının elde edilmesi ve sonrasında yapılan analizleri özetleyen akım şeması yer almaktadır. Ruşeym protein hidrolizatlarının elde edilmesi için öncelikle ruşeym örneğine ultrasonik ve enzimatik muameleler uygulanmıştır. Bunu takiben santrifüj edilmiş ve ultrafiltrasyon ile hacmen konsantre edilmiştir. Elde edilen ruşeym protein hidrolizatlarına DPPH süpürme aktivitesi, %DH, TFI, serbest amino asit analizleri uygulanmıştır. Bir sonraki aşamada elde edilen veriler değerlendirilip birincil değerlendirme kriteri olan serbest

amino asit içeriğine göre optimize ruşeym protein hidrolizatları elde edilmiş ve kütleli konsantrasyon uygulanmıştır. Son aşamada optimize ruşeym protein hidrolizatlarına ve konsantresine kül, şeker, Briks, DPPH süpürme aktivitesi, %DH, serbest amino asit içeriği, TFİ, organik karbon analizleri uygulanmıştır.





**Şekil 4.7:** Ruşeym protein hidrolizatlarının eldesinde ve sonrasında yürütülen çalışmaların akım şeması

**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

## BEŞİNCİ BÖLÜM

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada değirmencilik endüstrisinde yan ürün olarak elde edilen buğday ruşeymi kullanılarak L25 Taguchi tasarımına göre ultrasonik muamele, enzimatik proteoliz işlemleri uygulanmıştır. Sonraki aşamada ultrafiltrasyon ile numuneler hacmen konsantre edilerek hazırlanan ruşeym protein hidrolizatlarına DPPH süpürme aktivitesi, TFI, %DH ve serbest amino asit içeriği analizleri yapılmıştır. Serbest amino asit içeriği birincil kriter seçilerek hazırlanan ruşeym protein hidrolizatları ve konsantre edilmiş formuna analizler yapılmış ve ruşeym protein hidrolizatlarının farklı sektörlerde kullanım potansiyeline ilişkin literatür değerlendirmesi yapılmıştır.

Buğday ruşeymine L25 Taguchi tasarım yöntemine göre proteoliz uygulanmış ve serbest amino asit içeriğine göre optimize ruşeym protein hidrolizatları elde edilerek farklı sektörler için potansiyel bir ürün elde edilebilirliği değerlendirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda ruşeym örneğine ultrasonik ve proteolitik muameleler uygulanmış ve bunun yanında ürün performansını iyileştirmek için ısıtma, soğutma, asidifikasyon, pH modülasyonu, membran prosesleri gibi işlemlerden yararlanılmıştır. Bu şekilde elde edilen ürün, nispeten yüksek serbest amino asit içeriğine sahip olup, tarım, hayvan beslenmesi, gıda ve gıda takviyeleri üretimi gibi çeşitli sektörlerde potansiyel kullanım alanlarına sahip olduğu düşünülmektedir.

Mevcut çalışmada ruşeym protein hidrolizatlarının elde edilmesinde 26 kHz (200 W) ve 20 kHz (400 W) frekans ve güç (parantez içinde verilmiştir) sağlayan olmak üzere 2 farklı ultrasonik muamele uygulanmıştır. Literatürde proteoliz öncesi uygulanan ultrasonik muamelenin %DH değerini arttırdığı çalışmalar bulunmaktadır (Vidal vd., 2018)

L25 Taguchi tasarımına göre elde edilen 25 farklı ruşeym protein hidrolizatlarında DPPH süpürme aktivitesi, toplam fenolik içeriği, serbest amino asit içeriği ve hidroliz derecesi ölçülmüştür. Söz konusu her bir analiz için ana etki grafiği hazırlanmıştır. Ana etki grafiklerinde, ruşeym protein hidrolizatları hazırlanırken maksimum verimin alınması için ilgili analize uygun olarak optimize faktör seviyeleri belirlenmiştir. Mevcut çalışmada L25 Taguchi tasarımına göre hazırlanan ruşeym protein hidrolizatlarının serbest amino asit içeriği esas alınarak ana etki grafiği

oluşturulmuştur. Ana etki grafiğinde yer alan optimum faktör seviyelerine göre ruşeym protein hidrolizatları hazırlanmış ve konsantre edilmiştir. Optimize ruşeym protein hidrolizatlarına ve konsantresine kül, şeker, Briks, DPPH süpürme aktivitesi, %DH, serbest amino asit içeriği, TFI, organik karbon analizleri uygulanmıştır. Elde edilen analiz verileri, literatürdeki benzer çalışmalarla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Ruşeym protein hidrolizatlarının DPPH süpürme aktivitesi ana etki grafiğinde sunulan ultrasonik muamele süresi, proteolitik enzim konsantrasyonları ve ultrafiltrasyon hacmen konsantrasyonunun optimum parametrelerine göre hazırlanacak ruşeym protein hidrolizatlarının yüksek antioksidatif içeriğine sahip olacağı öngörülmektedir. Böylelikle bu koşullar altında hazırlanan ruşeym protein hidrolizatlarının kozmetik sektöründe değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra biyoteknolojide fermantasyon uygulamasında besin kaynağı olarak zengin karbon içeriği ve nispeten yüksek antioksidatif etkisi nedeniyle DPPH süpürme aktivitesinin optimum faktör seviyelerine göre hazırlanacak ruşeym protein hidrolizatlarının kullanıldığı yeni bir proje gerçekleştirilebileceği düşünülmektedir.

Benzer şekilde TFI değeri esas alınarak belirlenen optimize faktör seviyelerinde ruşeym protein hidrolizatları hazırlanarak tarım endüstrisinde bitkilerin büyüme ve gelişmesi üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışma yapılabilmektedir. Literatürde fenolik maddelerin bitkilere uygulanmasıyla birlikte, bitkide köklenmeyi arttırdığı ve verimi olumlu açıdan etkilediği çalışmalar yer almaktadır (Masondo vd., 2015). Fenolik maddeler tarım endüstrisinin yanı sıra kozmetik sektöründe gibi farklı sektörler için de önemli bileşenlerdir.

Kısacası bu çalışmada, ruşeym protein hidrolizatlarının üretiminde serbest amino asit içeriği birincil optimizasyon kriteri olarak belirlenmiştir. Bu doğrultuda elde edilen optimize hidrolizat örnekleri ilgili analizlerle karakterize edilmiştir. Benzer şekilde, diğer analizler için belirlenen faktör seviyelerine göre üretilen optimize ruşeym protein hidrolizatlarının farklı kullanım alanlarında değerlendirilebileceği ve bu kapsamda yeni araştırmaların yürütülebileceği öngörülmektedir.

## KAYNAKÇA

- Abd El-Salam, M. H., & El-Shibiny, S. (2017). Preparation, properties, and uses of enzymatic milk protein hydrolysates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1119-1132.
- Abdelgawad, K. F., Mhmoud, A. A., & Mohamed, H. F. (2018). Foliar spraying with some biostimulants improves growth, chemical constituents, and yield of head lettuce plant. *Middle East Journal of Agriculture Research*, 7(04), 1268-1277.
- Abdollahi, M., Axelsson, J., Carlsson, N. G., Nylund, G. M., Albers, E., & Undeland, I. (2019). Effect of stabilization method and freeze/thaw-aided precipitation on structural and functional properties of proteins recovered from brown seaweed (*Saccharina latissima*). *Food Hydrocolloids*, 96, 140-150.
- Adibi, S. A. (1989). Glycyl-dipeptides: new substrates for protein nutrition. *The Journal of laboratory and Clinical Medicine*, 113(6), 665-673.
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256-1262.
- Adler-Nissen J. (1986). *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. Amsterdam, Hollanda: Elsevier Applied Science Publishers, 427 pp.
- Adom, K. K., Sorrells, M. E., & Liu, R. H. (2005). Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2297-2306.
- Ajandouz, E. H., Desseaux, V., Tazi, S., & Puigserver, A. (2008). Effects of temperature and pH on the kinetics of caramelisation, protein cross-linking and Maillard reactions in aqueous model systems. *Food Chemistry*, 107(3), 1244-1252.
- Alvarez, M. A., & Moreno-Arribas, M. V. (2014). The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science & Technology*, 39(2), 146-155.

- Alves, A. L., Marques, A. L., Martins, E., Silva, T. H., & Reis, R. L. (2017). Cosmetic potential of marine fish skin collagen. *Cosmetics*, 4(4), 39.
- Amnuakit, T., Shankar, R., & Benjakul, S. (2022). Hydrolyzed fish collagen serum from by-product of food industry: cosmetic product formulation and facial skin evaluation. *Sustainability*, 14(24), 16553.
- Arntfield, S. D., Ismond, M. A. H., & Murray, E. D. (1985). The fate of antinutritional factors during the preparation of a fababean protein isolate using a micellization technique. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 18(2), 137-143.
- Arshad, M. U., Anjum, F. M., & Zahoor, T. (2007). Nutritional assessment of cookies supplemented with defatted wheat germ. *Food Chemistry*, 102(1), 123-128.
- Asaithambi, N., Singha, P., & Singh, S. K. (2023). Recent application of protein hydrolysates in food texture modification. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(30), 10412-10443.
- Ashaolu, T. J. (2020). Applications of soy protein hydrolysates in the emerging functional foods: A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 55(2), 421-428.
- Ashraf, J., Liu, L., Awais, M., Xiao, T., Wang, L., Zhou, X., ... & Zhou, S. (2020). Effect of thermosonication pre-treatment on mung bean (*Vigna radiata*) and white kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: Enzymatic hydrolysis, cholesterol lowering activity and structural characterization. *Ultrasonics Sonochemistry*, 66, 105121.
- Aydemir, L. Y., & Yemenicioglu, A. (2013). Are protein-bound phenolic antioxidants in pulses unseen part of iceberg. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*, 1(4), 1-3.
- Babaki, M., Yousefi, M., Habibi, Z., & Mohammadi, M. (2017). Process optimization for biodiesel production from waste cooking oil using multi-enzyme systems through response surface methodology. *Renewable Energy*, 105, 465-472.
- Barba, C., Méndez, S., Roddick-Lanzilotta, A., Kelly, R., Parra, J. L., & Coderch, L. (2008). Cosmetic effectiveness of topically applied hydrolysed keratin

- peptides and lipids derived from wool. *Skin Research and Technology*, 14(2), 243-248.
- Barneix, A. J., & Causin, H. F. (1996). The central role of amino acids on nitrogen utilization and plant growth. *Journal of Plant Physiology*, 149(3-4), 358-362.
- Barnes, P. J. (Ed.). (1983). *Lipids in cereal technology* (pp. 33-55). New York, ABD: Academic Press.
- Beare, M. H., Hendrix, P. F., & Coleman, D. C. (1994). Water-stable aggregates and organic matter fractions in conventional-and no-tillage soils. *Soil Science Society of America Journal*, 58(3), 777-786.
- Beauchamp, G. K., Maller, O., & Rogers, J. G. (1977). Flavor preferences in cats (*Felis catus* and *Panthera* sp.). *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 91(5), 1118.
- Belderok, B. (2000). Developments in bread-making processes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 55(1), 1-14.
- Benedito, J., Carcel, J. A., Gonzalez, R., & Mulet, A. (2002). Application of low intensity ultrasonics to cheese manufacturing processes. *Ultrasonics*, 40(1-8), 19-23.
- Benedito, J., Carcel, J., Clemente, G., & Mulet, A. (2000). Cheese maturity assessment using ultrasonics. *Journal of Dairy Science*, 83(2), 248-254.
- Benedito, J., Simal, S., Clemente, G., & Mulet, A. (2006). Manchego cheese texture evaluation by ultrasonics and surface probes. *International Dairy Journal*, 16(5), 431-438.
- Bilga, P. S., Singh, S., & Kumar, R. (2016). Optimization of energy consumption response parameters for turning operation using Taguchi method. *Journal of Cleaner Production*, 137, 1406-141
- Bilgiçli, N., Elgün, A., Herken, E. N., Ertaş, N., & İbanoğlu, Ş. (2006). Effect of wheat germ/bran addition on the chemical, nutritional and sensory quality of tarhana, a fermented wheat flour-yoghurt product. *Journal of Food Engineering*, 77(3), 680-686.

- Blaza, S. E., Burger, I. H., Holme, D. W., & Kendall, P. T. (1982). Sulfur-containing amino acid requirements of growing dogs. *The Journal of Nutrition*, *112*(11), 2033-2042.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, *181*(4617), 1199-1200.
- Bosch, G., Beerda, B., Hendriks, W. H., Van der Poel, A. F. B., & Verstegen, M. W. A. (2007). Impact of nutrition on canine behaviour: current status and possible mechanisms. *Nutrition Research Reviews*, *20*(2), 180-194.
- Bouchez-Mahiout, I., Pecquet, C., Kerre, S., Snégaroff, J., Raison-Peyron, N., & Laurière, M. (2010). High molecular weight entities in industrial wheat protein hydrolysates are immunoreactive with IgE from allergic patients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(7), 4207-4215.
- Boukid, F., Folloni, S., Ranieri, R., & Vittadini, E. (2018). A compendium of wheat germ: Separation, stabilization and food applications. *Trends in Food Science & Technology*, *78*, 120-133.
- Brandolini, A., & Hidalgo, A. (2012). Wheat germ: not only a by-product. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *63*(sup1), 71-74.
- Brestenský, S. M., & Patráš, P. (2019). Wheat germs and their protein quality for human nutrition. *Nutrition & Food Science International Journal*, *8*, 555746.
- BRF Ingredients BioActio Health & Performance (2022) (Chicken Protein Hydrolysate) <https://www.brfindredients.com/en/animal-nutrition/bioactio-health-performance/>, Erişim tarihi: 10/03/2025.
- Bronner, F., & Pansu, D. (1999). Nutritional aspects of calcium absorption. *The Journal of Nutrition*, *129*(1), 9-12.
- Brückner, H., Wittner, R., Hausch, M., & Godel, H. (1989). Analyse von chiralen Aminosäuren in fermentierten Lebensmitteln unter Verwendung von o-Phthaldialdehyd und neuartigen N-Acyl-L-Cysteinen. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie*, *333*, 775-776.

- Bulgari, R., Trivellini, A., & Ferrante, A. (2019). Effects of two doses of organic extract-based biostimulant on greenhouse lettuce grown under increasing NaCl concentrations. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 403468.
- Bulleid, N. J., & Ellgaard, L. (2011). Multiple ways to make disulfides. *Trends in Biochemical Sciences*, *36*(9), 485-492.
- Butré, C. I., Sforza, S., Gruppen, H., & Wierenga, P. A. (2014). Introducing enzyme selectivity: A quantitative parameter to describe enzymatic protein hydrolysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *406*, 5827-5841.
- Carillo, P., Colla, G., El-Nakhel, C., Bonini, P., D'Amelia, L., Dell'Aversana, E., ... & Rouphael, Y. (2019). Biostimulant application with a tropical plant extract enhances *Corchorus olitorius* adaptation to sub-optimal nutrient regimens by improving physiological parameters. *Agronomy*, *9*(5), 249.
- Caruso, G., De Pascale, S., Cozzolino, E., Giordano, M., El-Nakhel, C., Cuciniello, A., ... & Rouphael, Y. (2019). Protein hydrolysate or plant extract-based biostimulants enhanced yield and quality performances of greenhouse perennial wall rocket grown in different seasons. *Plants*, *8*(7), 208.
- Cave, N. J. (2006). Hydrolyzed protein diets for dogs and cats. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, *36*(6), 1251-1268.
- Chalamaiah, M., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food Chemistry*, *135*(4), 3020-3038.
- Challoner, N. I., Chahal, S. P., & Jones, R. T. (1997). Cosmetic proteins for skin care: An investigation into the use of proteins as moisturizing and tightening agents. *Cosmetics and Toiletries*, *112*(12), 51-63.
- Chaudhry, S., & Sidhu, G. P. S. (2022). Climate change regulated abiotic stress mechanisms in plants: A comprehensive review. *Plant Cell Reports*, *41*(1), 1-31.
- Chávez-Martínez, A., Reyes-Villagrana, R. A., Rentería-Monterrubio, A. L., Sánchez-Vega, R., Tirado-Gallegos, J. M., & Bolívar-Jacobo, N. A. (2020). Low and high-intensity ultrasound in dairy products: applications and effects on physicochemical and microbiological quality. *Foods*, *9*(11), 1688.

- Chen, C., Chi, Y. J., Zhao, M. Y., & Xu, W. (2012). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate. *Food Science and Biotechnology*, *21*, 27-34.
- Chen, H. J., Dai, F. J., Chen, C. Y., Fan, S. L., Zheng, J. H., Huang, Y. C., ... & Chen, C. S. (2021a). Evaluating the antioxidants, whitening and antiaging properties of rice protein hydrolysates. *Molecules*, *26*(12), 3605.
- Chen, W., Liao, A., Hou, Y., Pan, L., Yu, G., Du, J., ... & Huang, J. (2021b). Digestive characteristics and peptide release from wheat embryo proteins *in vitro*. *Food & Function*, *12*(5), 2257-2269.
- Cheung, L. K. Y., Sanders, A. D., Houfani, A. A., Grahame, D. A. S., Bryksa, B. C., Dee, D. R., & Yada, R. Y. (2024). Factors affecting enzyme activity and design. In *Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality* (pp. 17-57). Sawston, İngiltere: Woodhead Publishing.
- Cheynier, V. (2012). Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, *11*(2), 153-177.
- Cho, M. J., Unklesbay, N., Hsieh, F. H., & Clarke, A. D. (2004). Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(19), 5895-5901.
- Cimbala, J. M. (2014). Taguchi orthogonal arrays. *Pennsylvania State University: State College, PA, Amerika*, pp. 1-3.
- Claros Cuadrado, J. L., Pinillos, E. O., Tito, R., Mirones, C. S., & Gamarra Mendoza, N. N. (2019). Insecticidal properties of capsaicinoids and glucosinolates extracted from *Capsicum chinense* and *Tropaeolum tuberosum*. *Insects*, *10*(5), 132.
- Claver, I. P., & Zhou, H. (2005). Enzymatic hydrolysis of defatted wheat germ by proteases and the effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*, *29*(1), 13-26.
- Cleaves, H. J. (2023). Isoelectric Point. In *Encyclopedia of Astrobiology* (pp. 1541-1541). Berlin: Springer Berlin, Almanya.
- Clemente, A. (2000). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, *11*(7), 254-262.

- Colla, G., Hoagland, L., Ruzzi, M., Cardarelli, M., Bonini, P., Canaguier, R., & Roupael, Y. (2017). Biostimulant action of protein hydrolysates: Unraveling their effects on plant physiology and microbiome. *Frontiers in Plant science*, 8, 2202.
- Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R., & Roupael, Y. (2015). Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 28-38.
- Corte, L., Dell'Abate, M. T., Magini, A., Migliore, M., Felici, B., Roscini, L., ... & Benedetti, A. (2014). Assessment of safety and efficiency of nitrogen organic fertilizers from animal-based protein hydrolysates—a laboratory multidisciplinary approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(2), 235-245.
- Coşkun, Ö., Çağlar, A. F., Çakır, B., & Gülseren, İ. (2021). Influence of Maillard reaction conditions and solvent extraction on the surface activity and foaming characteristics of black cumin protein concentrates. *Journal of Food Science and Technology*, 58, 4323-4332.
- Coşkun, Ö., Çakır, B., Vahapoğlu, B., & Gülseren, İ. (2019). Influence of extraction conditions on structural and functional characteristics of black cumin protein concentrates and ACE-inhibition in their hydrolyzates. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(3), 2328-2338.
- Cozzone, A. J. (2002). Proteins: Fundamental chemical properties. *Encyclopedia of Life Sciences. No month listed-2002. John Wiley & Sons Ltd*, 1-10.
- Creighton, T. E. (1988). Disulphide bonds and protein stability. *BioEssays*, 8(2-3), 57-63.
- Cui, Q., Zhang, Z., Li, M., Zhou, M., & Sun, X. (2023). Peptide profiles and allergy-reactivity of extensive hydrolysates of milk protein. *Food Chemistry*, 411, 135544.
- Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M., & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 109(1), 144-148.

- Cushman, D. W., Cheung, H. S., Sabo, E. F., & Ondetti, M. A. (1982). Development and design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *The American Journal of Cardiology*, 49(6), 1390-1394.
- Çakmaklı, V., Köse, E. ve Kemahlıoğlu, K. (1995). Ham ve stabilize buğday tohumu ile birlikte iyileştiricilerin karışımının eklenmesinin hamur ve ekmeğin özellikleri üzerine etkileri. *Gıda*, 20 (4), 243-248.
- Dabbour, M., He, R., Mintah, B., & Ma, H. (2019). Antioxidant activities of sunflower protein hydrolysates treated with dual-frequency ultrasonic: Optimization study. *Journal of Food Process Engineering*, 42(5), e13084.
- Dale, H. F., Jensen, C., Hausken, T., Lied, E., Hatlebakk, J. G., Brønstad, I., ... & Lied, G. A. (2018). Effect of a cod protein hydrolysate on postprandial glucose metabolism in healthy subjects: A double-blind cross-over trial. *Journal of Nutritional Science*, 7, e33.
- Damodaran, S., & Parkin, K. L. (2017). Amino acids, peptides, and proteins. In *Fennema's food chemistry* (pp. 235-356). Boca Raton, Amerika: CRC press.
- Damodaran, S., (2000). Aminoácidos, péptidos y proteínas. In: Fennema, O.R. (Dir), *Química de los Alimentos*. Editorial Acribia SA, Zaragoza, pp. 381–511.
- Davis, J. P., Foegeding, E. A., & Hansen, F. K. (2004). Electrostatic effects on the yield stress of whey protein isolate foams. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 34(1), 13-23.
- Del Buono, D. (2021). Can biostimulants be used to mitigate the effect of anthropogenic climate change on agriculture? It is time to respond. *Science of the Total Environment*, 751, 141763.
- Del Mar Contreras, M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Martín-Álvarez, P. J., & Recio, I. (2011). Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 44(1), 9-15.
- Delgado-Povedano, M. M., & De Castro, M. L. (2015). A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship. *Analytica Chimica Acta*, 889, 1-21.

- Demain, A. L., Gerson, D. F., & Fang, A. (2005). Effective levels of tetanus toxin can be made in a production medium totally lacking both animal (eg, brain heart infusion) and dairy proteins or digests (eg, casein hydrolysates). *Vaccine*, 23(46-47), 5420-5423.
- Demirci, M. (2016). Gıda Kimyası. İstanbul, Türkiye.
- Dever, T. E., Wei, C. L., Benkowski, L. A., Browning, K., Merrick, W. C., & Hershey, J. W. (1994). Determination of the amino acid sequence of rabbit, human, and wheat germ protein synthesis factor eIF-4C by cloning and chemical sequencing. *Journal of Biological Chemistry*, 269(5), 3212-3218.
- Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M., & Hayes, M. (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124(4), 1296-1307.
- Dickinson, E. (1992). An introduction to food colloids (pp. 89-136). Oxford, İngiltere: Oxford University Press.
- Ding, Y., Wang, Y., Qu, W., Ren, X., Lu, F., Tian, W., ... & Ma, H. (2022). Effect of innovative ultrasonic frequency excitation modes on rice protein: Enzymolysis and structure. *LWT-Food Science and Technology*, 153, 112435.
- Direktif 2002/46/EC, <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32002L0046>, Erişim tarihi: 10/03/2025)
- Djellouli, M., López-Caballero, M. E., Arancibia, M. Y., Karam, N., & Martínez-Alvarez, O. (2020). Antioxidant and antimicrobial enhancement by reaction of protein hydrolysates derived from shrimp by-products with glucosamine. *Waste and Biomass Valorization*, 11, 2491-2505.
- Do Evangelho, J. A., Vanier, N. L., Pinto, V. Z., De Berrios, J. J., Dias, A. R. G., & da Rosa Zavareze, E. (2017). Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. *Food Chemistry*, 214, 460-467.

- Dolatowski, Z. J., Stadnik, J., & Stasiak, D. (2007). Applications of ultrasound in food technology. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 6(3), 88-99.
- Dong, X., Wang, J., & Raghavan, V. (2021). Impact of microwave processing on the secondary structure, *in-vitro* protein digestibility and allergenicity of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) proteins. *Food Chemistry*, 337, 127811.
- Doran, M. H., Pavadai, E., Rynkiewicz, M. J., Walklate, J., Bullitt, E., Moore, J. R., ... & Lehman, W. (2020). Cryo-EM and molecular docking shows myosin loop 4 contacts actin and tropomyosin on thin filaments. *Biophysical Journal*, 119(4), 821-830.
- Du Jardin, P. (2012). The Science of Plant Biostimulants—A bibliographic analysis, Ad hoc study report. Brussels: European Commission. Available online at: <http://hdl.handle.net/2268/169257> (Accessed April 25, 2013).
- Duran-Jimenez, G., Hernandez-Montoya, V., Montes-Moran, M. A., Bonilla-Petriciolet, A., & Rangel-Vazquez, N. A. (2014). Adsorption of dyes with different molecular properties on activated carbons prepared from lignocellulosic wastes by Taguchi method. *Microporous and Mesoporous Materials*, 199, 99-107.
- Eisenmenger, M., & Dunford, N. T. (2008). Bioactive components of commercial and supercritical carbon dioxide processed wheat germ oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, 55-61.
- Eisenmenger, M., Dunford, N. T., Eller, F., Taylor, S., & Martinez, J. (2006). Pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of wheat germ oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83, 863-868.
- Elliott, D. C., Orth, R. J., Gao, J., Werpy, T. A., Eakin, D. E., Schmidt, A. J., & Neuenschwander, G. G. (2002). *Biorefinery concept development based on wheat flour milling* (No. PNNL-SA-35705). Pacific Northwest National Lab.(PNNL), Richland, WA (Amerika).
- Endale, H., Aliye, S., & Mathewos, M. (2022). Vaccine epidemiology, evaluation, and constraints of vaccine effectiveness-A review. *Veterinary Vaccine*, 1(1), 100004.

- Ertani, A., Pizzeghello, D., Francioso, O., Sambo, P., Sanchez-Cortes, S., & Nardi, S. (2014). *Capsicum chinensis* L. growth and nutraceutical properties are enhanced by biostimulants in a long-term period: Chemical and metabolomic approaches. *Frontiers in Plant science*, 5, 375.
- Eskin, D. G., Tzanakis, I., Wang, F., Lebon, G. S. B., Subroto, T., Pericleous, K., & Mi, J. (2019). Fundamental studies of ultrasonic melt processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 52, 455-467.
- Etemadian, Y., Ghaemi, V., Shaviklo, A. R., Pourashouri, P., Mahoonak, A. R. S., & Rafipour, F. (2021). Development of animal/plant-based protein hydrolysate and its application in food, feed and nutraceutical industries: State of the art. *Journal of Cleaner Production*, 278, 123219.
- Fadimu, G. J., Gill, H., Farahnaky, A., & Truong, T. (2021). Investigating the impact of ultrasound pretreatment on the physicochemical, structural, and antioxidant properties of lupin protein hydrolysates. *Food and Bioprocess Technology*, 14, 2004-2019.
- Fang, A., Gerson, D. F., & Demain, A. L. (2006). Menstrum for culture preservation and medium for seed preparation in a tetanus toxin production process containing no animal or dairy products. *Letters in Applied Microbiology*, 43(4), 360-363.
- FAO (2022) FAOSTAT– [erişildi 21 Mayıs 2024] Çevrimiçi olarak şu adresten ulaşılabilir: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Farrant, L., Olsen, S. I., & Wang, A. (2010). Environmental benefits from reusing clothes. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 15, 726-736.
- Fennema, O. R. (2008). *Fennema's food chemistry*. S. Damodaran, & K. L. Parkin (Eds.). Boca Raton, Amerika: CRC Press.
- Feyzi, S., Varidi, M., Zareb, F., & Varidi, M. J. (2015). Extraction optimization of fenugreek seed protein. *Science of Food and Agriculture*, 15, 3165-3176.
- Firouz, M. S., Farahmandi, A., & Hosseinpour, S. (2019). Recent advances in ultrasound application as a novel technique in analysis, processing and quality control of fruits, juices and dairy products industries: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 57, 73-88.

- Flores, T., Todd, C. D., Tovar-Mendez, A., Dhanoa, P. K., Correa-Aragunde, N., Hoyos, M. E., ... & Polacco, J. C. (2008). Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signaling in root development. *Plant Physiology*, *147*(4), 1936-1946.
- Foegeding, E. A., Luck, P. J., & Davis, J. P. (2006). Factors determining the physical properties of protein foams. *Food Hydrocolloids*, *20*(2-3), 284-292.
- Förster, T. H., Waldmann-Laue, M., Both, W., & Jassoy, C. (1999). Lipoprotein creams: Utilization of multifunctional ingredients for the preparation of cosmetic emulsions with excellent skin compatibility. *International Journal of Cosmetic Science*, *21*(4), 253-264.
- Francis, O. L., Wang, K. Y., Kim, E. H., & Moran, T. P. (2020). Common food allergens and cross-reactivity. *Journal of Food Allergy (USA)*, *2*(1), 17-21.
- Friedman, M. (1999). Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(9), 3457-3479.
- Galkin, O., & Vekilov, P. G. (2000). Control of protein crystal nucleation around the metastable liquid–liquid phase boundary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(12), 6277-6281.
- Gao, C., Hui, M., Dong, N., & Koko, M. Y. F. (2022). Extraction, purification, and *in vitro* biological activities of intestinal alkaline phosphatase from pig intestine mucous waste. *Journal of Food Processing and Preservation*, *46*(11), e17023.
- Gao, C., Jia, J., Yang, Y., Ge, S., Song, X., Yu, J., & Wu, Q. (2023). Structural change and functional improvement of wheat germ protein promoted by extrusion. *Food Hydrocolloids*, *137*, 108389.
- Gao, R., Yu, Q., Shen, Y., Chu, Q., Chen, G., Fen, S., ... & Sun, Q. (2021). Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: Developments and challenges. *Trends in Food Science & Technology*, *110*, 687-699.
- Garba, U., & Kaur, S. (2014). Protein isolates: Production, functional properties and application. *International Journal of Current Research and Review*, *6*(3), 35.

- García-Cano, I., Rocha-Mendoza, D., Ortega-Anaya, J., Wang, K., Kosmerl, E., & Jiménez-Flores, R. (2019). Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*, 5243-5257.
- Ge, S., He, C., Duan, Y., Zhou, X., Lei, J., Tong, X., ... & Jia, J. (2023). Characteristics of enzymolysis of silkworm pupa protein after tri-frequency ultrasonic pretreatment: Kinetics, thermodynamics, structure and antioxidant changes. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *11*, 1170676.
- Ge, Y., Sun, A., Ni, Y., & Cai, T. (2000). Some nutritional and functional properties of defatted wheat germ protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(12), 6215-6218.
- Gernandt, J., & Hansson, P. (2012). Core-shell separation of a hydrogel in a large solution of proteins. *Soft Matter*, *8*(42), 10905-10913.
- Ghasemi, S., Khoshgoftarmanesh, A. H., Afyuni, M., & Hadadzadeh, H. (2013). The effectiveness of foliar applications of synthesized zinc-amino acid chelates in comparison with zinc sulfate to increase yield and grain nutritional quality of wheat. *European Journal of Agronomy*, *45*, 68-74.
- Ghelich, S., Ariaii, P., & Ahmadi, M. (2022). Evaluation of functional properties of wheat germ protein hydrolysates and its effect on physicochemical properties of frozen yogurt. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *28*(2), 69.
- Gildberg, A., & Stenberg, E. (2001). A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochemistry*, *36*(8-9), 809-812.
- Gómez-Guillén, M. C., Pérez-García, S., Alemán, A., López-Caballero, M. E., Sotelo, C. G., & Montero, M. P. (2023). Development of a ready-to-eat fish product enriched with fish oil entrapped in a  $\kappa$ -Carrageenan egg white fish protein hydrolysate dry powder. *Foods*, *12*(11), 2272.
- Görgüç, A., Bircan, C., & Yılmaz, F. M. (2019). Sesame bran as an unexploited by-product: Effect of enzyme and ultrasound-assisted extraction on the recovery of protein and antioxidant compounds. *Food Chemistry*, *283*, 637-645.

- Guillaume, J., & Choubert, G. (2001). Digestive physiology and nutrient digestibility in fishes. In: Guillaume J, Kaushik S, Bergot P, Métailler R (eds) Nutrition and feeding of fish and crustaceans (pp 27–58). Chichester, İngiltere: Springer.
- Gulevskyy, O. K. (2020). Influence of cryoprotective agents on protein biosynthesis in Krebs-2 ascites carcinoma and wheat germ cell-free systems. *Cryobiology*, 96, 55-60.
- Gülseren, İ., Güzey, D., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2007). Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(2), 173-183.
- Güzey, D., Gülseren, İ., Bruce, B., & Weiss, J. (2006). Interfacial properties and structural conformation of thermosonicated bovine serum albumin. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 669-677.
- Habinshuti, I., Mu, T. H., & Zhang, M. (2021). Structural, antioxidant, aroma, and sensory characteristics of Maillard reaction products from sweet potato protein hydrolysates as influenced by different ultrasound-assisted enzymatic treatments. *Food Chemistry*, 361, 130090.
- Hadnađev, M., Dapčević-Hadnađev, T., Lazaridou, A., Moschakis, T., Michaelidou, A. M., Popović, S., & Biliaderis, C. G. (2018). Hempseed meal protein isolates prepared by different isolation techniques. Part I. physicochemical properties. *Food Hydrocolloids*, 79, 526-533.
- Hartmann, M. D., Mandler, C. T., Bassler, J., Karamichali, I., Ridderbusch, O., & Lupas, A. N. (2016).  $\alpha/\beta$  coiled coils. *Elife*, 5, e11861-e11861.
- Hashempour-Baltork, F., Farshi, P., & Khosravi-Darani, K. (2022). Vegetable and fruit wastes as substrate for production of single-cell protein and aquafeed meal. In *Fruits and vegetable wastes: Valorization to bioproducts and platform chemicals* (pp. 169-187). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Hasni, I., Bourassa, P., Hamdani, S., Samson, G., Carpentier, R., & Tajmir-Riahi, H. A. (2011). Interaction of milk  $\alpha$ - and  $\beta$ -caseins with tea polyphenols. *Food Chemistry*, 126(2), 630-639.

- Hayta, M., Benli, B., İşçimen, E. M., & Kaya, A. (2020). Optimization of antihypertensive and antioxidant hydrolysate extraction from rice bran proteins using ultrasound assisted enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *14*, 2578-2589.
- He, R., Girgih, A. T., Malomo, S. A., Ju, X., & Aluko, R. E. (2013). Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *Journal of Functional Foods*, *5*(1), 219-227.
- Hidalgo, A., & Brandolini, A. (2008). Protein, ash, lutein and tocopherols distribution in einkorn (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) seed fractions. *Food Chemistry*, *107*(1), 444-448.
- Hoffmann, H., & Reger, M. (2014). Emulsions with unique properties from proteins as emulsifiers. *Advances in Colloid and Interface Science*, *205*, 94-104.
- Horax, R., Hettiarachchy, N. S., Chen, P., & Jalaluddin, M. (2004). Functional properties of protein isolate from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Journal of Food Science*, *69*(2), fct119-fct121.
- Hou YongQing, H. Y., Wu ZhenLong, W. Z., Dai ZhaoLai, D. Z., Wang GenHu, W. G., & Wu GuoYao, W. G. (2017). Protein hydrolysates in animal nutrition: industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *8*, 24. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0153-9>.
- Hönig, M., Sondermann, P., Turner, N. J., & Carreira, E. M. (2017). Enantioselective chemo- and biocatalysis: partners in retrosynthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, *56*(31), 8942-8973.
- Hu, H., Li-Chan, E. C., Wan, L., Tian, M., & Pan, S. (2013a). The effect of high intensity ultrasonic pre-treatment on the properties of soybean protein isolate gel induced by calcium sulfate. *Food Hydrocolloids*, *32*(2), 303-311.
- Hu, H., Wu, J., Li-Chan, E. C., Zhu, L., Zhang, F., Xu, X., ... & Pan, S. (2013b). Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. *Food Hydrocolloids*, *30*(2), 647-655.
- Hudson, M. J. (1995). Product development horizons--a view from industry. *European Journal of Clinical Nutrition*, *49*, S64-70.

- Hungerford, J. M. (2010). Scombroid poisoning: a review. *Toxicon*, 56(2), 231-243.
- Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. (1997). Dietary Reference Intakes. In *Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride*. Washington, ABD: National Academies Press.
- Ipsen, R., Otte, J., Sharma, R., Nielsen, A., Hansen, L. G., & Qvist, K. B. (2001). Effect of limited hydrolysis on the interfacial rheology and foaming properties of  $\beta$ -lactoglobulin A. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 21(1-3), 173-178.
- Iturmendi, N., García, A., Galarza, U., Barba, C., Fernández, T., & Maté, J. I. (2020). Influence of high hydrostatic pressure treatments on the physicochemical, microbiological and rheological properties of reconstituted micellar casein concentrates. *Food Hydrocolloids*, 106, 105880.
- Jakubowski, H., Flatt, P., Agnew, H., & Larsen, D. (2022). Fundamentals of biochemistry, a free and new LibreText book for undergraduate courses. *The FASEB Journal*, 36.
- Jeewanthi, R. K. C., Lee, N. K., & Paik, H. D. (2015). Improved functional characteristics of whey protein hydrolysates in food industry. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(3), 350.
- Jia, J., Ma, H., Zhao, W., Wang, Z., Tian, W., Luo, L., & He, R. (2010). The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chemistry*, 119(1), 336-342.
- Jin, J., Ma, H., Wang, K., Ael-G, Y., Owusu, J., Qu, W., ... & Ye, X. (2014). Effects of multi-frequency power ultrasound on the enzymolysis and structural characteristics of corn gluten meal. *Ultrasonics Sonochemistry*, 24, 55-64.
- Jovanović, J. R., Stefanović, A. B., Šekuljica, N. Ž., Tanasković, S. M. J., Dojčinović, M. B., Bugarski, B. M., & Knežević-Jugović, Z. D. (2016). Ultrasound pretreatment as an useful tool to enhance egg white protein hydrolysis: kinetics, reaction model, and thermodynamics. *Journal of Food Science*, 81(11), C2664-C2675.

- Juhász, A., Békés, F., & Wrigley, C. W. (2015). Wheat proteins. *Applied food protein chemistry*, U. Ustunol (Ed.), 219-305. Chichester, İngiltere: Wiley Blackwell.
- Kapel, R., Rahhou, E., Lecouturier, D., Guillochon, D., & Dhulster, P. (2006). Characterization of an antihypertensive peptide from an Alfalfa white protein hydrolysate produced by a continuous enzymatic membrane reactor. *Process Biochemistry*, 41(9), 1961-1966.
- Karami, Z., Peighambaroust, S. H., Hesari, J., Akbari-Adergani, B., & Andreu, D. (2019). Antioxidant, anticancer and ACE-inhibitory activities of bioactive peptides from wheat germ protein hydrolysates. *Food Bioscience*, 32, 100450.
- Karsa, D. R., & Houston, J. (2006). What are surfactants?. in: Chem. Technol. Surfactants, John Wiley & Sons, Ltd, 2006, pp. 1–23. <https://doi.org/10.1002/9780470988596.ch1>.
- Kasera, R., Singh, A. B., Lavasa, S., Prasad, K. N., & Arora, N. (2015). Enzymatic hydrolysis: A method in alleviating legume allergenicity. *Food and Chemical Toxicology*, 76, 54-60.
- Khan, S., Yu, H., Li, Q., Gao, Y., Sallam, B. N., Wang, H., ... & Jiang, W. (2019). Exogenous application of amino acids improves the growth and yield of lettuce by enhancing photosynthetic assimilation and nutrient availability. *Agronomy*, 9(5), 266.
- Khanna, N., & Davim, J. P. (2015). Design-of-experiments application in machining titanium alloys for aerospace structural components. *Measurement*, 61, 280-290.
- Kneepkens, C. F., & Meijer, Y. (2009). Clinical practice. Diagnosis and treatment of cow's milk allergy. *European Journal of Pediatrics*, 168, 891-896.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1297-1308.

- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food science and Nutrition*, 40(1), 43-81.
- Kuhn, D., Schlabitz, C., Girolidi, M., Lehn, D. N., Hoehne, L., & de Souza, C. F. V. (2023). Determination of free amino acids in dairy whey and its hydrolysates using gas chromatography coupled with mass spectrometry. *International Dairy Journal*, 141, 105626.
- Kumar, R. S., Sureshkumar, K., & Velraj, R. (2015). Optimization of biodiesel production from *Manilkara zapota* (L.) seed oil using Taguchi method. *Fuel*, 140, 90-96.
- Kuypers, M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 263-276.
- Lee, H. O., Luan, H., & Daut, D. G. (1992). Use of an ultrasonic technique to evaluate the rheological properties of cheese and dough. In *Rheology of Foods* (pp. 127-150). Elsevier.
- Lehrer, S. B., Horner, W. E., Reese, G., & Taylor, S. (1996). Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 36(6), 553-564.
- Li, G. Y., Fukunaga, S., Takenouchi, K., & Nakamura, F. (2005). Comparative study of the physiological properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate as cosmetic materials. *International Journal of Cosmetic Science*, 27(2), 101-106.
- Li, X., Da, S., Li, C., Xue, F., & Zang, T. (2018). Effects of high-intensity ultrasound pretreatment with different levels of power output on the antioxidant properties of alcalase hydrolyzates from Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein isolate. *Cereal Chemistry*, 95(4), 518-526.
- Li, X., Liu, Y., Wang, Y., Wang, J., Xu, Y., Yi, S., ... & Li, J. (2021). Combined ultrasound and heat pretreatment improve the enzymatic hydrolysis of clam (*Aloididae aloididi*) and the flavor of hydrolysates. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 67, 102596.

- Li, Y., Liu, H., Liu, Q., Kong, B., & Diao, X. (2019). Effects of zein hydrolysates coupled with sage (*salvia officinalis*) extract on the emulsifying and oxidative stability of myofibrillar protein prepared oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, *87*, 149-157.
- Li, Y., Szlachetka, K., Chen, P., Lin, X., & Ruan, R. (2008). Ingredient characterization and hardening of high-protein food bars: an NMR state diagram approach. *Cereal Chemistry*, *85*(6), 780-786.
- Lin, C. C., & Liang, J. H. (2002). Effect of antioxidants on the oxidative stability of chicken breast meat in a dispersion system. *Journal of Food Science*, *67*(2), 530-533.
- Lin, Y. F., & Aarts, M. G. (2012). The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *69*, 3187-3206.
- Liu, F. F., Li, Y. Q., Sun, G. J., Wang, C. Y., Liang, Y., Zhao, X. Z., ... & Mo, H. Z. (2022b). Influence of ultrasound treatment on the physicochemical and antioxidant properties of mung bean protein hydrolysate. *Ultrasonics Sonochemistry*, *84*, 105964.
- Liu, N., Lin, P., Zhang, K., Yao, X., Li, D., Yang, L., & Zhao, M. (2022a). Combined effects of limited enzymatic hydrolysis and high hydrostatic pressure on the structural and emulsifying properties of rice proteins. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *77*, 102975.
- Loeffler, A., Lloyd, D. H., Bond, R., Pfeiffer, D. U., & Kim, J. Y. (2004). Dietary trials with a commercial chicken hydrolysate diet in 63 pruritic dogs. *Veterinary Record*, *154*(17), 519-522.
- Loveday, S. M. (2019). Food proteins: technological, nutritional, and sustainability attributes of traditional and emerging proteins. *Annual Review of Food Science and Technology*, *10*, 311-339.
- Lucarini, M., Durazzo, A., Bernini, R., Campo, M., Vita, C., Souto, E. B., ... & Romani, A. (2021). Fruit wastes as a valuable source of value-added compounds: A collaborative perspective. *Molecules*, *26*(21), 6338.

- Lucas, B., & Sotelo, A. (1980). Effect of different alkalies, temperature, and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and of foods. *Analytical Biochemistry*, *109*(1), 192-197.
- Lupu, M. A., Gradisteanu Pircalabioru, G., Chifiriuc, M. C., Albulescu, R., & Tanase, C. (2020). Beneficial effects of food supplements based on hydrolyzed collagen for skin care. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *20*(1), 12-17.
- Ma, Q., Ji, Q., Chen, L., Zhu, Z., Tu, S., Okonkwo, C. E., ... & Zhou, C. (2022). Multimode ultrasound and ternary deep eutectic solvent sequential pretreatments enhanced the enzymatic saccharification of corncob biomass. *Industrial Crops and Products*, *188*, 115574.
- Mahmoud, A. A., Mohdaly, A. A., & Elneairy, N. A. (2015). Wheat germ: An overview on nutritional value, antioxidant potential and antibacterial characteristics. *Food and Nutrition Sciences*, *6*(02), 265.
- Maldonado, J., Gil, A., Narbona, E., & Molina, J. A. (1998). Special formulas in infant nutrition: A review. *Early Human Development*, *53*, S23-S32.
- Marchesini, G., Fasolato, L., Novelli, E., Balzan, S., Contiero, B., Montemurro, F., ... & Segato, S. (2015). Ultrasonic inactivation of microorganisms: A compromise between lethal capacity and sensory quality of milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *29*, 215-221.
- Marks, S. L., Laflamme, D. P., & McAloose, D. (2002). Dietary trial using a commercial hypoallergenic diet containing hydrolyzed protein for dogs with inflammatory bowel disease. *Journal of Veterinary Science*, *3*(2), 109-18.
- Martins, S. I., Jongen, W. M., & Van Boekel, M. A. (2000). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology*, *11*(9-10), 364-373.
- Masondo, N. A., Aremu, A. O., Rengasamy, K. R. R., Amoo, S. O., Gruz, J., Šubrtová, M., ... & Van Staden, J. (2015). Growth and phytochemical response in *Eucomis autumnalis* (Mill.) Chitt. treated with phenolic biostimulants from brown alga, *Ecklonia maxima*. *South African Journal of Botany*, *98*, 211.
- Matsui, T., Li, C. H., & Osajima, Y. (1999). Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition

from wheat germ. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, 5(7), 289-297.

- Matsui, T., Li, C. H., Tanaka, T., Maki, T., Osajima, Y., & Matsumoto, K. (2000). Depressor effect of wheat germ hydrolysate and its novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide, Ile-Val-Tyr, and the metabolism in rat and human plasma. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23(4), 427-431.
- Matsumura, M., Signor, G., & Matthews, B. W. (1989). Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. *Nature*, 342(6247), 291-293.
- McMahon, D. J., Adams, S. L., & McManus, W. R. (2009). Hardening of high-protein nutrition bars and sugar/Polyol-Protein Phase Separation. *Journal of Food Science*, 74(6), E312-E321.
- McManus, J. J., Charbonneau, P., Zaccarelli, E., & Asherie, N. (2016). The physics of protein self-assembly. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 22, 73-79.
- Meeker, D. L. (2009). North American Rendering: processing high quality protein and fats for feed. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38, 432-440.
- Meganaharshini, M., Sudhakar, V., Bharathi, N. D., & Deepak, S. (2023). Review on recent trends in the application of protein concentrates and isolates—A food industry perspective. *Food and Humanity*, 1, 308-325.
- Melini, F., Melini, V., Luziatelli, F., Ficca, A. G., & Ruzzi, M. (2019). Health-promoting components in fermented foods: An up-to-date systematic review. *Nutrients*, 11(5), 1189.
- Mızrak, G. (2021). *Topraktan Sofraya Buğday*. Ankara, Türkiye: Türkiye Ziraat Odaları
- Mielnik, M. B., Herstad, O., Lea, P., Nordal, J., & Nilsson, A. (2002). Sensory quality of marinated frozen stored chicken thighs as affected by dietary fish fat and vitamin E. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(1), 29-39.
- Min, S. G., Jo, Y. J., & Park, S. H. (2017). Potential application of static hydrothermal processing to produce the protein hydrolysates from porcine skin by-products. *LWT-Food Science and Technology*, 83, 18-25.

- Mpai, S., Mokganya, L. M., Raphoko, L., Masoko, P., & Ndhkala, A. R. (2022). Untargeted metabolites and chemometric approach to elucidate the response of growth and yield attributes on different concentrations of an amino acid based biostimulant in two lettuce cultivars. *Scientia Horticulturae*, *306*, 111478.
- Mullally, M. M., O'Callaghan, D. M., FitzGerald, R. J., Donnelly, W. J., & Dalton, J. P. (1994). Proteolytic and peptidolytic activities in commercial pancreatic protease preparations and their relationship to some whey protein hydrolyzate characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *42*(12), 2973-2981.
- Murray, E. D., Myers, C. D., & Barker, L. D. (1979). *U.S. Patent No. 4,169,090*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Mustafa, A., Åman, P., Andersson, R., & Kamal-Eldin, A. (2007). Analysis of free amino acids in cereal products. *Food Chemistry*, *105*(1), 317-324.
- Nelson, D. W., & Sommers, L. E. (1982). Total carbon, organic carbon, and organic matter. *Methods of soil analysis: Part 2 chemical and microbiological properties*, *9*, 539-579.
- Nelson, R. B., & Routtenberg, A. (1985). Characterization of protein F1 (47 kDa, 4.5 pI): a kinase C substrate directly related to neural plasticity. *Experimental Neurology*, *89*(1), 213-224.
- Niño, M. R. R., & Patino, J. R. (1998). Surface tension of bovine serum albumin and tween 20 at the air-aqueous interface. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *75*, 1241-1248.
- Niu, L. Y., Jiang, S. T., Pan, L. J., & Pang, M. (2013). Characterization of wheat germ oil in terms of volatile compounds, lipid composition, thermal behavior, and structure. *International Journal of Food Properties*, *16*(8), 1740-1749.
- NMKL, N. (2003). Determination in Foods and Feeds According to Kjeldahl (NMKL 6). (4th ed.), Nordisk metodikkomite for levnedsmidler, Lyngby, Denmark.
- Noman, A., Aqeel, M., Qasim, M., Haider, I., & Lou, Y. (2020). Plant-insect-microbe interaction: A love triangle between enemies in ecosystem. *Science of the Total Environment*, *699*, 134181.

- Nyström, L., Paasonen, A., Lampi, A. M., & Piironen, V. (2007). Total plant sterols, steryl ferulates and steryl glycosides in milling fractions of wheat and rye. *Journal of Cereal Science*, *45*(1), 106-115.
- Ogawa, A., & Takamatsu, M. (2019). Mutation of the start codon to enhance Cripavirus internal ribosome entry site-mediated translation in a wheat germ extract. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *29*(22), 126729.
- Opheim, M., Sterten, H., Øverland, M., & Kjos, N. P. (2016). Atlantic salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate–Effect on growth performance and intestinal morphometry in broiler chickens. *Livestock Science*, *187*, 138-145.
- Ospinal-Jimenez, M., & Pozzo, D. C. (2012). Structural analysis of protein denaturation with alkyl perfluorinated sulfonates. *Langmuir*, *28*(51), 17749-17760.
- Ottaiano, L., Di Mola, I., Cozzolino, E., El-Nakhel, C., Roupahel, Y., & Mori, M. (2021). Biostimulant application under different nitrogen fertilization levels: Assessment of yield, leaf quality, and nitrogen metabolism of tunnel-grown lettuce. *Agronomy*, *11*(8), 1613.
- Pace, C. N., Grimsley, G. R., & Scholtz, J. M. (2009). Protein ionizable groups: pK values and their contribution to protein stability and solubility. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(20), 13285-13289.
- Pace, C. N., Grimsley, G. R., Thomson, J. A., & Barnett, B. J. (1988). Conformational stability and activity of ribonuclease T1 with zero, one, and two intact disulfide bonds. *Journal of Biological Chemistry*, *263*(24), 11820-11825.
- Padial-Domínguez, M., Espejo-Carpio, F. J., Pérez-Gálvez, R., Guadix, A., & Guadix, E. M. (2020). Optimization of the emulsifying properties of food protein hydrolysates for the production of fish oil-in-water emulsions. *Foods*, *9*(5), 636.
- Pan, J., Zhu, Y., Cao, W., Dai, T., & Jiang, D. (2006). Predicting the protein content of grain in winter wheat with meteorological and genotypic factors. *Plant Production Science*, *9*(3), 323-333.
- Pan, M., Xu, F., Wu, Y., Yao, M., Xiao, X., Zhang, N., ... & Wang, L. (2020). Application of ultrasound-assisted physical mixing treatment improves *in*

- in vitro* protein digestibility of rapeseed napin. *Ultrasonics Sonochemistry*, 67, 105136.
- Parrado, J., Bautista, J., & Machado, A. (1991). Production of soluble enzymic protein hydrolyzate from industrially defatted nondehulled sunflower meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(3), 447-450.
- Parrado, J., Bautista, J., Romero, E. J., García-Martínez, A. M., Friaza, V., & Tejada, M. (2008). Production of a carob enzymatic extract: Potential use as a biofertilizer. *Bioresource Technology*, 99(7), 2312-2318.
- Parrado, J., Escudero-Gilete, M. L., Friaza, V., García-Martínez, A., González-Miret, M. L., Bautista, J. D., & Heredia, F. J. (2007). Enzymatic vegetable extract with bio-active components: Influence of fertiliser on the colour and anthocyanins of red grapes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(12), 2310-2318.
- Parrado, J., Miramontes, E., Jover, M., Gutierrez, J. F., de Teran, L. C., & Bautista, J. (2006). Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. *Food Chemistry*, 98(4), 742-748.
- Pasković, I., Popović, L., Pongrac, P., Polić Pasković, M., Kos, T., Jovanov, P., & Franić, M. (2024). Protein hydrolysates—production, effects on plant metabolism, and use in agriculture. *Horticulturae*, 10(10), 1041.
- Pastor-Cavada, E., Juan, R., Pastor, J. E., Alaiz, M., & Vioque, J. (2010). Protein isolates from two Mediterranean legumes: *Lathyrus clymenum* and *Lathyrus annuus*. Chemical composition, functional properties and protein characterisation. *Food Chemistry*, 122(3), 533-538.
- Pasupuleti, V. K., & Schie, B. J. (1998). Production of enzymes. *Nutritional requirements of commercially important microorganisms*. EsteeKay, Milwaukee, WI, ABD 129-162.
- Patel, A. K., Dong, C. D., Chen, C. W., Pandey, A., & Singhanian, R. R. (2023). Production, purification, and application of microbial enzymes. In *Biotechnology of microbial enzymes* (pp. 25-57). New York, ABD: Academic Press.

- Patil, U., Baloch, K. A., Nile, S. H., Kim, J. T., & Benjakul, S. (2023). Trypsin from pyloric caeca of asian seabass: Purification, characterization, and its use in the hydrolysis of acid-soluble collagen. *Foods*, *12*(15), 2937.
- Paul, K., Sorrentino, M., Lucini, L., Roupshael, Y., Cardarelli, M., Bonini, P., M.B. Miras Moreno, H. Reynaud, R. Canaguier, M. Trtílek, K. Panzarová, Colla, G. (2019). A combined phenotypic and metabolomic approach for elucidating the biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate on tomato grown under limited water availability. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 493.
- Peng, D., He, Z., Pan, X., Zheng, R., Bao, H., Liao, J., ... & Du, B. (2024). A comparative evaluation of the structure, functionality and volatile profiles of *Trichosanthes kirilowii* seed protein isolates based on different extraction methods. *Food Chemistry*, *443*, 138547.
- Peng, Z., Hou, H., Zhang, K., & Li, B. (2017). Effect of calcium-binding peptide from Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) bone on calcium bioavailability in rats. *Food Chemistry*, *221*, 373-378.
- Peters, V. J., Prescott, J. M., & Snell, E. E. (1953). Peptides and bacterial growth. IV. Histidine peptides as growth factors for *Lactobacillus delbrueckii* 9649. *The Journal of Biological Chemistry*, *202*(2), 521-532.
- Pınarlı, İ., İbanoğlu, Ş., & Öner, M. D. (2004). Effect of storage on the selected properties of macaroni enriched with wheat germ. *Journal of Food Engineering*, *64*(2), 249-256.
- Pietrzak, L. N., & Collins, F. W. (1996). Comparison of fluorometric reagents for microspectrofluorometric determination of flavonoid glycosides in wheat germ. *Journal of Cereal Science*, *23*(1), 85-91.
- Pilli, S., Bhunia, P., Yan, S., LeBlanc, R. J., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2011). Ultrasonic pretreatment of sludge: a review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *18*(1), 1-18.
- Pitt, J. J., Da Silva, E., & Gorman, J. J. (2000). Determination of the Disulfide Bond Arrangement of Newcastle Disease Virus Hemagglutinin Neuraminidase: Correlation With A B-Sheet Propeller Structural Fold Predicted For

*Paramyxoviridae* Attachment Proteins\* 210. *Journal of Biological Chemistry*, 275(9), 6469-6478.

Pitt, W. G., & Ross, S. A. (2003). Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth. *Biotechnology Progress*, 19(3), 1038-1044.

Pizzeghello, D., Berti, A., Nardi, S., & Morari, F. (2011). Phosphorus forms and P-sorption properties in three alkaline soils after long-term mineral and manure applications in north-eastern Italy. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 141(1-2), 58-66.

Pomeranz, Y. (1988). Wheat: chemistry and technology. *AACC monograph series (ABD)*.

Porfirio, E., & Fanaro, G. B. (2016). Collagen supplementation as a complementary therapy for the prevention and treatment of osteoporosis and osteoarthritis: a systematic review. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*, 19(1), 153-164.

Poste, L. M. (1990). A sensory perspective of effect of feeds on flavor in meats: poultry meats. *Journal of Animal Science*, 68(12), 4414-4420.

Premetis, G. E., & Labrou, N. E. (2020). Reduce, reuse and recycle in protein chromatography: Development of an affinity adsorbent from waste paper and its application for the purification of proteases from fish by-products. *Biomolecules*, 10(6), 822.

Qu, W., Ma, H., Jia, J., He, R., Luo, L., & Pan, Z. (2012). Enzymolysis kinetics and activities of ACE inhibitory peptides from wheat germ protein prepared with SFP ultrasound-assisted processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(5), 1021-1026.

Rahbari, M., Aalami, M., Kashaninejad, M., Maghsoudlou, Y., & Aghdaei, S. S. A. (2015). A mixture design approach to optimizing low cholesterol mayonnaise formulation prepared with wheat germ protein isolate. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 3383-3393.

Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597-635.

- 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*, 5021-5035.
- Rosado, J. L., Muñoz, E., López, P., & Allen, L. H. (1993). Absorption of zinc sulfate, methionine, and polyascorbate in the presence and absence of a plant-based rural Mexican diet. *Nutrition Research*, *13*(10), 1141-1151.
- Saborowski, R. (2015). Nutrition and digestion. *The Natural History of the Crustacea*, *4*, 285-319.
- Sachdev, S., Ansari, S. A., Ansari, M. I., Fujita, M., & Hasanuzzaman, M. (2021). Abiotic stress and reactive oxygen species: Generation, signaling, and defense mechanisms. *Antioxidants*, *10*(2), 277.
- Sackesen, C., Assa'ad, A., Baena-Cagnani, C., Ebisawa, M., Fiocchi, A., Heine, R. G., ... & Kalayci, O. (2011). Cow's milk allergy as a global challenge. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, *11*(3), 243-248.
- Sajib, M., Albers, E., Langeland, M., & Undeland, I. (2020). Understanding the effect of temperature and time on protein degree of hydrolysis and lipid oxidation during ensilaging of herring (*Clupea harengus*) filleting co-products. *Scientific Reports*, *10*(1), 9590.
- Salmon, R. E., Froehlich, D., & Butler, G. (1984). Effect of canola meal, fish meal, and choline plus methionine on the sensory quality of broiler chickens. *Poultry Science*, *63*(10), 1994-1998.
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, *5*(21), 5990-5999.
- Sandhya C., Madhavan Nampoothiri K., and Pandey A., J. L. Barredo (2005). Microbial protease, *Microbial Enzyme and Biotransformation*, 1st edition (pp. 165-180). Totowa, NJ: ABD, Humana Press.

- Santhirasegaram, V., Razali, Z., & Somasundram, C. (2013). Effects of thermal treatment and sonication on quality attributes of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1276-1282.
- Sarker, A., Chakraborty, S., & Roy, M. (2020). Dark red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates inhibit the growth of oxidizing substances in plain yogurt. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2, 100062.
- Schaafsma, G. (2009). Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63(10), 1161-1168.
- Schiavon, M., Ertani, A., & Nardi, S. (2008). Effects of an alfalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and nitrogen metabolism in *Zea mays* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 11800-11808.
- Schröder, A., Berton-Carabin, C., Venema, P., & Cornacchia, L. (2017). Interfacial properties of whey protein and whey protein hydrolysates and their influence on O/W emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 73, 129-140.
- Sebilo, M., Mayer, B., Nicolardot, B., Pinay, G., & Mariotti, A. (2013). Long-term fate of nitrate fertilizer in agricultural soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(45), 18185-18189.
- Sevier, C. S., & Kaiser, C. A. (2002). Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(11), 836-847.
- Shahidi, F. (Ed.). (2006). *Maximising the value of marine by-products*. Sawston, İngiltere: Woodhead Publishing.
- Shahrajabian, M. H., Chaski, C., Polyzos, N., & Petropoulos, S. A. (2021). Biostimulants application: A low input cropping management tool for sustainable farming of vegetables. *Biomolecules*, 11(5), 698.
- Sharma, S. S., & Dietz, K. J. (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, 57(4), 711-726.
- Shewry, P. R., Hawkesford, M. J., Piironen, V., Lampi, A. M., Gebruers, K., Boros, D., ... & Ward, J. L. (2013). Natural variation in grain composition of wheat

- and related cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(35), 8295-8303.
- Shurtleff, W., & Aoyagi, A. (2012). *History of soy sauce (160 CE to 2012)*. Soyinfo Center.
- Siemensma, A. D., Weijer, W. J., & Bak, H. J. (1993). The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae. *Trends in Food Science & Technology*, 4(1), 16-21.
- Siewe, F. B., Kudre, T. G., & Narayan, B. (2021). Optimisation of ultrasound-assisted enzymatic extraction conditions of umami compounds from fish by-products using the combination of fractional factorial design and central composite design. *Food Chemistry*, 334, 127498.
- Silk, D. B., Fairclough, P. D., Clark, M. L., Hegarty, J. E., Addison, J. M., Burston, D., ... & Matthews, D. M. (1980). Use of a peptide rather than free amino acid nitrogen source in chemically defined “elemental” diets. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 4(6), 548-553.
- Silva, G. H., de Souza, J. A. R., Macedo, W. R., & Pinto, F. G. (2021). Tyrosol, a phenolic compound from *Phomopsis* sp., is a potential biostimulant in soybean seed treatment. *Phytochemistry Letters*, 43, 40-44.
- Silva, V. M., Kurozawa, L. E., Park, K. J., & Hubinger, M. D. (2012). Water sorption and glass transition temperature of spray-dried mussel meat protein hydrolysate. *Drying Technology*, 30(2), 175-184.
- Silvestre, M. P. C. (1997). Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 60(2), 263-271.
- Singh, J., Sung, K., Cooper, T., West, K., & Mont, O. (2019). Challenges and opportunities for scaling up upcycling businesses—The case of textile and wood upcycling businesses in the UK. *Resources, Conservation and Recycling*, 150, 104439.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Sionkowska, A., Adamiak, K., Musiał, K., & Gadomska, M. (2020). Collagen based materials in cosmetic applications: A review. *Materials*, 13(19), 4217.
- Sitohy, M. Z., Desoky, E. S. M., Osman, A., & Rady, M. M. (2020). Pumpkin seed protein hydrolysate treatment alleviates salt stress effects on *Phaseolus vulgaris* by elevating antioxidant capacity and recovering ion homeostasis. *Scientia Horticulturae*, 271, 109495.
- Sodini, I., Lucas, A., Oliveira, M. N. D., Remeuf, F., & Corrieu, G. (2002). Effect of milk base and starter culture on acidification, texture, and probiotic cell counts in fermented milk processing. *Journal of Dairy Science*, 85(10), 2479-2488.
- Solms, J., Vuataz, L., & Egli, R. H. (1965). The taste of amino acids. *Experientia*, 21(12), 692-694.
- Song, P., Zhang, X., Wang, S., Xu, W., Wang, F., Fu, R., & Wei, F. (2023). Microbial proteases and their applications. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1236368.
- Sonklin, C., Laohakunjit, N., & Kerdchoechuen, O. (2018). Assessment of antioxidant properties of membrane ultrafiltration peptides from mungbean meal protein hydrolysates. *Peer Community Journal*, 6, e5337.
- Sosulski, F. (1979). Organoleptic and nutritional effects of phenolic compounds on oilseed protein products: a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(8), 711-715.
- Sosulski, F. W., & Bakal, A. (1969). Isolated proteins from rapeseed, flax and sunflower meals. *Canadian Institute of Food Technology Journal*, 2(1), 28-32.
- Šramková, Z., Gregová, E., & Šturdík, E. (2009). Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta Chimica Slovaca*, 2(1), 115-138.
- Straits Research (2023). Functional Pet Food Market Size, Share Growth Report 2030. <https://straitsresearch.com/report/functional-pet-food->

[market#:~:text=Market%20Overview,period%20\(2022%2D2030\)](#), Erişim tarihi: 21/05/2025.

- Tacias-Pascacio, V. G., Castaneda-Valbuena, D., Morellon-Sterling, R., Tavano, O., Berenguer-Murcia, Á., Vela-Gutiérrez, G., ... & Fernandez-Lafuente, R. (2021). Bioactive peptides from fisheries residues: A review of use of papain in proteolysis reactions. *Microwave WorldEuropean Journal of Biochemistry Journal of AOAC Internationals*, *184*, 415-428.
- Teglia, A., & Secchi, G. (1994). New protein ingredients for skin detergency: Native wheat protein–surfactant complexes. *International Journal of Cosmetic Science*, *16*(6), 235-246.
- Teglia, A., Mazzola, G., & Secchi, G. (1993). Chemical characteristics and cosmetic properties of protein hydrolysates. *Cosmetics and Toiletries*, *108*(11), 56-65.
- Tejada, M., Benítez, C., Gómez, I., & Parrado, J. (2011). Use of biostimulants on soil restoration: Effects on soil biochemical properties and microbial community. *Applied Soil Ecology*, *49*, 11-17.
- Tejada, M., Rodríguez-Morgado, B., Gómez, I., Franco-Andreu, L., Benítez, C., & Parrado, J. (2016). Use of biofertilizers obtained from sewage sludges on maize yield. *European Journal of Agronomy*, *78*, 13-19.
- Tejada, M., Rodríguez-Morgado, B., Paneque, P., & Parrado, J. (2018). Effects of foliar fertilization of a biostimulant obtained from chicken feathers on maize yield. *European Journal of Agronomy*, *96*, 54-59.
- Terler, G., Poier, G., Klevenhusen, F., & Zebeli, Q. (2022). Replacing concentrates with a high-quality hay in the starter feed in dairy calves: I. Effects on nutrient intake, growth performance, and blood metabolic profile. *Journal of Dairy Science*, *105*(3), 2326-2342.
- Thamnarathip, P., Jangchud, K., Nitisinprasert, S., & Vardhanabhuti, B. (2016). Identification of peptide molecular weight from rice bran protein hydrolysate with high antioxidant activity. *Journal of Cereal Science*, *69*, 329-335.
- Thornton, J. M. (1981). Disulphide bridges in globular proteins. *Journal of Molecular Biology*, *151*(2), 261-287.

- Tian, R., Feng, J., Huang, G., Tian, B., Zhang, Y., Jiang, L., & Sui, X. (2020). Ultrasound driven conformational and physicochemical changes of soy protein hydrolysates. *Ultrasonics Sonochemistry*, 68, 105202.
- Tian, S., Meng, F., & Du, K. (2024). Physicochemical properties and structure characteristics of different molecular weight peptides from ultrasonic assisted papain hydrolysate of wheat germ albumin. *Industrial Crops and Products*, 211, 118254.
- Tkaczewska, J., Borawska-Dziadkiewicz, J., Kulawik, P., Duda, I., Morawska, M., & Mickowska, B. (2020). The effects of hydrolysis condition on the antioxidant activity of protein hydrolysate from *Cyprinus carpio* skin gelatin. *LWT-Food Science and Technology*, 117, 108616.
- Toldrá, F., Reig, M., Aristoy, M. C., & Mora, L. (2018). Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chemistry*, 267, 395-404.
- Tong, X., Lian, Z., Miao, L., Qi, B., Zhang, S., Li, Y., ... & Jiang, L. (2020). An innovative two-step enzyme-assisted aqueous extraction for the production of reduced bitterness soybean protein hydrolysates with high nutritional value. *LWT- Food Science and Technology* 134, 110151.
- Turnbough, J. M., & Baldwin, R. E. (1986). Enhancing the nutritive value and appearance of microwave-baked muffins. *Microwave World*, 7(4), 7-9.
- Tutelian, V. A., Eller, K. I., & Aleshko-Ozhevsky, Y. P. (2004). Rukovodstvo po metodam kontrolya kachestva i bezopasnosti biologicheski aktivnykh dobavok k pishche [Guidance on methods for quality control and safety of bioactive food additives]. *Mos-cow: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Supervision of the Ministry of Health of Russia*.
- TÜİK, Türkiye İstatistik Kurumu, <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Animal-Production-Statistics-June-2018-27705>, Erişim tarihi: 10/05/2025, Erişim saati: 13:30
- TürKomp, Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı, versiyon 1.0, (2013) [www.turkomp.gov.tr](http://www.turkomp.gov.tr), Erişim tarihi: 10/05/2025, Erişim saati: 13:00

- Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2011). Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(5), 3148-3161.
- Ugolini, L., Cinti, S., Righetti, L., Stefan, A., Matteo, R., D'Avino, L., & Lazzeri, L. (2015). Production of an enzymatic protein hydrolyzate from defatted sunflower seed meal for potential application as a plant biostimulant. *Industrial Crops and Products*, 75, 15-23.
- US-FDA. 2003. Title 21 (Code of Federal Regulations). Parts. 170–99.
- Van Beresteijn, E. C., Peeters, R. A., Kaper, J., Meijer, R. J., Robben, A. J., & Schmidt, D. G. (1994). Molecular mass distribution immunological properties nutritive value of whey protein hydrolysates. *Journal of Food Protection*, 57(7), 619-625.
- Van Oosten, M. J., Pepe, O., De Pascale, S., Silletti, S., & Maggio, A. (2017). The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4, 1-12.
- Venugopal, V. (2016). Enzymes from seafood processing waste and their applications in seafood processing. *Advances in Food and Nutrition Research*, 78, 47-69.
- Vidal, A. R., Cechin, C. D. F., Cansian, R. L., Mello, R. D. O., Schmidt, M. M., Demiate, I. M., ... & Dornelles, R. C. P. (2018). Enzymatic hydrolysis (pepsin) assisted by ultrasound in the functional Properties of hydrolyzates from different collagens. *Ciência Rural*, 48, e20170649.
- Walkley, A., & Black, I. A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37(1), 29-38.
- Walstra, P. (2002). *Physical chemistry of foods*. Boca Raton, ABD: CRC press.
- Wan, H., & Blomberg, L. G. (2000). Chiral separation of amino acids and peptides by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 875(1-2), 43-88.
- Wang, B., Meng, T., Ma, H., Zhang, Y., Li, Y., Jin, J., & Ye, X. (2016). Mechanism study of dual-frequency ultrasound assisted enzymolysis on rapeseed protein by immobilized Alcalase. *Ultrasonics Sonochemistry*, 32, 307-313.

- Wang, D., Yan, L., Ma, X., Wang, W., Zou, M., Zhong, J., ... & Liu, D. (2018b). Ultrasound promotes enzymatic reactions by acting on different targets: Enzymes, substrates and enzymatic reaction systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, *119*, 453-461.
- Wang, F., & Zhou, B. (2020). Quantitative structure-activity relationship models for bitter-tasting tripeptides based on integrated descriptors. *Structural Chemistry*, *31*, 573-583.
- Wang, L., & Ruan, Y. L. (2013). Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signaling. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 163.
- Wang, L., Ding, Y., Zhang, X., Li, Y., Wang, R., Luo, X., ... & Chen, Z. (2018a). Isolation of a novel calcium-binding peptide from wheat germ protein hydrolysates and the prediction for its mechanism of combination. *Food Chemistry*, *239*, 416-426.
- Wang, L., Dong, J. L., Zhu, Y. Y., Shen, R. L., Wu, L. G., & Zhang, K. Y. (2021). Effects of microwave heating, steaming, boiling and baking on the structure and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein isolates. *International Journal of Food Science & Technology*, *56*(2), 709-720.
- Wang, Y., Wang, Z., Handa, C. L., & Xu, J. (2017). Effects of ultrasound pre-treatment on the structure of  $\beta$ -conglycinin and glycinin and the antioxidant activity of their hydrolysates. *Food Chemistry*, *218*, 165-172.
- Weaver, C. M., Schmidl, M. K., Woteki, C. E., & Bidlack, W. R. (1993). Research needs in diet nutrition, and health. *Food Technology*, *47*(3), S14.
- Wedemeyer, W. J., Welker, E., Narayan, M., & Scheraga, H. A. (2000). Disulfide bonds and protein folding. *Biochemistry*, *39*(15), 4207-4216.
- Wilde, P. J., & Clark, D. C. (1996). Foam formation and stability. *Methods of testing protein functionality*, *1*, 110-152, G.M. Hall (Ed.). London, İngiltere: Blackie Academic & Professional.
- Wilkinson, C., Dijksterhuis, G. B., & Minekus, M. (2000). From food structure to texture. *Trends in Food Science & Technology*, *11*(12), 442-450.

- Wisuthiphaet, N., Kongruang, S., & Chamcheun, C. (2015). Production of fish protein hydrolysates by acid and enzymatic hydrolysis. *Journal of Medical and Bioengineering*, 4(6).
- Wouters, A. G., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2016). Relevance of the functional properties of enzymatic plant protein hydrolysates in food systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(4), 786-800.
- Wu, Q., Zhang, X., Jia, J., Kuang, C., & Yang, H. (2018). Effect of ultrasonic pretreatment on whey protein hydrolysis by Alcalase: Thermodynamic parameters, physicochemical properties and bioactivities. *Process Biochemistry*, 67, 46-54.
- Wu, Y. H. S., & Chen, Y. C. (2022). Trends and applications of food protein-origin hydrolysates and bioactive peptides. *Journal of Food and Drug Analysis*, 30(2), 172.
- Xie, H., Huang, J., Woo, M. W., Hu, J., Xiong, H., & Zhao, Q. (2021). Effect of cold and hot enzyme deactivation on the structural and functional properties of rice dreg protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 345, 128784.
- Xu, L., & Diosady, L. L. (2002). Removal of phenolic compounds in the production of high-quality canola protein isolates. *Food Research International*, 35(1), 23-30.
- Xue, Y. P., Cao, C. H., & Zheng, Y. G. (2018). Enzymatic asymmetric synthesis of chiral amino acids. *Chemical Society Reviews*, 47(4), 1516-1561.
- Yang, L., Wen, K. S., Ruan, X., Zhao, Y. X., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 23(4), 762.
- Yang, X., Li, Y., Li, S., Oladejo, A. O., Ruan, S., Wang, Y., ... & Ma, H. (2017a). Effects of ultrasound pretreatment with different frequencies and working modes on the enzymolysis and the structure characterization of rice protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 19-28.
- Yang, X., Li, Y., Li, S., Oladejo, A. O., Wang, Y., Huang, S., ... & Ye, X. (2017b). Effects of multi-frequency ultrasound pretreatment under low power density

on the enzymolysis and the structure characterization of defatted wheat germ protein. *Ultrasonics sonochemistry*, 38, 410-420.

- Yanjun, S., Jianhang, C., Shuwen, Z., Hongjuan, L., Jing, L., Lu, L., ... & Jiaping, L. (2014). Effect of power ultrasound pre-treatment on the physical and functional properties of reconstituted milk protein concentrate. *Journal of Food Engineering*, 124, 11-18.
- Yao, Y., Pan, Y., & Liu, S. (2020). Power ultrasound and its applications: A state-of-the-art review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 62, 104722.
- Zhang, X., Yin, J., Ma, Y., Peng, Y., Fenton, O., Wang, W., ... & Chen, Q. (2024). Unlocking the potential of biostimulants derived from organic waste and by-product sources: Improving plant growth and tolerance to abiotic stresses in agriculture. *Environmental Technology & Innovation*, 103571.
- Zhou, C., Ma, H., Yu, X., Liu, B., Yagoub, A. E. G. A., & Pan, Z. (2013a). Pretreatment of defatted wheat germ proteins (by-products of flour mill industry) using ultrasonic horn and bath reactors: Effect on structure and preparation of ACE-inhibitory peptides. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(6), 1390-1400.
- Zhou, H., Wang, C., Ye, J., Tao, R., Chen, H., & Cao, F. (2016). Effects of enzymatic hydrolysis assisted by high hydrostatic pressure processing on the hydrolysis and allergenicity of proteins from ginkgo seeds. *Food and Bioprocess Technology*, 9, 839-848.
- Zhou, K., Canning, C., & Sun, S. (2013b). Effects of rice protein hydrolysates prepared by microbial proteases and ultrafiltration on free radicals and meat lipid oxidation. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 331-335.
- Zhu, K. X., Sun, X. H., & Zhou, H. M. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of defatted wheat germ proteins by reverse micelles. *Journal of Cereal Science*, 50(2), 266-271.
- Zhu, K. X., Wang, X. P., & Guo, X. N. (2015). Isolation and characterization of zinc-chelating peptides from wheat germ protein hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 12, 23-32.

- Zhu, K. X., Zhou, H. M., & Qian, H. F. (2006a). Proteins extracted from defatted wheat germ: Nutritional and structural properties. *Cereal Chemistry*, 83(1), 69-75.
- Zhu, K., Zhou, H., & Qian, H. (2006b). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with Alcalase. *Process Biochemistry*, 41(6), 1296-1302.
- Zhu, Z., Zhang, P., & Sun, D. W. (2020). Effects of multi-frequency ultrasound on freezing rates and quality attributes of potatoes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 60, 104733.
- Žilić, S., Akilloğlu, G., Serpen, A., Barać, M., & Gökmen, V. (2012). Effects of isolation, enzymatic hydrolysis, heating, hydration and Maillard reaction on the antioxidant capacity of cereal and legume proteins. *Food Research International*, 49(1), 1-6.

# ÖZGEÇMİŞ

Ayşenur Orakcı

## A. EĞİTİM

**Yüksek Lisans:** Yüksek Lisans: İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 2024, İstanbul

**Lisans:** İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 2020, İstanbul

## B. PROJELERİ

1- TÜBİTAK 2247-C Stajyer Araştırmacı Burs Programı (2021)- Türkiye Küflü Peynirlerine Has Küflerin Genetik Özelliklerinin ve *Penicillium roqueforti* Suşlarının Morfolojik ve Genetik Çeşitliliklerinin Belirlenmesi

2- 2209/A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destek Programı (2022)- Türkiye Küflü Peynirlerinden Elde Edilen *Penicillium roqueforti* İzolatlarının Mikofenolik Asit Biyosentez Geni *MpaC*'deki Delesyon Varlığı Yönünden İncelenmesi

3- TEYDEB 1505-Üniversite-Sanayi İş Birliği Destek Programı (2022-2023)- Endüstriyel Yan Ürünlerden Hazırlanan Bitkisel Protein Hidrolizatlarının Amino Asit İçeren Organik Gübre Formunda Üretimi, Karakterize Edilmesi ve Bitkilerdeki Biyostimulant Etkilerinin İncelenmesi

4- TEYDEB 1505-Üniversite-Sanayi İş Birliği Destek Programı (2023-2025)- Karalılığı Arttırılmış Enkapsüle Aroma Ürünlerinin Üretilmesi ve Gıda Ürünlerinde Kullanım Potansiyelinin Değerlendirilmesi

## C. SERTİFİKALARI

TS EN ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi Temel Eğitimi | İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi [2022]

TS EN ISO 9001:2015 Kalite Yönetim Sistemi Temel Eğitimi | İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi [2022]

TS 18001:2014 İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetim Sistemi Temel Eğitimi | İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi [2022]

TS EN ISO 14001 evre Yönetim Sistemi Temel Eğitimi | İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi [2022]

Temel Gıda Hijyen Eğitimi | İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi [2022]

#### **D. YAYINLARI**

Kirtil, H. E., **Orakci, A.**, Arici, M., & Metin, B. (2024). Genetic diversity and population structure of *Penicillium roqueforti* isolates from Turkish blue cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 421, 110801.