

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

KANOLA KÜSPESİNDEN YEŞİL TEKNOLOJİLERLE
PROTEİN HİDROLİZATI ÜRETİM SÜREÇLERİNİN
OPTİMİZASYONU VE PROTEİN
HİDROLİZATLARININ KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Büşra TOSUN

İstanbul
Ocak-2025

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

KANOLA KÜSPESİNDEN YEŞİL TEKNOLOJİLERLE
PROTEİN HİDROLİZATI ÜRETİM SÜREÇLERİNİN
OPTİMİZASYONU VE PROTEİN HİDROLİZATLARININ
KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Büşra TOSUN

Tez Danışmanı
Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN

İstanbul
Ocak-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 Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN

Üye Doç. Dr. Mustafa YAMAN

Üye Doç. Dr. Banu METİN

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Erhan İÇENER

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Yüksek lisans tezi olarak hazırladığım “**Kanola Küspesinden Yeşil Teknolojilerle Protein Hidrolizatı Üretim Süreçlerinin Optimizasyonu ve Protein Hidrolizatlarının Karakterizasyonu**” 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.

Büşra TOSUN

ÖN SÖZ

Tez çalışmasının hazırlanmamda, lisans ve yüksek lisans eğitim süreçlerimde bilimsel rehberlikleri, kıymetli bilgi ve birikimleri ile katkı sağlayan, aynı zamanda sürecin her aşamasında desteklerini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. İbrahim Gülseren'e en derin saygı ve şükranlarımı sunarım. Kendilerinin akademik rehberliği, bu çalışmanın temelini oluşturmuş ve araştırmanın bilimsel niteliğinin artmasında belirleyici bir rol oynamıştır.

Tez kapsamında yürütülen laboratuvar çalışmalarında bilgi ve deneyimleriyle sürece değerli katkılar sağlayan Biyokimyager Bilal Çakır'a içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, deneysel süreçlerin koordinasyonunda ve uygulamalarında özverili desteğiyle yanımda olan Araştırma Görevlisi Zeynep Saliha Güneş'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez jürimde bulunan ve değerli yorumları ile katkı sağlayan Doç. Dr. Banu Metin ve Doç. Dr. Mustafa Yaman'a teşekkür ederim.

Bu süreçte maddi ve manevi destekleriyle daima yanımda olan annem Medine Tosun, babam Mustafa Tosun, abilerim Adem Tosun, Mehmet Tosun, Eyüp Tosun ve arkadaşlarıma da ayrıca minnettarlığımı ifade etmek isterim. Onların sabrı, anlayışı ve teşvikleri, bu uzun ve zorlu yolculuğun üstesinden gelmemde önemli bir motivasyon kaynağı olmuştur.

Son olarak, bu çalışmanın bilimsel alanda yeni araştırmalara ışık tutmasını ve literatüre katkı sağlamasını temenni ediyorum. Bu tezi, bilimsel gelişime katkıda bulunma gayesiyle akademik camianın takdirine sunmaktan onur duyarım.

Saygılarımla,

Büşra TOSUN

İstanbul-2025

ÖZET

KANOLA KÜSPESİNDEN YEŞİL TEKNOLOJİLERLE PROTEİN HİDROLİZATI ÜRETİM SÜREÇLERİNİN OPTİMİZASYONU VE PROTEİN HİDROLİZATLARININ KARAKTERİZASYONU

Büşra TOSUN

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN

Ocak, 2025 – 117 Sayfa

Bu çalışma, soyadan sonra en çok ekilen ikinci yağlı tohum yan ürünü olan kanola küspesinin daha ekonomik ve çevresel açıdan sürdürülebilir şekilde değerlendirilmesini amaçlamaktadır. Kanola küspesi proteinlerinin hidroliziyle yüksek katma değerli ürünler elde etmek için enzimatik muameleler, ultrasonik işlemler ve ultrafiltrasyon gibi yeşil teknolojiler kullanılmıştır. Bu süreç, hem kaynak verimliliğini artırmak hem de çevresel etkileri azaltmak amacıyla tasarlanmış olup, Taguchi L25 ortogonal dizisi ile 25 farklı deney kombinasyonu hazırlanarak optimize edilmiştir. Deney tasarımı kapsamında Ultrasonik muamele 1 (26 kHz, 0-48 dk), Ultrasonik muamele 2 (20 kHz, 0-48 dk), Proteaz 1 (Alcalase, 2,4AU/ml, 20-100%), Proteaz 2 (Flavourzyme, 1000L, 20-100%), Ultrafiltrasyon (hacmen konsantrasyon, 0-10x) olmak üzere beş farklı faktör beş farklı seviyede değerlendirilmiştir. Bu yöntem, parametrelerin sistematik analizini sağlayarak en uygun koşulların belirlenmesine olanak tanımaktadır. Çalışmada, serbest amino asit miktarı, hidroliz derecesi (TNBS yöntemi), toplam antioksidan madde (DPPH metodu) ve toplam fenolik madde (Folin-Ciocalteu yöntemi) analizleri, istatistiksel yöntemlerle (ANOVA ve Taguchi analizi) optimize edilmiştir. Birincil yanıt değişkeni serbest amino asit miktarı olarak seçilmiş ve optimizasyon sonuçlarına uygun numune hazırlanmıştır. Hazırlanan numunenin fizikokimyasal ve fonksiyonel özellikleri toplam protein tayini (Kjeldahl yöntemi), amino asit dağılımı, hidroliz derecesi, organik karbon analizi (Walkley-Black metodu), toplam fenolik madde tayini, toplam antioksidan madde

miktarı, kül tayini ve kuru madde tayini gibi analizlerle kapsamlı şekilde değerlendirilmiştir. Serbest amino asit miktarı analizi sonrası yapılan optimizasyon ve analizde, faktörler arasında en belirgin etkiyi Flavourzyme muamelesinin gösterdiği ve bu işlemin %52,7 oranında etkisi olduğu tespit edilmiştir. S/N (Sinyal-Gürültü Oranı, Signal-to-Noise Ratio) oranları değerlendirilerek yapılan analizlerde, yüksek S/N (“the bigger the better”, daha yüksek o kadar iyidir) oranlarının daha iyi performansı işaret ettiği gözlemlenmiştir. Serbest amino asit miktarı baz alınarak hazırlanan optimum yanıt koşulları, ultrasonik muameleler için (20 ve 26 kHz) sırasıyla 48 ve 24 dakika, Proteaz 1 muamelesi için %40, Proteaz 2 muamelesi için %80’dir. Ayrıca, serbest amino asit miktarını artırmada etkisinin gözlemlenememesi nedeniyle ultrafiltrasyon işlemi uygulanmamıştır. Optimum seviyelerin birleşimiyle, deneysel tasarımda elde edilen en yüksek serbest amino asit miktarı (%1,16) aşılmış ve optimize numunede bu değer %1,42 olarak bulunmuştur. Hacmen 10,7 kat konsantre edilen optimize numunede ise serbest amino asit miktarı %12,72’ye çıkmıştır. Optimum numune üzerinde yapılan analizlerle, optimize hidrolizat ve konsantre numunelerin karakterizasyonu detaylı şekilde belirlenmiştir. Optimize hidrolizat numunesinde hidroliz derecesi %25,3, toplam antioksidan madde miktarı 30,75 TE mg/100g, toplam fenolik madde miktarı 387,5 g GAE/100g, toplam azot içeriği %2,63, organik karbon oranı %5,01, organik madde oranı %0,49 ve kuru madde oranı %7,4 olarak ölçülmüştür. Konsantre numunede ise bu değerler sırasıyla %28,1, 337,3 TE mg/100g, 4503,6 GAE/100g, %28,6, %30,2, %4,8 ve %79,5 olarak belirlenmiş, böylece konsantrasyon işleminin bileşenlerin zenginleşmesi üzerindeki etkisi net bir şekilde ortaya konmuştur. Bu çalışma, tarımsal ve endüstriyel üretimde kimyasal girdilere bağımlılığı azaltarak doğal kaynakların etkin kullanımını destekleyen çevre dostu ve yenilikçi çözümler sunmayı hedeflemektedir. Kanola küspesi gibi tarımsal yan ürünlerin değerlendirilmesi hem ekonomik hem de sürdürülebilirlik açısından büyük bir potansiyel taşımakta olup, yeşil teknolojilerin kullanımı ile çevresel etkilerin azaltılmasına ve katma değeri yüksek ürünlerin elde edilmesine katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Kanola küspesi, yan ürün, protein, enzim muamelesi, ultrason, ultrafiltrasyon.

ABSTRACT
OPTIMIZATION OF PROTEIN HYDROLYSATE
MANUFACTURING PROCESSES FROM CANOLA MEAL
WITH GREEN TECHNOLOGIES AND CHARACTERIZATION
OF THE PROTEIN HYDROLYSATES

Büşra TOSUN

Master, Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İbrahim GÜLSEREN

January, 2025- 117 Pages

This study aimed to valorize canola meal, the second most widely cultivated oilseed byproduct after soybean meal, using more economical and environmentally sustainable approaches. Green technologies such as enzymatic treatments, ultrasonic processes, and ultrafiltration were employed to obtain high-value products through the hydrolysis of canola meal proteins. This process was designed to increase resource efficiency and reduce environmental impacts. A total of 25 different experimental combinations were optimized using the Taguchi L25 orthogonal array. In the experimental design, five factors were assessed at five different levels: Ultrasonic treatment 1 (26 kHz, 0-48 min), Ultrasonic treatment 2 (20 kHz, 0-48 min), Protease treatment 1 (Alcalase, 2.4 AU/ml, 20-100%), Protease treatment 2 (Flavourzyme, 1000L, 20-100%), and Ultrafiltration (volume concentration, 0-10x). This method allows for a systematic analysis of parameters and helps in identifying the optimal conditions. In addition, free amino acid content, hydrolysis degree (TNBS method), total antioxidant content (DPPH method), and total phenolic content (Folin-Ciocalteu method) were optimized through statistical methods (ANOVA and Taguchi analysis). The primary response variable selected was free amino acid content, and a sample was prepared based on the optimization results. The physicochemical and functional properties of the prepared sample were comprehensively evaluated through various analyses, including total protein determination (Kjeldahl method), amino acid distribution, degree of hydrolysis, organic carbon analysis (Walkley-Black method),

total phenolic content, total antioxidant content, ash content, and dry matter content. After free amino acid content determination, the most significant effect among the factors was observed to be the Flavourzyme treatment, which had an impact of 52.7%. In the analyses performed by evaluating the S/N (Signal-to-Noise Ratio) ratios, it was observed that higher S/N ratios indicated better performance. Based on free amino acid content, the optimum response conditions were determined as follows: for ultrasonic treatments (20 and 26 kHz), 48 and 24 minutes, respectively; for Protease treatment 1, 40%; and for Protease treatment 2, 80%. Ultrafiltration was not further administered since its effect on increasing free amino acid content was not significant. By combining the optimum levels, the highest free amino acid content obtained in the experimental design (1.16%) was surpassed, with the optimized sample demonstrating a value of 1.42%. In the optimized sample, which was concentrated 10.7 times in volume, the free amino acid content increased to 12.72%. The characterization of the optimized hydrolyzed and concentrated samples was carried out based on similar tests. In the optimized sample, the degree of hydrolysis was 25.3%, the total antioxidant content was 30.75 TE mg/100 g, the total phenolic content was 387.5 g GAE / 100g, the total nitrogen content was 2.63%, the organic carbon ratio was 5.01%, the organic matter ratio was 0.49%, and the dry matter content was 7.4%. In the concentrated sample, these values were found to be 28.1%, 337.3 TE mg/100g, 4503.6 GAE/100g, 28.6%, 30.2%, 4.8%, and 79.5%, respectively, clearly demonstrating the impact of the concentration process on the enrichment of these components. Consequently, a method to provide environmentally friendly and innovative solutions that support the efficient use of natural resources while reducing dependency on harsh chemicals was generated. The utilization of agricultural byproducts such as canola meal holds great potential in both economic and sustainability terms, and the use of green technologies will contribute to reducing environmental impacts and obtaining high-value-added products.

Keywords: Canola meal, by-product, protein, enzymatic treatment, ultrasound, ultrafiltration.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ	ii
ÖN SÖZ.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiv
KISALTMALAR	xvi
BİRİNCİ BÖLÜM.....	1
GİRİŞ	1
İKİNCİ BÖLÜM.....	3
LİTERATÜR.....	3
2.1. Amino Asitler ve Peptit bağları.....	3
2.2. Proteinler	7
2.3. Proteinlerin Kimyasal Yapısı	8
2.4. Protein Konformasyonel Yapısının Düzeyleri	8
2.4.1. Birincil (Primer) Yapı.....	9
2.4.2. İkincil (Sekonder) Yapı	9
2.4.3. Üçüncül (Tersiyer) Yapı	10
2.4.4. Dördüncül (Kuarterner) Yapı.....	10
2.5. Protein Kaynakları.....	11
2.6. Kanola Bitkisi.....	13
2.7. Kanola Küspesi.....	15
2.8. Protein Hidrolizatlarının Temel Özellikleri	16

2.9. Protein Hidrolizatı Elde Etmek İçin Kullanılan Yöntemler	17
2.9.1. Kimyasal Hidroliz.....	17
2.9.1.1. Asidik Hidroliz.....	18
2.9.1.2. Alkali Hidroliz	18
2.9.2. Enzimatik Hidroliz.....	19
2.10. Protein Hidrolizatı Elde Etmek için Kullanılan Fiziksel Ön İşlemler.....	22
2.10.1. Ultrason İşleminin Temel Özellikleri	23
2.10.1.1. Ultrasonik Cihazlarda Dalgaların Üretilmesi.....	23
2.10.1.2. Ultrasonun Etki Mekanizması.....	23
2.10.1.3. Ultrasonun Gıda Endüstrisindeki Uygulamaları	25
2.10.1.4. Ultrason Ön İşleminin Protein Hidrolizatları İçin Önemi.....	26
2.10.2. Mikrodalga İşleminin Temel Özellikleri	27
2.10.3. Yüksek Basıncılı Yöntemlerin Temel Özellikleri.....	28
2.11. Protein Hidrolizatı Konsantre Etme Yöntemleri	28
2.11.1. Protein Hidrolizatlarının Ultrafiltrasyon Kullanılarak Konsantre Edilmesi	29
2.11.2. Protein Hidrolizatlarının Buharlaştırma ile Konsantre Edilmesi	30
2.11.3. Protein Hidrolizatlarının Liyofilizatör ile Konsantre Edilmesi	31
2.12. Protein Hidrolizatlarının Kullanım Alanları.....	31
2.12.1. Gıda endüstrisinde kullanımı	32
2.12.2. Tarımsal ve bitkisel uygulamalarda kullanımı.....	32
2.12.3. Hayvan beslenmesinde kullanımı	33
2.12.4. Farmasötik ve kozmetik endüstrisinde kullanımı	34
2.12.5. Tıbbi beslenme ve diyetetik alanlarında kullanımı.....	35
ÜÇÜNCÜ BÖLÜM	37
MATERYAL VE METOT	37
3.1. Malzemeler.....	37

3.1.1. Enzimler.....	37
3.1.2. Kimyasal malzemeler	37
3.1.3. Cihaz ve ekipmanlar	37
3.2. Metotlar	38
3.2.1. Kanola küspesinin kompozisyon analizi.....	39
3.2.1.1. Protein Analizi (Kjeldahl Metodu)	39
3.2.1.2. Nem analizi	40
3.2.1.3. Kül analizi	41
3.2.2. Deney Tasarımı.....	41
3.2.3. Kanola Küspesinden Protein Hidrolizatlarının Elde Edilmesi	43
3.2.3.1. Ultrasonik Muameleler	43
3.2.3.2. Enzimatik Hidroliz.....	45
3.2.3.3. Ultrafiltrasyon (UF) Yöntemi ile Fraksiyonlama.....	47
3.2.3.4. Hidrolizat Numunelerinin Konsantrasyonu	48
3.2.4. Hidrolizat ve Konsantre Numunelere Uygulanan Analizler.....	50
3.2.4.1. Toplam serbest amino asit analizi / % amino asit dağılımları	50
3.2.4.2. Hidroliz Derecesi Tayini (TNBS (trinitrobenzen sülfonik asit) yöntemi ile)	51
3.2.4.3. Toplam Antioksidan Aktivite Tayini (DPPH Metodu).....	52
3.2.4.4. Toplam Fenolik Madde Tayini (Folin-Ciocalteu Metodu)	53
3.2.4.5. Protein Analizi (Kjeldahl Metodu)	53
3.2.4.6. Organik Karbon Analizi (Walkey Black Metodu).....	54
3.2.4.7. Toplam Kül İçeriği Analizi	55
3.2.4.8. Kuru Madde Tayini	56
3.2.5. İstatiksel Analizler	57
3.2.5.1. Taguchi Analizi (DOE)	57
3.2.5.2. ANOVA	58

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM	59
BULGULAR VE TARTIŞMA	59
4.1. Kanola Küspesinin Kompozisyonel Analizleri	59
4.2. Deney Tasarımı Kapsamında Oluşturulan Hidrolizatların Analizleri	60
4.2.1. Serbest Aminoasit (%) Değerleri ve İstatiksel Analizleri	63
4.2.2. Optimizasyon Koşullarının Tanımlanması ve Uygulanması	69
4.2.3. Hidroliz Derecesi ve İstatiksel Analizleri	74
4.2.4. Toplam Antioksidatif Aktivitenin Belirlenmesi ve İstatiksel Analizleri ..	78
4.2.5. Toplam Fenolik Madde Tayini ve İstatiksel Analizleri	81
4.3. Optimizasyon Sonucu Elde Edilen Numunenin Analizleri	84
SONUÇ	93
KAYNAKÇA	96
ÖZGEÇMİŞ	117

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1: Taguchi deney tasarımı faktör tipleri, seviyeler ve değerler tablosu.....	41
Tablo 3.2: Taguchi deney deseni faktörleri ve seviyeleri	42
Tablo 4.1: Kanola küspesinin kompozisyonel analiz sonuçları	59
Tablo 4.2: Deneme desenine göre hazırlanan numunelerin serbest aminoasit miktarı (%), hidroliz derecesi (%), toplam antioksidan miktarı (TE, mg/100g), toplam fenolik madde miktarı (GAE, mg/100g)	61
Tablo 4.3.1: L25 deneme deseni kapsamında hazırlanan numunelerin serbest amino asit içerikleri 1.kısım (% w/w)	66
Tablo 4.3.2: L25 deneme deseni kapsamında hazırlanan numunelerin serbest amino asit içerikleri 2.kısım (% w/w)	67
Tablo 4.3.3: L25 deneme deseni kapsamında hazırlanan numunelerin serbest amino asit içerikleri 3.kısım (% w/w)	68
Tablo 4.4: Serbest amino asit miktarına göre belirlenmiş modelin R-sq, R-sq(adj) ve tahmin edilebilirlik değerleri.....	69
Tablo 4.5: Ultrason, enzim ve ultrafiltrasyon uygulamalarının SAA miktarına etkisine yönelik varyans analizi (ANOVA) sonuçları	69
Tablo 4.6: Flavourzyme miktarlarına ait farklı değerlerin ortalama hesaplamaları ve istatistiksel gruplama analizi tablosu	74
Tablo 4.7: Hidroliz derecesine göre belirlenmiş modelin R-sq, R-sq(adj) ve tahmin edilebilirlik değerleri.....	76
Tablo 4.8: Ultrason, enzim ve ultrafiltrasyon uygulamalarının hidroliz derecesine etkisine yönelik varyans analizi (ANOVA) sonuçları	77
Tablo 4.9: Toplam antioksidan madde miktarına göre belirlenmiş modelin R-sq, R-sq(adj) ve tahmin edilebilirlik değerleri.....	80
Tablo 4.10: Ultrason, enzim ve ultrafiltrasyon muamelelerinin toplam antioksidan madde miktarına etkisine yönelik varyans analizi (ANOVA) sonuçları	80

Tablo 4.11: Toplam fenolik madde miktarına göre belirlenmiş modelin R-sq, R-sq(adj) ve tahmin edilebilirlik değerleri.....	83
Tablo 4.12: Ultrason, enzim ve ultrafiltrasyon uygulamalarının toplam fenolik madde miktarına etkisine yönelik varyans analizi (ANOVA) sonuçları	83
Tablo 4.13: Optimize edilerek elde edilen kanola proteini hidrolizatının ve konsantre edilmiş formunun serbest amino asit miktarı, hidroliz derecesi, antioksidan ve fenolik madde miktarı, toplam azot, organik karbon, organik ve kuru madde analiz sonuçları	91
Tablo 4.14: Optimize edilerek elde edilen kanola proteini hidrolizatının ve konsantre edilmiş formunun serbest amino asit içerikleri (% w/w)	92



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Amino asitlerin genel yapısı	4
Şekil 2.2: Temel amino asitler, kimyasal gösterimleri ve moleküler ağırlıkları.....	6
Şekil 2.3: Proteinlerin konformasyonel düzeyleri (birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılar).....	11
Şekil 2.4: Kanola küspesi.....	16
Şekil 2.5: Ekzopeptidaz ve endopeptidazların etki mekanizması gösterimi.....	22
Şekil 2.6: Ultrasonik probun bir sıvı içine daldırılmasıyla meydana gelen kavitasyon olayının gösterimi	24
Şekil 2.7: Ultrasonik kavitasyon olayının şematik gösterimi	25
Şekil 3.1: Mekanik karıştırıcı ile karıştırma işlemi gösterimi.....	43
Şekil 3.2: Ultrasonik muamele 1	44
Şekil 3.3: Ultrasonik muamele 2.....	44
Şekil 3.4: Farklı işlemler sonrası numunelerin gösterimi (1. Ultrasonik muameleler, 2. Karbonhidraz (Selülaz) muamelesi, 3. Alcalase enzimi muamelesi, 4. Flavourzyme enzimi muamelesi)	46
Şekil 3.5: Ultrafiltrasyon işlemi gösterimi	47
Şekil 3.6: Hidrolizat numunelerinin konsantre edildiği etüv ve numunelerin gösterimi	48
Şekil 3.7: Kanola küspesinden protein hidrolizatı elde edilmesinin detaylı gösterimi	49
Şekil 3.8: UV spektrofotometre gösterimi	52
Şekil 3.9: Organik karbon analizi potasyum dikromat eklenmesi sonrası gösterimi .	55
Şekil 3.10: Kül fırını gösterimi	56
Şekil 3.11: Refraktometre gösterimi	57
Şekil 4.1: Serbest amino asit madde miktarı sonuçlarına göre oluşturulan S/N oranlarının ana etki grafiği gösterimi.....	72
Şekil 4.2: SAA (%) değerleri üzerindeki faktör ve etkileşimlerin standardize edilmiş etkilerinin pareto grafiği.....	73

Şekil 4.3: SAA değerlerinin (%) Proteaz 1 ve Proteaz 2'ye göre kontur grafiği.....	73
Şekil 4.4: Hidroliz derecesi sonuçlarına göre oluşturulan S/N oranlarının ana etki grafiği gösterimi	77
Şekil 4.5: Toplam antioksidan madde miktarı sonuçlarına göre oluşturulan S/N oranlarının ana etki grafiği gösterimi	81
Şekil 4.6: Toplam fenolik madde miktarı sonuçlarına göre oluşturulan S/N oranlarının ana etki grafiği gösterimi	84
Şekil 4.7: Optimize edilerek elde edilen kanola proteini hidrolizatı (A) ve optimize protein hidrolizatının evaporasyon ile konsantre edilmiş formu (B)	85



KISALTMALAR

m	: Mili
μ	: Mikro
n	: Nano
k	: Kilo
g	: Gram
Da	: Dalton
kDa	: Kilo Dalton
M	: Molar
N	: Normal
AU	: Ünite
MWCO	: Moleküler Ağırlık Kesim Değeri
UF	: Ultrafiltrasyon
MF	: Mikrofiltrasyon
ED	: Elektrodializ
HHP	: Yüksek Basıncılı İşlem
pH	: Hidrojen İyonu Gücü (Power of Hydrogen)
ABS	: Absorbans
AOAC	: Amerikan Resmi Analitik Kimyacılar Birliği (Association of Official Analytical Chemists)
NMKL	: Gıda Analizleri Alanında İskandinav Ülkeleri Birliği (Nordic Committee on Food Analysis)
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
USDA	: Amerika Birleşik Devletleri Ziraat Dairesi (United States Department of Agriculture)
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)
HD	: Hidroliz Derecesi
SAA	: Serbest Amino Asit
S/N	: Sinyal/ Gürültü oranı (Signal to Noise Ratio)
ANOVA	: Varyans Analizi (Analysis of Variance)
DOE	: Deney Tasarımı (Design of Experiments)
vd.	: ve diğerleri

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Dünya genelindeki hızlı nüfus artışı, gıda güvenliğini sağlama ve sürdürülebilir tarım uygulamalarına olan ihtiyacı arttırmıştır. Bu kapsamda, tarım sektörü kaynak yönetimi ve etkin üretim stratejileriyle daha fazla verimlilik arayışına girmiştir. Kanola bitkisi, yüksek yağ verimi ve besin değeri ile önemli bir tarımsal ürün olarak öne çıkmaktadır. Ancak, işleme sonrası elde edilen kanola küspesi çoğunlukla hayvan yemi olarak değerlendirilmekte ve ekonomik değerinin büyük bir kısmı bu şekilde sınırlı kalmaktadır.

Yağı alınmış kanola küspesi, yaklaşık %40 protein içeriğiyle dikkat çeken bir tarımsal yan üründür (Ayton, 2014). Bu yüksek protein içeriği, hidroliz yoluyla elde edilen polipeptitler, peptitler ve amino asitlerin, organik azot kaynağı olarak kullanımına olanak tanımaktadır. Proteinlerin hidrolizi, kanola küspesinin biyolojik değerini artırarak, birçok endüstriyel üründe küspenin kullanımını sürdürülebilir bir şekilde iyileştirmektedir. Elde edilen bu biyolojik bileşenler, birçok etkili ve çevre dostu ürün üretme alternatifleri sunmaktadır. Protein hidrolizatları, gıda endüstrisinden tıbbi beslenmeye, tarımdan endüstriyel uygulamalara kadar geniş bir yelpazede kullanılarak birçok alanda önemli faydalar sunmaktadır. Protein hidrolizatları gıda ürünlerinde emülsifiye edici, köpürtücü ve jel oluşturuç özellikleriyle işlevsellik sağlarken (Kristinsson ve Rasco, 2000; Tang vd., 2023) tarımsal uygulamalarda, toprak kalitesini iyileştirme ve mikroorganizma aktivitelerini destekleme potansiyeline sahip olan bu bileşenler, bitkilerin besin maddelerini daha verimli kullanmalarına da yardımcı olabilir (Maini, 2006; Schiavon vd., 2008). Ayrıca biyoteknoloji ve kimya sektöründe de düşük maliyetli ve stabil bileşenler olarak çeşitli süreçlerde kullanılmaktadır (Aguilar ve Sato, 2018).

Küspeden küçük peptitler ve serbest amino asitler elde etmek amacıyla yapılan endüstriyel kapasiteli hidroliz işlemlerinde, güçlü asitler, bazlar ve yüksek sıcaklıklar içeren geleneksel kimyasal süreçlerin sürdürülebilirlik ve nihai ürünün kimyasal bileşimi açısından çeşitli dezavantajları bulunmaktadır. Bu geleneksel yöntemlerin yanı sıra, bu dezavantajları aşmak ve daha verimli bir hidroliz süreci sağlamak amacıyla, serbest amino asitlerin kalitesini koruyan enzimlerin kullanımı giderek daha

yaygın hale gelmiştir. Sırasıyla, endo ve ekzo-peptidazlar olarak bilinen Alcalase ve Flavourzyme enzimlerinin kullanımı, ön işleme sonrası protein konsantreleri veya izolatları üzerinde geniş bir şekilde incelenmiş ve uygulanmıştır (Parrado vd., 1991; Villanueva vd., 1999). Bununla birlikte, ultrason ön işleme de bu sürecin etkinliğini artırmak için kullanılan bir teknoloji olarak öne çıkmaktadır. Ultrason, ses dalgalarının kullanılması yoluyla materyallerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirmeye yardımcı olur (Gülseren vd., 2007). Bu durum enzimlerin proteinleri daha verimli bir şekilde parçalamalarını sağlar (Li vd., 2016). Ultrason ön işleme, enzimatik hidroliz sürecini hızlandırarak, daha düşük enerji tüketimi ve daha kısa işlem süreleri ile yüksek kaliteli hidrolizatların elde edilmesine katkıda bulunur. Enzimatik muamele öncesinde uygulanan ultrasonik muamele, farklı teknolojilerin ve yöntemlerin bir araya getirilmesiyle sinerjik bir etki oluşturabilir. Bu yaklaşımda, ultrasonik işlem enzimatik reaksiyonları daha etkili hale getirmek için bir ön hazırlık adımı olarak kullanılmakta ve bu iki yöntem birlikte çalışarak daha yüksek verimlilik sağlamaktadır.

Ayrıca mevcut durumda bitkisel ve hayvansal protein hidrolizatlarının çoğu ithal edilmekte ve bu durum yerel üretim açısından maliyetleri artırarak sürdürülebilir tarım ve endüstriyel üretim uygulamalarını (gıda, gıda takviyeleri, kozmetik, farmasötik vb.) zorlaştırmaktadır. Yerel endüstrinin proseslerinden alınarak değerlendirilecek kanola küspesinin değerlendirilmesi, bu sorunun çözümü için umut verici bir alternatif sunmaktadır. Bu bağlamda yerel üretimin teşvik edilmesine, ithalat bağımlılığının azaltılmasına ve tarımsal sürdürülebilirliğin artırılmasına katkıda bulunulacaktır. Ayrıca, bu yaklaşımın uzun vadede Türkiye'nin protein hidrolizatları üretiminde ihracatçı bir konuma gelmesini sağlama potansiyeli taşımaktadır.

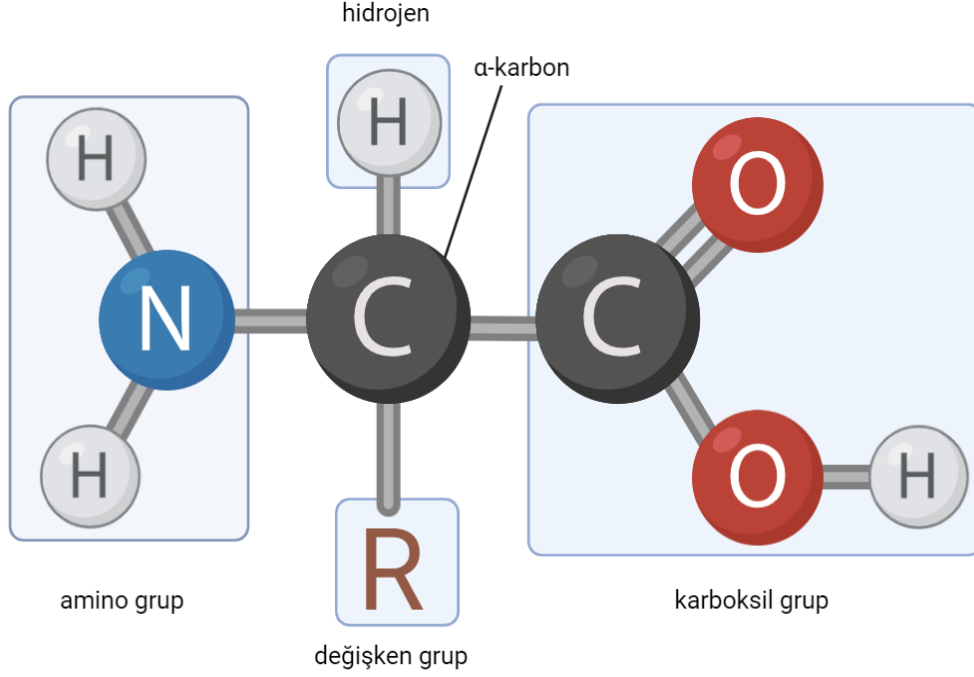
İKİNCİ BÖLÜM

LİTERATÜR

Proteinler ve protein hidrolizatları, gıda bilimi, tarım, biyokimya, ilaç ve kozmetik gibi birçok disiplinde önemli bir araştırma konusu olarak öne çıkmaktadır. Literatür kısmında, amino asitler ve peptit bağlarından başlayarak, proteinlerin kimyasal ve konformasyonel yapıları ile temel özellikleri incelenmekte, ardından kanola bitkisi ve küspesinden elde edilen protein hidrolizatları üzerinde durulmaktadır. Protein hidrolizatlarının üretim yöntemleri, fiziksel ön işlemleri, konsantrasyon teknikleri ve çeşitli kullanım alanları detaylı bir şekilde ele alınarak, bu ürünlerin biyoteknoloji ve endüstrideki önemine vurgu yapılmaktadır.

2.1. Amino Asitler ve Peptit bağları

Proteinler, amino asitlerin peptit bağları aracılığıyla bir araya gelerek oluşturduğu büyük makromoleküllerdir (Berg vd., 2002). Her amino asidin yapısı, Şekil 2.1'de gösterildiği gibi, merkezi bir karbon atomuna bağlı bir hidrojen atomu, bir amino grubu (-NH₂), bir karboksil grubu (-COOH) ve değişken bir yan zincir (R grubu) olmak üzere dört temel gruptan oluşmaktadır. Tüm doğal proteinlerin yapısal iskeleti bu temel yapı üzerine kuruludur. Ancak, alfa-karbona bağlı olan değişken yan zincir (R grubu), her amino asidin kimyasal özelliklerini belirler ve bu özellikler, proteinin özgün yapısını ve işlevlerini şekillendirir. Dolayısıyla, proteinin özellikleri ve fonksiyonları, amino asitlerin dizilimi ve yan zincirlerin çeşitliliği tarafından belirlenmektedir.

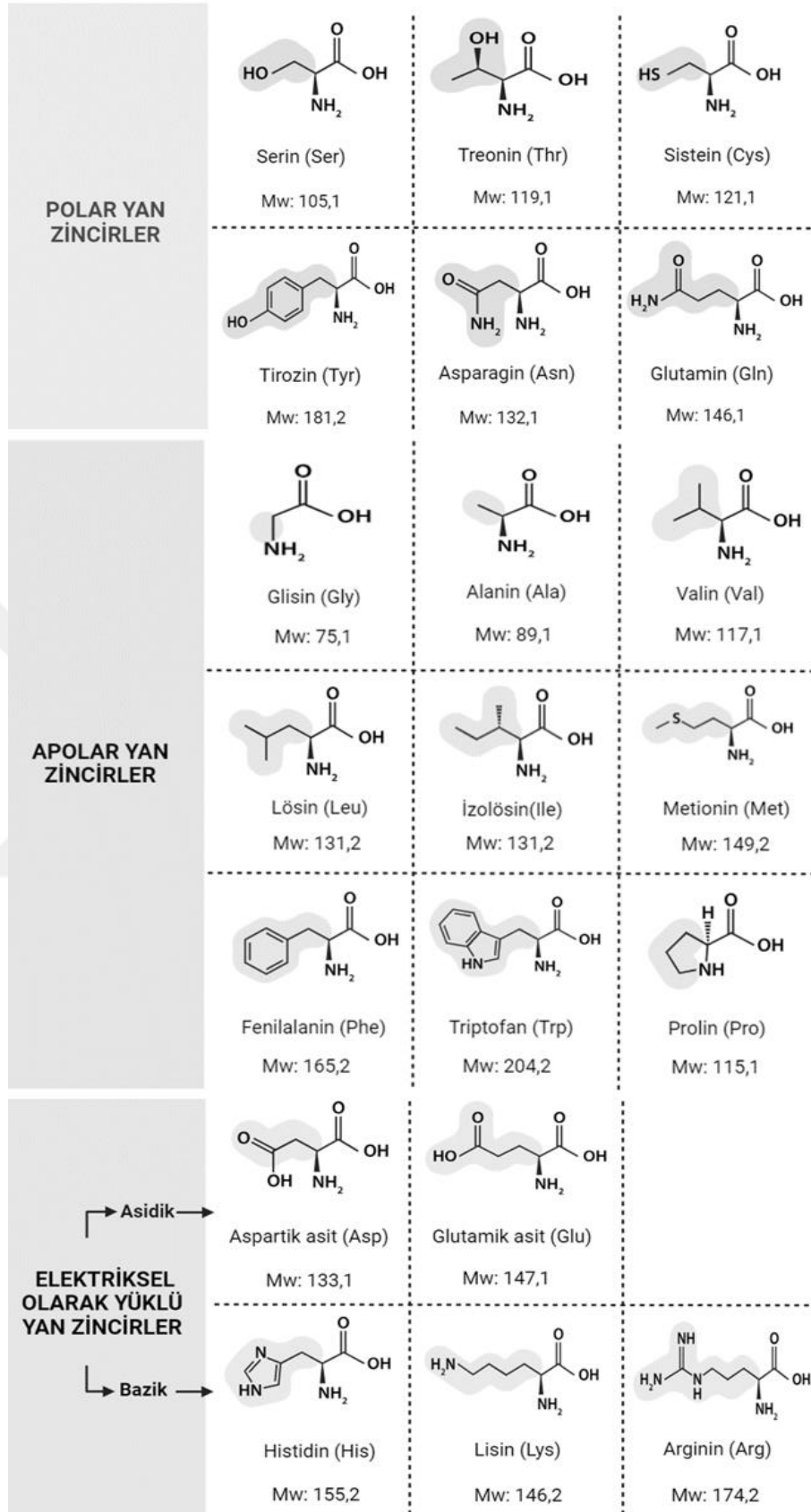


Şekil 2.1: Amino asitlerin genel yapısı

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Amino asitler, proteinlerin yapı taşları olarak bilinir ve proteinler genel olarak 20 temel amino asidin birleşiminden oluşan bir dizi kimyasal yapı içermektedir. Bu 20 amino asidin içinde, 9 tanesi esansiyel (lizin, metiyonin, treonin, fenilalanin, triptofan, valin, izolösin, lösin ve histidin), 11 tanesi ise non-esansiyel (alanin, asparajin, aspartik asit, sistein, glisin, glutamin, glutamik asit, prolin, serin, tirozin, arjinin) amino asitlerdir (Demirci, 2012). Ayrıca amino asitler, yan zincirlerinin kimyasal yapısı ve su ile etkileşimlerine göre apolar, polar ve elektrik yüklü olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.2). Apolar (hidrofobik) amino asitler, hidrokarbon içeren yan zincirleri nedeniyle suyla etkileşime girmeyen glisin, alanin, valin, lösin, izolösin, metiyonin, prolin, fenilalanin ve triptofandır; genellikle proteinlerin iç kısmında bulunmaktadırlar. Polar (hidrofilik) amino asitler, yan zincirlerinde hidrojen bağı yapabilen gruplar (OH, NH₂, SH) içerdiği için suyla etkileşim kuran serin, treonin, tirozin, asparajin ve glutamindir; bu amino asitler proteinlerin yüzeyinde yer alma eğilimindedir. Elektrik yüklü amino asitler ise, suyla yüksek çözünürlüğe sahip olup negatif yüklü (asidik) olan aspartik asit ve glutamik asit ile pozitif yüklü (bazik) olan lizin, arginin ve histidinden oluşmaktadır. Bu ayırım, amino asitlerin proteinlerin üç boyutlu yapısını ve işlevini belirlemede önemli rol oynamaktadır (Wimley vd., 1996; Biedermannová ve

Schneider, 2015; Panuszko vd. 2015). Bu temel amino asitler, protein sentezinde kritik rol oynamakta ve organizmaların sağlıklı işleyişini desteklemektedir. Ancak, doğada ve laboratuvarlarda keşfedilen toplam amino asit sayısı, 20 amino asitle sınırlı değildir. Çeşitli doğal kaynaklar ve kimyasal sentez yöntemleri sayesinde 500'den fazla amino asidin varlığı bilinmektedir (Tserodze vd., 2023). Bu geniş çeşitlilik, hem standart amino asitlerin çeşitli modifikasyonları ve türevleri hem de özel biyolojik işlevler gören doğal ve sentetik amino asitleri içermektedir. Örneğin, selenositin ve pirolisine gibi bazı özel amino asitler, doğal protein yapı taşlarının ötesinde bulunur ve özel biyolojik fonksiyonlara hizmet etmektedir (Johansson vd., 2005; Serrão vd., 2007). Ayrıca, mikroorganizmalar, bitkiler ve laboratuvar sentezleriyle üretilen farklı amino asitler, biyoteknoloji ve ilaç sektörlerinde geniş uygulama alanlarına sahiptir. Bu geniş amino asit çeşitliliği, biyolojik ve endüstriyel süreçlerdeki karmaşıklığı ve çeşitliliği yansıtmaktadır.



Şekil 2.2: Temel amino asitler, kimyasal gösterimleri ve moleküler ağırlıkları

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Peptit bağı, kovalent bir bağ olup, bir amino asidin karboksil grubunun karbonu ile diğer bir amino asidin amino grubunun azotu arasında gerçekleşen kimyasal bir bağıdır. Bu süreçte bir su molekülü ayrılır, bu ayrılma bir dehidrasyon sentezi (kondensasyon reaksiyonu) olarak bilinmektedir. Peptit bağı, proteinlerin ana yapısını oluşturan zincirlerin temel birimidir ve amino asitlerin birbirine bağlanmasıyla dipeptit, tripeptit veya polipeptit zincirlerinin oluşumunu sağlamaktadır. Bu zincirler, genellikle çok uzun polipeptit zincirleri olarak tanımlanmakta ve bu uzunluk proteinlerin yapısal çeşitliliğini mümkün kılmaktadır. Peptit bağlarının belirli sıralaması, proteinlerin üç boyutlu yapısını etkileyerek onların biyolojik ve fonksiyonel özelliklerini belirlemektedir. Protein yapısındaki bu düzenlemeler, peptit bağlarının serbest rotasyona izin vermemesi nedeniyle oldukça stabildir ve proteinlerin katlanma dinamiklerini de etkilemektedir (Nelson vd., 2008). Peptit bağları, bu nedenle proteinlerin biyolojik aktivitesinde kritik bir role sahiptir ve bu bağların yapısı ile özellikleri biyokimya ve moleküler biyolojide geniş çapta incelenmektedir (Berg vd., 2002).

2.2. Proteinler

Proteinler, hücrelerin temel yapı taşlarını oluşturan ve canlı organizmalardaki tüm yaşamsal fonksiyonlarda rol oynayan azot içeren makromoleküllerdir. "Protein" terimi, Yunanca "proteios" kelimesinden türetilmiştir; bu kelime "birincil" veya "birinci derecede önemli " anlamına gelmektedir. Bu terminoloji, proteinlerin biyolojik moleküller arasındaki temel ve üstün önemini vurgulamak amacıyla 1838 yılında Jons Berzelius tarafından önerilmiştir (Schlick, 2010). Proteinler, birçok önemli hücrel faaliyetleri yönetirler. Hücrelerin bölünmesi ve yenilenmesi için gerekli yapı taşlarını sağlayarak büyüme ve gelişmede kritik rol oynamaktadırlar. Enzimler, biyokimyasal reaksiyonları hızlandırarak hücre içindeki metabolik süreçleri düzenlemektedir. Hormonlar, vücudun farklı bölgeleri arasında sinyaller taşıyan kimyasal habercilerdir ve çeşitli fizyolojik süreçleri düzenlemektedir. Bağışıklık sistemi tarafından üretilen antikorlar, vücuda giren yabancı maddelere karşı savunma sağlamaktadır. Hemoglobin gibi taşıyıcı proteinler, oksijen (O₂) ve karbondioksit (CO₂) gibi molekülleri vücut içinde taşıırken, hücre zarında yer alan taşıyıcı proteinler hücre içine ve dışına madde taşınmasında görev almaktadır. Depolama proteinleri, önemli mineralleri depolamakta ve gerektiğinde serbest bırakmaktadır. Ayrıca, keratin

ve kolajen gibi yapısal proteinler, hücelere ve dokulara mekanik destek sağlamaktadır. Bu çok yönlü işlevler, canlı organizmaların hayatta kalması ve düzgün bir şekilde işlev görmesi için kritik öneme sahiptir (Berg vd., 2002).

2.3. Proteinlerin Kimyasal Yapısı

Proteinlerin kimyasal yapısının anlaşılması, biyomoleküllerin işlevsel özelliklerinin belirlenmesinde temel bir adımdır. Proteinler genellikle ortalama olarak %45-55 karbon, %20-25 oksijen, %15-17 azot, %6-8 hidrojen, %0-3 kükürt ve %0-0.8 fosfor içerir. Ayrıca, bazı proteinlerde demir ve bakır gibi iz elementler de bulunabilmektedir (Demirci, 2012).

Proteinlerin temel yapı taşları olan amino asitlerin düzenli dizilimi, peptit bağları aracılığıyla bir araya gelerek proteinlerin birincil yapısını oluşturmaktadır. Bu yapı, proteinlerin daha karmaşık yapısal seviyelerine evrilmesine zemin hazırlamaktadır; birincil yapı, amino asitlerin sırasını belirlerken, ikincil yapı, alfa sarmallar ve beta tabakalar gibi düzenli yapıların oluşumunu sağlamaktadır. Üçüncül yapı, polipeptit zincirinin katlanmasıyla üç boyutlu bir konformasyon kazandırırken, dördüncül yapı ise birden fazla polipeptit zincirinin birleşimiyle oluşmaktadır. Bu hiyerarşik yapı seviyeleri arasındaki etkileşimler, hidrojen bağları, iyonik bağlar, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimler gibi kuvvetler aracılığıyla sağlanmaktadır. Bu etkileşimler, proteinlerin biyolojik aktivitelerini belirleyen temel unsurlardır. Sonuç olarak, proteinlerin kimyasal yapısı, onların biyolojik sistemlerdeki karmaşık işlevlerini yerine getirmesinde kritik rol oynamaktadır (Chaffey vd., 2003).

2.4. Protein Konformasyonel Yapısının Düzeyleri

Proteinlerin konformasyonel yapısının farklı düzeylerini anlamak, proteinlerin işlevselliği ve biyolojik rolleri açısından kritik bir öneme sahiptir. Proteinler, amino asitlerin belirli bir sıralamayla dizildiği birincil yapıdan başlayarak, ikincil yapıda alfa sarmallar ve beta tabakaları oluşturarak daha karmaşık yapılar kazanmaktadır. Tersiyer yapı, bu peptit zincirlerinin üç boyutlu konformasyonunu tanımlamakta ve kuarterner yapı, birden fazla polipeptit zincirinin birleşerek oluşturduğu kompleks yapıyı ifade etmektedir (Rehman ve Botelho, 2019). Bu yapısal düzeyler, proteinlerin

doğru işleyişini ve biyolojik fonksiyonlarını belirleyen temel unsurlardır. Şekil 2.3 üzerinde proteinlerin konformasyonel yapısının düzeyleri gösterilmiştir.

2.4.1. Birincil (Primer) Yapı

Proteinlerin birincil yapısı, kovalent bağlarla bir araya gelen amino asit moleküllerinin dizilimini tanımlamaktadır. Bu yapı, peptit zincirindeki amino asitlerin sayısını ve sırasını, peptit bağlarının özelliklerini ve miktarını kapsamaktadır. Ayrıca, disülfid köprüleri ve diğer kovalent bağların pozisyonları ve nitelikleri hakkında bilgi içermektedir. Örneğin, insülin birincil proteinlere bir örnek teşkil etmektedir ve bu yapı, proteinin üç boyutlu yapısını ve biyolojik işlevlerini belirlemede kritik öneme sahiptir (Czech ve Corvera,1999; Velisek, 2013).

2.4.2. İkincil (Sekonder) Yapı

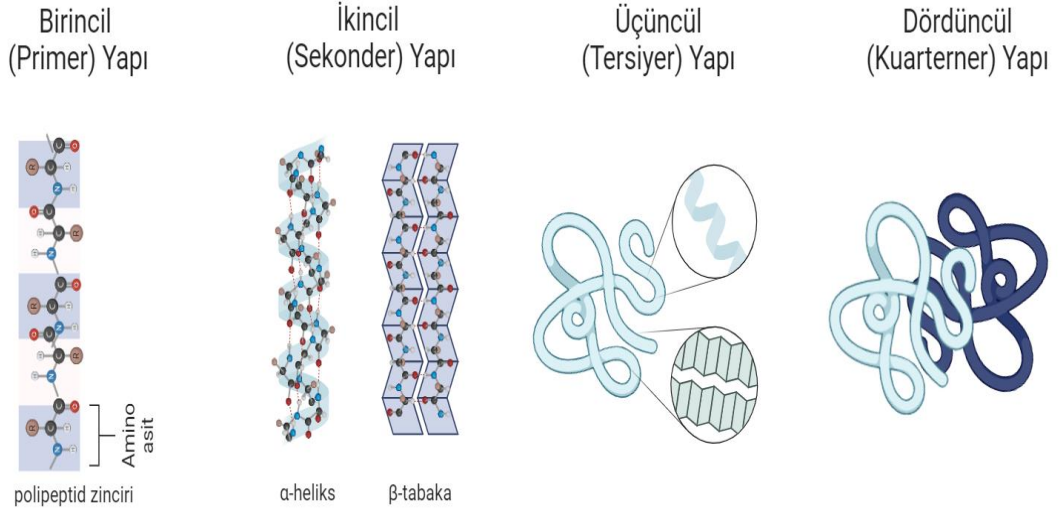
Sekonder yapı, polipeptidlerin belirli kısımlarının yerel konformasyonlarını ifade eder. Bu yapı, iki ana düzenlenme biçimi olan alfa heliks (α -heliks) ve beta tabaka (β -tabaka) içermektedir. α -heliks, zincirin kendi içinde belirli periyodik hidrojen bağları oluşturmasıyla meydana gelen sarmal bir yapıdır; peptit omurgası sağa doğru kıvrılmaktadır (saat yönünde). β -tabaka ise polipeptit zincirlerinin yan yana gelip hidrojen bağları oluşturduğu düzlemlerden oluşmaktadır ve zincirler arasında düz ve güçlü hidrojen bağları bulunmaktadır. Sekonder yapı, peptit omurgasındaki amino asitlerin karbonil oksijen atomları ile amido hidrojen atomları arasında oluşan hidrojen bağları ile stabilize edilmektedir. Ayrıca, disülfid bağları ve hidrofobik etkileşimler de sekonder yapının stabilizasyonunda rol oynayabilmektedir. α -heliks ve β -tabakalı yapılar, proteinlerin konformasyonel yapısında bulunmaktadır. Globüler ve fibröz proteinler, farklı oranlarda bu yapı birimlerini içermektedir. Örneğin, miyoglobin genelde α -heliks içerirken, proteinaz α -kimotripsin genelde β -tabakalı birimlere sahiptir. Ancak çoğu protein, yüksek oranlarda her iki yapı türünü de içermektedir (Demirci, 2012). Sekonder yapı, proteinlerin yerel düzenlenme biçimlerini tanımlamakta ve bu yapılar, proteinlerin stabilitesini ve fonksiyonlarını belirlemede önemli rol oynamaktadır.

2.4.3. Üçüncül (Tersiyer) Yapı

Peptit zincirinin üç boyutlu karmaşık ve düzensiz katlanması, tersiyer yapı olarak adlandırılmaktadır. Proteinlerin işlevselliği, tamamen bu üç boyutlu konformasyona bağlıdır; konformasyonunda bir değişiklik, proteinin işlevini kaybetmesine neden olabilmektedir. Bu karmaşık yapılar, amino asitlerin yan gruplarının (R-gruplarının) oluşturduğu çeşitli moleküler etkileşimlerle stabil hale gelmektedir (Gatti, 2010). R-grupları, hem düzenli yapılar (örneğin alfa sarmallar ve beta tabakaları) oluşturan bölgelerin hem de düzenli olmayan, karmaşık bölgelerin yapısını belirlemektedir. Bu etkileşimler arasında hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları, iyonik bağlar ve disülfid köprüleri bulunmakta, bu da proteinin genel yapısının ve işlevinin korunmasını sağlamaktadır. Laktat dehidrojenaz (LDH) tersiyer yapıya sahip bir proteindir (Rossman vd., 1975).

2.4.4. Dördüncül (Kuarterner) Yapı

Farklı protein birimlerinin birbirleriyle etkileşimlerini ve bir arada bulunmalarını tanımlayan yapı, proteinlerin birden fazla polipeptit zinciri içerdiği durumlarda uzaysal düzenlemeyi ifade etmektedir. Bu yapı, polipeptit zincirlerinin bir araya gelerek oligomerleşmesini sağlamakta; bu tür proteinler oligomer proteinler olarak da adlandırılabilir. Hemoglobin, dört alt birimden (iki alfa ve iki beta zincir) oluşan kuarterner yapıya sahiptir (Aharoni ve Tobi, 2018). Biyolojik olarak önemli birçok protein, dimer, trimer, tetramer gibi çeşitli yapılar oluşturmaktadır. Örneğin, fosforilaz b enzimi, iki özdeş alt birimin bir araya gelmesiyle bir dimer oluşturmaktadır. Bu dimer, fosforilaz b'nin aktif formunu oluşturmaktadır. Fosforilasyon işlemi sonucunda tetramer formuna (fosforilaz a) dönüşmektedir. Fosforilaz b'nin alt birimleri ayrı ayrı aktivite gösterememektedir; bu birimlerin doğru bir şekilde birleşmesi ve oligomerleşmesi gerekmektedir (Demirci, 2012).



Şekil 2.3: Proteinlerin konformasyonel düzeyleri (birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılar)

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

2.5. Protein Kaynakları

Proteinler, vücudun temel yapı taşları olarak hücrelerin, dokuların ve organların yapılandırılmasında ve birçok biyolojik işlevin yerine getirilmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Protein kaynakları genellikle hayvansal ve bitkisel kökenli olmasının yanı sıra, mikroalgler, böcekler, mikrobiyolojik yöntemlerle (maya ve çeşitli bakterilerden) sentezlenen ve amino asit sentezi yoluyla üretilen sentetik veya yapay proteinleri de içermektedir (Dolganyuk vd., 2023). Hayvansal proteinler genellikle et (domuz, sığır, tavuk, sakatat), balık, süt ve yumurta gibi gıdalardan elde edilirken, bitkisel proteinler ağırlıklı olarak tahıllar (buğday, mısır, pirinç, yulaf vb.), baklagiller ve yağlı tohumlardan (soya fasulyesi, ayçiçeği, kanola tohumu vb.) sağlanmaktadır.

Hayvansal kaynaklı proteinler, yüksek biyolojik değerleri ve kapsamlı fonksiyonel özellikleri nedeniyle detaylı bir şekilde araştırılmakta ve gıda sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, bu proteinlerin üretiminin çevresel etkileri önemli düzeydedir. Hayvancılığın küresel sera gazı emisyonuna olan tahmini etkisi %18 civarında olduğu raporlanmıştır (FAO, 2006). Arazi kullanımı değişikliğinden kaynaklanan karbon dioksit (CO₂), geniş getiren hayvanların enterik fermantasyonuyla açığa çıkan metan (CH₄) ve gübre yönetiminden salınan azot oksit (N₂O) sera gazı emisyonlarının başlıca kaynaklarıdır (Herrero vd., 2011). Bunun yanı sıra et ürünlerine

olan talep her geçen gün artmaktadır. Nitekim Birleşmiş Milletler Örgütü, dünya nüfusunun 2050 yılına kadar 9 milyarın üzerine çıkmasını beklemektedir. Bu artışın önemli bir kısmı et tüketiminin arttığı 3. dünya ülkelerinde gerçekleşmesi beklenmektedir. (Delgado 2003; BM 2013; Wouters vd., 2016). FAO/BM tahminine göre, 2050 yılında, özellikle hayvansal protein (et ve süt ürünleri) için küresel gıda talebi, 2013 yılındaki talebin iki katı olacağı öngörülmektedir (FAO, 2013). Bu nedenle, özellikle bitkisel protein kaynakları ve diğer alternatif protein kaynakları üzerine araştırmalar hız kazanmıştır. FAO verilerine göre, 2022 yılında yenilebilir bitkilerin toplam üretimi, hayvansal gıda kaynaklarının toplam üretiminden yaklaşık 4 kat daha fazladır (FAOSTAT, 2022). Bu fark, bitkisel gıdaların geniş üretim yelpazesi ve yüksek üretim kapasiteleri nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla, küresel gıda sistemlerinde bitkisel ürünlerin hayvansal ürünlere kıyasla daha büyük bir yer tuttuğunu ve bu ürünlerin genellikle daha sürdürülebilir üretim yöntemlerine sahip olabileceğine işaret etmektedir. Bununla birlikte, hayvansal proteinin büyük bir çoğunluğu (%92), ancak bitkisel proteinin sadece %33'ü gıda uygulamalarında kullanılmaktadır. Bitkisel proteinin daha düşük kullanım oranı, büyük ölçüde doğrudan insan tüketiminde kullanımın sınırlı olmasından kaynaklanmaktadır. Bitkisel proteinlerin önemli bir kısmı işleme sırasında kayba uğramakta veya yan ürün olarak değerlendirilmekte (Shepon vd., 2016), ayrıca sindirilebilirlikleri hayvansal proteinlere kıyasla daha düşük olabilmektedir (Cutroneo vd., 2017). Buna karşılık, hayvansal proteinin sadece %7'si, ancak bitki proteininin %26'ya kadarı hayvan yemi için kullanılmakta veya atılmaktadır (FAOSTAT 2011). Atılan ve dolayısıyla tam potansiyeliyle kullanılmayan bitki proteini miktarı, dünya çapında üretilen toplam hayvansal protein miktarına eşittir. Dikkate alınması gereken bir diğer önemli husus da üretim maliyetidir. Hayvansal protein üretimi, bitkisel proteine göre yaklaşık 10 kat daha maliyetlidir. Bu yüksek maliyetler, yalnızca ekonomik açıdan değil, aynı zamanda çevresel sürdürülebilirlik açısından da önemli dezavantajlar yaratmaktadır. Hayvansal üretim süreçleri, yem olarak kullanılan bitkisel ürünlerin (örneğin, mısır ve soya) büyük miktarda enerji, su ve diğer kaynakları tüketmesine neden olmaktadır. Buna ek olarak, hayvancılık süreçleri daha fazla iş gücü ve zaman gerektirirken, arazi kullanımı ve gübre kirliliği gibi çevresel etkiler de göz ardı edilemeyecek boyutlara ulaşmaktadır. Bu durum hem çevresel hem de ekonomik açıdan, bitkisel kaynaklı proteinlerin daha sürdürülebilir bir alternatif olduğunu ortaya koymaktadır (Zayas 1997; Lusk ve Norwood 2009).

Bu nedenlerle, bitkisel protein kaynaklarının değerlendirilmesi hem ekonomik verimlilik hem de çevresel sürdürülebilirlik açısından oldukça cazip bir seçenek olarak öne çıkmaktadır. Bitkisel proteinlerin daha etkili kullanımı, atık miktarını azaltma ve üretim maliyetlerini düşürme potansiyeline sahip olup, tarım ve gıda sistemlerinde daha sürdürülebilir ve verimli bir yaklaşımın benimsenmesine katkıda bulunabilir.

2.6. Kanola Bitkisi

Kanola, Brassicaceae (Cruciferae) familyasına ait olan en yaygın yağlı tohumlu bitkilerinden biridir. *Brassica napus* L. ssp. *napus*, *Brassica juncea* Czern. ssp. *juncea*, *Brassica rapa* L. ssp. *oleifera* Metzg, *Brassica rapa* (L.) ssp. *dichotoma* (Roxb.) Hanelt, *Brassica rapa* L. ssp. *trilocularis* gibi türleri bulunmaktadır (Daun, Eskin, & Hickling, 2015). Kolza tohumu olarak nitelendirilen bu yağlı tohum mahsulü yağdaki erusik asit miktarı %2'den az ve alifatik glukozinolat miktarı ise yağsız, nemsiz küspede 30 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ 'dan az olacak şekilde ıslah edilmiştir (Przybylski ve Mag, 2002). Laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar, erusik asidin yüksek düzeylerde bulunmasının kalp kasında yağ birikimine, inflamasyona ve doku hasarına yol açabildiğini bu durum neticesinde ise kalp lezyonlarını artırdığını göstermektedir. Aynı şekilde, alifatik glukozinolatın yüksek düzeylerde bulunması ise midesi olmayan hayvanlarda yiyeceklerin besin değerini ve lezzetini azalttığı tespit edilmiştir. Besin değerini arttıran bu ıslah çalışmaları sonucunda eski tarz kolza tohumundan ayırmak için yeni bir isme ihtiyaç duyulmuştur. Bu sebeple “kanola” terimi (Canada-oil-low-acid) kullanıldıktan sonra “kanola” ticari marka haline getirilmiştir (Downey, 2006).

Dünya genelinde 2023/2024 yılı verilerine göre, en çok kanola yetiştirilen ülkeler Kanada, Avrupa Birliği ülkeleri Almanya, Fransa, Polonya, Avustralya ve Çin'dir. Kanada, dünya çapında en fazla kanola üretimi yapan ülke olarak öne çıkmaktadır. Buna karşılık, Ukrayna ve Hindistan'da kanola üretiminde azalmalar gözlenmektedir. Türkiye'nin kanola üretimi ise yıllara göre bazı dalgalanmalar göstermektedir. Ülkenin 2023/2024 üretim sezonunda yaklaşık 1,550- 1,675 bin ton kanola üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu miktar, Türkiye'yi dünya genelinde orta büyüklükte bir üretici olarak konumlandırmaktadır. Türkiye, aynı zamanda kanola ithalatı ve ihracatında da hareketlilik göstermekte, ancak ihracat hacmi nispeten sınırlı kalmaktadır (USDA, 2024).

Bu dönemde, dünya genelinde en fazla üretilen yağlı tohum, 422,26 milyon metrik ton ile soya fasulyesi olmuştur. Kanola ise aynı dönemde 88,34 milyon metrik ton üretim ile soya fasulyesinden sonra en yüksek üretim miktarına sahip yağlı tohum olarak öne çıkmaktadır (USDA, 2024). Bu veriler, kanolanın tarımda önemli bir yağlı tohum olduğunu ve küresel üretimde dikkate değer bir rol oynadığını göstermektedir.

Kanola tohumu, modern tarım ve gıda endüstrisinde önemli bir rol oynamaktadır ve besin değeri ile endüstriyel uygulamalar açısından potansiyel taşımaktadır. Kimyasal bileşimi açısından kanola tohumu, yüksek oranda doymamış yağ asitleri, protein ve çeşitli mikro besin maddeleri içermektedir; bu özellikleri, onu gıda ve yem endüstrisinde değerli bir hammadde yapmaktadır. İşleme sonucunda elde edilen kanola küspesi ise yüksek protein, lif ve kül içeriğine sahip olup, özellikle hayvan yemlerinde kullanılmaktadır. Kanola tohumu %17-26 protein ve yaklaşık olarak %40 yağ içermektedir (Uppstrom, 1995). Proteinlerin %80'ini embriyoda bulunan depo proteinleri oluşturmaktadır. Proteinler genel olarak, albüminler (suda çözünür fraksiyonu oluşturan), globulinler (tuz çözeltilerinde çözünür fraksiyonu oluşturan), prolaminler (etanolde çözünür fraksiyon oluşturan) ve glutelinler (bahsi geçen çözücülerde çözünmeyen) olmak üzere 4 ana gruptan oluşmaktadır. Kanola proteinleri fraksiyonlama işlemleri ile sedimantasyon katsayısına (S, bir makromolekülün santrifüj alanında çökme hızı) göre çeşitli fraksiyonlar oluşturabilir. Bunlar kanola proteinleri için temelde 12S,7S; bölünmüş 2S, 1.7S, 1.8S'dir. Kanola tohumunda bulunan iki ana depo protein ailesi Napin ve Cruciferin proteinleridir. Napin (düşük moleküler ağırlıklı, 12.5–14.5 kDa) 2S albüminidir ve toplam proteinin %20'sini oluşturmaktadır. Cruciferin (yüksek moleküler ağırlıklı, 300–310 kDa) ise 12S globulindir ve toplam proteinin %60'ını oluşturmaktadır. (Hoglund vd., 1992; Aider & Barbana, 2011). Ağırlıklı olarak albümin ve globulin fraksiyonları içeren kanola tohumlarında yağ külecikleri ("oil bodies") ile ilgili olan bir başka protein türü de oleosindir (düşük moleküler ağırlıklı, 15–26 kDa) (Ghodsvalivd., 2005). Ayrıca kanola tohumları tripsin inhibitörleri, tiyoninler, LTP (lipit transfer proteini) gibi bazı proteinleri de içermektedirler (Bérot vd., 2005). Kanola tohumu proteinleri üzerine yapılan bir çalışmada, incebağırsakta emilim işleminin ölçüm değeri ("RID", real ileal digestibility) $84,0 \pm 8,8$, bir öğünden sonra aldığı proteinin ne kadarının sindirilip emilerek vücut tarafından kullanıldığını ölçen değer ("NPPU", Net Postprandial Protein Utilization) $70,5 \pm 9,6$, sindirilen proteinin vücut tarafından etkili bir şekilde

kullanıldığını gösteren değer ise (“PBV”, Postprandial Biological Value) 83.8 ± 4.6 olarak bulunmuştur. Elde edilen bulgular, kanola tohumu proteinlerinin yüksek besinsel değere sahip olduğu tespit edilmiştir (Bos vd., 2007). Ayrıca, kanola tohumu proteini, dengeli bir amino asit bileşimine sahip olmasıyla dikkat çekmektedir (Mäkinen vd., 2012, Mariscal-Land’ın vd., 2008). Kanola ve ürünlerindeki esansiyel amino asitlerin seviyesi >400 mg/g proteindir. Kükürt içeren amino asitler (“S-AA”, sulphur-containing amino acids), %3- 4 veya 40- 49 mg.g⁻¹ protein aralığında bulunmaktadır. Bu veriler, kanola proteinlerinin, FAO/UNU/WHO tarafından belirlenen insan gereksinimlerine ait referans protein modeline daha yakın olduğunu göstererek, kanolayı baklagil kaynaklarına kıyasla daha zengin bir sülfür içeren amino asit (S-AA) kaynağı olarak konumlandırmaktadır. Sülfür içeren amino asitler, protein sentezi ve metabolizma için kritik öneme sahip olduğundan, kanola proteini beslenme açısından daha yüksek biyolojik değere sahip bir seçenek olarak öne çıkmaktadır (Bos vd., 2007; Wanasundara vd., 2016).

2.7. Kanola Küspesi

Kanolanın endüstriyel işlenmesi, ön işleme (temizleme, presleme, pul haline getirme ve pişirme), mekanik presleme ve/veya organik çözücüler kullanarak yağın elde edilmesini içermektedir. Bu süreç, yüksek protein içeriğine sahip küspenin (Şekil 2.4) yan ürün olarak oluşmasına sebep olmaktadır (CCC, 2019). Kanola küspesinde yaklaşık %40 protein, %38 toplam lif, %7 kül bulunmaktadır (Ayton, 2014). Kanola küspesi, yağ ekstraksiyonunun yan ürünü olarak elde edilen ve artan protein talebine paralel olarak üretim hacmi, besinsel ve fonksiyonel nitelikleri nedeniyle uygun bir bitki proteini kaynağıdır. İnsan deneklerde yapılan çalışmalar, kanolanın esansiyel amino asit profili ve protein kullanım verimliliği açısından süt ve yumurta proteinleriyle karşılaştırılabilir yüksek kaliteli bir protein olduğunu göstermektedir (Bos vd., 2007; Fleddermann vd., 2013).



Şekil 2.4: Kanola küspesi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur

2.8. Protein Hidrolizatlarının Temel Özellikleri

Protein hidrolizatları, proteoliz süreciyle proteinlerin peptit bağlarının ayrılması sonucu oluşan, farklı uzunluklardaki peptitler ve serbest amino asitlerden oluşan ürünlerdir. Böylece protein hidrolizatları, karakteristik bir amino asit bileşimine ve tanımlanmış moleküler boyut dağılımına sahip olacak biçimde üretilmektedir (Clemente, 2000). Protein hidrolizatları, yüksek sindirilebilirlikleri ve esansiyel amino asitlerin mevcudiyeti sayesinde sindirim sorunları veya protein emilim bozukluğu olan kişiler için ideal bir besin takviyesi olabilmektedir. Bu bağlamda bebekler için hazırlanmış formüllerde de bu maddelerin kullanılması mümkün olabilmektedir. Ayrıca protein hidrolizatları, antioksidan, antimikrobiyal, antihipertansif ve immünomodülatör özellikler gösteren biyoaktif peptitler içermektedir (Clare ve Swaisgood, 2000). Bu peptitler, protein türü, kullanılan enzim ve hidroliz derecesine bağlı olarak değişen yüksek besin değeri ve verimli gastrointestinal absorpsiyon sağlayabilmektedir (Dong vd., 2008). Bunun yanı sıra protein hidrolizatları; artırılmış çözünürlük, pH değişiklikleri, metal iyonları gibi ajanlar tarafından gerçekleştirilen çökeltme proseslerine karşı yüksek direnç ve ısı kararlılık gibi bir dizi avantajlar sergileyebilmektedir (Fox vd., 1982). Ayrıca protein hidrolizatları içerisinde bulunan polipeptitler, peptitler ve amino asitler, organik azot kaynağı olarak kullanıldığı gibi, toprak kalitesini artırarak tarımda da bitkilerin azot alım verimliliğini de artırabilmektedir (Colla vd., 2014). Böylelikle hidrolizatlar, bitkilerin daha sağlıklı büyümesine ve verimli ürünler elde edilmesine yardımcı olabilmektedirler. Protein

hidrolizatları kullanımı kimyasal gübre girdisini ve dolayısıyla çevresel etkileri azaltabilmektedir. Bu nedenle, protein hidrolizatları sürdürülebilir tarım uygulamalarında da önemli bir rol oynayabilmektedir (Maini, 2006; Schiavon vd., 2008).

2.9. Protein Hidrolizatı Elde Etmek İçin Kullanılan Yöntemler

Protein hidrolizatı üretimi, farklı tekniklerin uygulandığı karmaşık bir süreç olup, son yıllarda birçok yenilikçi yöntemle daha verimli hale getirilmiştir. Geleneksel protein hidroliz yöntemleri arasında asidik, bazik ve enzimatik hidroliz yer almakta olup bu yöntemler uzun süredir kullanılmaktadır. Ancak günümüzde verimliliği artırmak ve çevresel etkileri en aza indirmek amacıyla daha modern ve sürdürülebilir teknolojiler de devreye girmektedir. Son dönemde, mikrodalga destekli, yüksek basınçlı ve ultrasonik yöntemler, doğrudan hidroliz teknikleri olarak değil, protein hidrolizini kolaylaştıran ön işlemler olarak öne çıkmaktadır (Phongthai vd., 2016; Chen vd., 2011, Zhou vd., 2016). Bu yenilikçi teknikler, protein yapılarını daha hızlı ve etkin bir şekilde bozarak hidroliz süreçlerinin verimliliğini artırabilir.

2.9.1. Kimyasal Hidroliz

Ticari olarak, protein hidrolizatları hem asidik hem de alkali hidroliz yöntemleriyle elde edilmektedir. Kimyasal hidroliz, proteinlerin peptit bağlarını kırmak için güçlü asitler veya bazlar kullanılarak gerçekleştirilmekte ve bu işlem sonucunda amino asitler serbest bırakılmaktadır. Ancak kimyasal hidrolizin en önemli yan etkilerinden biri, serbest amino asitlerin rasemizasyonudur; yani L-formundaki enantiyomerlerin D-formuna dönüşmesidir. Canlı organizmaların proteinlerinde doğal olarak yalnızca L-formunda amino asit enantiyomerleri bulunduğundan, D-formundaki amino asitlerin kullanılabilirliği düşmektedir. Bu durum, kimyasal hidroliz ile üretilen protein hidrolizatlarının biyoyararlılığını azaltabilir ve hatta potansiyel olarak toksik hale getirebilir (Cavani vd., 2003; Lisiecka vd., 2011; Colla vd., 2015). Ayrıca, kimyasal hidroliz sırasında bazı amino asitlerin parçalanması veya istenmeyen yan ürünlerin oluşması da hidrolizatın kalitesini ve etkinliğini olumsuz yönde etkileyebilmektedir.

2.9.1.1. Asidik Hidroliz

Asidik hidroliz, proteinlerin peptit bağlarını parçalayarak serbest amino asitler elde etmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu süreçte en sık tercih edilen kimyasal madde hem sıvı hem de gaz fazında kullanılabilen ve işlem sonrası kolayca buharlaştırılabilen hidroklorik asittir (HCl). Hem sıvı hem de gaz fazında kullanılabilen ve işlem sonrası kolayca buharlaştırılabilme özellikleri sayesinde hidrolizat, sulandırma tamponunun küçük bir hacmi içinde geri kazanılabilmektedir. Genellikle 6 M HCl ile vakum altında ve 100-160°C sıcaklık aralığında, 18- 72 saat arasında değişen sürelerle gerçekleştirilen hidroliz, protein yapısına ve hedeflenen amino asitlere bağlı olarak farklı verimliliklerde sonuçlar vermektedir. Örneğin, serin ve treonin kalıntılarının hidrolizi sırasında sırasıyla %10 ve %5'lik kayıplar meydana gelirken, triptofan tamamen yok olmaktadır. Ile-Ile, Val-Val, Ile-Val gibi alifatik kalıntılar arasındaki bağlar oldukça dirençlidir ve %50-70 verimle hidrolize edilir. Bu bağlar için 110°C'de 24 saat yerine 92 ila 120 saat gibi daha uzun süreler gerekebilir (Fountoulakis vd., 1998).

Hidroklorik asidin (HCl) dışında; metan sülfonik asit (MSA; CH₃SO₃H), p-toluen sülfonik asit (C₆H₄SO₃H), sülfürik asit (H₂SO₄), fosforik asit (H₃PO₄) ve nitrik asit (HNO₃) gibi diğer güçlü asitler de proteinlerin peptit bağlarını parçalamak amacıyla kullanılmaktadır (Fountoulakis vd., 1998). Bu asitler, amino asitlerin serbest bırakılmasını sağlayarak protein hidrolizatlarının üretimine katkıda bulunmaktadır. Ancak, asidik hidroliz sürecinin bazı zorlukları da bulunmaktadır. Örneğin, serbest amino asit içeriği artarken, belirli amino asitlerde önemli kayıplar gözlemlenmektedir. (Darragh vd., 1996). Bu amino asit kayıplarını minimize etmek ve hidrolizin etkinliğini artırmak için hidroliz süresi ve sıcaklık gibi parametrelerin dikkatle kontrol edilmesi gerekmektedir. Tam amino asit geri kazanımı hiçbir zaman mümkün olmasa da bu yöntem ticari protein hidrolizatlarının üretiminde yaygın olarak kullanılmaya devam etmektedir.

2.9.1.2. Alkali Hidroliz

Alkali hidroliz, proteinlerin ve diğer organik bileşenlerin bazik koşullarda kimyasal olarak parçalanmasını sağlayan bir yöntemdir. Özellikle triptofanın bazik koşullarda stabil kalması nedeniyle, bu amino asidin belirlenmesinde yaygın olarak

kullanılmaktadır. Yüksek miktarda karbonhidrat içeren protein örneklerinde, asidik hidroliz düşük verimle sonuçlanabilmektedir. Asidik koşullar, karbonhidratların yapısını bozarak istenmeyen yan ürünlerin oluşmasına ve proteinlerin hidrolizini engellemeye neden olabilmektedir. Buna karşılık, alkali hidroliz karbonhidratların bazik ortamda daha stabil olması ve triptofan gibi amino asitlerin korunması sayesinde bu tür örnekler için daha uygun bir yöntem olarak öne çıkmaktadır (Blackburn, 1978). Alkali hidroliz genellikle sodyum hidroksit (NaOH), potasyum hidroksit (KOH) veya nadiren baryum hidroksit (Ba(OH)₂) kullanılarak gerçekleştirilmektedir (vd., 1998). Alkali hidroliz, proteinlerin ve diğer organik bileşenlerin ayrıştırılmasında önemli bir yöntem olmasına rağmen, bazı amino asitlerin tahrip olması ve rasemizasyon gibi dezavantajları bulunmaktadır.

2.9.2. Enzimatik Hidroliz

Enzimatik hidroliz, proteinlerin spesifik enzimler kullanılarak kontrollü bir şekilde parçalanmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu süreçte, proteinlerin yapı taşı olan peptit bağları, enzimlerin özgülüğüne bağlı olarak belirli amino asitler arasında hedeflenmekte ve parçalanmaktadır. Bu, enzimlerin spesifik bağlanma bölgelerine ve substrat seçiciliğine göre gerçekleşmektedir; yani her enzim yalnızca belirli bir dizide veya belirli bir bağ türünde etkili olmaktadır. Bu özellik, süreç sırasında proteinlerin belirli bölgelerinin parçalanmasına olanak tanımakta ve böylece istenilen özelliklere sahip peptitlerin seçici olarak elde edilmesini sağlamaktadır. Enzimatik hidroliz, asidik veya alkali hidroliz yöntemlerine kıyasla daha yumuşak ve hassas koşullar altında gerçekleştirilmekte, bu durum da protein yapısının korunmasını desteklerken daha kontrollü bir parçalanma süreci sunmaktadır. Enzimatik hidroliz, gıda, ilaç ve biyoteknoloji endüstrilerinde biyolojik olarak aktif peptitler ve amino asitlerin üretiminde yaygın olarak kullanılan, etkili ve tercih edilen bir yöntemdir. Bu süreç, daha düşük rasemizasyon riski ve istenmeyen yan ürünlerin oluşumunu minimize etmesi nedeniyle, elde edilen ürünlerin biyoyararlılığını ve etkinliğini artırma avantajı sunmaktadır. Özellikle gıda endüstrisinde, protein hidrolizatlarının üretiminde kullanılan bu yöntem, güvenli, düşük maliyetli ve çevre dostu olmasıyla öne çıkmaktadır (Du vd., 2022).

Enzimatik hidroliz, tahıllar, baklagiller, yağlı tohum proteinleri gibi bitki proteinlerine tam hidroliz ve sınırlı hidroliz olmak üzere iki amaçla uygulanmaktadır. Tam hidrolizde proteinler küçük peptitler, peptonlar veya amino asitler haline gelirken; sınırlı hidrolizde ise proteinlerden farklı fonksiyonel özelliklere sahip polipeptitler oluşmaktadır. Uygun koşulların (substrat, enzim, hidroliz ortamı, zaman ve konsantrasyonların) dikkatle seçilmesiyle, hidrolizatlar farklı polipeptitlerden veya küçük peptitlerle büyük polipeptitlerin karışımından oluşabilmektedir (Adler-Nissen, 1986).

Enzimler, çeşitli biyokimyasal reaksiyonları katalize ederek geniş bir fonksiyon yelpazesi sunmaktadır. Bu fonksiyonlar arasında proteinleri peptitlere parçalayan proteolitik enzimler (proteazlar), karbonhidratları şekerlere dönüştüren karbonhidrazlar, yağları yağ asitlerine parçalayan lipazlar, nükleik asitleri parçalayan nükleazlar, su kullanarak bağları kıran hidrolazlar, oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarını katalize eden oksidazlar ve redüktazlar, moleküller arasında grup transferi yapan transferazlar, kimyasal bağları hidroliz kullanmadan kıran liyazlar ve moleküller içinde atomların veya grupların yeniden düzenlenmesini sağlayarak izomer oluşumunu katalize eden izomerazlar yer almaktadır (Nelson vd., 2008). Bu tez kapsamında karbonhidraz ve proteazlar enzimatik hidroliz için kullanılmıştır.

Karbonhidrazlar, karbonhidratları parçalayan enzimlerdir. Bu enzimler, polisakkaritlerin (uzun şeker zincirlerinin) daha küçük şeker birimlerine dönüştürülmesine yardımcı olmaktadır. Örneğin, selüloz gibi karbonhidrazlar, polisakkarit matris içindeki bağların etkin bir şekilde parçalanmasında belirgin bir rol oynayabilirler. Bu durum, protein gibi önemli hücre arası bileşenlerin serbest bırakılmasına olanak tanıyabilmektedirler (Wang vd., 1999).

Piyasada bulunan endüstriyel enzimlerin %60'ını temsil eden proteazlar ise, polipeptitlerin ve proteinlerin içerdiği peptit bağlarının hidrolizini katalize etmektedirler (Singh vd., 2016). Proteazlar, kaynaklarına, katalitik etkilerine ve katalitik etki bölgelerine göre sınıflandırılabilir. Laboratuvar koşullarında, kaynaklarına göre çeşitli ticari proteolitik enzimler kullanılarak enzimatik hidroliz gerçekleştirilmiştir. Bu enzimler arasında mikroorganizma kökenli enzimler olan Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, Protamex, Pronase ve Kojizyme; bitki kökenli enzimler olan papain ve bromelain; ayrıca hayvan kökenli enzimler olan pepsin, tripsin, kimotripsin ve pankreatin yer almaktadır (Etemadian vd., 2021). Katalitik etki

bölgelerine göre ise endopeptidazlar ve ekzopeptidazlar olarak iki gruba ayrılabilir (Rao vd., 1998). Şekil 2.5'te ekzopeptidaz ve endopeptidazların etki mekanizması gösterilmiştir. Endopeptidazlar polipeptit zincirlerinin iç kısımlarına rastgele etki gösterirken ekzopeptidazlar ise polipeptit zincirlerinin uç kısımlarına etki göstermektedirler (Li vd., 2013).

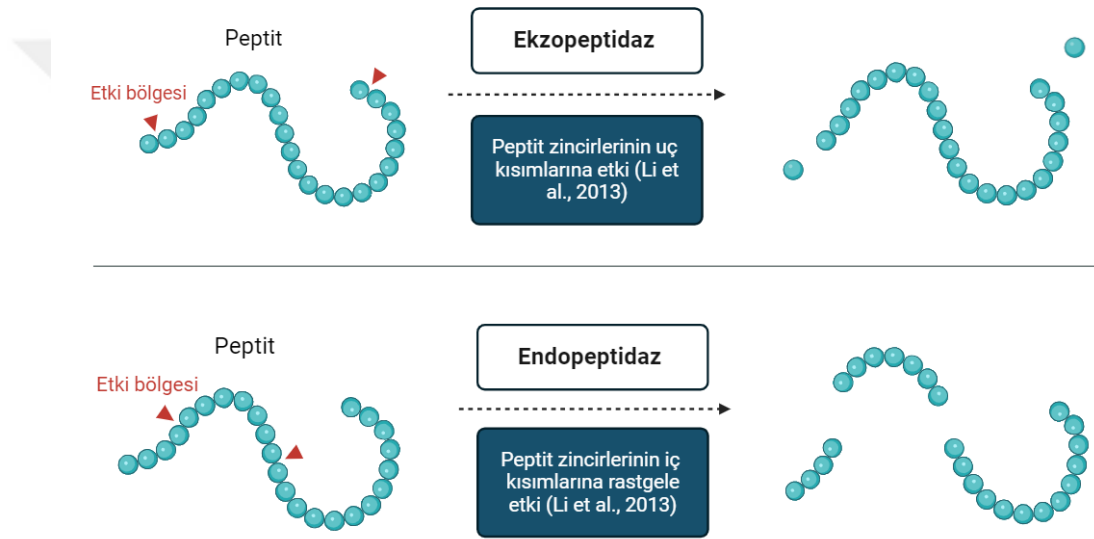
Alcalase enzimi, günümüzde *Bacillus licheniformis* kullanılarak daldırma tipi beslemeli fermentasyon yöntemiyle üretilmektedir (Tacias-Pascacio vd., 2020). Alcalase enzimi, amino asit zincirinin ortasında bulunan proteinleri hedef alarak peptit bağlarını parçalayan bir serin endopeptidaz olup, yüksek substrat esnekliği ile dikkat çekmektedir (Rawlings vd., 2014). Bu enzim, C-terminal amino asitlerinden peptit bağlarını parçalamaktadır (Vioque vd., 1999). Geniş bir yelpazede amino asitleri tanıma yeteneğine sahiptir, böylece peptit bağlarının hidrolizini etkin bir şekilde katalize etmektedir. Sonuç olarak, Alcalase proteinleri küçük parçalara ayırarak, birçok kısa peptitten oluşan bir protein hidrolizati üretmektedir. Bu protein hidrolizatları, gıda endüstrisinde fonksiyonel bileşenler olarak kullanılabilen biyolojik olarak aktif peptitler içermektedir (Tacias-Pascacio vd., 2020).

Flavourzyme ise *Aspergillus oryzae* adlı bir mantardan üretilmektedir. Farklı bir etki mekanizmasına sahip olup ve hem aminopeptidazlar hem de dipeptidil peptidazlar (DPP) gibi ekzopeptidazlar ile endopeptidazların bir kombinasyonundan oluşmaktadır (Shen vd., 2011). Flavourzyme, peptit zincirlerinin N-terminalindeki peptit bağlarını parçalayarak etki gösterirken, aynı zamanda endopeptidaz aktivitesi sayesinde protein zincirinin iç kısımlarındaki peptit bağlarını da kırabilir. Bu çift fonksiyonlu yapı, Flavourzyme enzimlerinin hem peptit zincirlerinin uçlarından hem de iç kısımlarından proteinleri parçalayabilmesini sağlamaktadır. Bu özellik, proteinlerin daha homojen bir şekilde hidrolize edilmesine olanak tanır ve spesifik peptitlerin elde edilmesini kolaylaştırmaktadır. Flavourzyme, gıda endüstrisinde protein hidrolizatlarının tat ve besin değerini iyileştirmek için yaygın olarak kullanılır ve biyoteknoloji ile ilaç sektörlerinde de fonksiyonel peptitlerin üretimi açısından önemlidir.

Nitekim, yapılan bir çalışmada, pirinç kepeği proteininin hidrolizinde Alcalase ve Flavourzyme bir arada kullanılmış ve bu kombinasyonun etkili olduğu gösterilmiştir. Optimum karışım oranlarında, daha küçük peptitlerin ve yüksek antioksidan aktiviteye sahip protein hidrolizatlarının elde edilmesi mümkün olmuştur (Hunsakul vd., 2022).

Bu çalışma, her iki enzimin sinerjik etkisinin protein hidrolizatlarının fonksiyonel ve biyolojik özelliklerini artırmada önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır.

Başka bir çalışmada ise, hurma tohumu unundan protein hidrolizatları üretmek için Alcalase, Flavourzyme ve Termolizin enzimleri kullanılmıştır. Enzimler, tek başına veya kombinasyon halinde uygulanmıştır. Alcalase ve Flavourzyme kombinasyonu ABTS, DPPH, hidroksil radikalleri ve ACE inhibitör aktivitesi açısından en yüksek inhibisyon kapasitesi ve süpürme performansı sergilemiştir. Bu sonuçlar, Alcalase ve Flavourzyme kombinasyonunun protein hidrolizatlarının fonksiyonel özelliklerini artırma potansiyelini desteklemektedir (Ambigaipalan vd., 2015)



Şekil 2.5: Ekzopeptidaz ve endopeptidazların etki mekanizması gösterimi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

2.10. Protein Hidrolizatı Elde Etmek için Kullanılan Fiziksel Ön İşlemler

Protein hidrolizatı üretim sürecinde, proteinlerin enzimatik veya kimyasal yöntemlerle hidrolize edilmeden önce gerçekleştirilen ön işlemler, nihai ürünün kalitesini ve verimliliğini önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Bu ön işlemler, proteinlerin hidroliz sürecine uygunluğunu artırmak ve verimliliği desteklemek amacıyla çeşitli teknolojiler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bunlar arasında ultrason, mikrodalga işlemi, yüksek basınç uygulaması gibi fiziksel yöntemler öne çıkmaktadır. Bu ön işlemler, proteinlerin yapısını değiştirebilir ve hidroliz sırasında enzimlerin etkisini artırarak, hidrolizatın kalitesini ve verimliliğini iyileştirebilmektedir.

2.10.1. Ultrason İşleminin Temel Özellikleri

Ultrason, insan işitme eşiğinin üzerinde olan frekansta yayılan ses dalgaları ve mekanik titreşimleri ifade etmektedir. Bu frekanslar, 20 kHz'in üzerindedir ve insan kulağının duyma kapasitesinin ötesindedir. Ses frekansları Hertz (Hz) cinsinden ölçülür ve ultrasonik frekanslar, saniyede 20,000 veya daha fazla titreşim üretmektedir. Ultrason, sıvılar, katılar veya gazlar içinde yayılarak mekanik enerji dalgaları şeklinde hareket etmektedir. Ses dalgaları, bu ortamlarda sıkışma ve genleşme hareketleri yaparak ilerlemektedir (Povey vd., 1998; Pico, 2012).

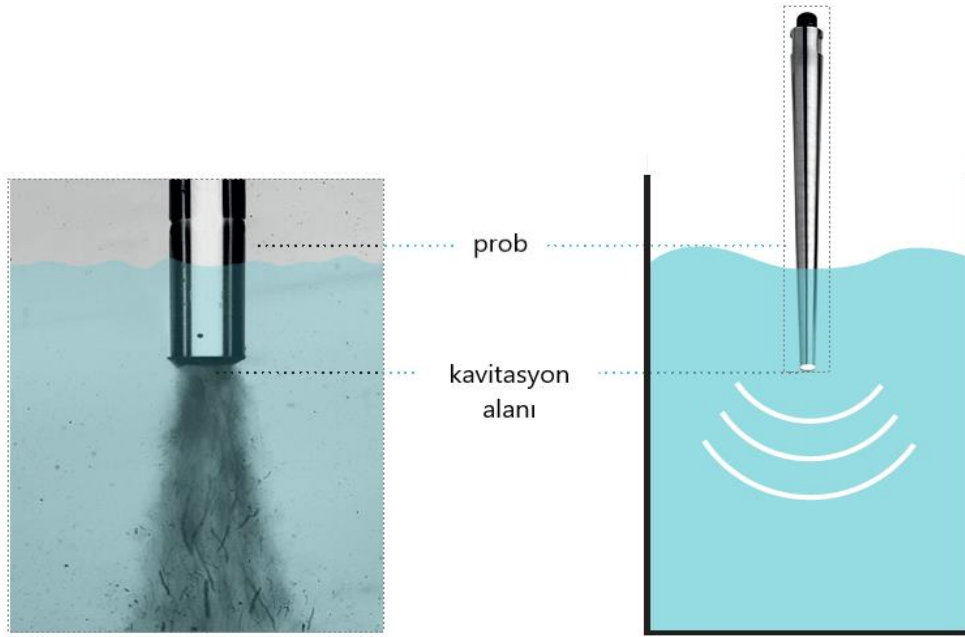
2.10.1.1. Ultrasonik Cihazlarda Dalgaların Üretilmesi

Ultrasonik cihazlarda, genellikle piezoelektrik ve magnetostriktif elemanlar kullanılarak ultrasonik dalgalar üretilmektedir. Piezoelektrik elemanlar, elektriksel enerjiyi mekanik titreşimlere dönüştürerek ses dalgalarını üretirken, magnetostriktif elemanlar ise manyetik alan etkisi altında mekanik gerilme oluşturarak ses dalgalarını üretilmektedir. Bu sensörler, ultrasonik cihazlarda ses dalgalarının genliğini artırmak ve belirli frekansta yüksek enerjili ses dalgaları oluşturmak için kullanılmaktadır. Dönüştürücüler, elektriksel veya mekanik enerjiyi etkili bir şekilde ses dalgalarına dönüştürerek, ultrasonik sistemlerin performansını ve verimliliğini arttırmaktadır (Pilli vd., 2011).

2.10.1.2. Ultrasonun Etki Mekanizması

Ultrason uygulamaları, termal, mekanik ve kavitasyon etkileri aracılığıyla sonokimyasal reaksiyonlara, suyun sonolizine, kavitasyonel kabarcık oluşumuna ve proteinler ile peptitlerde fizikokimyasal değişikliklere neden olabilmektedir (Gülseren vd., 2007; Kadam vd., 2013, Vardanega vd., 2014; Wali vd., 2017). Ultrasonun temel mekanizması, Şekil 2.6'da gösterilen sıvı içindeki kavitasyon (baloncuk oluşumu) olayına dayanmaktadır. Ultrasonik ses dalgaları sıvı içinde negatif basınç bölgeleri oluşturmaktadır. Bu negatif basınç bölgeleri, sıvı içerisindeki gaz ve buharların mikroskobik baloncuklar şeklinde birikmesine neden olmaktadır. Bu baloncuklar, sıvı

içindeki gaz ve buharın hızla sıvıya dönüşmesiyle büyümekte ve patlamaktadır (Suslick, 1990).

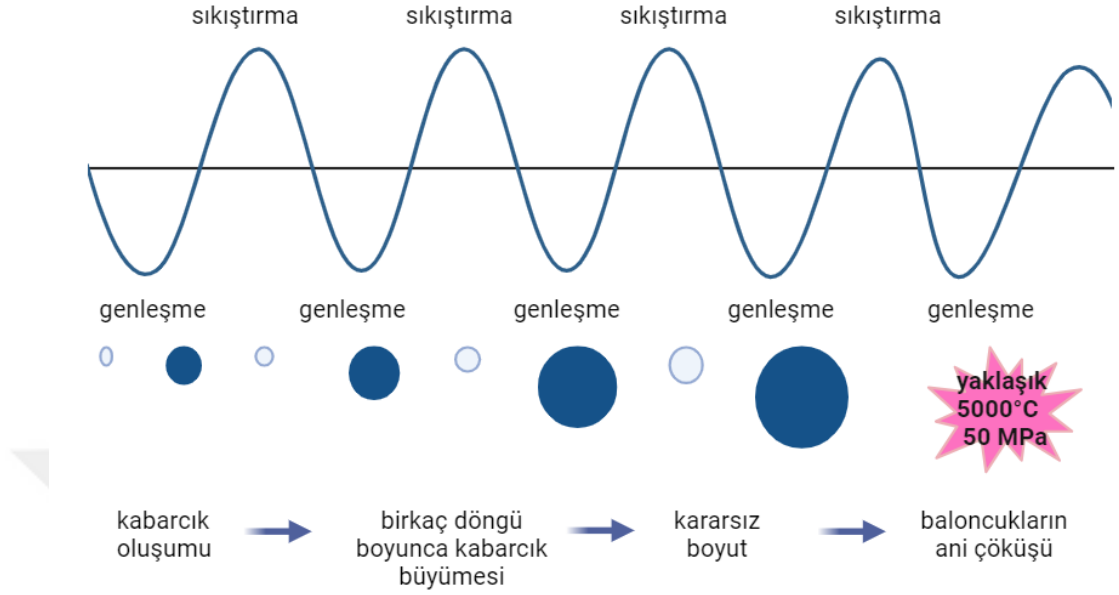


Şekil 2.6: Ultrasonik probun bir sıvı içine daldırılmasıyla meydana gelen kavite olayının gösterimi

Kaynak: BANDELIN electronic GmbH & Co. KG. (n.d.). *Sonopuls 2020* ultrasonic homogenisers: Instructions for the use and applications.

Baloncukların ani çöküşü, sıvıda yüksek sıcaklık (yaklaşık 5000°C) ve yüksek basınç (yaklaşık 50 MPa) oluşturarak şiddetli mekanik kuvvetler ve mikro jetler üretmektedir. Bu durumun gelişim süreci, Şekil 2.7'deki şematik gösterimle açıklanmaktadır. Bu kuvvetler, sıvı içindeki proteinler ve diğer moleküllerin fiziksel olarak parçalanmasına ve yüzeylerin tahribine yol açmaktadır. Sonuç olarak, protein moleküllerinin daha küçük parçalara ayrılması ve hidroliz sürecinin hızlanması sağlanmaktadır (Suslick, 1990; Flint vd., 1991) Ayrıca, kavite sırasında oluşan yüksek sıcaklıklar kimyasal reaksiyonları hızlandırarak, özellikle biyokimyasal süreçlerde önemli bir etki sağlamaktadır. Bu mekanizmalar sayesinde, ultrason çeşitli endüstriyel ve araştırma uygulamalarında verimliliği artırmak ve ürün kalitesini iyileştirmek için etkili bir araç olarak kullanılmaktadır.

ULTRASONİK KAVİTASYON



Şekil 2.7: Ultrasonik kaviteasyon olayının şematik gösterimi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

2.10.1.3. Ultrasonun Gıda Endüstrisindeki Uygulamaları

Ultrasonik enerjinin en yüksek verimi sağlaması için optimize edilmiş koşullarda çalışması esastır. Bu optimizasyon, ultrasonik teknolojinin gıda endüstrisindeki etkinliğini artırarak çeşitli işlemlerde kullanılmasını sağlamaktadır. Ultrason ön işleme, gıda bileşenlerinin ısıl olmayan bir şekilde modifiye edilmesine olanak tanımaktadır. Bu bağlamda, sonikasyon uygulamaları homojenizasyon, emülsifikasyon, parçacık küçültme, temizleme, kristalizasyon, pastörizasyon, viskozite değişikliği, mikroorganizmaların inaktivasyonu ve enzim aktivasyonu gibi işlemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, dondurma, sıvı berraklaştırma, kurutma ve filtrasyon gibi süreçlerde de etkili bir şekilde uygulanarak gıda ürünlerinin kalite, güvenlik ve fiziksel özelliklerini artırmaya yardımcı olmaktadır (Feng vd., 2011; Chandrapala vd., 2012; Ashokkumar, 2015; Bot vd., 2017).

2.10.1.4. Ultrason Ön İşleminin Protein Hidrolizatları İçin Önemi

Ultrason ön işlemi, proteinlerin yapısal konformasyonunu değiştirerek enzimlerin peptit bağlarına erişilebilirliğini sağlayan etkili bir yöntemdir (Kadam vd., 2015). Bu işlem, proteinlerin parçalanma hızını artırmakla birlikte, yeni biyoaktif peptitlerin salınımını teşvik etmektedir (Uluko vd., 2013). Ultrason sırasında oluşan akustik kaviteasyon, proteinlerin hidrofobik bölgelerini açığa çıkararak enzimlerin daha verimli çalışmasını sağlamakta ve bu da hidroliz sürecini hızlandırmaktadır (Qingli vd., 2012). Ek olarak, ultrasonik işlem, proteinlerin α -heliks ve β -tabaka yapılarında değişikliklere yol açarak proteinlerin biyoaktivitesini artırmaktadır (Xue vd., 2017). Bu nedenle, ultrason ön işlemi, protein hidrolizatlarının fonksiyonel özelliklerini iyileştirmek için önemli bir araç olarak kabul edilmektedir.

Ayrıca akustik kaviteasyon, ultrason işleminde verimi etkileyen en kritik faktörlerden biridir (Leighton, 1995) ve ultrason frekansı bu sürecin verimini doğrudan etkilemektedir (Liu vd., 2009). Farklı frekanslar, ultrasonik dalgaların şiddetini ve etki alanını değiştirerek kaviteasyonun etkinliğini artırmaktadır. Düşük frekanslar daha güçlü kaviteasyon etkileri yaratırken, yüksek frekanslar daha hassas bir etki sunmakta, bu da proteinlerin yapısının açılmasını ve enzimlerin protein bağlarına erişimini kolaylaştırmaktadır (Chemat ve Khan, 2011; Yang vd., 2017). Bu nedenle, çoklu frekans kullanımı, protein hidrolizini optimize etmek için önemli bir stratejidir (Dabbour vd., 2021).

Acı bakla proteini üzerine yapılan bir çalışmada, yüksek güçlü (400 W) ve düşük frekanslı (20 kHz) ultrason ön işleminin, proteazlar (Alcalase ve Flavourzyme) kullanılarak elde edilen hidrolizatların fizikokimyasal ve antioksidan özellikleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Sonuçlar, ultrason ön işleminin protein yapısında önemli değişiklikler meydana getirdiğini göstermiştir. FTIR analizinde absorpsiyon piklerinin daha yüksek dalga boyuna kaydığı belirlenmiş, CD analizlerinde ise α -heliks yapısında azalma ve β -tabaka yapısında artış kaydedilmiştir. Ayrıca, hidrolizatların fizikokimyasal özellikleri, ultrasonik işlem süresi ve kullanılan enzim tipine bağlı olarak değişmiş; partikül boyutu, zeta potansiyeli ve kristal içeriği üzerinde önemli etkiler gözlemlenmiştir. Antioksidan aktivite açısından ise, 10 dakikalık ultrason uygulamasından sonra hidrolizatlarda maksimum DPPH inhibisyonu (%50-70) ve ABTS aktivitesi tespit edilmiştir. Ultrasonik ön işlemin hidrolizat verimini

önemli ölçüde artırdığı ($p < 0.05$) ve hidrolizatların antioksidan potansiyelini güçlendirdiği saptanmıştır (Fadimu vd., 2021).

Ultrasonun, zayıf çözünür proteinlerin çözünürlüğünü artırma yeteneği de literatürde geniş bir şekilde belgelenmiştir. Örneğin, O'Sullivan vd. (2016), ultrason işleminin soya proteinlerinin suda çözünürlüğünü önemli ölçüde artırdığını göstermiştir. Bu etki, sonikasyon işlemi sırasında meydana gelen kabarcık kavitasyonuna atfedilmektedir (Jambrak vd., 2009). Kavitasyon, ultrason dalgalarının biyolojik ortamda kabarcıklar oluşturmasıyla meydana gelir ve bu kabarcıkların çökmesi sonucunda protein yapıları daha çözünebilir hale gelmektedir. Ayrıca, ultrasonik muamelenin protein yapısındaki çapraz bağların kırılmasına neden olduğu ve bunun da substrat ile enzim arasındaki etkileşimi artırabileceği belirtilmiştir (Li vd., 2016). Bu etkileşim artışı, protein hidrolizatlarının daha verimli bir şekilde üretilmesine olanak tanımaktadır. Yapılan bir çalışmada ultrasonik ön muamelenin süt proteini konsantrisi hidrolizatlarının hidroliz derecesi üzerine etkisi incelenmiştir. Ultrason ile ön işleme tabi tutulan numunelerdeki hidroliz derecesi kontrol numunelerinden anlamlı derecede ($p < 0.05$) yüksek olduğu raporlanmıştır (Uluko vd., 2014). Bu bulgular, literatürde benzer sonuçları ortaya koyan birçok çalışma ile de desteklenmektedir (Chen vd., 2011; Uluko vd., 2013). Bu yüzden istenilen etkilerin elde edilmesi için, çeşitli yöntemlerin bir araya getirilerek kombine bir yaklaşım benimsenmesi gerçekçi bir senaryo haline gelebilir.

2.10.2. Mikrodalga İşleminin Temel Özellikleri

Mikrodalga (MW) ısıtma, protein hidrolizatı hazırlama süreçlerinde alternatif bir yöntem olarak dikkat çekmektedir. MW ısıtma, hızlı ısıtma sistemleri arasında yer almakta ve birçok işlemde, özellikle protein hidrolizatı üretiminde kullanılmak üzere artan bir ilgi görmektedir. MW reaktörleri genellikle kimyasal bileşim reaksiyonları için kullanılmaktadır (Kostas vd., 2017). Mikrodalga ısıtmanın ön işlem olarak kullanımı, peptit bağlarının erişilebilirliğini artırabilir ve proteinlerin kısmi denatürasyonunu sağlayarak biyolojik aktiviteler ortaya çıkarabilmektedir (Ketnawa ve Liceaga, 2017). Modern mikrodalga sistemleri, hassas sıcaklık kontrolü, örneklerin homojen ısıtılması ve istenmeyen yan reaksiyonların azaltılmasını sağlamaktadır. Bu sistemlerde, kapalı kaplar altında su bazlı çözeltileri 200°C'den yüksek sıcaklıklara ısıtmak mümkündür (Gissibl vd., 2018). Yapılan bir çalışmada mikrodalga enerjisinin

peynir altı suyu protein hidrolizatlarının hidroliz derecesini (DH) ve stabilitesini artırdığı raporlanmıştır (Uluko vd., 2015).

2.10.3. Yüksek Basıncılı Yöntemlerin Temel Özellikleri

Yüksek hidrostatik basınç (high hydrostatic pressure, HHP), "soğuk işlem" olarak da bilinen ve gıda işleme alanında gelişmekte olan bir teknoloji olarak, protein hidrolizatlarının üretiminde önemli bir ön işlem olarak öne çıkmaktadır. Bu teknoloji, yapısal değişiklikler meydana getirerek, proteinlerin denatürasyonunu ve agregat oluşumunu teşvik etmektedir (Iametti vd., 1996). HHP, proteinlerin yapısına, uygulanan basınç aralığına, sıcaklığa, pH değerine ve çözücü bileşimine bağlı olarak karmaşık bir denatürasyon süreci gerçekleştirir; bu süreçte, protein moleküllerindeki elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler değiştirilebilmektedir (Palou vd., 1999). Yüksek basınç, yüklü grupların deprotonasyonuna ve tuz köprülerinin ile hidrofobik etkileşimlerin bozulmasına neden olarak, proteinlerin konformasyonel ve yapısal değişiklikler yaşamasına yol açmaktadır (Martin vd., 2002). Bu değişiklikler, proteinlerin agregasyonunu ve jelasyonunu artırarak, daha kısa sürelerde yüksek kaliteli protein hidrolizatları elde edilmesine olanak tanımaktadır. Sonuç olarak, HHP, protein hidrolizini optimize eden ve sürdürülebilir bir yaklaşım sunan modern bir tekniktir.

2.11. Protein Hidrolizatı Konsantre Etme Yöntemleri

Konsantrasyon, protein hidrolizatlarının hacmini azaltarak hedef bileşenlerin yoğunluğunu artırmayı amaçlayan önemli bir işlemdir. Bu işlem, ürünün taşınabilirliğini ve depolama stabilitesini iyileştirirken, aynı zamanda fonksiyonel özelliklerini koruma veya artırma potansiyeline sahiptir. Protein hidrolizatlarının konsantre edilmesinde kullanılan yöntemler, uygulanan teknolojilere, proses koşullarına ve hedef bileşenlerin özelliklerine bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir.

2.11.1. Protein Hidrolizatlarının Ultrafiltrasyon Kullanılarak Konsantre Edilmesi

Membranlar, iki fazı seçici bir şekilde ayırarak farklı bileşenlerin taşınımını kısıtlayan ve konsantre fazlar elde etmek için kullanılan yarı geçirgen bariyerlerdir (Aslan, 2016). Membran teknolojileri, yüksek verimlilik, basit ekipman gereksinimi, kolay kullanım ve düşük enerji tüketimi gibi birçok avantaj sunarak, en önemli endüstriyel ayırma tekniklerinden biri haline gelmiştir. Bu teknolojiler, tarımsal gıda ürünleri ve yan ürünlerinden değerli bileşenlerin geri kazanılması da dahil olmak üzere birçok alanda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Li ve Chase, 2010).

Membran teknolojisi, kullanım amacına göre ters osmoz (“reverse osmosis”, RO), ultrafiltrasyon (“ultrafiltration”, UF), mikrofiltrasyon (“microfiltration”, MF) ve elektrodializ (“electrodialysis”, ED) olmak üzere dört ana grupta incelenmektedir. Bu yöntemler arasındaki fark, membran gözeneklerinin çaplarından kaynaklanmaktadır. Gözenek çaplarının çeşitliliği, membranın geçirgen olduğu maddelerin türünü ve boyutunu etkilemektedir (Metin, 2013). Ultrafiltrasyon (UF) membranlarında, “gözenek çapı” teriminden ziyade daha kapsamlı olduğu için genellikle “moleküler ağırlık engelleme sınırı” (“Molecular Weight Cut Off”, MWCO) terimi kullanılmaktadır (Koyuncu, 2018). MWCO, membranın belirli moleküler ağırlık aralığında hangi maddeleri geçirebileceğini daha net bir şekilde tanımlar ve membranın ayırım yeteneğini daha kapsamlı bir şekilde ifade etmektedir.

UF membranları, moleküler ağırlık engelleme sınırı (MWCO) 1.000 ile 1.000.000 Dalton (Da) arasında değişen makromolekülleri, çözünmüş maddeleri ve kolloidleri 1-10 bar hidrostatik basınç farkı ile tutan bir bariyer olarak işlev görmektedir. Bu ayırma sürecinin seçiciliği, ayrılacak bileşenlerin boyutları, yüzey yükleri, membranın özellikleri ve hidrodinamik koşullarla doğrudan ilişkilidir (Marth vd., 2001; Wang vd., 2011).

Ultrafiltrasyon, protein hidrolizatlarının konsantrasyonunu artırmak ve biyolojik özelliklerini iyileştirmek amacıyla yaygın olarak kullanılan etkili bir teknolojidir (Roslan vd., 2017; Ecker vd., 2019). Bu süreç, protein moleküllerinin belirli fraksiyonlarının seçici olarak ayrılmasına olanak tanıyarak, safsızlıkların giderilmesini ve biyolojik aktivitenin artırılmasını sağlamaktadır (Baldasso vd., 2011). Ultrafiltrasyon, özellikle düşük moleküler ağırlıklı peptitlerin ve istenmeyen

bileşenlerin uzaklaştırılmasıyla protein hidrolizatlarının fonksiyonel özelliklerini optimize ederken, daha saf ve konsantre ürünlerin elde edilmesine imkân tanımaktadır. Bu özellik, protein hidrolizatlarının biyolojik aktivitesinin artmasını ve özellikle antioksidan özelliklerinin güçlenmesini sağlamaktadır (He vd., 2013). Ayrıca, ultrafiltrasyon, esansiyel amino asitler ve BCAA'lar (dallı zincirli amino asitler) gibi biyolojik açıdan önemli bileşenlerin daha yüksek konsantrasyonlarda elde edilmesine olanak tanımaktadır. Bu amino asitler, kas kütlesinin korunması ve iyileştirilmesi gibi önemli işlemlere sahip olup, sporcu beslenmesi ve medikal beslenme alanlarında büyük öneme sahiptir. Küçük peptitler ve amino asitler, biyolojik olarak daha aktif olduğu için, ultrafiltrasyon sayesinde protein hidrolizatlarının biyolojik etkinliği artırılabilir. Bu çok yönlü kullanım alanları, ultrafiltrasyonu sadece bir ayırma teknolojisi değil, aynı zamanda protein hidrolizatlarının değerini artıran stratejik bir yöntem haline getirmektedir. Böylece, biyoteknoloji, gıda, ilaç ve sporcu beslenmesi gibi çeşitli alanlarda protein hidrolizatlarının etkin bir şekilde kullanılmasına olanak sağlamaktadır.

2.11.2. Protein Hidrolizatlarının Buharlaştırma ile Konsantre Edilmesi

Buharlaştırarak konsantre etme işlemi, çözeltilerin hacmini azaltarak hedef bileşenlerin konsantrasyonunu artırmak amacıyla yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, özellikle su içeriği yüksek çözeltilerin yoğunlaştırılmasında etkili bir rol oynamaktadır. Ancak, buharlaştırma işlemi sırasında bazı bileşenlerin kaybı veya yapısal değişimi de söz konusu olabilmektedir. Örneğin, ısıya duyarlı vitaminler veya bazı uçucu bileşenler, buharlaştırma sürecinde kısmen kaybolabilir. Bu nedenle, optimum buharlaştırma koşullarının belirlenmesi hem ürün verimliliğini artırmak hem de bileşenlerin bütünlüğünü korumak açısından kritik öneme sahiptir.

Evaporatörlerin buharlaştırma yoluyla konsantre etme işlemini gerçekleştirebilmesi için üç temel gereksinimin karşılanması gerekmektedir. Birincisi, çözücünün buharlaştırılabilmesi için gereken yüksek miktardaki ısının sıvıya etkin ve hızlı bir şekilde aktarılmasıdır. İkinci olarak, bu işlem sırasında oluşan buharın, artık sıvıdan etkili bir şekilde ayrılması sağlanmalıdır. Üçüncü ve en kritik gereksinim ise, tüm bu süreçlerin sermaye maliyetleri dikkate alınarak, mümkün olan en düşük enerji tüketimiyle gerçekleştirilmesidir. Bu gereksinimlerin doğru şekilde karşılanması,

buharlaştırma sürecinin hem verimliliğini hem de maliyet etkinliğini önemli ölçüde artırmaktadır (Standiford, 2000).

2.11.3. Protein Hidrolizatlarının Liyofilizatör ile Konsantre Edilmesi

Liyofilizasyon, genellikle ısıya duyarlı biyolojik materyallerin veya çözeltilerin su içeriğini uzaklaştırmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu süreç, ürünün stabilitesini koruyarak, uzun süreli saklama ve nakliye için uygun hale getirilmesini sağlamaktadır. Liyofilizasyon veya dondurarak kurutma, suyun dondurulup ardından örnekten uzaklaştırıldığı bir süreçtir; bu süreç öncelikle süblimasyon (birincil kurutma) ve ardından desorpsiyon (ikincil kurutma) yoluyla gerçekleştirilmektedir. Dondurarak kurutma, suyun ürünün içinden doğrudan buhar fazına geçmesi yoluyla uzaklaştırıldığı bir kurutma yöntemidir (Akers vd., 1987).

Dondurarak kurutma veya liyofilizasyon, malzemeleri zarar vermeden kurutmanın etkili bir yoludur. Bu yöntem, doğrudan katı durumdan gaz fazına geçişi içeren süblimasyon olgusundan yararlanmakta ve ürün dondurulduktan sonra vakum altında kurutulmakta veya bazen çözülmesine izin verilmemektedir. Liyofilizasyon, rekombinant DNA teknolojisinin ortaya çıkmasıyla birlikte parenteral ürünler (bir maddenin vücuda sindirim yolu dışında damar içi, kas içi veya deri altı yolla verilmesi) endüstrisinde daha da önem kazanmıştır. Proteinler ve peptitlerin, klinik ve ticari kullanım için de dondurarak kurutma işlemi uygulanabilir (Nail vd., 2002).

2.12. Protein Hidrolizatlarının Kullanım Alanları

Protein hidrolizatları, biyolojik ve fonksiyonel özellikleri nedeniyle gıda endüstrisi, tarımsal ve bitkisel uygulamalar, hayvan besleme, farmasötik ve kozmetik endüstrisi, biyoteknoloji ve endüstriyel uygulamalar, tıbbi beslenme ve diyetetik alanları gibi çok çeşitli alanlarda geniş bir kullanım yelpazesine sahiptir. Son yıllarda yapılan çeşitli araştırmalar, farklı kaynaklardan elde edilen protein hidrolizatlarının hem besleyici özelliklere sahip olduğunu hem de içeriklerindeki biyoaktif peptitlerin etkisiyle belirgin biyolojik işlevler sergilediğini ortaya koymaktadır. Bu biyoaktif peptitlerin antimikrobiyal (Salampessy et al., 2010), antioksidan (Udenigwe & Aluko, 2012), kolesterol düşürücü (Udenigwe & Rouvinen-Watt, 2015), hipoglisemik (Nasri et al., 2015) ve antikanser (Chalamaiah et al., 2018) gibi çeşitli biyolojik aktiviteler

gösterdiği bildirilmiştir. Tüm bu özellikler, protein hidrolizatlarının farklı sektörler açısından oldukça değerli bir bileşen haline getirmiştir.

2.12.1. Gıda endüstrisinde kullanımı

Protein hidrolizatları, gıda endüstrisinde fonksiyonel ve biyoaktif özellikleri nedeniyle geniş bir kullanım alanına sahiptir. Çeşitli protein kaynaklarından elde edilen bu hidrolizatlar, gıda ürünlerinin besin değerini artırırken, işlevselliğini de geliştirmektedir. Gıda ürünlerinin dokusunu değiştirmek, köpürme, emülsifiye etme, jelleşme ve su tutma kapasitesini artırmak gibi özellikler kazandırmak için kullanılmaktadırlar (Asaithambi, Singha ve Singh, 2023; Tang vd., 2023). Ayrıca, protein hidrolizatları emülgatör olarak, yağ ve su gibi bileşenlerin homojen bir şekilde karışmasını sağlamakta ve emülgatör özelliği sayesinde mayonez, soslar, kremalar ve içecekler gibi ürünlerde önemli bir rol oynamaktadır (Gao vd., 2021; Tang vd., 2023). Ayrıca protein hidrolizatları sahip oldukları biyoaktif peptitlerin antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerinden dolayı doğal gıda koruyucu olarak kullanılmakta, gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatmakta ve gıda güvenliğini arttırmaktadır (Tkaczewska, 2020).

2.12.2. Tarımsal ve bitkisel uygulamalarda kullanımı

Artan gıda, yem, yakıt, lif ve hammadde talepleri, doğal kaynakların hızla tükenmesine ve ekosistemlerin bozulmasına neden olmakta, bu durum tarımsal üretimde sürdürülebilir yöntemlerin benimsenmesini zorunlu hale getirmektedir. Bu kapsamda, protein hidrolizatları, sürdürülebilir tarımda önemli bir çözüm olarak öne çıkmaktadır (Colla vd., 2014). Çeşitli uygulama yöntemleri ve formlarıyla sunulan protein hidrolizatları, bitki büyümesini teşvik etmekte, abiyotik stres faktörlerine (tuzluluk, su stresi, ağır metal, sıcaklık ve besin yetersizliği) karşı direnci artırmakta ve genel bitki sağlığını iyileştirmektedir (Colla ve Roupael, 2015).

Protein hidrolizatları, bitkilerin besin alım kapasitesini yükseltmekte, su tutma yeteneklerini geliştirmekte ve fotosentetik aktivite, besin asimilasyonu ve kalite parametreleri üzerinde olumlu etkiler sağlamaktadır (Kauffman vd., 2007; Malécange vd., 2023). Keçiboynuzu tohumlarından elde edilen protein hidrolizatlarıyla yapılan bir çalışmada, kontrol grubuna kıyasla bitki boyunda, çiçek sayısında ve meyve

verimliliğinde önemli artışlar gözlemlenmiştir (Parrado vd., 2008). Bu bulgular, biyostimülantların sürdürülebilir tarım uygulamalarında kimyasal gübre kullanımını azaltma potansiyeline işaret etmektedir.

Genel olarak amino asitler ve peptitlerden oluşan protein hidrolizatları, yaprak püskürtme ve toprak sulama gibi yöntemlerle uygulanabilmektedir. Yaprak püskürtme yoluyla fotosentetik yüzeye doğrudan amino asit ve peptit sağlanarak hızlı emilim sağlanırken, toprak sulama kök gelişimini desteklemekte ve besin alımını artırmaktadır (Colla vd., 2015). Serbest amino asitler ise çimlenme, fotosentez, besin alımı, hormon üretimi ve büyüme süreçlerinde kritik bir rol oynar (Shahrajabian vd., 2022). Protein hidrolizatları, aynı zamanda fenoller, karbonhidratlar, fitohormonlar ve mineral elementler gibi diğer faydalı bileşikleri de içererek bitki büyümesi ve verimliliğine katkıda bulunmaktadır (Malécange vd., 2023).

Sonuç olarak, protein hidrolizatları, karbon ve nitrojen metabolizmasının uyarılmasını ve nitrojen asimilasyonunu optimize ederek bitki büyümesini desteklemekte, sürdürülebilir tarımın önemli bir aracı olarak öne çıkmaktadır

2.12.3. Hayvan beslenmesinde kullanımı

Son yıllarda, protein hidrolizatlarının hayvan beslenmesindeki önemi artmaktadır. Hayvansal yan ürünlerin veya bitkisel proteinlerin kimyasal, enzimatik ya da mikrobiyal hidroliziyle elde edilen peptitler, hayvanlarda besleyici ve düzenleyici işlevler sunmaktadır. Bu hidrolizatlar, büyüme performansı ve yem verimliliğini artırırken bağırsak sağlığı gibi hayvan refahını destekleyici etkiler gösterebilmektedir. Özellikle biyoaktif peptitler antimikrobiyal, antioksidan ve immünomodülatör aktiviteler sağlayarak sağlık ve verimliliği optimize etmektedir (Hou vd., 2022). Protein hidrolizatları, hayvan beslenmesinde önemli faydalar sağlamaktadır. Kısa peptitler, bağırsaktaki amino asitlere kıyasla enterositlerde daha hızlı emilmekte ve kan dolaşımında daha dengeli bir amino asit karışımı oluşturmaktadır (Wu, 2021). Hayvan beslemede %2-8 oranında kullanılan hayvansal protein hidrolizatları (örneğin, domuz bağırsağı, domuz mukozası, somon iç organları veya kümes hayvanı dokusu hidrolizatları) ya da soya fasulyesi protein hidrolizatlarının eklenmesi, süttten kesilen domuzlar, genç buzağular, kuluçka sonrası kümes hayvanları ve balıklar gibi genç hayvanlarda büyüme performansını ve yem verimliliğini artırabilmektedir (Hou

vd., 2022). Sütte yapılan bir çalışmada ise serbest amino asitlerin, memelilerin metabolizmasında, büyümesinde ve gelişmesinde merkezi bir rol oynamakta ve protein senteziyle birlikte biyolojik işlev üstlenmekte olduğu gözlemlenmektedir (Yin vd., 2016).

2.12.4. Farmasötik ve kozmetik endüstrisinde kullanımı

Protein hidrolizatları, farmasötik ve kozmetik endüstrisinde, içerdikleri biyoaktif bileşenler, amino asitler ve peptitler nedeniyle geniş bir uygulama alanına sahiptir. Bu bileşikler, cilt sağlığını destekleme, yara iyileşmesini hızlandırma ve yaşlanma belirtilerini azaltma gibi çeşitli faydalar sunmaktadır.

Protein hidrolizatları, farmasötik ve kozmetik endüstrisinde antioksidan, antitirozinaz (melanin üretimini inhibe eden madde) gibi özellikleriyle dikkat çekmektedir. Antioksidan peptitler, serbest radikalleri etkisiz hale getirerek cilt yaşlanmasını yavaşlatmakta ve oksidatif strese karşı koruma sağlamaktadır. Kozmetik ürünlerde tirozinaz inhibitörleri olarak melanin üretimini düzenlemekte, böylece hiperpigmentasyon ve leke problemlerine karşı etkili bir çözüm sunmaktadır. Farmasötik alanda, *Pseudomonas aeruginosa* gibi patojenlerin biyofilm oluşumunu engelleme kapasitesi sayesinde enfeksiyon önleyici tedavilerde kullanılmaktadır. Ayrıca demir şelasyonu yetenekleri hem oksidatif hasarı önleme hem de cilt sağlığını desteklemede önemli bir rol oynamaktadır. Bu özellikler, protein hidrolizatlarını doğal, güvenilir ve çok yönlü bir bileşen haline getirmektedir (Karkouch vd., 2017).

Çeşitli çalışmalarda, tahıl protein hidrolizatları ve bunlardan elde edilebilecek peptitlerin antioksidan, antihipertansif ve antitümör aktivitelere sahip olduğu keşfedilmiştir (Rizzello vd., 2012; Rizzello vd., 2016). Gıda kaynaklı peptitlerin ve proteinlerin insan sağlığına olumlu katkıları günümüzde kabul edilebilir duruma gelmiştir (Coscueta vd., 2019). Pirinç proteini hidrolizatları üzerine yapılan bir çalışmada antioksidan aktivitelerini ve cilt yaşlanma enzimlerinin inhibitör aktiviteleri incelenmiştir. Bu çalışmada, pirinç proteini hidrolizatlarının gelecekteki kozmetik uygulamalar için antioksidan, antihyaluronidaz ve antitirozinaz aktivitelerine sahip olduğunu göstermiştir (Chen vd., 2021).

2.12.5. Tıbbi beslenme ve diyetetik alanlarında kullanımı

Protein hidrolizatlarının tıbbi beslenme ve diyetetik alanlarındaki kullanımı giderek artmaktadır. Bu hidrolizatlar, proteinlerin enzimatik veya kimyasal yollarla parçalanarak vücut tarafından daha hızlı emilebilen peptitler ve serbest aminoasitler içeren ürünlerdir. Özellikle esansiyel aminoasitler (EAA) ve dallı zincirli aminoasitler (BCAA) bakımından zengin bir içeriğe sahip olan bu ürünler, sağlık ve beslenme alanında önemli bir yer tutmaktadır. Esansiyel aminoasitler, vücutta sentezlenemediği için diyetle mutlaka alınması gereken aminoasitler olup, kas protein sentezi, doku onarımı ve metabolik süreçlerde kritik rol oynamaktadır (Who, 2007). BCAA'lar (valin, lösin ve izolösin) ise kas dokusunda yüksek oranda bulunmakta ve egzersiz sonrası kas yıkımının azaltılması, toparlanmanın hızlandırılması ve performansın artırılması gibi fonksiyonlara sahiptir (Anthony vd., 2001). Protein hidrolizatlarının diyetle alımı, özellikle sporcular, yaşlı bireyler ve protein ihtiyacı artmış bireyler için, aminoasitlerin hızlı emilimi ve biyoyararlanımı nedeniyle avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle, protein hidrolizatları hem beslenme hem de sağlık açısından önemli bir tamamlayıcı olarak değerlendirilmektedir.

Ayrıca sindirim, emilim ve amino asit metabolizması bozuklukları olan hastaların klinik tedavisinde, bu hastalara yönelik diyetlerde kullanılırken; kronik karaciğer hastalığı ve hepatik ensefalopati (karaciğer kaynaklı beyin fonksiyonu bozukluğu) protein hidrolizatlarının kullanımı, hastaların amino asit profillerini iyileştirmek, protein sentezini desteklemek ve karaciğer fonksiyonlarını optimize etmek için oldukça önemli bir tedavi olabilmektedir (Milla vd., 1983, Fischer vd., 1976; Clemente, 2000). Ayrıca protein hidrolizatları, gastrointestinal fonksiyon bozukluğu olan hastalar veya belirli organ hastalığı olan hastaların durumunda olduğu gibi özel ihtiyaçlara yönelik tıbbi beslenmede, spor beslenmesinde ve kilo kontrol diyetlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yaygın kullanım, protein hidrolizatlarının kolay sindirilebilirlik, düşük alerjenite, hızlı emilim ve biyoyararlanım gibi özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Sindirim sistemi sorunları olan hastalarda, proteinlerin parçalanmış formda olması nedeniyle sindirim ve emilim kolaylaşırken, sporcular için hızlı emilen amino asit profili kas iyileşmesini desteklemektedir. Aynı zamanda doyuruculuk özellikleri sayesinde kilo kontrolü diyetlerinde de etkili bir seçenek sunmaktadır (Mahmoud ve Cordle, 2000). Ayrıca beslenme çalışmaları, serbest amino asitlerin, diyetle alınmasının gen ekspresyonunu modüle ettiğini, ince bağırsak ve

iskelet kası büyümesini desteklediğini ve aşırı vücut yağını azalttığını ortaya koymaktadır. Bu özellikler, serbest amino asitlerin diyet takviyesi olarak kullanımını yalnızca besin desteği değil, aynı zamanda metabolik ve fizyolojik iyileştirmeleri destekleyen bir bileşen olarak da öne çıkarmaktadır (Wu, 2013; Hong vd., 2020; Gotti vd., 2022).

Yüksek protein miktarına sahip olan kanola küspesi, genel olarak hayvan yemi olarak kullanılmasına rağmen, protein hidrolizatları üretimi sayesinde daha işlevsel ve katma değeri yüksek bir ürüne dönüştürülebilme potansiyeli taşımaktadır. Biyoaktif peptitler açısından zengin olan bu protein hidrolizatları, gıda sektörü, tarım, hayvan beslenmesi, farmasötik, kozmetik vb. pek çok alanda kullanım potansiyeline sahiptir. Bu yaklaşım, kanola küspesinin ekonomik değerini artırırken, tarımsal yan ürünlerin daha verimli bir şekilde değerlendirilmesini sağlayarak sürdürülebilirliğe de önemli katkılar sunacaktır.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE METOT

3.1. Malzemeler

Endüstriyel olarak yağı alınmış kanola küspesi yerel bir firma (Reka Bitkisel Yağlar San. ve Tic. A.Ş) tarafından temin edilmiştir.

3.1.1. Enzimler

Selülaz (900.094.17, %92 saflıkta) enzimi HAMMADDELER.COM'dan satın alınmıştır. Alcalase (2,4 L, PLN05543) ve Flavourzyme (1000 L, HPN00581) Novozymes A/S (Bagsværd, Denmark) firmasından satın alınmıştır.

3.1.2. Kimyasal malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal sarf maddeleri; Sodyum hidroksit (S5881, Sigma-Aldrich), hidroklorik asit (320331, Sigma-Aldrich), sodyum dodesil sülfat (SDS, L3771, Merck), borik asit (B6768, Sigma-Aldrich), sodyum karbonat (13418, Sigma-Aldrich), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH, D9132, Sigma-Aldrich), pikril sülfonik asit çözeltisi (2,4,6-Trinitrobenzensülfonikasit, TNBS, P2297, Sigma-Aldrich), Kjeldahl tableti (1.15348, Merck), metilen blue (112070, Norateks), metil red (V21184.050, Beyan Lab), Folin-Ciocaltaeu fenol reaktifi (TPC, F9252, sigma aldrich) Potasyum dikromat (K₂Cr₂O₇, 483044, Sigma-Aldrich), sülfürik asit (H₂SO₄, 30743, Sigma-Aldrich), (±)-6-hidroksil-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit (troloks, 238813-5G, Sigma-Aldrich), 2,6-di-*tert*-bütil-4-metilfenol (BHT, B1378-1KG, Sigma-Aldrich), demir(II) klorür (372870, Sigma-Aldrich), metanol (1060072500, Merck) şeklindedir.

3.1.3. Cihaz ve ekipmanlar

Çalışma boyunca kullanılan cihazlar; ultra saf su (tip 1) sistemi (Millipore Direct-Q 3, Merck, Almanya), elektronik hassas terazi (AS 220-R2, Radwag, Polonya), elektronik kaba terazi (TP-3002, Denver Instrument, GmbH, Almanya), çelik blender (EB 8011,

Waring, ABD), sıcaklık kontrollü sirkülatör (C200-H13, Sıcaklık Aralığı (°C): -20 / 100, Labo Makina San. ve Tic. A.Ş., Türkiye), mekanik karıştırıcı (BS model, VELP Scientifica, İtalya), ultrasonik ünite 1 (UP200Ht, 26 kHz, 200 W, probe: Sonotrode S26d7, Hielscher, Almanya), ultrasonik ünite 2 (UW 400, 20 kHz, 230V, probe:TS425, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Almanya), 3 kDa, 10kDa ve 50 kDa MWCO membran (PES, 1510030VS, Sartorius Stedim, Almanya) etüv (UNB 500, Memmert, Almanya), kül fırını (MT-1105, Magmatherm, Türkiye), ısıtıcı tablalı çoklu manyetik karıştırıcı (Isolab, Almanya), pHmetre (HI 2211-02, Hanna Instruments, ABD), yüksek hızlı soğutmalı santrifüj, (Himac CR22N, Hitachi, Japonya), vorteks (Genie-2, Scientific Industries, ABD), kjeldahl yakma ünitesi (behr Labor-Technik GmbH, Almanya), kjeldahl distilasyon ünitesi (UDK 139, VELP Scientifica, İtalya), UV-Visible spektrofotometre (SP-3000 nano, Optima, Japonya), çalkalamalı su banyosu (WBN 14, Memmert, Almanya), ultrasonik su banyosu (Ultrasons-HD, Selecta, İspanya), +4 soğutucu ve -20°C dondurucu şeklindedir.

Çalışmada kullanılan araç ve gereçler; otomatik mikropipetler (Isolab, Almanya), pipet uçları, cam desikatör (250 mm, Isolab, Almanya), 0,45 µm gözenek çaplı polivinilden diflorid (PVDF) şırınga ucu filtre (Millex-HV, Merck-Millipore, Almanya), polistiren spektrofotometre küvetleri (Isolab, Almanya), kaba filtre kâğıdı, porselen kroze, plastik malzemeler (petri, falkon tüp, mikrosantrifüj tüpü, enjektör), paslanmaz çelik malzemeler (spatül, kaşık), cam malzemeler (beher, erlen, şişe, jöje) şeklindedir.

3.2. Metotlar

Kanola küspesini ve kanola küspesinde elde edilen protein hidrolizatlarını değerlendirmek, optimize etmek ve karakterize edebilmek amacıyla bir dizi analiz gerçekleştirilmiştir. Kanola küspesi kompozisyonel analizleri yapılarak, ardından farklı faktör ve seviyelerin etkilerini değerlendirmek amacıyla L25 Taguchi deney tasarımı uygulanmıştır. Deney tasarımına uygun olarak hazırlanan 25 numunenin serbest amino asit miktarı, TNBS yöntemiyle belirlenen hidroliz derecesi, DPPH metodu ile ölçülen toplam antioksidan madde miktarı ve Folin-Ciocalteu yöntemiyle belirlenen toplam fenolik madde miktarı analizleri gerçekleştirilmiş ve bu veriler optimizasyon sürecinde kullanılmıştır. Yapılan istatistiksel analizler (ANOVA ve

Taguchi analizi) sonucunda optimizasyon çalışmaları tamamlanmış ve elde edilen veriler doğrultusunda optimize bir numune (optimize hidrolizat) seçilerek üretilmiştir. Optimize edilen numune, konsantre edildikten sonra hem hidrolizat hem de konsantre formda çeşitli analizlerle kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. Konsantre edildikten sonra hem hidrolizat hem de konsantre hali için toplam serbest amino asit analizi, amino asit dağılımları, toplam azot/protein (Kjeldahl yöntemi) tayini, hidroliz derecesi tayini (TNBS, 2,4,6-Trinitrobenzenesülfonik asit), organik karbon analizi (Walkley-Black metodu), toplam fenolik madde tayini (Folin-Ciocalteu), toplam antioksidan madde miktarı tayini (DPPH radikali önleyici aktivite testi, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), kül tayini ve kuru madde tayini gibi yöntemlerle değerlendirilmiştir. Söz konusu analizler sonraki bölümlerde detaylandırılmaktadır.

3.2.1. Kanola küspesinin kompozisyon analizi

Tez kapsamında kullanılan kanola küspesinin literatürdeki çalışmalarla benzerliğini değerlendirmek amacıyla protein, nem ve kül analizleri yapılmıştır. Bu analizler, kanola tohumlarının yağının çıkarılmasından sonra kalan katı kısmın öğütülmesiyle elde edilen kanola küspesi üzerinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1. Protein Analizi (Kjeldahl Metodu)

Protein tayini, NMKL, (2003) referansına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Kanola küspesi öğütücü yardımıyla boyutu küçültülmüştür. Ardından nem içeriğinin protein analizini etkileyebileceğinden dolayı örnek kurutulmuştur. Sabit ağırlığa gelene kadar 105°C'de kurutma işlemi yapılmıştır. Her örnek paralelli olarak çalışılmıştır. Kontrol numunesi için 1 gram şeker tartılmıştır. Analizi yapılacak olan numunelerden 1'er gram tartıldıktan sonra Kjeldahl tüpü içerisine alınmıştır. 10 gram potasyum sülfat ve 0,3 gram bakır (II) sülfat içeren katalizör (Kjeldahl tableti) tüm tüplere birer tane olacak şekilde konulmuştur. Ardından tüplere 25 ml sülfürik asit eklenmiştir. Örnekler hazırlandıktan sonra yakma işlemi gerçekleştirilmek için tüpler Kjeldahl yakma ünitesine konulmuştur ve yakma işlemi başlatılmıştır. Tüplerin içerisindeki örnekler açık yeşil renk gözlenene kadar yakılmıştır. Renk değişikliği gözlendikten sonra, tüplerdeki örnekler 30 dakika daha yakılmış ve ardından soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan tüpler destilasyon cihazına takılmıştır. Analiz öncesinde su ve sodyum

hidroksit destilasyon cihazına eklenmiştir. Her bir tüp için 50 ml destile su, örneği bazik hale getirecek miktarda (100 ml) %40'lık sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi işlem sırasında cihaz tarafından tüplere ilave edilmiştir. Cihazın diğer ucuna ise %4'lük 25 ml borik asit ve 1 damla metilen mavisi ve 3 damla metilen kırmızısı indikatör içeren erlen bağlanmıştır. Her bir tüp için ayrı ayrı işlemler tekrarlanmış olup, her bir distilasyon işlemi 5 dakika boyunca devam etmiştir. Distilasyon sonucunda elde edilen distilat 0,1 N ayarlı hidroklorik asit (HCl) çözeltisi ile titre edilmiştir ve sarfiyat kaydedilmiştir.

Hesaplama:

$$\%N = \frac{(V_1 - V_2) \times N_{HCl} \times 1,401}{m} \quad (3.1)$$

- N : Toplam Azot Miktarı, %
- V_1 : Numune Çözeltisinin Titrasyonu İçin Harcanan Asit Çözeltisi Miktarı, ml
- V_2 : Kör Deneme Çözeltisinin Titrasyonu İçin Harcanan Asit Çözeltisi Miktarı, ml
- N_{HCl} : Titrasyonda kullanılan Asit Çözeltisinin Normalitesi, 0,1 N
- m : Numune Ağırlığı, g
- 1,401: Azotun Mili Ekvivalent Ağırlığı

Bulunan % azot miktarı protein faktörü ile çarpılarak numunedeki % protein miktarı bulunur.

$$\%Protein = N \times F \quad (3.2)$$

- F : Protein faktörü

3.2.1.2. Nem analizi

AOAC (1990) 950.46B protokolüne uygun olarak belirlenen nem analizi numunelere uygulanmıştır. İlgili protokole göre, 2 gram numune bir kap içinde tartılarak etüvde 100–102°C arasında 16–18 saat bekletilmiştir. Belirlenen sürenin sonunda numune, bir desikatörde soğutulmuş ve sabit tartıma ulaşıldığında meydana gelen ağırlık farkı, nem içeriğini hesaplamak için kullanılmıştır.

3.2.1.3. Kül analizi

Kül miktarı, AOAC (1998) 938.08 protokolüne göre belirlenmiştir. Porselen krozelerde 2 gram numune, 550°C'de 3 saat ısıtılarak organik madde yakılmıştır. İşlem sonrası krozeler desikatöre alınarak soğutulmuş ve kül miktarı, inorganik kalıntının toplam ağırlığa oranı ile hesaplanmıştır.

3.2.2. Deney Tasarımı

Bu çalışmada, 5x5 (L25) bir ortogonal dizi olan Taguchi tasarımı tercih edilmiştir. Toplamda 5 faktör için 5 ayrı seviye belirlenmiş ve bu seviyelerin kombinasyonlarıyla deneme matrisi oluşturulmuştur. Her bir numune, faktörlerin belirlenen seviyeleri üzerinde gerçekleştirilen denemeleri temsil etmektedir. Bu deneme tasarımı, faktörlerin etkileşimlerini ve her bir faktörün optimize edilmiş seviyelerini değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır.

Faktörler ve seviyeleri, deney tasarımına uygun olarak Tablo 3.1'de belirtildiği gibi seçilmiştir. Mevcut literatür taraması ve ön denemeler neticesinde girdi parametreleri olarak; ultrasonik muamele 1 (0-48 dk işlem süresi), ultrasonik muamele 2 (0-48 dk işlem süresi), proteaz 1 (Alcalase 2,4 AU, %100 aktiviteye eşit olmak üzere %0-100 enzim aktivitesi), proteaz 2 (Flavourzyme, 1000L %100 aktiviteye eşit olmak üzere %0-100 enzim aktivitesi) ve ultrafiltrasyon (0-10x hacmen konsantrasyon) seçildi. Tablo 3.2'de desenin koşulları detaylı şekilde yer almaktadır.

Tablo 3.1: Taguchi Deney Tasarımı Faktör Tipleri, Seviyeler ve Değerler Tablosu

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

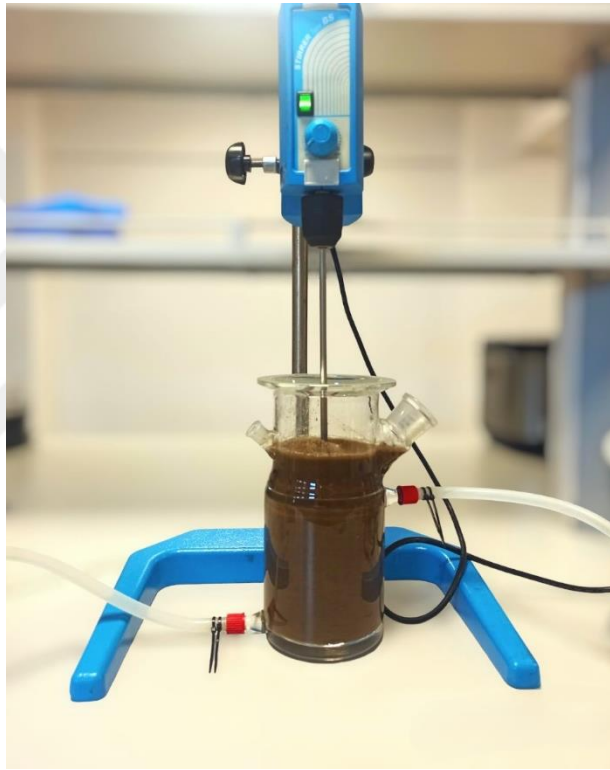
Faktörler	Seviyeler				
	1	2	3	4	5
Ultrasonik muamele 1 (dk)	0	12	24	36	48
Ultrasonik muamele 2 (dk)	0	12	24	36	48
Proteaz 1 (%)	20	40	60	80	100
Proteaz 2 (%)	20	40	60	80	100
Ultrafiltrasyon (x)	0	4	6	8	10

Tablo 3.2: Taguchi Deney Deseni Faktörleri ve Seviyeleri**Kaynak:** Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Deney No	Ultrasonik muamele 1 (0-48 dk)	Ultrasonik muamele 2 (0-48 dk)	Proteaz 1 (%20-100)	Proteaz 2 (%20-100)	UF (0-10 x)
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

3.2.3. Kanola Küspesinden Protein Hidrolizatlarının Elde Edilmesi

Şekil 3.7’de detaylı olarak gösterilen kanola küspesinde protein hidrolizatı elde edilmesi için ilk aşamada elektronik hassas teraziyle (AS 220-R2, Radwag, Polonya) tartılan 180 gram kanola küspesi çelik blender (EB 8011, Waring, ABD) yardımıyla öğütüldü. Hazırlanan örnek 1800 ml (1:10, katı: sıvı oranı) saf su ile karıştırılıp sıcaklık kontrollü sirkülatöre (C200-H13, Labo Makina San. ve Tic. A.Ş., Türkiye) bağlı olan çift cidarlı reaktöre alındı. Ardından mekanik karıştırıcı (Stirrer type BS, VELP Scientifica, İtalya) yardımıyla karıştırma (Şekil 3.1) işlemine başlandı.



Şekil 3.1: Mekanik karıştırıcı ile karıştırma işlemi gösterimi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

3.2.3.1. Ultrasonik Muameleler

Deney tasarımına uygun olarak seçilen ultrasonik muamele 1 (Hielscher UP200Ht ultrasonik homojenizatörü, 26 kHz, 200 W, probe: Sonotrode S26d7, Hielscher, Almanya) ve ultrasonik muamele 2 (Bandelin UW 400 ultrasonik homojenizatör, 20 kHz, 230V, probe:TS425, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Almanya) muameleleri (Şekil 3.2 ve Şekil 3.3) sırasıyla yapılmıştır.



Şekil 3.2: Ultrasonik muamele 1

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



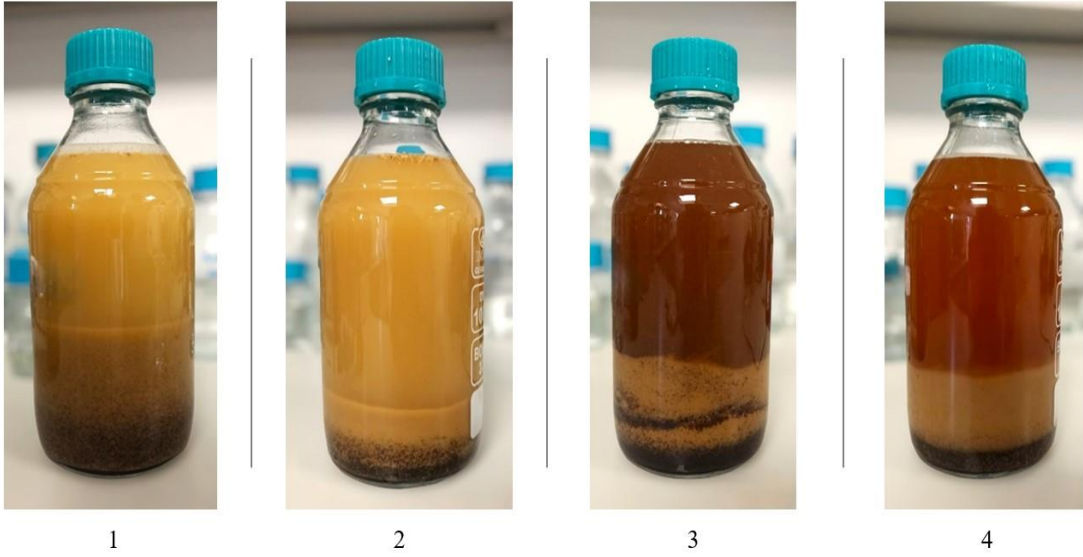
Şekil 3.3: Ultrasonik muamele 2

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

3.2.3.2. Enzimatik Hidroliz

Reaktörden alınan örnekler, manyetik karıştırıcı eşliğinde enzim işlemine tabi tutulmuştur. Enzimatik muameleler Şekil 3.4'te gösterildiği gibi tek tek ve sırayla gerçekleştirilmiştir. İlk olarak karışımın pH 6'ya ayarlanması için 1 N HCl kullanılmıştır. Daha sonra bir karbonhidraz enzimi olan Selülaz enzimi (%92 saflıkta) eklenmiş ve çalkalamalı banyoda 1 saat boyunca 50°C'de bekletilmiştir. Ardından manyetik karıştırıcı eşliğinde pH 8'e getirmek için 1 N NaOH kullanılmış ve proteaz 1 (Alcalase, 2,4 AU) eklenerek çalkalamalı banyoda 2 saat boyunca 50°C'de bekletilmiştir. Bu işlemin ardından karışımı pH 7'ye getirmek için 1 N HCl kullanılarak proteaz 2 (Flavourzyme, 1000L) eklenmiş ve 6 saat boyunca çalkalamalı banyoda 50°C'de bekletilmiştir. Enzimatik reaksiyonu sonlandırmak için örnek, çalkalamalı banyoda 5 dakika boyunca 95°C'de bekletilmiştir. Elde edilen örnekler kaba filtre kâğıdı ile süzildükten sonra santrifüjlendi (10,000 × g, 17°C, 20dk).

Yapılan ön denemeler neticesinde, Alcalase ve Flavourzyme miktarları hesaplanmıştır. Numunelerde kullanılan kanola küspesi miktarı 120 gramdır. Kanola küspesinin 120 gramında 39,6 gram protein bulunmaktadır. Alcalase 2.4 AU enzim yoğunluğu ve 1,17 g/ml yoğunluğa sahip olduğu dikkate alındığında, 39,6 gram protein için gerekli olan Alcalase miktarı 33,85 ml olarak hesaplanmıştır. Alcalase 2.4 AU, her gram enzimin 2,4 Aktivite Birimi (AU) içerdiğini ifade etmektedir. Bu hesaplamada, enzimin etkinliği ve yoğunluğu göz önünde bulundurularak, hedeflenen protein hidrolizi için optimum enzim miktarı belirlenmiştir. Belirlenen optimum enzim miktarı %20, %40, %60, %80 ve %100 olmak üzere 5 farklı seviyede kullanılarak, numunelere uygun şekilde hazırlanmıştır. Flavourzyme miktarı ise, 5 gram protein için 1 gram enzim kullanılarak belirlenmiştir. Hazırlanan numunenin toplam protein miktarı 39,6 gram olduğundan, bu miktarı karşılamak için gereken Flavourzyme miktarı hesaplanmış ve yoğunluğu 1,27 g/ml olan Flavourzyme, yaklaşık olarak 6,24 ml'ye karşılık gelmektedir. Çalışmanın ilerleyen bölümlerinde, bu 6,24 ml Flavourzyme, enzimin farklı etkilerini incelemek amacıyla %20, %40, %60, %80 ve %100 seviyelerinde uygulanmıştır. Her bir seviyede, başlangıçtaki 6.24 ml'lik enzim miktarının belirli yüzdelerine denk gelen hacimler kullanılmış ve bu sayede enzimin çeşitli oranlardaki etkileri değerlendirilmiştir.

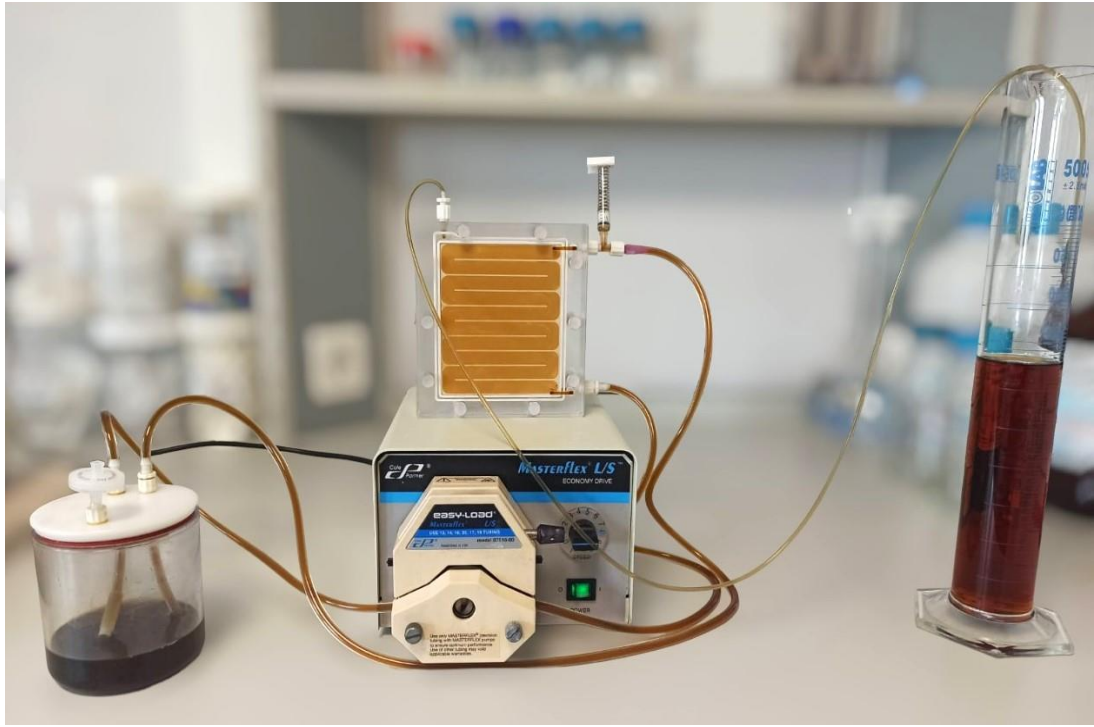


Şekil 3.4: Farklı işlemler sonrası numunelerin gösterimi (1. Ultrasonik muameleler, 2. Karbonhidraz (Selülaz) muamelesi, 3. Alcalase enzimi muamelesi, 4. Flavourzyme enzimi muamelesi)

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

3.2.3.3. Ultrafiltrasyon (UF) Yöntemi ile Fraksiyonlama

Santrifüjlenmiş hidrolizat numuneleri, uygun UF kasetleri (3 kDa, 10 kDa veya 50 kDa MWCO) kullanılarak ultrafiltrasyon işlemine tabi tutulmuştur (Şekil 3.5) ve hacmen 0-10 kat arasında konsantre edilmiştir. Elde edilen fraksiyonlar, alıkonma veya membrandan geçme durumlarına göre adlandırılmıştır (>10 kDa veya <10 kDa gibi).



Şekil 3.5: Ultrafiltrasyon işlemi gösterimi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

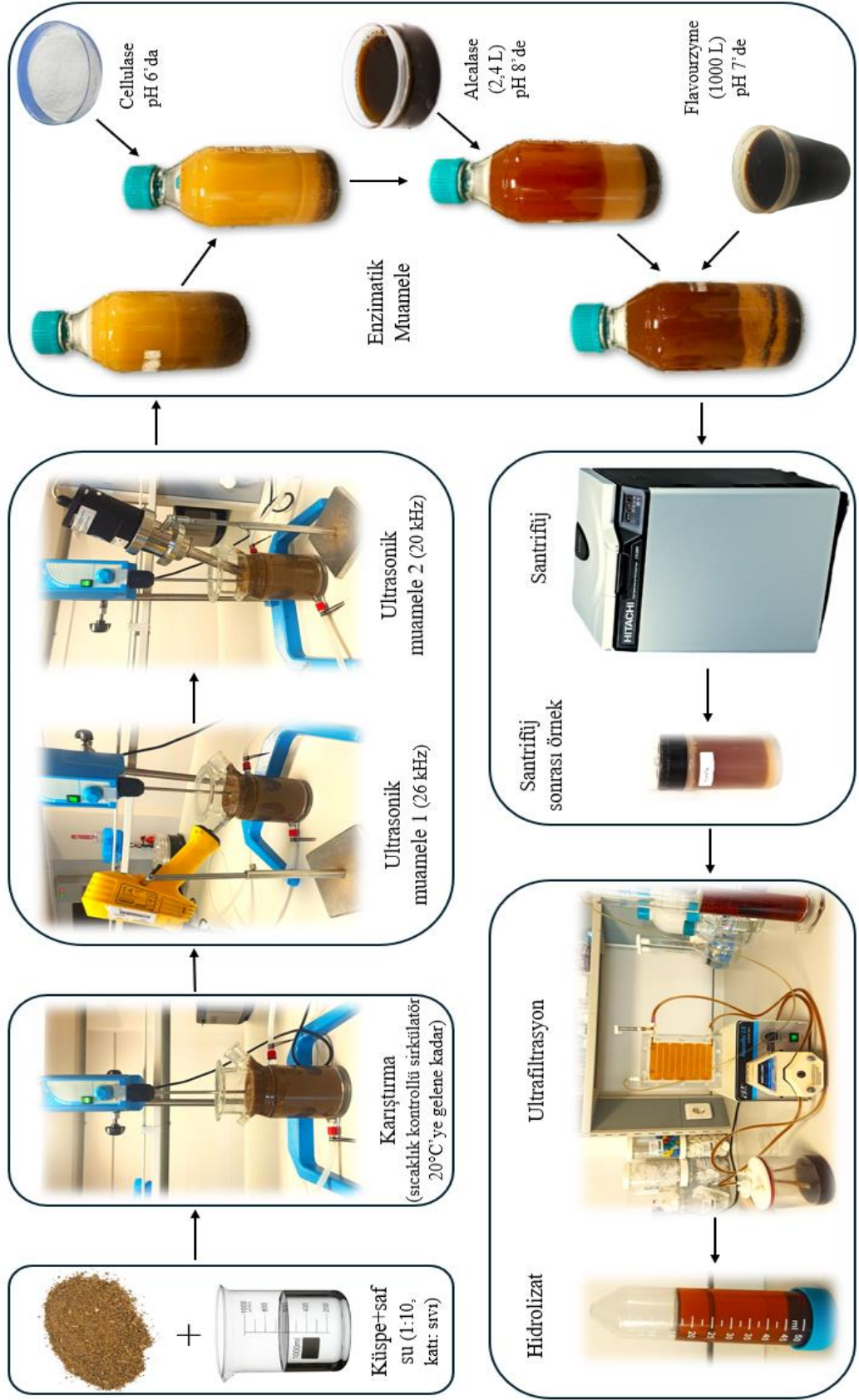
3.2.3.4. Hidrolizat Numunelerinin Konsantrasyonu

Deney tasarımına uygun şekilde hazırlanan hidrolizatlar, belirlenen koşullarda etüvde (Şekil 3.6) suyun buharlaştırılması yoluyla konsantre edilmiştir. Bu işlem sırasında, etüv sıcaklığı 45°C'ye ayarlanarak optimal konsantrasyon koşulları sağlanmıştır. Suyu buharlaştırılarak konsantre edilen örnekler ve konsantrasyon işlemi görmeden önce toplanan örnekler, analizlerin yapılması için dikkatle hazırlanmıştır.



Şekil 3.6: Hidrolizat numunelerinin konsantre edildiği etüv ve numunelerin gösterimi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



Şekil 3.7: Kanola küspesinden protein hidrolizati elde edilmesinin detaylı gösterimi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

3.2.4. Hidrolizat ve Konsantre Numunelere Uygulanan Analizler

L25 deneme deseni kapsamında serbest amino asit analizi, % amino asit dağılımları, hidroliz derecesi tayini (TNBS (trinitrobenzen sülfonik asit) yöntemi ile), toplam antioksidan aktivite tayini (DPPH metodu) ve toplam fenolik madde tayini (Folin-Ciocalteu metodu) gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon sürecinde birincil yanıt değişkeni olarak serbest amino asit miktarı belirlenmiş ve deneme deseni sonucunda optimum yanıt değeri elde edilerek optimizasyon sağlanmıştır. Ardından optimize numune örneği ve optimize numunenin konsantre formu hazırlanmıştır.

Optimum yanıtta göre elde edilen optimize numune ve optimize numunenin konsantre edilmiş formu üzerinde; toplam serbest amino asit analizi, % amino asit dağılımları, hidroliz derecesi tayini (TNBS (trinitrobenzen sülfonik asit) yöntemi ile), toplam antioksidan aktivite tayini (DPPH metodu), toplam fenolik madde tayini (Folin-Ciocalteu metodu), toplam protein tayini (Kjeldahl Metodu), organik karbon analizi (Walkey Black Metodu), toplam kül içeriği analizi ve kuru madde analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler, ürünün kimyasal ve fonksiyonel özelliklerini ayrıntılı bir şekilde değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

3.2.4.1. Toplam serbest amino asit analizi / % amino asit dağılımları

Toplam serbest amino asit analizi GÜBRE FABRİKALARI T.A.Ş. tesislerinde yapılmıştır. Bu analiz için protein hidrolizatlarından 0,25 g tartılarak 50 ml'lik ağız kapalı analiz şişesine alınmıştır. Numuneler 6 N hidroklorik asit (HCl) çözeltisinden 20 ml eklenerek saf azot gazı verilmiş ve şişenin ağız sıkıca kapatılmıştır. Bu işlem sonrasında şişe, 110°C'de etüvde 24 saat boyunca hidroliz edilmiştir. Hidroliz tamamlandıktan sonra örnekler oda sıcaklığına getirilerek hacimleri saf su ile 50 ml'ye tamamlanmış ve filtre kâğıdı ile süzülmüştür. Süzüntüden 0.1 ml deney tüpüne alınarak 50°C'de 30 dk azot gazı altında uçurulup, 0,2 ml saf su ile tekrar azot gazı altında uzaklaştırılmıştır. Karışıma 0.5 ml asetonitril ilave edilerek azot gazı altında uçurma işlemi tekrar edilmiştir. Kalıntıya 0.5 ml asetonitril: metanol: trietilamin karışımı ve 0.1 ml türevlendirme çözeltisi (%1 v/v Fenilizotiyosiyanat) ilave edilmiş ve 40°C'de 30 dakika süreyle türevlendirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Yeniden azot gazı altında 40°C'de çözücü uçurma işlemi uygulandıktan sonra üzerine 0.2 ml asetonitril ilave edilmiş ve asetonitril azot gazı altında tekrar uçurulmuştur. Üzerine 5

ml 0.02 M amonyum asetat çözeltisi ilave edilip, 0.20 µm filtreden süzölmüştür ve süzöntü HPLC viallerine alınmıştır. HPLC-UV analizinde ACE 5 C18 (250 x 4.6 mm) ters faz kolon kullanılmış, kolon sıcaklığı 40°C olarak ayarlanmış, UV dedektörü 254 nm dalga boyunda çalıştırılmış ve enjeksiyon hacmi 10 µl, akış hızı ise 1 ml/dakika olarak belirlenmiştir (Heinrikson ve Meredith, 1984; Gheshlaghi vd., 2008).

3.2.4.2. Hidroliz Derecesi Tayini (TNBS (trinitrobenzen sülfonik asit) yöntemi ile)

Parçalanan peptit bağlarının yüzde konsantrasyonu olarak tanımlanan (Adler-Nissen, 1976) hidroliz derecesi Adler-Nissen, (1979) referans alınarak ölçölmüştür. Hidroliz derecesinin belirlenebilmesi için kullanılabilen yöntemlerden biri, hidrolizattaki birincil amino gruplarının konsantrasyonunun belirlenebildiği TNBS (trinitrobenzen sülfonik asit) yöntemidir. Bu yöntemde 400 µl hidrolizat örnekleri, 400 µl SDS (%0,44) ve 190 µl sodyum fosfat tamponu (0,2 M, pH 8,2) ile karıştırılarak içerisine 300 µl TNBS (%0,1) çözeltisi ilave edilmiştir. Tepkime karanlıkta 1 saat boyunca (50°C) sürdürölmüştür. Tepkime tamamlanınca karışıma 1 ml HCl (0,1 M) eklenerek tepkime durdurulmuştur. Örnekler oda sıcaklığına gelince spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır (Şekil3.8).

$$\%DH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 \quad (3.3)$$

h: Parçalanan peptit bağlarının sayısını

h_{tot}: Toplam peptit bağı sayısı (*h_{tot}*=7.8 eq/kg olarak belirlenmiştir. Bu değer için Chabanon vd., (2007) referans alınmıştır.)



Şekil 3.8: UV spektrofotometre

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

3.2.4.3. Toplam Antioksidan Aktivite Tayini (DPPH Metodu)

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) serbest radikal giderme aktivitesi testi, Blois (1958) metodu referans alınarak yapılmıştır. Antioksidan kapasitesini belirlemek için DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali kullanılabilmektedir. DPPH radikali uzun ömürlü bir organik azot radikali olup derin mor bir rengi vardır. Ticari olarak temin edilebilir ve analiz öncesinde oluşturulması gerekmez. Bu yöntemde, mor renkli DPPH radikali antioksidan veya redüktif bileşikler tarafından soluk sarı renkli hidrazine indirgenir (Karadağ vd., 2009).

Hidrolizat numunesi (50 µl) ve %100 metanol (50 µl) karıştırılmış ve bu karışıma metanolde 1 mM hazırlanan 2 ml DPPH çözeltisi eklenmiştir. Referans örnek için 100 µl %100 metanol ve 2 ml DPPH çözeltisi kullanılmıştır. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika boyunca tepkime gerçekleştikten sonra metanolden oluşan köre karşı 517 nm dalga boyunda absorbansları kaydedilmiştir. Bu analizde, Troloks ((6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) ve BHT (Butylated Hydroxytoluene) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

$$\%DPPH \text{ Süpürme Aktivitesi} = \frac{A_0 - A}{A_0 - A_b} \times 100 \quad (3.4)$$

A_0 : Negatif kontrol absorbans değeri

A : Örnek absorbans değeri

A_b : Blank absorbans değeri

3.2.4.4. Toplam Fenolik Madde Tayini (Folin-Ciocalteu Metodu)

Toplam fenolik bileşik tayini Spektrofotometrik bir yöntem ile yapılmıştır (Singleton vd., 1999). Saf su ile seyreltilerek (1:10) hazırlanan 100 µl hidrolizat örneği, Folin-Ciocalteu reaktifi (750 µl) ve sodyum karbonat çözeltisi (750 µl, %6) deney tüpünde karıştırılarak 90 dakika karanlık ortamda ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Tepkime sonunda örneklerin absorbans değerleri (750 nm dalga boyunda) ölçülerek, örneklerdeki toplam fenolik bileşik miktarı mg GAE/100g olarak belirlenmiştir. Bu işlem için, önce farklı konsantrasyonlarda gallik asit çözeltileri hazırlanmış (0,01-0,6 mg/ml) ve bunların absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen verilerle gallik asit eşdeğeri (GAE) standart eğrisi oluşturulmuştur. Deney örneklerinin absorbans değerleri bu standart eğri kullanılarak fenolik bileşik konsantrasyonlarına dönüştürülmüş ve sonuçlar mg GAE/100g olarak raporlanmıştır.

3.2.4.5. Protein Analizi (Kjeldahl Metodu)

Toplam protein tayini, NMKL, (2003) referansına uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Tüplerin hazırlanması: Her örnek paralelli olarak çalışılmıştır. Kontrol numunesi için 1 gram şeker tartılmıştır. Analizi yapılacak olan numunelerden 1'er gram tartıldıktan sonra Kjeldahl tüpü içerisine alınmıştır. Analiz ve hesaplama, 3.2.1.1 bölümünde belirtilen prosedüre göre yapılmıştır.

3.2.4.6. Organik Karbon Analizi (Walkey Black Metodu)

Organik karbon analizi için 1 g numune 500 ml'lik erlenmayer içerisinde tartıldı. Ardından erlenmayerin içerisine 10 ml 1 N Potasyum dikromat ($K_2Cr_2O_7$) ilave edildi. Üzerine 20 ml derişik sülfürik asit (H_2SO_4) ilave edildikten sonra 1 dakika elle çalkalandı. Kontrol numunesi, hidrolizat numunesi eklenmeden aynı işlemlere tabi tutularak hazırlandı. Erlenmayerler önceden $160^\circ C$ 'ye ısıtılmış manyetik karıştırıcıda 25 dakika boyunca karıştırıldı. Çözeltinin son durumda rengi koyu kahverengi olmalıdır (Şekil 3.9). Renk kirli yeşil olduğu için üzerine 10 ml daha potasyum dikromat eklendi. Manyetik karıştırıcıda 5 dakika boyunca karıştırma işlemi devam etti. Koyu kahverengine dönen çözeltiler soğuması için çeker ocaklı düzenek içerisinde bekletildi. Soğuyan erlenmayerler içerisine 200 ml saf su ilave edildi. Üzerine 1:1 oranında saf su ile seyreltilmiş fosforik asitten 10 ml ilave edildi. 12-13 damla baryum difenilamin sülfonat çözeltisi eklendi. 0,5 N demir sülfat çözeltisi ile erlenmayerdeki çözelti titre edildi. Renk önce morumsu lacivert devamında yeşile döner. İlk defa yeşil renk belirdiğinde titrasyon bitirildi ve harcanan demir sülfat not edildi. Kontrol olarak hazırlanan erlenmayer için de demir sülfat harcanması not edildi.

$$\% \text{ Organik Karbon} = \frac{(A - (B * Nk)) * 0,337}{C} \quad (3.5)$$

A: Harcanan potasyum dikromat miktarı (ml)

B: Titrasyon da harcanan demir sülfat miktarı (ml)

C: Tartılan numune miktarı (g)

Nk: Demir sülfatın kesin normalitesi ($Nk = 10/\text{Kontrol numunesi için harcanan demir sülfatın miktarı}$)



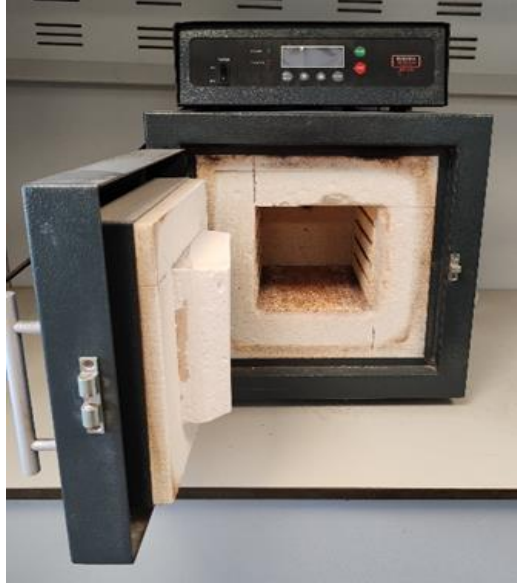
Şekil 3.9: Organik karbon analizi potasyum dikromat eklenmesi sonrası gösterimi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

3.2.4.7. Toplam Kül İçeriği Analizi

Porselen kroze etüvde (70°C) kurutulur, desikatöre alınıp soğutulularak tartılır. Bu işlem porselen kroze sabit tartıma gelinceye kadar tekrarlanır. Sabit tartıma gelince darası alınır. Hidrolizat ve konsantre numunelerden 2 g alındı, darası alınmış porselen kroze (dara + numune) ile tartıldı. İçinde numune bulunan porselen kroze kül fırınına yerleştirildi (Şekil 3.10). Kül fırının sıcaklığı kademeli olarak 550 °C' ye getirilerek yakma işlemi yapıldı. Yanma sonunda kül fırınının soğuması beklendi. Soğuduğunda kül ile porselen kroze (dara + kül) tartıldı. Denklem 3.8'te gösterildiği gibi orijinal ağırlığa bölünerek organik madde hesaplandı.

$$\% \text{ Kül Miktarı} = \frac{(Dara + Numune) - (Dara + Kül)}{Numune (Orijinal ağırlık)} \times 100 \quad (3.6)$$



Şekil 3.10: Kül fırını gösterimi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

3.2.4.8. Kuru Madde Tayini

Refraktometre cihazı kullanılmadan önce, bağlı bulunan sirkülasyonlu su banyosu 20°C'ye ayarlanarak ölçüm sırasında sıcaklık kontrolü sağlandı. Kuru madde tayini yapılmadan önce, hidrolizat örneği 0,22 µm gözenek çaplı selüloz asetat (CA) şırınga ucu filtrelerden süzülürken konsantre numune 1:5 oranında (konsantre numune: saf su) seyreltikten sonra 0,22 µm gözenek çaplı selüloz asetat (CA) şırınga ucu filtrelerden süzüldü. Ardından, vorteks yardımıyla karıştırılan hidrolizatlar refraktometrenin prizma yüzeyine uygulandı. Refraktometre (Şekil 3.11), sıvının kırılma indisini ölçerek bu değeri cihazın dijital ekranında kuru madde yüzdesi olarak gösterdi ve bu değer kaydedildi. Hesaplamalar seyreltmeler baz alınarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.11: Refraktometre gösterimi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

3.2.5. İstatiksel Analizler

Protein hidrolizatlarının elde edilmesi için kullanılan tekniklerin optimizasyonu, Deneysel Tasarım (“Design of experiments”, DOE) yöntemi kullanılarak sağlanmıştır. Deneysel tasarım (DOE), süreçlerin ve ürünlerin performansını optimize etmek için güçlü bir araç olarak kabul edilmektedir (Giles Jr vd., 2004). Bu yöntem, farklı faktörlerin ve seviyelerinin etkilerini sistemli bir şekilde değerlendirmekte ve yanıt değişkeni üzerindeki etkilerini analiz etmektedir. Bu çalışma, Taguchi Analizi ve Varyans Analizi (“Analysis of variance”, ANOVA) olmak üzere 2 farklı DOE tekniğine odaklanılmaktadır. Bu deneysel tasarım için kullanılan teknikler Minitab® 18 (State College, PA, ABD) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.1. Taguchi Analizi (DOE)

Taguchi metodolojisi, mühendislik verimliliğini önemli ölçüde artıran özgün bir istatistiksel deneysel tasarım yaklaşımıdır (Verma vd., 2012). Proses parametrelerini optimize etmek için kullanılan güvenilir ve etkili bir prosedürdür. Bu yöntem, sistem performansını artırmak amacıyla varyasyonu azaltır. Ayrıca, en iyi sonuçları minimum deneysel sayısıyla elde etmek için istatistiksel olarak tasarlanmış deneylerin ortogonal dizilerini uygular ve böylece deneysel süresini ve maliyetini azaltır. Bu matris

deneylerindeki amaç fonksiyonu, sinyal-gürültü (S/N) oranını içerir (Fratila vd., 2010). Sinyal-gürültü (Signal-to-Noise, S/N) oranı parametresinin eklenmesi, parametrelerin fiziksel davranışındaki duyarlılığın daha net bir şekilde anlaşılmasını sağlar. S/N oranı, sinyalin istenen gerçek değeri temsil ederken, gürültünün ölçülen değerlerdeki istenmeyen faktörleri ifade ettiği bilinmektedir (Canel vd., 2012). Genel olarak, performans özellikleri için S/N oranı analizi, "küçük daha iyidir", "nominal en iyisidir", ve "yüksek daha iyidir" olmak üzere üç kategoride gerçekleştirilir (Hsiang vd. 2012). Bu çalışmada, S/N oranının "yüksek daha iyidir" yaklaşımına göre hesaplanarak en yüksek değerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

$$\text{Küçük daha iyidir} \quad \frac{S}{N} = -10 \log \left(\frac{\sum_{i=1}^n (y_i^2)}{n} \right) \quad (3.7)$$

$$\text{Nominal en iyisidir} \quad \frac{S}{N} = -10 \log \left(\frac{\bar{y}_i^2}{\sigma^2} \right) \quad (3.8)$$

$$\text{Yüksek daha iyidir} \quad \frac{S}{N} = -10 \log \left(\frac{\sum_{i=1}^n \left(\frac{1}{y_i^2} \right)}{n} \right) \quad (3.9)$$

\bar{y}_i : Verilen faktör seviyesi için gözlemlenen verilerin (yanıtların) ortalaması

σ^2 : Gözlemlenen verilerin (yanıtların) varyansı

y_i : Verilen faktör seviyesi kombinasyonu için gözlemlenen veri (yanıt)

n : Faktör seviyesi kombinasyonundaki gözlemlerin (yanıtların) sayısıdır (Ross, 1996).

3.2.5.2. ANOVA

ANOVA, farklı proses parametrelerinin sistemin performansına olan etkilerini tahmin etmemizi sağlayan istatistiksel bir yöntemdir (Kishore vd., 2017). Bu analiz, faktörlerin varyanslarını karşılaştırarak faktörler arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farkları ortaya çıkarmaktadır. Özellikle deney tasarımı ve veri analizi süreçlerinde sıkça kullanılan ANOVA, araştırmacılara gruplar arasındaki farklılıkları belirlemekte ve sonuçlarını istatistiksel olarak değerlendirme imkânı sunmaktadır.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmanın ana hedefi doğrultusunda, kanola küspesinden elde edilen bitkisel protein hidrolizatlarının üretimi ve karakterizasyonu kapsamındaki analiz sonuçlarına yer verilmiştir. İlk olarak kanola küspesinin kompozisyonel analizi yapılarak ham maddenin içerik özellikleri detaylandırılmıştır. Sonrasında, Taguchi L25 deney tasarımı kapsamında hazırlanan farklı hidrolizat numunelerinin analiz sonuçları değerlendirilerek optimizasyon yürütülmüştür. Optimize edilen numune, belirlenen koşullara uygun şekilde yeniden hazırlanmış ve ürünün potansiyel etkileri hakkında çıkarımlar yapılmıştır. Bu bulgular, bitkisel protein hidrolizatlarının birçok alanda kullanımını değerlendirilme potansiyelini kapsamlı bir şekilde tartışmaya olanak sağlamaktadır.

4.1. Kanola Küspesinin Kompozisyonel Analizleri

Kanola küspesinin kompozisyonel özelliklerinin belirlenmesi amacıyla çeşitli analizler yapılmıştır. Kanola küspesi üzerinde yapılan protein, nem ve kül analizlerinin sonuçları Tablo 4.1'de verilmiştir. Analizler sonucunda kanola küspesinde bulunan ham protein oranı, nem oranı ve ham kül oranı sırasıyla yaklaşık %33, %12 ve %6,3 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.1: Kanola küspesinin kompozisyonel analiz sonuçları

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Analizler	Ortalama Değer (%)
Ham Protein	33,2±0,6
Nem	12±0,2
Ham Kül	6,3±0,1

Kanola küspesi üzerine yapılan literatür çalışmaları ile elde edilen bulgular karşılaştırıldığında, sonuçlarımızın literatürle büyük ölçüde uyumlu olduğu görülmektedir. Çalışmada tespit edilen ham protein oranı yaklaşık %33 olup, bu değer literatürde bildirilen %35-40 aralığına yakın bir sonuçtur. Bu durum, kanola küspesinin değerli bir protein kaynağı olduğunu vurgulamaktadır (Wanasundara vd., 2016; Tang ve Ghosh, 2023). Ham protein, bitkisel protein kaynakları arasında kanola küspesinin önemli bir yere sahip olmasını sağlayan ana bileşendir. Literatürdeki bu aralık, kanola küspesinin farklı türler ve işleme yöntemleri ile elde edilen ürünlerinde protein içeriğinin değişkenlik gösterebileceğini, ancak genel olarak yüksek bir protein düzeyine sahip olduğunu göstermektedir.

Nem içeriği açısından, literatürde %5 ile %17,5 arasında değişen değerler bildirilmektedir. Bu geniş aralık, kanola küspesinin nem içeriğinin işleme yöntemlerine, hasat zamanına ve saklama koşullarına bağlı olarak değişebileceğini ortaya koymaktadır (Jayas vd., 1988; Khattab ve Arntfield, 2009; Petraru ve Amariei, 2024). Örneğin, kanola küspesi taze işlenmişse veya uygun saklama koşulları sağlanmazsa nem içeriği yüksek olabilmektedir. Yüksek nem oranı, küspenin mikrobiyal yükünün yükselmesine ve potansiyel olarak zararlı mikroorganizmaların gelişmesine neden olabilmektedir. Bu durum, ürünün kalitesini ve güvenliğini olumsuz yönde etkileyebilir (Ayub vd., 2003). Çalışmada tespit edilen nem içeriği de literatürdeki bu değerlerle paralellik göstermektedir. Bu bulgular kanola küspesinin işleme sırasında nem oranının kontrol edilmesinin önemini vurgulamaktadır.

Kanola küspesi kül miktarı için Khattab ve Arntfield (2009) tarafından yapılan bir çalışmada ham kül miktarının %6,26 olarak belirlenmiş olması, bu çalışmada elde edilen sonucu desteklemektedir. Bu durum, kanola küspesinin mineral içeriği açısından da zengin bir yem ve gıda katkı maddesi olabileceğini göstermektedir.

4.2. Deney Tasarımı Kapsamında Oluşturulan Hidrolizatların Analizleri

Deneme desenine uygun olarak hazırlanan örneklerin detaylı analizleri tamamlanmıştır. Bu analizler, örneklerin belirli parametrelere (ultrasonik muamele 1, ultrasonik muamele 2, proteaz 1, proteaz 2 ve ultrafiltrasyon) göre incelenmesini içermektedir. Tablo 3.2 üzerinde belirtilen formülasyonlara uygun olarak hazırlanan 25 hidrolizatın serbest amino asit (% w/w) miktarları, antioksidatif etkinliği, toplam

fenolik madde miktarı ve hidroliz derecesi gibi 4 farklı özellik analiz edilmiştir. Analiz sonuçları Tablo 4.2’de verilmiştir. Ancak, yapılan 4 farklı analiz içerisinde birincil optimizasyon kriteri olarak serbest amino asit miktarı kullanılmıştır. Diğer analizler (antioksidan derecesi, toplam fenolik madde miktarı ve hidroliz derecesi), sonuçların bütüncül bir değerlendirmesini sağlamak amacıyla yapılmış olup sonuçların karşılaştırılması ve yorumlanması için değerlendirilmiştir. Bu yaklaşım, protein hidrolizatlarının genel kalitesinin ve biyolojik etkinliğini daha kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesine olanak sağlayabilecektir.

Yapılan bir optimizasyon çalışmasında çalışmada, palm çekirdeği küspesinin (PKC) besin değerini artırmak amacıyla enzimatik hidroliz, Taguchi yöntemi ile optimize edilmiştir. Optimizasyon sürecinde substrat yüzdesi (%10, %12, %14), inkübasyon süresi (2, 4, 6 saat) ve enzim miktarı (250, 500, 750 birim) gibi faktörler değerlendirilmiştir. Sonuçlar, %14 substrat, 6 saat inkübasyon süresi ve 750 birim enzim kullanıldığında en yüksek protein salınımının gerçekleştiğini göstermiştir. Optimizasyon ile protein salınımı tahmin edilen değerden üç kat daha yüksek çıkmıştır (Sathitkowitz vd., 2018). Literatürde, farklı uygulama alanları ve sektörlerde gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarının da çeşitli problemler için optimum yanıtlar sunduğu ve etkili sonuçlar elde ettiği görülmüştür (Cheung ve Chan, 2010; Chavan ve Gaikwad, 2021).

Tablo 4.2: Deneme desenine uygun biçimde hazırlanan numunelerin serbest amino asit miktarı (SAA, %), hidroliz derecesi (HD, %), toplam antioksidan miktarı (TAM, TE, mg/100g) ve toplam fenolik madde miktarı (TFM, GAE, mg/100g) değerleri

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Deney No	SAA (%)	HD (%)	TAM (TE, mg/100g)	TFM (GAE, mg/100g)
1	0,55±0,2	18,0±0,1	27,75±0,1	314,95±4,0
2	0,84±0,0	16,1±0,1	34,74±0,2	321,34±9,5
3	1,06±0,1	17,4±0,1	34,79±0,6	327,20±10,2
4	0,56±0,3	15,9±0,2	36,29±0,4	369,28±3,4

5	0,79±0,2	18,1±0,4	37,58±0,2	316,28±12,3
6	0,91±0,2	19,7±0,7	36,96±0,2	368,22±1,5
7	1,16±0,1	23,9±0,6	29,88±0,4	358,63±8,9
8	0,71±0,3	19,4±0,4	35,63±0,1	366,09±6,1
9	0,62±0,2	13,6±6,2	37,46±0,2	340,52±12,6
10	0,43±0,3	14,6±4,7	36,50±0,4	320,27±13,2
11	0,656±0,2	24,8±0,1	41,44±0,4	368,48±5,5
12	0,62±0,2	14,4±0,1	42,27±0,8	341,32±14,1
13	0,67±0,3	19,8±0,2	37,42±0,8	375,94±0,6
14	0,90±0,0	20,9±0,5	42,25±0,4	371,41±2,8
15	1,02±0,1	22,0±0,4	42,96±0,3	381,54±1,5
16	0,83±0,2	21,0±0,6	42,19±0,5	379,94±0,9
17	0,90±0,2	29,5±0,4	40,15±1,4	316,01±1,9
18	1,00±0,1	19,0±0,1	43,02±0,7	351,30±11,8
19	1,14±0,0	29,8±0,0	38,63±0,2	375,94±9,8
20	0,51±0,2	23,1±0,3	43,69±0,1	350,90±25,2
21	0,96±0,1	21,5±0,5	43,09±0,2	347,97±9,5
22	0,77±0,2	22,9±0,1	42,35±0,3	349,57±2,1
23	0,51±0,3	12,8±0,0	42,31±0,4	281,32±10,1
24	0,77±0,2	17,6±0,6	41,90±0,4	311,22±8,9
25	0,99±0,0	20,1±1,1	30,61±0,1	363,29±7,5

4.2.1. Serbest Aminoasit (%) Değerleri ve İstatiksel Analizleri

Protein hidrolizatları, protein kaynaklarının kısmi hidrolizi sonucunda oluşan polipeptitler, oligopeptitler ve serbest amino asitlerin bir karışımı olarak tanımlanmakta ve çok yönlü kullanım alanlarıyla dikkat çekmektedir (Schaafsma, 2009). Bu ürünler, gıda ve beslenme endüstrisi, tarım ve bitki yetiştiriciliği, hayvan beslenmesi ve sağlığı, farmasötik ve terapötik uygulamalar, kozmetik ve kişisel bakım ürünleri, diyetetik ve sağlık destek ürünleri gibi çeşitli sektörlerde yüksek değerli bileşenler olarak önemli bir yere sahiptir.

Protein hidrolizatlarının işlevselliğini belirleyen en kritik unsurlardan biri, içerdiği serbest amino asitlerdir. Bu amino asitlerin miktarı ve profili, ürünün besin değeri, sindirilebilirliği, emilim hızı, biyolojik aktivitesi ve formülasyonlardaki performansını doğrudan etkilemektedir. Bu özellikler, protein hidrolizatlarının gıda, tarım, farmasötik ve kozmetik sektörleri gibi birçok alandaki kullanım potansiyelini şekillendirmektedir.

Serbest amino asitler hem insan hem de hayvan beslenmesinde yaygın olarak kullanılan diyet takviyeleridir. Yüksek sindirilebilirlikleri, proteinlere kıyasla daha hızlı emilim sağlamaları ve biyolojik aktivitelerin etkinliğini artırmaları gibi görevleri üstlenmektedir (Rønnestad vd., 2000; Sierras vd., 2015; Yin vd., 2016). Serbest amino asitlerin biyokimyasal aktivitelerdeki kritik rolü de dikkat çekicidir. Hücresel enerji metabolizması, protein sentezi ve taşıma süreçlerinde önemli işlevler üstlenen bu bileşenler (Riggs ve Walker, 1963; Paddon-Jones vd., 2004), bağışıklık sisteminin güçlendirilmesinde de etkili bir araçtır. Özellikle arginin, glutamin ve sistein gibi amino asitlerin diyetle takviyesi, yetersiz beslenme veya enfeksiyon hastalığı olan bireylerde bağışıklık fonksiyonlarını artırmaktadır (Li vd., 2007).

Bu çalışma kapsamında, serbest amino asitlerin işlevselliği göz önüne alınarak serbest amino asit miktarı analizi birincil kriter olarak kabul edilmiştir. L25 ortogonal deney tasarımı neticesinde hazırlanan numunelerin serbest amino asit miktarları Tablo 4.2'de sunulmuştur. Elde edilen veriler, Minitab® 18 yazılımında istatistiksel olarak analiz edilerek değerlendirilmeye alınmıştır. Bu analizler, serbest amino asitlerin protein hidrolizatlarının etkinliği ve farklı alanlardaki uygulama potansiyelini anlamada temel bir referans sunmaktadır. Tablo 3.2'de yer alan protein hidrolizatı hazırlama koşulları ve Tablo 4.2'deki serbest amino asit (SAA) sonuçları incelendiğinde, en düşük serbest

amino asit %0,43 ile 10 numaralı numune (24 dk Ultrason1, Ultrasonik muamele 2 uygulanmamış, %20 Proteaz 1, %40 Proteaz 2 ve 8x ultrafiltrasyon), en yüksek serbest amino asit miktarı ise %1,16 ile 7 numaralı (24 dk Ultrason1, 24 dk Ultrasonik muamele 2, %60 Proteaz 1, %80 Proteaz 2 ve ultrafiltrasyon uygulanmamış) numunedir. Deney tasarımı kapsamında, serbest amino asit miktarlarının ortalaması yaklaşık %0,8 olarak hesaplanmıştır.

Deney tasarımı doğrultusunda elde edilen numunelerin serbest amino asit içerikleri, verilerin genişliği nedeniyle Tablo 4.3.1, Tablo 4.3.2 ve Tablo 4.3.3 olarak üç ayrı tabloya ayrılmıştır. Bu tablolarda sunulan veriler, protein hidrolizatlarının geliştirilmesi ve optimizasyonu açısından önemli bir temel oluşturmaktadır. Tabloların detaylı incelemesi sonucunda, birçok numunede glutamik asit, lösin, valin, treonin ve lizin gibi serbest amino asitlerin dikkate değer miktarlarda bulunduğu görülmüştür. Bu amino asitlerin varlığı hem besinsel hem de işlevsel açıdan önem taşımakta, hidrolizatların gıda, ilaç ve biyoteknoloji gibi farklı alanlardaki potansiyel uygulamalarına ışık tutmaktadır.

Bu kısımda, serbest amino asit düzeylerinin optimizasyonu amacıyla geliştirilen modelin veriye uyumunu değerlendirmek için yapılan analizlerde, açıklayıcılık oranı (R-sq) kullanılmıştır. Bu model, serbest amino asit değişkenindeki toplam varyansı açıklamayı amaçlamaktadır. Tablo 4.4'te, yapılan analizde modelin veriye uyumunu gösteren açıklayıcılık oranı (R-sq) %91,78 olarak hesaplanmıştır. Bu yüksek oran, modelin serbest amino asit değişkenindeki toplam varyansın önemli bir kısmını açıkladığını ve veriye önemli ölçüde uyum sağladığını göstermektedir.

Ultrason, enzim ve ultrafiltrasyon uygulamalarının serbest amino asit (SAA) miktarına etkisini incelemek amacıyla yapılan varyans analizi (ANOVA) sonuçları, Tablo 4.5'te sunulmaktadır. Bu analiz, her bir faktörün serbest amino asit üretimi üzerindeki etkilerini niceliksel olarak değerlendirerek, hangi faktörlerin daha fazla etkiye sahip olduğunu belirlemeyi amaçlamaktadır. Varyans analizi sonuçları, serbest amino asitlerin üretimini etkileyen farklı işleme koşullarının karşılaştırılması için önemli bilgiler sağlamaktadır. Tablo 4.2'de yer alan serbest amino asit miktarlarının değerlendirilmesi sonucunda, faktörler arasında anlamlı ($p \leq 0.05$) ve en belirgin etkiyi gösteren faktörün Proteaz 2 (Flavourzyme) muamelesi olduğu gözlemlenmiştir. Taguchi analizi sonuçlarına göre, Flavourzyme uygulamasının serbest amino asit miktarı üzerinde yaklaşık %53 oranında bir etkisi bulunmaktadır. Bu durum da

proteolitik enzimlerin serbest amino asit üretimindeki kritik rolünü ortaya koymaktadır. Bu etki oranı, protein hidrolizatlarının etkin amino asit salınımını artırmada Flavourzyme'in güçlü bir bileşen olduğunu göstermektedir.

Proteoliz, peptitler ve serbest amino asitler de dahil olmak üzere birçok küçük moleküler ağırlıklı nitrojen bileşiğinin oluşumunu sağlayan temel bir biyokimyasal süreçtir (Toldra, 1998). Bu süreçte etkili rol oynayan enzimlerden biri olan Flavourzyme hem ekzopeptidaz hem de endopeptidaz aktivitesi gösteren ve protein hidrolizinde yüksek verim sağlayan güçlü bir proteazdır (Waglay ve Karboune, 2016). *Aspergillus oryzae* kaynaklı olan Flavourzyme, protein yapılarını seçici ve etkin bir şekilde parçalayarak küçük peptitlerin ve serbest amino asitlerin açığa çıkmasını sağlamaktadır (Merz vd., 2015). Wu vd. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, başlangıçtaki toplam serbest amino asit miktarı salamura yönteminde 3.7414 g/kg, enjeksiyon yönteminde ise 3.8039 g/kg olarak ölçülmüş; Flavourzyme muamelesi sonrasında bu değerler sırasıyla 4.9160 g/kg ve 5.4061 g/kg seviyelerine yükselmiştir. Bu artış oranları, salamura yöntemi için %31,4, enjeksiyon yöntemi için ise %42,1 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca Flavourzyme uygulamasının protein yapılarını etkin bir şekilde parçalayarak serbest amino asit miktarını artırdığı, tilapia balığı protein hidrolizatı (Chuesiang vd., 2015), Kanton pastırması (Zhang vd., 2017), sığır kemiği hidrolizatı (Fan vd., 2020) ve buğday gluteni (Berends vd., 2014) gibi farklı protein kaynaklarında bulgulanmaktadır. Bu bulgular, enzim seçiminin enzimatik hidrolizatların bileşimi üzerinde belirleyici bir rol oynadığını ve Flavourzyme'in serbest amino asit oluşumunu anlamlı düzeyde artırarak proteoliz sürecinin verimliliğini artırabileceğini ortaya koymaktadır.

Tablo 4.3.1: L25 deneme deseni kapsamında hazırlanan numunelerin serbest amino asit içerikleri 1.kısım (% w/w)

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Serbest Amino Asit	1	2	3	4	5	6	7	8
Hidroksiprolin	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Histidin	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04
Asparajin	0,03	0,05	0,05	0,04	0,05	0,05	0,06	0,05
Serin	0,05	0,04	0,05	0,04	0,06	0,04	0,07	0,06
Glutamin	0,02	0,07	0,08	0,08	0,09	0,08	0,04	0,08
Arjinin	0,00	0,08	0,08	0,00	0,04	0,08	0,00	0,00
Glisin	0,05	0,01	0,02	0,05	0,04	0,01	0,03	0,06
Aspartik Asit	0,00	0,00	0,03	0,00	0,01	0,02	0,04	0,00
Glutamik Asit	0,14	0,05	0,07	0,07	0,09	0,05	0,16	0,10
Treonin	0,06	0,06	0,07	0,06	0,08	0,07	0,09	0,08
Alanin	0,04	0,03	0,04	0,04	0,05	0,04	0,07	0,05
Prolin	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00
Sistein	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00
Lizin	0,06	0,06	0,07	0,06	0,08	0,07	0,09	0,08
Tirozin	0,00	0,04	0,05	0,00	0,06	0,04	0,00	0,00
Metiyonin	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,03	0,00
Valin	0,06	0,07	0,08	0,08	0,09	0,08	0,10	0,10
İzolösin	0,00	0,05	0,06	0,00	0,00	0,05	0,06	0,00
Lösin	0,00	0,12	0,12	0,00	0,00	0,12	0,13	0,00
Fenilalanin	0,00	0,05	0,06	0,00	0,00	0,05	0,06	0,00
Triptofan	0,00	0,01	0,02	0,00	0,00	0,01	0,03	0,00
Toplam	0,55	0,84	1,06	0,56	0,79	0,91	1,16	0,71

Tablo 4.3.2: L25 deneme deseni kapsamında hazırlanan numunelerin serbest amino asit içerikleri 2.kısım (% w/w)

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Serbest Amino Asit	9	10	11	12	13	14	15	16
Hidroksiprolin	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Histidin	0,04	0,03	0,04	0,03	0,04	0,04	0,05	0,04
Asparajin	0,04	0,02	0,04	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05
Serin	0,04	0,02	0,05	0,04	0,05	0,05	0,06	0,04
Glutamin	0,02	0,09	0,11	0,03	0,00	0,10	0,09	0,04
Arjinin	0,00	0,07	0,05	0,05	0,00	0,03	0,00	0,00
Glisin	0,01	0,05	0,05	0,01	0,06	0,01	0,02	0,01
Aspartik Asit	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03	0,02
Glutamik Asit	0,09	0,00	0,06	0,08	0,17	0,08	0,13	0,11
Treonin	0,05	0,04	0,07	0,05	0,08	0,07	0,08	0,07
Alanin	0,03	0,00	0,04	0,03	0,04	0,05	0,06	0,04
Prolin	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Sistein	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01
Lizin	0,06	0,02	0,07	0,05	0,07	0,07	0,08	0,07
Tirozin	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Metiyonin	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,01	0,02	0,02
Valin	0,06	0,05	0,08	0,05	0,09	0,08	0,09	0,07
İzolösin	0,03	0,00	0,00	0,03	0,00	0,05	0,06	0,05
Lösin	0,10	0,00	0,00	0,09	0,00	0,11	0,12	0,12
Fenilalanin	0,04	0,00	0,00	0,03	0,00	0,05	0,05	0,05
Triptofan	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,02	0,02
Toplam	0,62	0,43	0,66	0,62	0,67	0,90	1,02	0,83

Tablo 4.3.3: L25 deneme deseni kapsamında hazırlanan numunelerin serbest amino asit içerikleri 3.kısım (% w/w)

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Serbest Amino Asit	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Hidroksiprolin	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Histidin	0,05	0,05	0,05	0,03	0,05	0,04	0,03	0,04	0,04
Asparajin	0,05	0,05	0,07	0,03	0,06	0,04	0,03	0,04	0,05
Serin	0,05	0,05	0,09	0,04	0,05	0,05	0,02	0,04	0,08
Glutamin	0,05	0,13	0,00	0,04	0,06	0,19	0,04	0,04	0,00
Arjinin	0,03	0,08	0,00	0,00	0,03	0,00	0,01	0,07	0,12
Glisin	0,01	0,02	0,08	0,01	0,01	0,06	0,01	0,01	0,06
Aspartik Asit	0,03	0,03	0,03	0,00	0,03	0,00	0,00	0,02	0,00
Glutamik Asit	0,10	0,05	0,31	0,06	0,11	0,04	0,06	0,07	0,23
Treonin	0,07	0,07	0,10	0,04	0,07	0,08	0,04	0,06	0,08
Alanin	0,05	0,05	0,09	0,03	0,05	0,05	0,02	0,03	0,07
Prolin	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Sistein	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00
Lizin	0,08	0,08	0,12	0,05	0,08	0,08	0,05	0,06	0,09
Tirozin	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,06	0,00	0,01	0,07
Metiyonin	0,02	0,00	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
Valin	0,08	0,09	0,12	0,05	0,09	0,08	0,05	0,06	0,10
İzolösin	0,05	0,06	0,00	0,03	0,06	0,00	0,03	0,04	0,00
Lösin	0,13	0,12	0,00	0,08	0,12	0,00	0,08	0,11	0,00
Fenilalanin	0,05	0,05	0,00	0,03	0,05	0,00	0,03	0,04	0,00
Triptofan	0,02	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00
Toplam	0,92	1,00	1,14	0,51	0,96	0,77	0,51	0,77	0,99

Tablo 4.4: Serbest amino asit miktarına göre belirlenmiş modelin R-sq. R-sq(adj) ve tahmin edilebilirlik değerleri

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

S	R-sq	R-sq(adj)
0,145438	91,78%	50,68%

Tablo 4.5: Ultrason, enzim ve ultrafiltrasyon uygulamalarının SAA miktarına etkisine yönelik varyans analizi (ANOVA) sonuçları

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Kaynak	DF	Seq SS	Katkı	F-değeri	P- değeri
Ultrasonik muamele 1	4	0,05241	5,09%	0,62	0,673
Ultrasonik muamele 2	4	0,03696	3,59%	0,44	0,779
Proteaz 1	4	0,08054	7,82%	0,95	0,518
Proteaz 2	4	0,54215	52,67%	6,41	0,050
Ultrafiltrasyon	4	0,23262	22,60%	2,75	0,175
Hata	4	0,08461	8,22%		
Toplam	24	1,02928	100,00%		

4.2.2. Optimizasyon Koşullarının Tanımlanması ve Uygulanması

Analizlerde, S/N oranları değerlendirilirken, yüksek S/N oranlarının (“the bigger the better”, yüksek daha iyidir) daha yüksek performansı temsil ettiği gözlemlenmiştir. Protein hidrolizatlarının çeşitli alanlardaki kullanılabilirliği ve serbest amino asitlerin rolü dikkate alındığında, elde edilen sonuçlar doğrultusunda optimize edilmiş örnekler seçilmiş ve ardından gerekli analizler gerçekleştirilmiştir.

Ultrasonik muamelelerin ve diğer yöntemlerin S/N oranları üzerindeki etkisini karşılaştırmayı amaçlayan grafik, yöntemlerin etkinliğini değerlendirmeyi hedeflemektedir. Şekil 4.1 incelendiğinde ultrasonik muamelelerin (Ultrasonik muamele 1 ve Ultrasonik muamele 2) genel olarak, S/N oranlarında belirgin bir

yükselme sağlamadığını göstermektedir. Bu durumda ultrasonik muamelelerin diğer yöntemlere kıyasla daha az etkili olduğu söylenebilmektedir. Ultrason işlemi, protein hidrolizatları üzerinde önemli etkiler yapabilmektedir. Yüksek enerjili ultrasonik dalgalar, proteinlerin yapısını bozarak veya hidroliz sürecini hızlandırarak daha küçük peptitlere ve amino asitlere parçalanmasını sağlamaktadır. Bu süreç sırasında protein molekülleri arasında bulunan hidrojen bağları ve diğer zayıf etkileşimler kırılmaktadır. Şekil 4.1 incelendiğinde ultrasonun, peptit zincirlerinin kısmen parçalanmasını destekliyor olabileceği ancak serbest amino asit miktarında anlamlı bir artış sağlamadığı düşünülebilmektedir. Ultrasonik muamelelerin, protein zincirlerinin fiziksel olarak parçalanmasını desteklese de serbest amino asitlerin artışı esasen enzimlerin substratlara spesifik etki mekanizmasına bağlı olabilmektedir. Eğer ultrason, enzimlerin aktif bölgelerine erişimi kolaylaştırmıyorsa veya enzimlerin etkisini artıracak koşullar oluşturmuyorsa, serbest amino asit miktarında anlamlı bir artış gözlenmeyebilmektedir.

Faktörlerin (Proteaz 1, Proteaz 2, Ultrasonik muamele 1 ve Ultrasonik muamele 2) serbest amino asit (SAA %) değerleri üzerindeki etkilerinin analiz edildiği Şekil 4.2, her bir faktörün standartlaştırılmış etkilerini göstermektedir. Kırmızı kesikli çizgi, %95 güven aralığına karşılık gelen 2,201 eşliğini belirlemekte olup etkilerin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını belirlemektedir. Şekil 4.2'deki Pareto grafiği, Proteaz 2'nin (B faktörü) serbest amino asit yüzdesi üzerinde en güçlü etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Özellikle Proteaz 2'nin ikinci dereceden etkisi (BB) anlamlılık sınırını (>2,201) aşmış olup serbest amino asit değerlerini artırmada önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, Proteaz 1 ve Proteaz 2'nin ikili etkileşimi (AB) de anlamlı (>2,201) bulunmuştur. Bu iki proteazın birlikte kullanıldığında sinerjik bir etki sağlayarak serbest amino asit değerlerini daha da yükseltebileceğine işaret etmektedir. Proteaz 1 ve Ultrasonik muamele 2'nin etkileşimi (AD) de pozitif etkilere sebep olabilmektedir. Proteaz 1 ve Ultrasonik muamele 2'nin etkileşimi, farklı faktörlerin kombinasyonlarının serbest amino asit üzerinde pozitif etkiler yaratabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, tek başına B faktörü ve Proteaz 2 ile Ultrasonik muamele 1'in etkileşimi (BC) de belirli bir etki yaratmış, ancak anlamlılık sınırını (<2,201) aşmamıştır.

Proteaz 1 ve Proteaz 2 seviyelerinin serbest amino asit üzerindeki etkilerini görsel olarak incelendiği Şekil 4.3'teki kontur grafiği ise Proteaz 2 seviyesinin yüksek olduğu

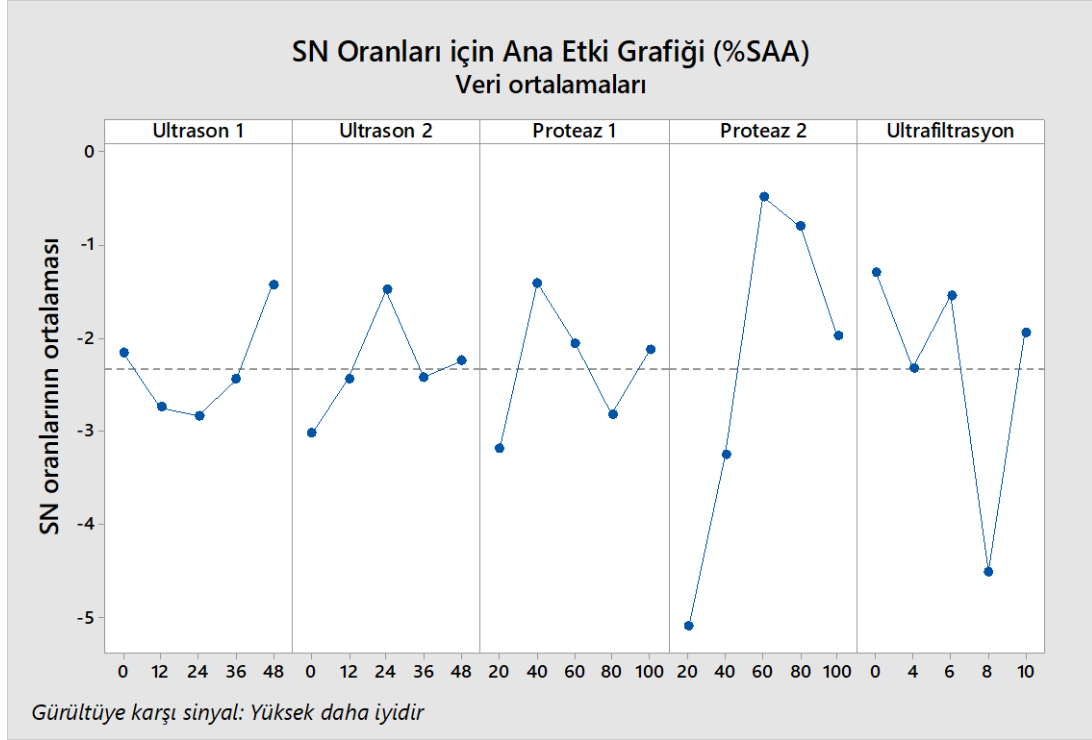
bölgelerde (yaklaşık %60-100 aralığında), serbest amino asit değerlerinin en yüksek seviyelere ulaştığı görülmektedir. Özellikle Proteaz 1 seviyesinin de 60-90 aralığında olduğu kombinasyonlarda, serbest amino asit yüzdesi 0,8 ve üzerine çıkmaktadır. Bu durumda iki proteazın birlikte yüksek seviyelerde kullanıldığında serbest amino asit değerlerinde maksimum etkiye ulaşıldığını göstermektedir. Daha düşük serbest amino asit değerleri ise Proteaz 2 seviyesinin düşük olduğu (%20-40 aralığı) alanlarda gözlemlenmiştir, bu da Proteaz 2'nin etkisinin serbest amino asit üretiminde belirleyici bir faktör olduğunu desteklemektedir.

Genel olarak bu iki grafik, özellikle Proteaz 2'nin serbest amino asit yüzdesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu, ayrıca Proteaz 1 ve Ultrasonik muamele 2 ile olan etkileşimlerinin sinerjik etkiler yaratarak serbest amino asit değerlerini artırabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, optimum serbest amino asit seviyesine ulaşmak için Proteaz 1 ve Proteaz 2 seviyelerinin birlikte optimize edilmesi gerektiğini ve özellikle Proteaz 2'nin yüksek seviyede tutulmasının önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Proteaz 2, özellikle %60 ve %80 seviyelerinde daha yüksek serbest amino asit oranları sergileyerek olumlu bir etki göstermiştir. Ayrıca, Tablo 4.6 incelendiğinde, %60 ile %80 arasındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu gözlemlenmekte, bu durum optimum seviyeye ulaşmak için Proteaz 2 seviyesinin %80 olarak kabul edilebileceğini ortaya koymaktadır.

Ultrafiltrasyon işlemi için ise Şekil 4.1'de elde edilen verilerde, serbest amino asit miktarını arttırmaya yönelik belirgin ölçüde bir fayda sağlamadığı gözlenmektedir. Foh vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, tilapya protein hidrolizatları 1, 3 ve 5 kDa moleküler ağırlık kesme sınırlarına (MWCO) sahip ultrafiltrasyon membranları kullanılarak fraksiyonlanmış ve düşük moleküler ağırlıklı fraksiyonların daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ancak, bu işlem sonucunda serbest amino asit miktarında anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Bu nedenle, serbest amino asit içeriğini arttırmaya yönelik bir amaçla ultrafiltrasyon kullanımı gerekli görülmemektedir.

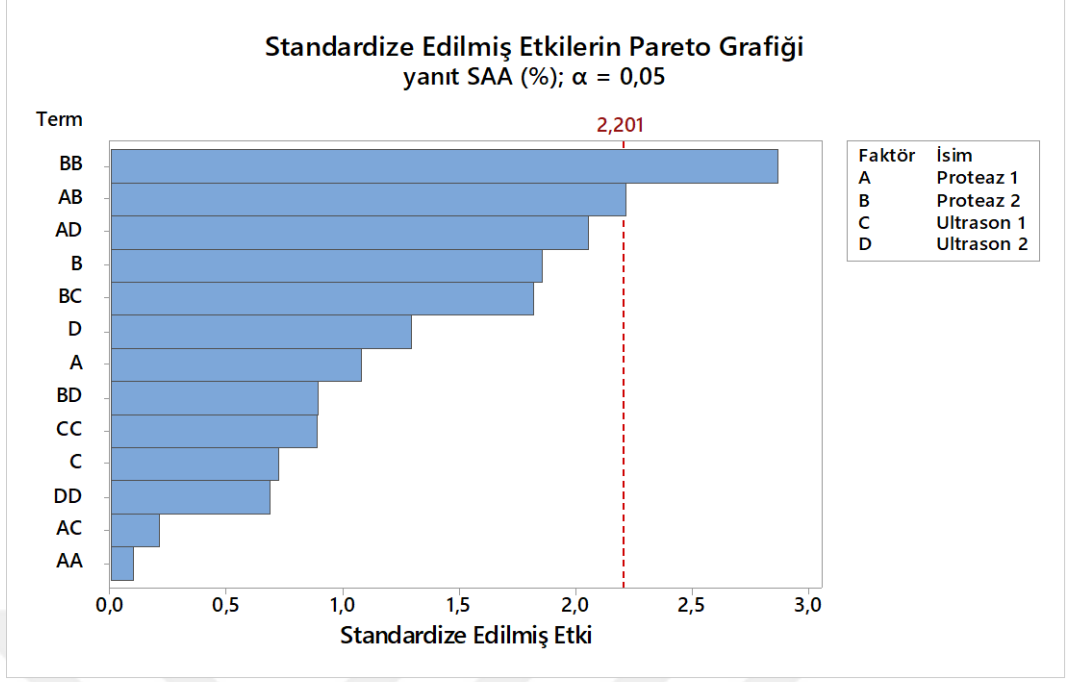
Bu sonuçlar doğrultusunda her bir faktör için belirlenen en iyi seviyeler kullanılarak optimize numunenin koşulları (Ultrasonik muamele 1 ve Ultrasonik muamele 2) sırasıyla 48 ve 24 dakika, proteaz 1 muamelesi için (Alcalase, 2 AU/ml) %40, proteaz 2 (Flavourzyme, 1000 L) muamelesi için %80 olarak seçilmiştir. Serbest amino asit miktarında belirgin bir artış gözlemlenememesi nedeniyle, optimize edilen numune

için ultrafiltrasyon işlemi uygulanmamasına karar verilmiştir. Sonuç olarak, her bir faktörün belirlenen en etkili seviyelerinin birleşimi, deneme deseninde elde edilen en yüksek SAA içeren numunenin ötesine geçmeyi hedeflemiştir.



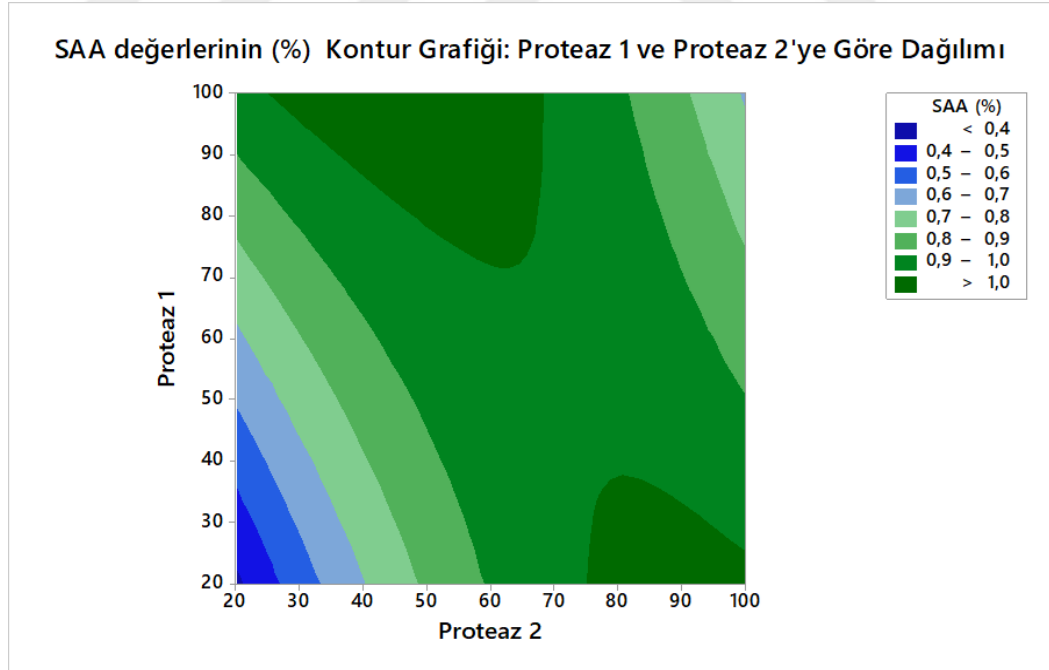
Şekil 4.1: Serbest amino asit madde miktarı sonuçlarına göre oluşturulan S/N oranlarının ana etki grafiği gösterimi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



Şekil 4.2: SAA (%) değerleri üzerindeki faktör ve etkileşimlerin standardize edilmiş etkilerinin pareto grafiği

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.



Şekil 4.3: SAA değerlerinin (%) Proteaz 1 ve Proteaz 2'ye göre kontur grafiği

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Tablo 4.6: Flavourzyme miktarlarına ait farklı değerlerin ortalama hesaplamaları ve istatistiksel gruplama analizi tablosu

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Değerler (%)	N	Ortalama	Gruplama	
60	5	0.9480	A	
80	5	0.938	A	
100	5	0.8120	A	B
40	5	0.7060	A	B
20	5	0.5575	B	

4.2.3. Hidroliz Derecesi ve İstatistiksel Analizleri

Hidroliz derecesi (%HD), genellikle peptit bağı hidrolizinin seviyesini değerlendiren bir parametre olarak proteolizin takibi için kullanılmaktadır (Adler-Nissen, 1984). Hidroliz derecesi, protein hidrolizatlarının enzimatik parçalanma sürecinin etkinliğini ve tamamlanma seviyesini göstermekte, bu parametre elde edilen hidrolizatlarda bulunan peptitlerin biyolojik aktivitesini ve fonksiyonel özelliklerini etkilemektedir (Girgih vd., 2011). Hidroliz derecesinin doğru seçimi, peptitlerin biyolojik aktivitesini etkilemenin yanı sıra fonksiyonel özelliklerin modülasyonu ve antioksidan aktivitenin artırılması açısından da büyük önem taşımaktadır (Li vd., 2015). Bu nedenle, hidroliz derecesinin optimizasyonu, protein hidrolizatlarının fonksiyonel ve biyolojik özelliklerinin iyileştirilmesi için kritik bir rol oynayabilir.

Hidroliz derecesi optimizasyonu amacıyla geliştirilen modelin veriye uyumunu değerlendirmek için Tablo 4.7 incelendiğinde modelin veriye uyumunu gösteren açıklayıcılık oranı yaklaşık %96 olarak hesaplanmıştır. Bu yüksek oran, modelin hidroliz derecesi değişkenindeki toplam varyansın büyük bir kısmını açıkladığını ve veriye oldukça yüksek ölçüde uyum sağladığını göstermektedir.

Yapılan optimizasyon çalışması sonucu protein hidrolizatlarındaki hidroliz derecesini önemli derecede ($p \leq 0.05$) artıran faktörlerin yaklaşık %36 ile Ultrasonik muamele 1

(26 kHz) ve %32 etki ile proteaz 2 (Flavourzyme, 1000 L) olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.8).

Pirinç proteinleri üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, 28 kHz frekansında uygulanan ultrason ön işleminin sonokimyasal etkileri detaylı bir şekilde incelenmiştir. Araştırma bulguları, ultrasonik ön işlemin protein yapısındaki çapraz bağları kırarak enzim ile substrat arasındaki etkileşimi önemli ölçüde artırdığını ($p \leq 0.05$) ve bu artışın hidroliz derecesinde (DH) belirgin bir yükselmeye neden olduğunu göstermektedir. Çalışmada, ultrason ve ultrason destekli alkali ön işlemlerinin pirinç proteininin enzimatik hidrolizini iyileştirdiği belirlenmiştir. Enzimatik hidroliz sonrasında kontrol grubunda DH %16,5 olarak ölçülürken, yalnızca ultrason uygulanan grupta bu değer %19,3'e, ultrason destekli alkali ön işlem uygulanan grupta ise %21,2'ye yükselmiştir. Benzer şekilde, protein elüsyon miktarı kontrol grubunda 62,08 µg/mL olarak belirlenirken, ultrason grubunda 178,1 µg/mL ve ultrason destekli alkali grubunda 716,4 µg/mL'ye ulaşmıştır. Ultrasonik muamele sonrası protein yapısındaki değişimler çeşitli spektroskopik analizler ile doğrulanmıştır. UV-Vis spektroskopisi sonuçları, ultrason işleminin protein yapısını açarak hidrofobik grupların dışa çıkmasını sağladığını göstermektedir. CD spektroskopisi (Circular Dichroism) analizleri ise α -heliks içeriğinde %48,8'e varan azalma olduğunu, buna karşılık β -tabaka ve rastgele sarmal yapıların oranında artış meydana geldiğini ortaya koymuştur. Floresans spektroskopisi ile yapılan değerlendirmeler, ultrason uygulaması sonrası proteinlerin daha fazla açıldığını ve yapılarında belirgin değişiklikler meydana geldiğini göstermektedir. Amino asit analizleri, hidrofobik amino asitlerin toplam amino asitlere oranının ultrason uygulanan grupta %42,3, ultrason destekli alkali ön işlem grubunda ise %44,5 olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, ultrason işleminin protein çözünürlüğünü artırarak enzimatik erişilebilirliği iyileştirdiğini kanıtlamaktadır (Li vd., 2016).

Başka bir çalışmada, yağsız soya unu Flavourzyme 1000 L, Novozym FM 2.0 L ve Alcalase 2.4 L FG olmak üzere 3 farklı proteaz ile enzimatik olarak hidrolize edilmiştir. Çalışmanın sonuçları, Flavourzyme'in en yüksek hidroliz derecesine (DH %39,5) ulaştığını ve bu derecenin diğer proteazlarla kıyaslandığında belirgin bir artış gösterdiğini ortaya koymuştur (Hrekova vd., 2002). Flavourzyme'in hidroliz etkinliğinin yüksek olmasının temel nedeni hem ekzopeptidaz hem de endopeptidaz aktivitesine sahip olmasıdır. Bu özellik, proteinin hem iç hem de uç bölgelerindeki

peptid bağlarının daha etkili bir şekilde parçalanmasını sağlayarak, daha küçük peptitlerin ve serbest amino asitlerin açığa çıkmasına olanak tanımaktadır. Özellikle, diğer proteazlara kıyasla daha yüksek miktarda serbest amino asit salınımı gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, enzim seçiminin hidroliz verimliliği üzerinde belirleyici bir rol oynadığını ve Flavourzyme'in enzimatik hidroliz süreçlerinde etkin bir proteaz olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Optimize edilmiş numuneyi belirlemek için incelenen Şekil 4.4'te, Ultrasonik muamele 1 işlemi S/N oranında belirgin bir artış göstermekte olup, özellikle 48 dakika seviyesinde yüksek değerler elde edilmiştir, bu yüzden bu süre tercih edilmelidir. Ultrasonik muamele 2 işleminde ise S/N oranları dalgalı bir seyir izlemektedir; dolayısıyla, orta düzeyde yüksek sonuçların gözlemlendiği 12 ve 24 dakika seviyeleri uygun seçenekler olarak öne çıkmaktadır. Proteaz 1 ve Proteaz 2 işlemlerinde dalgalı bir seyir görülmektedir. Proteaz 1 işleminde %60 ve %100 seviyeleri en yüksek değerlere ulaşırken, Proteaz 2 işleminde %60 ve %100 seviyeleri tercih edilebilir. Bu iki işlemde de sabit ve yüksek değerlerin seçilmesi önemlidir. Ek olarak, ultrafiltrasyon sisteminde konsantrasyon seviyesi arttıkça hidroliz derecesinin düştüğü gözlemlenmiştir. Bu durum, ultrafiltrasyon işlemi uygulanmadığında daha yüksek hidroliz derecelerinin elde edildiğini göstermiştir. Dolayısıyla, yüksek konsantrasyon seviyelerinin hidroliz verimliliğini olumsuz etkilediği dikkate alınarak, ultrafiltrasyon işleminin uygulanmamasının daha uygun bir yaklaşım olduğu sonucuna varılmıştır. Bu seçimler doğrultusunda, işlemler arasındaki en önemli ve en sabit değerler belirlenerek S/N oranı optimize edilebilmektedir.

Tablo 4.7: Hidroliz derecesine göre belirlenmiş modelin R-sq, R-sq(adj) ve tahmin edilebilirlik değerleri

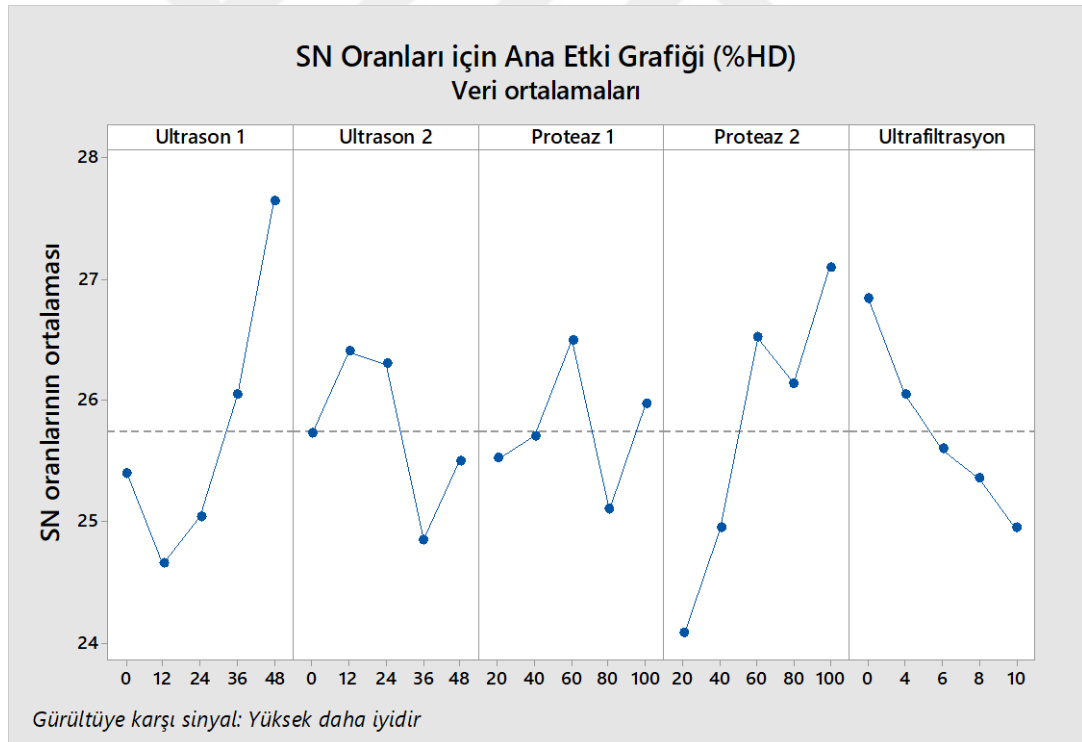
Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

S	R-sq	R-sq(adj)
2,21346	95,71%	74,27%

Tablo 4.8: Ultrason, enzim ve ultrafiltrasyon uygulamalarının hidroliz derecesine etkisine yönelik varyans analizi (ANOVA) sonuçları

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Kaynak	DF	Seq SS	Katkı	F-Değeri	P-Değeri
Ultrasonik muamele 1	4	163,14	35,70%	8,32	0,032
Ultrasonik muamele 2	4	42,34	9,27%	2,16	0,237
Proteaz 1	4	31,02	6,79%	1,58	0,334
Proteaz 2	4	146,22	32,00%	7,46	0,039
Ultrafiltrasyon	4	54,60	11,95%	2,79	0,172
Hata	4	19,60	4,29%		
Toplam	24	456,92	100,00%		



Şekil 4.4: Hidroliz derecesi sonuçlarına göre oluşturulan S/N oranlarının ana etki grafiği gösterimi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

4.2.4. Toplam Antioksidatif Aktivitenin Belirlenmesi ve İstatiksel Analizleri

Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize ederek hücrel hasarı engellemekte ve böylece hücrel hasarı önlemektedir. Toplam antioksidatif aktivite, protein hidrolizatlarının etkinliğini değerlendirmede önem taşımaktadır. Antioksidanlar, oksidatif stresin azaltılmasına ve bağışıklık sisteminin güçlendirilmesine katkı sağlamaktadır. Oksidatif stres, serbest radikallerin fazlalığı sonucu hücrel yapıları ve DNA'yı hasara uğratmaktadır. Protein hidrolizatları, serbest radikalleri nötralize ederek hücreleri oksidatif hasardan korumakta ve kanser, kalp hastalıkları gibi riskleri azaltmaktadır (Hajian, 2014; Wang, 2017).

Protein hidrolizatlarının etkisi yalnızca insan sağlığıyla sınırlı değildir. Tarım, hayvancılık ve gıda endüstrisinde de fayda sağlamaktadır. Oksidatif stresin azalması, bitki büyümesini teşvik etmektedir. Protein hidrolizatları, bitkilerin büyümesini desteklerken, tuz ve kuraklık gibi abiyotik stres koşullarına karşı dayanıklılık sağlamaktadır. Abiyotik stres, çevresel faktörlerden (sıcaklık, su eksikliği) kaynaklanmaktadır. Antioksidan özelliklere sahip protein hidrolizatları, bitkilerin sağlıklı gelişmesini ve çevresel faktörlere karşı direnç göstermesini sağlamaktadır (Colla vd., 2015; Kasote vd., 2015). Hayvan beslenmesinde ise, protein hidrolizatları sindirilebilirliği artırarak verimliliği ve bağışıklık sistemini güçlendirmektedir (Ponnampalam vd., 2022). Gıda endüstrisinde ise, bu bileşiklerin doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılması, ürünlerin raf ömrünü uzatmakta ve gıda güvenliğini artırmaktadır (Finley ve Given, 1986). Sonuç olarak, protein hidrolizatları, sadece antioksidan özellikleriyle değil, bitki büyümesini teşvik etme, çevresel streslere karşı dayanıklılığı artırma ve besin değerini iyileştirme gibi birçok alanda önemli etkiler göstermektedir. Bu özellikleriyle, tarım, sağlık ve gıda endüstrilerinde değerli bir kaynak olarak öne çıkmaktadır.

Antioksidatif madde miktarı optimizasyonu amacıyla geliştirilen modelin veriye uyumunun değerlendirilmesinde, Tablo 4.9'da yer alan analiz sonuçlarına göre, modelin açıklayıcılık oranı %97 olarak belirlenmiştir. Bu yüksek oran, modelin antioksidan madde miktarı değişkenindeki toplam varyansın büyük bir kısmını açıkladığını ve veriye oldukça yüksek uyum sağladığını göstermektedir.

Yapılan optimizasyon çalışması sonucunda, protein hidrolizatlarındaki antioksidan aktiviteyi anlamlı düzeyde ($p \leq 0.05$) arttıran başlıca faktörlerin yaklaşık %49 ile

Ultrasonik muamele 1 ve %41 etki ile ultrafiltrasyon olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.10). Ultrasonik ön işlemin, proteinlerin çözünlüğünü ve antioksidan kapasitesini artırdığı literatürde yapılan çeşitli çalışmalarla doğrulanmıştır. Bu işlem sırasında, ultrason dalgaları protein yapısını kısmen bozarak çözümler yüzey alanını genişletir ve enzimlerin proteine daha kolay erişmesini sağlamaktadır (Su ve Cavaco-Paulo, 2021). Böylece, enzimatik hidroliz sürecinde nispeten daha küçük ve bazen biyoaktif peptitler açığa çıkmaktadır. Keçi sütü proteinleri üzerine yapılan bir çalışmada, ultrason uygulamasının çözümler protein konsantrasyonunu artırdığı ve işlenmemiş proteinin %15,66 olan antioksidan aktivitesini (DPPH radikal inhibisyonu) %68,9'a yükselttiği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, ultrasonik ön işlemin serbest radikalleri daha etkin nötrale edebilen güçlü antioksidan peptitlerin oluşumunu desteklediğini göstermektedir (Koirala vd., 2021). Yapılan başka bir çalışmada ise *Erythrina edulis* bitkisi protein hidrolizatlarında da ultrasonik uygulamanın antioksidatif madde miktarını artırdığını ve antioksidan özelliklere sahip kısa peptitlerin oluşmasını sağladığı belirlenmiştir (Guerra-Almonacid vd., 2019; Tawalbeh vd., 2023). Bu bulgular, ultrasonun protein yapısındaki işlevselliği ve antioksidan etkinliği artırmada önemli bir ön işlem olduğunu ortaya koymaktadır.

Ultrafiltrasyon, protein hidrolizatlarında büyük molekülleri uzaklaştırarak küçük peptitler ve serbest amino asitler yoğunlaştırmaktadır. Bu süreç, biyoyararlanımı yüksek küçük moleküllerin zenginleşmesini sağlamakta ve protein hidrolizatlarının antioksidan içeriğini artırmaktadır. Bu süreçte düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerin (örneğin kısa zincirli peptitler ve belirli amino asitler) yoğunlaşması sağlanırken, aynı zamanda büyük makromoleküllerin (örneğin belirli proteinler veya polimerler) uzaklaştırılması da mümkündür. Bu sayede, antioksidan etkiyi doğrudan artıran küçük moleküller daha saf bir yapı içerisinde bulunur ve etkinliğini daha fazla gösterebilir. Örneğin, Aondona vd. (2021) susam tohumu enzimatik protein hidrolizatı üzerine yaptığı çalışma, Famuwagun vd. (2021) patlıcan yaprağı protein hidrolizatı üzerinde yaptığı araştırma ve He vd. (2013) kolza tohumu protein izolatu üzerine gerçekteşirdiği çalışmalar, ultrafiltrasyon teknolojisinin bitkisel protein hidrolizatlarında antioksidan madde miktarını artırdığını göstermiştir.

Optimize edilmiş numunenin belirlenmesi işlemleri ile ilgili veriler Şekil 4.5 üzerinde sunulmaktadır. Ultrasonik muamele 1 işlemi, S/N oranında belirgin bir artış sağladığından, 36 veya 48 dakika seviyelerindeki yüksek değerler tercih edilmelidir.

Ultrasonik muamele 2 işleminde ise S/N oranları daha sabit ve kademeli bir artış gösterdiğinden, yine 36 veya 48 dakika seviyeleri uygun seçeneklerdir. Proteaz 1 ve Proteaz 2 işlemlerinde dalgalı bir seyir gözlemlenmekte olup, Proteaz 1 için %40 ve %100, Proteaz 2 için ise %80 veya %100 seviyeleri önerilmektedir. Her iki proteaz işleminde de sabit ve yüksek değerlerin seçilmesi önemlidir. Ultrafiltrasyon işleminde hızlı bir artışın ardından dalgalanmalar görülmekte olup, en yüksek değerler için 4, 6 veya 10 kat seviyeleri tercih edilmelidir. Bu seçimlerle, her işlem için en yüksek ve istikrarlı değerler belirlenerek S/N oranı optimize edilebilir.

Tablo 4.9: Toplam antioksidan madde miktarına göre belirlenmiş modelin R-sq, R-sq(adj) ve tahmin edilebilirlik değerleri

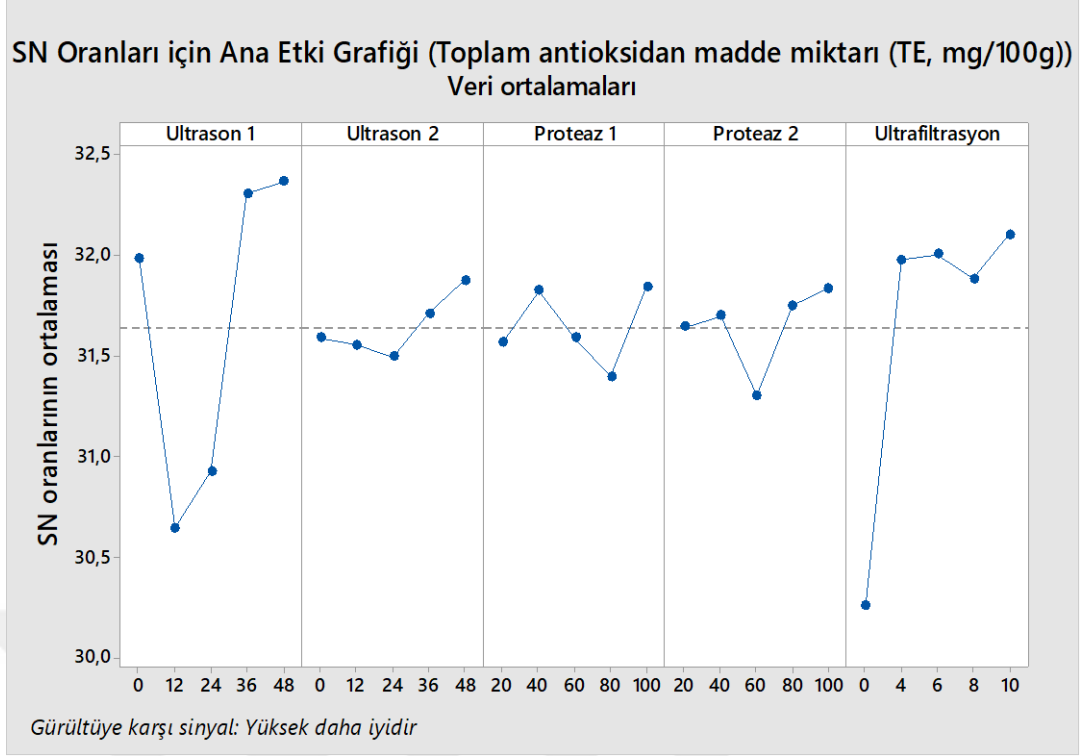
Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

S	R-sq	R-sq(adj)
1,90446	97,01%	82,06%

Tablo 4.10: Ultrason, enzim ve ultrafiltrasyon muamelelerinin toplam antioksidan madde miktarına etkisine yönelik varyans analizi (ANOVA) sonuçları

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Kaynak	DF	Seq SS	Katkı	F-Değeri	P-Değeri
Ultrasonik muamele 1	4	239,236	49,32%	16,49	0,009
Ultrasonik muamele 2	4	5,754	1,19%	0,40	0,804
Proteaz 1	4	10,233	2,11%	0,71	0,628
Proteaz 2	4	15,631	3,22%	1,08	0,472
Ultrafiltrasyon	4	199,729	41,17%	13,77	0,013
Hata	4	14,508	2,99%		



Şekil 4.5: Toplam antioksidan madde miktarı sonuçlarına göre oluşturulan S/N oranlarının ana etki grafiği gösterimi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

4.2.5. Toplam Fenolik Madde Tayini ve İstatiksel Analizleri

Protein hidrolizatlarında bulunan toplam fenolik maddeler, sahip oldukları güçlü antioksidan özellikleri sayesinde oksidatif stresle mücadele ederek hücre hasarını ve kronik hastalıkları önleme potansiyeline sahiptir (Li vd., 2014). Fenolik maddeler protein hidrolizatlarıyla etkileşime girerek, onların yapısal ve fonksiyonel özelliklerini etkileyebilmektedir. Emülsifiye etme, hidrofiliklik ve çözünürlük gibi özellikleri iyileştirmektedir (Zhao vd., 2022). *Cinnamomum kafura* tohumu çekirdeğinden elde edilen protein hidrolizatı antioksidan aktiviteyi artırırken hidroliz sonrası proteinlerin çözünürlük, emülsifiye edici özellikler ve stabilite gibi fonksiyonel özelliklerini iyileştirmiştir (Yan vd., 2021). Hayvan beslenmesinde de fenolik bileşiklerin doğal yem katkı maddesi olarak eklenmesinin, kümes hayvanları ve domuzlarda antioksidan,

bağışıklık, antimikrobiyal ve üretim performansı üzerinde olumlu etkiler sağlayabileceği vurgulanmaktadır (Mahfuz, Shang ve Piao, 2021).

Ayrıca fenolik bileşikler, bitki yaşam döngüsünde önem taşıyan ikincil metabolitlerdir. Bu bileşikler, bitkilerde hem normal hem de stresli koşullar altında üretilmektedir. Abiyotik stres altında, bitkiler fenolik asitler ve flavonoidlerin üretimini artırarak çevresel zorluklarla başa çıkmayı sağlamaktadır. Hücre bölünmesi, hormonal düzenleme, fotosentetik aktivite, besin alımı ve üreme gibi süreçlerde de önemli rol oynamaktadır (Sharma vd., 2019).

Fenolik madde miktarı optimizasyonu amacıyla geliştirilen modelin veriye uyumunun değerlendirilmesinde, Tablo 4.11’de yer alan analiz sonuçlarına göre, modelin açıklayıcılık oranı %88,78 olarak belirlenmiştir. Bu yüksek oran, modelin antioksidan madde miktarı değişkenindeki toplam varyansın büyük bir kısmını açıkladığını ve veriye oldukça yüksek uyum sağladığını göstermektedir.

Yapılan optimizasyon çalışması sonucunda, protein hidrolizatlarındaki toplam fenolik madde miktarını istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p \leq 0.05$) artıran bir faktör tespit edilememiştir. Bununla birlikte, Tablo 4.12 incelendiğinde, en yüksek etkiye sahip olan faktörün %31,15 ile Ultrasonik muamele 1 işlemi olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç, ultrasonik işlemin fenolik bileşikler üzerinde potansiyel bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim, mandalina kabukları üzerine yapılan bir çalışmada, ultrasonik muamelenin fenolik bileşikleri önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir (Ma vd., 2008).

Gerçekleştirilen muamelelerin (Ultrasonik muamele 1, Ultrasonik muamele 2, Proteaz 1, Proteaz 2, Ultrafiltrasyon) S/N oranları üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılan analiz, her bir yöntemin fenolik madde miktarını optimize etme üzerindeki etkinliğini ortaya koymaktadır. Bu analiz, yöntemlerin etkinliğini karşılaştırarak en verimli sonuçları veren muamelenin belirlenmesini sağlamayı hedeflemektedir. Optimize edilmiş numunenin belirlenmesi için Şekil 4.6’da yer alan grafik incelenmelidir. Bu şekil, farklı muamelelerin S/N oranları üzerindeki etkilerini ve en uygun koşulları görsel olarak sunmaktadır. Ultrasonik muamele 1 işleminde, işlem süresi arttıkça S/N oranında belirgin bir artış gözlemlenmektedir; özellikle 24 ve 36 dakika seviyelerinde yüksek değerlere ulaşılmaktadır, ancak 48 dakikada hafif bir düşüş yaşanmaktadır. 36 dakika seviyesi tercih edilebilir. Ultrasonik muamele 2

işlemi, nispeten dengeli bir seyir izlemekte olup 36 dakikada S/N oranında kısmi bir artış görülmektedir. Ancak genel olarak Ultrasonik muamele 2'nin etkisinin sınırlı olduğu anlaşılmaktadır, çünkü değerlerdeki değişimler küçük düzeyde kalmaktadır. Proteaz 1 işlemi sırasında S/N oranında dalgalanmalar görülmektedir. Özellikle %80 seviyelerinde yüksek değerler elde edilmiştir, bu da Proteaz 1'in belirli birimlerde toplam fenolik madde miktarını artırabildiğini göstermektedir. Proteaz 2 işleminde S/N oranında belirgin bir yükselme eğilimi gözlemlenmekte olup, %80 seviyesinde yüksek değerlere ulaşılmaktadır. Ultrafiltrasyon yapılmadığında fenolik madde miktarının en yüksek seviyede olduğu, ancak özellikle 8 ve 10 kat seviyelerinde belirgin bir düşüş yaşandığı görülmektedir; bu durum, yüksek konsantrasyon seviyelerinin fenolik madde miktarını olumsuz etkilediğini göstermektedir.

Tablo 4.11: Toplam fenolik madde miktarına göre belirlenmiş modelin R-sq, R-sq(adj) ve tahmin edilebilirlik değerleri

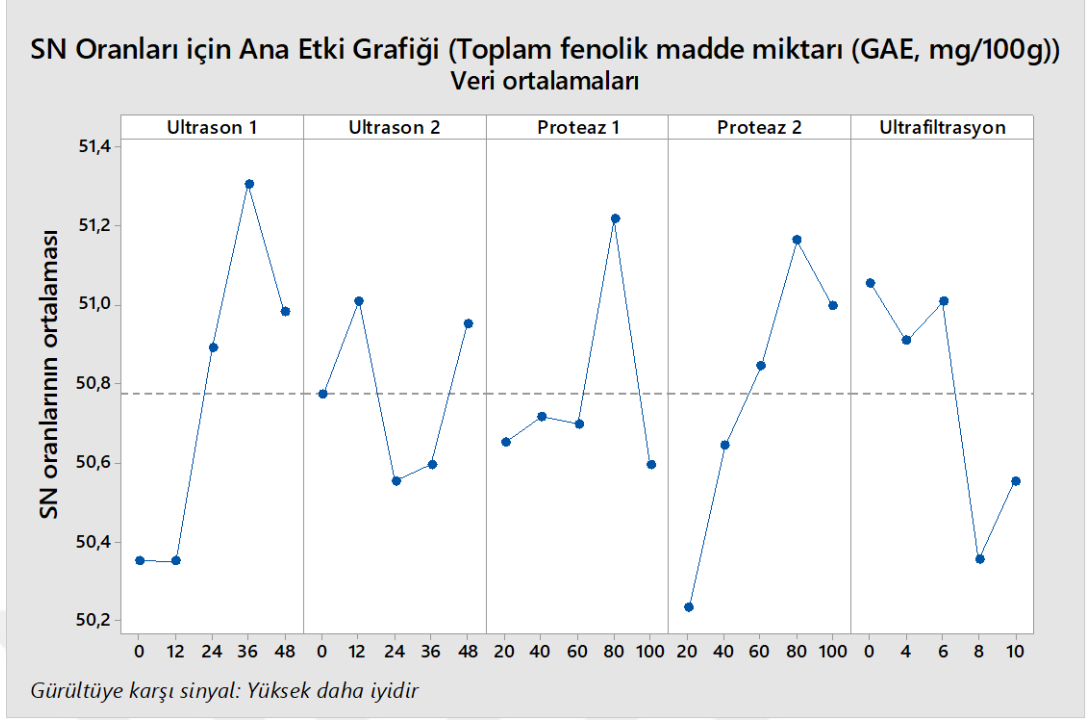
Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

S	R-sq	R-sq(adj)
21,9195	88,78%	32,67%

Tablo 4.12: Ultrason, enzim ve ultrafiltrasyon uygulamalarının toplam fenolik madde miktarına etkisine yönelik varyans analizi (ANOVA) sonuçları

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Kaynak	DF	Seq SS	Katkı	F-Değeri	P-Değeri
Ultrasonik muamele 1	4	5335	31,15%	2,78	0,173
Ultrasonik muamele 2	4	1303	7,61%	0,68	0,642
Proteaz 1	4	1963	11,46%	1,02	0,492
Proteaz 2	4	3837	22,41%	2,00	0,260
Ultrafiltrasyon	4	2767	16,15%	1,44	0,366
Hata	4	1922	11,22%		
Toplam	24	17126	100,00%		



Şekil 4.6: Toplam fenolik madde miktarı sonuçlarına göre oluşturulan S/N oranlarının ana etki grafiği gösterimi

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

4.3. Optimizasyon Sonucu Elde Edilen Numunenin Analizleri

Bu çalışmada, Taguchi L25 deneme tasarımı kullanılarak hazırlanan numunelerin istatistiksel analizleri, serbest amino asit miktarlarının optimize edilmesi üzerine odaklanılmaktadır. İstatistiksel analizler sayesinde farklı faktörlerin etkileşimleri incelenmiş ve bu etkileşimlerin etkileri doğrultusunda optimizasyon süreci başarılı bir şekilde yürütülmüştür. Kanola küspesinden elde edilen protein hidrolizatlarının optimizasyonu sonucunda, optimize edilmiş hidrolizat ve hidrolizatın buharlaştırılarak (evaporasyon) konsantre edilmiş halinin (Şekil 4.7) farklı sektörlerdeki muhtemel etkinlikleri, kalite özellikleri ve biyolojik etkilerini değerlendirmek amacıyla kapsamlı analizler yapılmıştır. Bu analizler, ürünlerin potansiyel kullanım alanlarını ortaya koymayı ve sektörel ihtiyaçlara uygunluğunu belirlemeyi hedeflemektedir. Elde edilen analiz sonuçları Tablo 4.13 üzerinde ayrıntılı olarak sunulmaktadır.



Şekil 4.7: Optimize edilerek elde edilen kanola proteini hidrolizatı (A) ve optimize protein hidrolizatının evaporasyon ile konsantre edilmiş formu (B)

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Bu çalışmada, protein hidrolizatının serbest amino asit içeriğini optimize etmek amacıyla Taguchi L25 deneysel tasarımı kullanılarak 25 farklı örnek hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, protein hidrolizatının ortalama serbest amino asit miktarı %0,8 (w/w) olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, en yüksek serbest amino asit miktarı %1,16 (w/w) olarak kaydedilmiştir. Deney tasarımı sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda optimize edilerek hazırlanan numunede, bu en yüksek değerin (%1,16) daha da üzerine çıkılması beklenmektedir.

Serbest amino asit içeriği, protein hidrolizatlarının biyolojik aktivitesi ve fonksiyonel özellikleri açısından önemli bir parametre olarak kabul edilmektedir. Yapılan analizler ve optimizasyon sonucu hazırlanan optimize numunenin serbest amino asit miktarı %1,42 (w/w) olarak bulunmuştur. Ayrıca, evaporasyon ile 10,7 kat konsantre edilmiş formdaki protein hidrolizatının serbest amino asit miktarı %12,72 (w/w) seviyesine

yükselmiştir. Bu sonuç, konsantrasyonun serbest amino asit içeriğini önemli ölçüde artırabileceğini ve potansiyel uygulamalar için daha verimli hale getirebileceğini göstermektedir. Elde edilen veriler, hidrolizatın serbest amino asit miktarını artıracak şekilde optimize edildiğini ve bu formülasyonların daha verimli kullanılabileceğini göstermektedir. Calvo vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada, farklı bitkisel ve hayvansal protein hidrolizatlarının serbest amino asit içeriklerinin %2 ila %18 arasında değiştiği belirlenmiştir. İncelenen protein hidrolizatları arasında hayvansal epitel ve bağ dokularından, kolajen ve elastinden, keçiboynuzu tohumu proteininden, yonca kalıntılarından, buğday damıtma çözeltilerinden ve alg proteininden elde edilen hidrolizatlar yer almaktadır. Bu çalışma ile elde edilen veriler, mevcut çalışmadaki konsantre numunenin literatürdeki tipik değerlerle uyumlu olduğunu göstermektedir. Ayrıca, Calvo vd. (2014) çalışmasında öne çıkan amino asitler arasında alanin, arginin, glisin, glutamik asit, glutamin, lösin, prolin ve valin bulunmaktadır. Optimize hidrolizat ve optimize konsantre numunelerinin serbest amino asit içerikleri Tablo 4.14 üzerinde sunulmuştur. Kanola optimize hidrolizatında özellikle glutamik asit, alanin, valin ve lösin amino asitlerinin belirgin düzeylerde bulunduğu tespit edilmiştir. Kanola optimize konsantre numunesinde ise bu amino asitlere ek olarak treonin de dikkate değer miktarlarda saptanmıştır. Treoninin konsantrasyon işleminde belirginleşmesi, suyun uzaklaştırılmasıyla amino asitlerin yoğunlaşması, treoninin stabilitesinin artması ve konsantrasyon sırasında farklı protein fraksiyonlarının zenginleşmesi gibi faktörlere bağlı olabilir. Bu sonuçlar, optimize edilen hidrolizat ve konsantrelerin serbest amino asit profillerindeki farklılıkları ve bu bileşenlerin potansiyel işlevselliğini ortaya koymaktadır.

Serbest amino asitler, gıda endüstrisinde hem besleyici hem de fonksiyonel bileşen olarak büyük önem taşımaktadır. Hidrolizattan elde edilen amino asitler, gıdaların protein içeriğini artırarak besleyici değerini zenginleştirmektedir. Ayrıca tat arttırıcı (umami), aroma geliştirme ve gıda formülasyonlarında dengeleyici ajan olarak işlev görmektedir (Nishimura ve Kato, 1988). Fermente gıdalarda, enerji barları ve sporcu besinlerinde kullanılabilen bu amino asitler, gıda ürünlerinde biyoaktif bileşenlerin varlığını artırarak sağlık faydalarını güçlendirmektedir. Bu bağlamda, elde edilen amino asitlerin sağlık üzerindeki potansiyel faydalarına yönelik daha geniş çaplı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Serbest amino asitlerin bitki büyümesini destekleyici etkileri de geniş çapta belgelenmiştir; örneğin hem bitkisel hem de hayvansal hidrolizatlarda bulunan amino asitler ve küçük peptitler, hormon benzeri bir etki göstererek nitrat asimilasyonunu teşvik etmektedir (Ertani vd., 2009). Bunun yanı sıra, biyostimülantlar glikoliz, Krebs döngüsü ve azot asimilasyonundaki enzimlerin aktivitelerini artırarak karbon ve azot metabolizmasını desteklemektedir (Schiavon vd., 2008). Yüksek biyoyararlanıma sahip besin kaynağı olarak hayvan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Özellikle genç hayvanların büyüme ve gelişim süreçlerini destekleyen serbest amino asitler, sindirimi kolaylaştırarak protein ihtiyacını karşılamaktadır (Wu vd., 2014). Farmasötik ve kozmetik alanlarında, serbest amino asitler cilt yenilenmesi ve nemlendirici etkileri nedeniyle tercih edilmektedir. Hidrolizat bazlı ürünler, yara iyileşmesini hızlandırıcı ve cilt bariyerini güçlendirici etkileriyle öne çıkmaktadır (Arribas-López vd., 2021). Ayrıca farmasötik formülasyonlarda aktif bileşen taşıyıcıları olarak da değerlendirilebilmektedir. Tıbbi beslenme ürünleri ve diyetetik uygulamalarda, serbest amino asitler düşük sindirim kapasitesine sahip bireyler için ideal bir protein kaynağı sunmaktadır. Yaşlılar, ameliyat sonrası iyileşme sürecindeki hastalar ve kronik hastalıklarla mücadele eden bireyler için özel beslenme ürünlerinde kullanılabilir (Azhar vd., 2021).

Protein hidrolizatlarının etkinliğini belirlemede hidroliz derecesi önemli bir rol oynamaktadır. Hidroliz derecesi, serbest amino asit ve küçük peptit miktarını doğrudan etkilemektedir. Hidroliz derecesi, proteinlerin daha kısa peptitlere ve serbest amino asitlere ayrılması ile doğrudan ilişkilidir ve bu da çözünürlük, emülsifikasyon ve biyoyararlanım gibi çeşitli fonksiyonel özellikleri olumlu yönde etkilemektedir (Kristinsson vd., 2000). Elde edilen analiz sonuçlarına göre, optimize edilmiş hidrolizatın hidroliz derecesi %25,3 iken, konsantre formda bu oran %28,1'e çıkmaktadır. Hidroliz derecesi bir oran olması sebebiyle konsantrasyon işlemi sırasında doğrudan artmamaktadır. Ancak, konsantrasyon işlemi sırasında ek hidroliz reaksiyonları gerçekleşirse (örneğin, sıcaklık veya enzim aktivitesi nedeniyle) veya işlemin hassasiyeti yeterince kontrol edilemezse, bu durum hidroliz derecesini arttırabilmektedir.

Optimize edilmiş numunelerdeki toplam antioksidan madde miktarı, hidrolizat formunda 30,75 TE mg/100g iken, konsantre formda bu değer 337,3 TE mg/100g'a ulaşarak kayda değer bir artış göstermektedir. Protein hidrolizatlarında yüksek

antioksidan içeriğinin bulunması, biyostimülant etkinliğini artırmada kritik bir rol oynamaktadır. Antioksidan bileşikler, bitkilerde oksidatif stresin zararlı etkilerini azaltarak hücre yapısının korunmasına ve hücresel işleyişin devamlılığına katkı sağlamaktadır. Bu özellik, bitkilerin çevresel stres faktörlerine – örneğin yüksek sıcaklık, tuzluluk ve kuraklık koşullarına – karşı direnç geliştirmesini desteklemektedir (Colla vd., 2015). Yapılan çalışmada, *Spirulina platensis*'in antioksidan bileşikler açısından zengin içeriğinin, *Triticum aestivum L.* bitkisinin çevresel stres faktörlerine, özellikle de kuraklık koşullarına, karşı direncini arttırdığı belirlenmiştir. *Spirulina* ile zenginleştirilen toprakta yetiştirilen buğday bitkilerinde, fenolikler ve flavonoidler gibi serbest radikal süpürücü antioksidan bileşiklerin konsantrasyonlarında belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Bu antioksidan bileşikler, reaktif oksijen türlerini (ROS) etkili bir şekilde nötralize ederek oksidatif stresi azaltmakta ve hücre zarlarının korunmasına katkı sağlamaktadır. Özellikle süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve peroksidaz (POD) gibi enzimatik antioksidan aktivitelerinin artışı, bitkinin oksidatif hasara karşı daha dirençli olmasını sağlarken, büyüme ve gelişim parametrelerinde de olumlu yönde değişikliklere yol açmıştır. Sonuç olarak, *Spirulina*'dan elde edilen hidrolizattaki antioksidan bileşiklerin, buğday bitkisinin kuraklık stresine karşı daha sağlıklı bir adaptasyon geliştirmesine ve sürdürülebilir tarım açısından önemli kazanımlar sağlamasına destek olduğu ortaya konulmuştur (El-Shazoly vd., 2024).

Toplam fenolik madde miktarı analizi sonuçlarına göre, optimize hidrolizatın toplam fenolik madde içeriği 387,50 g GAE/100 g iken, konsantre formda bu değer 4503,6 g GAE/100 g seviyesine ulaşmıştır. Fenolik madde içeriğindeki bu artış, fenolik bileşiklerin konsantrasyon arttıkça biyostimülant etkinliğinin de önemli ölçüde güçlendiğine işaret etmektedir. Literatürde, fenolik bileşiklerin bitki büyümesini destekleyici etkileri yaygın olarak kabul edilmiştir; bu bileşiklerin kök gelişimini teşvik ettiği, besin alımı ve taşınmasıyla ilişkili genlerin ekspresyonunu artırdığı ve bitki metabolizmasını düzenleyerek büyüme performansını iyileştirdiği bilinmektedir (Quaggiotti vd., 2004).

Azot, protein sentezi, enzim aktiviteleri ve hücre bölünmesi gibi temel biyolojik süreçlerin gerçekleşmesi için gereklidir. Canlıların vücut yapıları büyük ölçüde azot içeren bileşiklerden, özellikle proteinlerden oluşmaktadır (Novoa ve Loomis, 1981). Azot içeriği bakımından en önemli moleküller arasında proteinler öne çıkmakta olup,

bitkisel ve mikrobiyal hücrelerde toplam azotun %60'ını veya daha fazlasını oluşturduğu bilinmektedir. Bu çalışmada elde edilen protein hidrolizatının toplam azot miktarı %2,63 olarak belirlenmiş; konsantre edilmiş formunda ise bu değer %28,59'a ulaşarak azot içeriğinde önemli bir artış gözlemlenmiştir (Geisseler vd., 2010). Cavani vd. (2017) yaptığı çalışmada, 22 farklı bitkisel ve hayvansal protein hidrolizatı değerlendirilmiş; toplam azot miktarının %4,1 ile %17,7 arasında değiştiği ve ortalama %11,8 olduğu rapor edilmiştir.

Protein hidrolizatları, çoğunlukla amino asitler ve peptitlerden oluşmakta olup, amino asitlere ve küçük peptitlere ayrılmaları sayesinde, bitki tarafından alınabilen ve bitkisel gelişim süreçlerinde sinyal molekülleri olarak işlev görebilen organik nitrojen (N) formları üretmektedir (Ertani vd., 2018). Toplam azot içeriği (%), bitki büyümesi için gerekli temel besin maddelerinden biri olarak ve biyostimülant etkisinin etkinliğini belirleyen kritik bir unsur olarak öne çıkmaktadır (Colla vd., 2014; Rouphael vd., 2015). Dolayısıyla biyostimülantlarda yeterli düzeyde azot bulunması, bitki gelişimi üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olmaktadır (Marschner, 2011). Hayvancılık sektöründe ise azot, hayvanların protein ihtiyaçlarını karşılamak için yemlerinde bulunmakta ve bu proteinler, hayvanların kas gelişimi ve sağlıklı bir büyüme için kullanılmaktadır (Gionbelli vd., 2024). Ayrıca, azot bileşenleri ilaç sektöründe de kullanılmaktadır. Özellikle enzimlerin ve diğer biyolojik aktivitelerin düzenlenmesinde rol oynayan bileşiklerin üretiminde kullanılmaktadır (Kerru vd., 2020). Azotun bu sektördeki rolü, biyoteknolojik ürünlerin geliştirilmesinde ve tedavi edici bileşiklerin üretiminde önemli bir yer tutmaktadır. Bu nedenle, azot sadece biyolojik sistemler için değil, gıda, tarım, hayvancılık ve ilaç endüstrileri için de önemli bir elementtir.

Toplam organik karbon miktarı (%) analizi sonuçlarına göre, optimize hidrolizatta %5,01, optimize numunenin konsantre edilmiş formunda %30,18 olarak bulunmuştur. Karbon, bitki metabolizması, toprak mikrobiyolojisi ve stres toleransı açısından kritik bir öneme sahiptir. Karbon, protein hidrolizatlarının içerdiği amino asitler ve peptitlerin temel yapı taşı olarak bitkilere organik karbon sağlamakta ve bu, enerji metabolizması ve hücresel süreçler için gereklidir (Colla vd., 2017; Du Jardin, 2015). Karbon miktarı, bitkilerin karbon/azot dengesini etkileyerek büyüme ve savunma mekanizmalarını düzenlemektedir (Ertani vd., 2013). Ayrıca, hidrolizatların karbon içeriği, toprak mikroorganizmalarının aktivitesini artırarak topraktaki besin

döngüsünü hızlandırmakta ve bitkilere daha fazla erişilebilir besin sunmaktadır (Calvo vd., 2014). Yüksek karbon içeriği, abiyotik stres koşullarında bitkilerde antioksidan aktiviteyi destekleyebilir ve osmotik dengenin sağlanmasına yardımcı olabilmektedir (Rouphael vd., 2018).

Optimize edilmiş hidrolizat ve konsantre edilmiş formunda kül miktarları sırasıyla %0,49 ve %4,79 olarak belirlenmiştir. Bu inorganik bileşikler, gıda endüstrisinde mineral bakımından zenginleştirilmiş ürünlerin geliştirilmesinde önemlidir ve işlenmiş gıdaların besin değerini artırmaktadır (Fuente vd., 2023). Ayrıca tarım sektöründe, bitki yapısını güçlendirmenin yanı sıra, stres direncini artırmak ve diğer besin maddeleriyle etkileşime girerek bitki içindeki alım ve taşınmayı geliştirme potansiyeline sahiptir. Temel besin sağlamanın ötesinde, bu bileşikler bitki büyümesine olumlu etki eden fizyolojik süreçler üzerinde rol oynar ve abiyotik stres toleransını artırarak bitkiye katkıda bulunur. Örneğin, redoks dengesi, osmotik denge ve stres yanıtları için kritik olan enzim aktivitelerini destekleyebilirler. Bu özellikleri, bitkilerin zorlayıcı çevre koşulları altında daha iyi bir performans göstermesini sağlamak açısından değerlidir (Du Jardin, 2015; Pilon-Smits vd., 2009). Hayvan beslenmesinde, kül içeriği hayvanların mineral ihtiyaçlarını karşılayarak kemik ve genel vücut sağlığını desteklemektedir (Wang vd., 2020). Farmasötik ve kozmetik endüstrisinde ise kül bileşenlerindeki mineraller, cilt sağlığını iyileştiren ve ürün stabilitesini artıran özellikler sunmaktadır (Winkler, 2011). Bu özellikler, kül içeriğinin farklı sektörlerde önemli bir katkı sağlayarak hidrolizatların geniş bir uygulama alanına sahip olmasını mümkün kılmaktadır.

Hidrolizatın kuru madde oranı %7,4 iken, konsantre hidrolizatta bu oran %79,5 gibi çok daha yüksek bir seviyeye ulaşmıştır. Gıda endüstrisinde, kuru madde miktarının yüksek olması raf ömrünü uzatmakta ve mikrobiyel kontaminasyonu önlemektedir. Kuru madde miktarının yüksek olması, konsantre gübrenin depolama ve dayanıklılık açısından da avantaj sağladığını göstermektedir. Kuru madde oranının yüksek olması, protein hidrolizatının bozulma riskini azaltarak uzun süre dayanıklı kalmasını sağlamaktadır. Düşük su içeriği, mikrobiyal aktiviteyi sınırlandırarak bozulmayı yavaşlatmakta ve gübrenin etkisini korumasını sağlamaktadır (López-Malo ve Alzamora, 2015). Bu durumlar yüksek kuru madde içeriğine sahip protein hidrolizatlarının farklı sektörlerde, özellikle depolama ve lojistik süreçlerinde önemli bir avantaj sunmaktadır.

Tablo 4.13: Optimize edilerek elde edilen kanola proteini hidrolizatının ve konsantre edilmiş formunun serbest amino asit miktarı, hidroliz derecesi, antioksidan ve fenolik madde miktarı, toplam azot, organik karbon, organik ve kuru madde analiz sonuçları

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Optimum Numune İçin Gerçekleştirilen Analizler	Kanola Optimize (Hidrolizat)	Kanola Optimize (Konsantre)
Serbest amino asit miktarı (%)	1,42± 0,1	12,72±0,9
Hidroliz Derecesi (%)	25,3±0,6	28,1±2,2
Toplam Antioksidan Madde Miktarı (TE mg/100g)	30,75±0,6	337,3±9,8
Toplam Fenolik Madde Miktarı (g GAE/100 g)	387,50±5,3	4503,6±12,3
Toplam Azot Miktarı (%)	2,63±0,05	28,59±1,6
Organik Karbon Miktarı (%)	5,01±0,2	30,18±0,2
Organik Madde (%)	0,49±0,1	4,79±0,6
Kuru Madde (%)	7,4±0,1	79,5±0,7

Tablo 4.14: Optimize edilerek elde edilen kanola proteini hidrolizatının ve konsantre edilmiş formunun serbest amino asit içerikleri (% w/w)

Kaynak: Araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Serbest Amino Asit	Kanola Optimize (Hidrolizat) (% w/w)	Kanola Optimize (Konsantre) (% w/w)
Hidroksiprolin	0,00	0,00
Histidin	0,07	0,52
Asparajin	0,00	0,70
Serin	0,00	0,67
Glutamin	0,00	0,00
Arjinin	0,00	0,05
Glisin	0,11	0,37
Aspartik Asit	0,03	0,48
Glutamik Asit	0,37	2,63
Treonin	0,00	0,97
Alanin	0,18	0,85
Prolin	0,04	0,27
Sistein	0,01	0,06
Lizin	0,00	0,37
Tirozin	0,00	0,03
Metiyonin	0,03	0,39
Valin	0,28	1,86
İzolösin	0,00	0,00
Lösin	0,18	1,70
Fenilalanin	0,08	0,59
Triptofan	0,04	0,21
Toplam	1,42	12,72

SONUÇ

Bu çalışmada, dünya genelinde yaygın olarak ekilen ve yüksek protein içeriğine sahip kanolanın, yağının alınmasının ardından geriye kalan küspesinin daha verimli bir şekilde değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda, kanola küspesinin gıda endüstrisinde, tarım ve hayvancılık sektörlerinde, kozmetik, farmasötik ve tıbbi beslenme gibi alanlarda spesifik uygulamalar için yenilikçi çözümler sunarak ekonomik değer oluşturma potansiyelini önemli ölçüde artırmak hedeflenmiştir.

Çalışma kapsamında kanola küspesinden protein hidrolizatı elde etmek için kullanılan yeşil teknolojiler, çevre dostu ve sürdürülebilir üretim süreçlerine katkıda bulunan önemli yöntemlerdir. Ultrasonik muameleler (20 ve 26 kHz), proteolitik enzim muameleleri (Alcalase (2.4 AU) ve Flavourzyme (1000 L)) ve ultrafiltrasyon (hacmen konsantrasyon, 0-10x) gibi yöntemler, zararlı kimyasal maddelerden kaçınılarak daha doğal ve çevreye duyarlı bir üretim süreci sağlamak için tercih edilmiştir. Ultrasonik muameleler, enerji verimli ve düşük sıcaklıkta işlem yaparak, ürünün kalite kaybını en aza indirirken, proteolitik enzimler de biyolojik bazlı, çevreye zarar vermeyen alternatifler sunarak protein hidrolizini gerçekleştirmektedir. Ultrafiltrasyon ise, su tüketimini azaltan ve atık üretimini minimize eden bir ayırma tekniği olarak, kaynakların verimli kullanımını teşvik etmektedir. Bu teknolojilerin kullanımı, sürdürülebilirlik açısından büyük önem taşımakta ve çevresel etkileri en aza indirirken, üretim verimliliğini arttırmakta, ekonomik açıdan da kaynakları daha verimli kullanılmasına olanak tanımaktadır. Yeşil teknolojilerle yapılan bu çalışmalar, kanola küspesinin çevreye zarar vermeden değerli protein hidrolizatlarına dönüştürülmesini sağlayarak, tarım atıklarının değerlendirilmesi ve doğal kaynakların korunması açısından önemli bir katkı sunmaktadır.

Çalışmada, L25 Taguchi deneme deseni kullanılarak, belirlenen faktör (Ultrasonik muamele 1, Ultrasonik muamele 2, Proteaz1, Proteaz 2 ve Ultrafiltrasyon) ve seviyelere dayalı bir deneysel tasarım oluşturulmuştur. Deneme desenine uygun olarak hazırlanan numuneler, serbest amino asit miktarı, TNBS yöntemiyle belirlenen hidroliz derecesi, DPPH metodu ile ölçülen toplam antioksidan madde miktarı ve Folin-Ciocalteu yöntemiyle belirlenen toplam fenolik madde miktarı incelenmiştir. Özellikle, serbest amino asit miktarı biyolojik önemi nedeniyle, optimize edilmiş numunenin koşullarını belirlemek için temel bir parametre olarak kullanılmıştır. Elde edilen veriler, istatistiksel olarak ANOVA ve Taguchi analizi ile değerlendirilmiştir.

Taguchi analizi kapsamında, sinyal-gürültü oranları (S/N oranları) hesaplanarak, faktör seviyelerinin deneysel performans üzerindeki etkileri ayrıntılı bir şekilde analiz edilmiştir.

Kanola küspesinden elde edilen 25 farklı protein hidrolizatının serbest amino asit miktarının optimize edilmesiyle belirlenen ideal numune hazırlanmıştır. Serbest amino asit miktarı baz alınarak hazırlanan optimum numune muamele koşulları ultrasonik muameleler için (20 ve 26 kHz) sırasıyla 48 ve 24 dakika, Alcalase (2,4 AU/ml) muamelesi için %40, Flavourzyme (1000 L) muamelesi için %80 olarak yapılmıştır. Ayrıca, serbest amino asit miktarını arttırmada etkisinin gözlemlenememesi nedeniyle, optimize edilmiş numune için ultrafiltrasyon işlemi yapılmamıştır.

Mevcut çalışma kapsamında optimize edilerek hazırlanan numune ve konsantre edilmiş hali besin değeri, fonksiyonel özellikleri, antioksidan kapasitesi ve çevresel etkileri hakkında kapsamlı bilgiler sağlamak ve ürünün çeşitli endüstriyel uygulamalarda nasıl değerlendirilebileceğini detaylandırmak amacıyla bir dizi analize tabi tutulmuştur. Bu analizler kapsamında, serbest amino asit analizi, amino asit dağılımları, toplam protein (Kjeldahl yöntemi) tayini, hidroliz derecesi tayini (TNBS yöntemi), organik karbon analizi (Walkley-Black metodu), toplam fenolik madde tayini (Folin-Ciocalteu yöntemi), toplam antioksidan madde miktarı tayini (DPPH radikali önleyici aktivite testi), kül tayini ve kuru madde tayini yapılmıştır. Yapılan bu testler, protein hidrolizatlarının besin değeri, antioksidan kapasitesi, fonksiyonel özellikleri ve çevresel etkileri hakkında bilgi sunmuş ve ürünün potansiyel endüstriyel uygulamaları için önemli bir değerlendirme yapılmasına olanak tanımıştır.

Sonuç olarak, her bir faktörün belirlenen en iyi seviyelerinin birleşimi kullanılarak, deneme deseninde elde edilen en iyi sonucun ötesine geçilmiştir. Deneme deseninde elde edilen en yüksek serbest amino asit miktarı %1,16 olarak belirlenirken, optimize numunede bu değer %1,42 olarak bulgulanmıştır. Sonraki aşamada hacmen 10,7 kat konsantre edilen optimize numunenin serbest amino asit miktarı ise %12,72 olarak bulgulanmıştır. Bu bulgular, numunenin besin değerinin artırılabilirliğini ve daha zengin amino asit profiliyle fonksiyonel özelliklerin güçlendirilebileceğini göstermektedir. Optimum numune üzerinde gerçekleştirilen diğer analizlerin sonucunda, optimize hidrolizat ve optimize konsantre numunelerinin kimyasal bileşimleri belirlenmiştir. Optimize hidrolizat numunesinde hidroliz derecesi %25,3, toplam antioksidan madde miktarı 30,75 TE mg/100g, toplam fenolik madde miktarı

387,5 g GAE/100 g, toplam azot miktarı %2,63, organik karbon miktarı %5,01, organik madde oranı %0,49 ve kuru madde oranı %7,4 olarak ölçülmüştür. Konsantre numunesinde ise hidroliz derecesi %28,1, toplam antioksidan madde miktarı 337,3 TE mg/100g, toplam fenolik madde miktarı 4503,6 GAE/100 g, toplam azot miktarı %28,6, organik karbon miktarı %30,2, organik madde oranı %4,8 ve kuru madde oranı %79,5 olarak analiz edilmiştir. Bu bulgular, optimize edilmiş ve özellikle konsantre edilmiş numunelerin yüksek antioksidan kapasitesine ve fonksiyonel özelliklere sahip olduğunu, bu sayede sağlık açısından faydalı potansiyel taşıdığını ve çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Bu araştırmanın bulguları, gıda ve sağlık sektörlerinde yüksek kaliteli, fonksiyonel gıda bileşenlerinin üretimine katkı sağlayabilir.

Kanola küspesinden elde edilen protein hidrolizatlarının analiz sonuçları, bu değerli tarımsal yan ürünlerin hayvan yeminden çok daha üst düzeydeki uygulamalar için kullanılabileceğini göstermektedir. Elde edilen bu protein hidrolizatları, gıda, tarım, hayvancılık, kozmetik, farmasötik ve tıbbi beslenme gibi birçok sektörde yenilikçi, sürdürülebilir ve çevre dostu çözümler sunma potansiyeline sahiptir. Bu tür kullanımlar hem ekonomik hem de çevresel açıdan önemli avantajlar sağlamaktadır. Yeşil teknolojilerin kullanımı, bu süreçlerin çevreye minimum zarar vererek daha verimli ve sürdürülebilir hale gelmesini sağlamaktadır. Kanola küspesinin bu şekilde değerlendirilmesi, kaynakların verimli kullanımını ve çevre dostu üretim süreçlerini teşvik etmekte önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, kanola küspesinden elde edilen protein hidrolizatlarının pazarda geniş bir yer bulma potansiyeli bulunmaktadır. Bu alandaki araştırmaların artırılması, sürdürülebilir gelişim ve rekabet gücü açısından stratejik bir öneme sahiptir.

KAYNAKÇA

- Adler-Nissen, J. (1984). Control of the proteolytic reaction and of the level of bitterness in protein hydrolysis processes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Biotechnology*, 34(3), 215-222.
- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins* (pp. xxiv+-427pp).
- Aguilar, J. G., and Sato, H. H. (2018). Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, 103, 253-262.
- Aharoni, R., & Tobi, D. (2018). Dynamical comparison between myoglobin and hemoglobin. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 86(11), 1176-1183.
- Aider, M., & Barbana, C. (2011). Canola proteins: composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity—A practical and critical review. *Trends in Food Science & Technology*, 22(1), 21-39.
- Akers, M. J., Fites, A. L., & Robinson, R. L. (1987). Types of parenteral administration. *Journal of Parenteral Science and Technology*, 41, 88-95.
- Ambigaipalan, P., Al-Khalifa, A. S., & Shahidi, F. (2015). Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. *Journal of Functional Foods*, 18, 1125-1137.
- Anthony, J. C., Anthony, T. G., Kimball, S. R., & Jefferson, L. S. (2001). Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *The Journal of nutrition*, 131(3), 856S-860S.
- Aondona, M. M., Ikya, J. K., Ukeyima, M. T., Gborigo, T. W. J., Aluko, R. E., & Girgih, A. T. (2021). *In vitro* antioxidant and antihypertensive properties of sesame seed enzymatic protein hydrolysate and ultrafiltration peptide fractions. *Journal of Food Biochemistry*, 45(1), e13587.
- Arribas-López, E., Zand, N., Ojo, O., Snowden, M. J., & Kochhar, T. (2021). The effect of amino acids on wound healing: a systematic review and meta-analysis on arginine and glutamine. *Nutrients*, 13(8), 2498.

- 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.
- Ashokkumar, M. (2015). Applications of ultrasound in food and bioprocessing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 25, 17-23.
- Aslan, M. (2016). Membran Teknolojileri. *T.C. Çevre ve Şehircilik Bakanlığı*, 286.
- Ayton, J. (2014). Variability of quality traits in canola seed, oil and meal: a review. *New South Wales Department of Primary Industries*. New South Wales, Avustralya.
- Ayub, M., Wahab, S., & Durrani, Y. (2003). Effect of water activity (aw), moisture content and total microbial count on the overall quality of bread. *International Journal of Agriculture and Biology*, 5(3), 273-278.
- Azhar, G., Wei, J. Y., Schutzler, S. E., Coker, K., Gibson, R. V., Kirby, M. F., ... & Wolfe, R. R. (2021). Daily consumption of a specially formulated essential amino acid-based dietary supplement improves physical performance in older adults with low physical functioning. *The Journals of Gerontology: Series A*, 76(7), 1184-1191.
- Baldasso, C., Barros, T. C., & Tessaro, I. C. (2011). Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination*, 278(1-3), 381-386.
- Berends, P., Appel, D., Eisele, T., Rabe, S., & Fischer, L. (2014). Performance of enzymatic wheat gluten hydrolysis in batch and continuous processes using Flavourzyme. *LWT-Food Science and Technology*, 58(2), 534-540.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). Biochemistry. 5th editio. *New York: NCBI*.
- Bérot, S., Compoin, J. P., Larré, C., Malabat, C., & Guéguen, J. (2005). Large scale purification of rapeseed proteins (*Brassica napus* L.). *Journal of Chromatography B*, 818(1), 35-42.
- Biedermannová, L., & Schneider, B. (2015). Structure of the ordered hydration of amino acids in proteins: analysis of crystal structures. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 71(11), 2192-2202.
- Bos, C., Airinei, G., Mariotti, F., Benamouzig, R., Bérot, S., Evrard, J., ... & Gaudichon, C. (2007). The poor digestibility of rapeseed protein is balanced by its very high metabolic utilization in humans. *The Journal of Nutrition*, 137(3), 594-600.

- Bot, F., Plazzotta, S., & Anese, M. (2017). Treatment of Food Industry Wastewater With Ultrasound: A Big Opportunity for the Technology. In *Ultrasound: Advances for Food Processing and Preservation* (pp. 391-408). Academic Press.
- Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, 383, 3-41.
- Cavani, L., Ciavatta, C., & Gessa, C. (2003). Determination of free L-and D-alanine in hydrolysed protein fertilisers by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 985(1-2), 463-469.
- Cavani, L., Margon, A., Sciubba, L., Ciavatta, C., & Marzadori, C. (2017). What we talk about when we talk about protein hydrolyzate-based biostimulants. *AIMS Agriculture and Food*, 2(3), 221-232.
- CCC, Feed Industry Guide, 6th edn. Canola Council of Canada, Winnipeg, Canada (2019).
- Chabanon, G., Chevalot, I., Framboisier, X., Chenu, S., & Marc, I. (2007). Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. *Process Biochemistry*, 42(10), 1419-1428.
- Chaffey, N. (2003). Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). New York, NY: Garland Science.
- Chalamaiah, M., Yu, W., & Wu, J. (2018). Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food Chemistry*, 245, 205-222.
- Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2012). Ultrasonics in food processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(5), 975-983.
- Chemat, F., & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835.
- Chen, H. J., Dai, F. J., Chen, C. Y., Fan, S. L., Zheng, J. H., Huang, Y. C., ... & Chen, C. S. (2021). Evaluating the antioxidants, whitening and antiaging properties of rice protein hydrolysates. *Molecules*, 26(12), 3605.
- Chen, L., Chen, J., Ren, J., & Zhao, M. (2011). Effects of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of soy protein isolates and on the emulsifying properties of hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2600-2609.

- Cheung, I. W., & Li-Chan, E. C. (2010). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity and bitterness of enzymatically-produced hydrolysates of shrimp (*Pandalopsis dispar*) processing byproducts investigated by Taguchi design. *Food Chemistry*, *122*(4), 1003-1012.
- Cheynier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., & Martens, S. (2013). Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant physiology and biochemistry*, *72*, 1-20.
- Chuesiang, P., & Sanguandeeikul, R. (2015). Protein hydrolysate from tilapia frame: antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitor properties. *International Journal of Food Science & Technology*, *50*(6), 1436-1444.
- Clare, D. A., & Swaisgood, H. E. (2000). Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy Science*, *83*(6), 1187-1195.
- Clemente, A. (2000). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, *11*(7), 254-262.
- Colla, G., & Rouphael, Y. (2015). Biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, *196*, 1-134.
- Colla, G., Rouphael, Y., Canaguier, R., Svecova, E., & Cardarelli, M. (2014). Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 448.
- Coscueta, E. R., Campos, D. A., Osório, H., Nerli, B. B., & Pintado, M. (2019). Enzymatic soy protein hydrolysis: A tool for biofunctional food ingredient production. *Food chemistry: X*, *1*, 100006.
- 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.
- Cutroneo, S., Prandi, B., Faccini, A., Pellegrini, N., Sforza, S., & Tedeschi, T. (2023). Comparison of protein quality and digestibility between plant-based and meat-based burgers. *Food Research International*, *172*, 113183.
- Czech, M. P., & Corvera, S. (1999). Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(4), 1865-1868.

- Dabbour, M., Jiang, H., Mintah, B. K., Wahia, H., & He, R. (2021). Ultrasonic-assisted protein extraction from sunflower meal: Kinetic modeling, functional, and structural traits. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 74, 102824.
- Darragh, A. J., Garrick, D. J., Moughan, P. J., & Hendriks, W. H. (1996). Correction for amino acid loss during acid hydrolysis of a purified protein. *Analytical Biochemistry*, 236(2), 199-207.
- Daun, J. K., Eskin, M. N., & Hickling, D. (Eds.). (2015). *Canola: chemistry, production, processing, and utilization*. Elsevier.
- Delgado, C. L. (2003). Rising consumption of meat and milk in developing countries has created a new food revolution. *The Journal of nutrition*, 133(11), 3907S-3910S.
- Demirci, M. (2012). *Gıda Kimyası*. İstanbul, Türkiye.
- Dolganyuk, V., Sukhikh, S., Kalashnikova, O., Ivanova, S., Kashirskikh, E., Prosekov, A., ... & Babich, O. (2023). Food proteins: potential resources. *Sustainability*, 15(7), 5863.
- Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y., & Yang, H. (2008). Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 107(4), 1485-1493.
- Downey, R. K. (2006). Rapeseed to canola: Rags to riches. NABC.
- Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14.
- Du, X., Jing, H., Wang, L., Huang, X., Wang, X., & Wang, H. (2022). Characterization of structure, physicochemical properties, and hypoglycemic activity of goat milk whey protein hydrolysate processed with different proteases. *Food Science and Technology*, 159, 113257.
- Eckert, E., Han, J., Swallow, K., Tian, Z., Jarpa-Parra, M., & Chen, L. (2019). Effects of enzymatic hydrolysis and ultrafiltration on physicochemical and functional properties of faba bean protein. *Cereal Chemistry*, 96(4), 725-741.
- El-Shazoly, R. M., Aloufi, A. S., & Fawzy, M. A. (2024). The Potential Use of *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) as a Biostimulant for Drought Tolerance in Wheat (*Triticum aestivum* L.) for Sustainable Agriculture. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-18.

- Ertani, A., Cavani, L., Pizzeghello, D., Brandellero, E., Altissimo, A., Ciavatta, C., & Nardi, S. (2009). Biostimulant activity of two protein hydrolyzates in the growth and nitrogen metabolism of maize seedlings. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *172*(2), 237-244.
- Ertani, A., Francioso, O., Ferrari, E., Schiavon, M., & Nardi, S. (2018). Spectroscopic-chemical fingerprint and biostimulant activity of a protein-based product in solid form. *Molecules*, *23*(5), 1031.
- 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.
- Famuwagun, A. A., Alashi, A. M., Gbadamosi, S. O., Taiwo, K. A., Oyedele, D., Adebooye, O. C., & Aluko, R. E. (2021). Effect of protease type and peptide size on the in vitro antioxidant, antihypertensive and anti-diabetic activities of eggplant leaf protein hydrolysates. *Foods*, *10*(5), 1112.
- Fan, X., Peng, J., Li, S., Wu, H., Liang, Y., & Ma, L. (2020). The influence of different enzymolysis methods on the components of enzymolysis products. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 440, No. 2, p. 022002). IOP Publishing.
- FAO. (2006). *Livestock's long shadow: Environmental issues and options*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO. 2013. Dietary protein quality evaluation in human nutrition: Food & nutrition paper 92.
- FAOSTAT. 2011. Production statistics of the food and agriculture organization of the United Nations.
- Feng, H., Barbosa-Cánovas, G. V., & Weiss, J. (Eds.). (2011). *Ultrasound technologies for food and bioprocessing* (Vol. 1, p. 599). New York, NY, ABD.
- Finley, J. W., & Given Jr, P. (1986). Technological necessity of antioxidants in the food industry. *Food and Chemical Toxicology*, *24*(10-11), 999-1006.
- Fischer, J. E., Rosen, H. M., Ebeid, A. M., James, J. H., Keane, J. M., & Soeters, P. B. (1976). The effect of normalization of plasma amino acids on hepatic encephalopathy in man. *Surgery*, *80*(1), 77-91.

- Fleddermann, M., Fechner, A., Rößler, A., Bähr, M., Pastor, A., Liebert, F., & Jahreis, G. (2013). Nutritional evaluation of rapeseed protein compared to soy protein for quality, plasma amino acids, and nitrogen balance—a randomized cross-over intervention study in humans. *Clinical Nutrition*, 32(4), 519-526.
- Flint, E. B., & Suslick, K. S. (1991). The temperature of cavitation. *Science*, 253(5026), 1397-1399.
- Foh, M. B. K., Amadou, I., Foh, B. M., Kamara, M. T., & Xia, W. (2010). Functionality and antioxidant properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) as influenced by the degree of hydrolysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1851-1869.
- Fountoulakis, M., & Lahm, H. W. (1998). Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A*, 826(2), 109-134.
- Fox, P. F., & Mulvihill, D. M. (1982). Milk proteins: molecular, colloidal and functional properties. *Journal of Dairy Research*, 49(4), 679-693.
- Fuente, B., Aspevik, T., Barba, F. J., Kousoulaki, K., & Berrada, H. (2023). Mineral bioaccessibility and antioxidant capacity of protein hydrolysates from salmon (*Salmo salar*) and mackerel (*Scomber scombrus*) backbones and heads. *Marine Drugs*, 21(5), 294.
- G. Mariscal-Land'in, T. C. Reis de Souza, J. E. Parra S., A. Aguilera B., and B. Mar B., “Ileal digestibility of protein and amino acids from canola meal in weaned piglets and growing pigs,” *Livestock Science*, vol. 116, no. 1-3, pp. 53–62, 2008.
- 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.
- Gatti, R. (2010). *Pattern recognition techniques applied to protein docking problems* (Doctoral dissertation, Pavia University). Pavia University, Italy.
- Geisseler, D., Horwath, W. R., Joergensen, R. G., & Ludwig, B. (2010). Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms—a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(12), 2058-2067.
- Gheshlaghi, R. E. Z. A., Scharer, J. M., Moo-Young, M., & Douglas, P. L. (2008). Application of statistical design for the optimization of amino acid separation by reverse-phase HPLC. *Analytical Biochemistry*, 383(1), 93-102.

- Ghodsvali, A., Khodaparast, M. H., Vosoughi, M., & Diosady, L. L. (2005). Preparation of canola protein materials using membrane technology and evaluation of meals functional properties. *Food Research International*, 38(2), 223-231.
- Giles Jr, H. F., Mount III, E. M., & Wagner Jr, J. R. (2004). *Extrusion: the definitive processing guide and handbook*. William Andrew.
- Gionbelli, M. P., Costa, T. C., Cediel-Devia, D. C., Nascimento, K. B., Gionbelli, T. R., & Duarte, M. S. (2024). 427 Impact of late gestation slow-release nitrogen-enriched diets on energy metabolism in calf skeletal muscle: A proteomic and transcriptomic approach. *Journal of Animal Science*, 102(Supplement_3), 202-203.
- Girgih, A. T., Udenigwe, C. C., Li, H., Adebisi, A. P., & Aluko, R. E. (2011). Kinetics of enzyme inhibition and antihypertensive effects of hemp seed (*Cannabis sativa L.*) protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 1767-1774.
- Gissibl, A., Care, A., Parker, L. M., Iqbal, S., Hobba, G., Nevalainen, H., & Sunna, A. (2018). Microwave pretreatment of paramylon enhances the enzymatic production of soluble β -1, 3-glucans with immunostimulatory activity. *Carbohydrate Polymers*, 196, 339-347.
- Gotti, R., Esposito, E., Luise, D., Tullio, S., Interino, N., Trevisi, P., & Fiori, J. (2022). Determination of free amino acids in milk, colostrum and plasma of swine via liquid chromatography with fluorescence and UV detection. *Molecules*, 27(13), 4153.
- Guerra-Almonacid, C. M., Torruco-Uco, J. G., Murillo-Arango, W., Méndez-Arteaga, J. J., & Rodríguez-Miranda, J. (2019). Effect of ultrasound pretreatment on the antioxidant capacity and antihypertensive activity of bioactive peptides obtained from the protein hydrolysates of *Erythrina edulis*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 31(4), 288-296.
- 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.
- Hajian, S. (2014). Positive effect of antioxidants on immune system. *Immunopathologia Persa*, 1(1), e02.

- Halliwell, B. (1995, November). How to characterize an antioxidant: an update. In *Biochemical Society Symposia* (Vol. 61, pp. 73-101). Portland Press Limited.
- 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.
- Heinrikson, R. L., & Meredith, S. C. (1984). Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry*, 136(1), 65-74.
- Herrero, M., Gerber, P., Vellinga, T., Garnett, T., Leip, A., Opio, C., ... & McAllister, T. A. (2011). Livestock and greenhouse gas emissions: The importance of getting the numbers right. *Animal Feed Science and Technology*, 166, 779-782.
- Hoglund, A. S., Rodin, J., Larsson, E., & Rask, L. (1992). Distribution of napin and cruciferin in developing rape seed embryos. *Plant Physiology*, 98(2), 509-515.
- Hong, J., Fang, L. H., Jeong, J. H., & Kim, Y. Y. (2020). Effects of L-arginine supplementation during late gestation on reproductive performance, piglet uniformity, blood profiles, and milk composition in high prolific sows. *Animals*, 10(8), 1313.
- Hou, Y., Wu, Z., Dai, Z., Wang, G., & Wu, G. (2022). Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *Bioactive Peptides from Food*, 209-232.
- Hrckova, M., Rusnakova, M., & Zemanovic, J. (2002). Enzymatic hydrolysis of defatted soy flour by three different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *Czech Journal of Food Sciences*, 20(1), 7-14.
- Hunsakul, K., Laokuldilok, T., Sakdatorn, V., Klangpetch, W., Brennan, C. S., & Utama-Ang, N. (2022). Optimization of enzymatic hydrolysis by alcalase and flavourzyme to enhance the antioxidant properties of jasmine rice bran protein hydrolysate. *Scientific Reports*, 12(1), 12582.
- Iametti, S., De Gregori, B., Vecchio, G., & Bonomi, F. (1996). Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of β -lactoglobulin. *European Journal of Biochemistry*, 237(1), 106-112.

- J. O'Sullivan, B. Murray, C. Flynn, I. Norton, The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins, *Food Hydrocolloid*, 53 (2016) 141–154.
- Jambrak, A. R., Lelas, V., Mason, T. J., Krešić, G., & Badanjak, M. (2009). Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of Food Engineering*, 93(4), 386-393.
- Jayas, D. S., Kukulko, D. A., & White, N. D. G. (1988). Equilibrium moisture-equilibrium relative humidity relationship for canola meal. *Transactions of the ASAE*, 31(5), 1585-1588.).
- Johansson, L., Gafvelin, G., & Arnér, E. S. (2005). Selenocysteine in proteins—properties and biotechnological use. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1726(1), 1-13.
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., & O'Donnell, C. P. (2013). Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20), 4667-4675.
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Álvarez, C., & O'Donnell, C. P. (2015). Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 60-67.
- Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2, 41-60.
- Karkouch, I., Tabbene, O., Gharbi, D., Mlouka, M. A. B., Elkahoui, S., Rihouey, C., ... & Limam, F. (2017). Antioxidant, antityrosinase and antibiofilm activities of synthesized peptides derived from Vicia faba protein hydrolysate: A powerful agents in cosmetic application. *Industrial Crops and Products*, 109, 310-319.
- Kasote, D. M., Katyare, S. S., Hegde, M. V., & Bae, H. (2015). Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *International Journal of Biological Sciences*, 11(8), 982.
- Kauffman, G. L., Kneivel, D. P., & Watschke, T. L. (2007). Effects of a biostimulant on the heat tolerance associated with photosynthetic capacity, membrane thermostability, and polyphenol production of perennial ryegrass. *Crop Science*, 47(1), 261-267.

- Kerru, N., Gummidi, L., Maddila, S., Gangu, K. K., & Jonnalagadda, S. B. (2020). A review on recent advances in nitrogen-containing molecules and their biological applications. *Molecules*, 25(8), 1909.
- Ketnawa, S., & Liceaga, A. M. (2017). Effect of microwave treatments on antioxidant activity and antigenicity of fish frame protein hydrolysates. *Food and Bioprocess Technology*, 10, 582-591.
- Khattab, R. Y., & Arntfield, S. D. (2009). Functional properties of raw and processed canola meal. *LWT-Food Science and Technology*, 42(6), 1119-1124.
- Koirala, S., Prathumpai, W., & Anal, A. K. (2021). Effect of ultrasonication pretreatment followed by enzymatic hydrolysis of caprine milk proteins and on antioxidant and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity of peptides thus produced. *International Dairy Journal*, 118, 105026.
- Kostas, E. T., Beneroso, D., & Robinson, J. P. (2017). The application of microwave heating in bioenergy: A review on the microwave pre-treatment and upgrading technologies for biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 77, 12-27.
- 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.
- Leighton, T. G. (1995). Bubble population phenomena in acoustic cavitation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2(2), S123-S136.
- Li, J., & Chase, H. A. (2010). Applications of membrane techniques for purification of natural products. *Biotechnology Letters*, 32(5), 601-608.
- Li, Q., Yi, L., Marek, P., & Iverson, B. L. (2013). Commercial proteases: present and future. *FEBS letters*, 587(8), 1155-1163.
- Li, S., Yang, X., Zhang, Y., Ma, H., Liang, Q., Qu, W., ... & Mahunu, G. K. (2016). Effects of ultrasound and ultrasound assisted alkaline pretreatments on the enzymolysis and structural characteristics of rice protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 20-28.
- Li, X., Deng, J., Shen, S., Li, T., Yuan, M., Yang, R., & Ding, C. (2015). Antioxidant activities and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from defatted *Camellia oleifera* seed cake. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5681-5690.

- Lisiecka, J., Knaflewski, M., Spiżewski, T., Frąszczak, B., Kałużewicz, A., & Krzesiński, W. (2011). The effect on animal protein hydrolysate on quantity and quality of strawberry daughter plants cv.'Elsanta'. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*, 10(1), 31-40.
- Liu, H. L., & Hsieh, C. M. (2009). Single-transducer dual-frequency ultrasound generation to enhance acoustic cavitation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(3), 431-438.
- López-Malo, A., & Alzamora, S. M. (2015). Water activity and microorganism control: Past and future. *Water Stress in Biological, Chemical, Pharmaceutical and Food Systems*, 245-262.
- Lusk, J. L., & Norwood, F. B. (2009). Some economic benefits and costs of vegetarianism. *Agricultural and Resource Economics Review*, 38(2), 109-124.
- Ma, Y. Q., Ye, X. Q., Fang, Z. X., Chen, J. C., Xu, G. H., & Liu, D. H. (2008). Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5682-5690.
- Mahfuz, S., Shang, Q., & Piao, X. (2021). Phenolic compounds as natural feed additives in poultry and swine diets: A review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 12, 1-18.
- Mahmoud, M. I., & Cordle, C. T. (2000). Protein hydrolysates as special nutritional ingredients. In *Developments in Food Science* (Vol. 41, pp. 181-215). Elsevier.
- Maini, P. (2006). The experience of the first biostimulant, based on amino acids and peptides: a short retrospective review on the laboratory researches and the practical results. *Fertilitas Agrorum*, 1(1), 29-43.
- Mäkinen, S., Johannson, T., Gerd, E. V., Pihlava, J. M., & Pihlanto, A. (2012). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antioxidant properties of rapeseed hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 4(3), 575-583.
- Malécange, M., Sergheraert, R., Teulat, B., Mounier, E., Lothier, J., & Sakr, S. (2023). Biostimulant properties of protein hydrolysates: Recent advances and future challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9714.
- Marschner, H. (Ed.). (2011). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Academic press.
- Marth, E. H., & Steele, J. (Eds.). (2001). *Applied dairy microbiology*. CRC Press.

- Merz, M., Eisele, T., Berends, P., Appel, D., Rabe, S., Blank, I., ... & Fischer, L. (2015). Flavourzyme, an enzyme preparation with industrial relevance: automated nine-step purification and partial characterization of eight enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(23), 5682-5693.
- Metin, M., 2013. Süt Teknolojisi. Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. 12.Baskı. Ege Üniversitesi. Isbn: 978-975-483-279-2. Sy: 582-583.
- Nasri, R., Abdelhedi, O., Jemil, I., Daoued, I., Hamden, K., Kallel, C., ... & Karra-Châabouni, M. (2015). Ameliorating effects of goby fish protein hydrolysates on high-fat-high-fructose diet-induced hyperglycemia, oxidative stress and deterioration of kidney function in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 242, 71-80.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2008). Lehninger principles of biochemistry WH Freeman. New York, NY: ABD.
- Nishimura, T., & Kato, H. (1988). Taste of free amino acids and peptides. *Food Reviews International*, 4(2), 175-194.
- NMKL, N. (2003). Determination in Foods and Feeds According to Kjeldahl (NMKL 6).
- Paddon-Jones, D., Sheffield-Moore, M., Zhang, X. J., Volpi, E., Wolf, S. E., Aarsland, A., & Wolfe, R. R. (2004). Amino acid ingestion improves muscle protein synthesis in the young and elderly. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 286(3), E321-E328.
- Palou, E., Lopez-Malo, A., Barbosa-Canovas, G. V., & Swanson, B. G. (2007). High-pressure treatment in food preservation. In *Handbook of food preservation* (pp. 833-872). CRC Press.
- Panuszko, A., Adamczak, B., Czub, J., Gojło, E., & Stangret, J. (2015). Hydration of amino acids: FTIR spectra and molecular dynamics studies. *Amino Acids*, 47, 2265-2278.
- 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.

- Petraru, A., & Amarieci, S. (2024). Rapeseed An Important Oleaginous Plant in the Oil Industry and the Resulting Meal a Valuable Source of Bioactive Compounds. *Plants*, *13*(21), 3085.
- Phongthai, S., Lim, S. T., & Rawdkuen, S. (2016). Optimization of microwave-assisted extraction of rice bran protein and its hydrolysates properties. *Journal of Cereal Science*, *70*, 146-154.
- Pico, Y. (2012). Low-intensity ultrasounds. In *Chemical analysis of food: Techniques and Applications* (pp. 117-144). Academic Press, Boston, MA: ABD.
- 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.
- Pilon-Smits, E. A., Quinn, C. F., Tapken, W., Malagoli, M., & Schiavon, M. (2009). Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant Biology*, *12*(3), 267-274.
- Ponnampalam, E. N., Kiani, A., Santhiravel, S., Holman, B. W., Lauridsen, C., & Dunshea, F. R. (2022). The importance of dietary antioxidants on oxidative stress, meat and milk production, and their preservative aspects in farm animals: Antioxidant action, animal health, and product quality—Invited review. *Animals*, *12*(23), 3279.
- Povey, M. J., & Mason, T. J. (1998). *Ultrasound in food processing*. Springer Science & Business Media.
- Przybylski, R., & Mag, T. (2002). Canola/rapeseed oil. *Vegetable Oil in Food Technology: Composition, Properties and Uses*, 107-136, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.
- Qingli, Y., Chushu, Z., Shaofang, L., Jie, B., Jie, S., & Lina, Y. (2012). Ultrasonic-assisted enzymolysis to improve the antioxidant activities of peanut (*Arachin conarachin*) antioxidant hydrolysate. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(7), 9051–9068.
- Quaggiotti, S., Ruperti, B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tugnoli, V., & Nardi, S. (2004). Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays L.*). *Journal of Experimental Botany*, *55*(398), 803-813.

- R. Vardanega, D. T. Santos, and M. A. De Almeida, (2014), Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation, *Pharmacognosy Reviews*, 8 (16), 88–95.
- Rai, V. K. (2002). Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biologia Plantarum*, 45(4), 481-487.
- 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.
- Rawlings, N. D., Waller, M., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2014). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D503-D509.
- Rehman, I., & Botelho, S. (2019). Biochemistry, Tertiary Structure, Protein. *Treasure Island, FL: ABD*.
- Riggs, T. R., & Walker, L. M. (1963). Some relations between active transport of free amino acids into cells and their incorporation into protein. *Journal of Biological Chemistry*, 238(8), 2663-2668.
- Rizzello, C. G., Nionelli, L., Coda, R., & Gobbetti, M. (2012). Synthesis of the cancer preventive peptide lunasin by lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Nutrition and Cancer*, 64(1), 111-120.
- Rizzello, C. G., Tagliazucchi, D., Babini, E., Rutella, G. S., Saa, D. L. T., & Gianotti, A. (2016). Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. *Journal of Functional Foods*, 27, 549-569.
- Rønnestad, I., Conceição, L., Aragão, C., & Dinis, M. (2000). Free amino acids are absorbed faster and assimilated more efficiently than protein in postlarval Senegal sole (*Solea senegalensis*). *The Journal of Nutrition*, 130 11, 2809-12.
- Roslan, J., Kamal, S. M. M., Yunos, K. F. M., & Abdullah, N. (2017). Assessment on multilayer ultrafiltration membrane for fractionation of tilapia by-product protein hydrolysate with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Separation and Purification Technology*, 173, 250-257.

- Rossmann, M. G., Liljas, A., Brändén, C. I., & Banaszak, L. J. (1975). Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases. In *The enzymes* (Vol. 11, pp. 61-102). Academic Press.
- S. Blackburn, in: S. Blackburn (Ed.), *Amino Acid Determination*, Marcel Dekker, New York, 2nd ed., 1978, p. 8.
- Salampeyy, J., Phillips, M., Seneweera, S., & Kailasapathy, K. (2010). Release of antimicrobial peptides through bromelain hydrolysis of leatherjacket (*Meuschenia sp.*) insoluble proteins. *Food Chemistry*, *120*(2), 556-560.
- San Martin, M. F., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. (2002). Food processing by high hydrostatic pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *42*(6), 627-645.
- Sathitkowitzhai, W., Nitisinprasert, S., & Keawsompong, S. (2018). Improving palm kernel cake nutrition using enzymatic hydrolysis optimized by Taguchi method. *3 Biotech*. *8* (10), 407.
- 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.
- Schlick, T. (2010). Protein Structure Introduction., 77-104.
- Shahrajabian, M. H., Cheng, Q., & Sun, W. (2022). The effects of amino acids, phenols and protein hydrolysates as biostimulants on sustainable crop production and alleviated stress. *Recent Patents on Biotechnology*, *16*(4), 319-328.
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., & Zheng, B. (2019). Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, *24*(13), 2452.
- Shen, Y., Wang, F., Lan, D., Liu, Y., Yang, B., & Wang, Y. (2011). Biochemical properties and potential applications of recombinant leucine aminopeptidase from *Bacillus kaustophilus* CCRC 11223. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*(11), 7609-7625.

- Shepon, A., Eshel, G., Noor, E., & Milo, R. (2016). Energy and protein feed-to-food conversion efficiencies in the US and potential food security gains from dietary changes. *Environmental Research Letters*, *11*(10), 105002.
- Sierras, N., Botta, A., Staasing, L., Martinez, M. J., & Bru, R. (2015, November). Understanding the effect of amino acids based biostimulant by an enantiomeric analysis of their active principles and a proteomic profiling approach. In *II World Congress on the Use of Biostimulants in Agriculture 1148* (pp. 93-100).
- Singh, R., Mittal, A., Kumar, M., & Mehta, P. K. (2016). Microbial proteases in commercial applications. *Journal of Pharmaceutical Chemistry and Biological Sciences*, *4*(3), 365-374.
- 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.
- 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.
- Standiford, F. C. (2000). Evaporation. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*.
- Tacias-Pascacio, V. G., Morellon-Sterling, R., Siar, E. H., Tavano, O., Berenguer-Murcia, A., & Fernandez-Lafuente, R. (2020). Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *165*, 2143-2196.
- Tang, T., Wu, N., Tang, S., Xiao, N., Jiang, Y., Tu, Y., & Xu, M. (2023). Industrial application of protein hydrolysates in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *71*(4), 1788-1801.
- Tang, Y. R., & Ghosh, S. (2023). A Review of the utilization of canola protein as an emulsifier in the development of food emulsions. *Molecules*, *28*(24), 8086.
- Tawalbeh, D., Ahmad, W. W., & Sarbon, N. M. (2023). Effect of ultrasound pretreatment on the functional and bioactive properties of legumes protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Food Reviews International*, *39*(8), 5423-5445.

- Tkaczewska, J. (2020). Peptides and protein hydrolysates as food preservatives and bioactive components of edible films and coatings-A review. *Trends in Food Science & Technology*, *106*, 298-311.
- Toldra, F. (1998). Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. *Meat science*, *49*, S101-S110.
- Tserodze, N., Karkashadze, N., Tatiashvili, L., Kavtaradze, N., Uridia, R., & Tserodze, K. (2023). IMPORTANCE OF AMINO ACIDS. *GEORGIAN SCIENTISTS*.
- Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, *77*(1), R11-R24.
- Udenigwe, C. C., & Rouvinen-Watt, K. (2015). The role of food peptides in lipid metabolism during dyslipidemia and associated health conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(5), 9303-9313.
- Uluko, H., Zhang, S., Liu, L., Chen, J., Sun, Y., Su, Y., ... & Lv, J. (2013). Effects of microwave and ultrasound pretreatments on enzymolysis of milk protein concentrate with different enzymes. *International Journal of Food Science & Technology*, *48*(11), 2250-2257.
- Uluko, H., Zhang, S., Liu, L., Tsakama, M., Lu, J., & Lv, J. (2015). Effects of thermal, microwave, and ultrasound pretreatments on antioxidative capacity of enzymatic milk protein concentrate hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, *18*, 1138-1146.
- United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service. (2024). *Oilseeds: World markets and trade*. USDA.
- Uppstrom, B. (1995). Seed chemistry. In D. Kimber, & D. I. McGregor (Eds.), *Brassica oilseeds: Production and utilization*. UK: CAB International.
- Velisek, J. (2013). *The chemistry of food*. John Wiley & Sons.
- Villanueva, A., Clemente, A., Bautista-Gallego, J., & Millán, F. (1999). Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo-and exo-proteases, *Grasas y Aceites*, *50*(6), 472-476. Instituto de la Grasa. Avda. Padre García Tejero, Sevilla, España.

- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J., & Millan, F. (1999). Production and characterization of an extensive rapeseed protein hydrolysate. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76, 819-823.
- Waglay, A., & Karboune, S. (2016). Enzymatic generation of peptides from potato proteins by selected proteases and characterization of their structural properties. *Biotechnology Progress*, 32(2), 420-429.
- Wali, A., Ma, H., Shah Nawaz, M., Hayat, K., Xiaong, J., & Jing, L. (2017). Impact of power ultrasound on antihypertensive activity, functional properties, and thermal stability of rapeseed protein hydrolysates. *Journal of Chemistry*, 2017, Hindawi Publishing Corporation. London, UK.
- Wanasundara, J. P., McIntosh, T. C., Perera, S. P., Withana-Gamage, T. S., & Mitra, P. (2016). Canola/rapeseed protein-functionality and nutrition. *Organic Chemistry and Industrial Chemistry*, 23(4), D407.
- Wanasundara, J. P., McIntosh, T. C., Perera, S. P., Withana-Gamage, T. S., & Mitra, P. (2016). Canola/rapeseed protein-functionality and nutrition. *Organic Chemistry and Industrial Chemistry*, 23(4), D407.
- Wang, H., Gao, W., Huang, L., Shen, J. J., Liu, Y., Mo, C. H., ... & Zhu, Y. W. (2020). Mineral requirements in ducks: an update. *Poultry Science*, 99(12), 6764-6773.
- Wang, J., & Wang, H. (2017). Oxidative stress in pancreatic beta cell regeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017(1), 1930261.
- Wang, L. K., Chen, J. P., Hung, Y. T., & Shamma, N. K. (Eds.). (2008). *Membrane and desalination technologies* (Vol. 13). Springer Science+ Business Media, LLC.
- Wang, M., Hettiarachchy, N. S., Qi, M., Burks, W., & Siebenmorgen, T. (1999). Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 411-416.
- Who, J. (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition. *World Health Organization technical report series*, (935), 1.
- Wimley, W. C., Creamer, T. P., & White, S. H. (1996). Solvation energies of amino acid side chains and backbone in a family of host-guest pentapeptides. *Biochemistry*, 35(16), 5109-5124.

- Winkler, P. (2011). Minerals and the Skin. *Nutrition and Skin: Lessons for Anti-Aging, Beauty and Healthy Skin*, 91-109.
- Wouters, A. G., Rombouts, I., Lagrain, B., & Delcour, J. A. (2016). Impact of casein and egg white proteins on the structure of wheat gluten-based protein-rich food. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(3), 757-763.
- Wu, G. (2013). Functional amino acids in nutrition and health. *Amino acids*, 45, 407-411.
- Wu, G. (2021). *Amino acids: biochemistry and nutrition*. CRC press.
- Wu, G., Bazer, F. W., Dai, Z., Li, D., Wang, J., & Wu, Z. (2014). Amino acid nutrition in animals: protein synthesis and beyond. *Annual Review of Animal Bioscience*, 2(1), 387-417.
- Wu, H., Shi, W., Huang, H., Chen, L., Li, N., Du, Y., ... & Sun, J. (2022). The impact of Flavourzyme on flavor, antioxidant activity, and sensory attributes of salted grass carp by brine injection and brining. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(4), 1665-1673.
- Xue, F., Wu, Z., Tong, J., Zheng, J., & Li, C. (2017). Effect of combination of high-intensity ultrasound treatment and dextran glycosylation on structural and interfacial properties of buckwheat protein isolates. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 81(10), 1891-1898.
- Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., Yakhin, I. A., & Brown, P. H. (2017). Biostimulants in plant science: a global perspective. *Frontiers in Plant Science*, 7, 2049.
- Yan, X., Zhang, G., Zhao, J., Ma, M., Bao, X., Zeng, Z., ... & Gong, D. (2021). Influence of phenolic compounds on the structural characteristics, functional properties and antioxidant activities of Alcalase-hydrolyzed protein isolate from *Cinnamomum camphora* seed kernel. *Food Science and Technology*, 148, 111799.
- Yang, X., Li, Y., Li, S., Oladejo, A. O., Ruan, S., Wang, Y., ... & Ma, H. (2017). 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.
- Yin, B., Li, T., Zhang, S., Li, Z., & He, P. (2016). Sensitive analysis of 33 free amino acids in serum, milk, and muscle by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 9, 2814-2823.

- Zayas, J. F. (2012). *Functionality of Proteins in Food*. Springer science & business media.
- Zhang, S., Zhang, C., Qiao, Y., Xing, L., Kang, D., Khan, I. A., ... & Zhou, G. (2017). Effect of Flavourzyme on proteolysis, antioxidant activity and sensory qualities of Cantonese bacon. *Food Chemistry*, 237, 779-785.
- Zhao, X., Bao, Y., Guo, Y., Luo, J., Jiang, S., & Yang, X. (2022). Effect of phenolic compounds and hydroxyl content on the physicochemical properties of pine nut oil Pickering emulsions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 102, 5814–5825, Society of Chemical Industry, London, UK.
- 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.

ÖZGEÇMİŞ

Büşra TOSUN

EĞİTİM

- **Yüksek Lisans:** İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Gıda Mühendisliği
- **Lisans:** İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Gıda Mühendisliği
- **Lise:** Gaziosmanpaşa Anadolu Lisesi

PROJELER

- TÜBİTAK projesi: TÜBİTAK TEYDEB- 1505, Endüstriyel yan ürünlerden hazırlanan bitkisel protein hidrolizatlarının amino asit içeren organik gübre formunda üretimi karakterize edilmesi ve bitkilerdeki biyostimulant etkilerinin incelenmesi, Şubat 2023- Kasım 2023
- TÜBİTAK projesi: TÜBİTAK TEYDEB- 1505, Kararlılığı arttırılmış enkapsüle aroma ürünlerinin üretilmesi ve gıda ürünlerinde kullanım potansiyelinin değerlendirilmesi, Aralık 2023- Ocak 2025