

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜLER İLE FINDIK KÜSPESİNDEN
PROTEİN EKSTRAKSİYONU VE FINDIK PROTEİNLERİNİN
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra KİBAR BALBALLI

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

TEMMUZ 2025

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜLER İLE FINDIK KÜSPESİNDEN
PROTEİN EKSTRAKSİYONU VE FINDIK PROTEİNLERİNİN
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra KİBAR BALBALLI

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Gülşah KARABULUT

TEMMUZ 2025

Esra KİBAR BALBALLI tarafından hazırlanan “Derin Ötektik Çözücüler ile Fındık Küspesinden Protein Ekstraksiyonu ve Fındık Proteinlerinin Karakterizasyonu” adlı tez çalışması 18.07.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Jüri Başkanı : **Dr. Öğr. Üyesi Gülşah KARABULUT** (Danışman)
Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Doç. Dr. Gülay ÖZKAN**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Doç. Dr. Meral YURTSEVER**
Sakarya Üniversitesi



ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğine ve Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesine uygun olarak hazırlamış olduğum “Derin Ötektik Çözücüler ile Fındık Küspesinden Protein Ekstraksiyonu ve Fındık Proteinlerinin Karakterizasyonu” başlıklı tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın tüm aşamalarında yukarıda belirtilen yönetmelik ve yönergeye uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, bu tezi başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve 20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince Sakarya Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Enstitü tarafından belirlenmiş ölçütlere uygun rapor alındığını, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun ortaya çıkması halinde doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi beyan ederim.

(18/07/2025).

Esra KİBAR BALBALLI





Sevgili eşim Erkan ve çiçek kızım Güzin'e



TEŞEKKÜR

Her şeyden önce, tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Gülşah Karabulut'a bu çalışma süresince göstermiş olduğu kıymetli rehberliği, teşviki ve kesintisiz desteği için en derin şükranlarımı sunarım. Kendisinin uzmanlığı, yapıcı geri bildirimleri ve ilham verici mentörlüğü, bu tezin her aşamasında belirleyici olmuştur.

Bu proje Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2025-27-70-64 numaralı lisansüstü projesi ile desteklenmiştir. Sağladıkları bu kıymetli destek için müteşekkirimiz.

Özellikle bu yolculukta bana daima güç kaynağı olan sevgileri, sabırları ve bana olan inançlarıyla her daim yanımda olan eşim Erkan'a ve kızım Güzin'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Deneysel çalışmalar ve veri analizleri sürecinde zamanını, bilgisini ve desteğini esirgemeyen tüm meslektaşlarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim. Bu çalışmanın bir kısmı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından 124O455 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir; değerli katkıları için içten teşekkür ederiz.

Son olarak, bu araştırmaya doğrudan ya da dolaylı katkı sunan tüm kurumlara ve destek sağlayan kuruluşlara teşekkür ederim.

Esra KİBAR BALBALLI



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	v
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xiii
SİMGELER	xv
TABLO LİSTESİ	xvii
ŞEKİL LİSTESİ	xix
ÖZET	xxi
SUMMARY	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR TARAMASI	5
2.1. Protein Kimyası ve Yapısı	5
2.2.1. Bitki bazlı proteinler	7
2.1.2. Endüstride tarımsal atık proteinlerinin kullanımı	8
2.1.3. Tarımsal atık fındık küspesi	9
2.2. Protein Ekstraksiyon Yöntemleri	10
2.2.1. Kuru fraksiyonlama	10
2.2.2. Havalı sınıflandırma	12
2.2.3. Elektrostatik ayırma	13
2.2.4. Islak fraksiyonlama	14
2.2.5. Tuz bazlı ekstraksiyon	15
2.2.6. Alkali ekstraksiyonu	15
2.3. Derin Ötektik Çözücüler (DES) ile Protein Ekstraksiyonu	17
2.3.1. DES ile ekstraksiyon yöntemi	18
2.3.2. DES ve NADES arasındaki farklılıklar	19
2.3.3. Bitkisel protein ekstraksiyonunda DES kullanımına yönelik önceki çalışmalar	20
3. MATERYAL VE METOT	33
3.1. Derin Ötektik Çözücülerin Sentezi	33
3.2. Derin Ötektik ve Klasik Alkali Çözücülerle Protein Ekstraksiyonu	33
3.3. Protein Verimi ve Ekstraksiyon Verimliliğinin Belirlenmesi	35
3.4. SDS-PAGE Analizi	36
3.5. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi	36
3.6. İçsel Floresan Emisyonu	37
3.7. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	37
3.8. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli	37
3.9. Teknofonksiyonel Özelliklerin Analizi	37
3.9.1. Çözünürlük	37
3.9.2. Emülsiyon özellikleri	38
3.9.3. Köpük oluşturma özellikleri	38
3.10. İstatistiksel analiz	39

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	41
4.1. Fındık Proteinlerinin Verimi ve Ekstraksiyon Verimliliği.....	41
4.2. SDS-PAGE Analizi	44
4.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi	45
4.4. İçsel Floresan Emisyonu.....	46
4.5. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	48
4.6. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli	50
4.7. Teknofonksiyonel Özellikler	53
4.7.1. Çözünürlük.....	53
4.7.2. Emülsiyon aktivite indeksi ve emülsiyon stabilitesi	55
4.7.3. Köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi	56
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	59
KAYNAKÇA	63
ÖZGEÇMİŞ	73



KISALTMALAR

ALK	: Alkali Ekstraksiyon
BSA	: Sığır Serum Albumini
CD	: Dairesel Dikroizm
ChCl	: Kolin Klorür
DES	: Derin Ötektik Çözücüler
DES-GLU-C	: Kontrol Glukoz Tabanlı Derin Ötektik Çözücü
DES-GLY-C	: Kontrol Gliserol Tabanlı Derin Ötektik Çözücü
DES-SOR-C	: Kontrol Sorbitol Tabanlı Derin Ötektik Çözücü
DESys	: Derin Ötektik Çözücü Sistemleri
EAI	: Emülsiyon Aktivite İndeksi
ESI	: Emülsiyon Stabilite İndeksi
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GLU	: Glukoz
GLY	: Gliserol
GRAS	: Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen
HBA	: Hidrojen Bağ Alıcısı
HBD	: Hidrojen Bağ Vericisi
KK	: Köpük Kapasitesi
KS	: Köpük Stabilitesi
NADES	: Doğal Derin Ötektik Çözeltiler
PDI	: Polidispersite İndeks
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SOR	: Sorbitol
TRP	: Triptofan
US	: Ultrasonikasyon
UV-Vis	: Ultraviyole–Görünür Spektrofotometre



SİMGELER

%	: Yüzde
$\lambda_{\max}$	: Maksimum Dalga Boyu [nm]
A	: Absorbans
ϵ	: Molar Absorptivite Katsayısı [$L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$]
C	: Derişim [mg/mL]
d	: Parçacık Boyutu [μm]
η	: Viskozite [$mPa \cdot s$]
a/h	: Ağırlık/Hacim
xg	: Santrifüjleme İvmesi [m/s^2]
a/a	: Ağırlık/Ağırlık
I	: Floresans Yoğunluğu
K	: Adsorpsiyon Sabiti [L/mg]
t	: Zaman
ρ	: Yoğunluk [g/cm^3]
θ	: Optik Yol Genişliği
Φ	: Yağ Hacim Fraksiyonu



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 4.1. Derin ötektik çözücülerin karakterizasyonu.....	43
---	----





ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Bitkisel protein kaynakları ve protein içerikleri.	7
Şekil 3.1. Ultrases destekli DES protein ekstraksiyonunun şematik gösterimi.	34
Şekil 3.2. Alkali ve DES ile ekstrakte edilmiş fındık protein tozları.....	35
Şekil 4.1. (a) Alkali ve DES ile ekstrakte edilmiş fındık proteinlerinin süpernatant fazındaki protein verimi (%) ve ekstraksiyon verimliliği (%) (b) Toz formundaki protein verimi (%) ve ekstraksiyon verimliliği (%).	42
Şekil 4.2. Alkali ve DES ile ekstrakte edilmiş fındık proteinlerinin indirgen koşullar altındaki SDS-PAGE protein bantları	44
Şekil 4.3. Alkali ve DES ile ekstrakte edilmiş fındık proteinlerinin FTIR spektrumları.....	45
Şekil 4.4. Alkali ve DES ile ekstrakte edilmiş fındık proteinlerinin içsel emisyon spektrumu.....	47
Şekil 4.5. Alkali ve DES ile ekstrakte edilmiş fındık proteinlerinin morfolojik görüntüleri.....	49
Şekil 4.6. a) Alkali ile ekstrakte edilmiş ve b) DES ile ekstrakte edilmiş fındık proteinlerinin partikül boyut dağılımı, c) Zeta potansiyeli ve d) Ortalama partikül boyutu-polidispersite indeksi değerleri.....	51
Şekil 4.7. Alkali ve DES ile ekstrakte edilmiş fındık proteinlerinin çözünürlüğü	54
Şekil 4.8. Alkali ve DES ile ekstrakte edilmiş fındık proteinlerinin emülsiyon aktivite (m^2/g) ve stabilite (dakika) indeksleri.	55
Şekil 4.9. a) Köpük görüntüleri, b) Köpürme kapasitesi (%), c) Üst köpük tabakalarının görüntüleri, d) Alkali ve DES ile ekstrakte edilmiş fındık proteinlerinin köpük stabilitesi (%).	58



DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜLER İLE FINDIK KÜSPESİNDEN PROTEİN EKSTRAKSİYONU VE FINDIK PROTEİNLERİNİN KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Küresel nüfus artışı, iklim değişikliği ve doğal kaynakların hızla tükenmesi, dünyada sürdürülebilir ve işlevsel protein kaynaklarına yönelik yeni arayışları zorunlu kılmaktadır. Hayvansal protein kaynakları; yüksek sera gazı emisyonu, yoğun su ve arazi kullanımı gibi çevresel etkilerinin yanı sıra etik ve sağlıkla ilgili endişeler nedeniyle eleştirilmektedir. Bu durum, bitki bazlı ve çevre dostu protein kaynaklarına olan ilgiyi artırmış; özellikle tarım ve gıda sanayisinin yan ürünleri gibi yeterince değerlendirilmeyen agro-endüstriyel atıkların besin değeri ve fonksiyonel özellikleri açısından yeniden değerlendirilmesini gündeme getirmiştir.

Türkiye'nin dünya lideri olduğu fındık üretiminde, yağ çıkarıldıktan sonra geriye kalan küspe, kuru maddede yaklaşık %54'e varan protein içeriğiyle zengin ve yüksek potansiyele sahip bir yan üründür. Ancak geleneksel alkali ekstraksiyon yöntemleri, bu yan ürünün gıda endüstrisinde işlevsel olarak kullanılmasını kısıtlamaktadır. Alkali çözücülerle yapılan ekstraksiyon işlemleri her ne kadar yüksek protein verimi sağlasa da protein yapısında denatürasyona yol açarak fonksiyonel özellikleri azaltmakta ve çevreye zarar verebilmektedir. Bu nedenle, yeşil kimya ilkelerine uygun, çevresel etkileri minimum düzeyde olan yeni çözücülere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışmasında, fındık küspesinden protein ekstraksiyonu amacıyla üç farklı Doğal Derin Ötektik Çözücü (NADES) sistemi hazırlanmıştır. Bu çözücüler kolin klorür (ChCl) tabanında gliserol (DES-GLY), sorbitol (DES-SOR) ve glukozdan (DES-GLU) oluşturulmuştur. Ekstraksiyon işlemleri hem ultrases destekli hem de desteksiz olarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar pH 8,0, 9,0 ve 10,0'da uygulanan geleneksel alkali ekstraksiyon yöntemleriyle karşılaştırılmıştır. Sabit katı/sıvı oranı (1:20, a/h) kullanılarak yapılan bu işlemler sonucunda elde edilen protein izolatları; protein verimi, çözünürlük, emülsifiye ve köpürme özellikleri, partikül boyutu, zeta potansiyeli, yapısal analizler (FTIR, SDS-PAGE, içsel floresan emisyonu) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülemeleriyle kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir.

Elde edilen bulgulara göre, alkali ekstraksiyon yöntemleri DES ekstraksiyondan daha yüksek protein ve ekstraksiyon verimi göstermiştir. Örneğin; pH 10'da yapılan alkali ekstraksiyon yöntemi (ALK10) yaklaşık 260 mg/g protein ve %63 ekstraksiyon verimliliği sağlamıştır. Buna karşılık, DES-GLY ve DES-SOR sistemleri daha düşük protein (~200–220 mg/g) ve ekstraksiyon verimliliği (%50–55) göstermiştir. DES sistemlerinde bu durumun, uygun yöntemlerle proteinlerin çöktürülmesi ve süreç optimizasyonu ile giderilebileceği düşünülmektedir.

DES sistemleriyle ekstrakte edilen fındık proteinlerinin çözünürlüğü (%70–76), alkali ekstrakte edilen proteinlere kıyasla (%58–63) daha yüksek bulunmuştur.

Ayrıca DES-GLY ve DES-SOR örnekleri, emülsiyon kapasitesi açısından öne çıkmıştır. DES-GLY örneğinde emülsiyon aktivite indeksi (EAI) 15 m²/g'ye kadar yükselirken, DES-SOR örneğinde emülsiyon stabilitesi yaklaşık 60 dakika korunmuştur. Ancak köpük kapasitesi açısından alkali sistemler (%37–50), DES sistemlerine (%10–25) göre daha yüksek değerler göstermiştir.

FTIR ve içsel floresan emisyon analizleri, alkali ekstraksiyon işlemi sırasında protein yapısında açılma ve sekonder yapı değişikliklerinin meydana geldiğini göstermektedir. SDS-PAGE analizlerinde ise DES ve alkali yöntemlerle ekstrakte edilen proteinlerin indirgen koşullar altında elde edilen bant desenleri ve bant yoğunlukları arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir. SEM görüntülerinde, alkali ekstraksiyonla elde edilen proteinlerin daha kompakt ve düzgün yüzey yapısına sahip olduğu; DES ile ekstrakte edilen proteinlerin ise gözenekli ve düzensiz morfolojiler sergilediği görülmüştür. Zeta potansiyel analizleri ise alkali örneklerde (–45 ila –47 mV) daha yüksek yüzey yükü değerleri ölçülürken, DES örneklerinde bu değerlerin –29 ila –35 mV aralığında olduğu belirlenmiştir.

Bu tez çalışması, NADES sistemlerinin bitkisel protein ekstraksiyonunda sürdürülebilir ve işlevsel bir alternatif sunduğunu ortaya koymaktadır. Alkali ekstraksiyon yöntemi yüksek verim ve çözünürlük sağlarken, NADES sistemleri emülsifiye edici özellikleri, yapısal esnekliği ve çevre dostu profili ile öne çıkmaktadır. Gliserol ve sorbitol bazlı NADES sistemleri, protein-protein etkileşimlerini zayıflatarak yüzey aktivitesini artırmakta ve gıda uygulamaları için avantajlı yapılar oluşturmaktadır. Ayrıca ultrases destekli ekstraksiyonun, NADES sistemlerinin etkinliğini artırdığı ve kütle transferini hızlandığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma fındık küspesi gibi agro-endüstriyel atıkların değerli protein kaynakları olarak geri kazanılabileceğini ortaya koymakta ve NADES tabanlı ekstraksiyon sistemlerinin gıda endüstrisinde sürdürülebilir, temiz etiketli ve işlevsel ürün geliştirilmesine katkı sağlayabileceğini göstermektedir. Gelecekte, NADES sistemlerinin çözünürlük ve biyoyararlılık açısından moleküler düzeyde optimize edilmesi ve sindirilebilirlik analizleriyle desteklenmesi önerilmektedir.

PROTEIN EXTRACTION FROM HAZELNUT MEAL USING DEEP EUTECTIC SOLVENTS AND CHARACTERIZATION OF HAZELNUT PROTEIN

SUMMARY

Global population growth, climate change, and the accelerated depletion of natural resources have dramatically increased the urgency of identifying sustainable and functional protein sources to meet future food security demands. According to FAO projections, by 2050, the world population will surpass 9 billion, placing unprecedented pressure on existing food systems. Animal-based proteins, while nutritionally valuable, are increasingly criticized for their environmental impacts, including high greenhouse gas emissions, extensive land and water use, and contribution to biodiversity loss. In addition, ethical considerations regarding animal welfare and health concerns over red meat consumption have strengthened the drive toward alternative protein sources.

This context has led to growing interest in plant-based proteins, especially those derived from underutilized agro-industrial byproducts. Valorizing such side streams aligns with circular economy principles and reduces food waste while creating value-added ingredients for the food industry. Oilseed meals (press cakes) are particularly promising due to their high protein content, but they are often underexploited or used primarily as low-value animal feed.

Türkiye is the world's largest producer of hazelnuts, accounting for over 60% of global supply. After oil extraction, hazelnut press cake remains as a protein-rich byproduct, with protein contents reaching approximately 54% on a dry basis. Despite this high nutritional potential, its utilization in human food systems is limited, primarily due to challenges in extracting functionally intact proteins. Conventional alkaline extraction methods are widely used because they effectively solubilize proteins and deliver high yields. However, they also cause significant denaturation, altering secondary and tertiary structures. This structural damage can diminish solubility, emulsifying capacity, and foaming properties, making the resulting isolates less suitable for many food applications. Moreover, the use of strong alkalis raises environmental concerns due to wastewater treatment requirements and chemical hazards.

To address these issues, there is growing interest in developing green extraction techniques that minimize environmental impacts and preserve protein functionality. One such approach involves the use of Natural Deep Eutectic Solvents (NADES). NADES are mixtures of natural components (e.g., sugars, organic acids, amino acids, and polyols) that form eutectic systems through hydrogen bonding. They have emerged as promising green solvents due to their biodegradability, low toxicity, tunable physicochemical properties, and ability to disrupt plant cell walls and solubilize biomolecules without harsh conditions.

In this thesis, three different NADES systems were designed for the extraction of proteins from hazelnut press cake. These systems were based on choline chloride (ChCl) combined with glycerol (DES-GLY), sorbitol (DES-SOR), or glucose (DES-GLU), all of which are food-grade, biodegradable, and relatively inexpensive. Extraction experiments were conducted both with and without ultrasonic assistance. Ultrasound is a well-known green intensification technique that enhances mass transfer, disrupts plant matrices, and can reduce extraction times and solvent consumption.

For comparison, conventional alkaline extractions were also performed at pH 8.0, 9.0, and 10.0, using a fixed solid-to-liquid ratio (1:20 w/v). The resulting protein isolates were analyzed comprehensively for yield, solubility, emulsifying and foaming properties, particle size, zeta potential, and structural characteristics using FTIR spectroscopy, SDS-PAGE electrophoresis, intrinsic fluorescence spectroscopy, and scanning electron microscopy (SEM).

Key findings of this study revealed nuanced trade-offs between yield and functional quality. The highest protein yield was observed for alkaline extraction at pH 10 (ALK10), achieving approximately 260 mg/g with 63% extraction efficiency. DES-GLY and DES-SOR systems produced somewhat lower yields (~200–220 mg/g) and extraction efficiencies (50–55%). This difference is expected, given that strong alkalis solubilize proteins more aggressively. However, it is hypothesized that the lower yields in DES systems can be mitigated through process optimization—such as fine-tuning solvent composition, applying controlled pH shifts for protein precipitation, or integrating sequential extraction steps.

In terms of solubility, a crucial functional property for food applications, DES-extracted proteins significantly outperformed alkaline-extracted proteins. Solubility values ranged between 70–76% for DES isolates versus 58–63% for alkali isolates. This superior solubility is attributed to the milder extraction conditions of NADES systems, which reduce protein denaturation and aggregation. High solubility is essential for applications in beverages, dairy analogues, and other liquid foods.

Emulsifying properties were also improved in DES-extracted proteins. For example, the emulsion activity index (EAI) reached up to 15 m²/g for DES-GLY extracts, while DES-SOR maintained emulsion stability for approximately 60 minutes. These results align with previous studies showing that NADES extraction can improve protein surface activity by preserving flexible, partially unfolded conformations conducive to interface adsorption. Such properties are valuable in designing plant-based creams, dressings, and meat analogues.

In contrast, foaming capacity was higher for alkaline-extracted proteins (37–50%) compared to DES-extracted proteins (10–25%). Alkaline extraction can induce partial unfolding and exposure of hydrophobic residues, which can stabilize air–water interfaces during whipping. While this may be advantageous in certain bakery or confectionery applications, it comes at the cost of other functional properties and environmental sustainability.

Structural analyses supported these functional findings. FTIR and intrinsic fluorescence spectroscopy indicated more extensive unfolding and secondary structure disruption in alkali-extracted proteins. SDS-PAGE analyses under reducing conditions revealed similar band patterns between DES and alkaline extracts, suggesting that polypeptide subunit composition remained broadly conserved despite extraction method. SEM imaging highlighted morphological differences: alkaline-

extracted proteins exhibited compact and smooth surfaces, while DES-extracted proteins showed porous, irregular structures—a feature that may promote better water binding and hydration behavior in food matrices. Zeta potential analyses indicated that alkaline extracts had higher negative surface charges (−45 to −47 mV) compared to DES extracts (−29 to −35 mV), which may influence colloidal stability in formulations.

Overall, this thesis demonstrates that NADES systems represent a sustainable and functional alternative to conventional alkaline extraction for valorizing hazelnut press cake proteins. While alkaline methods excel in yield and foaming capacity, NADES systems deliver superior solubility and emulsifying properties, along with a greener, more environmentally friendly process profile. Glycerol- and sorbitol-based NADES systems, in particular, appear to weaken protein–protein interactions and enhance surface activity, creating protein ingredients well-suited for diverse food applications.

Ultrasound-assisted extraction further improved NADES performance by enhancing mass transfer and extraction efficiency. This aligns with broader trends in green process intensification, supporting more efficient and scalable extraction solutions.

Future research directions should focus on:

- Optimizing NADES formulations at the molecular level to maximize extraction yield while preserving or enhancing functional properties.
- Investigating the digestibility and bioavailability of NADES-extracted proteins using in vitro and in vivo models.
- Evaluating sensory properties and consumer acceptance of foods formulated with NADES-extracted proteins.
- Assessing economic feasibility and life cycle impacts of NADES-based extraction at industrial scale.

In conclusion, valorizing hazelnut press cake as a high-value protein source using NADES systems can support more sustainable, circular, and clean-label food production, aligning with both industry goals and global sustainability targets.



1. GİRİŞ

2050 yılı itibarıyla 9 milyarı aşması öngörülen küresel nüfus artışı, sürdürülebilir ve besleyici protein kaynaklarına yönelik acil bir talep yaratmaktadır. Geleneksel olarak insan beslenmesinde hayvansal proteinler baskın bir rol oynamış olsa da bu proteinlerin üretimi yoğun kaynak kullanımına dayanmakta ve ormansızlaşma, sera gazı emisyonları ve su kıtlığı gibi ciddi çevresel sorunlarla ilişkilendirilmektedir. Ayrıca etik kaygılar ve sağlıkla ilgili endişeler, bitki bazlı protein alternatiflerine yönelimi daha da hızlandırmıştır (Loveday, 2019; McClements ve Grossmann, 2021; Chen ve Luo, 2024). Bu dönüşüm doğrultusunda, bitkisel protein kaynakları giderek daha fazla önem kazanmakta ve baklagiller (örneğin bezelye, soya fasulyesi), tahıllar (örneğin buğday, mısır), yağlı tohumlar (örneğin kolza tohumu, ayçiçeği) gibi geleneksel bitkisel kaynaklar hem protein içeriği hem de fonksiyonel özellikleri açısından dikkat çekmektedir (Henchion ve ark., 2017; Lam ve Nickerson, 2013). Ancak, bu ana kaynaklara olan talebin artması, alternatif ve daha sürdürülebilir bitkisel protein kaynaklarının araştırılmasını da zorunlu kılmaktadır. Bu kapsamda, bitkisel proteinlerin çeşitli kaynakları arasında yer alan agro-endüstriyel yan ürünler henüz yeterince değerlendirilmemiş ancak umut vadeden bir çözüm olarak öne çıkmakta hem besinsel değer sunmakta hem de döngüsel ekonomi potansiyeli taşımaktadır (Sadh ve ark., 2018; Nadar ve ark., 2024).

Proteinler yalnızca beslenme açısından değil, aynı zamanda emülsifikasyon, jel oluşumu, çözünürlük ve köpürme gibi gıda sistemlerinin fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesinde de kritik roller üstlenmektedir. Proteinlerin birincilden dördüncül yapıya kadar uzanan yapısal hiyerarşisi, bu fonksiyonel özellikleri doğrudan etkilemekte olup; ekstraksiyon sürecinde bu yapıların korunması, fonksiyonelliğin sürdürülebilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Demodarshan ve ark., 2008; Ustunol, 2015). Bununla birlikte, alkali ekstraksiyon gibi geleneksel protein ekstraksiyon yöntemleri sıklıkla protein denatürasyonuna, çözünürlüğün azalmasına ve yoğun kimyasal ile su kullanımına bağlı olarak çevresel yüke neden olmaktadır (De Angelis ve ark., 2024; Dumoulin ve ark., 2021).

Bu bağlamda, Derin Ötektik Çözücüler (DES), geleneksel yöntemlere kıyasla çeşitli avantajlar sunan, çevre dostu ve biyouyumlu ekstraksiyon metotları olarak öne çıkmıştır. DES'ler, bir hidrojen bağ vericisi ile alıcısı arasında kurulan hidrojen bağları sayesinde düşük erime noktasına sahip ötektik bir karışım oluşturarak meydana gelir. Uçucu olmamaları, düşük toksisiteleri, biyobozunur özellikleri ve minimum işleme gereksinimleri sayesinde gıda ve farmasötik uygulamalarda ideal çözücüler olarak değerlendirilmektedir (Hanafî ve ark., 2024; Alsaidi ve Thiemann, 2025). Özellikle Doğal Derin Ötektik Çözücüler (Natural Deep Eutectic Solvents, NADES), tamamen gıda sınıfı metabolitlerden oluşmakta ve temiz etiketli protein ürünleriyle yüksek uyumluluk göstermektedir (Zhou ve ark., 2022; Jiang ve ark., 2024).

Dünyanın en büyük fındık üreticisi olan Türkiye’de yağ ekstraksiyonu sonrasında fazla miktarda elde edilen fındık küspesi, kuru bazda %54’e varan protein içeriğinin yanı sıra iyi emülsifiye edici ve köpürme özelliklerine sahiptir (Ceylan ve ark., 2022; Zhao ve ark., 2023). Ancak besinsel potansiyeline rağmen, fındık küspesi hâlâ yüksek katma değerli gıda uygulamalarında yeterince değerlendirilememektedir. Bu atığın sürdürülebilir şekilde değerlendirilmesi, sıfır atık biyorafineri hedefleri ve yerel ekonomik kalkınma stratejileriyle uyum göstermektedir.

Bu tez, Türkiye’de uygulanan soğuk sıkım fındık yağı üretimi sırasında ortaya çıkan fındık küspesinden protein geri kazanımı amacıyla derin ötektik çözücülerin (DES) potansiyel kullanımını araştırmayı hedeflemektedir.

Bu yüksek lisans tezinin hipotezleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- Derin ötektik çözücüler (DES), fındık küspesinden protein ekstraksiyonu için geleneksel alkali ekstraksiyon yöntemlerine kıyasla daha sürdürülebilir ve çevre dostu bir alternatif sunmaktadır.
- Alkali çözücülere kıyasla, DES sistemleri daha yumuşak ekstraksiyon koşulları sağlayarak, elde edilen proteinlerin yapısal bütünlüğünün ve fonksiyonel özelliklerinin (örneğin çözünürlük, emülsifikasyon) daha iyi korunmasına olanak tanımaktadır.
- DES ile yapılan ekstraksiyonlarda, uygun HBA-HBD birleşimleri ile elde edilen proteinlerin verim ve saflığı geleneksel yöntemlerle karşılaştırılabilir düzeye ulaştırılabilir.

- Doğal derin ötektik çözücüler (NADES), gıda ile temas eden uygulamalar için daha uygun çözücüler olup; protein fonksiyonelliği ve biyoyararlanımı açısından sentetik DES'lere göre üstün performans sergileyebilir.
- Ultrasonikasyon, hücre yapısının mekanik olarak bozulmasını sağlayarak çözücü penetrasyonunu artırmakta ve böylece protein ekstraksiyon verimi ile geri kazanım oranını iyileştirmek amacıyla kullanılabilir.
- Fındık küspesi gibi yerel agro-endüstriyel atıkların DES teknolojileri kullanılarak değerlendirilmesi, sıfır atık biyorafineri modellerine katkı sağlamakta ve çevresel ile ekonomik sürdürülebilirliği desteklemektedir.





2. LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Protein Kimyası ve Yapısı

Proteinler, insan vücudu için özellikle katalizör işlevi, molekül taşıma, hücresel sinyal iletimi ve bağışıklık tepkileri gibi hayati biyolojik süreçlerde temel rol oynayan polimerlerdir. Ancak gıdalardaki fonksiyonel rollerine bakıldığında; su bağlama kapasitesi, çözünürlük, renk stabilitesi, jelleşme, viskozite kontrolü, doku yapısının geliştirilmesi, emülsiyon stabilizasyonu, köpük oluşumu ve aroma bileşiklerini bağlama gibi teknolojik özelliklerin kazandırılmasında önemli görevler üstlenmektedirler (Demodarshan ve ark., 2008).

Proteinlerin yapısına bakıldığında, peptit bağları ile birbirine bağlanmış amino asitlerden oluştuğu görülmektedir. Bu proteinler doğada doğal olarak bulunan 20 farklı amino asit türünden oluşmaktadır. Bunlar: alanin, arjinin, asparajin, aspartik asit, sistein, glutamik asit, glutamin, glisin, histidin, izolösin, lösin, lisin, metiyonin, fenilalanin, prolin, serin, treonin, triptofan, tirozin ve valindir. (Nelson ve Cox, 2017). Bu amino asitler, peptit bağları aracılığıyla birbirine bağlandığında, proteinlerde hiyerarşik olarak dört düzeyde görülen farklı yapılar meydana gelir. Bu yapılar sırasıyla birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapı olarak sınıflandırılır.

Birincil yapı, amino asitlerin doğrusal bir diziliminden oluşur ve bu zincire, birçok peptit bağından oluştuğu için polipeptit zinciri adı verilir. Peptit bağları, bir amino asidin karboksil grubu ile onu izleyen amino asidin amino grubu arasında kurulur (Nelson ve Cox, 2017).

İkincil yapı, polipeptit zincirinde birincil yapıda birbirine yakın konumda bulunan amino asitlerin oluşturduğu düzenli ve tekrarlayan yapısal dizilimleri ifade eder. Bu düzenli yapılar; örneğin α -sarmallar (α -helix), β -tabakalar (β -sheet), β -dönüşleri (β -turn) ve rastgele kıvrımlar (random coil), polipeptit zincirinin birincil yapısı tarafından belirlenir (Sikorski, 2002). Helikal yapılar molekül içi hidrojen bağları ile, tabaka yapılar ise moleküller arası hidrojen bağları ile stabilize edilir. α -sarmal yapıdaki proteinler globüler (küresel) ya da fibröz (lifsi) yapıda olabilir. α -sarmal yapı, daha rijit ve kararlı bir yapı sunar. β -tabaka yapılarında, polipeptit zincirleri

neredeyse tamamen uzanmış hâlde bulunur ve birbirine komşu zincirler arasında hidrojen bağları oluşturulabilir. Bu tür yapılar genellikle sulu çözücülerde çözünmez (deMan, 2013). Küçük amino asitler genellikle α -sarmal oluşumuna daha uygundur; büyük yan zincirli amino asitler ise β -tabaka yapısında daha kolay yer alabilir. β -yapılar, α -sarmallara kıyasla daha hidrofobik karakterdedir (Damodaran ve Parkin, 2017). β -dönüşleri, büyük proteinlerin kompakt şekillerde katlanmasına olanak tanıyan U şeklinde kıvrımlardır ve genellikle iki ikincil yapıyı birbirine bağlar (Owusu-Apenten, 2004).

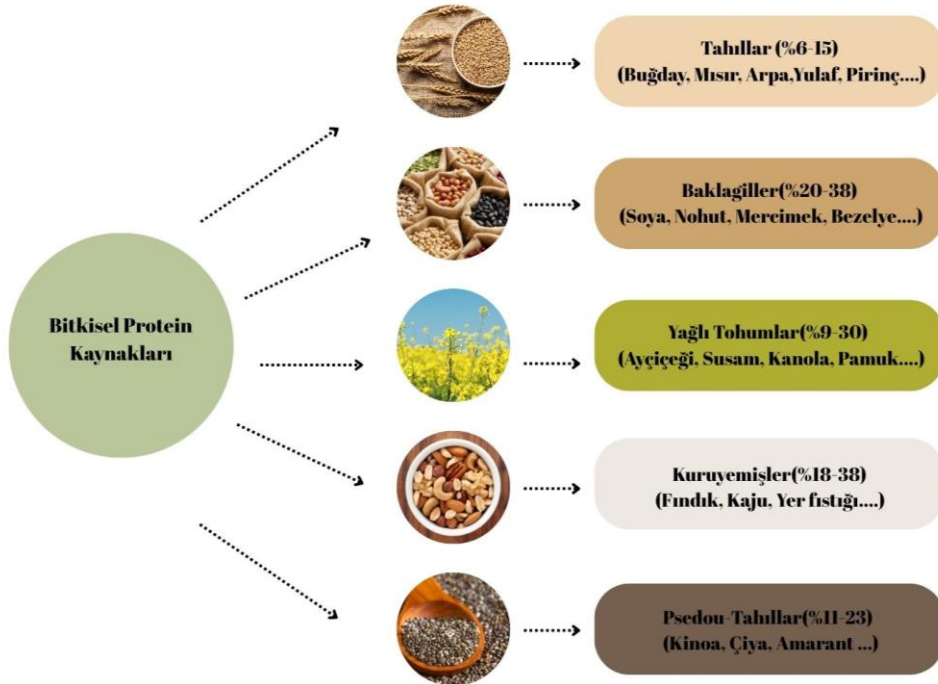
Üçüncül yapı, bir polipeptit zincirinin, içerdiği ikincil yapı elemanlarıyla birlikte üç boyutlu, kompakt bir katlanmış forma sahip olacak şekilde uzaydaki düzenlenişini ifade eder. Bir proteinin lineer bir konfigürasyondan çözeltideki üçüncül yapısına dönüşümü, oldukça karmaşık bir geometrik yeniden yapılanma sürecidir. Bu yapı, apolar (hidrofobik) amino asit kalıntılarının molekülün iç kısmına, hidrofilik kalıntıların ise dış yüzeye yerleşmesiyle oluşur (Nelson ve Cox, 2017).

Amino asit diziliminde hidrofobik ve hidrofilik kalıntıların dağılımı ve görelî oranı, proteinin moleküler şekli, yüzey topografyası ve çözünürlüğü gibi çeşitli fizikokimyasal özellikleri üzerinde önemli etkiye sahiptir (Damodaran, 2008). Protein yüzeyinde hidrofobik kalıntıların büyük kısmı yer aldığında, yüzey hidrofobikliği artmakta, buna bağlı olarak çözünürlük azalmaktadır. Bu nedenle, protein yüzeyinde hidrofobik ve hidrofilik kalıntıların dengeli bir dağılımı, çözünürlük ve emülsifiye edici özelliklerin iyileştirilmesi açısından büyük önem taşır (Sun ve Arntfield, 2011). Üçüncül yapının stabilizasyonu; hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri, disülfid köprüleri ve hidrofobik etkileşimler aracılığıyla sağlanır (Nelson ve Cox, 2017; Uversky ve Dunker, 2010).

Dördüncül yapı ise, birden fazla polipeptit zincirinin (diğer adıyla alt birimlerin veya oligomerleri) belirli bir üç boyutlu düzen içerisinde bir araya gelmesini ifade eder. Tüm proteinler dördüncül yapıya sahip değildir; ancak 100 kDa'nın üzerindeki büyük proteinler, genellikle birden fazla polipeptit zinciri içerir ve dördüncül yapı gösterir. Bu duruma en tipik örnekler, tahıllar ve soya fasulyesinden elde edilen proteinleridir (Demodarshan ve ark., 2008; Sun ve Arntfield, 2011). Bu yapının iki tipi bulunmaktadır; globüler proteinler, polipeptit zincirlerinin küresel bir yapı oluşturacak şekilde katlanmasıyla oluşur ve fibröz proteinler, polipeptit zincirlerinin uzun iplikler veya tabakalar halinde düzenlenmesiyle meydana gelir (Ustunol, 2015).

2.2.1. Bitki bazlı proteinler

Bitki bazlı proteinler son yıllarda besleyici özellikleri, çevresel sürdürülebilirlikleri ve hayvansal kaynaklı proteinlere kıyasla etik avantajları nedeniyle önemli ölçüde dikkat çekmiştir. Bu proteinler Şekil 2.1’de gösterildiği gibi ağırlıklı olarak tahıllardan (örneğin, buğday, mısır, arpa, yulaf pirinç), baklagillerden (örneğin, soya, nohut, mercimek, bezelye), yağlı tohumlardan (örneğin, ayçiçeği, susam, kanola, pamuk), kuruyemişlerden (fındık, kaju, yer fıstığı) ve psödo tahıllardan (kinoa, chia, amarant) elde edilmekte olup hem insan beslenmesinde hem de endüstriyel uygulamalarda geleneksel hayvansal proteinlere alternatif sunmaktadır (Thakur ve ark., 2023). Bu proteinler genellikle diyet lifi, doymamış yağ asitleri, fitokimyasallar ve temel mikro besin öğeleri bakımından zengindir (Karabulut ve ark., 2023; Loveday, 2019).



Şekil 2.1. Bitkisel protein kaynakları ve protein içerikleri.

Bununla birlikte, bitkisel proteinler; amino asit kompozisyonu, sindirilebilirlik ve fonksiyonel özellikler açısından hayvansal proteinlerden yapısal olarak önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Hayvansal proteinler genellikle tüm esansiyel amino asitleri içermeleri nedeniyle “tam protein” olarak kabul edilirken, birçok bitkisel protein bir veya daha fazla esansiyel amino asit bakımından eksiktir (Rutherford ve ark., 2014). Tahıllarda lizin eksikliği; baklagillerde ise metiyonin eksikliği yaygındır

(Chen ve Luo, 2024). Ancak, farklı bitki kaynaklarının stratejik olarak birleştirilmesiyle tam bir amino asit profili elde edilebilir. Soya, bezelye, kenevir, çiya ve kolza (kanola) gibi belirli protein kaynakları yüksek kaliteli protein sağlar ve bazıları dengeli amino asit profilleri sunar. Kolza tohumu proteinleri (krusiferin ve napin), kükürt içeren amino asitler açısından zengindir ve emülsifikasyon ile jel oluşturma gibi fonksiyonel özelliklerde mükemmel performans sergiler (Karabulut ve ark., 2025). Benzer şekilde, kenevir tohumu proteinleri yüksek sindirilebilirlikleri, düşük alerjeniteleri ve biyoaktif özellikleri ile dikkat çeker (Karabulut ve ark., 2023).

Bitkisel proteinler; emülsifiye edici, köpük oluşturuucu, su/yağ tutma ve jel oluşturma kapasiteleri sayesinde değerli fonksiyonel bileşenler olarak kabul edilmektedir. Amfilik (hem hidrofobik hem hidrofilik) yapıları, süt ve et benzeri ürünlerdeki emülsiyonların stabilizasyonunu mümkün kılmaktadır (Lam ve Nickerson, 2013). Örneğin, soya ve bezelye proteinleri et ikamelerinde yaygın olarak kullanılmakta; yulaf, kenevir ve chia proteinleri ise içecek ve fırıncılık ürünlerinde çözünürlük ve su tutma özellikleri nedeniyle tercih edilmektedir (Chen ve Luo, 2024).

2.1.2. Endüstride tarımsal atık proteinlerinin kullanımı

Küresel nüfus artışı ve çevresel kısıtlamaların tetiklediği sürdürülebilir protein kaynaklarına yönelik artan talep, geleneksel olmayan ve yeterince değerlendirilmemiş protein kaynaklarının araştırılmasını zorunlu kılmaktadır (Henchion ve ark., 2017). Agro-endüstriyel yan ürünler, bollukları, besin bileşimleri ve döngüsel biyoekonomi çerçevelerine potansiyel katkıları sayesinde umut vadeden bir alternatif olarak değerlendirilmektedir (Tomé-Sánchez ve ark., 2021). Tarım ve gıda işleme süreçleri sırasında ortaya çıkan kabuk, posa, kepek, yağ küspesi gibi yan ürünler; protein, diyet lifi ve biyoaktif bileşikler açısından zengin içerikleri sayesinde fonksiyonel gıda formülasyonlarında değerli birer hammadde kaynağı olarak öne çıkmaktadır (Hadidi ve ark., 2023; Galanakis, 2012). Enzimatik hidroliz ve mikrobiyal fermantasyon gibi modern biyoteknolojik işlemler, bu proteinlerin gıda, ambalaj, tarım ve tıp alanlarında kullanılmak üzere ekstrakte edilmesini kolaylaştırmaktadır (Sadh ve ark., 2018). Agro-endüstriyel atıklardan elde edilen mikrobiyal ve bitkisel proteinler, besinsel yeterliliği sağlarken sınırlı kaynaklara bağımlılığı azaltarak gelecekteki gıda kıtlıklarına karşı uygulanabilir bir çözüm sunmaktadır (Nadar ve ark., 2024).

Tahıl işleme yan ürünleri (örneğin buğday kepeği, pirinç kabuğu, mısır gluteni), yağlı tohum küspeleri (kanola, ayçiçeği, soya fasulyesi), meyve ve sebze kalıntıları (narenciye kabukları, elma posası, domates atığı), bira endüstrisi atıkları (atıl tahıllar, üzüm posası) ve yumru bitki artıkları (patates kabukları, manyok posası) gibi çeşitli tarımsal atıklar, insan ve hayvan beslenmesine uygun proteinlerin geri kazanımı için ileri düzey işleme teknikleriyle değerlendirilmektedir (Hadidi ve ark., 2023; Alvarez-Castillo ve ark., 2021).

Tarımsal atıklardan elde edilen proteinler, çeşitli sektörlerde çok yönlü olarak değerlendirilmektedir. Gıda endüstrisinde emülgatör, tekstür iyileştirici ve besin takviyesi olarak fırıncılık ürünleri ve içeceklerde kullanılmakta (Hadidi ve ark., 2023); yem sektöründe ise özellikle su ürünleri yetiştiriciliğinde balık unu ve soya küspesine alternatif protein kaynağı olarak öne çıkmaktadır (Priyanka ve ark., 2024). Ayrıca biyomalzeme alanında, bu proteinler biyoçözünür filmler, hidrojel yapılar ve kontrollü salım sistemlerinin temel bileşenleri olarak değerlendirilmekte (Alvarez-Castillo ve ark., 2021); farmasötik uygulamalarda ise antioksidan, antimikrobiyal ve terapötik etkiler gösteren biyoaktif peptitlerin üretiminde kullanılmaktadır (Boboua ve ark., 2024).

Agro-endüstriyel yan ürünler, yeterince değerlendirilmemiş ancak oldukça umut vadeden bir protein kaynağını temsil etmektedir. Bu atıkların kullanımı, yalnızca protein talebini ve gıda israfını aynı anda ele almakla kalmayıp, aynı zamanda ekonomik ve çevresel sürdürülebilirliği de teşvik etmektedir. Bu yeniliklerin ölçeklendirilerek küresel gıda sistemlerine entegre edilebilmesi için gelecekteki araştırmalar ve yasal düzenlemeler büyük önem taşımaktadır.

2.1.3. Tarımsal atık fındık küspesi

Türkiye, dünya fındık sektöründe yaklaşık %70–75’lik pay ile belirleyici bir konuma sahiptir (İslam, 2018; Güney, 2014). Ülke genelinde yaklaşık 700.000 hektarlık alan fındık tarımına ayrılmış olup, bu üretim faaliyeti başta Doğu ve Orta Karadeniz bölgelerinde yoğunlaşmak üzere 500.000’den fazla çiftçi ailesinin geçim kaynağını oluşturmaktadır (Temizyürek-Arslan, 2023). Fındık ihracatı, Türkiye’ye yıllık yaklaşık 1,5 ila 2,8 milyar ABD doları düzeyinde önemli bir ekonomik getiri sağlamak ve ülkenin tarımsal ihracat gelirlerinin yaklaşık %12–20’sini oluşturmaktadır (Bozoğlu ve ark., 2019; İslam, 2018). Türkiye, dünya fındık ihracatında lider konumda olmasına rağmen, ihracatın önemli bir kısmı ham formda

gerçekleştirilmektedir; bu durum, katma değer yaratma potansiyelini ve uluslararası rekabet gücünü sınırlamaktadır. Bu nedenle, Türkiye'nin küresel fındık endüstrisindeki liderliğini sürdürebilmesi için modernizasyon, iklim uyumu ve değer zinciri geliştirmeye yönelik stratejik yatırımlar kritik öneme sahiptir (Bozoğlu ve ark., 2019; İslam, 2018).

Fındık işleme süreci, önemli miktarda yan ürün üretmektedir; kabuklar, tüm fındık ağırlığının yaklaşık %55'ini, kabuk zarları ise iç fındık ağırlığının yaklaşık %2,5'ini oluşturmaktadır (Ceylan ve ark., 2023; Aguado-González ve ark., 2025). Yalnızca Türkiye'nin yıllık fındık üretiminin 600.000 metrik tonun üzerinde olduğu göz önüne alındığında, kabuk ve zar atıklarının hacmi oldukça büyüktür (Gianessi & Williams, 2023). Buna ek olarak, yağ ekstraksiyonu sırasında ortaya çıkan bir yan ürün olan fındık küspesi, iç fındık ağırlığının yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır (Ceylan ve ark., 2023). Geleneksel olarak bu yan ürünler ya atılmakta ya da yeterince değerlendirilememektedir; bu durum hem çevresel yönetim açısından sorun yaratmakta hem de biyoaktif bileşikler açısından zengin olan bu materyallerin kaybı anlamına gelmektedir (Zhao ve ark., 2023). Bu nedenle, bu atıkların sürdürülebilir şekilde katma değere dönüştürülmesine yönelik stratejiler hem araştırma hem de endüstri alanında giderek daha fazla önceliklendirilmektedir.

Fındıklar, yalnızca yağ profilleriyle değil, özellikle atık küspe içerisindeki protein içerikleriyle de değer görmektedir. Fındık küspesi, kuru madde bazında %38,7 ile %54,4 arasında değişen protein içeriğine sahiptir ve bu oran, konsantrasyon açısından soya proteiniyle benzer bir kategoriye yerleştirilmektedir (Ceylan ve ark., 2023). Esansiyel ve dallanmış zincirli amino asitleri içeren dengeli amino asit profili sayesinde, beslenme amaçlı uygulamalara uygun bir yapı sunmaktadır. Fındikkabuğu zarı da %7,5–9,4 arasında değişen protein içeriğinin yanı sıra, diyet lifi ve biyoaktif lipidler içermekte olup, çok işlevli bir gıda katkı maddesi veya takviye ürünü olarak potansiyelini artırmaktadır (Ceylan ve ark., 2023).

2.2. Protein Ekstraksiyon Yöntemleri

2.2.1. Kuru fraksiyonlama

Kuru fraksiyonlama, bitkisel protein açısından zengin fraksiyonların nişasta ve lif bileşenlerinden ayrılmasını sağlayan, çözücü kullanılmayan ve çevresel açıdan sürdürülebilir bir yöntemdir. Bu işlem genellikle mekanik boyut küçültme (öğütme)

ve ardından hava sınıflandırması veya elektrostatik ayırma gibi fiziksel ayırma tekniklerini içerir. Su, asit veya alkali kimyasalların kullanıldığı ve protein denatürasyonuna neden olan ıslak fraksiyonlamanın aksine, kuru fraksiyonlama proteinlerin doğal fonksiyonelliğini korur; böylece çözünürlük, emülsifikasyon ve jel oluşturma özellikleri muhafaza edilir (Schutyser ve van der Goot, 2011). Bu yöntem, nişasta granülleri ile protein partikülleri arasındaki boyut farkı gibi yapısal özellikleri nedeniyle baklagiller ve tahıllar için özellikle avantajlıdır (Pelgrom ve ark., 2015).

Ayrıca, kuru fraksiyonlama yeşil işleme ilkeleriyle uyumludur ve geleneksel ıslak yöntemlere kıyasla daha düşük enerji ve su gereksinimi sunar. Öğütme teknolojileri ve sınıflandırma sistemlerinde son yıllarda yaşanan gelişmeler, kuru işlemenin ayırma verimliliğini ve ölçeklenebilirliğini artırmış; böylece bu yöntemi büyük ölçekli gıda uygulamaları için umut vadeden bir seçenek haline getirmiştir (Pulivarthi ve ark., 2023). Düşük çevresel etkiye sahip fonksiyonel protein konsantrelerinin üretiminde kuru fraksiyonlama kullanımının iyi belgelenmiş olması ve sürdürülebilir gıda bileşenlerine olan küresel ilginin artmasıyla bu yönetime olan ilginin giderek arttığı bildirilmektedir (Meenakshi Sundaram ve ark., 2024).

Kuru fraksiyonlamanın en belirgin avantajlarından biri, kimyasal çözücü kullanımının tamamen ortadan kaldırılmasıdır; bu sayede protein denatürasyonu ve toksik kalıntı riski de elimine edilmiş olur. Bu çözücüsüz işlem özelliği, özellikle temiz etiketli (clean-label) ve organik gıda ürünleri için kritik öneme sahip olan daha temiz ve çevre dostu bir süreç sağlar (Meenakshi Sundaram ve ark., 2024). Ancak bu yöntemin dezavantajı, elde edilen protein saflığının nispeten düşük olmasıdır. Islak yöntemler >%90 saflıkta protein izolatları elde edebilirken, kuru fraksiyonlama ile üretilen ürünlerin protein içeriği genellikle hammadde türüne ve öğütme-sınıflandırma parametrelerinin optimizasyonuna bağlı olarak %50–70 arasında değişmektedir (Vogelsang-O'Dwyer ve ark., 2020).

Bu sınırlamaya rağmen, kuru fraksiyonlama, doğal protein yapılarının korunması sayesinde çözünürlük ve köpük oluşturma kapasitesi gibi protein fonksiyonelliğini daha yüksek düzeyde muhafaza etmektedir. Bu durum, kuru fraksiyonlama ile elde edilen proteinleri fırıncılık ürünleri, süt alternatifleri ve et benzeri ürünler gibi çeşitli gıda uygulamaları için uygun hale getirmektedir. Ayrıca, hava sınıflandırmasının elektrostatik ayırma veya ardışık işlem basamakları ile entegre edildiği hibrit yaklaşımlar, fonksiyonel bütünlüğü korurken protein zenginliği ve veriminde

iyileşmeler sağladığını ortaya koymuştur (Pulivarthi ve ark., 2023; Pelgrom ve ark., 2015).

2.2.2. Havalı sınıflandırma

Havalı sınıflandırma, öğütülmüş bitki materyallerinden protein, nişasta ve lif bileşenlerini partikül boyutu, yoğunluğu ve aerodinamik özelliklerindeki farklara dayanarak ayıran kuru bir ayırma teknolojisidir. Mekanik öğütme işleminden sonra, partiküller bir hava sınıflandırıcısına beslenir ve burada merkezkaç kuvvetleri ile hava akışındaki gradyanlar sayesinde daha ince ve hafif olan protein partikülleri, daha ağır nişasta granüllerinden ayrılır (Schutyser ve van der Goot, 2011). Sınıflandırıcı rotoru ve hava akış hızı, ince ve kaba fraksiyonlar arasındaki sınırı belirleyen kesme boyutunu tayin eder (Kaur ve Bhatia, 2022). Bu yöntem, kimyasal çözücü veya su içermediğinden, proteinlerin doğal yapısını korur ve çevresel etkileri en aza indirir (Xing ve ark., 2020).

Hava sınıflandırması sırasında, protein açısından zengin fraksiyon (genellikle <45 µm) ince fraksiyon olarak toplanırken, nişasta açısından zengin kaba fraksiyon (genellikle >45 µm) yerçekimi ve merkezkaç kuvvetlerinin etkisiyle çöker (Silventoinen ve ark., 2018). Bezelye ve mercimek gibi baklagillerde elde edilen ince fraksiyon, sınıflandırıcı hızı, besleme oranı ve partikül dağılımına bağlı olarak %55–63'e kadar protein içerebilmektedir (Pelgrom ve ark., 2015; Xing ve ark., 2020). Ancak, nohut veya kolza gibi küçük nişasta granülleri veya yapışkan lifler içeren hammaddelerde bu yöntem daha az etkilidir; bu gibi durumlarda, protein fraksiyonunun daha saf hale getirilmesi için elektrostatik ayırma gerekli olabilir (Wockenfuss ve ark., 2023).

Hava sınıflandırması, düşük enerji gereksinimi ve çözücüsüz işlem yapısı sayesinde temiz etiketli ve sürdürülebilir gıda üretimi ilkeleriyle uyumlu bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Islak fraksiyonlamaya kıyasla su kullanımını ortadan kaldırır, ısıl denatürasyonu azaltır ve proteinlerin çözünürlük ile jel oluşturma özelliklerini korur (Schutyser ve van der Goot, 2011; Kottage ve ark., 2024). Ayrıca, daha düşük sermaye ve işletme maliyetleri nedeniyle büyük ölçekli protein zenginleştirme uygulamaları için cazip bir yöntemdir (Kaur ve ark., 2024). Bununla birlikte, bu yöntemin sınırlamaları arasında daha düşük protein saflığı (genellikle %50–65) ve mütevazı verim oranları yer almaktadır; bu da >%80 saflık gerektiren protein izolatu uygulamaları için yetersiz olabilir (Pelgrom ve ark., 2015). Ayrıca, ayırma

verimliliği; kullanılan hammadde özellikleri, partikül aglomerasyonu ve sınıflandırıcı tasarımı gibi faktörlerden etkilenmektedir.

2.2.3. Elektrostatik ayırma

Elektrostatik ayırma, parçacıkların birbirleriyle ya da yükleme tüpünün iç yüzeyiyle sürtünmesi sonucu elektrik yükü kazanması prensibine dayanan triboelektrik etki temelinde çalışır. Yüklenen parçacıklar daha sonra bir elektrik alanından geçirilir ve sahip oldukları yükün polaritesi ve büyüklüğüne göre saptırılır. Protein parçacıkları, amino ve karboksil grupları nedeniyle genellikle pozitif yük kazanma eğilimindeyken, lif ve polisakkarit parçacıkları daha zayıf ya da negatif yükler edinir (Wang ve ark., 2024; Zhu ve ark., 2021). Bu farklılık, parçacıkların zıt yüklü elektrotlara seçici olarak yönelmesini sağlar. Geleneksel ıslak ayırma yöntemlerine kıyasla, bu kuru teknik çözücü veya yüksek sıcaklık gerektirmez; dolayısıyla son derece sürdürülebilir ve enerji açısından verimli bir yöntemdir (Schutyser ve van der Goot, 2011).

Elektrostatik ayırma, soya fasulyesi, bezelye, acı bakla gibi çeşitli bitkisel ürünlerde ve hatta *Enteromorpha prolifera* gibi deniz yosunlarında dahi etkili olduğunu kanıtlamıştır. Soya unu örneklerinde, ince öğütme ile spiral tüp tribo-yükleme işleminin birleşimi sonucunda %15'e kadar protein zenginleştirmesi ve %62 protein geri kazanım oranı elde edilmiştir (Xing ve ark., 2018). Bezelye ve mercimek gibi baklagillerde ise, hava sınıflandırmasını takiben elektrostatik ayırma ile yapılan iki aşamalı kuru fraksiyonlama sayesinde protein saflığı %63–67 düzeyine çıkarılmıştır (Xing ve ark., 2020). Bu yöntem, tüp uzunluğu, gaz akış hızı ve nem içeriği gibi parametrelere karşı oldukça duyarlıdır; zira bu faktörler parçacıkların dağılımını ve yüklenme verimliliğini doğrudan etkilemektedir (Wang ve ark., 2024).

Elektrostatik ayırma, gıda, yem ve nutrasötik ürünlerde fonksiyonel protein bileşenlerinin üretiminde kullanılmaktadır. Bu yöntem, özellikle emülsifikasyon ve jelasyon gibi proteinlerin doğal fonksiyonelliğinin korunmasının gerekli olduğu uygulamalar için oldukça uygundur (Assatory ve ark., 2019). Islak ekstraksiyonla elde edilen izolatlarla kıyasla protein saflığı genellikle daha düşük olmakla birlikte, çözücü ve ısıl işlem kullanılmaması sayesinde biyolojik aktivitenin korunumu daha yüksek düzeyde sağlanmaktadır. Hava sınıflandırmaya kıyasla, elektrostatik ayırma; benzer boyutta fakat farklı bileşimdeki partikülleri (örneğin protein ve lif) ayırmada daha hassas bir yöntemdir (Pelgrom ve ark., 2015). Bununla birlikte, yüksek nem

içeriğine sahip veya partikül farklılığı düşük numunelerde etkinliği azalmakta ve halen ölçeklenebilirlik ile işlem hacmi açısından çeşitli zorluklarla karşı karşıyadır (Flynn ve ark., 2017).

2.2.4. Islak fraksiyonlama

Islak fraksiyonlama, özellikle yüksek saflıkta protein izolatlarının elde edilmesi amacıyla bitkisel protein ekstraksiyonunda yaygın olarak uygulanan bir tekniktir. Bu süreç genellikle proteinlerin alkali ortamda çözündürülmesi, ardından proteinlerin izoelektrik noktasında (genellikle pH 4.5–5) izoelektrik çöktürmeye tabi tutulması, santrifüjlenmesi ve kurutulması adımlarını içerir (De Angelis ve ark., 2024; Möller ve ark., 2022). Yöntem, >%80 protein içeriğine sahip izolatlar üretmede oldukça etkilidir ve bezelye, bakla ve soya fasulyesi gibi baklagillerin işlenmesinde; bitkisel bazlı et benzerleri, süt alternatifleri ve besin takviyeleri gibi uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Li ve ark., 2024; Nasrollahzadeh ve ark., 2022). Ayrıca, verimi artırmak ve protein bütünlüğünü korumak amacıyla, kuru ve ıslak tekniklerin birleştirildiği hibrit prosesler de geliştirilmiştir (Dumoulin ve ark., 2021).

Protein izolasyonunda etkinliğine rağmen, ıslak fraksiyonlama genellikle çevresel etkileri nedeniyle eleştirilmektedir. Bu yöntem, 1 kg protein başına yaklaşık 85 kg su ve yaklaşık 63 MJ enerji gerektirmekte olup, süreci kaynak açısından yoğun ve kuru yöntemlere kıyasla daha az sürdürülebilir hale getirmektedir (Dumoulin ve ark., 2021). Ayrıca, alkali ekstraksiyon ve asidik çöktürme sırasında kullanılan kimyasal çözücüler (örneğin NaOH ve HCl), proteinlerde denatürasyona ve geri dönüşümsüz agregasyona yol açarak çözünürlüğü ve fonksiyonel kaliteyi azaltabilir (De Angelis ve ark., 2024; Nasrollahzadeh ve ark., 2022). Bunun yanı sıra, bu çözücüler uygun şekilde arıtılmadığında tehlikeli atıklar oluşturabilir ve bu durum çevresel endişeleri artırmaktadır. Bu nedenle, yalnızca su kullanılan sistemler ya da pH-nötr yaklaşımlar gibi daha hafif ıslak ekstraksiyon yöntemleri, çözücü yükünü azaltmak ve protein fonksiyonelliğini korumak amacıyla önerilmektedir (Möller ve ark., 2022). Bununla birlikte, bu alternatif yaklaşımlar saflık veya endüstriyel ölçeklenebilirlikten ödün verme riskini beraberinde getirerek, çevresel sürdürülebilirlik ile endüstriyel performans arasında bir denge gerektirdiğini ortaya koymaktadır.

2.2.5. Tuz bazlı ekstraksiyon

Tuz çözücileri, iyonik kuvvet düzenlemesi yoluyla protein çözünürlüğünü ayarlayabilme kapasiteleri sayesinde bitkisel protein ekstraksiyon süreçlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tuzla çözünme etkisi, özellikle globulinler için, elektrostatik etkileşimleri gölgeleyerek ve protein–matris bağ kuvvetlerini zayıflatarak protein ekstrakte edilebilirliğini artırır (Duong-Ly ve Gabelli, 2014; Lawal, 2004). NaCl gibi yaygın kullanılan tuzlar, minimum denatürasyonla doğal yapısına yakın proteinlerin ekstraksiyonunu kolaylaştırır. Bezelye proteinlerinde, 0.4 M NaCl konsantrasyonunda en yüksek ekstraksiyon verimi (%78'e kadar) elde edilmiş ve bu durum, kovalent olmayan etkileşimlerin bozulması yoluyla proteinlerin hücresel matrislerden daha etkin şekilde salınmasına bağlanmıştır (Zhang ve ark., 2025). Bu durum, protein–hücre duvarı tutulumu gibi sınırlayıcı bir faktörün ön planda olduğu baklagil bazlı hammaddeler için tuz ekstraksiyonunu özellikle avantajlı hale getirmektedir.

İzoelektrik çöktürme veya alkali çözündürmeye kıyasla, tuzla ekstrakte edilen proteinler genellikle daha yüksek çözünürlük ve yapısal bütünlük sergilemektedir. Bu proteinler, doğal konformasyonlarının korunması ve işlem sırasında minimal agregasyon yaşamaları sayesinde, emülsifiye etme ve köpük oluşturma özelliklerinde üstün performans göstermektedir (Karaca ve ark., 2011; Stone ve ark., 2015). Örneğin, tuzla ekstrakte edilen bezelye proteinleri, izoelektrik çöktürme ile elde edilen proteinlere kıyasla daha yüksek yağ tutma kapasitesi ve emülsiyon stabilitesi göstermiştir. Çünkü izoelektronik noktada çöktürme yöntemi genellikle kaliteyi düşüren fitat ve pigmentlerle birlikte çöktürmeye neden olmaktadır (Tanger ve ark., 2022). Ayrıca, tuz ekstraksiyonu daha hafif pH koşullarında gerçekleştirilir ve sert alkali işlemlerden kaçınılır, bu da proteinlerin denatürasyon ve yeniden sulandırıldığında geri dönüşümsüz jelasyon riskini azaltır (Zhang ve ark., 2025). Bu yönleriyle tuz ekstraksiyonu, yüksek çözünürlükte ve fonksiyonel bütünlüğü korunmuş protein izolatlarına ihtiyaç duyulan uygulamalar için değerli bir alternatif sunmaktadır.

2.2.6. Alkali ekstraksiyonu

Alkali ekstraksiyonu, çeşitli bitki bazlı materyallerden protein izolasyonu amacıyla yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu teknik, proteinlerin sodyum hidroksit (NaOH) veya diğer alkali ajanlar kullanılarak, genellikle pH 8–12 aralığında güçlü

bazik bir ortamda çözündürülmesini içerir. Alkali koşullarda, protein yapısı içerisindeki intermoleküler kuvvetler bozulur, bu da denatürasyon ve proteinlerin katlanmamış hale gelmesine neden olarak çözünürlüğü artırır (Hadidi ve ark., 2023; Shen ve ark., 2008). Bu bozulma sürecinde hidrojen bağları ve disülfid köprüleri kırılır ve hücre duvarı matrisi içinde bağlı durumda bulunan proteinlerin serbest bırakılması kolaylaşır (Souza ve ark., 2016). Elde edilen çözünür protein fraksiyonu genellikle, hedef proteinin izoelektrik noktasına kadar pH düşürülerek izoelektrik çöktürme yöntemiyle geri kazanılır.

Alkali ekstraksiyonla elde edilen proteinlerin verimi ve kalitesi, pH, sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve biyokütle/çözücü oranı gibi çeşitli faktörlere önemli ölçüde bağlıdır. Protein verimi, genellikle pH arttıkça artar; ancak bu artış belirli bir noktaya kadar (genellikle pH 9–11 aralığı) geçerlidir. Bu eşiğin aşılması durumunda denatürasyon ve agregasyon meydana gelebilir ve bu da çözünürlük, köpük oluşturma ve emülsifikasyon gibi fonksiyonel özellikleri olumsuz etkileyebilir (Valenzuela ve ark., 2012; Karlsen ve ark., 2022). Daha yüksek sıcaklıklar (50–70 °C) protein çözünürlüğünü ve kütle transferini hızlandırırsa da aynı zamanda Maillard reaksiyonları ve peptid hidrolizi gibi istenmeyen modifikasyonlara da neden olabilir (Braspaiboon ve ark., 2022). Ekstraksiyon süresi de etkilidir; 90 dakikadan uzun süreler, oksidatif hasara yol açabilir ve hassas protein fraksiyonlarının geri kazanımını azaltabilir.

Alkali ekstraksiyon, yalnızca protein verimini etkilemekle kalmaz, aynı zamanda yapısal ve fonksiyonel özelliklerde de önemli değişimlere neden olur. Alkali koşullarda ekstrakte edilen proteinler, genellikle daha yüksek yüzey hidrofobisitesi, değişmiş moleküler konformasyon ve iyileştirilmiş emülsifiye edici ve köpük oluşturma özellikleri sergiler (Hou ve ark., 2017; Gao ve ark., 2020). Ancak, yüksek pH'da meydana gelen denatürasyon, hassas amino asitlerin (örneğin, lizin, sistein) bozulmasına ve besleyici olmayan çapraz bağlı bileşikler (örneğin lizinolalanin) oluşumuna yol açarak besinsel kaliteyi azaltabilir. Bu tür bileşikler yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilir (Hou ve ark., 2017; Umagai ve ark., 2006).

Alkali ekstraksiyonun avantajları, yönteminin basitliği, maliyet etkinliği ve büyük ölçekli işlemlere uygunluğu olarak öne çıkmaktadır. Bu yöntem özellikle tahıl ve baklagil kaynaklarından glutelin ve prolaminlerin çözündürülmesinde etkilidir (Zhang ve ark., 2014). Ayrıca, pirinç kepeği, çay posası ve yaprak biyokütlesi gibi

yeterince değeriendirilmemiş tarımsal yan ürünlerden protein geri kazanımını da mümkün kılar (Zhang ve ark., 2014; Samad ve ark., 2021). Hafif alkali koşullar ve daha kısa işlem süreleri ile protein bütünlüğünü koruyarak verimliliği artıran hızlı alkali teknikler de geliştirilmiştir (Souza ve ark., 2016). Bununla birlikte yöntem, izoelektrik çöktürme, tuz diyalizi, ultrafiltrasyon veya enzimatik hidroliz gibi işlemlerle uyumlu olup, ekstrakte edilen proteinlerin istenen şekilde modifiye edilmesine olanak tanır (Braspaiboon ve ark., 2022). Basitliği ve etkinliği sayesinde, gıda, yem ve biyopolimer üretimi gibi alanlarda hem araştırma hem de endüstriyel ölçekte yaygın olarak uygulanmaktadır.

Avantajlarına rağmen, alkali ekstraksiyonun çeşitli sınırlamaları bulunmaktadır. Yüksek pH, proteinlerin kısmi bozulmasına, agregasyon sonucu çözünürlüğün azalmasına ve fonksiyonel özelliklerin olumsuz yönde değişmesine neden olabilir (Abd Rahim ve ark., 2023). Ayrıca, yüksek pH koşullarında gerçekleştirilen işlemler, enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarının ve besinsel açıdan zararlı olabilecek bileşiklerin oluşma ihtimalini artırır; bu durum besin güvenliğini tehlikeye atabilir (Hou ve ark., 2017). Bunun yanı sıra, süreç sonunda oluşan büyük miktarda alkali atık suyun nötrale edilmesi ve arıtılması gerekmektedir; bu da hem çevresel hem de ekonomik açıdan zorluklar yaratmaktadır.

2.3. Derin Ötektik Çözücüler (DES) ile Protein Ekstraksiyonu

Derin ötektik çözücüler, belirli molar oranlarda bir hidrojen bağı vericisi (HBD) ile bir hidrojen bağı alıcısı (HBA) arasında oluşan hidrojen bağları yoluyla sentezlenen yeni nesil çözücülerdir. Bu etkileşim sonucunda, bileşenlerin her birinin erime noktalarından önemli ölçüde daha düşük bir erime noktasına sahip ötektik bir karışım meydana gelir. DES'ler, uçucu olmamaları, düşük toksisiteye sahip olmaları, biyobozunurlukları, düşük maliyetli ve kolay sentezlenebilir yapıları sayesinde, özellikle gıda sınıfı veya doğal bileşenler kullanılarak hazırlandıklarında, sürdürülebilir çözücü sistemleri olarak dikkat çekmektedirler (Alsaiddi ve Thiemann, 2025; Hanafi ve ark., 2024).

DES'ler, yeşil kimya prensipleriyle uyumlu olmaları sayesinde geleneksel çözücülere sürdürülebilir bir alternatif sunmaktadır. Bu çözücülerin protein ekstraksiyonundaki kullanımı, çeşitli biyokütle kaynaklarında başarılı sonuçlar vermiş, enerji tüketimini azaltmış ve zararlı atık oluşumunu en aza indirmiştir. Örneğin, susam küspesinden

kolin klorür-laktik asit içeren DES kullanılarak yapılan protein ekstraksiyonu, daha yüksek protein çözünürlüğü ve fonksiyonel özelliklerde iyileşme ile sonuçlanmıştır (Cao ve ark., 2023). Ayrıca, yer bademi küspesi, mikroalgler ve kenevir gibi diğer matrislerde de DES kullanımı, artan verim ve protein stabilitesinde gelişme ile etkili bulunmuştur (Jiang ve ark., 2024; Chen ve ark., 2025; Guzmán-Lorite ve ark., 2022).

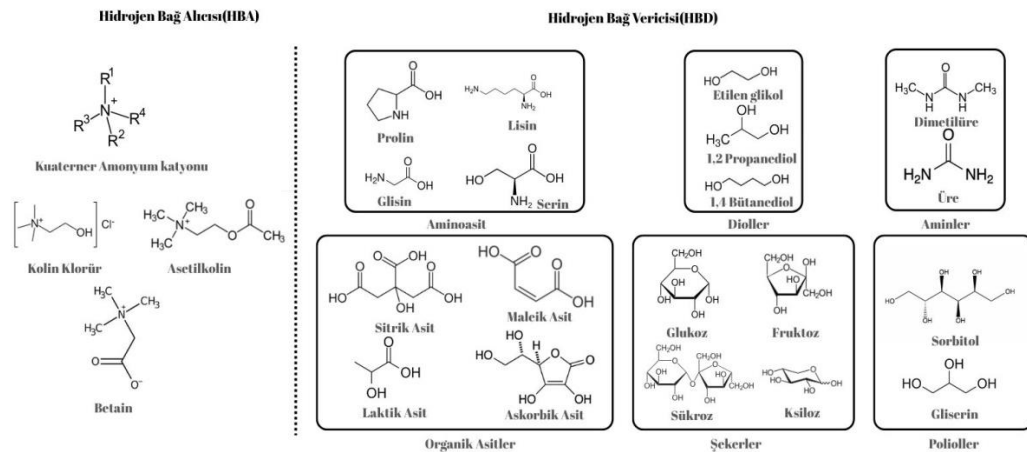
DES'ler, geniş bir işlem koşulu aralığında kimyasal olarak kararlı olup, çoğunlukla doğal olarak bulunan ve Genel Olarak Güvenli Tanınan (GRAS) bileşenlerden oluşmaktadır. Biyouyumlulukları, bu çözücüler özellikle gıda, nutrasötik ve farmasötik uygulamalar için son derece uygun hale getirmektedir. DES'lerin bir alt sınıfı olan NADES, özellikle düşük sitotoksiteleri ve gıda güvenliği açısından avantajlı olmalarıyla öne çıkmaktadır. Zein ve yulaf proteini gibi sistemlerde NADES kullanımı üzerine yapılan çalışmalar, bu çözücülerin protein bütünlüğünü korurken çevresel etkiyi en aza indirme potansiyelini doğrulamıştır (Anvar ve ark., 2025; Chakravorty ve Das, 2025; Ge ve ark., 2025).

2.3.1. DES ile ekstraksiyon yöntemi

DES ile yapılan protein ekstraksiyonları genellikle, hedef biyokütlenin önceden hazırlanmış bir DES çözeltisi ile kontrollü sıcaklık ve karıştırma koşullarında karıştırılması esasına dayanır. Mol oranı, sıcaklık (30–60 °C), katı-sıvı oranı ve viskoziteyi azaltmak amacıyla su ilavesi gibi parametreler, protein verimini maksimize edecek şekilde optimize edilir. Protein ekstraksiyonunun etkinliği, büyük ölçüde DES'in hazırlanmasında kullanılan spesifik hidrojen bağı alıcısı (HBA) ve hidrojen bağı vericisi (HBD) bileşenlerine bağlıdır. Kolin klorür, en yaygın kullanılan HBA olup; genellikle gliserol, üre, sitrik asit, glukoz, sorbitol veya okzalik asit gibi HBD'lerle eşleştirilir. Bu bileşenlerin polarite, viskozite ve hidrojen bağı oluşturma kapasitesi, protein çözünürlüğünü ve yapısal bütünlüğün korunmasını doğrudan etkiler. Örneğin, kolin klorür: okzalik asit karışımı, yulaf proteinleri için yüksek α -heliks içeriğini ve emülsifikasyon kapasitesini koruyarak oldukça etkili bulunmuştur (Ge ve ark., 2025). Zein proteini üzerinde yapılan çalışmada ise, farklı NADES kombinasyonlarının yüzey hidrofobikliği ve ikincil yapı üzerinde önemli değişiklikler yarattığı bildirilmiştir (Anvar ve ark., 2025).

2.3.2. DES ve NADES arasındaki farklılıklar

DES (Derin Ötektik Çözücüler) terimi hem sentetik hem de doğal formülasyonları kapsarken, NADES (Doğal Derin Ötektik Çözücüler) ise Şekil 2.2’de gösterildiği gibi özellikle biyolojik olarak uyumlu bileşenlerden oluşur. NADES sistemleri; hidrojen bağ vericisi olarak şekerler, amino asitler, dioller, aminler, polioller ve organik asitler gibi doğal metabolitleri, hidrojen bağ alıcısı olarak ise kuaterner amonyum katyonları, kolin klorür, asetilkolin ve betain gibi bileşenleri içerir (Li, 2022). Bu iki sistem arasındaki temel fark., NADES’in GRAS (Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen) statüsünde olması ve güvenlik profili açısından daha avantajlı olmasıdır; bu da NADES’in yenilebilir ve terapötik ürünlerde kullanımını mümkün kılar (Alsaiddi ve Thiemann, 2025). Sentetik DES sistemlerine kıyasla, NADES çözücülerini gıda sistemleriyle daha yüksek uyumluluk gösterir ve kalıntı toksisitesi ile ilgili endişeleri minimuma indirir (Zhou ve ark., 2022; Hanafi ve ark., 2024).



Şekil 2.2. NADES sistemini oluşturan doğal bileşenler.

NADES çözücüler, güvenlik ve fonksiyonel protein geri kazanımı açısından önemli avantajlar sunmaktadır. Bu çözücüler, tehlikeli bileşiklerle kontaminasyon riskini azaltır ve gıda sınıfı ekstraktlarda çözücü giderimine olan ihtiyacı ortadan kaldırır. Yer bademi, nar çekirdeği ve arı ekmeği gibi ham maddelerden NADES kullanılarak elde edilen proteinler, daha yüksek antioksidan aktivite ve geliştirilmiş amino asit profilleri göstermiştir (Bayram ve ark., 2024; Jiang ve ark., 2024; Guzmán-Lorite ve ark., 2022). Bu nedenlerle NADES çözücüler, temiz etiketli ve sürdürülebilir protein ürünlerinin geliştirilmesinde giderek daha fazla tercih edilmektedir.

Karşılaştırmalı çalışmalar, NADES çözücülerinin genellikle sentetik DES çözücülere kıyasla protein fonksiyonunun korunmasında ve daha yüksek ekstraksiyon verimlerinde üstün performans gösterdiğini ortaya koymaktadır. NADES kullanılarak bira üretimi sonrası arta kalan malt posasından elde edilen protein, %42 oranında geri kazanım sağlamış ve alkali çözeltilerle elde edilenlere kıyasla daha iyi termal stabilite göstermiştir (Hadinoto ve ark., 2025). Kenaf tohumu örneğinde ise, NADES ile yapılan ekstraksiyonun, alkali ve tuz bazlı ekstraksiyonlara kıyasla daha üstün emülsifiye edici ve jelleştirici özellikler sağladığı belirlenmiştir (Arulrajah ve ark., 2025).

2.3.3. Bitkisel protein ekstraksiyonunda DES kullanımına yönelik önceki çalışmalar

Yağlı tohum küspeleri, protein ekstraksiyonu için zengin kaynaklar sunarken; gıda üretimi sürecinde ortaya çıkan posalar da önemli bir potansiyele sahiptir. Özellikle kanola küspesi, kolza küspesi, susam küspesi ve pamuk tohumu küspesi gibi atıklar, işlevsel protein bileşenleri açısından değerlendirilmeye başlanmıştır. Bu bağlamda, sürdürülebilirlik odaklı çalışmalar giderek daha fazla gıda işleme artıklarına yönelmektedir.

Anvar ve ark. (2025) tarafından yürütülen bir çalışmada, mısır küspesinden alkali ekstraksiyon ile elde edilen zein proteini üzerinde DES modifikasyonunun etkilerini araştırmak için dört farklı DES sistemi kullanılmıştır (kolin klorür-oksalik asit, kolin klorür-üre, kolin klorür-gliserol ve glukoz-sitrik asit). Araştırmada, yaklaşık %50–60 oranında protein içeren mısır küspesinden elde edilen zein proteininin yapısı önemli ölçüde değişmiştir. Bu değişim, FTIR, floresan spektroskopisi, UV-Vis ve CD analizleri ile doğrulanmıştır. DES sistemlerinin protein zincirini açarak proteinlerin amid gruplarına erişimi artırdığı ve bu sayede serbest amin grup miktarını yükselttiği belirlenmiştir. DES ile modifiye edilen zein proteinleri, disülfid bağlarının azalması ve daha düşük molekül ağırlıklı alt birimlerin oluşması sayesinde geliştirilmiş fonksiyonel özellikler sergilemiştir. Özellikle, kolin klorür-oksalik asit kombinasyonu, yüzey hidrofobisitesi en yüksek çözücü olarak tanımlanmış ve bu özelliği sayesinde emülsifikasyon kapasitesi ile stabilitesinin en yüksek olduğu saptanmıştır. SDS-PAGE analizinde ise DES ile işlenmiş protein bantlarının neredeyse görünmez olduğu belirtilmiştir. Bu durum, DES sistemlerinin peptid bağlarını ve protein omurgasındaki kovalent bağları kırarak proteinlerin moleküler

ağırlığını azaltabileceğini göstermektedir. Tüm DES ve geleneksel modifikasyon sistemleri arasında, kolin klorür-oksalik asit çözeltisinin en yüksek çözünürlük ve emülsifikasyon performansı sağladığı sonucuna varılmıştır.

Cao ve ark. (2023) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, susam yağı üretimi sonucu ortaya çıkan bir yan ürün olan susam küspesinden proteinlerin sürdürülebilir şekilde ekstrakte edilmesi amacıyla derin ötektik çözücülerin kullanılma potansiyelini araştırılmıştır. Bu çalışmada dört farklı DES sistemi kullanılmıştır: kolin klorür-gliserol (ChCl-gliserol), kolin klorür-etilen glikol (ChCl-etilen glikol), kolin klorür-oksalik asit (ChCl-oksalik asit) ve kolin klorür-glikolik asit (ChCl-glikolik asit). Karşılaştırma amacıyla geleneksel alkali ekstraksiyon yöntemi kontrol örneği olarak kullanılmış ve fonksiyonel ile yapısal özellikler bakımından değerlendirilmiştir. İlk olarak, kullanılan DES türlerinin karakterizasyonu pH ve viskozite açısından yapılmıştır. Bu analizlere göre, ChCl-oksalik asit çözücüsü diğerlerine kıyasla daha yüksek asiditeye sahiptir ve bu nedenle bu çözücüyle ekstrakte edilen proteinin fonksiyonel özellikler bakımından farklı performans göstermesi beklenmiştir. Ayrıca, DES'lerin yüksek viskozitesi, bileşenleri arasındaki yoğun hidrojen bağlarından kaynaklanmakta olup bu durum çözücü olarak etkinliklerini sınırlamaktadır (Zhang, De Oliveira Vigier, Royer & Jerome, 2012). 40–55 °C ve 55–95 °C sıcaklık aralıklarında, ChCl-etilen glikol en düşük viskoziteye sahip çözücü olmuştur. Bu çözücü özelliklerine dayanarak her bir DES sistemi için protein ekstraksiyon saflığı, fonksiyonel özellikler ve ikincil yapı değerlendirilmiştir. Test edilen çözücüler arasında, ChCl-etilen glikol ile ekstrakte edilen protein en yüksek saflığa ulaşmıştır (%93'e kadar). ChCl-oksalik asit kullanılarak elde edilen protein, yüksek çözünürlük ve emülsifiye edici aktivite göstermiştir; bu durum muhtemelen ekstraksiyon ortamının aşırı asidik yapısından kaynaklanmaktadır. FTIR analizi, DES kullanımı sonucunda susam proteinlerinde geri dönüşümsüz denatürasyon meydana geldiğini ortaya koymuştur. Termogravimetrik (TG) analiz, ChCl-glikolik asit ile ekstrakte edilen proteinin en yüksek termal stabiliteye sahip olduğunu göstermiştir; bu da onu gıda ürünleri ve ileri fonksiyonel malzemeler gibi uygulamalarda uygun bir aday haline getirmektedir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri, ChCl-oksalik asit ile ekstrakte edilen proteinlerin pürüzsüz ve pullu bir yüzey yapısı sergilediğini; diğer çözücülerle ekstrakte edilenlerin ise daha kaba ve birikmiş granüler morfolojilere sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Wang ve ark. (2025) tarafından yürütülen çalışmada, pamuk tohumu küspesinden protein eldesi için kolin klorür: üre, asetik asit, gliserol, etilen glikol ve laktik asit gibi çeşitli hidrojen bağı vericileriyle oluşturduğu DES çözücü sistemleri kullanılmıştır. Box–Behnken yüzey yanıt optimizasyonu ile belirlenen ideal ekstraksiyon koşulları (56 °C, 3 saat, %40 su içeriği) altında, ChCl–etilen glikol sisteminde %86,85 oranında protein geri kazanımı elde edilmiştir. Bu oran, konvansiyonel alkali ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen %82,44'lük değerden daha yüksek bulunmuş ve DES yönteminin daha etkili ve verimli olduğunu göstermiştir. Her iki yöntemle elde edilen proteinlerin genel amino asit bileşimleri benzer olmasına rağmen, DES ile ekstrakte edilen proteinlerde metiyonin içeriği belirgin şekilde daha yüksek bulunmuş, bu da kükürt içeren esansiyel amino asitlerin daha iyi korunduğunu ortaya koymuştur. SDS-PAGE analizine göre, DES ekstraksiyon yöntemi protein bütünlüğünü daha etkin şekilde korumuş; bu durum, alkali yöntemle kıyasla daha net ve belirgin bant desenleriyle doğrulanmıştır. DES ile elde edilen proteinlerin çözünürlük ve emülsifiye etme kapasitesi gibi fonksiyonel özelliklerinin, alkali ekstrakte edilen proteinlere kıyasla önemli ölçüde daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, DES ile ekstrakte edilen proteinler daha yüksek antioksidan aktivite göstermiş ve bu durum, bu proteinlerin fonksiyonel gıdalar ve nutrasötik formülasyonlarda kullanım potansiyelini artırmıştır. SEM analizinde, DES ile ekstrakte edilen proteinlerin daha bütüncül ve gözenekli bir yapıya sahip olduğu, buna karşılık alkali yöntemle elde edilen örneklerin parçalanmış ve düzensiz bir morfoloji sergilediği gözlemlenmiştir.

Karimi ve ark. (2024) tarafından yürütülen çalışmada, kanola küspesinden protein ekstraksiyonu derin ötektik çözücüler kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmada teknolojik fonksiyonel özellikler ve proteinlerin ikincil yapıları açısından değerlendirilmek üzere, kolin klorür bazlı sorbitol, glukoz, üre ve gliserol ile kombine edilmiş çeşitli DES türleri kullanılmıştır. Üre içeren DES sistemi daha yüksek dielektrik sabitine ve pH değerine sahip olurken, en düşük yoğunluğa sahip olduğu belirlenmiştir. Tüm DES sistemleri ile elde edilen proteinlerin ekstraksiyon verimi (%44,17–44,88), pH 9'da yapılan alkali ekstraksiyona (%39,14) göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak, pH 12'de gerçekleştirilen alkali ekstraksiyon en yüksek verimi sağlamış (%68,34) ve bu yönüyle diğer tüm yöntemlerin üzerinde performans göstermiştir. Ayrıca, tüm DES proteinleri daha iyi renk özellikleri sergilemiştir; buna karşın pH 12'de

ekstrakte edilen protein izolatu koyu yeşil renkte olup bu durum fenolik bileşiklerden kinon oluşumuna bağlanmıştır. FTIR ve SDS-PAGE analizlerine göre, DES kullanılarak ekstrakte edilen proteinler alkali ekstraksiyona kıyasla doğal protein yapısını daha iyi korumuştur. Bununla birlikte, pH 9’da ekstrakte edilen proteinlerin tüm pH seviyelerinde nrlk ve emülsifikasyon özellikleri daha üstün bulunmuştur. Öte yandan, DES ile ekstrakte edilen proteinlerin köpürme özellikleri tüm pH seviyelerinde hem pH 9 hem de pH 12’de elde edilen alkali proteinlerden daha iyi performans göstermiştir.

Dermanovic ve ark. (2025) tarafından kolza (kanola tohumu) zerine yürütülen başka bir çalışmada, ChCl-re ve betain-sitrik asit bazlı iki farklı derin ötektik çözücü kullanılmış ve sonuçlar pH 12’de gerçekleştirilen alkali ekstraksiyonla karşılaştırılmıştır. Kanola protein ekstraksiyonunda olduğu gibi, alkali muamele ile elde edilen protein ekstraksiyon verimi en yüksek değere ulaşmış (%36,9), ancak ChCl-re bazlı DES ile elde edilen proteinin sağlığı en yüksek bulunmuştur (%95,8). Amino asit kompozisyonları açısından değerlendirildiğinde, DES bazlı izolatların özellikle sülfür içeren amino asitleri bakımından daha dengeli bir amino asit profiline sahip olduğu belirlenmiştir. Tekno-fonksiyonel analizlere göre, alkali pH 12 ile ekstrakte edilen protein, su ve yağ tutma kapasitesi ile köpük stabilitesini vurgulayan ürünler için avantaj sağlarken; ChCl-re, bu özelliklerde daha düşük performans göstermesine rağmen, yüksek nrlk sergileyerek daha geniş uygulama alanlarına uygunluk göstermiştir. FTIR analizine göre, alkali pH 12 ile ekstrakte edilen protein ve betain-sitrik asit ile ekstrakte edilen protein yapısında belirgin konformasyonel değişikliklerin meydana geldiği, bu durumun muhtemelen yüksek pH koşullarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Öte yandan, ChCl-re yapısal stabilite ve sağlığı daha iyi korumuştur. Elektroforez sonuçlarında alkali pH 12 ile ekstrakte edilen proteinde daha geniş bir protein dağılımı gözlenirken, DES sistemleri daha tutarlı ve potansiyel olarak bütünlüğü korunmuş oligomerik yapılar elde edilmiştir. *In vitro* sindirim analizleri, alkali pH 12 ile ekstrakte edilen protein ve ChCl-re ile ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik parçalanabilirliğinin daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Genel olarak, ChCl-re sistemi stabil ve sürdürülebilir bir ekstraksiyon yöntemi olarak öne çıkmakta olup, hedefe yönelik uygulamalar için daha fazla optimizasyonu gerektirmektedir.

Gıda işleme sonrası oluşan yan ürünler kadar, doğrudan tüketilmeyen veya yaygın kullanım alanı bulmamış bazı gıda ürünleri de alternatif protein kaynakları arasında öne çıkmaktadır. Bira üretim artıkları, pirinç posası, atık mantar sapları, yer bademi küspesi, detoksifiye edilmiş manyok yaprakları gibi atıklar, henüz yeterince değerlendirilmemiş olmalarına rağmen yüksek kaliteli protein bileşimleri sunmaktadır. Bu ürünler üzerine yapılan DES tabanlı araştırmalar, potansiyel kullanım alanlarını genişletmektedir.

Kolin klorür-gliserol kombinasyonu, derin ötektik karışımların elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan bir sistemdir. Jiang ve ark. (2024), yer bademi küspesinden protein ekstrakte etmek amacıyla ekstraksiyon verimi ve geri kazanım oranı sonuçlarına göre molar oran, nem miktarı ve katı-sıvı oranı gibi ekstraksiyon parametrelerini optimize etmişlerdir. Ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonunda Box–Behnken deneysel tasarımı kullanılmış ve en uygun koşullar; HBD ile HBA arasındaki molar oran 5:1, sıvı-katı oranı 11:1 ve nem miktarı %15 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, DES ile elde edilen proteinin, alkali yöntemle ekstrakte edilen proteine kıyasla daha yüksek saflıkta olduğunu ortaya koymuştur (%76,21'e karşılık %67,48). Her ne kadar alkali ekstraksiyon yöntemi daha yüksek ekstraksiyon oranı göstermiş olsa da (%16,67'ye karşılık %15,87), DES ile elde edilen protein, çözünürlük, emülsifiye edebilme ve köpürme özellikleri açısından anlamlı düzeyde daha iyi performans sergilemiştir. Hem alkali hem de DES ile ekstrakte edilen proteinler benzer amino asit kompozisyonuna sahip olup %42,32 oranında esansiyel amino asit içermektedir; ancak DES proteini, toplam amino asit içeriği bakımından (653,46 mg/g), alkali proteine kıyasla (563,38 mg/g) anlamlı derecede daha yüksek bir değer göstermiştir. FTIR, SEM, yüzey hidrofobisitesi ve içsel florans analizlerine bakıldığında DES ile ekstrakte edilen proteinlerin yüksek β -dönüş içeriği ile esnek bir ikincil yapıya sahip olduğu, pH değişimine karşı daha fazla konformasyonel esneklik gösterdiği ve bütüncül yapıyı koruduğu gözlemlenirken alkali ekstraksiyonunun hidrofobik bölgeleri açığı çıkararak yapısal kararsızlığı artırdığı ve yapısının bozulduğu görülmüştür. Alkali koşullarda yapılan değerlendirmeler, DES yöntemiyle ekstrakte edilen proteinlerin daha yüksek çözünürlük, emülsifiye edici aktivite ve stabilite, köpürme yetisi, yapısal esneklik (β -dönüş ve rastgele sarmal artışı), yüzey hidrofobikliği kontrolü ve *in vitro* sindirilebilirlik gibi fonksiyonel ve yapısal parametrelerde alkali ekstraksiyona

kıyasla anlamlı düzeyde üstünlük sağladığını ortaya koymuştur. Bu durum, DES ile ekstrakte edilen proteinlerin özellikle yüksek pH ortamlarında işlevsel gıda uygulamaları için daha uygun bir protein izolatı olduğunu göstermektedir.

Pirinç posası protein izolatı, gıda ve farmasötik endüstrilerde kullanım potansiyeli yüksek olan, sürdürülebilir ve henüz yeterince değerlendirilmemiş bir protein kaynağı olarak öne çıkmaktadır. Ancak, doğası gereği düşük çözünürlük ve sınırlı konformasyonel stabiliteye sahip olması, fonksiyonel uygulamalarını kısıtlamaktadır. Shadid ve ark. (2024), derin ötektik çözücülerin pirinç posası protein izolatının çözünürlüğü ve yapısal özellikleri üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Bu çalışmada kullanılan DES türü, glikoz (HBD) ve sitrik asit (HBA) bileşenlerinden oluşmaktadır. Çalışmada, DES ile muamele edilen izolatlar, yalnızca sitrik asit veya yalnızca glikoz ile muamele edilen izolatlarla karşılaştırılmıştır. Diğer çalışmaların aksine bu araştırmada protein ekstraksiyonu doğrudan DES ya da alkali işlemlerle yapılmamış; nişasta bileşenlerinin α -amilaz ve glukoamilaz enzimleriyle parçalanması yoluyla enzimatik hidroliz uygulanmış, ardından izoelektrik çöktürme ve saflaştırma adımları gerçekleştirilmiştir. Glikoz–sitrik asit bazlı DES kullanılarak pirinç posası protein izolatında (RDPI) gerçekleştirilen deamidasyon işlemi, çözünürlüğü ve teknolojik-fonksiyonel özellikleri önemli ölçüde artırmış ve gıda ile farmasötik uygulamalara yönelik potansiyelini genişletmiştir. FTIR spektroskopisi, DES ile muamele edilen proteinlerde α -heliks içeriğinde belirgin bir azalma ve buna karşılık rastgele sarmal ve β -dönüş yapıların artışı göstermiştir; bu da artan yapısal esnekliğe işaret etmekte olup, çözünürlük artışıyla doğrudan ilişkilidir. Ayrıca, zeta potansiyel ölçümleri, DES ile işlem gören proteinlerin yüzey yüklerinin önemli ölçüde daha negatif olduğunu (-50 mV'ye kadar) ortaya koymuş ve bunun elektrostatik itme ile kolloidal stabiliteyi artırdığı belirtilmiştir. Bu yapısal ve yüzeysel değişikliklerin bir araya gelmesiyle, DES ile indüklenen deamidasyonun katı protein konformasyonlarını bozduğu, ancak aynı zamanda protein dispersiyonlarını stabilize ettiği anlaşılmakta; bu durum ise emülsifiye edici ve köpük oluşturma kapasitelerinin gelişmesine katkı sağlamaktadır.

Patra ve Prasath (2025) tarafından gerçekleştirilen son çalışmada, detoksifiye edilmiş manyok (*Manihot esculenta*) yaprakları, temel amino asitler açısından zengin fakat yeterince değerlendirilmemiş bir protein kaynağı olarak ele alınmıştır. Çalışmada sekiz farklı DES sistemi kullanılmıştır: kolin klorür-laktik asit, kolin klorür-sitrik

asit, kolin klorür-gliserol, üre-gliserol, laktik asit-glikoz, kolin klorür-üre, laktik asit-fruktoz ve laktik asit-gliserol. Tüm çözücüler arasında, DES-8 (laktik asit: gliserol) protein ekstraksiyonu açısından en uygun özellikleri göstermiştir. Bu sistemin düşük viskozitesi, uygun pH değeri ve güçlü hidrojen bağlama kapasitesi, etkinliğini artıran başlıca etkenlerdir. FTIR analizi, laktik asit-gliserol sisteminde daha geniş -OH pikleri ve daha yüksek pik alanları gözlemlendiğini ortaya koymuş; bu da çözücü bileşenleri arasında yoğun hidrojen bağ etkileşimlerinin varlığını göstermektedir. Ek olarak, NMR verileri de bu bulguları destekleyerek hem hidrojen verici (gliserol) hem de alıcı (laktik asit) bileşenlerde anlamlı kimyasal kaymalar gözlemlenmiştir. Bu da güçlü ve kararlı moleküller arası etkileşimlerin oluştuğunu göstermektedir. Bu özelliklerin bir araya gelmesiyle, laktik asit-gliserol sistemi proteinleri etkin şekilde çözebilme ve stabilize etme kapasitesini artırmış, onu çalışmadaki en başarılı çözücü sistemi haline getirmiştir. DES sistemleri arasında laktik asit-gliserol ile elde edilen proteinler daha yüksek zeta potansiyel ve daha düşük partikül büyüklüğü göstermiş olup SEM analizinde DES proteinlerinin daha düzensiz, gözenekli ve gevşek bir morfolojiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, laktik asit-gliserol sisteminin, detoksifiye edilmiş manyok yapraklarından fonksiyonel ve yüksek kaliteli proteinlerin sürdürülebilir biçimde geri kazanılması açısından büyük potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Hadinoto ve ark. (2025), bira üretiminden arta kalan malt posasından (BSG) protein ekstraksiyonu amacıyla kolin klorür: trehaloz (3:1 mol/mol) bazlı doğal bir derin ötektik çözücünün performansını değerlendirmiş ve geleneksel alkali ekstraksiyonla karşılaştırmıştır. Optimize edilmiş koşullarda (60 °C, 1:15 BSG: çözücü oranı ve %75 NADES : %25 su oranı), DES ekstraksiyonu alkali yöntemle göre daha yüksek verim (%42'ye karşı %34) sağlamıştır. Ayrıca, 100 g BSG başına elde edilen protein miktarı da NADES ile daha yüksek bulunmuş, bu da DES sisteminin üstün ekstraksiyon verimliliğini ortaya koymuştur. Her iki yöntemde benzer moleküler ağırlık dağılımları ve amino asit profilleri elde edilmesine rağmen, DES ile ekstrakte edilen proteinler anlamlı düzeyde daha yüksek termal stabilite göstermiştir. Bu durum, DES'in proteinlerin tersiyer yapısını termal stres altında stabilize ettiğini göstermektedir. Çözünürlük ile su ve yağ tutma kapasiteleri her iki yöntem için benzer olsa da DES ekstraktlarında emülsifiye edici aktivite indeksi ve köpük kapasitesi özellikle nötr ve asidik pH seviyelerinde anlamlı düzeyde daha yüksek

bulunmuştur. Bu durum, protein yapısının daha iyi korunmasına ve yüzey aktif amino asit bileşenlerinin farklı olmasına bağlanmıştır. FTIR ve NMR analizleri, kolin klorür ve trehaloz arasında güçlü hidrojen bağlarının oluştuğunu ve ötektik karışımın başarılı bir şekilde hazırlandığını doğrulamıştır. Bu hidrojen bağları, ekstraksiyon sırasında proteinlerin stabilizasyonu ve seçici çözünürlüğünden sorumlu olmuştur. Çalışma, DES'in yalnızca alkali ekstraksiyona göre daha yüksek verim ve termal stabilite sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda gıda ile ilgili işlevsel özellikleri de koruduğu veya iyileştirdiği sonucuna varmıştır. Bu bulgular, DES sistemlerinin bira üretim artışı gibi endüstriyel atıkların fonksiyonel protein bileşenlerine dönüştürülmesinde sürdürülebilir ve çevre dostu bir alternatif olduğunu göstermektedir.

Karabulut ve ark. (2024) çalışmalarında, *Agaricus bisporus* mantarının sap kısmını sürdürülebilir bir protein kaynağına dönüştürmeyi amaçlayarak çevre dostu ekstraksiyon teknikleriyle değerlendirmişlerdir. Bu amaçla iki farklı derin ötektik çözücü kolin klorür: gliserol ve kolin klorür: laktik asit üzerinde çalışılmış olup geleneksel alkali ekstraksiyon ile karşılaştırılmıştır. Her ne kadar en yüksek protein içeriği (%45,90) ve ekstraksiyon verimi (%12,21) alkali ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiş olsa da protein geri kazanım oranları açısından DES yöntemleri üstünlük göstermiştir: ChCl-gliserol (%22,04) ve ChCl-laktik asit (%21,47), alkali ekstraksiyonun (%15,39) üzerindedir. Bu durum, DES sistemlerinin protein bütünlüğünü koruma açısından daha etkili olduğunu göstermektedir. Protein çözünürlüğü tüm örneklerde yüksek ve benzer düzeyde olup %72 ile %75 arasında değişmiştir. Ancak emülsifiye edici aktivite indeksi ve emülsiyon stabilitesi DES ile izole edilen proteinlerde, özellikle ChCl-gliserol örneklerinde, anlamlı derecede daha iyi korunmuş ve üstün arayüzey özelliklerini yansıtmıştır. Köpük kapasitesi ve stabilitesi de DES ekstraktlarında daha dengeli bulunmuş, bu da daha iyi hava tutma potansiyelini göstermektedir. FTIR analizleri, özellikle Amide I ve II bantlarındaki kaymalar ve yoğunluk artışı ile, DES örneklerinde daha güçlü hidrojen bağlarının varlığını doğrulamıştır. Her iki DES sistemi de saf bileşenlerine kıyasla belirgin spektral değişiklikler göstermiş, bu da başarılı ötektik karışım oluşumunu doğrulamıştır. SEM görüntüleme, DES ile izole edilen protein parçacıklarının daha düzgün ve homojen yüzey morfolojisine sahip olduğunu, alkali yöntemle izole edilen örneklerle kıyasla daha az agregasyon içerdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, DES

tabanlı ekstraksiyonların yalnızca çevresel açıdan değil, aynı zamanda fonksiyonel açıdan da üstün olduğunu ortaya koyarak mantar bazlı protein bileşenleri için yeşil ekstraksiyon sistemleri olarak potansiyelini vurgulamaktadır.

Gıda üretiminden kaynaklanan yan ürünler üzerine yapılan araştırmalar, bu materyallerin sürdürülebilir protein kaynakları olarak değerlendirilme potansiyelini ortaya koymuştur. Ancak son yıllarda, doğrudan küspe niteliği taşımayan bazı tarımsal ürünlerin de protein ekstraksiyonu açısından dikkat çekici bileşen profilleri sunduğu bildirilmektedir. Bu doğrultuda, *Parkia* tohumları, yulaf, bakla ve kenaf gibi alternatif bitkisel kaynaklar üzerine yürütülen DES ve NADES tabanlı çalışmalar, fonksiyonel protein eldesine yönelik yenilikçi yaklaşımlara önemli katkılar sağlamaktadır. Chakravorty ve Das (2025), *Parkia timoriana* tohumlarından protein ekstrakte etmek amacıyla kolin klorür bazlı NADES kullanarak bir çalışma gerçekleştirmiştir. Kullanılan NADES türleri kolin klorür-gliserol, kolin klorür-sorbitol, kolin klorür-glukoz, kolin klorür-sakkaroz ve kolin klorür-fruktoz kombinasyonlarıdır. Kontrol grubu olarak ise lesitin-su karışımı kullanılmıştır. Araştırmada NADES'lerin pH, iletkenlik ve yoğunluk gibi karakteristik özellikleri incelenmiştir. Sonuçlar, tüm NADES türlerinin, ortamda OH⁻ iyonlarına kıyasla daha fazla H⁺ iyonu bulunmasından dolayı asidik eğilim gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, Kolin Klorür-Sorbitol kombinasyonlu NADES'in, geliştirilmiş ötektik karışımlar içerisindeki yoğun hidrojen bağı ağları nedeniyle en yüksek yoğunluğa sahip olduğu bildirilmiştir. Protein-NADES dispersiyonlarının iletkenlik analizinde, kolin klorür-sakkaroz ve kolin klorür-glukoz sistemleri, kolin klorür'ün daha yüksek molar oranlarına sahip olmaları nedeniyle en yüksek iletkenlik değerlerini göstermiştir. Genel olarak, sorbitol bazlı NADES ile ekstrakte edilen proteinlerin emülsifikasyon aktivitesi (%50,42), emülsifikasyon stabilitesi (%42,55) ve TGA analizine göre termal stabilitesi daha yüksek bulunmuştur. FTIR analizleri, NADES'lerin *Parkia timoriana* tohumlarıyla olan etkileşimlerinin, proteinlerin birincil ve ikincil yapılarında belirgin bir değişikliğe yol açmadığını göstermiştir.

Ge ve ark. (2025) tarafından yürütülen bir çalışmada, yulaf proteininin ekstraksiyonu için DES kullanılarak yenilikçi bir yaklaşım sunulmuştur. Bu çalışmada üç farklı DES türü (ChCl-etilen glikol, ChCl-gliserol ve ChCl-1,4-butanediol) değerlendirilmiştir. Ancak ChCl-1,4-butanediol, yüksek çökelme eğilimi nedeniyle yulaf proteini ekstraksiyonunda kullanılmamıştır. İstatistiksel analizler, molar oran

ile ekstraksiyon verimi arasında net bir ilişim olduğunu göstermiştir. Her ne kadar 1:3 HBA: HBD oranında DES viskozitesi azalmış olsa da protein geri kazanım verimi 1:1 oranında anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç, 1:1 oranındaki daha yüksek kolin klorür içeriğinin, yulaf proteini ile daha güçlü hidrojen bağları oluşturmaya bağlanmaktadır. Buna karşılık, 1:3 oranında ChCl içeriğinin azalması, bu etkileşimlerin zayıflamasına ve dolayısıyla ekstraksiyon verimliliğinin düşmesine neden olmuştur. Bu nedenle, ChCl ile yulaf proteini arasındaki hidrojen bağlarının 1:1 oranında güçlenmesi, bu koşulun optimum olarak seçilmesinin temel nedenidir. Diğer parametlerde ise 120 dakika ekstraksiyon süresi ve 50-80°C ekstraksiyon sıcaklığı optimum olarak bulunmuştur. Sonuçlara göre, ChCl-etilen glikol (1:2 oranı, 80 °C, 120 dk) sistemi test edilen sistemler arasında en yüksek protein geri kazanım verimini sağlamıştır.

Hewage ve ark. (2024) tarafından yürütülen çalışmada, bakla tohumlarından protein ekstraksiyonu kolin klorür-gliserol temelli NADES sistemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Box–Behnken yüzey yanıt metodolojisi ile optimize edilen ideal ekstraksiyon koşulları 50 °C sıcaklık, 1 saat süre, %40 su içeriği, 1:2 molar oran ve 28:1 sıvı-katı oranı olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında elde edilen protein içeriği, verimi ve geri kazanım oranı sırasıyla %92,33, %65,42 ve %23,15 olarak bulunmuş; bu değerler, alkali ekstraksiyonla elde edilen değerlerden (%92,50, %60,76 ve %21,74) bir miktar daha yüksek gerçekleşmiştir. Çalışmada ayrıca, NADES sistemine su eklenip eklenmemesi durumuna göre pH, iletkenlik ve yoğunluk gibi karakteristik özellikler karşılaştırılmıştır. Su ilavesinin, NADES içerisindeki hidrojen bağlarını zayıflatarak viskozite ve yoğunluğu önemli ölçüde azalttığı, buna karşın iletkenliği belirgin şekilde artırdığı tespit edilmiştir. Bu değişikliklerin çözücünün kütle transfer kabiliyetini artırarak protein ekstraksiyonunu daha verimli hale getirdiği sonucuna varılmıştır. FTIR analizine göre, DES ile yapılan ekstraksiyonun protein denatürasyonu üzerindeki etkisi daha düşük bulunmuş ve bu da gıda sistemlerinde fonksiyonel özelliklerin daha iyi korunabileceğini göstermektedir. SEM analizinde, DES ile ekstrakte edilen proteinlerin daha düzgün yüzey yapısına sahip olduğu, alkali ile ekstrakte edilen proteinlerin ise nem içeriği ve dondurarak kurutma sırasındaki davranışları nedeniyle daha kırışık bir morfoloji sergilediği gözlemlenmiştir. Her ne kadar alkali ile ekstrakte edilen proteinler daha yüksek düzeyde esansiyel ve esansiyel olmayan

amino asitler içerse de, DES ile ekstrakte edilen proteinlerin kükürt içeren amino asit oranı daha yüksek bulunmuş, bu durum bakla fraksiyonlarının seçici ekstraksiyonuna bağlanmıştır. Ayrıca, DES proteinindeki daha düşük hidrofobik amino asit içeriği, daha hidrofilik bir yapıya işaret etmekte olup, bu da gıda uygulamalarındaki fonksiyonelliğini artırabilir. SDS-PAGE analizinde ise, DES ile ekstrakte edilen proteinlerin albümin ve legümin gibi polipeptid alt birimlerini daha geniş bir aralıkta koruduğu belirlenmiş, bu da alkali ekstraksiyona kıyasla özgün protein yapısının daha iyi muhafaza edildiğini göstermiştir.

Arulrajah ve ark. (2025) tarafından yürütülen çalışmada, kenaf tohumu (*Hibiscus cannabinus* L.), besleyici ve biyoaktif özellikleriyle dikkat çeken sürdürülebilir bir protein kaynağı olarak araştırılmıştır. Çalışmada choline chloride-üre (pH 9.0; alkali karakterli) ve choline chloride-gliserol (pH 5.97; asidik karakterli) DES sistemleri kullanılmış ve elde edilen sonuçlar geleneksel alkali ekstraksiyon yöntemi (pH 10) ile karşılaştırılmıştır. DES hazırlığı sırasında, çözücünün viskozitesini düşürmek ve kütle transferini artırmak amacıyla daha önceki araştırmalara (Guzmán-Lorite ve ark., 2022; Hewage ve ark., 2024) dayalı olarak %35 (v/v) oranında su ilavesi yapılmıştır. Tüm yöntemler arasında, ChCl: Üre ve geleneksel alkali ekstraksiyon en yüksek protein verimini (sırasıyla %23,40 ve %22,83) ve geri kazanım oranlarını (sırasıyla %59,66 ve %60,95) göstermiştir; buna karşın ChCl: Gly sistemi oldukça düşük verim (%16,00) ve geri kazanım (%34,47) değerleri sergilemiştir. SDS-PAGE analizine göre, geleneksel alkali yöntemle ekstrakte edilen proteinler bulanık ve zayıf bantlarla karakterize edilmiştir. Buna karşılık, DES ile ekstrakte edilen proteinler daha net ve belirgin bant ayrımı göstermiştir. FTIR bulguları ise DES tabanlı ekstraksiyonun, kenaf tohumu proteinlerinde geleneksel alkali yöntemle kıyasla daha az yapısal değişikliğe yol açtığını ortaya koymuş ve bu durum SDS-PAGE sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. SEM analizine göre, geleneksel alkali ile ekstrakte edilen proteinler, düzensiz, pul benzeri morfolojilere ve pürüzlü, gözenekli yüzeylere sahipken; ChCl: Üre ile ekstrakte edilen proteinler daha bütüncül, gözenekli ve yüzeyde çatlaklar içeren bir yapıya sahiptir. ChCl: Gliserol ile elde edilen proteinler ise daha düzgün, yoğun ve daha az gözle görülür gözenekli yapı sergilemiştir. ChCl: Üre bazlı DES ile ekstrakte edilen proteinler, geleneksel alkali yöntemle elde edilenlere kıyasla üstün köpürme kapasitesi ve termal stabilite göstermiştir. Klasik alkali ekstraksiyon ile ekstrakte edilen proteinler daha yüksek çözünürlük ve

emülsifiye edici özellik sergilerken, ChCl: Üre ile elde edilen proteinler daha dengeli bir amino asit profiline sahip olmuş ve yüksek hidroliz derecesiyle tamamen sindirilebilir bulunmuştur. Bu bulgular, ChCl: Üre tabanlı DES sisteminin, fonksiyonel ve yapısal açıdan avantajlar sunduğunu göstermektedir.





3. MATERİYAL VE METOT

Soğuk sıkım fındık yağı üretiminin bir yan ürünü olan fındık küspesi, Fiskobirlik'ten (Giresun, Türkiye) temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflık derecesinde veya daha yüksek saflıkta olup Sigma-Aldrich'ten (Steinheim, Almanya) satın alınmıştır. Fındık küspesinin protein, yağ, kül ve nem içeriği standart AOAC yöntemlerine (1990) göre belirlenmiştir. Karbonhidrat içeriği ise bu bileşenlerin toplamının 100%'den çıkarılmasıyla hesaplanmıştır.

3.1. Derin Ötektik Çözücülerin Sentezi

DES'ler, kolin klorür ile üç farklı hidrojen bağı vericinin (gliserol, sorbitol ve glukoz) sırasıyla 1:2, 1:1 ve 2:1 molar ağırlık oranlarında karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Bu yaklaşım, farklı bileşik sınıflarının (yani polioller, şeker alkoller ve şekerler) etkilerini araştırmak amacıyla tasarlanmıştır. Hidrojen bağ verici ve alıcı kimyasallar kapalı bir kap içinde yaklaşık 2 saat boyunca 80 °C'de karıştırılmış ve homojen, berrak bir çözelti elde edilene kadar işleme devam edilmiştir (Zhu ve ark., 2025).

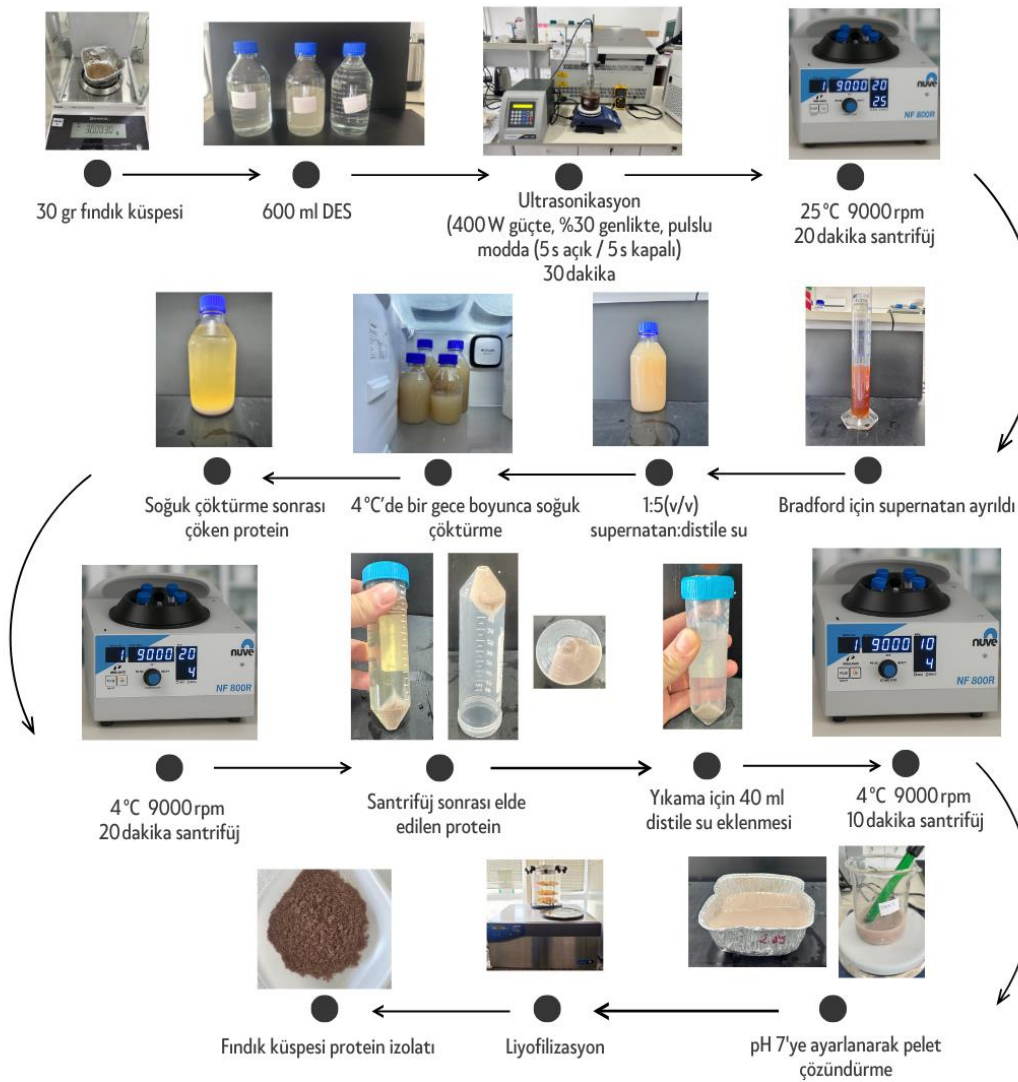
Ortaya çıkan DES'lerin doğası gereği yüksek viskozitesini azaltmak ve ekstraksiyon sırasında kütle transferini iyileştirmek amacıyla DES'lere %40 (v/v) distile su ilave edilmiştir. Hazırlanan DES çözeltileri oda sıcaklığına (~22 °C) soğutulmuştur. pH ölçümleri pH metreyle, viskozite ölçümleri reometreyle (Atago, PAL-1), kırılma indisi Abbe refraktometresiyle ve yoğunluk ölçümleri ise piknometre kullanılarak oda sıcaklığında yapılmıştır.

3.2. Derin Ötektik ve Klasik Alkali Çözücülerle Protein Ekstraksiyonu

Fındık küspesinden protein ekstraksiyonu için aşağıdaki yöntemler uygulanmıştır:

i) DES kullanılarak protein ekstraksiyonu: Ultrases destekli DES ekstraksiyonlar için yaklaşık 30 g fındık küspesi, 600 mL DES içeren bir beher içine aktarılmış ve katı/sıvı oranı 1:20 (a/h) olarak ayarlanmıştır. Ekstraksiyon, 13 mm uçlu bir prob-tip ultrasonikasyon cihazı (Sonics, 750 W, ABD) kullanılarak, 400 W güçte, %30 genlikte, pulslu modda (5 s açık / 5 s kapalı) 30 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir.

Ekstraksiyonun ardından karışımlar 25 °C’de 9000 rpm’de 20 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatantlar Bradford (Bradford, 1976) yöntemiyle protein miktarının belirlenmesi için toplanmıştır. Proteini çöktürmek amacıyla süpernatana, DES hacmine göre 1:5 (v/v) hacim oranında distile su eklenmiştir. Karışımlar, soğuk anti-çözgen çöktürme için 4 °C’de bir gece bekletilmiştir. Daha sonra süspansiyonlar, protein çöktürmelerini geri kazanmak için 4 °C’de 9000 rpm’de 20 dakika santrifüjlenmiştir (Universal 320R, Hettich, Almanya). Pelletler, her yıkama sonrasında 4 °C’de 9000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenerek 40 mL distile su ile üç kez yıkanmıştır.(Şekil 3.1.)

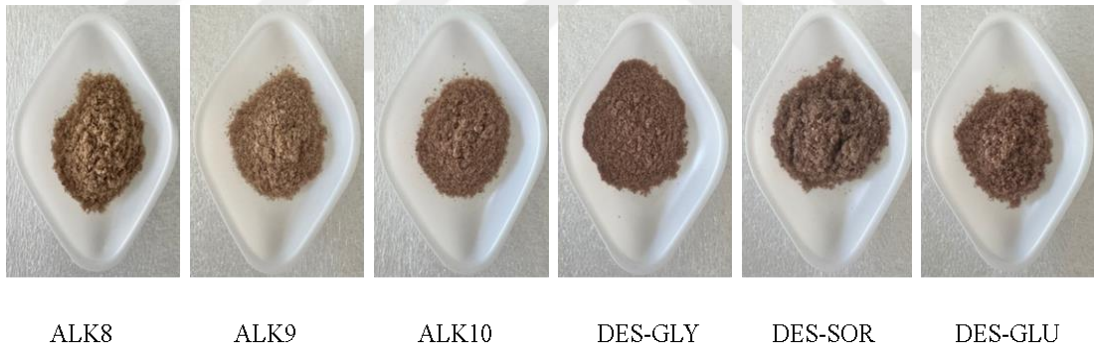


Şekil 3.1. Ultrases destekli DES protein ekstraksiyonunun şematik gösterimi.

ii) Klasik alkali yöntem kullanılarak protein ekstraksiyonu: Alkali ekstraksiyon prosedürü, Karaca ve ark. (2011) tarafından tanımlanan yöntemde kısmi değişikliklerle uygulanmıştır. Fındık küspesi, katı/sıvı oranı 1:20 (a/h) olacak şekilde

distile su içinde süspanse edilmiştir. Süspansiyonun pH'ı 5 N NaOH kullanılarak 8.0, 9.0 veya 10.0'a ayarlanmıştır. Karışım, protein çözünürlüğünü kolaylaştırmak için oda sıcaklığında 1 saat karıştırılmıştır. Ekstraksiyonun ardından süspansiyon, süpernatanı ayırmak için 4 °C'de 9000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmiştir (Universal 320R, Hettich, Almanya) ve süpernatantlar Bradford yöntemiyle (Bradford, 1976) protein miktarının belirlenmesi için toplanmıştır. Santrifüj işleminden sonra süpernatantlar izoelektronik noktada (pH 4.5) çöktürülmüş ve tekrar 4 °C'de 9000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmiştir.

Son çökeltiler dondurarak kurutulmuş ve protein verimi ile ekstraksiyon verimliliğini belirlemek amacıyla tartılmıştır. DES formülasyonları sırasıyla ChCl: Gliserol (DES-GLY), ChCl: Sorbitol (DES-SOR) ve ChCl: Glukoz (DES-GLU) kodlanmıştır. Ultrasesin ekstraksiyon ve protein verimi üzerindeki etkisini değerlendirmek için, aynı koşullar altında Ultrases uygulanmadan ekstraksiyonlar gerçekleştirilmiş ve bu kontrol örnekleri de sırasıyla DES-GLY-C, DES-SOR-C ve DES-GLU-C olarak adlandırılmıştır. Farklı pH değerlerinde (8.0, 9.0 ve 10.0) ekstrakte edilen alkali örnekler ise sırasıyla ALK8, ALK9 ve ALK10 olarak kodlanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Alkali ve DES ile ekstrakte edilmiş fındık protein tozları

3.3. Protein Verimi ve Ekstraksiyon Verimliliğinin Belirlenmesi

Ekstraksiyon sürecini kapsamlı bir şekilde değerlendirmek amacıyla protein verimi ve ekstraksiyon verimliliği iki ayrı aşamada hesaplanmıştır. Süpernatant aşamasında, ekstraktların santrifüjlenmesinin ardından çözünür protein konsantrasyonu Bradford yöntemi kullanılarak ve Denklem (1) ve (2)'ye göre kantitatif olarak belirlenmiştir.

$$\text{Protein verimi (mg protein/g kütse)} = \frac{C_s \times V_t}{W_m} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\text{Ekstraksiyon verimliliği (\%)} = \frac{C_s \times V_t}{P_i} \times 100 \quad (3.2)$$

Burada Cs, süpernatandaki çözünür protein konsantrasyonunu (mg/mL), Vt, ekstraktın toplam hacmini (mL), Pi, fındık küspesinin protein içeriğini (g) ve Wm ise fındık küspesinin ağırlığını (g) ifade etmektedir.

İkinci aşamada ise, protein çöktürme ve dondurarak kurutma işlemlerinin ardından elde edilen kuru proteinlerin kütlesi ve saflığı, Denklem (3) ve (4) kullanılarak yapılan hesaplamalarda kullanılmıştır.

$$\text{Protein verimi (mg protein/g küspe)} = \frac{A_p \times P}{W_m} \times 100 \quad (3.3)$$

$$\text{Ekstraksiyon verimliliği (\%)} = \frac{A_p \times P}{P_i} \times 100 \quad (3.4)$$

Burada Ap, protein miktarını (g), P, ekstrakte edilen proteinin saflığını (%), Pi, fındık küspesi protein içeriğini (g) ve Wm ise fındık küspesinin ağırlığını (g) ifade etmektedir.

3.4. SDS-PAGE Analizi

Ekstrakte edilen proteinlerin moleküler alt birim kompozisyonu ve bant dağılımı, hazır %4–20 akrilamid jel kasetleri (Genesuz, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. Protein örnekleri (3 mg/mL) SDS örnek tamponu ile karıştırılmış ve 95 °C’de 5 dakika süreyle denatüre edilmiştir. Daha sonra her örnekten 5 µL, bir moleküler ağırlık belirteci (10–270 kDa) ile birlikte Mini-PROTEAN elektroforez sistemindeki (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, ABD) kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez, boya jelin altına ulaşana kadar 180 V’de yürütülmüştür. Protein bantları, %0,1 Coomassie Brilliant Blue R-250 içeren %50 metanol ve %10 asetik asit çözeltisiyle boyanmış ve ardından %10 asetik asitte gece boyunca jeldeki fazla kalıntı boya uzaklaştırılmıştır.

3.5. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

Ekstrakte edilen proteinlerdeki yapısal değişiklikler, özellikle Amid I, II ve III bölgelerinde, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) spektroskopisi (Thermo Electron Co., WI, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. Spektrumlar 400–4000 cm⁻¹ aralığında, 16 cm⁻¹ çözünürlükte kaydedilmiş ve her örnek için 120 tarama ortalaması alınmıştır (Karabulut ve ark., 2024).

3.6. İçsel Floresan Emisyonu

Protein örneklerinin içsel floresans emisyonu bir spektrofotometre (Hitachi F7000, Tokyo, Japonya) kullanılarak ölçülmüştür. Protein süspansiyonları (0,25 mg/mL), 10 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 7.0) hazırlanmış ve dört yüzlü kuvars küvet içinde oda sıcaklığında analiz edilmiştir. Floresans emisyon spektrumları, 280 nm uyarma dalga boyunda kaydedilmiş ve emisyon 300 ile 450 nm aralığında taranmıştır.

3.7. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Ekstrakte edilen protein izolatlarının morfolojik özellikleri, SEM cihazı (Jeol JSM 6060 LV, Japonya) kullanılarak incelenmiştir. Görüntüleme öncesinde, dondurarak kurutulmuş protein tozları çift taraflı karbon yapışkan bant ile alüminyum numune tablalarına yerleştirilmiştir. Yerleştirilen örnekler, gözlem sırasında elektriksel iletkenliği artırmak ve yüklenme etkilerini azaltmak amacıyla vakum altında ince bir altın: palladyum alaşımı tabakası ile kaplanmıştır. SEM analizleri yüksek vakum modunda gerçekleştirilmiş ve görüntüler 100×, 250×, 500× ve 1000× büyütmelemlerde alınmıştır.

3.8. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli

Protein örneklerinin partikül boyut dağılımı, statik ışık saçılması yöntemiyle bir Mastersizer 2000 cihazı (Malvern Instruments Ltd., Birleşik Krallık) kullanılarak belirlenmiştir. Örnekler, son protein konsantrasyonu %1 (a/h) olacak şekilde distile su ile seyreltilmiş ve pH 7'ye ayarlanmıştır. Ölçümler oda sıcaklığında (~22 °C) gerçekleştirilmiş; protein için kırılma indisi 1.45, absorpsiyon için 0.1 ve dağıtıcı (su) için 1,33 olarak kullanılmıştır.

3.9. Teknofonksiyonel Özelliklerin Analizi

3.9.1. Çözünürlük

Protein çözünürlüğü, Bradford yöntemi (Bradford, 1976) kullanılarak belirlenmiştir. Kısaca, protein örnekleri (distile suda 5 mg/mL) 25 °C'de 13,000 ×g'de 25 dakika santrifüjlenmiş ve elde edilen süpernatantlar toplanmıştır. Her süpernatandan 150 µL 3 mL Bradford reaktifi ile karıştırılmış ve karışımlar oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Absorbans, bir UV-Vis spektrofotometre (Shimadzu UV-1240,

Japonya) kullanılarak 595 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Kör örnek olarak distile su kullanılmıştır. Standart kalibrasyon eğrisi, sığır serum albümini (BSA) kullanılarak oluşturulmuştur ($y=0.0016x+0.0214$, $R^2=0.9952$).

3.9.2. Emülsiyon özellikleri

Emülsiyon özellikleri, Pearce ve Kinsella (1978) yöntemine göre değerlendirilmiştir. Su-içinde-yag (o/w) emülsiyonları, 3 mL protein çözeltisine 1 mL ayçiçek yağı eklenerek hazırlanmış ve son yağ konsantrasyonu %0,25 (a/a) olacak şekilde ayarlanmıştır. Karışımlar, 10000 rpm hızında çalışan bir Ultra-Turrax homojenizatör (IKA, T18, Königswinter, Almanya) ile 2 dakika süreyle homojenize edilmiştir. Taze hazırlanmış emülsiyonların absorbansı 500 nm dalga boyunda hemen (A_0) ve 10 dakika sonra (A_{10}) bir UV-Vis spektrofotometre ile ölçülmüştür. Emülsiyon aktivite indeksi (EAI) ve emülsiyon stabilite indeksi (ESI), sırasıyla Denklem (5) ve (6) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$EAI (m^2/g) = \frac{(2 \times 2,303 \times A_0 \times SF)}{(C \times \theta \times \Phi \times 10000)} \quad (3.5)$$

$$ESI (min.) = \frac{(A_0 \times \Delta t)}{(A_0 - A_{10})} \quad (3.6)$$

Burada SF seyreltme faktörünü, C birim hacim başına protein miktarını (g/mL), θ optik yol genişliğini (0.01 m) ve Φ ise yağ hacim fraksiyonunu ifade etmektedir.

3.9.3. Köpük oluşturma özellikleri

Protein izolatlarının köpük oluşturma özellikleri, Yang ve ark. (2021) yönteminde modifikasyon yapılarak değerlendirilmiştir. 10 mL'lik bir protein süspansiyonu (5 mg/mL), oda sıcaklığında 10,000 rpm hızında çalışan yüksek hızlı bir homojenizatör (IKA, T18, Königswinter, Almanya) ile 2 dakika süreyle karıştırılmıştır. Köpüğün toplam hacmi karıştırma işleminin hemen ardından ve oda sıcaklığında 15, 30, 60, 90 ve 120 dakika bekleme sonrasında kaydedilmiştir. Köpürme kapasitesi (KK) ve köpük stabilitesi (KS), ilgili Denklem (7) ve (8) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$KK (\%) = \frac{V_0 - V}{V} \times 100 \quad (3.7)$$

$$KS (\%) = \frac{V_t - V}{V_0 - V} \times 100 \quad (3.8)$$

Burada V, köpürme öncesindeki başlangıç hacmi (mL), V_0 , homojenizasyon sonrası süspansiyon hacmi (mL), V_t ise homojenizasyondan hemen sonraki t zamanındaki toplam hacmi (mL) göstermektedir.

3.10. İstatistiksel analiz

Tüm analizler üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde sunulmuştur. İstatistiksel değerlendirmeler SPSS 20.0 yazılım paketi (SPSS Inc., Chicago, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Örnek grupları arasındaki anlamlı farklılıkları belirlemek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmış ve %95 güven düzeyinde ($p < 0,05$) Duncan çoklu karşılaştırma testi ile post-hoc analizler gerçekleştirilmiştir.



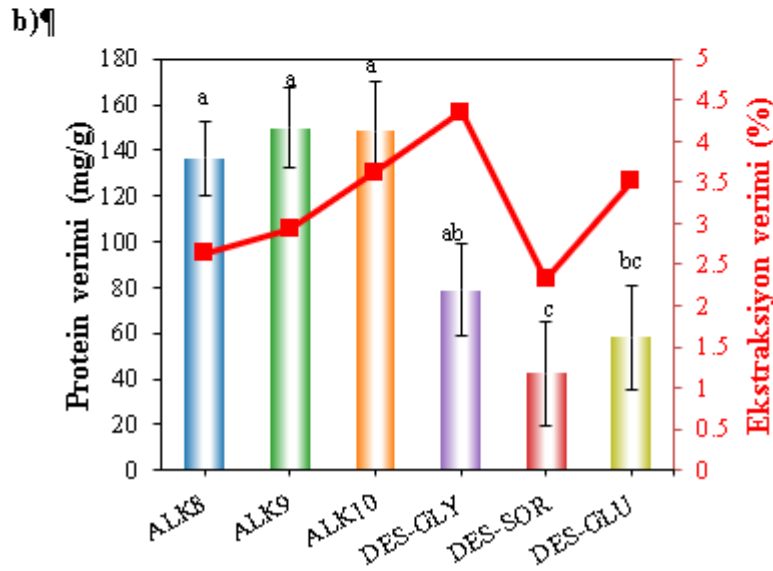
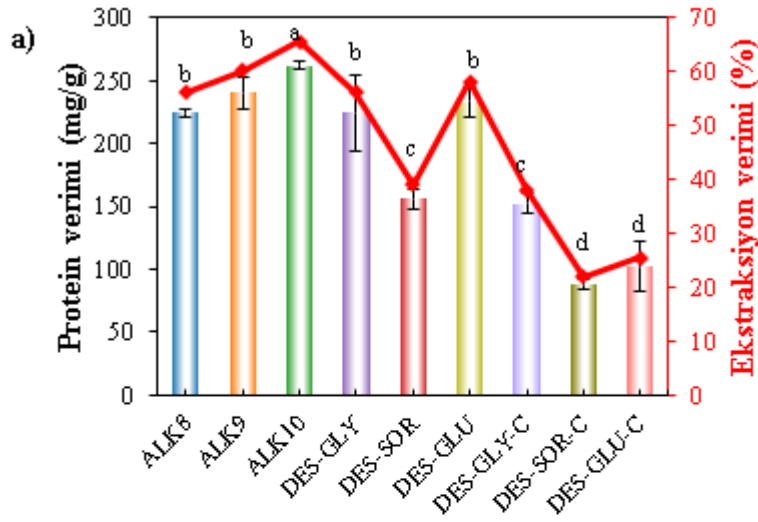
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Fındık Proteinlerinin Verimi ve Ekstraksiyon Verimliliği

Protein verimi ve ekstraksiyon verimliliği, ekstraksiyon sisteminin genel performansını kapsamlı bir şekilde değerlendirmek amacıyla iki kritik aşamada incelenmiştir: i) Dondurarak kurutma öncesinde (çözünür süpernatant fazında) ve ii) Dondurarak kurutma sonrasında.

Şekil 4.1a'da gösterildiği üzere, pH 10'da yapılan alkali ekstraksiyonda (ALK10), en yüksek protein verimi (260 mg/g) ve ekstraksiyon verimliliği (%63) elde edilerek tüm diğer işlemleri anlamlı düzeyde geride bırakmıştır ($p < 0,05$). ALK9 ve ALK8'de benzer şekilde yüksek performans sergileyerek 220 mg/g'nin üzerinde protein verimi ve %55'in üzerinde ekstraksiyon verimliliği sağlamıştır. Bu bulgular, bitkisel protein eldesinde alkali ekstraksiyonun özellikle yüksek pH değerlerinde artan çözünürlük sayesinde elektrostatik itmenin artması ve protein–matris etkileşimlerinin bozulması yoluyla kanıtlanmış etkinliğini doğrulamaktadır (Karaca ve ark., 2011; Malomo ve ark., 2014).

DES bazlı sistemler arasında, US destekli ekstraksiyonlar DES-GLY ve DES-GLU kullanılarak orta düzeyde protein verimi (~200–220 mg/g) ve yaklaşık %50–55 ekstraksiyon verimliliği elde edilmiştir. Alkali muadillerine göre daha düşük olsa da, bu değerler DES formülasyonlarının bitki bazlı proteinleri ekstrakte etme potansiyelini yansıtmaktadır. Buna karşılık, US uygulanmayan DES örnekleri (DES-SOR-C, DES-GLY-C ve DES-GLU-C) US-destekli analoglarına kıyasla %30–45 daha düşük protein verimi ve %40'ın altına düşen ekstraksiyon verimlilikleri sergilemiştir. Bu bulgular, DES ortamlarında US desteğinin gerekli olduğunu göstermekte olup, muhtemelen çözücünün bitki hücre yapılarına daha iyi nüfuz etmesini, hücre duvarlarının bozulmasını ve protein moleküllerinin çözücü faza kütle transferinin artmasını sağlamaktadır (Chemat ve ark., 2017; Ruesgas-Ramón ve ark., 2017).



Şekil 4.1. (a) Alkali ve DES ile ekstrakte edilmiş fındık proteinlerinin süpernatant fazındaki protein verimi (%) ve ekstraksiyon verimliliği (%) (b) Toz formundaki protein verimi (%) ve ekstraksiyon verimliliği (%).

Özellikle DES sistemleri arasındaki fizikokimyasal farklılıklar, onların fizikokimyasal özellikleriyle güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir (Tablo 4.1). En düşük viskoziteye (56,3 mPa·s) ve orta düzey polariteye (kırılma indisi: 1,440) sahip olan DES-GLY (ChCl: Gly, 1:2), daha etkin çözündürme ve kütle transferi sağlamıştır. Nispeten düşük yoğunluğu (1,115 g/cm³) da moleküler hareketliliği artırıcı bir etki göstermektedir. Buna karşılık, DES-GLU (ChCl: Glukoz, 2:1), çok daha yüksek viskoziteye (181,4 mPa·s) sahiptir ve bu, fiziksel destek olmadan çözücü difüzyonunu ve protein taşınmasını sınırlayabilir. DES-SOR (ChCl: Sorbitol, 1:1) ise

ara bir davranış göstermiştir; ancak daha yüksek viskozitesi (97,8 mPa·s) ve yoğunluğu (1,228 g/cm³) ekstraksiyon kapasitesini sınırlamış olabilir.

Tablo 4.1. Derin ötektik çözücülerin karakterizasyonu

Kompozisyon (ChCl:HBD)	pH (25 °C)	Viskozite (mPa·s)	Refraktif İndeks	Yoğunluk (g/cm ³)
ChCl: Glycerol (1:2)	5,21 ± 0,07 ^a	56,3 ± 5,4 ^c	1,440 ± 0,002 ^c	1,115 ± 0,006 ^c
ChCl: Sorbitol (1:1)	4,82 ± 0,05 ^b	97,8 ± 8,6 ^b	1,448 ± 0,003 ^b	1,228 ± 0,009 ^b
ChCl: Glucose (2:1)	4,53 ± 0,06 ^c	181,4 ± 12,3 ^a	1,451 ± 0,002 ^a	1,243 ± 0,008 ^a

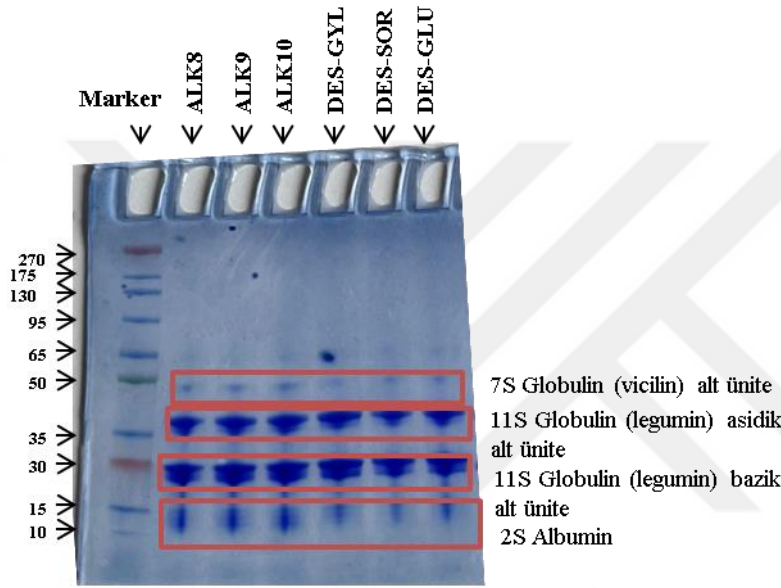
* %40 distile su ilavesiyle hazırlanmıştır. Farklı harfler farklı DES örnekleri arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$) (ortalama ± standart sapma, n = 3).

İkinci aşamada (Şekil 4.1b), dondurarak kurutma sonrası tüm işlemlerde toplam protein verimi, geri kazanım kayıpları ve nem uzaklaştırılması nedeniyle azalmıştır. Bu beklenen düşüşe rağmen, alkali ekstraksiyonlar (ALK8–ALK10) en yüksek kuru protein verim değerlerini (130–150 mg/g) göstermeye devam etmiştir. Buna karşılık, DES bazlı sistemlerde dondurarak kurutma sonrası protein verimi ve ekstraksiyon verimliliğinde daha belirgin bir düşüş gözlenmiştir. DES-GLY orta düzeyde kuru protein verimi (~80 mg/g) ve yaklaşık %3,5 ekstraksiyon verimliliği göstermiştir. DES-SOR ve DES-GLU ise 60 mg/g'nin altına düşerek %3'ün altında ekstraksiyon verimlilik değerleri kaydetmiştir. Bu bulgular, DES sistemlerinin sıvı fazda proteinleri etkili bir şekilde çözebilmesine rağmen, sonraki geri kazanım ve stabilizasyon adımlarını destekleme yeteneklerinin sınırlı olduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum, muhtemelen eksik çöktürmeden kaynaklanabilir (Ruesgas-Ramón ve ark., 2017; Zhu ve ark., 2025).

Bu sonuçlar, hem DES bileşiminin hem de ekstraksiyon koşullarının stratejik olarak tasarlanması gerektiğini vurgulamaktadır. Gliserol bazlı DES (ChCl: Gly), özellikle US desteği ile birlikte kullanıldığında umut verici bir alternatif olarak öne çıkmaktadır. Ancak, DES bazlı protein ekstraksiyon sistemlerinin tam potansiyelinin açığa çıkarılabilmesi için çöktürme stratejilerinin geliştirilmesi ve optimize kurutma tekniklerinin uygulanması gibi, ekstraksiyon sonrası geri kazanıma yönelik sınırlamaların aşılması kritik öneme sahiptir.

4.2. SDS-PAGE Analizi

İndirgen koşullar altında fındık proteinlerinin moleküler bantları ve alt birim kompozisyonunu değerlendirmek amacıyla SDS-PAGE analizi uygulanmıştır. Şekil 4.2’de gösterildiği üzere, elde edilen bantlar fındık kaynaklı proteinlerin karakteristik elektroforetik davranışıyla uyumlu olup, başlıca vicilin tip 7S globulinler (~35–50 kDa), legumin tip 11S globulinler (asidik alt birim: ~35–40 kDa; bazik alt birim: ~20–30 kDa) ve 2S albuminleri (~10–15 kDa) içermektedir (Barre ve ark., 2005; Pfeifer ve ark., 2017).

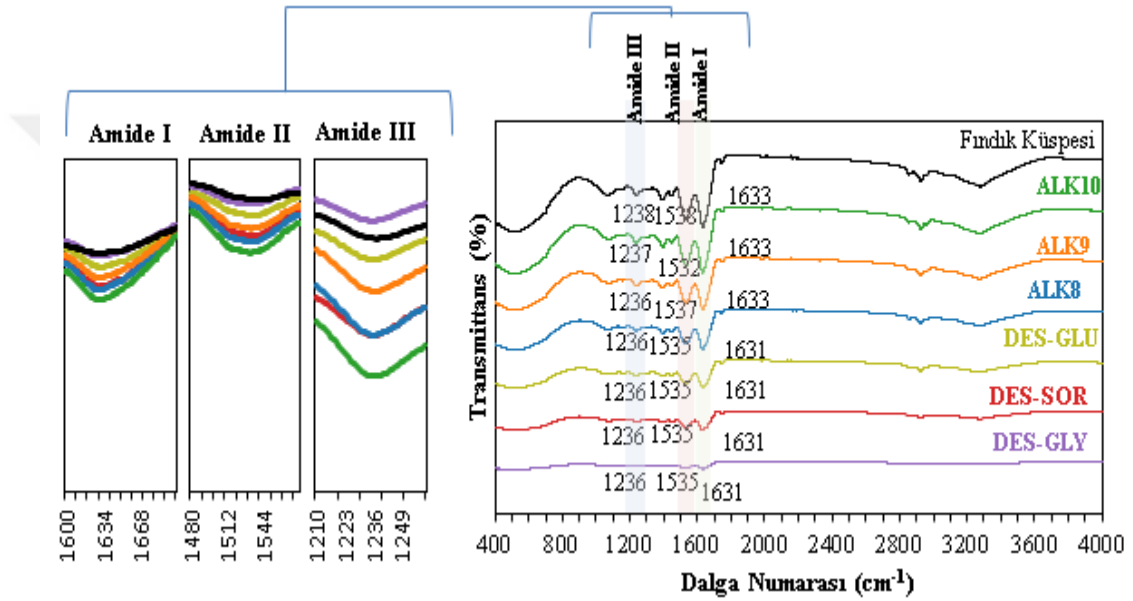


Şekil 4.2. Alkali ve DES ile ekstrakte edilmiş fındık proteinlerinin indirgen koşullar altındaki SDS-PAGE protein bantları

Alkali ve DES ile ekstrakte edilen örneklerin elektroforetik profilleri büyük ölçüde benzer olup, bant desenleri veya yoğunluklarında önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Bu durum, ana depo protein alt birimlerinin ekstraksiyon yönteminden bağımsız olarak benzer şekilde geri kazanıldığını göstermektedir. Tüm işlemler boyunca 2S albumin ve globulin bantlarının korunmuş olması, bu fraksiyonların test edilen koşullar altında görece stabil ve çözünür olduklarını ortaya koymaktadır. Bu bulgular hem alkali hem de DES destekli ekstraksiyonların fındık proteinlerinin alt birim kompozisyonunu koruma yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir.

4.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

Farklı çözücülerle ekstraksiyon sonrası fındık proteini izolatlarının yapısal değişimlerini aydınlatmak amacıyla FTIR spektroskopisi kullanılmıştır (Şekil 4.3). Özellikle Amid I ($1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$), Amid II ($1480\text{--}1570\text{ cm}^{-1}$) ve Amid III ($1200\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$) bölgelerine odaklanılmıştır. Bu bölgeler, protein omurgasının konformasyonunu yansıtır ve α -heliks, β -tabaka, β -dönüşler ve rastgele sarmal yapılarının varlığını izlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Zhou ve ark., 2022; Malomo ve ark., 2014).



Şekil 4.3. Alkali ve DES ile ekstrakte edilmiş fındık proteinlerinin FTIR spektrumları.

Amide I bölgesinde ($\sim 1631\text{--}1633\text{ cm}^{-1}$), özellikle ALK10 olmak üzere alkali ile ekstrakte edilen proteinler daha keskin ve daha yoğun pikler göstermiş, bu durum belirgin β -tabaka yapıları ve güçlü intramoleküler hidrojen bağları ile ilişkilendirilmiştir. Buna karşılık, DES ile ekstrakte edilen örnekler daha geniş ve daha az yer değiştirmiş Amide I ve II bantları sergileyerek daha iyi korunmuş, yerel (native-benzeri) ikincil yapıların varlığına işaret etmiştir. Bu stabilizasyon, ultrasonik işlem sırasında bile protein katlanmasını korumaya yardımcı olan DES çözücülerinin güçlü hidrojen bağı verici-alıcı ağlarına atfedilmektedir (Ruesgas-Ramón ve ark., 2017; Hanafi ve ark., 2024).

Benzer değişimler susam, yer bademi küspesi ve mantar proteinlerinin ekstraksiyonlarında DES kullanımıyla yapılan çalışmalarda da rapor edilmiştir (Zhu

ve ark., 2025). Bunun yerine, DES işlemleri fonksiyonel grupları açığa çıkaran kısmi ve kontrollü bir açılma sağlayarak toplam ikincil yapı bütünlüğünü korumakta ve bu sayede çözünürlük ve emülsifikasyon özelliklerinin muhafazasına katkıda bulunmaktadır (Anvar ve ark., 2025; Ecem Bayram ve ark., 2024; Hanafî ve ark., 2024).

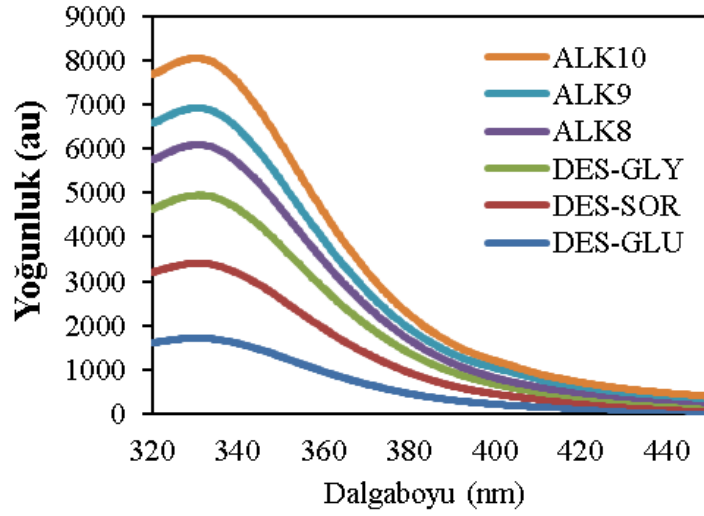
Ayrıca, DES ile işlem görmüş örneklerde O–H gerilme bölgesinde ($3200\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$) gözlenen pik kaymaları ve genişlemeler, çözücü–protein arasında güçlü hidrojen bağları ve kalıntı DES etkileşimlerini düşündürmektedir. Bu spektral özellikler, protein fonksiyonel grupları ile çözücü bileşenleri arasında oluşan yaygın hidrojen bağı ağlarının konformasyonu stabilize ettiği ve agregasyonu sınırladığı diğer kolin klorür bazlı DES bitkisel protein ekstraksiyonlarıyla da tutarlıdır (Tjalsma ve ark., 2025).

4.4. İçsel Floresan Emisyonu

Şekil 4.4’te, fındık protein izolatlarının ekstraksiyon yöntemine bağlı olarak tersiyer yapısal değişimlerini izlemek amacıyla içsel floresans spektroskopisi kullanılmıştır. Bu teknik, başlıca triptofan (Trp) olmak üzere aromatik amino asit kalıntılarının ortam duyarlı emisyon özelliklerinden yararlanarak protein katlanması, kompaktlığı ve çözücü erişilebilirliği gibi özelliklerin değerlendirilmesi için konformasyonel bir prob görevi görür (Lakowicz, 1999; Sengupta ve Udgaonkar, 2019). Tüm spektrumlar 280 nm’de uyarılarak kaydedilmiş ve emisyon 320–450 nm aralığında taranmıştır.

Şekil 4.4’te gösterildiği üzere, alkali ile ekstrakte edilen proteinler, özellikle ALK10, en yüksek floresans yoğunluklarını (FI) sergilemiş ve bu durum Trp kalıntılarının kutuplu sulu ortama daha fazla maruz kaldığını göstermiştir. Bu sonuç, yüksek pH koşullarında asidik yan zincirlerin deprotonasyonunu, stabilize edici intramoleküler bağların bozulmasını ve elektrostatik itmenin artmasını teşvik ederek kısmi açılma ve üçüncül yapıdaki gevşemeyi işaret eder. Bunun sonucunda daha esnek ve çözücüye erişilebilir konformasyonlar oluşur (Zhou ve ark., 2022; Ruesgas-Ramón ve ark., 2017). ALK9 ve ALK8 örnekleri de benzer şekilde yüksek FI değerleri göstermiş ve bu eğilimi desteklemiştir. Benzer pH kaynaklı açılma ve Trp maruziyeti, kolza tohumu, kanola ve pamuk tohumu proteinlerinin alkali ekstraksiyonlarında da

raporlanmıştır. Bu koşulların kısmi denatürasyona ve çözücüye erişilebilirliğin artmasına yol açtığı gösterilmiştir (Karaca ve ark., 2011; Malomo ve ark., 2014).



Şekil 4.4. Alkali ve DES ile ekstrakte edilmiş fındık proteinlerinin içsel emisyon spektrumu.

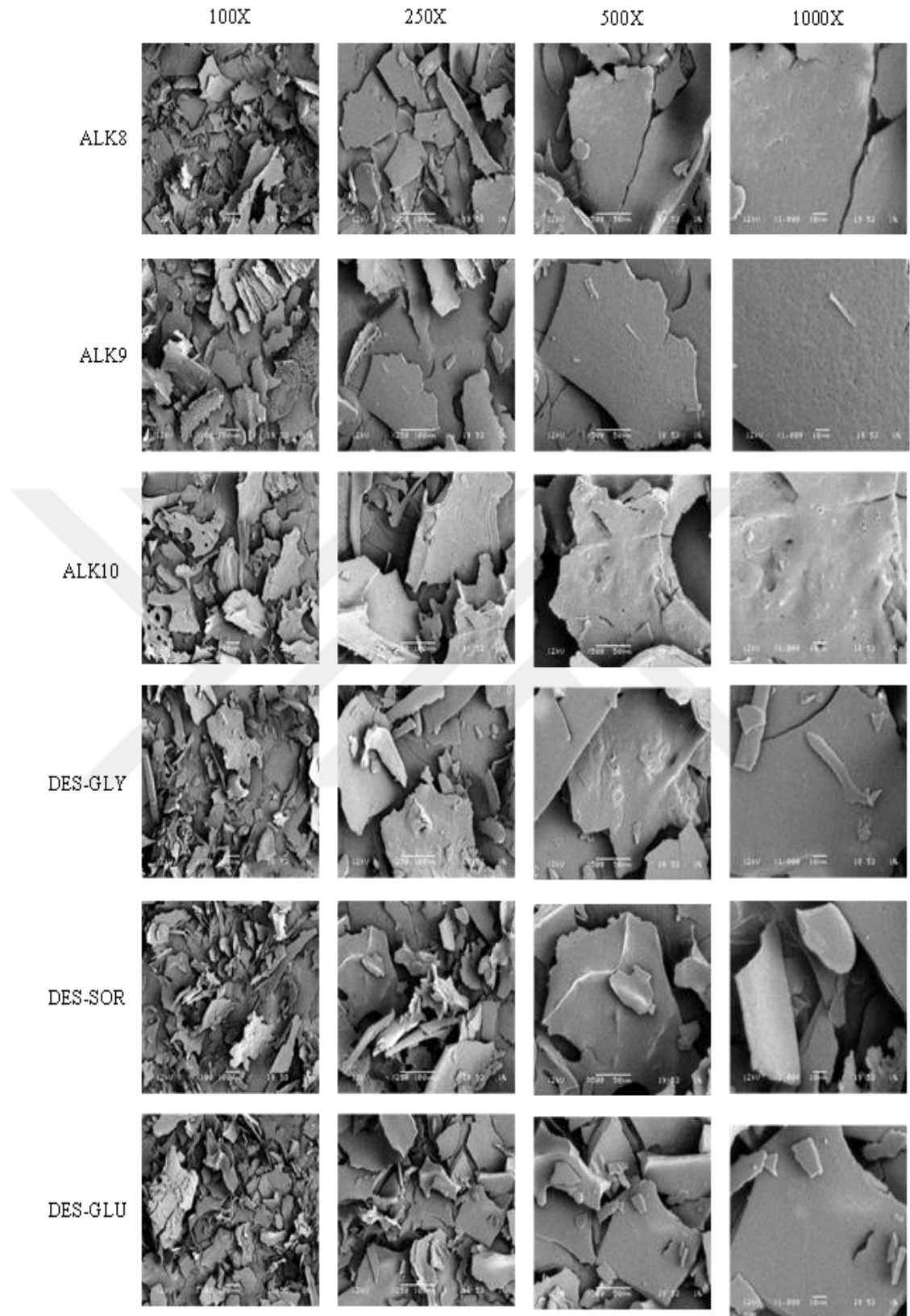
Buna karşılık, DES ile ekstrakte edilen proteinler (DES-GLY, DES-SOR, DES-GLU) daha düşük floresans yoğunlukları sergilemiş, bu da Trp kalıntılarının gömülü kaldığı daha kompakt üçüncül yapılar olduğunu düşündürmüştür (Tang ve ark., 2023). DES sistemlerinin güçlü hidrojen bağı verici–alıcı ağları, hidrofobik çekirdeğin açığa çıkmasını sınırlayarak daha sıkı paketlenmiş ve stabilize protein katlanmalarını korumaya yardımcı olur. Benzer içsel floresans analizleri, DES ile ekstrakte edilen proteinlerin native-benzeri üçüncül paketlenmeyi ve aromatik kalıntıların daha az açığa çıkmasını koruduğunu göstermiştir.

Bu bulgular FTIR ve CD sonuçlarıyla da uyumlu olup, DES sistemlerinin hem ikincil hem üçüncül yapıları koruyarak kapsamlı açılmayı sınırladığını, buna karşılık alkali ekstraksiyonun kısmi denatürasyona yol açtığını doğrulamaktadır. DES türevli proteinlerdeki bu koordineli yapı korumasının, yağlı tohum ve yan ürün matrislerinde çözünürlük, emülsifikasyon ve köpük stabilitesi gibi fonksiyonel özellikleri iyileştirdiği bilinmektedir. Bu nedenle, gıda uygulamaları için yüksek kaliteli ve fonksiyonel protein bileşenleri elde etmek amacıyla çözünürlüğü artırırken yapısal bütünlüğü koruyacak sürdürülebilir ekstraksiyon süreçleri tasarlamak kritik önem taşımaktadır.

4.5. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Farklı ekstraksiyon sistemleriyle elde edilen fındık protein izolatlarının mikroyapısal morfolojisini incelemek amacıyla SEM kullanılmıştır. Bu analiz, yüzey topolojisi, agregasyon davranışı ve yapısal organizasyon hakkında görsel bilgi sağlamaktadır. Hem yüzey özelliklerini hem de daha ince yapısal detayları ortaya koymak amacıyla 100×, 250×, 500× ile 1000× arasında değişen büyütmelemlerde mikrograflar elde edilmiştir (Şekil 4.5).

Alkali ile ekstrakte edilen protein örnekleri (ALK8, ALK9, ALK10), özellikle yüksek büyütmelemlerde (100×–1000×), görece olarak yoğun, sürekli ve kompakt mikroyapılar sergilemiştir. Bu gözlemler, belirgin protein agregasyonu ve sınırlı gözeneklilik ile uyumludur. Bu durum, yüksek pH ortamlarına maruz bırakılan proteinlerin tipik davranışıyla örtüşmektedir; bu ortamlar proteinlerin açılmasına, hidrofobik bölgelerin açığa çıkmasına ve çöktürme ile kurutma aşamalarında yeniden agregasyona yol açar (Karaca ve ark., 2011; Malomo ve ark., 2014). Alkali işlemleri arasında, ALK10 numunesi biraz daha gözenekli ve kesintili bölgeler göstermiş olup, daha yüksek pH'ta çözünürlük artışı ile agregasyon eğilimi arasında hassas bir dengeyi yansıtabileceğini düşündürmektedir. Bu mikroyapısal heterojenlik, kısmen artmış dağılılabilirlik ve işlevsel performansı (örn. daha yüksek çözünürlük ve amino asit geri kazanımı) açıklayabilir.



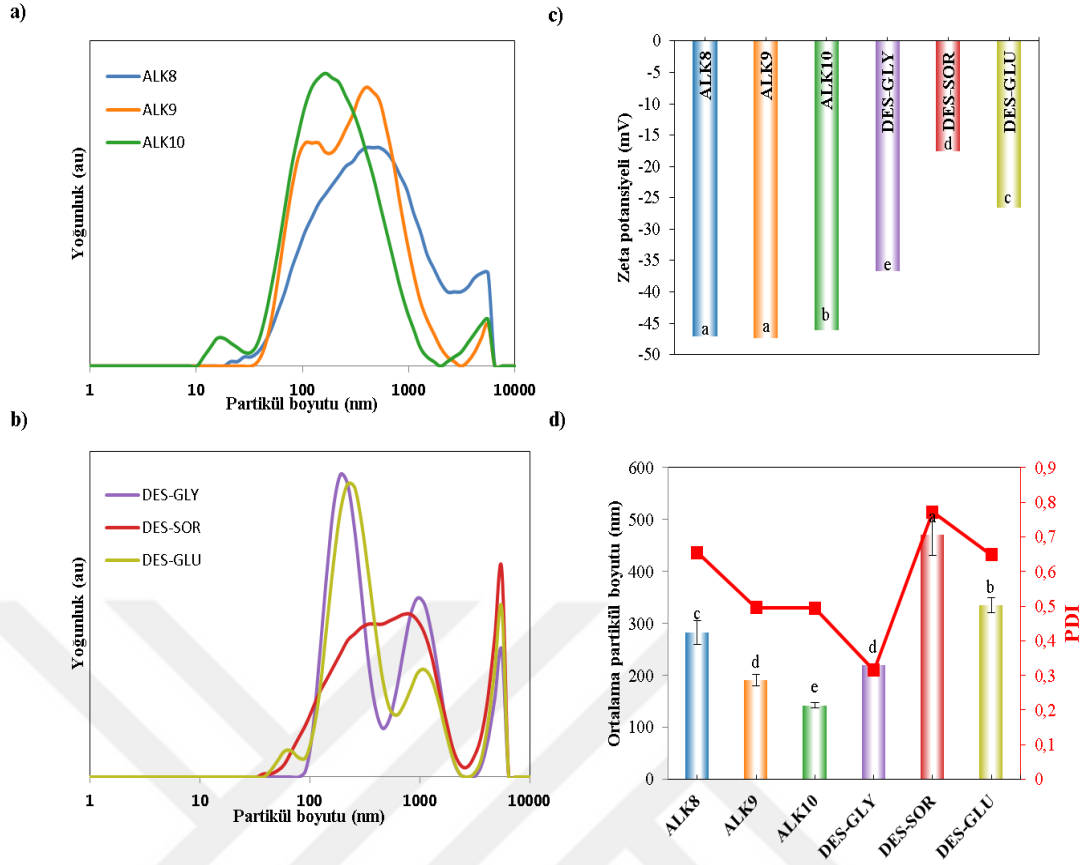
Şekil 4.5. Alkali ve DES ile ekstrakte edilmiş fındık proteinlerinin morfolojik görüntüleri.

Buna karşılık, DES kullanılarak ekstrakte edilen proteinler (DES-GLY, DES-SOR ve DES-GLU) belirgin şekilde parçalanmış, pulsu ve gözenekli yüzey yapıları sergilemiştir. Bu yapılar genel olarak daha az kompakt, gevşek bağlı protein partikülleri ve düzensiz kenarlara sahiptir. Bu durum, DES ortamlarının kendine özgü hidrojen bağı ağları ve ayarlanabilir polariteleri sayesinde yaygın protein-protein etkileşimlerini bozduğunu ve izolasyon sırasında yeniden agregasyonu sınırladığını düşündürmektedir. Poliol (gliserol) veya indirgen şeker bazlı hidrojen bağı vericilerin (HBD'ler; sorbitol, glukoz) varlığı, proteinler için daha yumuşak bir çözündürme ortamı sağlayarak dispersiyonu artırabilir ve sert matris oluşumunu engelleyebilir (Ruesgas-Ramón ve ark., 2017; Dai ve ark., 2015).

DES sistemleri arasında DES-SOR ve DES-GLU izolatları en belirgin yüzey bozulmalarını göstermiş, son derece düzensiz ve pürüzlü morfolojilere sahip olmuştur. Bu durum, sorbitol ve glukozun yüksek viskozitesi ve güçlü hidrojen bağ kapasitesi ile ilişkilendirilebilir. Bu bileşenler protein katlanmasını bozarak yapısal plastisiteyi artırabilir. Böyle gözenekli ve gevşek ağlar, daha fazla yüzey alanı ve azalmış moleküler paketlenme nedeniyle emülsifikasyon aktivitesi ve çözünürlük gibi işlevsel özellikler için avantajlıdır (Zhou ve ark., 2022; Zhu ve ark., 2025).

4.6. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli

Alkali ve DES sistemleriyle ekstrakte edilen fındık proteini izolatlarının kolloidal özellikleri, partikül boyutu dağılımı ve polidispersite indeksi (PDI) analiz edilerek değerlendirilmiştir. Bu parametreler, agregasyon davranışı, dispersiyon homojenliği ve çözeltideki potansiyel işlevsel performans hakkında önemli bilgiler sunmaktadır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. a) Alkali ile ekstrakte edilmiş ve b) DES ile ekstrakte edilmiş fındık proteinlerinin partikül boyut dağılımı, c) Zeta potansiyeli ve d) Ortalama partikül boyutu-polidispersite indeksi değerleri.

Alkali ile ekstrakte edilen örnekler arasında, artan pH ile birlikte partikül boyutunda belirgin bir azalma eğilimi gözlenmiştir. ALK10 örneği en küçük ortalama partikül boyutunu (~140 nm) göstermiş, bunu ALK9 (~190 nm) ve ALK8 (~280 nm) takip etmiştir. Bu durum, daha yüksek alkalitenin proteinlerin daha etkin şekilde açılmasını ve agregatlarının çözülmesini teşvik ettiğini göstermektedir. Özellikle ALK10'a ait partikül boyutu dağılım eğrilerinde görülen tek modlu ve daha keskin pikler, daha homojen bir protein popülasyonuna işaret etmektedir. Yüksek pH'lı alkali koşullarda gelişmiş dağılma davranışı, artan elektrostatik itme ve artan çözünme kapasitesine bağlanabilir. Bu da protein-protein etkileşimlerini en aza indirerek çözünürlüğü artırır.

Buna karşılık, DES kullanılarak ekstrakte edilen protein izolatları belirgin şekilde daha büyük partikül boyutları ve daha heterojen dağılım profilleri sergilemiştir. DES-SOR en yüksek ortalama partikül boyutuna (~500 nm) ulaşmış, bu durum zayıf dispersiyon stabilitesine ve yüksek molekül ağırlıklı fraksiyonların agregasyonu veya

tam çözünmemesine işaret etmektedir. DES-GLU ve DES-GLY orta düzeyde değerler (~ 360 nm ve ~ 220 nm) göstermiş olmakla birlikte, dağılım eğrileri daha geniş ve sıklıkla iki modlu yapıda kalmıştır. Bu durum, ince partiküller ile agregat kümelerinin birlikte varlığını yansıtmaktadır. DES sistemlerinin yüksek viskozitesi ve karmaşık hidrojen bağı etkileşimleri, protein çözünürlüğünü sınırlayarak ekstraksiyon sırasında aglomerasyonu kolaylaştırabilir.

PDI (polidispersite indeksi) ölçümleri bu gözlemleri desteklemiştir. ALK10 en düşük PDI değerini ($\sim 0,49$) sergileyerek dar ve tekdüze bir boyut dağılımını yansıtmıştır. ALK9 ve ALK8 de benzer şekilde düşük PDI değerleri göstermiş ve alkali ile ekstrakte edilen protein süspansiyonlarının homojenliğini doğrulamıştır. Buna karşılık, DES ile ekstrakte edilen proteinlerde, özellikle DES-SOR'da, daha yüksek PDI değerleri (0,78'e kadar) kaydedilmiş ve önemli derecede boyut polidispersitesine işaret edilmiştir. DES örnekleri arasında DES-GLY en düşük PDI değerini ($\sim 0,4$) göstermiş ve gliserolün plastikleştirici ve stabilize edici etkisiyle daha homojen bir dağılım sağlama potansiyelini ortaya koymuştur.

Bu bulgular, özellikle pH 10'daki alkali ekstraksiyonun, ince emülsiyonlar veya filmler gibi uygulamalara uygun, monodispers ve kolloidal olarak stabil protein izolatlarının üretimini desteklediğini göstermektedir. Gözlenen bu kolloidal davranış, daha önceki SEM ve floresans analizleriyle de tutarlı olup, ekstraksiyon ortamı, protein yapısı ve dispersiyon özellikleri arasındaki ilişkiyi güçlendirmektedir (Zhu ve ark., 2025; Ruesgas-Ramón ve ark., 2017).

Zeta potansiyel ölçümleri, alkali ve DES bazlı ekstraksiyon sistemleriyle elde edilen fındık proteini izolatlarının yüzey yükü özelliklerini ve elektrostatik stabilitesini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Zeta potansiyeli, kolloidal stabiliteyi öngörmeye kritik bir parametre olup, daha yüksek mutlak değerler (pozitif veya negatif) partiküller arası itici kuvvetlerin arttığını ve dolayısıyla agregasyon eğiliminin azaldığını gösterir.

Şekil 4.6c'de görüldüğü üzere, tüm protein örnekleri nötr pH koşullarında bitkisel proteinlerin anyonik doğasına uygun şekilde negatif zeta potansiyel değerleri sergilemiştir (Zhu ve ark., 2025). Alkali ile ekstrakte edilen örnekler arasında ALK8 ve ALK9 en negatif zeta potansiyellerini (-45 mV) göstermiş, bunu ALK10 (-43 mV) takip etmiştir. Bu değerler, disperse protein partikülleri arasında güçlü

elektrostatik itme kuvvetlerinin bulunduğunu ve sulu ortamlarda stabilitenin korunduğunu göstermektedir. Bu belirgin yüzey yükü, alkali ekstraksiyon sırasında asidik yan zincirlerin (ör. glutamik ve aspartik asit kalıntıları) daha fazla deprotonasyonu ve artık çözücülerin minimal müdahalesiyle açıklanabilir.

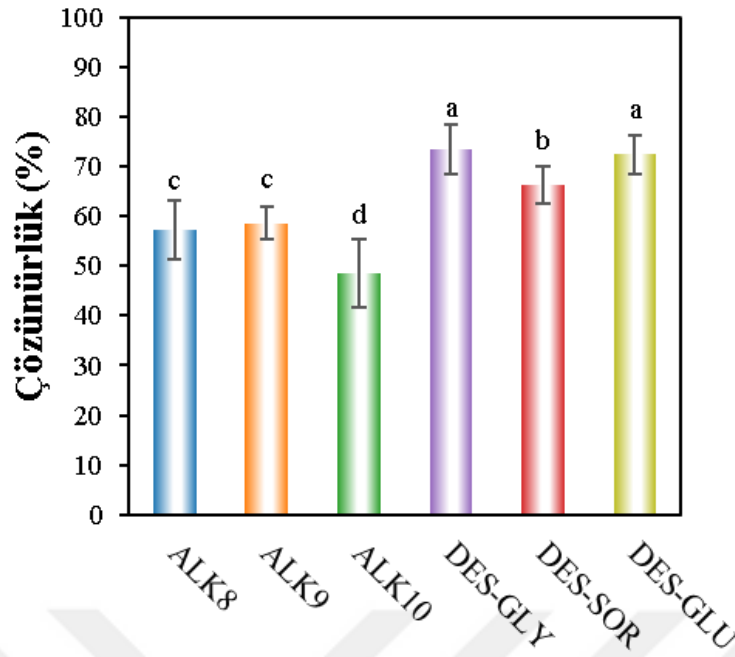
Buna karşılık, DES kaynaklı protein izolatları anlamlı şekilde daha düşük (daha az negatif) zeta potansiyel değerleri sergilemiştir. DES-GLU ve DES-GLY yaklaşık -30 mV değerler kaydederken, DES-SOR en az negatif değeri (~-25 mV) göstermiş ve elektrostatik stabilizasyonun azaldığını ortaya koymuştur. Bu düşüş, DES bileşenlerinin yüklü amino asit yan zincirleriyle etkileşmesi veya artık hidrojen bağı vericilerin (ör. şekerler, şeker alkolleri) yüzey yüklerini kısmen maskeleymesi veya nötralize etmesiyle açıklanabilir. Ayrıca, DES ortamlarının yüksek viskozitesi ve iyonik kalkanlama etkileri de zeta potansiyelinin azalmasına katkıda bulunabilir.

Sonuç olarak, özellikle pH 8–9 aralığındaki alkali ekstraksiyon, fındık proteinlerinin doğal yüzey yükü özelliklerini koruyarak güçlü kolloidal stabilite sağlamaktadır. Buna karşılık, DES ile gerçekleştirilen ekstraksiyonlar zeta potansiyelinde önemli değişimlere yol açarak dispersiyon stabilitesini potansiyel olarak azaltmaktadır. Bu sonuçlar, hedeflenen gıda formülasyonlarında protein işlevselliğini tasarlarken elektrostatik ve sterik mekanizmalar arasında bir denge kurulmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

4.7. Teknofonksiyonel Özellikler

4.7.1. Çözünürlük

Protein çözünürlüğü, gıda formülasyonlarındaki işlevsel performansın temel belirleyicilerinden biridir ve emülsifikasyon, köpürme ve jelasyon gibi özellikleri doğrudan etkiler. Şekil 4.7’de gösterildiği üzere, fındık proteini izolatları ekstraksiyon yöntemi ve kullanılan çözücü tipine bağlı olarak çözünürlük açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar ($p < 0,05$) göstermiştir.



Şekil 4.7. Alkali ve DES ile ekstrakte edilmiş fındık proteinlerinin çözünürlüğü

DES ile ekstrakte edilen proteinler, alkali yöntemle elde edilen örneklerle kıyasla tutarlı bir şekilde daha yüksek çözünürlük sergilemiştir. DES-GLY ve DES-GLU sistemleri en yüksek çözünürlüğü (%75–76) sağlarken, DES-SOR da yüksek seviyede (%70–71) kalmıştır. Buna karşılık, alkaliyle ekstrakte edilen proteinlerde çözünürlük belirgin şekilde daha düşüktür: ALK10 ~%63, ALK9 ~%61 ve ALK8 ~%58 olarak ölçülmüştür.

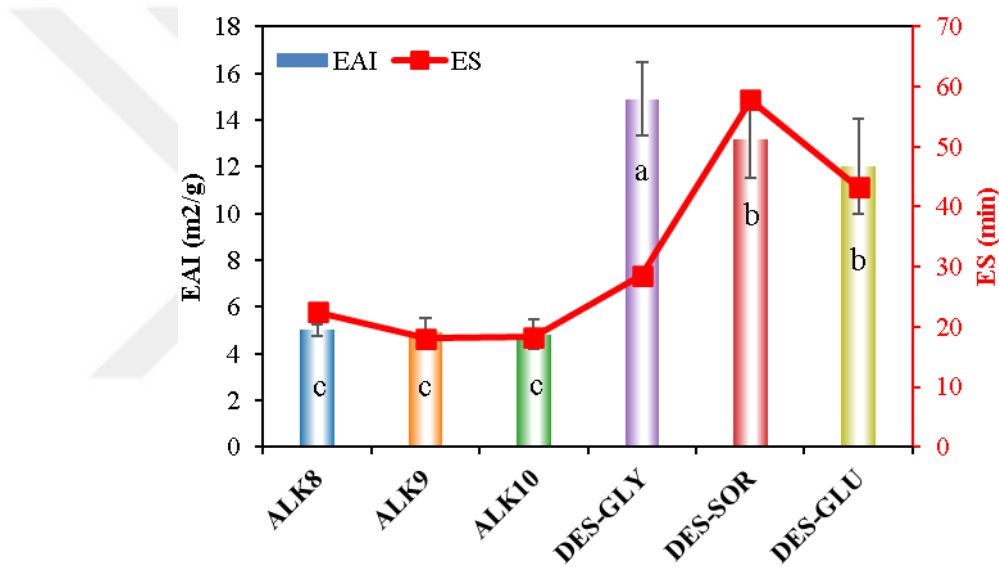
Bu sonuçlar, DES sistemlerinin bitkisel proteinlerin sulu dispersibilitesini artırdığını gösteren çalışmalara paraleldir. Karimi ve ark. (2024), Cao ve ark. (2023), Dermanovic ve ark. (2025) ve Wang ve ark. (2025) çalışmalarında, DES koşullarının fonksiyonel hidrasyonu korurken yoğun yeniden agregasyonu sınırlayarak çözünürlük artışı sağladığını bildirmiştir. Bu sistemlerin proteinlerin kısmi katlanma açılmasını sağlarken geri dönüşsüz agregasyona yol açmadığı belirtilmiştir. Moldes ve ark. (2024), sorbitol bazlı DES sistemleriyle alg proteinlerinin ~%72–74 çözünürlük gösterdiğini rapor etmiştir. Bu sinerji, kısmen açılmış ancak yüksek oranda hidratlanmış konformasyonların elde edilmesini sağlayarak su–protein etkileşimlerini ve dispersiyonunu güçlendirir.

Öte yandan, alkali ekstraksiyon güçlü pH kaynaklı denatürasyona neden olarak proteinleri geniş ölçüde katlanmamış hale getirir; ancak nötralizasyon ve kurutma işlemleri sırasında yeniden agregasyona yol açar. Sonuçta su ile uyumluluğu

sınırlayan yoğun ve kohezyonlu matrisler oluşur (Hanafî ve ark., 2024). Yüksek pH ile ekstrakte edilen proteinlerdeki bu azalmış çözünürlük, Karimi ve ark. (2024) ve Wang ve ark. (2025) tarafından da tutarlı bir şekilde bildirilmiştir.

4.7.2. Emülsiyon aktivite indeksi ve emülsiyon stabilitesi

Emülsifiye edebilme özellikleri (Emülsiyon Aktivite İndeksi, EAI ve Emülsiyon Stabilitesi, ES) bitkisel protein izolatlarının karmaşık gıda sistemlerindeki arayüzey davranışı ve işlevsel çok yönlülüğü hakkında kritik bilgiler sunar. Şekil 4.7’de gösterildiği üzere hem EAI hem de ES değerleri ekstraksiyon yöntemlerine bağlı olarak anlamlı farklılıklar göstermiştir. Bu durum, kullanılan çözücü sistemlerinin protein yapısı ve yüzey fonksiyonelliği üzerindeki etkisini yansıtmaktadır.



Şekil 4.8. Alkali ve DES ile ekstrakte edilmiş fındık proteinlerinin emülsiyon aktivite (m^2/g) ve stabilite (dakika) indeksleri.

DES sistemleri kullanılarak ekstrakte edilen proteinlerde EAI performansı, alkali yöntemlere kıyasla belirgin şekilde daha yüksek bulunmuştur. Özellikle DES-GLY, en yüksek EAI değerine (yaklaşık $15 \text{ m}^2/\text{g}$) ulaşarak geliştirilmiş arayüzey adsorpsiyon kapasitesine işaret etmiştir. Bu etki, gliserolün plastikleştirici ve yapı gevşetici özelliklerine atfedilebilir. Bu özellikler, protein moleküllerinin esnekliğini artırarak yağ-su arayüzeyinde hızlı hizalanmayı kolaylaştırabilir (Zhou ve ark., 2022). DES-SOR ve DES-GLU ile ekstrakte edilen proteinler de orta düzeyde EAI değerleri (yaklaşık $11\text{--}13 \text{ m}^2/\text{g}$) göstermiştir. Buna karşılık, alkali ile ekstrakte edilen izolatlar (pH 8–10) anlamlı şekilde daha düşük EAI ($<6 \text{ m}^2/\text{g}$) sergilemiştir. Bu

durum, agregasyon kaynaklı moleküler hareketlilik kaybı ve azalmış yüzey aktivitesi ile açıklanabilir (Karaca ve ark., 2011; Zhu ve ark., 2025).

ES (dak) verileri ise biraz farklı bir eğilim göstermiştir. DES-GLY, EAI'de en yüksek performansı sergilemiş olsa da, en uzun emülsiyon stabilitesi DES-SOR'da (yaklaşık 60 dakika) gözlenmiş, bunu DES-GLU (yaklaşık 45 dakika) ve DES-GLY (yaklaşık 30 dakika) takip etmiştir. Alkali ile ekstrakte edilen tüm proteinlerde ise oldukça kısa ES süreleri (yaklaşık 5–6 dakika) kaydedilmiş; bu da kırılğan arayüzey filmleri ve hızlı birleşme (koalesans) eğilimine işaret etmektedir. DES-SOR'un, görece daha düşük EAI değerine rağmen yüksek ES göstermesi, muhtemelen kalıntı sorbitol moleküllerinin sağladığı hidrojen bağları ve sterik engellenmeyle stabilize olan daha bütünleşik ve viskoelastik arayüzey filmlerinin oluşumuyla açıklanabilir (Ruesgas-Ramón ve ark., 2017). Bu gözlem, kritik bir öngörüyü vurgulamaktadır: yüksek EAI değeri mutlaka yüksek ES anlamına gelmez; çünkü bu iki parametre emülsifikasyonun farklı yönlerini yansıtır.

Genel olarak bu bulgular, özellikle gliserol ve sorbitol içeren DES ekstraksiyonunun, gelişmiş emülsifikasyon özelliklerine sahip proteinlerin elde edilmesini desteklediğini göstermekte ve bu proteinleri temiz etiketli ve sürdürülebilir emülgatör alternatifleri için umut verici adaylar haline getirmektedir. Bununla birlikte, belirli gıda matrisi gereksinimlerine bağlı olarak başlangıç aktivitesi ile uzun süreli stabilite arasında denge kurmak amacıyla formülasyonun daha ileri düzeyde optimize edilmesi gerekebilir.

4.7.3. Köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi

Fındık proteini izolatlarının köpürme özellikleri, köpürme kapasitesi (KK) ve köpük stabilitesi (KS) dâhil olmak üzere, ekstraksiyon yönteminden anlamlı şekilde etkilenmiştir (Şekil 4.9). Alkali ile ekstrakte edilen örnekler, DES kullanılarak elde edilenlere kıyasla daha üstün bir köpürme performansı sergilemiştir.

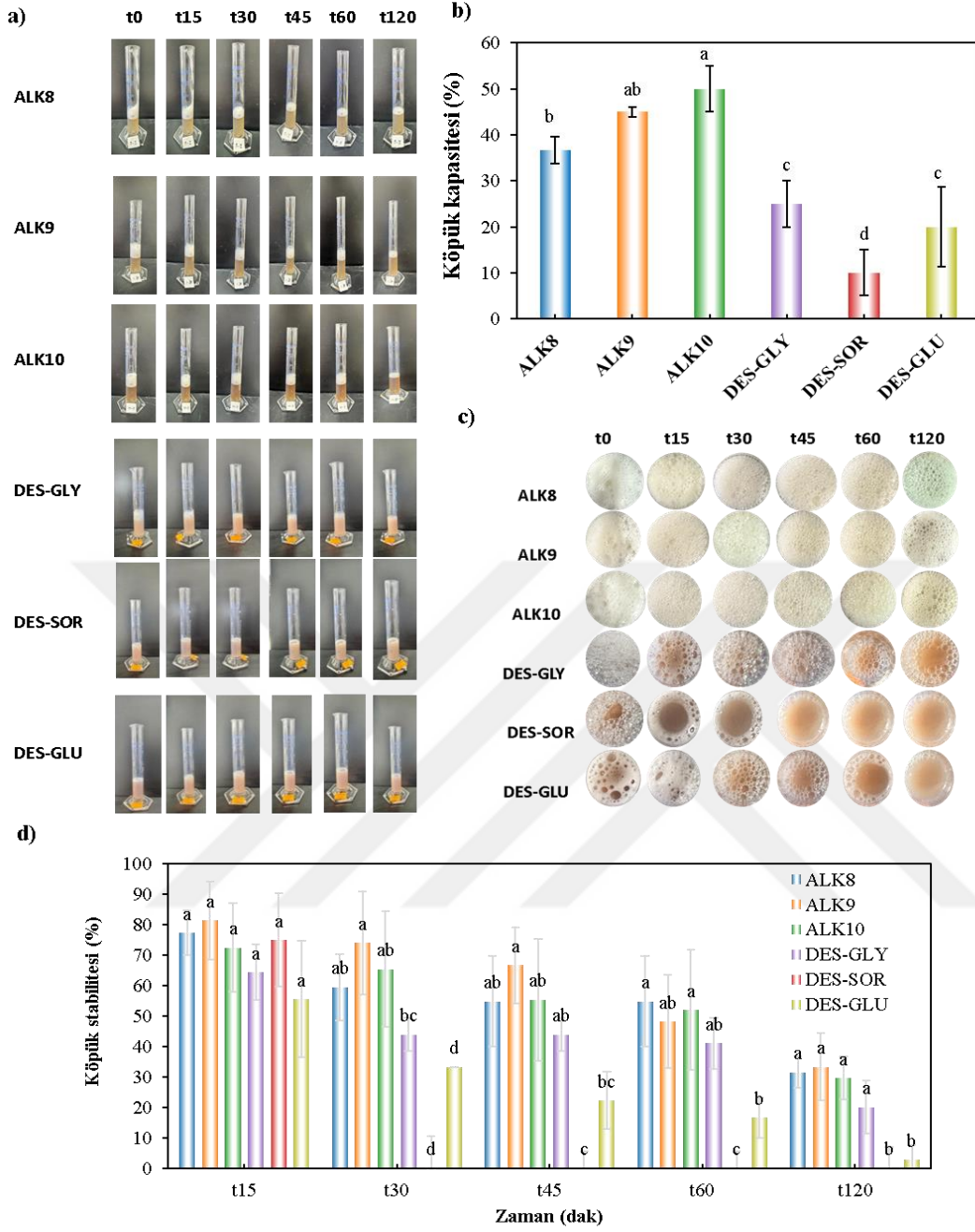
Alkali uygulamaları arasında pH 10'da ekstrakte edilen numune (ALK10) en yüksek köpürme kapasitesini (%50) gösterirken, bunu sırasıyla ALK9 (%45) ve ALK8 (~%37) takip etmiştir ($p < 0,05$). Bu sonuçlar, alkali koşulların protein moleküllerinin kısmi açılmasını teşvik ederek yapısal esnekliklerini artırdığını ve böylece yüzey aktivitelerini ve köpürme sırasında hava tutma yeteneklerini geliştirdiğini düşündürmektedir. Buna karşılık, DES sistemleri kullanılarak ekstrakte edilen

proteinler, özellikle DES-SOR ve DES-GLU, belirgin şekilde daha düşük köpürme kapasitesi (~%10 ve %20) sergilemiş olup, bu durum muhtemelen yapısal kararlılıktan kaynaklanan sınırlı arayüzey aktivitesine işaret etmektedir. DES uygulamaları arasında DES-GLY nispeten daha yüksek bir köpürme kapasitesi (%25) göstermiş olsa da alkali ile ekstrakte edilen izolatlarla kıyasla daha düşük performans sergilemiştir.

Köpük stabilitesi üzerine gerçekleştirilen 120 dakikalık değerlendirmeler, alkali ile ekstrakte edilen proteinlerin üstün performansını açıkça ortaya koymuştur. ALK9 ve ALK10 örnekleri, 60. dakikadan sonra başlangıç köpük hacminin %50'sinden fazlasını korumuş ve izleme süresinin sonunda yaklaşık %40–50 seviyelerinde stabil kalmıştır. Bu bulgular, birleşme (koalesans) ve yerçekimi kaynaklı drenajı önleyebilen bütünlük ve elastik arayüzey filmlerinin oluşumunu desteklemektedir.

Buna karşılık, DES ile ekstrakte edilen örneklerde hızlı köpük çökmesi gözlenmiştir; DES-SOR ve DES-GLU formülasyonlarında stabilite 45. dakikada %30'un altına, 120. dakikada ise %20'nin altına düşmüştür. Orta düzeyde başlangıç köpürme kapasitesine sahip olan DES-GLY ise diğer DES formülasyonlarına kıyasla daha yüksek stabilite sergileyerek, belirli DES bileşenlerinin köpük destabilizasyonunu kısmen engelleyebileceğini göstermiştir. Köpük yapılarına ve zaman içindeki morfolojik değişimlerine yönelik görsel incelemeler de bu sonuçları desteklemiştir; alkali ile elde edilen köpüklerin daha homojen ve kalıcı olduğu, DES ile muamele edilen örneklerin ise seyrek, heterojen ve hızla bozulan köpükler oluşturduğu belirlenmiştir.

Bu sonuçlar, özellikle yüksek pH seviyelerinde uygulanan alkali ekstraksiyonun, köpüklü gıda sistemlerinde kullanım için uygun protein izolatları elde etme potansiyelini vurgulamaktadır. Öte yandan, DES tabanlı ekstraksiyon sistemleri sürdürülebilir ve çevre dostu bir yaklaşım sunmasına rağmen, sınırlı köpürme performansları nedeniyle protein esnekliği ve arayüzey davranışı bakımından daha ileri düzeyde optimizasyona gereksinim duymaktadır



Şekil 4.9. a) Köpük görüntüleri, b) Köpürme kapasitesi (%), c) Üst köpük tabakalarının görüntüleri, d) Alkali ve DES ile ekstrakte edilmiş fındık proteinlerinin köpük stabilitesi (%).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması, fındık küspesi gibi agro-endüstriyel yan ürünlerin değerli bir protein kaynağı olarak değerlendirilmesini ve geleneksel alkali ekstraksiyon yöntemlerine alternatif olarak doğal derin ötektik çözücüler (NADES) kullanılarak sürdürülebilir protein ekstraksiyon stratejilerinin geliştirilmesini hedeflemiştir. Çalışmada, gliserol (DES-GLY), sorbitol (DES-SOR) ve glukoz (DES-GLU) bazlı NADES sistemleri sentezlenmiş ve ultrases destekli ya da desteksiz ekstraksiyon protokolleriyle uygulanarak, elde edilen protein izolatlarının verimi, çözünürlüğü, fonksiyonel özellikleri ve yapısal karakteristikleri detaylı olarak incelenmiştir.

NADES sistemlerinin alkali ekstraksiyon yöntemlerine göre çevresel olarak daha sürdürülebilir bir yaklaşım sunduğunu ve protein fonksiyonelliğini belirli yönlerden daha iyi koruduğunu ortaya koymuştur. Alkali ekstraksiyon, pH 10 seviyesinde en yüksek protein verimi (260 mg/g) ve ekstraksiyon verimliliği (%63) sağlamasına karşın; bu yöntem proteinin sekonder ve tersiyer yapılarında denatürasyona neden olmuş, çözünürlük ve emülsifiye edici özelliklerde belirgin sınırlamalara yol açmıştır. Nitekim FTIR ve içsel floresan analizleri, alkaliyle ekstrakte edilen proteinlerin yapısal bütünlüğünün önemli ölçüde bozulduğunu ve agregasyon eğiliminin arttığını göstermiştir. Ayrıca alkali işlemin daha yüksek negatif yüzey yükü (-45 ila -47 mV) ve daha kompakt morfoloji oluşturduğu, SEM görüntülerinde gözlemlenmiştir. Bu özellikler, özellikle nötralizasyon ve kurutma sonrası aşamada geri dönüşümsüz yeniden agregasyona katkıda bulunarak çözünürlük kaybını pekiştirmiştir.

Öte yandan, NADES sistemleri, ~%70–76 aralığında yüksek çözünürlük değerleri ile öne çıkmıştır. DES-GLY ve DES-SOR çözücüler, protein-protein etkileşimlerini zayıflatıp daha gevşek ve gözenekli morfolojiler oluşturarak, suyla daha iyi etkileşime girebilen, daha iyi disperse olabilen protein izolatlarının elde edilmesini sağlamıştır. Ayrıca, DES-GLY ile elde edilen proteinler $15 \text{ m}^2/\text{g}$ 'ye kadar çıkan emülsiyon aktivite indeksi değerleriyle, yüzey aktivitesinin ve emülsiyon stabilitesinin önemli ölçüde arttığını göstermiştir. DES-SOR sisteminde ise

emülsiyon stabilitesi yaklaşık 60 dakika korunarak, bu çözücünün emülsifiye edici gıda sistemleri için umut vadeden bir profil sunduğu belirlenmiştir. Ultrases desteği, NADES sistemlerinin performansını daha da artırarak kütle transferini iyileştirmiş ve ekstraksiyon verimliliğini optimize etmiştir.

Ancak çalışma, NADES sistemleriyle ekstraksiyonda protein veriminin (~200–220 mg/g) ve ekstraksiyon verimliliğinin (%50–55) alkali yöntemle göre daha düşük kaldığını da ortaya koymuştur. Bu durum, NADES sistemlerinin prosese özel optimizasyon gerektirdiğini ve çöktürme aşamalarının daha kontrollü tasarlanması gerektiğini göstermektedir. Ayrıca köpük kapasitesi açısından alkali ekstraksiyon avantajını sürdürmüş (%37–50), DES sistemleri ise daha düşük değerler üretmiştir (%10–25). Bu sonuç, alkali işlemin kısmen açılmış ve yüzeyde hidrofobik kalıntıları daha belirgin protein konformasyonları üreterek hava–su arayüzünde köpürme stabilizasyonuna daha uygun hale geldiğini göstermektedir.

Bu bağlamda tez çalışması, NADES sistemlerinin bitkisel protein ekstraksiyonunda fonksiyonel kaliteyi artıran, çevresel etkileri azaltan ve temiz etiketli ürün geliştirilmesine katkı sağlayabilecek bir alternatif olduğunu göstermiştir. Özellikle gliserol ve sorbitol bazlı NADES sistemleri, protein yapısal bütünlüğünü koruyarak çözünürlük ve emülsiyon özelliklerini iyileştirirken, ultrases destekli ekstraksiyonun bu süreçleri daha verimli hale getirdiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak, fındık küspesi gibi yerel ve ekonomik olarak önemli agro-endüstriyel atıkların NADES tabanlı teknolojilerle değerli protein bileşenlerine dönüştürülmesi, sürdürülebilir gıda sistemleri, sıfır atık biyorafineri modelleri ve yerel ekonomik kalkınma hedefleriyle uyumlu bir strateji sunmaktadır. Bu yaklaşım, Türkiye'nin fındık endüstrisinde katma değeri artırmak için de önemli bir fırsat yaratmaktadır.

Gelecek çalışmalar için öneriler şunlardır:

- NADES çözücülerini moleküler düzeyde optimize edilerek ekstraksiyon veriminin artırılması
- Enzimatik ön işlemler veya pH ayarlı çöktürme basamaklarıyla saflaştırma süreçlerinin geliştirilmesi
- NADES ile ekstrakte edilen proteinlerin sindirilebilirlik ve biyoyararlanım analizlerinin *in vitro* ve *in vivo* sistemlerde değerlendirilmesi

- Endüstriyel ölçekte süreç tasarımı, ekonomik fizibilite analizi ve çevresel yaşam döngüsü değerlendirmeleri
- Tüketici kabulü ve duyuşal özelliklerin sistematik olarak analiz edilmesi

Bu öneriler, NADES tabanlı ekstraksiyon teknolojilerinin endüstriyel uygulamalarını destekleyecek ve Türkiye'nin sürdürülebilir gıda üretimi hedeflerine katkı sağlayacaktır.





KAYNAKÇA

- Abd Rahim, F. N., Wan Ibadullah, W. Z., Saari, N., Brishti, F. H., Mustapha, N. A., Ahmad, N., & Arulrajah, B. (2023). The effect of alkaline extraction and drying techniques on the physicochemical, structural properties and functionality of rice bran protein concentrates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 242, 124908. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124908>
- Aguado-González, L., Sierra-Pérez, J., Forte, C., López-Forniés, I., & Blanc, S. (2025). Cascade valorization of hazelnut industry by-products for industrial use through co-creative processes. *Journal of Cleaner Production*, 494(494), 144989. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2025.144989>
- Alsaïdi, R., & Thiemann, T. (2025). Use of natural deep eutectic solvents (NADES) in food science and food processing. *Sustainability*, 17(5), 2293. <https://doi.org/10.3390/su17052293>
- Álvarez-Castillo, E., Felix, M., Bengoechea, C., & Guerrero, A. (2021). Proteins from agri-food industrial biowastes or co-products and their applications as Green Materials. *Foods*, 10(5), 981. <https://doi.org/10.3390/foods10050981>
- Anvar, A., Azizi, M. H., & Gavligi, H. A. (2025). Exploring the effect of natural deep eutectic solvents on zein: Structural and functional properties. *Current Research in Food Science*, 10, 100965. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2024.100965>
- Arulrajah, B., Qoms, M. S., Wan Ibadullah, W. Z., & Saari, N. (2025). Innovative deep eutectic solvent approach vs. conventional alkaline for kenaf seed protein extraction: A comprehensive comparison of structural, thermal, nutritional and techno-functional properties. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 102, 103972. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2025.103972>
- Assatory, A., Vitelli, M., Rajabzadeh, A. R., & Legge, R. L. (2019). Dry fractionation methods for plant protein, starch and fiber enrichment: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 340–351. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.006>
- Association of Official Analytical Chemists. (1990). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (Vol. 11). The Association.
- Barre, A., Borges, J. P., & Rougé, P. (2005). Molecular modelling of the major peanut allergen Ara h 1 and other homotrimeric allergens of the cupin superfamily: a structural basis for their IgE-binding cross-reactivity. *Biochimie*, 87(6), 499-506.

- Bayram, E. N., Gerçek, Y. C., Kutlu, N., Çelik, S., Bayram, S., Baştürk, F. N., & Yıldırım, N. (2024). The application of deep eutectic solvents for protein extraction from bee bread (Perga). *Microchemical Journal*, 204, 111139. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.111139>
- Birleşmiş Milletler. (2024). *World population projected to reach 9.8 billion in 2050, and 11.2 billion in 2100*. United Nations; United Nations. <https://www.un.org/en/desa/world-population-projected-reach-98-billion-2050-and-112-billion-2100>
- Boboua, S. Y. B., Wen, Q., Zhang, L., Chen, Y., Yu, J., Chen, P., Sun, Y., & Zheng, T. (2024). Valorization of animal waste proteins for agricultural, food production, and medicinal applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 8(1). <https://doi.org/10.3389/fsufs.2024.1366333>
- Bozoğlu, M., Başer, U., Kılıç Topuz, B., & Alhas EROĞLU, N. (2019). An Overview of Hazelnut Markets and Policy in Turkey. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 22(5), 733–743. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.v22i45606.532645>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Braspaiboon, S., Osiriphun, S., Surawang, S., Jirattananarangsri, W., Kanha, N., & Laokuldilok, T. (2022). Ultrasound-assisted alkaline extraction of proteins in several algae and their nutritional characteristics. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(9), 6143–6154. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15975>
- Cao, P.-H., Zhang, C.-X., Ma, Y.-X., Yu, Y.-M., Liu, H.-M., Wang, X.-D., & Zheng, Y.-Z. (2023). Extraction of protein from sesame meal: Impact of deep eutectic solvents on protein structure and functionality. *LWT*, 187, 115366. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115366>
- Ceylan, F. D., Yılmaz, H., Adrar, N., Günal Köroğlu, D., Gultekin Subasi, B., & Capanoglu, E. (2022). Interactions between Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Protein and Phenolics and In Vitro Gastrointestinal Digestibility. *Separations*, 9(12), 406. <https://doi.org/10.3390/separations9120406>
- Chakravorty, P., & Das, A. B. (2025). Impact of choline chloride and sugar natural deep eutectic solvents on structure and functionality of treebean (*Parkia timoriana*) seed protein. *Scientific Reports*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-87890-z>
- Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert-Vian, M. (2017). Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 41, 357–377. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.016>
- Chen, S., & Luo, X. (2024). Chia seed protein as a promising source for plant-based foods: Functional properties, processing methods and potential food applications. *Applied Food Research*, 4(2), 100459. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2024.100459>

- Chen, Y., Oliveira, W. S., Dias, F. F. G., & Ismail, B. P. (2025). Impact of a Novel Two-Phase Natural Deep Eutectic Solvent-Assisted Extraction on the Structural, Functional, and Flavor Properties of Hemp Protein Isolates. *Plants*, 14(2), 274. <https://doi.org/10.3390/plants14020274>
- Dai, Y., Witkamp, G.-J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2015). Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chemistry*, 187, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.123>
- Damodaran, S. & Parkin, K. L. (2017). *Fennema's Food Chemistry*. CRC Press.
- De Angelis, D., Latrofa, V., Squeo, G., Pasqualone, A., & Summo, C. (2024). Techno-functional, rheological, and chemical properties of plant-based protein ingredients obtained with dry fractionation and wet extraction. *Current Research in Food Science*, 9(9), 100906. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2024.100906>
- deMan, J. M. (2013). *Principles of Food Chemistry*. Springer Science & Business Media.
- Demodarshan, S. Parkin, K. L., & Fennema, O. R. (2008). *Fennema's food Chemistry*. Crc Press.
- Dermanović, B., Marić, A., Sakač, M., Tomić, D., Dragojlović, D., Popović, L., Šarić, B., & Jovanov, P. (2025). Impact of alkaline and deep eutectic solvent extraction on rapeseed protein isolates characteristics and in vitro digestibility. *Current Research in Food Science*, 101075–101075. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2025.101075>
- Dumoulin, L., Jacquet, N., Malumba, P., Richel, A., & Blecker, C. (2021). Dry and wet fractionation of plant proteins: How a hybrid process increases yield and impacts nutritional value of faba beans proteins. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 72(72), 102747. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102747>
- Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2014). Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. *Methods in Enzymology*, 541(1), 85–94. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-420119-4.00007-0>
- Flynn, K., Gupta, A., & Hrach, F. (2017). *Subject: Electrostatic Separation of Dry Granular Plant Based Food Materials Title Electrostatic Separation of Dry Granular Plant Based Food Products*.
- Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26(2), 68–87. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.003>
- Gao, Z., Shen, P., Lan, Y., Cui, L., Ohm, J.-B., Chen, B., & Rao, J. (2020). Effect of alkaline extraction pH on structure properties, solubility, and beany flavor of yellow pea protein isolate. *Food Research International*, 131, 109045. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109045>
- Ge, W., Xiao, Z., Ding, X., Bi, W., & Chen, D. D. Y. (2025). Deep eutectic system enhanced oat protein extraction. *Journal of Food Science*, 90(1). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.17645>

- Gianessi, L., & Williams, A. (2023, October 2). *Turkey No 1 Hazelnut Producer Thanks to Insecticides - CropLife International*. CropLife International. https://croplife.org/case-study/turkey-no-1-hazelnut-producer-thanks-to-insecticides/?utm_source=chatgpt.com
- Guzmán-Lorite, M., Marina, M. L., & García, M. C. (2022). Successive extraction using natural deep eutectic solvents and pressurized liquids for a greener and holistic recovery of proteins from pomegranate seeds. *Food Research International*, 161, 111862. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111862>
- Güney, O. İ. (2014). Turkish hazelnut production and export competition. *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, 24(1), 23-29.
- Hadidi, M., Aghababaei, F., & McClements, D. J. (2023). Enhanced alkaline extraction techniques for isolating and modifying plant-based proteins. *Food Hydrocolloids*, 145, 109132. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109132>
- Hadidi, M., Aghababaei, F., Gonzalez-Serrano, D. J., Goksen, G., Trif, M., McClements, D. J., & Moreno, A. (2024). Plant-based proteins from agro-industrial waste and by-products: Towards a more circular economy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 261(261), 129576–129576. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129576>
- Hadinoto, K., Ling, J. K.-U., Park, J.-W., Tran, T.-T., & Pu, S. (2025). Extraction of brewer's spent grain protein using natural deep eutectic solvent compared to alkaline extraction: Evaluating their yields, physicochemical characteristics, and functionalities. *Food and Bioprocess Processing*, 150, 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2024.12.012>
- Hanafı, M. A., Anwar, F., & Saari, N. (2024). Valorization of biomass for food protein via deep eutectic solvent extraction: Understanding the extraction mechanism and impact on protein structure and properties. *Food Frontiers*, 5(3), 1265–1301. <https://doi.org/10.1002/fft2.389>
- Henchion, M., Hayes, M., Mullen, A., Fenelon, M., & Tiwari, B. (2017). Future Protein Supply and Demand: Strategies and Factors Influencing a Sustainable Equilibrium. *Foods*, 6(7), 53. <https://doi.org/10.3390/foods6070053>
- Hewage, A., Olatunde, O. O., Nimalaratne, C. House, J. D., Aluko, R. E., & Bandara, N. (2024). Deep eutectic solvent-based sustainable protein extraction technology for fava bean protein extraction. *Food Hydrocolloids*, 147, 109283–109283. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109283>
- Hou, F., Ding, W., Qu, W., Oladejo, A. O., Xiong, F., Zhang, W., He, R., & Ma, H. (2017). Alkali solution extraction of rice residue protein isolates: Influence of alkali concentration on protein functional, structural properties and lysinoalanine formation. *Food Chemistry*, 218, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.064>
- İslam, A. (2018). Hazelnut cultivation in Turkey. *Akademik Ziraat Dergisi*, 7(2), 251–258. <https://doi.org/10.29278/azd.476665>
- Jiang, X., Gao, F., Ma, Y., Huo, N., Guo, Y., & Yu, Y. (2024). Protein from tiger nut meal extracted by deep eutectic solvent and alkali-soluble acid precipitation: A comparative study on structure, function, and nutrition. *Food Chemistry*, 452(452), 139608. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139608>

- Karabulut, G., Kahraman, O., Pandalaneni, K., Kapoor, R., & Feng, H. (2023). A comprehensive review on hempseed protein: Production, functional and nutritional properties, novel modification methods, applications, and limitations. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253(253), 127240. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127240>
- Karabulut, G., Köroğlu, D. G., Feng, H., & Karabulut, Z. (2024). Sustainable fungi-based protein extraction from agro-waste mushroom stem using deep eutectic solvents. *Food Chemistry: X*, 24(24), 101931. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101931>
- Karabulut, G., Subasi, B. G., Ivanova, P., Goksen, G., Chalova, V., & Capanoglu, E. (2025). Towards sustainable and nutritional-based plant protein sources: A review on the role of rapeseed. *Food Research International*, 202(202), 115553. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115553>
- Karaca, A. C., Low, N., & Nickerson, M. (2011). Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International*, 44(9), 2742–2750. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.012>
- Karimi, A., Bhowmik, P., Yang, T. C., Samaranayaka, A., & Chen, L. (2024). Extraction of canola protein via natural deep eutectic solvents compared to alkaline treatments: Isolate characteristics and protein structural and functional properties. *Food Hydrocolloids*, 152, 109922. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.109922>
- Karlsen, F., Lund, I., & Skov, P. V. (2022). Optimisation of alkaline extraction of protein from brewer's spent grain. *Journal of the Institute of Brewing*. <https://doi.org/10.1002/jib.703>
- Kaur, G., & Bhatia, S. (2022). Radish leaf protein concentrates: optimization of alkaline extraction for production and characterization of an alternative plant protein concentrate. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(4), 3166–3181.
- Kaur, G., & Bhatia, S. (2022). Radish leaf protein concentrates: optimization of alkaline extraction for production and characterization of an alternative plant protein concentrate. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(4), 3166–3181. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01411-4>
- Kottage, S. M., Samaranayaka, A. G. P., Bhowmik, P., & Chen, L. (2024). Comparison of dry (air classification) and wet fractionated pea protein on protein molecular structure and gelling properties. *Sustainable Food Proteins*, 2(3), 141–158.
- Lakowics, J. R. (1999). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Kluwer Academic.
- Lam, R. S. H., & Nickerson, M. T. (2013). Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach. *Food Chemistry*, 141(2), 975–984. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.038>
- Lawal, O. S. (2004). Functionality of African locust bean (*Parkia biglobossa*) protein isolate: effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. *Food Chemistry*, 86(3), 345–355. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.036>

- Li, D. (2022). Natural deep eutectic solvents in phytonutrient extraction and other applications. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1004332.
- Li, Z., Messina, V., Skylas, Daniel J., Valtchev, P., Whiteway, C., Cheng, S., Langrish, Timothy A. G., Quail, Ken J., & Dehghani, F. (2024). Effect of Dry and Wet Fractionation on Nutritional and Physicochemical Properties of Faba Bean and Yellow Pea Protein. *Legume Science*, 6(2). <https://doi.org/10.1002/leg3.244>
- Loveday, S. M. (2019). Food Proteins: Technological, Nutritional, and Sustainability Attributes of Traditional and Emerging Proteins. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10(1), 311–339. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121128>
- Malomo, S. A., He, R., & Aluko, R. E. (2014). Structural and functional properties of hemp seed protein products. *Journal of food science*, 79(8), C1512-C1521.
- McClements, D. J., & Grossmann, L. (2021). A brief review of the science behind the design of healthy and sustainable plant-based foods. *Npj Science of Food*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41538-021-00099-y>
- Meenakshi Sundaram, G. S., Das, D., Emiola-Sadiq, T., Sajeeb Khan, A., Zhang, L., & Meda, V. (2024). Developments in the Dry Fractionation of Plant Components: A Review. *Separations*, 11(12), 332. <https://doi.org/10.3390/separations11120332>
- Möller, A. C., van der Padt, A., & van der Goot, A. J. (2022). Influence of the fractionation method on the protein composition and functional properties. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 81, 103144. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103144>
- Nadar, C. G., Fletcher, A., Moreira, B. R. de A., Hine, D., & Yadav, S. (2024). Waste to protein: A systematic review of a century of advancement in microbial fermentation of agro-industrial byproducts. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23(4). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13375>
- Nasrollahzadeh, F., Roman, L., Swaraj, V. J. Shiva., Ragavan, K. V., Vidal, N. P., Dutcher, J. R., & Martinez, M. M. (2022). Hemp (*Cannabis sativa* L.) protein concentrates from wet and dry industrial fractionation: Molecular properties, nutritional composition, and anisotropic structuring. *Food Hydrocolloids*, 131, 107755. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107755>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry* (7th ed.). Basingstoke.
- Owusu-Apenten, R. K. (2004). *Food protein analysis : quantitative effects on processing*. Marcel Dekker.
- Patra, A., & V, A. P. (2025). Protein extraction from detoxified cassava leaves using various deep eutectic solvents: A sustainable strategy to enhance nutritional and functional properties. *Food Chemistry*, 474, 143200. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.143200>
- Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of agricultural and food chemistry*, 26(3), 716-723.

- Pelgrom, P. J. M., Wang, J., Boom, R. M., & Schutyser, M. A. I. (2015). Pre- and post-treatment enhance the protein enrichment from milling and air classification of legumes. *Journal of Food Engineering*, 155(155), 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.01.005>
- Pfeifer, S., Bublin, M., Dubiela, P., Hummel, K., Wortmann, J., Hofer, G., ... & Hoffmann-Sommergruber, K. (2015). Cor a 14, the allergenic 2S albumin from hazelnut, is highly thermostable and resistant to gastrointestinal digestion. *Molecular nutrition & food research*, 59(10), 2077–2086.
- Priyanka, G., Singiri, J. R., Adler-Agmon, Z., Sannidhi, S., Daida, S., Novoplansky, N., & Grafi, G. (2024). Detailed analysis of agro-industrial byproducts/wastes to enable efficient sorting for various agro-industrial applications. *Bioresources and Bioprocessing*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-024-00763-7>
- Pulivarthi, M. K., Buenavista, R. M., Bangar, S. P., Li, Y., Pordesimo, L. O., Bean, S. R., & Siliveru, K. (2023). Dry fractionation process operations in the production of protein concentrates: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(6), 4670–4697. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13237>
- Ruesgas-Ramón, M., Figueroa-Espinoza, M. C., & Durand, E. (2017). Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(18), 3591–3601. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01054>
- Rutherford, S. M., Fanning, A. C., Miller, B. J., & Moughan, P. J. (2014). Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores and Digestible Indispensable Amino Acid Scores Differentially Describe Protein Quality in Growing Male Rats. *The Journal of Nutrition*, 145(2), 372–379. <https://doi.org/10.3945/jn.114.195438>
- Sadh, P. K., Duhan, S., & Duhan, J. S. (2018). Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>
- Samad, S., Zaidel, A., Jusoh, M., Jeng, S., Lim, A., Yunus, J., Klemeš, Soo, M., Samad, N., Norulfairuz, D., Maslina, Y., Muhamad, I., & Hashim, Z. (2021). Extraction of Plant Based Protein from Moringa oleifera Leaves using Alkaline Extraction and Isoelectric Precipitation Method. *Chemical Engineering Transactions*, 89, 253–258. <https://doi.org/10.3303/CET2189043>
- Schutyser, M. A. I., & van der Goot, A. J. (2011). The potential of dry fractionation processes for sustainable plant protein production. *Trends in Food Science & Technology*, 22(4), 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.006>
- Sengupta, I., & Udgaonkar, J. (2019). Monitoring site-specific conformational changes in real-time reveals a misfolding mechanism of the prion protein. *Elife*, 8, e44698.
- Shahid, A., Haq, M. A., Hussain, N., Nawaz, H., & Xu, J. (2024). Impact of deep eutectic solvent deamidation on the solubility and conformation of rice dreg protein isolate. *Cereal Chemistry*, 102(1), 80–88. <https://doi.org/10.1002/cche.10848>

- Shen, L., Wang, X., Wang, Z., Wu, Y., & Chen, J. (2008). Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. *Food Chemistry*, 107(2), 929–938. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.047>
- Sikorski, Z. E. (2002). *Chemical and functional properties of food proteins*. Technomic, Cop.
- Silventoinen, P., Sipponen, M. H., Holopainen-Mantila, U., Poutanen, K., & Sozer, N. (2018). Use of air classification technology to produce protein-enriched barley ingredients. *Journal of Food Engineering*, 222(222), 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.11.016>
- Souza, D. de, Sbardelotto, A. F., Ziegler, D. R., Marczak, L. D. F., & Tessaro, I. C. (2016). Characterization of rice starch and protein obtained by a fast alkaline extraction method. *Food Chemistry*, 191, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.032>
- Stone, A. K., Karalash, A., Tyler, R. T., Warkentin, T. D., & Nickerson, M. T. (2015). Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food Research International*, 76, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.017>
- Sun, X. D., & Arntfield, S. D. (2011). Gelation properties of salt-extracted pea protein isolate induced by heat treatment: Effect of heating and cooling rate. *Food Chemistry*, 124(3), 1011–1016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.063>
- Tang, J., Yao, D., Xia, S., Cheong, L., & Tu, M. (2024). Recent progress in plant-based proteins: From extraction and modification methods to applications in the food industry. *Food Chemistry: X*, 23, 101540.
- Tanger, C., Mertens, J., & Ulrich Kulozik. (2022). Influence of extraction method on the aggregation of pea protein during thermo-mechanical treatment. *Food Hydrocolloids*, 127, 107514–107514. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107514>
- Temizyurek-Arslan, M. (2023). Evaluation of hazelnut production in Türkiye in environment, energy and economy using life cycle assessment approach. *Science of the Total Environment*, 892(892), 164468. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164468>
- Thakur, S., Pandey, A. K., Verma, K., Shrivastava, A., & Singh, N. (2024). Plant-based protein as an alternative to animal proteins: A review of sources, extraction methods and applications. *International Journal of Food Science and Technology*, 59(1), 488–497.
- Tomé-Sánchez, I., Martín-Diana, A. B., Peñas, E., Frias, J., Rico, D., Jiménez-Pulido, I., & Martínez-Villaluenga, C. (2021). Bioprocessed Wheat Ingredients: Characterization, Bioaccessibility of Phenolic Compounds, and Bioactivity During in vitro Digestion. *Frontiers in Plant Science*, 12(12). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.790898>
- Umagai, T., Awamura, H., Use, T., Atanabe, T., Aito, Y., Asumura, T., Atanabe, R., & Adowaki, M. (2006). Production of Rice Protein by Alkaline Extraction Improves Its Digestibility. *J Nutr Sci Vitaminol*, 52, 467–472.

- Ustunol, Z. & Wiley, J. (2015). *Applied food protein chemistry*. Wiley Blackwell, Cop.
- Uversky, V. N., & Dunker, A. K. (2010). Understanding protein non-folding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(6), 1231–1264. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.01.017>
- Valenzuela, C., Abugoch, L., Tapia, C., & Gamboa, A. (2012). Effect of alkaline extraction on the structure of the protein of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and its influence on film formation. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(4), 843–849. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12035>
- Vogelsang-O'Dwyer, M., Petersen, I. L., Joehnke, M. S., Sørensen, J. C., Bez, J., Detzel, A., Busch, M., Krueger, M., O'Mahony, J. A., Arendt, E. K., & Zannini, E. (2020). Comparison of Faba Bean Protein Ingredients Produced Using Dry Fractionation and Isoelectric Precipitation: Techno-Functional, Nutritional and Environmental Performance. *Foods*, 9(3), 322. <https://doi.org/10.3390/foods9030322>
- Wang, N., Zhu, H., Bao, L., Sun, G., Zhao, S., Yan, Y., & Li, Z. (2024). A novel application of electrostatic separation technology on green enrichment for protein from *Enteromorpha prolifera*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 96(103791), 103791. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2024.103791>
- Wang, T., Yu, D., Wang, J., Yang, B., Ma, L., & Xu, S. (2025). *Sustainable utilization of cottonseed meal: Integrated protein extraction and detoxification using deep eutectic solvents*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144499>
- Wockenfuss, L., Lammers, V., Heinz, V., Sozer, N., & Silventoinen-Veijalainen, P. (2023). Two steps of dry fractionation: Comparison and combination of air classification and electrostatic separation for protein enrichment from defatted rapeseed press cake. *Journal of Food Engineering*, 357(357), 111623. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2023.111623>
- Xing, Q., de Wit, M., Kyriakopoulou, K., Boom, R. M., & Schutyser, M. A. I. (2018). Protein enrichment of defatted soybean flour by fine milling and electrostatic separation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 50(207), 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.08.014>
- Xing, Q., Utami, D. P., Dematthey, M. B., Kyriakopoulou, K., de Wit, M., Boom, R. M., & Schutyser, M. A. I. (2020). A two-step air classification and electrostatic separation process for protein enrichment of starch-containing legumes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 66(66), 102480. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102480>
- Yang, J., Lamochi Roozalipour, S. P., Berton-Carabin, C. C., Nikiforidis, C. V., van der Linden, E., & Sagis, L. M. C. (2021). Air-water interfacial and foaming properties of whey protein - sinapic acid mixtures. *Food Hydrocolloids*, 112, 106467. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106467>
- Zhang, C., Sanders, J. P. M., & Bruins, M. E. (2014). Critical parameters in cost-effective alkaline extraction for high protein yield from leaves. *Biomass and Bioenergy*, 67, 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.020>

- Zhang, Y., Roman, L., Kirkensgaard, J. J. K., & Corredig, M. (2025). Effect of salt extraction on composition, structure, and thermal properties of pea protein. *Food Chemistry*, 486, 144650. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144650>
- Zhao, J., Wang, X., Lin, H., & Lin, Z. (2023). Hazelnut and its by-products: A comprehensive review of nutrition, phytochemical profile, extraction, bioactivities and applications. *Food Chemistry*, 413(413), 135576. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135576>
- Zhou, Y., Wu, W., Zhang, N., Soladoye, O. P., Zhang, Y., & Fu, Y. (2022). Deep eutectic solvents as new media for green extraction of food proteins: Opportunity and challenges. *Food Research International*, 161(161), 111842. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111842>
- Zhu, H.-G., Tang, H.-Q., Cheng, Y.-Q., Li, Z.-G., & Tong, L.-T. (2021). Electrostatic separation technology for obtaining plant protein concentrates: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 113(111933), 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.044>
- Zhu, Y. K., Li, M. H., Yang, M., Xu, J. X., Ren, M. Y., Zhao, Z. K., ... & Zhang, M. W. (2025). Extraction of walnut protein using deep eutectic solvent aqueous two-phase system: Investigation of structural and functional properties. *Food Chemistry: X*, 102546.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Esra KİBAR BALBALLI

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2016, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2020 yılından itibaren arasında Tarım ve Orman Bakanlığı'nda gıda mühendisi olarak çalışmaktadır.

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER:

- Kibar Balballı, E., & Karabulut, G. (2025). Extraction and Isoelectric Precipitation of Protein from Hazelnut Meal. *IV. International Congress of the Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, Niğde, Türkiye*, 142–142.gönderen <https://www.turjaf.com/index.php/TURSTEP/article/view/335>

DİĞER ESERLER:

- Karakuş, E., Kibar Balballı, E., Ara, İ., & Ayhan, Z. (2021). Polisakkarit ve Protein Bazlı Aktif Biyokompozit Malzemelerin Gıda Ambalajlama Açısından Değerlendirilmesi. *Akademik Gıda*, 19(1), 74–88. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.927700>