



**KENEVİR PROTEİN İZOLATI ÜRETİMİNİN VE
GLİKASYONUNUN YANIT YÜZEY METODU
(RSM) İLE OPTİMİZASYONU**

Elvan YÜZER

Yüksek Lisans Tezi

Organik Tarım İşletmeciliği

Ana Bilim Dalı

Doç. Dr. Naciye KUTLU KANTAR

2024

(Her Hakkı Saklıdır)



T.C.
BAYBURT ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
ORGANİK TARIM İŞLETMECİLİĞİ ANA BİLİM DALI
ORGANİK TARIM İŞLETMECİLİĞİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

KENEVİR PROTEİN İZOLATI ÜRETİMİNİN VE GLİKASYONUNUN YANIT
YÜZEY METODU (RSM) İLE OPTİMİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elvan YÜZER

Danışman: Doç. Dr. Naciye KUTLU KANTAR

BAYBURT - 2024



KABUL VE ONAY

Doç. Dr. Naciye KUTLU KANTAR danışmanlığında, Elvan YÜZER tarafından hazırlanan “Kenevir Protein İzolatı Üretiminin ve Glikasyonunun Yanıt Yüzey Metodu (RSM) ile Optimizasyonu” başlıklı bu çalışma, 13.12.2024 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak jürimiz tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Cansu Ekin BONACINA

Üye : Doç. Dr. Nesrin ECEM BAYRAM

Üye : Doç. Dr. Naciye KUTLU KANTAR

Bu tezin kabulü Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/...../20... tarih ve 20...../.....-..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Murat KUL
Enstitü Müdürü



BEYANNAME

Bayburt Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre Doç. Dr. Naciye KUTLU KANTAR danışmanlığında hazırlamış olduğum “Kenevir Protein İzolatı Üretiminin ve Glikasyonunun Yanıt Yüzey Metodu (RSM) ile Optimizasyonu” başlıklı program seçin tezimin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

13.12.2024

Elvan YÜZER



ÖN SÖZ

Tez çalışmalarım esnasında akademik bilgisini, tecrübelerini, anlayış ve ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yol gösteren, akademik çalışmalarım için imkan sunan danışman hocam Doç. Dr. Naciye KUTLU KANTAR'a sonsuz saygı, sevgi ve içtenlikle şükranlarımı sunarım. Ayrıca, yüksek lisans serüvenimin başlamasında ilgi ve emekleri olan Doç. Dr. Volkan GÜL'e teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca beni daima destekleyen ve destekleriyle her zaman yanımda olan değerli babam Musa Süreyya BALCI'ya ve annem Songül BALCI'ya minnetlerimi sunmayı bir borç bilir ve içtenlikle teşekkür ederim.

Tecrübesiyle beraber desteğini hep yanımda hissettiğim, gösterdiği sabır, fedakarlıklar ve laboratuvarındaki yardımlarıyla sonuçlandırabildiğim tez çalışmam için meslektaşım, sevgili eşim Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Onur YÜZER'e ve canım oğlum Mustafa Ertuğrul YÜZER'e gönül dolusu teşekkürlerimi sunarım ve tezimi onlara armağan etmekten gurur duyarım.

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından TÜBİTAK 1002-A kapsamında 122O719 proje numarası ile desteklenmiş olup TÜBİTAK'a desteği için teşekkür ederiz.

Elvan YÜZER



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KENEVİR PROTEİN İZOLATI ÜRETİMİNİN VE GLİKASYONUNUN YANIT YÜZEY METODU (RSM) İLE OPTİMİZASYONU

Elvan YÜZER

Bayburt Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Organik Tarım İşletmeciliği Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Naciye KUTLU KANTAR

Bayburt-2024, Sayfa: 56

Günümüzde vegan beslenme kültürü oldukça yaygınlaşmıştır. Bu nedenle bitki-bazlı protein kaynaklarına olan ilgi günden güne artmaktadır. Bitki-bazlı protein kaynaklarından biri olan, endüstriyel kenevir tohumu, yüksek miktarda kaliteli yağ, protein, karbonhidrat, çözünmeyen lif, vitamin ve mineral içermektedir. Kenevir tohumu proteininin, mükemmel sindirilebilirliği ve esansiyel amino asit içeriğinin yeterliliği nedeniyle, yumurta akı ve soya fasulyesi proteinleriyle karşılaştırılabilir besin değerine sahip olduğu bilinmektedir. Bu çalışma kapsamında, yağı alınmış kenevir tohumundan, farklı ekstraksiyon koşullarında en yüksek verimde protein izolatı eldesi için yanıt yüzey metodu (RSM) ile optimizasyon uygulanmıştır. Optimum ekstraksiyon koşulları, tuz konsantrasyonunun 0, pH değerinin 12 ve sıcaklığın 49 °C olduğu durumda belirlenmiştir. Optimum koşullarda üretilen protein izolatı glikasyon işlemine tabii tutulmuş olup glikasyon koşulları da RSM ile optimize edilmiştir. Glikasyon için en uygun glikasyon derecesi ve esmerleşme indeksinin elde edildiği optimum koşullar ise protein:şeker (fruktoz) oranının 1.6:1, sıcaklığın 60 °C ve sürenin 90 dk olduğu durumda saptanmıştır. Bu koşullarda elde edilen glike protein izolatının, glike edilmemiş protein izolatı ile emülsifiye edici aktivite indeksi ve emülsiyon stabilite indeksi sonuçlarında istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Toplam fenolik-flavonoid bileşik ve antioksidan aktivite miktarlarında ise şeker kompleksi bu değerlerin azalmasına neden olmuştur. Bunun yanı sıra toplam fenolik-flavonoid bileşik ve antioksidan aktivite değerleri arasında yüksek pozitif korelasyon olduğu belirlenmiştir. SEM mikrografları, kenevir protein izolatı ve şeker arasındaki ilişkilerin varlığını göstermiş ve bu etkileşimler süngerimsi üç boyutlu bir mikro yapıya yol açmıştır. FTIR sonuçlarına göre glike edilmiş olan izolatla glike edilmemiş ile karşılaştırıldığında 3300-3200 cm⁻¹'de daha güçlü absorpsiyon gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum polisakkarit zincirinin indirgeyici ucunun amino asitlerle kovalent olarak birleştirildiğinin göstergesidir. Sonuç olarak, bu çalışma ile monosakkaritlerin glikasyonu nasıl etkilediği konusunda fonksiyonel ve karakteristik özellikler adına önemli bulgular tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kenevir tohumu, protein modifikasyonu, glikasyon, optimizasyon.



ABSTRACT

M. SC. THESIS

OPTIMIZATION OF HEMP PROTEIN ISOLATE PRODUCTION AND GLYCATION BY RESPONSE SURFACE METHOD (RSM)

Elvan YÜZER

Bayburt University

Institute of Graduate Studies

Department of Organic Agriculture Management

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Dr. Naciye KUTLU KANTAR

Bayburt-2024, Pages: 56

Today, vegan diet culture has become quite widespread. Therefore, interest in plant-based protein sources is increasing day by day. Industrial hemp seed, one of the plant-based protein sources, contains high quality oil, protein, carbohydrate, insoluble fiber, vitamins and minerals. It is known that hemp seed protein has a nutritional value comparable to egg white and soybean proteins due to its excellent digestibility and sufficient essential amino acid content. In this study, optimization was applied with response surface method (RSM) to obtain the highest yield protein isolate from defatted hemp seed under different extraction conditions. Optimum extraction conditions were determined when salt concentration was 0, pH value was 12 and temperature was 49 °C. Protein isolate produced under optimum conditions was subjected to glycation process and glycation conditions were also optimized with RSM. The optimum conditions for glycation, where the most suitable glycation degree and browning index were obtained, were determined as protein:sugar (fructose) ratio of 1.6:1, temperature of 60 °C and time of 90 min. Under these conditions, no statistical difference was found in emulsifying activity index and emulsion stability index results of glycated protein isolate obtained from non-glycated protein isolate. In total phenolic-flavonoid compound and antioxidant activity amounts, sugar complex caused a decrease in these values. In addition, it was determined that there was a high positive correlation between total phenolic-flavonoid compound and antioxidant activity values. SEM micrographs showed the existence of relationships between hemp protein isolate and sugar and these interactions led to a spongy three-dimensional microstructure. According to FTIR results, it was determined that glycated isolate showed stronger absorption at 3300-3200 cm⁻¹ compared to non-glycated isolate. This is an indication that the reducing end of the polysaccharide chain is covalently combined with amino acids. As a result, this study has determined important findings in terms of functional and characteristic properties on how monosaccharides affect glycation.

Keywords: Hemp seed, protein modification, glycation, optimization.



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	II
BEYANNAME	III
ÖN SÖZ	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
TABLOLAR.....	IX
ŞEKİLLER.....	X
KISALTMALAR	XI
SİMGELER.....	XI
GİRİŞ.....	1
Araştırmanın Konusu ve Problemi	1
Araştırmanın Amacı	2
Araştırmanın Önemi ve Gerekçesi	2
BİRİNCİ BÖLÜM	4
1. KURAMSAL ÇERÇEVE	4
1.1. KENEVİR BİTKİSİ	4
1.2. PROTEİN	5
1.3. MODİFİKASYON YÖNTEMLERİ	6
1.3.1. Glikasyon	8
1.4. OPTİMİZASYON	9
1.5. KONU İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR	10
İKİNCİ BÖLÜM	15
2. YÖNTEM	15
2.1. MATERYALLER	15
2.2. KENEVİR TOHUMLARININ ANALİZLERE HAZIRLANMASI VE KİMYASAL BİLEŞİMLERİN BELİRLENMESİ	15
2.3. PROTEİN EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU	15
2.4. PROTEİN EKSTRAKSİYONU	16
2.5. BELİRLENEN OPTİMUM ŞARTLARLA PROTEİN İZOLATI ÜRETİMİ	16
2.6. GLİKASYON KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU	17
2.7. GLİKASYON İŞLEMİ	17
2.8. GLİKASYON DERECEİ VE ESERLEŞME İNDEKSİ	18
2.9. FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİN BELİRLENMESİ	18
2.9.1. Su ve Yağ Tutma Kapasitesi	18
2.9.2. Emülsiyon Özellikleri	19
2.9.3. Köpüklenme Özellikleri	19
2.10. TOPLAM FENOLİK-FLAVONOİD BİLEŞİK VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTE	20
2.10.1. Antioksidan Aktivite	20
2.10.2. Toplam Fenolik Bileşik (TFB)	21
2.10.3. Toplam Flavonoid Bileşik (TFlaB)	21
2.11. FİZİKSEL VE KİMYASAL KARAKTERİZASYON	21
2.11.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	21
2.11.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR)	21
2.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	



ÜÇÜNCÜ BÖLÜM.....	23
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	23
3.1. KENEVİR TOHUMU, YAĞSIZ KENEVİR TOHUMU VE PROTEİN İZOLATININ BİLEŞİMLERİ.....	23
3.2. PROTEİN EKSTRAKSİYONUN OPTİMİZASYONU	24
3.3. GLİKASYON İŞLEMİNİN OPTİMİZASYONU	27
3.4. FONKSİYONEL ÖZELLİKLER	36
3.4.1. Su ve Yağ Tutma Kapasitesi	36
3.4.2. Emülsiyon Özellikleri.....	37
3.4.3. Köpüklenme Özellikleri	38
3.5. TOPLAM FENOLİK-FLAVONOİD BİLEŞİK VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTE.....	40
3.5.1. Toplam Fenolik Bileşik (TFB)	40
3.5.2. Antioksidan Aktivite	41
3.5.3. Toplam Flavonoid Bileşik (TFlaB)	42
3.6. FİZİKSEL VE KİMYASAL KARAKTERİZASYON.....	43
3.6.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	43
3.6.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR).....	44
SONUÇ VE ÖNERİLER	46
Sonuç	46
Öneriler.....	47
KAYNAKÇA.....	48
ÖZ GEÇMİŞ	56



TABLÖLER

Tablo 1: Protein Modifikasyon Yöntemleri.....	7
Tablo 2: Protein Ekstraksiyonu İçin Kullanılan Bağımsız Değişkenlerin Aralık ve Seviyeleri	15
Tablo 3: Glikasyon İşlemi İçin Kullanılan Bağımsız Değişkenlerin Aralık ve Seviyeleri.....	17
Tablo 4: Kenevir Tohumu ve Yağsız Kenevir Tohumunun Kimyasal Bileşimi (Kurumadde Bazında).....	24
Tablo 5: Box-Behnken Deney Tasarımına Göre Elde Edilen Deneysel ve Tahmini Değerler (Ekstraksiyon).....	25
Tablo 6: Protein Miktarına Ait RSM Model İstatistikleri ve ANOVA Analizi (Ekstraksiyon)	26
Tablo 7: Regresyon Analizi Sonucu Elde Edilen Denklem (Ekstraksiyon)	26
Tablo 8: Tek Örneklemli t-Testi Analiz Sonuçları (Ekstraksiyon)	27
Tablo 9: Box-Behnken Deney Tasarımına Göre Elde Edilen Deneysel ve Tahmini Değerler (Glikasyon)	28
Tablo 10: Bağımlı Değişkenlere Ait RSM Model İstatistikleri ve ANOVA Analizi (Glikasyon)	29
Tablo 11: Regresyon Analizi Sonucu Elde Edilen Denklemler (Glikasyon)	31
Tablo 12: Tek Örneklemli t-Testi Analiz Sonuçları (Glikasyon)	35
Tablo 13: Örneklerin Toplam Fenolik-Flavonoid Bileşik ve Antioksidan Aktivite Değerleri	40
Tablo 14: KPI, G-KPI ve N-G-KPI Örneklerinin Toplam Fenolik-Flavonoid Bileşik ve Antioksidan Aktivite Değerlerinin Birbirleriyle Olan Korelasyonunu Gösteren Pearson Katsayıları	42



ŞEKİLLER

Şekil 1: Protein:Şeker Oranı ve Reaksiyon Sıcaklığı ile Değişim a) %DG-Glikasyon Derecesi b) %FAG- Serbest Amino Grubu Oranı	32
Şekil 2: 420 nm Dalga Boyundaki Esmerleşme Yoğunluğuna Bağımlı Değişkenlerin Etkisi a) Protein:Şeker Oranı-Reaksiyon Sıcaklığı b) Protein:Şeker Oranı-Reaksiyon Süresi c) Reaksiyon Sıcaklığı- Reaksiyon Süresi	33
Şekil 3: 294 nm Dalga Boyundaki Esmerleşme Yoğunluğuna Bağımlı Değişkenlerin Etkisi a) Protein:Şeker Oranı-Reaksiyon Sıcaklığı b) Protein:Şeker Oranı-Reaksiyon Süresi c) Reaksiyon Sıcaklığı- Reaksiyon Süresi	34
Şekil 4: Kenevir Protein İzolatlarının Su (STK) ve Yağ (YTK) Tutma Kapasiteleri	37
Şekil 5: Kenevir Protein İzolatlarının Emülsifikasyon Özellikleri (EAİ: Emülsifiye Edici Aktivite İndeksi, ESİ: Emülsiyon Stabilite İndeksi).....	38
Şekil 6: Kenevir Protein İzolatlarının Köpüklenme Özellikleri (KK: Köpüklenme Kapasitesi, KS: Köpüklenme Stabilitesi)	39
Şekil 7: KPI (A), G-KPI (B) ve N-G-KPI (C) Örneklerinin SEM Mikroagrafları (10.000x) ...	43
Şekil 8: Kenevir Tohumu Protein İzolatlarının FTIR Spektrumları (KPI: Kenevir Protein İzolatu, G-KPI: Glike Edilmiş Kenevir Protein İzolatı, N-G-KPI: Kenevir Protein İzolatu+Şeker Kompleksi)	45



KISALTMALAR

ANOVA	: Varyans Analizi
RSM	: Yanıt Yüzey Metodu
EC	: Emülsiyon Kapasitesi
ES	: Emülsiyon Stabilitesi
KPI	: Kenevir Protein İzolatı
G-KPI	: Glike Edilmiş Kenevir Protein İzolatı
N-G-KPI	: Kenevir Protein İzolatı+Şeker Kompleksi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopu
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi
ESİ	: Emülsiyon Stabilite İndeksi
EAİ	: Emülsiyon Aktivite İndeksi
YTK	: Yağ Tutma Kapasitesi
STK	: Su Tutma Kapasitesi
FAG	: Serbest Amino Grup
DG	: Aşılama Derecesi
TFB	: Toplam Fenolik Bileşik
DPPH	: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl Radikal Süpürücü Aktivite
FRAP	: Demir İndirgeyici Antioksidan Aktivite
CUPRAC	: Bakır İndirgeyici Antioksidan Aktivite
TFlaB	: Toplam Flavonoid Bileşik
KK	: Köpük Kapasitesi
KS	: Köpük Stabilitesi

SİMGELER

v/v	: hacim/hacim
w/v	: ağırlık/hacim
m	: metre
mL	: mililitre
g	: gram
mg	: miligram
r	: Pearson katsayısı
µL	: mikrolitre
nm	: nanometre



GİRİŞ

Araştırmanın Konusu ve Problemi

Son yıllarda sağlıklı beslenme bilincindeki artış ile birlikte ağırlıklı olarak hayvansal ürünlerin çevre üzerindeki olumsuz etkilerine yönelik küresel uyarılardan dolayı, bitki-bazlı ürünlere ağırlık vererek, tüketicilerin daha fazla ve alternatif protein bazlı ürünlere yönelik bir eğilim ortaya çıkmıştır (Banovic vd., 2018). Bundan dolayı, bitki-bazlı alternatif protein konsantreleri (buğday, soya, bezelye, kanola, kenevir, patates, pirinç, yulaf vb.), yüksek proteinli doğal ürünlerde veya bitki-bazlı proteinle zenginleştirilmiş gıda ürünlerindeki (pişmiş gıdalar, tahıllar, enerji içecekleri) protein içerikleri pazar büyüklüğünü de yapılandırmaktadır (Plati vd., 2021). Bunların yanı sıra son dönemlerde bir beslenme tercihi olarak vegan beslenme kültürü oldukça yaygınlaşmıştır (Fox ve Ward, 2008). Son yıllarda, bitki-bazlı protein pazarında, sürdürülebilir, etnik, dini, diyetel ve ahlaki tercihleri olan tüketicilerin, hayvansal proteinlerin tüketimine nazaran artan talepleri nedeniyle, hızlı bir büyüme görülmektedir. Bunun gibi nedenlerle kenevir tohumu, bitki-bazlı protein kaynağı olarak mükemmel bir alternatiftir. Bütün kenevir tohumları gıda olarak tüketilebilirken (örneğin, kavrulmuş tohum atıştırmalıkları), öncelikle kenevir tohumu unu, yağı ve proteini gibi diğer ürünlerin geliştirilmesi için hammadde olarak kullanılabilirler (Zajac vd., 2019).

Kenevir tohumu proteininin, mükemmel sindirilebilirliği ve esansiyel amino asitlerdeki yeterliliği nedeniyle yumurta akı ve soya fasulyesi proteinleriyle karşılaştırılabilir besin değerine sahip olduğu bildirilmiştir (Tang vd., 2006). Ticari kenevir tohumu proteinine olan talep, küresel bitki proteini pazarında giderek artmaktadır (Karabulut ve Yemiş, 2022). Talebin arkasındaki itici güç, kenevir tohumu protein izolatının yüksek kaliteli bir protein olmasıdır.

Yapılan çalışmalarda kenevir tohumu protein izolatının emülsifikasyon, köpürme, su ve yağ absorpsiyonu gibi fonksiyonel özellikleri araştırılmış ve soya proteini izolatu ile karşılaştırılmış ve kenevir tohumu protein izolatının fonksiyonel özelliklerinin soya proteini izolatından daha iyi olmadığı sonucuna varılmıştır (Galves vd., 2019; Tang vd., 2006). Kenevir tohumu protein izolatının zayıf fonksiyonel özellikleri, esas olarak düşük çözünürlüğüne bağlanmıştır. Kenevir proteinleri, yeterli esansiyel amino asitlere ve mükemmel sindirilebilirliğe sahip iyi bir protein kaynağı olarak nitelendirilir. Kenevir proteinlerinin fonksiyonel özelliklerinin farklı modifikasyon yöntemleri ile geliştirilebilmesi mümkündür (Shen vd., 2021). Maillard reaksiyonunun ilk basamağı olan glikasyon, proteinlerin özelliklerini değiştirmek için kullanılabilir. Glikasyon reaksiyonu proteinlerin fonksiyonel özelliklerini iyileştirdiğinden gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.



(Tas vd., 2021). Bu çalışmada kenevir tohumu protein izolatının işlevselliğinin glikasyon ile geliştirilerek, soya proteini izolatına alternatif ürün eldesi üzerinde durulmuştur.

Araştırmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, önemi ve teşviki artan kenevirin, farklı özelliklerini araştırmak ve özellikle gıda endüstrisinde kullanılabilirliğini sağlamak ve artırmaktır. Çalışmada yanıt yüzey metodu (RSM) ile ekstraksiyon şartları optimize edilerek kenevir tohumlarından yüksek protein içeriğine sahip kenevir protein izolatı (KPI) elde edilmiş ve ardından fonksiyonel özellikleri geliştirmek için protein izolatına glikasyon işlemi uygulanmıştır. Glikasyon işleminde de optimizasyon uygulanarak en uygun glikasyon derecesi ve esmerleşme indeksi değerlerini sağlayacak reaksiyon şartları belirlenmiştir. Bu aşamada sıcaklık, süre ve izolat:şeker (fruktoz) karışım oranı glikasyonun bağımsız değişkenleri olarak seçilmiştir. Box-Behnken tasarımı kullanılarak protein fonksiyonel özelliklerini en üst düzeye çıkaracak deneme tasarımı belirlenmiştir. Glikasyon derecelerinden düşük serbest amino grup (FAG) değeri, yüksek aşılama derecesi (DG) değeri ve yüksek esmerleşme indekslerinden A_{294} (294 nm dalgaboyunda) ve A_{420} (420 nm dalga boyunda) değerleri elde edilecek şekilde optimum koşullar belirlenmiştir. Elde edilen optimum koşullarda yapılan glikasyon işleminden sonra, glike edilmiş KPI'nın (G-KPI) fonksiyonel özellikleri (su ve yağ tutma kapasitesi, emülsifikasyon, köpürme ve biyoaktif özellikler) analiz edilmiş ve işlenmemiş KPI ile karşılaştırılmıştır. Son olarak yine optimum koşullarda elde edilen protein izolatlarının karakterizasyonu (SEM ve FTIR) incelenmiştir.

Araştırmanın Önemi ve Gerekçesi

Araştırmalar sonucunda, kenevir proteinlerinin glikasyonu ile ilgili son dönemde yayınlanan sadece tek bir çalışmaya rastlanılmıştır (Ding vd., 2023). Bu çalışmada uygulanan koşul ve kullanılan şeker türleri bizim çalışmamıza göre farklılık göstermektedir. Tez çalışmamızda ek olarak protein ekstraksiyonunun optimizasyonu çalışılmıştır. Bu kapsamda özgün nitelik taşımaktadır. Bu tez çalışması ile ilerleyen zamanlarda daha geniş bütçeli ve kapsamlı çalışmaların gerçekleştirilmesine zemin hazırlanmış ve kenevir proteinlerinin gıda sanayinde farklı alanlarda kullanımı araştırılabilecektir. Sonuç olarak ülkemizde de önemi ve kullanımı artan kenevirin değerlendirilmesi için yeni bakış açıları kazanılmış olunacaktır.

Ülkemizde kenevir ekim alanları son 10 yıllık süreç içerisinde iyice azalmış olmasına rağmen, son iki-üç yıl içerisinde piyasadan gelen talepler ve değişen devlet politikaları üzerine tekrar artış eğilimine girmiştir. Ülkemizde gün geçtikçe önemi artan kenevirin daha farklı alanlarda kullanılabilirliğini araştırmak ve kenevir proteinlerinin tekno-fonksiyonel



özelliklerini geliştirebilmek için modifikasyon teknikleri uygulamak ve böylece kenevirin kullanım alanını genişleteceği hipotezinden yola çıkarak mevcut çalışmanın yapılması planlanmıştır.

Bu çalışmayla, ülkemizde önemi ve teşviği artan kenevirin, farklı özelliklerini araştırmak ve özellikle gıda endüstrisinde kullanabilirliğini sağlamak ve artırmak hedeflenmiştir. Böylece kenevir tohumu protein izolatlarının gıda endüstrisinde emülgatör ya da stabilizatör gibi kullanılabilirliği belirlenmiş ve literatüre katkı sağlanmıştır.



BİRİNCİ BÖLÜM

1. KURAMSAL ÇERÇEVE

1.1. KENEVİR BİTKİSİ

Cannabaceae familyasının bir üyesi olan endüstriyel kenevir (*Cannabis sativa* L.) tek yıllık otsu bir bitkidir. Kenevir, tüm dünyada yetiştirilen en eski mahsullerden biri olmasına ve değerli bir besin kaynağı olmasına rağmen, içerdiği psikotropik maddeler nedeniyle ekimi sınırlandırılmıştır. Kenevir, uyuşturucu türü (marihuana) ve ilaç dışı tür (kenevir) olarak sınıflandırılabilir. Birincisi genellikle tıbbi ve rekreasyonel amaçlar için uygulanırken, ikincisi gıda ve lif endüstrileri için önemlidir (Leonard vd., 2020). Psikoaktif bileşik tetrahidrokanabinolün (THC) mevcudiyeti nedeniyle, yakın geçmişte gerçekleştirilen ekiminin kısıtlaması, aşamalı olarak sona ermektedir (Wang ve Xiong, 2019).

Türkiye Cumhuriyeti Cumhurbaşkanlığı Strateji ve Bütçe Başkanlığı tarafından yayınlanan 12. Kalkınma Planı'nda (2024-2028) kenevire yönelik “Yurt içinde geliştirilen çeşitler kullanılmak suretiyle endüstriyel amaçlı kenevir üretimi artırılacaktır” ve “Kenevir gibi doğal üründen üretilebilen ve doğada tamamıyla çözünen ürünlerin üretimine ve sektörde kullanımına yönelik mevzuat düzenlemesi yapılacaktır” maddeleri yer almaktadır. Dolayısıyla 12. Kalkınma Planı göz önüne alınarak yapılan bu tez çalışması ile kenevir proteinlerinin kimyasal, tekno-fonksiyonel ve biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi hem literatüre hem de ekonomiye katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Kenevir tohumu içeriği, insan beslenmesinde ihtiyaç duyulan miktarda ve oranda temel amino asitleri ve yağ asitleri açısından zengindir (Doğan ve Doğan, 2021). Dünya çapında hasadı yapılmakta olup diğer bitkilere göre su tüketiminin daha az olması ve ekiminin kolay olması nedeniyle ekonomiktir. Yüksek biyokütle ve enerji konsantrasyonu nedeniyle yenilenebilir enerji kaynağı olarak da bilinir. Kenevir tohumları esas olarak %30-35 yağ, %20-25 protein ve %25-30 karbonhidrattan oluşur. Ayrıca, kenevir proteininin, diğer yağlı tohum proteinlerinde yaygın olarak bulunmayan glutamik asit ve arginin açısından da bol olduğu gösterilmiştir (Kahraman vd., 2022).

Endüstriyel kenevir tohumu, yüksek miktarda kaliteli yağ, protein, karbonhidratlar, çözünmeyen lifler, vitaminler ve besleyici mineraller içermesi nedeniyle son dönemlerde akademik ve endüstriyel alanda artan bir ilgi görmektedir (Shen vd., 2020). Besleyici değer açısından bakıldığında, kenevir tohumları lif (27-36 g/100 g), yağ (25-35 g/100 g) ve protein (21-28 g/100 g) gibi besin öğelerini büyük oranda içerir. Yağ asitleri ile ilgili olarak, kenevir tohumu, toplam yağ asitlerinin yarısından fazlasını oluşturan önemli miktarlarda linoleik



içerir (Alonso-Esteban vd., 2020; Alonso-Esteban vd., 2022).

1.2. PROTEİN

Gıda proteinleri, canlıların hayatta kalabilmesi için gerekli olan temel besin öğelerinden biridir. Beslenmedeki temel amaçları gerekli amino asitleri yeterli miktarda sağlamaktır (Friedman, 1996). Besin değerinin yanı sıra gıda proteinleri, gıda sistemlerindeki hazırlama, işleme, depolama ve tüketim sırasındaki davranışlarını etkileyen benzersiz fonksiyonel özellikler sağlamakta ve gıdanın kalitesine ve duyuşal özelliklerine katkıda bulunmaktadır (Zayas, 1997). Proteinler polimerik yapısı sayesinde, içersine eklenen ürünlerin reolojik ve tekstürel özelliklerini geliştirmekte ve ürünü tüketici için daha kabul edilebilir hale getirmektedir (Gómez-Arellano vd., 2017). Proteinlerde ürün davranışını etkileyen en önemli fonksiyonel özelliklerden bir emülsifiye etme kapasitesi (EC), diğeri ise emülsiyon stabilitesi (ES)'dir. Bu özellikler, bir proses için hangi proteinin uygun olduğunun kararında başvuru olan önemli kritik parametrelerdir.

Proteinler, eklendikleri ürünler içersindeki su-yağ ara yüzü gerilimi azaltabilmekte ve bileşenlerin bir araya gelmesinin önlenmesine destek olabilir. Emülsiyon içersinde proteinin stabilize edici etki gösterebilmesi için, yağ damlasını etrafından bir zar matrisi oluşmakta ve bu şekilde birleşim engellenebilmektedir (Cano-Medina vd., 2011). EC ve ES haricinde proteinlerin fonksiyonel özellikleri hakkında bilgi veren farklı faktörlerde bulunmaktadır. Bunların başında, çözünürlük, su ve yağ tutma kapasitesi, köpüklenme kapasitesi ve stabilitesi, jelleşme, kütle yoğunluğu ve viskozite gelmektedir. Bahsi geçen bu özelliklerin etkisi kullandıkları protein izolatına ve uygulandıkları model gıdaya göre değişiklik gösterebilmektedir (Onsaard, 2012).

Gıda sistemlerinde protein işlevselliği, moleküler ağırlık, şekil, yapı, konformasyon, yük dağılımı, amino asit dizisi ve yüzey hidrofobikliği ile yakından ilişkilidir. Protein işlevselliğini değiştirmek için çeşitli fiziksel, termal, enzimatik ve kimyasal işlemler kullanılabilir (Karabulut ve Yemiş, 2022). Gıda uygulamalarında proteinler için hayati önem taşıyan bu fonksiyonel özellikler; çözünürlük, şişme, su tutma kapasitesi, köpürme özelliği, jelleşme kapasitesi, emülsifiye etme ve yağ bağlama olarak bilinmektedir (Zayas, 1997). Bu farklı özellikler hem içsel (moleküler yapı, bileşim vd.) hem de dışsal (sıcaklık, pH, kimyasallar vb.) faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Bu faktörler değiştirildiğinde (modifiye edildiğinde), gıda proteinlerinin fonksiyonel özellikleri kolaylıkla değiştirilebilir (Damodaran, 2008; Liu vd., 2012). Proteinlerin fonksiyonel özelliklerinden çözünürlük, şişme, jelleşme kapasitesi ve emülsifiye etme yeteneğinin iyileştirilmesi, hem gıda bilimi alanında çalışan araştırmacılar hem de gıda endüstrisi için en büyük istek ve hedeflerinden biridir.



Proteinlerin fonksiyonel özelliklerini iyileştirmek ya da geliştirmek için uygulanan bazı yöntemler: Hidroliz, asetilasyon, asitleştirme, esterleştirmedir. Bu yöntemler kimyasal, fiziksel ve biyolojik olabilmektedir. Bunların içerisinde kimyasal yöntemler, çoğunlukla toksik bileşenler içerdiğinden çok sık kullanılmamaktadır. Fakat bunlar arasında glikasyon, reaksiyon sırasında herhangi bir kimyasal katalizör kullanmadan proteinlerin indirgeyici şekerlerle konjugasyonu ile uygulanabilmekte olup protein modifikasyonu açısından son 15 yılda popülerlik kazanmıştır (Namli vd., 2021). Modifikasyon yöntemleri ile ilgili daha detaylı bilgiler bölüm 1.3.'de sunulmuştur.

1.3. MODİFİKASYON YÖNTEMLERİ

“Protein modifikasyonu” terimi, bir proteinin moleküler yapısını veya birkaç kimyasal grubunu, tekno-işlevsellik ve biyoaktivite iyileştirmeleri amacıyla özel yöntemlerle değiştirme sürecini ifade etmektedir. Bitki bazlı proteinlerin modifikasyonu, fizikokimyasal özelliklerini değiştirerek ve sınırlamalarını ele alarak gıda sistemleri için elverişli hale getirme fırsatı sağlamaktadır. Modifikasyon yöntemleri, özellikle gıda ve farmasötik uygulamalar için dikkatli bir şekilde seçilmelidir çünkü bu yöntemlerin, bitki proteinlerinin besin değeri, fonksiyonel ve organoleptik özellikleri üzerinde gözle görülür bazı etkileri olabilir. Gıda sektörlerinde uygulamalarını genişletmek için fiziksel, kimyasal, biyolojik gibi modifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır (Nasrabadi vd., 2021). Protein modifikasyon yöntemleri Tablo 1’de sunulmuştur.



Tablo 1: Protein Modifikasyon Yöntemleri

Fiziksel Yöntemler	➤ Isıtma
	➤ Gama Işınlama
	➤ Elektron Işını
	➤ Morötesi Radyasyon
	➤ Vurgulu Elektrik Aan
	➤ Yüksek Basınç
	➤ Sonikasyon
	➤ Ekstrüzyon
	➤ Ultrafiltrasyon
	➤ Öğütme
Kimyasal Yöntemler	➤ Soğuk Atmosferik Plazma
	➤ Glikasyon
	➤ Fosforilasyon
	➤ Asilasyon
	➤ Deamidasyon
	➤ Katyonlaşma
Biyolojik Yöntemler	➤ pH Değiştirme
	➤ Enzimatik
	➤ Fermantasyon

Proteinlerin işlevselliğini artırmaya yönelik fiziksel yöntemler, kimyasallara veya enzimlere dayanmayan basit yaklaşımlardır. İşleme sırasında hiçbir kimyasal kullanılmadığından, bu protein modifikasyon yöntemleri, olası kimyasal kalıntıların zararlı sonuçlarından koruduğundan dolayı son dönemlerde çok ilgi görmektedir. En sık uygulanan fiziksel yöntem ısıtma olmakla birlikte farklı ısıtma teknikleri bulunmaktadır. Bunlar, geleneksel ısıtma, ohmik ısıtma, mikrodalga ısıtma, radyofrekans ısıtma, kızılötesi ısıtmadır (Nasrabadi vd., 2021).

Gıda proteinlerinin kimyasal yöntemlerle modifikasyonu; etkinliği, düşük maliyeti ve kullanım kolaylığı nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Proteinlerin kimyasal modifikasyonu, yeni fonksiyonel parçaların eklenmesi veya bileşenlerin protein yapısından çıkarılmasıyla sağlanabilir. En sık kullanılan kimyasal yöntemlerden biri glikasyondur. Glikosilasyon olarak da adlandırılan bu reaksiyon, güvenli olduğu ve genellikle başka kimyasallar gerektirmediği için protein işlevselliklerini iyileştirmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Doost vd., 2018).



Enzimatik ve fermentasyon süreçlerine dayanan biyolojik modifikasyon yöntemleri, çevre dostu olduğu ve toksik yan ürünler üretmeden daha az enerji tükettiği için başka bir popüler modifikasyon tekniğidir. Protein işlevselliğinin modülasyonuna ek olarak, bu yaklaşımlar, antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerin yanı sıra sindirilebilirlik, biyoyararlanım dahil olmak üzere beslenme kalitelerini iyileştirme yeteneğine sahiptir (Nasrabadi vd., 2021).

Kenevir tohumu protein izolatının modifikasyonu ile ilgili literatür bilgisi çok azdır (Karabulut ve Yemiş, 2022; Raikos vd., 2014; Wang vd., 2018a). Karabulut ve Yemiş (2022) yaptıkları çalışmada kenevir tohumu protein izolatını yüksek yoğunluklu ultrason (HIUS) işlemi ile modifiye ederek protein izolatının işlevselliğini ve yaygınlığını artırabileceğini göstermiştir. Wang vd. (2018a), kenevir tohumu protein yapısını pH değişikliği ve ısı işlemi ile birleştirerek değiştirmiştir. Değişen sıcaklıklarda bu işlemin protein çözünürlüğünü %97 gibi çok yüksek değerlere çıkardığını bildirmişlerdir. Ancak bu işlem, lizinoalanin olarak bilinen toksik bir bileşiğin oluşmasıyla sonuçlanmış ve bazı amino asitlerin miktarı 80 °C'nin üzerinde düşüşler göstermiştir. Böylece, kenevir tohumu proteininin fonksiyonel özelliklerini maksimum verimlilikte geliştirmek için yeni tekniklere ihtiyaç olduğu sonucu çıkarılmaktadır ve yapılan tez ile literatüre bu anlamda katkı sağlandığı düşünülmektedir.

1.3.1. Glikasyon

Glikasyon, proteinlerin indirgen şekerleri ve serbest amino grupları arasında meydana gelen enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarının (Maillard reaksiyonu) ilk adımı olarak tanımlanmaktadır. Glikasyon Maillard reaksiyonları yoluyla kimyasal olarak elde edilebileceği gibi transglutaminaz veya lakkaz gibi çapraz bağlayıcı enzimlerle de elde edilebilir. Kimyasal glikasyon, bir protein, peptit veya amino asidin serbest amin grubu ile indirgeyici bir şekerin karbonil grubu arasında kovalent konjugasyon yoluyla, yaş ısıtma, kuru ısıtma ve moleküler kalabalıklaştırma dahil olmak üzere farklı yöntemlerle elde edilen kimyasal reaktif içermeyen, güvenli ve hafif bir süreçte su varlığında kontrollü ısıtma yoluyla gerçekleşmektedir (Nasrabadi vd., 2021).

Proteinlerin glikasyonu sırasında, glikasyona uğramış proteinlerin verimini, kalitesini ve tekno-fonksiyonelliğini etkileyebilmek ve renk ve kötü tat oluşumunu en aza indirebilmek için reaksiyonların sıcaklığı, zamanı, ortamı ve konsantrasyonunun yanı sıra pH ve su aktivitesi (a_w) de kontrol edilebilmelidir (Oliver vd., 2006; Kutzli vd., 2021). Artan sıcaklıklar ve daha uzun işlem süreleri, indirgen şeker ile amino grupları arasındaki reaktivite oranının artmasına neden olmaktadır (De Oliveira vd., 2016). Sıcaklık aynı zamanda reaktanların konformasyonunu ve dolayısıyla proteinlerin ve karbonhidratların reaktif grupla



erişilebilirliği de etkilemektedir. Isı kaynaklı konformasyonel değişiklikler, indirgeyici şeker moleküllerinin reaktif açık zincir formunun fazla olması nedeniyle daha yüksek bir reaktiviteye veya proteinlerin denatürasyonu ve agregasyonu nedeniyle amino gruplarının glikasyon reaksiyonu için daha az erişilebilir olmasına neden olarak sınırlı reaktiviteye yol açabilir (Van Boekel, 2001; Mulcahy vd., 2018; O'Mahony vd., 2019). Ek olarak yüksek pH değerlerinde, şekerin açık zincir formu ve amino grubunun protonlanmamış formu, reaktif formlar olarak Maillard reaksiyonunu desteklemektedir. pH daha düşük olduğunda ise daha fazla protonlanmış amino grubu dengede olmakta ve bu nedenle şeker molekülleri ile daha az reaktif olmaktadır. Bu denge ayrıca amino grubunun pKa değerine de bağlıdır (O'Mahony vd., 2019).

Wang vd. (2018b), soya proteini izolatının ksiloz veya fruktoz ile glikasyonunun, çözünürlük üzerindeki olumlu etkisine rağmen emülsifiye edici aktivitesi üzerindeki azaltıcı etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Bitki bazlı proteinlerin diğer işlevsel özelliklerinin de farklı sakkaritlerle glikasyon sonrasında iyileştirildiği rapor edilmiştir. Soya proteini izolatının köpürme özelliklerinin yanı sıra emülsifiye edici özellikleri, glikoz ile ıslak ısıtma glikasyonundan sonra geliştiği Li vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada da belirlenmiştir. Başka bir çalışmada Wen vd. (2020), soya proteini izolatu için ultrasonik destekli Maillard reaksiyonu yoluyla lentinan ile konjugasyondan sonra çözünürlük, emülsifiye etme yeteneği ve termal stabilite ile birlikte gelişmiş köpürme yeteneğinin de gözlendiği rapor edilmiştir.

Glikasyon uygulamasında proteinlerin fonksiyonel özelliklerini iyileşebildiği gibi ayrıca son ürün kalitesi (özellikle görünümünü ve tadını) de etkilediğinden gıda endüstrisinde sıklıkla tercih edilmektedir (Tas vd., 2021). Kimyasal yöntemlerden biri olan glikasyon, diğer tekniklere nazaran daha ılımlı koşullar altında gerçekleşmekte olup farklı bir kimyasal madde gerektirmemektedir (Liu vd., 2012; Tas vd., 2021). Glikasyon, gıda protein çözünürlüğünü önemli derecede iyileştirmekte (Shepherd vd., 2000), ısı stabilitesini arttırmakta (Sato vd., 2005), emülsifiye edici özellikleri arttırmakta (Diftis ve Kiosseoglou, 2004), köpürme özelliklerini iyileştirmekte (Achouri vd., 2005), antioksidan aktiviteyi arttırmakta (Lertittikul vd., 2007), antimikrobiyal veya bakterisidal aktiviteye olumlu etki göstermekte (Song vd., 2002) ve tekstürel özellikleri de iyileştirmektedir (Gerrard vd., 2003).

1.4. OPTİMİZASYON

Optimizasyon, bir sistem, süreç veya üründen maksimum faydayı elde etmek ve olası en iyi sonucu alabilmek adına uygulanacağı koşulları keşfetmek için performansının iyileştirilmesini ifade eder. Optimizasyonda çok değişkenli teknikler arasında en çok kullanılan yöntem yanıt yüzey metodolojisi (RSM)'dir. Yanıt yüzey metodolojisi, istatistiksel öngörüler yapmak amacıyla, bir veri setinin davranışını tanımlaması gereken, deneysel verileri



polinom denklemi ile destekleyen matematiksel ve istatistiksel teknikleri kapsamaktadır. Bir ya da birden fazla sonucun hangi değişkenlerden etkilendiğini saptamak istendiği durumlarda iyi bir şekilde uygulanabilmektedir. RSM ile amaç, en iyi süreç performansını sağlayabilmek için bu değişkenlerin seviyelerini aynı anda optimize etmektir (Bezerra vd., 2008). RSM, deneysel ve teorik yanıtları analiz etmek ve optimize etmek için çok kullanışlı olup doğru deney yöntemi sayesinde hem deneysel hem de teorik sonuçlarda yakın yaklaşımlar sağlamaktadır. Bilgisayar tabanlı birçok modelleme ve optimizasyon tekniği geliştirilmesine rağmen, RSM vazgeçilmez bir yöntemdir ve Bilim, Mühendislik ve Teknoloji alanında modelleme ve optimizasyon için kullanılmaktadır (Lamidi vd., 2022).

RSM'i uygulamadan önce, çalışılan deneysel bölgede hangi deneylerin yapılması gerektiğini tanımlayacak bir deneysel tasarımın seçilmesi gerekmektedir. Bu amaca yönelik bazı deney matrisleri bulunmaktadır. Doğrusal fonksiyonlarla tanımlanamayan verilere bir yanıt fonksiyonu uyarlayabilmek için, üç seviyeli faktöriyel, Box-Behnken, merkezi kompozit ve Doehlert gibi ikinci dereceden yanıt yüzeyleri için deney tasarımları kullanılmalıdır. Box-Behnken, matematiksel modelin birinci ve ikinci dereceden katsayılarının verimli bir şekilde tahmin edilmesini sağlayan üç seviyeli faktöriyel düzenlemeden noktaların nasıl seçileceğini öneren bir deney tasarımıdır ve sıklıkla tercih edilmektedir (Box ve Behnken, 1960; Hanrahan ve Lu, 2006; Bezerra vd., 2008).

1.5. KONU İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR

Kenevir tohumu proteinleri ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde genel olarak onların fonksiyonel özellikleri üzerinde durulduğu görülmüştür. Aluko (2017) kenevir tohumu proteinin yüksek düzeyde arginin ve kükürt içermesinden dolayı yüksek besin değerleri sağladığını bildirmiştir. Ek olarak, fonksiyonel özellikleri değerlendirildiğinde kenevir proteinlerinin, süt proteini bazlı emülsiyonlara benzer yağ damlacık boyutlarına sahip yüksek kaliteli emülsiyonlar oluşturduğu görülmüştür. Başka bir çalışmada, Liu vd. (2023) farklı tür kenevirlerden elde edilen protein izolatlarının bileşimi ve fonksiyonel özelliklerini inceledikleri bir çalışmada, protein çözünürlüğünü ve işlevselliğini etkileyen edestin, vicilin ve albumin proteinlerinin yüksek miktarda bulunduğunu saptamışlardır. Ayrıca türler arasında daha yüksek miktarda vicilin ve albumin ihtiva eden örneklerin köpük kapasitesinin de yüksek olduğunu görmüşlerdir. Fang vd. (2023a) tarafından yapılan bir çalışmada ters misel (RM) ekstraksiyon yöntemi kullanılarak kenevir protein izolatu elde edilmiştir. RM ekstraksiyon sisteminde hem yağı alınmış (D-HF) hem de yağı alınmamış (ND-HF) kenevir unundan kenevir protein izolatu çıkarılmıştır. ND-HF'den ziyade D-HF'den (%95.20) ekstrakte edilen izolatta yüksek protein saflığı elde edilmiş, yağdan arındırma açısından her iki izolatında, çözünürlük, termal stabili-



emülsifiye etme ve köpüklenme gibi fonksiyonel özellikler açısından büyük bir benzerliğe sahip oldukları görülmüştür. Ayrıca D-HF'den ekstrakte edilen izolat, jel oluşturmak için daha az konsantrasyona ihtiyaç duymuştur.

Kenevir proteininin biyoyararlanım ve biyosindirilebilirlik özelliklerine bakıldığında ise, Wang vd. (2018a) yaptıkları çalışmada kenevir tohumu protein izolatı ve soya protein izolatının in vitro sindirilebilirliğini, SDS-PAGE ve nitrojen salım analizlerini azaltarak sıralı pepsin ve tripsin sindirim modeli kullanılarak değerlendirmişlerdir. Pepsin sindirimi sırasında, edestin, soya glisinin sindirimine benzer şekilde 1 dakika içinde hızla bozunduğunu ve molekül ağırlıklarının 10 kDa'dan az olan oligo-peptidleri serbest bıraktığını, Kenevir tohumu protein izolatı yalnızca pepsin tarafından sindirildiğinde soya protein izolatına benzer bir sindirilebilirlik gösterse de, kenevir tohumu protein izolatının toplam sindirilebilirliği (%88 ila %91), soya protein izolatından (%71) belirgin şekilde daha yüksek olduğunu ve bu durumun kenevir tohumu protein izolatının insan tüketimi için protein beslenme kaynağı olarak verimli olduğunu bildirmişlerdir. House vd. (2010) kenevirin farklı kısımlarından elde edilen proteinlerin sindirilebilirliği üzerine çalışmışlardır. Protein sindirilebilirliği yüzdesinin, tam kenevir tohumu için %84.1–86.2, kenevir tohumu küspesi için %90.8–97.5 ve kabuğu çıkarılmış kenevir tohumu için %83.5–92.1 aralığında olduğunda saptamışlardır. Lisin aminoasiti proteinin sindirilebilirliği sınırlayıcı etki göstermiştir. Dolayısı ile üründe kabuk fraksiyonunun çıkarılması ile protein sindirilebilirliğinin arttığı vurgulanmıştır. Ayrıca, Mamone vd. (2019) kenevir unu ve kenevir tohumu protein izolatının yüksek derecede sindirilebilirliğe sahip olduğuna dair kanıtlar göstermişlerdir.

Son dönemlerde birçok araştırmacı polifenoller ve proteinler arasındaki etkileşimi incelemeye başlamıştır. Proteinler ve polifenoller hem kovalent olmayan hem de kovalent bağlar yoluyla etkileşime girebilir. Polifenoller ve proteinler üzerine yapılan araştırmalar esas olarak kovalent olmayan etkileşimlere odaklanmıştır, ancak bu etkileşimler geri dönüşümlü ve kararsızdır. Bu nedenle Pang vd. (2021), polifenoller ve proteinler arasındaki kovalent etkileşimleri araştırmışlardır. Bu etkileşimleri araştırmak için kenevir protein izolatı (HPI) ve (-)-epigallokateşin galatın'nin (EGCG) oluşturduğu kovalent kompleksler kullanılmıştır. HPI-EGCG kompleksinin yapısını araştırmak için Zeta potansiyel değerleri, CD spektrumları ve üç boyutlu floresans spektrumlarını incelemişlerdir. Kovalent kompleksin fonksiyonel özellikleri, reaktif grupların, polifenol içeriğinin, parçacıkların boyutunun ve diğer ilgili göstergelerin analiz edilmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmanın sonucu, HPI'nın farklı konsantrasyonlarda bir polifenol ile birleştirilmesiyle yapısında değişikliklere ve gelişmiş fonksiyonel özelliklere



neden olduğu saptanmıştır. HPI, 1 mM EGCG ile birleştirildikten sonra kovalent kompleksin emülsifikasyonu ve çözünürlüğünün iyileştiği de rapor edilmiştir.

Kenevir tohumu protein izolatının modifikasyonu ile ilgili çalışmalar incelendiğinde sınırlı sayıda araştırma olduğu görülmüştür. Wang vd. (2018a), kenevir tohumu protein yapısını pH değişikliği ve ısı işlem ile birleştirerek değiştirmiştir. Değişen sıcaklıklarda bu işlemin protein çözünürlüğünü %97 gibi çok yüksek değerlere çıkardığını bildirmişlerdir. Ancak bu işlem, lizinoalanin olarak bilinen toksik bir bileşiğin oluşmasıyla sonuçlanmış ve bazı amino asitlerin miktarı 80 °C'nin üzerinde düşüşler göstermiştir. Karabulut ve Yemiş (2022) yaptıkları çalışmada kenevir tohumu protein izolatını yüksek yoğunluklu ultrason (HIUS) işlemi ile modifiye ederek protein izolatının işlevselliğini ve yaygınlığını artırabileceğini göstermiştir. Diğer bir çalışmada Kahraman vd. (2022) kenevir tohumu protein izolatını pH değişimi ve ultrasonikasyon yöntemleri ile muamele ederek fonksiyonel özelliklerini geliştirmeyi hedeflemiştir. Sonuçta modifikasyon yöntemlerinin tek tek uygulanması yerine, kombine bir şekilde uygulanmasının sinejetik etkiye neden olduğunu belirtmişlerdir. Örneklerin çözünürlüğü, kombine işlemlerle 1442.75 µg/mL'den 1718.20 µg/mL'ye kadar artmış olup önemli ölçüde iyileşme görülmüştür. Ek olarak, uygulanan işlemlerin serbest sülfhidril içeriği miktarını ve proteinin çözünürlüğünü (yaklaşık %20 oranında) arttırdığını dolayısı ile uygulanan bu kombine yöntemin protein modifikasyonu için etkili bir alternatif olabileceğini rapor etmişlerdir. Yu vd. (2023) de bir modifikasyon yöntemi olarak ultrasonikasyonu uygulamışlardır ve bu yöntemin kenevir tohumu protein izolatının yapı ve fonksiyonel özelliklerini geliştirdiğini belirtmişlerdir.

Glikasyon yönteminin uygulandığı çalışmalar incelendiğinde, gıda proteinlerinin glikasyon ile modifiye edilmesinden sonra çözünürlük, emülsifikasyon ve antioksidan aktivitenin arttığı gösterilmiştir (Liu vd., 2012; Tas vd., 2021). Zhao vd. (2021) glikasyon işlemini soya proteinine uygulamışlar ve özelliklerini incelenmişlerdir. Çalışma sonucunda, glikasyon reaksiyonu, soya proteini izolatlarının izoelektrik noktasını, yüzey hidrofobikliğini, serbest sülfhidril gruplarını ve parçacık boyutunu arttırmıştır. Bu durum izolatın reolojik özelliklerini ve mikro yapısını geliştirerek jel mukavemetini ve su tutma kapasitesini artırmıştır. Ertuğrul vd. (2021) tarafından yapılan başka bir çalışmada, protein çözünürlüğünü ve hidrasyon davranışını, serbest amino gruplarını, kalan indirgeyici şekerleri ve glikasyon ürünlerini belirleyerek bezelye protein konsantresi (PPC) üzerinde indirgen şekerler (glukoz, fruktoz ve alüloz) mikrodalga ısıtması ile glikasyonun kapsamını ve etkisini araştırmayı amaçlamışlardır. Çözünürlük bezelye proteinlerinin en büyük zayıflığı olduğundan, çözünürlüğün artırılması bu çalışmanın önceliği olmuştur ve Lowry yöntemi, MD ısıtması ile glikasyonun kontrole kıyasla



hemen hemen tüm örneklerin çözünürlüğünü arttırdığını kanıtlanmıştır. Geleneksel ısıtma yoluyla glikasyon işleminin de çözünürlüğü arttığı görülmüş ancak MD ısıtma, daha yüksek reaksiyon hızları ve proteinin daha kısa sürede çözünürlüğü nedeniyle daha etkili olmuştur. Ayrıca alkali ortam PPC çözünürlüğünü arttırmıştır. Bunun dışında, MW ısıtmayla yapılan glikasyon, geleneksel ısıtmayla karşılaştırıldığında suyun hidrasyonunu arttırdığı saptanmıştır. He vd. (2021) glikasyon ve asilasyonun soya proteini izolatının (SPI) yapısal ve fizikokimyasal özellikleri üzerine etkileri araştırmışlardır. Çalışmada dekstran glikasyonu ve süksinik anhidrit asilasyonunun farklı sıralı işlemleri uygulanmıştır. Bu işlemlerin SPI'nin çözünürlüğünü, emülsifikasyonunu ve köpürme özelliklerini önemli ölçüde geliştirdiği rapor edilmiştir. Bu vd. (2022) yaptığı çalışmada glikasyon reaksiyon koşullarının, maltoz (M) ile konjuge soya proteini izolatının (SPI) yapısal özellikleri ve fonksiyonel özellikleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar, 60 °C'lik reaksiyon sıcaklığı ve 1:2 protein:maltoz kütle oranının en yüksek aşılama derecesini verdiğini göstermiştir. SPI-M konjugatlarının çözünürlüğü ve emülsifikasyonu, glikasyondan sonra önemli ölçüde iyileşmiştir. FTIR ve floresans spektroskopisi, şeker zincirlerinin eklenmesinin soya proteininin uzaysal yapısında değişikliklere yol açtığını göstermiştir. Glikasyonun ayrıca soya proteininin in vitro pankreas sindirilebilirliği üzerinde de olumlu bir etkisi olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada Feng vd. (2023) iki farklı yöntemle (kuru ısıtma ve yaş ısıtma) uygulanan glikasyon işleminin soya fasulyesi proteinin fonksiyonel özelliklerine etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, ıslak ısıtma ile yapılan glikasyon işlemi, kuru ısıtmayla yapılabildiğine göre daha yüksek viskoelastisite ve tüm yüksek elektronegatiflik gösterdiği saptanmıştır. Bu bulgular sayesinde, glikasyonla modifiye edilmiş protein-polisakarit ikili sistemlerinin gıda emülsiyonu uygulaması için yararlı olduğu rapor edilmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar monosakkaritler ile uygulanan glikasyonun, susam proteinlerinin alerjenitesini etkili bir şekilde azalttığı ve bu alerjenite azalmasının üründeki yapısal değişikliklerden kaynaklı olabileceği saptanmıştır. Jiang vd. (2023) yaptığı bir çalışmada, glikasyonun susam proteinlerinin alerjenitesi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Susam proteinlerinin aromatik amino asitleri etrafındaki ikincil ve üçüncül yapının glikasyon modifikasyonundan sonra belirgin şekilde değiştiği görülmüş, bu durumun da susam proteinlerinin uzaysal yapısının glikasyon modifikasyonundan etkilendiğini göstermiştir. Sakkarozla glikozile edilmiş susam proteinleri hariç, glikozile edilmiş susam proteinlerinin yüzey hidrofobikliğinin de azaldığını bulunmuştur. Bu çalışma monosakkaritler ile glikasyonun susam proteinlerinin alerjenitesini disakkaritlerden daha etkili bir şekilde azalttığını göstermiştir. Bunun nedeninin muhtemelen monosakkaritlerin susam proteinlerine daha yüksek erişilebilirlik nedeniyle daha kolay ve sıkı bağlanması ve bu bağlanmanın konformasyonel epitoplara büyük zarar vermesi olduğu saptanmıştır.



Bu çalışmalardan farklı olarak, mikrodalga kaynaklı glikasyonun yumurta akı proteininin fizikokimyasal özellikleri ve pişirme performansı üzerine etkisi araştırılmıştır. Maltodekstrin (MD) varlığında mikrodalga işlemine tabi tutulan endüstriyel yumurta beyazı tozunun (YBT) fizikokimyasal özelliklerine ve pişirme performansına odaklanılmıştır. Glikasyonu ve yapı dönüşümünü doğrulamak için proteinin çözünürlüğü, floresan özellikleri, moleküler ağırlığı ve ikincil yapısı incelenmiş olup, modifiye YBT'nin pişirme performansı köpük özellikleri, spesifik hacim, su içeriği, mikro yapısı kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Glike edilmiş protein, hidrofilik MD zincirlerinin kovalent bağlanmasının bir sonucu olarak, mikrodalga ile işlem görmüş YBT'ye kıyasla artan çözünürlük ve moleküler ağırlık ile karakterize edilmiştir. Hidrofobik amino zincirlerinin açığa çıkışı ve hidroksil grubunun artan yüzey bağlanması, protein molekülleri arasındaki hidrofobik ve hidrojen bağı etkileşiminin artırılmasına yardımcı olmuştur. Yukarıdaki değişikliklerin tümü, glikolize YBT'nin köpürme yeteneği ve stabilitesindeki iyileşmeye katkıda bulunmuştur (Chang vd., 2021).

Son olarak, Ding vd. (2023) çeşitli koşullar altında kenevir proteini ve pullulan konjugatlarını hazırlamak için glikosilasyon reaksiyonunu benimsemiş ve ardından bu konjugatların yapısal ve fonksiyonel özelliklerini değerlendirmişlerdir. Biyolojik olarak parçalanabilen, suda çözünebilen bir polisakarit olan pullulan, yüksek çözünürlüğü, düşük viskozitesi, toksik olmaması, koku ve tat nötrlüğü nedeniyle gıdalarda yaygın olarak kabul görmüştür. Bu hedefe ulaşmak için farklı substrat oranlarına, sıcaklıklara ve sürelerle sahip glikosile edilmiş kenevir protein izolatları (KPI) üretmişlerdir. Kültür koşullarının KPI-pullulan konjugatlarının aşılama derecesi, esmerleşme kuvveti, protein yapısı ve fonksiyonel özellikleri üzerindeki etkileri analiz edilmiştir. Sonuçlar, KPI ve KPI-pullulan arasında elde edilen yapılar ve fizyokimyasal özellikler açısından önemli farklılıklar göstermektedir. Tüm KPI-pullulan konjugatlarının farklı glikosilasyon reaksiyonları ile başarılı bir şekilde konjuge edilmesine rağmen, farklı reaktivite sergiledikleri görülmüştür. SDS-PAGE ve spektroskopi sonuçları, KPI-pullulanın daha yüksek molekül ağırlıklı bir konjugat oluşturduktan sonra ikincil ve üçüncül proteinlerin yapısını değiştirdiğini göstermiştir. Sonuç olarak, bu bulgular sadece karmaşık gıdalarda bir bileşen olarak kenevir proteininin geliştirilmesine rehberlik etmekle kalmayıp, aynı zamanda polisakkaritlerin glikozilasyonunun nasıl kontrol edileceği ile ilgili bir bilgi sunmaktadır.



İKİNCİ BÖLÜM

2. YÖNTEM

2.1. MATERYALLER

Araştırmada kullanılan kenevir tohumları yerel üreticiden doğrudan temin edilmiştir. Temin edilen kenevir tohumları, nem geçirmeyen plastik torbalar içinde analiz süresine kadar +4 °C’de buzdolabında depolanmıştır. Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Merck, Sigma-Aldrich ve Isolab firmalarından temin edilmiştir.

2.2. KENEVİR TOHUMLARININ ANALİZLERE HAZIRLANMASI VE KİMYASAL BİLEŞİMLERİN BELİRLENMESİ

Kenevir tohumlarından (KT), proteinlerini eldesi için öncelikle kenevir tohumlarından yağ uzaklaştırılmış ve ardından kurutulmuştur. Bu işlem Yüzer (2021) tarafından kullanılan eter ekstraksiyon yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır. Kenevir tohumları bir öğütücüden (AR1133, Arzum, Türkiye) geçirilmiş ve dietil eter (1:4 w/v, tohum/çözücü) ile 4 saat süresince 150-200 rpm devir hızında oda sıcaklığında sabit karıştırılarak yağı giderilmiştir. Örnek için üç kez daha yağdan arındırma işlemi (aynı tohum/çözücü oranı kullanılarak) gerçekleştirilmiş ve daha sonra yağ alınmış kenevir tohumları filtre kağıdı ile süzölmüş olup eter fazı 40 °C etüvde bir gece boyunca bekletilerek uzaklaştırılmıştır. Kurutulduktan sonra yağsız kenevir tohumu (YKT), protein ekstraksiyonu için hazır hale gelmiştir. KT ve YKT örneklerinin kimyasal bileşimleri (nem, ham protein (Nx6.25), kül ve yağ içeriği) AOAC (2000) tarafından açıklanan yöntemlere göre belirlenmiştir.

2.3. PROTEİN EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU

Maksimum protein veriminin sağlanması amacıyla, üç bağımsız değişken (tuz konsantrasyonu, pH ve ekstraksiyon sıcaklığı), Box-Behnken tasarımında kullanılmak üzere seçilmiştir. Bağımsız değişkenler için seçilen değerler, daha önce yapılan literatür çalışmalarına göre belirlenmiş (Karabulut ve Yemiş, 2022; Tang vd., 2006) ve bunlar Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2: Protein Ekstraksiyonu için Kullanılan Bağımsız Değişkenlerin Aralık ve Seviyeleri

Değişkenler	Kod	Aralık ve seviyeler		
		-1	0	+1
Tuz konsantrasyonu (M)	X ₁	0.0	0.5	1.0
pH	X ₂	8	10	12
Ekstraksiyon sıcaklığı (°C)	X ₃	25	37	49

Veriler, eşitlik 1’de gösterildiği gibi ikinci dereceden bir polinom modeli kullanılarak analiz edilmiştir. Burada; Y tahmini bağımlı değişkendir, β_0 sabittir ve $\beta_1, \beta_2, \beta_3; \beta_{12}, \beta_{13},$



ve β_{11} , β_{22} , β_{33} sırasıyla model tarafından belirlenen doğrusal, interaksiyon ve ikinci dereceden katsayılarıdır. X_1 , X_2 ve X_3 bağımsız değişkenlerdir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_{12} + \beta_{22} X_{22} + \beta_{33} X_{32} \quad (1)$$

MINITAB® 21.0 istatistik programı (Minitab, State College, PA) kullanılarak deneysel verileri optimize etmek için yüzey yanıt yöntemi (RSM) kullanılmıştır. Optimizasyon için protein miktarı maksimize edilerek en uygun (optimum) tuz konsantrasyonu, pH ve sıcaklık koşulları belirlenmiştir. Tahmini ve deneysel değerler arasında istatistiksel fark tek örneklemli t-testi (MINITAB® 21.0 programı ile) ile belirlenmiştir.

2.4. PROTEİN EKSTRAKSİYONU

Tablo 2’de verilen deney tasarımına uygun olarak protein ekstraksiyonu, Tang vd. (2006) ve Yüzer (2021) yöntemleri modifiye edilerek yapılmıştır. Stok YKT süspansiyonları (%5 w/v) saf su ile farklı tuz konsantrasyonlarında (0, 0.5 ve 1.0 M) hazırlanmış ve 2 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde 300 rpm hızda çalkalanmıştır. Elde edilen süspansiyonlarından yaklaşık 10’ar mL test tüplerine alınmış ve pH’ları, 1N HCl veya 1N NaOH kullanılarak 8, 10 ve 12 olacak şekilde ayarlanmıştır. Dispersiyonlar 2 saat boyunca 25, 37 ve 49 °C’lerde devamlı karıştırılarak pH’ları belirlenen değerde tutulmuştur. Sonrasında örnekler 30 dakika boyunca sonikasyon uygulanmış olup sonikasyon sırasında banyo sıcaklığı termometre ile sürekli kontrol edilerek, gerekli durumlarda buz takviyesi ile sıcaklık ± 2 değişkenlikte sabit tutulmuştur. Sonikasyon sonunda örnekler 2060xg’de 30 dakika boyunca santrifüj (NF 1200R, Nuve, Türkiye) edilmiştir. Süpernatantların protein miktarı, Bradford (1976) yöntemi ile belirlenmiştir.

2.5. BELİRLENEN OPTİMUM ŞARTLARLA PROTEİN İZOLATI ÜRETİMİ

Optimizasyon sonucu saptanan tuz konsantrasyonu, pH ve ekstraksiyon sıcaklığı değerleri kullanılarak ve Tang vd. (2006) ile Yüzer (2021) metotları modifiye edilerek izolat üretimi gerçekleştirilmiştir. Bunun için ilk olarak 1:20 (w/v) oranında olacak şekilde saf su ile YKT süspansiyonu hazırlanmıştır. Optimum sıcaklık değerinde 2 saat süreyle 300 rpm’de karıştırılmış ve filtre edilerek, çözünen proteinleri ihtiva eden süpernatant alınmıştır. Verimi arttırmak adına kalan katı kısım aynı şartlarda tekrar işleme tabi tutulmuş ve süpernatant filtre edilerek tekrar alınmıştır. Daha sonra örneklerin pH değerleri izoelektrik noktaya (pH 5, 1N HCl veya 1N NaOH kullanılarak) getirilerek, proteinlerin çökmesi için 18 saat süre ile +4 °C’de bekletilmiştir. Çöken proteinler 3000xg’de 4 °C’de 30 dakika santrifüjleme yapıldıktan sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Elde edilen çöktürleri yıkamak için saf su kullanılmış ve daha sonra nötrlemek amacıyla pH 7’ye ayarlanmıştır. Elde edilen izolatlar liyofilize (Scan



Coolsafe 110-4 Pro, Danimarka) edilmiş olup kenevir tohumu protein izolatı (KPI) üretimi gerçekleşmiş ve analizler yapıncaya kadar 4 °C’de muhafaza edilmiştir.

2.6. GLİKASYON KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

Glikasyon işlemi için ikinci bir deney tasarımı belirlenmiştir. Bu deney tasarımı için bağımsız değişken olarak, protein izolatı:şeker oranı (X_1 ; 2:1, 1:1 ve 1:2), reaksiyon sıcaklığı (X_2 ; 60, 45, 90 °C) ve reaksiyon süresi (X_3 ; 30, 60, 90 dakika) seçilmiş ve 3 faktörlü bir Box-Behnken tasarımı uygulanmıştır. Kullanılan deney tasarımındaki bağımsız değişkenlerin aralıkları ve seviyeleri Tablo 3’de verilmiştir. Bu değerler de daha önce yapılan literatür çalışmalarına göre belirlenmiştir (Namli vd., 2021; Tas vd., 2021; Zhong vd., 2019). Yanıt yüzey yöntemi (RSM) ile optimizasyonu için, glikasyon derecesi (serbest amino grupları ve aşılama derecesi) ve esmerleşme indeks değerleri kullanılmıştır. Bu bağımlı değişkenlerden serbest amino grupları değerleri minimize edilmiş olup, diğer tüm değişkenler maksimize edilerek optimum koşullar elde edilmiştir. Tahmini ve deneysel değerler arasında istatistiksel fark tek örneklemli t-testi (MINITAB® 21.0 programı ile) ile belirlenmiştir.

Tablo 3: Glikasyon İşlemi için Kullanılan Bağımsız Değişkenlerin Aralık ve Seviyeleri

Değişkenler	Kod	Aralık ve seviyeler		
		-1	0	+1
Protein izolatı:şeker oranı	X_1	2:1	1:1	1:2
Reaksiyon sıcaklığı (°C)	X_2	60	75	90
Reaksiyon süresi (dk)	X_3	30	60	90

2.7. GLİKASYON İŞLEMİ

Glikasyon reaksiyonu Zhao vd. (2021) ve Zhang vd. (2015) tarafından önerilen yöntemle ufak modifikasyonlar eklenerek uygulanmıştır. Glikasyon işlemi için öncelikle kuru bazda KPI ve fruktoz şekeri deney tasarımında belirlenen oranlarda karıştırılmıştır. Karışımlar, 0.1M potasyum fosfat tamponu (pH 7) ile toplam çözelti konsantrasyonu %10 (w/v) olacak şekilde 20 mL’lik viallere hazırlanmıştır. Daha sonra izolat:şeker dispersiyonları oda sıcaklığı altında 2 saat boyunca karıştırılmış ve çözünmenin tam olabilmesi ve hidrasyonun sağlanması adına 1 gece boyunca 4 °C’de bekletilmiştir. Glikasyon reaksiyonu için, su banyosunda deney tasarımında belirtilen farklı sıcaklıklar (60, 75 ve 90 °C) ve farklı sürelerde (30, 60 ve 90 dakika) inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Inkübasyonun tamamlanmasından hemen sonra sıcaklık düşürülerek reaksiyonu durdurulmuş ve vialler buz banyosunda oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutulmuştur. Ardından önce -20 °C’de dondurularak liyofilize edilmiştir.



Son olarak, liyofilize örnekler toz haline getirilmiş ve fiziksel ve kimyasal analizlerde kullanılmak üzere 4 °C’de muhafaza edilmiştir.

Ayrıca, glikasyonun proteinler üzerindeki etkisini gözlemleyebilmek için su banyosunda ısıtma ve soğutma adımları atlanarak KPI-şeker kompleksleri ve KPI için aynı prosedürler uygulanmıştır. Bu numuneler kontrol numuneleri olarak değerlendirilmiştir.

2.8. GLİKASYON DERECEŚİ VE ESMERLEŐME İNDEKSİ

İlk olarak 80 mg OPA (o-Ftalaldehit) 2 mL %95 etanol içerisinde çözündürölmüőtür. Daha sonra bu solüsyona 50 mL 0.01 M sodyum tetraborat tampon çözeltisi (pH 9.7), 5 mL %20 (w/v) sodyum dodesil sülfat ve 200 uL β-merkaptotanol eklenmiştir. OPA reaktifi hazırlanırken karışım distile su ile 100 mL’ye seyreltilmiştir. Numune dispersiyonları (200 uL 2 mg/mL), 90 °C’de 5 dakika boyunca 4 mL OPA reaktifi ile reaksiyona sokulmuőtur. Numunelerin serbest amino grupları (FAG), bir ultraviyole görünür (UV–Vis) spektrofotometre kullanılarak 340 nm dalga boyunda ölçölmüőtür. KPI numunesi referans olarak kullanılmıştır. Numunelerin FAG ve aşılama dereceleri (DG) eşitlik 2 ve 3 kullanılarak hesaplanmıştır (Zhao vd., 2021).

$$FAG (\%) = \frac{A_s}{A_r} \times 100 \quad (2)$$

$$DG (\%) = \frac{(A_r - A_s)}{A_r} \times 100 \quad (3)$$

Burada A_r , referans numunenin (KPI) absorbansıdır ve A_s , numunenin absorbansıdır.

Glikasyon reaksiyonunun esmerleşme yoğunluğu, Zhao vd. (2021) tarafından bildirilen prosedürlere göre yapılmıştır. Numune dispersiyonları deiyonize su ile %1’e (w/v) seyreltilmiştir. 294 nm (A_{294}) ve 420 nm’de (A_{420}) dispersiyonların absorbansı UV–Vis spektroskopisi kullanılarak ölçölmüőtür. Ara ürünler ve esmerleşme yoğunluğu sırasıyla A_{294} ve A_{420} olarak temsil edilmiştir. Optimum glikasyon derecesi için %FAG değerlerinin düşük, %DG ve esmerleşme yoğunluğu değerlerinin yüksek olması hedeflenmiştir.

2.9. FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİN BELİRLENMESİ

2.9.1. Su ve Yağ Tutma Kapasitesi

Su (STK) ve yağ tutma kapasitelerini (YTK) belirlemek için, yaklaşık 50 mg protein izolatı 2 mL’lik bir santrifüj tüpünde 1.5 mL damıtılmış su veya ticari mısırozü yağı eklenerek disperse edilerek, bir vorteksle oda sıcaklığında 20 s karıştırılmıştır. Karıştırıldıktan sonra tüplerin kapakları kapatılmış ve tüpler oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Tüpler daha sonra 14000×g’de 20 dakika süreyle santrifüjlenerek süpernatant alınmış ve tortuyu içeren



santrifüj tüpü tartılmıştır. Emilen su veya yağ içeriği, tortuyu içeren tüplerin tartılmasıyla belirlenmiştir. STK ve YTK, sırasıyla g protein izolatu başına emilen g su veya yağ olarak ifade edilmiştir. STK ve YTK eşitlik 4 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$STK \text{ ya da } YTK = \frac{M_2 - M_1}{M_0} \quad (4)$$

Denklemden M_1 kuru örneği içeren santrifüj tüpünün ağırlığıdır, M_2 yağ veya suyun alınmasından sonra tüpün ağırlığı ve M_0 örneğin ağırlığıdır (Aydemir ve Yemenicioğlu, 2013; Gündoğan ve Karaca, 2020).

2.9.2. Emülsiyon Özellikleri

Emülsiyon aktivite indeksi (EAI) ve emülsiyon stabilite indeksi (ESI) belirlemek için Pearce ve Kinsella (1978) tarafından geliştirilen yöntem kullanılmıştır. Öncelikle 300 mg KPI 30 mL saf su ile karıştırılmış (%1'lik protein dispersiyonu) ve bu karışıma 10 mL mısırözü yağı eklenmiştir. Karışımın pH değerini 7'ye ayarlayabilmek için 1N HCl veya 1N NaOH kullanılmış ve homojenizatör (Ultra-Turrax T25 digital, IKA, Almanya) ile 20000 rpm hızda 1 dakika süreyle karıştırılmıştır. Emülsiyon oluşumu sonrası, emülsiyonun sıvı fazından (alt kısım) 50 µL bir tüp içerisine alınarak üzerine 5 mL %0.1'lik (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi eklenerek seyreltilmiş ve bu karışımın 500 nm dalga boyundaki absorbansı spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Emülsiyon aktivite indeksi eşitlik 5 ile hesaplanmıştır.

$$EAI (m^2/g) = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times N}{c \times \phi \times 10000} \quad (5)$$

Burada, A_0 , 0. dakikadaki absorbans; N, seyreltme faktörü (100); c, protein dispersiyonunun konsantrasyonu (0.01 g/mL); ϕ ise yağın hacimsel fraksiyonudur (10/40=0.25).

Örneklerin ESI değerleri ise emülsiyon 10 dakika bekletildikten sonra yine aynı şekilde alt kısmından alınan 50 µL örneğin 5 mL %0.1'lik (w/v) SDS ile seyreltilmesi ve 500 nm'de absorbansının okunmasının ardından eşitlik 6 ile hesaplanmıştır.

$$ESI (dk) = \frac{A_0 \times t}{A_0 - A_{10}} \quad (6)$$

Burada, A_{10} , 10. dakikadaki absorbans; t ise bekleme süresidir (10 dakika).

2.9.3. Köpüklenme Özellikleri

Öncelikle örneklerin saf su %3 (w/v) ile dispersiyonları hazırlanmış ve 1N HCl veya 1N NaOH ile pH değerleri 7'ye ayarlanmıştır. Daha sonra karışım 11000 rpm hızda 2 dakika



boyunca homojenize edilmiş ve karışım 100 mL'lik bir dereceli silindire aktarılmıştır. Köpüklenme kapasitesi (KK), toplam hacim ve sıvı hacimlerin kaydedilmesi ile eşitlik 7 kullanılarak hesaplanmıştır. Köpük stabilitesi (KS) ise karışımın ortam sıcaklığında 10 ve 30 dakika bekletilmesinden sonra kalan köpüğün hacmi kaydedilerek eşitlik 8 yardımıyla belirlenmiştir (Gündoğan ve Karaca, 2020).

$$KK (\%) = \frac{V_1 - V_0}{V_0} \times 100 \quad (7)$$

$$KS (\%) = \frac{V_2}{V_1} \times 100 \quad (8)$$

Burada V_0 , homojenizasyon öncesi protein çözeltisinin hacmi; V_1 , homojenizasyondan hemen sonra oluşan köpük hacmi; V_2 ise 10 ve 30 dakika bekletme sonrası köpük hacmidir.

2.10. TOPLAM FENOLİK-FLAVONOİD BİLEŞİK VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTE

2.10.1. Antioksidan Aktivite

Örneklerin antioksidan aktiviteleri, radikal süpürücü aktivite (DPPH•; 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), ferrik indirgeyici antioksidan güç (FRAP) ve bakır iyonu azaltan antioksidan kapasite (CUPRAC) yöntemleri ile ölçülmüştür. Kenevir protein izolatlarının ekstraksiyon işleminde Taaifi vd. (2021) ait metot modifiye edilerek uygulanmıştır. Bu amaçla 1 g örnek içine 20 mL metanol:su (%90) karışımı eklenmiş ve 1 dakika boyunca vortekslenmiştir. Sonrasında örnekler 30 dakika ultrasonikasyon uygulanıp, sonrasında çözeltiler 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant elde edilmiştir. Tüm antioksidan aktivite standart eğrileri için farklı konsantrasyonlarda troloks solüsyonları kullanılmıştır ve sonuçlar mg troloks eşdeğeri (TE)/g kuru madde olarak verilmiştir.

DPPH• radikal süpürücü aktivite: DPPH• (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radikalini süpürücü etkisi, DPPH• ile oluşturdukları rengin ölçümüze dayalı olarak Brand-Williams vd. (1995) tarafından önerilen yöntemin modifiye edilmiş hali ile belirlenmiştir. Ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrakttan 100 µL alınmış ve üzerine 3.9 mL DPPH• (6×10^{-5} M) solüsyonu eklenmiştir. Daha sonra karışım 30 dakika boyunca karanlık bir ortamda bekletilmiş ve süre sonunda spektrofotometre (Shimadzu, UV-1201V, Japonya) ile 515 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür.

CUPRAC: Bu yöntemde 50 µL ekstrakt üzerine önce 1 mL 10 mM $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi, sonra 1 mL 7.5 mM Neocuproine çözeltisi ve en son 1 mL 1M amonyum asetat (pH=7) çözeltisi eklenerek son hacim saf su ile 4.1 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra karışım karanlık bir ortamda 30 dakika bekletilmiş ve absorbansları 450 nm dalga boyunda spektrofotometre ile (Shimadzu, UV-1201V, Japonya) ölçülmüştür (Apak vd., 2004).



FRAP: Bu yöntemde Teh vd. (2014) tarafından önerilen metot ufak değişiklikler sonrasında kullanılmıştır. pH 3.6'da asetat tampon, 10 mM TPTZ (2,4,6- Triphridyl-s-triazine) solüsyonu ve 20 mM FeCl₃, 10:1:1 (v/v/v) oranında birleştirilerek FRAP çözeltisi elde edilmiştir. Daha sonra 900 µL taze olarak hazırlanan FRAP reaktifi üzerine 100 µL ekstrakt eklenerek oda sıcaklığında 4 dakika boyunca bekletilmiş ve absorbansları 593 nm dalga boyunda spektrofotometre ile (Shimadzu, UV-1201V, Japonya) ölçülmüştür.

2.10.2. Toplam Fenolik Bileşik (TFB)

TFB analizinde, 1 mL ekstrakt ve 5 mL Folin-Ciocalteu reaktifi (1:10 v/v) karıştırılmış olup 3-4 dakika sonra üzerine 4 mL %7.5'luk Na₂CO₃ eklenmiştir. Çözeltiler karıştırıldıktan sonra karanlık bir ortam ve oda sıcaklığında 60 dakika boyunca bekletilmiştir (Singleton ve Rossi, 1965; Babiker vd., 2021). Absorbans değerleri 750 nm dalga boyunda spektrofotometre ile (Shimadzu, UV-1201V, Japonya) ölçülmüştür. Sonuçlar mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g kuru madde şeklinde verilmiştir.

2.10.3. Toplam Flavonoid Bileşik (TFlaB)

TFlaB analizi, alüminyum klorür spektrometrik yöntem kullanılarak yapılmıştır (Chandra vd., 2014). Bu amaçla, ekstrattan 2 mL alınarak üzerine 2 mL %2'lik AlCl₃ çözeltisi eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 15 dakika boyunca bekletilmiştir. Süre sonunda absorbans değerleri 420 nm dalga boyunda spektrofotometre (Shimadzu, UV-1201V, Japonya) ile belirlenmiştir. Sonuçlar, mg kuarsetin eşdeğeri (KE)/g kuru madde olarak verilmiştir.

2.11. FİZİKSEL VE KİMYASAL KARAKTERİZASYON

2.11.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Örneklerin yüzey morfolojisi, 10 kV'luk voltaj ivmesinde bir taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak belirlenmiştir. Örneklerin elektriksel iletkenliğini desteklemek ve daha net bir görüntü sağlayabilmek için örneklerin yüzeyi, ölçümden önce 10 nm kalınlığında altın-paladyum alaşımı ile kaplanmıştır. SEM görüntüleri x10.000 büyütme oranı ile elde edilmiştir.

2.11.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR)

Örneklerin fonksiyonel gruplarının belirlenmesi ve aralarındaki etkileşimin tanımlanabilmesi için fourier transforme edilmiş kızılötesi (FTIR) spektroskopisi kullanılmıştır. Kenevir tohumu proteini izolatlarının ikincil yapısı, Platinum ATR donanımlı



bir FTIR spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. Ölçümler 400 cm^{-1} ile 4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

2.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Verilerin istatistiksel değeriendirmesi SPSS Statistics 26.0 (IBM, New York, USA) programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı Duncan testi ile %95 güven aralığında ($P \leq 0.05$) belirlenmiştir.



ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. KENEVİR TOHUMU, YAĞSIZ KENEVİR TOHUMU VE PROTEİN İZOLATININ BİLEŞİMLERİ

Materyal olarak kullanılan kenevir tohumu (KT), yağsız kenevir tohumu (YKT) ve çalışma kapsamında elde edilen kenevir protein izolatının (KPI) kimyasal bileşimleri Tablo 4'de verilmiştir. Kenevir tohumunun su, protein, yağ ve kül içerikleri sırasıyla %4.12, %15.07, %10.86 ve %4.88 olarak belirlenmiştir. YKT'nin bileşimi ise %3.90 nem, %21.42 protein, %0.83 yağ ve %4.77 kül içeriğinden oluşmaktadır. Karabulut ve Yemiş (2022) Narlı çeşidi kenevir tohumlarının su, protein, yağ, kül ve karbonhidrat içeriğini sırasıyla %6.6, %25.4, %35.7, %4.8 ve %27.5 olarak tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada yağsız kenevir tohumun bileşimini ise yine sırasıyla %6.8, %55.3, %1.8, %8.0 ve %28.1 olarak belirlemişlerdir. El-Sohaimy vd. (2022) yaptıkları çalışmada kenevir tohumunun nem içeriğini %10.0, kül içeriğini %4.0, lif içeriğini %12.0, protein içeriğini %21.0, kaba yağ içeriğini %28.0 ve toplam karbonhidrat içeriğini %25.0 olarak rapor etmişlerdir. Montserrat-de la Paz vd. (2023) kenevir tohumunun kül, protein ve yağ içeriklerini sırasıyla %5.0, %23.8 ve %31.8 olarak belirlemişlerdir. Literatürle karşılaştırıldığında mevcut çalışmada kullanılan kenevir tohumlarının su ve kül içerikleri benzerlikler gösterirken protein ve yağ içerikleri oldukça düşük görünmektedir. Protein ve yağ içeriklerindeki bu farklılığın tohum çeşidine, coğrafi ve iklim koşullarına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada elde olunan kenevir protein izolatının su, protein, yağ ve kül içerikleri sırasıyla %7.48, %77.58, %0.94 ve %7.56 olarak belirlenmiştir. Malomo vd. (2014) kenevir tohumu protein izolatının protein içeriğini %84.15 olarak bildirmişlerdir. Karabulut ve Yemiş (2022) Narlı çeşidi kenevir tohumlarından elde ettikleri KPI'nın su, protein, yağ, kül ve karbonhidrat içeriğini sırasıyla %5.6, %90.0, %0.6, %2.6 ve %1.2 olarak tespit etmişlerdir. Literatürde kenevir protein izolatlarının protein içeriklerinin mevcut çalışmadakine göre çok daha yüksek olduğu araştırmalar mevcuttur (Hadrade vd., 2018; Plati vd., 2021; Fang vd., 2023a, b; Montserrat-de la Paz vd., 2023). Protein içeriğindeki farklılıklar, protein çöktürme yönteminin yanı sıra ekstraksiyon malzemelerindeki farklılıklardan da kaynaklanabilir.

Kenevir protein izolatının çalışmada kullanılan ekstraksiyon koşullarıyla kenevir tohumu ağırlığına göre protein ekstraksiyon verimi %56.85 olarak belirlenirken yağsız kenevir tohumu ağırlığına göre protein ekstraksiyon verimi %31.68 olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde Plati vd. (2021) kenevir tohumu ağırlığı ve yağdan arındırılmış kenevir tohumu ağırlığı



protein içeriğine göre ifade edilen protein veriminin sırasıyla %58.08 ve %28.51 olduğunu rapor etmişlerdir. Hadnadev vd. (2018) izoelektrik çökeltme ve miselizasyon tekniği kullanılarak kenevir tohumu küspesinden elde ettikleri protein izolatları için verimleri kenevir küspesi ağırlığına (%) dayalı olarak %19.24-24.24 olarak belirlerken, protein ağırlığına (%) dayalı olarak ise %40.17-50.60 olarak tespit etmişlerdir. Bir diğer çalışmada, Malomo vd. (2014) tarafından, izolatlardan protein ağırlığı ve brüt ağırlık bazında elde edilen verimin sırasıyla %37.90 ve %16.80 olduğu belirtilmiştir. Verimdeki bu farklılıklar malzeme kesme geçmişine, yani yağın kenevir tohumlarından preslenmesi/çıkarılması sırasında uygulanan kesme kuvvetlerinin boyutuna ve bunların hücre duvarı parçalanması üzerindeki etkilerine atfedilebilir.

Tablo 4: Kenevir Tohumu ve Yağsız Kenevir Tohumunun Kimyasal Bileşimi (Kurumadde Bazında)

Materyal	Su içeriği (%)	Ham protein (%)	Ham yağ (%)	Kül (%)
Kenevir tohumu (KT)	4.12±0.24 ^b	15.07±1.12 ^c	10.86±2.03 ^a	4.88±0.08 ^b
Yağsız kenevir tohumu (YKT)	3.90±0.01 ^b	21.42±0.53 ^b	0.83±0.11 ^b	4.77±0.03 ^b
Kenevir protein izolatı (KPI)	7.48±0.06 ^a	77.58±0.00 ^a	0.94±0.48 ^b	7.56±0.04 ^a

Değerler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir, n=2. ^{a-c} Farklı üst simge karakterler, bir sütun içinde P≤0.05 düzeyinde önemli farklılıkları göstermektedir.

3.2. PROTEİN EKSTRAKSİYONUN OPTİMİZASYONU

Kenevir tohumlarının protein ekstraksiyonu Tablo 2’de verilen deney tasarımına göre yapılmış olup, analiz sonuçları (Y₁ deneysel) Tablo 5’de sunulmuştur. Ek olarak, modelden elde edilen tahmini değerler de (Y₁ tahmini) Tablo 5’de görülmektedir. Değerler incelendiğinde farklı koşullarda elde edilen ekstraksiyon sonucunda deneysel protein miktarının 0.17-1.70 mg/mL aralığında değiştiği görülmektedir. En düşük protein miktarı, tuz konsantrasyonun 0 M, pH değerinin 8 ve ekstraksiyon sıcaklığının 37 °C olduğu koşullarda elde edilirken, en yüksek değer ise tuz konsantrasyonun 0.5 M, pH değerinin 12 ve ekstraksiyon sıcaklığının 49 °C olduğu koşullarda elde edilmiştir.



Tablo 5: Box-Behnken Deney Tasarımına Göre Elde Edilen Deneysel ve Tahmini Değerler (Ekstraksiyon)

No	X ₁ *	X ₂	X ₃	Y ₁ deneysel	Y ₁ tahmini
1	0.5	12	25	1.49	1.51
2	0.5	10	37	0.96	0.96
3	0.5	10	37	1.04	0.97
4	0	12	37	1.55	1.57
5	0.5	8	25	0.76	0.81
6	1	10	49	1.18	1.23
7	0.5	10	37	0.91	0.96
8	0	10	49	1.26	1.29
9	1	8	37	0.98	0.95
10	0	10	25	1.09	1.03
11	0.5	10	37	0.94	0.96
12	0.5	8	49	1.00	0.97
13	0	8	37	0.17	0.89
14	1	10	25	1.24	1.21
15	0.5	10	37	0.98	0.96
16	1	12	37	1.65	1.64
17	0.5	12	49	1.70	1.64

*X₁: Tuz konsantrasyonu (M), X₂: pH, X₃: Ekstraksiyon sıcaklığı (°C), Y₁: Protein miktarı (mg/mL).

Box–Behnken deney tasarımı kullanılarak elde edilen protein miktarları, yanıt yüzey yöntemi ile optimize edilmiş olup çalışmaya ait ANOVA analizlerine ait sonuçlar Tablo 6’da sunulmuştur. Modelin iyi uyum sağlayabilmesi için minimum regresyon katsayısı (R^2) değerinin %80’den yüksek olması gerektiği bilinmektedir (Gan vd., 2007). Ayrıca duysal, fizikokimyasal analiz sonuçları için kabul edilen ayarlanmış regresyon katsayısı (R^2_{adj}) değerinin ise %70’den yüksek olması beklenmektedir (Granato vd., 2010). Bu çalışmada denklemin regresyon katsayısı %97.28, ayarlanmış regresyon katsayısı ise %93.64 olarak bulunmuş olup, tüm koşulları sağladığı belirlenmiştir. Diğer bir istatistiksel faktör olan model uyumsuzluğu (Lack of fit) ise modelin matematiksel formunun uygunsuzluğundan kaynaklanan hataya denilmekte olup bu değer istatistiksel olarak önemsiz olması beklenmektedir (Box ve Draper, 2007). Tablo 6 incelendiğinde, regresyon modelinin uyumsuzluk değerinin önemsiz bulunduğu görülmüştür ($P>0.05$).



Tablo 6: Protein Miktarına Ait RSM Model İstatistikleri ve ANOVA Analizi (Ekstraksiyon)

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F-Değeri	P-değeri
Model	8	0.953027	0.119128	26.78	0.000
Lineer	3	0.712014	0.021891	4.92	0.047
X ₁	1	0.041667	0.000427	0.10	0.767
X ₂	1	0.630208	0.054230	12.19	0.013
X ₃	1	0.040139	0.009903	2.23	0.186
Kareler	3	0.226336	0.075445	16.96	0.002
X ₁ *X ₁	1	0.061535	0.054756	12.31	0.013
X ₂ *X ₂	1	0.133759	0.096145	21.61	0.004
X ₃ *X ₃	1	0.031041	0.031041	6.98	0.038
İnteraksiyon	2	0.014678	0.007339	1.65	0.269
X ₁ *X ₃	1	0.014400	0.014400	3.24	0.122
X ₂ *X ₃	1	0.000278	0.000278	0.06	0.811
Hata	6	0.026688	0.004448		
Model uyumsuzluğu	2	0.017119	0.008560	3.58	0.129
Saf hata	4	0.009569	0.002392		
Toplam	14	0.979716			
		R²	R²_{adj}		
Model		%97.28	%93.64		

X₁: Tuz konsantrasyonu (M), X₂: pH, X₃: Ekstraksiyon sıcaklığı (°C)

Regresyon analiziyle bulunan ikinci dereceden denklem ile elde edilen model eşitliği Tablo 7’de verilmiştir. Modelde bağımsız değişkenlerin protein miktarı üzerine etkisi incelendiğinde, en etkili bağımsız değişkenin pH olduğu görülmektedir. Protein miktarı üzerine pH değerinin etkisinin yüksek olduğu anlaşılabilmektedir. pH değerinin 8’den 12’ye artması ile protein miktarında yaklaşık 2 kat artış görülmüştür. Ayrıca tüm değişkenlerin kendisi ile interaksiyonun da istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur (Tablo 7).

Tablo 7: Regresyon Analizi Sonucu Elde Edilen Denklem (Ekstraksiyon)

Bağımlı değişken	Model
Protein miktarı	$Y_1 = 3.97821^{**} - 0.08017X_1 - 0.66444X_2^{*} - 0.03522X_3 + 0.51267X_1X_1^{*} + 0.04246X_2X_2^{**} + 0.00067X_3X_3^{*} - 0.01000X_1X_3 - 0.00035X_2X_3$

*Önem derecesi $P \leq 0.05$; **Önem derecesi $P \leq 0.01$; X₁: Tuz konsantrasyonu (M), X₂: pH, X₃: Ekstraksiyon sıcaklığı (°C), Y₁: Protein miktarı (mg/mL).

Box–Behnken deney tasarımı ile farklı protein ekstraksiyonu koşullarında elde edilen örneklerde yapılan analiz sonucunda yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyon yapılmış olup, protein miktarının maksimize edilmiştir ve optimum koşullar;



- Tuz konsantrasyonu (M): 0
- pH: 12
- Ekstraksiyon sıcaklığı (°C): 49, olarak bulunmuştur.

Optimum koşullar altında tahmini protein miktarı değeri 1.79 mg/mL olarak elde edilmiş olup, deneyler sırasında bu değer 1.70 mg/mL olarak elde edilmiştir. Deneysel elde edilen değerler ile optimizasyon elde edilen tahmini değer arasında tek örneklemli t-testi uygulanarak aralarında fark olmadığı görülmüştür ($P>0.05$). İstatistiksel sonuçlar Tablo 8’de sunulmuştur. Ek olarak optimizasyon sonucu elde edilen modelin arzu edilebilirlik değeri (d) 1.00 olarak bulunmuştur. Bu durum, modelin uyumluluğunun çok yüksek olduğunu diğer bir göstergesidir.

Tablo 8: Tek Örneklemli t-Testi Analiz Sonuçları (Ekstraksiyon)

Yanıt	N	Ortalama	Standart sapma	P
Protein miktarı	3	1.73	0.52	0.423

3.3. GLİKASYON İŞLEMİNİN OPTİMİZASYONU

Protein ekstraksiyonunun optimizasyonu sonucunda belirlenen optimum koşullarda kenevir protein izolatu (KPI) elde edilmiş ve protein izolatının glikasyon işlemleri Tablo 3’de verilen bağımsız değişkenler kullanılarak yapılmış olup, analiz sonuçları (Y_1 deneysel, Y_2 deneysel, Y_3 deneysel, Y_4 deneysel) Tablo 9’da sunulmuştur. Ek olarak, modelden elde edilen tahmini değerler de (Y_1 tahmini, Y_2 tahmini, Y_3 tahmini, Y_4 tahmini) Tablo 9’da görülmektedir. Değerler incelendiğinde farklı koşullarda elde edilen glikasyon işlemi ile glikasyon derecesi (%DG) %40.38-67.95, serbest amino grupları (%FAG) %32.05-59.62, 420 nm dalga boyundaki esmerleşme yoğunluğu (A_{420}) 0.24-0.53 ve 294 nm dalga boyundaki esmerleşme yoğunluğunun (A_{294}) ise 1.53-2.24 aralığında değiştiği görülmektedir.



Tablo 9: Box-Behnken Deney Tasarımına Göre Elde Edilen Deneysel ve Tahmini Değerler (Glikasyon)

No	X ₁ *	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄
				deneysel	deneysel	deneysel	deneysel	tahmini	tahmini	tahmini	tahmini
1	1:1	90	30	61.54	38.46	0.271	1.582	61.62	38.38	0.280	1.598
2	1:1	60	30	62.82	37.18	0.394	1.918	63.71	36.30	0.399	1.957
3	2:1	60	60	48.08	51.92	0.534	2.242	46.79	53.20	0.536	2.226
4	1:1	75	60	58.97	41.03	0.260	1.604	57.05	42.95	0.255	1.594
5	2:1	75	90	41.67	58.33	0.497	1.987	43.03	56.97	0.505	2.020
6	2:1	75	30	40.38	59.62	0.485	2.103	40.79	59.21	0.478	2.080
7	1:1	75	60	53.21	46.79	0.256	1.607	57.05	42.95	0.255	1.594
8	1:1	90	90	59.62	40.38	0.346	1.727	58.73	41.27	0.341	1.687
9	2:1	90	60	41.03	58.97	0.433	1.865	40.54	59.46	0.431	1.872
10	1:1	75	60	55.77	44.23	0.245	1.596	57.05	42.95	0.255	1.594
11	1:2	90	60	63.46	36.54	0.262	1.534	64.74	35.26	0.260	1.551
12	1:2	75	90	63.46	36.54	0.293	1.619	63.06	36.94	0.300	1.642
13	1:1	75	60	67.95	32.05	0.242	1.535	57.05	42.95	0.255	1.594
14	1:2	60	60	67.31	32.69	0.309	1.713	67.79	32.21	0.311	1.706
15	1:2	75	30	67.31	32.69	0.294	1.649	65.95	34.05	0.287	1.616
16	1:1	75	60	60.26	39.74	0.272	1.627	57.05	42.95	0.255	1.594
17	1:1	60	90	66.03	33.97	0.388	1.852	65.95	34.05	0.379	1.836

*X₁: Protein:şeker oranı, X₂: Reaksiyon sıcaklığı (°C), X₃: Reaksiyon süresi (dk), Y₁: %DG-Glikasyon derecesi, Y₂: %FAG-Serbest amino gruplarının oranı, Y₃: A₄₂₀-420 nm’de esmerleşme yoğunluğu, Y₄: A₂₉₄-294 nm’de esmerleşme yoğunluğu.

Box–Behnken deney tasarımı kullanılarak elde edilen bağımlı değişkenlerin (%DG, %FAG, A₄₂₀ ve A₂₉₄), yanıt yüzey yöntemi ile optimize edilmiş olup çalışmaya ait ANOVA analizlerine ait sonuçlar Tablo 10’da sunulmuştur. Modelin iyi uyum bu çalışmada da regresyon katsayıları %96.98-99.32 aralığında, ayarlanmış regresyon katsayıları ise %92.44-98.44 aralığında değiştiği bulunmuştur. Diğer bir istatistiksel faktör olan model uyumsuzluk değerlerinin (Lack of fit) ise tüm denklemler için önemsiz bulunduğu saptanmıştır (P>0.05).



Tablo 10: Bağımlı Değişkenlere Ait RSM Model İstatistikleri ve ANOVA Analizi (Glikasyon)

	Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F-Değeri	P-değeri
%DG	Model	9	1275.35	141.705	21.39	0.001
	Lineer	3	1064.58	56.275	8.49	0.014
	X ₁	1	1021.17	93.499	14.11	0.009
	X ₂	1	43.20	51.622	7.79	0.032
	X ₃	1	0.21	0.183	0.03	0.874
	Kareler	3	195.06	65.019	9.81	0.010
	X ₁ *X ₁	1	129.46	129.464	19.54	0.004
	X ₂ *X ₂	1	52.01	52.006	7.85	0.031
	X ₃ *X ₃	1	13.59	13.586	2.05	0.202
	İnteraksiyon	3	15.72	5.239	0.79	0.542
	X ₁ *X ₂	1	2.57	2.568	0.39	0.556
	X ₁ *X ₃	1	6.57	6.575	0.99	0.358
	X ₂ *X ₃	1	6.57	6.575	0.99	0.358
	Hata	6	39.76	6.626		
	Model uyumsuzluğu	3	9.35	3.116	0.31	0.821
	Saf hata	3	30.41	10.136		
	Toplam	15	1315.10			
			R²	R²_{adj}		
	Model		%96.98	%92.44		
%FAG	Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F-Değeri	P-değeri
	Model	9	1275.35	141.705	21.39	0.001
	Lineer	3	1064.58	56.275	8.49	0.014
	X ₁	1	1021.17	93.499	14.11	0.009
	X ₂	1	43.20	51.622	7.79	0.032
	X ₃	1	0.21	0.183	0.03	0.874
	Kareler	3	195.06	65.019	9.81	0.010
	X ₁ *X ₁	1	129.46	129.464	19.54	0.004
	X ₂ *X ₂	1	52.01	52.006	7.85	0.031
	X ₃ *X ₃	1	13.59	13.586	2.05	0.202
	İnteraksiyon	3	15.72	5.239	0.79	0.542
	X ₁ *X ₂	1	2.57	2.568	0.39	0.556
	X ₁ *X ₃	1	6.57	6.575	0.99	0.358
	X ₂ *X ₃	1	6.57	6.575	0.99	0.358
	Hata	6	39.76	6.626		
	Model uyumsuzluğu	3	9.35	3.116	0.31	0.821
	Saf hata	3	30.41	10.136		
	Toplam	15	1315.10			
			R²	R²_{adj}		
	Model		%96.98	%92.44		



	Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F-Değeri	P-değeri
A₄₂₀	Model	9	0.149211	0.016579	113.27	0.000
	Lineer	3	0.091285	0.011707	79.98	0.000
	X ₁	1	0.078210	0.022677	154.92	0.000
	X ₂	1	0.012285	0.011319	77.33	0.000
	X ₃	1	0.000790	0.007550	51.58	0.000
	Kareler	3	0.055525	0.018508	126.45	0.000
	X ₁ *X ₁	1	0.035362	0.031214	213.25	0.000
	X ₂ *X ₂	1	0.009006	0.007958	54.37	0.000
	X ₃ *X ₃	1	0.011157	0.011157	76.22	0.000
	İnteraksiyon	3	0.002401	0.000800	5.47	0.030
	X ₁ *X ₂	1	0.000716	0.000716	4.89	0.063
	X ₁ *X ₃	1	0.000046	0.000046	0.31	0.594
	X ₂ *X ₃	1	0.001640	0.001640	11.21	0.012
	Hata	7	0.001025	0.000146		
	Model uyumsuzluğu	3	0.000462	0.000154	1.10	0.447
	Saf hata	4	0.000562	0.000141		
	Toplam	16	0.150236			
			R²	R²_{adj}		
			Model	%99.32	%98.44	
	Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F-Değeri	P-değeri
A₂₉₄	Model	9	0.694047	0.077116	42.80	0.000
	Lineer	3	0.484127	0.059367	32.95	0.000
	X ₁	1	0.354272	0.114499	63.55	0.000
	X ₂	1	0.129286	0.056292	31.24	0.001
	X ₃	1	0.000570	0.039950	22.17	0.002
	Kareler	3	0.187142	0.062381	34.62	0.000
	X ₁ *X ₁	1	0.118364	0.104315	57.90	0.000
	X ₂ *X ₂	1	0.035875	0.032255	17.90	0.004
	X ₃ *X ₃	1	0.032903	0.032903	18.26	0.004
	İnteraksiyon	3	0.022777	0.007592	4.21	0.053
	X ₁ *X ₂	1	0.009851	0.009851	5.47	0.052
	X ₁ *X ₃	1	0.001849	0.001849	1.03	0.345
	X ₂ *X ₃	1	0.011078	0.011078	6.15	0.042
	Hata	7	0.012612	0.001802		
	Model uyumsuzluğu	3	0.007741	0.002580	2.12	0.241
	Saf hata	4	0.004871	0.001218		
	Toplam	16	0.706658			
			R²	R²_{adj}		
			Model	%98.22	%95.92	

X₁: Protein:şeker oranı, X₂: Reaksiyon sıcaklığı (°C), X₃: Reaksiyon süresi (dk), %DG: Glikasyon derecesi, %FAG: Serbest amino gruplarının oranı, A₄₂₀: 420 nm’de esmerleşme yoğunluğu, A₂₉₄: 294 nm’de esmerleşme yoğunluğu.



Regresyon analiziyle bulunan ikinci dereceden denklem ile elde edilen model eşitlikleri Tablo 11’de verilmiştir. Bağımsız değişkenlerin glikasyon derecesi ve serbest amino grup oranlarının üzerine etkisi incelendiğinde, her ikisi için de protein:şeker oranı ile reaksiyon sıcaklığının etkili olduğu görülmektedir. Esmerleşme yoğunlukları ise tüm bağımsız değişkenlerden istatistiksel olarak önemli olacak şekilde etkilenmiştir.

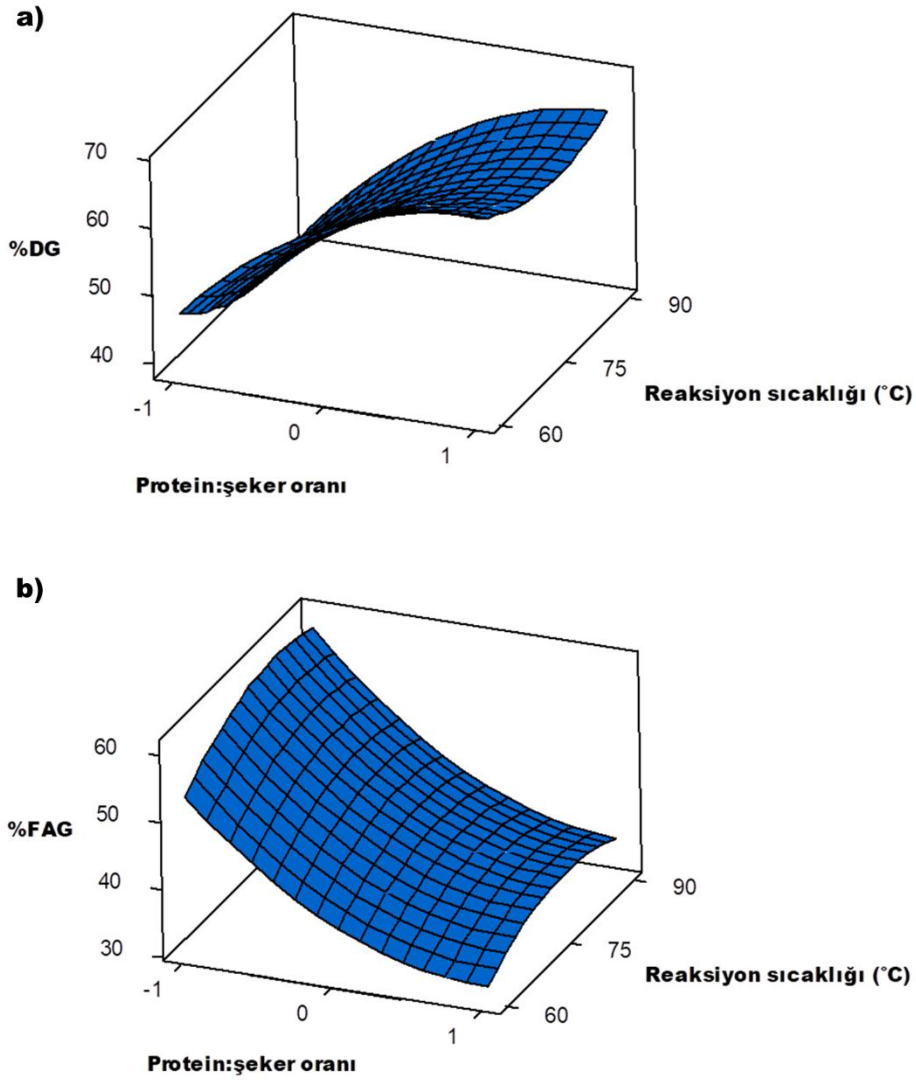
Tablo 11: Regresyon Analizi Sonucu Elde Edilen Denklemler (Glikasyon)

Bağımlı Değişkenler	Modeller
%DG	$Y_1 = 111.218^{**} + 32.612X_1^{**} - 2.495X_2^{*} + 0.048X_3 - 5.689X_1^2 - 0.016X_2^2 + 0.002X_3^2 + 0.053X_1X_2 - 0.043X_1X_3 - 0.003X_2X_3$
%FAG	$Y_2 = -11.2179^{*} - 32.6122X_1^{**} + 2.4947X_2^{*} - 0.0481X_3 + 5.6891X_1^2 - 0.016X_2^2 - 0.0020X_3^2 - 0.0534X_1X_2 + 0.0427X_1X_3 + 0.0028X_2X_3$
A ₄₂₀	$Y_3 = 2.58854^{**} - 0.5034X_1^{**} - 0.03608X_2^{**} - 0.00968X_3^{**} + 0.0861X_1^2 - 0.00019X_2^2 + 0.00006X_3^2 + 0.00089X_1X_2 - 0.00011X_1X_3 + 0.00005X_2X_3^{*}$
A ₂₉₄	$Y_4 = 6.9469^{**} - 1.13116X_1^{**} - 0.08046X_2^{**} - 0.02227X_3^{**} + 0.15740X_1^2 - 0.00039X_2^2 + 0.0001X_3^2 + 0.00331X_1X_2 + 0.00072X_1X_3 + 0.00012X_2X_3^{*}$

*Önem derecesi $P \leq 0.05$; **Önem derecesi $P \leq 0.01$; X₁: Protein:şeker oranı, X₂: Reaksiyon sıcaklığı (°C), X₃: Reaksiyon süresi (dk), %DG: Glikasyon derecesi, %FAG: Serbest amino gruplarının oranı, A₄₂₀: 420 nm’de esmerleşme yoğunluğu, A₂₉₄: 294 nm’de esmerleşme yoğunluğu

Glikasyon derecesinin ve serbest amino grubu oranlarının farklı koşullar altında değişimi Şekil 1a-b’de verilmiştir. Farklı protein:şeker oranı ve reaksiyon sıcaklıkları ile glikasyon derecesinin değişimi Şekil 1a’da görülmektedir. Protein:şeker oranı ile pozitif korelasyon gösterdiği grafikten de anlaşılmakta olup oran artışı ile glikasyon derecesinde artış gözlenmiştir. Serbest amino grupları oranının reaksiyon protein:şeker oranı ve reaksiyon sıcaklığı ile değişimi ise Şekil 1b’de sunulmuştur. Bu oranın düşük olması arzu edildiğinden dolayı yüksek protein:şeker oranı (negatif korelasyon) ve düşük sıcaklık değerlerinde (pozitif korelasyon) en düşük %FAG elde edilmiştir.

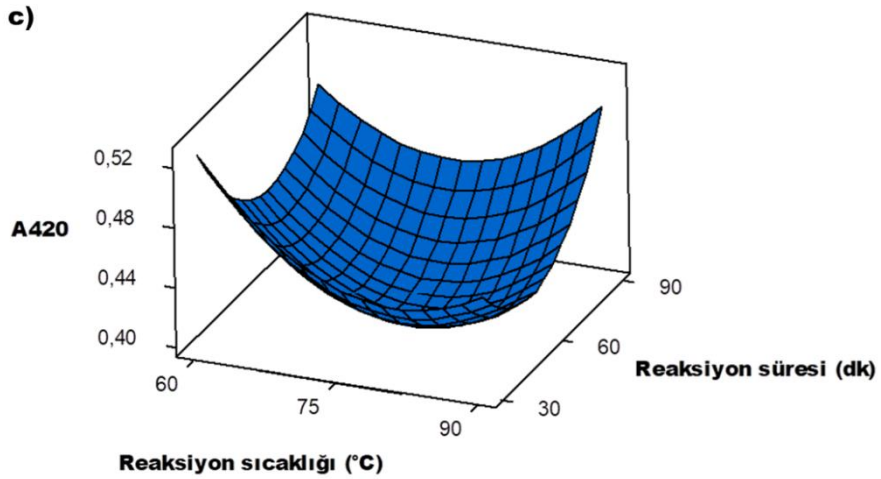
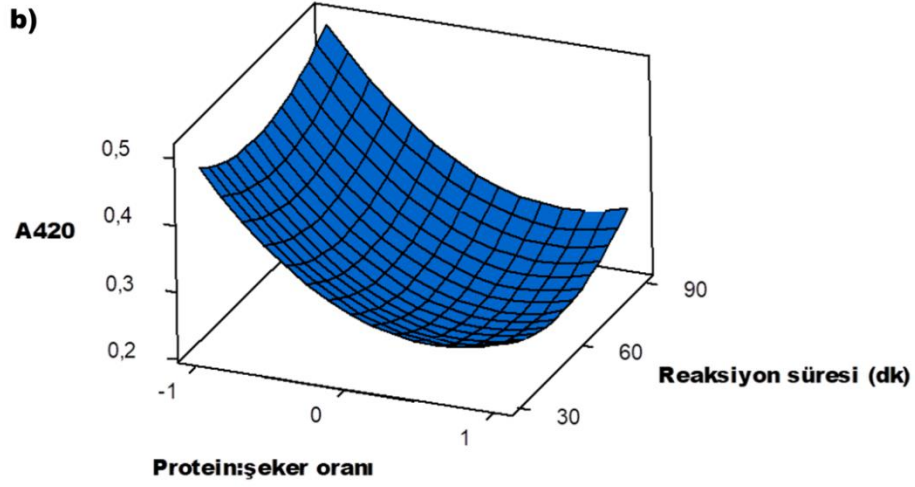
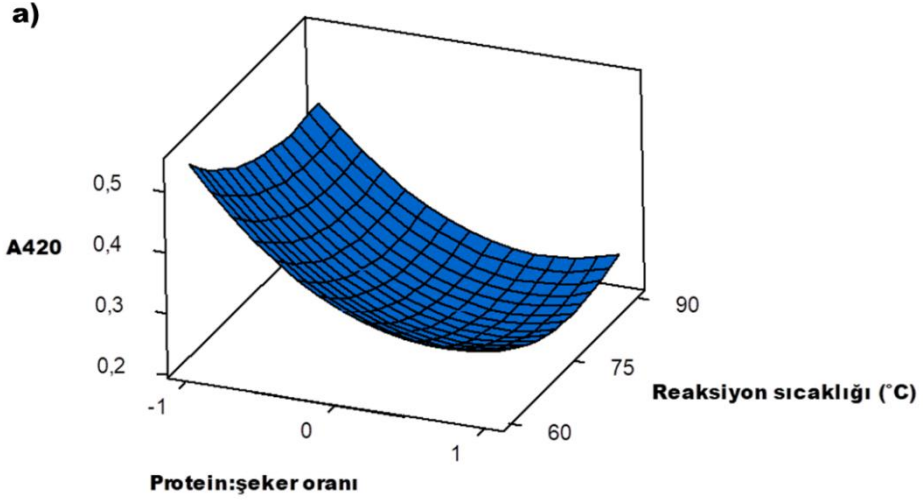




Şekil 1: Protein:Şeker Oranı ve Reaksiyon Sıcaklığı ile Değişim a) %DG-Glikasyon Derecesi b) %FAG- Serbest Amino Grubu Oranı

420 nm dalga boyunda elde edilen esmerleşme yoğunluğu değerlerinin farklı koşullar altında değişimi Şekil 2a-c’de verilmiştir. A_{420} değeri protein:şeker oranı, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi ile negatif korelasyon göstermiş olup, bu değişim grafiklerden de anlaşılmaktadır. Protein:şeker oranı ve reaksiyon sıcaklığının en düşük olduğu koşullarda A_{420} değerinin maksimum olduğu görülmektedir (Şekil 2a). Benzer değişim, protein:şeker oranı ve reaksiyon süresinin minimum olduğunda da bu değerin yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 2b). Şekil 2c’de ise reaksiyon sıcaklığı ve süresi ne kadar düşük olursa o kadar yüksek değer elde edilmiştir.



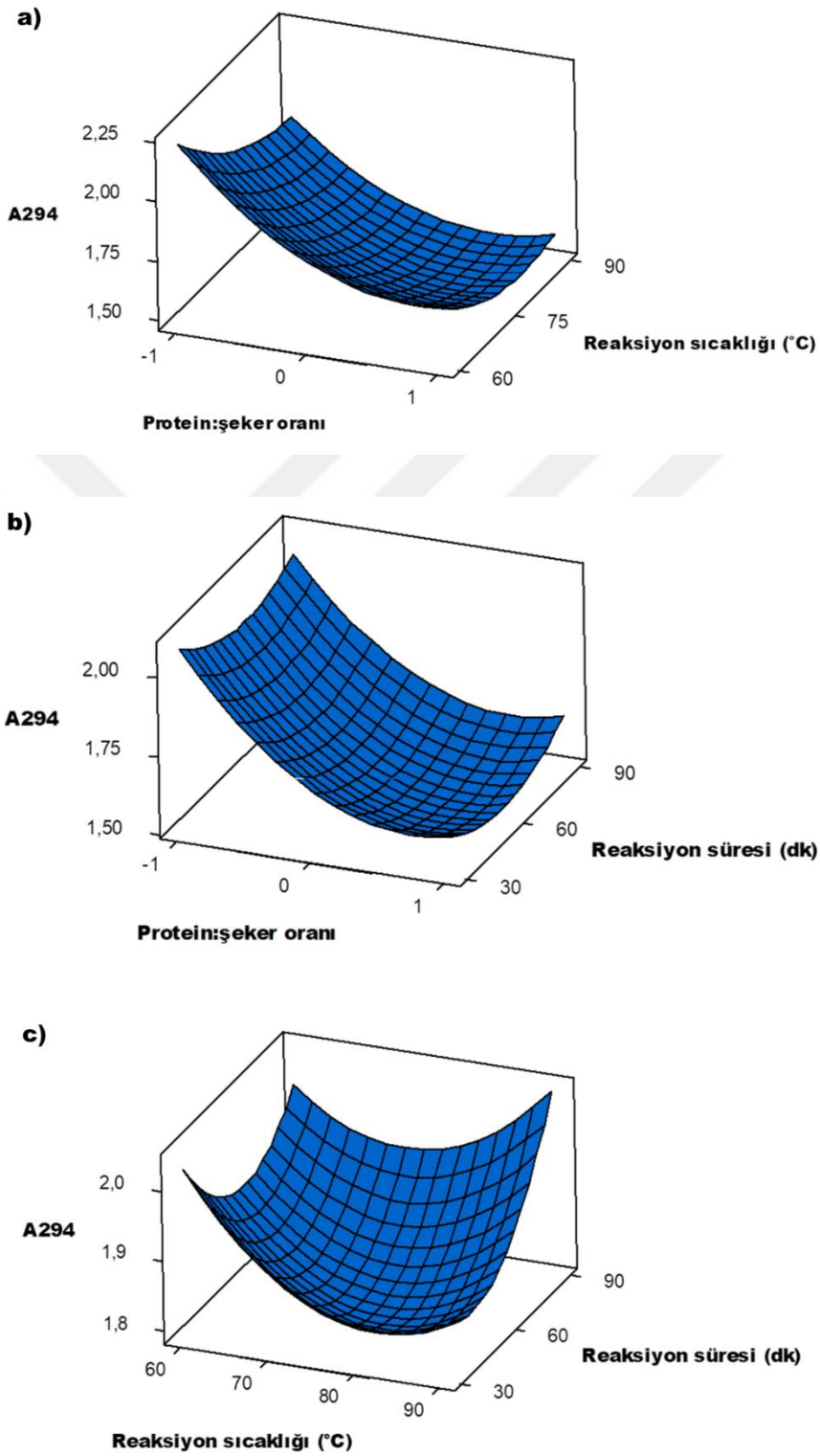


Şekil 2: 420 nm Dalga Boyundaki Esmerleşme Yoğunluğuna Bağımlı Değişkenlerin Etkisi a) Protein:Şeker Oranı-Reaksiyon Sıcaklığı b) Protein:Şeker Oranı-Reaksiyon Süresi c) Reaksiyon Sıcaklığı- Reaksiyon Süresi

294 nm dalga boyunda elde edilen esmerleşme yoğunluğu değerlerinin farklı koşullar altında değişimi Şekil 3a-c’de verilmiştir. Bu dalga boyunda da değişimler 420 nm dalga boyu



ile benzer eğilimde bulunmuş olup, bağımsız değişkenlerin minimum olması ile A_{294} değeri maksimum değerini almıştır. Ek olarak Şekil 2a-c ve Şekil 3a-c karşılaştırıldığında, A_{420} ve A_{294} değerlerinin birbiri ile koordineli olduğu da görülmüştür.



Şekil 3: 294 nm Dalga Boyundaki Esmerleşme Yoğunluğuna Bağlı Değişkenlerin Etkisi a) Protein:Şeker Oranı-Reaksiyon Sıcaklığı b) Protein:Şeker Oranı-Reaksiyon Süresi c) Reaksiyon Sıcaklığı- Reaksiyon Süresi



Box–Behnken deney tasarımı ile farklı işlem koşullarında elde edilen örneklerde yapılan analizler sonucunda yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyon yapılmış olup, %FAG oranı minimize, %DG, A₄₂₀ ve A₂₉₄ değerleri maksimize edilmiştir ve optimum koşullar;

- Protein:şeker oranı: 1.6:1
- Reaksiyon sıcaklığı (°C): 60
- Reaksiyon süresi (dk): 90, olarak bulunmuştur.

Optimum koşullar altında tahmini %DG, %FAG, A₄₂₀ ve A₂₉₄ değerleri sırasıyla %58.43, %41.57, 0.48 ve 2.03 olarak elde edilmiş olup, deneyler sırasında bu değerler yine sırasıyla %67.95±1.81, %32.05±1.81, 0.53±0.03 ve 2.24±0.02 olarak elde edilmiştir. Deneysel elde edilen değerler ile optimizasyon elde edilen tahmini değerler arasında tek örneklemli t-testi uygulanarak aralarında fark olmadığı görülmüştür (P>0.05). İstatistiksel sonuçlar Tablo 12’de sunulmuştur. Ek olarak optimizasyon sonucu elde edilen modelin arzu edilebilirlik değeri (d) 0.72 olarak bulunmuştur. Bu durum, modelin uyumlu olduğunun diğer bir göstergesidir.

Tablo 12: Tek Örneklemli t-Testi Analiz Sonuçları (Glikasyon)

Yanıt	N	Ortalama	Standart sapma	P
%DG	3	64.74	5.64	0.191
%FAG	3	35.22	5.64	0.191
A ₄₂₀	3	0.516	0.04	0.254
A ₂₉₄	3	2.172	0.12	0.186

%DG: Glikasyon derecesi, %FAG: Serbest amino gruplarının oranı, A₄₂₀: 420 nm’de esmerleşme yoğunluğu, A₂₉₄: 294 nm’de esmerleşme yoğunluğu

Glikasyon işlemi optimizasyonu sonucunda belirlenen optimum koşullarda KPI ve fruktoz şekeri arasında glikasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonucunda glike edilmiş kenevir protein izolatu (G-KPI) elde edilmiştir. Ayrıca, KPI-şeker (N-G-KPI) kompleksi de kontrol numunesi olarak hazırlanmıştır. Glikasyon, Schiff bazını oluşturmak için indirgen şekerlerdeki karbonil grubunun proteinlerdeki serbest amino gruplarıyla yoğunlaşma reaksiyonu yoluyla meydana gelir ve glikasyon reaksiyonlarının boyutunu karakterize etmek için sıklıkla aşılama derecesi (DG) kullanılır (Ding vd., 2023). Mevcut araştırmada KPI-fruktoz konjugatının (G-KPI) DG değeri %44.58 olarak belirlenmiştir. KPI-fruktoz karışımının (N-G-KPI) DG değeri ise %13.25’dir. Elde edilen bu DG değerleri, ısı işlem olmadan da protein ve şekerler arasında bir bağlantının gerçekleştiğini, ancak ısı işlem ile yani glikasyon reaksiyonuyla bu değerin daha da arttığını göstermektedir. Ayrıca bu değerler KPI-fruktoz numunesinin glikasyon reaksiyonu ile başarılı bir şekilde konjuge edildiğini göstermektedir. Konjugasyonun gerçekleştiği FTIR analiziyle de doğrulanmıştır (Detaylar Bölüm 3.6.2.’de



verilmiştir). Ding vd. (2023) kenevir protein izolatu ve pullulan arasındaki glikosilasyon reaksiyonunun derecesini %6.85 ile %29.33 arasında değişen değerlerde tespit etmiştir. Kenevir protein izolatıyla ilgili literatürde çok farklı çalışmalara rastlanılmaktayken, KPI'nın glikasyonu ile ilgili ilk araştırma (Ding vd., 2023) mevcut çalışma devam ederken yayınlanmıştır. Dolayısıyla bu araştırmanın kenevir protein izolatının glikasyonu ile ilgili ilk çalışmalardan biri olduğu söylenebilir.

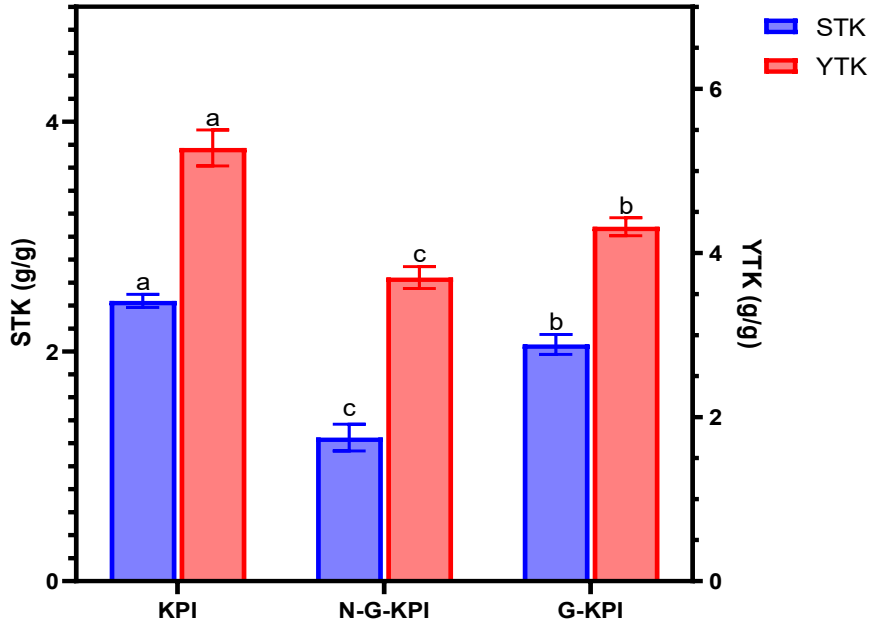
3.4. FONKSİYONEL ÖZELLİKLER

3.4.1. Su ve Yağ Tutma Kapasitesi

Su tutma kapasitesi, protein ve su arasındaki etkileşimin önemli bir göstergesidir (Wang vd., 2018c). Ayrıca bu değerler proteinin, gıdanın viskozitesi, tadı ve dokusuyla ilişkili olan su ve yağı bağlama yeteneğini yansıtmaktadır (Deng vd., 2019). Kenevir proteini izolatının su (STK) ve yağ tutma (YTK) kapasiteleri Şekil 4'de gösterilmiştir. KPI'nın STK ve YTK değerleri sırasıyla 2.44 g su/g protein ve 5.28 g yağ/g protein olarak belirlenmiştir. El-Sohaimy vd. (2022) kenevir proteininin STK değerlerini farklı pH değerlerinde 2.10-4.21 mL su/g protein arasında, YTK değerlerini ise 1.23-2.56 mL yağ/g protein arasında tespit etmişlerdir. Bu çalışmayla benzer şekilde Tang vd. (2006) KPI'nın STK ve YTK değerlerini sırasıyla 3.37 g/g ve 5.27 g/g olarak belirlemişlerdir.

Şekil 4 incelendiğinde, KPI'ya şeker ilavesi ve glikasyon reaksiyonu sonucu STK ve YTK değerleri azalmıştır ve istatistiksel olarak bu farklar önemli ($P \leq 0.05$) etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Ding vd. (2023) kenevir protein izolatını pullulan polisakkarit ile glikosilasyon reaksiyonu yoluyla değiştirmeyi amaçlamışlar ve ardından yapısal ve fonksiyonel özelliklerini karakterize etmişlerdir. Sonuç olarak pullulan polisakkaritinin glikosilasyon reaksiyonu ile KPI'nın STK ve YTK değerlerini arttırdığını bildirmişlerdir. Bunun nedeni olarak ise hidrofilik polisakkaritin yan zincirini devreye sokarak, protein moleküllerinin açıldıktan sonra lipitlerle ve suyla daha iyi birleşmesine olanak tanınmasına bağlamışlardır. Mevcut çalışmada ise molekül ağırlığı nispeten daha düşük olan bir monosakkaritin tercih edilmesi fonksiyonel özelliklerde istenilen artışı sağlayamamıştır. Bunun dışında, literatürde başka protein izolatlarının şeker ilavesiyle fonksiyonel özelliklerinde her zaman istenildiği gibi artışlara sebep olmadığı da rastlanılan bir durumdur. Gu vd. (2009) %10 ile %40 aralığındaki şekerlerin, dispersiyonların pH 6.9'da ısıtılmasından sonra soya protein izolatının STK değerlerini önemli ölçüde azalttığını tespit etmişler ve bunu da ısı kaynaklı denatürasyona karşı soya protein izolatının kısmi stabilizasyonuna atfedilebileceğini bildirmişlerdir. Bu bulgu, bizim çalışmamızda STK ve YTK değerlerinde meydana gelen azalmanın da olası sebebi olduğu düşünülmektedir.





Şekil 4: Kenevir Protein İzolatlarının Su (STK) ve Yağ (YTK) Tutma Kapasiteleri (^{a-c} Farklı üst simge karakterler, aynı özellik için $P \leq 0.05$ düzeyinde önemli farklılıkları göstermektedir.)

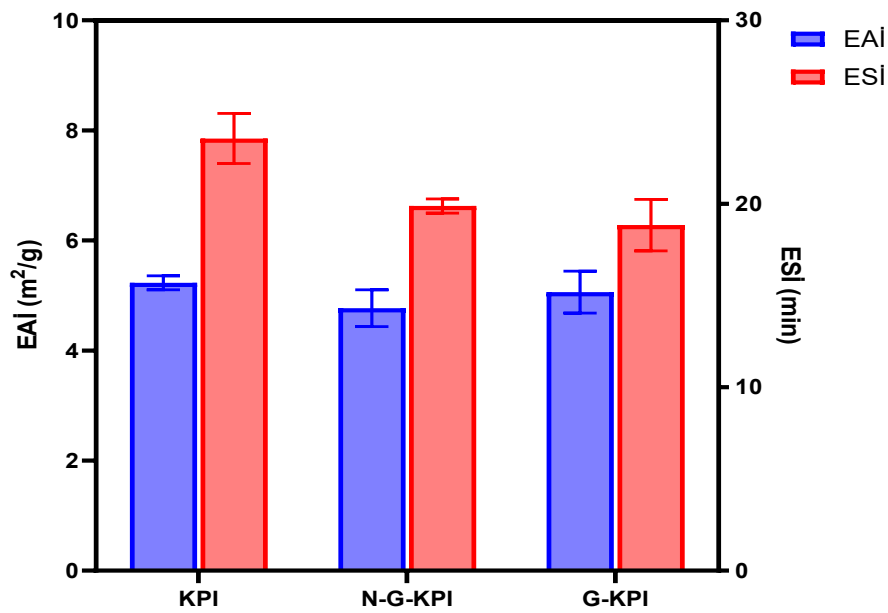
3.4.2. Emülsiyon Özellikleri

Kenevir proteini izolatının emülsifiye edici özellikleri emülsifiye edici aktivite indeksi (EAI) ve emülsiyon stabilite indeksi (ESI) (Şekil 5) aracılığıyla karakterize edilmiştir. EAI, yağ fazının anında birleşmesini önlemek ve dağılmasına yardımcı olmak için proteinin, ara yüzey alanının yeterli kaplamasını hızlı bir şekilde sağlama yeteneğinin bir ölçüsü olarak tanımlanabilir (Onsaard vd., 2010). Emülsiyon stabilite indeksi ise proteinin, elde edilen emülsiyonların faz ayrılmasını önleme yeteneğini yansıtmaktadır (Gao vd., 2022). KPI'nın EAI ve ESI değerleri sırasıyla $5.23 \text{ m}^2/\text{g}$ ve 23.56 dk olarak tespit edilmiştir. Liu vd. (2022) KPI'nın EAI değerini $15.36 \text{ m}^2/\text{g}$ ve ESI değerini 21.36 dk olarak belirlemişlerdir.

Glikasyon reaksiyonu ve şeker ilave edilen kenevir protein izolatları, glike edilmemiş protein izolatına benzer EAI değerleri göstermişlerdir ve kenevir proteininin emülsifikasyon özellikleri üzerine önemsiz ($P > 0.05$) etkisi olduğu belirlenmiştir. Şeker ilavesiyle birlikte protein izolatının ESI değerlerinde ise azalma eğilimi gözlenmektedir. Genel olarak proteinin EAI ve ESI değerlerinin, Maillard reaksiyonu bazlı konjugasyondan sonra geliştirilebileceğine inanılır çünkü bu işlem, karbonhidratlardan hidrofilik zincirlerin kovalent bağlanmasını artırır (Gao vd., 2023). İlginç bir şekilde, mevcut çalışmada durum böyle değildir. Ding vd. (2023) kenevir protein izolatı-pullulan polisakkariti glikosilasyon konjugatlarında, glike edilmemiş kenevir protein izolatına göre EAI ve ESI değerlerinin arttığını bildirmişlerdir. Bunun nedeninin glikosilasyon reaksiyonu sonucunda, protein moleküllerinin artan moleküler ağırlığı ve sterik engeli olduğu bildirilmiştir. Sterik engelin artışı ise glikasyon reaksiyonunun c



fazla hidrofilik grup oluşturmaya atfedilmiştir. Protein moleküllerindeki hidrofobik uç yağ damlacıklarına entegre olabilirken, su damlacıkları şeker molekülleri tarafından çekebilir. Diğer bir deyişle glikosilasyon, proteinin arayüzünü (su/yag) stabilize etmiş ve yağ damlası bir araya gelme eğilimini azalttığı rapor edilmiştir. Bu nedenle emülsifiye özelliklerinde (EAİ ve ESİ) bir iyileşme görülmüş olabilir. Mevcut çalışmada ise glikasyon sırasında şeker olarak monosakkarit kullanılmış olmasından kaynaklı yukarıda belirtilen etkinin görülmediği, dolayısıyla EAİ için yakın değerler belirlenirken ESİ için bir azalma göstermiş olabileceği söylenebilir. Daha öznel bir bakış açısı ile fruktozun düşük moleküler ağırlığı, sterik stabilizasyon sürecini olumsuz etkileyerek (Han vd., 2022), daha küçük EAİ ve ESİ değerleri saptanmış olabilir. Wang vd. (2018b) soya fasulyesi protein izolatı (SPI) kullanarak ıslak ısıtmalı Maillard reaksiyonu yoluyla ksiloz/fruktoz ile iki monosakkaritli konjugasyonun, çözünürlüğü önemli ölçüde arttırdığını, ancak SPI'nin emülsifiye edici aktivitesini azalttığını rapor etmişlerdir.



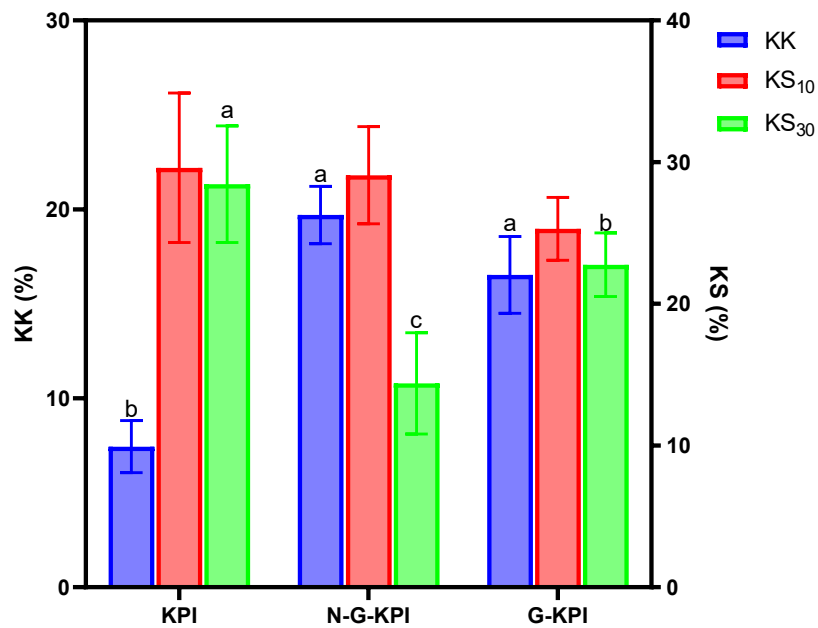
Şekil 5: Kenevir Protein İzolatlarının Emülsifikasyon Özellikleri (EAİ: emülsifiye edici aktivite indeksi, ESİ: emülsiyon stabilite indeksi) (İstatistiksel olarak fark olmadığından gruplarda harflendirme yapılmamıştır.)

3.4.3. Köpüklenme Özellikleri

Köpüklenme kapasitesi (KK) ve köpüklenme stabilitesi (KS), protein moleküllerinin hayati arayüzey özellikleridir (Ding vd., 2023). Kenevir protein izolatlarının köpüklenme özellikleri Şekil 6'da gösterilmiştir. Glike edilmiş proteinin ve şeker karışımının KK'sinin, kenevir proteininkinden önemli ölçüde farklı olduğu ($P \leq 0.05$) ve KPI'nın KK değeri başlangıçta %7.44 olmasına rağmen maksimum %19.7'ye yükseldiği görülmektedir. KS_{10} açısından ise numuneler arasında anlamlı bir fark ($P > 0.05$) gözlenmezken, KS_{30} açısı



örnekler arasında önemli ölçüde fark olduğu ($P \leq 0.05$) belirlenmiştir. Süre ilerledikçe köpük stabilitesi tüm numunelerde beklendiği gibi azalmıştır. Köpürme kapasitesi, proteinin çözünürlüğü ile bağlantılı olduğu ve köpüklenme kapasitesi ile protein konsantrasyonu arasında doğrudan bir ilişki olduğu bilinmektedir. Protein KK değerleri yalnızca hidrofilik/hidrofobik grubun çözünürlüğü ve dengesinden değil, aynı zamanda protein bileşimleri ve yapısal özelliklerinden de etkilenebilir (Fang vd., 2023a). El-Sohaimy vd. (2022) pH 7’de KPI’nın KK değerini %20.3 ve KS değerini %14.9 olarak tespit etmişlerdir. Bu araştırmanın bulgularının, protein konsantrasyonunun %2’ye kadar artırılmasıyla proteinin köpürme kapasitesinin arttığını da belirtmişlerdir. Ding vd. (2023) glikosile edilmiş proteinin KK ve KS’sinin, kenevir proteinininkinden önemli ölçüde farklı olduğunu ($P \leq 0.05$) ve KK’nin başlangıçta %14.20 (KPI) olduğunu ve maksimum %23’e yükseldiğini bildirmişlerdir. Bu olayın, polisakkarit zincirini devreye sokan glikosilasyon modifikasyonuna ve moleküle çok sayıda hidroksil grubunun eklenmesine atfedilebileceğini bildirmişlerdir.



Şekil 6: Kenevir Protein İzolatlarının Köpüklenme Özellikleri (KK: Köpüklenme kapasitesi, KS: köpüklenme stabilitesi) (^{a-c} Farklı üst simge karakterler, aynı özellik için $P \leq 0.05$ düzeyinde önemli farklılıkları göstermektedir. İstatistiksel olarak fark olmayan gruplarda harflendirme yapılmamıştır.)

Literatürde ekseriyetle çalışmalarda glikasyon reaksiyonunun protein izolatlarının STK, YTK, EAI, ESI, KK ve KS değerlerini artırıp iyileştirdiği görülmektedir (Zhang vd., 2015; Pirestani vd., 2017; Chen vd., 2019; Meng vd., 2019; Zhong vd., 2019; Ma vd., 2020; Tas vd., 2021; Zhao vd., 2021; Ding vd., 2023). Ancak mevcut çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu şekilde olan ve bu özelliklerin azaldığını bildiren çalışmalara da rastlanılmaktadır (Gu vd., 2009; Álvarez vd., 2012; Wang vd., 2018b; Zha vd., 2019; Gao vd., 2023). Dolayısıyla mevcut



çalışmada tespit edilen sonuçların nedenlerini araştırmak gelecekte önemli bir çalışma alanı oluşturmaktadır.

3.5. TOPLAM FENOLİK-FLAVONOİD BİLEŞİK VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTE

KPI, G-KPI ve N-G-KPI örneklerinin toplam fenolik-flavonoid bileşik ve antioksidan aktivite değerleri belirlenmiş edilmiş olup sonuçlar Tablo 13’de verilmiştir.

Tablo 13: Örneklerin Toplam Fenolik-Flavonoid Bileşik ve Antioksidan Aktivite Değerleri

Örnekler	TFB (mg GAE/g)	DPPH• (mg TE/g)	FRAP (mg TE/g)	CUPRAC (mg TE/g)	TFlaB (mg KE/g)
KPI	21.18±1.03 ^a	3.77±0.44 ^a	125.34±4.45 ^a	30.60±0.38 ^a	7.16±0.00 ^a
G-KPI	18.16±0.83 ^{ab}	1.10±0.02 ^b	79.24±0.64 ^b	24.43±1.08 ^b	6.05±0.01 ^b
N-G-KPI	17.26±0.91 ^b	1.21±0.21 ^b	79.24±1.91 ^b	22.77±1.27 ^b	5.89±0.03 ^c

Değerler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir, n=2. ^{a-c} Farklı üst simge karakterler, bir sütun içinde P≤0.05 düzeyinde önemli farklılıkları göstermektedir. KPI: Kenevir protein izolatu, G-KPI: Glike edilmiş kenevir protein izolatu, N-G-KPI: Kenevir protein izolatu+şeker kompleksi, TFB: Toplam fenolik bileşik, DPPH•: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil, FRAP: Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç, CUPRAC: Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite, TFlaB: Toplam flavonoid bileşik.

3.5.1. Toplam Fenolik Bileşik (TFB)

Kenevir tohumlarındaki renk ve acı tat, fenoliklere ve polimerizasyon bileşiklerine atfedilebilmektedir (Karabulut vd., 2023). Bu çalışmada elde edilen kenevir proteini izolatlarının TFB değerleri Tablo 13’de görülmektedir. En yüksek TFB değeri 21.18 mg GAE/g ile KPI örneğinde elde edilmiş olup, G-KPI örneği ile aralarında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır (P≤0.05). N-G-KPI örneği ise G-KPI ile benzer olmasına rağmen, 17.26 mg GAE/g değeri ile en düşük TFB içeriğine sahip grup olmuştur. KPI ile şeker kombinasyonu TFB içeriğinde düşüşe neden olmuştur. Hadnađev vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, kenevir tohumu küspesinden protein izolatları alkali ekstraksiyon/izoelektrik çöktürme (HPI) ve miselleştirme (HMI) prosedürleri kullanılarak hazırlanmış ve fizikokimyasal özellikleri ve işlevsellikleri açısından karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, HMI ve HPI için TFB değerleri sırasıyla 1.01 ve 1.40 mg GAE/g taze örnek olarak bulunmuş olup, HMI izolatlarındaki TFB değeri HPI ile karşılaştırıldığında %28 daha düşük olduğu saptanmıştır. Diğer bir çalışmada Potin vd. (2019) kenevire farklı tuz konsantrasyonu, pH ve katı madde oranlarında ekstraksiyon uygulayarak elde ettikleri proteinin TFB değerlerinin 0.1-0.8 mg GAE/g aralığında değiştiğini ve değerlerin pH artışı ile doğru orantılı olduğunu tespit etmişlerdir. Yine Potin vd. (2022) tarafından kenevir protein konsantresi, yüksek alkali pH’da (10 ve 12) ekstraksiyon ve ardından bir ultrafiltrasyon/diyafiltrasyon (UF) saflaştırma aşaması ve püskürtmeli kurutma ile kenevir tohumu kekinden elde edilmiştir. pH 10 olduğunda 33 mg GAE/g olan TFB değeri UF işlemi ile 31.5 mg GAE/g değerine, pH 12 olduğunda 35.1 mg GAE/g olan değerin ise UF işlemi ile 32.5 mg GAE/g değerine düştüğü belirtilmiştir. Diğer bir deyişle, farklı pH değerlerindeki



değerinin UF işlemi ile %5-7 oranında azaldığı görülmüştür. Bu durumun nedeninin ise fenolik bileşiklerin protein, lipidler veya polisakkaritler gibi diğer makromoleküllerle spesifik olmayan veya kovalent etkileşimler yoluyla kompleksleşmesinden kaynaklı olduğunu rapor etmişlerdir. Farklı materyallerden elde edilen izolatlar incelendiğinde, Fernando ve Manthey (2022) fasulye proteini izolatının TFB değerini 13.06 mg GAE/g olarak hesaplamışlardır. Yan vd. (2020) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise tarçın ağacı tohumu çekirdeğinden elde edilen protein izolatında bu değer 1.7 mg GAE/g olarak bulunmuştur.

3.5.2. Antioksidan Aktivite

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşturduğu oksidasyon sürecini geciktirebilen veya durdurabilen bileşiklerdir ve fenolik bileşikler gibi çeşitli kimyasal sınıflara ait doğal maddeler olarak bilinirler (Pisoschi ve Pop, 2015; Benkirane vd., 2022). Kenevir protein izolatlarının antioksidan aktivite değerleri DPPH•, FRAP ve CUPRAC yöntemleri ile belirlenmiş olup Tablo 13'de verilmiştir. Değerler incelendiğinde, KPI örneklerinin DPPH•, FRAP ve CUPRAC değerlerinin G-KPI ve N-G-KPI örneklerinden istatistiksel olarak daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum TFB sonuçlarında olduğu gibi, izolatın şeker ile kombinasyonu ile antioksidan aktivitesinde azalma olduğunun göstergesidir. Diğer bir deyişle şeker eklenmesi ile DPPH• değerlerinde ortalama %70, FRAP değerlerinde ortalama %37 ve CUPRAC değerlerinde ise ortalama %23 oranında düşüş gözlenmiştir. Benzer bulgular Wang vd. (2013) tarafından buğday protein izolatlarının farklı şekerler ile ısıtma yöntemiyle modifikasyonu sonucunda da saptanmıştır. Bunun yanı sıra bizim çalışmamızda, G-KPI ile N-G-KPI örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemesi, termal işlemin antioksidan aktivite üzerine etkisinin olmadığına bir göstergesidir. Literatürde yapılan bazı çalışmalar, protein izolatlarının yüksek DPPH• veya diğer yöntemlerle belirlenen antioksidan aktivitelerinin, yüksek hidrofobiklik ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Li vd., 2008; Pownall vd., 2010; Girgih vd., 2011). Bu bulgu bizim çalışmamızla da uyumlu bulunmuştur. STK değerlerine bakıldığında, en yüksek KPI örneğinde elde edildiği görülmektedir. Kenevir tohumu proteininden farklı olarak, Yan vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, tarçın ağacı tohumu çekirdeğinden elde edilen protein izolatında DPPH•, FRAP ve CUPRAC değerleri sırasıyla 35, 40 ve 25 µmol TE/g olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak şeker kompleksi içeren örneklerin antioksidan aktivite değerleri KPI'ye göre azalmış gibi görünse de miktar olarak önemli derecede ihtiva etmektedir.



3.5.3. Toplam Flavonoid Bileşik (TFlaB)

Flavonoidler, bitkilerde antimikrobiyal, antialerjik ve antiinflamatuvar etkiye sahip önemli antioksidanlardır (Munteanu vd., 2023). Bu çalışmada elde edilen kenevir proteini izolatlarının TFlaB değerleri Tablo 13’de görülmektedir. KPI, G-KPI ve N-G-KPI örneklerinin TFlaB değerleri sırasıyla 7.16, 6.05 ve 5.89 mg KE/g olarak hesaplanmış olup istatistiksel olarak birbirlerinden farklı bulunmuştur ($P \leq 0.05$). Başka bir deyişle, TFlaB değeri şeker kullanımı ile ortalama %16 oranında düşmüştür. Bu eğilim hem TFB hem de antioksidan aktivite sonuçlarında da görülmüştür. Dia vd. (2019) yaptıkları bir çalışmada, kenevir protein izolatının TFlaB miktarını 1.1 mg KE/g olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda bu değer daha yüksek elde edilmiştir. Bunun nedeninin de iki çalışmada uygulanan ekstraksiyon prosesindeki farklılıklar olduğu söylenebilir. Farklı hammaddeler incelendiğinde, Saraiva vd. (2021) bira yapımında atık olarak oluşan tortunun (trub) protein izolatının flavonoid içeriğinin 4.06 mg KE/g olduğu rapor edilmiştir.

Korelasyon (Pearson – r) katsayısı değişkenler arasındaki korelasyonu anlamak veya doğrusallığı hakkında bilgi almak için kullanılmaktadır. Bu değer -1 (güçlü negatif korelasyon) ile +1 (güçlü pozitif korelasyon) aralığında olmaktadır. Değer sıfıra yakın olduğunda korelasyonun olmadığı anlamına gelmektedir (Asuero vd., 2006). KPI, G-KPI ve N-G-KPI örneklerinin toplam fenolik-flavonoid bileşik ve antioksidan aktivite değerlerinin birbirleri ile korelasyonunun gösteren Pearson katsayıları Tablo 14’de verilmiştir. Toplam fenolik-flavonoid bileşik ve antioksidan aktivite değerlerinin birbirleri ile interaksyonu incelendiğinde, yüksek pozitif bir korelasyon olduğu saptanmıştır. Bizim bulgularımıza benzer olarak, Dia vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada da kenevir protein izolatının biyoaktif bileşiklerinin uyumunun oldukça yüksek olduğu rapor edilmiştir.

Tablo 14: KPI, G-KPI ve N-G-KPI Örneklerinin Toplam Fenolik-Flavonoid Bileşik ve Antioksidan Aktivite Değerlerinin Birbirleriyle Olan Korelasyonunu Gösteren Pearson Katsayıları

Bileşikler	TFB	DPPH•	FRAP	CUPRAC	TFlaB
TFB	1.0000				
DPPH•	0.8702	1.0000			
FRAP	0.9193	0.9677	1.0000		
CUPRAC	0.9080	0.9552	0.9442	1.0000	
TFlaB	0.9283	0.9767	0.9880	0.9795	1.0000

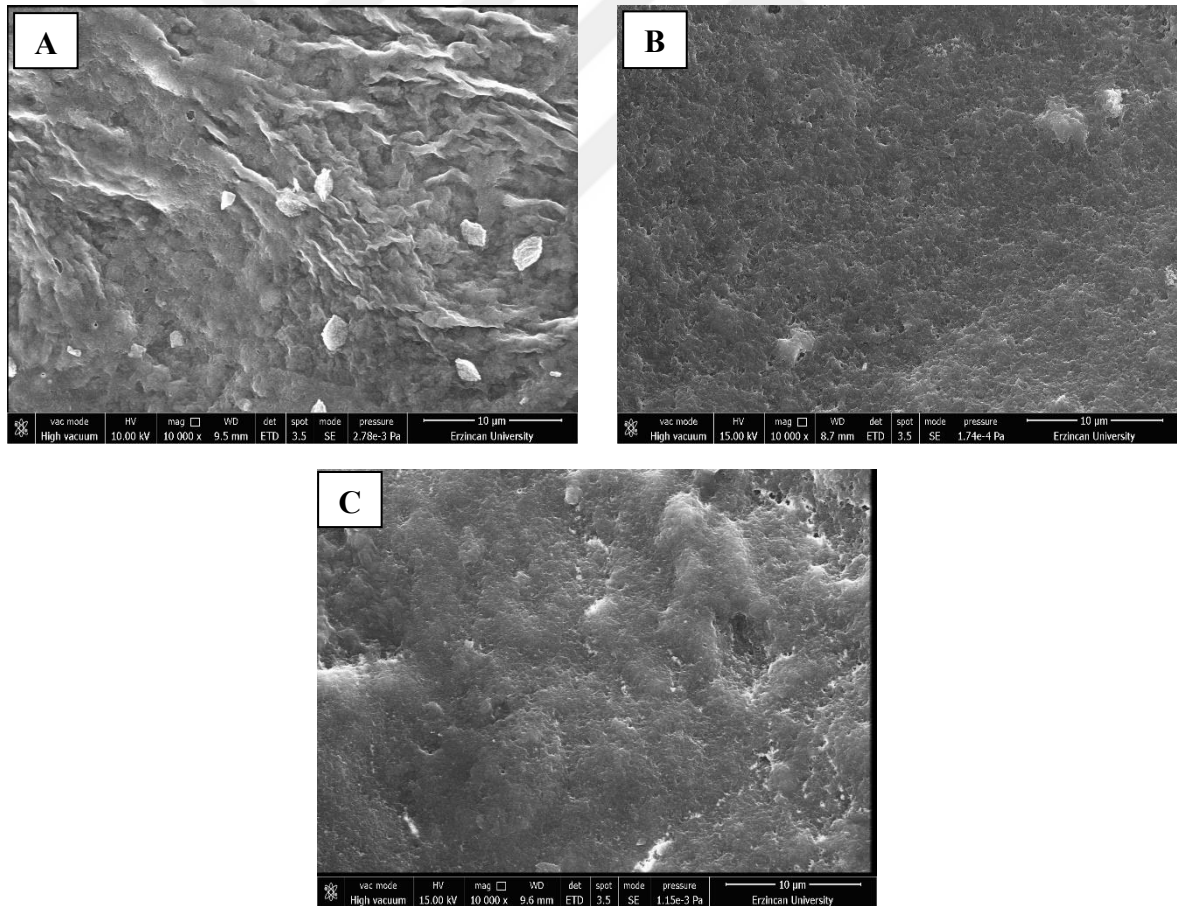
TFB: Toplam fenolik bileşik, DPPH•: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil, FRAP: Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç, CUPRAC: Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite, TFlaB: Toplam flavonoid bileşik



3.6. FİZİKSEL VE KİMYASAL KARAKTERİZASYON

3.6.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Protein izolatlarının SEM görüntüleri Şekil 7’de sunulmuştur. Toz haline getirilmiş numunelerin düzensiz, pul pul bir şekil, pürüzlü yüzeylerin olması ve dondurarak kurutma tekniği uygulanarak elde edilen suyu alınmış ürünlere özgü kompakt, düzensiz bir yüzey morfolojisi sergiledikleri görülmektedir. Elde edilen SEM mikrografları, FTIR spektrumlarında gösterildiği gibi (Bölüm 3.6.2.’de detaylandırılmıştır), KPI ve şeker arasındaki ilişkilerin varlığını da gösterebilir. KPI ve fruktoz arasındaki etkileşimler süngerimsi üç boyutlu bir mikro yapıya yol açmış (Şekil 7B ve C), gözenekli yüzey farklı boyutlarda boşluklardan ve iç içe geçmiş vakuollerden oluştuğu söylenebilir. Fakat G-KPI ve N-G-KPI karışımları için SEM mikrografları, tanımlanabilir bir bağ göstermemektedir (Şekil 7B ve C). Buna karşılık, konjugasyonun bir sonucu olarak partikül yapısında ve şeklinde bazı değişiklikler meydana gelmiştir. Görüntüler, KPI ve şeker bileşenleri için aralarında kovalent bağların oluşumunu gösteren çok kompakt bir rasgele mikro yapı göstermektedir.



Şekil 7: KPI (A), G-KPI (B) ve N-G-KPI (C) Örneklerinin SEM Mikrografları (10.000x)

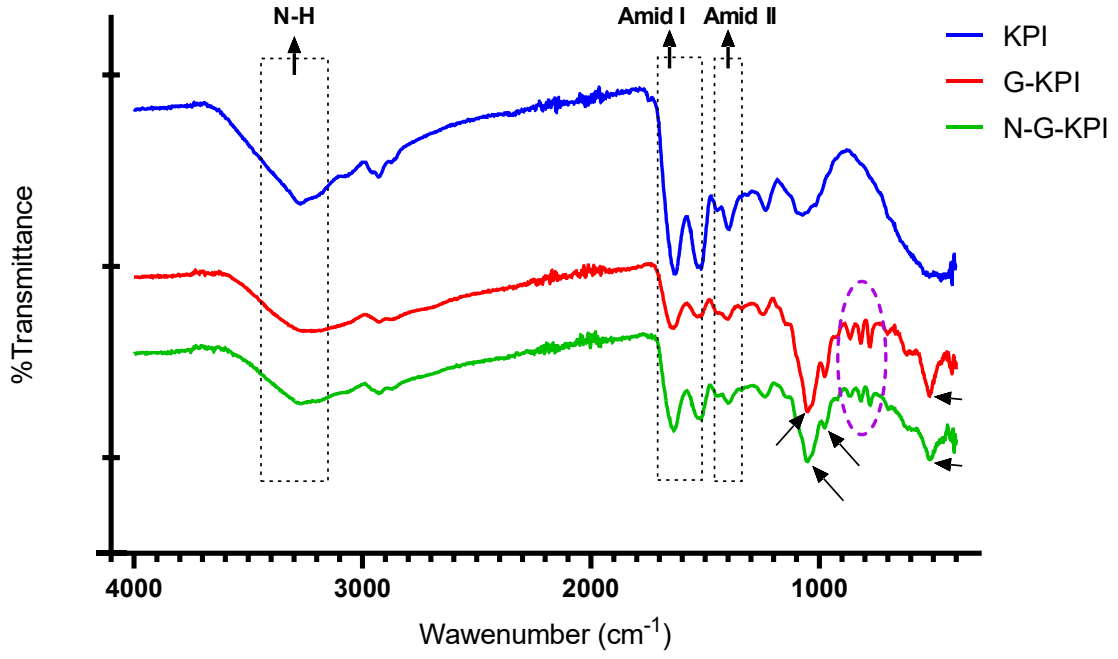


3.6.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR)

Şeker ilavesi ve glikasyon reaksiyonunun proteinin ikincil yapısı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla Fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi kullanılmıştır. KPI, G-KPI ve N-G-KPI'nın IR spektrumları (Şekil 8) çoğunlukla bir karbonil (C=O) gerilme titreşimi olan Amid I bandına (1632 cm^{-1}) karşılık gelen karakteristik bölgelerden, Amid II bandından (1515 cm^{-1}) ve Amid III bandından (1234 cm^{-1}) oluşmuştur. Proteinlerin karakteristik bantları, sırasıyla yaklaşık 1700 ila 1600 cm^{-1} , 1550 – 1450 cm^{-1} ve 1229 – 1301 cm^{-1} arasındaki Amid I, II ve III bantlarıdır. Amid I esas olarak amino grubunun C=O gerilme titreşimini, Amid II esas olarak NH gerilmesini ve Amid III ise NH bükülmesi ve CN gerilmesinin bir kombinasyonunu temsil eder. Ek olarak, Şekil 8 incelendiğinde alifatik birincil amin için 3400 – 3300 cm^{-1} civarında NH gerilmesiyle ilişkili bir geniş bir tepenin daha ortaya çıktığı görülmektedir. Kenevir protein izolatlarının FTIR spektrumları yapılan diğer çalışmalarla uyum içerisindedir (Hadnadev vd., 2018; Plati vd., 2021; El-Sohaimy vd., 2022; Karabulut vd., 2022; Ding vd., 2023).

Glike edilmiş konjuge numunelerde 516 , 700 , 778 , 816 , 864 , 975 ve 1050 cm^{-1} 'deki (fruktoz için belirtilen bölgeler) absorpsiyon KPI'ye kıyasla önemli ölçüde arttığı görülmektedir. Bu durum Şekil 9'de detaylı bir şekilde gösterilmiştir. Dolayısıyla bu gözlem, proteinlerin polisakkaritlerle kovalent bağlanmasını açıklamak için güvenilir nedenler sunabilir (Guan vd., 2006). Ayrıca, glike edilmiş olan G-KPI (3211 cm^{-1}), KPI (3271 cm^{-1}) ile karşılaştırıldığında 3300 – 3200 cm^{-1} 'de daha güçlü absorpsiyon göstermiştir; bu durum polisakkarit zincirinin indirgeyici ucunun amino asitlerle kovalent olarak birleştirildiğini, dolayısıyla N-H'nin gerilme titreşimine neden olduğunu göstermektedir. Ding vd. (2023) N-H gerilme bölgesinde pullulan'ın KPI glikosile edilmiş numunenin 3300 cm^{-1} 'de daha yaygın bir absorpsiyon gösterdiğini tespit etmişlerdir.





Şekil 8: Kenevir Tohumu Protein İzolatlarının FTIR Spektrumları (KPI: Kenevir Protein İzolatı, G-KPI: Glike Edilmiş Kenevir Protein İzolatı, N-G-KPI: Kenevir Protein İzolatı+Şeker Kompleksi)



SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç

Ülkemizde kenevir ekim alanları son 10 yıllık süreç içerisinde iyice azalmış olmasına rağmen, son iki-üç yıl içerisinde piyasadan gelen talepler ve değişen devlet politikaları üzerine tekrar artış eğilimine girmiştir. Özellikle son dönemlerde vegan beslenme kültürünün daha fazla kişi tarafından benimsenmesi ile bitki-bazlı proteine talep de artmaktadır. Bu tez kapsamında, ülkemizde gün geçtikçe önemi artan kenevirin daha farklı alanlarda kullanılabilirliğini araştırmak ve kenevir proteinlerinin tekno-fonksiyonel özelliklerini incelenerek, modifikasyon teknikleri uygulanmıştır. Yanıt yüzey metodunu (RSM) kullanılarak ekstraksiyon koşulları optimize edilmiş ve tuz konsantrasyonunun 0, pH değerinin 12 ve sıcaklığın 49 °C olduğu koşullar optimum olarak bulunmuştur. Bu koşullarda elde edilen protein izolatları (KPI), fonksiyonel özelliklerinin değiştirilmesi için glikasyon işlemine tabi tutulmuş ve bunun için de yine yanıt yüzey metodu kullanarak glikasyon reaksiyonu optimize edilmiştir. Glikasyon için optimum koşullar ise en uygun glikasyon dereceleri ve esmerleşme indekslerinin elde edildiği protein:şeker (fruktoz) oranının 1.6:1, sıcaklığın 60 °C ve sürenin 90 dk olduğu durumda saptanmıştır. Son olarak optimum koşullarda glike edilen protein izolatlarının (G-KPI) fonksiyonel, toplam fenolik-flavonoid bileşik miktarları, antioksidan aktivite değerleri ve karakterizasyonu araştırılmıştır. Karşılaştırma amacıyla KPI ve G-KPI örneklerine ek olarak şeker ile kompleks oluşturulmuş ama glike edilmemiş olan N-G-KPI örneği de kullanılmıştır.

Elde edilen sonuçlar irdelendiğinde, KPI ve KPI-fruktoz kompleksleri (G-KPI ve N-G-KPI) arasında gerçekleşen yapılar ve fizyokimyasal özellikler açısından önemli farklılıklar görülmüştür. G-KPI örnekleri glikasyon reaksiyonu ile başarılı bir şekilde konjuge edilmesine rağmen, köpük kapasitesi (KK) hariç diğer fonksiyonel özelliklerinde KPI örneklerine göre herhangi bir artış gözlenmemiştir. Konjugasyonun gerçekleştiği FTIR analizi sonuçları ile de doğrulanmıştır. Sonuçlar, optimal reaksiyon koşullarının üretilen KPI-fruktoz konjugatlarının verimli bir şekilde elde edilmesine olanak sağladığını göstermektedir. Elde edilen SEM görüntüleri, FTIR spektrumlarını destekler nitelikte, KPI ve şeker arasındaki ilişkilerin varlığını göstermektedir. KPI ve fruktoz arasındaki etkileşimler süngerimsi üç boyutlu bir mikro yapıya yol açmış, gözenekli yüzey farklı boyutlarda boşluklardan ve iç içe geçmiş vakuollerden oluştuğu söylenebilir. Konjugasyonun bir sonucu olarak partikül yapısında ve şeklinde bazı değişiklikler meydana gelmiştir. Toplam fenolik-flavonoid bileşik ve antioksidan aktivite değerleri karşılaştırıldığında, KPI örneklerinin daha yüksek miktarda bu bileşikleri ihtiva ettiği görülmüştür, fakat G-KPI ve N-G-KPI örnekleri de önemli düzeyde toplam fenolik-flavonoid



bileşik ve antioksidan aktivite içermektedir. Ek olarak, toplam fenolik-flavonoid bileşik ve antioksidan aktivite değerleri arasında yüksek pozitif bir korelasyon olduğu saptanmıştır.

Öneriler

Tüm bu bulgular ışığında, mevcut çalışma monosakkaritlerin glikasyonunun nasıl kontrol edileceği açısından önemli bilgiler sunmaktadır. Ayrıca, gelecekte protein izolatlarının fonksiyonel özelliklerindeki değişimleri değerlendirebilmek için bileşimi ve yapısal özellikleri hakkında daha detaylı incelemeler yapılması gerektiği önerilmektedir. Bu çalışma baz alınarak devamında daha geniş bütçeli ve kapsamlı projeler/tezler geliştirilerek, kenevir protein izolatının gıdalarda (örneğin kek, mayonez gibi) emülgatör ve stabilizatör olarak kullanımının etkilerinin araştırılabileceği düşünülmektedir.



KAYNAKÇA

- Achouri, A., Boye, J. I., Yaylayan, V. A., & Yeboah, F. K. (2005). Functional properties of glycated soy 11S glycinin. *Journal of Food Science*, 70(4), C269-C274.
- Alonso-Esteban, J. I., González-Fernández, M. J., Fabrikov, D., Torija-Isasa, E., Sánchez-Mata, M. D. C., & Guil-Guerrero, J. L. (2020). Hemp (*cannabis sativa* L.) varieties: Fatty acid profiles and upgrading of γ -linolenic acid-containing hemp seed oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 122(7), 1900445.
- Alonso-Esteban, J. I., Pinela, J., Ćirić, A., Calhelha, R. C., Soković, M., Ferreira, I. C., F. R., Barros, L., Torija-Isasa, E., & de Cortes Sánchez-Mata, M. (2022). Chemical composition and biological activities of whole and dehulled hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds. *Food Chemistry*, 374, 131754.
- Aluko, R. E. (2017). *Hemp seed (Cannabis sativa L.) proteins: Composition, structure, enzymatic modification, and functional or bioactive properties*. In Sustainable protein sources (pp. 121-132). Academic Press.
- Álvarez, C., García, V., Rendueles, M., & Díaz, M. (2012). Functional properties of isolated porcine blood proteins modified by Maillard's reaction. *Food Hydrocolloids*, 28(2), 267-274.
- AOAC. (2000). *AOAC official method 940.25 nitrogen (total) in seafood*. First action 1940, Official Methods of Analysis of AOAC International 17th Edition.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Asuero, A. G., Sayago, A., & González, A. G. (2006). The correlation coefficient: An overview. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36(1), 41-59.
- Aydemir, L. Y., & Yemenicioğlu, A. (2013). Potential of Turkish Kabuli type chickpea and green and red lentil cultivars as source of soy and animal origin functional protein alternatives. *LWT-Food Science and Technology*, 50(2), 686-694.
- Babiker, E. E., Uslu, N., Al Juhaimi, F., Ahmed, I. A. M., Ghafoor, K., Özcan, M. M., & Almusallam, I. A. (2021). Effect of roasting on antioxidative properties, polyphenol profile and fatty acids composition of hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds. *LWT-Food Science and Technology*, 139, 110537.
- Banovic, M., Arvola, A., Pennanen, K., Duta, D. E., Brückner-Gühmann, M., Lähtenmäki, L., & Grunert, K. G. (2018). Foods with increased protein content: A qualitative study on European consumer preferences and perceptions. *Appetite*, 125, 233-243.
- Benkirane, C., Moumen, A. B., Fauconnier, M. L., Belhaj, K., Abid, M., Caid, H. S., Elamrani, A., & Mansouri, F. (2022). Bioactive compounds from hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds: Optimization of phenolic antioxidant extraction using simplex lattice mixture design and HPLC-DAD/ESI-MS 2 analysis. *RSC Advances*, 12(39), 25764-25777.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escalera, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.
- Box, G. E., & Behnken, D. W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2(4), 455-475.



- Box, G. E., & Draper, N. R. (2007). Response surfaces. *Mixtures, and Ridge Analyses*, 649.
- 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.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bu, G., Ren, M., Zuo, Y., & Zhao, C. (2022). Functional characteristics and structural properties of soybean protein isolate–maltose conjugates. *Cereal Chemistry*, 99(1), 100-110.
- Cano-Medina, A., Jiménez-Islas, H., Dendooven, L., Herrera, R. P., González-Alatorre, G., & Escamilla-Silva, E. M. (2011). Emulsifying and foaming capacity and emulsion and foam stability of sesame protein concentrates. *Food Research International*, 44(3), 684-692.
- Chandra, S., Khan, S., Avula, B., Lata, H., Yang, M. H., ElSohly, M. A., & Khan, I. A. (2014). Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: A comparative study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014(1), 253875.
- Chang, C., Su, Y., Gu, L., Li, J., & Yang, Y. (2021). Microwave induced glycosylation of egg white protein: study on physicochemical properties and baking performance. *Food Hydrocolloids*, 118, 106569.
- Chen, W., Ma, X., Wang, W., Lv, R., Guo, M., Ding, T., Ye, X., Miao, S., & Liu, D. (2019). Preparation of modified whey protein isolate with gum acacia by ultrasound maillard reaction. *Food Hydrocolloids*, 95, 298-307.
- Damodaran, S. (2008). Amino acids, peptides and proteins. *Fennema's Food Chemistry*, 4, 425-439.
- De Oliveira, F. C., Coimbra, J. S. D. R., de Oliveira, E. B., Zuñiga, A. D. G., & Rojas, E. E. G. (2016). Food protein-polysaccharide conjugates obtained via the Maillard reaction: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(7), 1108-1125.
- Deng, Y., Huang, L., Zhang, C., Xie, P., Cheng, J., Wang, X., & Li, S. (2019). Physicochemical and functional properties of Chinese quince seed protein isolate. *Food Chemistry*, 283, 539-548.
- Dia, V. P., Wang, Z., Lin, Y., & Pangloli, P. (2019). Comparative biological activities determination of aqueous extracts of hempseed oil and hempseed protein isolate production coproducts. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 96(11), 1265-1274.
- Diftis, N., & Kiosseoglou, V. (2004). Competitive adsorption between a dry-heated soy protein–dextran mixture and surface-active materials in oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 18(4), 639-646.
- Ding, Z., Jiang, F., Liu, K., Gong, F., Liu, Y., Zheng, Z., & Xu, Y. J. (2023). Structural and functional characteristics of hemp protein isolate–pullulan polysaccharide glycosylation conjugate in an aqueous model system. *Foods*, 12(7), 1416.
- Doğan, N., & Doğan, C. (2021). Mucizevi bitki kenevir'in (*Cannabis sativa* L.) gıda endüstrisinde kullanımı. *Bozok Veterinary Sciences*, 2(2), 47-56.
- Doost, A. S., Dewettinck, K., Devlieghere, F., & Van der Meeren, P. (2018). Influence of non-ionic emulsifier type on the stability of cinnamaldehyde nanoemulsions: A comparison of polysorbate 80 and hydrophobically modified inulin. *Food Chemistry*, 258, 237-244.



- El-Sohaimy, S. A., Androsova, N. V., Toshev, A. D., & El Enshasy, H. A. (2022). Nutritional quality, chemical, and functional characteristics of hemp (*Cannabis sativa ssp. sativa*) protein isolate. *Plants*, 11(21), 2825.
- Ertugrul, U., Namli, S., Tas, O., Kocadagli, T., Gokmen, V., Sumnu, S. G., & Oztop, M. H. (2021). Pea protein properties are altered following glycation by microwave heating. *LWT-Food Science and Technology*, 150, 111939.
- Fang, B., Gu, Z., Ohm, J. B., Chen, B., & Rao, J. (2023a). Reverse micelles extraction of hemp protein isolate: Impact of defatting process on protein structure, functionality, and aromatic profile. *Food Hydrocolloids*, 135, 108158.
- Fang, B., Chang, L., Ohm, J. B., Chen, B., & Rao, J. (2023b). Structural, functional properties, and volatile profile of hemp protein isolate as affected by extraction method: Alkaline extraction–isoelectric precipitation vs salt extraction. *Food Chemistry*, 405, 135001.
- Feng, S., Zhang, S., Jiang, M., Liu, F., Chen, K., & Zhang, Y. (2023). Effects of glycation methods on the interfacial behavior and emulsifying performance of soy protein isolate–gum Arabic conjugates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 233, 123554.
- Fernando, S., & Manthey, F. A. (2022). Soluble phenolic compounds affect functional and rheological properties of black bean protein isolates. *Cereal Chemistry*, 99(1), 119-129.
- Fox, N., & Ward, K. (2008). Health, ethics and environment: A qualitative study of vegetarian motivations. *Appetite*, 50(2-3), 422-429.
- Friedman, M. (1996). Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 6-29.
- Galves, C., Stone, A. K., Szarko, J., Liu, S., Shafer, K., Hargreaves, J., Siarkowski, M., & Nickerson, M. T. (2019). Effect of pH and defatting on the functional attributes of safflower, sunflower, canola, and hemp protein concentrates. *Cereal Chemistry*, 96(6), 1036-1047.
- Gan, H. E., Karim, R., Muhammad, S. K. S., Bakar, J. A., Hashim, D. M., & Rahman, R. A. (2007). Optimization of the basic formulation of a traditional baked cassava cake using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 40(4), 611-618.
- Gao, K., Zha, F., Yang, Z., Rao, J., & Chen, B. (2022). Structure characteristics and functionality of water-soluble fraction from high-intensity ultrasound treated pea protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 125, 107409.
- Gao, K., Chang, L., Xu, Y., Rao, J., & Chen, B. (2023). Water-soluble fraction of pea protein isolate is critical for the functionality of protein-glucose conjugates obtained via wet-heating Maillard reaction. *Food Research International*, 174, 113503.
- Gerrard, J. A., Brown, P. K., & Fayle, S. E. (2003). Maillard crosslinking of food proteins III: The effects of glutaraldehyde, formaldehyde and glyceraldehyde upon bread and croissants. *Food Chemistry*, 80(1), 45-50.
- Girgih, A. T., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2011). In vitro antioxidant properties of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate fractions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 381-389.
- Gómez-Arellano, A., Jiménez-Islas, H., Castrejón-González, E. O., Medina-Torres, L., Dendooven, L., & Escamilla-Silva, E. M. (2017). Rheological behaviour of sesame (*Sesamum indicum* L.) protein dispersions. *Food and Bioproducts Processing*, 106, 201-208.



- Granato, D., Ribeiro, J. C. B., Castro, I. A., & Masson, M. L. (2010). Sensory evaluation and physicochemical optimisation of soy-based desserts using response surface methodology. *Food Chemistry*, 121(3), 899-906.
- Gu, X., Campbell, L. J., & Euston, S. R. (2009). Influence of sugars on the characteristics of glucono- δ -lactone-induced soy protein isolate gels. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 314-326.
- Guan, J. J., Qiu, A. Y., Liu, X. Y., Hua, Y. F., & Ma, Y. H. (2006). Microwave improvement of soy protein isolate-saccharide graft reactions. *Food Chemistry*, 97(4), 577-585.
- Gündoğan, R., & Karaca, A. C. (2020). Physicochemical and functional properties of proteins isolated from local beans of Turkey. *LWT-Food Science and Technology*, 130, 109609.
- Hadnađev, M., Dapčević-Hadnađev, T., Lazaridou, A., Moschakis, T., Michaelidou, A. M., Popović, S., & Biliaderis, C. G. (2018). Hempseed meal protein isolates prepared by different isolation techniques. Part I. Physicochemical properties. *Food Hydrocolloids*, 79, 526-533.
- Han, L., Zhou, S., Zhang, X., Lu, K., Qi, B., & Li, Y. (2022). Effect of carbohydrate type on the structural and functional properties of Maillard-reacted black bean protein. *Journal of Food Science*, 87(1), 165-177.
- Hanrahan, G., & Lu, K. (2006). Application of factorial and response surface methodology in modern experimental design and optimization. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36(3-4), 141-151.
- He, M., Li, L., Wu, C., Zheng, L., Jiang, L., Huang, Y., Teng F., & Li, Y. (2021). Effects of glycation and acylation on the structural characteristics and physicochemical properties of soy protein isolate. *Journal of Food Science*, 86(5), 1737-1750.
- House, J. D., Neufeld, J., & Leson, G. (2010). Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(22), 11801-11807.
- Jiang, S., Wang, T., Chen, K., Wang, H., & Meng, X. (2023). Assessment of the effect of glycation on the allergenicity of sesame proteins. *Food Research International*, 168, 112771.
- Kahraman, O., Petersen, G. E., & Fields, C. (2022). Physicochemical and functional modifications of hemp protein concentrate by the application of ultrasonication and pH shifting treatments. *Foods*, 11(4), 587.
- Karabulut, G., & Yemiş, O. (2022). Modification of hemp seed protein isolate (*Cannabis sativa* L.) by high-intensity ultrasound treatment. Part 1: Functional properties. *Food Chemistry*, 375, 131843.
- Karabulut, G., Feng, H., & Yemiş, O. (2022). Physicochemical and antioxidant properties of industrial hemp seed protein isolate treated by high-intensity ultrasound. *Plant Foods for Human Nutrition*, 77(4), 577-583.
- 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*, 127240.
- Kutzli, I., Weiss, J., & Gibis, M. (2021). Glycation of plant proteins via Maillard reaction: reaction chemistry, technofunctional properties, and potential food application. *Foods*, 10(2), 376.



- Lamidi, S., Olaleye, N., Bankole, Y., Obalola, A., Aribike, E., & Adigun, I. (2022). *Applications of response surface methodology (RSM) in product design, development, and process optimization*. IntechOpen.
- Leonard, W., Zhang, P., Ying, D., & Fang, Z. (2020). Hempseed in food industry: Nutritional value, health benefits, and industrial applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(1), 282-308.
- Lertittikul, W., Benjakul, S., & Tanaka, M. (2007). Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein–glucose model system as influenced by pH. *Food Chemistry*, 100(2), 669-677.
- Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., & Liu, J. (2008). Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry*, 106(2), 444-450.
- Li, R., Cui, Q., Wang, G., Liu, J., Chen, S., Wang, X., Wang, X., & Jiang, L. (2019). Relationship between surface functional properties and flexibility of soy protein isolate–glucose conjugates. *Food Hydrocolloids*, 95, 349-357.
- Liu, J., Ru, Q., & Ding, Y. (2012). Glycation a promising method for food protein modification: Physicochemical properties and structure, a review. *Food Research International*, 49(1), 170-183.
- Liu, X., Wang, M., Xue, F., & Adhikari, B. (2022). Application of ultrasound treatment to improve the technofunctional properties of hemp protein isolate. *Future Foods*, 6, 100176.
- Liu, M., Toth, J. A., Childs, M., Smart, L. B., & Abbaspourrad, A. (2023). Composition and functional properties of hemp seed protein isolates from various hemp cultivars. *Journal of Food Science*, 88(3), 942-951.
- Ma, X., Chen, W., Yan, T., Wang, D., Hou, F., Miao, S., & Liu, D. (2020). Comparison of citrus pectin and apple pectin in conjugation with soy protein isolate (SPI) under controlled dry-heating conditions. *Food Chemistry*, 309, 125501.
- 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.
- Mamone, G., Picariello, G., Ramondo, A., Nicolai, M. A., & Ferranti, P. (2019). Production, digestibility and allergenicity of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolates. *Food Research International*, 115, 562-571.
- Meng, X., Li, T., Song, T., Chen, C., Venkitasamy, C., Pan, Z., & Zhang, H. (2019). Solubility, structural properties, and immunomodulatory activities of rice dreg protein modified with sodium alginate under microwave heating. *Food Science & Nutrition*, 7(8), 2556-2564.
- Montserrat-de la Paz, S., Rivero-Pino, F., Villanueva, A., Toscano-Sanchez, R., Martin, M. E., Millan, F., & Millan-Linares, M. C. (2023). Nutritional composition, ultrastructural characterization, and peptidome profile of antioxidant hemp protein hydrolysates. *Food Bioscience*, 53, 102561.
- Mulcahy, E. M., Park, C. W., Drake, M., Mulvihill, D. M., & O'mahony, J. A. (2018). Enhancement of the functional properties of whey protein by conjugation with maltodextrin under dry-heating conditions. *International Journal of Dairy Technology*, 71(1), 216-225.
- Munteanu, C., Mihai, M., Dulf, F., Ona, A., Muntean, L., Ranga, F., Urdă, C., Pop, D., Mihaiescu, T., Mârza, S. M., & Papuc, I. (2023). Biochemical changes induced by the administration of *Cannabis sativa* seeds in diabetic Wistar rats. *Nutrients*, 15(13), 2944.



- Namli, S., Sumnu, S. G., & Oztop, M. H. (2021). Microwave glycation of soy protein isolate with rare sugar (D-allulose), fructose and glucose. *Food Bioscience*, 40, 100897.
- Nasrabadi, M. N., Doost, A. S., & Mezzenga, R. (2021). Modification approaches of plant-based proteins to improve their techno-functionality and use in food products. *Food Hydrocolloids*, 118, 106789.
- O'Mahony, J. A., Drapala, K. P., Mulcahy, E. M., & Mulvihill, D. M. (2019). *Whey protein-carbohydrate conjugates*. In *Whey proteins* (pp. 249-280). Academic Press.
- Oliver, C. M., Melton, L. D., & Stanley, R. A. (2006). Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(4), 337-350.
- Onsaard, E., Pomsamud, P., & Audtum, P. (2010). Functional properties of sesame protein concentrates from sesame meal. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 3(4), 420-431.
- Onsaard, E. (2012). Sesame proteins. *International Food Research Journal*, 19(4), 1287-1295.
- Pang, X. H., Yang, Y., Bian, X., Wang, B., Ren, L. K., Liu, L. L., Yu, D. H., Yang, J., Guo, J. C., Wang, L., Zhang, X. M., Yu, H. S., Zhang, N. (2021). Hemp (*Cannabis sativa* L.) seed protein-EGCG conjugates: Covalent bonding and functional research. *Foods*, 10(7), 1618.
- 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.
- Pirestani, S., Nasirpour, A., Keramat, J., Desobry, S., & Jasniewski, J. (2017). Effect of glycosylation with gum Arabic by Maillard reaction in a liquid system on the emulsifying properties of canola protein isolate. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1620-1627.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.
- Plati, F., Ritzoulis, C., Pavlidou, E., & Paraskevopoulou, A. (2021). Complex coacervate formation between hemp protein isolate and gum Arabic: Formulation and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 144-153.
- Potin, F., Lubbers, S., Husson, F., & Saurel, R. (2019). Hemp (*Cannabis sativa* L.) protein extraction conditions affect extraction yield and protein quality. *Journal of Food Science*, 84(12), 3682-3690.
- Potin, F., Goure, E., Lubbers, S., Husson, F., & Saurel, R. (2022). Functional properties of hemp protein concentrate obtained by alkaline extraction and successive ultrafiltration and spray-drying. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(1), 436-446.
- Pownall, T. L., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2010). Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4712-4718.
- Raikos, V., Neacsu, M., Russell, W., & Duthie, G. (2014). Comparative study of the functional properties of lupin, green pea, fava bean, hemp, and buckwheat flours as affected by pH. *Food Science & Nutrition*, 2(6), 802-810.
- Saraiva, B. R., Anjo, F. A., Vital, A. C. P., & Matumoto-Pintro, P. T. (2021). Soluble protein isolate from brewing by-product (trub) using the Box-Behnken design. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(10), e15871.



- Sato, R., Sawabe, T., & Saeiki, H. (2005). Characterization of fish myofibrillar protein by conjugation with alginate oligosaccharide prepared using genetic recombinant alginate lyase. *Journal of Food Science*, 70(1), 58-62.
- Shen, P., Gao, Z., Xu, M., Ohm, J. B., Rao, J., & Chen, B. (2020). The impact of hempseed dehulling on chemical composition, structure properties and aromatic profile of hemp protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 106, 105889.
- Shen, P., Gao, Z., Fang, B., Rao, J., & Chen, B. (2021). Ferreting out the secrets of industrial hemp protein as emerging functional food ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 112, 1-15.
- Shepherd, R., Robertson, A., & Ofman, D. (2000). Dairy glycoconjugate emulsifiers: Casein-maltodextrins. *Food Hydrocolloids*, 14(4), 281-286.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Song, Y., Babiker, E. E., Usui, M., Saito, A., & Kato, A. (2002). Emulsifying properties and bactericidal action of chitosan-lysozyme conjugates. *Food Research International*, 35(5), 459-466.
- Taaifi, Y., Benmoumen, A., Belhaj, K., Aazza, S., Abid, M., Azeroual, E., Elamrani, A., Mansouri, F., Serghini Caid, H. (2021). Seed composition of non-industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) varieties from four regions in northern Morocco. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(11), 5931-5947.
- Tang, C. H., Ten, Z., Wang, X. S., & Yang, X. Q. (2006). Physicochemical and functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8945-8950.
- Tas, O., Ertugrul, U., Oztop, M. H., & Mazi, B. G. (2021). Glycation of soy protein isolate with two ketoses: d-Allulose and fructose. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(11), 5461-5470.
- Teh, S. S., Niven, B. E., Bekhit, A. E. D. A., Carne, A., & Birch, E. J. (2014). The use of microwave and pulsed electric field as a pretreatment step in ultrasonic extraction of polyphenols from defatted hemp seed cake (*Cannabis sativa*) using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 3064-3076.
- Van Boekel, M. A. J. S. (2001). Kinetic aspects of the Maillard reaction: A critical review. *Food/Nahrung*, 45(3), 150-159.
- Wang, W. Q., Bao, Y. H., & Chen, Y. (2013). Characteristics and antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products from interactions in a whey protein isolate and sugars system. *Food Chemistry*, 139(1-4), 355-361.
- Wang, Q., Jin, Y., & Xiong, Y. L. (2018a). Heating-aided pH shifting modifies hemp seed protein structure, cross-linking, and emulsifying properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(41), 10827-10834.
- Wang, Z., Zhang, C., Zhang, T., Ju, X., & He, R. (2018b). Effects of acylation and glycation treatments on physicochemical and gelation properties of rapeseed protein isolate. *RSC Advances*, 8(70), 40395-40406.
- Wang, L. H., Sun, X., Huang, G. Q., & Xiao, J. X. (2018c). Conjugation of soybean protein isolate with xylose/fructose through wet-heating Maillard reaction. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12, 2718-2724.



- Wang, Q., & Xiong, Y. L. (2019). Processing, nutrition, and functionality of hempseed protein: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(4), 936-952.
- Wen, C., Zhang, J., Qin, W., Gu, J., Zhang, H., Duan, Y., & Ma, H. (2020). Structure and functional properties of soy protein isolate-lentinan conjugates obtained in Maillard reaction by slit divergent ultrasonic assisted wet heating and the stability of oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 331, 127374.
- Yan, X., Liang, S., Peng, T., Zhang, G., Zeng, Z., Yu, P., Gong, D., Deng, S. (2020). Influence of phenolic compounds on physicochemical and functional properties of protein isolate from *Cinnamomum camphora* seed kernel. *Food Hydrocolloids*, 102, 105612.
- Yu, Y., Wang, T., Huang, X., Lian, Y., Yang, F., & Yu, D. (2023). Hemp seed protein and chlorogenic acid complex: Effect of ultrasound modification on its structure and functional properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 233, 123521.
- Yüzer, M. O. (2021). *Susam Proteinlerinden İzolat Eldesi ve Elektrospinning Yöntemi ile Nanolif Üretimi: Tahinde Yağ Ayırması Üzerine Etkileri* (Doktora Tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 706039).
- Zajac, M., Guzik, P., Kulawik, P., Tkaczewska, J., Florkiewicz, A., & Migdał, W. (2019). The quality of pork loaves with the addition of hemp seeds, de-hulled hemp seeds, hemp protein and hemp flour. *LWT-Food Science and Technology*, 105, 190-199.
- Zayas, J. F. (1997). *Functionality of proteins in food*. Springer Science & Business Media.
- Zha, F., Dong, S., Rao, J., & Chen, B. (2019). Pea protein isolate-gum Arabic Maillard conjugates improves physical and oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 285, 130-138.
- Zhang, B., Guo, X., Zhu, K., Peng, W., & Zhou, H. (2015). Improvement of emulsifying properties of oat protein isolate–dextran conjugates by glycation. *Carbohydrate Polymers*, 127, 168-175.
- Zhao, C., Yin, H., Yan, J., Niu, X., Qi, B., Liu, J. (2021). Structure and acid-induced gelation properties of soy protein isolate–maltodextrin glycation conjugates with ultrasonic pretreatment. *Food Hydrocolloids*, 112, 106278.
- Zhong, L., Ma, N., Wu, Y., Zhao, L., Ma, G., Pei, F., Hu, Q. (2019). Characterization and functional evaluation of oat protein isolate-Pleurotus ostreatus β -glucan conjugates formed via Maillard reaction. *Food Hydrocolloids*, 87, 459-469.



ÖZ GEÇMİŞ

Elvan Yüzer, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden 2014 yılında mezun oldu. 2022 yılında Bayburt Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Organik Tarım İşletmeciliği Yüksek Lisans programına girdi. Aynı yıl içerisinde Anadolu Üniversitesi Açık Öğretim Fakültesi Sağlık Yönetimi Bölümü'nden mezun oldu. Yüksek lisans eğitimi devam ederken 2024 yılı içerisinde Gümüşhane İl Sağlık Müdürlüğünde Mutemet olarak görev almaya başladı. (13.12.2024).

