

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

**KENEVİR TOHUM PROTEİNLERİNİN ULTRASES, YÜKSEK
BASINÇ VE MANOTERMOSONİKASYON UYGULAMALARI İLE
MODİFİKASYONU**

DOKTORA TEZİ

Gülşah KARABULUT

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

MAYIS 2023

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

**KENEVİR TOHUM PROTEİNLERİNİN ULTRASES, YÜKSEK
BASINÇ VE MANOTERMOSONİKASYON UYGULAMALARI İLE
MODİFİKASYONU**

DOKTORA TEZİ

Gülşah KARABULUT

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Oktay YEMİŞ

MAYIS 2023

Gülşah KARABULUT tarafından hazırlanan “Kenevir tohum proteinlerinin ultrases, yüksek basınç ve manotermosonikasyon uygulamaları ile modifikasyonu” adlı tez çalışması 02.05.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Esra ÇAPANOĞLU GÜVEN
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Omca DEMİRKOL
Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Aslı CAN KARAÇA
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Serpil ÖZTÜRK MUTİ
Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Oktay YEMİŞ (Danışman)
Sakarya Üniversitesi



ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

(02/05/2023)

Gülşah KARABULUT





Oğluma...



TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmam süresince beni yönlendiren danışmanım Doç. Dr. Oktay YEMİŞ ve tez izleme komite üyeleri Prof. Dr. Omca DEMİRKOL ve Prof. Dr. Esra ÇAPANOĞLU GÜVEN'e teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar imkanları konusunda anlayış ve yardımlarını esirgemeyen Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanlığı'na, Araştırma-Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (SARGEM)'ne ve çalışma arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim. Aynı zamanda yurtdışına gidiş sürecimdeki yardımlarından dolayı Doç. Dr. Oktay YEMİŞ, Doç. Dr. Gökçe POLAT YEMİŞ ve Dr. Öğretim Üyesi Semanur YILDIZ'a minnettarım.

Urbana-Champaign Illinois Üniversitesi'deki (Amerika) danışman hocam Dr. Hao Feng'e anlayışı, etik değerleri ve akademik tecrübelerini paylaştığı için teşekkür ederim. Aynı zamanda laboratuvarında birlikte çalışmaktan büyük zevk aldığım Ragya KAPOOR, Amir MALVANDİ, Vedant MUNDADA, Xiaojuan WANG, Mengyi DONG ve daha ismini sayamadığım ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim. Özellikle Ragya KAPOOR-my protein sister- seninle aynı laboratuvarında çalışmak güzeldi.

Tez çalışmamın büyük bir kısmını Tübitak 2214-A doktora sırası burs programı (Proje No:1059B141900258) kapsamında “Kenevir tohum proteinlerinin manotermosonikasyon uygulaması ile modifikasyonu” adlı proje kapsamında Urbana-Champaign Illinois Üniversitesi'nde (Amerika) gerçekleştirme fırsatı veren Tübitak-BİDEB'e bu desteğinden dolayı minnettarım. Aynı zamanda bu çalışmanın bir kısmının hayata geçirilmesinde maddi olarak destek veren Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığına (Proje No: 2020-7-25-24) teşekkür ederim. Yine Mısır Araştırma Enstitüsü'ne desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme, canım eşim Zekeriya KARABULUT'a ve biricik oğlum Mehmet Kayra KARABULUT'a teşekkür ederim. İyi ki varsınız.

Gülşah KARABULUT



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	v
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xv
ŞİMGELER	xvii
TABLO LİSTESİ	xix
ŞEKİL LİSTESİ	xxi
ÖZET	xxiii
SUMMARY	xxvii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Bitkisel Proteinler	5
2.2. Endüstriyel Kenevir	6
2.3. Endüstriyel Kenevir Tohum Özellikleri	7
2.4. Endüstriyel Kenevir Tohum Proteininin Özellikleri	8
2.4.1. Endüstriyel kenevir tohum proteininin gıda uygulamaları	10
2.4.2. Endüstriyel kenevir tohum proteininin sağlık uygulamaları	11
2.4.3. Endüstriyel kenevir tohum proteininin modifikasyonu	12
2.5. Proteinlerin Fonksiyonel Özellikleri	13
2.5.1. Çözünübilirlik	14
2.5.2. Su bağlama	15
2.5.3. Yağ bağlama	16
2.5.4. Viskozite	16
2.5.5. Jel oluşturma	16
2.5.6. Emülsifikasyon	17
2.5.7. Köpük oluşturma	18
2.6. Ultrases Homojenizasyonu (USH)	19
2.7. Yüksek Basınç Homojenizasyonu (YBH)	23
2.8. Manotermosonikasyon (MTS)	25
2.9. Optimizasyon	27
3. ULTRASES HOMOJENİZASYONU UYGULAMASI İLE KENEVİR TOHUM PROTEİNLERİNİN MODİFİKASYONU	29
3.1. Giriş	29
3.2. Materyal ve Yöntem	30
3.2.1. Kenevir tohum protein izolatlarının eldesi	30
3.2.2. Kimyasal analizler	33
3.2.3. Ultrases homojenizasyon uygulaması	33
3.2.3.1. Akustik enerji yoğunluğunun belirlenmesi	33
3.2.4. Fizikokimyasal özelliklerde birincil yapı değişimi	34
3.2.4.1. Amino asit dağılımı	34
3.2.4.2. Molekül ağırlık dağılımı	34

3.2.5. Fizikokimyasal özelliklerde ikincil yapı değişimi	35
3.2.5.1. Fourier dönüşümü kızılötesi spektrumları (FT-IR)	35
3.2.5.2. İkincil yapı dağılımı	35
3.2.6. Fizikokimyasal özelliklerde üçüncül yapı değişimi	35
3.2.6.1. Partikül boyutu ve zeta potansiyeli	35
3.2.6.2. Yüzey hidrofobisitesi	35
3.2.6.3. Serbest sülfidril grup içeriği	36
3.2.6.4. Termal davranışı	36
3.2.7. Morfolojik özellikler	36
3.2.7.1. Taramalı elektron mikroskobu	36
3.2.8. Fonksiyonel özellikler	37
3.2.8.1. Protein çözünabilirliği	37
3.2.8.2. Su ve yağ bağlama kapasitesi	37
3.2.8.3. Emülsiyon özellikleri	37
3.2.8.4. Köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi	38
3.2.8.5. Jel oluşturma kapasitesi	38
3.2.9. Biyoaktif özellikler	38
3.2.9.1. Antioksidan aktivite	38
3.2.10. Deney tasarımı ve optimizasyonu	39
3.2.11. İstatistiksel analiz	41
3.3. Sonuç ve Tartışma	41
3.3.1. Kimyasal kompozisyon	41
3.3.2. Akustik enerji yoğunluğu	42
3.3.3. Ultrases homojenizasyon parametrelerinin optimizasyonu	43
3.3.3.1. Model uygunluğu	43
3.3.3.2. Bağımsız değişkenlerin çözünürlük ve partikül boyutu üzerine etkisi	46
3.3.4. Fizikokimyasal özelliklerde birincil yapı değişimi	51
3.3.4.1. Amino asit dağılımı	51
3.3.4.2. Molekül ağırlık dağılımı (SDS-PAGE)	52
3.3.5. Fizikokimyasal özelliklerde ikincil yapı değişimi	53
3.3.5.1. Fourier dönüşümü kızılötesi spektrumu (FT-IR)	53
3.3.5.2. İkincil yapı dağılımı (CD)	54
3.3.6. Fizikokimyasal özelliklerde üçüncül yapı değişimi	55
3.3.6.1. Zeta potansiyeli	55
3.3.6.2. Yüzey hidrofobisitesi	56
3.3.6.3. Serbest sülfidril grup içeriği	58
3.3.6.4. Termal davranışı	58
3.3.7. Morfolojik özellikler	59
3.3.7.1. Taramalı elektron mikroskobu	59
3.3.8. Fonksiyonel özellikler	61
3.3.8.1. Su ve yağ bağlama kapasitesi	61
3.3.8.2. Emülsiyon özellikleri	62
3.3.8.3. Köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi	63
3.3.8.4. Jel oluşturma kapasitesi	63
3.3.9. Biyoaktif özellikler	64
3.3.9.1. Antioksidan aktivite	64
4. YÜKSEK BASINÇ HOJENİZASYONU, MANOTERMOSONİKASYON VE PH DEĞİŞTİRME UYGULAMALARI İLE KENEVİR TOHUM PROTEİNLERİNİN MODİFİKASYONU	67

4.1. Giriş.....	67
4.2. Materyal ve Yöntem.....	69
4.2.1. Kenevir tohum proteinlerinin hazırlanması	70
4.2.2. Manotermosonikasyon, yüksek basınçlı homojenizasyon ve pH değiştirme	70
4.2.3. Fizikokimyasal özelliklerde birincil yapı değişimi	71
4.2.3.1. Molekül ağırlık dağılımı (SDS-PAGE).....	71
4.2.4. Fizikokimyasal özelliklerde ikincil yapı değişimi	72
4.2.4.1. İkincil yapı dağılımı	72
4.2.4.2. Fourier dönüşümü kızılötesi spektrumları (FT-IR).....	72
4.2.5. Fizikokimyasal özelliklerde üçüncül yapı değişimi	72
4.2.5.1. Partikül boyutu ve zeta potansiyeli	72
4.2.5.2. İçsel floresan emisyonu.....	72
4.2.5.3. Serbest SH grubu içeriği	73
4.2.5.4. Sindirilebilirlik	73
4.2.5.5. X-ışını difraktometresi (XRD)	74
4.2.5.6. Termal davranış.....	74
4.2.6. Morfolojik özellikler	74
4.2.6.1. Taramalı elektron mikroskopu (SEM)	74
4.2.7. Tekno-fonksiyonel özellikler	74
4.2.7.1. Çözünürlük.....	74
4.2.7.2. Emülsiyon özellikleri	75
4.2.8. İstatistiksel analiz.....	76
4.3. Sonuç ve Tartışma	76
4.3.1. Manotermosonikasyon işlem parametreleri	76
4.3.2. Fizikokimyasal özelliklerde birincil yapı değişimi	78
4.3.2.1. Molekül ağırlık dağılımı (SDS-PAGE).....	78
4.3.3. Fizikokimyasal özelliklerde ikincil yapı değişimi	79
4.3.3.1. Fourier dönüşümü kızılötesi spektrumları (FT-IR).....	79
4.3.3.2. İkincil yapı dağılımı (CD).....	80
4.3.4. Fizikokimyasal özelliklerde üçüncül yapı değişimi	81
4.3.4.1. Partikül boyutu ve zeta potansiyeli	81
4.3.4.2. İçsel floresan emisyonu.....	84
4.3.5. Serbest SH grubu içeriği	85
4.3.5.1. X-ışını difraktometresi (XRD)	86
4.3.5.2. Termal davranışı.....	87
4.3.5.3. Sindirilebilirlik	88
4.3.6. Morfolojik özellikler	89
4.3.6.1. Taramalı elektron mikroskopu (SEM)	89
4.3.7. Tekno-fonksiyonel özellikler	90
4.3.7.1. Çözünürlük.....	90
4.3.7.2. Emülsiyon özellikleri	91
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	95
6. KAYNAKÇA	101
ÖZGEÇMİŞ.....	113



KISALTMALAR

ABTS	: 2,2-azinobis 3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit
ANS	: 1-anilino naphthalene-8-sülfonik asit
<i>C. sativa</i> L.	: <i>Cannabis sativa</i> L.
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DSC	: Diferansiyel taramalı kalorimetre
F-DEĞERİ	: Fisher değeri
Ha	: Hektar
HCl	: Hidroklorik asit
KTP	: Kenevir tohum proteini
KTP-USH	: Ultrases homojenizasyon uygulanmış kenevir tohum proteini
MTS	: Manotermosonikasyon
PBS	: Fosfat tampon tuzu
pI	: İzoelektrik nokta pH değeri
R²	: Uyum katsayısı
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SH	: Sülfidril grup
TCA	: Trikloroasetik asit
USH	: Ultrases homojenizasyonu
YBBO	: Bileşik yıllık büyüme oranı
YBH	: Yüksek basınç homojenizasyonu
YYY	: Yanıt yüzey yöntemi



SİMGELER

a	: Ağırlık (g)
h	: Hacim (mL)
W	: Watt
H₀	: Yüzey hidrofobisitesi
°C	: Santigrat derece (°)
%	: Yüzde
ζ	: Zeta potansiyeli (mV)



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Kenevir tohumunun kimyasal bileşimi (%) (Callaway, 2004).....	8
Tablo 2.2. Kenevir tohumunun farklı fraksiyonlarının ve proteininin amino asit içeriği (%) (Leonard ve ark., 2020).....	9
Tablo 2.3. Kenevir proteininden elde edilen peptitlerin biyolojik aktivitesi.....	11
Tablo 2.4. Kenevir tohum proteininin modifikasyonu üzerine yapılan çalışmalar.	12
Tablo 2.5. Gıdalarda proteinlerin fonksiyonel rolü (Damodaran, 1994).....	14
Tablo 3.1. Bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve kodlanmamış değerleri.....	40
Tablo 3.2. Kenevir tohumunun, yağı alınmış unun (YKTU) ve protein (KTP) izolatının kimyasal kompozisyonu (g/100 g taze ağırlık).	41
Tablo 3.3. Box-Behnken deney tasarımına göre USH uygulama koşullarının çözünürlük ve partikül boyut yanıt değerleri. A: USH genlik (%), B: protein konsantrasyonu (%), C: USH süre (dk.).....	44
Tablo 3.4. KTP'nin modifikasyonu için USH uygulama koşullarında kuadratik modelin varyans analizi.....	45
Tablo 3.5. KTP ve KTP-USH'nin amino asit dağılımı (g/100 g).	51
Tablo 3.6. KTP ve KTP-USH'nin CD spektrumu ve ikincil yapı formlarının dağılımları (%).	54
Tablo 3.7. KTP ve KTP-USH'nin zeta potansiyeli (ζ , mV), serbest SH grup içeriği ($\mu\text{mol/g}$ protein), denatürasyon sıcaklığı (T_d , °C), entalpi (J/g) ve yüzey hidrofobisitesi (H_o)değerleri.....	56
Tablo 3.8. KTP ve KTP-USH'nin su/yağ bağlama kapasitesi (%), emülsiyon aktivite (m^2/g)/stabilite (dk.) indeksleri, köpük kapasite/stabilitesi (%) ve jel oluşturma kapasitesi (%).	61
Tablo 3.9. KTP ve KTP-USH'nin DPPH (%) ve ABTS (%) inhibisyon aktiviteleri.	64
Tablo 4.1. Farklı proses koşullarında (sıcaklık, süre, basınç) MTS uygulanan KTP'lerin çözünürlük ve partikül boyutu değerleri.....	76
Tablo 4.2. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin T_{onset} (°C) T_d (°C) ve entalpi (W/g) değerleri.	87
Tablo 4.3. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin çözünürlük (%), emülsiyon aktivitesi (m^2/g), emülsiyon stabilitesi (dk.) ve kremalaşma indeks (%) değerleri.	91



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Manotermosonikasyon sistem bileşenleri.....	25
Şekil 2.2. Manotermosonikasyon sisteminin şematik diyagramı (Yıldız ve ark., 2017).	26
Şekil 3.1. Kenevir tohum protein izolatu eldesinin şematik diyagramı.....	32
Şekil 3.2. Deneme tasarımına göre farklı genlik, konsantrasyon ve sürelerde USH uygulanan KTP izolatlarının toz formdaki görselleri.....	43
Şekil 3.3. Farklı USH uygulama koşulları sonucu KTP izolatının çözünürlük ve partikül boyutu üzerinde genlik, konsantrasyon ve sürenin etkisini gösteren 3B yanıt ve kontur grafikleri.	48
Şekil 3.4. KTP ve KTP-USH'nin indirgen (+2-ME) ve indirgen olmayan (-2-ME) koşullar altındaki SDS-PAGE profilleri.	52
Şekil 3.5. KTP ve KTP-USH'nin FT-IR spektrumu.....	53
Şekil 3.6. KTP ve KTP-USH'nin floresan yoğunluğu.....	57
Şekil 3.7. KTP ve KTP-USH'nin elektron mikroskop görüntüleri.....	60
Şekil 4.1. Manotermosonikasyon sisteminin görsel tasarımı.	77
Şekil 4.2. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin SDS-PAGE protein bantları.....	78
Şekil 4.3. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin FT-IR spektrumları.....	79
Şekil 4.4. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin ikincil yapı dağılımları.	80
Şekil 4.5. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin a) partikül boyutları ve b) partikül boyut dağılımlarındaki değişimler.	82
Şekil 4.6. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin zeta potansiyelindeki değişim.....	83
Şekil 4.7. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin floresan yoğunluklarındaki değişim.....	84
Şekil 4.8. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin serbest SH grup içeriğindeki değişimler.....	85
Şekil 4.9. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin XRD spektrumları.	86
Şekil 4.10. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin protein sindirilebilirliği (%).	89
Şekil 4.11. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin x500 ve 2000 büyütme değerlerindeki elektron mikroskop görüntüleri.....	90
Şekil 4.12. Farklı modifikasyon uygulamalarından elde edilen KTP emülsiyonlarının 0. dakika (t ₀) ve 60.dakikadaki (t ₆₀) mikrografları.....	92



KENEVİR TOHUM PROTEİNLERİNİN ULTRASES, YÜKSEK BASINÇ VE MANOTERMOSONİKASYON UYGULAMALARI İLE MODİFİKASYONU

ÖZET

Dünya nüfustaki hızlı artış trendi gelecekte gıda talebini karşılamada zorluklar yaşanacağına işaret etmektedir. Ayrıca, küresel salgınlar, savaşlar ve iklim değişiklikleri gıda zincirindeki olası sıkıntıları tetiklemektedir. Bu noktada sağlıklı beslenme düzeninde kilit rol oynayan proteinlerin tedarikinde yakın gelecekte sıkıntılar meydana geleceği öngörülmektedir. Özellikle hayvansal protein kaynaklarıyla ilişkili ekonomik, etnik ve dini nedenlere ek olarak bu kaynakların yarattığı çevre ve sağlık endişeleri araştırmacıları alternatif protein kaynakları üzerinde çalışmaya yönlendirmiştir. Bu bağlamda, bitkisel protein kaynakları bol, çeşitli, ucuz ve erişilebilir olmasıyla küresel markette hızlı bir şekilde yer edinmiştir. Artan tüketici bilinciyle birlikte sağlıklı, dengeli ve vejetaryen beslenmeye eğilim bitkisel protein talebine ivme kazandırmıştır. Özellikle gıda işleme atıklarının alternatif protein kaynağı olarak değerlendirilmesi, çevresel geri dönüşümü destekleyerek sürdürülebilir, katma değerli ve yenilikçi çözümler üretmesiyle önem taşımaktadır.

Kenevir; lifi, tohumu ve yağı için uzun yıllardan beri yetiştirilen çok fonksiyonlu endüstriyel bir bitkidir. Son yıllarda yapılan yasal düzenlemelerle uyuşturucu (*Marijuana*) ve endüstriyel kenevir çeşitlerinin (*Cannabis sativa*, d-9-tetrahidrokannabinol (THC) <0,3) ayırımının net bir şekilde yapılması çok değerli bileşenleri bünyesinde barındıran kenevir tohumu üzerindeki çalışmaları artırmıştır. Kenevir tohumu özellikle yapısındaki yüksek kaliteli protein ve yağ içeriğiyle dikkat çekmektedir. Yağ ekstraksiyonu sonrasında kalan küspe, %55-60 yüksek kaliteli -esansiyel amino asitlerce zengin- bir protein kaynağı olarak ortaya çıkmaktadır. Kenevir tohum proteini (KTP), düşük alerjenitesi, yüksek sindirilebilirliği ve biyoaktif özellikleri ile bilinmektedir. Bu açıdan KTP, gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan ancak genetik modifikasyon, alerjenite ve düşük sindirilebilirliğiyle bilinen soya proteinine alternatif olarak görülmektedir. KTP'nin ekmek, et, kahvaltılık gevrek ve dondurma gibi gıda formülasyonlarının yapısında çeşitli amaçlarla kullanıldığı çalışmalar literatürde yer almaktadır. Buna rağmen KTP'nin gıda endüstrisinde yaygın kullanımı bulunmamaktadır. Bu durumun altında yatan nedenler, KTP'nin diğer bitkisel protein kaynakları gibi düşük çözünürlüğe sahip olmasıdır (nötr pH'da ~%20). Gıda bileşen ve katkı maddelerinin gıda formülasyonlarında tercih edilebilmesi, sahip oldukları çoklu fonksiyonel özelliklerine bağlıdır. Düşük çözünürlük; protein süspansiyonlarının emülsiyon, köpük ve jel oluşturma gibi diğer birçok fonksiyonel özelliğini birincil derecede etkilediği için KTP'nin bu handikabı aşılması gereken bir problemdir.

Bu doktora tez çalışması kapsamında, kenevir tohum proteinlerinin fonksiyonel özelliklerinin geliştirilmesi için fiziksel (ısıl olmayan) ve kimyasal modifikasyon tekniklerinin tekil ve kombine kullanımının etkinliği üzerine odaklanılmıştır. Çalışmada ülkemizdeki ilk tescilli kenevir tohum çeşidi olan "Narlısaray" kullanılarak

bu çeşidin tekno fonksiyonel özelliklerinin uluslararası literatüre girmesi sağlanmıştır. Fiziksel tekniklerden; ultrases homojenizasyon (USH), yüksek basınç homojenizasyon (YBH), manotermosonikasyon (MTS) ve kimyasal tekniklerden; pH değiştirme uygulamasına dair bulgular iki ayrı bölümde ayrıntılı şekilde sunulmuştur.

Isıl olmayan teknikler; yenilikçi, güvenli, verimli ve yeşil uygulamalar olarak bilinmektedir. Enzimatik ve ısı uygulamaların yüksek maliyet ve proses kontrol zorlukları fiziksel tekniklerin önemini arttırmaktadır. Kaviteasyon temelli USH, HPH ve MTS uygulamalarının ısıtma, dinamik çalkalama, kayma gerilmeleri ve türbülans gibi etkileri protein süspansiyonlarında çeşitli modifikasyonlara yol açabilmektedir. Özellikle yurtdışında kullanılan dünyadaki tek sürekli sistemde çalışan MTS cihazı, USH teknolojisinin basınç ve sıcaklık uygulamasıyla birleştirildiği bir teknolojiyi yansıtmaktadır. USH uygulamasının tek başına kullanılması proteinlerde istenilen değişikliği sağlayamazken, kombine sistemlerle bu sorun aşılabilmektedir. Ayrıca USH uygulamasının modifikasyon verimini artırmak için 15–30 dakikaya kadar uzayan işlem süresi, enerji ve zaman tüketiminin yanı sıra endüstride uygulanabilirliğini de azaltmaktadır. MTS sisteminin kullanımı ile aynı etkiyi sağlayacak olan işlem süresinin 1,4 dakikaya kadar düşme potansiyeli bulunmaktadır. MTS uygulanmasındaki ılımlı sıcaklık ve basınç kombinasyonu kaviteasyonel etkileri teşvik edici olabilmektedir. Aynı zamanda pH değiştirme bu fiziksel uygulamalara kolayca uyarlanarak, uygulama yapılan proteinlerin modifikasyonu üzerindeki etkinin artmasına katkı sağlayabilmektedir. Tez çalışmasının bir kısmı Türkiye’de ve bir kısmı Amerika’da gerçekleştirildiği ve farklı kenevir tohumları kullanıldığı için çalışma iki bölüme ayrılmıştır.

Tez çalışmasının birinci bölümünde, USH uygulamasının KTP’nin fonksiyonel, fizikokimyasal, morfolojik ve biyoaktif özellikleri üzerine etkisi incelenmiş, bu uygulamanın KTP’nin özelliklerini modifiye etme potansiyeli ortaya koyulmuştur. Öncelikle, USH proses parametrelerinin (genlik, süre, konsantrasyon) KTP’nin çözünürlük ve partikül boyut yanıtları üzerine etkisi belirlenmiştir. USH işleminin optimal proses koşulları, KTP’nin maksimum çözünürlük ve minimum partikül boyut yanıtlarına göre 37 W/cm² akustik yoğunlukta, 7,8 dakika işlem süresi ve %6,9 protein konsantrasyonu (20 kHz frekansta) olarak belirlenmiştir. Yüksek R² ve uyum değerleri sunan çözünürlük ve partikül boyut modelleri gerçek analiz koşullarında doğrulanmıştır. Optimum koşullarda USH uygulanan KTP’nin (KTP-USH) elektroforetik profilinde önemli bir değişiklik meydana gelmemiştir, ancak amino asit profili değişmiştir. FT-IR spektrumu, USH uygulaması ile proteinin Amid 1 ve 2 bölgelerindeki kaymaları ortaya çıkarmıştır. USH uygulamasından sonra Amid 1 (1700–1600 cm⁻¹) bölgesindeki pik 1636 cm⁻¹’den 1629 cm⁻¹’e kaymıştır. Amid 1 bölgesindeki bu kayma, USH uygulamasından sonra KTP’nin ikincil yapısındaki değişikliğe işaret etmektedir. KTP’nin Amid 2 bölgesindeki pik ise 1529 cm⁻¹’den 1524 cm⁻¹’e kaymıştır. FT-IR spektrasında, daha yüksek değerlere doğru görülen kaymalar, USH uygulamasından sonra proteinin α -heliks yapıdan rastgele sarmal ve β -sheet yapılarına dönüşmesi ile ilişkilendirilebilir. USH işleminden sonra KTP’nin denatürasyon sıcaklığında artış, denatürasyon entalpisinde ise azalış görülmüştür. USH uygulamasından sonra, KTP’nin çözünürlüğü (%78), serbest SH grup içeriği (%59) ve zeta potansiyeli (%25) artarken, partikül boyutu (%46) azalmıştır. KTP-USH’nin emülsifikasyon, yağ absorpsiyon ve köpük oluşturma özelliklerinin KTP’ye kıyasla arttığı, en düşük jel konsantrasyonunun ise azaldığı saptanmıştır. Ayrıca KTP’nin antioksidan özelliği, USH uygulaması ile %38 oranında artmıştır.

Tez çalışmasının ikinci bölümünde YBH ve MTS uygulamaları ve bunların pH değiştirme ile kombine kullanımlarının KTP'nin fizikokimyasal, morfolojik ve fonksiyonel özellikleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. MTS uygulamasının optimum işlem parametreleri KTP'nin en yüksek çözünürlük ve en düşük partikül boyutunu verecek şekilde 50°C, 200 kPa ve 90 s olarak belirlenmiştir. Uygulanan modifikasyon işlemleri sonrasında, KTP'nin ikincil yapısındaki değişim FTIR ve CD verileri ile doğrulanmıştır. Uygulamalar öncesinde KTP'nin ikinci yapı dağılımı %4,5 α -heliks, %37,9 β -sheet, %14,7 β -turn ve %42,9 rastgele sarım olarak ortaya çıkmıştır. Uygulamalar sonrasında proteinin ikincil yapı dağılımında genel bir eğilim olarak, α -heliks ve β -sheet oranı azalırken, β -turn ve rastgele sarım oranı artmıştır. İkincil yapı formlarındaki değişiklik, α -heliks ve β -sheet formlarından β -turn ve rastgele sarım formlarına olası dönüşleri göstermektedir. Modifikasyon uygulamaları sonrasında pH12MTS için HSP'nin maksimum floresan yoğunluk (FI_{max}) değeri 13768 Au'dan 43268 Au'a yükselmiştir. pH12MTS izolatu diğer izolatlar göre en yüksek floresans yoğunluğuna sahip iken, bunu sırasıyla HPH, MTS, pH12HPH ve pH12 izolatlarının floresans yoğunluk değerleri izlemiştir. KTP'nin maksimum floresan yoğunluğundaki dalga boyu (λ_{max}) değeri 334 nm civarındayken, modifiye edilmiş tüm izolatlar daha uzun dalga boylarına (336 nm) doğru kaymalar göstermiştir. Bu batokromik kayma, proteinin iç kısımlarında gömülü olan triptofan aminoasidinin protein yüzeyine yöneliminin ve sıvı ortamdaki polaritenin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, tüm uygulamalardan sonra izolatların termal davranışı ve XRD kristal yapısının oranı değişerek modifiye edilen KTP'nin daha düzensiz yapılar gösterdiğini kanıtlamıştır. KTP'nin partikül boyutu (365,87 nm), pH12MTS izolatında 112,67 nm'ye kadar düşmüştür. Modifiye edilen izolatların zeta potansiyelleri ve serbest SH grup içerikleri kavitasyonel kuvvetlerin ve pH değiştirme uygulamalarının kombine etkileri sonucu üçüncül yapılarda meydana gelen değişikliklerin kanıtı olarak artmıştır. pH12MTS izolatının çözünürlüğü, uygulama yapılmayan KTP'ye kıyasla %52 oranında artmıştır. Ayrıca, pH12MTS izolatının emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi, KTP'ye kıyasla sırasıyla 2,11 ve 2,15 kat artışlarla diğer uygulamalara kıyasla en yüksek değerleri göstermiştir. Ayrıca, modifikasyon işlemleri sonrasında, KTP'nin %84,23 olan sindirilebilirliği pH12MTS uygulamasında %95,46'ya artış göstermiştir. Bu durum, protein agregatlarının makromoleküler yapısında kavitasyonel etkilerle meydana gelen kısmi açılmalar ve kırılan protein-protein arası interaksiyonlarla ilişkilendirilmiştir.

Sonuç olarak, bu doktora tez çalışması, kenevir tohum proteinlerinin teknolojik özelliklerinin geliştirilmesinde ısılmayan ve kimyasal modifikasyon yöntemlerinin önemli rol oynadığını göstermiştir. KTP'nin yapısında hem farklı modifikasyon tekniklerinin ortaya çıkardığı değişimler kıyaslanmış hem de KTP'nin detaylı teknolojik fonksiyonel profili ortaya koyulmuştur. Proses parametrelerinin farklı fonksiyonel özellikleri maksimize edecek şekilde optimize edilebileceği gösterilmiştir. Fonksiyonel özelliklerde meydana gelen değişimler fizikokimyasal ve morfolojik analizlerle de uygun bir korelasyon sergilemiştir. Özellikle MTS sistemi, klasik USH ve YBH işlemlerine kıyasla daha kısa proses süresi ile daha etkin bir modifikasyon sağlayan, gelecek vaat eden bir teknik olarak görülmektedir. Aynı zamanda kombine pH değiştirme uygulamaları da fiziksel modifikasyonların etkinliğini arttırmıştır. Modifiye edilen KTP'lerin, daha yüksek çözünürlük, emülsiyon, köpük ve jel oluşturma özelliklerine sahip olması, etkin gıda bileşenleri için arzu edilen teknolojik özelliklere sahip bir gıda bileşeni olarak gıda proseslerinde kullanım potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Aynı zamanda, kullanılan USH, YBH ve MTS teknolojileri işlevselleştirilmiş ve katma değerli farklı proteinlerin

eldesinde, biyoaktif bileşenlerin kapsüllenmesinde ve biyopolimer ambalaj materyallerinin elde edilmesinde kullanılma potansiyeli söz konusudur.



MODIFICATION OF HEMP SEED PROTEINS USING ULTRASOUND, HIGH PRESSURE AND MANOTHERMOSONICATION TREATMENTS

SUMMARY

The global population is anticipated to reach 10.4 billion by 2100, which will result in considerable challenges to meet the protein demand in future. Furthermore, the COVID-19 pandemic has markedly expedited the transition to alternative protein sources, owing to the disruption in the worldwide food supply chain. Recent studies have reported the favorable impact of plant-based diets on mitigating the severity of COVID-19. Plant proteins have been attracting attention due to various reasons, such as economic, ethnic, and religious factors, as well as consumers' growing awareness of sustainable and healthy diet. All these factors have led to increase the popularity of plant-based products, which have become more readily accessible, diverse, and affordable in the market. The global plant protein market's worth was \$12.2 billion in 2022, with a projected Compound Annual Growth Rate (CAGR) of 7.3% over the next five years. The escalating demand has triggered the pursuit of utilizing industrial plant waste, which was previously considered an environmental problem or used as animal feed, as an alternative, low-cost, and clean-labeled protein source.

Hemp seed, an industrial by-product, has garnered substantial attention in recent years due to its rich protein and oil content. Hemp seed protein (HSP) is recognized for its high digestibility, low allergenicity, and bioactive properties. *Cannabis sativa* L. (*C. sativa* L.), a hemp variety containing a low amount of d-9-tetrahydrocannabinol (THC) (0.2%), is typically classified into two different types. As the demand for hemp fiber from industries such as paper, biodegradable plastics, textiles, and fuel continues to increase, so does the quantity of hemp seeds that are discarded as waste. Hemp seed is a superb by-product, with high-quality protein (20–25%) and oil (30–35%). The meal obtained from the seeds after hemp oil extraction contains roughly 55–60% protein. Comparisons of hemp seed proteins with egg white and soy protein in terms of nutritional value and digestibility have indicated that hemp protein can be an alternative food additive. Additionally, hemp seeds exhibit favorable health effects, including the ability to reduce blood pressure and cholesterol levels.

This PhD thesis focused on evaluating the efficacy of non-thermal and chemical modification techniques, both separately and in combination, for enhancing the functional properties of hemp seed proteins. Ultrasound homogenization (USH), high pressure homogenization (HPH), manothermosonication (MTS) from non-thermal techniques, and pH shifting from chemical techniques were considered to investigate their effects on the functional, physicochemical, morphological, and bioactive properties of hemp seed proteins.

Ultrasound homogenization (USH) is a non-thermal technique based on a combination of effects such as cavitation, heating, dynamic agitation, shear stresses, and turbulence. Cavitation bubbles, microjets, micro-turbulence, high-speed interparticle collisions, and microporous particle disruption cause modifications. The bursting of these bubbles generates high temperature and pressure values (approximately 50 MPa and 5500 K)

around the bubble, leading to several reactions in the solution. In the first part of the thesis, the optimal processing conditions for the USH treatment were determined as 6.9% protein concentration (at a frequency of 20 kHz), 37 W/cm² acoustic intensity, and 7.8 minutes processing time based on maximum solubility and minimum particle size responses of HSP. The solubility and particle size responses were used to obtain models with high R² and lack-of-fit values. After USH treatment, the solubility of HSP (78%), free SH group content (59%), and zeta potential increased (25%), while the particle size decreased (46%). Although there was no significant change in the electrophoretic profile of HSP-USH under optimum conditions, the amino acid profile of HSP-USH differed from that of HSP. Moreover, the emulsification, oil absorption, and foaming properties of HSP-USH were found to increase compared to HSP, while the lowest gel concentration decreased. The shift in the amide 1 (1700–1600 cm⁻¹) region from 1636 cm⁻¹ to 1629 cm⁻¹ after USH application indicates a partial alteration in the secondary structure of HSP. The amide 2 region (1580–1480 cm⁻¹) is characterized by dominant N–H (40-60%), C–N (18-40%), and C–C (10%) vibrations. The shift in the peak number from 1529 cm⁻¹ to 1524 cm⁻¹ in the Amid 2 region (1580–1480 cm⁻¹) of HSP indicates alterations in α -helix and β -sheet structures. The shifts towards higher values suggest the transformation of the protein into random coil and β -sheet structures following USH application. After USH treatment, an increase in the denaturation temperature and proportion of β -structure for the secondary structure distribution was observed. Furthermore, the USH treatment led to a 38% increase in the antioxidant properties of HSP.

The aim of the second part is to examine the impact of high-pressure homogenization (HPH) and manothermosonication (MTS) processes, as well as their combined employment with pH-shift treatments, on the physicochemical, morphological, and functional attributes of hemp seed proteins. The MTS represents an innovative technology in which ultrasound homogenization (USH) technology is integrated with pressure and temperature application in a continuous system. While the alone-USH technology cannot yield the desired protein alterations, this limitation can be surmounted using integrated systems. Moreover, the efficacy of USH application is restricted by the requirement of an extended processing time of up to 15–30 minutes, thereby hindering its industrial applicability. In contrast, the MTS system has reduced the processing time from 15.9 minutes to 1.4 minutes, providing similar results with a more moderate temperature application. This makes it a more feasible and efficient alternative to thermal modification approaches.

Chemical modification of proteins can be achieved through various techniques (phosphorylation, Acylation, pH-shifting, etc.), which pH shifting stands out as a straightforward and safe approach among these techniques. Extensive studies have shown that polypeptide structures of proteins can be altered by exposing them to highly acidic or alkaline pH treatments (pH 1.5–3.5 or pH 10–12). The rationale behind this is that the polypeptide chains of proteins unfold at extreme pH levels and subsequently refold and rearrange when the pH is adjusted to 7.0. The pH shifting process induces partial denaturation, resulting in tertiary structure losses, side chain interactions, and the release of sulfhydryl and hydrophobic nuclei, leading to the formation of "molten globules." To enhance the modification of proteins, researchers often combine the pH shifting technique with thermal or non-thermal technologies. One such non-thermal technique is high-pressure homogenization (HPH), which has gained popularity in the food industry and among researchers for its ability to modify the molecular structure, functionality, and physicochemical properties of proteins. HPH operates on the

principle of subjecting a suspension to high pressure, causing it to flow continuously through a narrow valve, resulting in high turbulence, shear stress, cavitation, and a rise in temperature.

The optimal parameters for the MTS process were determined to be 50°C, 200 kPa, and 90 s, based on the highest solubility and the lowest particle size. The solubility of pH12MTS isolate increased by 52% compared to untreated HSP. Furthermore, the emulsion activity and stability of pH12MTS isolate exhibited the highest values with 2.11- and 2.15-fold increases, respectively, compared to HSP. The particle size decreased from 365.87 nm to 112.67 nm following pH12MTS treatment. The zeta potential, free SH group content, and fluorescence intensity of the modified isolates increased due to the combined effects of cavitation forces and pH shifting treatments, providing evidence of tertiary structural changes. After the applied modification processes, a change in the secondary structure of HSP was observed, which was evidenced by the decrease of α -helix forms and the increase of random coil forms as a result of FTIR and CD data. The secondary structural distribution of the HSP sample was found to be 4.5% α -helix, 37.9% β -sheet, 14.7% β -turn, and 42.9% random coil. As a general trend, the ratio of α -helix and β -sheet decreased, while the ratio of β -turn and random coil increased in the secondary structure composition of all treated samples. The change in secondary structure indicated that the possibility of a reversal from α -helix and β -sheet to β -turn and random coil. After the modification applications, the F_{max} value of HSP increased from 13768 Au to 43268 Au for pH12MTS. The pH12MTS isolate demonstrated the highest fluorescence intensity compared to the other isolates, followed by the fluorescence intensity values of HPH, MTS, pH12HPH, and pH12 isolates, respectively. While the λ_{max} value was approximately 334 nm for untreated HSP, all modified isolates exhibited shifts towards longer wavelengths (336 nm). These shifts towards longer wavelengths are known as bathochromic shifts or redshifts. The bathochromic shift is caused by the surface orientation of the tryptophan embedded in the interior of the protein and the increase in polarity in the liquid medium. In addition, all applications changed the thermal behavior of the isolates and the proportional distribution of the crystal structure, causing the modified HSP to exhibit more irregular forms. After the modification processes, the digestibility of HSP increased from 84.23% to 95.46% after pH12MTS treatment.

In summary, this PhD thesis has established that various non-thermal and chemical modification techniques can significantly enhance the technological properties of hemp seed protein. The study has highlighted that optimal process parameters are critical for obtaining the desired functional properties. Compared to the conventional USH process, the MTS method provided a more effective modification with a shorter processing time. The modified hemp seed proteins exhibit potential as multi-functional food ingredients, offering desirable techno-functional properties for food products. Additionally, the USH, HPH, and MTS technologies employed in this research can be applied to obtain functionalized, value-added protein ingredients, encapsulation, and biopolymer packaging materials.



1. GİRİŞ

Proteinler, beslenme değerinin yanı sıra sahip oldukları fonksiyonel özellikleri sayesinde gıda ürünlerinde ve proseslerinde geniş kullanım alanına sahip çok fonksiyonlu gıda bileşenleridir. Gıdalarda proteinlerin bileşen olarak kullanımları; emülsiyon, jel, köpük oluşturma, su, yağ/aroma bağlama ve vizkozite artırma gibi tekno-fonksiyonel özellikleriyle yakından ilişkilidir. Özellikle emülsiyon tipi işlenmiş gıdalarda tekstür ve emülsiyon stabilitesi oldukça önemli parametreler olup, proteinler bu özelliklerin ürüne kazandırılmasında aktif rollere sahiptirler (Phillips, 2013). Günümüzde hayvansal proteinler, bitkisel proteinlere göre fonksiyonel açıdan üstün özellikler gösterse de ekonomik, etnik ve dini nedenlere ek olarak tüketicilerin sağlıklı beslenme ve vejetaryenliğe olan ilgisinin artışı bitkisel protein talebini ve dolayısıyla bu konuda yapılan araştırmaları hızlandırmıştır (Alu'datt ve ark., 2013).

Kenevir; lifi ve yağı için uzun yıllardan beri üretilen tek yıllık tıbbi bir bitkidir. Temelde iki ayrı türü olan kenevirin, *Cannabis sativa* L. (*C. sativa* L.) türü düşük uyuşturucu etken maddesi, d-9-tetrahidrokannabinol (THC), içeriğine (%0,3) sahip olan endüstriyel çeşididir (Schlutenhofer ve Yuan 2017). Kenevir lifinin kullanımına kâğıt, biyobozunur plastik, tekstil ve yakıt endüstrilerinde artan talep ile ortaya atık olarak çıkan ve çok değerli bileşenleri barındıran kenevir tohumu miktarı da artmaktadır. Kenevir tohumları yapısında yüksek kalitede protein (%20–25) ve yağ (%30–35) ihtiva eden mükemmel bir besin kaynağıdır (Callaway, 2004). Kenevir yağı ekstraksiyonu sonrası tohumlardan geriye kalan küspede yaklaşık %55–60 oranında protein bulunmaktadır (Tang ve ark., 2006). Kenevir tohum proteinini (KTP) yumurta beyazı ve soya proteini ile kıyaslayan çalışmalarda kenevir proteininin besinsel değeri ve sindirilebilirlik açısından bu proteinlere alternatif bir gıda katkı maddesi olduğu ortaya koyulmuştur (Callaway, 2004; Wang ve ark., 2019). Kenevir tohumu besleyici değerinin yanı sıra kan basıncını ve kolesterolü düşürme gibi pozitif sağlık etkileri de göstermektedir (Oomah ve ark., 2002). Ayrıca, KTP'nin antioksidan aktivite, anjiyotensin (Teh ve ark., 2016), dipeptil peptidaz IV (Nongonierma ve FitzGerald,

2015) ve α -glukosidaz enzim inhibisyonu (Ren ve ark., 2016) aktivitelerine sahip olduğu rapor edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda, KTP'nin emülsifikasyon, köpük ve film oluşturma gibi teknolojik fonksiyonel birçok özelliğinin olduğu saptanmıştır (Malomo ve Aluko., 2015; Tang ve ark., 2006; Yin ve ark., 2008). KTP'nin sayısız gıda ürünü formülasyonunda kullanımına ve sahip olduğu fonksiyonel özelliklerin ortaya çıkmasına özellikle nötr ve altındaki pH değerlerindeki düşük çözünürlüğü engel teşkil etmektedir (Tang ve ark., 2006; Yin ve ark., 2008; Wang ve ark., 2019). KTP'nin düşük çözünürlüğünün altında yatan neden içeriğindeki 6 alt ünitelerden oluşan (hekzamer) globüler edestin proteininin (%60–80) kompakt yapısı ve yüksek oranda içerdiği metiyonin ve sistein amino asitlerinin moleküller arası kovalent disülfid bağlar oluşturarak birbiri ile kolayca agregat olma eğilimidir (Tang ve ark., 2006). KTP'nin bu problemini çözmeye yönelik çeşitli bilimsel çalışmalar yapılmıştır. Örneğin; araştırmacılar enzimatik hidroliz ve açılma reaksiyonları (Yin ve ark., 2008), sıcaklık uygulaması (Raikos ve ark., 2014) ve pH değiştirme-ısı kombinasyonu (Wang ve ark., 2018a) gibi ısı ve kimyasal uygulamalarla kenevir proteinlerinin bu handikabını elemine etmeye çalışmışlardır. Bu çalışmalardan pH değiştirme-ısı kombinasyonunda %20 olan kenevir tohum proteininin çözünürlüğünün %97'ye ulaştığı saptanmıştır. Ancak, bu çalışmada 80°C'nin üstündeki sıcaklık uygulaması protein yapısında lisinoalainin (LAL) olarak bilinen toksik bir bileşiği ortaya çıkarmış ve ayrıca bazı amino asitlerin miktarında önemli derecede azalmalar meydana getirmiştir (Wang ve ark., 2018a). Enzimatik hidroliz ile KTP'nin modifikasyonunda ise kullanılan tripsin enzimi proteinin çözünürlüğünü artırırken; emülsiyon ve köpük oluşturma kapasitesini düşürmüştür (Yin ve ark., 2008).

Besinsel bileşiminin zenginliğine ek olarak birçok fonksiyonel ve biyoaktif özelliği bünyesinde barındıran, proseste atık olarak görülen kenevir tohum proteinlerine uygun modifikasyon yöntemleri hala yeterince aydınlatılamamıştır. Bu doktora tez çalışmasında, ısı olmayan üç teknoloji (ultrases homojenizasyonu, yüksek basınç homojenizasyonu ve manotermosonikasyon) temel alınarak KTP'nin yapısında meydana gelen değişimler incelenmiştir. Aynı zamanda bu ısı olmayan teknikler kimyasal yöntemle de (pH değiştirme) birleştirilerek bu kombine uygulamaların protein modifikasyonu üzerindeki etkinliği incelenmiştir.

Bu doktora tez çalışmasının hipotezleri aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- i. Ultrases homojenizasyon (USH) uygulama parametreleri KTP’de istenen modifikasyonu elde etmek için kritik olabilir. Uygun modellerle KTP’de istenen fizikokimyasal ve fonksiyonel değişimler sağlanabilir.
- ii. USH uygulaması, KTP’nin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısında değişim ortaya koyabilir. Bu değişimler KTP’nin protein-protein agregasyon eğilimini azaltarak çözünürlük başta olmak üzere fonksiyonel özellikleri geliştirebilir.
- iii. USH uygulanan KTP’nin fonksiyonel özelliklerindeki değişimler fizikokimyasal özellikleriyle doğrudan ilişkili olabilir.
- iv. Manotermosonikasyon (MTS) uygulama parametreleri KTP’de istenen değişimi elde etmek için önemli olabilir.
- v. Yüksek basınç homojenizasyon (YBH) ve MTS uygulamaları KTP’nin makroagregat yapısında kavitasyonel kuvvetlerin etkisiyle çeşitli modifikasyonlar ortaya koyabilir.
- vi. Kimyasal modifikasyon uygulaması (pH değiştirme) ile ısıl olmayan uygulamaların kombinasyonu KTP’nin yapısını kavitasyonel etkilere hassas hale getirebilir.



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Bitkisel Proteinler

Sanayileşme ve küresel nüfustaki dikkat çekici artış, sürdürülebilir nitelikteki gıda kaynaklarına olan talebi ortaya çıkarmıştır. Ayrıca nüfus ve tüketicilerin beslenme alışkanlıklarındaki değişimlerin etkisiyle diyetteki protein ihtiyacının özellikle yenilenebilir kaynaklardan sağlanması güncel bir konu olmuştur (Wen ve ark., 2019). Bunun nedenleri şu şekilde özetlenebilir: (i) Bitkisel kaynakların çevre dostu ve sürdürülebilir olması; (ii) hayvansal proteinlerin uzun süreli kullanımının yüksek tansiyon, obezite gibi sağlık risklerine yol açması; (iii) tüketicilerin vejetaryanlık eğilimi; (iv) bitkisel proteinlerin daha çeşitli ve erişilebilir olması; (v) dini inanışlar, kültürel etkiler ve prion vb. hayvansal hastalıklardan kaçınma isteğidir (Henchion ve ark., 2017).

Hayvansal proteinler, örneğin süt, yumurta ve et proteinleri, geleneksel ve işlenmiş gıdalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Hayvansal proteinlerin besinsel açıdan bitkisel proteinlere kıyasla birçok avantajı olmasına rağmen, olumsuz çevresel etkileri ve sınırlı kaynak mevcudiyeti yadsınamaz bir problem teşkil etmektedir. Bu nedenle, hayvansal proteinlere alternatif protein kaynaklarının geliştirilerek bu problemin üstesinden gelmek için yenilebilir nitelikteki kaynakların ve sürdürülebilir üretim uygulamalarının benimsenmesi gerekmektedir (Wen ve ark., 2019).

Dünyada bitkisel protein pazarı 10,5 milyar dolarlık hacme sahip olmakla birlikte bu pazarın önümüzdeki 5 yılda %6,6 büyüme göstereceği tahmin edilmektedir (Grandview Research, 2022). Bitkisel protein pazarında baskın olan soya proteinine yönelik genetik modifikasyon endişesi, farklı ve daha fonksiyonel protein kaynakları üzerinde çalışmaların yoğunlaşmasını teşvik etmektedir. Bitkisel proteinlere artan talep meyve, sebze, tahıl ve çeşitli endüstriyel-tarımsal atıklarının ticari protein kaynağı olarak değerlendirilmesinde bir yarış ortaya çıkarmıştır (Wen ve ark., 2019). Gıda endüstrisi atıkları önceleri çevresel problem olarak görülürken, günümüz

araştırmaları gıda atıklarının değerli bileşenlerin kaynağı ve ilaç etken maddesi olarak değerlendirilmesi konusunda hızlı bir ivme kazanmıştır (Galanakis, 2012). Protein, diyet lifi ve biyoaktif bileşenlerce zengin olan endüstriyel atıkların insan veya hayvan gıdası olarak tüketilmesinin sağlık üzerine olumlu etkilerinin yanı sıra çevresel geri dönüşüm ve gıda sisteminin sürdürülebilirliğine olan katkısı da aşıkardır (Oreopoulou ve Russ, 2007). Özellikle yağ endüstrisinde solvent veya mekaniksel ekstraksiyon yöntemleri sonrası, kabuk, çekirdek, küspe ve yağ tortusu olmak üzere önemli miktarda tarımsal işleme atığı ortaya çıkmaktadır. Yağ uzaklaştırma işlemi sonrası küspe, çeşide bağlı olarak %35–60 arasında protein içermektedir. Yağ endüstrisi atıklarından elde edilen proteinlerin düşük maliyetli gıda bileşeni olarak veya istenilen fonksiyonel özelliklerin sağlanmasıda gıda katkı maddesi olarak kullanım potansiyeli bulunmaktadır (Moure ve ark., 2006). Tarımsal işleme atıklarının depolanması ve nakliyesinde yaşanan ekonomik kısıtlar nedeniyle bu ürünler çoğunlukla hayvansal yem veya gübre olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle hem besinsel hem de teknolojik açıdan değerli bu atıkların verimli, ucuz ve çevresel açıdan güvenli şekilde tekrar değerlendirilmesi sürdürülebilirlik ve endüstriyel karlılık açısından önem arz etmektedir (Lowe ve Evans, 1995). Tarımsal işleme atıklarının fonksiyonel protein kaynağı olarak kullanıldığı çeşitli çalışmalar literatürde mevcuttur. Örneğin; Gul ve ark. (2018) fındık yağı işleme proses atıklarından ekstrakt ettikleri proteinlerin fonksiyonel özelliklerini incelemişlerdir. Benzer şekilde ayçiçek yağı küspesi (Malik ve ark., 2017); perilla küspesi (Zhu ve Fu, 2012); kanola küspesinden (Manamperi ve ark., 2011) elde edilen proteinlerin fonksiyonel özellikleri ve gıda katkı maddesi olarak kullanım potansiyelleri araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Bu alışmalar sonucunda emülsifikasyon, köpürme, su bağlama, yağ bağlama vb. birçok fonksiyonel özelliği bünyesinde barındıran bitkisel proteinlerin hayvansal proteinlere alternatif teknolojik potansiyele sahip olabileceği ortaya koyulmuştur.

2.2. Endüstriyel Kenevir

Kenevir; lifi ve yağı için uzun yıllardan beri üretilen tek yıllık tıbbi bir bitkidir. Kenevir bitkisi Çin’de yaklaşık 4500 yıl önce yetiştirilmeye başlanmış olup, liflerinin kullanıldığını gösteren kayıtlar, Neolitik devirlere kadar ulaşmaktadır. M.Ö. 700-800’lü yıllarda Anadolu’da kenevir liflerinin bulunduğunu gösteren kayıtlar

mevcuttur. Kenevir ülkemizde kendir ve çetene olarak da adlandırılmaktadır (Gül, 2008). Temelde iki ayrı türü olan kenevirin, *C. sativa* L. türü düşük d-9-tetrahidrokannabinol (THC) içeriğine (%0,3) sahiptir (Schlутtenhofer ve Yuan 2017). Türkiye’de "2313 Sayılı Uyuşturucu Maddelerin Murakabesi Hakkında Kanun"da 1990 yılında yapılan değişiklikle endüstriyel öneme sahip düşük THC oranı (%0,3) olan *Cannabis sativa* L. türü kenevirlerin lif, tohum, sap ve benzeri amaçlarla ekimi bakanlık iznine tabi tutulmuştur. Güncel olarak 2016 yılında yürürlüğe konulan yönetmelik gereğince Türkiye’de kenevir tarımına toplamda 20 ilde destek verilmektedir. Bu iller; Amasya, Antalya, Bartın, Burdur, Çorum, İzmir, Karabük, Kastamonu, Kayseri, Kütahya, Malatya, Ordu, Rize, Samsun, Sinop, Tokat, Uşak, Yozgat, Zonguldak ve Sivas’tır. Ülkemizde 2018 yılı TÜİK verilerine göre 590 hektar (ha) kenevir ekim alanında 7 ton lif ve 3 ton tohum üretilmektedir (TÜİK, 2022). Ülkemizdeki kenevir ekim alanları Avrupa’ya kıyasla oldukça azdır. Özellikle Çin 30 bin ha ekim alanı ile kenevir tarımında lider konumdadır. Bunun haricinde Kanada, Şili, Kuzey Kore ve Fransa önemli kenevir üreticileridir. Ticari ve araştırma amaçlı kenevir tarımı en az 47 ülkede yapılmaktadır (Schlутtenhofer ve Yuan 2017). Özellikle 2011 yılından beri Dünya çapında kenevir ekim alanları büyük artış göstermiştir. Günümüzde ilaç, kâğıt, yakıt ve kumaş üretimlerini de içine alan 3 binin üstünde üründe kullanılan kenevir, küresel pazarda yıllık 4 milyar dolarlık bir değere sahiptir. “Grand View” raporuna göre 2025 yılında kenevir ve kenevir ürünlerinin toplam piyasa değerinin 11 milyar dolara çıkması beklenmektedir (Grandview Research, 2022). Kenevirin kâğıt, biyobozunur plastik, tekstil ve yakıt endüstrilerinde kullanılmasıyla piyasada artan talep ortaya çok değerli bileşenleri barındıran kenevir tohumu miktarını da artırmaktadır.

2.3. Endüstriyel Kenevir Tohum Özellikleri

Botanik açıdan, kenevir tohumu *C. sativa* L. meyveleridir. Tohum çapları 3,0 ila 5,0 mm arasında değişmekte, yuvarlak şekilli, koyu kırmızı-kahverengi bir renge sahiptir. Her tohum, ince iki tabakalı perikarp (dış tüp hücreli tabaka ve iç süngerimsi parankima hücreli tabaka), bir endosperm ve iç kısmında iki kotiledon ile kaplıdır (Leonard ve ark., 2020). Kenevir tohumu binlerce yıldan beri kullanılan mükemmel bir besin kaynağıdır. Yapısında %20–25 oranında yüksek kalitede protein, %30–36

oranında yağ, %30–40 lif ve %6–7 nem ihtiva etmektedir (Tablo 2.1) (Callaway, 2004).

Tablo 2.1. Kenevir tohumunun kimyasal bileşimi (%) (Callaway, 2004).

Bileşen	Kenevir tohumu	Kenevir tohum küspesi
Yağ (%)	35,5	11,1
Protein (%)	24,8	33,5
Karbonhidrat (%)	27,6	42,6
Nem (%)	6,5	5,6
Kül (%)	5,6	7,2
Toplam diyet lif (%)	27,6	42,6
Çözünür lif (%)	5,4	16,4
Çözünmeyen lif (%)	22,2	26,2
Enerji (kJ/100 g)	2200	1700

Kenevir tohumu yağı 2 temel çoklu doymamış yağ asidini mükemmel oran sayılan 3:1 (Omega 6: Omega 3) oranında içermesiyle insan beslenmesinde önemli bir role sahiptir (Oomah ve ark., 2002). Aynı zamanda hidroksisinamik ve lignanamid gibi polifenoller açısından zengindir (Chen ve ark., 2013).

2.4. Endüstriyel Kenevir Tohum Proteininin Özellikleri

Kenevir tohumu, birçok gıdada az miktarda bulunan esansiyel amino asitlerden sistein ve metiyonin amino asitlerini yüksek oranda içermektedir. Aynı zamanda vücutta pek çok fizyolojik fonksiyonda etkili olan arjinin ve glutamik asit içeriği yüksektir (Tang ve ark., 2006). Kenevir tohum proteini (KTP), dengeli bir amino asit profiline sahiptir. KTP, FAO/WHO'nun 2–5 yaş arası çocuklar için tavsiye ettiği esansiyel amino asitlerin büyük çoğunluğunu içermektedir. Sülfürce zengin olan KTP özellikle soya fasulyesi, bezelye gibi baklagil proteinlerine kıyasla iyi bir tiyol kaynağıdır (Wang ve Xiong, 2019). Tablo 2.2'de kenevir tohum fraksiyonlarının ve proteinlerinin amino asit dağılımları (%) verilmiştir (Leonard ve ark., 2020).

Tablo 2.2. Kenevir tohumunun farklı fraksiyonlarının ve proteininin amino asit içeriği (%) (Leonard ve ark., 2020).

Amino asit (%)	Kenevir tohum fraksiyonları				Kenevir tohum proteini	
	Bütün tohum	Kabuksuz tohum	Kenevir tohum küspesi	Kenevir tohum kabuğu	Albumin	Globulin
Alanin	0,96 ± 0,09	1,52 ± 0,14	1,61 ± 0,32	0,40 ± 0,17	3,91	2,84
Arjinin	2,28 ± 0,26	4,55 ± 0,45	3,91 ± 0,89	0,94 ± 0,80	12,82	16,12
Asparajin	2,39 ± 0,18	3,66 ± 0,37	3,66 ± 0,67	0,90 ± 0,35	7,93	9,47
Sistin	0,41 ± 0,06	0,65 ± 0,07	0,70 ± 0,15	0,18 ± 0,06	3,20	3,32
Glutamik asit	3,74 ± 0,30	6,23 ± 0,77	6,03 ± 1,24	1,19 ± 0,62	20,37	21,48
Glisin	1,06 ± 0,10	1,61 ± 0,15	1,66 ± 0,35	0,41 ± 0,16	8,26	4,10
Histidin	0,55 ± 0,06	0,97 ± 0,11	0,93 ± 0,19	0,25 ± 0,15	3,68	3,87
İsolösin	0,80 ± 0,11	1,29 ± 0,35	1,45 ± 0,23	0,39 ± 0,14	2,02	2,86
Lösin	1,49 ± 0,16	2,14 ± 0,28	2,35 ± 0,45	0,71 ± 0,27	4,05	5,57
Lisin	0,86 ± 0,09	1,26 ± 0,05	1,32 ± 0,27	0,33 ± 0,16	7,37	3,69
Metiyonin	0,56 ± 0,08	0,94 ± 0,12	0,88 ± 0,25	0,18 ± 0,12	1,74	4,07
Fenilalanin	1,03 ± 0,16	1,43 ± 0,30	1,62 ± 0,30	0,53 ± 0,09	1,32	3,27
Prolin	0,90 ± 0,10	1,62 ± 0,41	1,59 ± 0,32	0,69 ± 0,48	3,82	3,87
Serin	1,19 ± 0,17	1,70 ± 0,17	1,73 ± 0,32	0,42 ± 0,16	5,12	5,73
Treonin	1,01 ± 0,22	1,27 ± 0,11	1,35 ± 0,23	0,36 ± 0,13	4,63	2,60
Triptofan	0,23 ± 0,06	0,38 ± 0,07	0,39 ± 0,10	0,06 ± 0,04	0,16	0,34
Tirozin	0,68 ± 0,11	1,28 ± 0,22	1,15 ± 0,28	0,40 ± 0,07	2,02	3,41
Valin	1,14 ± 0,14	1,78 ± 0,19	1,91 ± 0,30	0,60 ± 0,31	2,90	3,41

Diyetteki proteinin sindirilebilirliği, sindirim enzimlerinin proteine erişebilirliğini etkilemesi nedeniyle proteinin moleküler yapısı ve diğer bileşenlerle etkileşimi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Soya (%71 sindirilebilirlik) ve benzeri diğer bitkisel protein kaynaklarının düşük sindirilebilirliğine rağmen KTP vücutta yüksek oranda (%88–91) sindirilebilmektedir (Wang ve ark., 2019).

KTP'nin yapısı globulin (edestin; %60–80) ve albümin (%25) protein fraksiyonlarından oluşmaktadır. Edestin fraksiyonu disülfid bağı ile bağlanmış asidik ve bazik 6 alt üiteden oluşmaktadır (Tang ve ark., 2006). Edestinin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 300 kDa'dır ve yapısındaki arjinin ve metiyonin amino asitlerinin miktarı yüksektir (Wang ve ark., 2019). Albümin fraksiyonu ise daha az disülfid bağı içeriğiyle globuline kıyasla daha esnek bir yapı gösterir. Malomo ve Aluko (2015) albümin ve globulin fraksiyonlarının fonksiyonel özelliklerini kıyasladıkları

çalışmalarında, albümin fraksiyonunun daha yüksek çözünübilirlik ve köpük oluşturma özelliği gösterdiğini rapor etmişlerdir. KTP'nin düşük çözünübilirliğinin içeriğindeki 6 alt üniteden oluşan (hekzamer) globüler yapıdaki edestin proteininin (%60–80) ve yüksek oranda içerdiği metiyonin ve sistein amino asitlerinin moleküller arası kovalent disülfid bağlar oluşturarak birbiri ile agrege olmasından kaynaklandığı rapor edilmiştir (Tang ve ark., 2006). KTP düşük alerjen gıda maddesi olarak bilinmektedir. Bu konuda Mamone ve ark. (2019) kenevir tohumunun yapısında yer alan taumin benzeri protein ve lipit transfer proteinleri gibi alerjen maddelerin protein izolatu elde etme aşamasında elemine olarak elde edilen protein izolatında bulunmadığını tespit etmişlerdir.

2.4.1. Endüstriyel kenevir tohum proteininin gıda uygulamaları

Kenevir tohum ve proteinlerinin gıda formülasyonlarında ürünün özelliklerini geliştirmek veya ürüne yeni fonksiyonel özellikler kazandırmak için kullanımı üzerine çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, Mikulec ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada, kenevir unu ile hazırlanan ekmeklerde buğday unu ile hazırlanan kontrol ekmeklerine kıyasla antioksidan aktivitenin arttığı, HMF, furfural ve aldehit içeriğinin ise azaldığı rapor edilmiştir. Araştırmacılar elde edilen kenevir unu ilaveli ekmeklerin hacminde ve organoleptik özelliklerinde düşüş gözlemlemişlerdir. Buğday ununa eklenecek kenevir unu oranı en fazla %30 olarak rapor edilmiştir Kenevir tohum ve proteinlerinin et ürünlerinde kullanımını araştıran bir çalışmada ise, domuz etlerine kabuklu ve kabuksuz kenevir tohumu, kenevir proteini ve ayrıca kenevir unu (%5 oranında) ilave edilmiştir. Elde edilen et ürünlerinde kenevir türevi ilavesi yapılmayan et ürünlerine kıyasla daha sert, yüksek lif, mineral ve çoklu doymamış yağ asidi içeriği olan ürünler elde edilmiştir. Aynı zamanda kenevir türevleri eklenen et ürünlerinde mikrobiyal açıdan fark görülmezken, tüketiciler özellikle kabuksuz kenevir tohumlarının eklendiği et ürününü hiçbir ilave yapılmayan kontrol et örneğine kıyasla daha kabul edilebilir bulmuşlardır (Zajac ve ark., 2019).

Fonksiyonel ürünlere artan talebin sonucunda birçok biyoaktif özelliği bulunan kenevir tohumlarından bitkisel temelli fermente yenilikçi ürünler geliştirilmiştir. Kenevir sütlerine *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* eklendiği bir çalışmada probiyotik bakteri sayısı fermentasyon sonrası 2 logaritmik birim artış göstermiştir. 21

günlük raf ömrü sürecinde, probiyotik bakteri sayısı 10,92 log (kob/mL)'dan 7,35 log (kob/mL)'e azalış gösterirken minimum 6 log olan terapötik etki seviyesi korunmuştur (Szparaga ve ark., 2019). Benzer şekilde kenevir sütlerinin *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* ve *Bifidobacterium bifidum* probiyotik bakterileri ile fermentasyonu sonucu elde edilen bitkisel süt ürününde hayvansal süt ürünlerine kıyasla uzun süreli bakteri canlılığını muhafaza eden, daha yüksek antioksidan, doymamış yağ asidi ve biyoaktif bileşen içeren yenilikçi ürünler elde edilmiştir (Nissen ve ark., 2020).

2.4.2. Endüstriyel kenevir tohum proteininin sağlık uygulamaları

İlaç etken maddesi niteliğindeki bileşenlerin doğal ve sürdürülebilir kaynaklardan sağlanması geleceğin ilaç ve gıda bileşeni üretim endüstrisinde büyük önem taşımaktadır. Kenevir tohumu besleyici değerinin yanı sıra kan basıncını ve kolesterolü düşürme potansiyeliyle pozitif sağlık etkisi göstermektedir (Oomah ve ark., 2002). KTP'nin antioksidan aktivite ve anjiyotensin enzim (Teh ve ark., 2016), dipeptil peptidaz IV (Nongonierma ve FitzGerald, 2015) ve α -glukosidaz enzim inhibisyon (Ren ve ark., 2016) aktivitelerine sahip olduğu yapılan güncel çalışmalarda ortaya koyulmuştur. Tablo 2.3'te KTP'den elde edilen peptitlerin biyolojik aktivitesi verilmiştir.

Tablo 2.3. Kenevir proteininden elde edilen peptitlerin biyolojik aktivitesi.

Biyoaktivitesi	Referans
Anjiyotensin enzim inhibisyonu (ACE)	Teh ve ark. (2016)
Renin inhibisyonu	Girgih ve ark., (2014)
Tansiyon düşürücü etki	Girgih ve ark., (2014)
Açilkolinesteraz (AChE) inhibisyonu	Malomo ve Aluko, (2016)
Antioksidan	Teh ve ark. (2016), Hadnadev ve ark., 2018
Metal bağlama	Wang ve Xiong (2018)
Hücre büyümesi	Lu ve ark. (2010)
Hipokolestrol etkisi	Zanoni ve ark. (2017)
α -glukosidaz inhibisyonu	Ren ve ark. (2016)

2.4.3. Endüstriyel kenevir tohum proteininin modifikasyonu

KTP kompakt yapısı nedeniyle genellikle sınırlı fonksiyonel özelliğe ve endüstriyel uygulama alanına sahiptir. Bu nedenle, araştırmacılar tarafından KTP'nin fonksiyonel özelliklerini geliştirmek için ısıtma işlemi, enzimatik hidroliz, açılma ve pH değiştirme gibi birçok fiziksel, kimyasal ve enzimatik uygulamalar üzerinde çalışılmıştır. Bu çalışmalar ile ilgili detaylı bilgiler Tablo 2.4'te listelenmiştir.

Tablo 2.4. Kenevir tohum proteininin modifikasyonu üzerine yapılan çalışmalar.

Uygulama	Sonuç	Kaynak
<u>Sıcaklık</u>		
95°C 10 dk.	Çözünürlük azalmıştır. Emülsiyon aktivite ve stabilite indeksleri artmıştır. Köpük aktivitesi değişmezken stabilitesi artmıştır. Su bağlama kapasitesi artarken yağ bağlama kapasitesi azalmıştır.	Yin ve ark. (2008)
40–100°C 10 dk.	80°C ve üstü sıcaklıklarda agregat oluşumu gözlenmiştir.	Raikos ve ark. (2014)
80°C 60 dk.	Çözünürlük artmıştır.	Wang ve ark. (2018a)
<u>Enzimatik hidroliz</u>		
Tripsin enzimi	Çözünürlük artmıştır. Su ve yağ bağlama kapasitesi azalmıştır. Emülsiyon aktivitesi nötr ve asidik pH'da azalmıştır. Emülsiyon stabilite indeksi nötr pH haricinde artmıştır.	Yin ve ark. (2008)
Alkalaz, pepsin, termolisin	Köpük kapasitesi ve stabilitesi azalmıştır. Jelleşme üzerinde olumsuz etki göstermiştir.	Isinguzo, (2011)
Açılma/ Süksinilasyon	Çözünürlüğü artmıştır. Nötr pH'da emülsiyon aktivite indeksi artmıştır.	Yin ve ark. (2009)
pH12 + Sıcaklık uygulaması	Çözünürlük, yüzey hidrofobisitesi, emülsiyon aktivite indeksi artmıştır. Lisinoalanin toksik maddesi miktarı 50°C'ye kadar çok değişmezken, bu değerin üstünde oldukça artmıştır.	Wang ve ark. (2018b)

2.5. Proteinlerin Fonksiyonel Özellikleri

Proteinlerin fonksiyonel özellikleri “işleme, depolama, pişirme ve tüketim sırasında gıda sistemlerindeki davranışını etkileyen fiziksel ve kimyasal özellikler” olarak tanımlanmaktadır. Gıdalardaki proteinlerin fonksiyonel davranışını etkileyen fiziko-kimyasal özellikler arasında boyut, şekil, amino asit bileşimi/dizisi, net yük, yük dağılımı, hidrofobiklik, hidrofiliklik, moleküler yapısı (ikincil, üçüncül ve dördüncül), dış faktörlerdeki değişime karşı moleküler esnekliği ve diğer gıda bileşenleri ile etkileşimi sayılabilir (Damodaran, 1994). Gıdalarda proteinlerin bileşen olarak kullanımları; emülsifikasyon, jel oluşturma, köpük oluşturma, su ve yağ bağlama, vizkozite artırma gibi fonksiyonel özellikleriyle yakından ilişkilidir (Phillips, 2013). Kazein miselleri ve soya proteinlerinin pıhtı oluşturma özellikleri, yumurta akının köpürme ve çırpma özellikleri, et proteinlerinin su bağlama, emülsifiye etme ve doku oluşturma davranışı peynir, süt ürünleri, et ürünleri, fırıncılık ürünleri, dondurma vb. birçok gıda ürünüde önemlidir (Damodaran, 1994). Özellikle emülsiyon tipi işlenmiş gıdalarda tekstür ve emülsiyon stabilitesi çok önemli parametreler olup, proteinler bu özelliklerin ürüne kazandırılmasında aktif rollere sahiptirler (Phillips, 2013).

Gıdaların duyusal kalitesine katkıda bulunan bir proteinin fonksiyonel rolü, tek bir fizikokimyasal özellikten kaynaklanmamaktadır; çoklu özelliklerin karmaşık bir etkileşiminin sonucudur. Örneğin, yumurta akı köpürtme, emülsiyonlaştırma ve bağlama gibi birçok işleve sahiptir. Bu durum yumurta akını birçok gıda uygulamasında arzu edilen protein haline getirir. Bir proteinin gıda sisteminde yüksek performans göstermesi için birden fazla işlevselliğe sahip olması beklenmektedir (Damodaran, 1994). Proteinlerin fonksiyonel özellikleri 3 temel kategoriye ayrılabilir. Bunlar;

1. Hidratasyon özellikleri (çözünebilirlik, su ve yağ bağlama)
2. Yapı ve reoloji özellikleri (vizkozite, jelleşme)
3. Yüzey özellikleri (emülsifikasyon, köpük oluşturma) (Moure ve ark., 2006)

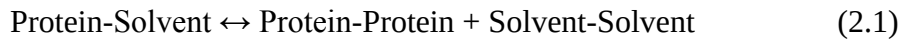
Gıdalarda proteinlerin sahip olduğu fonksiyonel özellikleri, kullanıldıkları gıdalar ve yaygın olarak kullanılan protein çeşitleri Tablo 2.5’te listelenmiştir (Damodaran, 1994).

Tablo 2.5. Gıdalarda proteinlerin fonksiyonel rolü (Damodaran, 1994).

Fonksiyon	Mekanizma	Gıda	Protein
Çözünübilirlik	Hidrofilik	İçecekler	Peynir altı suyu proteini
Su bağlama	Hidrojen bağlama, iyonik hidrasyon	Sosis, kek, ekmek	Kas proteini, yumurta proteini
Yağ bağlama	Hidrofobik etkileşim ve hapsedme	Az yağlı fırıncılık ürünleri ve donat	Yumurta proteini, süt proteini, tahıl proteini
Vizkozite	Su bağlama, hidrodinamik boyut ve şekil	Çorba, salata sosu, tatlı, sos	Jelatin
Jel oluşturma	Su hapsedme, ağ oluşumu	Et, jel, kek, fırıncılık ürünleri, peynir	Kas proteini, yumurta proteini, süt proteini
Emülsifikasyon	Adsorpsiyon ve yüzeyde film oluşumu	Sosis, Bologna, çorba, kek, sos	Kas proteini, yumurta proteini, süt proteini
Köpük oluşturma	Yüzey adsorpsiyonu ve film oluşturma	Kremşanti, dondurma, kek, tatlı	Yumurta proteini, süt proteini

2.5.1. Çözünübilirlik

Proteinlerin çözünübilirliği, protein-protein ve protein-solvent etkileşimleri arasındaki dengeğin termodinamik karşılığıdır. Çözünürlük, protein yüzeyindeki hidrofobik ve hidrofilik grupların içinde bulunduğu solvent ile etkileşiminden kaynaklanan net serbest enerji değişimi ile ilişkilendirilmektedir. Diğer bir deyişle, çözünürlük, protein yüzeyinin fizikokimyasal doğasından etkilenmektedir (2.1) (Damodaran, 1994; Hall, 1996).



Proteinlerin çözünübilirliği; kıvam artırma, köpük oluşturma, emülsifikasyon ve jelleşme gibi birçok fonksiyonel özelliğini etkilemektedir. Çözünürlüğü düşük olan proteinlerin gıdalarda kullanılabilirliği kısıtlıdır (Damodaran, 1994). İçeceklerde, emülsifiye ürünlerde, fırıncılık ürünlerinde, köpüklerde proteinin sahip olduğu fonksiyonel özellikleri gösterebilmesi için bulunduğu ortamda çözünabilir formda olması şarttır. Yüksek çözünürlük; az sayıda hidrofobik grup varlığı, yüksek yük ve izoelektrik pH'ın üstünde ve altındaki pH'larda meydana gelen elektrostatik itme ve iyonik hidrasyonun etkisinde sağlanabilmektedir (Moure ve ark., 2006). Proteinler

asidik ve bazik koşullarda yüksek çözünübilirlik gösterirken izoelektrik noktaya yakın değerlerde (pH 4–6) proteinlerin çözünübilirliği düşmektedir (Boye ve ark., 2010). Çözünübilirlik proteinlerin yüzey aktivitesinin bir sonucudur. Proteinlerin yüzey aktivitesini belirleyen faktörlerden bazıları amino asit kompozisyonu, amino asit dağılımı, moleküler esneklik, şekil ve boyut olarak sayılabilir (Hall, 1996).

Nötr pH’da KTP’nin çözünürlüğü genellikle zayıftır ve uygulanan santrifüjleme kuvvetine ve çözünürlük metoduna bağlı olarak çözünürlüğü %8–38 arasında değişir (Hadnağev ve ark., 2018; Malomo ve Aluko, 2015; Tang ve ark., 2006). KTP’nin nötr pH’da sahip olduğu düşük çözünürlüğü, edestinın agregasyon eğilimi ile ilişkilendirilmiştir. Yüksek orandaki sistein ve metiyonin amino asitleri moleküller arası disülfid bağları oluşturarak edestin proteinlerinin agregasyonunu artırmaktadır. Albümin fraksiyonunun (pH 3: %57, pH 8: %84) çözünürlüğü, globulin fraksiyonundan (pH 3: %20, pH 8: %50) önemli ölçüde daha yüksektir (Malomo ve Aluko, 2015).

2.5.2. Su bağlama

Proteinlerin su bağlama kapasitesi “proteinin gramı başına bağlayabildiği suyun miktarı” olarak tanımlanan gıda işleme uygulamalarında önem taşıyan fonksiyonel bir özelliktir. Su bağlama kapasitesinin düşük olması özellikle depolama sırasında gıdaların kurummasına ve kırılgan bir yapıya sahip olmasına neden olmaktadır (Boye ve ark., 2010). Gıda uygulamalarında, su bağlama kapasitesi, suyu yer çekimine karşı tutma kabiliyeti ile ilgilidir ve bağlı su, hidrodinamik su ve kılcak su gibi fiziksel olarak tutulan suyu içerir. Proteinlerin su bağlama kapasitesi amino asit profili, yüklü grupların sayısı, konformasyonu, hidrofobikliği, pH, sıcaklık, iyonik güç ve protein konsantrasyonu ile yakından ilişkilidir (Moure ve ark., 2006). Gıda işlemede su bağlama kapasitesi özellikle et ürünlerinde gevreklik, tekstür; fırıncılık ürünlerinde tazelik, yumuşaklık gibi kalite parametrelerine etki etmektedir.

KTP’nin su bağlama kapasitesi üzerine yapılan çalışmada kenevir ununun yüksek protein içeriği nedeniyle bakla, karabuğday, yeşil bezelye ve buğdaydan hazırlanan unlardan daha güçlü su bağlama kapasitesine sahip olduğu ortaya koyulmuştur (Raikos ve ark., 2014) Aynı zamanda KTP’nin su bağlama kapasitesi keten tohumu ve kanola protein izolatlarından daha yüksek bulunmuştur (Teh ve ark., 2014). Buna karşın soya protein izolatının su bağlama kapasitesi KTP’den daha yüksektir. Bunun nedeni olarak

KTP'nin yapısındaki içe gömülü apolar grupların varlığı gösterilmiştir (Tang ve ark., 2006).

2.5.3. Yağ bağlama

Proteinlerin yağ bağlama kapasitesi “proteinin gramı başına bağlayabildiği yağın miktarı” olarak tanımlanan gıda işleme uygulamalarında önem taşıyan bir özelliktir (Damodaran, 1994). Yağ ve protein arasındaki etkileşim, gıdaların tekstür ve kalitesi üzerinde etkilidir. Proteinin yağ bağlama özelliği emülsifikasyon, aroma bağlama ve hamur oluşturmada önem taşır. Proteinlerin partikül boyutunun küçülmesi daha iyi yağ absorpsiyonu sağlar. Yağ bağlama mekanizması öncelikle proteinin mikro yapısı ile ilişkilidir. Protein yapısında apolar grup artışı yağ bağlama özelliğini artırır (Zayas, 1997).

KTP'nin yağ bağlama kapasitesi, sahip olduğu hidrofobik gruplar ve moleküler esnekliği sayesinde soya proteini ile (Tang ve ark., 2006) aynı iken, keten ve kanola proteinlerinden daha üstündür (Teh ve ark., 2014).

2.5.4. Vizkozite

Proteinlerin vizkozitesi, hidrodinamik özellikleriyle bağlantılıdır ve şekil ve boyut özellikleri, amino asit kompozisyonu ve dağılımından daha fazla etkilenir (Hall, 1996). Denatürasyon ve jelleşme, proteinlerin vizkozitesinin artmasına neden olur. Hidrofobiklik ve mikro yapısı, proteinlerin hidrodinamik özellikleri ve reolojik özelliklerinde rol oynar. Proteinlerin su bağlama kapasiteleri, viskozite üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Proteinlerin kısmi denatürasyonu, hidrodinamik yüzey artışı ile protein vizkozitesinin artmasına yol açar (Moure ve ark., 2006).

2.5.5. Jel oluşturma

Jel, katı ile sıvı arası bir fazdır. Proteinlerin jelleşmesi sol halden jel hale geçiş olarak tanımlanmaktadır. Proteinler kovalent ve kovalent olmayan çapraz bağlarla suyu ve düşük molekül ağırlıklı maddeleri içerisinde hapsedebilecek 3 boyutlu bir ağ yapısı meydana getirirler (Damodaran, 1994). Proteinler farklı reolojik özellikler ve jelleşme noktasına sahip jeller oluşturmak için kullanılırlar. Özellikle proteinler pektin, nişasta ve gamlar ile birleşince oldukça kuvvetli jel yapıları oluşur. Protein jellerinin oluşumu sıcaklık, enzim, divalent katyon varlığında gerçekleşebilmektedir. Sıcaklık varlığında

jelleşen proteinler öncelikle sol halden projel hale geçiş yaparlar. Projel hali, kısmi protein polimerizasyonunun meydana geldiği viskoz sıvı bir formdur. Bu aşama proteinlerin açılmasına, fonksiyonel grupların hidrojen bağları, hidrofobik grupları açığa çıkarmasına yol açarak sonraki adımda jel ağ yapısının oluşumuna neden olur. Gıda sanayinde jel oluşturma, et ürünleri, balık ürünleri, tart/pasta dolguları, meyve jelleri, fırıncılık ürünleri gibi ürünlerin üretiminde oldukça önemli bir fonksiyondur.

KTP üzerine yapılan bir çalışmada en düşük jelleşme konsantrasyonu %22 olarak bulunmuştur (Malomo ve ark., 2014). Bir başka çalışmada ise, KTP'nin en düşük jelleşme konsantrasyonu %12 olarak saptanmıştır (Isinguzo, 2011). KTP'nin en düşük jelleşme konsantrasyonunda görülen farklılıklar kenevir tohum çeşidinden ve spesifik ekstraksiyon koşulları sonucu ortaya çıkan farklı oranlardaki protein fraksiyonları ile ilişkili olabilmektedir. Aynı zamanda, jelleşmeden önce kenevir tohumunun ön ısıtma aşamasında değişen protein denatürasyon dereceleri de jelleşme özelliklerinde etkilidir (Wang ve Xiong, 2019).

2.5.6. Emülsifikasyon

Proteinler yağ damlacıkları etrafında bir film oluşturarak emülsifiye edici özellik gösterir. Böylece proteinler ortamdaki yağların birleşme, kremalaşma, flokülasyon veya sedimantasyon gibi yapısal değişikliklerini önler (Boye ve ark., 2010; Yavuz ve Özçelik, 2016). Proteinlerin sürfaktan özelliği proteinlerin yüzeye adsorbe olmasına, yüzey gerilimini düşürmesine ve yüzeyde ince viskoelastik bir film oluşturmaya bağlıdır (Damodaran, 1994). Proteinlerin emülsifikasyon özelliği molekül ağırlığı, hidrofobiklik, konformasyon kararlılığı, yük, pH, iyonik güç ve sıcaklık gibi fizikokimyasal faktörlere bağlıdır (Moure ve ark., 2006). Emülsiyon aktivite (EA) ve emülsiyon stabilite (ES) indeksleri, proteinlerin emülsifikasyon özelliklerini değerlendirmek için sıklıkla kullanılan iki indekstir. EA, birim protein başına emülsifiye edilebilen yağ miktarını ölçerken, ES, emülsiyonun belirli bir zaman dilimi boyunca yapısındaki değişikliklere direnme yeteneğini ölçer (Boye ve ark., 2010). EA proteinin arayüzeye adsorpsiyonu ve yüzey gerilimini düşürmesi ile ilişkili iken; ES protein filmin reolojik özellikleriyle ilişkilidir. Protein filminin reolojik yapısı protein molekülleri arası interaksiyonların sonucunda oluşan sıkı ve sürekli protein ağ yapısına bağlıdır. Oluşan ağ yapısında hidrofobik, Van der Waals, elektrostatik,

hidrojen bağları gibi kovalent olmayan bağlar etkili olmakta ve proteinin konformasyonel değişimiyle değişim göstermektedir (Damodaran, 1994). Gıda işlemede emülsiyonlar işlenmiş et ürünleri, dondurma, çorbalar, kekler ve soslarda önemli işlevleri yerine getirirler.

KTP'nin emülsiyon özellikleri üzerine yapılan bir çalışmada, soya proteininden daha zayıf emülsiyon özelliği gösterdiği rapor edilmiştir (Tang ve ark., 2006). KTP'nin kanola proteini ile emülsiyon özelliklerini kıyaslayan bir çalışmada ise, proteinlerin emülsiyon kapasiteleri benzer iken KTP'nin emülsiyon stabilite indeksinin daha düşük olduğu bildirilmiştir (Teh ve ark., 2014).

2.5.7. Köpük oluşturma

Gıda ürünlerinde proteinler, gaz halindeki dağılmış fazın stabilize edilmesi için gereken yüzey aktif maddelerdir. Köpük oluşumunda havanın sıvı faza katılması ve iç ve dış kuvvetlere dayanıklı arayüzey filminin oluşması için geniş bir arayüzey alanı gerekir (Moure ve ark., 2006). Oluşan arayüzeyde proteinler birbiri üzerine katlanırlar. Proteinlerin apolar kısımları hava yüzeyinde kalacak şekilde dışarı doğru yönelir. Proteinlerin hava kabarcığı yüzeyine bağlanmasıyla kısmi denatüre olan proteinler bir tabaka oluşturur. Oluşan tabaka hava kabarcıklarını hapseder, böylece hava kabarcıklarının bir araya gelmesi engellenir ve köpük yapısı korunur (Yavuz ve Özçelik, 2016). Köpük oluşturma kapasitesi, proteinin yüzey gerilimini azaltması, moleküler esnekliği ve fiziko-kimyasal özelliklerine (hidrofobiklik, net yük ve yük dağılımı, hidrodinamik özellikler) bağlıdır (Moure ve ark., 2006). Köpük özelliklerini ölçmek için en sık kullanılan indeksler köpük kapasitesi (KK) ve köpük stabilitesidir (KS). KK birim protein başına oluşan köpük miktarını ölçerken; KS köpüğün belirli bir zaman dilimi boyunca yerçekimine ve mekaniksel strese direnme yeteneğini ölçer (Damodaran, 1994). Köpük oluşturma proteinlerin aşağıda sıralanan özelliklerine bağlıdır:

- (i) Çırpma ve köpürme sırasında hızla hava yüzeyine adsorbe olması,
- (ii) Hızlı bir konformasyonel dönüşüme sahip olması, hava-su arayüzünde yüzey gerilimini azaltarak yeniden organize olması,
- (iii) Moleküller arası etkileşimler yoluyla viskoelastik yapışkan film oluşturabilmesidir (Moure ve ark., 2006).

Örneğin; β -kazeinin moleküler esnekliği sayesinde köpük kapasitesi yüksekken vizkoelastik özellikleri zayıf olduğundan köpük stabilitesi düşüktür. Ancak lizozimin köpük kapasitesi düşükken köpük stabilitesi daha yüksektir (Damodaran, 1994). Köpük oluşumu, içecekler, köpükler, kremalı kekler ve çırpılmış kremler gibi gıda uygulamalarında önemlidir.

KTP'nin sahip olduğu hidrofobik amino asitler köpük oluşturma özelliğinin gelişmesine yol açmıştır. KTP'nin köpük oluşturma kapasitesini inceleyen bir çalışmada albümin fraksiyonunun köpük kapasitesi, globulin fraksiyonunun köpük stabilitesinin daha iyi olduğu görülmüştür (Malomo ve Aluko, 2015).

2.6. Ultrases Homojenizasyonu (USH)

Ultrases homojenizasyonu (USH) son dönemlerde proteinlerin tekno-fonksiyonel özelliklerinde önemli değişikliklere yol açması nedeniyle oldukça dikkat çeken zaman ve enerji tasarrufu sağlayan ısıl olmayan fiziksel tekniklerden bir tanesidir (Jambrak ve ark., 2009). USH uygulaması, çeşitli basınç ve yoğunluklarda insan kulağının duyma sınırı altındaki 20 kHz–10 MHz arası frekansları kapsayan mekanik dalgalar olarak tanımlanmaktadır. Genel olarak gıda teknolojisinde düşük şiddetli USH ve yüksek şiddetli USH olmak üzere iki farklı çeşidi bulunmaktadır. Düşük şiddetli USH uygulamaları (0,1–100 MHz frekans) fizikokimyasal özelliklerle ilişkili iken; yüksek şiddetli USH uygulamaları (<0,1 MHz frekans) gıda koruma, enzim inaktivasyonu, biyoaktif bileşen ekstraksiyonu, emülsifikasyon vb. amaçlarla kullanılabilir (Baysal ve İçier, 2012).

USH'nin prensibi; kavitasyon, ısıtma, dinamik çalkalama, kayma gerilmeleri ve türbülans gibi etkilere dayanmaktadır (Kadam ve ark., 2015). Kavitasyonel baloncukların patlaması, mikro jetlerin oluşumu, mikro-türbülans, yüksek hızlı partiküller arası çarpışmalar ve mikro gözenekli partiküllerde bozulmalar sayesinde modifikasyonlar meydana gelirken aynı zamanda kimyasal reaksiyonları da hızlanmaktadır. Patlama sırasında, bu kabarcıkların içinde çok yüksek sıcaklık ve basınç değerlerine (yaklaşık 50 MPa; 5500 K) ulaşılır ve bu da kabarcığın etrafında birçok reaksiyona neden olmaktadır (Shirsath ve ark., 2012).

USH uygulaması sonrasında ortaya çıkan kavitasyon etkisinin proteinlerin moleküler yapısı, yüzey yükleri, partikül boyutu ve yüzey aktivitelerinde değişime neden olarak protein çözünübilirliğini arttırdığı yapılan bazı çalışmalarda ortaya koyulmuştur. Örneğin; soya protein izolat ve konsantratlarına USH uygulaması (20 kHz; 600 W; 15, 30 dk.) sonucunda uygulama yapılmayan izolatlarla kıyasla çözünübilirlik, spesifik yüzey alanı, emülsiyon aktivite indeksinin köpük oluşturma aktivitesi, vizkozitesi artarken; molekül ağırlık dağılımı, partikül boyut ($D_{4,3}$) değerleri azalmıştır (Jambrak ve ark., 2009). Benzer şekilde yine soya proteinlerine USH uygulanan bir çalışmada (20 kHz; %20 frekans; 20 dk.) proteinlerin çözünübilirlik ve yüzey hidrofobisitesi değerleri artarken; serbest sülfidril grup içeriği değişmemiştir. Kontrol örneklerine kıyasla USH uygulanan proteinlerin partikül boyutları ve vizkozitesi azalmıştır. Sonuç olarak USH uygulaması soya proteinlerinin özellikle tersiyer yapısında değişikliklere yol açmıştır (Arzeni ve ark., 2012). Hu ve ark. (2013) tarafından soya proteinlerine (20 kHz; 200, 400, 600 W; 15, 30 dk.) USH uyguladıktan sonra vizkozitesinin arttığı rapor edilmiştir. Aynı zamanda USH uygulaması sonrası soya proteinlerinin uygulama yapılmayanlara kıyasla serbest sülfidril grup içeriği, yüzey hidrofobisitesi ve çözünübilirlik değerleri artmıştır. Elektron mikroskop görüntüsünde uygulama yapılmayan proteine kıyasla daha büyük agregatlar görülürken elektroforetik protein bantlarında önemli bir değişim olmamıştır. Düşük güç (200 W) uygulanan proteinlerde α -heliks ve rastgele sarım yapı azalırken; yüksek güç (400–600 W) uygulanan proteinlerde α -heliks yapıda artış, β -sheet yapıda azalış gözlenmiştir. Bölgesel açılmalar ve moleküller arası etkileşimlerin azalması sonucunda USH uygulaması proteinlerin serbest sülfidril grup, yüzey hidrofobisitesi ve çözünübilirlikte pozitif modifikasyonları sağlamıştır.

Nazari ve ark. (2018) çalışmalarında, darı proteinlerinin USH uygulaması (20 kHz; 18,4, 29,58, 73,95 W/cm²; 5, 12,5, 20 dk.) sonrasında fonksiyonel ve yapısal özelliklerindeki değişimleri ortaya koymuşlardır. USH uygulaması sonrası proteinlerin çözünübilirliği, emülsiyon aktivite indeksi, köpük stabilitesi artarken; molekül ağırlığı azalmıştır. Proteinlerin köpük aktivitesi düşük frekanslarda azalırken; yüksek frekanslarda artmıştır. Yüzeyde negatif yüklü amino asitlerin ortaya çıkmasıyla proteinlerin zeta potansiyeli artış göstermiştir. Genel olarak USH uygulamasıyla kavitasyonel baloncuklarının neden olduğu kesme kuvveti sekonder

yapıda değişim meydana getirmiştir ve uygulama sonrasında proteinlerin moleköl ağırlıkları azalmıştır.

Jiang ve ark. (2014) alışmalarında (20 kHz; 150, 300, 450 W; 12, 24 dk.) siyah fasölle proteinlerine USH uygulaması sonrasında primer yapıda değişimin olmadığını benzer protein bantlarının görölmesiyle ortaya koymuşlardır. Sekonder yapıda USH uygulaması sonrası α -heliks yapı azılırken β -sheet yapı artmıştır. Floresans spektrumuna göre USH uygulaması sonrasında proteinlerin tersiyer yapısı değişmiştir. Taramalı elektron mikroskopunda daha büyük agregatların görölmesi proteinlerin yapısal değişimlerini göstermiştir. 300 W 24 dk.'lık USH uygulaması sonrasında, elde edilen proteinlerin partiköl boyutunun en az; zeta potansiyelinin ise en yüksek seviyede olduğu bildirilmiştir. Yüksek güçte USH uygulaması ise, kovalent olmayan etkileşimlerle yeniden protein agregatlarının oluşumuna yol arak proteinlerin partiköl boyutunun artmasına ve zeta potansiyelinin azalmasına neden olmuştur.

Martínez-Velasco ve ark. (2018) bakla proteinlerine USH uygulaması sonrasında (20 kHz; genlik %45–75; 11,3–33,7 dk.) öncelikle USH genlik ve süre değerlerini partiköl boyutu, partiköl boyut dağılımı, yüzey gerilimi, çözünebilirlik ve zeta potansiyeline karşı optimize etmiştir. Optimize edilen (%72,67 genlik; 17,29 dk.) proteinler uygulama yapılmayan protein örneklerine kıyasla düşük yüzey gerilimi, zeta potansiyeli ve vizkozite; ancak yüksek çözünürlük ve sindirilebilirlik göstermiştir. Optimize protein örneklerinin köpük oluşturma özelliklerine bakıldığında daha düşük yüzey gerilimi, köpük baloncuk çapı, sıvı drenajının aksine daha yüksek stabilite değerleri görölmüştür.

Jiang ve ark. (2017) alışmalarında, bezelye proteinlerine USH (20 kHz; 68 W/100 mL; 5 dk.) uygulaması ve pH değiştirme kombine (pH 2, 4, 10, 12 değiştirme) uygulamalarının etkisini incelemişlerdir. Özellikle pH12'de yapılan pH değiştirme ve USH uygulamasında bezelye proteinlerinin çözünürlüğü uygulama yapılmayan örneklere kıyasla 7 kat arttığı, partiköl boyutlarının ise düştüğü rapor edilmiştir. Araştırmacılar, USH kavitasyonel kuvvetlerin ortaya çıkardığı mekaelektrostatik etkilerin protein yapısındaki disülfid bağlarının kırılmasına ve daha fazla protein alt ünitelerinin oluşumuna yol açtığı bildirilmiştir.

Zhu ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada, ceviz proteinlerine USH uygulaması sonrasında (25 kHz; 200, 400, 600 W; 15, 30 dk.) proteinlerin bant dağılımında uygulama yapılmayan örneklerle kıyasla herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir. İkincil yapı dağılımında USH uygulaması sonrasında α -heliks yapının oranı azalırken, beta ve rastgele sarım yapının oranının arttığını saptamışlardır. USH uygulamasının ceviz proteinlerinde serbest sülfidril grup içeriğini artırması ve floresan yoğunluğu azaltması proteinlerin tersiyer yapısında değişim olduğunu ortaya koymuştur. Benzer şekilde USH uygulaması, partikül boyutlarının küçülmesine ve çözünübilirlik, emülsiyon aktivite ve stabilite indeksleri gibi fonksiyonel özelliklerin gelişmesini sağlamıştır.

Resendiz-Vazquez ve ark. (2017), jak meyvesi çekirdek proteinlerine USH uygulaması sonrasında (20 kHz; 200, 400, 600 W; 15 dk.) 200 ve 400 W da yağ tutma ve emülsiyon kapasitesinin, 400 ve 600 W da ise emülsiyon aktivitesi ve stabilite indekslerini geliştirdiğini rapor etmişlerdir. USH uygulanan örneklerde uygulama yapılmayanlara kıyasla köpük kapasitesi artarken; su tutma, köpük stabilitesi ve jelleşme yeteneği azalmıştır. USH uygulaması sonrasında proteinlerin elektron mikroskop görüntüsünde uygulama yapılmayanlara kıyasla daha büyük agregatlar oluşmuştur. USH uygulaması etkisiyle proteinin iç kısımlarındaki hidrofobik bağların kırılması çözünübilirlik ve yüzey hidrofobisitesinin artışıyla ortaya koyulmuştur. Ancak yüksek USH güç uygulamasının (600 W) aşırı hızlanan moleküler hareket etkisiyle proteinin yapısında agregasyona ve olumsuz değişimlere yol açtığı saptanmıştır.

Malik ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada, ayçiçeği proteinlerinde USH uygulaması (20 kHz; 500 W; %25 frekans; 5, 10, 20, 30 dk.) sonrasındaki değişim rapor edilmiştir. Proteinlerin SDS-PAGE profilinde USH uygulanan proteinlerde daha düşük molekül ağırlıklarında bantlar tespit edilmiştir. USH uygulanan proteinlerin yüzey hidrofobisitesi ve sülfidril gruplarındaki artış ve termal stabilitesindeki düşüş protein moleküllerindeki kısmi bölgesel açılmaya kanıt olarak gösterilmiştir. USH uygulamasıyla proteinlerin partikül boyutu düşmüş ve bu düşüş sonucunda daha berrak süspansiyonlar elde edilmiştir. USH uygulaması sonrasında ayçiçeği küspe proteinlerinin çözünübilirlik, emülsiyon, köpük ve yağ bağlama özellikleri gelişirken,

su bağlama yeteneği azalmıştır. Ayrıca USH uygulaması, proteinlerin amino asit dağılımındaki lisin amino asidinin içeriğini düşürmüştür.

2.7. Yüksek Basınç Homojenizasyonu (YBH)

YBH uygulaması, örneğin yüksek basınçla çok dar bir valf boşluğu içinden hidrostatik basınç etkisiyle geçmeye zorlanması sonucu kavitasyon, kayma, türbülans etkileri meydana getirmesi prensibine dayanmaktadır. YBH uygulamasında örneğe 350 mPa'a kadar yüksek basınç uygulanabilir (Bader ve ark., 2011; Sarıcaoglu ve ark., 2018). Bu yöntemde, örnek öncelikle basınçla ittirilir ve iki geometrik olarak özdeş mikro kanaldan geçirilir. Kanaldan çıkışta iki akım çok yüksek hızlarda birbirleriyle çarpışır. Bu da gıda partiküllerinin fizikokimyasal olarak modifikasyonuna neden olur (Ogawa ve ark., 2003).

YBH uygulaması ile işlenmiş akışkanın yapısal ve fizikokimyasal özelliklerinin, nano damlacıkların/mikron damlacıkların dar boyut dağılımı nedeniyle değişmesi muhtemeldir. Literatürde YBH uygulamasının proteinlerin fonksiyonel, fizikokimyasal ve morfolojik özelliklerinin modifikasyonu üzerine bazı çalışmalar yer almaktadır. Örneğin, fındık proteini (Sarıcaoglu ve ark., 2018), soya proteini (Keerati-U-Rai ve Corredig, 2009) ve yer fıstığı proteininin (Dong ve ark., 2011) YBH uygulaması sonrasında gelişen özellikleri araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir.

Shou-Wei ve ark. (2009) barbunya proteinleri üzerine YBH'nin etkisini inceledikleri çalışmalarında, uygulama sonrasında çözünmeyen protein agregatlarının çözünür yapılara dönüştüğünü ortaya koymuştur. Aynı zamanda YBH uygulanan barbunya protein örneklerinin emülsifikasyon aktivitesi gelişmiştir. Ancak, YBH uygulaması barbunya proteinlerinin ikincil yapılarında önemli bir değişim meydana getirmemiştir.

Ruan (2009)'nın yumurta beyazı proteininde YBH uygulamasının (20–160 mPa) etkisini inceleyen çalışmada, uygulama yapılan proteinlerin partikül boyutunun ve sülfidril grup içeriğinin azaldığını ancak protein çözünürlüğünün arttığını rapor etmişlerdir. YBH uygulamasında artan basınç değerlerinin etkisiyle proteinlerin denatürasyon entalpisi daha düşük değerler göstermiştir. Yüzey hidrofobisitesinde en yüksek değerler 100 mPa'daki YBH uygulanan yumurta beyazı protein örneklerinde gözlenmiştir.

Dong ve ark. (2011), YBH uygulamasının (0,1; 40; 80 mPa) yer fıstığı proteininin emülsifikasyon aktivitesi, köpük kapasitesi ve su tutma kapasitesi gibi fonksiyonel özelliklerini geliştirdiğini bildirmiştir. Ancak YBH uygulamaları sonucu yer fıstığı proteinlerinin emülsifikasyon ve köpük stabilitesi değerlerinde azalmalar meydana gelmiştir.

Bader ve ark. (2011)'nın lupin protein izolatlarına YBH uygulamasının (0–150 MPa) etkisini inceledikleri çalışmalarında, izolatların çözünürlük, jel kuvveti ve emülsifikasyon özelliklerinin uygulama etkisiyle geliştiğini rapor etmişlerdir. Uygulama yapılan lupin proteinlerinin partikül boyutu düşük basınç değerlerinde azalırken, basınç 150 mPa'a yaklaştıkça moleküller arası agregasyon sonucu partikül boyutu artmıştır.

Shen ve Tang (2012) tarafından yürütülen çalışmada, YBH'nin (120 mPa) soya proteininin çözünürlüğünü ve yüzey hidrofobisitesini arttırdığı gösterilmiştir. Aynı zamanda uygulama yapılan proteinlerin serbest sülfidril grup içeriği ve emülsifikasyon aktivitesi gelişmiştir. YBH uygulanan soya proteinlerinin primer yapısındaki değişim, araştırmacılar tarafından çözünmez yapıdaki agregatların çözünür forma geçişine yorumlanmıştır. Song ve ark. (2013) tarafından çalışmada, soya proteinlerine YBH uygulaması sonrasında (137 mPa, 207 MPa; %7 konsantrasyon) proteinlerin partikül boyutunda azalış, partikül boyut dağılımında daralma ve zeta potansiyelinde artış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, Tu ve ark. (2007) YBH'nin soya proteinlerinin fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada, uygulama sonrasında soya proteinlerinin ortalama partikül boyutunun azaldığı, partikül boyut dağılımının daraldığı, hidrofobik grupların açığa çıktığı ve termal stabilitenin arttığı vurgulanmıştır.

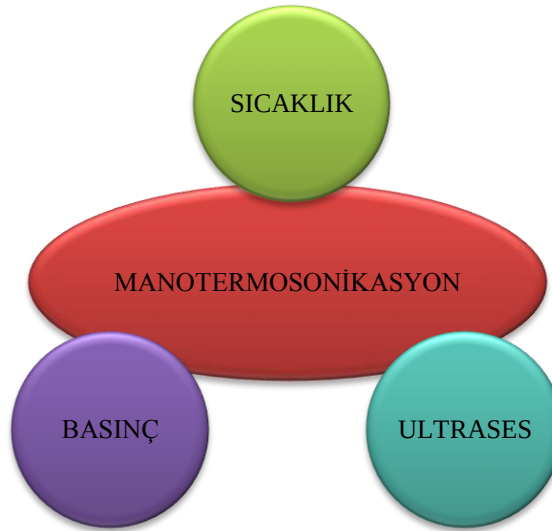
Yang ve ark. (2018) börülce protein izolatlarına YBH uyguladıkları (103 MPa, 207 MPa) çalışmalarında, proteinlerin çözünebilirliği %35'ten %99'a artmıştır. Aynı zamanda YBH uygulaması proteinlerin yüzey hidrofobisitesi ve köpük oluşturma özelliklerini de geliştirmiştir. Ancak uygulama sonrasında proteinlerin emülsifikasyon aktivitesinde azalış gözlenmiştir.

Saricaoglu ve ark. (2018) fındık proteinine YBH'yı farklı basınçlarda uygulayarak (0, 25, 50, 75, 100 ve 150 MPa) proteinin fonksiyonel özelliklerindeki değişimi

araştırmışlardır. YBH uygulaması sonrasında uygulama öncesine kıyasla fındık proteinlerinin partikül boyutu azalırken, zeta potansiyeli, çözünabilirlik, emülsiyon ve köpük oluşturma özellikleri artmıştır. Proteinlerin birincil yapısı YBH uygulaması 75 MPa'a kadar iken değişmezken, 100 MPa basınca ulaştığında SDS-PAGE protein bant yoğunluğunda azalış rapor edilmiştir.

2.8. Manotermosonikasyon (MTS)

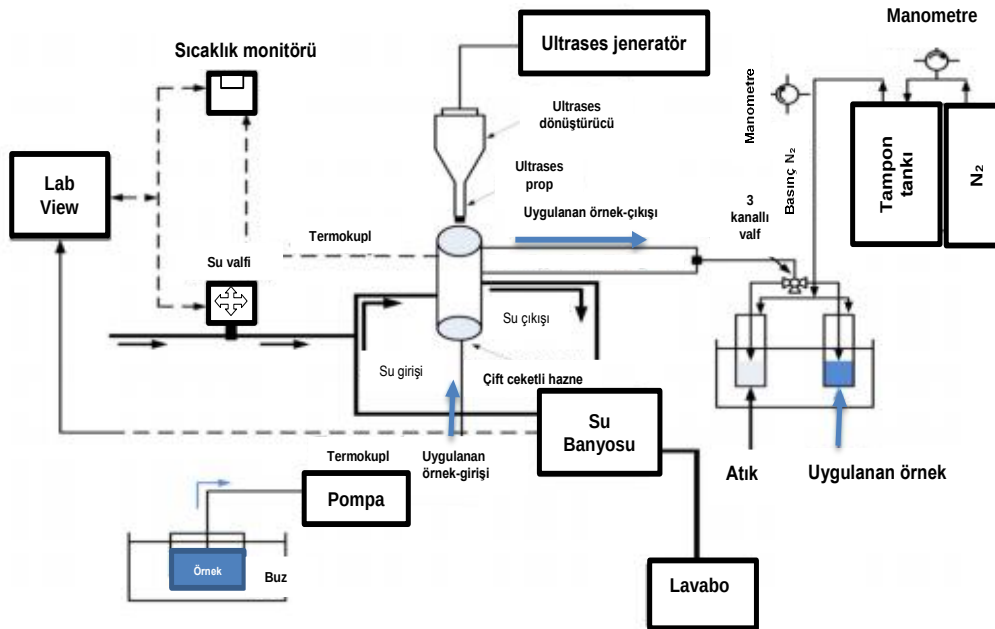
MTS cihazı ultrases homojenizasyon teknolojisinin, basınç ve sıcaklık uygulaması ile sürekli sistemde kombine edildiği bir teknolojiyi yansıtmaktadır (Şekil 2.1). USH uygulamasının tek başına kullanımı proteinlerde istenen değişimi yeterli seviyede sağlayamazken, kombine sistemler ile bu sorun aşılabilmektedir. Ayrıca USH uygulamasının modifikasyon etkinliğini artırmak için 15–30 dakikaya kadar uzayan işlem süresi, enerji ve zaman sarfiyatının yanı sıra sanayide uygulanabilirliğini de düşürmektedir. MTS sisteminin kullanımı ile aynı etkiyi sağlayacak işlem süresi USH uygulamasındaki 15,9 dakikadan 1,4 dakikaya indirgenmiştir (Yildiz ve ark., 2018). Aynı zamanda manotermosonikasyon ile uygulanması gereken sıcaklık değerleri de ısı modifikasyon uygulamalarına kıyasla daha ılımlı ve aktive edici koşulları desteklemektedir.



Şekil 2.1. Manotermosonikasyon sistem bileşenleri.

Yıldız ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada soya proteinlerinin MTS sistemine 50°C’de 200 kPa, 60 saniye muamelesi sonucu elde edilen modifiye nano proteinlerin çözünürlüğünün %9,1’den %71,4’e çıktığı rapor edilmiştir. Benzer şekilde soya proteinlerinin uygulama sonucu toplam fenolik ve antioksidan aktivitesi de önemli düzeyde artış göstermiştir. Bir başka çalışmada bezelye ve soya proteinlerinin izoelektrik noktada sınırlı olan çözünürlüğü MTS sistem uygulaması ile artırılarak sonrasında oluşturulan protein-karbonhidrat kompleksinin özellikleri incelenmiştir. Modifiye edilen protein-karbonhidrat komplekslerinin değerli yağların kapsüle edilmesinde alternatif bir materyal olarak kullanılabileceğini ortaya koyulmuştur (Yıldız ve ark., 2018).

MTS sisteminin temel çalışma prensibini yansıtan şematik gösterimi Şekil 2.2’de verilmiştir. MTS sisteminde ultrasones homojenizasyon probu, reaktör ceket içerisindeki akustik enerjinin dağıtımını sağlamaktadır. Jeneratör 20 kHz frekansla çalışmakta ve 13 mm çapında bir prop içermektedir. Reaktör içerisindeki sıcaklık termokapıl ile monitörden kontrol edilmektedir. Su sirkülasyonu ile sıcaklık yükselmesinin önüne geçilmektedir. Labview programı sistemin kontrolünde kullanılmaktadır. Nitrojen gazı da sistemdeki basıncı sağlamak için kullanılmaktadır.



Şekil 2.2. Manotermosonikasyon sisteminin şematik diyagramı (Yıldız ve ark., 2017).

2.9. Optimizasyon

Optimizasyon, sistemden maksimum fayda elde etmek için sistemin, sürecin veya ürünün performansının iyileştirilmesini ifade eder. Optimizasyonda kullanılan en yaygın çok değişkenli tekniklerin arasında yanıt yüzeyi yöntemi (YYY) yer almaktadır (Araujo ve Brereton, 1996). YYY, bir polinom denkleminin deneysel verilere uygunluğuna dayanan, istatistiksel önermeler yaparak veri kümesinin davranışını tanımlayan matematiksel ve istatistiksel teknikler bütünüdür. Amaç, en iyi işlem performansını elde etmek için bu değişkenlerin seviyelerini aynı anda optimize etmektir (Bezerra ve ark., 2008).

YYY kullanılarak en az sayıda deneme ile çok sayıdaki bağımsız değişkenin prosese etkisi belirlenebilmektedir (Koç ve Kaymak-Ertekin, 2010). USH, YBH ve MTS uygulamalarında güç ve süre parametrelerinin değişimi fonksiyonel özellikleri geliştirirken; belli uygulama parametresi seviyelerinde etki etmemekte veya proteinlerin agregasyonuna neden olarak olumsuz etkiler gösterebilmektedir (Jambrak ve ark., 2009; Arzeni ve ark., 2012; Nazari ve ark., 2018). Homojenizasyon uygulamaları sonucunda protein zincirlerinin açılması ile agregasyona uğraması arasındaki denge, proses parametrelerinin optimize edilmesiyle en verimli modifikasyonu sağlayabilecektir (Zhu ve ark., 2018).



3. ULTRASES HOMOJENİZASYONU UYGULAMASI İLE KENEVİR TOHUM PROTEİNLERİNİN MODİFİKASYONU

3.1. Giriş

Proteinlerin fonksiyonel özellikleri proteinin molekül ağırlığı, şekli, konformasyonu, yük dağılımı, amino asit dizilişi ve hidrofobisitesi ile yakından ilişkilidir (Alashi ve ark., 2013). Proteinlerin peptit bağlarının açılması ve serbest amino ve karboksil gruplarının ortaya çıkmasıyla birçok bitkisel proteinin gıda bileşeni olarak kullanımına engel teşkil eden çözünürlük sorunu ortadan kaldırılabilmektedir (Jambrak ve ark., 2009; Arzeni ve ark., 2012; Hu ve ark., 2013; Nazari ve ark., 2018). Bu nedenle, kenevir tohum proteinlerinin besinsel ve fonksiyonel özelliklerini geliştirerek gıda uygulamalarında ondan maksimum verimde faydalanmak için modern tekniklerin kullanılması gereklidir (Wang ve ark., 2018a).

USH uygulaması son dönemlerde proteinlerin teknolojik özelliklerinde önemli değişikliklere yol açmasıyla oldukça dikkat çeken zaman ve enerji tasarrufu sağlayan ısıl olmayan tekniklerden bir tanesidir (Jambrak ve ark., 2009). USH uygulamasının prensibi; kavitasyon, ısıtma, dinamik çalkalama, kayma gerilmeleri ve türbülans gibi etkilere dayanmaktadır (Kadam ve ark., 2015). Kavitasyonel baloncukların patlaması, mikro jetlerin oluşumu, mikro-türbülans, yüksek hızlı partiküller arası çarpışmalar ve mikro gözenekli partiküllerde oluşan deformasyonlar protein yapısında çeşitli modifikasyonları meydana getirmektedir. Patlamalar sırasında, bu kabarcıkların içinde çok yüksek sıcaklık ve basınç değerlerine (yaklaşık 50 MPa; 5500 K) ulaşılır ve bu da kabarcığın etrafında birçok reaksiyona neden olmaktadır (Shirsath ve ark., 2012). USH uygulaması sonrasında ortaya çıkan kavitasyon etkisinin proteinlerin moleküler yapısı, yüzey yükü, partikül boyutu ve yüzey aktivitesinde değişime yol açarak proteinlerin çözünürlüğünü arttırdığı literatürde rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, USH uygulaması darı proteinlerinin (20 kHz; 5, 12,5, 20 dk.; 100 W; %20–100 genlik) primer yapısını, sekonder yapısını ve yüzey aktivitesini değiştirmiştir (Nazari ve ark., 2018). USH uygulaması (20 kHz; 17,29 dk.; 750 W; %72,67 frekans) sonrasında bakla

proteinlerinin zeta potansiyeli, vizkozitesi ve sindirilebilirliğinin arttığı rapor edilmiştir (Martínez-Velasco ve ark., 2018). Hu ve ark. (2013), USH uygulaması sonrası (20 kHz; 15, 30 dk.; 200–600 W) soya proteinlerinin protein zincirlerinde bölgesel açılmalar ve moleküller arası interaksiyonlarında azalmalar gözlemlemişlerdir. Üçüncül yapıda görülen değişimin sonucunda USH uygulanan proteinlerin serbest sülfidril grupları, yüzey hidrofobisitesi ve çözünürlüğü gelişmiştir. Ayrıca Jambrak ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada, soya proteinlerine (20 kHz; 15, 30 dk.; 600 W) USH uygulaması sonrasında, proteinlerin çözünürlüğünün ve emülsifikasyon aktivite indeksinin arttığı rapor edilmiştir.

Tez çalışmasının bu bölümünde kenevir tohum proteinlerinin fonksiyonel, fizikokimyasal, biyoaktif ve morfolojik özellikleri üzerine USH uygulamasının etkisi incelenmiştir. Bu amaçla öncelikle USH uygulamasının proses parametrelerinin (USH genlik, USH süre ve protein konsantrasyonu) KTP'nin çözünürlüğü ve partikül boyutu üzerindeki etkisi deney tasarımı ile optimize edilmiştir. Elde edilen optimum koşullardaki KTP'nin (KTP-USH) özellikleri uygulama yapılmayan kontrol proteini (KTP) ile kıyaslanmıştır.

3.2. Materyal ve Yöntem

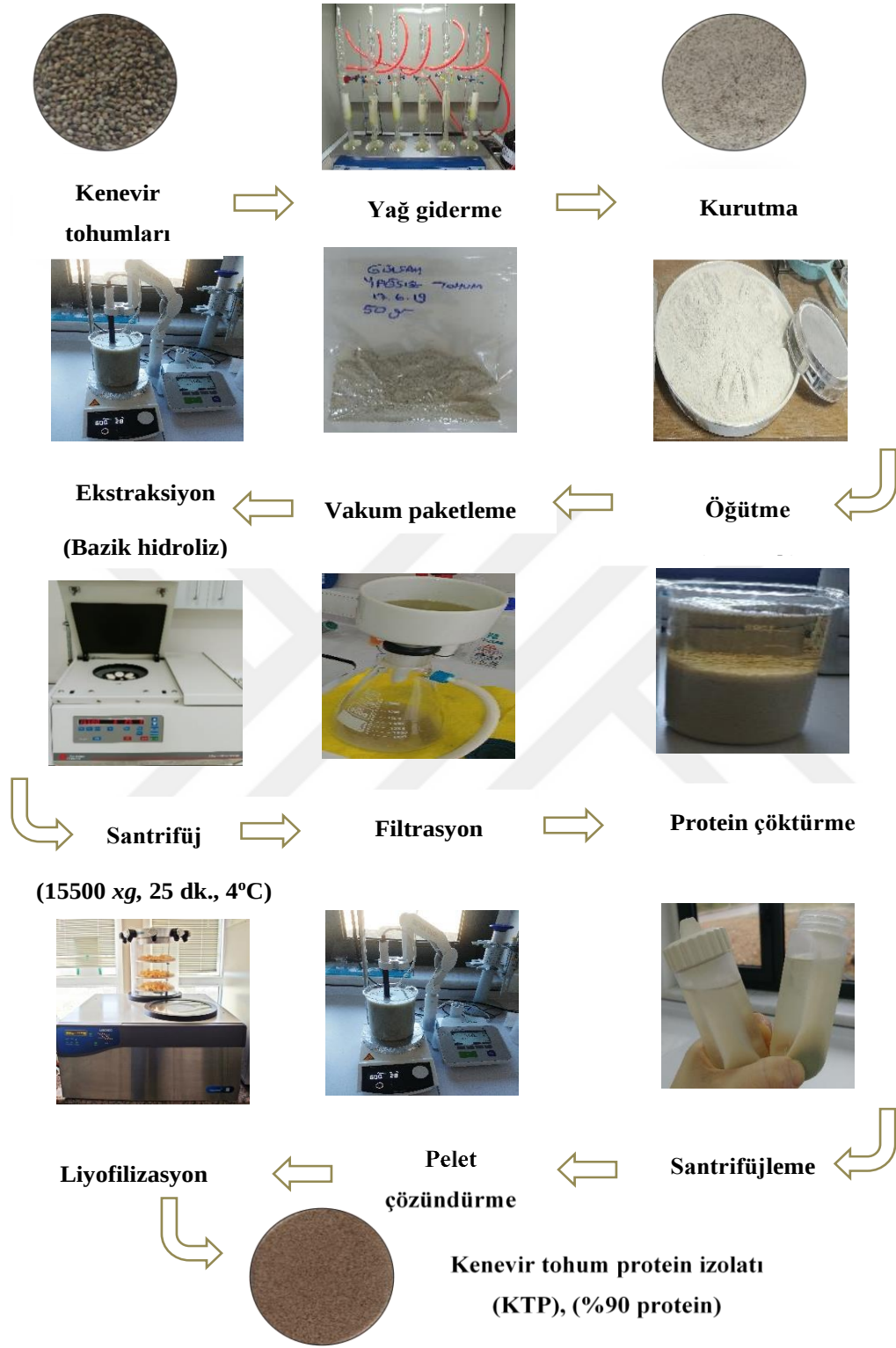
Kenevir (*C. sativa* L.) tohumları Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü'nden (Amasya, Türkiye) temin edilmiştir. “Narlısaray” popülasyonuna ait olan kenevir tohumları Kasım 2019 hasadıdır. Çalışmada kullanılan kimyasallar Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından satın alınmıştır. Kimyasallar teknik kalite ve daha yüksek saflıktadır.

3.2.1. Kenevir tohum protein izolatlarının eldesi

Kenevir tohumları laboratuvar tipi öğütücü (Jupiter Plus, Type 862, Almanya) ile homojen bir kitle elde etmek için öğütülmüştür. Tohumlardan safsızlık unsurlarını (lipit, basit şekerler, serbest fenolikler vs.) uzaklaştırmak için eter ile (1:3, a/h) (kaynama noktası 34,6°C) oda koşullarında (23°C, 2 saat) ön yağ giderme işlemi uygulanmıştır. Bu sürenin sonunda eterde çözünen sulu faz vakum altında kaba filtre kağıdından süzölmüştür. Kalıntı eterin evapore olması için tohumlar oda koşullarında bekletilmiştir (23°C, 16 saat). Ön yağ giderme işleminden alınan tohumlar tekrar

öğütülmüştür. Filtre kağıdına sarılmış ön yağ giderme işleminden geçmiş tohumlar (30 g) Soxhlet kartuşları (Whatman; 34 mm x 130 mm) içerisinde Soxhlet yağ ekstraksiyon cihazında eter (150 mL) ile 8 saat süresince ekstrakt edilmiştir. Elde edilen yağsız tohumlar oda koşullarında bekletilerek kalıntı eterin evapore olması sağlanmıştır (23°C, 16 saat). Sonrasında örnekler tekrar öğütülmüş ve 40 mesh'lik elekten geçirilerek yağsız kenevir unu elde edilmiş ve protein izolat eldesi aşamasına geçilmiştir.

Kenevir tohumlarından protein izolat eldesi Malomo ve ark. (2014)'nın uyguladığı bazik hidroliz-izoelektrik noktada çöktürme metodunda bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Yağsız kenevir unlarına 1:20 (a/h) oranında distile su eklenmiştir. Bazik hidroliz için elde edilen süspansiyonun pH'sı 10,0'a (2 N NaOH) ayarlanarak 37°C'de 2 saat süresince pH'nın 10,0 da kalması sağlanmıştır. Örneklerin 15500 xg, 25 dk., 4°C santrifüjlenmesi (Beckman Coulter, ABD) ile elde edilen süpernatantlar toplanmıştır. Toplanan süpernatantlar Whatman no:1 filtreden (Whatman, İngiltere) süzüldükten sonra kenevir tohum proteinlerinin izoelektrik noktası (pI) olan pH'sı 5,0'e (2 N HCl) ayarlanmıştır. pI'da çökelmeleri için 30 dk. bekleme süresi sonrasında protein kitlesi 15500 xg, 25 dk., 4°C santrifüjlenerek ayrılmıştır. Elde edilen protein izolatına distile su eklenerek süspanse olması sağlanmış ve süspansiyonun pH'sı 7,0'ye (2 N NaOH) ayarlanmıştır. Elde edilen KTP liyofilize (Labconco, Freezone, Kansas, ABD) edilerek analiz edilinceye kadar vakum paketlerde +4°C'de muhafaza edilmiştir



Şekil 3.1. Kenevir tohum protein izolatu eldesinin şematik diyagramı.

3.2.2. Kimyasal analizler

Kenevir tohumunun, yağsız tohumun ve KTP'nin nem içeriği, kül içeriği ve protein içeriği AOAC (1990)'nin yöntemleri baz alınarak belirlenmiştir. Protein analizi Dumas yöntemine göre yapılarak dönüşüm faktörü ($N \times 6,25$) olarak alınmıştır. Ham yağ analizi Soxhlet ekstraksiyon yöntemine göre yapılmıştır. Karbonhidrat içerikleri yüzde protein, yağ, kül ve nem içeriklerinin farkından hesaplanmıştır. Analizler en az 3 tekrarlı yapılmıştır ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde ifade edilmiştir.

3.2.3. Ultrases homojenizasyon uygulaması

Kenevir tohum proteinlerinde USH uygulamasının meydana getirdiği değişimi gözlemlemek için fosfat tamponu (0,01 M, pH 7,0) içerisinde 100 mL'lik protein süspansiyonları (2–10%, a:h) hazırlanmıştır. Tampon içerisine mikrobiyal gelişimi önlemek için sodyum azid eklenmiştir (%0,02, a:h). Hazırlanan süspansiyonlar oda sıcaklığında (23°C) 4 saat ve sonrasında 4°C'de 16 saat karıştırılmıştır. Uygulama öncesi süspansiyonların oda sıcaklığına (23°C) gelmesi beklenmiş ve pH'sı 10'a (2,0 NaOH) ayarlanmıştır. Uygulama sırasında USH tarafından ortaya çıkan sıcaklığın etkisini elemine etmek için süspansiyonlar +5°C'de sirkülatörlü soğutucuya (Scientz, DC2006, Çin) bağlı reaktör içerisine yerleştirilmiştir. USH cihazı sabit 20 kHz frekansta 750 W gücünde (Sonics, VCX750, ABD) olup 13 mm'lik (1:2 inç) titanyum prob ile kullanılmıştır. Uygulama sırasında prob protein süspansiyonuna üstten 20 mm daldırılmıştır. USH uygulaması sırasında süspansiyonların sıcaklığı 45°C'nin altında tutulmuştur. USH uygulanan KTP'ler liyofilizatörde kurutulup KTP-USH olarak kodlanmıştır ve analiz edilinceye kadar hava sızdırmaz kaplarda +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.1. Akustik enerji yoğunluğunun belirlenmesi

USH probu tarafından süspansiyon ortamına iletilen akustik enerji hem kinetik enerji hem de termal enerji olarak kendini gösterir. Ortama iletilen kinetik enerji, viskoz kayıplar nedeniyle ısı olarak dağıtılır (Tjøtta, 1999; Margulis ve Margulis, 2003). Bu nedenle akustik enerji yoğunluğu (W/cm^2); ultrasonik jeneratörden ziyade, prob ucu yüzeyinden işlem gören örneğe iletilen gücü ölçmenin bir yoludur. Bu yolla örneğe transfer edilen gerçek ultrases homojenizasyon enerjisinin tespiti ve farklı uygulamaların birbiri ile kıyaslanması mümkün olmaktadır. USH uygulaması

sırasında örneğin sıcaklık değişiminin zamana karşı kalorimetrik olarak ölçülmesiyle aşağıdaki denklemlere (3.1, 3.2 ve 3.3) göre akustik enerji yoğunluğu hesaplanmıştır (Margulis ve Margulis, 2003).

$$P = m \cdot c_p \cdot \left(\frac{dT}{dt} \right)_{t=0} \quad (3.1)$$

$$I_a = \frac{P}{A} \quad (3.2)$$

$$I_h = \frac{P}{H} \quad (3.3)$$

Formüllerde yer alan, P = ultrasonik güç (W), m= USH uygulanan süspansiyonun kütlesi (g), c_p = sabit basınçta süspansiyonun özgül ısısı (4,18 J/g.K), dT/dt = zamana bağlı sıcaklık değişim kurvesinin ilk 30 sn.deki eğimi (K/sn.), I_a = akustik güç yoğunluğu, alan cinsinden (W/cm²), A= USH probunun yüzey alanı (cm²), I_h = akustik güç yoğunluğu, hacim cinsinden (W/mL) ve H= Örnek hacmidir (mL).

3.2.4. Fizikokimyasal özelliklerde birincil yapı değişimi

3.2.4.1. Amino asit dağılımı

Proteinlerin amino asit profillerini belirlemek için öncelikle kapalı bir tüpte 110 °C’de 24 saat 6 M HCl ile asidik hidroliz uygulanmıştır. Hidrolize izolatlar süzölmüş ve distile su kullanılarak 50 mL’ye tamamlanmıştır. 1 mL seyreltik numune, 0,22 µm membran filtreden geçirilmiştir. Amino asitler, LC-MS-MS (Agilent Technologies, 6460 Triple Quad, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.4.2. Molekül ağırlık dağılımı

Proteinlerin molekül ağırlıklarını belirlemek amacıyla SDS-PAGE jellerinde protein örnekleri standart protein markırı birlikte yürütölmüştür. Ayırıcı jeli olarak %12 akrilamid; istifleme jeli olarak ise %4 akrilamid kullanılmıştır. Protein (4 mg/mL) çözeltisi eşit hacimde SDS-PAGE örnek tamponu ile (%10 β-merkaptöetanol) 3 dk. kaynatılmıştır. Her bir kuyucuğa 60 µg protein yüklenmiştir. Molekül ağırlık standartları (Bio-Rad, ABD) (10–150 kDa) örnekler ile 160 V’da 70 dakika süresince paralel olarak yürütölmüştür. Elektroforez işlemi sonrası jel %0,1 Coomassie Brilliant Blue R250 (%50 metanol, %6,8 asetik asit içerisinde) boyası ile boyanmıştır. Sonrasında %5,0 metanol ve %7,5 asetik asit ile 24 saat süresince boya giderme işlemi yapılmıştır (Wang ve ark., 2018a).

3.2.5. Fizikokimyasal özelliklerde ikincil yapı değişimi

3.2.5.1. Fourier dönüşümü kızılötesi spektrumları (FT-IR)

Proteinlerin (10 mg) Fourier dönüşümü kızılötesi spektrumları, ATR modda FT-IR spektrometresi (Perkin Elmer Spectrum Two, ABD) kullanılarak 400–4000 cm^{-1} spektral aralığında alınmıştır. Her spektrum için 4 cm^{-1} çözünürlük değerinde 16 tarama değeri elde edilmiştir.

3.2.5.2. İkincil yapı dağılımı

Distile su içerisindeki protein (0,25 mg/mL) çözeltileri 10 mm hücre uzunluğundaki kuvars küvete aktarılmıştır. Proteinlerin CD spektrumu, 25°C’de bir spektropolarimetre (Jasco, J-815, MD, ABD) ile 190–260 nm’den elde edilmiştir. Tarama hızı, 8 sn’lik bir veri entegrasyon süresi ile 50 nm/dk olarak ayarlanmıştır. Distile sudan kaynaklanan gürültü, ölçülen örnek spektrum değerlerinden çıkarılmıştır. Nihai protein spektrumu, proteinin ikincil yapısını belirlemek için BeStSel web sitesi (<https://bestsel.elte.hu/index.php>) kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.6. Fizikokimyasal özelliklerde üçüncül yapı değişimi

3.2.6.1. Partikül boyutu ve zeta potansiyeli

Proteinler 1:500 (a:h) oranında distile suyla seyreltildikten sonra partikül boyutu ve zeta potansiyeli (Malvern, Zetasizer NanoZS, İngiltere) belirlenmiştir. Numunelerin soğurma ve kırılma indeksi sırasıyla 0,001 ve 1,33’e ayarlanmıştır.

3.2.6.2. Yüzey hidrofobisitesi

Analizde 1-anilino naphthalene-8-sülfonik asit (ANS) kullanılarak proteinlerin floresan yoğunluğu ölçülmüştür (Kato ve Nakai, 1980). Protein süspansiyonları 0,05–0,25 mg/mL konsantrasyonlarda fosfat tamponu içerisinde (10 mM, pH 7,0) hazırlanmıştır. Protein süspansiyonunun 3 mL’sine 20 μL 8 mM ANS çözeltisi ilave edilerek karıştırılmıştır. Floresan yoğunluğu ekstinsiyon dalga boyu 365 nm; emisyon dalga boyu 470 nm’de spektrofotometre ile ölçülmüştür. Yüzey hidrofobisitesi (H_0), floresan yoğunluğunun protein konsantrasyonuna karşı elde edilen grafikte elde edilen lineer regresyonun eğimi olarak ifade edilmiştir (Wang ve ark., 2018a).

3.2.6.3. Serbest sülfidril grup içeriği

Proteinlerin serbest sülfidril (SH) grup içeriği Ellman (1959) tarafından geliştirilen metotta modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir. Serbest sülfidril gruplarını belirlemek için proteinler Tris-glisin tampon içerisinde (pH 8,0; 0,086 M Tris, 0,09 M glisin, 4 mM Na₂EDTA) %0,2 (a:h) protein konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Protein süspansiyonları 25°C oda sıcaklığında 24 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında (15000 xg 4°C 20 dakika) elde edilen süpernatantlar toplanmıştır. Süpernatantın 3 mL'sine 0,03 mL Ellman reaktifi (4 mg DNTB/mL tampon) eklenip vorteksledikten sonra 15 dk. inkübe edilmiştir. Süpernatantın absorbansı 412 nm'de 3 mL tampon ve 0,03 mL Ellman reaktif karışımı kör olarak alınıp spektrofotometrede okunmuştur. Protein içeriği Bradford (1976) metoduna göre Sığır serum albümini standart alınarak belirlenmiştir. Serbest SH grup içeriği µmol SH/g protein cinsinden verilmiştir (3.4).

$$C_o = \frac{A}{13600} \times D \quad (3.4)$$

C_o: Konsantrasyon; A: Absorbans (412 nm); D: Dilüsyon faktörü; 13600: Ekstinksiyon katsayısı.

3.2.6.4. Termal davranışı

Proteinlerin termal özelliklerini belirlemek amacıyla Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) analizleri 40–180°C arasında 5°C/dk. artış parametreleriyle TA Universal 2500 (TA Instrument, New Castle, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Denatürasyon sıcaklığı (T_d) ve entalpisi (ΔH) TA Universal programı (TA Instrument, New Castle, ABD) ile termogramlar vasıtasıyla ortaya koyulmuştur.

3.2.7. Morfolojik özellikler

3.2.7.1. Taramalı elektron mikroskobu

Proteinlerin morfolojisini belirlemek için taramalı elektron mikroskobu (SEM, Jeol JSM. 6060 LV, Tokyo, Japonya) kullanılmıştır. Bu amaçla proteinler altın/palladyum kaplanıp çift taraflı bant yüzeyine tutundurulmuştur. Protein örnekleri 15 kV voltajda x100 ve x200 büyütme derecelerinde incelenmiştir.

3.2.8. Fonksiyonel özellikler

3.2.8.1. Protein çözünübilirliği

Proteinlerin çözünübilirliğinin belirlenmesinde Morr ve ark. (1985) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Kısaca, protein süspansiyonu (10 mg/100 mL) 0,01 M fosfat tamponu (pH 7,0) içerisinde hazırlanarak 1 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Toplam protein çözünübilirliği için protein örnekleri 0,1 N NaOH içerisinde hazırlanmıştır. Ardından 12000 xg, 20 dk., 23°C’de santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatantlardaki çözünür protein içeriği Nitrojen analiz cihazında (Velp, NDA 701, İtalya) Dumas yöntemine göre belirlenmiştir. Proteinler için azot dönüşüm faktörü 6,25 olarak alınmıştır. Protein çözünübilirliği (%) süpernatanttaki protein içeriğinin toplam protein içeriğine oranı olarak denklem 3.5’e göre hesaplanarak verilmiştir.

$$\text{Protein çözünübilirliği (\%)} = \frac{\text{Süpernatanttaki protein içeriği}}{\text{Toplam protein içeriği}} \times 100 \quad (3.5)$$

3.2.8.2. Su ve yağ bağlama kapasitesi

Proteinlerin 50 mg’ı 1,5 mL distile su veya ticari ayçiçek yağı ile oda sıcaklığında bir falkon tüpü içerisinde 20 saniye süre ile vortekslenmiştir. Bu karıştırma işlemi sonrası tüpler kapatılmış ve 30°C’de 30 dk. süre ile inkübe edilmiştir. Süre sonunda tüpler 7000 xg, 4°C, 20 dk. santrifüjlenmiş, serbest haldeki su veya yağ dikkatli bir şekilde uzaklaştırılıp tüplerin ağırlık kayıplarından su ve yağ absorpsiyon miktarı hesaplanmıştır (Aydemir ve Yemenicioğlu, 2013).

3.2.8.3. Emülsiyon özellikleri

Emülsiyon aktivite ve stabilite indeksleri Pearce ve Kinsella (1978) tarafından kullanılan metotta modifikasyon yapılarak ölçülmüştür. Protein süspansiyonunun (10 mg/mL; pH 7,0) 4 mL’sinin üzerine 1 mL ayçiçek yağı eklenmiştir. Bu karışım yüksek hızlı homojenizatör (Ultraturrax, T18, IKA, Staufen, Almanya) yardımıyla 2 dakika süreyle 20000 rad/s hızla homojenize edilmiştir. Bu homojenatın dip kısmından 25 µL örnek alınarak 2,5 mL SDS çözeltisi (%0,1) ile karıştırılmıştır. Emülsiyon aktivite indeksi bir spektrometre (Thermo, Spectronic Genesys 5, ABD) yardımıyla 500 nm’de absorbans ölçülerek belirlenmiştir (3.6). Emülsiyon stabilite indeksi ise emülsiyon oluşumunun 10. dakikada tekrar absorbans ölçülerek saptanmıştır (3.7).

$$\text{Emülsiyon aktivite indeksi (m}^2/\text{g)} = \frac{2*2,303*A_0}{0,25*Protein \text{ ağırlığı}} \quad (3.6)$$

$$\text{Emülsiyon stabilite indeksi (dk.)} = \frac{A_{10} \times \Delta t}{\Delta A} \quad (3.7)$$

A_0 : 0. dakikadaki absorbans; A_{10} : 10. dakikadaki absorbans; Δt : 10 dakika; ΔA : $A_0 - A_{10}$.

3.2.8.4. Köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi

Proteinlerin köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesindeki değişimi belirlemek için 50 mg/mL konsantrasyonlarında 25 mL'lik çözeltiler (pH 7,0) hazırlanmıştır. Ultraturaks yardımıyla 2 dk. 20000 rad/s hızla homojenize edilmiştir. Köpük aktivitesi oluşan köpüğün hacminin ölçülmesi ile belirlenmiştir (3.8). Oluşan köpüğün stabilitesi (3.9) ise ölçülen köpük hacminin 10 dk. sonraki değişimine bakılarak saptanmıştır (Aydemir ve Yemenicioğlu, 2013).

$$\text{Köpük aktivitesi} = \frac{V_0 - 25}{25} \times 100 \quad (3.8)$$

$$\text{Köpük stabilitesi} = \frac{V_{10} - 25}{V_0 - 25} \times 100 \quad (3.9)$$

V_0 : 0. dk. daki hacim; V_{10} : 10 dk. beklendikten sonraki hacim.

3.2.8.5. Jel oluşturma kapasitesi

Protein süspansiyonları distile su içerisinde farklı konsantrasyonlarda (%0–24, a:h) hazırlanmış ve test tüplerine aktarılıp 90°C'deki su banyosunda 1 sa. süre ile bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda tüpler hızlı bir şekilde soğutulmuş ve +4°C'de 2 sa. jel oluşumu için inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası tüpler, ağzı aşağı gelecek şekilde çevrildiğinde yer çekimi etkisi ile hiçbir şekilde akma ve düşmenin olmadığı sert jel yapılarının görüldüğü konsantrasyon, jel oluşumu için en düşük konsantrasyon olarak (% a:h) belirlenmiştir (Aydemir ve Yemenicioğlu, 2013).

3.2.9. Biyoaktif özellikler

3.2.9.1. Antioksidan aktivite

Proteinlerden 0,5 g alınarak 4 mL metanol:su (%80, h:h) karışımı içerisinde oda sıcaklığında 1 sa. boyunca fenolik maddeler ekstrakt edilmiştir. Ekstraktlar 12000 xg'de 4 °C 20 dak. santrifüjlenerak süpernatantlar toplanmıştır. Ekstraktların toplam

hacmi %80 metanol:su (h:h) ile 5 mL'ye tamamlanmıştır. Ekstraktlardan 200 µL alınarak küçük deney tüpüne aktarılmıştır. Deney tüplerine 3 mL 0,051 mM 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) çözeltisi eklenmiş ve vortex yardımıyla karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 30 dk. karanlık ortamda bekletilmiştir. Süre sonunda karışım küvetlere aktararak 517 nm'de absorbans değeri okunmuştur. Kontrol absorbansı için örnek yerine 200 µL %70'lik metanol koyulmuştur. Cihazın sıfırlama işlemi %70'lik metanol ile yapılmıştır (Brand-Williams ve ark., 1995). Örneklerin antioksidan aktivitesi, aşağıdaki denklem 3.10 kullanılarak ifade edilmiştir.

$$\%DPPH \text{ giderme aktivitesi} = \frac{(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}})}{(A_{\text{kontrol}})} * 100 \quad (3.10)$$

Burada, A_{kontrol} = Kontrolün absorbansı; $A_{\text{örnek}}$ = Örnek absorbansı.

Elde edilen proteinlerin antioksidan aktivitelerini belirlemede kullanılan diğer bir yöntem ise ABTS'dir. Bu amaçla Re ve ark. (1999) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) potasyum persülfat ile okside edilerek mavi/yeşil renkli serbest radikal çözeltisi ($ABTS^+$) haline getirilmiştir. Bu stok radikal çözeltisi pH'sı 7,4 olan PBS (Fosfat tampon tuzu) ile 734 nm'de $0,700 \pm 0,02$ absorbans değerini verecek şekilde PBS ile seyreltilmiştir. Seyreltilmiş bu radikal çözeltisinden 3 mL alınarak spektrofotometre küvetine transfer edilmiş ve 734 nm'de başlangıç absorbans değeri kaydedilmiştir. Daha sonra bu radikal çözeltisinin üzerine 30 µL antioksidan aktivitesi belirlenmek istenen ekstraktan eklenerek karıştırılmıştır. Renk açılmasının sabitlendiği süre sonunda absorbans değeri kaydedilmiştir. Bu absorbans değeri baz alınarak başlangıç değerine göre yüzde azalma oranı (inhibisyon oranı) hesaplanmıştır (3.11).

$$\%ABTS \text{ inhibisyon oranı} = \frac{(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}})}{(A_{\text{kontrol}})} * 100 \quad (3.11)$$

Burada, A_{kontrol} = Kontrolün absorbansı; $A_{\text{örnek}}$ = Örnek absorbansı.

3.2.10. Deney tasarımı ve optimizasyonu

Optimizasyon çalışması Design-Expert (versiyon 11,0, Statease Inc., Minneapolis, MN, ABD) adlı istatistik programının YYY uygulanarak yapılmıştır. Optimum koşullar ve USH parametrelerinin KTP'nin çözünübilirliği üzerindeki etkisi Box-Behnken tasarıma uygun oluşturulmuştur.

USH uygulamasının optimum çalışma koşulları 3 bağımsız değişkenin 3 farklı seviyede (USH genlik, işlem süresi ve sulu çözeltinin protein konsantrasyonu); 2 farklı bağımlı değişkene (protein çözünübilirliği ve partikül boyutu) yanıtı ölçülerek belirlenmiştir (Tablo 3.1). Bağımsız değişkenler USH genlik (A: 45–85, %), sulu çözeltinin protein konsantrasyonu (B: %2–10, a:h) ve işlem süresidir (C: 5–15 dk.). Optimum koşulların saptanmasında çalışılacak faktörler (genlik, süre ve protein konsantrasyonu) ve bunların çalışma aralıklarına yapılan literatür taraması ile karar verilmiştir (Jiang ve ark., 2014; Malik ve ark., 2017). Deneme deseni dış faktörlere bağlı olarak gözlenen yanıtlardaki açıklanamayan değişkenlerin etkisini en aza indirmek için rastgele bir sırayla 3 merkez noktada olmak üzere 15 faktöriyel noktada tasarlanmıştır (Tablo 3.1)

Tablo 3.1. Bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve kodlanmamış değerleri.

Bağımsız değişkenler	Faktör seviyeleri		
	Düşük (-1)	Orta (0)	Yüksek (+1)
Ultrases genlik, % (A)	45	65	85
Protein konsantrasyonu, a:h (B)	2	6	10
Homojenizasyon süresi, dk. (C)	5	10	15

Deneyisel veriler ikinci derece polinom modele örtüştürülmüş ve regresyon katsayıları çoklu doğrusal regresyon ile elde edilmiştir. İkinci mertebeden polinom modeller aşağıdaki denklem 3.12'deki gibidir:

$$D = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_{11} AB + \beta_{22} BC + \beta_{33} AC + \beta_{12} AA + \beta_{13} AB + \beta_{23} CC + \epsilon \quad (3.12)$$

Burada, D; tahmin edilen bağımlı değişken, A, B, C bağımsız değişkenler, β_{1-2-3} , $\beta_{11-22-33}$, $\beta_{12-13-23}$ sırasıyla lineer, interaksiyon ve kuadratik terimlerinin regresyon katsayıları, β_0 ; değişken sayısıdır. Model uygunluğu, regresyon katsayıları ve istatistiksel anlamlılığı değerlendirmek için varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkileri görselleştirmek için, uyumlu polinom regresyon denklemlerinin yüzey yanıtı, kontur grafikleri ve hedeflenen yanıtlar için optimal koşullar Design Expert 11,0 yazılımının (Stat-Ease, Inc., MN, ABD) deneme sürümü tarafından oluşturulmuştur. Sonuçlar istatistiksel olarak $p=0,05$ anlamlılık düzeyinde test edilmiştir. Modelin uygunluğu, programın ANOVA çıktıları olan uyum eksikliği, uyum katsayısı (R^2) ve Fisher test değerine (F-değeri) göre değerlendirilmiştir.

Optimum koşullar, bu koşullar altında deneyler yapılarak doğrulanmıştır. Elde edilen yanıtlar model tahmin sonuçlarıyla denklem 3.13 kullanılarak karşılaştırılmıştır.

$$\% \text{Bağıl hata} = \frac{x_i - x_0}{x_0} * 100 \quad (3.13)$$

Burada x_i Gerçek yanıt ve x_0 tahmini yanıt değeridir.

3.2.11. İstatistiksel analiz

Tüm analizler 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen deneysel veriler ortalama $\pm$ standart sapma olacak şekilde kaydedilerek SPSS 20,0 paket programı (SPSS Inc. ABD) ile %95 güven aralığında ANOVA testi ile test edilmiştir.

3.3. Sonuç ve Tartışma

3.3.1. Kimyasal kompozisyon

Kenevir tohumunun, yağı alınmış unun (YKTU) ve KTP izolatının genel kimyasal kompozisyonu Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Kenevir tohumunun, yağı alınmış unun (YKTU) ve protein (KTP) izolatının kimyasal kompozisyonu (g/100 g taze ağırlık).

	Protein	Yağ	Nem	Kül	Karbonhidrat
Tohum	25,4 $\pm$ 0,5	35,7 $\pm$ 0,3	6,6 $\pm$ 0,2	4,8 $\pm$ 0,0	27,5 $\pm$ 1,0
YKTU	55,3 $\pm$ 0,8	1,8 $\pm$ 0,0	6,8 $\pm$ 0,5	8,0 $\pm$ 0,3	28,1 $\pm$ 1,6
KTP	90,0 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,0	5,6 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,3

Kenevir tohumunun genel kimyasal kompozisyonu %25,4 protein, %35,7 yağ, %6,6 nem, %4,8 kül ve %27,5 karbonhidrat içermektedir. Literatürdeki çalışmalarda kenevir tohumunun kimyasal kompozisyonu %24,8 protein, %35,5 yağ, %6,5 nem, %5,6 kül (Callaway, 2004); %26,1 protein, %37,3 yağ, %8,5 nem, %5,0 kül (Das, 2015) ve %23,8–28 protein, %26,9–30,6 yağ, %1,1–7,2 nem, %5,1–5,8 kül (Vonapartis ve ark., 2015) olarak rapor edilmiştir. Bu tez kapsamında materyal olarak kullandığımız “Narlisaray” kenevir çeşidinin kimyasal kompozisyonun literatürdeki verilerle uyumlu olduğu görülmüştür. Kimyasal kompozisyonlarda görülen kısmi farklılıklar tohum çeşidine, toprak ve iklim koşullarına bağlı olarak ortaya çıkabilmektedir.

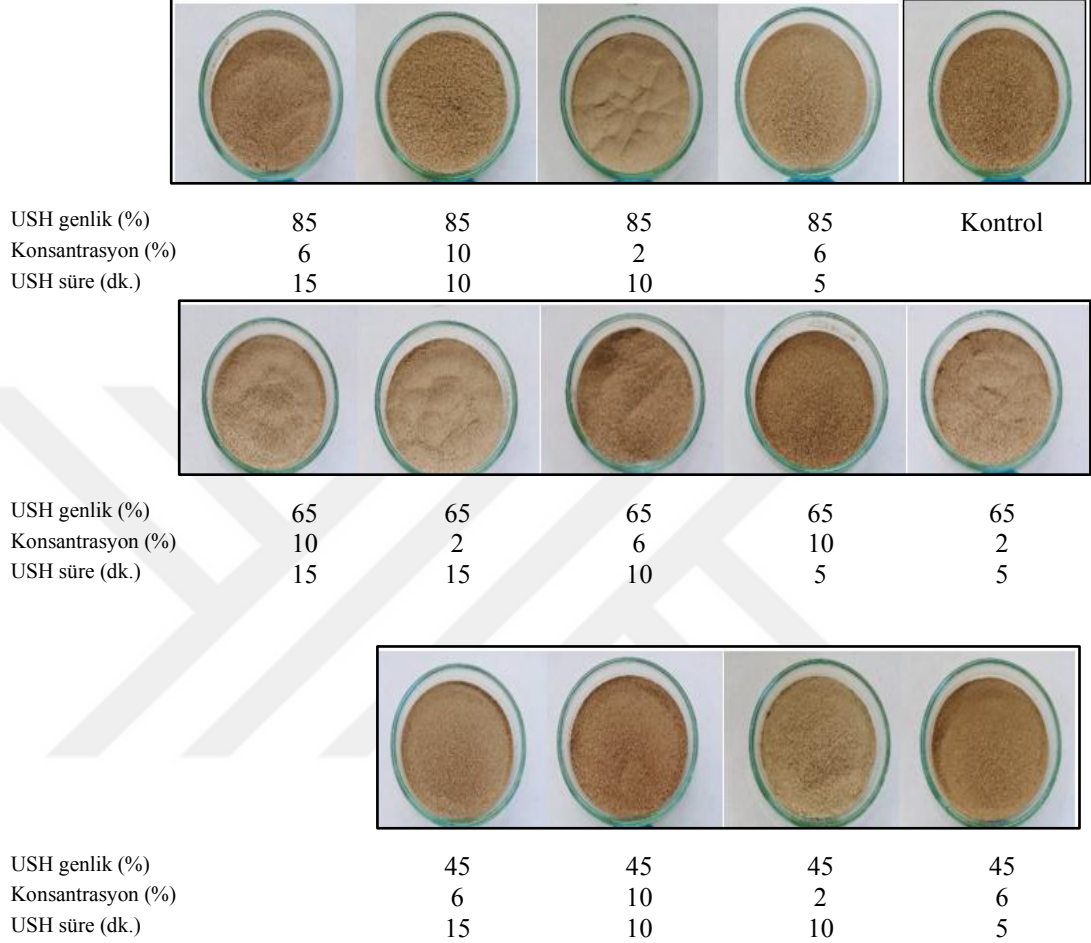
Yağı alınmış unun kimyasal kompozisyonu %55,3 protein, %1,8 yağ, %6,8 nem ve %8,0 kül olarak saptanmıştır (Tablo 3.2). Literatürde yağı alınmış unun kimyasal kompozisyonu %33,5 protein, %11,1 yağ, %5,6 nem, %7,2 kül (Callaway, 2004); %50,2 protein, %6,7 nem, %3,2 kül (Tang ve ark., 2006); %52,5 protein, %1,54 yağ, %2,1 nem, %6,5 kül (Teh ve ark., 2014) ve %29,4 protein, %10,4 yağ, %8,7 nem, %6,4 kül (Mamone ve ark., 2019) şeklindedir. Farklı yağ uzaklaştırma prosesleri, kullanılan solvent, solventin konsantrasyonu, ekstraksiyon süresi ve partikül boyutu gibi faktörler tohumda kalan yağ oranını ve yağsız unun genel kimyasal kompozisyonunu etkilemektedir. Çalışmada yağsız tohumda %1,7 yağ içeriğine ulaşılması yağ uzaklaştırma işleminin etkin şekilde yapıldığını göstermektedir. Yağ uzaklaştırma işleminin etkin şekilde yapılması, protein-yağ interaksiyonunun azalmasıyla protein ekstraksiyon verimi açısından önem taşımaktadır.

Protein izolatının kimyasal kompozisyonuna bakıldığında KTP'nin protein içeriği %90,0, yağ içeriği %0,6, nem ve kül içeriği ise sırasıyla %5,6 ve %2,6'dır (Tablo 3.2). Literatürde kenevir protein izolatlarının kimyasal bileşimine dair birçok çalışma mevcuttur. Çalışmamızdaki verilere benzer şekilde kenevir protein izolatının genel kimyasal kompozisyonunu %86,9 protein, %3,9 nem, %2,6 kül (Tang ve ark., 2006); %86,4 protein, %5,6 kül (Das, 2015); %85,9 protein %0,0 yağ %2,1 nem %0,5 kül (Mamone ve ark., 2019) olduğu farklı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Bu çalışmalarda protein içeriği (%), elde ettiğimiz protein izolatının protein içeriğinden daha düşük değerleri göstermektedir. Buna rağmen; kenevir protein izolatında %90,5–95,2 aralığında protein içeriğine ulaşan çalışmalar da mevcuttur (Girgih ve ark., 2014; Teh ve ark., 2014; Hadnadev ve ark., 2018). Kenevir protein izolatının genel kimyasal kompozisyonunda yer alan protein (%) değerlerindeki farklılık, ekstraksiyon ve çöktürme yöntemlerinden (miselizasyon, alkali veya asidik ortamda hidroliz; izoelektrik noktada veya diyaliz ile proteini ayırma), farklı sıcaklık uygulaması, enzim uygulaması veya iyonik katkı maddesi ilavesi vd. etkenlerden kaynaklı olabilmektedir.

3.3.2. Akustik enerji yoğunluğu

USH uygulamasında (20 kHz; 13 mm prob) akustik enerji yoğunluğu alan cinsinden %45, %65 ve %85 genlik değerleri için sırasıyla 6–11 W/cm², 27–32 W/cm² ve 48–52 W/cm² olarak hesaplanmıştır. Akustik enerji yoğunluğu hacim cinsinden ise %45, %65

ve %85 genlik değerleri için sırasıyla; 7–12 W/100 mL, 31–36 W/100 mL ve 54–58 W/100 mL’dir. Toz haldeki KTP ve USH uygulanan KTP’lerin görüntüsü Şekil 3.1’deki gibidir.



Şekil 3.2. Deneme tasarımına göre farklı genlik, konsantrasyon ve sürelerde USH uygulanan KTP izolatlarının toz formdaki görselleri.

3.3.3. Ultrases homojenizasyon parametrelerinin optimizasyonu

3.3.3.1. Model uygunluğu

KTP’nin çözünürlük ve partikül boyutu, Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak 15 farklı deneme düzeninde USH genlik, protein konsantrasyonu ve USH uygulama süresi değişkenlerine karşı gerçek ve tahmini yanıtlarıyla birlikte Tablo 3.3’te verilmiştir. YYY ile elde edilen modellerin regresyon katsayıları ve varyans analizi Tablo 3.4’te özetlenmiştir.

Tablo 3.3. Box-Behnken deney tasarımına göre USH uygulama koşullarının çözünürlük ve partikül boyut yanıt değerleri. A: USH genlik (%), B: protein konsantrasyonu (%), C: USH süre (dk.).

	Bağımsız değişkenler			Çözünürlük (%)			Partikül boyutu (nm)		
	A	B	C	Gerçek	Tahmini	Bağıl hata	Gerçek	Tahmini	Bağıl hata
1	45 (-1)	2 (-1)	10 (0)	24,0	23,6	1,7	155,2	152,0	2,1
2	45 (-1)	6 (0)	15 (+1)	26,2	26,0	0,8	140,5	142,7	-1,5
3	65 (0)	6 (0)	10 (0)	35,8	36,2	-1,1	98,2	100,3	-2,1
4	65 (0)	10 (+1)	15 (+1)	20,4	19,4	5,2	177,7	180,4	-1,5
5	45 (-1)	6 (0)	5 (-1)	26,9	26,4	1,9	134,6	140,5	-4,2
6	85 (+1)	6 (0)	15 (+1)	24,1	24,6	-2,0	150,5	144,6	4,1
7	85 (+1)	6 (0)	5 (-1)	33,3	33,5	-0,6	108,3	106,1	2,1
8	65 (0)	6 (0)	10 (0)	35,9	36,2	-0,8	101,0	100,3	0,7
9	65 (0)	10 (+1)	5 (-1)	34,0	33,4	1,8	110,5	109,5	0,9
10	85 (+1)	2 (-1)	10 (0)	27,8	26,6	4,5	130,3	135,2	-3,6
11	45 (-1)	10 (+1)	10 (0)	22,7	23,9	-5,0	159,3	154,4	3,2
12	85 (+1)	10 (+1)	10 (0)	26,1	26,6	-1,9	135,6	1388	-2,3
13	65 (0)	2 (-1)	15 (+1)	28,0	28,6	-2,1	125,9	126,9	-0,8
14	65 (0)	6 (0)	10 (0)	36,8	36,2	1,7	101,8	100,3	1,5
15	65 (0)	2 (-1)	5 (-1)	22,9	23,9	-4,2	159,8	156,9	1,7

Tablo 3.4. KTP'nin modifikasyonu için USH uygulama koşullarında kuadratik modelin varyans analizi.

	Çözünürlük			Partikül boyutu		
	k	F	p	k	F	p
Katsayı	+36,17			+100,33		
A-Genlik	+1,44	11,51	0,0194	-8,11	15,50	0,0110
B-Konsant.	+0,0625	0,02	0,8885	+1,51	0,54	0,4959
C-Süre	-2,30	29,45	0,0029	+10,20	24,51	0,0043
AB	-0,10	0,03	0,8740	+0,30	0,01	0,9220
AC	-2,12	12,57	0,0165	+9,08	9,70	0,0264
BC	-4,67	60,84	0,0006	+25,23	74,94	0,0003
A ²	-4,86	60,65	0,0006	+17,41	32,95	0,0022
B ²	-6,16	97,46	0,0002	+27,36	81,37	0,0003
C ²	-3,68	34,86	0,0020	+15,73	26,91	0,0035
Model			0,0007			0,0010
Model uyumsuzluğu (Lack-of-fit)		7,23	0,1240		15,17	0,0625
R ²			0,9827			0,9804
Düzeltilmiş R ²			0,9515			0,9450
Varyans katsayısı			4,23%			4,39%
Etkili faktörler						
Genlik				<0,05		<0,05
Konsantrasyon				-		-
Süre				<0,01		<0,01

*A: USH genlik, %, B: protein konsantrasyonu, a/h, C: USH süre, dk.

Design Expert programında hem protein çözünürlüğü hem de partikül boyutuna ilişkin kuadratik model önerilmiştir. Model uyumsuzluğu (Lack-of-fit), F-testi ve varyans analizi (ANOVA) sonuçları değerlendirilerek elde edilen modellerin uygunluğu ortaya koyulmuştur. İkinci dereceden çözünürlük ve partikül boyutu modelleri için "model uyumsuzluğu" değerleri sırasıyla 0,1240 ve 0,0625 olarak bulunmuştur. Model uyumsuzluğunun olasılık (*p*) değerinin 0,05'ten fazla olması önerilen ikinci dereceden modellerin deneysel tasarım için uygun olduğunu göstermektedir. Model uyumsuzluğu için görülen yüksek F ve *p* değerleri, elde edilen modellerin önemli olduğunu kanıtlamıştır. Modeldeki terimlerin *p*<0,05 olması deneme tasarımında elde edilen modellerin KTP'nin çözünürlük ve partikül boyut yanıtlarını tanımlamada

yeterli olduğunu göstermiştir. Protein çözünürlüğü ve partikül boyutu için kodlanmış değerler baz alınarak oluşturulan regresyon denklemleri aşağıda 3.13 ve 3.14'te verilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{Çözünürlük} = & +35,17 + 1,44A + 0,0625B - 2,30C - 0,10AB \\ & -2,12AC - 4,67BC - 4,86A^2 - 6,16B^2 - 6,38C^2 \quad (3.13) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Partikül boyutu} = & +100,33 - 8,11A + 1,51B + 10,20C + 0,30AB \\ & +9,08AC + 25,22BC + 17,41A^2 + 27,36B^2 + 15,73C^2 \quad (3.14) \end{aligned}$$

Burada A: USH genlik, B: protein konsantrasyonu, C: USH süre.

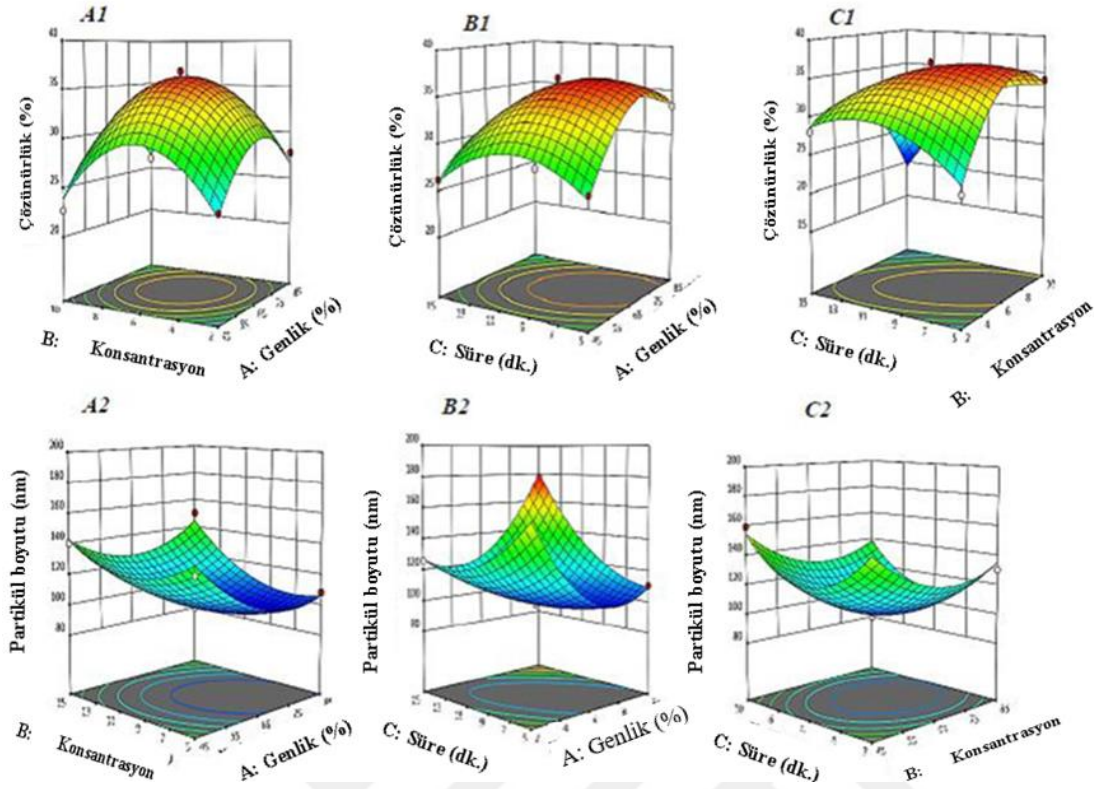
Her bir bağımsız değişkenin çözünürlük üzerindeki etkisini gösteren *p* değeri ANOVA ile Tablo 3.4'te gösterilmiştir. Belirlenen çözünürlük modeli bağımsız değişkenleri uygun şekilde yanıtlayabilecek yeterlilikte önemlidir ($p < 0,05$). Lineer regresyonda “Genlik” ve “Süre” değişkenleri önemli ($p < 0,05$) iken “Konsantrasyon” değişkeni önemsizdir ($p > 0,05$). Kuadratik modelde Genlik*Konsantrasyon interaksyonu önemsiz ($p > 0,05$) iken diğer tüm kuadratik ve interaksiyon regresyonları önemlidir ($p < 0,05$). Modeldeki her bir değişken için düşük *p* değeri ve yüksek *F* değeri yanıt değişkeni üzerindeki etkinin önemini göstermektedir.

ANOVA tablosu, USH genliğinin ve uygulama süresinin hem çözünürlük hem de partikül boyutu açısından istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ($p < 0,05$), protein konsantrasyonunun ise anlamlı olmadığını ($p > 0,05$) göstermiştir. Tablo 3.4'te gösterildiği gibi, ikinci dereceden regresyon modelleri için belirlenen regresyon katsayısı (R^2), çözünürlük için 0,9827 ve partikül boyutu için ise 0,9804'tür. Güçlü bir istatistiksel model için R^2 'nin en az 0,80 olması gerekmektedir (Joglekar ve ark., 1987). Yüksek regresyon katsayısı (R^2), deneysel ve tahmini yanıtlar arasındaki uyum anlamına gelmekte ve elde edilen modellerin yanıtlarının tahminlemede yeterli olduğunu göstermektedir.

3.3.3.2. Bağımsız değişkenlerin çözünürlük ve partikül boyutu üzerine etkisi

Çözünürlük proteinlerin denatürasyon ve agregasyon formları hakkında bilgi vermenin yanı sıra diğer tüm fonksiyonel özelliklerini de birinci dereceden etkilemektedir. Proteinlerin yüksek çözünürlük göstermesi daha iyi fonksiyonel özelliklere sahip olmasında önemli rol oynamaktadır (Arzeni ve ark., 2012). YYY ile

elde edilen deney tasarımı, farklı parametrelerde USH uygulaması sonrası elde edilen proteinlerin çözünürlük değerleri %20,4 ile %36,8 arasında değişim göstermiştir (Tablo 3.3). Uygulama yapılmamış KTP'nin çözünürlüğü %20,3 iken USH uygulamasından sonra maksimum çözünürlük R₁₄ tasarımında (%65 genlik, %6 protein konsantrasyonu, 10 dk., 30 W/cm²) %36,8 olarak bulunmuştur. Tablo 3.4'e göre USH genlik parametresi KTP'nin çözünürlüğü üzerinde pozitif bir etkiye sahipken, USH uygulama süresi negatif etki göstermiştir. Ancak USH genliğinin çözünürlük üzerindeki etkisi USH uygulama süresine kıyasla daha düşük olmuştur. Tablo 3.4'te gösterildiği gibi, bağımsız değişkenlerden protein konsantrasyonu, %2–10 protein konsantrasyon aralığında, çözünürlük ve partikül boyut yanıtları için önemsiz bir faktördür ($p > 0,05$). Çözünürlük ve partikül boyutu için denklem 3.13 ve denklem 3.14'e göre oluşturulan 3B yanıt yüzey grafikleri Şekil 3.3'te verilmiştir. 3B yanıt yüzey grafiklerinde üçüncü bağımsız değişken, değişkenler arasındaki etkileşimin etkisini anlamak için sabit tutulmuştur. Çözünürlük için yüzey yanıt analizinde, Genlik*Süre ($p = 0,0165$) ve Süre*Konsantrasyon ($p = 0,0006$) arasındaki etkileşimlerinin önemli olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, Genlik*Konsantrasyon arasında anlamlı bir etkileşim bulunamamıştır ($p > 0,05$). USH uygulamasında 5–10 dakika ve %45–65 genlik aralığında (6–11 W/cm², 27–32 W/cm²) çözünürlük %22,7'den %36,8'e doğrusal olarak artmıştır (Şekil 3.3 A1).



Şekil 3.3. Farklı USH uygulama koşulları sonucu KTP izolatının çözünürlük ve partikül boyutu üzerinde genlik, konsantrasyon ve sürenin etkisini gösteren 3B yanıt ve kontur grafikleri.

Çözünürlükteki bu artış, protein moleküllerinin kısmen açılmasıyla artan protein-su etkileşimine bağlanabilir. Bununla birlikte, %65 üstü genlik ve 10 dakikadan (30 W/cm^2) daha uzun USH uygulama sürelerinde KTP'nin çözünürlüğü azalış göstermiştir. Bu azalma, kovalent olmayan etkileşimler sonucu protein moleküllerinin daha yüksek molekül ağırlıklı agregatlara dönüşmesiyle ilişkilendirilebilir. Bu bulguyla uyumlu olarak, Malik ve ark. (2017), $58\text{--}61 \text{ W/cm}^2$ güçte USH uygulanan ayçiçeği protein izolatlarının çözünürlüğünün artan uygulama süresiyle (20 dakikaya kadar) arttığını bildirmiştir; ancak, bu artış daha uzun süreli USH uygulamalarında gözlenmemiştir. USH uygulanan perilla tohum protein izolatı (Zhao ve ark., 2022), nohut protein izolatı (Wang ve ark., 2020), siyah fasulye protein izolatı (Jiang ve ark., 2014) ve bakla proteini (Martínez-Velasco ve ark., 2018) için de benzer sonuçlar rapor edilmiştir. Yüksek genlik ve uzun süre kombinasyonundaki USH uygulaması literatürde 'aşırı uygulama' (over-process) olarak tanımlanmıştır. Benzer şekilde, Jiang ve ark. (2014), siyah fasulye protein izolatlarının çözünürlüğünün artan USH

genlik ve uygulama süresi (300 W, 12 dakikaya kadar) ile arttığını belirtmiş, ancak daha yoğun USH uygulamalarının siyah fasulye proteinlerinin çözünürlüğünü azalttığını belirtmişlerdir. Bu durumu aşırı USH uygulama koşullarının siyah fasulye protein izolatlarının içindeki hidrofobik ve gömülü merkaptto gruplarını serbest hale geçirmesi ve çözünmez makromoleküler agregatların oluşumunu tetiklemesi şeklinde yorumlamışlardır.

USH uygulamasının protein çözünürlüğünde meydana getirdiği değişimde uygulanan USH güç ve süre parametrelerinin yanı sıra proteinin sahip olduğu moleküler yapı da etkili olmaktadır (Arzeni ve ark., 2012). KTP'nin yüksek oranda globüler-edestin proteini içermesi, moleküller arası kovalent disülfid bağlar oluşturarak kompakt yapıdaki agregatların oluşumuna neden olmaktadır (Tang ve ark., 2006). Bu da KTP'nin USH uygulamasından etkilenme derecesini değiştirebilmektedir. Ayrıca KTP'nin 11S protein yapısı çözünürlüğün en düşük olduğu yüksek molekül ağırlıklı, hidrofobik/hidrofilik dengesi yüksek olan fraksiyonudur (Ajibola, 2020). Çözünürlükteki artış 11S fraksiyonundaki değişim ile ilişkilendirilebilir. USH uygulamasının neden olduğu kavitasyonel baloncukların patlamasıyla oluşan sıcaklık ve basınçtaki bölgesel artış, türbülans akış ve kesme kuvveti protein bağlarının kırılmasına ve proteinlerin kısmi denatürasyonuna neden olmaktadır. Protein yapısında bozulan bazı interaksiyonların etkisiyle çözünmez proteinlerin çözünür yapıya dönüşmesi mümkün olabilmektedir (Jambrak ve ark., 2009). Ayrıca, USH uygulaması sonrası globüler formdaki KTP'nin 3 boyutlu yapısında meydana gelebilecek değişim yüklü grupların (NH_4^+ , COO^-) sayısını artırarak protein-su arası elektrostatik etkileşimlere yol açabilmektedir.

USH işleminin KTP'nin partikül boyutunu önemli ölçüde azalttığı Tablo 3.3'de gösterilmiştir. KTP'nin partikül boyutu 180,5 nm iken deneme tasarımıdaki farklı proses koşullarında, partikül boyutu değerleri 98,2–177,7 nm arasında değişim göstermiştir. USH uygulamalarından sonra KTP'nin en düşük partikül boyutu deneme tasarımı R₃ ile kodlanan proses koşullarında verildiği üzere (%65 genlik, %6 protein konsantrasyonu ve 10 dakika) 98,2 nm'dir. ANOVA tablosuna göre (Tablo 3.4), %2–10 aralığındaki protein konsantrasyonunun çözünürlük ve partikül boyutu için önemsiz bir faktör olduğu ortaya çıkmıştır. Benzer şekilde, USH işlem süresinin KTP'nin partikül boyutu üzerindeki etkisi, genliğin etkisinden daha yüksektir. 3B

yanıt yüzey grafiklerinde (Şekil 3.3 B2), USH uygulama süresinin (10 dakikaya kadar) ve genliğin (%65'e kadar) arttırılmasıyla partikül boyutunun azaldığı ortaya koyulmuştur. Bununla birlikte, yüksek genlik seviyelerinde (>%65) artan USH uygulama süresi ile partikül boyutunda artış gözlenmiştir. Literatürde benzer şekilde, USH uygulamasının proteinlerin partikül boyutunu azalttığı bildirilmiştir (Jiang ve ark., 2014, Malik ve ark., 2017, Zhu ve ark., 2018). Protein izolatlarının partikül boyutundaki azalma, USH'un kesme kuvveti, mikro akış ve şok dalgalarına bağlanabilir. USH uygulaması, protein yapısındaki hidrofobik ve elektrostatik etkileşimlerin kırılmasına neden olabilmektedir (Kadam ve ark., 2015, Shirsath ve ark., 2012). Zhu ve ark. (2018) tarafından ılımlı USH işlem koşullarının ceviz proteininin partikül boyutunu azalttığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, araştırmacılar ceviz proteinine uygulanan USH'nin süresinin 15 dakikadan 30 dakikaya uzatılmasıyla daha büyük protein kümelerinin oluştuğunu rapor etmişlerdir.

Maksimum çözünürlük ve minimum partikül boyutuna dayalı optimum USH işlem koşulları %71,4 genlik, %6,9 konsantrasyon ve 7,8 dakika (20 kHz, 37 W/cm²) olarak belirlenmiştir. Model validasyonu için optimum işlem koşullarında doğrulama deneyleri yapılmıştır. Optimum noktada, KTP-USH'nin deneysel çözünürlüğü ve partikül boyutu değerleri sırasıyla %36,15 ± 0,12 (tahmini %36,88) ve 97,6 ± 1,3 nm (tahmini 96,04 nm) olarak elde edilmiştir. Tahmini ve deneysel yanıtların bağıl hata değeri %10,0'u geçmemelidir. Hesaplanan bağıl hata değerleri çözünürlük ve partikül boyutu için sırasıyla %2,0 ve %1,6'dır. Tahmini ve gerçek yanıtların birbirine yakın olmasıyla elde edilen modellerin doğruluğu teyit edilmiştir. Optimum USH koşulları altında (%71,4 genlik, %6,9 konsantrasyon, 7,8 dakika; 20 kHz, 37 W/cm²) KTP'ye kıyasla çözünürlük %78 artarken; partikül boyutu %46 azalmıştır.

3.3.4. Fizikokimyasal özelliklerde birincil yapı değişimi

3.3.4.1. Amino asit dağılımı

KTP ve optimum koşullarda hazırlanan KTP-USH'nin amino asit profilleri Tablo 3.5'te sunulmaktadır.

Tablo 3.5. KTP ve KTP-USH'nin amino asit dağılımı (g/100 g).

Amino asit (g/100 g)	KTP	KTP-USH
Alanin	4,262 ± 0,001 ^b	4,314 ± 0,000 ^a
Arginin	12,829 ± 0,007 ^a	12,253 ± 0,002 ^b
Aspartik Asit	9,926 ± 0,001 ^b	10,428 ± 0,001 ^a
Sistein	1,676 ± 0,001 ^b	1,754 ± 0,000 ^a
Glutamik Asit	16,478 ± 0,007 ^b	16,616 ± 0,007 ^a
Glisin	5,312 ± 0,001 ^a	3,685 ± 0,000 ^b
Histidin	3,368 ± 0,007 ^a	2,953 ± 0,001 ^b
Izolösin	2,908 ± 0,005 ^a	2,682 ± 0,003 ^b
Lösin	6,679 ± 0,003 ^a	6,568 ± 0,010 ^b
Lisin	4,831 ± 0,002 ^a	4,070 ± 0,001 ^b
Metiyonin	2,229 ± 0,001 ^a	2,169 ± 0,006 ^b
Oritin	0,442 ± 0,000 ^b	0,492 ± 0,000 ^a
Fenilalanin	4,953 ± 0,000 ^a	4,801 ± 0,003 ^b
Prolin	4,473 ± 0,007 ^a	4,367 ± 0,006 ^b
Serin	5,648 ± 0,000 ^b	6,198 ± 0,001 ^a
Treonin	3,276 ± 0,001 ^a	3,221 ± 0,005 ^b
Tirozin	3,455 ± 0,001 ^a	3,270 ± 0,007 ^b
Valin	4,718 ± 0,000 ^a	4,640 ± 0,001 ^b
Taurin	0,000 ± 0,000 ^a	0,000 ± 0,000 ^a
EAA*	26,283 ± 0,010 ^b	31,108 ± 0,015 ^a
HAA**	35,537 ± 0,008 ^a	33,231 ± 0,005 ^b

Farklı harflere sahip örnekler satır boyunca önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). Değerler ortalama ± standart sapma, n = 3 olarak ifade edilmiştir.

*EAA Esansiyel amino asit içeriği (histidin + izolösin + lösin + lizin + metiyonin + fenilalanin + treonin + valin)

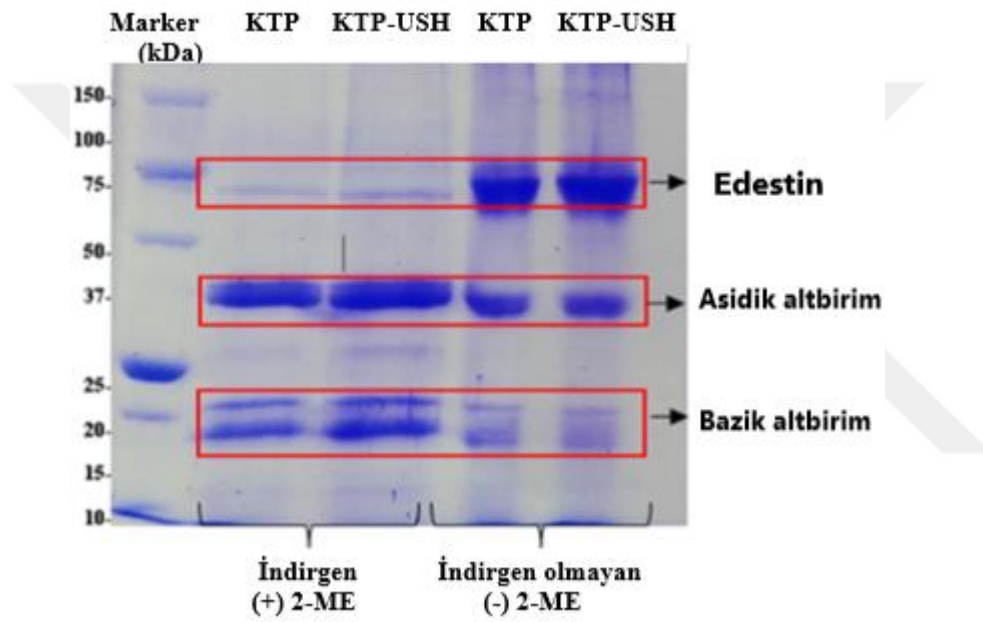
**HAA Hidrofobik amino asit içeriği (glisin, alanin, valin, lösin, izolösin, prolin, fenilalanin, metiyonin, triptofan)

KTP-USH'nin amino asit dağılımı KTP ile karşılaştırıldığında tüm amino asitlere dair profilin değiştiği görülmüştür. KTP'nin esansiyel amino asit içeriği USH uygulamasından sonra $26,28 \pm 0,01$ 'den $31,11 \pm 0,01$ g/100 g'a yükselirken, KTP'nin hidrofobik amino asit içeriği $35,54 \pm 0,01$ 'den $33,23 \pm 0,01$ g/100 g'a düşmüştür.

Benzer şekilde, Li ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada, USH uygulamasının (58 W/L, 15 dk.) toplam hidrofobik amino asit içeriğini azalttığı bildirilmiştir. Bulgularımızın aksine, Li ve ark. (2017), USH işleminden sonra (448 W, 40 dk.) pirinç proteininin hidrofobik amino asit içeriğinde %4,78'lik bir artış olduğunu beyan etmiştir.

3.3.4.2. Molekül ağırlık dağılımı (SDS-PAGE)

SDS-PAGE'in indirgen (+2-ME) ve indirgen olmayan (-2-ME) koşulları altında KTP ve KTP-US'nin protein bantları Şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.4. KTP ve KTP-USH'nin indirgen (+2-ME) ve indirgen olmayan (-2-ME) koşullar altındaki SDS-PAGE profilleri.

SDS-PAGE profilinde, ~60 kDa'daki baskın bant edestin proteinine karşılık gelmektedir ve diğer bantlar ~37 kDa'da asidik alt birim ve ~18 kDa'da bazık alt birim olarak adlandırılmaktadır (Wang ve ark., 2019). USH uygulaması sonrası, KTP'nin SDS-PAGE protein profilinde oluşan bantların hem sayı hem de yoğunluklarında gözle görülür bir değişiklik meydana gelmemiştir. Bu gözlem, USH etkisiyle protein yapısındaki peptit bağlarının kırılmadığını ortaya koymuştur.

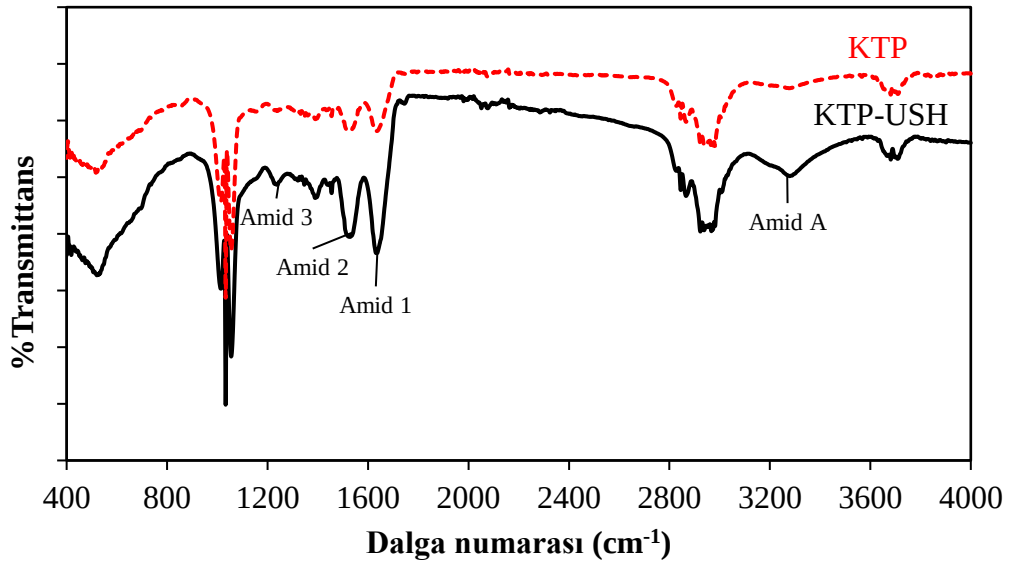
Aynı protein örneğinde indirgen ve indirgen olmayan koşullar değerlendirildiğinde ise oluşan protein fraksiyonları değişmiştir. İndirgen olmayan koşullarda edestin bandı (60 kDa) baskın iken, indirgen koşullar altında disülfid bağlarının kırılmasıyla daha

düşük moleköl ağırlıklarında iki farklı bant (37 kDa-asidik alt birim, 18–20 kDa-bazik alt birim) gözlenmiştir. Bunun nedeni muhtemelen 2-ME'nin proteinlerin disülfid bağlarını kırarak daha küçük polipeptitlerin oluşumuna neden olmasıdır. Bu nedenle, KTP'nin kompakt yapısı ve agregasyon eğilimi, protein bant profilinde de görülen edestin proteininin yoğun varlığı ile ilişkilendirilebilir. Benzer şekilde bazı araştırmacılar USH uygulaması sonrasında proteinlerin elektroforetik modellerinde önemli bir fark olmadığını rapor ederek, bu çalışmalarda kullanılan USH'nin kaviteasyon yoğunluklarıyla ilişkili olarak proteinlerin birincil yapısının değişmediğini öne sürmüşlerdir (Jiang ve ark., 2014, Wang ve ark., 2019). Nazari ve ark. (2018), USH işleminin (73,95 W/cm²) darı proteinlerinde 40 ve 50 kDa yer alan protein bantlarını kesme kuvvetlerinin etkisiyle değiştirmesiyle birincil protein yapısında modifikasyon meydana getirdiğini öne sürmüşlerdir.

3.3.5. Fizikokimyasal özelliklerde ikincil yapı değişimi

3.3.5.1. Fourier dönüşümü kızılötesi spektrumu (FT-IR)

KTP ve KTP-USH'nin FT-IR spektrumları Şekil 3.6'da verilmiştir. Protein yapısı ile ilgili birincil ilişkili pikler temelde Amid A, Amid 1, Amid 2 ve Amid 3 bölgelerinde yer almaktadır.



Şekil 3.5. KTP ve KTP-USH'nin FT-IR spektrumu.

N–H gerilme titreşimleri (%95) Amid A bölgesinde (3500–3200 cm⁻¹) kendini göstermektedir. KTP ve KTP-USH'nin Amid A titreşimleri 3279 cm⁻¹ dalga

numarasında benzer değerlerde görülmüştür. Amid 1 bandı C=O (%70–85) ve C–N (%10–20) gerilme titreşimlerini içeren 1700–1600 cm⁻¹ dalga numarası aralığında oluşmaktadır. Şekil 3.5’te gösterildiği gibi, USH uygulaması sonrasında Amid 1 (1700–1600 cm⁻¹) bölgesindeki pik 1636 cm⁻¹’den 1629 cm⁻¹’e kaymıştır. Amid 1 bölgesindeki bu kayma KTP’nin USH uygulaması sonrasında ikincil yapısında kısmi bir değişim meydana geldiğini göstermektedir. Amid 2 bölgesinde (1580–1480 cm⁻¹) N–H (%40–60), C–N (%18–40) ve C–C (%10) gerilme titreşimleri baskındır. KTP örneğinin Amid 2 bölgesindeki (1580–1480 cm⁻¹) pik 1529 cm⁻¹’den 1524 cm⁻¹’e kayma göstermiştir. Amid 2 bandında 1545–1551 cm⁻¹ ve 1521–1525 cm⁻¹ dalga numaraları α -heliks ve β -sheet yapılarını göstermektedir. Dalga numarasındaki yüksek değerlere doğru olan kaymalar, USH uygulamasından sonra proteinin ikincil yapısında rastgele sarım ve β -sheet yapılarına dönüşümlerle ilişkilendirilebilir (Stefanović ve ark., 2017). Nazari ve ark. (2018), USH uygulanan darı proteininin Amid 2 bölgesinin benzer şekilde daha yüksek dalga boylarına kaymasını USH sırasında üretilen kavitsiyonel kuvvetlerinin etkisiyle oluşan konformasyonel değişimlere bağlamıştır. Amid 3 bölgesi (1400–1200 cm⁻¹) daha karmaşık bağlar içerir. KTP-USH ve KTP’nin Amid 3 bölgesinde 1234 cm⁻¹’de benzer piklere sahip olduğu gösterilmiştir.

3.3.5.2. İkincil yapı dağılımı (CD)

Dairesel dikroizm spektroskopisi (CD), proteinlerin ikincil yapılarını analiz etmek için kullanılan bir analiz tekniğidir. Proteinin ikincil yapısı, amino asitlerin konformasyonel düzeni ve farklı bölgelerdeki amino asitlerin etkileşimleri ile ilgilidir. KTP ve KTP-USH’nin sıvı formdaki molar eliptikliği 190–260 nm arasında analiz edilmiştir. Tablo 3.6’da KTP ve KTP-USH’nin ikincil yapıdaki α -heliks, β -sheet, β -turn ve rastgele sarım oranını göstermektedir.

Tablo 3.6. KTP ve KTP-USH’nin CD spektrumu ve ikincil yapı formlarının dağılımları (%).

İkincil yapı (%)	KTP	KTP-USH
α -heliks	22,2 $\pm$ 0,5a	12,5 $\pm$ 1,1b
β -sheet	42,6 $\pm$ 0,8b	48,8 $\pm$ 0,7a
β -turn	0,0	0,0
Rastgele sarım	35,2 $\pm$ 0,1b	38,7 $\pm$ 0,5a

*Farklı harflere sahip örnekler satır boyunca önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). Değerler ortalama $\pm$ standart sapma, n = 3 olarak ifade edilmiştir.

USH uygulaması KTP'nin ikincil yapısında genel dağılımdaki α -heliks yapının oranını azaltırken (%22,2'den %12,5'e), β -sheet (%42,6'dan %48,8'e) ve rastgele sarım oranını (%35,2'den %38,7'ye) artırmıştır. Protein yapısındaki bu konformasyonel değişiklikler, USH işleminin kavitasyon, türbülans ve mikro akış etkilerinden kaynaklanabilir. FT-IR spektrumunda Amid 1 ve Amid 2 bölgelerinde görülen kaymalar da proteinin ikincil yapısındaki oransal değişimi kanıtlamıştır. Zhu ve ark. (2018), USH işleminden sonra ceviz proteininin β -sheet, β -turn ve rastgele sarım yapısındaki artışları bildirmiştir. Araştırmacılar USH işleminin hidrojen bağlarını bozarak α -heliks yapıdan β -sheet'e, β -turn'e veya rastgele sarım yapılarına dönüşüme neden olabileceğini vurgulamışlardır. Benzer şekilde, Hu ve ark. (2013) 200, 400 ve 600 W'de (75–83 W/cm², 105–110 W/cm² ve 131–138 W/cm²) USH işlemi sonrası soya proteininin ikincil yapısını araştırmıştır. Soya proteininin α -heliks ve rastgele sarım yapılarının 200 W gücündeki USH uygulamasından sonra azaldığını ve 600 W gücündeki USH uygulamasından sonra ise arttığını gözlemlemişlerdir. USH'un protein yapıları üzerindeki etkisi, protein fraksiyonlarına ve USH uygulama parametrelerine bağlıdır.

3.3.6. Fizikokimyasal özelliklerde üçüncül yapı değişimi

3.3.6.1. Zeta potansiyeli

Tablo 3.7'de KTP'nin USH uygulaması sonrasında negatif zeta potansiyel (ζ) değerinin -22,30 mV'den -27,80 mV'ye (%25) arttığı görülmektedir. Bu sonuçlar, USH uygulamasının katlanmamış protein yapılarına yol açarak proteinin iç kısmından çevreye daha fazla negatif yüklü grupların açığa çıkmasına neden olabileceğini göstermiştir. Böylece USH uygulaması sonrasında daha stabil yapıda KTP-USH süspansiyonu elde edilmiştir.

Tablo 3.7. KTP ve KTP-USH'nin zeta potansiyeli (ζ , mV), serbest SH grup içeriği ($\mu\text{mol/g}$ protein), denatürasyon sıcaklığı (T_d , $^{\circ}\text{C}$), entalpi (J/g) ve yüzey hidrofobisitesi (H_0) değerleri.

	ζ SH (mV)	Serbest ($\mu\text{mol/g}$)	T_d ($^{\circ}\text{C}$)	Entalpi (J/g)	H_0 (Au)
KTP	$-22,30 \pm 0,40b$	$2,65 \pm 0,11b$	$77,97 \pm 0,12b$	$14,10 \pm 2,11a$	$5616,6 \pm 173,1b$
KTP-USH	$-27,80 \pm 1,70a$	$4,22 \pm 0,05a$	$81,00 \pm 0,05a$	$12,70 \pm 2,52b$	$8082,6 \pm 131,0a$

* Farklı harflere sahip örnekler sütun boyunca önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). Değerler ortalama $\pm$ standart sapma, $n = 3$ olarak ifade edilmiştir.

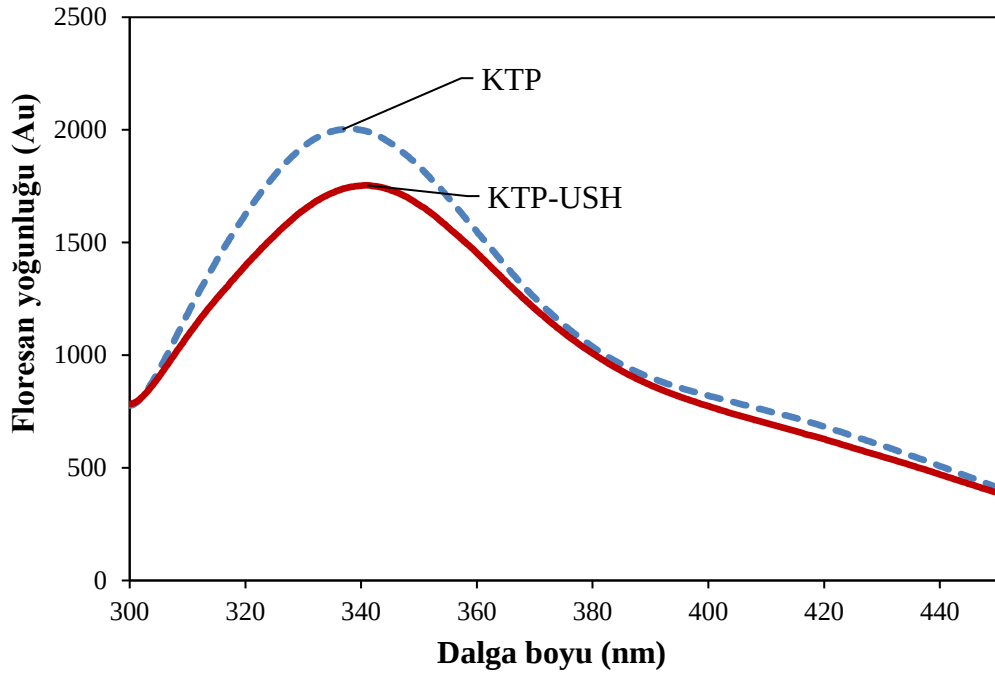
Nazari ve ark. (2018), USH işleminin (sırasıyla 5, 12,5 ve 20 dk. için 18,4, 29,58 ve 73,95 W/cm²) darı proteini üzerindeki etkisini incelemiştir. USH uygulamasından sonra darı proteininin zeta potansiyeli -32,9 mV'den -42,2 mV'ye yükseldiği rapor edilmiştir. Araştırmacılar, görülen bu artışın, proteinin yapısal modifikasyonu ve amino asitlerin çözücüye maruz kalması ile ilişkili olabileceğine dair yorum yapmışlardır. Yüksek yüzey yükü, protein partikülleri arasındaki elektrostatik itmeyi güçlendirerek protein agregasyonunu engellemektedir (Stefanović ve ark., 2017). Elde ettiğimiz FT-IR sonuçları da tersiyer yapıdaki konformasyonel değişimi USH uygulamasından sonra Amid 1 ve Amid 2 bölgelerindeki kaymalar ile doğrulamıştır.

3.3.6.2. Yüzey hidrofobisitesi

Yüzey hidrofobisitesi (H_0) proteinlerin çözünürlük, emülsiyon, köpük oluşturma gibi fonksiyonel özelliklerinde etkili olan önemli bir yapısal karakteristiğidir. Yüzey hidrofobikliği, hidrofobik etkileşimler yoluyla proteinin emülsifiye etme ve köpürme gibi fonksiyonel özellikleri için kritik olan, protein yüzeyindeki hidrofobik grupların sayısını gösterir (Kato ve Nakai, 1980; Kato ve ark., 1982).

KTP-USH'nin yüzey hidrofobikliği (8082,6 Au), KTP'nin yüzey hidrofobikliğinden (5616,6 Au) önemli ölçüde ($p < 0,05$) daha yüksektir (Tablo 3.7). Bu durum, USH uygulaması ile yüzeyde daha fazla hidrofobik grubun açığa çıktığını göstermiştir.

İçsel floresan emisyonu, proteinin kısmi denatürasyonu, agregasyonu ve üçüncül yapı değişikliklerini belirlemek için kullanılan başka bir spektroskopik analiz parametredir (Jiang ve ark., 2014). KTP ve KTP-USH'un içsel floresan emisyon spektrumları Şekil 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3.6. KTP ve KTP-USH'nin floresan yoğunluğu.

USH uygulamasından sonra, KTP'nin floresan yoğunluğu (FI) 2002 Au'dan 1754 Au'ya düşerken, maksimum emisyon dalga boyu ($\lambda_{\max}$) 336,8 nm'den 341,0 nm'ye kayma göstermiştir. FI'deki bu düşüş ve $\lambda_{\max}$ 'taki artış, USH uygulamasının etkisiyle protein yapısındaki kısmi açılmadan kaynaklı çözücü ortama daha fazla maruz kalan kromoforlara bağlanabilir. Jiang ve ark. (2014), protein yapılarındaki açılma ile gömülü hidrofobik grupların protein yüzeyinde immobilize olduğunu bildirmişlerdir. Hidrofobik grupların proteinlerin gömülü iç kısımlarından yüzeye doğru hareketinin bir sonucu olarak FI azalır ve $\lambda_{\max}$ daha yüksek dalga boylarına kayma gösterebilir (batokromik kayma) (Karoui ve Blecker, 2011). Kısmen katlanmış veya katlanmamış protein yapılarında yer alan bu amino asitler çözücü ortamına taşınır ve çözeltinin polaritesinde artışa neden olurlar (Jiang ve ark., 2014). Hidrofobik ortamda tirozin ve triptofan amino asitleri yüksek kuantum verimliliği ve yüksek FI değerlerine sahiptir. Öte yandan, hidrofilik ortamda bu amino asitlerin kuantum etkinliği düşerek düşük FI'ya neden olmaktadır. Bu durum, katlanmış yapıdaki triptofan ve tirozin amino asitlerinin genellikle proteinin iç kısımlarında bulunduğunu göstermektedir (Karoui ve Blecker, 2011).

3.3.6.3. Serbest sülfidril grup içeriği

Optimum koşullardaki USH uygulaması sonrası proteinlerin tersiyer yapısındaki katlanma/açılma derecelerindeki değişim, serbest SH grubu içeriği ile tespit edilmiştir. KTP ve KTP-USH'nin serbest SH grup içerikleri Tablo 3.7'de verilmiştir.

KTP'nin serbest SH grubu içeriği $2,65 \pm 0,11$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur. Bu değer Tang ve ark. (2006) tarafından bildirilen $3,9$ $\mu\text{mol/g}$ protein değerinden daha düşüktür. Protein ekstraksiyon aşamaları ve çeşitsel farklılıkların etkisiyle örneklerin serbest SH grup içeriği değişebilmektedir. Sonikasyon uygulaması, KTP'nin serbest SH grup içeriğini $2,65$ 'ten $4,22$ $\mu\text{mol/g}$ 'ye, %59'dan daha fazla oranda artırmıştır. KTP-USH'nin serbest SH grubu içeriğindeki artışın iki olası nedeni olabilir. Bunlar; kavitasyon ve kayma kuvvetlerinin etkisiyle proteinin iç SH gruplarının yüzeydeki aktivitesi ve daha küçük partikül boyutlarıdır. USH uygulamasıyla protein yapılarının modifiye edilmesine ilişkin önceki raporlarda da serbest SH grup içeriğinde benzer artışlar görülmüştür (Malik ve ark., 2017, Jiang ve ark., 2017). Bu sonuçların aksine, aşırı USH uygulama koşullarının soya proteinlerinin 7S ve 11S gruplarındaki SH grup içeriğini azalttığı bildirilmiştir (Hu ve ark., 2013). Jiang ve ark. (2017), USH uygulanan proteinin serbest SH gruplarındaki artışı kavitasyon etkisiyle kırılan SS bantlarından yeni SH gruplarının oluşmasına bağlamışlardır. Aksine, Arzeni ve ark. (2012) USH uygulamasının peynir altı suyu, soya ve yumurta akı proteinlerinin serbest SH gruplarında herhangi bir farklılığa neden olmadığını belirtmişlerdir. Bu durumu, proteinlerin serbest SH gruplarının hızla geri dönüşebilir olmasıyla ilişkilendirmişlerdir.

3.3.6.4. Termal davranışı

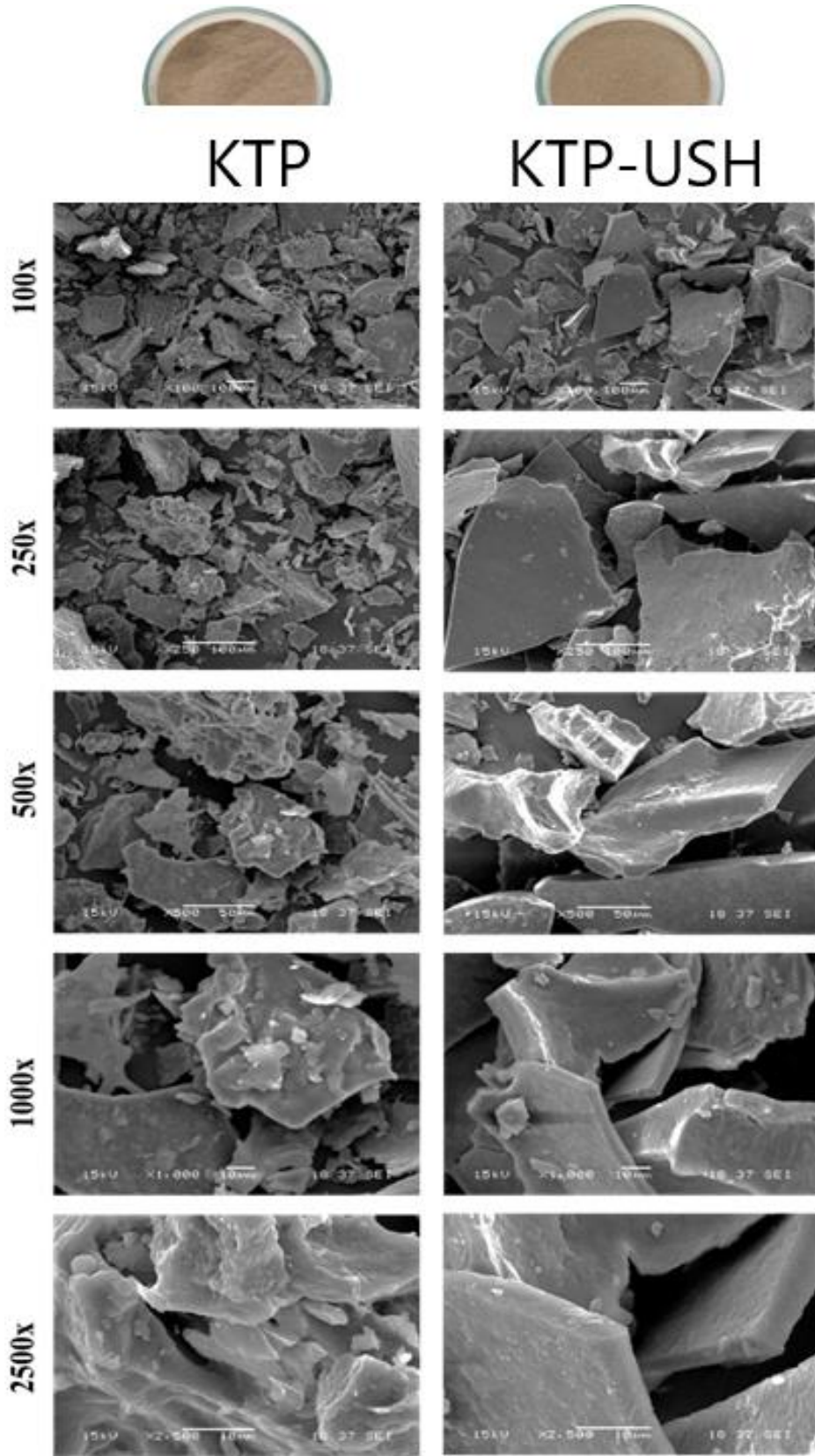
Termal stabilite, ısıya maruz kalan proteinlerin agregasyona karşı gösterdiği direnç olarak tanımlanır. T_d ($^{\circ}\text{C}$, denatürasyon sıcaklığı) ve ΔH (J/g, entalpi) değerleri, bir proteinin termal stabilitesini yansıtmak için diferansiyel taramalı kalorimetre cihazı ile hesaplanabilmektedir. KTP ve KTP-USH termogramlarından elde edilen veriler Tablo 3.7'de verilmiştir. Her iki protein örneği de tek bir endotermik denatürasyon piki göstermiştir. USH uygulaması KTP'nin T_d değerini $77,97^{\circ}\text{C}$ 'den $81,00^{\circ}\text{C}$ 'ye yükseltirken, ΔH değerini $14,10$ J/g'dan $12,70$ J/g'ye düşürmüştür. KTP'nin yüksek termal stabilitesi, edestin proteininin kompakt yapısı ile ilişkilendirilebilir. Proteinin termal davranışındaki değişiklikler, protein yapılarının kısmi denatürasyonunu ve

yapısal modifikasyonunu kanıtlamaktadır. Kesme kuvvetleri etkisiyle oluşan kavitasyon kabarcıkları USH uygulanan proteinlerin moleküller arası bağlarını kırabilmektedir. Bu durum rapor ettiğimiz FT-IR, serbest SH grubu ve zeta potansiyel analiz verileri ile de doğrulanmıştır. KTP ve KTP-USH'nin ΔH verilerine göre, USH uygulaması sonrasında protein örneğini denatüre etmek için daha az enerji gerektiği ortaya koyulmuştur. Literatürde, USH ile muamele edilmiş ayçiçeği protein izolatının termogravimetrik özelliklerindeki değişiklikler, üçüncül yapıdaki konformasyonel değişimlere bağlanmıştır. Vera ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada, USH uygulanan ayçiçeği ve kinoa proteinlerinin T_d değerlerindeki artışın (81,6'dan 99,8°C'ye) hidrofobisitedeki artıştan kaynaklandığı rapor edilmiştir. Benzer şekilde, Malik ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada, ayçiçeği proteininin USH ile işlenmesinden sonra, T_d ve ΔH değerleri sırasıyla 87,8'den 81,2°C'ye ve 6,1'den 4,3 J/g'a düşmüştür. Nazari ve ark. (2018), USH uygulanan darı proteinlerinin denatürasyon sıcaklığında herhangi bir değişiklik saptamamıştır, ancak araştırmacılar USH uygulamasından sonra proteinin ΔH değerinin düştüğünü belirtmişlerdir. Araştırma çıktılarındaki bu farklılık USH tarafından indüklenen çeşitli protein kaynaklarının fizikokimyasal yapılarına, denatürasyon/agregasyon derecelerine ve moleküler stabilitelerine sahip olmaları ile açıklanabilir.

3.3.7. Morfolojik özellikler

3.3.7.1. Taramalı elektron mikroskobu

Şekil 3.7'de USH uygulamasının KTP'nin mikro yapısı üzerindeki etkisi taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri ile gösterilmiştir.



Şekil 3.7. KTP ve KTP-USH'nin elektron mikroskop görüntüleri.

KTP-USH izolatu, KTP'ye kıyasla partikül morfolojisi değişmiştir. Bu durum, USH uygulaması etkisiyle protein yapısında serbest SH ve hidrofobik grupların artışına bağlanabilir. Aynı zamanda proteinlerin dondurarak kurutulması sırasında bu SH grupları birbirleriyle etkileşime girebilmekte ve daha büyük protein agregaları oluşturabilmektedir. Benzer şekilde, Zhu ve ark. (2018), farklı güç seviyelerinde (200, 400 veya 600 W) ve zamanlarda (15 veya 30 dk.) USH uygulanan ceviz proteininin mikro yapısının daha düzensiz ve büyük tabakalar halinde olduğunu bildirmiştir.

3.3.8. Fonksiyonel özellikler

3.3.8.1. Su ve yağ bağlama kapasitesi

Proteinlerin yapısındaki hidrofilik/hidrofobik dengenin göstergesi olan su ve yağ bağlama özellikleri, içeriğinde bulunduğu gıda ürünlerinin gevreklik, tekstür gibi kalite parametrelerini depolama süresince etkilemektedir. KTP ve KTP-USH'nin su/yağ bağlama kapasiteleri Tablo 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.8. KTP ve KTP-USH'nin su/yağ bağlama kapasitesi (%), emülsiyon aktivite (m^2/g)/stabilite (dk.) indeksleri, köpük kapasite/stabilitesi (%) ve jel oluşturma kapasitesi (%).

Fonksiyonel özellikler	KTP	KTP-USH
Su bağlama kapasitesi (%)	1,20±0,09 ^a	1,11±0,01 ^a
Yağ bağlama kapasitesi (%)	1,78±0,03 ^b	1,97±0,04 ^a
Emülsiyon aktivite indeksi (m^2/g)	21,45±0,14 ^b	28,14±0,08 ^a
Emülsiyon stabilite indeksi (dk.)	20,89±0,00 ^b	30,88±0,93 ^a
Köpük kapasitesi (%)	102,50±4,33 ^b	163,50±4,09 ^a
Köpük stabilitesi (%)	79,36±2,40 ^b	91,81±2,64 ^a
Jel oluşturma kapasitesi (%)	22,00±0,00 ^a	18,00±0,00 ^b

* Farklı harflere sahip örnekler satır boyunca önemli ölçüde farklıdır ($p<0,05$). Değerler ortalama ± standart sapma, n = 3 olarak ifade edilmiştir.

USH uygulaması sonrasında KTP'nin su bağlama kapasitesi değişmezken; yağ bağlama kapasitesi artmıştır. Benzer veriler USH uygulanan ayçiçeği küşpe proteinlerinde elde edilirken; bu değişimin proteinlerin moleküler yapısındaki denatürasyon ve yüzey hidrofobisitesindeki artıştan kaynaklandığı bildirilmiştir (Malik ve ark., 2017). USH uygulaması sonrasında artan hidrofobisite proteinlerin yağ molekülü ile etkileşimini artırmaktadır (Resendiz-Vazquez ve ark., 2017). Yağ bağlama kapasitesinin yüksek olması gıda teknolojisinde ürün bileşimine giren yağ

miktarının azaltılmasına, raf ömrünün artırılmasına ve aroma bileşenlerinin korunmasına yardımcı olabilmektedir.

3.3.8.2. Emülsiyon özellikleri

Emülsiyon aktivite (EA) ve stabilite (ES) indeksleri proteinlerin emülsiyon özelliklerini gösteren 2 temel parametredir. Proteinler, sulu bir ortamda dağılmış yağ damlacıklarının etrafında film oluşturarak emülgatör görevi görür ve böylece yağ damlacıklarının birleşme, kremalaşma, topaklanma veya çökelme gibi yapısal değişikliklerini önlerler. EA, proteinin birim başına emülsiyon haline getirilebileceği yağ miktarını ölçerken; ES, emülsiyonun belirli bir süre boyunca yapısındaki değişikliklere direnme yeteneğini ölçer. Proteinlerde çözünürlük-agregasyon arasındaki dengenin korunması amacıyla USH parametrelerinin optimizasyonu emülsiyon özelliklerinin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır.

KTP-USH ve KTP'nin emülsiyon aktivite ve stabilite indeksleri Tablo 3.8'de verilmiştir. KTP'nin USH uygulaması sonrasında emülsiyon aktivitesi 21,45 m²/g'dan 28,14 m²/g'ya ve emülsiyon stabilitesi ise 20,89 dk.'dan 30,88 dk.'ya artmıştır. Benzer şekilde USH etkisiyle proteinlerin emülsiyon aktivitesi ve stabilitesindeki artış soya protein izolat ve konsantratında (20 kHz; 15, 30 dk.; 600 W, Jambrak ve ark., 2009); ayçiçeği küspe proteininde (20 kHz; 5, 10, 20, 30 dk.; 500 W; %25 frekansta, Malik ve ark., 2017); jak meyvesi çekirdek proteininde (20 kHz; 200, 400, 600 W; 15 dk., Resendiz-Vazquez ve ark., 2017); darı proteininde (20 kHz; 5, 12,5; 20 dk.; 18,4; 29,58; 73,95 W/cm², Nazari ve ark., 2018) ve ceviz proteininde de (200, 400, 600 W; 15, 30 dk., Zhu ve ark., 2018) rapor edilmiştir. Ultrasonik işlemten sonra protein parçacık boyutunun azalması ve çözünürlüğünün artması, emülsiyonların yağ-su arayüzünde protein difüzyon hızını artırabilmektedir. Emülsiyon hacmi başına düşen protein konsantrasyonunun artması, yağ damlacıklarının adsorpsiyon kabiliyetini geliştirebilmektedir (Zhao ve ark., 2022). Yüzey hidrofobisitesi verileriyle korelasyon halindeki FT-IR verilerinden de anlaşılabileceği üzere USH uygulaması ile protein-protein arası etkileşimler azalarak iç kısımlardaki gömülü hidrofobik gruplar yüzeye yakın konumlarda açığa çıkmıştır. KTP'nin özellikle 2S fraksiyonu yüksek emülsiyon aktivitesi gösterirken daha yüksek molekül ağırlığına sahip 11S fraksiyonu proteinin emülsiyon özelliklerini kısıtlamaktadır (Ajibola, 2020). Malik ve ark. (2017) yaptıkları

çalışmalarında (20 kHz; 5, 10, 20, 30 dk.; 500 W; %25 frekansta), düşük güçte USH uygulamasının proteinlerin emülsiyon aktivitesini arttırdığını ancak; yüksek güçte uzun süre USH uygulanmasının proteinlerin emülsiyon aktivitesini ve stabilitesini düşürdüğünü rapor etmişlerdir.

3.3.8.3. Köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi

Proteinlerin köpürme özelliği, hava-sıvı arayüzeyinde yapışkan viskoelastik film oluşturmasıyla ilgilidir (Wang & Damodaran, 1991). KTP'nin köpürme performansı, USH uygulamasından sonra önemli ölçüde artmıştır (Tablo 3.8). KTP-USH'nin köpük kapasitesi ve köpük stabilitesi değerleri KTP'den sırasıyla %69 ve %16 daha yüksektir. Bu sonuçlar, USH etkisiyle protein yapısındaki kısmi denatürasyona ve hidrofobik grupların proteinin iç kısımlarından yüzeye doğru açığa çıkmasına atfedilebilir. KTP-USH'nin artan hidrofobikliği kovalent olmayan hidrofobik etkileşim yoluyla hava-su arayüzey filmini destekleyerek proteinlerin köpürme kapasitesini arttırmaktadır. Küçülen partikül boyutu ve artan çözünürlük, daha küçük hava kabarcıkları üreterek proteinlerin köpürme stabilitesini arttırabilmektedir (Malik ve ark., 2017). Küçük hava kabarcıkları deformasyona karşı daha dirençli bir arayüz oluşturur ve böylece hava-su arayüzünde hızlıca hava moleküllerini çevreleyebilir (Martínez-Velasco ve ark., 2018). Bir başka açıklama ise USH etkisiyle ortaya çıkan kavite kuvveti, bölgesel sıcaklık artışı ve akustik akış, KTP-USH yapısında moleküller arası bağların kırılmasına yol açarak moleküler yapının hareketliliğinin ve esnekliğinin artması şeklinde yapılabilmektedir. Daha esnek protein yapılarının proteinlerin köpük özelliklerini olumlu yönde modifiye ettiği bilinmektedir. Protein izolatlarının köpürme performansının ultrases homojenizasyon ile arttırılmasına yönelik benzer çalışmalar, ayçiçeği proteini izolatu (Malik ve ark., 2017), soya proteini izolatu (Jambrak ve ark., 2009), bakla proteini izolatu (Martínez-Velasco ve ark.), darı proteini izolatu (Nazari ve ark., 2018), jak meyvesi tohum proteini izolatu (Resendiz-Vazquez ve ark., 2017) için de rapor edilmiştir.

3.3.8.4. Jel oluşturma kapasitesi

Proteinlerin jelleşmesi, puding, jöle, tatlılar ve et gibi gıda ürünü formülasyonlarında önemli fonksiyonel bir özelliktir. En düşük jelleşme konsantrasyonu, kovalent ve kovalent olmayan bağlardan oluşan 3 boyutlu ağ yapısındaki kendi kendini

destekleyen bir jel oluşturmak için en düşük konsantrasyon olarak tanımlanmaktadır. Protein boyutu, yapısı, esnekliği, moleküller arası etkileşimler, hidrofobiklik ve diğer amino asitlerin yapısal dağılımı gibi çeşitli faktörler jel oluşumunu etkilemektedir (Wang & Damodaran, 1991). Tablo 3.8’de gösterildiği gibi, USH uygulaması KTP’nin jelleşme kapasitesini %22’den %18’e düşürerek, daha düşük konsantrasyonda jel eldesine imkân vermiştir. Resendiz-Vazquez ve ark. (2017), USH uygulamasının (20 kHz; 200, 400, 600 W; 15 dakika) jack meyve çekirdeği proteininin en düşük jel oluşturma konsantrasyonunun (pH 6) %10’dan %4’e düşürdüğünü bildirmiştir. Araştırmacılar bu değişimin USH uygulaması sonrasında proteinin çözünürlüğündeki artışa bağlamışlardır. Gelişmiş çözünürlük, protein jellerinin 3 boyutlu ağ yapısına katkıda bulunmaktadır. Kaviteasyon etkisiyle gömülü hidrofobik grupların ve sülfidril grupların açığa çıkması disülfid, hidrojen, hidrofobik ve Van der Waals bağları oluşturarak jelleşmeyi kolaylaştırmaktadır. Böylece daha sağlam ve düşük konsantrasyonlu jeller oluşturulabilmektedir (Arzeni ve ark., 2012). Çalışmamızda rapor ettiğimiz yüzey hidrofobikliği analiz verilerine göre de artan hidrofobik bağlar daha az protein konsantrasyonuna sahip jellerin oluşumunu sağlayabilmektedir. Kısmi denatürasyonun ve partikül boyut küçülmesinin bir sonucu olarak artan protein esnekliği 3-boyutlu jel oluşumunu destekleyerek daha düşük konsantrasyonda jel oluşumunu desteklemiştir.

3.3.9. Biyoaktif özellikler

3.3.9.1. Antioksidan aktivite

KTP ve KTP-USH’nin antioksidan aktiviteleri (DPPH, ABTS) Tablo 3.9’da verilmiştir.

Tablo 3.9. KTP ve KTP-USH’nin DPPH (%) ve ABTS (%) inhibisyon aktiviteleri.

	DPPH (%)	ABTS (%)
KTP	33,24 ± 0,38 ^b	40,28 ± 0,16 ^b
KTP-USH	45,76 ± 0,13 ^a	55,66 ± 0,48 ^a

* Farklı harflere sahip örnekler sütun boyunca önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

* Değerler ortalama ± standart sapma, n = 3 olarak ifade edilmiştir.

USH uygulaması KTP'nin DPPH (+%37,9) ve ABTS (+%38,2) inhibisyonunu önemli ölçüde artırmıştır. Tang ve ark. (2006) tarafından bildirildiği gibi USH ile muamele edilmiş proteinlerin antioksidan kapasitesi, serbest SH grubu içeriğindeki artış dolayısıyla gelişmiş olabilir. Aynı zamanda, proteinin antioksidan kapasitesindeki artış, antioksidan özellikteki hidrofobik amino asitlerin içeriğindeki artışla da yakından ilişkilidir (Zhu ve ark., 2018). Sonikasyondan sonra artan antioksidan kapasitenin bir başka olası açıklaması da partikül boyutunun küçülmesi sonucu aktif grupların yüzeydeki etkinliğidir. Falcão ve ark. (2019) USH uygulamasından sonra soya proteininin DPPH ve ABTS aktivitelerinde sırasıyla %68 ve %129 artış bildirmiştir. Araştırmacılar bu durumu, USH uygulaması etkisiyle protein yapısındaki bağlı fenoliklerin salınması ve böylece daha iyi antioksidan aktivitenin ortaya çıkmasıyla açıklamışlardır.



4. YÜKSEK BASINÇ HOMOJENİZASYONU, MANOTERMOSONİKASYON VE PH DEĞİŞTİRME UYGULAMALARI İLE KENEVİR TOHUM PROTEİNLERİNİN MODİFİKASYONU

4.1. Giriş

Dünya nüfusunun 2100 yılına kadar 10,4 milyara ulaşması beklenmektedir. Bu durum mevcut protein talebini karşılamada öngörülebilir zorluklar yaratacaktır (UN, 2022). Ayrıca COVID-19 salgını küresel gıda tedarik zincirindeki aksama nedeniyle alternatif protein kaynaklarına geçişi önemli ölçüde hızlandırmıştır. Son araştırmalar, bitki bazlı diyetlerin COVID-19'un şiddetini azaltma üzerindeki olumlu etkisini belgelemiştir (Kim ve ark., 2021). Bitkisel proteinler, ekonomik, etnik ve dini nedenlerin yanı sıra tüketicilerin sürdürülebilir ve sağlıklı beslenme konusundaki artan farkındalıkları nedeniyle ilgi görmektedir. Tüm bu faktörler, bitkisel ürünlerin popüleritesine katkıda bulunarak onları pazarda daha erişilebilir, çeşitli ve uygun fiyatlı hale getirmiştir. Küresel bazda bitkisel protein pazarının değeri 2022'de 12,2 milyar dolar iken önümüzdeki beş yıl içinde %7,3'lük bir YBBO'ya (Bileşik Yıllık Büyüme Oranı) ulaşacağı tahmin edilmektedir (Marketsandmarkets, 2022). Bu talep aynı zamanda, daha önce çevresel bir sorun olarak görülen veya hayvan yemi olarak kullanılan endüstriyel bitkisel atıkları alternatif, düşük maliyetli ve yeşil protein kaynağı olarak kullanma yarışını da ortaya çıkarmıştır.

Uyuşturucu (*Marijuana*) ve endüstriyel kenevir (*Cannabis sativa* L. *sativa*, δ -tetrahidrokanabinol $<0,3$) arasındaki farklılık konusunda artan bilinç kenevir tohumu üzerine olan ilgiyi artırmıştır. Kenevir tohumu, hipoalerjenik ve sindirilebilir protein yapısına (%88–91) sahip mükemmel bir besin kaynağıdır (Pihlanto ve ark., 2020). Kenevir tohumlarının yağ ekstraksiyonundan sonra kalan küspedeki protein içeriği %50'ye ulaşmaktadır ve böylece yağ üretiminden sonra ortaya değerli bir yan ürün çıkmaktadır. Kenevir proteini, FAO/WHO tarafından (2–5 yaş arası çocuklar için) önerilen tüm temel amino asitleri içermektedir. Yaygın olarak kullanılan soya proteininin alerjen, genetiği değiştirilmiş ve düşük sindirilebilirliğine (%71) dair

bulgular farklı bitkisel protein kaynakları üzerine yapılan araştırmaları teşvik etmektedir (Schlutenhofer & Yuan, 2017). Bu bağlamda, son zamanlarda kenevir proteini ekmek, kurabiye, granola, et ve bitki bazlı süt gibi farklı gıda formülasyonlarına dahil edilmiştir (Hayward ve McSweeney, 2020; Wang ve ark., 2018a; Zahari ve ark., 2020). Ancak, kenevir proteininin zayıf tekno-işlevselliği, gıda endüstrisinde yaygın kullanımını zorlaştırmaktadır. Proteinlerin istenen fonksiyonel özellikleri sergilemeleri için çözelti halinde olmaları gerektiğinden, özellikle zayıf çözünürlük, kenevir proteininin fonksiyonel özelliklerinin en temel sorunudur (Karabulut ve Yemiş, 2022). Son yıllarda ısı (Wang ve ark., 2019), ısı olmayan (Karabulut ve ark., 2022), enzimatik (Wang ve Xiong, 2019) ve kimyasal (Kahraman ve ark., 2022) modifikasyon yöntemleriyle kenevir proteininin öznrlğu de dahil olmak üzere birçok fonksiyonel özelliğini iyileştirmek için çalışmalar yapılmıştır. Bu tekniklerin bir kısmı istenmeyen yan ürünlerin oluşumu, tüketiciler ve evre kaygıları, yüksek enerji tüketimi ve yüksek işleme maliyetleri nedeniyle gıda endüstrisinde pratik ve kabul edilebilir değildir.

Kimyasal modifikasyon uygulamaları arasında pH değiştirme, protein yapılarını modifiye etmek için basit bir yöntemdir. nceki alışmalar, proteinlerin polipeptit yapılarının, yüksek asidik veya alkali pH işlemleriyle (pH 1,5–3,5 veya pH 10–12) değiştirilebileceğini ortaya koymuştur (Yıldız ve ark., 2017). Bunun nedeni, polipeptit zincirlerinin aşırı pH'larda açılması ve ardından pH 7,0'da yeniden katlanması ve düzenlenmesidir. pH değiştirme işlemi, bazı üçüncül yapı kayıplarını, yan zincir etkileşimlerini ve kısmi denatürasyon yoluyla sülfidril ve hidrofobik çekirdeklerin açığa çıkmasını teşvik etmektedir. Bu protein formlarına "erimiş globül" denilmektedir (Jiang ve ark., 2017). Kahraman ve ark. (2022), pH değiştirme işlemi uygulanmış kenevir proteini konsantresinin çözünürlüğünde, işlenmemiş olana kıyasla %19'luk bir artış olduğunu bildirmişlerdir. Çoğu durumda araştırmacılar, proteinlerin modifikasyonunu geliştirmek için pH değiştirme tekniğini ısı veya ısı olmayan teknolojiler ile kombine etmişlerdir (Kahraman ve ark., 2022; Wang ve ark., 2019).

Yeni bir uygulama olan Manotermosonikasyon (MTS), geleneksel ultrases homojenizasyon (USH) ve diğer uygulamalara karşı yeşil ve alternatif bir teknoloji olarak ortaya çıkmıştır. MTS; ultrases, düşük hidrostatik basınc (2–5 atm) ve ılımlı sıcaklığın (<60°C) kombine edildiği bir sistemi ifade etmektedir. şimdiye kadar, MTS

teknolojisi enzim-mikrobiyal inaktivasyon, katı-sıvı ekstraksiyonu, koaservasyon ve protein-pektin modifikasyonunda başarıyla uygulanmıştır (Guzel ve ark., 2020; Kahraman ve Feng, 2021; Lee ve ark., 2013; Wang ve ark., 2020; Yıldız ve ark., 2018; Yıldız ve ark., 2017). MTS sisteminin, geleneksel USH uygulamasına kıyasla kavitasyon etkisini 3–6 kat arttırdığı bildirilmiştir (Yıldız ve ark., 2017). Kesme kuvveti, makro/mikro akış, lokalize ısıtma, şok dalgaları ve su jetleri dahil olmak üzere kavitasyonla ilgili aktivitelerin konformasyonel değişiklikleri teşvik ederek ve aktif grupları iç kısımlardan yüzeye salarak proteinlerin çözünürlüğünü, emülsiyon ve köpürme özelliklerini iyileştirdiği rapor edilmiştir (Rahman ve Lamsal, 2021). Yıldız ve ark. (2017), MTS uygulanmış soya proteininin (50°C, 200 kPa, 60 s) çözünürlüğünün %9,1'den %71,4'e çıktığını bildirmiştir. Aynı zamanda, tek başına USH uygulamasına kıyasla MTS, aynı modifikasyon etkisi için gereken işlem süresini 15,9 dakikadan 1,4 dakikaya indirmiştir (Yıldız ve ark., 2017). MTS sisteminin kısa işleme süresi ve eşlik eden enerji/zaman tasarrufu, gıda endüstrisinde uygulanabilirliğini artırmaktadır.

Gelecek vaat eden bir başka ısıl olmayan teknik, yüksek basınç homojenizasyon (YBH), proteinlerin moleküler yapısını, işlevselliğini ve fizikokimyasal özelliklerini değiştirmek için gıda endüstrisi ve araştırmacıları tarafından kullanılmaktadır. YBH'nin çalışma prensibi, yüksek türbülans, kayma gerilimi, kavitasyon ve sıcaklık artışına neden olan dar bir valf aracılığıyla yüksek basınç altında bir süspansiyonun sürekli akışına odaklanmaktadır (Huang ve ark., 2022; Nasrabadi ve ark., 2021; Yıldız ve ark., 2017).

Bu bölümde amaçlanan çıktılar sırasıyla şu şekilde sıralanabilir: i) KTP'nin çözünürlük ve partikül boyutu kriterlerine karşı MTS işlem koşullarını optimize etmek, ii) Optimize MTS koşullarında elde edilen KTP ile YBH ve pH değiştirme uygulamalarının tekil ve kombine kullanımıyla elde edilen KTP'leri fizikokimyasal, fonksiyonel ve morfolojik özellikleri açısından karşılaştırmaktır.

4.2. Materyal ve Yöntem

Kenevir tohum protein konsantratu (KTPK, kuru bazda %75 protein), Applied Food Sciences'dan (Teksas, ABD) temin edilmiştir. Tüm kimyasallar Sigma (Steinheim,

Almanya), Biorad (California, ABD) ve Merck'ten (Darmstadt, Almanya) teknik ve daha yüksek kalite olarak satın alınmıştır. Tüm deneylerde distile su kullanılmıştır.

4.2.1. Kenevir tohum proteinlerinin hazırlanması

Seri izoelektrik nokta çökeltmesiyle KTPK'dan kenevir protein izolatu (KTP) elde edilmiştir. KTP'nin protein içeriği, Dumas yöntemine (Nx6,25) göre nitrojen analizörü (Elementar analyzer, Rapid N cube, Almanya) kullanılarak kuru bazda %91,2±0,2 olarak belirlenmiştir.

4.2.2. Manotermosonikasyon, yüksek basınçlı homojenizasyon ve pH değiştirme

MTS uygulaması, Şekil 4.1'de gösterildiği gibi, Dr. Hao Feng'in laboratuvarında geliştirilen sürekli akışlı laboratuvar ölçekli bir sistem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. MTS sistemi, çift ceketli bir sonoreaktör, bir peristaltik pompa ve bir basınç kaynağından oluşmaktadır. Protein süspansiyonu, peristaltik bir pompa (Masterflex, Vermon Hill, IL, ABD) ile sonoreaktöre pompalanmaktadır. Reaktördeki süspansiyonun sıcaklığı bir termokapıl kullanılarak takip edilmiş ve çift cidarlı sonoreaktörden su sirkülasyonu ile sıcaklık istenen değerlerde sabit tutulmuştur. Sistemdeki basınç azot gazı ile sağlanmış ve manometre ile kontrol edilmiştir. 20 kHz güçteki generatör (Sonics, Newtown, CT, VC-750, ABD), %100 genlikte 1,3 cm çapındaki değiştirilebilir bir titanyum prob vasıtasıyla sonoreaktördeki protein solüsyonuna akustik enerjiyi iletmek için kullanılmıştır. MTS işleminden sonra, örnekler çıkış şişesinde toplanmıştır ve hemen bir buz banyosu içerisinde soğutulmuştur.

Bu çalışmada, KTP'yi modifiye etmek için toplamda beş farklı yöntem uygulanmıştır:

- i) pH değiştirme (pH12): Distile suda hazırlanan KTP süspansiyonunun pH'sı (%3, a/h), protein sarmalını açmak için 2 N NaOH kullanılarak pH 12'ye ayarlanmıştır. Oda sıcaklığında pH 12 sabit değerinde 1 saat bekletildikten sonra, 2 N HCl kullanılarak pH değeri nötralize edilmiştir.
- ii) MTS uygulaması (MTS): Distile su (%3 a/h) içindeki KTP süspansiyonu, oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. Süspansiyon, sürekli modda MTS reaktör haznesine pompalanmıştır. MTS uygulamasında, işlem sıcaklığının (40, 45 ve 50 °C), sürenin (30, 60 ve 90 s) ve basıncın (100, 200, ve 300 kPa) KTP'nin

çözünürlüğü ve partikül boyutu üzerine etkisi deney tasarımının farklı 13 kombinasyonunda uygulanmıştır.

- iii) pH değiştirme ile MTS uygulamasının kombinasyonu (pH12MTS): KTP süspansiyonunun (%3, a/h) pH değeri 2 N NaOH ile pH 12'ye ayarlanarak süpansiyon 1 saat süreyle sabit pH'da tutulmuştur. Belirlenen optimal MTS uygulama koşullarında (50°C, 200 kPa ve 90 s) işlem gören KTP süspansiyonunun pH'sı sonrasında 2 N HCl kullanılarak nötrale edilmiştir.
- iv) YBH işlemi (YBH): YBH işlemi, 3 döngüde 130 MPa'da yüksek basınç homojenizasyonu (Microfluidics, M110P, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Oda sıcaklığındaki KTP süspansiyonu (%3, a/h) YBH valflerinden geçirilmiştir. KTP süspansiyonu, döngüler arasında bir buz banyosunda oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Süspansiyonun sıcaklığı her döngüde 45 °C'yi geçmemiştir.
- v) pH değiştirme ile YBH uygulamasının kombinasyonu (pH12YBH): KTP süspansiyonunun (%3) pH'sı pH 12'ye ayarlanmıştır. Protein süspansiyonu 1 saat sabit pH 12'de bekletildikten sonra 130 MPa'da 3 döngü halinde YBH'den geçirilmiştir. Daha sonra işlem gören KTP süspansiyonu, 2 N HCl kullanılarak nötrale edilmiştir.

Uygulama yapılmayan KTP kontrol proteini olarak kullanılmıştır. Tüm numuneler dondurularak kurutulmuş ve analiz edilinceye kadar +4 °C'de hava geçirmez kaplarda saklanmıştır.

4.2.3. Fizikokimyasal özelliklerde birincil yapı değişimi

4.2.3.1. Molekül ağırlık dağılımı (SDS-PAGE)

SDS-PAGE analizi, %4–20 akrilamid jel konsantrasyonundaki hazır jel kasetleri (Biorad, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE numune tamponundaki protein solüsyonu (2,5 mg/mL) 2 dakika 100°C'de tutulmuştur. Protein süspansiyonu (10 µL) ve ticari moleküler ağırlık standardı (5 µL, Bio-Rad, ABD, 10-250 kDa) jel yuvalarına enjekte edilmiştir. Elektroforez, Mini-Protean sistemi (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, ABD) ile sabit 200 V'ta gerçekleştirilmiştir. Jeller, %0,1 Coomassie Brilliant Blue R250 boyası (%50 metanol, %10 asetik asit) ile boyanmış

ve daha sonra %10 asetik asit ve %20 metanol solüsyonları ile gece boyunca jellerin boyası giderilmiştir (Jiang ve ark., 2017).

4.2.4. Fizikokimyasal özelliklerde ikincil yapı değişimi

4.2.4.1. İkincil yapı dağılımı

KTP'nin ikincil yapı değişikliklerini belirlemek için Dairesel Dikroizm (CD) spektroskopisi (Jasco, J-715, MD, ABD) kullanılmıştır. Örneklerin spektrumu, proteinin ikincil yapısını tahmin etmek için Beta Yapı Seçimi (BeStSel) (<https://bestsel.elte.hu/index.php>) uygulaması kullanılarak analiz edilmiştir.

4.2.4.2. Fourier dönüşümü kızılötesi spektrumları (FT-IR)

ATR özellikteki FT-IR spektrometresi (Perkin Elmer Spectrum Two, ABD) kullanılarak KTP'nin 400–4000 cm^{-1} spektral aralığında spektrumu alınmıştır. Her spektrum için 4 cm^{-1} çözünürlükte 16 taramada sonuç elde edilmiştir. Elde edilen spektrum grafiğinde Amid 1, Amid 2 ve Amid 3 bölgelerindeki dalga numaraları yapısal değişikliğin analizi için değerlendirilmiştir (Teh ve ark., 2014).

4.2.5. Fizikokimyasal özelliklerde üçüncül yapı değişimi

4.2.5.1. Partikül boyutu ve zeta potansiyeli

KTP süspansiyonunun partikül boyutu (ortalama partikül boyutu) ve partikül boyutu dağılımı lazer partikül boyutu analiz cihazı (Malvern, Zeta sizer NanoZS, İngiltere) kullanılarak ölçülmüştür. KTP örnekleri (5 mg/mL) sodyum fosfat tamponu (10 mM, pH 7,0) içinde hazırlanmıştır. Farklı pH'larda (pH 3–9) zeta potansiyeli için ölçülmüştür. Numunelerin soğurma ve kırılma indeksi sırasıyla 0,001 ve 1,33'e ayarlanmıştır.

4.2.5.2. İçsel floresan emisyonu

KTP'nin içsel floresan emisyonu, bir spektrofloreometre (SLM Instrument, SLM Aminco MC 400, ABD) ile ölçülmüştür. 4 yüzlü kuvars küvetteki KTP süspansiyonunun (1 mg/mL sodyum fosfat tamponu, 10 mM, pH 7,0) floresans emisyonu, 280 nm uyarma dalga boyu ve 300–450 nm emisyon spektrumu ile oda sıcaklığında ölçülmüştür.

4.2.5.3. Serbest SH grubu içeriği

KTP'nin serbest SH grubu içeriği, Ellman'ın (1959) modifiye yöntemine göre belirlenmiştir. 3 mL KTP (tampon çözeltisinde %0,25 a/h, pH 8,0; 0,086 M Tris, 0,09 M glisin, 4 mM EDTA), 0,03 mL Ellman reaktif çözeltisi (4 mg DNTB/mL metanol) ile karıştırılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda (15 dak) örneklerin absorbansı bir spektrofotometre (Thermo, Spectronic Genesys 5, ABD) ile 412 nm'de okunmuştur. Solüsyondaki protein içeriği Bradford (1976) yöntemi ile analiz edilmiştir. Serbest SH grubunu belirlemek için aşağıdaki denklem 4.1 kullanılmıştır.

$$\text{Serbest SH grubu içeriği } (\mu\text{mol/g}) = A_{412} / (C \times 13600) \quad (4.1)$$

A_{412} , 412 nm'deki absorbans, $13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (412 nm'de 2-nitro-5-tiyobenzoat (NTB)) molar emilim katsayısı ve C, protein konsantrasyonudur.

4.2.5.4. Sindirilebilirlik

KTP'nin sindirilebilirliği, Li ve ark. (2011) tarafından kullanılan yöntemde ufak modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir. İn vitro sindirim araştırması için Pepsin (Sigma, P7000, 1:10000, 600–1000 birim/mg) ve tripsin (Genview, DH355-1, 1:250) enzimleri kullanılmıştır. Kısaca, 5 mL %1 (a/h) KTP solüsyonunun pH'sı 1 M HCl ile pH 1,5'e ayarlanmış ve 37 °C'de bir su banyosunda 3–5 dakika ön inkübe edilmiştir. Daha sonra, 1:100 (u/a) pepsin (20 mg pepsin/mL 0,1 M KH_2PO_4 , pH 2, tampon) ilave edilmiştir. Pepsin ve protein solüsyonu karışımları iyice karıştırılarak 37 °C'de 120 dk. inkübe edilmiş, enzimatik reaksiyonları durdurmak için 1,0 M NaOH ile 7,0'ye ayarlanmıştır. Pepsinle sindirilmiş hidrolizatlar (pH 7,0), 1:20 (u/a) enzim:substrat oranında (0,1 M Tris-HCl tamponunun 20 mg/mL tripsin ilave edilerek 37 °C'de 120 dk. inkübe edilmiştir.

Sindirim işlemi sırasında % nitrojen salınımı için 10 mL sindirilmiş karışıma 10 mL %10 (a/h) trikloroasetik asit (TCA) ilave edilmiştir ve nihai TCA konsantrasyonu %5'e (a/h) ulaşmıştır. Karışımlar daha sonra çöktelleri elde etmek için santrifüjlenmiştir (8000 xg, 30 dakika). Çökteller 10 mL TCA (%10, a/h) ile yıkandıktan sonra tekrar aynı parametrelerde santrifüj edilerek çökteller elde edilmiştir. Sindirim sırasındaki nitrojen salınımı (%) Dumas yöntemiyle ($N \times 6,25$) belirlenmiştir. Sindirilebilirlik (%) değeri aşağıdaki denklem 4.2'ye göre belirlenmiştir.

$$\text{Sindirilebilirlik } (\%) = (N_d - N_i) / N_{\text{total}} \quad (4.2)$$

burada N_d (mg), sindirim sonrası Trikloroasetik Asitte (TCA) çözünmeyen azot içeriği, N_i (mg), KTP'nin sindirim öncesi TCA'da çözünmeyen azot içeriği ve N_{total} (mg), protein numunesinin toplam azot içeriğidir.

4.2.5.5. X-ışını difraktometresi (XRD)

KTP'nin kristal yapısı 40 kV ve 40 mA'da 1° hızda çalışan bir Cu Ka tüpü ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), Eiger 2R_500K (0D modu) ile bir X-ışını difraktometresi (Bruker D8 Advance, Almanya) kullanılarak ölçülmüştür. Kristallik (%) Diffrac.Eva yazılımı (versiyon V5.1, Bruker, Rheinstetten, Almanya) kullanılarak kristal alanın 4° ile 30° (2θ) arasındaki toplam alana oranı olarak hesaplanmıştır (Dong ve ark., 2011).

4.2.5.6. Termal davranış

KTP örneklerinin termal davranışı TA Universal 2500 (TA Instrument, New Castle, ABD) cihazı ile $40\text{--}180^\circ\text{C}$ arasında 5°C/dk sıcaklık artışıyla analiz edilmiştir. DSC analizi denatürasyon sıcaklığı (T_d $^\circ\text{C}$) ve termal denatürasyon entalpisini (ΔH J/g protein) belirlemek için cihaz yazılımı kullanılmıştır (Teh ve ark., 2014).

4.2.6. Morfolojik özellikler

4.2.6.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

KTP örneklerinin mikro yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) (S-4700 SEM, Hitachi, Ltd., Tokyo, Japonya) kullanılarak incelenmiştir. Analizden önce, numune iletken karbon yapışkanlı çift taraflı bant üzerine yerleştirilmiştir ve ardından toz partiküllerinin yüklenmesini önlemek için 60 s boyunca altın-platin tabakası ile püskürtmeli kaplama yapılmıştır. Görüntüler farklı büyütme güçlerinde ($\times 500\text{--}2000$) 10 kV voltajda alınmıştır.

4.2.7. Tekno-fonksiyonel özellikler

4.2.7.1. Çözünürlük

Protein çözünürlüğü, Bradford'un (1976) yöntemi modifiye edilerek belirlenmiştir. 3 mL Bradford kullanıma hazır boya reaktifine (Biorad, ABD) $150 \mu\text{L}$ protein solüsyonu (3 mg/mL) eklenmiştir. 10 dakikalık reaksiyon süresinden sonra numunenin absorbansı spektrofotometre (Thermo, Spectronic Genesys 5, ABD) kullanılarak 595 nm 'de okunmuştur. Sığır serum albümini, standart protein çözeltisi olarak kullanılmıştır ($R^2 = 0,996$). Protein çözünürlüğü denklem 4.3'e göre hesaplanmıştır.

$$\text{Protein çözünürlüğü (\%)} = \frac{\text{Çözünür protein içeriği}}{\text{Başlangıç protein içeriği}} * 100 \quad (4.3)$$

4.2.7.2. Emülsiyon özellikleri

KTP'nin emülsiyon aktivitesi (EA) ve stabilitesi (ES) Pearce ve Kinsella (1978) tarafından geliştirilen metotta bazı modifikasyonlarla analiz edilmiştir. KTP süspansiyonun (10 mg/mL) 4 mL'si bir beher içinde 1 mL ayçiçek yağı ile ultraturrex (IKA, T20, Königswinter, Almanya) kullanılarak 20000 rpm'de 1 dakika homojenize edilmiştir. Homojenizasyondan sonra beherin tabanından 25 µL emülsiyon alınmış ve 10 mL sodyum dodesil sülfat solüsyonu (%0,1 a/h) ile seyreltilmiştir. Emülsiyonun 0. ve 10. dakikada absorbansları bir spektrofotometre (Thermo, Spectronic Genesys 5, Amerika) kullanılarak 500 nm'de okunmuştur. EA ve ES değerleri aşağıdaki denklem 4.4 ve 4.5'e göre olarak hesaplanmıştır.

$$EA (m^2/g) = (2 * 2,303 * A_0 * SF) / (C * \Phi * \theta * 10000) \quad (4.4)$$

$$ES (dak) = (A_0 * \Delta t) / (A_0 - A_{10}) \quad (4.5)$$

Burada SF seyreltme faktörü, C protein konsantrasyonu (g/mL), Φ optik yol (1 cm), θ emülsiyondaki yağ fraksiyonu ve A_0 ve A_{10} emülsiyonların sırasıyla 0 dk. ve 10 dk. sonraki absorbanslarıdır.

Emülsiyonların kremalaşma indeksleri, McClements (2007) tarafından kullanılan yöntemle göre analiz edilmiştir. Yukarıdaki bahsedildiği şekilde hazırlanan emülsiyonlar bir dereceli silindirlere aktarılmış ve 60 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında krema tabakası ve toplam emülsiyon altındaki serum tabakasının yüksekliği ölçülmüş ve 4.6'ya göre kremalaşma indeksi (%) hesaplanmıştır.

$$\text{Kremalaşma indeksi (\%)} = \frac{\text{Serum tabakasının yüksekliği}}{\text{Toplam emülsiyonun yüksekliği}} * 100 \quad (4.6)$$

Emülsiyonların morfolojisi x40 büyütmede (Swift, National, ABD) optik mikroskop kullanılarak görüntülenmiştir. 50 µL'lik emülsiyon mikroskop lamı üzerine yerleştirilmiştir ve üstüne lamel ile kapatılmıştır. Mikrograflar 0. ve 60. dk. emülsiyonların incelenmesiyle elde edilmiştir.

4.2.8. İstatistiksel analiz

Tüm uygulamalar ve analizler üç paralel halinde gerçekleştirilmiştir ve elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. İstatistiksel analizler SPSS 20,0 paket programı (SPSS Inc., Chicago, Amerika) kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar tek yönlü ANOVA ile %95 güven aralığında test edilmiştir.

4.3. Sonuç ve Tartışma

4.3.1. Manotermosonikasyon işlem parametreleri

Yanıt yüzey yönteminden elde edilen deneme tasarımının farklı MTS işleme süresi (30–90 s), sıcaklık (40–50°C) ve basınç (100–300 kPa) parametrelerindeki 13 farklı kombinasyonunda KTP'nin çözünürlük ve partikül boyutu değerleri Tablo 4.1'de gösterilmektedir.

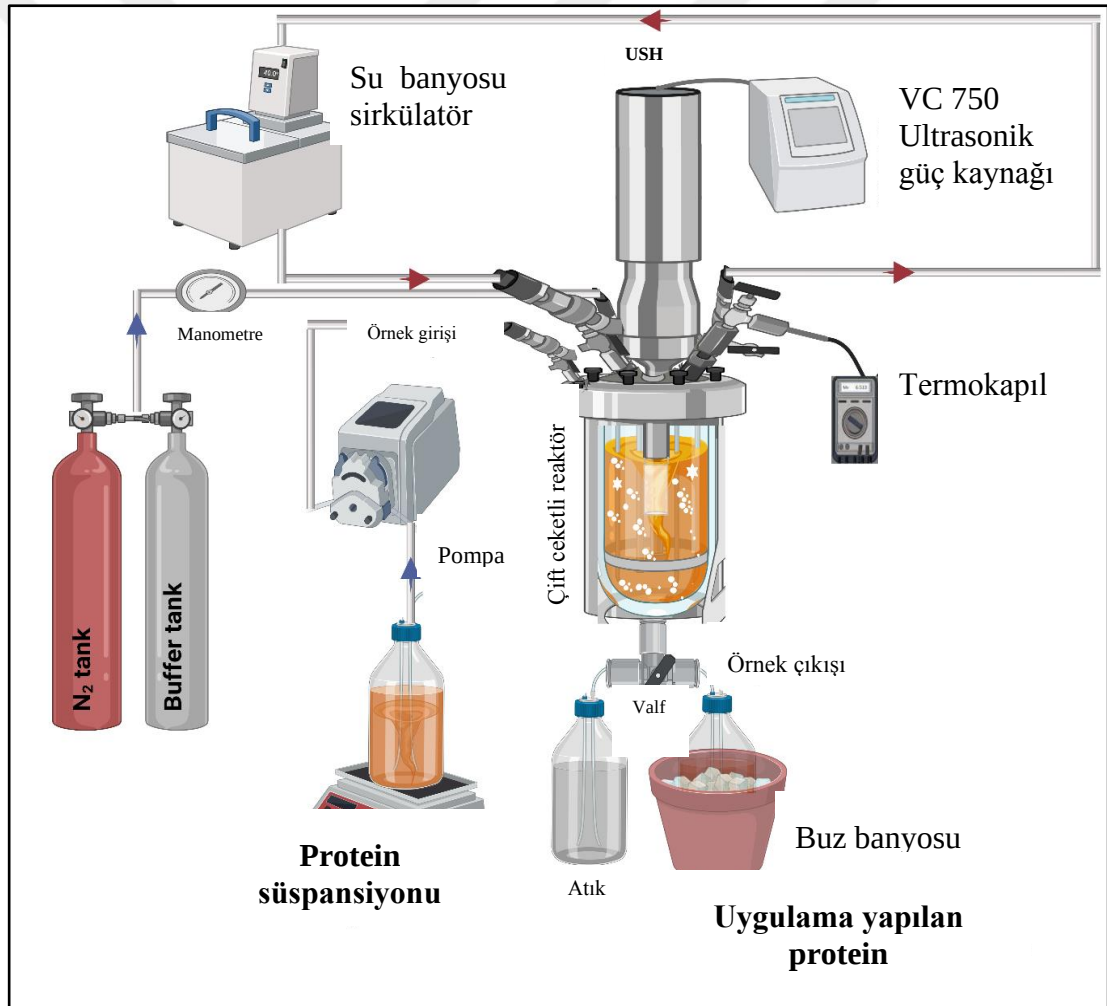
Tablo 4.1. Farklı proses koşullarında (sıcaklık, süre, basınç) MTS uygulanan KTP'lerin çözünürlük ve partikül boyutu değerleri.

Proses koşulları	Çözünürlük (%)	Partikül boyutu (nm)
KTP (Kontrol)	24,88 $\pm$ 0,73	365,87 $\pm$ 0,68
<u>40 °C</u>		
30 s, 200 kPa	31,40 $\pm$ 0,17	203,83 $\pm$ 1,55
60 s, 100 kPa	30,80 $\pm$ 0,18	216,87 $\pm$ 1,43
60 s, 300 kPa	23,33 $\pm$ 0,21	257,47 $\pm$ 0,72
90 s, 200 kPa	25,40 $\pm$ 0,26	248,00 $\pm$ 2,26
<u>45 °C</u>		
30 s, 100 kPa	30,88 $\pm$ 0,03	213,17 $\pm$ 2,18
30 s, 300 kPa	29,57 $\pm$ 0,31	221,50 $\pm$ 2,57
60 s, 200 kPa	35,53 $\pm$ 0,35	193,47 $\pm$ 1,90
90 s, 100 kPa	32,13 $\pm$ 0,42	200,67 $\pm$ 2,00
90 s, 400 kPa	32,36 $\pm$ 0,59	200,53 $\pm$ 2,05
<u>50 °C</u>		
30 s, 300 kPa	33,68 $\pm$ 0,21	199,23 $\pm$ 0,60
60 s, 100 kPa	33,81 $\pm$ 0,06	200,83 $\pm$ 2,25
60 s, 300 kPa	39,13 $\pm$ 0,31	191,23 $\pm$ 0,64
90 s, 200 kPa*	41,63 $\pm$ 0,15*	182,83 $\pm$ 1,97*

*Optimum MTS proses koşulları 50 °C 90 s, 200 kPa olarak belirlenmiştir.

Yanıt yüzey yönteminden önemli bir model elde edilememiştir. KTP için en yüksek çözünürlük ve en düşük partikül boyutunu veren MTS işleme koşulu 50°C, 200 kPa ve 90 s olarak belirlenmiştir. Bu koşul altında, en yüksek çözünürlük (%41,63) ve en

düşük partikül boyutu (182,83 nm) değerlerine ulaşılmıştır. Böylece KTP'ye kıyasla elde edilen MTS izolatinin çözünürlüğü 1,7 kat artarken, partikül boyutu 2,0 kat azalmıştır. Sono-reaktörde artan basınç ve sıcaklık, USH probu vasıtasıyla örneğe iletilen şok dalgaları ve kesme kuvveti etkisini artırarak kavitasyonlu kabarcık patlamalarını destekleyebilmektedir (Yıldız ve ark., 2017). Bununla birlikte, uzun süreli basınç uygulamasının, aşırı kavitasyona bağlı olarak çözünmeyen makro-agregatları oluşturması sonucu çözünürlüğün azaldığı bilinmektedir (Condés ve ark., 2015). Bu nedenle, protein yapısında arzu edilen modifikasyon çıktılarını elde etmek için MTS işlem koşullarının optimize edilmesi esastır. Şekil 4.1'de MTS sisteminin tasarımına yer verilmiştir.

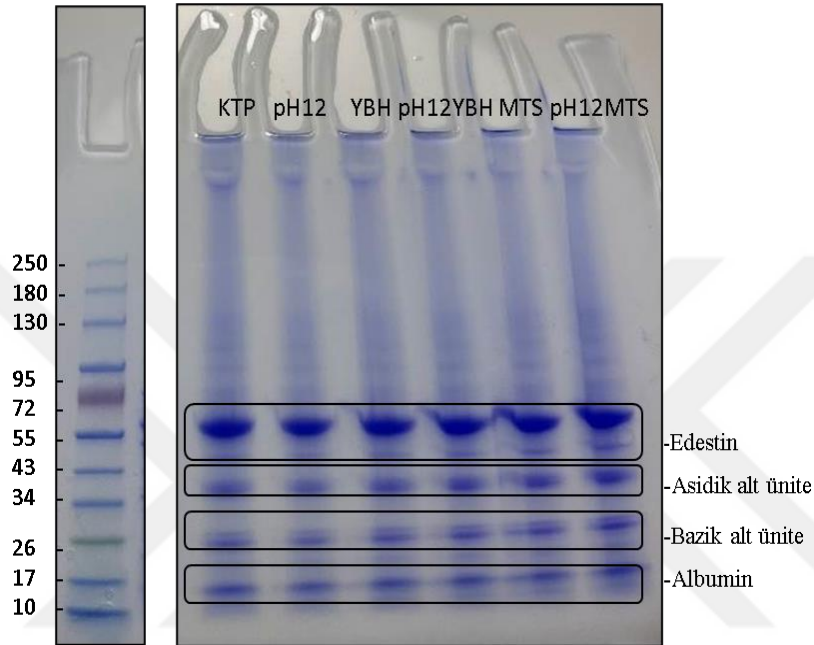


Şekil 4.1. Manotermosonikasyon sisteminin görsel tasarımı.

4.3.2. Fizikokimyasal özelliklerde birincil yapı değişimi

4.3.2.1. Molekül ağırlık dağılımı (SDS-PAGE)

Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin birincil yapısında meydana gelebilecek muhtemel değişimler, SDS-PAGE elektroforezi kullanılarak karakterize edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin SDS-PAGE protein bantları.

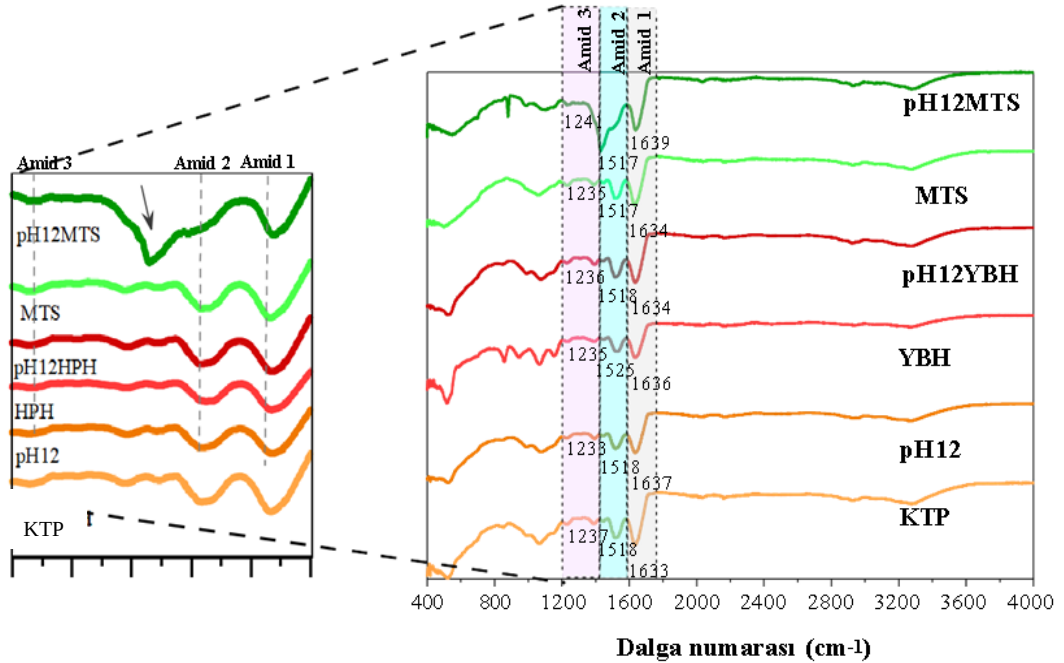
SDS-PAGE jellerinde dört ana protein fraksiyonu gözlenmiş ve önceki çalışmalara göre bu protein fraksiyonları tanımlanmıştır (Shen ve ark., 2020; Hadnaev ve ark., 2018). Alt birimler dahil edestin, KTP'deki toplam proteinin %82'sini oluşturan ana protein fraksiyonudur. Geri kalan protein fraksiyonları ise KTP'nin yaklaşık %18'ini oluşturur. Şekil 4.2'de görülen ~55 kDa'daki baskın bant, edestin proteinlerine karşılık gelmektedir. Diğer fraksiyonlar asidik alt birim (~37 kDa), bazık alt birim (~26 kDa) ve albumindir (~15 kDa) (Tang ve ark., 2006). Modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'nin protein profili incelendiğinde bant yoğunluklarında ve sayılarında gözle görülür bir değişiklik meydana gelmemiştir. Bu durum peptit bağlarının uygulamalarda etkilenmediğini yani KTP'nin birincil yapısında modifikasyon meydana gelmediğini göstermektedir. Önceki çalışmalarda, USH veya YBH ile işlenen bezelye, bakla ve kinoa proteinlerinin SDS-PAGE profillerinin uygulama öncesine kıyasla değişmediğini ortaya koyulmuştur (Alavi ve ark., 2021; Gao ve ark.,

2022; Luo ve ark., 2022; Melchior ve ark., 2022). Aksine, Jiang ve ark. (2017), USH ile pH değişimi kombine uygulamasından sonra bezelye proteininin SDS-PAGE profilinde protein agregasyonunun meydana geldiğini bildirmişlerdir. Farklı protein türlerinin (bezelye ve kenevir) çeşitsel varyasyonları ve çalışmada yer alan kavitsiyonel kuvvetlerin yoğunluğu elde edilen verilerin farklılığına neden olabilmektedir.

4.3.3. Fizikokimyasal özelliklerde ikincil yapı değişimi

4.3.3.1. Fourier dönüşümü kızılötesi spektrumları (FT-IR)

FT-IR, Amid bölgelerinde (Amid 1, Amid 2, Amid 3) dalga numarası kaymaları ile proteinin ikincil yapısındaki değişimi belirlemek için kullanılan güçlü bir tekniktir. Şekil 4.3 uygulamalar sonrasında KTP örneklerinin farklı IR spektrum parmak izlerini göstermektedir.



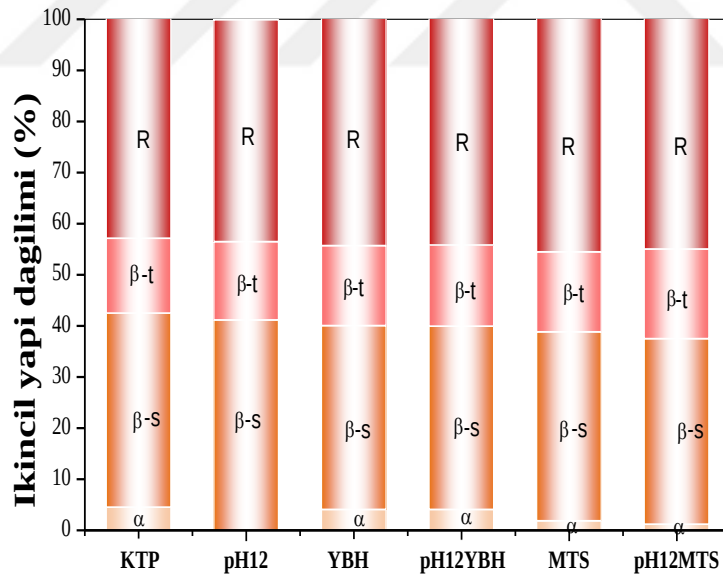
Şekil 4.3. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin FT-IR spektrumları.

Amid 1 esneme titreşimi KTP'de 1633 cm^{-1} iken uygulamalar sonrasında $1634\text{--}1639\text{ cm}^{-1}$ 'e doğru batokromik kayma göstermiştir ve bu durum ikincil yapıların C=O ve C–N esneme titreşimindeki değişikliği ortaya çıkarmıştır. Amid 2 esneme titreşiminde ise uygulamalardan sonra 1518 cm^{-1} 'den $1517\text{--}1525\text{ cm}^{-1}$ 'e kayma gözlenmiştir.

İzolatların Amid 3 bölgesi 1233–1241 cm^{-1} arasında değişen çok zayıf pikler göstermiştir. Amid 2 ve 3 bölgelerindeki bağların esneme titreşimlerindeki değişimler, N-H ve C-N bağlarının uygulamalar sonucundaki değişimlerini ortaya çıkarmıştır. Güçlü kavitsiyonel etkilerden kaynaklı konformasyonel değişiklikler pH12MTS örneğinde 1430 cm^{-1} ve 870 cm^{-1} 'de C-H titreşimlerini kapsayan yeni titreşim pikleri göstermiştir. Benzer bir bulgu, pH değiştirme ve USH uygulanan amarant proteinindeki kovalent olmayan bağların kırılmasıyla ortaya çıkan ikincil konformasyonel değişiklikler için de rapor edilmiştir (Figuerola-González ve ark., 2022).

4.3.3.2. İkincil yapı dağılımı (CD)

Dairesel dikroizm spektrumlarından elde edilen veriler, proteinlerin ikincil yapısı (α -heliks, β -sheet, β -turn ve rastgele sarım), protein sarmalının katlanma- açılma durumu ve sindirilebilirliği hakkında dolaylı veya direkt bilgiler vermektedir (Greenfield, 2006). Şekil 4.4'te KTP'nin ikincil yapı formlarındaki (α -heliks, β -sheet, β -turn ve rastgele sarım) oransal değişim gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin ikincil yapı dağılımları.

KTP örneğinin ikinci yapısal dağılımı, %4,5 α -heliks (α), %37,9 β -sheet (β -s), %14,7 β -turn (β -t) ve %42,9 rastgele sarım (R) olarak ortaya çıkmıştır. Genel bir eğilim olarak, uygulama yapılan tüm örneklerin ikincil yapı kompozisyonunda α -heliks ve β -

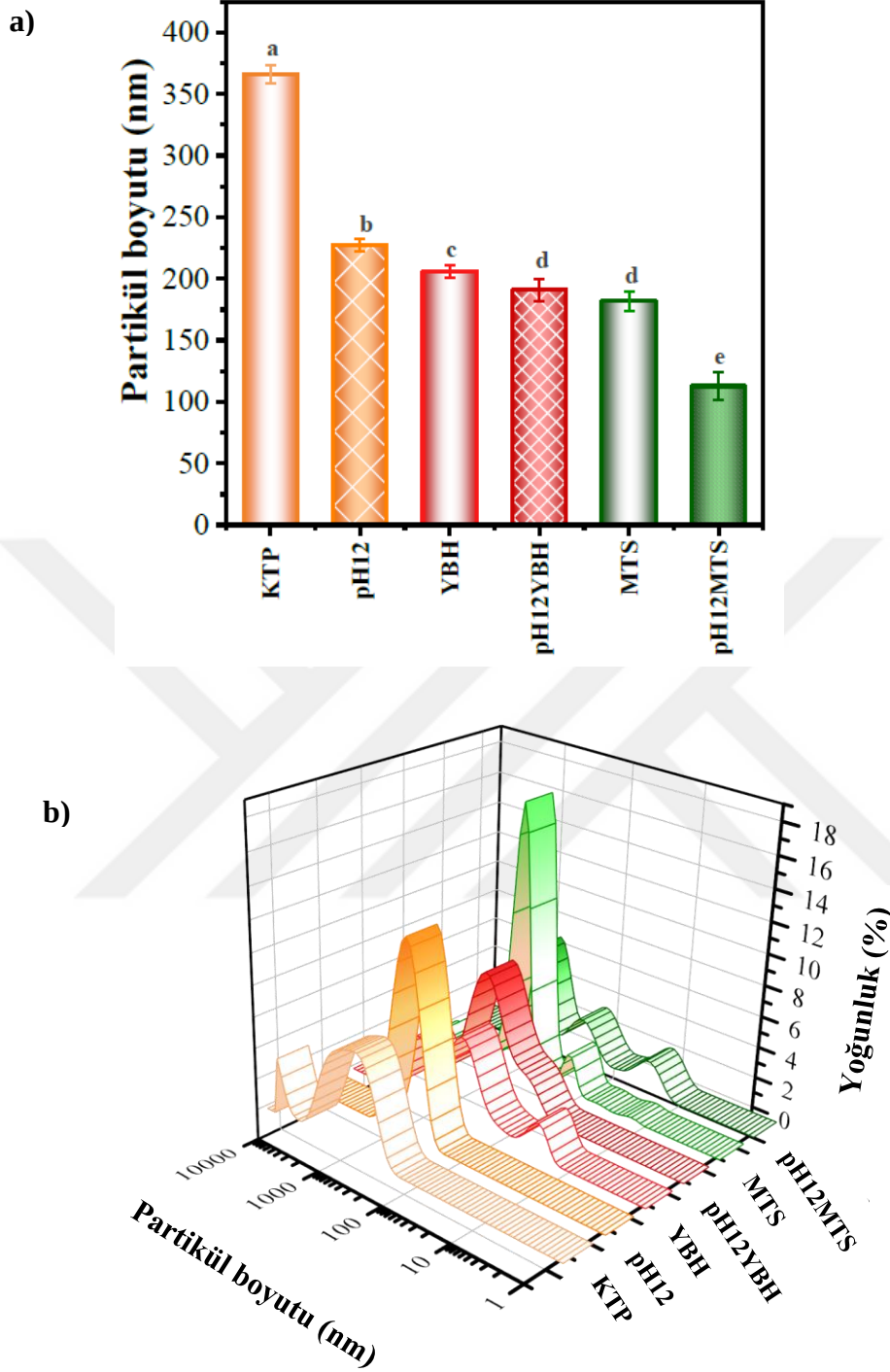
sheet oranı azalırken, β -turn ve rastgele sarım oranı artmıştır. İkincil yapı formlarındaki değişim α -heliks ve β -sheet formlardan β -turn ve rastgele sarım formlarına olası dönüşleri göstermektedir. Benzer şekilde, Yuanqing ve ark. (2020), sonikasyon uygulamasından sonra farklı proteinlerin (pirinç, yulaf, mısır ve soya) rastgele sarım formlarında artış olduğunu bildirmiştir. İkincil yapı dağılımındaki değişimler kompakt α -heliks formlarının daha esnek ve düzensiz rastgele sarım formlarına dönüşmesiyle ilişkilendirilmiştir.

4.3.4. Fizikokimyasal özelliklerde üçüncül yapı değişimi

4.3.4.1. Partikül boyutu ve zeta potansiyeli

Protein agregatlarının partikül boyutu, onların emülsifikasyon, köpürme, jelleşme vb. tekno-işlevsel özelliklerini doğrudan etkilemektedir. KTP'nin partikül boyutu 365,87 nm iken farklı uygulamalar sonrasında izolatların partikül boyutları 227,57-112,67 nm arasında daha düşük partikül boyut değerleri göstermiştir. pH12MTS izolatlarının partikül boyutu uygulama yapılmayan KTP ile karşılaştırıldığında 3,2 kat azalmış ve en küçük partikül boyut (112,67 nm) değerlerini göstermiştir. Bu örnekleri MTS (2,0 kat) ve pH12YBH (1,9 kat) izolatları takip ederek partikül boyut değerleri KTP örneklerinden daha düşük değerler göstermiştir (Şekil 4.5a).

pH12MTS örneği, 10–100 nm'de daha küçük partikül boyutlarına sahip multimodal dağılım pikleri sergilerken, diğer tüm örnekler mono ve bimodal dağılımlar sergilemiştir (Şekil 4.5b).

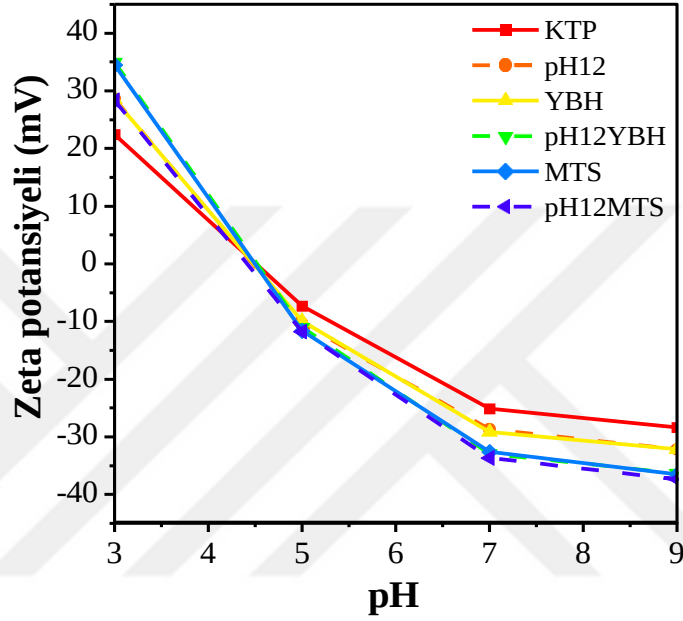


Şekil 4.5. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin a) partikül boyutları ve b) partikül boyut dağılımlarındaki değişimler.

Kavitasyonel kuvvetler ve pH değiştirme uygulamaları ile kovalent olmayan ve elektrostatik etkileşimlerin bozulması protein-protein agregasyonunu önleyerek modifiye KTP'nin daha küçük partikül boyutlarına ulaşmasına katkıda

bulunabilmektedir (Wang ve ark., 2022; Zheng ve ark., 2019). pH değiştirme işlemleriyle erimiş globul yapının oluşması sonucu protein polipeptit zincirlerini USH'nin kavitasyon etkisine karşı daha duyarlı hale getirmiş ve ileri modifikasyonu desteklemiştir.

Zeta potansiyeli, proteinlerin yzey ykünü gsteren, sulu formlardaki stabilitenin kritik parametrelerinden bir tanesidir.



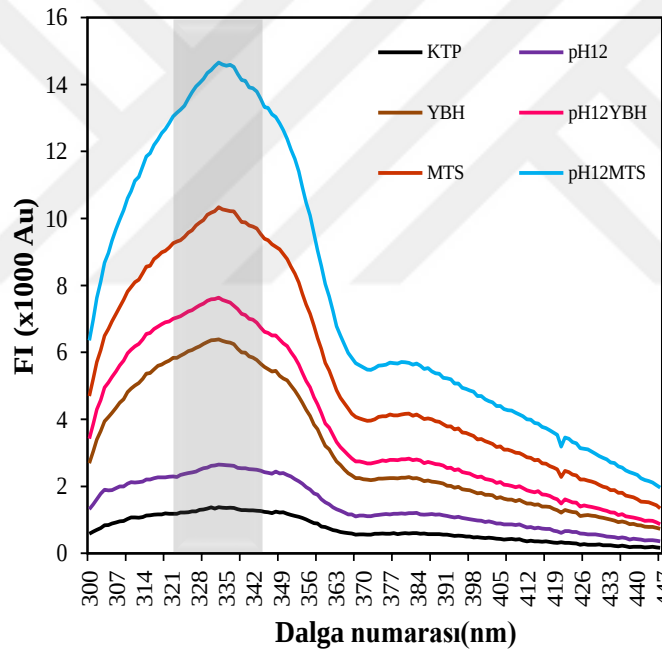
şekil 4.6. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin zeta potansiyelindeki değişim.

şekil 4.6'da grrldüğü gibi, tüm protein süspansiyonları izoelektrik noktanın (pI) üzerindeki pH 3 değerinde pozitif ve izoelektrik noktanın (pI) altındaki pH 5–7–9 değerlerinde ise negatif olarak yklenmiştir. pI yakınında (pH 4,5–5) net yk 0'dır. Özellikle pH 7'de pH12MTS (-33,6 mV) en yksek zeta potansiyel değerini gstermiş, bunu MTS (-32,6 mV) ve pH12YBH (-32,9 mV) izolatlarının zeta potansiyeli değerleri izlemiştir. YBH ve MTS işlemleri ile kombine edilen pH değiştirme uygulamasının ardından artan net negatif yk, kompakt katlanmış protein yapılarının kısmi aılmasına ve yzeye yakın ykly grupların ortaya çıkmasına bağlanabilir. Aynı zamanda, modifikasyon uygulamalarından sonra proteinlerin partikul boyutunun kuyulmesi protein yzeylerindeki net ykly artırarak daha az protein-protein etkileşimine yol açabilmektedir (Sharma ve ark., 2023; Yıldız ve ark., 2017). Genel

olarak, daha yüksek zeta potansiyeli değerlerine sahip pH12MTS izolatları asitli ve nötr pH'larda içecek formülasyonlarında diğer izolatlara göre daha kararlı olabilir.

4.3.4.2. İçsel floresan emisyonu

Proteinlerin içsel floresan spektrumları, hidrofobik yapıdaki triptofan, tirozin ve fenilalanin gruplarının yerel moleküler ortamlardaki konformasyonel değişikliklerini değerlendirmek için kullanılmaktadır. İçsel floresans emisyonu, diğer amino asitlerden daha güçlü bir floresans etkinliğine sahip olduğu için öncelikle triptofan aminoasidine aittir (Longworth, 1983). Proteinlerin üçüncül yapısındaki değişiklikler, değişen maksimum dalga boyu (λ_{max}) ve floresan yoğunluğu (FImax) ile gösterilmektedir. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin floresans spektrumları, Şekil 4.7'de sunulmaktadır.



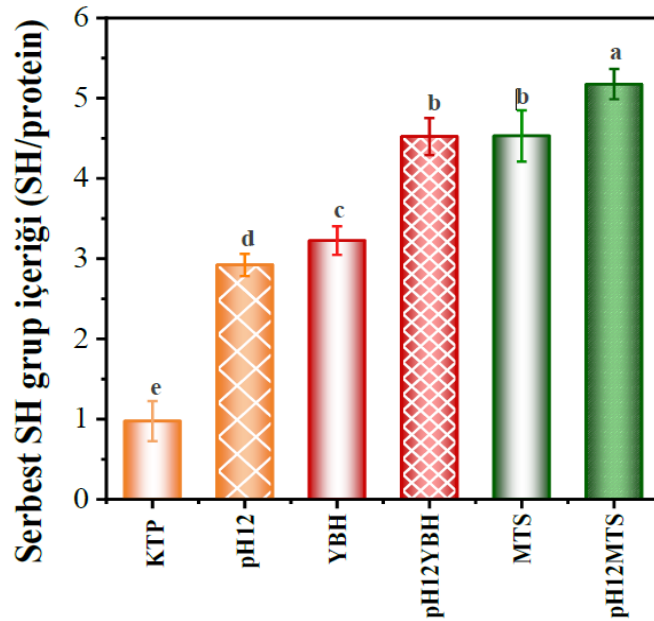
Şekil 4.7. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin floresan yoğunluklarındaki değişim.

Modifikasyon uygulamalarından sonra KTP'nin FImax değeri 13768 Au.'dan pH12MTS için 43268 Au.'ya yükselmiştir. pH12MTS izolatu diğer izolatlarla kıyasla en yüksek floresans yoğunluğuna sahipken ardından sırasıyla YBH, MTS, pH12YBH, ve pH12 izolatlarının floresans yoğunluk değerleri gelmektedir. λ_{max} değeri uygulama yapılmayan KTP için 334 nm civarındayken, modifiye edilmiş tüm izolatlar daha uzun dalga boylarına (336 nm) doğru kaymalar göstermiştir. Bu daha uzun dalga

boylarına doğru meydana gelen kaymalar batokromik kayma veya kırmızıya kayma olarak tanımlanmaktadır. Batokromik kayma, proteinin iç kısmında gömülü olan triptofanın yüzeye yönelimi ve sıvı ortamdaki polarite artışının nedenidir (Jin ve ark., 2021). Benzer şekilde, Kahraman ve ark. (2022) USH uygulamasından sonra kenevir proteininin floresans yoğunluklarının arttığını bildirmiştir Uygulamalardan sonra proteinlerin floresans yoğunluklarındaki artış uygulamalar sonrasında protein yapısının kısmen açılması etkisiyle sıvı ortama maruz kalan kromoforların sayısındaki artış ile açıklanmaktadır (Mir ve ark., 2019; Vera ve ark., 2019). Aynı zamanda, kavitasyon ve pH değiştirme yoluyla proteinin partikül boyutunun küçülmesi, yeni kutupsal yüzey alanlarının çevre ile etkileşime girmesine izin vermektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz FT-IR, serbest SH grup içeriği ve DSC verileri de izolat yapılarının uygulama sonrasında kısmi olarak açıldığının kanıtıdır. pH12MTS izolatlarının en yüksek floresan yoğunluk değerlerini göstermesi diğer tüm uygulamalardan daha agresif modifikasyon koşulları sağladığını kanıtlamaktadır.

4.3.5. Serbest SH grubu içeriği

Serbest SH grup içeriği, proteinlerin üçüncül yapısal değişikliklerine kanıt olmakla birlikte jelleşme, köpürme, emülsiyon oluşturma özelliklerini doğrudan etkilemektedir. KTP örneklerinin serbest SH grup içerikleri Şekil 4.8’de verilmiştir.

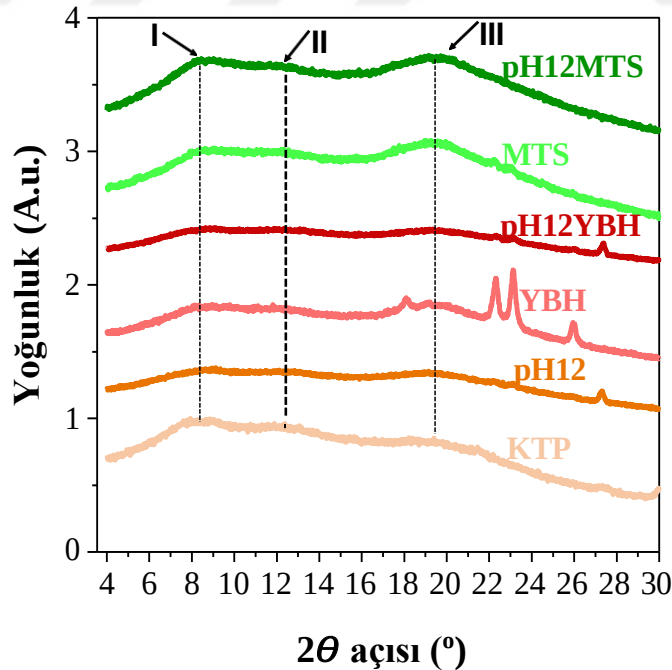


Şekil 4.8. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP’lerin serbest SH grup içeriğindeki değişimler.

En yüksek serbest SH grubu içeriği pH12MTS izolatında ($5,17 \pm 0,08 \mu\text{mol/g}$), KTP'den ($0,97 \pm 0,02 \mu\text{mol/g}$) 5,3 kat daha yüksek olarak bulunmuştur. Benzer şekilde MTS (+4,7 kat) ve pH12YBH (+4,6 kat) izolatları da KTP'den daha yüksek serbest SH grubu içeriği göstermiştir. Kavitasyon ve pH değiştirme uygulamaları sonrasında proteinin serbest SH grubu içeriğinde bir artış olduğu önceki çalışmalarda da bildirilmiştir (Yıldız ve ark., 2017). Kavitasyon ve pH değiştirme işleminin sinerjistik etkisi ile protein yapısındaki gömülü SH grupları protein yüzeyine maruz kalmaktadır. Ek olarak, tüm uygulamalardan sonra partikül boyutunun küçülmesi, gömülü SH gruplarının protein yüzeyine salınmasını sağlamaktadır. Serbest SH gruplarının yüzeye maruz kalması, FT-IR ve CD grafiklerinde görüldüğü gibi proteinlerin konformasyonel değişiklikler ile yakından ilişkilidir.

4.3.5.1. X-ışını difraktometresi (XRD)

Proteinlerin üç boyutlu kristalografik yapıları hakkında bilgi veren X-ışını difraktometresi (XRD) ile proteinlerin amorf ve kristal formları tespit edilebilmektedir. Kristalinite değeri (%) kristal pik alanlarının toplam pik alanlarına oranını tanımlanmaktadır.



Şekil 4.9. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin XRD spektrumları.

Şekil 4.9 protein izolatlarının XRD spektrumunu göstermektedir. Literatür çalışmalarında da rapor edildiği gibi, KTP'nin 2θ açısı 8° ve 12° α -heliks ve 19° β -sheet protein yapılarına işaret eden pikler tespit edilmiştir. KTP'nin 2θ açısı değerleri yapılan uygulamalardan sonra değişim göstermemiştir. KTP'nin %20,66 olan kristalinite değeri uygulamalardan sonra pH12MTS izolatında %29,54 ile en yüksek değere ulaşmıştır. MTS, pH12YBH ve YBH izolatlarının kristalinite değerleri (%) ise sırasıyla %27,28, %26,34 ve %25,45'tir. Uygulamaların sonucunda proteinlerin moleküler yapısındaki artan düzensizlik, amorf formların kristal formlara dönüşümüne yol açabilmektedir. pH, kavitasyon ve sıcaklığın etkisiyle proteinler amorf formlardan kristal formlara dönüşebilmektedir (McManus ve ark., 2016).

4.3.5.2. Termal davranışı

Proteinlerin termal davranışı, gıda üreticileri için yol gösterici bir parametredir. Denatürasyon sıcaklığı (T_d), denatürasyonun başlangıç sıcaklığı (T_{onset}) ve entalpi değerleri, proteinlerin üçüncül yapıları, kısmi açılımı ve agregasyonu hakkında değerli bilgiler sağlamaktadır. Tablo 4.2'de görüldüğü gibi, modifikasyon uygulamalarından sonra izolatlar farklı termal davranışlar sergilemiştir.

Tablo 4.2. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin T_{onset} ($^\circ\text{C}$) T_d ($^\circ\text{C}$) ve entalpi (W/g) değerleri.

Uygulamalar	T_{onset} ($^\circ\text{C}$)	T_d ($^\circ\text{C}$)	Entalpi (W/g)
KTP	$88,96 \pm 0,42^b$	$92,77 \pm 0,16^b$	$10,84 \pm 1,68^a$
pH12	$93,79 \pm 1,02^a$	$102,49 \pm 1,44^a$	$0,60 \pm 0,24^c$
YBH	$94,29 \pm 0,32^a$	$98,96 \pm 0,33^{ab}$	$8,20 \pm 1,65^b$
pH12YBH	$93,66 \pm 0,79^a$	$101,04 \pm 1,85^a$	$0,29 \pm 0,00^d$
MTS	$78,53 \pm 1,12^c$	$86,97 \pm 0,67^c$	$7,66 \pm 0,79^b$
pH12MTS	$75,12 \pm 1,84^d$	$87,54 \pm 0,56^c$	$0,12 \pm 0,02^e$

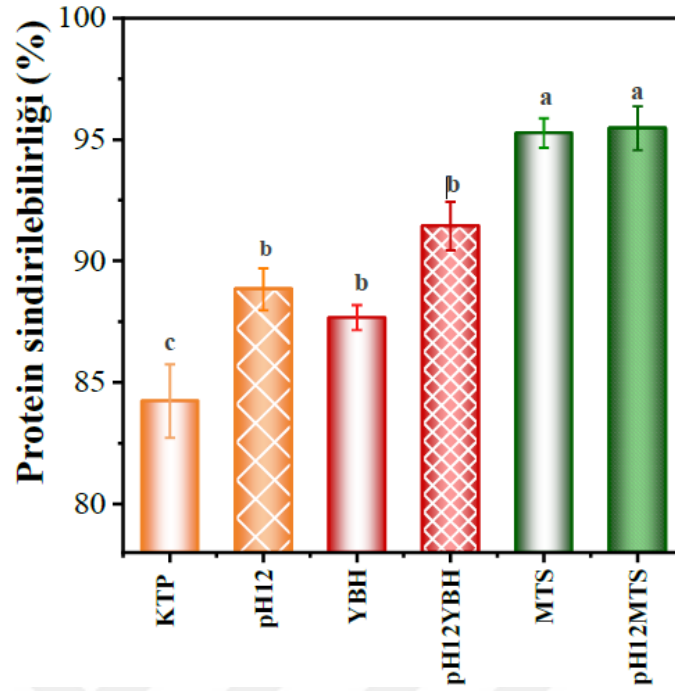
*Farklı harflere sahip örnekler sütun boyunca önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). Değerler ortalama $\pm$ standart sapma, $n = 3$ olarak ifade edilmiştir.

KTP izolatının T_{onset} ve T_d sıcaklıkları sırasıyla $88,96^\circ\text{C}$ ve $92,77^\circ\text{C}$ iken, pH12, YBH ve pH12YBH izolatları daha yüksek T_{onset} ($93,66$ – $94,29^\circ\text{C}$) ve T_d (96 – $102,49^\circ\text{C}$) değerleri göstermiştir. MTS ve pH12MTS örnekleri, KTP'den daha düşük T_{onset} sıcaklıklarına sahip olmuştur. T_d açısından, MTS ($86,97^\circ\text{C}$) ve pH12MTS ($87,54^\circ\text{C}$) izolatları, işlem görmemiş izolatlardan daha düşük değerler göstermiştir. Proteinlerin artan T_d değerleri, geniş bir sıcaklık aralığının gerekli olduğu gıda işleme

uygulamalarında avantajlı olabilmektedir. Ek olarak, kenevir proteininin denatürasyonunu tamamlamak için gereken enerjiyi belirten entalpi değeri analiz edilmiştir. Uygulama yapılmayan KTP'nin entalpisi (10,84 W/g), YBH ve MTS işlemlerinden sonra azalmıştır. Özellikle, pH12 (0,60 W/g), pH12YBH (0,29 W/g) ve pH12MTS (0,12 W/g) izolatları, diğer işlemlerden daha düşük entalpi değerlerine sahip olmuştur. Elde edilen veriler KTP'nin termal davranışındaki değişimin temelinde yatan üçüncül yapı modifikasyonunun en çok pH12MTS ve MTS uygulamalarında meydana geldiğini kanıtlamaktadır. Proteinlerin üçüncül yapıları, iyonik, hidrojen, hidrofobik ve disülfid bağları gibi çeşitli bağ türlerini içermektedir (Nazari ve ark., 2018). Kesme kuvvetleri ve kavitasyonlu kabarcık patlaması dahil olmak üzere USH kaynaklı etkiler, bu bağların bazılarını parçalayabilir ve protein sarmalını kısmen açabilmektedir. Modifikasyon işlemlerinden sonra daha öncesinde rapor ettiğimiz zeta potansiyeli, FI_{max} ve serbest SH gruplarındaki artışlar da DSC bulgularını desteklemektedir.

4.3.5.3. Sindirilebilirlik

Uygulama yapılan ve yapılmayan KTP'nin protein sindirilebilirliği (%) verileri Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Modifiye edilmiş tüm kenevir protein izolatları, uygulama yapılmayan KTP'den (%84,23) daha yüksek protein sindirilebilirlik değerleri göstermiştir. Spesifik olarak, pH12MTS (%95,46) ve MTS (%95,26) işlemleri, diğer tüm uygulamalara kıyasla protein sindirilebilirliğini artırmada 1,1 kat artış ile daha yüksek sonuçlar vermiştir. Ardından bu değerleri pH12YBH (%91,43), YBH (%87,66) ve pH12 (%88,83) izolatlarının sindirilebilirlik verileri takip etmektedir.



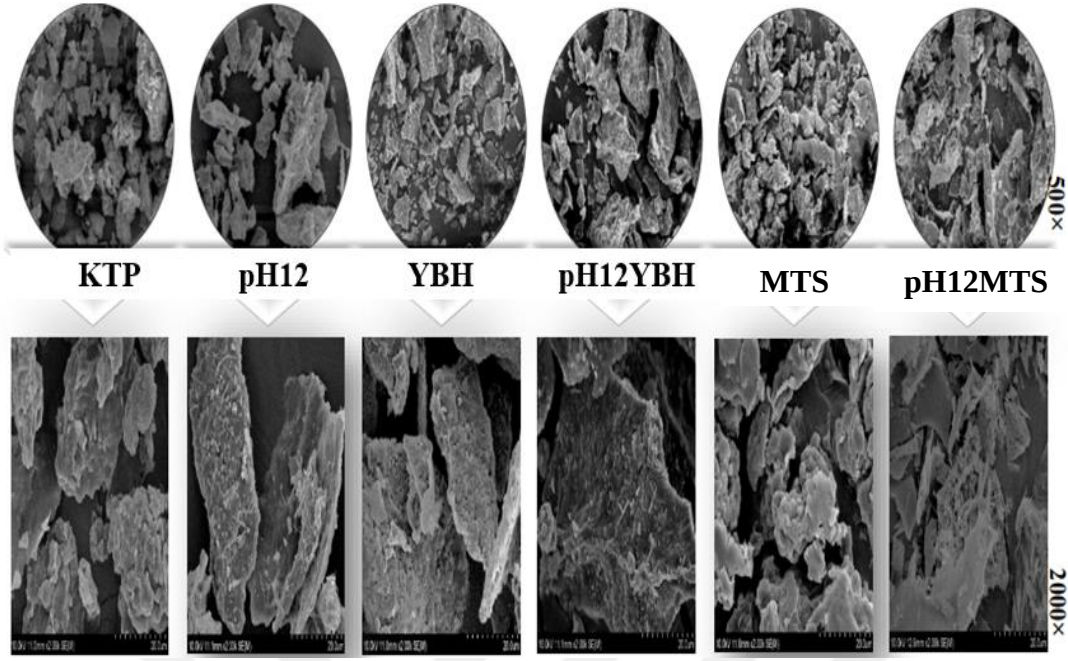
Şekil 4.10. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin protein sindirilebilirliği (%).

Önceki çalışmalar da USH veya YBH uygulamalarından sonra protein sindirilebilirliğinde iyileşmeler olduğunu bildirmiştir (Pan ve ark., 2020; Yuanqing ve ark., 2020). Gelişmiş protein sindirilebilirliğinin olası nedeni, işlemlerden sonra modifiye proteinlerin ikincil yapı oranındaki dönüşüm olabilmektedir. Yuanqing ve ark. (2020), proteinlerin (pirinç, yulaf, mısır ve soya proteinleri) sindirilebilirliğinin, α -heliks yapısında azalış, β ve rastgele sarım formlarında meydana gelen artış sayesinde geliştiğini bildirmiştir. Diğer olası sebepler ise serbest SH gruplarının artması (Pan ve ark., 2020) ve protein yapılarının açılması sonucu gastrik enzimlerin daha etkin ve izolatların sindirime daha duyarlı hale gelmesidir.

4.3.6. Morfolojik özellikler

4.3.6.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Uygulamaların KTP izolatlarının morfolojisi üzerindeki etkilerini anlamak için SEM, x500 ve x2000 büyütme derecelerinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin x500 ve 2000 büyütme değerlerindeki elektron mikroskop görüntüleri.

Uygulamalardan sonra KTP izolatları, nispeten yuvarlak ve pürüzsüz bir yüzey sergilemiştir. Buna karşılık, tüm işlemler kenevir proteinin yapısını kısmen parçalamış ve izolatlar mikroskop görüntülerinde oldukça pürüzlü, keskin kenarlı pul pul şekiller göstermiştir. USH'nin kavitasyon kuvvetlerinin etkisi, protein yapılarının bozulmasına neden olabilmektedir (Zhang ve ark., 2019). Çatlak, düzensiz ve küçük partiküller, çözünürlük ve emülsiyon analizi sonuçlarını kanıtlamak için yeterli veriyi sağlamaktadır. pH değiştirme sonrası izolatların yüzeylerinde görünür fibrile benzer yapılar gözlenmiştir.

4.3.7. Tekno-fonksiyonel özellikler

4.3.7.1. Çözünürlük

Çözünürlük, proteinlerin işlevsel özelliklerinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Protein çözünürlüğü hidrofobik/hidrofilik grup oranına, partikül boyutuna, yüzey hidrofobikliğine ve denatürasyon/agregasyon derecesine bağlıdır (Yıldız ve ark., 2018). Tablo 4.3'te görüldüğü gibi, en yüksek protein çözünürlüğü KTP'ye (%25) kıyasla 2,08 kat artışla pH12MTS (%52) izolatında elde edilmiştir.

Tablo 4.3. Farklı modifikasyon uygulamaları sonrasında KTP'lerin çözünürlük (%), emülsiyon aktivitesi (m²/g), emülsiyon stabilitesi (dk.) ve kremalaşma indeksi (%) değerleri.

	Çözünürlük (%)	Emülsiyon aktivitesi (m ² /g)	Emülsiyon stabilitesi (dk.)	Kremalaşma indeksi (%)
KTP	24,88 ± 0,73 ^d	12,38 ± 0,62 ^e	14,75 ± 0,12 ^e	28,15 ± 0,20 ^e
pH12	34,01 ± 0,51 ^c	16,19 ± 0,20 ^d	19,28 ± 0,46 ^d	30,70 ± 0,44 ^d
YBH	36,06 ± 3,13 ^c	16,95 ± 0,53 ^d	18,59 ± 0,14 ^d	32,96 ± 0,06 ^c
pH12YBH	41,10 ± 1,03 ^b	22,75 ± 1,30 ^c	28,00 ± 0,85 ^c	34,15 ± 0,08 ^b
MTS	42,21 ± 1,10 ^b	18,70 ± 0,52 ^b	29,88 ± 0,15 ^b	34,12 ± 0,10 ^b
pH12MTS	52,54 ± 1,19 ^a	26,09 ± 0,36 ^a	31,75 ± 0,57 ^a	37,65 ± 0,25 ^a

*** Farklı harflere sahip örnekler sütun boyunca önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$). Değerler ortalama ± standart sapma, n = 3 olarak ifade edilmiştir.

Sonrasında sırasıyla pH12YBH (1,64 kat), MTS (1,68 kat), pH12 (1,36 kat) ve YBH (1,44 kat) izolatları uygulama yapılmayan KTP'den daha yüksek çözünürlük değerleri göstermiştir.

Yüksek basınç ve ılımlı ısı işlem altındaki MTS sisteminin, yalnızca USH uygulamasına kıyasla 3 ila 6 kat daha yüksek akustik kaviteasyon yoğunluğu ürettiği bilinmektedir (Yıldız ve ark., 2017). Kaviteasyon kabarcıkları (Güzel ve ark., 2020), sono-reaktördeki sıcaklık, biyokimyasal reaksiyonlar için gerekli aktivasyon enerjisini düşürme işlevi görmektedir (Lo ve ark., 2022; Yıldız ve ark., 2017). pH12MTS işlemi kenendir proteininin çözünürlüğünü diğer tüm işlemlerden daha fazla artırmıştır.

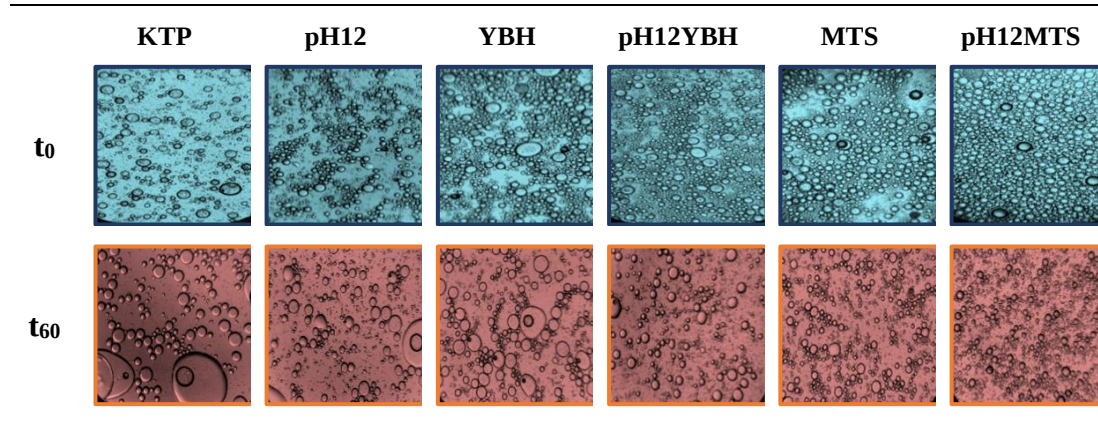
4.3.7.2. Emülsiyon özellikleri

Emülsiyon özellikleri, kek, sosis, dondurma, tatlı ve kahve beyazlatıcı gibi birçok gıda ürünü için temel bir faktördür ve proteinin arayüzey adsorpsiyon yeteneklerini gösterir. Emülsiyon aktivitesi (EA) ve emülsiyon stabilitesi (ES), proteinlerin emülsiyon özelliklerinin iki temel göstergesidir. EA, birim protein başına emülsifiye edilebilecek yağ miktarını gösterir ve ES, emülsiyonun belirli bir süre boyunca kararlılığını ölçer (Yıldız ve ark., 2017). KTP izolatlarının EA ve ES değerleri Tablo 4.3'te sunulmaktadır.

Uygulamalar içinde pH12MTS emülsiyonu en yüksek EA (26,09 m²/g) ve ES (31,75 dk.) değerlerine sahip olmuştur ve uygulama yapılmayan KTP emülsiyonuna kıyasla sırasıyla EA, 2,11 kat ve ES, 2,15 kat daha yüksek değerler göstermiştir. MTS ve pH12YBH emülsiyonları ikinci en yüksek EA ve ES değerlerini gösterirken bunu YBH ve pH12 emülsiyonları takip etmiştir. Böylece, tüm işlemler, su-yag

arayüzlerinde daha güçlü viskoelastik protein filmleri oluşturarak KTP'nin EA ve ES değerlerini iyileştirmiştir. Benzer şekilde Kahraman ve ark. (2022) tarafından USH ve pH değiştirme işlemlerinden sonra KTP'nin emülsiyon özelliklerinin iyileştiği bildirilmiştir. Proteinin emülsifikasyon özellikleri ile çözünürlüğü ve hidrofobikliği arasında güçlü bir korelasyon olduğu Zhang ve ark. (2014) tarafından rapor edilmiştir. Uygulamalardan sonra izolatların gösterdiği yüksek floresan yoğunluk ve çözünürlük gelişen emülsiyon özellikleri ile ilişkilendirilebilir.

Kremalaşma indeksi, krema ve serum katmanlarındaki faz ayrımı ile emülsiyonun kararsızlığını belirler. pH12MTS emülsiyonu en yüksek kremalaşma indeksini gösterirken (1,34 kat daha yüksek), bunu sırasıyla MTS, pH12YBH ve YBH emülsiyonları izlemiştir (Tablo 4.3). Daha yüksek kremalaşma kararlılığına sahip olan proteinler daha iyi emülsiyon özelliklerini göstermektedir. Kremalaşmaya karşı gösterilen stabilite, emülsiyonların damlacık boyutuna ve viskozitesine bağlıdır (McClements, 2007). Modifiye edilen izolatların daha küçük partikül boyutları, daha yüksek çözünürlüğü ve zeta potansiyeli, yağ damlacıklarını hızla çevreleyen stabil emülsiyonların oluşumunu sağlayabilmektedir. Benzer şekilde, Karaca ve ark. (2011) emülsiyonların kremalaşma kararlılığı ile zeta potansiyeli ve çözünürlüğün pozitif, damlacık boyutunun ise negatif korelasyona sahip olduğunu bildirmiştir.



Şekil 4.12. Farklı modifikasyon uygulamalarından elde edilen KTP emülsiyonlarının 0. dakika (t₀) ve 60.dakikadaki (t₆₀) mikroagrafları.

Şekil 4.12'deki mikroagraflar, 0. ve 60. dakika sonrasında emülsiyon damlacıklarının mikroskop görüntülerini göstermektedir. pH12MTS ve MTS emülsiyonları tekdüze, küçük damlacık boyutlarına sahipken, KTP izolatu daha büyük ve çoklu damlacık

boyutları göstermiştir. Aynı eğilim emülsiyonların 60. dakika mikrograflarında da görülmüştür.

pH12 izolatlarından elde edilen emülsiyonların gelişmiş özellikleri pH değiştirme işlemi ile oluşan erimiş globül protein yapılarına bağlanabilir. Erimiş globül formundaki proteinler, kısmen katlanmış konformasyonlarda düzensiz üçüncül yapılar göstererek, üçüncül etkileşimleri ve iyi paketlenmiş amino asit yan zincirlerini kaybederler. Böylece erimiş yan zincir yapısında hidrofobik yüzey alanı artmaktadır (Choe ve ark., 2022; Dijkstra ve ark., 2018). Ayrıca, artan çözünürlük yağ damlacıklarını adsorbe etmek için emülsiyon hacmi başına düşen protein miktarının artması sağlamaktadır. Kavitasyon fenomeni ve pH değişimi ile partikül boyutunun küçülmesi, etkin bir arayüzey film tabakası oluşturmak için esnek ve aktif gruplar ortaya çıkarabilmektedir (Nazari ve ark., 2018; Zhao ve ark., 2022).



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu doktora tez çalışması, kenevir tohum proteinlerinin fonksiyonel, fizikokimyasal, morfolojik ve biyoaktif özelliklerini geliştirmek amacıyla ısıl olmayan ve kimyasal modifikasyon tekniklerinin tekil veya kombine kullanımının etkinliğini konu almıştır. Isıl olmayan tekniklerden ultrases (USH), yüksek basınç homojenizasyon (YBH), manotermosonikasyon (MTS) ve kimyasal tekniklerden pH değiştirme (pH12) uygulamasına dair elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

- Ülkemizin ilk tescillenen kenevir tohum çeşidi “Narlısaray”ın genel kimyasal kompozisyonu %25,4 protein, %35,7 yağ, %6,6 nem, %4,8 kül ve %27,5 karbonhidrat olarak bulunmuştur. Literatürdeki farklı kenevir çeşitlerinin genel kimyasal kompozisyonu ile benzer değerler göstermiştir.
- KTP’nin genel kimyasal kompozisyonunda protein içeriği %90,0, yağ içeriği %0,6, nem, kül, karbonhidrat içerikleri ise sırasıyla %5,6, %2,6 ve %1,2 olarak bulunmuştur. Etkin yağ giderme işlemi ve alkali hidroliz-izoelektrik çökeltme prosedürüyle elde edilen kenevir tohumlarından yüksek saflıkta protein izolatu elde edilebilmiştir.
- USH probu tarafından farklı güçlerde KTP süspansiyonlarına aktarılan akustik enerjinin yoğunluğu zamana karşı kalorimetrik ölçümler sonucunda %45, %65 ve %85 genlik değerleri için sırasıyla 6–11 W/cm², 27–32 W/cm² ve 48–52 W/cm² olarak hesaplanmıştır.
- USH proses koşulları (%45–85 genlik, 5–15 dak. süre, %2–10 protein konsantrasyonu) KTP’nin maksimum çözünürlük ve minimum partikül boyutu yanıtlarına göre yüksek korelasyon çıktılarıyla ($R^2_{\text{çözünürlük}}=0,9728$, $R^2_{\text{partikül boyutu}}=0,9804$) modellenmiştir. Elde edilen her iki modelde de protein konsantrasyonunun yanıtlar üzerinde önemli bir etkisi görülmezken, genlik ve süre etkili bulunmuştur. Genlik*Konsantrasyon interaksyonu harici diğer tüm interaksyonlar yanıtlar üzerinde önemli ölçüde etkilidir.

- Elde edilen modellere göre optimum proses parametreleri, %71,9 genlik, %6,9 protein konsantrasyonu ve 7,8 dakika olarak bulunmuştur. Çözünürlük ve partikül boyutları için optimum noktanın validasyonunda bağıl hata değerlerinin sırasıyla %2,0 ve %1,6 olması (<%10) elde edilen modellerin tahminleme doğruluğunu teyit etmektedir.
- Uygulama öncesine kıyasla, optimum proses koşullarında elde edilen KTP-USH izolatlarının çözünürlüğü %78 artarken, partikül boyutu %46 azalmıştır.
- USH uygulamasının KTP'nin birincil yapısında değişime yol açmadığı elektroforetik protein bantlarının değişmemesinden yola çıkılarak söylenebilir. KTP'nin protein bant profili literatüre benzer şekilde ~60 kDa'da edestin ~37 kDa'da asidik, ~18 kDa'da bazik alt birimler ve albüminden oluşmaktadır. SDS-PAGE'in 2-ME ile indirgenen ortamında KTP'nin düşük fonksiyonel özelliklerine atfedilen disülfid bağlarının kırılmasıyla edestin protein bant yoğunluğunun azaldığı gözlenmiştir.
- KTP'nin aminoasit profili USH uygulaması etkisiyle değişmiştir. Bazı aminoasitlerin miktarında azalmalar ve yine bazı aminoasitler arası olası dönüşümler meydana gelmiştir.
- USH uygulamasının KTP'nin ikincil yapısındaki değişimi FT-IR spektrumunda proteinin Amid 1 ve 2 bölgelerindeki kaymalar ortaya çıkarmıştır. Yine benzer şekilde uygulama sonrasında KTP'nin ikincil yapı dağılımındaki α -heliks oranı azalırken (%22,2'den %12,5'e), β -sheet (%42,6'dan %48,8'e) ve rastgele sarım oranı (%35,2'den %38,7'ye) artmıştır. Özellikle rastgele sarım oranındaki artış proteinlerin daha esnek ve düzensiz yapılara sahip olması ile daha gelişmiş fonksiyonel özellikler göstermesini sağlayabilmektedir.
- USH uygulamasının KTP'nin üçüncül yapısında meydana getirdiği değişim serbest SH grubu içeriği (+%59) ve zeta potansiyeli (+%25) artışı ile ortaya koyulmuştur. KTP'nin termal davranışındaki değişim ise uygulama sonrasında denatürasyon entalpisindeki azalma ile kendini göstermiştir. Benzer şekilde KTP'nin yüzey hidrofobisitesinde, uygulama sonrasında görülen artış ve içsel flöresan değerindeki batokromik kayma protein yapısında agregasyona neden olan interaksiyonların bozulduğunu ve gömülü grupların yüzeyde aktif hale geçtiğini göstermiştir.

- USH uygulaması sonrasında KTP'nin fizikokimyasal özelliklerinde görülen değişimler fonksiyonel özelliklerini de geliştirmiştir. KTP-USH'un emülsifikasyon, yağ bağlama ve köpürme özelliklerinin KTP'ye kıyasla arttığı, ancak en düşük jelleşme konsantrasyonunun azaldığı rapor edilmiştir. Görülen bu değişimler KTP'nin USH uygulaması sonrasında serbest sülfidril grup içeriğinin ve yüzey hidrofobisinin artışı ile ilişkilendirilebilir. Çünkü bu artışlar, özellikle proteinlerin yağ bağlama, emülsiyon, jel ve köpük özelliklerini desteklemektedir. Yine USH uygulaması sonrasında artan çözünürlük diğer tüm fonksiyonel özellikler için aktif yüzey gruplarını desteklediği için dolaylı bir artışa yol açtığını söyleyebiliriz. Ayrıca, KTP'nin antioksidan özelliği USH uygulaması ile %38 oranında artmıştır.
- Tez çalışmasının ikinci bölümünde ise YBH, MTS ve bunların pH değiştirme uygulaması ile kombinasyonlarının KTP'nin fizikokimyasal, morfolojik ve fonksiyonel özellikleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır.
- MTS işleminin çözünürlük ve partikül boyutlarına ilişkin optimum işlem parametreleri 50°C, 200 kPa ve 90 s olarak belirlenmiştir. KTP'ye kıyasla optimum koşullarda MTS uygulanan örnekte partikül boyutu 2,0 kat azalırken, çözünürlük 1,7 kat artmıştır.
- Uygulamalar proteinlerin SDS-PAGE profilinde bir değişim meydana getirmemiştir. İşlemler sonrası ikincil yapıdaki değişim, α -heliks formlarındaki azalma ve rastgele sarım formlardaki artış görülen CD verileriyle kanıtlanmıştır. Benzer şekilde FT-IR esneme titreşimlerinde Amid 1 ve Amid 2 bölgelerindeki esneme titreşimlerindeki batokromik kaymalar gözlenmiştir. Özellikle pH12MTS uygulama örnekte 1430 ve 870 cm^{-1} bölgesinde yeni pikler tespit edilmiştir. Bu da MTS uygulamasının protein süspansiyonunda diğer uygulamalara kıyasla daha etkin koşullar ortaya çıkardığına yorumlanabilir.
- KTP'nin 365 nm olan partikül boyutu, uygulamaların etkisiyle 227–112 nm aralığında değişim göstermiştir. Bu değişimde pH12MTS'nin partikül boyutu 3,2 kat ile en fazla azalışı göstermiştir ve sonrasında sırasıyla MTS, pH12YBH ve pH12 uygulamalarının yapıldığı izolatların partikül boyut azalışı takip etmiştir. Uygulamalar sonrasında KTP'nin partikül boyut dağılımı monomodelden multimodele geçiş yaparken, 10-100 nm aralığında partikül boyutuna sahip pikler gözlenmiştir. Zeta potansiyeli de pH 7,0'de -33,6 mV

değeri ile negatif yönde en yüksek pH12MTS uygulamasında görülmüştür. Bu durum partikül boyut küçülmesi ve çözünürlük artışıyla yüzeydeki negatif yük dengesinin yükseldiğini düşündürmektedir. Böylece uygulamalar, daha stabil protein süspansiyonlarının oluşumuna katkı sağlayabilecektir.

- Modifiye edilen izolatların floresan yoğunluğu, kavitasyonel kuvvetlerin ve pH değiştirme uygulamalarının kombine etkileri ile üçüncül yapısal değişikliklerin kanıtı olarak artmıştır. Protein yapısının kısmi açılması kromoforların yüzeye salınımına neden olabilmektedir. Proteinlerin yüzey hidrofobisitesindeki artış, yağ ve havayı adsorbe eden daha etkin ara yüzey filmlerin oluşmasına ve böylece emülsiyon ve köpük özelliklerinin iyileşmesine neden olabilmektedir.
- Tüm uygulamalar izolatların termal davranışını ve amorf yapı oranını değiştirerek daha düzensiz formlar oluşmasına yol açmıştır. Ek olarak, uygulama yapılmamış izolatın protein sindirilebilirliği (%84,23) modifikasyon işlemleri sonrasında artarak pH12MTS (%95,46) izolatında en yüksek sindirilebilirlik değeri elde edilmiştir. Bu durum, sindirim enzimlerine daha duyarlı kısmen denatüre protein yapılarının oluşmasına ve ikincil yapıdaki değişimlere bağlanmıştır. MTS ve pH12MTS uygulamaları, KTP'nin fonksiyonel ve fizikokimyasal özelliklerini ve sindirilebilirliğini diğer uygulamalara göre önemli ölçüde daha fazla artırmıştır.
- Bu değişimde pH12MTS'nin (%52) çözünürlüğü, uygulama yapılmayan KTP'ye (%25) kıyasla 2,08 kat daha yüksek bulunmuştur. Ek olarak, pH12MTS izolatının emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi, KTP'ye kıyasla sırasıyla 2,11 ve 2,15 kat artışlarla en yüksek değerlerde bulunmuştur. MTS'nin protein yapısında daha etkin modifikasyonlar sağlaması akustik etkilerin basınç ve sıcaklık varlığında daha fazla indüklenmesinden kaynaklanabilir.
- Genel bir değerlendirme yapacak olursak, KTP'nin yüksek serbest SH grup ve globüler protein içeriği, onun kompakt yapısının ve zayıf çözünürlüğünün ana nedenleri olarak bilinmektedir. KTP'nin fonksiyonel özelliklerinin akustik güdümlü ve pH değiştirme etkisindeki modifikasyonuna katkıda bulunan faktörler aşağıdaki gibi özetlenebilir:
 - Kavitasyonel etkilerin ortaya çıkardığı fiziksel kuvvetler ve kimyasal etkiler, üç boyutlu protein yapılarını etkileyebilmektedir. Bu grupların protein yüzeyine maruz kalması, protein-su etkileşimlerini teşvik

etmektedir. Proteinlerin uygulamalar sonrasında yüzeydeki elektrostatik yük artışı zeta potansiyeli sonuçlarıyla da kanıtlanmıştır.

- pH12 işlemi, protein sarmalındaki kısmi açılma ve katlama adımlarından sonra protein yapısını erimiş globül formuna dönüştürür ve fiziksel değişikliklere karşı daha hassas yapılar oluşturabilir. Bu nedenle, MTS ile pH değiştirmenin kombinasyonu, protein örneklerini kavitasyon etkilerine karşı daha duyarlı hale getirerek sinerjistik olarak KTP'nin çözünürlüğünü artırmış olabilir.
- Kavitasyon etkisiyle oluşan kabarcıklar, kesme kuvvetleri ve yüksek basınçlı şok dalgaları kenevir proteininin üçüncül yapısındaki bozulmalara neden olarak daha küçük partikül boyutlarına yol açmıştır. Daha küçük partikül boyutları, su-protein etkileşimleri için yeni aktif yüzey alanları sunarak çözünürlüğü teşvik edebilir. Partikül boyutu ile çözünürlük arasındaki negatif korelasyon bu açıklamayı desteklemektedir.
- Kısmi açılma ve kovalent olmayan bağ kırılmaları ile ikincil ve üçüncül yapılarda meydana gelen konformasyonel değişiklikler protein yüzeyinde daha fazla hidrofilik kalıntı bulunmasına neden olmuş olabilir. Bu durum FT-IR, floresan yoğunluğu, ikincil yapı, DSC ve serbest SH grubu bulguları ile doğrulanmıştır.
- Kavitasyon ve türbülans akış etkileri, proteinlerde kısmi denatürasyona yol açarak hidrofobik grupları açığa çıkartır. Bu gruplar, proteinlerin emülsiyon/köpük oluşum fazında yağ/hava damlacıkları etrafında ince vizkoeleastik film oluşumundaki etkinliğini artırır. Çünkü, yüzey hidrofobikliğindeki artış, yüzeyde artan polar olmayan gruplarla daha sağlam arayüzey membran yapısına katkıda bulunur. Aynı zamanda çözünürlükteki artış proteinlerin su interaksiyonunu ve yağ/hava adsorpsiyonunu etkileyerek daha iyi emülsiyonların/köpüklerin oluşmasına katkı sağlamaktadır. USH uygulamasındaki kavitasyon ve türbülans akış etkisiyle protein fraksiyonlarında meydana gelen kısmi açılmalar sonucu oluşan düzensiz yapılar yağ/hava-su arayüzeyine girebilecek protein konsantrasyonunun ve yağı/hava kapsüle edebilecek protein miktarının artışında etkilidir. Partikül boyutundaki azalış emülsiyon ortamında daha fazla proteinin yer almasını

sağlayarak emülsiyon/köpük stabilitesini olumlu yönde etkilemektedir. Proteinlerin ikincil yapılarında rastgele sarım oranındaki artış ve α -heliks oranındaki azalış moleküllerin daha iyi hareket kabiliyeti kazanmasına ve dolayısıyla daha etkin emülsiyon/köpük özellikleri göstermesine yol açabilmektedir.

- MTS uygulamasının klasik USH (7,4 dak.) ve YBH uygulamalarına göre daha etkin modifikasyonu daha kısa işlem süresinde (90 s) sağlayabilmesi önem taşımaktadır. MTS sistemindeki basınç ve sıcaklık, ses dalgalarının sağladığı türbülans, kesme kuvveti, bölgesel sıcaklık ve basınç etkilerinin katlanarak artmasına yol açmaktadır. Bu nedenle daha etkin ve kısa sürede fonksiyonel değişimler sağlamasıyla KTP'yi pH12MTS uygulaması ile modifiye etmek uygun bir seçim olacaktır.

Bu çalışma ile ısıl olmayan ve kimyasal modifikasyon uygulamalarının kenevir tohum proteinin teknolojik özelliklerini geliştirmede katkı sağlayabileceği ortaya koyulmuştur. Optimum proses parametrelerinde istenilen fonksiyonel özelliklerin elde edilebileceği gösterilmiştir. Aynı zamanda modifiye edilen kenevir tohum proteinlerinin gıda bileşeni olarak kullanım potansiyeli bulunmaktadır. MTS teknolojisi işlevselleştirilmiş ve katma değerli protein bileşenleri, kapsülleme malzemeleri ve yenilebilir filmler üretmek için kullanılabilir. Yine modifiye edilen proteinlerin gıda sistemlerindeki davranışının belirlenmesi gerekmektedir. Gelecekteki çalışmalarda bu kapsamda tasarlanacaktır.

6. KAYNAKÇA

- Ajibola, C. F. (2020). Structural and functional properties of hemp seed storage. [Doktora Tezi]. Manitoba University.
- Alashi, A. M., Blanchard, C. L., Mailer, R. J., & Agboola, S. O. (2013). Technological and bioactive functionalities of canola meal proteins and hydrolysates. *Food Reviews International*, 29(3), 231–260.
- Alavi, F., Chen, L., & Emam-Djomeh, Z. (2021). Effect of ultrasound-assisted alkaline treatment on functional property modifications of faba bean protein. *Food Chemistry*, 354, 129494.
- Alu'datt, M. H., Rababah, T., Ereifej, K., Brewer, S., & Alli, I. (2013). Phenolic–protein interactions in oilseed protein isolates. *Food Research International*, 52(1), 178–184.
- AOAC (1990). Official method for analysis (15th ed.). Association of Official Analytical Chemists.
- Araujo, P. W., & Brereton, R. G. (1996). Experimental design III. Quantification. *Trends in Analytical Chemistry*, 15(3), 156–163.
- Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., P´erez, O. E., & Pilosof, A. M. R. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 463–472. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.018>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.023>
- Bader, S., Bez, J., & Eisner, P. (2011). Can protein functionalities be enhanced by high-pressure homogenization?—A study on functional properties of lupin proteins. *Procedia Food Science*, 1, 1359–1366.
- Baysal, T. ve İçier, F. (2012). Gıda Mühendisliğinde Isıl Olmayan Teknolojiler. Nobel Akademik Araştırmalar Yayınevi.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (YYY) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965–977.
- Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43(2), 414–431.

- 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.
- Callaway, J. C. (2004). Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*, 140, 65–72.
- Chen, J., Chen, X., Zhu, Q., Chen, F., Zhao, X., & Ao, Q. (2013). Determination of the domain structure of the 7S and 11S globulins from soy proteins by XRD and FTIR. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7), 1687–1691.
- Choe, U., Chang, L., Ohm, J. B., Chen, B., & Rao, J. (2022). Structure modification, functionality and interfacial properties of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrate as affected by post-extraction treatments. *Food Hydrocolloids*, 133, 108000.
- Condés, M. C., Añón, M. C., & Mauri, A. N. (2015). Amaranth protein films prepared with high-pressure treated proteins. *Journal of Food Engineering*, 166, 38–44.
- Damodaran, S. (1994). Structure-function relationship of food proteins. Protein functionality in food systems, Taylor & Francis.
- Das, R. (2015). Multienzyme Modification of Hemp Protein for Functional Peptides Synthesis. *Journal of Food Processing*, 2015, 1–5.
- Dijkstra, M. J. J., Fokkink, W. J., Heringa, J., van Dijk, E., & Abeln, S. (2018). The characteristics of molten globule states and folding pathways strongly depend on the sequence of a protein. *Molecular Physics*, 116(21–22), 3173–3180.
- Dong, X., Zhao, M., Yang, B. A. O., Yang, X., Shi, J., & Jiang, Y. (2011). Effect of high-pressure homogenization on the functional property of peanut protein. *Journal of Food Process Engineering*, 34(6), 2191–2204.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70–77.
- Falcão H.G., Silva M.B.R., de Camargo A.C., Shahidi F., Franchin M., Rosalen P.L., Alencar S.M., Kurozawa L.E., & Ida E.I. (2019) Optimizing the potential bioactivity of isoflavones from soybeans via ultrasound pretreatment: antioxidant potential and NF-κB activation. *Journal of Food Biochemistry*, 43(11):13018.
- Figueroa-González, J. J., Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E. J., Aguirre-Mandujano, E., Alvarez-Ramirez, J., & Martínez-Velasco, A. (2022). Modifying the structure, physicochemical properties, and foaming ability of amaranth protein by dual pH-shifting and ultrasound treatments. *LWT-Food Science and Technology*, 153, 112561.
- Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26(2), 68–87.

- 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.
- Girgih, A. T., Alashi, A. M., He, R., Malomo, S. A., Raj, P., Netticadan, T., & Aluko, R. E. (2014). A novel hemp seed meal protein hydrolysate reduces oxidative stress factors in spontaneously hypertensive rats. *Nutrients*, 6(12), 5652–5666.
- Grandview Research (2022, 16 Şubat) Industrial hemp market size, share & trends analysis report by product (seeds, fiber, shivs), by application (animal care, textiles, personal care), by region (North America, Apac), and segment forecasts, 2022–2030. <https://www.grandviewresearch.com/>.
- Greenfield, N. J. (2006). Analysis of the kinetics of folding of proteins and peptides using circular dichroism. *Nature Protocols*, 1(6), 2891–2899.
- Gul, O., Saricaoglu, F. T., Besir, A., Atalar, I., & Yazici, F. (2018). Effect of ultrasound treatment on the properties of nano-emulsion films obtained from hazelnut meal protein and clove essential oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 41, 466–474.
- Gül, V. (2008). Karadeniz bölgesindeki bazı kenevir (*Cannabis sativa* L.) tohumlarının fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi. [Yüksek lisans tezi], Ordu Üniversitesi
- Guzel, N., Kahraman, O., & Feng, H. (2020). Solid–liquid extraction by manothermosonication: recapturing the value of pomegranate peels and nanocomplexation of extracts with pea protein. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(44), 16671–16679.
- Hadnadev M., Dapčević-Hadnadev 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.
- Hall, G. M. (1996). Methods of testing protein functionality. Blackie Academic & Professional.
- Hayward, L., & McSweeney, M. B. (2020). Acceptability of bread made with hemp (*Cannabis sativa* subsp. *sativa*) flour evaluated fresh and following a partial bake method. *Journal of Food Science*, 85(9), 2915–2922.
- Henchion, M., Hayes, M., Mullen, A. M., Fenelon, M., & Tiwari, B. (2017). Future protein supply and demand: strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. *Foods*, 6(7), 53.
- Hu, H., Wu, J., Li-Chan, E. C. Y., Zhu, L., Zhang, F., Xu, X., ... & Pan, S. (2013). Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. *Food Hydrocolloids*, 30(2), 647–655.
- Huang, Z. G., Wang, X. Y., Zhang, J. Y., Liu, Y., Zhou, T., Chi, S. Y., & Bi, C. H. (2022). High-pressure homogenization modified chickpea protein: Rheological properties, thermal properties and microstructure. *Journal of Food Engineering*, 335, 111196.
- Isinguzo, G. (2011). Physicochemical, functional and in vitro bioactive properties of hempseed (*Cannabis sativa*) protein isolates and hydrolysates. [Yüksek Lisans tezi]. University of Manitoba.

- Jambrak, A. R., Lelas, V., Mason, T. J., Krešić, G., & Badanjak, M. (2009). Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of Food Engineering*, 93(4), 386–393.
- Jiang L., Wang J., Li Y., Wang Z., Liang J., Wang R., Chen Y., Ma W., Qi B., & Zhang M. (2014) Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. *Food Research International*, 62:595–601.
- Jiang S., Ding J., Andrade J., Rababah T.M., Almajwal A., Abulmeaty M.M., & Feng H. (2017). Modifying the physicochemical properties of pea protein by pH-shifting and ultrasound combined treatments. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38:835–842.
- Jin, J., Okagu, O. D., Yagoub, A. E. A., & Udenigwe, C. C. (2021). Effects of sonication on the in vitro digestibility and structural properties of buckwheat protein isolates. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105348.
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Álvarez, C., & O'Donnell, C. P. (2015). Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 60–67.
- Kahraman, O., & Feng, H. (2021). Continuous-flow manothermosonication treatment of apple-carrot juice blend: Effects on juice quality during storage. *LWT-Food Science and Technology*, 137, 110360.
- 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*, 1–7.
- Karaca, A. C., Low, N., & Nickreferencererson, M. (2011). Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International*, 44(9), 2742–2750.
- Karoui, R., & Blecker, C. (2011). Fluorescence spectroscopy measurement for quality assessment of food systems-a review. *Food and Bioprocess Technology*, 4(3), 364–386. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0370-0>
- Kato, A., & Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 624(1), 13–20.
- Kato, A., Osako, Y., Matsudomi, N., & Kobayashi, K. (1982). Changes in the emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47(1), 33–37.
- Keerati-U-Rai, M., & Corredig, M. (2009). Effect of dynamic high pressure homogenization on the aggregation state of soy protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3556–3562.

- Kim, H., Rebholz, C. M., Hegde, S., LaFiura, C., Raghavan, M., Lloyd, J. F., ... & Seidemann, S. B. (2021). Plant-based diets, pescatarian diets and COVID-19 severity: a population-based case-control study in six countries. *BMJ Nutrition, Prevention & Health*, 4(1), 257.
- Koç, B., & Kaymak-Ertekin, F. (2010). Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları. *Gıda*, 35(1), 1–8.
- Lee H., Yildiz G., dos Santos L.C., Jiang S., Andrade J.E., Engeseth N.J., & Feng H. (2016). Soy protein nano-aggregates with improved functional properties prepared by sequential pH treatment and ultrasonication, *Food Hydrocolloids*, 55: 200–209.
- Lee, H., Kim, H., Cadwallader, K. R., Feng, H., & Martin, S. E. (2013). Sonication in combination with heat and low pressure as an alternative pasteurization treatment—Effect on *Escherichia coli* K12 inactivation and quality of apple cider. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(4), 1131–1138.
- 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.
- Li K., Ma H., Li S., Zhang C., & Dai C. (2017) Effect of ultrasound on alkali extraction protein from rice dreg flour. *Journal of Food Process Engineering*, 40:12377.
- Li S., Yang X., Zhang Y., Ma H., Liang Q., Qu W., & Mahunu G.K. (2016) Effects of ultrasound and ultrasound assisted alkaline pretreatments on the enzymolysis and structural characteristics of rice protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31:20–28.
- Li, H., Zhu, K., Zhou, H., & Peng, W. (2011). Effects of high hydrostatic pressure on some functional and nutritional properties of soy protein isolate for infant formula. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(22), 12028–12036.
- Lo, B., Kasapis, S., & Farahnaky, A. (2022). Effect of low frequency ultrasound on the functional characteristics of isolated lupin protein. *Food Hydrocolloids*, 124, 107345.
- Longworth, J. W. (1983). Intrinsic fluorescence of proteins. In R. B. Cundall, & R. E. Dale (Ed.), *Time-resolved fluorescence spectroscopy in biochemistry and biology* (pp. 651–725). Springer.
- Lowe, E. A., & Evans, L. K. (1995). Industrial ecology and industrial ecosystems. *Journal of Cleaner Production*, 3(1–2), 47–53.
- Lu, R. R., Qian, P., Sun, Z., Zhou, X. H., Chen, T. P., He, J. F., ... & Wu, J. (2010). Hempseed protein derived antioxidative peptides: purification, identification and protection from hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Food Chemistry*, 123(4), 1210–1218.
- Luo, L., Wang, Z., Deng, Y., Wei, Z., Zhang, Y., Tang, X., ... & Li, P. (2022). High-pressure homogenization: A potential technique for transforming insoluble pea protein isolates into soluble aggregates. *Food Chemistry*, 397, 133684.
- Malik, M. A., Sharma, H. K., & Saini, C. S. 2017. High intensity ultrasound treatment of protein isolate extracted from dephenolized sunflower meal: Effect on physicochemical and functional properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 39, 511–519.

- Malomo, S. A., & Aluko, R. E. (2015). A comparative study of the structural and functional properties of isolated hemp seed (*Cannabis sativa* L.) albumin and globulin fractions. *Food Hydrocolloids*, 43, 743–752.
- Malomo, S. A., & Aluko, R. E. (2016). In vitro acetylcholinesterase-inhibitory properties of enzymatic hemp seed protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93, 411–420.
- Malomo, S. A., He, R., & Aluko, R. E. (2014). Structural and functional properties of hemp seed protein products. *Journal of Food Science*, 79(8).
- 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.
- Manamperi, W. A., Wiesenborn, D. P., Chang, S. K., & Pryor, S. W. (2011). Effects of protein separation conditions on the functional and thermal properties of canola protein isolates. *Journal of Food Science*, 76(3), 266–273.
- Margulis, M. A., & Margulis, I. M. (2003). Calorimetric method for measurement of acoustic power absorbed in a volume of a liquid. *Ultrasonics Sonochemistry*, 10(6), 343–345.
- Marketsandmarkets (2022, 19 Ekim) Plant based protein market. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/plant-based-protein-market>
- Martínez-Velasco, A., Lobato-Calleros, C., Hernández-Rodríguez, B. E., Román-Guerrero, A., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2018). High intensity ultrasound treatment of faba bean (*Vicia faba* L.) protein: Effect on surface properties, foaming ability and structural changes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 44, 97–105.
- McClements, D. J. (2007). Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(7), 611–649.
- McManus, J. J., Charbonneau, P., Zaccarelli, E., & Asherie, N. (2016). The physics of protein self-assembly. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 22, 73–79.
- Melchior, S., Moretton, M., Calligaris, S., Manzocco, L., & Nicoli, M. C. (2022). High pressure homogenization shapes the techno-functionalities and digestibility of pea proteins. *Food and Bioproducts Processing*, 131, 77–85.
- Mikulec, A., Kowalski, S., Sabat, R., Skoczylas, Ł., Tabaszewska, M., & Wywrocka-Gurgul, A. (2019). Hemp flour as a valuable component for enriching physicochemical and antioxidant properties of wheat bread. *LWT-Food Science and Technology*, 102, 164–172.
- Mir, N. A., Riar, C. S., & Singh, S. (2019). Physicochemical, molecular and thermal properties of high-intensity ultrasound (US) treated protein isolates from album (*Chenopodium album*) seed. *Food Hydrocolloids*, 96, 433–441.
- Morr, C. V., German, B., Kinsella, J. E., Regenstein, J. M., Buren, J. P. V., Kilara, A., ... Mangino, M. E. (1985). A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *Journal of Food Science*, 50(6), 1715–1718.

- Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2006). Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Research International*, 39(9), 945–963.
- 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*, 106789.
- Nazari, B., Mohammadifar, M. A., Shojaee-Aliabadi, S., Feizollahi, E., & Mirmoghtadaie, L. (2018). Effect of ultrasound treatments on functional properties and structure of millet protein concentrate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 41, 382–388.
- Nissen, L., di Carlo, E., & Gianotti, A. (2020). Prebiotic potential of hemp blended drinks fermented by probiotics. *Food Research International*, 131, 109029.
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2015). Investigation of the potential of hemp, pea, rice and soy protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides. *Food Digestion: Research and Current Opinion*, 6, 19–29.
- Ogawa, S., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2003). Production and characterization of O/W emulsions containing cationic droplets stabilized by lecithin–chitosan membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2806–2812.
- Oomah, B. D., Busson, M., Godfrey, D. V., & Drover, J. C. (2002). Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Food Chemistry*, 76(1), 33–43.
- Oreopoulou, V., & Russ, W. (Ed.). (2007). Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry. Springer.
- Pan, M., Xu, F., Wu, Y., Yao, M., Xiao, X., Zhang, N., ... & Wang, L. (2020). Application of ultrasound-assisted physical mixing treatment improves in vitro protein digestibility of rapeseed napin. *Ultrasonics Sonochemistry*, 67, 105136.
- 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.
- Phillips, L. G. (2013). Structure-function properties of food proteins. Academic Press.
- Pihlanto, A., Nurmi, M., & Mäkinen, S. (2020). Hempseed protein: Processing and functional properties. In G. Crini & E. Lichtfouse (Ed.), *Sustainable Agriculture Reviews* (pp. 223–237). Springer.
- Rahman, M. M., & Lamsal, B. P. (2021). Ultrasound-assisted extraction and modification of plant-based proteins: Impact on physicochemical, functional, and nutritional properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 1457–1480.
- 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.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231–1237.

- Ren, Y., Liang, K., Jin, Y., Zhang, M., Chen, Y., Wu, H., & Lai, F. (2016). Identification and characterization of two novel α -glucosidase inhibitory oligopeptides from hemp (*Cannabis sativa* L.) seed protein. *Journal of Functional Foods*, 26, 439–450.
- Resendiz-Vazquez J.A., Ulloa J.A., Urías-Silvas J.E., Bautista-Rosales P.U., Ramírez-Ramírez J.C., Rosas-Ulloa P., & González-Torres L. (2017) Effect of high-intensity ultrasound on the technofunctional properties and structure of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed protein isolate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37:436–444.
- Ruan, R. (2009). Dynamic high pressure micro-fluidization effects on structure and physico-chemical properties of egg white protein. *Chemical Research in Chinese Universities*.
- Sadat A., & Joye I.J. (2020) Peak fitting applied to fourier transform infrared and raman spectroscopic analysis of proteins. *Applied Sciences*, 10(17):5918.
- Saricaoglu, F. T., Gul, O., Besir, A., & Atalar, I. (2018). Effect of high pressure homogenization (HPH) on functional and rheological properties of hazelnut meal proteins obtained from hazelnut oil industry by-products. *Journal of Food Engineering*, 233, 98-108.
- Schluttenhofer C., & Yuan L. (2017) Challenges towards revitalizing hemp: a multifaceted crop. *Trends Plant Science*, 22:917–929.
- Sharma, N., Sahu, J. K., Choudhary, A., Meenu, M., & Bansal, V. (2023). High intensity ultrasound (HIU)-induced functionalization of foxtail millet protein and its fractions. *Food Hydrocolloids*, 134, 108083.
- 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, L., & Tang, C. H. (2012). Microfluidization as a potential technique to modify surface properties of soy protein isolate. *Food Research International*, 48(1), 108-118.
- Shirsath, S. R., Sonawane, S. H., & Gogate, P. R. (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 53, 10–23.
- Shou-Wei, Y., Chuan-He, T., & Qi-Biao, W. (2009). Effect of micro-fluidization treatment on conformational and functional properties of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L) protein isolates. *Journal of South China University of Technology: Natural Science Edition*.
- Song, X., Zhou, C., Fu, F., Chen, Z., & Wu, Q. (2013). Effect of high-pressure homogenization on particle size and film properties of soy protein isolate. *Industrial Crops and Products*, 43, 538-544.
- Stefanović A.B., Jovanović J.R., Dojčinović M.B., Lević S.M., Nedović V.A., Bugarski B.M., & Knežević-Jugović Z.D. (2017) Effect of the controlled high-intensity ultrasound on improving functionality and structural changes of egg white proteins. *Food Bioprocess Technology* 10(7):1224–1239.

- Szparaga, A., Tabor, S., Kocira, S., Czerwińska, E., Kuboń, M., Plóciennik, B., & Findura, P. (2019). Survivability of probiotic bacteria in model systems of non-fermented and fermented coconut and hemp milks. *Sustainability*, 11(21), 6093.
- 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.
- Teh, S. S., Bekhit, A. E. D. A., Carne, A., & Birch, J. (2016). Antioxidant and ACE-inhibitory activities of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysates produced by the proteases AFP, HT, Pro-G, actinidin and zingibain. *Food Chemistry*, 203, 199–206.
- Teh, S. S., Bekhit, A. E. D., Carne, A., & Birch, J. (2014). Effect of the defatting process, acid and alkali extraction on the physicochemical and functional properties of hemp, flax and canola seed cake protein isolates. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 8, 92–104.
- Tjøtta, S. (1999). Theoretical investigation of heat and streaming generated by high intensity ultrasound. *Acta Acustica united with Acustica*, 85(6), 780–787.
- Tu, Z. C., Wang, J. Q., Li, J. L., Liu, C. M., Ruan, R. S., & Li, X. T. (2007). Mechanochemical effects in the process of soybean protein ultra high-pressure microfluidization. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao/Chemical Journal of Chinese Universities*, 28(11), 2225–2228.
- TUIK (2022, 19 Ekim) Bitkisel Üretim İstatistikleri <https://www.tuik.gov.tr/>
- United Nations (2022, 19 Ekim) World Population-Prospects 2022 <https://www.un.org/development/desa/pd/content/World-Population-Prospects-2022>
- Vera A., Valenzuela A., Yazdani-Pedram M., Tapia C., & Abugoch L. (2019) Conformational and physicochemical properties of quinoa proteins affected by different conditions of high-intensity ultrasound treatments. *Ultrasonics Sonochemistry*, 51:186–196.
- Vonapartis, E., Aubin, M. P., Seguin, P., Mustafa, A. F., & Charron, J. B. (2015). Seed composition of ten industrial hemp cultivars approved for production in Canada. *Journal of Food Composition and Analysis*, 39, 8–12.
- Wang S., Wang J., Xue F., Li C. (2019) Effects of heating or ultrasound treatment on the enzymolysis and the structure characterization of hempseed protein isolates. *Journal of Food Science and Technology*, 56:3337–3346.
- Wang, C. H., & Damodaran, S. (1991). Thermal gelation of globular proteins: Influence of protein conformation on gel strength. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39 (3), 433–438.
- Wang, Q., & Xiong, Y. L. (2018). Zinc-binding behavior of hemp protein hydrolysates: Soluble versus insoluble zinc-peptide complexes. *Journal of Functional Foods*, 49, 105–112.
- Wang, Q., & Xiong, Y. L. (2019). Processing, nutrition, and functionality of hempseed protein: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.

- Wang, Q., Jiang, J., & Xiong, Y. L. (2018b). High pressure homogenization combined with pH shift treatment: A process to produce physically and oxidatively stable hemp milk. *Food Research International*, 106, 487–494.
- 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, W., Chen, W., Kahraman, O., Chantapakul, T., Ding, T., Liu, D., & Feng, H. (2020). Manothermosonication (MTS) treatment by a continuous-flow system: Effects on the degradation kinetics and microstructural characteristics of citrus pectin. *Ultrasonics Sonochemistry*, 63, 104973.
- Wang, Y., Wang, S., Li, R., Wang, Y., Xiang, Q., Li, K., & Bai, Y. (2022). Effects of combined treatment with ultrasound and pH shifting on foaming properties of chickpea protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 124, 107351.
- Wen, C., Zhang, J., Yao, H., Zhou, J., Duan, Y., Zhang, H., & Ma, H. (2019). Advances in renewable plant-derived protein source: The structure, physicochemical properties affected by ultrasonication. *Ultrasonics Sonochemistry*, 53, 83–98.
- Yang, J., Liu, G., Zeng, H., & Chen, L. (2018). Effects of high pressure homogenization on faba bean protein aggregation in relation to solubility and interfacial properties. *Food Hydrocolloids*, 83, 275–286.
- Yavuz, M., & Özçelik, B. (2016). Bitkisel protein izolatlarının fonksiyonel özellikleri. *Akademik Gıda*, 14(4), 424–430.
- Yildiz G., Andrade J., Engeseth N.E., & Feng H. (2017) Functionalizing soy protein nano-aggregates with pH-shifting and mano-thermosonication. *Journal of Colloid Interface Science*, 505:836–846.
- Yildiz, G., Ding, J., Andrade, J., Engeseth, N. J., & Feng, H. (2018). Effect of plant protein-polysaccharide complexes produced by mano-thermo-sonication and pH-shifting on the structure and stability of oil-in-water emulsions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 47, 317–325.
- Yin S.W., Tang C.H., Cao J.S., Hu E.K., Wen Q.B., & Yang X.Q. (2008) Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Food Chemistry*, 106:1004–1013.
- Yin, S. W., Tang, C. H., Wen, Q. B., & Yang, X. Q. (2009). Functional and structural properties and in vitro digestibility of acylated hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolates. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), 2653–2661.
- Yuanqing, H., Min, C., Lingling, S., Quancai, S., Pengyao, Y., Rui, G., ... & Haile, M. (2020). Ultrasound pretreatment increases the bioavailability of dietary proteins by dissociating protein structure and composition. *Food Biophysics*, 15(4), 409–415.
- Zahari, I., Ferawati, F., Helstad, A., Ahlström, C., Östbring, K., Rayner, M., & Purhagen, J. K. (2020). Development of high-moisture meat analogues with hemp and soy protein using extrusion cooking. *Foods*, 9(6), 772.

- 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.
- Zanoni, C., Aiello, G., Arnoldi, A., & Lammi, C. (2017). Hempseed peptides exert hypocholesterolemic effects with a statin-like mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(40), 8829–8838.
- Zayas, J. F. (1997). *Functionality of proteins in food*. Springer Science & Business Media.
- Zhang, Q. T., Tu, Z. C., Xiao, H., Wang, H., Huang, X. Q., Liu, G. X., ... & Lin, D. R. (2014). Influence of ultrasonic treatment on the structure and emulsifying properties of peanut protein isolate. *Food and Bioproducts Processing*, 92(1), 30–37.
- Zhang, Y., Wang, B., Zhang, W., Xu, W., & Hu, Z. (2019). Effects and mechanism of dilute acid soaking with ultrasound pretreatment on rice bran protein extraction. *Journal of Cereal Science*, 87, 318–324.
- Zhao, Q., Xie, T., Hong, X., Zhou, Y., Fan, L., Liu, Y., & Li, J. (2022). Modification of functional properties of perilla protein isolate by high-intensity ultrasonic treatment and stability of o/w emulsion. *Food Chemistry*, 368, 130848.
- Zheng, T., Li, X., Taha, A., Wei, Y., Hu, T., Fatamorgana, P. B., ... & Hu, H. (2019). Effect of high intensity ultrasound on the structure and physicochemical properties of soy protein isolates produced by different denaturation methods. *Food Hydrocolloids*, 97, 105216.
- Zhu Z., Zhu W., Yi J., Liu N., Cao Y., Lu J., Decker E.A., & McClements D.J. (2018) Effects of sonication on the physicochemical and functional properties of walnut protein isolate. *Food Research International*, 106:853–861.
- Zhu, J., & Fu, Q. (2012). Optimization of ultrasound-assisted extraction process of perilla seed meal proteins. *Food Science and Biotechnology*, 21, 1701–1706.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Gülşah KARABULUT

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2011, Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü
- **Yüksek lisans** : 2017, Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2022–2023 yılları arasında Amerika merkezli National Science Foundation (NSF) destekli sanayi-üniversite işbirliği organizasyonu Center for Advanced Research in Drying (CARD) kapsamındaki “Isıya hassas materyallerin ultrasonik temaslı kurutucu tasarımıyla kurutulması” isimli projede bursiyer olarak görev almıştır.
- 2022 yılında IFT22 konferansında (Chicago, Amerika) Isıl olmayan teknolojiler poster yarışmasında Başarı Ödülü’nü kazanmıştır.
- 2021-2023 yılları arasında doktora tez çalışmasının bir kısmını (1,5 yıl) Urbana-Champaign-İllinois Üniversitesi’nde (Amerika) ziyaretçi araştırmacı olarak tamamlamıştır.
- 2021–2023 yılları arasında Tübitak 2214-A Yurtdışı Doktora Sırası Araştırma Projesi kapsamında 1059B141900258 numaralı “Kenevir tohum proteinlerinin manotermosonikasyon uygulaması ile modifikasyonu” isimli araştırma projesi kabul edilmiştir.
- 2020–2023 yılları arasında TAGEM destekli TBAD/Ü/19/A7/P2/2278 nolu “Ülkesel mısır ıslah materyallinin kalite özelliklerinin belirlenmesi” isimli projede araştırmacı olarak görev almıştır.
- 2020–2021 yılları arasında Tübitak ARDEB destekli 119O488 nolu “Ultras ses ve yüksek basınç homojenizasyonlarının bezelye kabuk proteinleri üzerine etkilerinin araştırılması ve soya proteinine alternatif gıda bileşeni olarak kullanım potansiyelinin belirlenmesi” isimli projede bursiyer olarak görev almıştır.
- 2020 yılında Erasmus personel hareketliliği kapsamında Hohenheim Üniversitesi (Stuttgart, Almanya)’nde gözlemci araştırmacı olarak bulunmuştur.
- 2016–2017 yıllarında 2016-01-16-007 nolu ve “*Williopsis saturnus* var. *saturnus* içeren yenilebilir kaplamanın kaşar peyniri yüzeyinde uygulanmasının maya ve küf üremesine karşı antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi” isimli arge

kapsamındaki Sakarya Üniversitesi destekli bilimsel araştırma projesinde (BAP) araştırmacı olarak yer almıştır.

- 2014 yılından beri Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.
- 2010 yılında Erasmus staj programı kapsamında IRTA (Girona, İspanya) araştırma merkezinde 3 aylık yaz stajını tamamlamıştır.

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER:

- Karabulut, G., Kapoor, R., Yemiş, O., Feng, H. (2023). Manothermosonication, high-pressure homogenization, and their combinations with pH-shifting improve the techno-functionality and digestibility of hemp protein - *Food Hydrocolloids* (Under review)
- 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., Kapoor, R., Feng, H. (2022). Improvement of the physicochemical properties of hemp seed protein: The pH-shifting and its combination with high-pressure homogenization (Oral presentation), ACS Green Chemistry, Haziran 6–8, 2022, Reston, ABD.
- Karabulut, G., Kapoor, R., Feng, H.(2022). Modification of hemp protein isolate by pH-shifting, high-pressure homogenization, and pH-shift + high-pressure homogenization, IFT22, Temmuz 10–13, 2022, Şikago, ABD.
- Karabulut, G., & Yemiş, O. (2021). Ultrases uygulaması ile kenevir tohum protein izolat çözünürlüğünün yanıt yüzey yöntemi ile optimize edilmesi. UBCAK 5. Uluslararası Bilimsel Çalışmalar Kongresi, Mart 15–17, 2021, online.

DİĞER ESERLER:

- Karabulut, G., & Yemiş, O. (2019). Fenolik bileşiklerin bağlı formları ve biyoyararlılığı. *Akademik Gıda*, 17(4), 526–537.
- Karabulut, G., & Cagri-Mehmetoglu, A. (2018). Antifungal, mechanical, and physical properties of edible film containing *Williopsis saturnus* var. *saturnus* antagonistic yeast. *Journal of Food Science*, 83(3), 763–769.
- Karabulut, G., Efendioğlu, B., Kurtuluş, B., Turan, E., Kuyumcu, H., Şule, E., & Mehmetoğlu, A. Ç. (2018). *Bacillus subtilis* içeren yenilebilir kaplama uygulamasının çileğin raf ömrüne etkisi. *Gıda*, 43(1), 53–63.