



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ŞEKER PANCARI (*BETA VULGARIS*) YAPRAĞI EKSTRAKTININ
FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**ZEYNEP AKKAYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ**



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ŞEKER PANCARI (*BETA VULGARIS*) YAPRAĞI EKSTRAKTININ
FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**ZEYNEP AKKAYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Levent Yurdaer AYDEMİR**

ADANA, YIL 2025

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak, bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın hazırladığım bu tez çalışmasında;

Bu tezin özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin akademik kurallara ve etik davranışa uygun olarak elde edilerek sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, tez kapsamında bu kuralların ve davranışların gerektirdiği şekilde bu çalışmaya özgün olmayan tüm veri ve bilgiler için bilimsel etik ve gelenek çerçevesinde kaynak gösterdiğimi; bu kaynakları da kaynakçada belirttiğimi beyan ederim. Çalışmam ile ilgili yaptığım beyana aykırı bir durum saptanması halinde tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

10/06/2025

[İmza]

Zeynep AKKAYA

ÖZET

ŞEKER PANCARI (*BETA VULGARIS*) YAPRAĞI EKSTRAKTININ FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

ZEYNEP AKKAYA

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. LEVENT YURDAER AYDEMİR

Haziran 2025, 75 sayfa

Gıda proteinleri, vücudun ihtiyaç duyduğu amino asitlerin temel kaynağını oluşturmakta ve hem bitkisel hem de hayvansal kaynaklardan elde edilmektedir. Artan dünya nüfusu sürdürülebilir yeni protein kaynaklarına olan gereksinimi artırırken, bitkisel kaynaklar düşük maliyet, erişilebilirlik ve besleyici değerleriyle öne çıkmaktadır. Şeker pancarı (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*), kökü şeker üretiminde değerlendirilen, yaprak kısmı ise çoğunlukla yem veya atık olarak kalan bir ham maddedir. Kuru maddede ikinci büyük fraksiyonu oluşturan protein dikkate alınarak, bu çalışmada şeker pancarı yapraklarından farklı yöntemlerle protein ekstraksiyonu ve biyofonksiyonel özelliklerin incelenmesi amaçlanmıştır. Protein ekstraksiyonu için üç çöktürme yöntemi (ısı, izoelektrik nokta, amonyum sülfat) ile ultrases destekli sekiz enzimatik protokol (Koşul 1–8) uygulanmıştır. Ultrases işlemleri %60 genlikte, 20 dakika kesikli modda yürütülmüş; bazı protokollerde Viscozyme®, pektinaz ve cellulysin enzimleri kullanılmıştır. Elde edilen ekstraktlarda toplam/çözünür protein, toplam fenolik madde, antioksidan kapasiteler (DPPH, ABTS) ve enzim inhibisyon aktiviteleri (ACE, α -amilaz, lipaz) belirlenmiştir. Çöktürme yöntemleri arasında PF2 (izoelektrik çöktürme) en yüksek toplam protein içeriğini verirken, PF1 (ısı çöktürme–süpernatant) en yüksek çözünür protein, fenolik içerik ve antioksidan kapasiteyi göstermiştir; lipaz inhibisyonu da PF1’de en yüksek bulunmuştur. ACE ve α -amilaz inhibisyonu tespit edilememiştir. Ultrases destekli enzimatik protokoller, çöktürmeye kıyasla daha yüksek verimler sağlamıştır. Ultrasesin enzimden önce uygulanması (ön-ultrases) ekstraksiyon verimini anlamlı biçimde artırmıştır ($p<0,05$). Nitekim Koşul 3’te protein içeriği %16,47 ve verim %67,23 ile en yüksek değerlere ulaşılmış; Koşul 5’te %12,63 ve %51,54; Koşul 7’de ise %15,90 ve %63,71 elde edilmiştir. Ayrıca enzim inaktivasyonunun santrifüjden sonra yapılması (ör. Koşul 5), protein

özünrlüğünü koruyarak toplam verimi yükseltmiştir. Sonuçlar, şeker pancarı yapraklarının fonksiyonel proteinler için uygun bir hammadde olduğunu ve özellikle ultrases–enzim kombinasyonunun endüstriyel ölçekte uygulanabilir, verimli ve sürdürülebilir bir ekstraksiyon yaklaşımı sunduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan aktivite, biyoaktif aktivite, enzim inhibisyon aktivite, şeker pancarı yaprağı, ultrases destekli enzimatik hidroliz



ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF SUGAR BEET (*BETA VULGARIS*) LEAF EXTRACT

ZEYNEP AKKAYA

M.Sc., Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Levent Yurdaer Aydemir

June 2025, 75 pages

Food proteins constitute the main source of amino acids needed by the body and are obtained from both plant and animal sources. While the increasing world population is increasing the need for new sustainable protein sources, plant sources stand out with their low cost, accessibility, and nutritional value. Sugar beet (*Beta vulgaris L. ssp. vulgaris*) is a raw material whose root is utilized in sugar production, while the leaves are mostly left as feed or waste. Considering that protein constitutes the second largest fraction in dry matter, this study aimed to investigate protein extraction from sugar beet leaves using different methods and their biofunctional properties. Three precipitation methods (heat, isoelectric point, ammonium sulfate) and eight ultrasound-assisted enzymatic protocols (Conditions 1–8) were applied for protein extraction. Ultrasound treatments were conducted at 60% amplitude in batch mode for 20 min; in some protocols, Viscozyme®, pectinase, and cellulysin enzymes were used. Total/soluble protein, total phenolic substance, antioxidant capacities (DPPH, ABTS) and enzyme inhibition activities (ACE, α -amylase, lipase) were determined in the obtained extracts. Among the precipitation methods, PF2 (isoelectric precipitation) gave the highest total protein content, while PF1 (heat precipitation–supernatant) showed the highest soluble protein, phenolic content and antioxidant capacity; lipase inhibition was also found to be the highest in PF1. ACE and α -amylase inhibition could not be detected. Ultrasound-assisted enzymatic protocols provided higher yields compared to precipitation. Application of ultrasound before the enzyme (pre-ultrasound) significantly increased the extraction yield ($p<0.05$). Indeed, the highest values were reached with 16.47% protein content and 67.23% yield in Condition 3; 12.63% and 51.54% in Condition 5; In Condition 7, 15.90% and 63.71% were obtained. Furthermore, performing enzyme inactivation after centrifugation (e.g., Condition 5) increased

the total yield while preserving protein solubility. The results demonstrate that sugar beet leaves are a suitable raw material for functional proteins, and the ultrasound-enzyme combination, in particular, offers an efficient and sustainable extraction approach applicable on an industrial scale.

Keywords: Antioxidant activity, bioactive activity, enzyme inhibitory activity, sugar beet leaves, ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis



İthaf

Bu tezi rahmetli babam Ramazan Seyhan ve rahmetli ağabeyim Alaattin Seyhan'a, aynı zamanda hiçbir zaman desteğini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan sevgili eşim Ahmet Akkaya'ya ithaf ediyorum...



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, tez ve laboratuvar çalışmalarında bana rehberlik eden, değerli fikir ve bilgileriyle yol gösteren tez danışmanım Sayın Levent Yurdaer Aydemir'e sonsuz teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Sevgili arkadaşlarım Esra Koca Yağmurca ve Melike Beyza Özdemir'in deneysel çalışmalarım boyunca bilgi, tecrübe ve manevi desteklerini benden esirgemedikleri ve her zaman yanımda oldukları için çok teşekkür ederim.

Bu çalışma 120R078 proje numarası ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

İçindekiler	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANNAMESİ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
<i>İthaf</i>	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xi
KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Proteinler	1
1.2. Bitkisel Proteinler	3
1.3. Şeker Pancarı ve Yaprakları	4
1.4. Proteinlerin Saflaştırılması	5
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	10
3. MATERYAL VE METOT	15
3.1. Materyal	15
3.2. Metot	15
3.3. Şeker Pancarı Yaprak Tozu Üretimi	15
3.4. Protein Ekstraksiyonu	16
3.4.1. Isı ile çöktürme yöntemi	16
3.4.2. İzoelektrik noktada çöktürme	16
3.4.3. Amonyum sülfat yardımıyla çöktürme	16
3.5. Ultrases Destekli Protein Ekstraksiyonu	18
3.6. Analiz Yöntemleri	23
3.6.1. Numunelerde toplam fenolik madde tayini	23
3.7. Örneklerde ezim inhibisyon aktivite tayinleri	23
3.7.1.1. α -Amilaz inhibisyon deneyi	23
3.7.1.2. Lipaz inhibisyon deneyi	24

3.7.1.3.	Antihipertansif aktivite	25
3.7.2.	Örneklerde antioksidan aktivite tayinleri	25
3.7.2.2.	DPPH deneyi	25
3.7.2.3.	ABTS deneyi	26
3.7.2.4.	Hidroksil (OH ⁻) radikali bağlama kapasitesi	27
3.7.3.	Örneklerde çözünür protein miktarı tayini	27
3.7.4.	Örneklerde toplam protein tayini	28
3.7.5.	Örneklerde istatistiksel değerlendirme	29
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	30
4.1.	Şeker Pancarı Yapraklarından Elde Edilen Protein Ekstraktlarının Toplam Protein Ve Protein Verimleri	30
4.2.	Ultrases Destekli Ekstraksiyon Yöntemi ile Şeker Pancarı Yapraklarından Elde Edilen Ekstraktlarda Toplam Protein ve Protein Verimleri	32
4.2.1.	Koşul 1 ve koşul 2’de üretilen ekstraktların protein içerikleri ve protein verimleri	32
4.2.2.	Koşul 3 ve koşul 4’de üretilen ekstraktların protein içerikleri ve protein verimleri	34
4.2.3.	Koşul 5 ve koşul 6’de üretilen ekstraktların protein içerikleri ve protein verimleri	35
4.2.4.	Koşul 7 ve koşul 8’de üretilen ekstraktların protein içerikleri ve protein verimleri	38
4.3.	Şeker pancarı yapraklarından elde edilen protein ekstraktlarının suda çözünür protein miktarı	39
4.4.	Şeker pancarı yapraklarından elde edilen protein ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı	41
4.5.	Şeker pancarı yapraklarından elde edilen protein ekstraktlarının ABTS +, DPPH ve OH ⁻ radikali bağlama aktivitesi	43
4.6.	Şeker pancarı yapraklarından elde edilen protein ekstraktlarının enzim inhibisyon aktiviteleri	46
5.	SONUÇLAR	48
	KAYNAKÇA	50

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Proteinlerin Yapısı	2
Şekil 3.1. a. Şeker pancarı yaprağının taze hali b. Etüvde kurutulan şeker pancarı yaprak örneği c. Kurutulmuş yapraklardan elde edilen şeker pancarı yaprak tozu	14
Şekil 3.2. Şeker pancarı yaprağı diyaliz uygulaması	16
Şekil 3.3. Gallik asit kalibrasyon eğrisi	22
Şekil 3.4. Trolox kalibrasyon eğrisi	25
Şekil 3.5. BSA kalibrasyon eğrisi	26

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. Koşul 1 ve koşul 2 uygulanan ekstraksiyon koşulları ve işlem basamakları	18
Tablo 3.2. Koşul 3 ve koşul 4 uygulanan ekstraksiyon koşulları ve işlem basamakları	19
Tablo 3.3. Koşul 5 ve koşul 6 uygulanan ekstraksiyon koşulları ve işlem basamakları	20
Tablo 3.4. Koşul 7 ve koşul 8 uygulanan ekstraksiyon koşulları ve işlem basamakları	21
Tablo 4.1. Protein fraksiyonlarının toplam protein ve protein verimi analiz sonuçları	29
Tablo 4.2. Koşul 1 ve Koşul 2’de üretilen ekstraktların protein içerikleri ve protein verimleri	31
Tablo 4.3. Koşul 3 ve Koşul 4’te üretilen ekstraktların protein içerikleri ve protein verimleri	33
Tablo 4.4. Koşul 5 ve Koşul 6’de üretilen ekstraktların protein içerikleri ve protein verimleri	34
Tablo 4.5. Koşul 7 ve Koşul 8’de üretilen ekstraktların protein içerikleri ve protein verimleri	36
Tablo 4.6. Protein fraksiyonlarının suda çözünür protein miktarı analiz sonuçları	38
Tablo 4.7. Protein fraksiyonlarının toplam fenolik madde miktarı analiz sonuçları	40
Tablo 4.8. Protein fraksiyonlarının ABTS +, DPPH ve OH ⁻ Radikali Bağlama analiz sonuçları	41
Tablo 4.9. Protein fraksiyonlarının enzim inhibisyon aktivite tayinleri analiz sonuçları	45

KISALTMALAR

ABTS: 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)

DPPH: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil serbest radikali

ADE: Anjiyotensin-dönüştürücü enzim

BSA : Bovine Serum Albumin

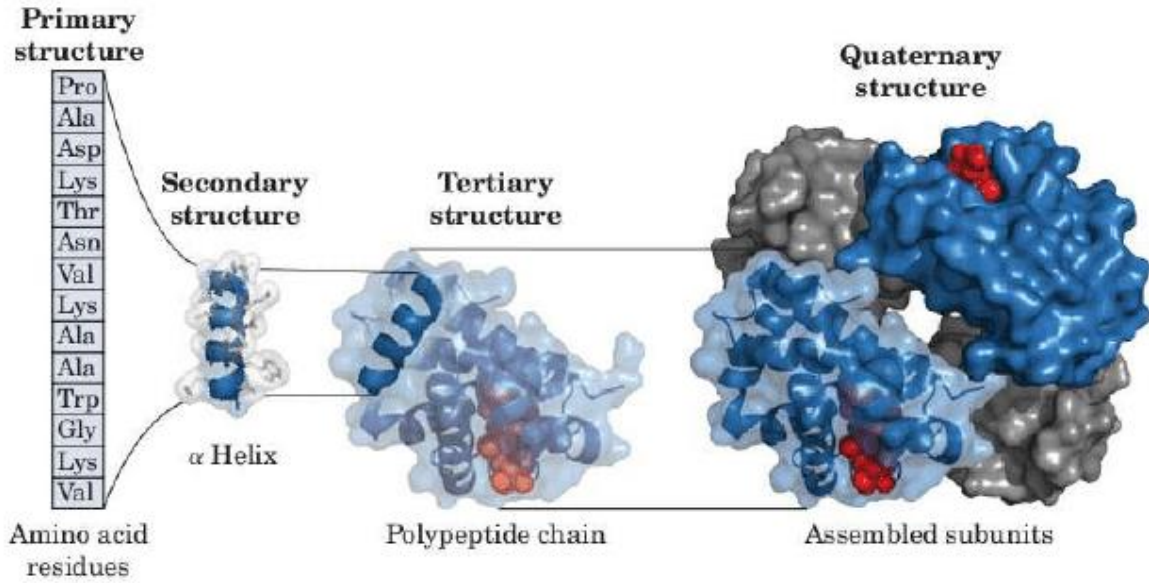


1. GİRİŞ

1.1. Proteinler

Proteinler, insan vücudu için önemli rol oynayan ve hayati öneme sahip olan temel besin maddeleridir (WHO, 2007). İşlevsel ve yapısal olarak çeşitlilik gösteren proteinler, enzimler, yapısal bileşenler, taşıyıcılar, hormonlar ve savunma molekülleri gibi vücuttaki birçok biyolojik sürecin düzenlenmesine ve sürdürülmesine katkıda bulunurlar. Proteinler, amino asitlerin peptit bağlarıyla bir araya gelmesiyle oluşan karmaşık biyomoleküllerdir. Bu yapılardaki amino ve karboksil gruplarının etkileşimi sonucunda, bir amino asidin amino grubu ile diğerinin karboksil grubu arasında peptit bağları meydana gelir. Amino grubu (NH_2) aminoasitlerin adını aldıkları gruptur. Bu grup, azot atomuna ve iki hidrojen atomuna sahip bir amin grubudur. Amino grubu, protein sentezi sırasında peptit bağlarının oluşmasında önemli rol oynar. Karboksil grubu (COOH) amino asitlerin bir diğer önemli bileşenidir. Karboksil grubu, bir karbon atomuna bir oksijen atomu ve bir hidrojen atomu bağlı olan bir karboksilik asit grubudur. Bu grup, protein sentezi sırasında peptid bağlarının oluşmasında karbonil grubuyla reaksiyona girer. Amino asitlerde karbon atomuna bağlı bir hidrojen atomu içerirler ve amino asidin genel yapısının bir parçasıdır. Amino asitleri birbirinden ayıran ve özgün özellikleri kazandıran kısımda yan zincirdir (R grubu). Her amino asidin yan zinciri farklı olabilir ve çeşitli kimyasal gruplar içerebilir. Yan zincirler, amino asitlerin hidrofilik (suda çözünme) veya hidrofobik (suda çözünmeme) olma özelliklerini belirler. Proteinlerin yapısal ve fonksiyonel özellikleri, onların katlanmış yapısının ve amino asit diziliminin bir sonucudur. Bu özellikler, proteinlerin spesifik işlevlerini yerine getirmesine ve biyolojik sistemlerde çeşitli roller üstlenmesine olanak tanır. Yapı bakımından proteinler dört bölümden oluşmaktadırlar. Bunlar, primer (birincil), sekonder (ikincil), tersiyer (üçüncül) ve kuarterner (dördüncül) yapılarıdır. Amino asitlerin peptit bağlarıyla bir araya gelerek oluşturdukları düz polimer zinciri, proteinin birincil yapısını oluşturur. Bir proteinin birincil yapısı, onun üç boyutlu yapısını belirler. Bu nedenle, birincil yapıdaki amino asit değişiklikleri, proteinin üç boyutlu konformasyonunu ve işlevini etkileyebilir. Proteinlerin üç boyutlu yapıları, onların spesifik işlevlerini yerine getirebilmesi için kritiktir ve bu yapıların doğru oluşturulması, proteinlerin biyolojik aktivitesini sağlar. Proteinin sekonder yapısı, polipeptit zincirindeki amino asitlerin belirli bir

şekilde kıvrılması veya katlanması sonucunda oluşmaktadır. Amino asitler arasındaki kimyasal etkileşimlerin ve hidrojen bağlarının rol oynadığı bir yapıdır ve en yaygın olarak ikincil yapılar α -heliks ve β -tabakadır. Tersiyer yapı ise, ikincil yapıların daha karmaşık bir şekilde katlanması ve polipeptit zincirindeki çeşitli kovalent ve kovalent olmayan etkileşimlerin sonucunda oluşmaktadır. Bu etkileşimler arasında hidrojen bağları, iyonik bağlar, hidrofobik etkileşimler, van der Waals etkileşimleri, polar etkileşimler ve disülfid bağları yer almaktadır. Üçüncül yapı, tüm protein zincirinin üç boyutlu konformasyonunu gösterir. Bu yapı, proteinin biyolojik olarak aktif hale gelmesini sağlar. Üçüncül yapı, proteinin fonksiyonunu belirler ve bu yapıdaki herhangi bir değişiklik proteinin işlevini doğrudan etkileyebilir (Nelson & Cox, 2017). Bazı proteinlerde ise iki ya da daha fazla polipeptit zinciri, hidrofobik etkileşimler ve diğer zayıf bağlarla bir araya gelerek kuaterner yapıyı oluşturur. Bununla birlikte bazı proteinlerde, birden fazla polipeptit zincirinin birleşmesiyle oluşan kuaterner (dördüncül) yapı, proteinin tam işlevselliğini kazanmasında kritik rol oynamaktadır (Branden & Tooze, 1999; Lodish ve ark., 2000)



Şekil 1.1. Proteinlerin Yapısı (Schmid, S. (2014).

1.2. Bitkisel Proteinler

İnsanların beslenme ihtiyaçları açısından temel besin öğelerinden biri proteinlerdir. Geleneksel olarak bu protein ihtiyacı et, süt ürünleri ve balık gibi hayvansal gıdalardan karşılanmaktadır. Ancak günümüzde dünya nüfusunun hızla artması, sürdürülebilir gıda sistemleri açısından hayvansal kaynaklı protein üretiminin çevresel etkileri ve ekonomik sürdürülebilirliği konusunda ciddi endişelere neden olmuştur. Hayvansal protein üretimi yüksek miktarda su, enerji ve arazi kullanımına yol açmakta ve sera gazı emisyonlarının önemli bir kaynağı olarak çevresel yük oluşturmaktadır (Poore & Nemecek, 2018). Bu durum, alternatif ve daha sürdürülebilir protein kaynakları olan bitkisel proteinlere yönelik ilgiyi artırmaktadır. Bitkisel protein kaynakları, fasulye, mercimek, nohut, bezelye, soya, badem, fındık, çeşitli tohumlar, tahıllar, kinoa ve yeşil yapraklı sebzeler gibi çok geniş bir yelpazede bulunmaktadır. Bu kaynaklar, protein ihtiyacını karşılamamanın yanı sıra besinsel ve fonksiyonel özellikler bakımından da oldukça zengindir (Joshi & Kumar, 2015; Sá ve ark., 2020). Bitkisel proteinlerin temel avantajlarından biri, doymuş yağ ve kolesterol içermemeleri ya da çok az içermeleridir. Ayrıca, lif, vitaminler (özellikle B vitaminleri ve E vitamini) ve mineraller (magnezyum, potasyum ve demir gibi) açısından zengin olmaları nedeniyle sağlıklı beslenme açısından da avantajlıdır (Day, 2013). Bitkisel kaynaklı proteinlerin amino asit profili, bazı kaynaklarda hayvansal proteinlerden farklılıklar gösterse de çeşitli bitkisel gıdaların kombinasyonu ile vücudun ihtiyaç duyduğu tüm esansiyel amino asitler dengeli bir biçimde sağlanabilmektedir. Örneğin, baklagiller lizin bakımından zengin ancak metiyonin açısından sınırlıyken, tahıllar tam tersi şekilde metiyonin açısından zengin ancak lizin açısından sınırlıdır. Bu gıdaların birlikte tüketimi, protein kalitesini ve biyoyararlanımı artırmaktadır (Henchion ve ark., 2017; Sá ve ark., 2020). Bitkisel proteinler ayrıca alerji riski ve laktoz intoleransı gibi sağlık sorunları yaşayan bireyler için ideal bir alternatif oluşturur. Özellikle vegan ve vejetaryen diyetlerin popüler hale gelmesiyle birlikte, bitkisel protein ürünleri tüketici talebinde belirgin bir artış yaşamıştır. Bu bağlamda, protein izolatları ve konsantreleri şeklinde üretilen bitkisel proteinlerin kullanımı, gıda endüstrisinde protein takviyesi, fonksiyonel gıdalar ve et alternatifi ürünlerin geliştirilmesinde yaygınlaşmaktadır (Boye ve ark., 2010). Bitkisel proteinlerin üretim süreçleri, çevresel etkileri bakımından hayvansal proteinlere göre daha düşük karbon ayak izine sahip olduğundan, sürdürülebilir gıda sistemleri ve çevre koruma politikalarında da önemli bir yere sahiptir. Bu durum, tarımsal üretim sistemlerinin çevresel sürdürülebilirliği açısından

büyük önem taşımakta ve geleceğin gıda güvenliği politikalarının oluşturulmasında merkezi bir rol oynamaktadır (Aiking & de Boer, 2020).

1.3. Şeker Pancarı ve Yaprakları

Şeker pancarı (*Beta vulgaris L.*), Amaranthaceae familyasına ait ekonomik değeri yüksek bir endüstriyel bitkidir. Fotosentez mekanizması bakımından C3 bitkileri arasında sınıflandırılan şeker pancarı, özellikle ılıman iklim koşullarında ve iyi drene edilmiş verimli topraklarda yetiştirilir (Zicari ve diğerleri, 2019). Şeker üretimi amacıyla yaygın olarak yetiştirilen şeker pancarının kökleri, hasattan sonra fabrikalarda işlenerek kristal şeker elde edilir. Yapraklar ise genellikle hayvan beslenmesinde yem olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, yaprakların yüksek protein içeriği ve besleyici özellikleri nedeniyle alternatif değerlendirme yöntemleri üzerine yapılan çalışmalar giderek artmaktadır (Tamayo Tenorio ve diğerleri, 2017). Şeker pancarı yaprakları, yüksek besin değeri açısından önemli bir potansiyele sahiptir. Taze yaprakların yaklaşık %3'ü proteinlerden oluşurken, yaprakların büyük kısmı (%85-90) sudan ibarettir. Ancak kuru madde bazında değerlendirildiğinde, protein içeriği %30'a kadar çıkabilmektedir (Merodio ve Sabater, 1988; Jwanny ve diğerleri, 1993; Lammens ve diğerleri, 2012; Kiskini ve diğerleri, 2016; Tamayo Tenorio ve diğerleri, 2017; Akyüz ve Ersus, 2021). Şeker pancarı yaprağı proteinleri, dengeli ve besleyici bir amino asit profiline sahip olup, özellikle serin amino asidi başta olmak üzere treonin, valin, fenilalanin, izolösin ve lösin gibi esansiyel amino asitleri önemli miktarlarda içerir (Akyüz ve Ersus, 2021). Yaprakların yağ içeriği oldukça düşüktür; ancak yaprakların %20'ye kadar varan kül içeriği, yüksek miktarlarda makro ve mikro elementleri barındırmaktadır. Bu elementler arasında fosfor (P), potasyum (K), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), sodyum (Na), çinko (Zn), bakır (Cu), demir (Fe), mangan (Mn), bor (B) ve molibden (Mo) bulunur (Tamayo Tenorio ve diğerleri, 2016). Bu mineraller, yaprakların hem besleyici değerini artırmakta hem de protein ekstraksiyonu ve fonksiyonel gıda üretimi açısından avantajlar sunmaktadır. Gıda endüstrisinde kullanılan protein kaynakları genellikle hayvansal ve bitkisel olarak sınıflandırılır. Hayvansal proteinler biyoyararlanım açısından üstün olsa da bitkisel proteinlerin ekonomik olarak daha uygun ve sürdürülebilir kaynaklar olması, alternatif protein kaynakları arayışında onları ön plana çıkarmaktadır. Bitkisel proteinler genellikle tahıllar, baklagiller ve yağlı tohumlardan elde edilmekle birlikte, yeşil yapraklı sebzeler de yüksek protein ve besleyici değerleri nedeniyle potansiyel alternatif

kaynaklar arasında gösterilmektedir (Day, 2013; Sá ve ark., 2020). Artan küresel nüfus, bu kaynakların daha etkin değerlendirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu bağlamda, bitkisel proteinler, geniş çaplı üretim imkânı, düşük çevresel etkileri, ekonomik avantajları ve geniş tüketici kitlesine hitap edebilme potansiyelleri nedeniyle büyük önem kazanmaktadır (Boye ve diğerleri, 2010; Aiking ve de Boer, 2020). Şeker pancarı yaprakları gibi tarımsal yan ürünlerin protein açısından değerlendirilmesi, bu kapsamda önemli bir araştırma alanını oluşturmaktadır.

1.4. Proteinlerin Saflaştırılması

Proteinlerin biyolojik materyallerden saflaştırılması ve izole edilmesi, genellikle birden fazla fiziksel ve kimyasal işlemin bir arada uygulandığı çok basamaklı bir süreçtir. Bu süreçte tercih edilen yöntemler; çökeltme, kromatografik ayırma, elektroforez, santrifügasyon ve ultrafiltrasyon gibi teknikleri içermektedir. Hangi yöntem veya yöntemlerin seçileceği ise büyük ölçüde hedef proteinin çözünürlük, stabilite ve moleküler yapı gibi özgün özelliklerine bağlı olarak belirlenmektedir (Scopes, 1994). Proteinlerin ayrılması ve saflaştırılmasında kullanılan kromatografi ve elektroforez gibi yöntemler, proteinlerin yük, moleküler büyüklük ve yapısal konformasyon gibi karakteristik fiziksel özelliklerinden yararlanılarak uygulanmaktadır. İyon değişim kromatografisi, proteinlerin yüzeysel net yüklerine göre sabit faza bağlanarak ayrılmasına olanak tanırken; jel filtrasyon (moleküler eleme) kromatografisi, proteinleri boyutlarına göre fraksiyonlara ayırmakta ve genellikle saflaştırmanın ileri aşamalarında tercih edilmektedir (Janson, 2012). Elektroforetik teknikler ise, özellikle sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) gibi yöntemlerle, proteinlerin moleküler kütlelerinin belirlenmesi ve yapısal özelliklerinin değerlendirilmesi açısından yaygın biçimde kullanılmaktadır (Laemmli, 1970). Protein ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılan çöktürme yöntemleri, proteinlerin çözünürlük özelliklerine dayalı olarak geliştirilmiştir. Bu teknikler, ortam koşullarının değiştirilmesi yoluyla proteinlerin çözünürlüklerinin azaltılması ve böylece ortamdan ayrıştırılmasını hedefler. Amonyum sülfat çöktürmesi, tuz konsantrasyonunun artırılmasıyla suyun protein üzerindeki hidrasyon etkisinin azalmasına neden olur ve bu sayede proteinlerin selektif olarak çökmesini sağlar. Bu yöntem, düşük maliyeti ve ölçeklenebilirliği nedeniyle endüstriyel uygulamalarda sıkça tercih edilmektedir. Benzer şekilde, izoelektrik noktada çöktürme ise, proteinin net yükünün sıfırlandığı pH aralığında çözünürlüğünün minimuma inmesi prensibine dayanır. Ayrıca, aseton ve etanol gibi

organik çözücülerin kullanıldığı çöktürme uygulamaları da proteinleri ortamdan ayırtırmada etkili alternatifler sunmaktadır (Rattanachomsri ve ark., 2009). Geleneksel protein ekstraksiyon yöntemleri, gıda ve biyoteknoloji endüstrisinde yaygın şekilde kullanılmakla birlikte, bazı önemli sınırlılıklar barındırmaktadır. Bu tekniklerde genellikle hedef proteinin düşük verimle elde edilmesi, ürünün fonksiyonel ve besinsel kalitesinin istenilen düzeyde olmaması ve kullanılan kimyasalların çevresel yük oluşturmaları gibi sorunlar öne çıkmaktadır (Puri, Sharma & Barrow, 2012). Ayrıca, sert çözücüler, yüksek sıcaklıklar ve uzun işlem süreleri gibi şiddetli proses koşulları hem protein yapısında bozulmalara yol açmakta hem de ekonomik maliyetleri artırmaktadır. Bu bağlamda, daha sürdürülebilir ve verimli ekstraksiyon süreçlerinin geliştirilmesi amacıyla alternatif ön işlem tekniklerine olan ilgi giderek artmaktadır. Bu doğrultuda, hem ısı hem de ısı olmayan çeşitli yenilikçi yöntemler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Isıl uygulamalardan biri olan enzim destekli ekstraksiyon, özellikle hücre duvarlarının seçici enzimlerle parçalanarak proteinlerin matriksten daha etkin şekilde serbest bırakılmasını sağlar; aynı zamanda hedef proteinlerin doğal yapısını koruma avantajı sunar (Hardouin ve ark., 2016). Mikrodalga destekli ekstraksiyon ise materyalin hızlı ve homojen bir şekilde ısınmasını sağlayarak hücrel içeriklerin salımını kolaylaştırmakta ve böylece ekstraksiyon verimini artırmaktadır (Choi ve ark., 2006). Ohmik ısıtma yöntemi ise, elektrik akımı yardımıyla materyalin içsel direnci üzerinden doğrudan ısı üreterek proteinlerin hücre dışına geçişini teşvik etmektedir (Nair ve ark., 2014). Son yıllarda sürdürülebilir gıda teknolojilerine yönelik artan ilgi, ısı olmayan ekstraksiyon yöntemlerinin önemini giderek artırmıştır. Bu yenilikçi teknikler, hem çevre dostu olmaları hem de proteinlerin yapısal bütünlüğünü koruma potansiyelleri sayesinde öne çıkmaktadır. Bu yöntemlerden biri olan ultrasonik ekstraksiyon, yüksek frekanslı ses dalgaları aracılığıyla ortamdaki kaviteasyon etkisini tetikleyerek hücre yapılarının parçalanmasını sağlar ve böylece proteinlerin matriksten çözünmesi sürecini hızlandırır (Chittapalo & Noomhorm, 2009; Yagoub ve ark., 2017). Benzer şekilde, yüksek hidrostatik basınç (HHP) uygulamaları, materyalin tamamına eşit biçimde uygulanan yüksek basınç sayesinde hücre duvarlarının bütünlüğünü bozarak proteinlerin salımını kolaylaştırmakta ve bu sırada proteinlerin fonksiyonel özelliklerini büyük ölçüde korumaktadır (Cao ve ark., 2018). Alternatif olarak kullanılan vurgulu elektrik alan (PEF) teknolojisi, hücre membranında geçici porlar (gözenekler) oluşturarak hücre içeriğinin dış ortama geçişini desteklemekte; bu süreç düşük enerji tüketimi ile yüksek ekstraksiyon verimi

sağlamaktadır (Zhou ve ark., 2017). Tüm bu ısı olmayan ön işlem teknolojilerinin temel hedefi, protein ekstraksiyonunda hem çevresel etkileri azaltmak hem de ürün kalitesini ve verimini artırmaktır. Bu nedenle, geleneksel yöntemlerin sınırlamalarını aşmak amacıyla geliştirilen bu modern teknikler, gıda endüstrisinden farmasötik uygulamalara kadar birçok alanda yaygın biçimde kullanılmaya başlanmıştır. Enzim destekli ekstraksiyon yöntemi ile daha ılımlı koşullarda daha yüksek verim ve kalitede, üstün fonksiyonel özellikli ve besleyici değeri yüksek protein izolatlarının eldesi mümkün olabilmektedir (Marathe ve diğerleri, 2017). Literatür incelendiğinde, enzim destekli ekstraksiyon ile protein eldesi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma olduğu görülmektedir. Bitki hücrelerinde, toplam proteinin yaklaşık %30'u hücre içi ve dokularda çözünür formdayken, geri kalan kısım çözünmez formdadır ve çoğunlukla selülozik karbonhidrat veya hücre zarı bileşenleri ile kompleks formda bulunurlar. Bitki yapraklarından protein izolasyonundaki ana zorluk, hücre bütünlüğünü bozmak ve kompleks proteinleri su fazına alabilmektir. Bu amaçla uygulanan klasik ekstraksiyon yöntemleri çok düşük protein verimine yol açmaktadır. Bu çalışmada, şeker endüstrisinin işlenmesi sırasında ortaya çıkan ve genellikle hayvan yemi olarak değerlendirilen şeker pancarı yapraklarının, sürdürülebilir bir protein kaynağı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, protein ekstraksiyonunu daha verimli ve çevre dostu hale getirmek üzere ultrason destekli enzimatik ekstraksiyon yöntemi tercih edilmiştir. Bitkisel kaynaklardan protein eldesi sırasında karşılaşılan en büyük engellerden biri, hücre duvarında yer alan kompleks polisakkarit yapıların (selüloz, hemiselüloz, lignin ve pektin) protein salımını sınırlandırmasıdır. Enzim destekli ekstraksiyon yöntemi, bu engeli aşmak için özellikle lignoselülozik matrisleri hedef alan enzimler yardımıyla bu yapıları hidrolize ederek hücre içeriğindeki proteinlerin açığa çıkmasını sağlar (Kumar ve ark., 2021). Bu yöntemin bir diğer önemli avantajı, geleneksel ekstraksiyon süreçlerinde sıklıkla kullanılan sert kimyasallara olan ihtiyacı ortadan kaldırarak, proteinlerin biyolojik aktivitesini koruyacak şekilde daha nazik koşullarda işlem yapılmasına olanak tanınmasıdır. Bu sayede hem çevresel etki azaltılmakta hem de elde edilen proteinlerin fonksiyonel kalitesi artırılmaktadır (Chemat ve ark., 2017). Uygulamada kullanılacak enzimlerin seçimi, ekstrakte edilecek biyolojik materyalin kimyasal yapısına bağlı olarak belirlenmekte olup; Cellulysin®, Pektinaz ve Viscozyme® L, bitkisel hammaddelerde yer alan hücre duvarı polisakkaritlerinin etkili şekilde parçalanması ve içeride hapsolmuş proteinlerin serbest bırakılmasının sağlanması amacıyla sıkça tercih edilen ticari enzim preparatlarıdır

(Karabulut ve ark., 2023). Cellulysin®, *Trichoderma viride* kaynaklı bir selülazdır ve yüksek selülaç aktivitesi (≥ 10.000 U/g kuru madde) ile β -1,4-glikozidik bağları kırarak selülozu oligosakkaritlere bölerek hücre duvarı yapısını zayıflatır; optimum aktivite koşulları 40–50 °C ve pH 4–5 civarında olup, hem sulu hem polisakkarit içeren ortamlarda stabildir (Serva, 2007; Worthington Biochemical Corp., 2022). Pektinaz, *Aspergillus* türlerinden elde edilen endo-poligalakturonaz ve pektin esteraz karışımıdır; pektinleri hidroliz ederek meyve ve sebze dokularını yumuşatır, özellikle pH 3,5–5,5 ve 40–50 °C aralığında maksimum aktivite gösterir (Sreenath ve ark., 1995; Frontiers, 2020). Bu sayede ekstraksiyon sırasında fenolik bileşiklerin salınımı ve berraklık sağlanmasında önemli rol oynar. Viscozyme® L, *Aspergillus aculeatus* kökenli multifonksiyonel bir karbonhidraz kompleksi olup arabanaz, hemiselülaç, ksilanaz, β -glukanaz ve selülaç gibi enzimleri birlikte içerir; 45–55 °C ve pH 4,5–6,5 aralığında etkili şekilde çalışır. Örneğin, soya posasında uygulandığında protein geri kazanımını yaklaşık %28 ve çözünürlüğü %17–86 oranında artırdığı rapor edilmiştir (Khare ve ark., 2018; Radenkovs ve ark., 2024; PMC, 2017). Bu enzimlerin sinerjik veya ayrı kullanımları, özellikle protein ekstraksiyon verimi, fonksiyonel bileşen korunumu ve biyoyararlanım açısından kritik avantajlar sağlamaktadır. Ultrasonik ekstraksiyon ise bu sürece fiziksel bir destek sağlayarak, yüksek frekanslı ses dalgalarının neden olduğu kavitasyon etkisi ile hücre duvarlarını parçalamakta ve kütle transferini artırarak ekstraksiyon verimini önemli ölçüde yükseltmektedir (Vilkhu ve ark., 2008; Jadhav ve ark., 2009). Ultrason teknolojisinin bir diğer avantajı ise daha düşük sıcaklıkta ve daha az çözücü kullanımı ile yüksek verimlilik elde edilmesini mümkün kılmasıdır. Bu özelliği sayesinde hem enerji tüketimi hem de çevresel ayak izi minimize edilmekte, bu da yöntemi sürdürülebilir gıda işleme teknikleri arasında öne çıkarmaktadır (Li ve ark., 2021). Yapılan literatür araştırmalarında, ultrason destekli enzimatik ekstraksiyonun çeşitli bitkisel materyallerden fenolik bileşikler, polisakkaritler ve diğer biyoaktif bileşenlerin elde edilmesinde etkili bir teknik olduğu ortaya konmuştur (Xu ve ark., 2015; Fu ve ark., 2020). Özellikle yaprak gibi zor parçalanan bitkisel dokularda bu yöntemin etkinliği vurgulanmakta, ancak protein ekstraksiyonu bağlamında yaprak materyali üzerinde ultrason ve enzim kombinasyonunun birlikte kullanıldığı çalışmalara sınırlı düzeyde rastlanmaktadır. Bu yönüyle, şeker pancarı yaprakları üzerinde yürütölen bu çalışma, yaprak proteinlerinin ekstraksiyonunda ultrason ve enzim kombinasyonunun etkilerini araştırarak literatürdeki sınırlı çalışmalara katkı sunmayı ve yeşil yapraklı bitkilerin alternatif protein kaynağı olarak değerlendirilmesine

bilimsel temel oluşturmayı amaçlamaktadır. Bu çalışmada, şeker pancarı yapraklarından protein geri kazanımı için su esaslı u çöktürme yaklaşımı (ısı ktrme: YF/PF1, izoelektrik ktrme: PF2, amonyum sülfat ktrme: PF3) uygulanmış ve karşılaştırılmıştır. Ayrıca ultrases destekli enzimatik ekstraksiyon kapsamında Viscozyme®, Pektinaz ve Cellulysin® kullanılarak sekiz protokol (Koşul 1–8) tasarlanmış; protokoller, ultrasesin uygulanma sırası (enzim öncesi/sonrası), enzim dozu, hidroliz süresi ve enzim inaktivasyonunun zamanlaması değişkenleri gözetilerek kurgulanmıştır (ultrases: %60 genlik, 20 dk, kesikli mod). Elde edilen ekstraktlar süreç adımlarına bağlı olarak suda çözünen/çözünmeyen fraksiyonlara ayrılmış; toplam protein (Kjeldahl), znr protein, toplam fenolik madde, antioksidan kapasiteler (DPPH, ABTS, •OH) ve enzim inhibisyon aktiviteleri (ACE, -amilaz, lipaz) için analiz edilmiştir. Veriler uygun istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmış ve yöntem-parametre ilişkileri literatür çerçevesinde tartışılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

Günümüzde artan dünya nüfusu, gıda güvenliğini tehdit eden önemli bir unsur hâline gelmiştir. Bu durum sürdürülebilir gıda kaynaklarının önemini her geçen gün artırmaktadır. Bitkisel kökenli protein kaynakları, özellikle yeşil yapraklı bitkiler, hem çevresel sürdürülebilirlik hem de ekonomik üretilebilirlik açısından büyük potansiyele sahiptir. Şeker pancarı yaprağı, ıspanak, lahana, pazı ve yonca gibi yeşil yapraklı bitkiler yalnızca yüksek protein içerikleriyle değil, aynı zamanda fonksiyonel bileşen zenginlikleri ve potansiyel biyoaktif etkileriyle de dikkat çekmektedir (Di Stefano vd., 2018; Martin vd., 2019). Ancak bu bitkilerin, gıda endüstrisinde sıklıkla atık olarak değerlendirilen yaprak kısımlarındaki proteinlerinin etkin biçimde kazanılabilmesi için geleneksel yöntemler yetersiz kalmakta, modern ve çok yönlü ekstraksiyon tekniklerinin kullanılması gerekmektedir. Son yıllarda geliştirilen ultrasonik ekstraksiyon ve enzim destekli ekstraksiyon yöntemleri, bitki yapraklarındaki proteinlerin yüksek verim ve kalitede elde edilmesini mümkün kılmaktadır. Üstelik bu yöntemler, çevresel etkilerinin düşük olması ve enerji verimlilikleri sayesinde sürdürülebilir gıda işleme stratejileri içinde önemli bir yer edinmektedir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon, ultrason dalgalarının oluşturduğu kavitasyon etkisiyle hücre duvarlarını parçalayarak proteinlerin bitki hücre matrisinden serbest kalmasını sağlar. Bu teknik, düşük enerji gereksinimi, kısa işlem süresi ve çevre dostu yapısı ile öne çıkmaktadır (Gulzar ve ark., 2020). Nitekim Lahori ve arkadaşları (2022), ıspanak yapraklarına 20 kHz frekans ve %60 genlikte uygulanan ultrason işlemi sonucunda klasik yöntemlere kıyasla %25 daha fazla çözünür protein elde edildiğini rapor etmişlerdir. Bu sonuç, ultrasonik işlemin hücre duvarlarında fiziksel hasar oluşturarak protein salımını hızlandırdığını göstermektedir. Chemat ve arkadaşları (2017) da ultrason uygulamasında kavitasyonla ortaya çıkan mikrojetler ve şok dalgalarının bu etkinin temel mekanizması olduğunu belirtmiştir. Etkili bir kavitasyon için ultrason genliği, uygulama süresi ile kesikli veya sürekli uygulama şekli gibi parametrelerin optimize edilmesi büyük önem taşır. Enzim destekli ekstraksiyon ise bitki hücre duvarındaki selüloz, hemiselüloz ve pektin gibi kompleks polisakkaritleri parçalayarak proteinleri matriksten serbest bırakan etkili bir biyoteknolojik yöntemdir. Bu süreçte Viscozyme®, Cellulysin ve Pectinase gibi ticari enzim kokteylleri sıklıkla kullanılmaktadır (Radenkovs ve ark., 2024). Ultrasonik bir ön işlem, hücre duvarlarını kısmen parçalayarak enzimlerin substrata daha kolay erişmesine imkân tanıdığı için

enzimatik ekstraksiyon verimliliğini arttırmaktadır. Uygun ultrason-enzim kombinasyonları kullanıldığında oldukça yüksek ekstraksiyon verimi ve ürün kalitesi elde edilebilmektedir. Örneğin, Tamayo Tenorio ve arkadaşları (2017) şeker pancarı yapraklarına ultrasonik ön işlem uyguladıktan sonra Viscozyme® enzimiyle ekstraksiyon yaparak %79 ekstraksiyon verimi ve %69 protein içeriğine sahip bir ürün elde etmişlerdir. Aynı çalışmada, enzim inaktivasyonunun zamanlamasının işlem çıktısı üzerinde kritik öneme sahip olduğu; geç inaktivasyonun enzimin aşırı hidrolizine yol açarak ürün kalitesini düşürdüğü vurgulanmıştır. Ekstraksiyon verimini etkileyen enzim konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi gibi başlıca parametrelerin dikkatlice optimize edilmesi gerekmektedir. Bu faktörler enzim aktivitesi ile protein çözünürlüğünü doğrudan etkilediğinden, hem elde edilen proteinin saflığı hem de toplam verim üzerinde belirleyicidir. Örneğin, Khare ve arkadaşları (2018) optimum koşullarda soya posasından %86'ya varan çözünür protein verimi elde etmişlerdir. Benzer şekilde, Akyüz ve Ersus (2021) pH 9'da gerçekleştirdikleri 2 saatlik ekstraksiyon ve ardından izoelektrik çöktürme işlemiyle yüksek saflıkta protein fraksiyonları üretmeyi başarmışlardır. Inkübasyon süresinin değiştirilmesinin de protein çözünürlüğü ve verimi üzerinde belirgin etkileri olduğu, bu nedenle optimum ekstraksiyon süresinin tespitiyle performansın artırılabilirdiği belirtilmektedir. Ayrıca, substrat bileşiminin önceden analiz edilip uygun enzim kombinasyonlarının seçilmesi sayesinde yalnızca proteinler değil, aynı zamanda polifenoller gibi diğer fonksiyonel bileşenler de ekstrakt edilebilmektedir (Zhao ve ark., 2019; Sun ve ark., 2021). Bu sayede elde edilen ekstraktın toplam fonksiyonel değeri önemli ölçüde artmaktadır. Tüm bu ekstraksiyon süreçlerinin yanı sıra, elde edilen yaprak proteinlerinin besinsel ve biyofonksiyonel özellikleri de kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. Literatürde özellikle ıspanak ve yonca yapraklarından elde edilen suda çözünür protein hidrolizatlarının antioksidan, antimikrobiyal, opioid ve antihipertansif aktiviteler sergilediği bildirilmiştir (Yang ve ark., 2001; Yang ve ark., 2003; Yang ve ark., 2004; Zhao ve ark., 2008a; Zhao ve ark., 2008b; Kapel ve ark., 2006; Kobbi ve ark., 2015; Kobbi ve ark., 2017). Ispanak (*Spinacia oleracea*) yaprakları, yüksek protein içerikleri ve özellikle RuBisCo (ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz) protein fraksiyonu ile fonksiyonel bileşik üretimi potansiyeli sayesinde dikkat çekmektedir (Yang ve ark., 2001; Yang ve ark., 2003). Ayrıca, ıspanak yaprağı protein hidrolizatlarının DPPH ve ABTS⁺ serbest radikal süpürme testlerinde yüksek antioksidan aktivite sergilediği gösterilmiştir (Yang ve ark., 2004). Di Stefano ve arkadaşları (2018) ise

ıspanaktan elde edilen protein hidrolizatlarının lipaz, α -amilaz ve α -glukozidaz gibi metabolik enzimleri inhibe edebildiğini, dolayısıyla bu kaynağın fonksiyonel gıda ürünleri geliştirmede kullanılabileceğini vurgulamışlardır. Yonca (*Medicago sativa*) yaprakları da tıpkı ıspanak gibi zengin RuBisCo içeriğine sahip olup biyolojik açıdan aktif peptit üretimi için son derece değerli bir hammaddedir. Yang ve arkadaşları (2001), yonca yaprağı protein hidrolizatlarının çözünürlük ve biyoaktivite bakımından önemli fonksiyonel özellikler taşıdığını rapor etmişlerdir. Zhao ve arkadaşları (2008a, 2008b) ise yonca yaprağı proteinlerinden elde edilen düşük molekül ağırlıklı peptit fraksiyonlarının Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı belirgin antimikrobiyal etki gösterdiğini bildirmiştir. Bu etkinin, söz konusu peptitlerin mikrobiyal hücre zar bütünlüğünü bozup hücre içi metabolizmayı aksatmasından kaynaklandığı belirtilmektedir. Ayrıca, Kapel ve arkadaşları (2006) ile Kobbi ve arkadaşları (2015, 2017), yonca protein hidrolizatlarının anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibisyonu yoluyla antihipertansif etki potansiyeli taşıdığını ortaya koymuşlardır. Özellikle <3 kDa boyutundaki peptit fraksiyonlarının bu biyolojik aktiviteleri çok daha belirgin sergilediği ve farmakolojik açıdan anlamlı düzeyde etki gösterdiği ifade edilmiştir. Lahana (*Brassica oleracea*) yaprakları, glukosinolatlar gibi ikincil metabolitlerin yanı sıra çözünür proteinler bakımından da zengin bir sebzedir. Enzimatik hidroliz çalışmaları, lahana yapraklarından özellikle RuBisCo kaynaklı peptitlerin üretilbildiğini göstermiştir. Kırmızı lahana yaprağı ekstraktlarının yüksek fenolik bileşik içeriği sayesinde güçlü antioksidan kapasite sergilediği rapor edilmiştir (López ve ark., 2013). Ayrıca lahana yaprak proteinlerinin gastrointestinal enzimlere karşı dirençli olduğu ve sindirim sonrasında da biyolojik aktivitelerini koruyabildiği belirlenmiştir (Udenigwe & Aluko, 2012). Bu protein hidrolizatlarının α -glukozidaz enzimini inhibe ederek antidiabetik etki gösterebileceği ve bu nedenle fonksiyonel bir gıda bileşeni olarak değerlendirilebileceği ileri sürülmüştür. Pazı (*Beta vulgaris* var. *cicla*) yaprakları, şeker pancarı ile aynı familyaya ait olmaları nedeniyle hem besinsel değer hem de fonksiyonel bileşen içeriği bakımından dikkat çekici bir yeşil yapraklı sebze olarak değerlendirilmektedir. Yüksek düzeyde çözünür protein, fenolik bileşen, vitamin ve mineral içeriğine sahip olmasıyla pazı yaprakları gıda endüstrisi için potansiyel bir hammadde olarak görülmektedir. Pazı yapraklarından elde edilen protein ekstraktlarının antioksidan kapasitesi üzerine yapılan çalışmalar, bu bitkinin yalnızca besleyici değil aynı zamanda fonksiyonel özelliklere sahip bir protein kaynağı olduğunu ortaya koymuştur (Radenkovs ve ark., 2024). Nitekim Radenkovs ve arkadaşları (2024), ultrasonik ön

işlem ile Viscozyme® enzim uygulamasını birleştirerek pazı yapraklarından DPPH ve ABTS⁺ radikal süpürme testlerinde yüksek aktivite gösteren protein fraksiyonları elde etmişlerdir. Ultrason ön işleminin hücre duvarını parçalayarak enzimlerin substrata erişimini kolaylaştırmasının, elde edilen peptit fraksiyonlarının antioksidan kapasitesini artırdığı belirtilmiştir (Radenkovs ve ark., 2024). Ayrıca, pazıdan elde edilen düşük molekül ağırlıklı peptitlerin lipid peroksidasyonunu engelleyerek hücresel düzeyde oksidatif strese karşı koruyucu rol oynayabildiği ifade edilmiştir. Fonksiyonel özellikler açısından değerlendirildiğinde, pazı yaprağı proteinlerinin yağ bağlama kapasitesi, emülsiyon stabilitesi ve köpük oluşturma kabiliyeti gibi teknolojik özellikleri, fonksiyonel gıda formülasyonları açısından umut vadeden nitelikler göstermektedir (Radenkovs ve ark., 2024). Ancak pazı proteinlerinin amino asit kompozisyonu ve sindirilebilirliği üzerine yapılan çalışmalar sınırlı olduğundan, bu bitkinin potansiyelinin tam olarak anlaşılabilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Son olarak, şeker pancarı yapraklarından protein ekstraktı üretimine yönelik analizlerde, çözünür proteinler genellikle “beyaz” ve “yeşil” protein fraksiyonları olacak şekilde iki ayrı kısımda üretilmişlerdir. Genellikle ekstraktların protein içerikleri arttığında, protein verimlerinin ise azaldığı gözlemlenmiştir. Daha ileri fraksiyonlama işlemleriyle elde edilen ekstraktların protein içerikleri %80–90 seviyelerine ulaşsa da protein verimlerinin %20 seviyesinde kaldığı belirlenmiştir (Sheen, 1991; Jwanny vd., 1993; Merodio ve Sabater, 1988; Tamayo Tenorio vd., 2016, 2017a, 2018). Bütün bunlarla birlikte, Akyüz ve Ersus (2021) şeker pancarı yapraklarını glukozidaz aktivitesi içeren bir enzim çözeltisiyle muamele etmiş ve %79 ekstraksiyon verimi ile %69 protein içeriğine sahip bir ekstrakt elde etmişlerdir. Fakat bu çalışmada hesaplanan protein veriminin, protein çözünürlüğü üzerinden belirlenmiş olması; çözünmeyen formdaki hatırı sayılır miktarda proteinin yeşil fraksiyonda ya da posa içinde kaldığına işaret etmektedir. Ayrıca, süreç sonunda ortaya çıkan atık biyokütle miktarı ve yapılan enerji-ekserji analizleri dikkate alındığında, daha yüksek protein verimi ve saflığında ekstrakt elde edilmesi ihtiyacının henüz tam anlamıyla giderilemediği anlaşılmaktadır. Şu ana kadar üretilen protein ekstraktlarının genel bileşimleri karakterize edilmiş ve amino asit içerikleri belirlenmiştir (Sheen, 1991; Merodio ve Sabater, 1988; Tamayo Tenorio vd., 2016; Akyüz ve Ersus, 2021). Elde edilen beyaz protein fraksiyonunun endüstriyel açıdan kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla emülsiyon ve köpük oluşturma kapasiteleri, stabilite, çözünürlükleri, yağ ve su tutma kapasiteleri ile jelleşme özellikleri gibi fonksiyonel

nitelikleri de incelenmiştir (Sheen, 1991; Martin vd., 2019). Şeker pancarı yaprak proteinlerinin %10'undan fazlasının, güçlü fonksiyonel özelliklere ve yüksek biyoaktiviteye sahip RuBisCo proteininden oluştuğu bildirilmektedir (Di Stefano vd., 2018; Martin vd., 2019). Nitekim ekstraksiyon çalışmalarında RuBisCo'nun çözünür beyaz ve yeşil fraksiyonlar arasında dengeli bir şekilde dağıldığı görülmüştür (Tamayo Tenorio vd., 2016). Şeker pancarı yaprak proteinlerinin yüksek RuBisCo içeriğine sahip olması, bu yapraklardan elde edilen protein ekstraktlarının da güçlü biyoaktif özellikler sergileyebileceğine işaret ettiğini düşündürmektedir. Ancak, literatürde şeker pancarı yaprak proteinlerinin biyoaktif özelliklerini derinlemesine inceleyen çok az sayıda çalışma bulunduğu görülmektedir.



3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan şeker pancarı (*Beta vulgaris L.*) yaprakları Niğde yöresinde şeker üretimi yapan bir firmadan temin edilmiştir. Yapraklardaki toprağın giderilmesi amacıyla yapraklar yıkanmıştır sonrasında -18 °C’de dondurularak saklanmıştır.

3.2. Metot

3.3. Şeker Pancarı Yaprak Tozu Üretimi

Şeker pancarı yaprağı ilk olarak 50°C’de, %50 fan altında, 1 gece kurumaya (Memmert UF110, Almanya) bırakılmıştır. Hemen ardından kuruyan yapraklar öğütücü blendır (Fakir Aromatic Öğütücü, Türkiye) yardımıyla toz haline getirilmiştir. Elde edilen yaprak tozları analizlerde kullanılmıştır.



(a)



(b)



(c)

Şekil 3.1. a. Şeker pancarı yaprağının taze hali b. Etüvde kurutulan şeker pancarı yaprak örneği c. Kurutulmuş yapraklardan elde edilen şeker pancarı yaprak tozu

3.4. Protein Ekstraksiyonu

3.4.1. Isı ile çöktürme yöntemi

Bu yöntem, Jwanny ve arkadaşları (1993) tarafından tanımlanan yöntem temel alınarak uygulanmıştır. 25 gram şeker pancarı yaprağı tartımının ardından 500 mL distile su eklenip yüksek devirde 5 dakika boyunca blenderda homojenize edilmiş ve 1 gece rehidre edilmiştir. Daha sonra sıcaklığı 55°C'ye ayarlanmış su banyosunda elde edilen karışım 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hemen ardından örnekler 7500 rpm'de ve 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonucunda süpernatant kısım ve yeşil fraksiyon (YF) olarak ikiye ayrılmıştır. 0,1 M asetik asit ve sodyum hidroksit kullanılarak süpernatant kısım pH'ı 7'ye ayarlanması yapılmıştır. Bu kısma protein fraksiyonu 1 (PF 1) adı verilmiştir. Bütün bu işlemler sonucunda elde edilen ekstraktlar etüvde 50°C'de ve % 100 fan ile kurumaya bırakılmıştır.

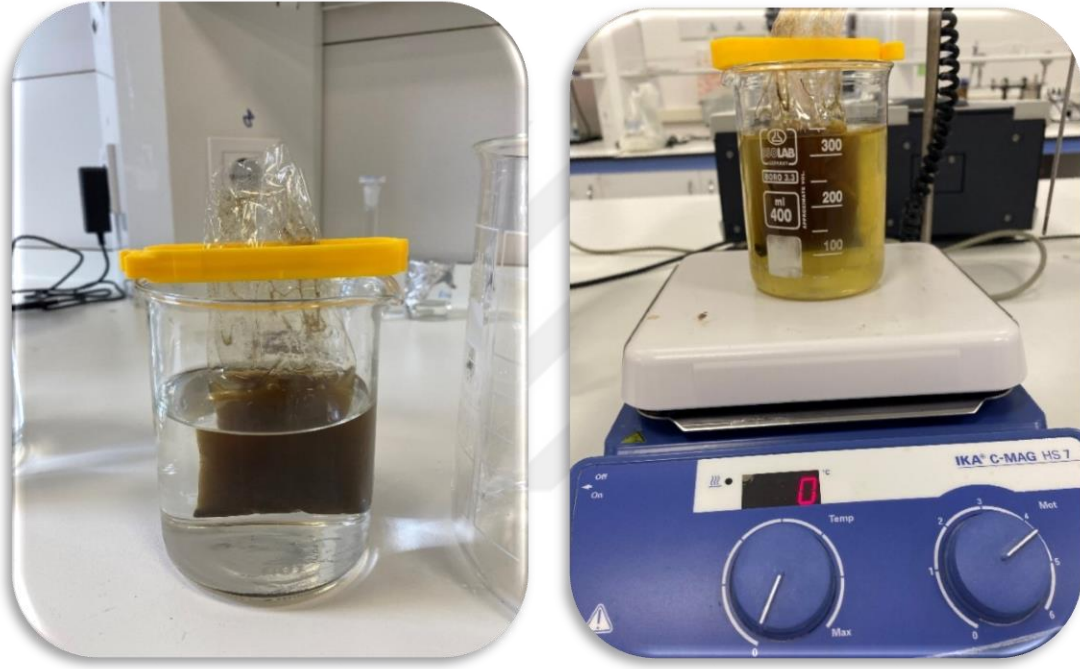
3.4.2. İzoelektrik noktada çöktürme

Tomayo Tenorio ve arkadaşları (2017) tarafından tanımlanan izoelektrik çöktürme yöntemi temel alınarak, şeker pancarı yaprağı 25 gram tartılmıştır ve 500 mL distile su içerisinde homojenize edilip 1 gece rehidre edilmiştir. Blenderın (ELECTROLUX E4TB1-6ST Create 4, ÇİN) yüksek devrinde 5 dakika homojenize edilmesinin ardından 0,1 M asetik asit ve sodyum hidroksit kullanılarak pH'ı 9'a ayarlanmış ve protein çözünürlüğünü maksimum seviyeye çıkarmak amacıyla 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi sonrasında örnekler 7500 rpm'de ve 30 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından süpernatant kısmının pH'ı 4,5'e ayarlanarak tekrar 7500 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilmiş olan pelet etüvde 50 °C ve % 100 fan ile kurutulmuştur. Bu kısma protein fraksiyonu 2 (PF2) adı verilmiştir.

3.4.3. Amonyum sülfat yardımıyla çöktürme

Akyüz ve Ersus (2021) tarafından bildirilen amonyum sülfat çöktürme yöntemi temel alınarak, 2,5 gram şeker pancarı yaprak tozu tartımının ardından 50 mL distile su eklenmiştir ve 5 dakika homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında çözeltinin pH'ı 12'ye ayarlanmış olup aynı zamanda 1 saat boyunca manyetik karıştırıcıda (IKA C-MAG HS 10, Almanya) karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Karıştırma işlemi sonrasında örnekler 25 °C 7500 rpm'de ve 30 dakika santrifüj edilmiştir daha sonra süpernatant (çöken) kısım ayrılmıştır. Elde edilen

süpernatant pH'ı 4,5 olacak şekilde ayarlanmıştır ve çözeltideki proteinlerin çökmesi için amonyum sülfat derişimi %70 oranına çıkarılmıştır. Daha sonra 4 °C 7500 rpm'de ve 30 dakika santrifüj edilmiştir daha sonra süpernatant (çöken) kısım ayrılmıştır. Elde edilmiş olan pelet etüvde 50 °C ve % 100 fan ile kurutulmuştur. Örnek içerisindeki amonyum sülfat diyaliz uygulaması ile uzaklaştırılmıştır. Amonyum sülfat ile elde edilen protein fraksiyonu PF3 olarak adlandırılmıştır.



Şekil 3.2. Şeker pancarı yaprağı diyaliz uygulaması

3.5. Ultrases Destekli Protein Ekstraksiyonu

Bu çalışmada, şeker pancarı yapraklarından protein ekstraksiyonu amacıyla ultrases destekli çeşitli enzimatik yöntemler uygulanmıştır (T103 problu, Sonoplus, Bandelin, Almanya). Her biri farklı işlem sırasına ve koşullara sahip toplam sekiz ekstraksiyon protokolü (Koşul 1–8) değerlendirilmiştir. Uygulanan bu protokollerde, ekstraksiyon verimliliğini artırmak amacıyla ultrases (ultrasonik) uygulamaları yapılmış, bazı koşullarda Viscozyme®, pektinaz veya cellulysin gibi ticari enzim preparatları kullanılmıştır. Ultrases işlemi tüm gruplarda %60 genlikte, 20 dakika süreyle ve kesikli modda (1 saniye uygulama – 1 saniye duraklama) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstraktların protein içerikleri ve protein verimleri (%) bazında belirlenmiştir. Protein analizleri Kjeldahl yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Sekiz farklı ekstraksiyon koşuluna ait işlem adımları, Koşul 1–2 (Tablo 3.1.), Koşul 3–4 (Tablo 3.2.), Koşul 5–6 (Tablo 3.3.) ve Koşul 7–8 (Tablo 3.4.) olmak üzere dört ayrı tabloda sunulmuştur.

Koşul 1 ve Koşul 2 protokollerinde, şeker pancarı yapraklarından protein ekstraksiyonu amacıyla benzer ön işlemler gerçekleştirilmiştir. Her iki koşulda da kuru yaprak:su oranı 1:30 olacak şekilde hazırlanan numuneler bir gece boyunca rehidrasyona bırakılmıştır. Rehidrasyonun ardından, hücre duvarı bileşenlerinin parçalanmasını kolaylaştırmak ve protein salımını artırmak amacıyla Pektinaz, Cellulysin ve Viscozyme® enzimleri ekstraksiyon ortamına ilave edilmiştir. Enzim ilavesini takiben her iki koşulda da ultrases uygulaması gerçekleştirilmiştir. Ultrases işlemi, %60 genlikte ve 20 dakika süreyle, kesikli modda (1 saniye uygulama – 1 saniye duraklama) gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem, hücresel yapıların daha kontrollü şekilde parçalanmasını sağlayarak proteinlerin salımını artırmayı hedeflemiştir. Sonraki aşamada, enzimlerin etkisini sonlandırmak amacıyla numuneler 5 dakika boyunca kaynar su banyosunda tutulmuştur. Karışımların pH'ı 9 olacak şekilde ayarlanmış ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıda homojenize edilmiştir. Elde edilen karışımlar 7500 rpm'de, 25°C sıcaklıkta 30 dakika süreyle santrifüjlenmiş, ardından süpernatant ve pelet fraksiyonları ayrılmıştır. Koşul 1'de ekstrakt edilen süpernatant, izoelektrik noktada çöktürme amacıyla pH 4,5'e ayarlanmış ve 4°C'de tekrar santrifüjlenerek çökelek formundaki protein fraksiyonu elde edilmiştir. Her iki koşulda da son ürünler liyofilizasyon yöntemiyle kurutulmuştur.

Tablo 3.1. Koşul 1 ve koşul 2 uygulanan ekstraksiyon koşulları ve işlem basamakları

Koşul 1	Koşul 2
• 1 gece rehidrasyon (Kuru yaprak:su oranı 1:30) • Enzim ilavesi (her biri için 0,0625 mL; Pektinaz, Cellulysin, Viscozyme) • Ultrases uygulaması • Enzim inaktivasyonu (5 dakika kaynayan suda bekletme) • Oda sıcaklığında karıştırma (pH 9, 2 saat) • Santrifüj (7500 rpm, 25°C, 30 dakika) • İzoelektrik noktada çöktürme (pH 4,5) • Santrifüj (7500 rpm, 4°C, 30 dakika) • Liyofilizasyon (Çökelek) (LABART LFD-10, İtalya)	• 1 gece rehidrasyon (Kuru yaprak:su oranı 1:30) • Enzim ilavesi (her biri için 0,0625 mL; Pektinaz, Cellulysin, Viscozyme) • Ultrases uygulaması • Enzim inaktivasyonu (5 dakika kaynayan suda bekletme) • Oda sıcaklığında karıştırma (pH 9, 2 saat) • Santrifüj (7500 rpm, 25°C, 30 dakika) • Supernatant ve pellet ayrılması • Liyofilizasyon (LABART LFD-10, İtalya)

Koşul 3 ve Koşul 4 protokolleri, Viscozyme® enziminin uygulanma sırasının ve ultrasonik ön işlemin etkisinin karşılaştırılmasını amaçlamaktadır. Her iki koşulda da kuru yaprak:su oranı 1:30 olarak ayarlanmış ve örnekler bir gece boyunca rehidrasyona bırakılmıştır. Koşul 3'te rehidrasyon sonrası ultrases uygulaması gerçekleştirilmiştir. Ultrases uygulaması, %60 genlikte ve 20 dakika süreyle, kesikli modda (1 saniye uygulama – 1 saniye duraklama) gerçekleştirilmiş ve bu işlem, hücre yapılarının kontrollü bir şekilde parçalanarak protein salımının artırılması hedefiyle uygulanmıştır. Ultrases sonrası 0,1 veya 1 mL Viscozyme® enzimi ilave edilerek karışım 1 saat boyunca 350 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Enzimatik hidroliz sonrasında enzimlerin inaktivasyonu için örnekler 5 dakika süreyle kaynar su banyosunda bekletilmiş, ardından 25°C'de 7500 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant fraksiyonu daha ileri analizlerde kullanılmak üzere toplanmıştır. Koşul 4'te ise Viscozyme® ilavesi, rehidrasyon sonrası doğrudan gerçekleştirilmiş olup, ultrasonik işlem enzimatik inkübasyondan sonra uygulanmıştır. Takiben örnekler, Koşul 3'te olduğu gibi enzim

inaktivasyonu ve santrifüj adımlarına tabi tutulmuştur. Bu iki koşul, ultrases uygulamasının zamanlamasının ekstraksiyon verimliliği üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla kurgulanmıştır.

Tablo 3.2. Koşul 3 ve koşul 4 uygulanan ekstraksiyon koşulları ve işlem basamakları

Koşul 3	Koşul 4
1 gece rehidrasyon (Kuru yaprak:su oranı 1:30) - Ultrases uygulaması - Enzim ilavesi (0,1 ya da 1 mL Viscozyme), 1 saat inkübasyon, 350 rpm karıştırma - Enzim inaktivasyonu (5 dakika kaynayan suda bekletme) - Santrifüj (7500 rpm, 25°C, 30 dakika) - Supernatant toplama	1 gece rehidrasyon (Kuru yaprak:su oranı 1:30) - Enzim ilavesi (0,1 ya da 1 mL Viscozyme), 1 saat inkübasyon, 350 rpm karıştırma - Ultrases uygulaması - Enzim inaktivasyonu (5 dakika kaynayan suda bekletme) - Santrifüj (7500 rpm, 25°C, 30 dakika) - Supernatant toplama

Koşul 5 ve Koşul 6, enzim konsantrasyonu ve inkübasyon süresinin ekstraksiyon verimliliği üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılandırılmıştır. Her iki koşulda da örnekler, kuru yaprak:su oranı 1:20 olacak şekilde hazırlanarak bir gece boyunca rehidrasyona bırakılmıştır. Rehidrasyon sürecinin ardından her iki gruba da ultrases destekli fiziksel ön işlem uygulanmıştır. Bu işlem, %60 genlikte ve 20 dakika süreyle, kesikli modda (1 saniye uygulama – 1 saniye bekleme) gerçekleştirilmiş olup, bitki hücre duvarlarının yapısal olarak zayıflatılarak proteinlerin ekstraksiyon ortamına geçişini kolaylaştırmayı hedeflemiştir. Takiben, her bir örneğe Viscozyme® enzimi 0,1 veya 1 mL konsantrasyonlarında ilave edilmiş ve enzimatik hidroliz işlemi, 1., 3. ve 24. saatlerde olmak üzere farklı inkübasyon sürelerinde, 350 rpm

karıştırma hızıyla gerçekleştirilmiştir. Koşul 5’te, inkübasyon ve santrifüjleme işlemlerinden sonra elde edilen süpernatant toplanmış, ardından enzimlerin inaktivasyonu amacıyla çözeltiler 5 dakika boyunca kaynar su banyosunda bekletilmiştir. Buna karşılık, Koşul 6’da enzim inaktivasyonu santrifüjleme işleminden önce uygulanmış ve daha sonra süpernatant ayrılarak analiz için toplanmıştır. Her iki prosedür, enzim inaktivasyonunun zamanlamasının ekstrakt edilen protein miktarına olan etkilerini karşılaştırmalı olarak değerlendirmek amacıyla kurgulanmıştır.

Tablo 3.3. Koşul 5 ve koşul 6 uygulanan ekstraksiyon koşulları ve işlem basamakları

Koşul 5	Koşul 6
1 gece rehidrasyon (Kuru yaprak:su oranı 1:20) - Ultrases uygulaması - Enzim ilavesi (0,1 veya 1 mL Viscozyme), 1-3-24 saat inkübasyon, 350 rpm karıştırma - Santrifüj (7500 rpm, 25°C, 30 dakika) - Supernatant toplama - Enzim inaktivasyonu (5 dakika kaynayan suda bekletme)	1 gece rehidrasyon (Kuru yaprak:su oranı 1:20) - Ultrases uygulaması - Enzim ilavesi (0,1 veya 1 mL Viscozyme), 1-3-24 saat inkübasyon, 350 rpm karıştırma - Enzim inaktivasyonu (5 dakika kaynayan suda bekletme) - Santrifüj (7500 rpm, 25°C, 30 dakika) - Supernatant toplama

Koşul 7 ve Koşul 8, Viscozyme® enziminin farklı işlem basamaklarıyla kombine edilerek protein ekstraksiyonuna etkisinin incelendiği protokolleri temsil etmektedir. Her iki koşulda da kuru yaprak:su oranı 1:20 olacak şekilde örnekler hazırlanmış ve bir gece boyunca rehidrasyona bırakılmıştır. Koşul 7’de, rehidrasyonun ardından örnekler ultrasonik ön işlem uygulanmıştır. Bu işlem, %60 genlikte ve 20 dakika süreyle, kesikli modda (1 saniye uygulama – 1 saniye duraklama) gerçekleştirilmiş olup, bitki hücre duvarlarının yapısal bütünlüğünü bozarak hücre

içi bileşenlerin serbestleşmesini kolaylaştırmayı amaçlamıştır. Ultrases uygulamasını takiben, ardından 1 ila 2 mL Viscozyme® enzimi eklenmiştir. Enzimatik hidroliz işlemi, 1 ila 24 saat süresince 350 rpm’de karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, pH 9 olacak şekilde ayarlanan karışım oda sıcaklığında 2 saat süreyle ek olarak karıştırılmıştır. Nihai olarak örnekler 7500 rpm hızında, 25°C’de 30 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı ayrılarak analiz için toplanmıştır. Koşul 8’de ise benzer enzimatik inkübasyon ve karıştırma adımlarına ek olarak, santrifüj öncesinde enzim inaktivasyonu amacıyla örnekler 5 dakika boyunca kaynar su banyosunda bekletilmiştir. Böylece, Koşul 7 ve 8 arasında yalnızca enzim inaktivasyonunun zamanlaması farklılık göstermekte olup bu durumun protein çözünürlüğü ve verimi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

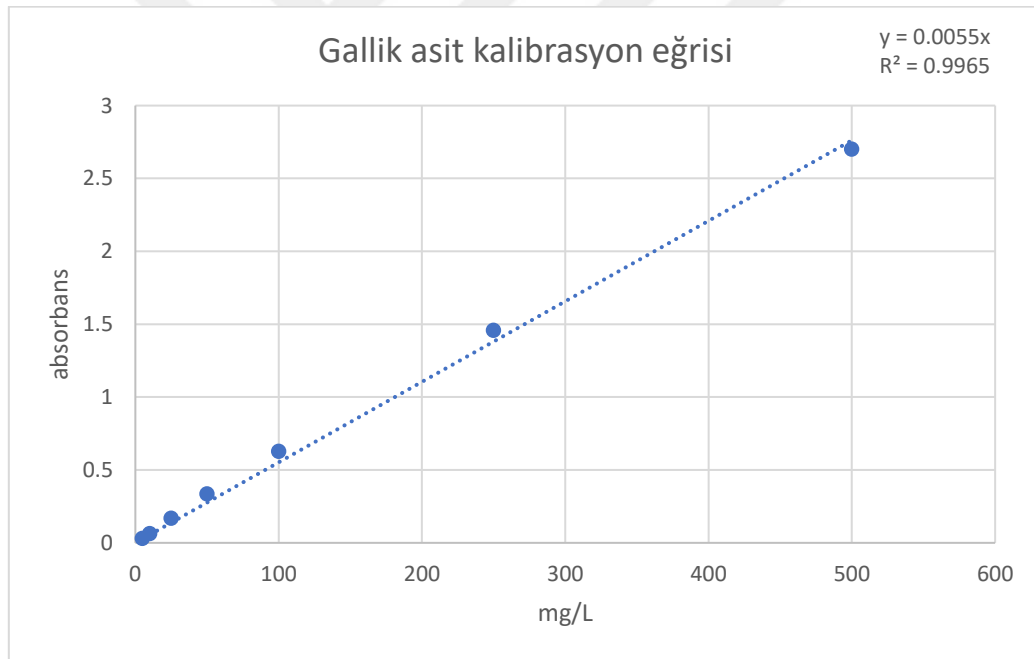
Tablo 3.4. Koşul 7 ve koşul 8 uygulanan ekstraksiyon koşulları ve işlem basamakları

Koşul 7	Koşul 8
1 gece rehidrasyon (Kuru yaprak:su oranı 1:20) - Ultrases uygulaması - Enzim ilavesi (1 ya da 2mL Viscozyme), 1-24 saat inkübasyon, 350 rpm karıştırma - Oda sıcaklığında karıştırma (pH 9, 2 saat) - Santrifüj (7500 rpm, 25°C, 30 dakika) - Supernatant toplama	1 gece rehidrasyon (Kuru yaprak:su oranı 1:20) - Enzim ilavesi (1 ya da 2mL Viscozyme), 1-24 saat inkübasyon, 350 rpm karıştırma - Oda sıcaklığında karıştırma (pH 9, 2 saat) - Enzim inaktivasyonu (5 dakika kaynayan suda bekletme) - Santrifüj (7500 rpm, 25°C, 30 dakika) - Supernatant toplama

3.6. Analiz Yöntemleri

3.6.1. Numunelerde toplam fenolik madde tayini

Şeker pancarı yaprak tozu ile hazırlanan protein ekstraktlarının Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak toplam fenolik madde tayinleri yapılmıştır (Singleton & Rossi, 1965). Uygun oranlarda seyreltilmiş örnekten 100 µl alınıp, 1000 µl Folin Ciocalteu reaktifi (1/10 oranında distile su ile seyreltilmiştir) ile karıştırılıp 3 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sona ermesi ile üzerine 800 µl Na₂CO₃ (%7,5) ilave edilmiştir ve karıştırılıp 1 saat karanlık ortamda tekrar inkübe edilmiştir. Sonrasında 765 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür ve elde edilen sonuçlar gallik asit eşleniği cinsinden ifade edilmiştir (Agilet Carry 60, ABD). Örnekler 2 paralel olarak çalışılmıştır.



Şekil 3.3. Gallik asit kalibrasyon eğrisi

3.7. Örneklerde ezim inhibisyon aktivite tayinleri

3.7.1.1. α -Amilaz inhibisyon deneyi

Ayyash ve diğerleri (2018)’ te belirlenen yönteme göre şeker pancarı yaprak tozuyla elde edilen örneklerin α -amilaz enzim inhibisyon deneyi gerçekleştirilmiştir. İlk olarak α -amilaz enzimi

(10 unit/ml) ile 0.1 M tuzsuz sodyum fosfat tamponu (pH: 6.8) hazırlanmıştır. 100 µL örnek alınıp içerisine 100 µL α-amilaz enzimi (10 unit/ml) ilave edilmiştir ve su banyosu içerisinde 37 °C’de 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde sodyum fosfat tamponu (pH 6.8) ile hazırlanmış olan 250 µL % 1 (mg/ml)’ lik nişasta eklenip reaksiyon başlatılmıştır ve bu reaksiyon su banyosu içerisinde 37 °C’de 5 dakika inkübasyona bırakılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 0.4 M NaOH içinde %1’lık 3,5-dinitrosalisilik asit ve % 12’lık sodyum potasyum tartarat ile hazırlanmış olan 200 µL DNS reaktifi ilave edilmiştir. Su banyosunda 95°C’ de 10 dakika boyunca bekletilerek enzim inaktive hale getirilip reaksiyon sonlandırılmıştır ve üzerine 1 ml distile su eklenip 540 nm’de absorbans ölçümü ile α-amilaz inhibisyonu belirlenmiştir. Örnekler 2 paralel çalışılmıştır ve her örnek için substrat ve enzim içermeyen kontrol deney hazırlanmıştır.

3.7.1.2. Lipaz inhibisyon deneyi

Lipaz inhibisyon tayini Gordon J. McDougall ve diğerleri (2009)’ de belirlenen yöntemle göre modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir (McDougall, Kulkarni, & Stewart, 2009). Lipaz enzimi (10 mg/ml) 8000 rpm de 10 dakika santrifüjlenerek hazırlanmıştır. Analize başlamadan önce enzim aktivitesini belirlemek amacıyla farklı sürelerde (30 dk., 45 dk., 60 dk. 75dk. ve 90 dk.) denemeler yapılmıştır. 100mM Tris-buffer (pH:8.2) tampon çözeltisi olarak hazırlanmıştır. Analize başlamadan önce farklı sürelerde (15 dk., 45 dk., 60 dk., 75 dk. ve 90dk.) denemeler yapılmıştır. Her deneme süresi içerisinde örnekler 37°C’ye ayarlanmış su banyosu içerisinde inkübe edilmiştir süre bitiminde sırasıyla her örnek 6000 rpm’de 7dk. santrifüj edilip 400 nm’de absorbans değerleri ölçülmesiyle enzim aktivitesi belirlenmiştir. Önceden hazırlanan tampon çözeltisinden 400 µL alınıp ependorf içine eklendikten sonra sırasıyla 400 µL örnek, 450 µL substrat ve 150µL lipaz enzimi eklenip ile 90 dakika boyunca 37°C’ye ayarlanmış su banyosu içerisinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bittikten sonra örnekler 6000 rpm’de 7dk. santrifüj edilip 400 nm’de absorbans değerleri ölçülmesiyle lipaz inhibisyonu belirlenmiştir.

3.7.1.3. Antihipertansif aktivite

Şeker pancarı yapraklarının antihipertansif aktivitesi, Shalaby ve arkadaşları (2006) tarafından bildirilen yöntem esas alınarak, belirli modifikasyonlarla değerlendirilmiştir. Analizlerde anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibisyonu esas alınmış ve ölçümler spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilmiştir. Deneysel aşamada pH 7.0'de hazırlanmış 0.01 mol/L fosfat tamponlu salin (PBS; NaCl konsantrasyonu: 0.5 mol/L) içerisinde 0,1 U/mL yoğunlukta ACE çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra, uygun oranlarda seyreltilmiş örneklerden 40 µL alınarak 20 µL ACE çözeltisi ile karıştırılmış ve 37 °C'de 15 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Ardından, 740 µL FAPGG (N-[3-(2-Furil)akriloil]-L-fenilalanil-glisilglisin) substratı eklenmiş ve 37 °C sıcaklıkta 75 dakika boyunca inkübasyon devam ettirilmiştir. Reaksiyonun ardından 400 µL PBS ilave edilmiş ve absorbans değerleri 340 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Analizlerin güvenilirliğini sağlamak amacıyla tüm örnekler 2 paralel olarak analiz edilmiştir.

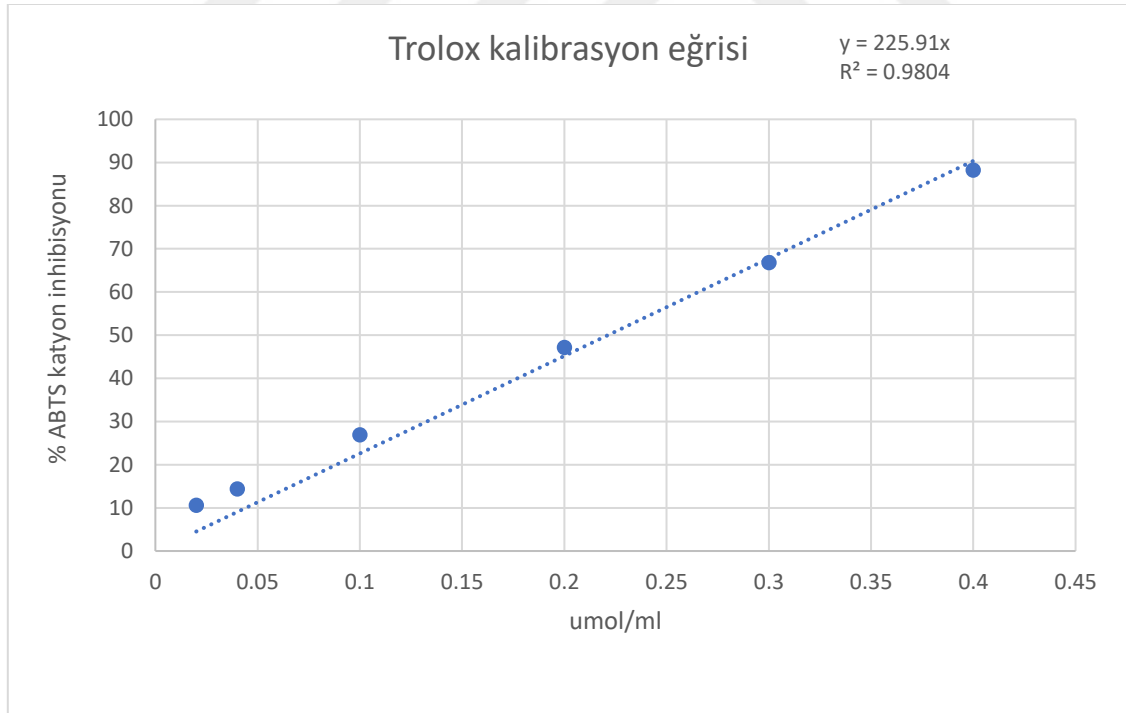
3.7.2. Örneklerde antioksidan aktivite tayinleri

3.7.2.2. DPPH deneyi

Brand-Williams vd. (1995) ve Kim vd. (2002)'de anlatıldığı şekilde DPPH (2,2- Difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil) hidrazil) radikali kullanılarak antioksidan aktivite ölçümü gerçekleştirilmiştir. İlk olarak 0,06 mmol/L metanol olacak şekilde DPPH çözeltisi hazırlanmıştır ve bu çözelti 0,06 mmol/L metanol kullanılarak başlangıç absorbans değeri $0,700 \pm 0,020$ olarak ayarlanmıştır. Şeker pancarı yaprak tozu ile hazırlanan örnek çözeltisi içerisinden 0,5 mL alınmış olup üzerine 1.95 mL DPPH çözeltisi ilave edilerek 30 dakika karanlık bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır ve inkübasyon süresi bitimiyle birlikte çözeltinin 517 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir 734 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir (Agilent Carry 60).

3.7.2.3. ABTS deneyi

Re ve diğerleri (1999) tarafından tanımlanan ABTS (2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiyazolin-6-sulfonik asit)) serbest radikallerini nötralize etme aktiviteleri ölçülmüştür. Örneklerin antioksidan aktivite ölçümleri troloks standart eğrisi antioksidan kapasite yöntemi kullanılarak bulunması amaçlanmıştır. İlk olarak ABTS radikal çözeltisi 2,45 mmol/L potasyum persülfat içerisinde hazırlanmıştır ve 75 mmol/L tuzlu fosfat tampon çözeltisi (150 mmol/L NaCl içeren ve pH 7.4 ayarlanmış) kullanılarak ABTS radikal çözeltisinin başlangıç absorbansı 0.700 ± 0.020 ayarlanmıştır. Şeker pancarı yaprak tozu ile hazırlanan örnek çözeltisi içerisinde 100 μ L alınarak ependorf içerisine eklenmiştir ve üzerine 1.9 ml 7 mmol/L ABTS radikal çözeltisi ilave edilip 6 dakika karanlık bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi bitiminde 734 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir (Agilent Carry 60). Örnekler 2 paralelli çalışılmıştır.



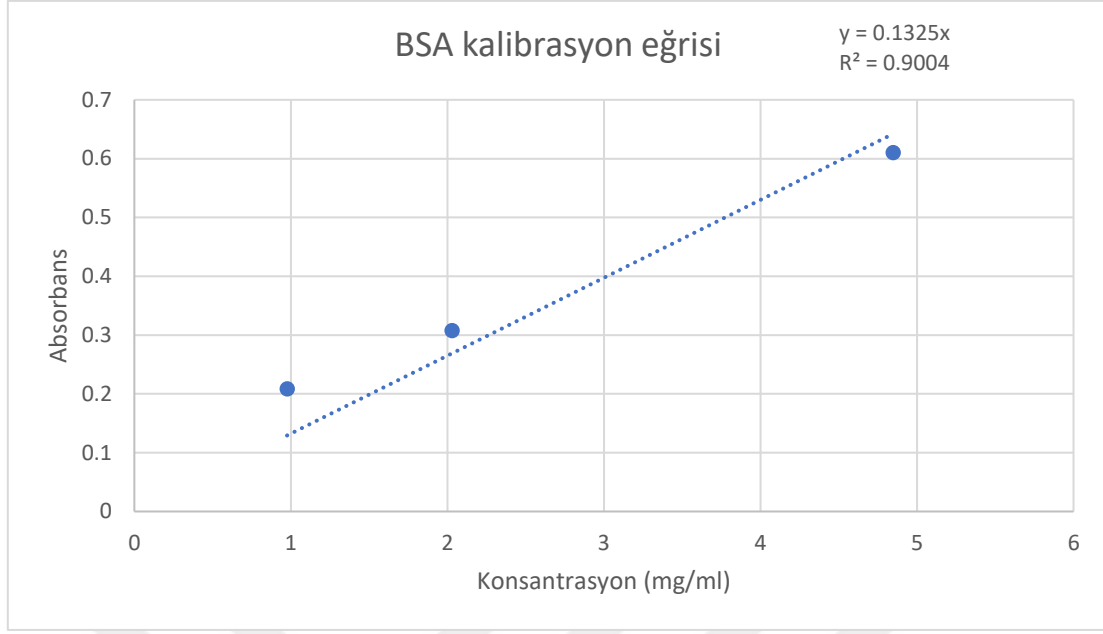
Şekil 3.4. Trolox kalibrasyon eğrisi

3.7.2.4. Hidroksil (OH⁻) radikali bağlama kapasitesi

Smirnoff ve Cumbes (1989) tarafından bazı modifikasyonlarla açıklanan yönteme göre belirlenmiştir. İlk olarak 150 µl sodyum salisat (20 mM) ependorf içine eklenmiştir. Ardından sırasıyla 500 µl Demir II Sülfat (1,5 mM FeSO₄), 500 µl örnek, 350 µl Hidrojen peroksit (H₂O₂, 6 mM) eklenmiş olup önceden 37  C'ye ayarlanmış su banyosu içerisinde 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi sonunda 510 nm absorbans ölçülmüştür.

3.7.3. Örneklerde    n r protein miktarı tayini

şeker pancarı yaprak tozu ile hazırlanan örneklerin Lowry, Rosebrough, Farr, & Randal (1951) yöntemi ile    n r protein miktarı tayinleri yapılmıştır. İlk olarak bir şişe içerisine 0.1 mol/L NaOH   eltisi içinde 245 ml %2'lik Na₂CO₃, 2,5 ml %1'lik CuSO₄, 2,5 ml %1'lik Na-K tartarat eklenip karıştırılarak Lowry reaktifi hazırlanır. 0.2 ml örnek ependorf içerisine eklenir ve üzerine 2,1 ml Lowry reaktifi ilave edilip karıştırılmıştır ve aynı zamanda oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi bitiminde 0,2 ml Folin-Ciocalteu (1/10 oranında distile su ile seyreltilmiş) ependorflara eklenip 60 dakika oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Hemen ardından oluşan renk spektrofotometrik olarak 750 nm'de ölçülmüştür ve elde edilen sonuçlar BSA (bovine serum albümine) cinsinden ifade edilmiştir. Örnekler 2 paralel çalışılmıştır.



Şekil 3.5. BSA kalibrasyon eğrisi

3.7.4. Örneklerde toplam protein tayini

Şeker pancarı yaprak tozu ile hazırlanan örneklerin toplam azotlu madde miktarı tayini Kjeldahl yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Hazırlanan örneklerin tartımı gerçekleştirildikten sonra yakma tüplerinin içerisine eklenmiştir. Daha sonra çeker ocak içerisindeki yakma tüplerinin üzerine 15 mL konsantre sülfürik asit (H_2SO_4) ve bir tane katalizör tablet (% 1.5 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ +% 2 Se - Cu-Se, Sigma Aldrich) ilave edilip tüpler yakma ünitesi içerisine yerleştirilmiştir. Yakma ünitesinde önce 250 ° C’de 15 dakika sonra 420 ° C’de 90 dakika boyunca yakma işlemi gerçekleştirilmiştir. Yakma işlemi bittikten sonra tüplerin soğuması beklenir ve soğuyan tüpler sırayla distilasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sarfiyatlar not edilmiştir. Örnekler 2 paralel olarak çalışılmış; sarfiyatlar kaydedilmiş ve aşağıdaki formül kullanılarak yüzde azot (%N) içeriği hesaplanmıştır.

$$\%Azot: \frac{(S - S_{blank}) \times F \times 0,0014}{m} \times 100$$

Burada;

S: Titrasyonda tüketilen HCl miktarı (mL)

S_{blank}: Titrasyonda kör için tüketilen HCl miktarı (mL)

F: HCl faktörü

m: Örnek ağırlığı (g)

3.7.5. Örneklerde istatistiksel değerlendirme

Çalışmada incelenen şeker pancarı yapraklarından elde edilen protein ekstraktlarının analiz edilen özellikleri arasında anlamlı farklılıklar olup olmadığı araştırılmıştır. Tüm analizler ikili paralel olarak gerçekleştirilmiştir, ayrıca sonuçlar ortalama ve standart sapma şeklinde sunulmuştur. İstatistiksel değerlendirmeler, %95 güven düzeyinde SPSS programı (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılarak Duncan çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Şeker Pancarı Yapraklarından Elde Edilen Protein Ekstraktlarının Toplam Protein Ve Protein Verimleri

Bu çalışmada, şeker pancarı yapraklarından ısı çöktürme, izoelektrik noktada çöktürme ve amonyum sülfat çöktürme yöntemleriyle elde edilen ekstraktların toplam protein içerikleri ve protein verimleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.1.).

Yapılan analizler sonucunda, protein içeriği bakımından en yüksek değer $41,13 \pm 1,24$ ile PF2 örneğinde elde edilmiştir. Bu durum, izoelektrik noktada çöktürme yönteminin, proteinlerin pH 4,5–5 civarında çözünürlüklerini kaybederek çökmesini sağlamasıyla açıklanabilir. İsoelektrik çöktürme, özellikle yüksek saflıkta protein elde etmek amacıyla tercih edilen bir yöntemdir (Kleintop ve ark., 2013). Ancak bu yöntemde protein verimi yalnızca %3,43 olarak belirlenmiş, bu da pelette biriken proteinin toplam ekstrakt içindeki oranının sınırlı kaldığını göstermektedir. Bu bulgu, Tamayo Tenorio ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan çalışmada da desteklenmiş ve izoelektrik çöktürme yönteminin yüksek saflık sağlarken düşük toplam verimle sonuçlandığı bildirilmiştir.

PF1 örneği ise $29,50 \pm 0,17$ toplam protein içeriği ve %37,20 protein verimi ile ısı çöktürme yönteminin çözünür proteinleri koruyabildiğini göstermektedir. Isı uygulaması, bazı proteinlerin denatürasyonuna yol açsa da, düşük sıcaklıklarda kontrollü uygulandığında süpernatanttaki çözünür proteinlerin korunmasını sağlayabilmektedir (Lamsal ve ark., 2007). Bu durum PF1 örneğinin yüksek verimiyle doğrulanmıştır. Benzer şekilde Akyüz ve Ersus (2021), 55 °C'de yapılan ısı uygulamasının proteinlerin çözünürlük ve biyoyararlılığını artırabileceğini bildirmiştir.

YF örneği, $11,04 \pm 0,09$ toplam protein içeriği ve %24,37 protein verimi ile orta düzeyde değerlere sahiptir. Bu fraksiyon, ısı çöktürme işlemi sonrasında oluşan pelet kısmıdır ve denatüre olmuş proteinlerin birikmesini temsil etmektedir. PF1 ve YF örnekleri karşılaştırıldığında, çözünür fraksiyonun daha yüksek protein oranına sahip olduğu görülmektedir. Bu da süpernatanttaki proteinlerin büyük kısmının çökmeden korunabildiğini göstermektedir.

PF3 fraksiyonunda belirlenen toplam protein içeriği $27,44 \pm 0,95$ olup, bu değer bitkisel kaynaklı protein ekstraksiyonlarında oldukça yüksek bir düzeye işaret etmektedir. Şeker pancarı yapraklarından elde edilen bu fraksiyon, Akyüz ve Ersus (2021) tarafından yeşil yapraklı sebzelerde bildirilen %20–25 aralığındaki toplam protein değerlerinden daha yüksek sonuçlar sunmaktadır. Aynı zamanda %36,50 olarak hesaplanan protein verimi, ekstraksiyon sürecinin etkinliğini ortaya koymakta ve bu yöntemin, şeker pancarı yaprakları gibi tarımsal atıkların fonksiyonel protein kaynaklarına dönüştürülmesinde başarılı bir strateji olduğunu göstermektedir. Literatürde Tomayo Tenorio ve arkadaşları (2017) tarafından bildirilen %25–35 aralığındaki verim değerleriyle karşılaştırıldığında, bu çalışmada elde edilen protein veriminin bu sınırların üzerinde yer alması, uygulanan amonyum sülfat çöktürme protokolünün yüksek ekstraksiyon kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, PF3 fraksiyonu hem miktar hem de verim açısından değerlendirildiğinde, fonksiyonel ve besinsel değeri yüksek bir protein kaynağı potansiyeli taşımaktadır. Sonuç olarak, çalışmada elde edilen bulgular; ısı çöktürme yönteminin protein verimi açısından daha avantajlı, izoelektrik çöktürme yönteminin ise saflık açısından daha etkili olduğunu göstermektedir. Amonyum sülfat yöntemi ise bu çalışmada düşük performans sergilemiştir. Bu durum, yüksek tuz konsantrasyonunun proteinlerde kısmi denatürasyona yol açması ve çözünür proteinlerin kaybına neden olmasıyla ilişkili olabilir. Nitekim literatürde de benzer şekilde, amonyum sülfat çöktürmesinin bazı yaprak proteinlerinde düşük verim sağladığı ve optimum tuz derişimi ile kademeli çöktürme stratejilerinin gerekli olduğu bildirilmiştir (ör. Akyüz & Ersus, 2021; Jwanny ve ark., 1993).

Tablo 4.1. Protein fraksiyonlarının toplam protein ve protein verimi analiz sonuçları

	Toplam Protein (%)	Protein Verimi (%)
YF	$11,04 \pm 0,09^a$	24,37
PF1	$29,50 \pm 0,17^b$	37,20
PF2	$41,13 \pm 1,24^c$	3,43
PF3	$27,44 \pm 0,95^b$	36,5

*: Aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0.05$).

4.2. Ultrases Destekli Ekstraksiyon Yöntemi ile Şeker Pancarı Yapraklarından Elde Edilen Ekstraktlarda Toplam Protein ve Protein Verimleri

4.2.1. Koşul 1 ve koşul 2’de üretilen ekstraktların protein içerikleri ve protein verimleri

Şeker pancarı yapraklarından protein ekstraksiyonu amacıyla uygulanan Koşul 1 ve Koşul 2 protokollerinin etkinliği değerlendirilmiştir. Tablo 4.2’de bu koşullar altında üretilen ekstraktların protein içerikleri ve protein verimleri sunulmaktadır. Koşul 1’de izoelektrik noktada çöktürme yöntemi uygulanarak elde edilen ekstraktlar analiz edilmiş, Koşul 2’de ise ekstraktlar suda çözünen ve suda çözünmeyen fraksiyonlar olarak iki grupta incelenmiştir. Protein içerikleri ve protein verimleri Kjeldahl yöntemi ile belirlenmiştir. Koşul 1 kapsamında elde edilen ekstraktlarda en yüksek protein içeriği $\%45,92 \pm 2,87$ ile Vis-1 (Viscozyme® uygulanan örnek) grubunda belirlenmiştir. Bunu sırasıyla Pek-1 (Pektinaz uygulanan örnek; $\%44,08 \pm 1,77$) ve Kontrol-1 (enzim ilavesi yapılmayan örnek; $\%42,38 \pm 2,15$) takip etmiştir. Ancak bu koşulda protein verimi $\%11,02 - 11,87$ aralığında kalmış, yani yüksek protein içeriğine rağmen toplam ekstraksiyon verimi düşük bulunmuştur. Bu durum, izoelektrik çöktürme basamağının protein kayıplarına yol açarak verimi sınırladığını düşündürmektedir. Koşul 2’de ekstraktlar hem suda çözünen hem de suda çözünmeyen fraksiyonlar şeklinde değerlendirilmiştir. Suda çözünen fraksiyonlarda protein içerikleri oldukça düşük olup en yüksek değer $\%0,31 \pm 0,02$ ile Vis-2 (Viscozyme® uygulanan örnek) grubunda elde edilmiştir. Ancak bu grupta protein verimleri $\%31,41 - 38,47$ aralığında olup Koşul 1’e kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar, suda çözünür proteinlerin miktar olarak az fakat daha fazla ekstrakt kütlesi içerdiğini göstermektedir. Suda çözünmeyen fraksiyonlarda ise protein içerikleri oldukça yüksek bulunmuştur. En yüksek içerik $\%25,60 \pm 0,09$ ile Pek-2 (Pektinaz uygulanan örnek) grubunda, en yüksek verim ise $\%63,81$ ile Vis-2 (Viscozyme® uygulanan örnek) grubunda elde edilmiştir. Bu bulgular, şeker pancarı yaprağındaki proteinlerin büyük ölçüde suda çözünmeyen fraksiyonlarda yoğunlaştığını ve özellikle enzim kullanımının ekstraksiyon verimini artırdığını göstermektedir. Literatürde de benzer bulgular rapor edilmiştir. Örneğin, Akyüz ve arkadaşları (2024), taze şeker pancarı yapraklarından pH 9’da yapılan ekstraksiyonlarda izoelektrik çöktürme yöntemiyle $\%20,20$ protein verimi elde etmişlerdir. Aynı çalışmada, ultrason destekli ekstraksiyon ile bu değer $\%28,60$ ’a, Pectinex Ultra SP-L

enzim ilavesiyle ise %38,09'a yükselmiştir. Bu durum, enzim ve ultrason uygulamalarının ekstraksiyon verimini artırmada etkili olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, izoelektrik noktada çöktürme yöntemi yüksek protein saflığı sağlarken, verim açısından sınırlı kalmaktadır. Buna karşılık, suda çözünmeyen fraksiyonlarda özellikle Viscozyme® uygulaması ile elde edilen sonuçlar, protein verimi açısından en etkili yaklaşım olarak öne çıkmaktadır. Bu bulgular, literatürde bildirilen çalışmalarla da uyumludur ve şeker pancarı yapraklarından protein ekstraksiyonunda enzim–ultrason kombinasyonunun önemini ortaya koymaktadır.

Tablo 4.2. Koşul 1 ve Koşul 2’de üretilen ekstraktların protein içerikleri ve protein verimleri

Koşul	Örnek	% Protein	Protein verimi (%)
Koşul 1 – izoelektrik noktada çöktürme ile üretilen ekstrakt	Kontrol-1	42,38±2,15a*	11,31
	Cel-1	35,73±0,51b	11,02
	Pek-1	44,08±1,77a	11,47
	Vis-1	45,92±2,87a	11,87
Koşul 2 – suda çözünen ekstrakt	Kontrol-2	0,28±0,00b	34,86
	Cel-2	0,26±0,00a	31,41
	Pek-2	0,26±0,00a	31,47
	Vis-2	0,31±0,02c	38,47
Koşul 2 – suda çözünmeyen ekstrakt	Kontrol-2	24,91±0,24a	60,58
	Cel-2	24,83±0,11a	58,34
	Pek-2	25,60±0,09c	62,96
	Vis-2	25,33±0,02b	63,81

*: Aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p <0.05).

4.2.2. Koşul 3 ve koşul 4’de üretilen ekstraktların protein içerikleri ve protein verimleri

Şeker pancarı yapraklarından protein ekstraksiyonu amacıyla uygulanan Koşul 3 ve Koşul 4 protokollerinin etkinliği değerlendirilmiş, elde edilen ekstraktların protein içerikleri ve protein verimleri Tablo 4.3.’de sunulmuştur. Her iki protokolde de Viscozyme® enzimi kullanılmış olup, yalnızca ultrason uygulama sırası farklılık göstermektedir. Elde edilen sonuçlara göre, Viscozyme® 1 mL uygulamasında Koşul 3’te en yüksek protein içeriği %16,47 ve en yüksek protein verimi %67,23 olarak bulunmuştur. Koşul 4’te bu değerler sırasıyla en yüksek protein içeriği %12,57 ve en yüksek protein verimi %51,29 olarak bulunmuştur. 0,1 mL ve kontrol gruplarında da benzer eğilim gözlenmiş, Koşul 3’teki verimler (sırasıyla %30,87 ve %31,69) Koşul 4’e kıyasla (%28,33 ve %28,51) daha yüksek olmuştur. Genel olarak, her iki parametre açısından da Koşul 3’ün Koşul 4’e kıyasla daha yüksek değerlere ulaştığı ve bu farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Bu bulgular, ultrasesin enzim ilavesinden önce uygulanmasının, hücre duvarı ve hücre içi matriks yapısını kavitasyon, mikrojet ve kesme kuvvetleri ile parçalayarak enzimin substrata erişimini kolaylaştırdığını göstermektedir. Ön-işlem olarak ultrases uygulaması, hücre içi proteinlerin çözeltide serbest kalmasını artırmış ve böylece ekstraksiyon verimini yükseltmiştir. Buna karşılık ultrasesin hidroliz sonrası uygulanması, hücresel bariyerler enzim etkisiyle zaten kısmen yıkıldığından, ilave bir çözünürlük artışı sağlamamış; hatta son aşamadaki ultrasesin yarattığı ısınma, köpüklenme ve protein denatürasyonu gibi etkiler, verimi sınırlamış olabilir. Literatürde de benzer sonuçlar rapor edilmiştir. Örneğin, Ghosh ve ark., (2020) ultrasesin enzimatik ekstraksiyon öncesinde uygulanmasının, mikroalg ve bitkisel materyallerde protein salımını belirgin şekilde artırdığını bildirmiştir. Yine Zhang ve ark., (2022), ultrasesin enzimatik hidroliz sonrası uygulanmasının, enzim öncesi uygulamaya kıyasla daha düşük çözünür protein verimi sağladığını rapor etmiştir. Bu durum, ultrasesin proteinlerin yapısal bütünlüğüne ve çözünürlük özelliklerine uygulama zamanına bağlı olarak farklı etkiler gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, bu çalışmada protokol sırası ekstraksiyon etkinliği üzerinde belirleyici olmuştur. Ön-ultrases yaklaşımı (Koşul 3), özellikle yüksek enzim konsantrasyonunda (1 mL) protein verimini artırmada daha etkili bulunmuştur. Bu bulgu, şeker pancarı yapraklarından fonksiyonel proteinlerin geri kazanımında, ultrasesin enzimden önce uygulanmasının daha uygun bir strateji olabileceğini göstermektedir.

Tablo 4.3. Koşul 3 ve Koşul 4’de üretilen ekstraktların protein içerikleri ve protein verimleri

Koşul	Örnek	% Protein	Protein verimi (%)
Koşul 3 – Ultrases sonrası enzim ilavesi	Kontrol-3	7,76±0,13a*	31,69
	Vis (0,1 mL)-3	7,56±0,53a	30,87
	Vis (1 mL)-3	16,47±1,97b	67,23
Koşul 4 – Enzimatik hidroliz sonrası ultrases uygulaması	Kontrol-4	6,99±0,04a	28,51
	Vis (0,1 mL)-4	6,94±1,08a	28,33
	Vis (1 mL)-4	12,57±0,10b	51,29

*: Aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0.05$).

4.2.3. Koşul 5 ve koşul 6’de üretilen ekstraktların protein içerikleri ve protein verimleri

Şeker pancarı yapraklarından protein ekstraksiyonu amacıyla uygulanan Koşul 5 ve Koşul 6 protokollerinin etkinliği değerlendirilmiş olup, bu protokoller sonucunda elde edilen ekstraktların toplam protein içerikleri ve protein verimleri Tablo 4.4’te sunulmuştur. Koşul 5 ve Koşul 6 uygulamaları, enzim inaktivasyon basamağının zamanlamasının ekstraksiyon verimliliği üzerindeki etkisini karşılaştırmalı olarak değerlendirmek amacıyla tasarlanmıştır. Her iki koşulda da örnekler, rehidrasyonun ardından ultrases ön işlemi ile kavitasyon etkisine maruz bırakılmış ve bu sayede bitki hücre duvarlarının yapısal bütünlüğünün zayıflatılması hedeflenmiştir. Ultrases sonrası her iki gruba da Viscozyme® enzimi farklı miktarlarda (0,1 mL ve 1 mL) ilave edilmiş ve 1, 3 ve 24 saatlik inkübasyon süreleri uygulanmıştır. Koşul 5’te santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra süpernatant ayrılmış ve enzim inaktivasyonu bu aşamadan sonra gerçekleştirilmiştir. Buna karşın, Koşul 6’da enzim inaktivasyonu santrifüjden önce yapılmış, ardından süpernatant toplanmıştır. Sonuçlar, her iki koşulda da en yüksek toplam protein içeriği ve protein veriminin 1 mL enzim ilavesi ve 24 saatlik inkübasyon süresinde elde edildiğini göstermiştir. Bu koşullarda Koşul 5’te toplam protein içeriği $12,63 \pm 0,07$ ve verim $51,54$ iken, Koşul 6’da sırasıyla $12,20 \pm 0,31$ ve $49,79$ olarak ölçülmüştür. Daha kısa inkübasyon sürelerinde (1 ve 3 saat) her iki parametrede de belirgin düşüşler gözlenmiştir.

Genel eğilim, tüm süre ve enzim miktarlarında Koşul 5'in Koşul 6'ya kıyasla daha yüksek toplam protein içeriği ve verim sağlaması yönündedir. Bu durum, santrifüj sonrası inaktivasyonun, enzimin hidroliz sürecini tamamlamasına olanak tanıdığı ve böylece matriks içerisindeki toplam protein içeriğini artırdığı şeklinde yorumlanabilir. Koşul 6'da ise inaktivasyonun santrifüj öncesinde uygulanması, ısıya bağlı protein koagülasyonu ve fenolik-polisakkarit komplekslerinin pellete taşınması gibi mekanizmalarla toplam protein miktarını sınırlamış olabilir. Bu bulgular, literatürde bildirilen benzer çalışmalarla uyumludur. Zhang ve ark., (2022) ve Hildebrand ve ark., 2020, enzimatik hidroliz süresinin uzatılmasının protein salımını artırdığını, ancak erken inaktivasyonun hidroliz verimini düşürdüğünü rapor etmiştir. Ayrıca Akyüz ve ark., (2024), enzimatik ekstraksiyonlarda ultrases ön işleminin matriks geçirgenliğini artırarak enzimin substrata erişimini kolaylaştırdığını ve toplam protein içeriğini yükselttiğini bildirmiştir. Bu bağlamda, çalışmamızda elde edilen veriler, enzim inaktivasyonunun santrifüj sonrası yapılmasının, özellikle yüksek enzim konsantrasyonu ve uzun hidroliz sürelerinde, şeker pancarı yapraklarından toplam protein içeriği ve veriminin artırılmasında daha uygun bir strateji olabileceğini ortaya koymaktadır.

Tablo 4.4. Koşul 5 ve Koşul 6'de üretilen ekstraktların protein içerikleri ve protein verimleri

Koşul	Örnek	% Protein	Protein verimi (%)
Koşul 5 – Santrifüj sonrası enzim durdurma	Kontrol – 5 1 saat inkübasyon	8,74±0,19a*	35,66
	Kontrol –5 3 saat inkübasyon	8,60±0,54a	35,08
	Kontrol –5 24 saat inkübasyon	8,39±0,08a	34,22
	Vis (0,1 mL) - 5 1 saat hidrolizasyon	8,94±0,03a	36,50
	Vis (0,1 mL) -5 3 saat hidrolizasyon	8,85±0,01a	36,13

	Vis (0,1 mL) -5 24 saat hidrolizasyon	8,92±0,00a	36,47
	Vis (1 mL) -5 1 saat hidrolizasyon	12,05±0,01c	49,17
	Vis (1 mL) - 5 3 saat hidrolizasyon	11,34±0,22b	46,28
	Vis (1 mL) - 5 24 saat hidrolizasyon	12,63±0,07d	51,54
Koşul 6 – Enzim durdurma sonrası santrifüj	Kontrol – 6 1 saat inkübasyon	8,16±0,06a	33,31
	Kontrol – 6 3 saat inkübasyon	8,78±0,14a	35,82
	Kontrol – 6 24 saat inkübasyon	8,71±0,22a	35,33
	Vis (0,1 mL) -6 1 saat hidrolizasyon	8,55±0,24a	34,92
	Vis (0,1 mL) -6 3 saat hidrolizasyon	8,87±0,03a	36,22
	Vis (0,1 mL) -6 24 saat hidrolizasyon	8,92±0,11a	36,40
	Vis (1 mL) -6 1 saat hidrolizasyon	10,68±0,02b	43,59
	Vis (1 mL) -6 3 saat hidrolizasyon	10,60±0,73b	43,28
	Vis (1 mL) -6 24 saat hidrolizasyon	12,20±0,31c	49,79

*: Aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0.05$).

4.2.4. Koşul 7 ve koşul 8’de üretilen ekstraktların protein içerikleri ve protein verimleri

Şeker pancarı yapraklarından protein ekstraksiyonu amacıyla uygulanan Koşul 7 ve Koşul 8 protokollerinin etkinliği değerlendirilmiş, bu protokoller sonucunda elde edilen ekstraktların protein içerikleri ve protein verimleri Tablo 4.5.’de sunulmuştur. Her iki koşulda da Viscozyme® enzimi kullanılmıştır. Koşul 7’de enzim eklenmeden önce ultrases ön işlemi uygulanmış (2 mL Viscozyme®, 24 saat hidroliz) ve %15,90 protein içeriği ile %63,71 verim elde edilmiştir. Koşul 8’de ise ultrases uygulanmamış, doğrudan enzimatik hidroliz gerçekleştirilmiş ve santrifüj öncesinde enzim inaktivasyonu yapılmıştır. Bu koşulda %14,53 protein içeriği ve %60,03 verim elde edilmiştir. Elde edilen bulgular, ultrases ön işleminin hücre duvarı yapısını mekanik olarak parçalayarak yüzey alanını artırdığını ve enzimlerin substrata daha etkin erişimini sağlayarak ekstraksiyon verimini iyileştirdiğini göstermektedir (Qian ve ark., 2023). Literatürde, bu mekanizmanın substrat morfolojisinde çatlak ve gözenek oluşumuna yol açarak enzim–substrat etkileşimini güçlendirdiği ve hidroliz verimini artırdığı bildirilmektedir. Ayrıca, balık proteinlerinden elde edilen hidrolizatlarda ultrases ön işlemi uygulanan örneklerde, protein çözünürlüğü ve hidroliz derecesinde anlamlı artışlar gözlemlenmiştir (Cropotova ve ark., 2025). Bununla birlikte, Koşul 8’de ultrases uygulanmamasına rağmen yüksek protein içeriği ve verim elde edilmesi, yalnızca ultrasesin değil; protokol tasarımının, enzim konsantrasyonunun, pH düzenlemesinin ve inkübasyon süresinin de ekstraksiyon verimliliğinde belirleyici olduğunu göstermektedir. Nitekim quinoa gibi diğer bitkisel kaynaklarda yapılan çalışmalarda, ultrases ve enzim kombinasyonunun yüksek verim sunduğu; ancak yalnızca işlem parametrelerinin (örneğin pH, enzim/substrat oranı, süre) dikkatle optimize edilmesinin de benzer düzeyde verim artışına yol açabileceği vurgulanmaktadır (Yang, 2024). Sonuç olarak, şeker pancarı yapraklarından protein ekstraksiyonunda maksimum verim elde edebilmek için ultrases ön işleminin enzimatik hidroliz öncesinde uygulanması önerilmekte; bununla birlikte enzim miktarı, pH ve hidroliz süresi gibi diğer kritik işlem parametrelerinin de optimize edilmesi gerekmektedir.

Tablo 4.5. Koşul 7 ve Koşul 8’de üretilen ekstraktların protein içerikleri ve protein verimleri

Koşul	Örnek	% Protein	Protein verimi (%)
Koşul 7	Vis (1 mL) – 7 1 saat hidrolizasyon	10,80±0,08a*	43,85
	Vis (1 mL) – 7 24 saat hidrolizasyon	13,14±0,23c	52,97
	Vis (2 mL) – 7 1 saat hidrolizasyon	12,42±0,13b	50,32
	Vis (2 mL) – 7 24 saat hidrolizasyon t	15,90±0,41d	63,71
Koşul 8	Vis (1 mL) – 7 1 saat hidrolizasyon	8,51±0,21a	34,43
	Vis (1 mL) – 7 24 saat hidrolizasyon	10,56±0,05b	42,97
	Vis (2 mL) – 7 1 saat hidrolizasyon	10,56±0,26b	42,97
	Vis (2 mL) – 7 24 saat hidrolizasyon	14,53±0,26c	60,03

*: Aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0.05$).

4.3. Şeker pancarı yapraklarından elde edilen protein ekstraktlarının suda çözünür protein miktarı

Isı çöktürme ve izoelektrik noktada çöktürme yöntemleri ile şeker pancarı yapraklarından elde edilen protein ekstraktlarının suda çözünür protein miktarları Tablo 4.6.’de verilmiştir. En yüksek suda çözünür protein içeriği, 241,3±4,6 mg BSA/g ekstrakt ile PF1 fraksiyonunda gözlemlenmiştir. Bu fraksiyon, ısı ile çöktürme işlemi sonrası elde edilen süpernatantı temsil etmektedir. Uygulanan 55 °C sıcaklık, proteinlerin yapısal bütünlüğünü tamamen bozmadan çözünür formda kalmasına olanak sağlamış olabilir. Bu durum, kontrollü sıcaklık uygulamasının proteinlerin çözünürlük ve fonksiyonelliğini korumada etkili olabileceğini bildiren Lamsal ve ark. (2007) ile uyumludur.

PF2 örneği, izoelektrik çöktürme yöntemi ile elde edilen peleti temsil etmekte olup $123,2 \pm 5,1$ mg BSA/g ekstrakt çözünür protein değeri ile orta seviyede bir sonuç vermiştir. Bu yöntemde, pH'ın proteinlerin izoelektrik noktasına (genellikle pH 4,5–5,5 arası) ayarlanması, proteinlerin minimum çözünürlük noktasına ulaşır çökelmelerine neden olur (Kleintop ve ark., 2013). Yine de elde edilen orta düzeydeki çözünür protein miktarı, bazı proteinlerin izoelektrik çökeltme sırasında tamamen agregasyona uğramayıp kısmen çözünür kaldığını düşündürmektedir.

PF3 fraksiyonunda belirlenen suda çözünür protein miktarı 218 ± 3 mg BSA/g ekstrakt olup, bu değeri PF1'den sonra en yüksek ikinci çözünürlük düzeyine karşılık gelmektedir. PF3, amonyum sülfat yardımıyla çöktürme yöntemiyle elde edilen protein fraksiyonudur. Bu yöntemde çözeltinin pH'ı önce 12'ye ayarlanmış, ardından %70 oranında amonyum sülfat ilavesiyle proteinlerin tuzlanma yoluyla selektif olarak çöktürülmesi sağlanmıştır. Bu koşullar altında, proteinlerin denatürasyonu minimum düzeyde kalmış, çözünürlük özellikleri büyük ölçüde korunmuştur. PF3'teki yüksek çözünürlük değeri, özellikle proteinlerin hidrofilik yapısının sürdürüldüğünü ve bu fraksiyonun fonksiyonel uygulamalar için uygun olduğunu göstermektedir. Barac ve arkadaşları (2010), baklagillerden elde edilen protein fraksiyonlarında suda çözünürlük değerlerinin 100–200 mg BSA/g ekstrakt aralığında olduğunu bildirmiştir. PF3'te elde edilen 218 mg BSA/g değeri, bu referans aralığın üzerinde yer almakta ve şeker pancarı yaprağından elde edilen proteinin fonksiyonellik açısından önemli bir potansiyele sahip olduğunu desteklemektedir.

YF fraksiyonunda (pelet), suda çözünür protein miktarı en düşük olarak belirlenmiştir ($50,1 \pm 3,4$ mg BSA/g ekstrakt). Varyans analizi sonucunda fraksiyonlar arasında suda çözünür madde miktarı bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Bu fraksiyonun, ısı uygulaması sonrası çöken ve muhtemelen denatüre olan proteinleri içerdiği göz önüne alındığında, düşük çözünürlük değeri beklenen bir sonuçtur. Isıya bağlı protein denatürasyonu, hidrofobik etkileşimlerin artmasına ve agregat oluşumuna yol açarak çözünürlüğü azaltır (Zhou ve ark., 2023). Bu durum, PF1 ile YF arasında belirgin fark oluşmasına neden olmuştur. Varyans analizi sonuçlarına göre, fraksiyonlar arasında suda çözünür protein miktarı bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Sonuçlar, ısı ile çöktürme sonrası süpernatant kısmın (PF1) çözünür protein açısından en avantajlı fraksiyon olduğunu ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, protein izolasyonu ve

fonksiyonel ürün geliştirme çalışmalarında, kontrollü ısı uygulamasının çözünürlük açısından değerli olduğu söylenebilir.

Tablo 4.6. Protein fraksiyonlarının suda çözünür protein miktarı analiz sonuçları

	Suda çözünür protein (mg BSA/g ekstrakt)
YF	50,1 ± 3,4 ^a
PF1	241,3 ± 4,6 ^d
PF2	123,2 ± 5,1 ^b
PF3	218±3 ^c

*: Aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p < 0.05).

4.4. Şeker pancarı yapraklarından elde edilen protein ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı

Şeker pancarı yapraklarından elde edilen farklı protein fraksiyonlarının toplam fenolik madde içerikleri Tablo 4.7.'de sunulmuştur. En yüksek toplam fenolik bileşik miktarı PF1 fraksiyonunda belirlenmiştir (20,29 ± 0,44 µg GA/mg ekstrakt). Bu fraksiyon, ısı ile çöktürme yöntemiyle elde edilen süpernatant kısmını temsil etmektedir. Isı uygulamasının ılımlı koşullarda gerçekleştirilmesi (55 °C, 1 saat) fenolik bileşiklerin termal bozunmadan korunmasını sağlamakta ve çözünür formda süpernatantta kalmasına olanak tanımaktadır (López ve ark., 2011). Bu bulgu, fenolik bileşiklerin ısıya karşı kısmen stabil olduklarını ve su bazlı ekstraksiyon ortamında süpernatantta tutulduklarını göstermektedir.

PF2 fraksiyonu (izoelektrik noktada çöktürme ile elde edilen pellet), 11,60 ± 0,14 µg GA/mg fenolik madde içeriğiyle orta düzeyde bir sonuç vermiştir. Bu yöntem sırasında pH'nın 4,5 seviyesine ayarlanması, fenolik bileşiklerin iyonizasyon durumunu etkileyerek bazılarının proteinlerle birlikte çökmesine neden olabilir (Kleintop ve ark., 2013). Bununla birlikte, toplam fenolik içeriğin süpernatanta göre belirgin şekilde daha düşük kalması, fenolik bileşiklerin büyük ölçüde çözünür kısımda kaldığını desteklemektedir.

PF3 fraksiyonunda belirlenen toplam fenolik madde miktarı $17,67 \pm 0,56 \mu\text{g GA/mg}$ olup, bu değer PF1'in ardından ikinci en yüksek içeriğe sahiptir. Bu fraksiyon, amonyum sülfat yardımıyla çöktürme yöntemiyle elde edilmiş olup, uygulanan pH 12 gibi bazik koşulların fenolik bileşiklerin çözünürlük durumlarını etkilediği düşünülmektedir. Alkali ortamda birçok fenolik bileşik, kararlı iyonik formda kalabilmekte ve bu sayede ekstrakta geçiş oranı artabilmektedir. Aynı zamanda, amonyum sülfatın tuzlanma etkisiyle protein-fenolik etkileşimleri sınırlı düzeyde gerçekleşmiş olabilir. Bu durum, fenolik bileşiklerin süpernatantta kalmasını kolaylaştırarak PF3'te yüksek toplam fenolik içerik elde edilmesini sağlamış olabilir. Benkeblia (2005), fenolik bileşiklerin çözünürlüğünün pH ve iyonik güçten önemli ölçüde etkilendiğini belirtmiş ve özellikle hafif alkali koşullarda çözünürlüğün artabileceğini ifade etmiştir. PF3'te elde edilen bu değer, ekstraksiyon parametrelerinin fenolik bileşiklerin korunması ve ekstrakta geçişi açısından optimize edilebileceğini göstermektedir.

YF fraksiyonunda (ısı çöktürme sonrası oluşan pellet) ise toplam fenolik madde miktarı en düşük düzeyde tespit edilmiştir ($4,53 \pm 0,56 \mu\text{g GA/mg}$). Bu sonuç, fenolik bileşiklerin çoğunlukla çökelmeyerek süpernatantta kaldığını ve pellet içerisinde sınırlı düzeyde tutulduğunu göstermektedir. Ayrıca, yüksek sıcaklık uygulamasının bazı fenolik bileşiklerin degradasyonuna veya çözünürlüklerinin azalmasına yol açabileceği bilinmektedir (Zhou ve ark., 2023). Bu bulgular istatistiksel analizle de desteklenmiştir. Varyans analizi sonucunda gruplar arasında toplam fenolik madde içeriği bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Bütün bunlarla birlikte, ısı çöktürme işlemi sonrasında elde edilen süpernatant (PF1) fraksiyonu, toplam fenolik madde açısından en zengin ekstrakt olarak öne çıkmaktadır. Fonksiyonel gıda bileşeni olarak değerlendirilebilecek fenoliklerin, ekstraksiyon yöntemi ve işlem parametrelerine oldukça duyarlı olduğu bu çalışma ile bir kez daha doğrulanmıştır.

Tablo 4.7. Protein fraksiyonlarının toplam fenolik madde miktarı analiz sonuçları

Toplam fenolik madde ($\mu\text{g GA} / \text{mg}$)	
YF	4,53 $\pm$ 0,56 ^a
PF1	20,29 $\pm$ 0,44 ^d
PF2	11,60 $\pm$ 0,14 ^b
PF3	17,67 $\pm$ 0,56 ^c

*: Aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0.05$).

4.5. Şeker pancarı yapraklarından elde edilen protein ekstraktlarının ABTS⁺, DPPH ve OH⁻ radikali bağlama aktivitesi

Şeker pancarı yapraklarından elde edilen farklı protein fraksiyonlarının antioksidan aktiviteleri, ABTS⁺, DPPH ve OH⁻ radikali bağlama kapasiteleri üzerinden değerlendirilmiştir (Tablo 4.8.). Bu testler, ekstraktların serbest radikallerle etkileşim kapasitelerini ölçerek biyolojik açıdan fonksiyonel potansiyellerini belirlemede önemli veriler sunmaktadır.

ABTS⁺ radikali bağlama testinde en yüksek değer %38,02 $\pm$ 4,93 ile PF1 fraksiyonunda gözlemlenmiştir. Bu fraksiyon, ısı çöktürme yöntemi sonrası elde edilen süpernatant kısmını temsil etmektedir. Bu sonuç, ılımlı sıcaklık uygulamasının fenolik ve antioksidan bileşiklerin denatürasyonunu önleyerek çözeltide tutulmasını sağladığını göstermektedir. Literatürde, ısı uygulamasının bazı polifenollerin biyoyararlılığını koruyabildiği ve antioksidan kapasiteyi artırabileceği belirtilmiştir (Shahidi & Zhong, 2015). Bu bulgular istatistiksel analizle desteklenmiştir. PF3 fraksiyonunda ABTS⁺ radikal bağlama kapasitesi %22,14 $\pm$ 0,37 olarak belirlenmiştir. Bu değer PF1 ve YF fraksiyonlarına kıyasla daha düşük olsa da, PF2 fraksiyonundan istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur. Amonyum sülfat ile çöktürme yönteminde kullanılan yüksek pH (pH 12) koşulları, bazı antioksidan bileşiklerin stabilitesini olumsuz etkileyebileceğinden bu fraksiyonda daha sınırlı radikal bağlama yeteneği gözlemlenmiş olabilir. Ayrıca, amonyum sülfatın proteinleri çöktürme sırasında oluşturduğu

iyonik ortamın, fenolik bileşiklerin serbest radikallerle etkileşimini kısmen sınırladığı da düşünülebilir (Zhou ve ark., 2023). Yapılan varyans analizi (ANOVA) sonucunda gruplar arasında ABTS⁺ radikali giderme kapasitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$).

DPPH radikali bağlama testinde yine PF1 örneği $45,6 \pm 1,27$ ile en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Bu, PF1'in çözünür fenolik bileşikler bakımından da zengin olduğunu desteklemektedir. YF fraksiyonunda bu değer $7,7 \pm 0,46$ ile oldukça düşük kalırken, PF2 örneği $25,3 \pm 3,19$ ile orta düzeyde bir aktivite sergilemiştir. PF2'nin izoelektrik noktada çöktürme yöntemiyle elde edilmiş olması, pH değişimlerinin antioksidan moleküllerin yapısını etkileyebileceğini göstermektedir (Kleekayai ve ark., 2015). Bu bulgular istatistiksel analizle de desteklenmiştir. PF3 fraksiyonu, DPPH bağlama kapasitesi açısından $33,38 \pm 0,94$ ile oldukça dikkat çekici bir seviyede yer almıştır. Bu değer, PF2'den anlamlı düzeyde yüksek ve YF'den çok daha üstün bir antioksidan kapasiteye işaret etmektedir. Bu durum, PF3 fraksiyonunda yer alan bazı çözünür peptitlerin veya proteinlere bağlı fenolik yapıların DPPH radikalleri ile etkili şekilde reaksiyona girdiğini göstermektedir. Literatürde de belirtildiği üzere, protein-hidroksil grubu içeren fenolik bileşiklerin varlığı DPPH bağlama kapasitesini artırabilmektedir (Tang ve ark., 2019). Yapılan varyans analizi (ANOVA) sonucunda gruplar arasında DPPH radikali giderme kapasitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$).

OH⁻ radikali bağlama kapasitesine bakıldığında ise, en yüksek bağlama kapasitesi YF fraksiyonunda belirlenmiştir ($79,32 \pm 3,89$). Bu dikkat çekici durum, pelet kısmında bazı antioksidan proteinlerin veya peptitlerin birikmiş olabileceğini düşündürmektedir. PF1 ve PF2 örneklerinde bu değer sırasıyla $28,38$ ve $44,34$ olarak belirlenmiştir. Bu bağlamda, OH⁻ radikalini nötralize etme kapasitesinin sadece çözünür fenolik bileşiklerle değil, aynı zamanda özgül amino asit dizilerine sahip peptitlerle de ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Tacias-Pascacio ve ark., 2020). Bu bulgular istatistiksel analizle de desteklenmiştir. PF3 fraksiyonu, OH⁻ radikali bağlama kapasitesi bakımından $55,30 \pm 2,14$ değeriyle orta-yüksek düzeyde bir aktivite göstermiştir. Bu oran, PF1 ve PF2'nin üzerinde olup, YF'nin ardından ikinci sırada yer almaktadır. PF3'teki bu yüksek aktivite, amonyum sülfat çöktürme yöntemi sırasında peptitlerin yapısal olarak korunmuş olabileceğini ve bu yapıların hidroksil radikalleri ile etkili

şekilde bağlanabildiğini göstermektedir. Özellikle, bu yöntemle elde edilen fraksiyonların özgül amino asit dizileri ve aromatik halkalar içeren peptitler açısından zengin olması, OH⁻ bağlama kapasitesini destekleyebilir (Chalamaiah ve ark., 2018). Böylece PF3 fraksiyonunun hidroksil radikali bağlama kapasitesi bakımından dikkate değer bir biyolojik aktivite sergilediği söylenebilir. Yapılan varyans analizi sonucunda fraksiyonlar arasında OH⁻ radikali bağlama kapasitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir (p<0.05).

Genel olarak, PF1 fraksiyonu hem ABTS⁺ hem de DPPH testlerinde en yüksek antioksidan aktivite göstererek bu fraksiyonun fonksiyonel gıda bileşeni olarak potansiyel taşıdığını ortaya koymaktadır. OH⁻ radikali bağlama açısından ise YF örneği beklenenden daha yüksek kapasite göstermiş olup, bu durum pellette kalan farklı moleküllerin varlığına işaret etmektedir.

Tablo 4.8. Protein fraksiyonlarının ABTS⁺, DPPH ve OH⁻ Radikali Bağlama analiz sonuçları

	ABTS ⁺ radikali bağlama (%) - (1 mg/mL)*	DPPH radikali bağlama (%) - (20 mg/mL)*	OH ⁻ radikali bağlama (%) - (5 mg/mL)
YF	29,06 ± 3,5 ^d	7,7 ± 0,46 ^a	79,32 ± 3,90 ^d
PF1	38,02 ± 4,94 ^c	45,6 ± 1,27 ^d	28,38 ± 1,67 ^a
PF2	19,38 ± 3,21 ^a	25,3 ± 3,19 ^b	44,34 ± 5,11 ^b
PF3	22,14 ± 0,37 ^b	33,38 ± 0,94 ^c	55,30 ± 2,14 ^c

*: Aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p < 0.05).

4.6. Şeker pancarı yapraklarından elde edilen protein ekstraktlarının enzim inhibisyon aktiviteleri

Şeker pancarı yapraklarından elde edilen farklı protein fraksiyonlarının potansiyel biyolojik aktiviteleri, ADE (anjiyotensin dönüştürücü enzim), lipaz ve α -amilaz inhibitör kapasiteleri ile değerlendirilmiştir (Tablo 4.9.). Bu parametreler, ilgili protein fraksiyonlarının fonksiyonel gıdalarda kullanılabilirliğini ve sağlık açısından potansiyel etkilerini ortaya koymak adına önemlidir.

Yapılan analizlerde, α -amilaz inhibisyon aktivitesi tüm örneklerde “tespit edilemedi” (T.E.) olarak kaydedilmiştir. ADE inhibisyonu ise yalnızca PF3 fraksiyonunda anlamlı düzeyde gözlemlenmiş ($\%39,61 \pm 1,25$), diğer fraksiyonlarda ise ölçülebilir seviyede bulunamamıştır. Bu durum, PF3’ün amonyum sülfat ile çöktürme yöntemiyle elde edilmesinin, ADE inhibitör etkiye sahip özgül peptit veya proteinleri konsantre etmiş olabileceğini göstermektedir. Literatürde, ADE inhibitör aktivitenin özellikle hidrofobik amino asitler içeren kısa peptit zincirleriyle ilişkili olduğu ve bu tür peptitlerin amonyum sülfat gibi çöktürme yöntemleriyle ayrıştırılabildiği belirtilmiştir (Daliri ve ark., 2017; Martínez-Maqueda ve ark., 2012). Buna karşın PF1, PF2 ve YF gibi fraksiyonlarda bu tür peptitlerin ya bulunmaması ya da konsantrasyonlarının tespit sınırının altında kalması nedeniyle ADE inhibisyonu tespit edilememiştir. Ayrıca ADE inhibisyonunun gözlenebilmesi için özgül substrat-enzim etkileşimlerine sahip biyolojik aktif yapıların varlığı kritik olup, bu yapıların fraksiyonlara göre farklılık göstermesi doğaldır.

Lipaz inhibisyonu açısından incelendiğinde en yüksek aktivitenin PF1 örneğinde ($\%42,52 \pm 1,26$) olduğu gözlemlenmiştir. PF1 fraksiyonu, ısı ile çöktürme işlemi sonrası elde edilen süpernatantı temsil etmekte olup, bu sonuç ısı uygulaması sırasında lipaz inhibitörü özelliğe sahip protein veya peptitlerin çözeltide kaldığını ve yapısal bütünlüklerini koruyarak işlevsel özelliklerini muhafaza ettiğini göstermektedir. YF örneği (ısı çöktürme sonrası pellet), $\%38,84 \pm 1,90$ ile orta düzeyde bir aktivite sergilemiş olup, bazı inhibitör bileşiklerin ısı uygulaması ile çökelerek pellet kısmında yoğunlaşabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde PF2 örneği (izoelektrik noktada çöktürme ile elde edilen pellet) $\%37,61 \pm 1,89$ değeriyle diğer fraksiyonlara yakın düzeyde inhibisyon göstermiştir. PF3 fraksiyonu ise $\%38,80 \pm 1,04$ lipaz inhibisyon aktivitesi ile diğer fraksiyonlarla benzer düzeyde bir sonuç vermiştir. Yapılan

varyans analizi (ANOVA) sonucunda lipaz inhibisyon aktivitesi bakımından fraksiyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0.05$). Bu sonuç, tüm fraksiyonların lipaz inhibisyon kapasitesinin benzer düzeyde olduğunu ve analiz edilen gruplar arasında anlamlı bir varyasyon bulunmadığını ortaya koymaktadır. Literatürde, bazı bitkisel protein ekstraktlarının lipaz inhibitörü özellik gösterebildiği ve bu etkinin özellikle düşük moleküler ağırlıklı peptitlerin varlığı ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir (Xie ve ark., 2020). Ayrıca, ılımlı sıcaklık koşullarında gerçekleştirilen ekstraksiyonların, bu biyolojik olarak aktif peptit yapıların stabilitesini koruyabileceği bildirilmektedir (Shahidi & Zhong, 2015). Bu doğrultuda, elde edilen sonuçlar, tüm fraksiyonların belirli düzeyde lipaz inhibitörü potansiyel taşıdığını ancak aralarındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığını göstermektedir.

Tablo 4.9. Protein fraksiyonlarının enzim inhibisyon aktivite tayinleri analiz sonuçları

	YF	PF1	PF2	PF3
ADE inhibisyonu (%) - (10 mg/mL)*	T.E.	T.E.	T.E.	39,61 ± 1,25
Lipaz inhibisyonu (%) - (1 mg/mL)	38,84 ± 1,90 ^a	42,52 ± 1,26 ^a	37,61 ± 1,89 ^a	38,80 ± 1,04 ^a
α-amilaz inhibisyonu (%)	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.

T.E.: Tespit Edilemedi.

*: Aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0.05$).

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, şeker pancarı yapraklarından elde edilen protein ekstraktları, farklı ekstraksiyon teknikleriyle değerlendirilmiş; elde edilen fraksiyonların protein içerikleri, çözünürlük özellikleri, fenolik madde düzeyleri, antioksidan kapasiteleri ve enzim inhibisyon aktiviteleri ayrıntılı olarak incelenmiştir. Uygulanan yöntemlerin ekstraksiyon verimi ve biyofonksiyonel bileşenlerin korunumu üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

- Şeker pancarı yapraklarından elde edilen protein fraksiyonlarının analizleri, ekstraksiyon yöntemlerinin elde edilen protein miktarı ve fonksiyonel özellikler üzerinde belirleyici olduğunu göstermiştir. Isı çöktürme yöntemiyle elde edilen PF1 fraksiyonu, %37,20 protein verimi, yüksek çözünür protein miktarı (241,3 mg BSA/g), fenolik bileşik içeriği (20,29 µg GA/mg) ve antioksidan aktiviteleri (DPPH %45,6; ABTS %38,0) ile en üstün özelliklere sahip fraksiyon olmuştur. Bu sonuç, ılımlı sıcaklık koşullarının protein ve fenolik bileşiklerin yapısal stabilitesini koruduğunu ve fonksiyonel nitelikleri olumlu yönde etkilediğini ortaya koymaktadır.
- İzoelektrik çöktürme yöntemiyle (PF2) elde edilen fraksiyon, %41,13 toplam protein içeriği ile yüksek saflık sağlarken, %3,43 gibi oldukça düşük protein verimi göstermiştir. Bu durum, izoelektrik çöktürmenin miktar açısından sınırlı olmakla birlikte saf protein elde etmede avantajlı bir yöntem olduğunu göstermektedir.
- Amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle (PF3) elde edilen fraksiyon, %28,02 toplam protein içeriğine rağmen %1,52 gibi oldukça düşük verim sergilemiştir. Bununla birlikte PF3, %41,12 lipaz inhibisyonu ve %11,87 ADE inhibisyon aktivitesi ile dikkat çekmiş; biyolojik olarak aktif peptitlerin bu yöntemle kısmen korunabildiğini göstermiştir.
- Ultrason destekli enzimatik ekstraksiyon yöntemleri, özellikle suda çözünmeyen fraksiyonlarda protein veriminde belirgin artış sağlamıştır. Viscozyme® enzimi ile %63,81'e ulaşan verim, ultrason–enzim sinerjisinin etkinliğini göstermiştir. Ultrasonun enzim uygulamasından sonra yapılması, protein eldesini daha olumlu etkilemiştir. Bu bulgular literatürde bildirilen sonuçlarla uyumludur ve enzim–ultrason kombinasyonunun verim artırıcı etkisini desteklemektedir.
- Fenolik bileşikler açısından, en yüksek değer ılımlı sıcaklıkla elde edilen PF1'de belirlenmiş, diğer fraksiyonlarda ise fenolik içerik daha düşük bulunmuştur. Bu sonuç,

sıcaklık ve çöktürme koşullarının fenolik bileşiklerin süpernatantta tutulma kapasitesini doğrudan etkilediğini göstermektedir.

- Antioksidan aktiviteler bakımından, PF1 fraksiyonu en yüksek DPPH ve ABTS+ radikali bağlama aktivitelerini göstermiştir. OH⁻ radikali bağlama kapasitesi ise en yüksek YF fraksiyonunda (%79,3) bulunmuştur. PF3 fraksiyonu orta düzeyde antioksidan aktivite göstermesine rağmen anlamlı biyolojik etkilere sahip olduğunu ortaya koymuştur.
- Enzim inhibisyon aktiviteleri açısından, lipaz inhibisyonu PF1 (%42,5) ve PF3 (%41,12) fraksiyonlarında yüksek bulunmuş, ADE inhibisyonu yalnızca PF3'te saptanmıştır. Bu sonuç, farklı fraksiyonlama yöntemlerinin yalnızca miktar değil, aynı zamanda biyofonksiyonel özelliklerin korunmasında da belirleyici olduğunu göstermektedir.
- Genel olarak, bu çalışma şeker pancarı yapraklarının yalnızca şeker üretimi sonrası atık olarak değerlendirilmemesi gerektiğini, aksine yüksek protein içeriği, antioksidan kapasitesi ve enzim inhibisyon aktiviteleri ile fonksiyonel gıda endüstrisinde kullanılabilecek değerli bir bitkisel protein kaynağı olduğunu açıkça ortaya koymuştur. Elde edilen sonuçlar, sürdürülebilirlik ve alternatif protein kaynaklarına yönelik artan küresel ihtiyacı destekler niteliktedir ve bu alanda daha ileri araştırmaların gerekliliğini vurgulamaktadır.

KAYNAKÇA

Aiking, H., & de Boer, J. (2020). Protein transition: A policy perspective. *Annual Review of Resource Economics*, 12, 21-38.

Akyüz, A., Ersus, S. 2021. “Optimization of enzyme assisted extraction of protein from the sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves for alternative plant protein concentrate production”, *Food Chemistry*, 335, 1-8.

Akyüz, G., & Ersus, S. (2021). Recovery of protein from sugar beet leaves using ultrasound-assisted enzyme extraction. *Waste and Biomass Valorization*, 12(3), 1685-1698.

Ashaolu, T. J. 2020. “Antioxidative peptides derived from plants for human nutrition: their production, mechanisms and applications”, *European Food Research and Technology* 246, 853–65.

Arcan, I., Yemenicioglu, A. 2007. “Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans”, *Food Chemistry*, 103, 301–312.

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, 686-694.

Barac, M. B., et al. (2010). Functional properties of protein isolates from different legume sources. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 253–262.

Benkeblia, N. (2005). Free-radical scavenging capacity and antioxidant properties of some selected onions (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(5), 753–759.

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.

Chalamaiah, M., Yu, W., & Wu, J. (2018). Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food Chemistry*, 245, 205–222.

- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. *A review*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560.
- Chiesa, S., Gnansounou, E. 2011. “Protein extraction from biomass in a bioethanol refinery possible dietary applications: use as animal feed and potential extension to human consumption”, *Bioresource Technology*, 102, 427-436.
- Cropotova, J., Kvangarsnes, K., Stangeland, J., Le Gall, A., & Rustad, T. (2025). Effect of ultrasonication and use of aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica* on quality parameters of fish protein hydrolysates from side streams of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *Frontiers in Nutrition*, 12, 1591672.
- Day, L. (2013). Proteins from land plants—potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science & Technology*, 32(1), 25-42.
- Daliri, E. B., Oh, D. H., Lee, B. H. 2017. “Bioactive Peptides”, *Foods*, 6(5), 1-21.
- Delgado-Povedano, M. D., Priego-Capote, F., Luque de Castro, M. D. 2017. “Selective ultrasound-enhanced enzymatic hydrolysis of oleuropein to its aglycon in olive (*Olea europaea* L.) leaf extracts”, *Food chemistry*, 220, 282–88.
- Di Stefano, E., Agyei, D., Njoku, E. N., Udenigwe, C. C. 2018. “Plant RuBisCo: an underutilized protein for food applications”, *Journal of the American Oil Chemists' Society* , 95, 1063–1074.
- Dukić, J., Hunić, M., Nutrizio, M., & Režek Jambrak, A. (2022). Influence of high-power ultrasound on yield of proteins and specialized plant metabolites from sugar beet leaves (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *altissima*). *Applied Sciences*, 12(18), 8949.
- Dukić, D., Vojvodić Cebin, A., & Seregelj, V. (2022). Application of ultrasound-assisted extraction for valorization of sugar beet leaves: Influence on protein and phenolic yield. *Processes*, 10(9), 1783.

E. Turhan, K. Dal, H. Çağatay, S. Kocaman, “Baraj Yıkılması Akım Probleminin Farklı Yoğunluklu Akışkan Yaklaşımı ile Deneysel ve Sayısal Olarak İncelenmesi,” 5th International Dam Safety Symposium, İstanbul, Türkiye, 2018

Fu, Y., Zhang, B., Sun, B., Xu, Y., & Zhang, H. (2020). Ultrasound-assisted enzymatic extraction of phenolic compounds from grape pomace and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 302, 125295.

Gençdağ, E., Görgüç, A., Yılmaz, F. M. 2020. “Recent advances in the recovery techniques of plant-based proteins from agro-industrial by-products”, *Food Reviews International*, (*inpress*), 1–22.

Goycoolea, F. M., et al. (2000). Chitosan–protein interactions and their relevance in biological systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5(6), 344–349.

Guldiken, B., et al. (2016). Phenolic composition and antioxidant activity of fresh and dried basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Food Chemistry*, 193, 95–106.

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.

Hildebrand, G., Poojary, M., O'Donnell, C., Lund, M., García-Vaquero, M., & Tiwari, B. K. (2020). Ultrasound-assisted processing of *Chlorella vulgaris* for enhanced protein extraction. *Journal of Applied Phycology*, 32(3), 1709–1718.

Jadhav, D., Rekha, B. N., Gogate, P. R., & Rathod, V. K. (2009). Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. *Journal of Food Engineering*, 93(4), 421–426.

Jaskulska, I., Jaskulski, D., Kamieniarz, J., Radziemska, M., Brtnický, M., & Różniak, E. (2023). Effect of Fungicide Protection of Sugar Beet Leaves (*Beta vulgaris* L.): Results of Many Years Experiments. *Agronomy*, 13(2), 346.

Joanna, B., Michal, B., Piotr, D., Agnieszka, W., Dorota, K., Izabela, W. 2018. “Sugar beet pulp as a source of valuable biotechnological products”. *Advances in Biotechnology for Food*

Industry, Handbook of Food Bioengineering. Editörler: Holban A. M., Grumezescu, A.M. London: Elsevier Inc.

Joshi, V. K., & Kumar, S. (2015). Meat analogues: Plant-based alternatives to meat products-a review. *International Journal of Food and Fermentation Technology*, 5(2), 107–119.

Jwanny, E. W., Montanari, L., Fantozzi, P. 1993. “Protein production for human use from sugarbeet: Byproducts”, *Bioresource Technology*, 43, 67-70.

Karabulut, I., Ercan, P., & Gültekin Subaşı, B. (2023). Enhancement of protein recovery from pea peels using ultrasound-assisted enzymatic treatment. *Food and Bioproducts Processing*, 141, 78–85.

Karabulut, H., Kaya, M., & Aydın, M. (2023). Enzim destekli protein ekstraksiyon teknikleri. *Gıda Teknolojileri Dergisi*, 48(2), 56–66.

Karabulut, N., Demirhan, E., & Ozbek, B. (2023). Protein extraction from plant-based materials: Recent trends and developments. *Food Science and Biotechnology*, 32(1), 1–15.

Kapel, R., Rahhou, E., Lecouturier, D., Guillochon, D., Dhulster, P. 2006. “Characterization of an antihypertensive peptide from an alfalfa white protein hydrolysate produced by a continuous enzymatic membrane reactor”, *Process Biochemistry*, 41(9), 1961–66.

Kiskini, A., Vissers, A., Vincken, J. P., Gruppen, H., Wierenga, P. A. 2016. Effect of plant age on the quantity and quality of proteins extracted from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(44), 8305–14.

Kleekayai, T., Laohakunjit, N., & Kerdchoechuen, O. (2015). Effect of pH and enzymatic hydrolysis on antioxidant properties and peptide profiles of mung bean protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 197, 1101–1109.

Kleintop, C., Hager, A. S., & Arendt, E. K. (2013). Influence of pH on protein–polyphenol interactions and solubility. *Food Chemistry*, 141(3), 2599–2607.

Kobbi, S., Balti, R., Bougatef, A., Le flem, G., Firdaous, L., Bigan, M., Chataigné, G., Chaabouni, S., Dhulster, P., Nedjar, N. 2015. “Antibacterial activity of novel peptides isolated from protein hydrolysates of RuBisCO purified from green juice alfalfa”, *Journal of Functional Foods*, 18, 703–713.

Kobbi, S., Bougatef, A., Le flem, G., Balti, R., Mickael, C., Fertin, B., Chaabouni, S., Dhulster, P., Nedjar, N. 2017. “Purification and recovery of RuBisCO protein from alfalfa green juice : antioxidative properties of generated protein hydrolysate”, *Waste and Biomass Valorization*, 8(2), 493–504.

Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945–960.

Kumar, M., Tomar, M., Bhuyan, D. J., Punia, S., Grasso, S., Sa, A. G. A., & Changan, S. (2021). Plant-based proteins and their multifaceted role in food and nutrition: A review. *Legume Science*, 3(1), e94.

Lammens, T. M., Franssen, M. C. R., Scott, E. L., Sanders, J. P. M. 2012. “Availability of protein-derived amino acids as feedstock for the production of bio-based chemicals”, *Biomass and Bioenergy*, 44, 168–181.

Lamsal, B. P., Koegel, R. G., & Gunasekaran, S. (2007). Some physicochemical and functional properties of soluble protein isolates from alfalfa. *LWT - Food Science and Technology*, 40(9), 1520–1526.

Lemes, A. C., Sala, L., Ores, J., Braga, A. R., Egea, M. B., Fernandes, K. F. 2016. “A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste”, *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6),1-24.

Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., Vian, M. A., & Chemat, F. (2021). Green extraction of natural products: Theory and practice. *John Wiley & Sons*.

- López, A., et al. (2011). Effects of temperature and solvent on the antioxidant properties of extracts from various plant parts of *Moringa oleifera*. *Food Chemistry*, 128(3), 570–577.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. “Protein measurement with the Folin phenol reagent”, *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Luo, S., Zeng, C., Luo, F., Li, M., Feng, S., Zhou, L., Chen, T., Yuan, M., Huang, Y., Ding, C. 2020. “Optimization of ultrasound-assisted extraction of triterpenes from *Bergenia emeiensis* leaves and inhibition effect on the growth of Hela cells”, *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 18, 1-9.
- Meral, R. (2016). The Effects of Different Thermal Applications on Phenolics Compounds, Yüzüncü Yıl University. *Journal of The Institute of Natural & Applied Sciences*, 21, 55-67.
- Martin, A. H., Castellani, O., de Jong, G. A. H., Bovetto, L., Schmitt, C. 2019. “Comparison of the functional properties of RuBisCO protein isolate extracted from sugar beet leaves with commercial whey protein and soy protein isolates”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 1568-75
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I., & Hernández-Ledesma, B. (2012). Antihypertensive peptides from food proteins: A review. *Food & Function*, 3(4), 350–361.
- Merodio, C., Sabater, M. 1988. “Preparation and properties of a white protein fraction in high yield from sugar beet (*Beta vulgaris* L) leaves”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 44, 237-43.
- Poore, J., & Nemecek, T. (2018). Reducing food’s environmental impacts through producers and consumers. *Science*, 360(6392), 987–992.
- PubMed Central (PMC). (2017). Action of multi-enzyme complex on protein extraction to obtain a ... *PMC*, 5876221.
- Qian, J., Ye, J., Wang, J., Liu, J., Cui, J., & Ma, H. (2023). Ultrasound-assisted enzymatic protein hydrolysis in food processing: Mechanism and parameters. *Foods*, 12(19), 3673.

- Radenkovs, V., Kviesis, J., & Juhnevica-Radenkova, K. (2024). Extraction of plant proteins using enzymatic disruption of cell wall polymers. *Plants*, 13(1), 122.
- Sá, A. G. A., Moreno, Y. M. F., & Carciofi, B. A. M. (2020). Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 170–184.
- Sanchez, A., Vazquez, A. 2017. “Bioactive peptides: A review”, *Food Quality and Safety*, 1, 29–46.
- Sedlar, T., Pasković, I., Dragojlović, D., Popović, S., Vidosavljević, S., Goreta Ban, S., & Popović, L. (2025). Enzyme-assisted extraction of proteins from cauliflower and broccoli waste leaves. *Horticulturae*, 11(2), 148.
- Scarabattoli, L., Sangiorgio, S., Romagnuolo, F., & Speranza, G. (2023). Use of carbohydrases to promote protein extraction from rice bran and soybean meal: A comparative study. *LWT—Food Science and Technology*.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant and inhibitory activities of bioactive protein hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 18, 757–781.
- Shafaei, A., Ab Halim, N. H., Zakaria, N., Ismail, Z. 2017. “Analysis of free amino acids in different extracts of *Orthosiphon stamineus* leaves by high-performance liquid chromatography combined with solid-phase extraction”, *Pharmacogn Mag.*, 13, 385-91
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. 1965. “Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents”, *Am J Enol Vitic.*, 16, 144-158.
- Tacias-Pascacio, V. G., Morellon-Sterling, R., Siar, E. H., & Fernandez-Lafuente, R. (2020). Bioactive peptides derived from food proteins and their inhibitory activities on key enzymes involved in metabolic disorders. *Processes*, 8(3), 289.
- Tamayo Tenorio, A., Gieteling, J., de Jong, G. A. H., Boom, R. M., van der Goot, A. J. 2016. “Recovery of protein from green leaves : overview of crucial steps for utilisation”, *Food Chemistry*, 203, 402–8.

Tamayo Tenorio, A., Gieteling, J., Boom, R. M., & van der Goot, A. J. (2017). Recovery of protein from green leaves: Overview of crucial steps for utilization. *Food Chemistry*, 203, 402–408.

Tamayo Tenorio, A., Boom, R. M., van der Goot, A. J. 2017a. “Understanding leaf membrane protein extraction to develop a food- grade process”, *Food Chemistry*, 217, 234–243.

Tamayo Tenorio, A., Schreuders, F. K. G., Zisopoulos, F. K., Boom, R. M., van der Goot, A. J. 2017b. “Processing concepts for the use of green leaves as raw materials for the food industry.” *Journal of Cleaner Production*, 164, 736–48.

Tamayo Tenorio, A., Kyriakopoulou, K. E., Suarez Garcia, E., van den Berg, C., van der Goot, A. J. 2018. “Understanding differences in protein fractionation from conventional crops , and herbaceous and aquatic biomass - Consequences for industrial use”, *Trends in Food Science and Technology*, 71, 235–245.

Tang, C. H., & Liu, R. (2019). Plant protein–polyphenol interactions: Mechanisms, biological significance and potential applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(2), 335–352.

Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü (TEPGE) “Şeker pancarı 2018 raporu”. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr>. Son erişim tarihi:20,06,2020

Worthington Biochemical Corporation. (2022). *Cellulysin cellulase from Trichoderma viride*. Retrieved from <https://www.worthington-biochem.com>

Wu, N., Fu, K., Fu, Y. J., Zu, Y. G., Chang, F. R., Chen, Y. H., & Liu, X. L. (2014). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Rosa rugosa* petals and evaluation of antioxidant activity in vitro. *Food Chemistry*, 120(4), 1059–1066.

Xie, N., Cui, Y., Yin, Y., & Zeng, X. (2020). Plant protein-derived bioactive peptides and their biological functions: A review. *Food Reviews International*, 36(6), 553–567.

Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., & Li, H. B. (2015). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 96.

Xu, Y., Zhang, L., Yang, Y., Song, X., Yu, Z. 2015. “Optimization of ultrasound-assisted compound enzymatic extraction and characterization of polysaccharides from blackcurrant”, *Carbohydrate Polymers*, 117, 895-902.

Yang S, Yunden J, Sonoda S, Doyama, N., Lipkowski, A. W., Kawamura, Y., Yoshikawa, M. 2001. “Rubiscolin , a δ selective opioid peptide derived from plant Rubisco”, *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 509, 213–17.

Yang S, Kawamura Y, Yoshikawa M 2003. “Isolation and antihypertensive effect of Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) inhibitory peptides from spinach Rubisco peptides”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 51, 4897-4902.

Yang, Y., Marczak, E. D., Usui, H., Kawamura, Y., Yoshikawa, M. 2004. “Antihypertensive properties of spinach leaf protein digests”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(8), 2223–5.

Varga, I., Markulj Kulundžić, A., Tkalec Kojić, M., & Antunović, M. (2024). Does the Amount of Pre-Sowing Nitrogen Fertilization Affect Sugar Beet Root Yield and Quality of Different Genotypes?. *Nitrogen*, 5(2), 386-408.

Varga, I., Lončarić, Z., Kristek, S., Kulundžić, A. M., Rebekić, A., & Antunović, M. (2021). Sugar beet root yield and quality with leaf seasonal dynamics in relation to planting densities and nitrogen fertilization. *Agriculture*, 11(5), 407.

Vernon, L. P. (1960). Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts. *Analytical Chemistry*, 32(9), 1144–1150.

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 161–169.

Zhang, L., Guo, S., Wang, M., He, L. 2015. PEG-based ultrasound-assisted enzymatic extraction of polysaccharides from *Ginkgo biloba* leaves”, International Journal of Biological Macromolecules, 80, 644-50.

Zhang, Q., Zhang, Y., Li, K., & Ma, H. (2022). Thermal-induced autolysis enzymes inactivation, protein degradation and quality changes of *Cucumaria frondosa*. *Processes*, 10(5), 847.

Zhong, C., Wang, R., Zhou, Z., Jia, S., Tan, Z., Han, P. 2012. “Functional properties of protein isolates from *Caragana korshinskii* Kom. extracted by three different methods”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60, 10337–42.

Zhou, Y., Sun, Y., & Ma, H. (2023). Effects of ionic strength on functional properties of protein–polyphenol complexes. *Journal of Food Biochemistry*, 47(2), e13597.

Zicari, G., Selene, A., Cervantes, M., & López, M. (2019). Photosynthesis in *Beta vulgaris*: A comparative review of C3 mechanisms. *Plant Science Today*, 6(2), 185-191.

