

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**SULU ENZİMATİK EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE AYÇİÇEK YAĞI VE
PROTEİNİ ELDESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Rumeysa BAYRAK

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

NİSAN 2023

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**SULU ENZİMATİK EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE AYÇİÇEK YAĞI VE
PROTEİNİ ELDESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Rumeysa BAYRAK
(506191512)**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Derya KAHVECİ KARINCAOĞLU

NİSAN 2023

İTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün 506191512 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Rumeysa BAYRAK, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “SULU ENZİMATİK EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE AYÇİÇEK YAĞI VE PROTEİNİ ELDESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Derya KAHVECİ KARINCAOĞLU**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Dr. Öğr. Üyesi Fatma Ebru FIRATLIGİL**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Zeynep TACER CABA
Bahçeşehir Üniversitesi

Teslim Tarihi : 24 Nisan 2023
Savunma Tarihi : 19 Nisan 2023



ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez dönemim boyunca desteğini ve ilgisini benden esirgemeyen, her konudaki kıymetli tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocam Doç. Dr. Derya KAHVECİ KARINCAOĞLU'na tüm katkılarından ve desteğinden dolayı teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmaları sırasında yardımını esirgemeyen Ar. Gör. Elif Feyza AYDAR, Ar. Gör. Zehra MERTDİNÇ'e ve sevgili arkadaşlarım Beyza VAHAPOĞLU ve Ayşenur BİLGİN'ne çok teşekkür ederim.

Tüm eğitim ve öğretim hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen sevgili aileme ve dostlarıma teşekkür ederim.

Nisan 2023

Rumeysa BAYRAK
(Gıda Mühendisi)



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	ix
SEMBOLLER	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvii
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ	1
1.1 Tezin Amacı	1
1.2 Literatür Taraması	1
1.2.1 Ayçiçeği, ayçiçeği yağı ve üretimi	1
1.2.2 Ayçiçeği proteini	3
1.2.2.1 Ayçiçeği proteininin gıda endüstrisinde bir alternatif olarak değerlendirilmesi.....	5
1.2.3 Endüstriyel bitkisel yağ eldesi	7
1.2.3.1 Ön işlemler.....	7
1.2.3.2 Mekanik presleme yöntemi.....	9
1.2.3.3 Solvent ekstraksiyon yöntemi	9
1.2.3.4 Ön presleme-ekstraksiyon yöntemi.....	9
1.2.5 Sulu enzimatik ekstraksiyon yöntemi.....	10
1.2.5.1 Enzimler ve enzimlerin sulu enzimatik ekstraksiyon yöntemi için kullanılması	10
1.2.5.2 Sulu enzimatik ekstraksiyon prosesi.....	11
1.2.5.3 Sulu enzimatik ekstraksiyon yönteminin avantaj ve dezavantajları	14
1.2.6 Ayçiçeği tohumlarında klorojenik asit varlığı ve kaliteye etkisi	14
1.3 Hipotez	16
2. MATERYAL VE METOT	17
2.1 Materyal.....	17
2.2 Metot	17
2.2.1 Ayçiçeği çekirdeklerinin öğütülmesi ve karakterizasyonu.....	17
2.2.2 Ayçiçeği çekirdeklerinden sulu enzimatik ekstraksiyon ile yağ eldesinde ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi.....	18
2.2.2.1 Sulu enzimatik ekstraksiyon için kullanılacak enzimlerin belirlenmesi	18
2.2.2.2 Sulu enzimatik ekstraksiyon için krema emülsiyon yönteminin belirlenmesi	19
2.2.2.3 Sulu enzimatik ekstraksiyon için kullanılacak sıcaklığın belirlenmesi	21
2.2.3 Ayçiçeği çekirdeklerinden sulu enzimatik ekstraksiyon ile yağ eldesi ...	21

2.2.4 Ayçiçeği çekirdeklerinden sulu enzimatik ekstraksiyon ile yağ eldesi için Tepki Yüzey Metodolojisi kullanılarak oluşturulan deney tasarımı	22
2.2.4.1 Ayçiçeği yağının serbest yağ asitliği derecesinin belirlenmesi	24
2.2.4.2 Ayçiçeği yağının peroksit sayısının belirlenmesi	25
2.2.4.3 Ayçiçeği yağının yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi.....	26
2.2.4.4 Optimum koşullarda enzim kullanılmadan gerçekleştirilen sulu enzimatik ekstraksiyon	26
2.2.5 Protein izolatu eldesi.....	27
2.2.5.1 Alkali ekstraksiyon-izoelektrik çöktürme ile protein izolatu eldesi .	27
2.2.5.2 Klorojenik asit uzaklaştırma sonrası protein izolatu eldesi	28
2.3 İstatistiksel Analiz	30
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
3.1 Ayçiçeği Çekirdeklerinin Karakterizasyonu	31
3.2 Ayçiçeği Çekirdeklerinde Gerçekleştirilen Sulu Enzimatik Ekstraksiyon için Kullanılacak Enzimlerin Belirlenmesi	31
3.3 Ayçiçeği Çekirdeklerinde Gerçekleştirilen Sulu Enzimatik Ekstraksiyon için Sıcaklıkların Belirlenmesi	33
3.4 Ayçiçeği Çekirdeklerinde Gerçekleştirilen Sulu Enzimatik Ekstraksiyon Sonucu Oluşan Kremada Demülsifikasyon İşleminin Belirlenmesi	34
3.5 Ayçiçeği Çekirdeklerinden Sulu Enzimatik Ekstraksiyon ile Yağ Eldesindeki Parametrelerin Optimizasyonu	36
3.6 Optimum Koşullarda Sulu Enzimatik Ekstraksiyon ile Elde Edilen Yağın Fiziko-Kimyasal Özellikleri	41
3.7 Ayçiçeği Yağının Yağ Asidi Kompozisyonu	43
3.8 Optimum Koşullarda Gerçekleştirilen Sulu Enzimatik Ekstraksiyon Sonrası ve Klorojenik Asit Uzaklaştırma İşlemi Sonrası Protein İzolatu Eldesi	44
3.9 Ayçiçeği Protein İzolatlarının Renginin Belirlenmesi.....	45
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ	55

KISALTMALAR

GC	: Gaz Kromatografisi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
RSM	: Yüzey Yanıt Metodolojisi
SEE	: Sulu Enzimatik Ekstraksiyon





SEMBOLLER

%	: Yüzde
g	: Gram
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
pH	: Potansiyel Hidrojen
<i>p</i>	: Probability; Olasılık
mg	: Miligram
mEq	: Miliekivalen



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1: Dünya ayçiçeği çekirdeği ve ayçiçeği yağı üretim değerleri (2021-2023/1000 ton) (USDA).	3
Çizelge 2.1: Sulu enzimatik ekstraksiyon için kullanılacak optimum katı sıvı oranı ve enzim konsantrasyonunun belirlenmesi için kullanılacak olan faktöriyel dizayn.	23
Çizelge 2.2: Optimizasyon aşaması örnek deney tasarımı.	23
Çizelge 2.3: Gaz kromatografisi analiz şartları.	26
Çizelge 3.1: Ayçiçeği tohumlarının kompozisyonu.	31
Çizelge 3.2: Alcalase® ve Celluclast® -Alcalase® enzim kombinasyonu ile gerçekleştirilen SEE sonrası serbest yağ miktarı ve yağ verimi.	32
Çizelge 3.3: 50° ve 60°'de gerçekleştirilen sulu enzimatik ekstraksiyon sonucunda elde edilen protein ve yağ verimi.	33
Çizelge 3.4: pH ayarlaması veya enzim ilavesi ile gerçekleştirilen emülsiyon kırma işlemi sonucu yağ verimi.	34
Çizelge 3.5: Optimizasyon aşaması için gerçekleştirilmesi beklenen optimum şartlarda ayçiçeği tohumlarından sulu enzimatik ekstraksiyon ile elde edilen yağ verimi ve protein değerleri (%).	36
Çizelge 3.6: Ayçiçeği çekirdeklerinden sulu enzimatik ekstraksiyon ile elde edilen protein için ANOVA çizelgesi.	39
Çizelge 3.7: Ayçiçeği çekirdeklerinden sulu enzimatik ekstraksiyon ile elde edilen yağ verimi için ANOVA çizelgesi.	43
Çizelge 3.8: Optimum koşulların validasyonu.	44
Çizelge 3.9: Optimum koşullarda ve Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen yağların karakterizasyonu.	45
Çizelge 3.10: Sulu enzimatik ekstraksiyon sonrasında elde edilen yağın serbest yağ asidi kompozisyonu.	45
Çizelge 3.11: Optimum koşullarda SEE sonrası elde edilen protein izolatu ve klorojenik asit uzaklaştırılmış protein izolatu protein içeriği ve klorojenik asit miktarı.	46
Çizelge 3.12: Ayçiçeği protein izolatlarının renk parametreleri.	47



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Yağlı tohum hücre yapısı ve hücre duvarı.	13
Şekil 2.1: Ayçiçeği çekirdeklerinden sulu enzimatik ekstraksiyon sonrasında oluşan krema emülsiyonunda demülsifikasyon işlem prosesi.	20
Şekil 2.2 : Santrifüj sonrası ayrılan fazlar.	22
Şekil 2.3: Optimum koşullarda enzim kullanılmadan gerçekleştirilen sulu enzimatik ekstraksiyon sonrası santrifüj uygulaması sonrası faz ayrımı.	27
Şekil 2.4: a) SEE sonrası sulu fazın alkali ortamda çöktürülmesi için ortam pH'sının 9'a ayarlanması ve manyetik karıştırıcıda karıştırılması b) Santrifüj sonrası faz ayrımı c) Santrifüj sonrası sulu fazda izoelektrik çöktürme için ortam pH'sının 4,5'a ayarlanması ve manyetik karıştırıcıda karıştırılması d) Çöken proteinin liyofilizatör kullanılarak kurutulmuş hali.	28
Şekil 2.5: a) Alkali ekstraksiyon-izoelektrik çöktürme ile elde edilen protein izolatı b) Klorojenik asit uzaklaştırma işlemi sonrası elde edilen protein izolatı.	29
Şekil 3.1: Viscozyme® L (V), Celluclast® (C) ve Pectinex® (P) ile yapılan sulu enzimatik ekstraksiyon.	32
Şekil 3.2: Bağımsız değişkenler arasındaki ikili etkileşimlerin serbest yağ verimi üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzeyinin kontur grafiği.	38
Şekil 3.3: Bağımsız değişkenler arasındaki ikili etkileşimlerin protein içeriği üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzeyinin kontur grafiği.	40



SULU ENZİMATİK EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE AYÇİÇEK YAĞI VE PROTEİNİ ELDESİ

ÖZET

Çevre kirliliğinin artması ile birlikte gıda kaynaklarının korunması ve sürdürülebilirliği önemli bir konu haline gelmektedir. Bu amaçla, günümüzde birçok alanda sürdürülebilir ve çevre dostu alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Solvent ekstraksiyonu, yağ endüstrisinde en yaygın kullanılan geleneksel yöntemlerden biridir ve bu yöntemle elde edilen yağ verimi oldukça yüksektir. Solvent ekstraksiyonunda hekzan ve/veya n-hekzan gibi organik çözücüler kullanılmaktadır. Ancak kullanılan bu organik çözücüler toksik ve yanıcı olması gibi sebeplerden dolayı bazı kısıtlamalara sahiptir. Aynı zamanda çok fazla çözücü kullanılması da çevre sorunlarını beraberinde getirmektedir. Sulu enzimatik ekstraksiyon yöntemi çözücü olarak su kullanılması sebebi ile çevre dostu bir yöntemdir ve bu yöntemle yüksek kalitede ürünler ekstrakte edilebilmektedir. Bununla birlikte herhangi bir bozulma olmadan yüksek besin içeriğine sahip yan ürünlerin de elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Ayçiçeği, yağ, küspe ve biyodizel gibi kullanım alanları açısından önemli bir yağlı tohum bitkisidir. Günümüzde üretilen ayçiçeği tohumunun büyük bir kısmı yağ üretimi için kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, ayçiçeği tohumlarından yağ eldesinde, geleneksel solvent ekstraksiyonu yöntemi yerine sulu enzimatik ekstraksiyon yöntemi kullanılarak yağ elde edilmesi ve aynı zamanda yağ ekstraksiyonu sonrasında ayçiçeği proteinlerinin de eş zamanlı olarak elde edilmesi amaçlanmıştır. Sulu enzimatik ekstraksiyon sonrasında elde edilen yağda verim hesaplanarak Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen yağ verimleri ile karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda, sulu enzimatik ekstraksiyon sonrası sulu fazda alkali ekstraksiyon-izoelektrik çöktürme ile protein izolatu elde edilmiştir ve protein izolatlarında bulunan klorojenik asitin uzaklaştırılması için yıkama yapılmıştır. Sulu enzimatik ekstraksiyon için Yüzey Tepki Metodolojisi (RSM) kullanılarak 31 adet örnek deney tasarımı oluşturulmuştur. Optimum sulu enzimatik ekstraksiyon koşullarını belirlemek için 1:4, 1:7, 1:10 katı sıvı oranı ve 1,3,5 ml/100 g enzim oranları ve ekstraksiyon süresi olarak 30, 60, 90 dk (Celluclast® ve Alcalase® için ayrı ayrı) kullanılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda, optimum sulu enzimatik ekstraksiyon parametreleri 4g/g katı sıvı oranı, 5mL/100g enzim konsantrasyonu, Celluclast® süre 1,5 ve Alcalase® süre 1,5 saat olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda gerçekleştirilen SEE sonrası elde edilen yağ verimi %33,44 ve protein değeri %3,82 olarak bulunmuştur. Elde edilen yağın serbest yağ asidi değeri %0,74±0,05, peroksit değeri 1,55±0,175 meqiv/kg bulunmuştur. Sulu enzimatik ekstraksiyon ile elde edilen yağ verimi, solvent ekstraksiyonu ile elde edilen yağ verimi ile kıyaslandığında daha düşük bir yağ verimi elde edilmiştir.

Alkali ekstraksiyon-izoelektrik çöktürme ile elde edilen protein izolatu miktarı 1,60±0,07g ve protein içeriği %54,99±1,12 olarak bulunurken klorojenik asit uzaklaştırma işleminden sonra elde edilen protein izolatu miktarı 0,81±0,13g ve protein içeriği %58,27±0,15 olarak elde edilmiştir. Belirlenen optimum koşullarda HPLC

kullanılarak izolatlardaki klorojenik asit miktarları tespit edilmiştir. Sulu enzimatik ekstraksiyon sonucu elde edilen protein izolatlarındaki klorojenik asit miktarı $2,43\pm0,56\text{mg/g}$ olarak tespit edilirken klorojenik asit yıkama sonrasındaki protein izolatlarındaki klorojenik asit miktarının $3,66\pm0,84\text{mg/g}$ olduğu gözlemlenmiştir ve klorojenik asit uzaklaştırma için denenen yöntemin etkili olmadığı gözlemlenmiştir.



SUNFLOWER OIL AND PROTEIN OBTAINED BY AQUEOUS ENZYMATIC EXTRACTION

SUMMARY

Sunflower seeds are one of the most important oil crops in the world and in Turkey. Global production of sunflower seeds in the world ranks third after soybeans and rapeseed. Sunflower seeds are produced in Europe and Turkey, especially in Ukraine and Russia. Nowadays, most of the sunflower seeds produced are used for oil production. Sunflower oil is generally considered a premium oil when compared to other vegetable oils due to its light colour, mild flavor and rich components.

As a result of oil extraction of sunflower seeds, a valuable by-product called oil cake is obtained. The oil cake obtained after extraction has a very rich content, especially in terms of protein (20-60%), and it can be evaluated as an alternative protein source. In addition, oil cakes are a source of bioactive compounds with beneficial properties for health. Sunflower seed meal appears to have a balanced amino acid profile when compared to other seed meals. However, the oil cake obtained as a result of oil extraction by traditional methods such as solvent extraction is used only as animal feed. Phenolic compounds, which are found in relatively high amounts in sunflower seeds, are also considered among the factors limiting the use of sunflower proteins. In particular, the presence of chlorogenic acid in sunflower seeds is an important problem. This is because phenolic compounds reduce both the digestibility and functionality of proteins as a result of their interaction with proteins. These reactions lead to the destruction of essential amino acids and the formation of toxic compounds. However, the presence of chlorogenic acid in sunflower seeds may cause undesirable color and flavor changes in sunflower protein isolates. Solvent extraction is one of the traditional methods of vegetable oil production and is widely used. Generally, solvents such as hexane and/or n-hexane are used in solvent extraction. However, such organic solvents have some limitations as they are toxic and flammable. At the same time, the use of excess solvent in the process also causes serious environmental problems.

With the increase in environmental pollution, the protection and sustainability of food resources becomes an important issue. Therefore, there is a need for sustainable and environmentally friendly alternative methods in many areas. Due to the use of water as a solvent in the aqueous enzymatic extraction method, it is an alternative to traditional methods, reliable and environmentally friendly, and it is possible to obtain high quality products with this method. In addition, by-products with high nutrient content can be obtained without degradation of the material to be extracted.

In this study, it was aimed to obtain oil from sunflower seeds by using aqueous enzymatic extraction method instead of traditional solvent extraction method. At the same time, it was tried to obtain sunflower proteins simultaneously after oil extraction. The yield of oil obtained after aqueous enzymatic extraction was calculated and compared with the oil yields obtained by Soxhlet extraction. After the aqueous enzymatic extraction, the protein isolate was obtained by alkaline extraction-

isoelectric precipitation in the aqueous phase and washing was carried out to remove the chlorogenic acid present in the protein isolates.

The efficiency of Celluclast®, Alcalase®, Viscozyme® and Pectinex® enzymes individually and their combinations were evaluated in order to disrupt the cell wall structure of sunflower seeds and to release the bound oil. As a result of aqueous enzymatic extraction with Celluclast®, Viscozyme® and Pectinex® enzymes, no oil phase was formed. The highest oil yield was obtained by aqueous enzymatic extraction with Celluclast® -Alcalase® enzyme combination. In order to decide on the extraction temperature beforehand, extraction trials were carried out at 50°C and 60°C. It was observed that there was no significant difference between the oil yields obtained after aqueous enzymatic extraction performed at 50°C and 60°C temperatures, but considering that high temperatures may affect the quality parameters of the oil, it was decided to perform the extraction at 50°C. Compared to traditional solvent extraction, the oil yield obtained by the aqueous enzymatic extraction method is relatively lower. For this reason, demulsification process is applied in the cream phase obtained at the end of the extraction in order to increase the oil yield. For this step, demulsification process was applied both with pH and by adding enzyme, and the efficiency of the two methods was evaluated. The oil yield obtained after the demulsification process using the enzyme was found to be relatively higher. However, due to the length of the process, it was decided to perform the demulsification process by adjusting the pH.

In order to determine the optimum extraction parameters for aqueous enzymatic extraction, 31 sample experimental designs were created by using the Surface Response Methodology (RSM). In order to determine the optimum aqueous enzymatic extraction conditions, 1:4, 1:7, 1:10 solid-liquid ratio and 1,3,5 mL/100 g enzyme ratios and extraction time were determined as 30, 60, 90 min for Celluclast® and Alcalase®. As a result of the experiments, the optimum aqueous enzymatic extraction parameters were determined as 4g/g solid-liquid ratio, 5mL/100g enzyme concentration, Celluclast® time 1.5 and Alcalase® time 1.5 hours. The oil yield after SEE performed under these conditions was 33.44% and the protein value was 3.82%. The free fatty acid value of the obtained oil was $0.74 \pm 0.05\%$, and the peroxide value was 1.55 ± 0.175 meqiv/kg. It was determined that the oil yield was lower when the oil yield obtained by aqueous enzymatic extraction was compared with the oil yield obtained by solvent extraction.

Protein isolate was obtained by alkaline extraction-isoelectric precipitation from the aqueous phase after aqueous enzymatic extraction performed under optimum conditions. For this purpose, the aqueous phase obtained after the aqueous enzymatic extraction was collected and the pH was adjusted to 9 in order to extract the proteins in alkaline medium and mixed for 1 h. It was then centrifuged and the aqueous supernatant was collected and the same procedure was repeated. This time, it was aimed to precipitate the proteins at the isoelectric point by adjusting the pH to 4.5. The resulting precipitate was freeze-dried. In order to prevent the formation of green pigment as a result of the interaction of chlorogenic acid with proteins after oxidation in alkaline conditions, the aqueous phase obtained after aqueous enzymatic extraction was subjected to acidic washing before obtaining the protein isolate. After the aqueous phase obtained after the aqueous enzymatic extraction was collected, the pH of the medium was adjusted to 5 and subjected to a 30-minute mixing process. Then it was centrifuged and the same process was repeated by removing the precipitate from the mixture. After the precipitate remaining after centrifugation was dispersed in water at a ratio of 1:10 (w/v), protein isolate was obtained by alkaline extraction-isoelectric

precipitation method. While the amount of protein isolate was $1.60\pm0.07\text{g}$ and the protein content was $54.99\pm1.12\%$, the amount of protein isolate obtained after chlorogenic acid removal was $0.81\pm0.13\text{g}$ and the protein content was $58.27\pm0.15\%$. The amount of chlorogenic acid in the isolates was determined using HPLC. While the amount of chlorogenic acid in the protein isolates obtained as a result of aqueous enzymatic extraction was determined as $2.43\pm0.56\text{mg/g}$, the amount of chlorogenic acid in the protein isolates after chlorogenic acid washing was observed to be $3.66\pm0.84\text{mg/g}$.





1. GİRİŞ

1.1 Tezin Amacı

Günümüzde artan çevre sorunları ile birlikte gıda kaynaklarının korunması ve sürdürülebilir gıda uygulamaları konusu oldukça önem kazanmaktadır. Bu amaçla bitkisel yağ üretiminde yaygın olarak kullanılan geleneksel yöntemlerin yerine sürdürülebilir ve çevre dostu yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, dünyada ve ülkemizde en önemli bitkisel yağ kaynaklarından biri olan ayçiçeği yağının, sürdürülebilir, çevre dostu ve aynı zamanda ürün kalitesini koruyan bir yöntem olan sulu enzimatik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilmesinin yanı sıra bu yöntem ile gıda bileşeni olarak değerlendirilemeyen ayçiçeği proteinlerinin de eş zamanlı olarak elde edilmesi amaçlanmıştır.

1.2 Literatür Taraması

1.2.1 Ayçiçeği, ayçiçeği yağı ve üretimi

Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) dünyada en yaygın yetiştirilen önemli yağ bitkilerinden biridir. Ayçiçeğinin cins adı, Yunanca helios (güneş) ve anthos (çiçek) kelimelerinden türetilmiştir (Fick ve Miller, 1997). Anavatanı Güney Amerika olmasına rağmen günümüzde ayçiçeği Karadeniz Bölgesi başta olmak üzere Akdeniz Bölgesi'nde yetişmektedir (Kaya ve ark., 2008). İlk olarak Hintliler tarafından yiyecek ve ilaç olarak kullanılmasının yanı sıra törenlerde vücut boyaması için de kullanılmıştır. Ayçiçeği tohumları genellikle çorba ve yemeklerde un olarak karıştırılmış, hatta eski zamanlarda kahve olarak bile kullanıldığı bildirilmiştir. Öte yandan, ayçiçeği kabuğu ve yaprakları boya yapımında, taç yaprakları ve polenleri yüz boyamada, ayçiçeği yağı ise saç tedavisinde ve yemeklik yağ olarak kullanılmıştır (Kaya ve ark., 2012).

Helianthus cinsinin 14'ü tek, 37'si çok yıllık olmak üzere 51 türü mevcuttur (Fernandez ve ark. 2009). Ayçiçeği bitkisi genel olarak uzun yapılı bir bitkidir. Ekimi yapılan ayçiçekleri genellikle 150-200cm civarında bir boya sahipken yabani türlerin boyu 4-5 metreyi bulabilmektedir. Bitkilerin boyları iklim ve toprak koşullarına bağlıdır ve kuraklık veya yetersiz beslenen topraklar bitki boyunu büyük ölçüde azaltırken, sulama ve daha az su stresi bitki boyunu olumlu etkilemektedir. Standart boydaki (150–180 cm) melezlerin yanı sıra dünyada hem yarı bodur (100–150 cm) hem de bodur (50–100 cm) melezleri de üretilmiştir. Bitki boyunun azalması, yatma ve bazı hastalıklara karşı dayanıklılık, bitki yoğunluğunun yüksek olması vb. gibi birçok avantajı olmasına rağmen, bitki boyu da verimi olumlu yönde etkilemektedir ve birçok çalışmada değerli bir verim özelliği olarak belirtilmektedir (Kaya ve Atakisi 2003).

Ayçiçeği tohumları tekli ve çoklu doymamış yağ asitlerinin yanı sıra E vitamini içeriğinin yüksek olması nedeniyle tüketiciler tarafından yaygın olarak tüketilmektedir. Ayçiçeği tohumlarının yağ kalitesi, yağ asidi kompozisyonu, tokoferoller, steroller, karotenoidler ve diğer bileşiklerin seviyeleri ile belirlenmektedir. Normal ayçiçek yağı, %55–65 linoleik asit (C18:2) ve %20–30 oleik asitten (C18:1) oluşmaktadır. Geriye kalan kısım ise %5-10 palmitik (C16:0) ve stearik asitten (C18:0) oluşmaktadır. Ayçiçek yağı yüksek oranda çoklu doymamış yağ asidi olan linoleik asit içermektedir. Aynı zamanda iyi bir kalsiyum, fosfor, nikotinik asit ve E vitamini kaynağı olduğu bildirilmiştir (Joksimović ve ark., 2006).

Yağlı ayçiçeği tohumları, yağ endüstrisi açısından oldukça önemli bir yağlı tohumdur ve genellikle bitkisel yağ üretimimizin %69'unu karşılamaktadır. Yağ endüstrisinde bol miktarda yan ürün üretilmektedir. Bunlar arasında, ayçiçeği küspesi yüksek besin ve protein içeriği nedeniyle oldukça dikkat çekici bir yan ürün olarak değerlendirilmektedir (Binboğa Meral, 2019).

Ayçiçeği, yağ, küspe ve biyodizel gibi kullanım alanları açısından önemli bir yağlı tohum bitkisidir. Günümüzde üretilen ayçiçeği tohumunun büyük bir kısmı yağ üretimi için kullanılmaktadır. Ayçiçeği yağı, açık rengi, yumuşak tadı ve yüksek duman noktası nedeniyle diğer bitkisel yağların çoğuna kıyasla genellikle birinci sınıf bir yağ olarak kabul edilmektedir (Fick ve Miller, 1997). Yağlı tohum üretimi açısından ayçiçeği, soya fasulyesi (%66) ve kolza tohumundan (%10) sonra küresel üretimin %5,6'sı ile üçüncü sırada yer almaktadır. Ayçiçeği sınırlı sayıda ülkede büyük ölçekte üretilmekte olup, üretimin üçte ikisi Ukrayna ve Rusya dahil olmak üzere

Avrupa'da ve Türkiye'nin Trakya Bölgesi'nde yoğunlaşmaktadır. Diğer büyük üretici ülkeler ise Arjantin, Çin, Amerika Birleşik Devletleri ve Afrika'nın Güneydoğu bölgesidir (Pilorge E, 2020). Türkiye'de, en fazla ekim alanına ve üretimine sahip yağlı tohumu ayçiçeğidir ve bitkisel ham yağ üretiminin %46'sını ayçiçeği tohumu oluşturmaktadır (USDA, 2020). Çizelge 1.1'de dünya ayçiçeği tohumu ve ayçiçeği yağı üretim miktarlarının yıllara göre dağılımı gösterilmiştir.

Çizelge 1.1: Dünya ayçiçeği çekirdeği ve ayçiçeği yağı üretim değerleri (2021-2023/1000 ton) (USDA).

Üretim	Ülke	Ayçiçeği Çekirdeği			Ayçiçeği Yağı		
		20/21	21/22	22/23	20/21	21/22	22/23
	Arjantin	3,430	3,350	4,200	1,350	1,440	1,482
	Rusya	13,269	15,572	17,000	5,121	5,823	6,195
	Türkiye	1,560	1,750	1,900	1,044	923	1,175
	Ukrayna	14,100	17,500	9,500	5,913	4,515	4,085
	Avrupa Birliği	8,897	10,341	9,700	3,460	4,225	4,352
	Diğer	8,017	8,806	8,629	2,173	2,705	2,698
Toplam		49,273	57,319	50,929	19,061	19,631	19,987

Türkiye'de yağlık ayçiçeği üretiminin en çok yapıldığı il Tekirdağ'dır. Konya ve Edirne ise yağlık ayçiçeği üretiminde sırasıyla ikinci ve üçüncü sırayı almaktadır. Üretim alanı en yüksek il Tekirdağ (235 kg/da) olmasına rağmen verim değeri en yüksek il Konya (408 kg/da)'dır (Semerci ve Durmuş, 2021). 2021 TÜİK verileri incelendiğinde ayçiçeği üretimi %16,8 oranında artarak 2,4 milyon ton olmuştur (TÜİK, 2021).

1.2.2 Ayçiçeği proteini

Günümüzde hayvansal ve bitkisel proteinlere karşı artan bir talep mevcuttur. Ancak hayvansal proteinler ekonomik ve çevresel faktörler sebebi ile oldukça pahalıdır. Bu sebeple alternatif protein kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bitkisel proteinler, gıda formülasyonlarında fonksiyonel bileşen olarak hayvansal proteinlere ekonomik ve sürdürülebilir alternatiflerdir.

Yağlı tohumlar, önemli bitkisel protein kaynakları olarak değerlendirilmektedir. Özellikle soya proteinleri, gıdalarda fonksiyonel bir bileşen olarak kullanılan temel yağlı tohum proteinidir. Ayçiçeği tohumu, genellikle yağ endüstrisinde yağ elde etmek için kullanılmaktadır ve ekstraksiyon sonucunda küspe olarak adlandırılan değerli bir yan ürün oluşmaktadır. Proteinler, lipitlerden sonra ayçiçeği tohumunun ikinci ana bileşenini oluşturmaktadır (González-Pérez ve Vereijken, 2007). Kabuğu uzaklaştırılmış ayçiçeği tohumunun yaklaşık olarak %20-40 ham protein içerdiği bildirilmiştir. Belirtilen bu değerlerin yaklaşık %89-99'unu gerçek proteinler oluşturmaktadır. Geri alan %1-13'lük kısım ise peptitler, aminoasitler ve azotlu maddelerdir. Ayçiçeği tohumları, toksik bileşenleri içermemektedir, buna karşı klorojenik asit ve kafeik asit gibi baskın fenolik bileşiklerin varlığı fonksiyonel bir bileşen olarak kullanımlarını kısıtlamaktadır. Ayçiçeği tohumunda bulunan polifenoller, soya fasulyesindeki isoflovanoller ve yer fıstığında bulunan gosipol gibi zararlı değildir. Fakat birçok gıda ürünüde lezzet ve rengi etkileyen önemli değişikliklere sebep olmaktadır (Gassmann, 1983).

Ayçiçeği proteinlerinin, gıda bileşeni olarak değerlendirilmesi noktasında bazı uygulamaları mevcuttur. Bu uygulamalar, özellikle et ve süt ürünleri, bebek maması, unlu mamüller ve makarna ürünleri başta olmak üzere, gıdaların ayçiçeği küspesi ile zenginleştirilmesi ile ilgilidir (Salunkhe, 1992). Hayvan veya bitki kaynaklı proteinlere yönelik dünya çapında artan bir talep vardır. Bununla birlikte, hayvansal proteinler, özellikle et proteinleri, hem piyasa fiyatı hem de çevresel etki açısından pahalıdır. Ayrıca, sığır süngerimsi ensefalopati gibi hastalıklarla ilgili gıda güvenliği sorunları, dioksin kontaminasyonu ve hayvan hormonlarının kullanımı nedeniyle tüketicinin hayvansal ürünlere olan güveni azalabilmektedir. Bu nedenle bitkisel proteinlerin kullanımına ilgi artmaktadır. Bitkisel proteinler, gıda formülasyonlarında fonksiyonel bileşenler olarak hayvansal proteinlere ekonomik ve sürdürülebilir alternatiflerdir. Yağlı tohumlar, bitkisel protein preparatlarının en önemli kaynağıdır. Şimdiye kadar soya proteini, gıdalarda fonksiyonel bir bileşen olarak kullanılan ana yağlı tohum proteini olmuştur (González-Pérez, 2015). Bununla birlikte bezelye, nohut, bakla, kolza tohumu, ayçiçeği gibi yağlı tohumlar da önemli protein kaynakları olarak değerlendirilebilmektedir. Bu alternatif kaynaklar arasında, ayçiçeği tohumları, soyanın üretilmediği veya çok az üretildiği bölgelerde yaygın olarak bulunabilmeleri açısından özellikle ilgi çekicidir. Ayrıca ayçiçeği, yukarıda bahsedildiği gibi, yağ

çıkarma işlemi için yaygın kullanımı nedeniyle hem çiftçiler hem de işleyiciler için iyi bilinen bir üründür.

1.2.2.1 Ayçiçeği proteininin gıda endüstrisinde bir alternatif olarak değerlendirilmesi

Günümüzde insan nüfusunun artması ve kaynakların aşırı kullanımı gibi sebeplerden dolayı oluşan çevre sorunları, tedarik sırasında gıda israfını en aza indirmek ve sürdürülebilir gıda için yeni stratejilerin geliştirilmesine neden olmaktadır. Atıkların veya yan ürünlerin değerlendirilmesi noktasında kullanılan bazı geleneksel yöntemler mevcuttur. Bu geleneksel yöntemler arasında yakma, aerobik fermantasyon, kompostlaştırma, gübre ve yem maddesi olarak değerlendirilmesi bulunmaktadır. Alternatif çözümler, atık olarak değerlendirilen biyoaktif bileşiklerden katma değerli ürünler elde ederek gıdaların sürdürülebilirliğini amaçlamaktadır. Bununla birlikte protein kaynakları dünya çapında giderek daha sınırlı hale gelmektedir. Bu sebeple alternatif protein kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu açıdan ayçiçeği küspesinde kalan proteinler alternatif protein kaynağı olarak değerlendirilmektedir (Saleh, 2021). Bitkisel protein izolatlarının hazırlanmasında kullanılan ana hammaddeler proteince zengin tohumlardan elde edilmektedir (Pedroche, 2015). Proteinlerin %75'inden fazlasını oluşturan ayçiçeği protein konsantresi küspeden ekstrakte edilmektedir ve protein kaynağı olarak değerlendirilebilmektedir.

Yağlı tohumlardan ekstraksiyon ile yağ eldesi işleminde yan ürün yağlı küspedir ve bu yağlı küspeler sağlık açısından faydalı özelliklere sahip biyoaktif bileşiklerin kaynağıdır. Ayrıca enzim, antibiyotik, yüzey aktif bileşiklerin ve mantarların üretimi için substrat görevi görmektedir. Yağlı küspenin değerlendirilmesindeki diğer uygulamalar ise hayvan yemi olarak kullanılması, kompozitler, biyoyakıt ve film üretimidir (Ancuța ve Sonia, 2020). Ayçiçeği tohumu küspesi, diğer yağlı tohum küspeleri ile karşılaştırıldığında dengeli bir aminoasit profiline sahip olduğu görülmektedir. Bununla birlikte protein ve lif bakımından zengin bir içeriğe sahiptir (Petraru ve ark., 2021). Yağ ekstraksiyonundan sonra oluşan küspede, protein oranı yaklaşık %20-60, lif oranı %5-35 ve geride kalan yağ oranı %3-5'tir (González-Pérez, 2015). Bu bölümde, ayçiçeği tohumlarından yağ ekstraksiyonu sonucunda küspede kalan proteinlerin gıda endüstrisinde alternatif olarak değerlendirilmesi hakkında araştırmalara yer verilmiştir.

Ayçiçeği proteinleri, yağ endüstrisinde yan ürün olarak değerlendirilen ayçiçeği küspesinden ekstrakte edilmektedir (Salgado ve ark., 2010). Ayçiçeği küspesinden elde edilen proteinlerin yaygın olarak kullanılmasının amaçlanması, soya proteinleri gibi nispeten daha pahalı protein kaynaklarının yerini alması açısından oldukça önemlidir (Shchekoldina ve Aider, 2014). Schekoldina ve Aider, (2014) ayçiçeği küspesi protein izolatlarını katkı maddesi olarak kullanılması üzerine bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada buğday ununa ayçiçeği küspesi protein izolatı ilave ederek fonksiyonel ekmek üretimini amaçlamışlardır. Düşük klorojenik ve kafeik asit içeriğine sahip ayçiçeği protein izolatları toplam buğday ununun %8-12'si oranında hamur formülüne ilave edilmiştir. Ayçiçeği küspesi protein izolatı eklenen ekmeğin kontrol ekmeğine kıyasla yüksek kütle hacmine ve besin kalitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Della Gatta ve Piergiorgianni, (1996) unlu mamullere ayçiçeği küspesi ilavesinin protein içeriğini arttırdığını ancak ekmek kalitesi üzerinde olumsuz bir etkisi olduğunu bulmuştur. Zorzi ve ark., (2020) yapmış oldukları bir çalışmada, ayçiçeği protein konsantrasyonlarını düşük protein içeriğine sahip glutensiz ekmeğe ilave ederek renk, doku, ekmek içi özellikleri ve protein içeriklerini değerlendirmiştir. Elde edilen sonuçlar, ayçiçeği protein konsantrasyonlarının glutensiz ekmekte kullanılmasının duyusal olarak kabul edilebilir olduğunu ve protein içeriği yüksek glutensiz ekmeklerin üretilebileceğini göstermiştir (Zorzi ve ark., 2020).

Genellikle protein filmlerinin oksijen, lipidler ve aromalara karşı güçlü bir bariyer özelliği bulunmaktadır. Bununla birlikte orta düzeyde mekanik özelliklere sahiptir. Buğday gluteni, mısır zeini, soya, ayçiçek, pirinç gibi bitkisel kaynaklı proteinlerin yenilebilir ve/veya biyolojik olarak parçalanabilen filmler oluşturma yetenekleri üzerine çeşitli araştırmalar yapılmaktadır (Gennadios, 2002). Ayhllon ve ark., (2000) ayçiçeği protein izolatının film oluşturma potansiyeli üzerine bir çalışma gerçekleştirmiştir. Bu çalışma ayçiçeği proteinlerinden film üretmenin mümkün olduğunu göstermiştir. Ayçiçeği küspe protein izolatları ile hazırlanan filmlerin yağ ve organik çözücülere karşı dirençli, iyi bariyer özelliklerine sahip olduğu tespit edilmiştir (Ayhllon-Meixueiro ve ark., 2000). Ayçiçeği küspesinden ekstrakte edilen protein izolatları toksik değildir. Bu nedenle yenilebilir film ve kaplama formülasyonları için kullanılabilir. Geleneksel olarak üretilen ambalajların yerine sürdürülebilir ve çözünebilir biyofilmlerin üretilmesi üzerine bir çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada taze çilekler, ayçiçeği küspesi protein izolatları

kullanılarak geliştirilen biyofilmlemler ile kaplanmıştır ve depolama süresi boyunca çileğın kalitesi ve raf ömrü değerdendirilmiştir. Sonuçlar, geliştirilen bu filmlerin taze meyvelerin amlajlanmasında kullanılabılır olduğunu kanıtlamıştır (Efthymiou ve ark., 2022). Ayçiçeği küspesi protein izolatlarının gıda katkı maddesi olarak kullanılması kısıtlayan bir takım polifenolik maddeler bulunmaktadır. Klorojenik ve kafeik asit, ayçiçeği küspesi protein izolatlarının kullanımını kısıtlayan baskın polifenolikler olarak değerdendirilmektedir. Bu maddeler gıda matrisinin rengine önemli değışikliklere neden olmaktadır. Ayrıca lizin ve metionin gibi bazı aminoasitlerle etkileşimleri nedeniyle son ürünün besin değeri ni düşürmektedir (Schekoldina ve Aider, 2012). Yapılan bir çalışmada, farklı düzeylerde fenolik bileşiklere sahip ayçiçeği protein izolatlarından biyolojik olarak parçalanabilen filmler hazırlanmıştır ve bunların antioksidan aktiviteleri dahil filmlerin yapısal ve fonksiyonel özellikleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ayçiçeği küspesi protein izolatlarından hazırlanan filmlerin mekanik özellikleri biyolojik olarak bozunabilir filmler hazırlamak için yeterli olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda protein izolatlarındaki fenolik bileşikler, oksidasyona karşı duyarlı gıdaların korunması için güçlü bir antioksidan özellik göstermiştir fakat filmlerde oluşturduğu renk, bu malzemelerin gıda ambalajlarındaki bazı potansiyel uygulamalarını sınırlandırmaktadır (Pablo R. Saldago, 2010).

1.2.3 Endüstriyel bitkisel yağ eldesi

1.2.3.1 Ön işlemler

Yağlı tohumlardan yağ elde edilmesinde bazı ön işlemlerin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu aşamanın birincil basamağı, yağlı tohumların yabancı madde adı verilen yağlı tohum dışındaki sap, taç, toprak, çeşitli metal parçaları vb. gibi maddelerin uzaklaştırılmasıdır. Bu amaçla yağlı tohumlarda bulunabilecek yabancı maddelerin irilik, şekil, yoğunluk ve mıknatıslık özellikleri göz önünde bulundurularak temizleme yapılmaktadır. Yağlı tohumlardan yabancı maddelerin temizlenmesinde kullanılan sistemler başlıca elekler, triyörler, pnömatik ayırıcılar, mıknatıs sistemi ve linterleme makineleridir. Bu sistemler yağlı tohumun sahip olduğu birtakım özellikler göz önünde bulundurularak oluşturulmuştur. Elekler irilik esasına göre ayırmada, triyörler şekil farkı prensibine göre ayırmada, pnömatik ayırıcılar ise yabancı maddelerin yoğunluk farkı esas ı dikkate alınarak ayırmada kullanılmaktadır. Yağlı tohumlarda bulunabilecek metal parçacıklarının ayrılmasında mıknatıs sistemleri kullanılmaktadır. Yağlı tohumların kabuklarının kırılması ve ayrılması

işlemi yağın kalitesi açısından büyük öneme sahiptir. Kabuğun yağlı tohumdan ayrılması, kabukta bulunan renk, aroma ve mumsu maddelerin yağa geçerek yağın kalitesinin bozulmasına sebep olmaktadır. Aynı zamanda yağlı tohumlarda kabuğun ayrılması pres kapasitesini düşürmektedir.

Yağlı tohumlar, yabancı maddelerden ayrıldıktan sonra özel kırıcılarda çarpma yöntemi ile kırılmaktadır. Bu işlem silindirik sabit bir gövdede ve dakikada 600-650 devirle dönebilen paletlere sahip bir tamburda üsten gelen yağlı tohumların cidara savrulması sonucu gerçekleştirilmektedir. Çarpma işlemi sonucunda, kabukların bir kısmı bütün bir kısmı da parçalanmış bir şekilde tohumdan ayrılmaktadır. Ayçiçeği gibi esnek kabuklara sahip yağlı tohumların kabuklarının soyulmasında bar ve disk kabuk soyucular kullanılmaktadır. Kabuk kırma işleminin ardından kabuklar düz elekler yardımı ile içten ayrılmaktadır. Düz elek üzerindeki emici sistem sayesinde kabuklar hava akımı ile emilmektedir. Yağlı tohumdan yağ elde edilmesinde ekstraksiyon yöntemi kullanılacak ise kabuk miktarının az olması istenirken, pres yöntemi ile yağ elde edilmesinde bir miktar kabuğun kalması istenmektedir. Ayçiçeğinde bir miktar kabuk kalması istenilen bir durumdur. Bunun başlıca sebebi kabukların presleme işlemine yardımcı olmasıdır. Bazı tohumlar için kabuğun bir kısmının bulunması presleme işlemi için olumlu bir etkiye sahipken bazı tohumlar için kabuklar presleme kapasitesini düşürmesi açısından istenmeyen bir durum olarak tanımlanmaktadır. Yağlı tohumlarda, yağ zerrelere hücre sitoplazmasında bulunduğu için, iç kısmın küçük parçalara inceltirilerek ezilmesi gerekmektedir. Bu amaçla dişli valsler kullanılmaktadır. Yağlı tohumlardan yağ elde edilmesinde ekstraksiyon yöntemi kullanılması amaçlanıyorsa yağlı tohumların düz valsler yardımı ile pulcuklar haline getirilmesi istenilmektedir. Düşük nem içeriğinde pullar kırılırken yüksek nem içeriğinde pullaşma olmamaktadır. Ayçiçeğinde iyi bir pullanma için olması gereken nem %8-10'dur.

Tohum ve meyvelerde hücre içinde bulunan yağın alınabilmesi için ısıtılmak suretiyle kavrulması gerekmektedir. Kavurma işlemi birçok açıdan oldukça önemlidir. Yağlı tohumun hücre duvarı protein yapısında olduğundan sıcaklık uygulaması ile oluşan protein denatürasyonu sayesinde hücre içinde bulunan yağ moleküllerinin dışarı çıkması daha kolay hale gelmektedir. Aynı zamanda proteinlerin yağlarla oluşturduğu emülsiyon sıcaklık sebebi ile kırılmaktadır. Böylece yağ kolay bir şekilde yapıdan ayrılabilir. Küf, bakteri gibi mikroorganizmalar kavurma işlemi ile inaktive

edilmektedir. Küçük işletmelerde ısıtma işlemi tek katlı tavalarda yapılırken büyük işletmelerde 4-5 katlı ısı yalıtımlı tavalarda kavurma işlemi gerçekleştirilmektedir. Kavurma işlemi gerçekleştirilmeden önce yağlı tohumun nem miktarı ayarlanmalıdır.

1.2.3.2 Mekanik presleme yöntemi

Yağ oranı %20 ve üzerinde olan yağlı tohumlardan yağ elde edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Mekanik presleme yönteminde ham yağ esas ürün olarak değerlendirilirken yağı alınmış küspe yan ürün olarak değerlendirilmektedir. Yan ürün olarak değerlendirilen küspede yağ oranı yaklaşık olarak %15-20 civarındadır. Kesikli çalışan hidrolik presler, sürekli vidalı presler ve döner presler mekanik presleme yöntemi için kullanılan preslerdir (Kayahan, 2004).

1.2.3.3 Solvent ekstraksiyon yöntemi

Solvent ekstraksiyon yönteminin temel prensibi, yağın içinde çözündüğü bir organik çözücü yardımıyla yağlı tohumdan ayrılmasıdır. Bu amaçla yağlı tohum çözücü ile muamele edilip yağın çözücüye geçmesi sağlanmaktadır. Bu aşamadan sonra çözücü ile yağ birbirinden ayrıştırılmaktadır. Geride kalan yağ ham yağ olarak değerlendirilmektedir. Solvent ekstraksiyonu sonucunda küspede kalan yağ miktarı en fazla %1'dir. Ekstraksiyon öncesinde yağlı tohumlara herhangi bir ısıtma işleminin uygulanmaması veya çok az uygulanması yağın kalitesine olumlu etki yapmaktadır. Solvent ekstraksiyonunda kullanılan çözücülerin yanıcı ve patlayıcı olması bu yöntemin dezavantajları arasında sıralanmaktadır. Ayçiçeği gibi yüksek yağ içeriğine sahip yağlı tohumlarda hem mekanik hem de solvent ekstraksiyonu ile küspedeki yağ oranı düşürülebilmektedir. Türkiye ve dünyada kullanılan en yaygın çözücü hekzandır ve yanıcı özellikte olması bir dezavantajdır.

1.2.3.4 Ön presleme-ekstraksiyon yöntemi

Ön presleme-ekstraksiyon işleminde yağ oranı yüksek yağlı tohumlar kullanılmaktadır. Öncelikle presleme yöntemi ile hammaddede bulunan yağ oranının %20'nin altına düşmesi sağlanmaktadır. Elde edilen küspeye ekstraksiyon işlemi uygulanarak yağ oranı %5 civarlarına kadar düşürülmektedir (Nas, 2001).

1.2.5 Sulu enzimatik ekstraksiyon yöntemi

1.2.5.1 Enzimler ve enzimlerin sulu enzimatik ekstraksiyon yöntemi için kullanılması

Doğada meydana gelen süreçlerin önemli oranda gerçekleşmesi için enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır. Enzimler, kimyasal reaksiyonları hızlandıran proteinler olarak ifade edilmektedir. Enzimatik reaksiyonlarda reaksiyonun başlangıcında bulunan moleküllere substrat adı verilmektedir. Enzimler substratları için seçicidir ve substratları ürün adı verilen farklı moleküllere dönüştürmektedir. Bütün katalizörlerde olduğu gibi, enzimler katalize ettikleri reaksiyonlar tarafından tüketilmemektedir ve bu reaksiyonların dengesini değiştirmemektedir. Tüm katalizörler gibi enzimler de kullanılacakları reaksiyon için aktivasyon enerjisini düşürerek çalışmaktadır. Aynı zamanda enzimler spesifik bir yapıya sahip olduklarından katalizörlerin çoğunluğundan farklıdır. Neredeyse tüm enzimler protein olmasına rağmen, bütün biyokimyasal katalizörler enzim değildir.

Gıda endüstrisinde enzimlerin kullanılmasının birtakım avantajları mevcuttur. Bu avantajlar arasında en önemlisi, enzimlerin geleneksel kimyasal bazlı teknolojiye alternatif olarak kullanılmasıdır. Bu amaçla enzimler, çok çeşitli işlemlerde sentetik kimyasalların yerini alabilme potansiyeli taşımaktadır. Aynı zamanda, enerji tüketimini ve ürünlerin biyolojik olarak parçalanabilirliğini azaltarak süreçlerin çevresel etkisi üzerinde avantaj sağlamaktadır. Ayrıca enzimler, kimyasal reaktanlardan daha spesifik olduklarından, enzim kullanılarak gerçekleştirilen işlemler sonucunda daha kaliteli ürünlerin elde edilmesine ve daha az atık ürün oluşumuna bununla birlikte, gıdaların ve gıda bileşenlerinin değerli özelliklerini yok etmeden işlemeye olanak sağlamaktadır (Whitehurt R. J. ve Oort van M., 2010).

Ekstraksiyon işlemi sırasında kullanılacak enzimlerin seçiminde dikkat edilmesi gereken bazı parametreler mevcuttur. Enzimler seçilirken, tohumun kimyasal bileşimine, hücre duvarı yapısına ve tohum içerisinde bulunan ve ekstrakte edilmek istenen yağ partiküllerinin konumu dikkat edilmesi gereken parametrelerdir (Nadar ve ark., 2018). Genel olarak yağ partikülleri, hücre duvarında dominant olarak bulunan protein ile çevrilidir. Protein ve pektin, soya fasulyesi ve kolza gibi yağlı tohumların da hücre duvarının ana bileşenini oluşturmaktadır. Dolayısıyla bu bileşenlerin, proteaz, selüloz, pektinaz ve diğer enzim karışımları kullanılarak ekstrakte edilmesi gerekmektedir (Mat Yusoff ve ark., 2016). Enzimler, işlevselliği için neme ihtiyaç

duymaktadır ve yağlı tohumlarda düşük nem içeriği kalın bir süspansiyon oluşumuna neden olarak yağ verimini düşürmektedir (Nadar ve ark., 2018).

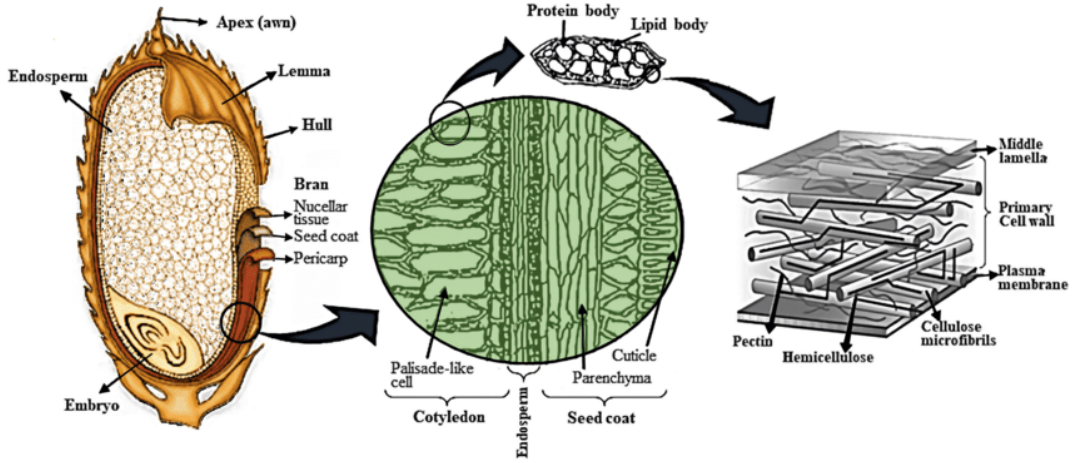
1.2.5.2 Sulu enzimatik ekstraksiyon prosesi

Solvent ekstraksiyonu, yağ endüstrisinde en yaygın kullanılan geleneksel yöntemlerden biridir ve bu yöntemle elde edilen yağ verimi oldukça yüksektir. Proses kolaylığı ve ekonomik sebepler de yaygın olarak kullanılmasına neden olmaktadır. Genellikle hekzan ve/veya n-hekzan gibi çözücü maddeler kullanılmaktadır. Bu gibi çözücü maddeler düşük kaynama noktası, yüksek çözünürlük, polar olmayan yapıları, basit ve kolay geri kazanımları gibi üstün özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir. Ancak bu organik çözücüler toksik ve yanıcı olması gibi sebeplerden dolayı bazı kısıtlamalara sahiptir. Aynı zamanda çok fazla çözücü kullanılması da çevre sorunlarını beraberinde getirmektedir. Bu sebepten dolayı çevre dostu alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (Iwona Konopka, 2016; Mwaurah ve ark., 2020). Sulu enzimatik ekstraksiyon yöntemi çözücü olarak su kullanılması sebebi ile çevre dostu bir yöntemdir ve bu yöntemle yüksek kalitede ürünler ekstrakte edilmektedir. Bununla birlikte herhangi bir bozulma olmadan yüksek besin içeriğine sahip yan ürünler elde edilebilmektedir (Chemat ve ark., 2017).

Sulu enzimatik ekstraksiyon yöntemi ile yağ eldesinin temel prensibi, yağlı materyalden yağ ekstrakte etmek için çözücü olarak suyun kullanılmasıdır. Ancak suyun yağlı materyalin hücre duvarını parçalaması uzun bir süreci kapsamaktadır ve yağ verimi solvent ekstraksiyonu gibi geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine kıyasla daha düşüktür. Bu sebeple, yağlı materyalin hücre duvarını parçalamak için hem su hem de enzim/enzim kombinasyonları kullanılmaktadır (Mat Yusoff ve ark., 2016). Bitki materyallerinin hücre duvarı selüloz, hemiselüloz ve pektinden oluşmaktadır (Şekil 1.1). Bu maddelerin tamamı ticari olarak da temin edilmesi mümkün çeşitli enzimler tarafından parçalanabilmektedir. Lipitler amfipatik özelliğe sahip olduğu için sadece suda çözünür kısımlar suya geçerken suda çözünmeyen kısımlar bir emülsiyon oluşturmaktadır. Emülsiyon sıcaklığının değiştirilmesi veya yağı çözen enzimlerin ilave edilmesi yağın daha çok emülsifiye olmasına sebep olmaktadır. Sulu enzimatik ekstraksiyon, su ve yağın birbiri içerisinde çözünmemesi, ekstrakte edilmek istenen bileşiklerin zarar görmeden ayrılması, yağ ve proteinlerin eş zamanlı elde edilebilmesi açısından alternatif bir yöntem olarak değerlendirilmektedir (Mwaurah ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2012).

Yaygın olarak kullanılan enzimler arasında selüloz, pektinaz, hemiselüloz, proteaz ve fosfolipaz bulunmaktadır. Enzimatik ekstraksiyon yönteminde kullanılacak enzim seçiminde hücre duvarı bileşiminin yanı sıra yağlı tohumun yapısı da dikkate alınmaktadır. Ekstraksiyon için seçilen enzimler tek başına veya enzim kombinasyonu şeklinde de kullanılabilir. Enzimatik ekstraksiyon yönteminde yağ verimini etkileyen bazı parametreler mevcuttur. Partikül büyüklüğü, yağ verimini etkileyen önemli parametrelerden biridir. Yağ ekstrakte edilmek istenen hücrelerden yağın uzaklaştırılmasını kolaylaştırmak için materyalin çözücü ile temas yüzey alanının artırılması zorunludur. Bu amaçla ekstraksiyon öncesinde öğütme işlemi uygulanmaktadır ve öğütme işlemi, ekstrakte edilecek tohuma göre gerçekleştirilmektedir. Bazı durumlarda, eğer yağlı tohum yüksek yağ içeriğine sahipse, küçük boyutlu partiküller birbirine yapışma eğilimi göstermektedir ve bu durum ekstraksiyon verimliliğini olumsuz yönde etkilemektedir (Nyam ve ark., 2009).

Sulu enzimatik ekstraksiyon yönteminde diğer kritik parametrelerden biri ise ortam pH'sıdır. Yağ ekstraksiyonu sonucunda yüksek yağ verimi elde etmek için optimum pH koşulları belirlenmelidir. Çünkü kullanılacak enzimler kendilerine özgü pH değerlerinde çalışmaktadır. Eğer yağ ekstraksiyonu, proteinlerin izoelektrik noktasında gerçekleşiyorsa, proteinler bu durumda çözünmez olma eğiliminde olduklarından dolayı ekstraksiyon verimi düşebilmektedir. Bunun sebebi, birçok yağlı tohumda lipid moleküllerinin protein molekülleri ile birlikte gömülü olmasıdır ve bu durum yağın hücreden ayrılmasını engelleyebilmektedir. Bu nedenle, kullanılan pH değeri sadece enzimlerin faaliyeti için elverişli olmakla kalmamalı, aynı zamanda protein izoelektrik noktasından da uzak olmalıdır. Aynı zamanda sulu enzimatik ekstraksiyon sonucu daha yüksek bir yağ verimi elde etmek için enzim kombinasyonları kullanılmaktadır (Mat Yusoff ve ark., 2015).



Şekil 1.1: Yağlı tohum hücre yapısı ve hücre duvarı.

Sulu enzimatik ekstraksiyon için sıcaklık kritik parametrelerden biri olarak değerlendirilmektedir. Çünkü ortam pH'sının yanı sıra, enzimler dar bir sıcaklık aralığında çalışmaktadır. Genellikle sulu enzimatik ekstraksiyon, mevcut yağ asitleri ve yağlı tohumun çeşidine bağlı olarak 45°C'de ve/veya altındaki bir sıcaklıkta daha etkili gerçekleşmektedir. Yüksek sıcaklıklar proteinlerin denatürasyonuna sebep olduğu için enzimatik aktiviteyi düşürmektedir ve bu süreç yağ ekstraksiyonunu olumsuz yönde etkilemektedir (Kumar ve ark., 2017). Enzim/substrat oranı enzimatik ekstraksiyon için diğer bir önemli parametredir ve kullanılacak enzim konsantrasyonları yağ verimi ile doğru orantılıdır. Ancak belirli bir noktadan sonra aşırı doygunluğun olumsuz etkileri, yağda kötü tatların ve acılığın oluşmasına sebep olmaktadır (Jiang ve ark., 2010). Su/Substrat oranı, karıştırma hızı gibi faktörler de sulu enzimatik ekstraksiyon verimini etkileyen diğer faktörlerdir (Mwaurah ve ark., 2020).

Sulu enzimatik ekstraksiyon sonrasında yağı ayırabilmek için santrifüj işlemi gerçekleştirilmektedir ve bu aşamadan sonra karışımlar yağ fazı, sulu faz, krema ve katı faz olmak üzere dört faza ayrılmaktadır. Yağlı tohumlardan SEE yöntemi sonrası elde edilen yağ verimi, solvent ekstraksiyonu sonrasında elde edilen yağ verimi ile kıyaslandığında nispeten daha düşüktür ve yağın tamamı serbest yağ olarak ayrılmamaktadır. Sulu enzimatik ekstraksiyon sonrasında santifüj uygulaması yapılmaktadır. Elde edilen krema fazına uygun enzimlerin eklenmesi ile kremada bulunan yağı ayırmak mümkündür. Sulu enzimatik ekstraksiyon sonrasında oluşan krema fazından yağ elde edilmesi emülsiyon kırma işlemi olarak ifade edilmektedir. Bu yöntemde, krema fazına eklenen enzimler ara yüzey proteinlerini hidrolize ederek

moleküler boyutlarını küçültmektedir. Bu enzimatik reaksiyonlar daha büyük yağ damlacıklarının birleşimine ve bunun sonucunda da serbest yağın ayrılmasına neden olmaktadır (Chabrand ve Glatz, 2009; Tabatabaei ve Diosady, 2013). Bununla birlikte, pH ayarlaması yapılarak da krema fazında bulunan yağ ayrılmaktadır.

Wu ve ark., (2009) yapmış oldukları bir çalışmada öğütülmüş soya fasulyesinden yağ elde etmek için SEE yöntemini kullanmayı amaçlamıştır. SEE sonrasında elde edilen kremada emülsiyon kırma işlemi hem enzim kullanılarak hem de pH ayarlaması yapılarak gerçekleştirilmiştir. pH ayarlaması yapılarak gerçekleştirilen emülsiyon kırma işleminde farklı pH aralıklarının (pH: 3-8; 50°C; 15dk) yağ verimi üzerine etkisi de incelenmiştir. Sonuç olarak yağ veriminin en yüksek olduğu pH aralığının 4-4,5 olduğu gözlemlenmiştir ve yağın %100 verimle elde edildiği tespit edilmiştir (Wu ve ark., 2009).

1.2.5.3 Sulu enzimatik ekstraksiyon yönteminin avantaj ve dezavantajları

Dünya ve Türkiye genelinde kullanılan ve yüksek yağ verimliliği açısından büyük öneme sahip organik çözücü hekzandır. Bununla birlikte hekzanın yanıcı ve patlayıcı olması, işletim maliyetlerinin yüksek olması önemli dezavantajları arasında yer almaktadır. Bu problemler dikkate alındığında sulu enzimatik ekstraksiyon yöntemi alternatif bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (de Moura ve ark., 2008). Sulu enzimatik ekstraksiyonda yağın suda çözünmemesi prensibi esastır. Bu yöntemin solvent ekstraksiyonu yöntemine göre birtakım avantajları vardır. Sulu enzimatik ekstraksiyonda çözücü olarak suyun kullanılması daha çevre dostu bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır. Daha az işletim maliyeti, çevresel açıdan daha temiz ve protein hasarının daha az olması yöntemin önemli avantajlarındandır. Buna karşın sulu enzimatik ekstraksiyon yönteminde yağ verimi solvent ekstraksiyonu yöntemine göre düşüktür (Tabatabaei ve Diosady, 2013).

1.2.6 Ayçiçeği tohumlarında klorojenik asit varlığı ve kaliteye etkisi

Ayçiçeği protein izolatları albümin ve globülinlerden (%70-80) oluşmaktadır ve yüksek intrinsik (gerçek, özgül) çözünürlüğe sahiptir. Çözünürlük kavramı birçok fonksiyonel özellik açısından oldukça önemlidir ve ayçiçeği tohum proteinlerinin bir gıda bileşeni olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır.

Ayçiçeği proteinlerinin kullanımını kısıtlayan birtakım faktörler mevcuttur ve bu durum, ayçiçeği proteinlerinin hayvan yemi olarak kullanılmasına neden olmaktadır.

Ayçiçeği tohumlarından yağ elde edilmesinde kullanılan mekanik presleme ve yüksek sıcaklıklar kullanılarak gerçekleştirilen solvent ekstraksiyonu gibi işlemler protein denatürasyonuna sebep olmaktadır. Bunun sonucunda, çözünmeyen ve fonksiyonel olmayan bir protein fraksiyonu oluşmaktadır. Ayçiçeği tohumlarında nispeten yüksek miktarlarda bulunan fenolik bileşikler de ayçiçeği proteinlerinin kullanımını kısıtlayan faktörler arasındadır. Özellikle ayçiçeği tohumlarında klorojenik asit varlığı önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır (González-Pérez ve ark., 2002). Fenolik bileşiklerin proteinlerle etkileşime girmeleri sonucunda, hem proteinlerin sindirilebilirlikleri hem de işlevsellikleri azalmaktadır. Ayrıca bu reaksiyonlar, esansiyel aminoasitlerin tahrip edilmesine ve aynı zamanda toksik bileşiklerin oluşmasına yol açmaktadır (Zardo ve ark., 2019). Bunun yanı sıra klorojenik asit varlığı, ayçiçeği protein izolatlarında arzu edilmeyen tat ve renk değişikliğine sebebiyet vermektedir (González-Pérez ve ark., 2002). Yağlı tohum bazlı protein izolatlarının elde edilmesinde, geleneksel metot olarak alkali ekstraksiyonu ve ardından izoelektrik çöktürme işlemi uygulanmaktadır. Ancak kullanılan yüksek pH sebebi ile protein ile reaksiyona giren klorojenik asit, ayçiçeği proteinlerinin yeşil pigmentasyonuna neden olmaktadır. Yeşil renk oluşumunu engellemek için ayçiçeği protein izolatlarının ekstraksiyonunda bazı ek uygulamalar gerekmektedir (Wildermuth ve ark., 2016).

Ayçiçeği proteinlerinden klorojenik asitin uzaklaştırılması amacıyla birçok yöntem denenmiştir. Bu yöntemler arasında, klorojenik asidin organik çözücüler ve su karışımları ile ekstraksiyonu, sulu asit çözeltileri ve tuzlarla ekstraksiyonu, membran filtrasyon gibi yöntemler bulunmaktadır. Aynı zamanda ayçiçeği tohumlarında bulunan klorojenik asidin uzaklaştırılmasında metanol, etanol, 2-propanol gibi kimyasalları kullanılması hem proteinlerin hem de klorojenik asidin ekstrakte edilebilirliğine olanak sağlamaktadır (González-Pérez ve ark., 2002). Ayçiçeği protein izolatlarının fonksiyonel bir gıda bileşeni olarak intrinsik özelliklerinin değerlendirilebilmesi için proteinlerin hem denatüre olmaması hem de klorojenik asit içermemesi gerekmektedir. Yapılan bir çalışmada ayçiçeği tohumlarında predominant şekilde bulunan klorojenik asidin uzaklaştırılmasında süper kritik CO₂ ekstraksiyonun etkinliği değerlendirilmiştir ve çalışma sonunda, belirlenen optimum koşullarda klorojenik asit geri kazanımının %52,08 olduğu bildirilmiştir. Klorojenik asidin, arzu edilmeyen etkilerinin yanı sıra antioksidan, antiaterjik, antiinflamatuvar, antimikrobiyal

gibi biyofarmokolojik özelliklere sahip bir bileşen olduğu bildirilmiştir (Daraee ve ark., 2019).

1.3 Hipotez

Ayçiçeği tohumlarından yağ eldesinde, geleneksel solvent ekstraksiyonu yöntemi yerine sulu enzimatik ekstraksiyon yönteminin kullanılması ile ürün kalitesinin korunduğu daha yüksek bir yağ verimi alınması ve aynı zamanda yağ ekstraksiyonu sonrasında ayçiçeği proteinlerinin de eş zamanlı olarak elde edilmesi beklenmektedir.



2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

Bu çalışmada kullanılan kabuksuz ayçiçeği çekirdekleri Pakmaya'dan temin edilmiştir. Ayçiçeği çekirdeklerinden sulu enzimatik ekstraksiyon deneylerinde proteaz olarak Alcalase® 2.5L, selüloz olarak Celluclast® 1.5L, Viscozyme® L ve pektinaz olarak Pectinex® ticari enzimleri kullanılmıştır. Kullanılan enzim ve kimyasallar, BAP Projesi kapsamında AYS Kimya tarafından temin edilmiştir.

Alcalase® 2.5 L Type-DX *Bacillus licheniformis* mikroorganizmalarından elde edilmiş ve 2,5 AU/g (Anson Units/ gram) proteolitik aktiviteye sahip proteazdır. Enzim için belirtilen optimum sıcaklık 55-70 °C ve optimum pH aralığı 4-8 'dir. Celluclast® 1.5 L iplikli bir mantar türü olan *Trichoderma reesei*'den elde edilmiş ve 700 U/g selüloolitik aktiviteye sahip olan selülozadır. Enzim için belirtilen optimum sıcaklık 50-60 °C ve optimum pH 4,5-6 'dır. Viscozyme® L bir mantar türü olan *Aspergillus sp.* 'den elde edilmiş ve 100 FBGU/g enzim aktivitesine sahip selüloolitik enzim karışımıdır. Enzim için belirtilen optimum sıcaklık aralığı 40-50°C ve optimum pH 3.3-5.5 'tir. Pectinex® Ultra Clear ise bir mantar türü olan *Aspergillus niger* tarafından elde edilen ve 7900 PGNU/mL enzim aktivitesine sahip pektinaz enzim karışımıdır. Enzim için belirtilen optimum sıcaklık aralığı 50°C ve optimum pH 3,5-6'dır. Kabuksuz ayçiçeği çekirdekleri ve enzimler çalışmalar sırasında buzdolabı koşullarında saklanmıştır. Sulu enzimatik ekstraksiyon için çözücü olarak distile su kullanılmıştır.

2.2 Metot

2.2.1 Ayçiçeği çekirdeklerinin öğütülmesi ve karakterizasyonu

Kabuksuz ayçiçeği çekirdekleri yaklaşık 20 g olacak şekilde tartılmıştır ve 100°C'ye önceden ısıtılmış etüvde 30 dakikalık bir ön ısıtma işlemi uygulanmıştır. Ön ısıtma işlemi sonrasında ayçiçeği çekirdekleri öğütücüde yaklaşık olarak 5 saniye kadar öğütülmüştür. Ayçiçeği çekirdeklerinin nem içeriği vakumlu etüv kullanılarak (AOAC 925.09) ve yağ içeriği Soxhlet yöntemi (AOAC 963.15) kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. Ayçiçeği tohumlarının ham protein içeriği, Kjeldahl yöntemi (AOAC 992.15) ile belirlenmiştir. Örneklerin protein içerikleri, ayçiçeği çekirdeği için 5,30'luk bir nitrojen faktörü kullanılarak hesaplanmıştır.

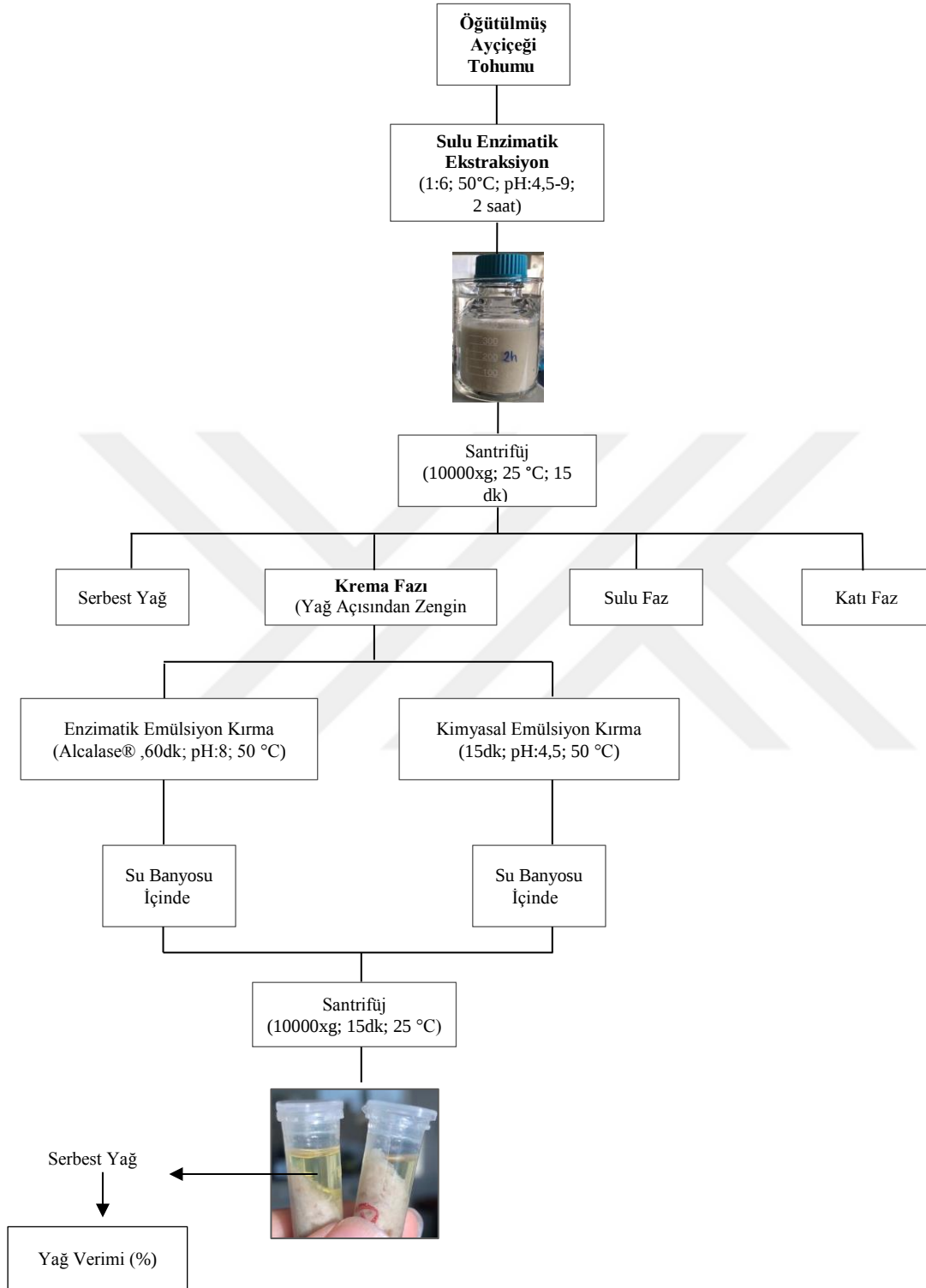
2.2.2 Ayçiçeği çekirdeklerinden sulu enzimatik ekstraksiyon ile yağ eldesinde ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi

2.2.2.1 Sulu enzimatik ekstraksiyon için kullanılacak enzimlerin belirlenmesi

Ayçiçeği tohumlarında her bir enzim için sulu enzimatik ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Kabuksuz ayçiçeği tohumları 20 gram kadar tartılmıştır ve 100°C'de 30 dakika boyunca etüvde ön ısıtma işlemine tabi tutulmuştur. Öğütme işlemi sonrasında 1:6 oranında su ilave edilmiştir. Her bir enzim için optimum pH değerine uygun olarak pH ayarlaması yapılmıştır ve 600µl enzim ilave edilmiştir. Sulu enzimatik ekstraksiyon, 45°C'de 2 saat boyunca gerçekleştirilmiştir ve ekstraksiyon sonucunda 1000xg'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Kabukları ayrılmış ayçiçeği tohumlarında Celluclast® -Alcalase® kombinasyonu kullanılarak SEE yapılmıştır. Ayçiçeği tohumları 20g kadar tartılmıştır ve 100°C'de 30dk boyunca etüvde ısıtılmıştır. Daha sonra çekirdekler yaklaşık 5sn kadar öğütücüde öğütülmüştür. 1:6 oranında olacak şekilde hazırlanan ve sıcaklığı 45°C'de sabit tutulan saf suda, Celluclast® için pH ayarlaması yapılmıştır. (Celluclast® için pH değeri:4,5) pH ayarlaması yapıldıktan sonra öğütülmüş ayçiçeği çekirdekleri ilave edilmiştir ve yaklaşık 5dk kadar bu şekilde sıcaklığın 45°C'ye gelmesi sağlanmıştır. Bu süre sonunda 600µl Celluclast® enzim ilavesi yapılmıştır. Ekstraksiyon süresi 1 saat olarak gerçekleştirilmiş ve bu süre boyunca termometre yardımı ile sıcaklık kontrolü (45°C) yapılmıştır. Daha sonra Alcalase® için tekrar pH ayarlaması yapılmıştır (Alcalase® için pH:8). 600µl Alcalase® enzimi ilavesinden sonra 1 saat daha manyetik karıştırıcıda ekstraksiyona devam edilmiştir. SEE sonucunda, enzim inaktivasyonu için 90°C'de yaklaşık 10dk kadar sıcak su içerisinde bekletilmiştir. Akabinde 10000xg'de 15dk santrifüj yapılmıştır. Celluclast® -Alcalase® kullanılarak gerçekleştirilen SEE'nin üçlü tekrarı yapılmıştır. Üstte kalan serbest yağ pipet yardımıyla ayrıldıktan sonra tartılmıştır. Krema ve katı fazında sırası ile vakumlu etüv, yağ ve protein analizleri yapılmıştır. Sulu fazda ise sadece protein analizi yapılmıştır.

2.2.2.2 Sulu enzimatik ekstraksiyon için krema emülsiyon yönteminin belirlenmesi

Bu aşamada Celluclast® -Alcalase® kombinasyonu kullanılarak yapılan SEE işlemi sonucunda elde edilen krema için Alcalase® enzimi ilave edilerek veya pH ayarlaması yapılarak krema emülsiyon kırma işlemi gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu iki yöntem kullanılarak gerçekleştirilen emülsiyon kırma işlemi sonuçları karşılaştırılarak en uygun yöntem belirlenmiştir. Enzim kullanılarak gerçekleştirilen krema emülsiyonu kırma işlemi için bir kap içerisinde biriktirilen krema ikiye bölünerek iki ayrı behere alınmıştır. Kremalar 50°C'ye kadar ısıtılmıştır ve iki beherden biri içerisindeki kremaya ağırlıkça %0,5 oranında Alcalase® enzimi ilave edilmiştir. Alcalase® ilave edilmemiş krema ise kontrol olarak seçilmiştir. Manyetik karıştırıcıda yaklaşık 1 saat boyunca ısıtıldıktan sonra enzim ilave edilen krema için 90 °C'de 10dk boyunca enzim inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Kremalara santrifüj uygulandıktan sonra oluşan serbest yağ pipet yardımı ile toplanmış ve tartılmıştır. pH ile krema emülsiyonu kırma işleminde ise, SEE sonrası elde edilen krema iki ayrı behere eşit olarak ayrılmıştır. İki beherden biri içerisindeki kremanın pH'sı 4,5'e ayarlanmıştır ve diğer krema ise kontrol olarak seçilmiştir. Kremalar 50°C'de 15dk kadar ısıtılmıştır. Kremalara santrifüj uygulandıktan sonra oluşan serbest yağ pipet yardımı ile toplanmış ve tartılmıştır. İki metot (Şekil 2.1) için krema emülsiyonu sonrası yağ verimleri karşılaştırılmıştır.



Şekil 2.1: Ayçiçeği çekirdeklerinden sulu enzimatik ekstraksiyon sonrasında oluşan krema emülsiyonunda demülsifikasyon işlem prosesi.

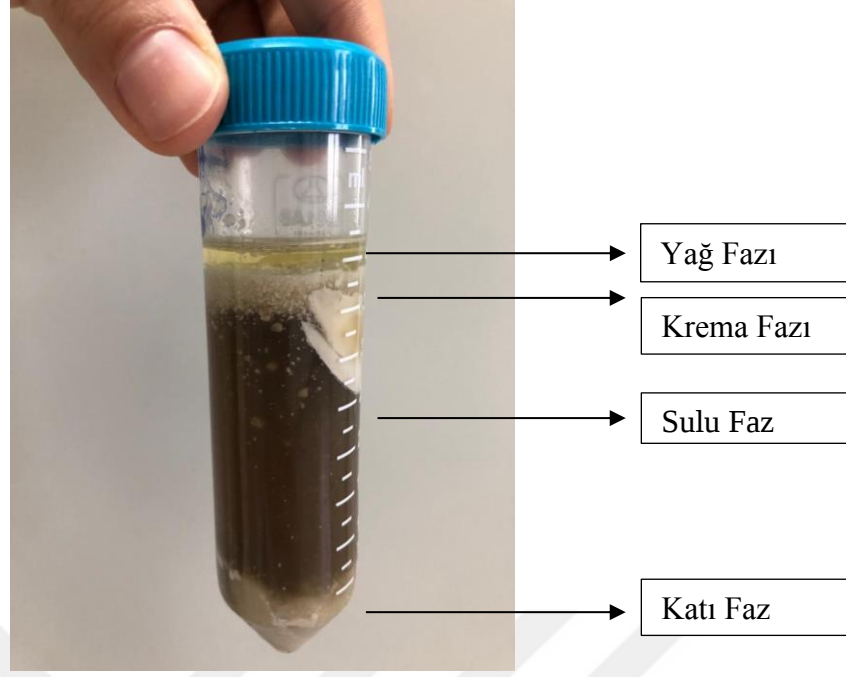
2.2.2.3 Sulu enzimatik ekstraksiyon için kullanılacak sıcaklığın belirlenmesi

Optimizasyon aşaması için gerçekleştirilmesi beklenen sıcaklıklara öncesinden karar verebilmek için 50 ve 60°C’de sulu enzimatik ekstraksiyon denemesi yapılmıştır. Denemeler üçlü tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda yağ verimlerine bakılmıştır ve sulu fazda protein analizi gerçekleştirilmiştir.

2.2.3 Ayçiçeği çekirdeklerinden sulu enzimatik ekstraksiyon ile yağ eldesi

Bu araştırma kapsamında, ayçiçeği çekirdeklerinden sulu enzimatik ekstraksiyon yöntemi ile yağ eldesinde enzim miktarı, süre ve sıcaklığın ekstraksiyon verimine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla kabukları ayrılmış ayçiçeği çekirdeklerinde belirli enzim kombinasyonları kullanılarak SEE (Sulu enzimatik ekstraksiyon) yapılmıştır. Ayçiçeği çekirdekleri 20g kadar tartılmıştır ve 100°C’de 30dk boyunca etüvde ısıtılmıştır. Daha sonra çekirdekler yaklaşık 5sn kadar öğütücüde öğütülmüştür. 50°C’de sabit tutulan sıcaklık için belirtilen SEE koşullarına göre su-substrat oranları her bir deney için farklı olacak şekilde (1:4; 1:7; 1:10) kullanılmıştır. Celluclast® için pH ayarlaması yapılmıştır. (Celluclast® için pH değeri:4,5) pH ayarlaması yapıldıktan sonra öğütülmüş ayçiçeği çekirdekleri ilave edilmiştir ve yaklaşık 5dk kadar bu şekilde sıcaklığın 50°C’ye gelmesi sağlanmıştır. Bu süre sonunda, farklı su-substrat oranları için, farklı enzim substrat oranlarında (200µl, 600µl, 1000µl) Celluclast® enzim ilavesi yapılmıştır. Ekstraksiyon süresi boyunca termometre yardımı ile sıcaklık kontrolü (50°C) yapılmıştır. Daha sonra Alcalase® için tekrar pH ayarlaması yapılmıştır (Alcalase® için pH:8). Alcalase® enzimi ilave edildikten sonra belirtilen sürelerde manyetik karıştırıcıda ekstraksiyona devam edilmiştir. Sulu enzimatik ekstraksiyon sonucunda, enzim inaktivasyonu için 90°C’de yaklaşık 10dk kadar sıcak su içerisinde bekletilmiştir. Akabinde 10000xg’de 15dk santrifüj yapılmıştır (Şekil 2.2). Oluşan yağ fazı pipet yardımı ile toplandıktan sonra yağ verimi (Y-SEE), eşitlik 2.1’e göre hesaplanmıştır.

$$Y - SEE, \% = \frac{SEE \text{ sonrası serbest yağ (g)}}{Ayçiçeklerindeki yağ (g)} \times 100 \quad (2.1)$$



Şekil 2.2 : Santrifüj sonrası ayrılan fazlar.

Enzimatik ekstraksiyon işlemi sırasında enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan hidroliz ürünleri ile sulu ortama geçen yağ molekülleri arasında bir emülsiyon oluşmaktadır. Bunun doğal bir sonucu olarak yağın tamamı yüzeyde toplanamamaktadır. Bu sebeple krema fazında emülsiyon kırma işlemi gerçekleştirilmektedir.

Sulu enzimatik ekstraksiyon sonrası elde edilen krema fazı, enzimatik emülsiyon kırma yöntemi için ayrı bir behere alınarak 50°C'ye ısıtılmıştır. pH ayarlama ile emülsiyon kırma yöntemi uygulanmıştır. Krema fazının pH değeri 2 N HCl kullanılarak 4,5'e getirilmiştir. 50°C'de 1 saat boyunca karıştırılmıştır. İşlem sonrasında pH değeri 2N NaOH kullanılarak 9'a getirilmiştir. 50 °C'de 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra 10000g'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Uygulama süresi sonunda serbest yağ, pipet yardımı ile toplanmıştır. Emülsiyon kırılması sonrası yağ verimi (Y-SEE-E), eşitlik 2.2'ye göre hesaplanmıştır.

$$Y - SEE - E, \% = \frac{SEE \text{ sonrası serbest yağ (g)} + \text{Emülsiyon kırılması sonrası serbest yağ (g)}}{\text{Ayçekirdeklerindeki yağ (g)}} \times 100 \quad (2.2)$$

2.2.4 Ayçiçeği çekirdeklerinden sulu enzimatik ekstraksiyon ile yağ eldesi için Tepki Yüzey Metodolojisi kullanılarak oluşturulan deney tasarımı

Sulu enzimatik ekstraksiyon için kullanılacak olan optimum enzim oranı ve katı sıvı oranının belirlenmesi amacıyla 3 faktör seviyesi ve 4 faktör ile 3n faktöriyel deney tasarımı kullanılmıştır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1: Sulu enzimatik ekstraksiyon için kullanılacak optimum katı sıvı oranı ve enzim konsantrasyonunun belirlenmesi için kullanılacak olan faktöriyel dizayn.

Faktör Seviyesi	Katı Sıvı Oranı (g/g)	Enzim Konsantrasyonu (ml/100g)	Ekstraksiyon Süresi (saat)
-1	1:4	1	0,5
0	1:7	3	1,0
1	1:10	5	1,5

SEE koşulları, enzim/substrat oranı (E-S), su/substrat oranı (S-S) ve reaksiyon süresi (t) olarak belirlenmiştir. Minitab yazılımı ile oluşturulmuş 31 adet örnek deney tasarımının bu aşamada denenmesi amaçlanmıştır. Sulu enzimatik ekstraksiyonun optimizasyonu için oluşturulan deney tasarımı Çizelge 2.2’de gösterilmektedir. Enzimatik reaksiyonlarda koşulların tek tek etkilerinin yanı sıra birlikte değiştirilmeleri sonucunda oluşan sinerjistik etkinin incelenmesi büyük öneme sahiptir. Bu sebeple, bu çalışma için Tepki Yüzey Metodolojisi (Response Surface Methodology, RSM) kullanılmıştır.

Çizelge 2.2: Optimizasyon aşaması örnek deney tasarımı.

Deney No	Enzim:substrat oranı, mL/100 g	Su:substrat oranı, g/g	Celluclast® süre, saat	Alcalase® süre, saat
1	1	7	1	1
2	3	7	1	1
3	1	4	1,5	1,5
4	3	7	1,5	1
5	5	4	0,5	1,5
6	5	10	1,5	0,5
7	5	10	1,5	1,5
8	5	4	1,5	1,5
9	1	10	0,5	1,5
10	3	7	1	1,5
11	3	7	1	1
12	5	4	1,5	1,5
13	5	10	0,5	1,5
14	3	10	1	1
15	5	7	1	1
16	3	7	1	1
17	3	4	1	1

Çizelge 2.2 (devam): Optimizasyon aşaması örnek deney tasarımı.

Deney No	Enzim:substrat oranı, mL/100 g	Su:substrat oranı, g/g	Celluclast® süre, saat	Alcalase® süre, saat
18	1	4	1,5	0,5
19	1	10	1,5	1,5
20	3	7	1	1
21	1	10	0,5	0,5
22	3	7	1	1
23	3	7	1	1
24	1	10	1,5	0,5
25	3	7	0,5	1
26	3	7	1	0,5
27	1	4	0,5	1,5
28	3	7	1	1
29	5	4	0,5	0,5
30	5	10	0,5	0,5
31	1	4	0,5	0,5

Optimum koşullarda elde edilen yağda serbest yağ asitliği, peroksit sayısı AOCS yöntemlerine göre belirlenmiştir. Ayrıca yağın yağ asidi kompozisyonu gaz kromatografisi ile tespit edilmiştir. Bütün analizler, ayçiçeği çekirdeklerinin Soxhlet yöntemiyle ekstraksiyonu sonucu elde edilen yağda da gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar ANOVA ile kıyaslanmıştır.

2.2.4.1 Ayçiçeği yağının serbest yağ asitliği derecesinin belirlenmesi

Başlangıçta 0,01 N Etil Alkollü KOH çözeltisi hazırlanmıştır. Bu aşamadan sonra 1/1 (v/v) oranında Etil alkol-dietileter çözeltisi hazırlanmaya başlanmıştır. Bunun için de 25 ml dietileter 25 ml etil alkol ile karıştırılmış ve bu şekilde çözücü karışımı tamamlanmıştır. Nötralizasyon işlemi için 0,01 N etil alkollü KOH ile çözücü karışımı titre edilmiştir. Böylece nötralizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu aşamadan sonra yağ örneği erlen içine tartılmıştır. Kaç gram tartılacağı beklenen yağ asitliğine göre hesaplanmıştır (Ayçiçeği yağı için beklenen asitlik %1,8'dir). Yağ örneğinden 1 gram tartılmıştır. Nötralize olan çözelti ile numune karıştırılmıştır ve birkaç damla fenolftaleyn indikatörü ilave edilmiştir. 0,01 N Etil alkollü KOH ile titre edilmiştir ve sarfiyat kaydedilmiştir. Serbest yağ asidi tayini 2.3'teki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Serbest yağ asidi, (\%)} = \frac{V \times c \times MA}{10 \times m} \quad (2.3)$$

V = Harcanan etanollü potasyum hidroksit çözeltisi hacmi (mL)

c = Ayarlı etanollü potasyum hidroksit çözeltisinin derişimi (M)

MA = Oleik asidin molekül ağırlığı (=282)

m = Numune miktarı (g)

2.2.4.2 Ayçiçeği yağının peroksit sayısının belirlenmesi

Optimum koşullarda SEE ile elde edilen ayçiçeği yağındaki peroksit değerinin belirlenmesinde IDF (74A:1991) metodu kullanılmıştır. Başlangıç aşamasında FeCl₂ çözeltisi hazırlamak için 0,2 g baryum klorür dihidrat 25 ml saf suda çözdürülmüştür, daha sonra bu çözelti yavaş bir şekilde ve karıştırma eşliğinde 0,25 g FeSO₄.7H₂O ve 25 ml su ile hazırlanan demir (II) sülfat çözeltisine eklenmiştir. Bu işlemin devamında, bu çözeltiye 1ml 10 N HCl eklenmesi sonucu çöken baryum sülfat filtre kağıdıyla 3 kez süzölmüştür, böylece berrak bir demir (II) çözeltisi elde edilmiştir. Elde edilen bu demir (II) çözeltisi amber şişe ve karanlık bir ortamda muhafaza edilmiştir. Diğer taraftan analizde kullanılan başka bir çözelti olan amonyum tiosiyanat çözeltisini hazırlamak için 1,5 g amonyum tiosiyanat saf suda çözdürülmüştür ve hacmi 5 mililitreye tamamlanmıştır. Ayçiçeği yağının peroksit değerini belirlemek için cam bir tüpe 0.3 g ayçiçeği yağı tartılmıştır, üzerine 9,7 ml kloroform:metanol (7:3, v/v) çözeltisi eklendikten sonra 2-4 saniye vorteksle karıştırılmıştır. Daha sonra bu çözeltiye 50 µl amonyum tiosiyanat çözeltisi eklenerek tekrar 2-4 saniye vortekste karıştırıldıktan sonra üzerine 50 µl demir (II) çözeltisi eklenerek bir kez daha vortekste 2-4 saniye karıştırma işlemi yapılmıştır. Son olarak, bu karışım 5 dakika boyunca karanlıkta bekletilmiştir ve 500 nm dalga boyunda yağ hariç bütün kimyasalları içeren kör çözeltiye karşı spektrofotometrede (Thermo Evolution 220, Almanya) analiz edilmiştir ve absorbans değerleri belirlenmiştir. Bütün deneyler üçlü tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir. Peroksit sayısının hesaplanmasında eşitlik 2.4'ten yararlanılmıştır.

$$\text{Peroksit Sayısı} = (A_s - A_b) \times m \times 55,84 \times m_0 \times 2 \quad (2.4)$$

A_s: Yağ örneğinin absorbans değeri

A_b: Kör çözeltinin absorbans değeri

m: Kalibrasyon eğrisinin eğimi (Bu IDF metoduna göre 41,52 olarak belirlenmiştir.)

55,84: Demir elementinin molekül ağırlığı (g/mol)

m₀: Yağ örneğinin miktarı (g)

2.2.4.3 Ayçiçeği yağının yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi

Ayçiçeği çekirdeklerinden Soxhlet yöntemi ile ekstrakte edilmiş ayçiçeği yağları ile sulu enzimatik ekstraksiyon yöntemi ile edilen ayçiçeği yağlarının yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi gaz kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her iki yöntemle elde edilen yağlar önce BF₃/Metanol esterifikasyon prosedürüne göre işleme tabi tutulmuş, yağ asitlerinin metil esterlerine dönüşümü sağlanmıştır. Gaz kromatografisinde okunmak üzere yağ örnekleri cihaza verilmiştir. 1µl hacmindeki numune injeksiyon iğnesi ayırma oranı 1:50 olan ayırma modunda injeksiyon sağlanmıştır. Kromatogramlardaki piklerin belirlenmesi için standart yağ asitlerinin metil esterlerinin aynı şartlarda gerçekleştirilen kromatogramları kullanılmıştır. Çizelge 2.3'te kromatografik analiz şartları gösterilmiştir.

Çizelge 2.3: Gaz kromatografisi analiz şartları.

Dedektör tipi	FID*
Dedektör sıcaklığı, °C	280
İnjeskiyon sıcaklığı, °C	250
İnjeskiyon hacmi, µl	1
Akış hızı, mL/dak	40
Dağıtma oranı	1/50
Kolon tipi	Kapılar kolon**

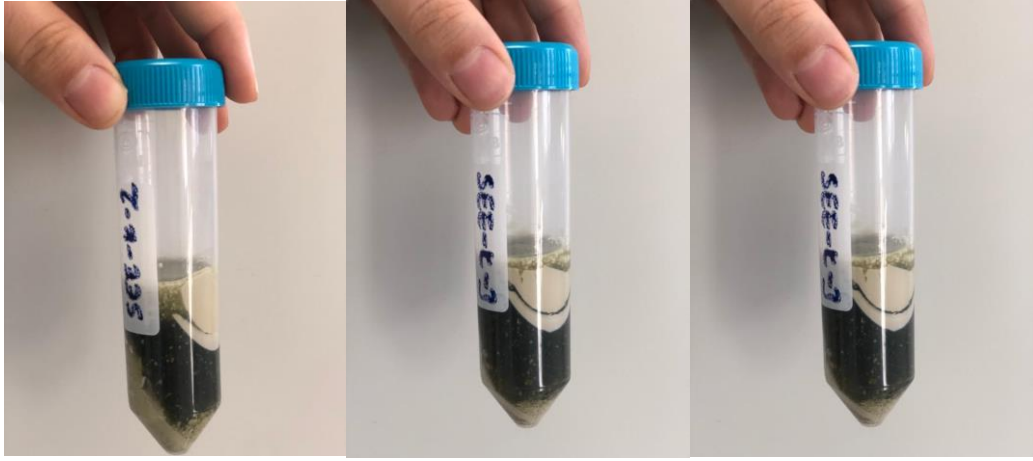
* Alev iyonizasyonu dedektörü

** 30 m x 0,25 mm, 0,25mm; Agilent

2.2.4.4 Optimum koşullarda enzim kullanılmadan gerçekleştirilen sulu enzimatik ekstraksiyon

Kabukları ayrılmış ayçiçeği çekirdeklerinde enzim ilavesiz sulu enzimatik ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Ayçiçeği çekirdekleri 20g kadar tartılmıştır ve 100°C'de 30dk boyunca etüvde ısıtılmıştır. Daha sonra çekirdekler yaklaşık 5sn kadar öğütücüde öğütülmüştür. 1:5 oranında olacak şekilde hazırlanan ve sıcaklığı 50°C'de

sabit tutulan saf suda, normal şartlarda Celluclast® için yapılan pH ayarlaması yapılmıştır (Celluclast® için pH değeri:4,5) fakat Celluclast® enzimi ilave edilmemiştir. pH ayarlaması yapıldıktan sonra öğütülmüş ayçiçeği çekirdekleri ilave edilmiştir. Ekstraksiyon süresi 1,5 saat olarak gerçekleştirilmiş ve bu süre boyunca termometre yardımı ile sıcaklık kontrolü (50°C) yapılmıştır. Daha sonra normal şartlarda Alcalase® için tekrar pH ayarlaması yapılmıştır (Alcalase® için pH:8) ve ilk aşamada olduğu gibi Alcalase® enzim ilavesi yapılmamıştır. Ekstraksiyon, 1 saat 8 dk sıcaklığı 50°C’de sabit tutularak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sonucunda 10000xg’de 15dk santrifüj yapılmıştır (Şekil 2.3). Celluclast® -Alcalase® enzimi kullanılmadan gerçekleştirilen SEE’nin üçlü tekrarı yapılmıştır.



Şekil 2.3: Optimum koşullarda enzim kullanılmadan gerçekleştirilen sulu enzimatik ekstraksiyon sonrası santrifüj uygulaması sonrası faz ayrımı.

2.2.5 Protein izolatu eldesi

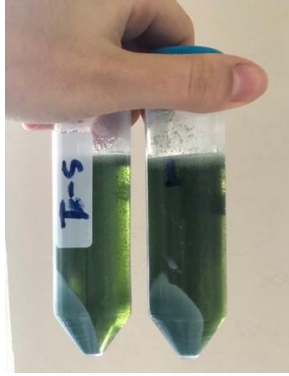
2.2.5.1 Alkali ekstraksiyon-izoelektrik çöktürme ile protein izolatu eldesi

Ayçekirdeği tohumlarında optimum şartlarda gerçekleştirilen SEE sonrası sulu faz toplanmıştır. SEE sonrası elde edilen sulu fazın pH değeri, öncelikle proteinlerin alkali ortamda ekstrakte edilmesi için 2 N NaOH ile 9’a getirilmiş ve 1 saat karıştırılmıştır. Daha sonra 10,000 g’de 20 dakika santrifüjlenen karışımın sulu üst fazı alındıktan sonra çöktürme aynı işlem tekrarlanmıştır. Geride kalan çözünmeyen katılar, kayıp protein miktarının tespiti için Kjeldahl yöntemiyle analiz edilmek üzere saklanmıştır. Diğer yandan sulu üst faz, bu kez izoelektrik noktada proteinlerin çöktürülmesi amacıyla 2 N HCl ile pH 4,5 değerine getirilmiştir ve 30 dakika karıştırma sonrası 10,000 g’de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen çöktürmelerde dondurarak kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir.

a)



b)



c)



d)



Şekil 2.4: a) SEE sonrası sulu fazın alkali ortamda çöktürülmesi için ortam pH'sının 9'a ayarlanması ve manyetik karıştırıcıda karıştırılması b) Santrifüj sonrası faz ayrımı c) Santrifüj sonrası sulu fazda izoelektrik çöktürme için ortam pH'sının 4,5'a ayarlanması ve manyetik karıştırıcıda karıştırılması d) Çöken proteinin liyofilizatör kullanılarak kurutulmuş hali.

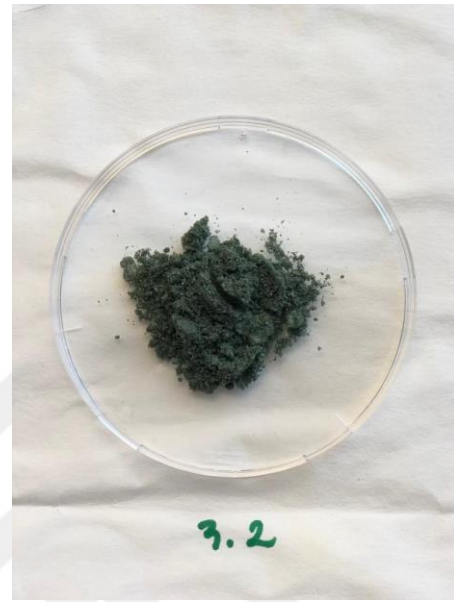
2.2.5.2 Klorojenik asit uzaklaştırma sonrası protein izolatı eldesi

Klorojenik asidin alkali koşullarda oksidasyonu sonrasında proteinlerle interaksyonu sonucu yeşil pigment oluşumunu önlemek amacıyla, SEE sonrası elde edilen sulu faz, protein izolatı eldesinden önce asidik yıkamaya tabii tutulmuştur. SEE sonrası elde edilen sulu faz toplandıktan sonra 3M'lık HCl kullanılarak ortam pH'sı 5'e getirilmiştir ve 30 dakikalık bir karıştırma işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra 10,000 g'de 20 dakika santrifüjlenen karışımdan elde edilen çökelti alınarak aynı işlem tekrar edilmiştir. Bu süreçte ortam pH'sı ara ara kontrol edilerek 5'te sabit tutulmaya çalışılmıştır. Daha sonra 10000xg'de 20 dakika santrifüjlenen karışımdan elde edilen

çökelti alınarak aynı işlem tekrar edilmiştir. Santrifüj sonrası geride kalan çökelti, 1:10 (w/v) oranında suda dağıtıldıktan sonra bir önceki bölümde anlatıldığı şekilde protein izolatu elde edilmiştir.

a)

b)



Şekil 2.5: a) Alkali ekstraksiyon-izoelektrik çöktürme ile elde edilen protein izolatu
b) Klorojenik asit uzaklaştırma işlemi sonrası elde edilen protein izolatu.

Optimum koşullarda elde edilen protein izolatlarında, protein izolatlarının saflığını tespit etmek için Kjeldahl analizi gerçekleştirilmiştir. Klorojenik asit uzaklaştırma işleminin etkisi, her iki izolatın renklerinin kolorimetre (Minolta Chroma Meter 400) ile ölçülmesi sonucu tespit edilmiştir. Protein izolatlarındaki klorojenik asit miktarları, HPLC (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya) ile tespit edilmiştir.

Ayçiçeği protein izolatlarının renk ölçümü

Ayçiçeği protein izolatlarının rengi bir kolorimetre (Minolta Chroma Meter 400) yardımıyla ölçülmüştür. Renk parametrelerini ölçmek için, protein izolatları beyaz bir plaka yüzeyine homojen bir şekilde dağıtılmıştır.

Ayçiçeği protein izolatlarında klorojenik asidin tespiti

Liyofilizatör sonrası elde edilen donmuş-kuru örnekten yaklaşık olarak 0,2 g kadar örnek tartımı gerçekleştirilmiştir. Üzerine otomatik pipet yardımı ile 1,2 ml %75'lik MeOH ilave edilmiştir. 15 dakika su banyosunda bekletildikten sonra 2500 rpm'de 10

dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj sonrası üst faz toplanmıştır. Geride kalan çökeltiye ise 0,8 ml %75'lik MeOH ilave edilmiştir ve aynı işlem (su banyosu ve santrifüj) tekrar edilmiştir. Toplanan üst fazlar filtreden geçirilerek viallere HPLC'de okunmak üzere aktarılmıştır.

2.3 İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada elde edilen verileri ifade etmek için üçlü tekrarların ortalama±standart sapması (n=3) kullanılmıştır. İstatistiksel analiz için Minitab programı kullanılmıştır ve ANOVA ve iki örnek t testleri %95 güven aralığında tespit edilmiştir.



3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Ayçiçeği Çekirdeklerinin Karakterizasyonu

Ayçiçek tohumlarının nem içeriği, kül, yağ ve protein miktarları Çizelge 3.1’de gösterilmiştir. Liretatürde ayçiçeği tohumlarının %5,5 nem, %3,49 kül, %18,72 protein, %37,47 yağ ve %28,30 lif içerdiği bildirilmiştir (Anjum ve ark., 2012). Kabuğu alınmış ayçiçeği tohumlarının %20-40 ham protein içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir (González-Pérez ve Vereijken, 2007). Elde edilen değerler literatürdeki değerlerle benzerlik göstermektedir.

Çizelge 3.1: Ayçiçeği tohumlarının kompozisyonu.

Kompozisyon	% (w/w)
Nem	4,01±0,1234
Kül	2,63±0,0274
Yağ	67,63±8,2804
Protein	18,63±4,4600

Ayçiçek tohumlarının içerdiği yağ miktarı, nem gibi özellikler ayçiçek tohumunun cinsi, iklim ve çevresel faktörler, tohumların hasat edildiği zaman, ekstraksiyon yöntemi ve koşulları gibi parametrelere göre değişiklik gösterebilmektedir.

3.2 Ayçiçeği Çekirdeklerinde Gerçekleştirilen Sulu Enzimatik Ekstraksiyon için Kullanılacak Enzimlerin Belirlenmesi

Şekil 3.1’de görüldüğü gibi Viscozyme® L, Celluclast® ve Pectinex® enzimleri ile gerçekleştirilen sulu enzimatik ekstraksiyonda yağ fazı ayrımı gözlemlenmemiştir. Bu sebeple, bu enzimler ile yapılan sulu enzimatik ekstraksiyon ile yağ eldesinde enzimlerin tek başına yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 3.1: Viscozyme® L (V), Celluclast® (C) ve Pectinex® (P) ile yapılan sulu enzimatik ekstraksiyon.

Ancak Alcalase® enzimi ile gerçekleştirilen sulu enzimatik ekstraksiyon ile yağ fazı ayrımı gözlemlenmiştir. Bu aşamada Alcalase® enzimi için aynı koşullarda sulu enzimatik ekstraksiyon denemesi yapılmıştır. Alcalase® ile gerçekleştirilen SEE denemesi sonuçları incelendiğinde, daha yüksek yağ verimi için enzim kombinasyonu denemesinin yapılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla ayçiçeği tohumlarında SEE için Celluclast® -Alcalase® enzim kombinasyonunun denenmesine karar verilmiştir ve iki denemenin sonuçları (Çizelge 3.2) karşılaştırılmıştır.

Çizelge 3.2: Alcalase® ve Celluclast® -Alcalase® enzim kombinasyonu ile gerçekleştirilen SEE sonrası serbest yağ miktarı ve yağ verimi.

Enzim	SEE sonrası serbest yağ miktarı (g)	Yağ verimi (%)
Alcalase®	1,47±0,955	12,25±7,960 ^a
Celluclast® -Alcalase®	2,49±0,3	20,75±2,5 ^a

*1:6 katı sıvı oranı ve 45°C sıcaklıkta 2 saat süre ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir.

Sadece Alcalase® enzimi ve Alcalase®-Celluclast® enzim kombinasyonu kullanılarak gerçekleştirilen sulu enzimatik ekstraksiyon sonucunda elde edilen yağ verimleri karşılaştırıldığında, iki deneme arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0,05$). Fakat Celluclast®-Alcalase® enzim kombinasyonu kullanılarak gerçekleştirilen sulu enzimatik ekstraksiyon sonucunda daha yüksek yağ verimi (%20,75) elde edilmiştir. Ekstraksiyonun gerçekleştirileceği hammaddeye göre değişmekle birlikte, enzimatik reaksiyonlarda en sıklıkla kullanılan enzimler glikosidazlardır. Glikosidazların etkisinin özellikle hücre duvarı üzerine

olduğu bildirilmiştir. Bitki hücre duvarı pektinin yanı sıra selüloz, hemiselüloz ve ligninen oluşmaktadır ve selüloz, pektinaz gibi birçok hidrolitik enzimin kullanılmasının amacı kotiledon hücre duvarının yapısını kırmaktır. Böylece çözünür bileşenler çözücü içerisinde kalırken, salınan yağ ayrı bir faz oluşturmaktadır (Rosenthal ve ark., 1996). Literatürde pekan cevizinden yağ eldesinde, Alcalase® ve Celluclast® ticari enzim kombinasyonu kullanılarak sulu enzimatik ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir ve yağ veriminin %26,8 olduğu bildirilmiştir (Polmann ve ark., 2019).

3.3 Ayçiçeği Çekirdeklerinde Gerçekleştirilen Sulu Enzimatik Ekstraksiyon için Sıcaklıkların Belirlenmesi

Sıcaklık enzimatik ekstraksiyon için önemli ve kritik bir parametredir. Enzimatik ekstraksiyonun gerçekleştirileceği optimum sıcaklık, enzim ve yağlı tohum cinsine göre değişim gösterebilmektedir. Bu amaçla, ekstraksiyon sıcaklığı belirlenirken yağ veriminin yanı sıra yağ ve proteinin kalite özellikleri de dikkate alınmalıdır. Enzimatik ekstraksiyon için yüksek sıcaklıkların seçilmesi enzim inaktivasyonuna sebep olurken aynı zamanda yağın kararmasına ve proteinlerin inaktivasyonuna da sebep olmaktadır. Ayçiçeği tohumlarında gerçekleştirilmesi amaçlanan sulu enzimatik ekstraksiyon için sıcaklıklara önceden karar verebilmek için 50° ve 60°'de ekstraksiyon denemesi (Çizelge 3.3) yapılmıştır. Sulu enzimatik ekstraksiyon sonrasında yağ verimleri incelendiğinde, bu iki sıcaklık arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0,05$).

Çizelge 3.3: 50° ve 60°'de gerçekleştirilen sulu enzimatik ekstraksiyon sonucunda elde edilen protein ve yağ verimi.

Sıcaklık (°C)	SEE sonrası serbest yağ miktarı (g)	Yağ verimi (%)	Protein (%)
50	2,57±0,353	24,75±2,944 ^a	1,75±0,104 ^a
60	2,91±0,835	24,22±6,961 ^a	1,725±0,387 ^a

*1:6 katı sıvı oranı ve Celluclast® -Alcalase® enzim kombinasyonu kullanılarak 2 saat sürede sulu enzimatik ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

*Sonuçlar ortalama ± standart sapma (n=3) olarak ifade edilmiştir.

Sıcaklık söz konusu olduğunda, genellikle enzimatik ekstraksiyon için optimum sıcaklık 40-50°C arasında değişmektedir ve yeterli aktivite sağlayan mümkün en düşük

sıcaklık kullanılmaktadır (Rui ve ark., 2009). Literatürde yapılan bir çalışmada, Viscozyme® L kullanılarak ayçiçeği tohumlarında gerçekleştirilen sulu enzimatik ekstraksiyon için ekstraksiyon sıcaklığı 50°C olarak belirlenmiştir (Danso-Boateng E, 2011). Literatürdeki başka bir çalışmada ayçiçeği çekirdeğinde Alcalase® , Celluclast® ve Pectinex® enzimleri kullanılarak sulu enzimatik ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir ve ekstraksiyon sıcaklığı 50°C olarak belirlenmiştir. Ekstraksiyon sonucunda elde edilen yağ verimi %36 olarak hesaplanmıştır (Ribeiro ve ark., 2016). Sineiro ve ark., (1998) ayçiçeği çekirdeklerinde Celluclast® enzimi kullanarak sulu enzimatik ekstraksiyon ile ayçiçeği yağı elde etmiştir ve yağ veriminin %30'dan fazla olduğu bildirilmiştir. (Sineiro ve ark., 1998). Çalışma için belirlenen ekstraksiyon sıcaklıkları literatürdeki çalışmalarla paraleldir. Sıcaklık artışına bağlı olarak yağın kalite özelliklerinin etkilenmesi göz önüne alındığında, sulu enzimatik ekstraksiyonun 50°C'de yapılmasına karar verilmiştir.

3.4 Ayçiçeği Çekirdeklerinde Gerçekleştirilen Sulu Enzimatik Ekstraksiyon Sonucu Oluşan Kremada Demülsifikasyon İşleminin Belirlenmesi

Ayçiçeği tohumlarından sulu enzimatik ekstraksiyon ile yağ eldesi sonucunda oluşan krema fazında krema emülsiyonu kırma işlemi için kullanılacak yöntemin belirmesi için bir deneme yapılmıştır. Bu amaçla, krema emülsiyonu kırma işleminin pH ayarlaması ile veya enzim ilavesi ile yapılıp yapılmayacağına karar verebilmek için gerçekleştirilen denemede (Çizelge 3.4) enzim ilavesi ile emülsiyon kırma işleminin yağ verimi üzerinde istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 3.4: pH ayarlaması veya enzim ilavesi ile gerçekleştirilen emülsiyon kırma işlemi sonucu yağ verimi.

	SEE sonrası yağ miktarı (g)	Krema emülsiyonu sonrası yağ miktarı (g)	Yağ verimi (%)
pH ayarlaması ile	2,15±0,342	0,35±0,107	20,83±2,318 ^a
Enzim ilavesi ile	2,57±0,298	0,57±0,294	26,167±1,967 ^b

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma (n=3) olarak ifade edilmiştir.

* Farklı küçük hafler aynı numune grubunun farklı emülsiyon kırma işlemi yöntemleri sonrası yağ verimleri arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

Sulu enzimatik ekstraksiyon yönteminin en önemli dezavantajlarından biri yağ veriminin geleneksel çözücü ekstraksiyonuna göre daha düşük olmasıdır. Bu amaçla sulu enzimatik ekstraksiyon sonrasında oluşan krema fazında, krema emülsiyonu kırma işlemi gerçekleştirilerek yağ veriminin artması beklenmektedir. Literatürde yer fıstığında gerçekleştirilen sulu enzimatik ekstraksiyon sonrası yağ verimini arttırmak için krema fazında enzim ilavesi ve pH ayarlaması yapılarak krema emülsiyonu kırma işlemi gerçekleştirilmiştir. pH 3-9 aralıklarında ayarlanarak yağ verimleri karşılaştırılmıştır. En yüksek yağ veriminin pH 4,5'te olduğu gözlemlenmiştir. Çünkü bu değerin yer fıstığı proteinlerinin izoelektrik noktasına yakın olması, yağ damlacıklarını saran protein katmanlarını kırarak yağın serbest kalmasına sebep olmuştur. Bununla birlikte, pH arttıkça yağ veriminde azalma olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak pH ayarlamasının enzim ilave etmeden krema emülsiyonunun stabilitesini açık bir şekilde etkilediği sonucuna varılmıştır (Li ve ark., 2016). Literatürde soya fasülyesinden yağ eldesi için sulu enzimatik ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Krema emülsiyonu kırma işlemi, çift aşamalı enzim uygulaması (Protex 6L) ve pH ayarlaması (4,5) ile gerçekleştirilmiştir ve iki yöntem için yağ verimleri kıyaslanmıştır. Çift aşamalı enzim uygulanarak gerçekleştirilen krema emülsiyonu kırma işlemi ile elde edilen yağ veriminin %95 ve pH ayarlaması ile elde edilen yağ veriminin %83 olduğu gözlemlenmiştir (Chabrand ve Glatz, 2009b). Wu ve ark., soya fasülyesinde sulu enzimatik ekstraksiyon gerçekleştirmiş ve emülsiyon kırma işlemi için enzim ilavesinin yanı sıra pH ayarlamasının etkisi de incelenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, pH'ı 4,5 ve 4'e ayarlamanın krema emülsiyonunu tamamen kararsız hale getirdiği ve serbest yağ verimini %100'e çıkardığı gözlemlenmiştir (Wu ve ark., 2009b). Literatürde yapılan çalışmalar, krema emülsiyonu kırma işlemi için pH ayarlamasını desteklemektedir ve enzim kullanılarak gerçekleştirilen krema emülsiyonu kırma işleminin zaman alıcı olması nedeniyle, krema emülsiyonu kırma işleminin pH ayarlaması yapılarak gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

3.5 Ayçiçeği Çekirdeklerinden Sulu Enzimatik Ekstraksiyon ile Yağ Eldesindeki Parametrelerin Optimizasyonu

Yüzey Tepki Metodolojisi ile oluşturulan örnek deney tasarımıdaki parametreler dikkate alınarak ayçiçeği çekirdeklerinde sulu enzimatik ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.5). Sonuçlar incelendiğinde, yağ verimi %31,17-46,83 ve protein değerleri %1,18-3,71 arasında olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.5: Optimizasyon aşaması için gerçekleştirilmesi beklenen optimum şartlarda ayçiçeği tohumlarından sulu enzimatik ekstraksiyon ile elde edilen yağ verimi ve protein değerleri (%).

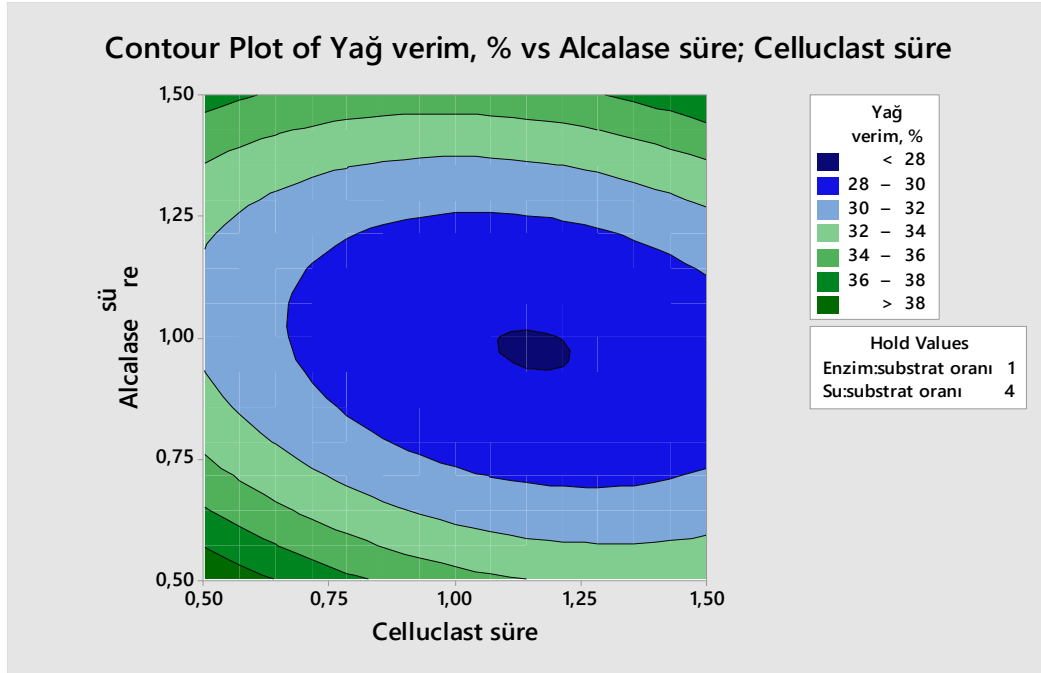
Enzim:substrat oranı, mL/100 g	Su:substrat oranı, g/g	Celluclast® süre, saat	Alcalase® süre, saat	Yağ verimi, %	Sulu Fazda Protein, %
1	10	0,5	0,5	34,08	1,33
1	10	1,5	1,5	33,50	1,41
3	7	1,5	1	44,67	2,36
3	7	1	1	39,67	2,03
3	7	1	1	36,33	1,84
1	4	0,5	1,5	35,58	3,32
3	7	1	0,5	46,83	1,95
5	4	1,5	0,5	39,08	3,64
3	7	1	1	36,50	1,28
1	4	1,5	0,5	34,75	3,21
3	7	1	1	39,17	1,54
5	10	1,5	1,5	41,58	1,53
5	4	0,5	0,5	44,58	3,71
1	7	1	1	31,17	2,03
1	10	0,5	1,5	34,08	1,18
5	7	1	1	39,33	2,04
5	4	0,5	1,5	46,58	3,69
5	10	0,5	0,5	44,42	1,62
5	10	1,5	0,5	34,42	1,43
1	4	1,5	1,5	37,33	3,40
5	4	1,5	1,5	37,25	3,56
3	7	0,5	1	37,75	2,01
3	4	1	1	36,50	2,40
3	10	1	1	29,33	1,82
3	7	1	1	37,33	1,65
5	10	0,5	1,5	35,83	1,18
1	10	1,5	0,5	24,92	1,29
1	4	0,5	0,5	39,92	3,66
3	7	1	1,5	44,50	2,18
3	7	1	1	37,83	2,02
3	7	1	1	38,50	2,11

En yüksek yağ verimi, enzim/substrat oranı 3mL/100g, su/substrat 7g/g, Celluclast® süre 1 ve Alcalase® süre 0,5 saat olduğu koşulda %46,83 olarak tespit edilirken en düşük yağ verimi ise enzim/substrat oranı 1mL/100g, su/substrat oranı 7g/g, Celluclast® süre 1 ve Alcalase® süre 1saat iken %31,17 olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte ayçiçeği çekirdeği protein içeriğinin en yüksek olduğu koşullar enzim/substrat oranı 5mL/100g, su/substrat oranı 4g/g, Celluclast® süre ve Alcalase® sürenin 0,5 saat olduğu durumda %3,71 olarak tespit edilmiştir. En düşük protein içeriği ise enzim/substrat oranı 1mL/100g, su/substrat oranı 10g/g, Celluclast® süre 0,5 ve Alcalase® sürenin 1,5 saat olduğu koşullarda %1,18 olarak bulunmuştur. Ayçiçeği çekirdeklerinde gerçekleştirilen sulu enzimatik ekstraksiyon sonucunda elde edilen yağ verimi modelinin yeterliliğinin ve uygunluğunun saptanması için varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır ve elde edilen değerler Çizelge 3.6’da özetlenmiştir. Ayçiçeği çekirdeklerinin yağ ekstraksiyonunun varyans analizi sonuçları incelendiğinde modelin *p* değerinin 0,05’ten küçük olması modelin anlamlı olduğunu göstermiştir.

Çizelge 3.6: Ayçiçeği çekirdeklerinden sulu enzimatik ekstraksiyon ile elde edilen yağ verimi için ANOVA çizelgesi.

Kaynak	P-değeri
Model	0,003
Linear	0,001
E/S	0,000
S/S	0,009
Celluclast® süre	0,072
Alcalase® süre	0,808
Square	0,006
E/S*E/S	0,069
S/S*E/S	0,006
Celluclast® süre*Celluclast® süre	0,268
Alcalase® süre*Alcalase® süre	0,003
İnteraksiyon	0,390
E/S*S/S	0,443
E/S*Celluclast® süre	0,640
E/S*Alcalase® süre	0,524
S/S*Celluclast® süre	0,736
S/S*Alcalase® süre	0,490
Celluclast® süre*Alcalase® süre	0,042
Uyum eksikliği	0,008
Saf hata	
Toplam	
R ² =0,79	

Aynı zamanda regresyon katsayısının ($R^2=0,79$) 1'e yakın olduğu dolayısıyla gözlemlenen ve tahmin edilen değerler arasındaki ilişkinin yüksek olduğu görülmektedir. %95 anlamlılık düzeyinde en önemli doğrusal etkinin enzim/substrat oranı olduğu, ardından katı sıvı oranı gelirken, Celluclast® süre ve Alcalase® sürenin yağ verimi üzerinde istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0,05$). Ekstraksiyon parametreleri arasındaki etkileşimler için modelin yalnızca Celluclast® süre ve Alcalase® süre için anlamlı olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,05$).



Şekil 3.2: Bağımsız değişkenler arasındaki ikili etkileşimlerin serbest yağ verimi üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzeyinin kontur grafiği.

Sulu enzimatik ekstraksiyon ile elde edilen en yüksek yağ verimi ve protein içeriği için enzim konsantrasyonu, katı sıvı oranı, Alcalase® süre ve Celluclast® süre gibi faktörlerin etkileşimlerinin yanıt entegrasyonu üzerindeki etkisi kontur grafikleri ile gösterilmektedir. Diğer bağımsız değişkenler sabit tutulurken Alcalase® süre ve Celluclast® sürenin yağ verimi üzerindeki birleşik etkisi gösteren kontur grafiği Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Şekil 3.2’de görüldüğü gibi Celluclast® süre ve Alcalase®

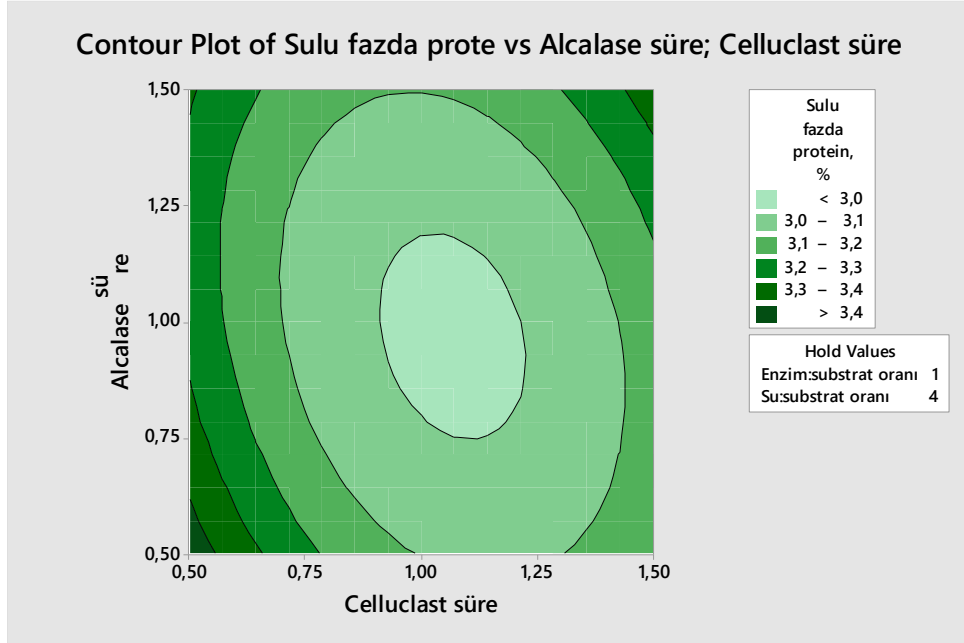
sürenin azalmasıyla birlikte yağ veriminin maksimum değere ulaştığı gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.7: Ayçiçeği çekirdeklerinden sulu enzimatik ekstraksiyon ile elde edilen protein için ANOVA çizelgesi.

Kaynak	P-değeri
Model	0,000
Linear	0,000
E/S	0,310
S/S	0,000
Celluclast® süre	0,929
Alcalase® süre	0,800
Square	0,013
E/S*E/S	0,690
S/S*E/S	0,470
Celluclast® süre*Celluclast® süre	0,301
Alcalase® süre*Alcalase® süre	0,598
İnteraksiyon	0,959
E/S*S/S	0,750
E/S*Celluclast® süre	0,926
E/S*Alcalase® süre	0,853
S/S*Celluclast® süre	0,519
S/S*Alcalase® süre	0,927
Celluclast® süre*Alcalase® süre	0,381
Uyum eksikliği	0,321
Saf hata	
Toplam	
R ² =0,91	

Ayçiçeği çekirdeklerinde gerçekleştirilen sulu enzimatik ekstraksiyon sonucunda elde edilen protein için modelinin yeterliliğinin ve uygunluğunun saptanması amacıyla varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır ve elde edilen değerler Çizelge 3.7’de özetlenmiştir. Ayçiçeği çekirdeklerinden elde edilen protein için gerçekleştirilen varyans analizi sonuçları incelendiğinde modelin *p* değerinin 0,05’ten küçük olması modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda regresyon katsayısının ($R^2=0,91$) 1’e yakın olduğu dolayısıyla gözlemlenen ve tahmin edilen değerler arasındaki ilişkinin yüksek olduğu görülmektedir. Ayçiçeği protein izolatlarında, %95 anlamlılık düzeyinde sadece katı sıvı oranın ayçiçeği proteinleri üzerinde

istatistiksel olarak önemli bir etkisi olduğu gözlemlenmiştir ($p>0,05$). Bununla birlikte etkileşimlerin hiçbirinin istatistiksel olarak önemli bir etkisi olmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 3.3: Bağımsız değişkenler arasındaki ikili etkileşimlerin protein içeriği üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzeyinin kontur grafiği.

Diğer bağımsız değişkenler sabit tutulurken Alcalase® süre ve Celluclast® sürenin protein üzerindeki birleşik etkisi gösteren kontur grafiği Şekil 3.3’de gösterilmiştir. Şekil 3.3’de görüldüğü gibi Celluclast® süre ve Alcalase® sürenin azalmasıyla birlikte protein içeriğinin maksimum değere ulaştığı gözlemlenmiştir. Alcalase® süre ve Celluclast® süre 0,5 saat olduğu koşullarda en yüksek protein içeriğinin (>%3,4) elde edilmesi beklenmektedir. Validasyon aşaması için yüzey tepki metodolojisi ile belirlenen optimum koşullardan 3 tanesi seçilerek bu koşullarda sulu enzimatik ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.8’de model tarafından tahmin edilen ve deneysel olarak gözlemlenen değerler sunulmuştur.

Çizelge 3.8: Optimum koşulların validasyonu.

Örnek	Enzim:substrat oranı, mL/100 g	Su:substrat oranı, g/g	Alcalase® süre	Celluclast® süre	Tahmin edilen yağ verimi (%)	Ölçülen yağ verimi (%)	Tahmin edilen protein (%)	Ölçülen protein (%)
Optimum 1	3	7	1,5	1	44,67	29,52	2,36	2,23
Optimum 2	5	4	0,5	1,5	46,58	27,1	3,69	3,53
Optimum 3	5	4	1,5	1,5	37,25	33,44	3,56	3,82

Validasyon denemeleri sırasında ayçiçeği çekirdeği değiştirilmek durumunda kalınmıştır. Yeniden temin edilen ayçiçeği çekirdeğinin yağ içeriği (%42), daha öncesinde kullanılan ayçiçeği çekirdeğinin yağ içeriği (%67,63) değerinden daha düşük olduğu Soxhlet ile tespit edilmiştir. Bu sebeple validasyon denemeleri sırasında sulu enzimatik ekstraksiyon ile elde edilen yağ verimleri Çizelge 3.8’de de görüldüğü gibi tahmin edilen değerlere yakın çıkmamıştır. Model tarafından tahminlenen ve ölçülen değerler arasındaki farklılığın numunenin değişmesi sebebi ile olduğu açıkça görülmektedir. Fakat modelin R^2 değerinin 1’e yakın olması modelin tahmin ediciliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Ayçiçeği çekirdeklerinden sulu enzimatik ekstraksiyon ile elde edilen yağ verimi ve protein içeriğinin yüksek olması için gerçekleştirilen optimizasyon denemesi sonucunda, program tarafından önerilen parametrelerde optimum ekstraksiyon koşulu enzim konsantrasyonu 5mL/100g, su/substrat oranı 4g/g, Alcalase® süre 1,5 ve Celluclast® süre 1,5 saat olarak seçilmiştir. Optimum koşullar altında gerçekleştirilen sulu enzimatik ekstraksiyon sonucunda elde edilen yağ verimi %33,44 ve protein içeriği ise %3,82 olarak tespit edilmiştir. Literatür çalışmaları incelendiğinde Moradi ve Rahimi (2019), ayçiçeği çekirdeklerinde 1:6 katı sıvı oranı ve %2 enzim oranı kullanarak sulu enzimatik ekstraksiyon ile yağ elde etmiştir. Sulu enzimatik ekstraksiyon sonrasında elde edilen yağ verimi %23,7 olarak hesaplanmıştır. Diğer bir çalışmada ayçiçeği çekirdeklerinden yağ eldesi için SEE gerçekleştirilmiştir. En yüksek yağ veriminin (%36,6), %10 (v/v) enzim substrat oranı, 1:6 katı sıvı oranı ve 8 saatlik ekstraksiyon süresi koşullarında elde edildiği bildirilmiştir (Ribeiro ve ark., 2016). Ayçiçeği çekirdeklerinde SEE için süre (1; 2; 3 sa), katı sıvı oranı (5; 7,5; 10 g g⁻¹) ve enzim substrat oranı (0,5; 1,25; 2 g 100g⁻¹) parametreleri değerlendirilmiştir ve 1:5 katı sıvı oranı, 1,25 g 100g⁻¹ enzim substrat oranı ve 2 saat ekstraksiyon süresinde gerçekleştirilen SEE sonucunda %30’dan fazla yağ verimi elde edilmiştir (Sineiro ve ark., 1998).

3.6 Optimum Koşullarda Sulu Enzimatik Ekstraksiyon ile Elde Edilen Yağın Fiziko-Kimyasal Özellikleri

Optimum koşullarda gerçekleştirilen sulu enzimatik ekstraksiyon ve Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen yağlarda bozulmayı ve acılaşmayı tespit etmek amacıyla serbest yağ asitliği ve peroksit değeri analizleri gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda

optimum koşullar altında gerçekleştirilen sulu enzimatik ekstraksiyon ve Soxhelet ekstraksiyonu ile elde edilen yağın antioksidan aktivitesinin belirlenmesi amacıyla DPPH analizi yapılmıştır ve sonuçlar Çizelge 3.9'da özetlenmiştir.

Çizelge 3.9: Optimum koşullarda ve Soxhelet ekstraksiyonu ile elde edilen yağların karakterizasyonu.

	SEE sonrası elde edilen yağ	Soxhelet ekstraksiyonu sonrası elde edilen yağ
Serbest Yağ Asidi (%)	0,74±0,050 ^a	0,79±0,005 ^a
Peroksit Değeri (mEq O₂/kg)	1,55±0,175 ^a	1,33±0,260 ^b

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma (n=3) olarak ifade edilmiştir.

* Farklı küçük hafler aynı numune grubunun farklı yöntemlerle elde edilen yağlarının peroksit değerleri arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir (p<0,05).

Optimum koşullarda gerçekleştirilen sulu enzimatik ekstraksiyon sonucu elde edilen ayçiçeği yağının serbest yağ asitliği ile soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen yağın serbest yağ asitliği karşılaştırıldığında, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Literatür ile karşılaştırıldığında, ayçiçeği tohumlarında sulu enzimatik ekstraksiyon ile yağ eldesinde 5 farklı enzim etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışma yapılmıştır. Sulu enzimatik ekstraksiyon ile elde edilen yağlarla, çözücü ekstraksiyonu ile elde edilmiş yağlar (%0,94) kıyaslandığında önemli ölçüde daha düşük bir serbest yağ içeriği (%0,64-69) gözlemlenmiştir. Bu durum, çözücü ekstraksiyonu sırasında hızlandırılmış sıcaklık işlemi sebebi ile olabilmektedir (Latif ve Anwar, 2009). Optimum koşullarda gerçekleştirilen sulu enzimatik ekstraksiyon ile çözücü ekstraksiyonu sonucunda elde edilen yağlarda peroksit değerine bakılmıştır ve örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık mevcut olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Latif ve Anwar, (2009) yapmış oldukları bir çalışmada ayçiçeği tohumlarında sulu enzimatik ekstraksiyonu ve çözücü ekstraksiyonu ile edilmiş yağların peroksit değerleri incelenmiştir. Sulu enzimatik ekstraksiyon sonucunda elde edilen ayçiçeği yağının (1,25-1,37 mEq O₂/kg) peroksit değerinin, kontrol (1,29 mEq O₂/kg) ile benzer değerlere sahip olduğu ancak solvent ekstraksiyonu ile elde edilmiş yağdan (1,78 mEq O₂/kg) önemli ölçüde daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Hekzan kullanılarak gerçekleştirilen geleneksel solvent ekstraksiyonu sırasındaki yüksek çalışma sıcaklıklarının yağ kalitesini, özellikle yağların oksidasyon durumunu etkileyebileceği bildirilmiştir (Latif ve Anwar, 2009).

3.7 Ayçiçeği Yağının Yağ Asidi Kompozisyonu

Ayçiçeği çekirdeklerinden sulu enzimatik ekstraksiyon ile elde edilen yağın serbest yağ aside kompozisyonu Çizelge 3.10'de verilmiştir. Elde edilen değerler literatürdeki değerler ile karşılaştırılmıştır.

Çizelge 3.10: Sulu enzimatik ekstraksiyon sonrasında elde edilen yağın serbest yağ asidi kompozisyonu (%).

Yağ asidi	Lipid numarası	SEE sonrası ayçiçeği yağının yağ asidi kompozisyonu (%)
Palmitik Asit	C16:0	5,79
Stearik Asit	C18:0	4,43
Oleik Asit	C18:1	30,93
Linoleik Asit	C18:2	57,78
Araşidonik Asit	C20:0	0,28
Behenik Asit	C22:0	0,79

Ayçiçeği yağındaki ana yağ asitlerinin linoleik, oleik, palmitik ve stearik asit olduğu bildirilmiştir. De Aquino ve ark., (2019) ayçiçeği çekirdeklerinde sulu enzimatik ekstraksiyon ile elde ettikleri ayçiçeği yağının yağ asidi içeriğini, Soxhlet ekstraksiyonu ile elde ettikleri yağ ile karşılaştırmıştır. Oleik asit (%48,58-49,52) ve linoleik asit (%40,53-41,91) ayçiçeği yağında dominant yağ asidi olarak bulunmuştur. Sonuçlar incelendiğinde, ayçiçeği yağının çoklu doymamış yağ asidi oranının oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (de Aquino ve ark., 2022). Yapılan araştırmalar ayçiçeği çekirdeğinin yağ asidi bileşimi üzerinde çevresel faktörlerin etkili olduğunu ve bunun sonucunda çekirdeklerin yağ asidi bileşiminin, yetiştirildiği çevreye bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. Yapılan bir çalışmada farklı yıllarda yetiştirilen farklı türdeki ayçiçeği çekirdeklerinin yağ asidi kompozisyonu incelenmiştir. Sonuçlar, ayçiçeği yağlarının yağ asitleri içindeki linoleik asit içeriği (C18:2), %49,7-74,6 arasında bulunurken oleik asit içeriği (C18:1), %14,8-40,1 arasında olduğunu göstermiştir. Stearik asit (C18:0) içeriği 2,3-5,5 arasında tespit edilirken palmitik asit (C16:0) içeriği ise %4,7-8,3 arasında bulunmuştur (Alpaslan ve Gündüz, 2000). Chowdhury ve ark., (2008) yaptıkları bir çalışmada farklı yenilenilir yağların yağ asidi kompozisyonlarını karşılaştırmıştır. Ayçiçeği yağının linoleik asit içeriği % 46,02±16,75 bulunurken bu değeri sırasıyla %45,39±18,77 oleik asit, %6,52±1,75 palmitik asit ve %1,98±1,44 stearik asit takip etmiştir (Chowdhury K. ve ark., 2007). Ayçiçeği yağında sulu enzimatik ekstraksiyon ile elde edilen ayçiçeği yağının serbest yağ asidi

kompozisyonu literatürdeki çalışmalar ile karşılaştırıldığında benzer sonuçlar gözlemlenmiştir.

3.8 Optimum Koşullarda Gerçekleştirilen Sulu Enzimatik Ekstraksiyon Sonrası ve Klorojenik Asit Uzaklaştırma İşlemi Sonrası Protein İzolatı Eldesi

Çözelti formundaki protein moleküllerinin yüzeyleri, hidrofilik ve hidrofobik bölgelerle birlikte pozitif ve negatif yüklü bölgelerden oluşmaktadır. Protein molekülleri birbirini iterek çözeltide kalmaktadır. Protein moleküllerinin çözünürlüğünün azalması, çözücü ortamının veya protein moleküllerinin yüzey yüklerinin değiştirilmesi ile gerçekleştirilebilmektedir. Çözünürlükteki azalma, çökelmeye sebep olan aşırı doygunluk ile sonuçlanmaktadır. Çözücü ortamı, pH'nın ayarlanması (izoelektrik çöktürme) ile değiştirilebilmektedir (Raphael ve ark., 1995). Optimum koşullarda SEE sonrası izoelektrik çöktürme ile elde edilen protein izolatları ve klorojenik asit uzaklaştırılmış protein izolatlarının miktarları, protein ve klorojenik asit içerikleri Çizelge 3.11'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.11: Optimum koşullarda SEE sonrası elde edilen protein izolatı ve klorojenik uzaklaştırılmış protein izolatı protein içeriği ve klorojenik asit miktarı.

Protein izolatı	Protein izolatı miktarı (g)	Protein içeriği (%)	Klorojenik asit miktarı (mg/g)
SEE sonrası protein izolatı	1,60±0,07	54,99±1,12 ^b	2,43±0,56 ^a
SEE sonrası klorojenik uzaklaştırılmış protein izolatı	0,81±0,13	58,27±0,15 ^a	3,66±0,84 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma (n=3) olarak ifade edilmiştir.

* Farklı küçük harfler SEE sonrası ve SEE sonrası klorojenik asit uzaklaştırılmış protein izolatlarının protein içeriği arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir (p<0,05).

Ayçiçeği protein izolatları ile klorojenik asit uzaklaştırılmış protein izolatlarının protein içeriği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu gözlemlenmiştir (p<0,05). Klorojenik asidin uzaklaştırılması için art arda ekstraksiyon adımlarının eklemesi klorojenik asit uzaklaştırılmış protein izolatlarında, protein artışına sebep olmuştur (Salgado ve ark., 2012). SEE sonrası protein izolatları ile klorojenik asit uzaklaştırılmış protein izolatlarının içerdiği klorojenik asit miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir (p>0,05). Fakat klorojenik asit yıkama sonrasında elde edilen klorojenik asit miktarı (3,66mg/g), SEE sonrası

protein izolatlarının içerdiği klorojenik asit miktarından (2,43mg/g) daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Literatürde, Salgado ve ark., (2012) yapmış oldukları bir çalışmada ayçiçeği küspesinde izoelektrik çökeltme ile protein izolatları elde etmiştir. Daha düşük fenolik bileşik içeriğine sahip ayçiçeği protein izolatları elde etmek için ise ayçiçeği proteinlerinin alkali ortamda ekstraksiyonundan önce asit pH'da iki ekstraksiyona tabi tutulmuştur. İsoelektrik çökeltme ile elde edilen protein izolatlarının protein miktarı 70,4g/100g bulunurken içerdiği fenolik bileşiklerin miktarı 2,5g/100g bulunmuştur. Bununla birlikte fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması sonrasında elde edilen protein izolatlarının protein miktarı 70,1g/100 g bulunurken fenolik bileşik içeriği 2,1g/100g olarak bulunmuştur. Bu çalışmada, fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması için yapılan ekstraksiyon sonucunda fenolik bileşiklerin miktarında bir azalma meydana gelmiştir fakat fenolik bileşikler tamamen uzaklaştırılamamıştır (Salgado ve ark., 2012).

3.9 Ayçiçeği Protein İzolatlarının Renginin Belirlenmesi

Ayçiçeği tohumlarından SEE sonrası elde edilen protein izolatlarından klorojenik asidin uzaklaştırılması sonrası renk parametrelerinde farklılık göstermiştir (Çizelge 3.12).

Çizelge 3.12: Ayçiçeği protein izolatlarının renk parametreleri.

Ayçiçeği protein İzolatı	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
SEE sonrası	33,21±3,672 ^b	-3,78±1,157 ^a	3,21±0,673 ^b
SEE sonrası klorojenik asit uzaklaştırılmış	43,59±4,551 ^a	-4,36±1,066 ^a	4,60±0,895 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma (n=3) olarak ifade edilmiştir.

* Farklı küçük harfler SEE sonrası ve SEE sonrası klorojenik asit uzaklaştırılmış protein izolatlarının renk değerleri arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir (p<0,05).

SEE sonrası protein izolatlarının ve klorojenik asit uzaklaştırılmış protein izolatları yeşilimsi bir renge (negatif *a* değerleri) sahip olduğu gözlemlenmiştir. SEE sonrası elde edilen protein izolatı *a* değeri ile klorojenik asit uzaklaştırma işlemi uygulanarak elde edilen protein izolatı *a* değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir (p>0,05). Klorojenik asit uzaklaştırılmış protein izolatları, SEE sonrası protein izolatları ile karşılaştırıldığında daha açık bir tona (daha yüksek *L* değeri) sahip olduğu görülmüştür (p<0,05). Fenolik bileşiklerin uzaklaştırılmasından

nceki alkali muamele, daha fazla su ekstraksiyonu adımlarıyla giderilemeyen ve fenolik bileşiklerinin nihai içeriği ile ilişkili olmayan yeşilimsi bir renge neden olabilmektedir (Salgado ve ark., 2012).



4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sulu enzimatik ekstraksiyon yönteminde deneysel değişkenlerin ayçiçek yağı ve proteini eldesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır ve yüksek yağ verimi için optimum koşullar belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, düşük katı sıvı oranı ve enzim konsantrasyonunun yağ verimini arttırdığı gözlemlenmiştir. Ayçiçeği çekirdeklerinden Celluclast® ve Alcalase® enzimleri kullanılarak gerçekleştirilen sulu enzimatik ekstraksiyonda enzim konsantrasyonu 5mL/100g, su/substrat oranı 4g/g, Celluclast® süre 1,5 ve Alcalase® süre 1,5 saat olarak belirlenen optimum şartlarda yağ verimi % 33,44 ve ayçiçeği protein içeriği % 3,82 olarak bulunmuştur. Elde edilen yağın serbest yağ asidi değeri %0,74±0,05, peroksit değeri 1,55±0,175 meqiv/kg bulunmuştur. Sulu enzimatik ekstraksiyon sonrası alkali ekstraksiyon-izoelektrik çöktürme ile elde edilen protein izolatu miktarı 1,60±0,07g ve protein içeriği %54,99±1,12 olarak bulunurken klorojenik asit uzaklaştırma işleminden sonra elde edilen protein izolatu miktarı 0,81±0,13g ve protein içeriği %58,27±0,15 olarak elde edilmiştir.

Günümüzde ayçiçeği çekirdeklerinden sulu enzimatik ekstraksiyon yöntemi ile yağ eldesinde verimin geleneksel solvent ekstraksiyona kıyasla nispeten daha düşük olması yöntemin yaygın kullanımını kısıtlamaktadır. Ancak yöntemin ayçiçeği proteinlerinin yüksek kalitede ve eş zamanlı olarak kazanılmasını sağlamasının yanı sıra artan çevresel sorunlardan dolayı güvenilir ve çevre dostu yöntemlere olan ihtiyaç giderek artmaktadır. Bu çalışmadaki veriler göz önüne alındığında yüksek kalitede yan ürünlerin üretilmesi ve daha yüksek yağ verimi elde etmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.



KAYNAKLAR

- Alpaslan, M., & Gündüz, H.** (2000). The effects of growing conditions on oil content, fatty acid composition and tocopherol content of some sunflower varieties produced in Turkey. *Nahrung* , 44(6), 434–437.
- Ancuța, P., & Sonia, A.** (2020). Oil press-cakes and meals valorization through circular economy approaches: A review. In *Applied Sciences (Switzerland)* (Vol. 10, Issue 21, pp. 1–31). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/app10217432>
- Anjum, F. M., Nadeem, M., Khan, M. I., & Hussain, S.** (2012). Nutritional and therapeutic potential of sunflower seeds: A review. In *British Food Journal* (Vol. 114, Issue 4, pp. 544–552). <https://doi.org/10.1108/00070701211219559>
- Ayhlion-Meixueiro, F., Vaca-Garcia, C., & Silvestre, F.** (2000). Biodegradable films from isolate of sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 3032–3036. <https://doi.org/10.1021/jf9907485>
- Binboğa Meral, Ü.** (2019). Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) Bitkisinin Önemi ve Üretimine Genel Bir Bakış. In *International Journal of Life Sciences and Biotechnology* (Vol. 2, Issue 2).
- Chabrand, R. M., & Glatz, C. E.** (2009a). Destabilization of the emulsion formed during the enzyme-assisted aqueous extraction of oil from soybean flour. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(1), 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.03.008>
- Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M.** (2017). Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. In *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (Vol. 41, pp. 357–377). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.016>
- Chowdhury K., Banu L. A., Khan S., & Latif A.** (2007). Studies on the Fatty Acid Composition of Edible Oil. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* , 42(3), 311–316.
- Danso-Boateng E.** (2011). Effect of enzyme and heat pretreatment on sunflower oil recovery using aqueous and hexane extractions. *International Journal of Chemical and Molecular Engineering*, 5(8), 700–706.
- Daraee, A., Ghoreishi, S. M., & Hedayati, A.** (2019). Supercritical CO₂ extraction of chlorogenic acid from sunflower (*Helianthus annuus*) seed kernels:

modeling and optimization by response surface methodology. *Journal of Supercritical Fluids*, 144, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.10.001>

de Aquino, D. S., Roders, C., Vessoni, A. M., Stevanato, N., & da Silva, C. (2022). Assessment of obtaining sunflower oil from enzymatic aqueous extraction using protease enzymes. *Grasas y Aceites*, 73(1). <https://doi.org/10.3989/gya.0323211>

de Moura, J. M. L. N., Campbell, K., Mahfuz, A., Jung, S., Glatz, C. E., & Johnson, L. (2008). Enzyme-assisted aqueous extraction of oil and protein from soybeans and cream de-emulsification. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(10), 985–995. <https://doi.org/10.1007/s11746-008-1282-2>

Efthymiou, M. N., Tsouko, E., Papagiannopoulos, A., Athanasoulia, I. G., Georgiadou, M., Pispas, S., Briassoulis, D., Tsironi, T., & Koutinas, A. (2022). Development of biodegradable films using sunflower protein isolates and bacterial nanocellulose as innovative food packaging materials for fresh fruit preservation. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10913-6>

Fernández-Martínez, J. M., Pérez-Vich, B., & Velasco, L. (2009). Sunflower. In *Oil crops* (pp. 155–232). Springer, New York, NY.

Fick, G. N., & Miller, J. F. (1997). Sunflower Breeding. In *Sunflower Technology and Production* (Vol. 35, pp. 395–428).

Gassmann, B. (1983). Preparation and application of vegetable proteins, especially proteins from sunflower seed, for human consumption. An approach Production and processing of vegetable proteins forced by international development from the economical point of view. In *Die Nahrung* (Vol. 27).

Gennadios, A. (2002). *Protein-based films and coatings*. CRC press.

González-Pérez, S. (2015). Sunflower Proteins. In *Sunflower: Chemistry, Production, Processing, and Utilization* (pp. 331–393). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-94-3.50018-0>

González-Pérez, S., Merck, K. B., Vereijken, J. M., van Koningsveld, G. A., Gruppen, H., & Voragen, A. G. J. (2002). Isolation and characterization of undenatured chlorogenic acid free sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1713–1719. <https://doi.org/10.1021/jf011245d>

González-Pérez, S., & Vereijken, J. M. (2007). Sunflower proteins: Overview of their physicochemical, structural and functional properties. In *Journal of the Science of Food and Agriculture* (Vol. 87, Issue 12, pp. 2173–2191). <https://doi.org/10.1002/jsfa.2971>

- Iwona Konopka, B. R. S. C. M. T.** (2016). Optimization of Aqueous Enzymatic Pumpkin Oil Extraction. *Food Technology Biotechnology* , 54(4), 413–420.
- Jiang, L., Hua, D., Wang, Z., & Xu, S.** (2010). Aqueous enzymatic extraction of peanut oil and protein hydrolysates. *Food and Bioproducts Processing*, 88(2–3), 233–238. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.08.002>
- Joksimović, J. , Atlagić Jovanka, Marinković, R. , & Jovanović, D.** (2006). Genetic control of oleic and linoleic acid contents in sunflower. In *HELIA* (Vol. 29), <https://doi.org/10.2298/hel0644033j>
- Kaya, Y., & Atakişi, İ.** (2003). Ayçiçeğinde (*Helianthus Annus L.*) değişik verim ögelerinde path ve korelasyon analizi. *ANADOLU Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 13(1), 31-45. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-94-3.50025-8>
- Kaya, Y., V. Kaya, G. Evci, İ. Şahin and M. Üstün Kaya.** (2008b). Oil type sunflower production in Turkey. Proc. 17th International Sunflower Conference 2: 797-802. Cordoba, Spain. June 8-12. International Sunflower Association. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-94-3.50025-8>
- Kaya, Y., Jocic, S., & Miladinovic, D.** (2012). Sunflower. In *Technological Innovations in Major World Oil Crops* (Vol. 1, pp. 85–129). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0356-2_4
- Kayahan, M.** (2005). Yemeklik Yag Rafinasyon Teknolojisi, TMMOB Gıda Mühendisleri Odası Kitaplar Serisi No:10, Ankara.
- Kumar, K., Yadav, A. N., Kumar, V., Vyas, P., & Dhaliwal, H. S.** (2017). Food waste: A potential bioresource for extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0148-6>
- Latif, S., & Anwar, F.** (2009). Effect of aqueous enzymatic processes on sunflower oil quality. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(4), 393–400. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1357-8>
- Li, P., Gasmalla, M. A. A., Liu, J., Zhang, W., Yang, R., & Aboagarib, E. A. A.** (2016). Characterization and demulsification of cream emulsion from aqueous extraction of peanut. *Journal of Food Engineering*, 185, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.04.003>
- Liu, J. J., Gasmalla, M. A. A., Li, P., & Yang, R.** (2016). Enzyme-assisted extraction processing from oilseeds: Principle, processing and application. In *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (Vol. 35, pp. 184–193). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.05.002>

- Mat Yusoff, M., Gordon, M. H., Ezech, O., & Niranjana, K.** (2016). Aqueous enzymatic extraction of *Moringa oleifera* oil. *Food Chemistry*, 211, 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.050>
- Mat Yusoff, M., Gordon, M. H., & Niranjana, K.** (2015). Aqueous enzyme assisted oil extraction from oilseeds and emulsion de-emulsifying methods: A review. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 41, Issue 1, pp. 60–82). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.09.003>
- Moradi, N., & Rahimi, M.** (2019). Effect of ultrasound-and pulsed electric field-assisted enzymatic treatment on the recovery and quality of sunflower oil. *Separation Science and Technology*, 54(6), 1043-1054. <https://doi.org/10.1080/01496395.2018.1522344>
- Mwaurah, P. W., Kumar, S., Kumar, N., Attkan, A. K., Panghal, A., Singh, V. K., & Garg, M. K.** (2020). Novel oil extraction technologies: Process conditions, quality parameters, and optimization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(1), 3–20. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12507>
- Nadar, S. S., Rao, P., & Rathod, V. K.** (2018). Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. In *Food Research International* (Vol. 108, pp. 309–330). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.006>,
- Nas, S., Gökalp, H.Y., Ünsal, M.** (2001). Bitkisel Yag Teknolojisi. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Kitapları, Yayın No:005, Denizli.
- Nyam, K. L., Tan, C. P., Che Man, Y. B., Lai, O. M., & Long, K.** (2009). Physicochemical properties of Kalahari melon seed oil following extractions using solvent and aqueous enzymatic methods. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(4), 694–701. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01828.x>
- Pedroche, J.** (2015). Utilization of Sunflower Proteins. In *Sunflower: Chemistry, Production, Processing, and Utilization* (pp. 395–439). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-94-3.50019-2>
- Petraru, A., Ursachi, F., & Amariei, S.** (2021). Nutritional characteristics assessment of sunflower seeds, oil and cake. Perspective of using sunflower oilcakes as a functional ingredient. *Plants*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/plants10112487>
- Polmann, G., Badia, V., Frena, M., Teixeira, G. L., Rigo, E., Block, J. M., & Camino Feltes, M. M.** (2019). Enzyme-assisted aqueous extraction combined with experimental designs allow the obtaining of a high-quality and yield pecan nut oil. *LWT*, 113. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108283>
- Raphael, M., Rohanp, S., & Sosulski, F.** (1995). Isoelectric Precipitation of Sunflower Protein in a tubular Precipitator. *The Canadian Journal of*

- Ribeiro, S. A. O., Nicacio, A. E., Zanqui, A. B., Biondo, P. B. F., de Abreu-Filho, B. A., Visentainer, J. v., Gomes, S. T. M., & Matsushita, M.** (2016). Application of enzymes in sunflower oil extraction: Antioxidant capacity and lipophilic bioactive composition. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(5), 834–840. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150335>
- Rosenthal, A., Pyle, D. L., & Niranjan, K.** (1996). Aqueous and enzymatic processes edible oil extraction for. *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 402–420.
- Rui, H., Zhang, L., Li, Z., & Pan, Y.** (2009). Extraction and characteristics of seed kernel oil from white pitaya. *Journal of Food Engineering*, 93(4), 482–486. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.02.016>
- Saleh, A. A., El-Awady, A., Amber, K., Eid, Y. Z., Alzawqari, M. H., Selim, S., ... & Shukry, M.** (2021). Effects of sunflower meal supplementation as a complementary protein source in the laying hen's diet on productive performance, egg quality, and nutrient digestibility. *Sustainability*, 13(6), 3557. <https://doi.org/10.3390/su13063557>
- Salgado, P. R., Drago, S. R., Ortiz, S. E. M., Petrucci, S., Andrich, O., González, R. J., & Mauri, A. N.** (2012). Production and characterization of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein-enriched products obtained at pilot plant scale. *LWT-Food Science and Technology*, 45(1), 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.07.021>
- Salunkhe, D. K., Adsule, R. N., Chavan, J. K., & Kadam, S. S.** (1992). *World oilseeds*. Springer Science & Business Media.
- Semerçi, A., & Durmuş, E.** (2021). Analysis of oily sunflower production in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 9(1), 56–62. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v9i1.56-62.3688>
- Shchekoldina, T., & Aider, M.** (2014). Production of low chlorogenic and caffeic acid containing sunflower meal protein isolate and its use in functional wheat bread making. *Journal of Food Science and Technology*, 51(10), 2331–2343. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0780-2>
- Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M. J., & Lema, J. M.** (1998). Optimization of the enzymatic treatment during aqueous oil extraction from sunflower seeds. *Food Chemistry*, 61(4), 467–474.
- Tabatabaei, S., & Diosady, L. L.** (2013). Aqueous and enzymatic extraction processes for the production of food-grade proteins and industrial oil from dehulled yellow mustard flour. *Food Research International*, 52(2), 547–556. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.005>

- TÜİK**, (2021). <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Bitkisel-Uretim-1.Tahmini-2021-37247>
- Whitehurt R. J., & Oort van M.** (2010). Food Enzymes. In Whitehurt R. J. & van Oort M. (Eds.), *Enzymes in Food Technology* (2nd ed., pp. 7–16).
- Wildermuth, S. R., Young, E. E., & Were, L. M.** (2016). Chlorogenic Acid Oxidation and Its Reaction with Sunflower Proteins to Form Green-Colored Complexes. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 15, Issue 5, pp. 829–843). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12213>
- Wu, J., Johnson, L. A., & Jung, S.** (2009a). Demulsification of oil-rich emulsion from enzyme-assisted aqueous extraction of extruded soybean flakes. *Bioresource Technology*, 100(2), 527–533. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.057>
- Wu, J., Johnson, L. A., & Jung, S.** (2009b). Demulsification of oil-rich emulsion from enzyme-assisted aqueous extraction of extruded soybean flakes. *Bioresource Technology*, 100(2), 527–533. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.057>
- Zardo, I., de Espíndola Sobczyk, A., Marczak, L. D. F., & Sarkis, J.** (2019). Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Sunflower Seed Cake Using Response Surface Methodology. *Waste and Biomass Valorization*, 10(1), 33–44. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0038-3>
- Zhang, Y. L., Li, S., Yin, C. P., Jiang, D. H., Yan, F. F., & Xu, T.** (2012). Response surface optimisation of aqueous enzymatic oil extraction from bayberry (*Myrica rubra*) kernels. *Food Chemistry*, 135(1), 304–308. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.111>
- Zorzi, C. Z., Garske, R. P., Flôres, S. H., & Thys, R. C. S.** (2020). Sunflower protein concentrate: A possible and beneficial ingredient for gluten-free bread. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 66. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102539>

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Rumeysa BAYRAK

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2017, Konya Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- Küçükduman, Y., **Bayrak, R.**, Esmer, E., Başaran, P. (2021). Gıda Teknolojilerinde İnovatif Bir Yaklaşım Olarak “Bakteriyofajlar”. European Journal of Science and Technology, (27), 6-16.

