



Farklı LED ışıklar altında yetiştirilen köksüz su mercimeğinin (*Wolffia arrhiza*) Dumas yöntemi kullanılarak ham protein içeriğinin belirlenmesi

Beyhan TAŞ¹, Faruk Tolga ŞENGÜLENDİ²

Cite this article as:

Taş, B., Şengüleri, F.T. (2023). Farklı LED ışıklar altında yetiştirilen köksüz su mercimeğinin (*Wolffia arrhiza*) Dumas yöntemi kullanılarak ham protein içeriğinin belirlenmesi. *Aquatic Research*, 6(3), 189-200. <https://doi.org/10.3153/AR23019>

¹ Ordu Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ordu, Türkiye

² Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye

ORCID IDs of the author(s):

B.T. 0000-0001-6421-2561

F.T.Ş. 0000-0002-2114-3778

Submitted: 11.04.2023

Revision requested: 12.05.2023

Last revision received: 16.05.2023

Accepted: 03.06.2023

Published online: 27.06.2023

Correspondence:

Beyhan TAŞ

E-mail: beyhantass@gmail.com



© 2023 The Author(s)

Available online at

<http://aquatres.scientificwebjournals.com>

ÖZ

Köksüz su mercimeği insanlar için potansiyel bir yüksek proteinli gıda kaynağıdır. Lemnaceae familyasının kök, gövde ve yaprakları indirgenmiş bir üyesi olan *Wolffia*, dünyanın en küçük spermatofitidir. *Wolffia* türleri ile yapılan bilimsel araştırmalar oldukça yeni olup, bu türün Türkiye’de nadir olduğu düşünülmektedir. Doğal ya da kültür ortamındaki çevresel faktörler, bitkilerin fitokimyasalları ve besinsel bileşimleri üzerinde önemli bir etki gösterir. Bu çalışmada, Yeşilirmak Deltası’nda (Samsun) lokal bir alandan toplanıp kültüre alınan *Wolffia arrhiza*, kontrollü koşullarda farklı LED ışıklar altında yetiştirilmiştir. Ham protein miktarının belirlenmesinde Dumas metodu kullanılmıştır. Azot (%) içeriğinin standart dönüşüm faktörü 6.25 ile çarpılmasıyla hesaplanan protein içeriği, literatürlerdeki farklı dönüşüm faktörleri kullanılarak da değerlendirilmiştir. Araştırma sonucunda, köksüz su mercimeğinin farklı ışık spektrumları ile yapay aydınlatma koşullarında başarılı bir şekilde yetiştirildiği kanıtlanmıştır. Doğal ortamdaki köksüz su mercimeğinin %10 civarında olan protein içeriği, kırmızı LED ışıkta oldukça yükselmiştir (%41.6 protein). Farklı ışıkların *W. arrhiza* protein içeriğine etkisi kırmızı LED > mavi LED > mor LED > floresan şeklinde gözlenmiştir. Yüksek protein içeriği, çevre dostu ve sürdürülebilir üretimi ile *Wolffia*, yakın gelecekte geleneksel mahsullere alternatif bir ürün olarak, bitki bazlı protein ve fonksiyonel gıda pazarında hızla yer alabilir potansiyele sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Alternatif protein kaynağı, Su mercimeği, Bitki bazlı protein, İnsan gıdası, LED

ABSTRACT

Determination of crude protein content using the Dumas method of rootless duckweed (*Wolffia arrhiza*) grown under different LED lights

Rootless duckweed (*Wolffia* spp.) has the potential high-protein food source for humans. *Wolffia* is a member of the Lemnaceae family and is the world's smallest spermatophyte, with reduced roots, stems, and leaves. Scientific research on *Wolffia* species is relatively new, and this species is believed to be rare in Turkey. The phytochemicals and nutritional composition of plants are significantly affected by environmental factors in the natural or cultivated medium. In this study, *Wolffia arrhiza* was collected and cultured from a local area in Yeşilirmak Delta (Samsun) grown under controlled conditions using different LED lights. The Dumas method was used to determine the amount of crude protein. The protein content, calculated by multiplying the nitrogen (%) content by the standard conversion factor 6.25, was also evaluated by using different conversion factors in the literature. The results showed that rootless duckweed can be successfully grown under artificial lighting conditions with different light spectrums. The protein content of rootless duckweed, which was around 10% in the natural environment, increased considerably under red LED light (41.6% protein). The effect of different lights on protein content of *W. arrhiza* was observed as red LED > blue LED > purple LED > fluorescent. With its high protein content, environmentally friendly and sustainable production, *Wolffia* has the potential to quickly take place in the plant-based protein and functional food market as an alternative to traditional crops in the near future.

Keywords: Alternative protein source, Duckweed, Plant-based protein, Human food, LED

Giriş

Suda serbest yüzen monokotil su bitkilerinden olan su mercimekleri, Lemnaceae familyasına ait 5 cins (*Landoltia*, *Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia* ve *Wolffiella*) ve 36 tür içerir (Sree ve ark., 2015; Bog ve ark., 2019; Bog ve ark., 2020; Tippery ve Les, 2020). Su mercimeklerinin en küçük bireyi olan ve kökleri indirgenmiş olan *Wolffia*, dünyanın da en küçük spermatofitidir. Su mercimekleri hızlı büyüme oranları, yüksek besin alım kapasiteleri, yenilebilirlikleri, yetiştirme koşullarına bağlı olarak besin içeriğinin ve değerlerinin değişkenliği gibi karakteristik özellikleriyle (Xu ve ark., 2011; Xu ve Shen, 2011; Ziegler ve ark., 2015), insan gıdası ve hayvan yemi olarak, biyoteknoloji alanında, fitoremediasyon çalışmalarında, yenilenebilir enerji gibi oldukça farklı alanlarda kullanım için potansiyel bir kaynaktır (Cui ve Cheng, 2015; Appenroth ve ark., 2017; Petersen ve ark., 2022).

Küresel iklim değişikliği ve dünya nüfusu hızla artarken, tarım alanları yavaş yavaş azalmaktadır. Bu durumda küresel gıda kıtlığı gelecekte daha da kritik hale gelecektir (van Dijk ve ark., 2021). Fonksiyonel ve besleyici gıda olarak kullanılan algler gibi (Taş ve Şengüllendi, 2022a), su mercimeği de birçok içsel avantaja sahip olduğu için, geleneksel tahıl ve tahıl mahsullerine kıyasla son yıllarda oldukça ilgi çekmektedir (Appenroth ve ark., 2017; 2018; Xu ve ark., 2022). Örneğin, algler gibi, su mercimeği de hızla büyür, yetiştirme için büyük tarım arazilerine gerek duymaz ve tarım arazisi ile rekabet etmeden üretilebilir. Su mercimekleri, özellikle *Wolffia* türleri insan beslenmesi için değerli bileşenler içerir ve protein, yağ, nişasta ve diyet lifi bakımından en yüksek verime sahiptir (Appenroth ve ark., 2017; 2018). Su mercimeği Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) tavsiyesini karşılayan yeterli tüm esansiyel amino asitleri (EAA) sağlayabilir ve faydalı pigmentler ve antioksidanlar açısından zengindir. Ayrıca, su mercimeği fonksiyonel özellikler ve besinler sağlayan nişasta, selüloz, eser miktarda hemiselüloz ve pektin gibi çok yönlü karbonhidratlar da içerir (Appenroth ve ark., 2017; Xu ve ark., 2022). Bitkisel bir protein kaynağı ve tüm EAA'ları içeren su mercimeği, vücudumuzun ihtiyacı olan yüksek kaliteli proteinin yanı sıra lif, demir, folat, magnezyum ve potasyum gibi diğer besin maddeleri açısından da zengindir. Bu nedenle, sağlıklı bir beslenme planı için mükemmel bir seçenektir. Özellikle vejetaryenler veya veganlar için sağlıklı ve önemli bir gıdadır. Su mercimeklerinin proteinler, çoklu doymamış lipidler, lifler, mikro besinler ve

diğer bazı biyoaktif bileşikler dahil olmak üzere zengin bir yaşamsal makro besin kaynağı oluşturması, iyi dengelenmiş bir amino asit profiline sahip olmaları, bu bitkileri insan gıdası olarak formüle etmek için harika bir aday yapar (Diwan, 2023).

Su mercimeği, tatlı sularda doğal olarak yetişir. Ilıman iklim kuşağında bulunan Türkiye'nin kuzeyinde yer alan Yeşilirmak ve Kızılırmak deltaları su mercimeğinin yetişmesi için oldukça uygun sucul habitatlara sahiptir. Daha ılıman bir iklim, gölgeli habitatlar, düşük ışık yoğunlukları ve aşırı sıcaklıkların az olması gibi abiyotik faktörler nedeniyle deltadaki sığ göller, lagünler, sulak alanlar, kanal ve hendeklerde zaman zaman su mercimekleri aşırı çoğalmalar yapmaktadır (Taş ve Topaldemir, 2021). Su mercimeği yetiştiriciliği için, uygun çevresel koşullar altında, seralarda verimli sistemler kurmak ve sürdürülebilir şekilde yıl boyu hasat elde etmek mümkündür (Arslan Günal ve Taş, 2022; Taş ve Şengüllendi, 2022b). Abiyotik faktörlerden ışık yoğunluğu ve spektral ışık dağılımı (Petersen ve ark., 2022) yetiştiricilik için önemlidir. Örneğin, çok yüksek ışık yoğunluğu ışık doygunluğuna yol açar, dolayısıyla bitkinin fotosentetik aktivitesini artırmaz (Landolt ve Kandeler, 1987). Mavi ışıkla yetiştirilen *W. arrhiza*'nın kırmızı ışığa kıyasla daha yüksek klorofil içerdiği bildirilmiştir. Ancak, yapılan çalışmalar, abiyotik faktörlerin farklı su mercimeği türlerinde farklı sonuçlar çıkarabileceğini göstermiştir (Wedge ve Burris, 1982; Yin ve ark., 2015; Paolacci ve ark., 2018; Stewart ve ark., 2020). Işık yayan diyot (LED, Light Emitting Diode) teknolojisinin gelişmesiyle, bitki yetiştiriciliğinde verim ve kaliteyi arttırmak hedeflenmiş, son yıllarda bitki üretiminde geleneksel aydınlatma sistemlerine alternatif olarak LED kullanımı yaygınlaşmıştır. Bununla birlikte, bitki gelişimi ve fizyolojisi, büyüme ortamı ışık spektrumundan güçlü bir şekilde etkilendiği için, bitkinin fizyolojik tepkilerini anlamaya yönelik yeni araştırmalarda LED aydınlatma kullanımı yaygınlaşmaya başlanmıştır (Taş ve Şengüllendi, 2022b).

Su mercimeği pazarının, 2030 yılına kadar farklı gelişim fırsatlarına kapı açacağı öngörülmektedir (Diwan, 2023). Artan dünya nüfusu ile birlikte yenilikçi, besleyici, sağlıklı ve çevre dostu gıdalara olan ihtiyaç su mercimeklerini ön plana çıkarmıştır. Gıdaların temeli olan protein üretimi için ek ve sürdürülebilir biyokütle kaynağına yönelik küresel olarak su mercimeği proteinlerine olan ilginin arttığı görülmektedir. Bununla birlikte, protein kaynağı olarak su mercimeklerinin

potansiyelini doğru bir şekilde belirlemek için, güvenilir kantitatif yöntemler gerekmektedir. Bitki dokusundaki toplam azot (TN) içeriği Kjeldahl yöntemi veya CHN/S organik element analizörleri kullanılarak yakma yoluyla belirlenebilmektedir. Protein içeriğinin belirlenmesinde ise çoğunlukla Kjeldahl azotu (Kj-N) faktörü olarak bilinen 6.25'lik dönüşüm faktörü ile TN çarpılmakta ve yaygın olarak bu yöntem kullanılmaktadır. Doğrudan ekstraksiyon yoluyla da protein analizleri yapılmaktadır, ancak bu yöntemle ilgili yaşanan teknik sorunların aksine, bitki dokusundaki TN içeriği Kjeldahl veya elementel analizörler kullanılarak daha güvenilir olarak belirlenebilir. Çünkü bu yöntemlerle belirlenen toplam doku azotu içeriği, doğrudan ekstraksiyon prosedürlerinden daha az değişkendir. Fakat bu yöntemlerin yanılabilirliği, daha sonra toplam proteini hesaplamak için kullanılan dönüştürme faktörüdür (Angell ve ark., 2016). Deniz alglerinin protein içeriğinin incelendiği bir meta-analizde, proteomik amino asitlerin toplamı olarak tanımlanan, doğrudan ekstraksiyon prosedürlerinin protein içeriğini %33 oranında az, en sık kullanılan, azottan proteine dönüşüm faktörü olan 6,25'in kullanıldığı durumda ise protein içeriğinin %43 oranında fazla tahmin edildiği belirtilmiştir (Angell ve ark., 2016). Bu nedenle, farklı gıda ve bitki gruplarında olduğu gibi, su mercimeklerinin protein içeriğini belirlemeye yönelik evrensel bir dönüşüm katsayısının belirlenmesine ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada, doğal ortamından toplanıp kültürü yapılan ve kontrollü koşullarda, farklı LED ışıklarda yetiştirilen köksüz su mercimeği *W. arrhiza*'nın ham protein içeriği analiz edilerek, LED ışıkların protein içeriğine etkisi incelenmiştir. Dumas metoduyla belirlenen %N üzerinde protein içeriği hesaplanırken, standart Kj-N katsayısı ile birlikte farklı dönüşüm faktörleri de kullanılmıştır. Çalışmada *W. arrhiza*'nın seçilmesinin nedeni, Türkiye'de henüz tanınmaması, yüksek büyüme hızı ve protein içeriği, değerli fitokimyasallarıyla nutrasötik ve farmasötik alanda kullanım potansiyelinin yüksek oluşu ile ilgili ön çalışmalarda iyi performans göstermesidir. Köksüz su mercimeğinin üretiminin yapılarak ülke ekonomisine ve bitki bazlı protein pazarına katkı sağlaması umulmaktadır.

Materyal ve Metot

Biyolojik Materyal ve Büyüme Koşulu

Köksüz su mercimeği türü, *W. arrhiza*, *Yeşilirmak Delta'sı*'ndan (Samsun) toplanmıştır (Taş ve Topaldemir, 2021).

Ordu Üniversitesi (ODÜ) Hidrobiyoloji Laboratuvarı'nda kültüre alınan köksüz su mercimeği stok kültürü elde edilmiştir (Şekil 1). *W. arrhiza*, suda serbest yüzen, yaprak olarak niteleyebileceğimiz frond adı verilen yapısı alg tallusuna benzeyen, yüzeyi şeffaf olmayan parlak yeşil renktedir (Taş ve Şengüllendi, 2022b). Yapraklar genişliğinin 1–1.5 katı derinliğinde, küresel ila elipsoid, üst yüzeyde dış bükey, en büyük genişliği su yüzeyinin biraz altında, 0.5–1.5 mm uzunluğunda, 0.4–1.2 mm genişliğindedir. Bitkiler bazen çiçek açar ve nadiren meyve verir. Tohumlar 0.4–0.5 mm uzunluğunda, yaklaşık 0.4 mm kalınlığındadır (Bog ve ark., 2020). Toplu iğne başı büyüklüğündeki bitkicik, tomurcuklanma gibi vejetatif olarak hızla çoğalmaktadır (Şekil 1).

W. arrhiza büyüme ortamı olarak sentetik "N ortamı" kullanılmıştır (Appenroth ve ark., 2017). N ortamı su mercimeklerinin yetiştirilmesi için önerilen bir ortamdır. Bu ortam aşağıdaki kimyasalların karışımıyla hazırlanmıştır. Kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Merck KGaA (Almanya)'dan satın alınmıştır.

Stok 1: 4.083 g/L KH₂PO₄; *Stok 2:* 47,23 g/L Ca(NO₃)₂.4H₂O; *Stok 3:* 161.8 g/L KNO₃, 61.8 mg/L H₃BO₃, 514.5 mg/L MnCl₄.H₂O, 9.4 mg/L Na₂MoO₄.2H₂O, 49.30 g/L MgSO₄.7H₂O; *Stok 4:* 1.835 g/L FeNaEDTA. Hazırlanan stoklar +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Bir litre besin ortamı hazırlamak için her stok solüsyondan 5 mL kullanılmış, pH 5.5'e ayarlanıp 121°C'de 15 dak. otoklavda steril edilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulan steril ortamlar kültürlerin çoğaltılmasında kullanılmıştır.

W. arrhiza yetiştirmek için, ODÜ Hidrobiyoloji Laboratuvarı'ndaki steril iklim kabini kullanılmıştır (Grotech/GR08, Unitroniks® Vision350™). Dört plastik kap (uzunluk × genişlik × yükseklik: 64 cm × 43 cm × 18.5 cm) içine aşılana köksüz su mercimeği, farklı LED'ler [kırmızı, mavi, mor (kırmızı+mavi)] ve floresan ışıklı rafların altına yerleştirilmiştir (Şekil 2). Farklı LED ışıklı panolar şerit LED'ler kullanılarak laboratuvarında hazırlanmıştır. Su yüzeyinin 30 cm yukarısına yerleştirilen LED'lerin ışık yoğunluğu 70–80 µmol/cm²/s, iklim dolabının floresan lamba (Polylux XLR™, F18W/827, Hungary) ışık yoğunluğu (sıcak beyaz, 4 adet) 4500 lux'dür. LED ışıkların yoğunluğu PPF meter (AMS TCS3701 LIGHT ALS renk sensörü, Samsung), floresan ışık yoğunluğu multimeter (MASTECH® MS6300, Environment Multimeter, Mastech Group, Hong Kong) kullanılarak ölçülmüştür. İklimlendirme koşulu olarak 16/8 aydınlık/karanlık

fotoperiyot, $24 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık, 70°C nem ayarlanmıştır. Kontrollü koşullarda çoğalan *W. arrhiza*, dört günün sonunda hasat edilmiştir. Distile su (dH_2O) ile yıkanan köksüz su mercimeğinin fazla suyu havlu peçete ile alınıp derin dondurucuya kaldırılmış, ardından liyofilizatörde (FreeZone® 2.5, Labconco) kurutulmuştur. Kuru örnekler mekanik öğütücüde (Waring 8011 EB Blender) toz haline getirildikten sonra analizler yapılincaya kadar -21°C 'de muhafaza edilmiştir.

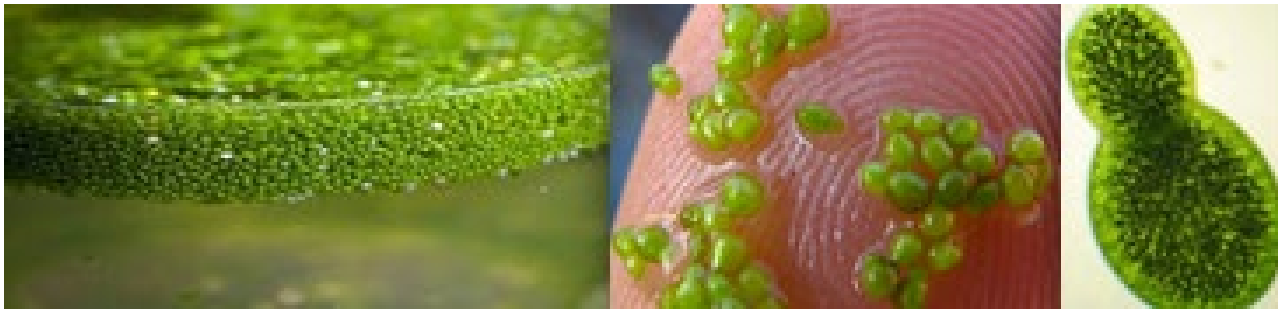
Dumas Metoduyla Ham Protein Analizi

Toplam azot (TN) içeriği, Ordu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan bir CHNS analizörü (vario MICRO cube, Elementar, Germany) kullanılarak, Dumas prosedürüne göre analiz edilmiştir. Bu yöntemde 1–2 mg dondurularak kurutulmuş bitki materyali yakılmış ve üretilen azot, termal iletkenlik sensörü ile ölçülmüştür. Tüm azot formları yandığında, bu analiz organik, nitrat, nitrit ve amonyum azotunun toplamını verir (Devlamynck ve ark., 2020). Cihazda taşıyıcı gaz olarak helyum, referans standart olarak sülfanilamid kullanılmıştır. CHNS analizöründe her numuneden üç kopya analiz edilen TN miktarı, bitki kuru

ağırlıklarına dayalı olarak Elementar Vario yazılımı tarafından yüzde olarak belirlenmiştir. Farklı LED ışıklarda yetiştirilen köksüz su mercimeğinin kuru ağırlık bazında protein içeriği (% ham protein), Kj-N'nin 6.25 faktörü ile çarpılmasıyla ($\text{N} \times 6.25$) hesaplanmıştır (Kjeldahl, 1883; Casal ve ark., 2000). Bunun yanı sıra, güncel literatürlerde belirtilen farklı N-protein dönüştürme faktörleri de kullanılarak [F(5.8), Nieuwland ve ark., 2021; F(5.6), Mariotti ve ark., 2008; F(5), Angell ve ark., 2016] protein değerleri karşılaştırılmıştır.

İstatistiksel Analiz

Farklı ışık grupları arasında değişkenin nicel ortalamalarına göre anlamlı bir farklılığın olup olmadığını test etmek için Kruskal-Wallis testi yapılmıştır. Bu test, tek yönlü varyans analizinin (ANOVA) parametrik olmayan karşılığıdır. İstatistiksel analiz yapıldığında MINITAB 16 (Minitab Inc., State College, Pennsylvania, ABD) kullanılmıştır. Yine, elde edilen sonuçlardan Origin Pro Lab (Origin 8.5, 2021) yazılımı kullanılarak hot plot grafiği hazırlanmıştır.



Şekil 1. Köksüz su mercimeği, *Wolffia arrhiza* (original)

Figure 1. Rootless duckweed, *Wolffia arrhiza* (original)



Şekil 2. İklim dolabında farklı LED aydınlatmada *W. arrhiza* yetiştirme, hasat ve kurutma

Figure 2. Growing, harvesting and drying *W. arrhiza* in different LED lighting in climate cabinet

Bulgular ve Tartışma

Azot, bitkisel proteinlerin ana bileşenidir, bu nedenle yüksek azot içeriği, bitkilerin yüksek protein içeriği ile ilişkilendirilir. Lemnaceae ailesine ait su bitkilerinin azot içeriği oldukça yüksektir, genellikle %3 ila %5 arasında değişir. Bitki büyüme süreçlerini katalize eden ve düzenleyen azot, çeşitli enzimatik proteinlerin bir parçasıdır (Sinfield ve ark., 2010). Karbon, hidrojen ve oksijenden sonra azot, fotosentez işlemi için temel olan klorofil üretimindeki kilit rolü nedeniyle bitkilerdeki temel elementlerden biridir. Ayrıca azot, parazitlere ve bitki hastalıklarına karşı koruma sağlayan kimyasal bileşenlerin üretimine de katkıda bulunur (Hoffland ve ark., 2000).

Çalışmamızda, kontrollü koşullarda, farklı ışıklarda yetiştirilen *W. arrhiza*'nın CHNS analizörü ile belirlenen (Dumas metodu) TN miktarı Tablo 1'de görülmektedir. Farklı ışıkların bitkideki azot içeriğini değiştirdiği görülmektedir. Köksüz su mercimeğinin ham protein içeriği üzerine, farklı ışık spektrumlarının anlamlı bir etkisinin olup olmadığını test etmek için Kruskal-Wallis testi yapılmıştır. Analiz sonucu, farklı ışık kaynaklarının *W. arrhiza*'nın ortalama protein değerleri üzerinde önemli bir etkisi olduğunu ortaya koymuştur ($H=13.23$; $p<0.001$; $df=4$).

Yeşilirmak Deltası'ndaki doğal ortamdan toplanan *W. arrhiza*'nın TN içeriği yaklaşık %1.6'dır. Kontrollü laboratuvar koşullarında, sentetik N ortamında, floresan ve farklı LED ışıklar altında yetiştirilen *W. arrhiza*'nın TN içeriği doğal ortamdakine göre oldukça artış göstermiştir. Bu artış, kırmızı

LED ışıkta %316, mavi LED ışıkta %261, mor LED ışıkta %246 oranındadır. LED ışıklara kıyasla beyaz floresan ışıkta yetiştirilen *W. arrhiza*'nın TN içeriği daha azdır, fakat doğal ortamdakinden %162.5 oranında daha fazladır. Köksüz su mercimeğindeki farklı protein içeriklerinin ışık spektrumlarının ve yoğunluklarının farklılığından kaynaklandığını söyleyebiliriz.

Organik bileşiklerde azot tayini için en çok kullanılan yöntemlerden biri Kjeldahl metodudur (Kjeldahl, 1883). Bu metod gıda, içecek, et, yem, tahıl, gübre, atık su, toprak ve bitki dokusunda azot tayini için yaygın olarak kullanılmaktadır (Muñoz-Huerta ve ark., 2013). Klasik Kjeldahl metoduna alternatif olarak, CHNS analizörü kullanılarak Dumas (yakma) metodu ile de azot analiz edilebilir. Bu iki metod, proteinlerde bulunan toplam azotun dikkate alındığı metodlardır. Doku analizine dayalı bu metodlar, organik azot tayinindeki güvenilirlikleri nedeniyle bitkilere yaygın olarak uygulanmıştır (Muñoz-Huerta ve ark., 2013). Kjeldahl metodu basit ve doğruluğu kanıtlanmış, referans bir yöntemi oluştururken, Dumas metodu, toplam azotu doğru bir şekilde tahlil eder (Wiles ve ark., 1998). Geleneksel dönüştürme faktörü (6.25), köksüz su mercimeğinde protein içeriğini olduğundan fazla tahmin etmektedir (Tablo 1). Bununla birlikte, bir dönüşüm faktörünün kullanılması, dokudaki azot ölçümüne dayalı olarak proteini tahmin etmenin basit bir yolu olduğundan, hala çalışmaların çoğu için tercih edilen bir yöntem olmaya devam edecek standart bir yaklaşım olarak görülmektedir.

Tablo 1. N-protein dönüşüm faktörleri kullanılarak farklı LED ışıklarda yetiştirilen *W. arrhiza*'nın ham protein içeriği

Table 1. Crude protein content of *W. arrhiza* grown in different LED lights using N-protein conversion factors

Işık kaynağı	TN (%)	Ham protein (%)				
		F(6.25)	F(5.8)	F(5.6)	F(5)	Ort.
Doğal	1.6	10	9.3	8.9	8	9.1
Floresan	4.2	24	24.1	23.3	20.8	23.1
Kırmızı LED	6.7	41.6	38.6	37.3	33.3	37.7
Mavi LED	5.8	36.1	33.5	32.4	28.9	32.7
Mor LED	5.5	34	32.1	31	27.6	31.2

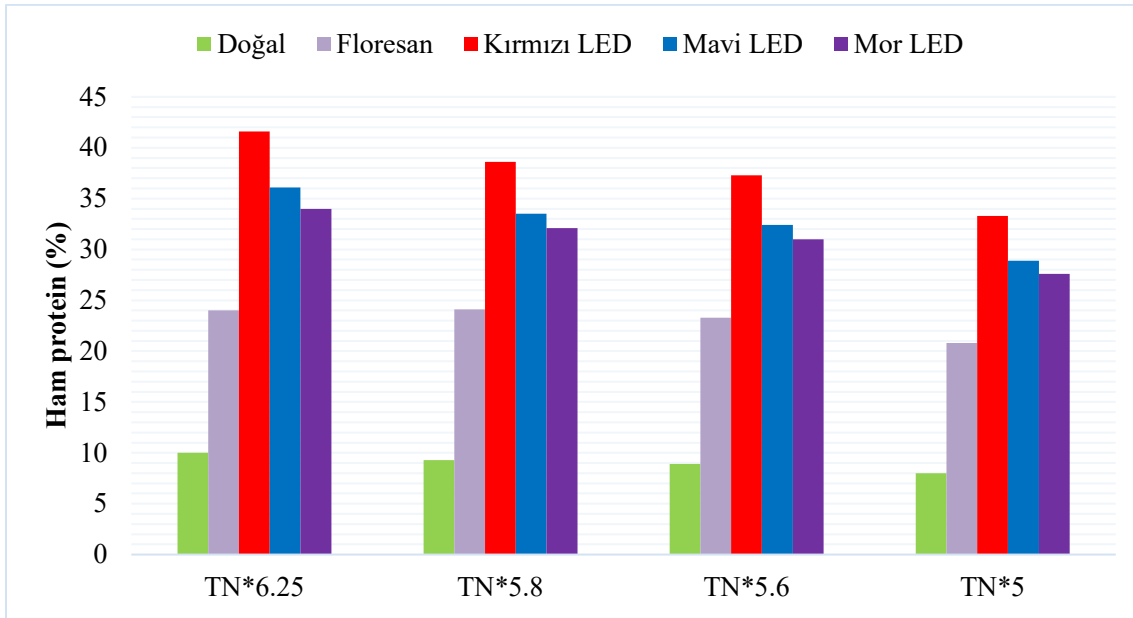
TN: Dumas metoduyla analiz edilen toplam azot içeriği (organik, amonyum, nitrit ve nitrat azotu)

Dumas metodu kullanılarak genellikle biraz daha yüksek azot seviyeleri bulunur. Bu, numunedeki tüm azot formlarının değerlendirilmesinde daha yüksek bir toplam verimlilikle açıklanabilir (Daun ve DeClercq, 1994; Thompson ve ark., 2002). Kjeldahl yöntemiyle karşılaştırıldığında, Dumas prosedürünün birkaç avantajı vardır, çünkü daha az güçlü reaktant tüketir, daha az emek gerektirir ve numunelerden azotu serbest bırakmak için daha verimli bir sıcaklıkta çalışır (Etheridge ve ark., 1998). Sonuç olarak, bu yöntem gıda ve yem numunelerindeki toplam azotu analiz etmek için giderek daha fazla tercih edilmektedir. Dumas metodu organik bağlı azotun önemli ölçüde fazla tahmin edilmesine yol açar, bu nedenle ham protein tahmini için, Dumas metodu protein içeriği tayini için kullanılacaksa, bu yönteme özgü yeni bir dönüştürme faktörü belirlenmelidir (Devlamynck ve ark., 2020). Genellikle bitkisel proteinler için Kj-N katsayısı olan 6.25 yaygın olarak kullanılmasına rağmen, elde edilen sonuçlar, örneklerin gerçek protein içeriğini temsil etmez. Bunun nedeni, örneklerdeki azotun, protein dışındaki diğer bileşiklerin yapıtaş olabileceği gerçeğidir. Bu nedenle, Kj-N katsayısıyla belirlenen protein miktarı, “toplam protein” miktarını ifade eder. Genel olarak, çoğu analitik yöntem protein içeriğini olduğundan fazla tahmin etmiştir. Hatalar, dolaylı ölçümlerle, yani azot tayini ve müteakip protein dönüştürme veya diğer kimyasal maddelerden kaynaklanan girişim ile bağlantılıdır. İnsan diyetinin bu kadar önemli bileşenleri olarak, gıdalardaki protein içeriğini bilmek çok önemlidir ve bu nedenle güvenilir analitik yöntemlere sahip olmak önem arz etmektedir (Mæhre ve ark., 2018).

Çalışmamızda, Dumas metoduna göre, köksüz su mercimeğinde bulunan TN miktarından protein içeriği (% ham protein) hesaplanırken hem geleneksel Kj-N faktörü hem de güncel literatürlerdeki su mercimeği için uygun olabilecek farklı faktörler kullanılmıştır (Tablo 1). *W. arrhiza*'da Kj-N faktörü (6.25) ile hesaplanan protein içeriği farklı LED ışıklarda yaklaşık %34 ila %42 arasında değişmiştir. En yüksek protein kırmızı LED ışıkta yetiştirilen numunelerde hesaplanmıştır (%41,6). Bunu mavi ve mor LED ışıklarda yetiştirilen numuneler takip etmiştir (Şekil 3). Floresan ışıkta protein içeriği LED ışıklardan daha azdır. Köksüz su mercimeği (*W. arrhiza*) için Kj-faktörü olarak 5.7–5.8 arasında bir değer önerilmektedir (Nieuwland ve ark., 2021). Bu değerler kullanıldığında, kırmızı LED ışıkta yetiştirdiğimiz

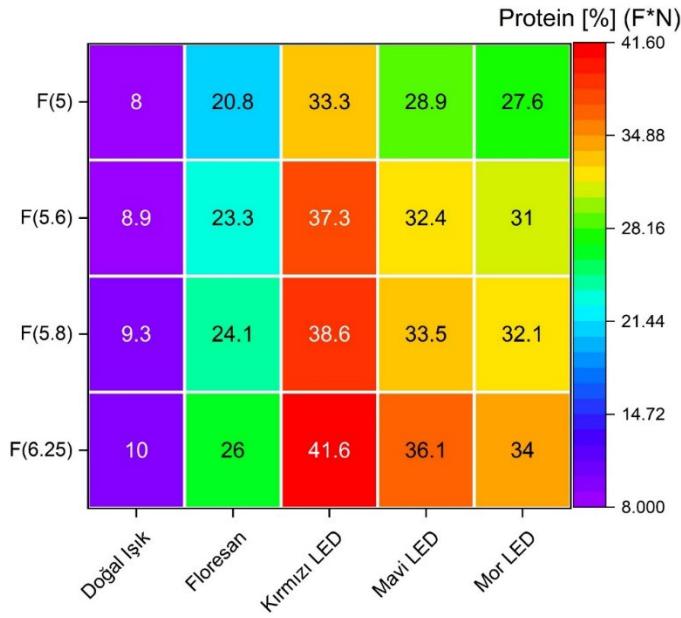
W. arrhiza'nın protein içeriği %38–39 olarak hesaplanmaktadır. Ancak, bitkinin yetiştiği koşullar, genetik varyasyonlar ve diğer faktörler, Kjeldahl faktörü değerini etkileyebilir. Bu nedenle, protein hesaplamaları yapılırken doğru Kjeldahl faktörünü kullanmak için uygun literatür kaynaklarına başvurulmalıdır.

Nieuwland ve ark. (2021), şişman su mercimeği *Lemna gibba*'da ham protein içeriğini standart ve onaylanmış bir Dumas azot analiz yöntemi kullanılarak incelemiştir. Yarı konsantre Hoagland çözeltisinde, 18 saat ışık ve 20 ila 30 °C sıcaklık arasında üretilen ve dondurularak kurutulan *L. gibba*'nın ham protein miktarı, ıspanaktan ve şeker pancarı yaprağından elde edilen RuBisCO'nun (RuBisCO, tüm yeşil bitkilerde karbon fiksasyonunda önemli rol oynayan proteindir ve “yaprak proteini” nin ana bileşenidir) 5.8'lik dönüştürme faktörü kullanılarak hesaplanmıştır. *L. gibba*'da ham protein içeriğinin, literatürde bildirilen diğer su mercimeği çeşitlerine benzer şekilde (Xu ve Shen, 2011), kuru ağırlık bazında yaklaşık %34 (33.6 g/100 g) olduğu bildirilmiştir. Bu değer protein izolasyonu için kullanılan diğer yaprak kaynaklarına kıyasla daha yüksek olduğu, örneğin kuru ağırlık bazında proteinin ıspanakta %28, marulda %25, şeker pancarından %18 olduğu ifade edilmiştir (WHO, 1970). Dumas metoduyla analizini yaptığımız *W. arrhiza*'da 5,8 katsayısını kullanarak belirlediğimiz ham protein içeriği (%N*5,8), farklı ışık kaynaklarının etkisinde, kuru ağırlık bazında yaklaşık %24 ila %39 aralığında hesaplanmıştır. Kjeldahl faktörüyle (%N*6.25) hesaplandığında *W. arrhiza*'da ham protein %26 ila %42 aralığındadır. Yani standart Kj-N faktörü ile hesaplama yapıldığında daha yüksek protein içeriği elde edilmektedir. Farklı LED ışıkların floresan ışığa kıyasla, *W. arrhiza*'nın gelişimini pozitif yönde etkilediği gözlenirken, kırmızı LED ışığın azot içeriğini, dolayısıyla protein seviyesini yükselttiği tespit edilmiştir. Farklı ışık kaynaklarında yetiştirilen *W. arrhiza*'nın farklı katsayılar kullanılarak hesaplanan protein içeriği hot plot grafiğinde Şekil 4'te görülmektedir. Grafikte, protein yoğunluğu farklı renkler ve tonlar kullanılarak ifade edilmiş, protein içeriğinin az olduğunu mor renkten protein içeriğinin en yüksek olduğunu kırmızı rene doğru değişim gösterilmiştir. Çalışmamızın sonuçlarına göre, *W. arrhiza*'dan *L. gibba*'ya göre daha yüksek oranda protein elde edilebileceğini ifade edebiliriz. Hatta geliştirilecek farklı metotlarla bu oran daha da yükseltilebilir.



Şekil 3. *W. arrhiza*'da ham protein içeriğinin farklı ışık spektrumlarında değişimi

Figure 3. Variation of crude protein content in *W. arrhiza* in different light spectra



Şekil 4. *Wolffia arrhiza*'da protein içeriğinin hot plot grafiği

Figure 4. Hot plot graph of protein content in *Wolffia arrhiza*

Küçük ölçekli kapalı dikey bir sistemde, farklı ışık yoğunluğu ve spektrumun su mercimeği *L. minor* ve *W. hyalina* büyümesi ve proteinleri üzerindeki etkisinin incelendiği bir

çalışmada, TN Dumas metodu ile analiz edilmiş ve 6.25 faktörüyle ham protein hesaplanmıştır. Ham protein *L. minor*'da %31.8–%32.4, *W. hyalina*'da %39.3–%40 oranında tespit edilmiştir. Bir tür içindeki farklı ışık yoğunluklarının ve spektral dağılımların ham proteinde önemli bir fark yaratmadığı belirtilmiştir (Petersen ve ark., 2022). Oysa çalışmamızda, *W. hyalina*'dan farklı olarak, *W. arrhiza*'da farklı ışık yoğunluğu ve spektrum ham protein içeriğini değiştirmiş, 6.25 faktörüyle en yüksek protein %41.6 oranında kırmızı LED ışıkta, en az protein ise %34.5 oranında mor LED ışıkta yetiştirilen bitkide tespit edilmiştir (Şekil 4). Mevcut bulgularımız, LED ışıkların bitkinin büyümesi ve besin içeriği üzerinde olumlu etkileri olduğunu göstermiştir. Doğal ekosistemden (Yeşilirmak Deltası'ndan) toplanan *W. arrhiza*'nın protein içeriği oldukça düşük iken (%10), kontrollü koşullarda farklı ışık spektrumlarının, özellikle LED ışıkların protein miktarını artırdığı görülmüştür. Köksüz su mercimeğinin protein içeriğinin arttırılmasında LED ışığın floresan ışığa göre daha verimli, etkili ve avantajlı olduğunu söyleyebiliriz. Farklı LED ışıkların *W. arrhiza*'nın element (C, H, N, S) içeriğini değiştirdiği belirlenmiştir (Taş ve Şengüllendi, 2022). Dolayısıyla ışık kalitesi ve çeşidi, yetiştiriciliği yapılan bitki türlerinin nutrasötik özelliklerini geliştirerek biyoaktif bileşiklerin üretimini artırabilir. Aynı zamanda insan sağlığı üzerinde değerli etkileri olan primer ve sekonder metabolitlerin biyosentezini

de etkiler.

Ham protein hesaplamalarında dönüşüm faktörlerinin etkili olduğuna ve doğru katsayının kullanılması gerektiğine dikkat çekmek isteriz. Örneğin, Angell ve ark. (2016)'nın deniz algleri ile yaptıkları incelemede, protein içeriğine ilişkin tüm araştırmaların %52'sinde, azot tayininin ardından 6.25'lik bir dönüşüm faktörü (azottan proteine) kullanılarak hesaplamaların yapıldığı belirtilmiştir. Oysa ki bu faktörün, çoğu gıdada ve özellikle bitki gıdalarında protein içeriğinin olduğundan fazla tahmin edilmesine yol açtığını belgeleyen birçok çalışma vardır (Jones, 1931; Sosulski ve Imafidon, 1990; Mariotti ve ark., 2008). Gıda protein tayini için sıklıkla kullanılan dönüştürme faktörü 6.25, proteinlerdeki genel azot içeriğinin %16 olduğu ve gıdalardaki tüm azotun proteine bağlı olduğu varsayımına dayanmaktadır. Bununla birlikte, her aminoasitin kendine has nispi azot içeriğinden ve amino asit bileşimi gıda proteinleri arasında değiştiğinden, bunlar oldukça kaba varsayımlardır (Sosulski ve Imafidon, 1990). Ayrıca nitrat, amonyak, üre, nükleik asitler, serbest amino asitler, klorofiller ve alkaloidler gibi çok çeşitli başka bileşikler de azot içerir. Bu bileşiklere "protein olmayan azot" denir ve bunların nispi içerikleri genellikle sebzelerde hayvansal gıdalardan daha yüksektir (Sosulski ve Imafidon, 1990). Yıllar boyunca, 6.25'lik dönüştürme faktörünün çoğu durumda protein içeriğini fazla tahmin ettiği kanıtlanmıştır ve bu varyasyonları ayarlamak için türe özgü birkaç dönüştürme faktörü önerilmiştir (Jones, 1931; Sosulski ve Imafidon, 1990; Lourenço ve ark., 2002; Mariotti ve ark., 2008); Angell ve ark., 2016; Mæhre ve ark., 2018). *L. gibba*'da protein içeriğinin iki yöntemle (Kjeldahl ve bikinkoninik asit (BCA) yöntemi) karşılaştırıldığı çalışmada, Kjeldahl yöntemi ile %21.3, BCA yöntemi ile %20.5 ham protein hesaplanmıştır. Kjeldahl yöntemi ile elde edilen sonucun biraz fazla çıkması ve yöntemin daha basit olması nedeniyle, su mercimeğindeki protein içeriğini hesaplamak için 6.25 faktörünün yaygın olarak kullanılmasını haklı çıkardığı belirtilmiştir (Casal ve ark., 2000).

Farklı ortamlarda yetiştirilen su mercimeği *L. minor*'ün kuru maddede ham protein içeriğinin incelendiği bir araştırmada, su mercimeğinin sentetik N ortamında %28, atıksuda %25, yağmur suyunda %15 oranında protein içerdiği belirlenmiştir. Ham protein Kj-N faktörü olan 6,25 ile hesaplanmıştır. *L. minor*'ün TN içeriği Dumas ve Kjeldahl metodları kullanılarak karşılaştırıldığında ise, Kjeldahl azotunun CHN analizörü ile belirlenen toplam azottan anlamlı

derecede düşük olduğu tespit edilmiştir (Devlamynck ve ark., 2020). Bunun nedeni muhtemelen Dumas yıkımının, yanma aşamasında 1300°C sıcaklığa ulaştığı için Kjeldahl prosedürüyle karşılaştırıldığında organik azot bileşiklerini parçalamada biraz daha verimli olmasıdır.

Yapılan araştırmalar, Lemnaceae üyelerinin protein içeriğinin türe ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak değişebildiğini göstermektedir. Mevcut çalışmamızda farklı LED ışıklarda yetiştirilen *W. arrhiza*'nın protein içeriği, literatürde bildirilen diğer su mercimeği çeşitlerine (*Lemna* spp., *Spirodela polyrhiza*) benzer şekilde (Xu ve Shen, 2011; Nieuwland ve ark., 2021), hatta daha yüksek, kuru ağırlık bazında yaklaşık %35–%42 aralığında tespit edilmiştir. Farklı N-dönüşüm faktörleri kullanıldığında, *W. arrhiza*'nın ham protein içeriği; kırmızı ışıkta %33–42, mavi ışıkta %29–36, mor ışıkta %28–34, floresan ışıkta %21–24 aralığında hesaplanmıştır. Dolayısıyla *W. arrhiza*, diğer su mercimekleri içinde yüksek protein içeriğiyle dikkatleri üzerine çekmektedir. *Wolffia* spp. ile yapılan güncel araştırmalar, proteinin yanı sıra bu bitkinin gıda ve sağlık üzerinde oldukça etkili biyoaktif bileşenlere sahip olduğunu göstermiştir. Moleküler barkodlama ile tanımlanan *Wolffia* cinsine ait su mercimeklerinin 11 türünün tümü, insan beslenmesiyle ilgili bileşenler açısından araştırılmıştır (Appenroth ve ark., 2018). Modifiye Schenk-Hildebrandt medyumunda yetiştirilen ve dondurularak kurutulan *Wolffia* türlerinde toplam protein içeriğinin %20 ila %30 arasında değiştiği bildirilmiştir. WHO standartlarına göre, *Wolffia* türlerinde esansiyel amino asit içeriğinin okul öncesi çağındaki çocukların gereksinimlerine yakın veya daha yüksek olduğu, yağ içeriğinin düşük, ancak çoklu doymamış yağ asitleri fraksiyonunun toplam yağın %60'ının üzerinde olduğu ve çoğu türde omega 3 çoklu doymamış yağ asitleri içeriğinin omega 6 çoklu doymamış yağ asitlerinden daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bu veriler *Wolffia* türlerini insan sağlığı için fonksiyonel gıda kaynağı olarak üretmenin ve daha fazla araştırma yapmanın gerekli olduğunu göstermektedir.

Su mercimekleri (*Spirodela*, *Landoltia*, *Lemna*, *Wolffiella* ve *Wolffia*) ile yapılan araştırmalarda, yüksek protein içeriği ve amino asit spektrumunun kalitesinden dolayı bu bitkilerin birçok klonunun insan beslenmesi için uygun olduğu sonucuna varıldığı ifade edilmektedir (Appenroth ve ark., 2017; 2018). Yenilebilir bir su bitkisi olan *Wolffia globosa* su mercimeği (Mankai suyu; yüksek denetimli koşullar altında yetiştirilen su mercimeği), protein içeriği bakımından zengindir

(kuru maddenin >45%) ve dokuz temel ve altı koşullu amino asidin tamamını içermektedir (Zelicha ve ark., 2019). Son zamanlarda, insanlar arasında, *W. globosa*'daki temel amino asitlerin biyoyararlanımının, iyi bilinen hayvan (yumuşak peynir) ve bitki (bezelye) izo-protein kaynaklarına benzer olduğu ve bu bitkinin kaliteli proteininin yüksek olduğu vurgulanmıştır (Kaplan ve ark., 2019). Ayrıca sıçan modellerinde *W. globosa*'dan türetilen demirin biyoyararlı olduğu ve demir eksikliği anemisinin tedavisinde etkili olduğu bulunmuştur (Yaskolka Meir ve ark., 2019). Yeşil Akdeniz diyetinin kardiyometabolik risk üzerine etkisinin incelendiği randomize bir çalışmada, donmuş küpler şeklinde günde 100 g *W. globosa* akşam yemeğinde hayvansal proteinin yerine yeşil bitki bazlı bir protein içeceği olarak verilmiştir. Düzenli Mankai tüketiminin kısa süreli glikoz toleransını iyileştirdiği ve ayrıca insüline hassasiyette uzun vadeli iyileşmeyi teşvik ettiği belirtilmiştir. Çalışma sonucunda ceviz, yeşil çay ve Mankai ile desteklenmiş yeşil Akdeniz diyetinin yararlı kardiyometabolik etkileri artırabileceği ifade edilmiştir (Tsaban ve ark., 2021). Başka bir randomize çalışmada, *W. globosa* Mankai su mercimeğinin, potansiyel faydalı postprandiyal glisemik etkilerinin olduğu, yoğurtla karşılaştırıldığında daha düşük bir postprandiyal glikoz zirvesi ortaya çıkardığı ve gelişmekte olan bir alternatif bitki protein kaynağı olarak hizmet edebileceği belirtilmiştir (Zelicha ve ark., 2019).

Sonuç

Dünyanın en küçük çiçekli bitkisi olan köksüz su mercimeği *Wolffia*'nın, insan gıdası olarak değerlendirilebilecek ve çevresel iyileştirme için sürdürülebilir bir yaklaşım yaratmada muazzam bir potansiyele sahip olduğu görülmektedir. Bu bitki hızlı üreme oranına sahip olduğu için, Türkiye gibi subtropikal bölgelerde de kontrollü sera koşullarında, LED ışıklar kullanılarak biyokütle elde edilmesi nispeten kolay olabilir. Aynı zamanda, çeşitli yararlı biyoaktif bileşikler elde etmek için kolayca hasat edilip işlenebilir. Mevcut fitokomponentleri ve gıda değeriyle, özellikle yüksek protein içeriği ve temel amino asitleriyle, küresel iklim krizi kötüleştikçe, geleneksel mahsullere alternatif bir ürün olarak gelecekte bitki bazlı protein pazarında hızla yer alması beklenmektedir.

LED ışıklar altında köksüz su mercimeği yetiştirerek, bitkinin hızlı çoğalması ve fitokomponentlerinin artırılması sağlanabilir. Bulgular *W. arrhiza*'nın farklı dalga boyu ve yoğunluktaki LED ışıklar altında yetiştirildiğinde, bitkideki TN

miktarının dolayısıyla protein içeriğinin değiştiğini göstermiştir. Bu çalışmalar, LED ışıkların bitki yetiştirme teknolojisinde kullanımının, bitki büyümesi ve besin içeriği açısından faydalı olabileceğini göstermektedir. Farklı ışık kombinasyonları hazırlanarak *W. arrhiza*'nın protein içeriği daha da artırılabilir. Ancak, köksüz su mercimeği bitkisinin protein içeriğinin hangi LED spektrumunda daha yüksek olduğunu belirlemek için yapılmış bilimsel çalışmaların sayısı çok yetersizdir. Bu nedenle daha fazla araştırmaya ve sonuçların kesin olması için daha fazla veriye ihtiyaç vardır. Yine, yüksek renk doygunluğuna sahip, gerçek renkleri sunabilen, normal LED'lerde gözlenen aşırı mavi ışınmasını filtrelemesi, pürüzsüz ve kesintisiz olarak güneş ışığına daha yakın bir aydınlatma sağlaması gibi avantajlarından dolayı full spectrum LED teknolojisinin de denenerek bitkinin protein içeriğinin ve fitokimyasallarının değişimi izlenebilir.

Bitkilerde protein miktarının belirlenmesine yönelik birçok metot bulunmaktadır ve bu metotların hepsinin avantaj ve dezavantajları vardır. Dumas metodunun Kjeldahl metoduna kıyasla ağır kimyasal maddelerle çalışmaya ihtiyaç duyulmaması, sıvı, katı veya yarı katı haldeki her türlü gıda maddesinde kolaylıkla uygulanabilir ve çok kısa bir sürede sonuç alınabilir olması avantajlı yönleridir. Fakat Dumas metodunun gıda içindeki proteinlerin dışındaki diğer tüm N formlarına da duyarlı olması dezavantajdır. Bu nedenle, çalışmamızda su mercimeği proteini için "ham protein" ifadesi kullanılmıştır. Doğru karşılaştırma yapabilmek için analitik yöntemin doğru seçimi önemlidir. Bu çalışmada TN analizine dayalı protein tayininde, türe özgü N-protein dönüşüm faktörleri kullanıldığında veya kullanılmadığında farklı sonuçlar elde edildiği, LED ışıkların protein içeriğini artırdığı ve en yüksek proteinin kırmızı LED ışıkta yetiştirilen *W. arrhiza*'da olduğu sonucuna varılmıştır.

Hayvansal kaynaklı protein üretiminin birçok ekonomik, sağlık ve çevresel dezavantajı vardır. Azalan doğal kaynaklar ve artan dünya nüfusu nedeniyle, hayvansal protein talebini sadece geleneksel yöntemlerle karşılamak zordur. En pahalı proteinler hayvansal kaynaklı olanlardır. Dünya çapında et fiyatları yükseldikçe, alternatif proteinlerin insan diyetine sistematik olarak dahil edilmesi konusu daha da acil hale gelmektedir. Bu nedenle su mercimeği proteini çevre dostu, sürdürülebilir ve alternatif bitki proteini kaynağı gibi görünmektedir. Su mercimekleri, özellikle *Wolffia* türleri, sahip olduğu nutrasötik ve farmasötik içeriğiyle insan gıdası olarak umut vericidir ve ülke ekonomisine katma değerli

ürünler üretme potansiyeline sahiptir. *Wolffia*, üzerinde daha fazla bilimsel araştırmalar yapmaya değer bir su bitkisidir.

Etik Standartlar ile Uyumluluk

Çıkar çatışması: Yazarlar herhangi bir çıkar çatışmasının olmadığını beyan eder.

Etik kurul izni: Araştırma niteliği bakımından etik izin gerektirmemektedir.

Finansal destek: Bu araştırma, Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: B-2210.

Teşekkür: Türü tanımlayan ve doğal ortamdan köksüz su mercimeği örneklemede yardımcı olan Dr. Halim TOPALDEMİR'e teşekkür ederiz.

Açıklama: -

Kaynaklar

Angell, A.R., Mata, L., de Nys, R., Paul, N.A. (2016). The protein content of seaweeds: A universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. *Journal of Applied Phycology*, 28, 511–524.
<https://doi.org/10.1007/s10811-015-0650-1>

Appenroth, K.J., Sree, K. S., Bog, M., Ecker, J., Seeliger, C., Böhm, V., . . . Tolzin-Banasch, K. (2018). Nutritional value of the duckweed species of the genus *Wolffia* (Lemnaceae) as human food. *Frontiers in Chemistry*, 6, 483.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00483>

Arslan Günal, S., Taş, B. (2022). Uzay çalışmalarında biyorejeneratif yaşam destek sistemleri için potansiyel bir tür: Dünyanın en küçük spermatofiti, köksüz su mercimeği (*Wolffia arrhiza*). International Scientific Research Congress Dedicated to the 30th Anniversary of Baku Eurasia University, Proceedings Book, 305–316.

Bog, M., Appenroth, K.J., Sree, K.S. (2019). Duckweed (Lemnaceae): Its molecular taxonomy. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, 117.
<https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00117>

Bog, M., Sree, K.S., Fuchs, J., Hoang, P.T., Schubert, I., Kuever, J., . . . Appenroth, K.J. (2020). A taxonomic revision of *Lemna* sect. *Uninerves* (Lemnaceae). *Taxon*, 69(1), 56–66.
<https://doi.org/10.1002/tax.12188>

Casal, J., Vermaat, J., Wiegman, F. (2000). A test of two methods for plant protein determination using duckweed. *Aquatic Botany*, 67(1), 61–67.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(99\)00093-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(99)00093-5)

Cui, W., Cheng, J. (2015). Growing duckweed for biofuel production: A review. *Plant Biology*, 17, 16–23.
<https://doi.org/10.1111/plb.12216>

Daun, J.K., DeClercq, D.R. (1994). Comparison of combustion and Kjeldahl methods for determination of nitrogen in oilseeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71, 1069–1072.
<https://doi.org/10.1007/BF02675898>

Devlamynck, R., de Souza, M.F., Bog, M., Leenknecht, J., Eeckhout, M., Meers, E. (2020). Effect of the growth medium composition on nitrate accumulation in the novel protein crop *Lemna minor*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 206, 111380.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111380>

Diwan, F. (2023). Duckweed and its broad-spectrum applications. Climate Survival Solutions, Inc., and Climate Survival Solutions Pvt. Ltd., 1–18.

Etheridge, R., Pesti, G., Foster, E. (1998). A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on samples typical of an animal nutrition analytical laboratory. *Animal Feed Science and Technology*, 73(1-2), 21–28.
[https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(98\)00136-9](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(98)00136-9)

Hoffland, E., Dicke, M., Van Tintelen, W., Dijkman, H., Van Beusichem, M.L. (2000). Nitrogen availability and defense of tomato against two-spotted spider mite. *Journal of Chemical Ecology*, 26, 2697–2711.
<https://doi.org/10.1023/A:1026477423988>

Jones, D.B. (1931). Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins. Circular No. 18, US Department of Agriculture, Washington, D.C.

Kaplan, A., Zelicha, H., Tsaban, G., Meir, A.Y., Rinott, E., Kovsan, J., . . . Shai, I. (2019). Protein bioavailability of *Wolffia globosa* duckweed, a novel aquatic plant—a randomized controlled trial. *Clinical Nutrition*, 38(6), 2576–2582.
<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.12.009>

- Kjeldahl, J. (1883).** Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen körpern. *Zeitschrift für analytische Chemie*, 22(1), 366–382.
<https://doi.org/10.1007/BF01338151>
- Landolt, E., Kandeler, R. (1987).** The family of Lemnaceae—a monographic study, 2. Biosystematic Investigations in the Family of Duckweeds (Lemnaceae). Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der ETH. Stiftung Rübél, Zurich.
- Lourenço, S.O., Barbarino, E., De-Paula, J.C., Pereira, L.O., Marquez, U.M.L. (2002).** Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycological Research*, 50(3), 233–241.
<https://doi.org/10.1046/j.1440-1835.2002.00278.x>
- Mæhre, H.K., Dalheim, L., Edvinsen, G.K., Elvevoll, E.O., Jensen, I.J. (2018).** Protein determination—method matters. *Foods*, 7(1), 5.
<https://doi.org/10.3390/foods7010005>
- Mariotti, F., Tomé, D., Mirand, P.P. (2008).** Converting nitrogen into protein—beyond 6.25 and Jones' factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(2), 177–184.
<https://doi.org/10.1080/10408390701279749>
- Muñoz-Huerta, R.F., Guevara-Gonzalez, R.G., Contreras-Medina, L.M., Torres-Pacheco, I., Prado-Olivarez, J., Ocampo-Velazquez, R.V. (2013).** A review of methods for sensing the nitrogen status in plants: Advantages, disadvantages and recent advances. *Sensors*, 13(8), 10823–10843.
<https://doi.org/10.3390/s130810823>
- Nieuwland, M., Geerdink, P., Engelen-Smit, N.P., Van Der Meer, I.M., America, A.H., Mes, J.J., . . . Mulder, W.J. (2021).** Isolation and gelling properties of duckweed protein concentrate. *ACS Food Science & Technology*, 1(5), 908–916.
<https://doi.org/10.1021/acscfoodscitech.1c00009>
- Paolacci, S., Harrison, S., Jansen, M.A. (2018).** The invasive duckweed *Lemna minuta* Kunth displays a different light utilisation strategy than native *Lemna minor* Linnaeus. *Aquatic Botany*, 146, 8–14.
<https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2018.01.002>
- Petersen, F., Demann, J., Restemeyer, D., Olf, H.W., Westendarp, H., Appenroth, K.J., Ulbrich, A. (2022).** Influence of light intensity and spectrum on duckweed growth and proteins in a small-scale, re-circulating indoor vertical farm. *Plants*, 11(8), 1010.
<https://doi.org/10.3390/plants11081010>
- Sinfield, J.V., Fagerman, D., Colic, O. (2010).** Evaluation of sensing technologies for on-the-go detection of macro-nutrients in cultivated soils. *Computers and Electronics in Agriculture*, 70(1), 1–18.
<https://doi.org/10.1016/j.compag.2009.09.017>
- Sosulski, F.W., Imafidon, G.I. (1990).** Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors for animal and plant foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(6), 1351–1356.
<https://doi.org/10.1021/jf00096a011>
- Sree, K.S., Sudakaran, S., Appenroth, K.J. (2015).** How fast can angiosperms grow? Species and clonal diversity of growth rates in the genus *Wolffia* (Lemnaceae). *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(10).
<https://doi.org/10.1007/s11738-015-1951-3>
- Stewart, J.J., Adams III, W.W., Escobar, C.M., López-Pozo, M., Demmig-Adams, B. (2020).** Growth and essential carotenoid micronutrients in *Lemna gibba* as a function of growth light intensity. *Frontiers in Plant Science*, 11, 480.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00480>
- Taş, B., Şengüllendi, F.T. (2022a).** Algal biyoteknoloji: Besleyici ve fonksiyonel gıdalar. Ziraat, Orman ve Su Ürünleri Alanında Yeni Trendler, Duvar Yayınları; ISBN: 978-625-8261-57-8, 125–149.
- Taş, B., Şengüllendi, F.T. (2022b).** Effect of different led lights on the element content of rootless duckweed. 7th Asia Pacific International Modern Sciences Congress, November 4-5, 2022/Jakarta, Indonesia, VII - Proceedings Book, 163–173.
- Taş, B., Topaldemir, H. (2021).** Assessment of aquatic plants in the Miliç coastal wetland (Terme, Samsun, Turkey). *Review of Hydrobiology*, 14(1-2), 1–23.
- Thompson, M., Owen, L., Wilkinson, K., Wood, R., Damant, A. (2002).** A comparison of the Kjeldahl and Dumas methods for the determination of protein in foods, using data from a proficiency testing scheme. *Analyst*, 127(12), 1666–1668.
<https://doi.org/10.1039/b208973b>

Tippery, N.P., Les, D.H. (2020). Tiny plants with enormous potential: Phylogeny and evolution of duckweeds. In *The Duckweed Genomes* (pp. 19–38): Springer.

https://doi.org/10.1007/978-3-030-11045-1_2

Tsaban, G., Meir, A.Y., Rinott, E., Zelicha, H., Kaplan, A., Shalev, A., ... Shai, I. (2021). The effect of green Mediterranean diet on cardiometabolic risk; a randomised controlled trial. *Heart*, 107(13), 1054–1061.

<https://doi.org/10.1136/heartjnl-2020-317802>

van Dijk, M., Morley, T., Rau, M.L., Saghai, Y. (2021). A meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010–2050. *Nature Food*, 2(7), 494–501.

<https://doi.org/10.1038/s43016-021-00322-9>

Wedge, R.M., Burris, J.E. (1982). Effects of light and temperature on duckweed photosynthesis. *Aquatic Botany*, 13, 133–140.

[https://doi.org/10.1016/0304-3770\(82\)90047-X](https://doi.org/10.1016/0304-3770(82)90047-X)

Wiles, P.G., Gray, I.K., Kissling, R.C. (1998). Routine analysis of proteins by Kjeldahl and Dumas methods: review and interlaboratory study using dairy products. *Journal of AOAC International*, 81(3), 620–632.

<https://doi.org/10.1093/jaoac/81.3.620>

WHO (World Health Organization) (1970). Requirements of ascorbic acid, vitamin D, vitamin B-12, folate, and iron. World Health Organization Technical Report, 1–452.

Xu, J., Cui, W., Cheng, J.J., Stomp, A.M. (2011). Production of high-starch duckweed and its conversion to bioethanol. *Biosystems Engineering*, 110(2), 67–72.

<https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2011.06.007>

Xu, J., Shen, G. (2011). Growing duckweed in swine wastewater for nutrient recovery and biomass production. *Bioresource Technology*, 102(2), 848–853.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.003>

Xu, J., Shen, Y., Zheng, Y., Smith, G., Sun, X.S., Wang, D., ... Li, Y. (2022). Duckweed (Lemnaceae) for potentially nutritious human food: A review. *Food Reviews International*, 1–15.

<https://doi.org/10.1080/87559129.2021.2012800>

Yaskolka Meir, A., Tsaban, G., Zelicha, H., Rinott, E., Kaplan, A., Youngster, I., ... Shai, I. (2019). A green-Mediterranean diet, supplemented with *Mankai duckweed*, preserves iron-homeostasis in humans and is efficient in reversal of anemia in rats. *The Journal of Nutrition*, 149(6), 1004–1011.

<https://doi.org/10.1093/jn/nxy321>

Yin, Y., Yu, C., Yu, L., Zhao, J., Sun, C., Ma, Y., & Zhou, G. (2015). The influence of light intensity and photoperiod on duckweed biomass and starch accumulation for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 187, 84–90.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.097>

Zelicha, H., Kaplan, A., Yaskolka Meir, A., Tsaban, G., Rinott, E., Shelef, I., ... Shai, I. (2019). The effect of *Wolffia globosa* Mankai, a green aquatic plant, on postprandial glycemic response: a randomized crossover controlled trial. *Diabetes Care*, 42(7), 1162–1169.

<https://doi.org/10.2337/dc18-2319>

Ziegler, P., Adelman, K., Zimmer, S., Schmidt, C., Appenroth, K.J. (2015). Relative in vitro growth rates of duckweeds (Lemnaceae)-the most rapidly growing higher plants. *Plant Biology*, 17, 33–41.

<https://doi.org/10.1111/plb.12184>