



Bitkisel yağ olarak değerlendirilebilen yağlı tohum ve meyvelerin posalarından protein konsantresi ve izolatlarının üretilmesi ve bunların değerlendirilmesi

Program Kodu: 3501

Proje No: 115O569

**Proje Yürütücüsü:
Yrd. Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN**

Araştırmacı(lar):

Yrd. Doç. Dr. Halime PEHLİVANOĞLU

...

Danışman(lar):

Prof. Dr. Hüseyin Hüsnü GÜNDÜZ

...

Bursiyer(ler):

Özgenur ÖZDEMİR

...

AĞUSTOS 2017
İSTANBUL

Önsöz

Gıda üretiminde kullanılan değerli bitkisel lifler, renk maddeleri ve proteinleri de içermek üzere birçok teknik ve biyolojik fonksiyonellik gösteren birçok katma değerli bileşen ülkemize ithalat yoluyla girmektedir. Buna bağlı olarak, bu ürünlerin maliyetleri artmakta, tedariği zorlaşmakta ve aynı zamanda hem firmalarımız hem de devletimiz için ek denetim/kontrol maliyetleri ortaya çıkmaktadır. Düşük maliyetli tarımsal ham maddeler ve/veya endüstriyel atıklar ve yenilikçi yaklaşımlar kullanılarak değerli gıda bileşenleri üretilmesi ülkemizin menfaatleri icabıdır.

Dolayısıyla, bu projede soğuk pres yağ üretiminde ortaya çıkan posalar kullanılarak protein konsantreleri üretilmiş ve bu konsantrelerin protein içeriğinin uygun teknolojik yaklaşımlarla oldukça geniş bir aralıkta (yaklaşık %30-90) seyretmesi dolayısıyla birçok endüstriyel ürüne uygun olması sağlanmıştır.

Söz konusu posalar ulusal bir üreticimizin (Neva Ltd., İstanbul) endüstriyel üretiminden alınarak değerlendirilmiştir. Bu numuneler arasında çörek otu, üzüm çekirdeği, kabak çekirdeği, fındık, susam, keten tohumu ve nar çekirdeği posaları bulunmaktadır.

Bu posalardan uygun sulu ve organik ekstraksiyon yöntemleri ile bitkisel proteinler üretilmiş ve üretilen protein konsantrelerinin teknolojik özellikleri detaylı olarak değerlendirilmiştir. Buna ek olarak, uygun muamelelerle (Maillard konjugasyonu, TGase enzimi ile muamele vs) bu proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin iyileştirilmesi hedeflenmiştir. Söz konusu muamelelere tabi olan ve olmayan bütün numuneler yine ulusal bir firmamızın (Polen Gıda, İstanbul) katkılarıyla ekmek üretiminde değerlendirilmiştir. Bu amaçla, normal ve gluten içermeyen ekmek formülasyonlarında söz konusu protein konsantrelerinden yararlanılmıştır. Bu yollar üretilen ekmeklerin de temel karakteristikleri incelenmiştir.

Dolayısıyla bu projede protein içeriği artırılmış ve/veya glutensiz olarak üretilmiş ekmeklerin kalitesini arttırmak amacıyla ulusal ham maddelerimizden ekonomik ve insan sağlığına uygun yöntemlerle üretilmiş bitkisel protein ürünlerinden yararlanılmıştır. Bu bağlamda ulusal bir firmamızın yan ürünü diğerinin ticarileşmesine katkı verebileceği son ürünlerde sınanmıştır. İlgili firmalarla ortak çalışmalar olanaklar ölçüsünde sürdürülmekte ve bu projenin sürdürülebilirliğini sağlamak amacıyla ticarileşmeye uygun yeni ürün çalışmaları planlanmaktadır.

Bu proje TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Proje ekibi bu destek dolayısıyla TÜBİTAK'a müteşekkirdir.

| | |
|---|---|
| İçindekiler | |
| Önsöz..... | ii |
| Tablo listesi..... | vi |
| Şekil listesi..... | ix |
| Özet..... | xii |
| Abstract..... | xiii |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. LİTERATÜR ÖZETİ..... | 3 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 11 |
| 3.1 Bitkisel posalardan proteinlerin izolasyonu..... | 11 |
| 3.2 Posalarda kalan yağın analizi ve uzaklaştırılması..... | 11 |
| 3.3 Posaların alkali ve asidik çözeltilerle muamele edilmesi (izoelektrik çökeltme)..... | 12 |
| 3.4 Tuz çözeltileriyle ekstraksiyon ve diyaliz..... | 12 |
| 3.5 Protein miselleri oluşturarak ayırım sağlanması..... | 12 |
| 3.6 İzole edilen proteinlerin konsantrasyonu ve toz halde elde edilmesi..... | 12 |
| 3.6.1 Membran prosesleri..... | 12 |
| 3.6.2 Liyofilizasyon..... | 13 |
| 3.7 Numunelerin temel karakterizasyonu..... | 13 |
| 3.8 Numunelerde protein içeriği (Kjeldahl analizi)..... | 13 |
| 3.9 Proteinlerin moleküler büyüklüklerinin analizi (SDS-PAGE)..... | 13 |
| 3.10 Protein izolatları ve konsantrelerinin fonksiyonel özelliklerinin değerlendirilmesi..... | 14 |
| 3.10.1 Su ve yağ tutma kapasitesi..... | 14 |
| 3.10.2 Çözünürlük..... | 14 |
| 3.10.3 Yüzey gerilimi..... | 14 |
| 3.10.4 Köpük ve emülsiyon oluşturma kapasitesi..... | 15 |
| 3.10.5 Protein izolatlarının şişme kapasitesi..... | Hata! Yer işareti tanımlanmamış. |
| 3.11 Proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin iyileştirilmesi..... | 15 |
| 3.11.1 Maillard konjugatlarının hazırlanması..... | 16 |
| 3.11.2 Transglutaminaz enzimi ile muamele edilmesi..... | 16 |
| 3.12 Ekmeklik unlar, protein takviyesi içeren unlar ile bu ürünlerden üretilen ekmeklerin analizleri..... | 17 |
| 3.13 İstatistiksel analiz..... | 18 |
| 4. BULGULAR..... | 18 |
| 4.1 Projenin genel koordinasyonu ve ön hazırlıklar..... | 18 |
| 4.2 Çörek otu proteinlerinin üretilmesi ve fonksiyonel özelliklerinin değerlendirilmesi..... | 20 |
| 4.2.1 Ekstraksiyon yöntemlerinin çörek otu protein konsantrelerine etkisi..... | 20 |
| 4.2.2 Protein konsantrelerinde moleküler büyüklük dağılımı analizi (SDS-PAGE)..... | 21 |
| 4.2.3 Protein konsantrelerinin fonksiyonel özellikleri..... | 22 |
| 4.2.3.1 Çözünürlük..... | 22 |

| | |
|--|----|
| 4.2.3.2 Su ve yağ tutma kapasitesi | 23 |
| 4.2.3.3 Köpük oluşturma (köpürme) kapasitesi | 25 |
| 4.2.3.4 Emülsifikasyon aktivite indeksi (EAI) ve emülsiyon kararlılığı..... | 27 |
| 4.2.3.5 Dinamik yüzey geriliminin ölçülmesi (Drop shape tensiometry)..... | 28 |
| 4.3 Nar çekirdeği, kabak çekirdeği ve üzüm çekirdeği proteinlerinin üretilmesi ve fonksiyonel özelliklerinin değerlendirilmesi | 29 |
| 4.3.1 Nar çekirdeği, kabak çekirdeği ve üzüm çekirdeği protein konsantrelerinin temel fizikokimyasal içeriği | 29 |
| 4.3.2 Nar çekirdeği, kabak çekirdeği ve üzüm çekirdeği protein konsantrelerinin karakterizasyonu | 29 |
| 4.3.3 Nar çekirdeği, kabak çekirdeği ve üzüm çekirdeği protein konsantrelerinin temel fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi | 31 |
| 4.3.3.1 Çözünürlük | 31 |
| 4.3.3.2 Su ve yağ tutma kapasitesi | 32 |
| 4.3.3.3 Köpük kapasitesi ve stabilitesi | 33 |
| 4.3.3.4 Emülsiyon oluşturma kapasitesi ve stabilitesi | 33 |
| 4.3.3.5 Dinamik yüzey geriliminin ölçülmesi (Drop shape tensiometry)..... | 34 |
| 4.4 Fındık ve susam proteinlerinin üretilmesi ve fonksiyonel özelliklerinin değerlendirilmesi. | 34 |
| 4.5 Ketan tohumu proteinlerinin üretilmesi ve fonksiyonel özelliklerinin değerlendirilmesi..... | 36 |
| 4.6 Protein konsantrelerinin detaylı tensiyometrik analizi..... | 39 |
| 4.7 Protein konsantrelerinin fonksiyonel özelliklerinin iyileştirilmesi | 39 |
| 4.7.1 Maillard konjugasyonu | 39 |
| 4.7.1.1 Maillard konjugasyonuna uğramış numunelerin elektroforetik analizi..... | 40 |
| 4.7.1.2 Köpük kapasitesi ve kararlılığı | 42 |
| 4.7.1.3 RP-HPLC-RID Analizi | 44 |
| 4.7.2 Transglutaminaz muamelesi | 46 |
| 4.7.2.1. Ticari transglutaminaz enziminin enzim aktivitesinin belirlenmesi | 46 |
| 4.7.2.2. Transglutaminaz ile muamele edilmiş protein konsantrelerinin SDS-PAGE analizi .. | 47 |
| 4.7.2.3. Transglutaminaz ile muamele edilmiş protein konsantrelerinin köpük kapasitesi ve stabilitesi | 48 |
| 4.7.2.4. Transglutaminaz ile muamele edilmiş protein konsantrelerinin jelleşme özelliği..... | 50 |
| 4.8 Protein konsantrelerinin ve fonksiyonel özellikleri iyileştirilmiş hallerinin ekmek formülasyonlarında kullanılması | 51 |
| 4.8.1 Normal ekmek çalışması | 51 |
| 4.8.1.1 Formülasyon..... | 51 |
| 4.8.1.2 Ekmek yapımı..... | 52 |
| 4.8.1.3 Kimyasal kompozisyon | 53 |
| 4.8.1.4 Proteinle zenginleştirilen unların analitik ölçümleri | 54 |
| 4.8.1.5 Protein ilavesi yapılmış unların extensograf analizi | 54 |
| 4.8.1.6 Protein ilavesi yapılmış unların farinograf analizi | 55 |

| | |
|--|----|
| 4.8.1.7 Protein ilavesi yapılmış ekmeklerin renk analizi | 56 |
| 4.8.1.8 Protein ilavesi yapılmış ekmeklerin tesktür analizi | 57 |
| 4.8.1.9 Mikrobiyolojik analizler..... | 61 |
| 4.8.2 Glutensiz ekmek çalışması | 65 |
| 4.8.2.1 Formülasyon..... | 65 |
| 4.8.2.2 Glutensiz ekmek yapımı | 66 |
| 4.8.2.3 Glutensiz ekmeklerin hacim analizi..... | 68 |
| 4.8.2.3 Glutensiz ekmeklerin tesktür analizi..... | 69 |
| 4.8.2.4 Glutensiz ekmeklerin renk parametreleri..... | 70 |
| 4.8.3 İyileştirilmiş özellikleri olan protein numuneleri ile ekmek üretimi ve ürün karakterizasyonu | 71 |
| 4.8.3.1 Formülasyon..... | 71 |
| 4.8.3.2. İyileştirilmiş özellikleri olan protein numuneleri ile üretilmiş ekmeklerin hacim analizi | 73 |
| 4.8.3.3. İyileştirilmiş özellikleri olan protein numuneleri ile üretilmiş ekmeklerin tekstür analizi | 74 |
| 4.8.3.4. İyileştirilmiş özellikleri olan protein numuneleri ile üretilmiş ekmeklerin renk parametreleri..... | 75 |
| 4.9 Elde edilen proteinlerin proteomik analizi ve muhtemel biyoaktivitelerinin incelenmesi ... | 75 |
| 5. TARTIŞMA/SONUÇ | 76 |
| Referanslar..... | 77 |
| Ekler..... | 82 |

Tablo listesi

- Tablo 1.** Numunelerin protein (%), nem (%) ve kül miktarlarının hegzan ekstraksiyonundan önce ve sonra belirlenmesi.....22
- Tablo 2.** Protein izolatlarının protein, nem ve kül analiz sonuçları. (AE-IP: Alkali ekstraksiyon izolelektrik çöktürme, SE; Tuzla çöktürme, MP: misel oluşturarak çöktürme)....31
- Tablo 3.** AE-IP, SE ve MP yöntemleriyle hazırlanan kabak çekirdeği, nar çekirdeği ve üzüm çekirdeği protein konsantrelerinin çözünürlükleri (%).34
- Tablo 4.** İzoelektrik çöktürme (AE-IP), tuzla ekstraksiyon ve diyaliz (SE), misel oluşturarak çöktürme (MP) yöntemleriyle elde edilen protein izolatlarının % su ve yağ tutma kapasitesi.....34
- Tablo 5.** İzoelektrik çöktürme (AE-IP), tuzla ekstraksiyon ve diyaliz (SE), misel oluşturarak çöktürme (MP) yöntemleriyle elde edilen protein izolatlarının % köpük oluşturma kapasitesi.....35
- Tablo 6.** İzoelektrik çöktürme (AE-IP), tuzla ekstraksiyon ve diyaliz (SE), misel oluşturarak çöktürme (MP) yöntemleriyle elde edilen protein izolatlarının emülsiyon aktivite indeksi (EAI).....35
- Tablo 7.** Fındık ve susam posalarından elde edilen protein konsantrelerinin nem, kül ve protein değerleri.....37
- Tablo 8.** Fındık ve susam posası proteini konsantrelerinin su ve yağ tutma kapasitesi değerleri. Değerler, standart sapmaları ile birlikte verilmiştir.....37
- Tablo 9.** Fındık ve susam posası protein konsantrelerinin köpük oluşturma kapasitesi değerleri.....37
- Tablo 10.** Susam posası protein konsantrelerinin emülsiyon aktivite ve stabilite indeksi kapasite değerleri.....38
- Tablo 11.** Fındık posası protein konsantrelerinin emülsiyon aktivite ve stabilite indeksi kapasite değerleri.....38
- Tablo 12.** Ham maddelerin %protein ve %nem tayin sonuçları.....38
- Tablo 13.** Protein izolatlarının protein, nem ve kül analiz sonuçları. (AE-IP: Alkali ekstraksiyon-izolelektrik çöktürme; SE: Tuzla çöktürme; MP: misel oluşturarak çöktürme).....38
- Tablo 14.** Protein izolatlarının su ve yağ tutma kapasitesi (AE-IP: Alkali ekstraksiyon-izolelektrik çöktürme; SE: Tuzla çöktürme; MP: misel oluşturarak çöktürme).....39

| | |
|--|----|
| Tablo 15. İzoelektrik çöktürme (AE-IP), tuzla ekstraksiyon ve diyaliz (SE), misel oluşturarak çöktürme (MP) yöntemleriyle elde edilen protein izolatlarının % çözünürlük değerleri..... | 40 |
| Tablo 16. İzoelektrik çöktürme (AE-IP), tuzla ekstraksiyon ve diyaliz (SE), misel oluşturarak çöktürme (MP) yöntemleriyle elde edilen protein izolatlarının emülsiyon aktivite index değerleri..... | 40 |
| Tablo 17. İzoelektrik çöktürme (AE-IP), tuzla ekstraksiyon ve diyaliz (SE), misel oluşturarak çöktürme (MP) yöntemleriyle elde edilen protein izolatlarının % köpük oluşturma kapasitesi..... | 40 |
| Tablo 18. Maillard konjugasyonu sırasında Çörekotu protein konsantreleri ve glukoz karışımlarında glukoz bağlama (%) ve fruktoz oluşum (%) karakteristikleri. Maillard reaksiyonu 100°C’de ve protein:glukoz oranı olarak 1:2 oranında yürütülmüştür..... | 47 |
| Tablo 19. Ekmek reçetesi. BC: çörek otu; GS: üzüm çekirdeği; PS: kabak çekirdeği..... | 53 |
| Tablo 20. Protein takviyesi yapılmış ekmek ve unun kimyasal kompozisyonu..... | 55 |
| Tablo 21. Protein takviyesi yapılan unların analitik kalite parametreleri..... | 56 |
| Tablo 22. Protein takviyesi yapılmış unların extensograf parametreleri..... | 57 |
| Tablo 23. Protein takviyesi yapılmış unların farinograf parametreleri..... | 57 |
| Tablo 24. Ekmek içinin renk parametreleri..... | 59 |
| Tablo 25. Dilisyon derecelerine göre toplam <i>E.coli</i> sayısı..... | 63 |
| Tablo 26. Dilisyon derecelerine göre toplam <i>B.cereus</i> koloni sayısı..... | 64 |
| Tablo 27. Dilisyon derecelerine göre <i>C.perfingens</i> toplam koloni sayısı..... | 64 |
| Tablo 28. Dilisyon derecelerine göre MAB toplam koloni sayısı..... | 65 |
| Tablo 29. Dilisyon derecelerine göre toplam küf-maya koloni sayısı..... | 66 |
| Tablo 30. Glutensiz ekmek formülasyonu. (BCB: çörek otu ekmeği; GSB: üzüm çekirdeği ekmeği; PSB: kabak çekirdeği ekmeği; BCPC: çörek otu protein konsantresi; GSPC: üzüm çekirdeği protein konsantresi; PSPC: kabak çekirdeği protein konsantresi).... | 67 |
| Tablo 31. Glutensiz ekmeklerin hacim parametreleri..... | 71 |
| Tablo 32. Glutensiz ekmeğin renk parametreleri (BC: çörek otu; GS: üzüm çekirdeği; PS: kabak çekirdeği)..... | 73 |



Tablo 33. Glutensiz ekmek formülasyonları. (BC: çörek otu; GS: üzüm çekirdeği; PS: kabak çekirdeği; BCPC: çörek otu protein konsantresi; GSPC: üzüm çekirdeği protein konsantresi; PSPC: kabak çekirdeği protein konsantresi).....74

Tablo 34. İyileştirilmiş özellikleri olan protein numuneleri ile üretilmiş glutensiz ekmeklerin hacim sonuçları.....75

Tablo 35. Glutensiz ekmeğin renk parametreleri (BC: çörek otu; GS: üzüm çekirdeği; PS: kabak çekirdeği).....78

| | |
|--|----|
| Şekil listesi | |
| Şekil 1. Ultrafiltrasyon cihazı (Sartorius Masterflex Ultrafiltration System)..... | 20 |
| Şekil 2. Elektroforez ünitesi (MiniProtean Tetra Cell)..... | 20 |
| Şekil 3. Tensiyometre (OneAttension Theta)..... | 21 |
| Şekil 4. Liyofilizatör (Teknosem TRS 2/2V)..... | 21 |
| Şekil 5. Çörekotu proteinlerinin elektroforetik analizi (SDS-PAGE)..... | 24 |
| Şekil 6. Proteinlerin çözünürlük özellikleri..... | 25 |
| Şekil 7. Protein konsantrelerinin WHC değerleri..... | 26 |
| Şekil 8. Protein konsantrelerinin OHC değerleri..... | 27 |
| Şekil 9. Zamana ve ekstraksiyon yöntemine bağlı olarak köpürme kapasitesinin incelenmesi..... | 28 |
| Şekil 10. Mevcut protein konsantrelerinin EAI değerleri..... | 29 |
| Şekil 11. Protein numuneleri için yüzey geriliminin zamana bağlı değişimi..... | 30 |
| Şekil 12. Üzüm çekirdeği protein izolatlarının SDS-PAGE görüntüsü (%1). 1. Şerit izoelektrik çökeltme, 2. Şerit, tuzla muamele..... | 32 |
| Şekil 13. Kabak çekirdeği (sol taraf) ve nar çekirdeği (sağ taraf) protein konsantresi SDS-PAGE analizi (%1). 1.şerit AE-IP, 2.şerit SE, 3.şerit MP..... | 33 |
| Şekil 14. Kabak çekirdeği, nar çekirdeği ve üzüm çekirdeği protein konsantresi havasız yüzey gerilimi (mN/m) ölçümleri. A: Kabak çekirdeği, nar çekirdeği; B: Üzüm çekirdeği (%0,1)..... | 36 |
| Şekil 15. İyot testi sonucunda izolatlarda gözlenen renk değişimleri..... | 39 |
| Şekil 16. Protein konsantrelerinin (çörekotu) Maillard konjugasyonuna uğramış ya da uğramamış hallerinin elektroforetik analizi. Deneyle native ya da SDS-PAGE yöntemlerinden yararlanılmıştır..... | 43 |
| Şekil 17. Çörekotu protein konsantreleri ile hazırlanan köpüklerin köpüklenme kapasitesi (%) ve stabilitesi (pH 3-7, 0-120 min). Sonuçlar kazeinat (2%) ile karşılaştırılmıştır..... | 44 |
| Şekil 18. Çörekotu protein konsantreleri ile hazırlanan Maillard konjugatlarının köpüklenme kapasitesi (%) ve stabilitesi (pH 3-7, 0-120 min). Veriler şeker: glukoz oranına (1: 1, 1: 2 ve 1: 4) oranına uygun olarak farklı pH değerlerinde hazırlanmıştır..... | 45 |

- Şekil 19.** Protein:karbonhidrat oranı olarak 1:2 kullanıldığında pH (3-7) değerinin fonksiyonu olarak çörekotu proteini konsantrelerinin (% 2) laktoz veya maltodekstrin ile oluşturulan konjugatları ile hazırlanan köpüklerin kapasitesi (%) ve stabilitesi. Tepkime süresi 0-30 dakika ve depolama süresi 0-120 dakika olarak belirlenmiştir.....46
- Şekil 20.** Çörekotu protein konsantreleri ve glukoz karışımlarından oluşan Maillard ürünlerinin RP-HPLC-RID analizi. Protein:glukoz oranı bütün durumlarda 1:2'dir. **(A)** 25 °C, **(B)** 100 °C, 15 dakika, **(C)** 100 °C, 30 dakika.....48
- Şekil 21.** TGase ile muamele edilen çörek otu, kabak çekirdeği ve üzüm çekirdeği protein konsantrelerinin SDS-PAGE analizi. (şerit 1: çörek otu protein konsantresi; şerit 2: kabak çekirdeği protein konsantresi; şerit 3: üzüm çekirdeği protein konsantresi).....49
- Şekil 22.** TGase ile muamele edilmiş çörek otu, kabak çekirdeği ve üzüm çekirdeği protein konsantrelerinin köpük kapasitesi ve stabilitesi.....51
- Şekil 23.** TGase muamelesi yapılan protein konsantrelerinin (%5) farklı pH değerlerinde jelleşme özelliği.....52
- Şekil 24.** Ekmek yapım prosesi.....54
- Şekil 25.** Protein takviyesi yapılmış unların farinogramları. A: katkısız un (kontrol); B: çörek otu protein konsantresi ilaveli un; C: üzüm çekirdeği protein konsantresi ilaveli un; D: kabak çekirdeği protein konsantresi ilaveli un.....58
- Şekil 26.** Protein takviyesi yapılmış ekmeklerin tekstürel parametreleri. Kontrol (KO), çörek otu (ÇO), üzüm çekirdeği (ÜÇ), kabak çekirdeği (KÇ).....60
- Şekil 27.** Farklı fermentasyon sürelerine sahip ekmeklerin piştikten sonra görünümü. Fermentörde kalma süreleri; A: 80 dk; B: 110 dk; C: 140 dk.....62
- Şekil 28.** *E.coli* ekimi yapılan petri kaplarının görüntüsü.....63
- Şekil 29.** *B.cereus* ekimi yapılan petri kaplarının görüntüsü.....64
- Şekil 30.** *C.perfingens* ekimi yapılan petri kaplarının görüntüsü.....65
- Şekil 31.** MAB ekimi yapılan petri kaplarının görüntüsü.....65
- Şekil 32.** Küf-maya ekimi yapılan petri kaplarının görüntüsü.....66
- Şekil 33.** Glutensiz ekmek yapımı prosesi.....68
- Şekil 34.** Çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği protein konsantresi ile zenginleştirilmiş ve farklı su oranları eklenerek pişirilmiş glutensiz ekmek görüntüsü. (A: Aynı su oranı; B: Su oranı %8 artırılmış C: Su oranı %15 artırılmış).....70

Şekil 35. Protein ilavesiz glütensiz ekmek ve proteinle zenginleştirilmiş glütensiz ekmeklerin tekstür parametreleri. BC: çörek otu; GS: üzüm çekirdeği; PS: kabak çekirdeği protein konsantresi ilave edilmiş glütensiz ekmekler.....72

Şekil 36. İyileştirilmiş özellikleri olan çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği protein konsantresi ile zenginleştirilmiş glütensiz ekmeklerin görüntüsü. (A: Glikolizasyon; B: TGase muamelesi).....75

Şekil 37. Protein ilavesiz glütensiz ekmek ve iyileştirilmiş özellikleri olan proteinle zenginleştirilmiş glütensiz ekmeklerin tekstür parametreleri: BC: çörek otu; GS: üzüm çekirdeği; PS: kabak çekirdeği protein dispersiyonu ilave edilmiş glütensiz ekmekler.....77

Özet

Bu projede uygun sulu ve organik ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak soğuk pres posalarından protein konsantreleri üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda kullanılan başlıca numuneler arasında çörek otu, kabak çekirdeği, üzüm çekirdeği, nar çekirdeği, keten tohumu, susam ve fındık posaları sıralanabilir. 3 temel sulu ekstraksiyon yöntemi ile protein üretimi yapılmış ve uygun durumlarda numunelerde kalmış olan yağ molekülleri de hegzan ekstraksiyonu yoluyla uzaklaştırılmıştır. Ekstraksiyon prosesleri sonunda liyofilizasyon yoluyla protein konsantreleri elde edilmiştir. Numunelerdeki protein içeriği geniş bir aralıkta seyretmekte olup (yaklaşık %25-90) bu değerler kullanılan kaynak ve uygulanan ekstraksiyon koşullarından etkilenmektedir.

Üretilen protein konsantrelerinin ve izolatlarının fizikokimyasal özellikleri ve teknik fonksiyonellikleri incelenerek farklı gıda ürünü kategorilerine yönelik uygunlukları değerlendirilmiştir. Bu bağlamda, protein konsantreleri ve izolatlarının değerlendirilen başlıca fonksiyonel özellikleri **çözünürlük, emülsiyon ve köpük oluşturma kapasitesi, yağ ve su tutma, şişme kapasitesi ve hava-su ara yüzeylerinde yüzey aktivitesidir.**

Fonksiyonellikleri değerlendirilen numunelerin fonksiyonelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla Maillard konjugasyonu ve transglutaminaz muamelesi gibi yöntemlerden yararlanılmıştır. Yukarıda bahsedilen ekstraksiyon yöntemleri ile izole edilen ya da iyileştirme teknikleri ile özellikleri iyileştirilen numuneler fonksiyonellik testlerinin yanında ekmek üretiminde değerlendirilmiştir.

Polen Gıda firmasının desteği ile firmanın tesislerinde protein konsantreleri normal ve glutensiz ekmek formülasyonlarında kullanılmış ve ekmeklerin özellikleri değerlendirilmiştir. Bu çalışmalar sonunda gerek proteince zenginleştirilmiş, gerekse de teknik özellikleri iyileştirilmiş bazı ekmek ürünleri ortaya çıkarılmıştır. Dolayısıyla, ulusal bir firmamızın yan ürününün başka bir ulusal firmamızın formülasyonlarında test edilmesi mümkün olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Soğuk pres yağ üretimi; yağ bitkisi posaları; protein izolat ve konsantreleri; proteinlerin fonksiyonel özellikleri; membran prosesleri; ekmek ürünleri.

Abstract

In this project, protein concentrates were produced from cold press meals using appropriate aqueous and organic extraction methods. Among the main samples used in this context were black cumin seeds, pumpkin seeds, grape seeds, pomegranate seeds, flaxseeds, sesame seeds and hazelnuts. Protein production was carried out using 3 basic aqueous extraction methods and oil molecules remaining in the samples were also removed by hexane extraction. At the end of extraction processes, protein concentrates were obtained by lyophilization. The protein contents in the samples were spread in quite a wide range (about 25-90%) and these values were influenced by the source and applied extraction conditions.

The physicochemical properties and technical functionalities of the protein concentrates and isolates produced were evaluated and their suitability for different food product categories was evaluated. In this context, the principal functional properties of protein concentrates and isolates evaluated were their **solubility, emulsion and foam-forming capacity, oil and water retention, swelling capacity and surface activity at air-water interfaces.**

Maillard conjugation and transglutaminase treatments have been utilized to improve the functionality of the evaluated samples. The samples isolated by the extraction methods mentioned above or whose properties were improved by the improvement techniques were evaluated in bread production besides the functional tests.

With the support of Polen Foods Company, protein concentrates were used in normal and gluten-free bread formulations and the properties of the breads were evaluated. At the end of these studies, some bread products that were both protein-enriched and improved in technical properties were generated. It was therefore possible to test the byproduct of a national company in formulations of another national company.

Keywords: Manufacture of cold press oils; oil seed and oil fruit meals; protein isolates and concentrates; functional properties of proteins; membrane processes; ekmek ürünleri products.

Sonuç Raporu Ana Metni

1. GİRİŞ

Modern bitkisel yağ üretimi, genellikle organik çözücü ekstraksiyonu teknolojisi ile yürütülmektedir. Organik çözücülerin kullanılmasının besin unsurlarının kaybı ve kimyasal atıkların ortaya çıkması anlamında bazı olumsuz etkileri bulunmaktadır. Soğuk pres yöntemi ile yağ üretimi genellikle 50°C'nin altında yapılmaktadır ve bu proste organik çözücü ekstraksiyonunun olumsuz etkilerinin üstesinden gelmek söz konusu olabilmektedir. Bununla birlikte, soğuk pres yağların üretiminde işlem maliyeti, dolayısıyla ürün fiyatları, nispeten yüksek, işleme kapasiteleri de nispeten düşük olmaktadır. Bu alandaki maliyeti azaltmak için soğuk pres işleminden geriye kalan posaların da katma değerli ürünlere dönüştürülmesi gereklidir.

Yağı alınmış bitkisel posalarda bulunan bileşenlerin başlıcalarından biri proteinlerdir. Proteinler hem teknolojik, hem de biyolojik işlevleri olan değerli gıda bileşenleridir. Dünyada sürekli artmakta olan protein talebi, hayvansal proteinlere ek olarak bitkisel proteinlerin de değerlendirilmesi zorunluluğunu ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, bitkisel yağların üretiminde ortaya çıkan posalardan üretilcek protein ürünleri (protein konsantre ve izolatları) ile ulusal tarım ürünlerimize katma değer kazandırmak ve gıda bileşenleri (özellikler proteinler) alanında dışa bağımlılığımızı azaltmak gibi getiriler ortaya konulabilir.

Dolayısıyla, bu projede, ülkemizde faaliyet gösteren bir soğuk pres yağ üreticisi firmanın yan ürünleri olan bitkisel posalar değerlendirilerek bu posaların protein üretiminde kullanılması hedeflenmektedir. İlgili firmadan numune desteği ve teknik destek alınarak yeni protein ürünleri İZÜ laboratuvarlarında geliştirilmiştir. Bitkisel proteinler alanında özellikle soya ve ayçiçeği posalarının değerlendirilmesi bağlamında birçok çalışma bilimsel literatürde bulunmaktadır. Bu çalışmada ise, üretici firmanın düzenli olarak sağlama potansiyeli öngörülmüş olan **erik çekirdeği, üzüm çekirdeği, keten tohumu, kabak çekirdeği, nar çekirdeği, çörek otu ve incir çekirdeğine** ait soğuk pres posalarının protein üretiminde kullanımı hedeflenmiştir. Kullanılan ham maddelerin bir kısmının soğuk pres işleminden önce dahi bir endüstriyel yan ürün olduğu vurgulanmalıdır. Ayrıca, bu ürünlerin çoğu ile ilgili detaylı çalışmalar literatürde bulunmamaktadır. Özellikle bu proteinlerin gıda uygulamaları konusunun detaylı olarak incelenmesi gereklidir.

Bu bağlamda genellikle sulu ekstraksiyon, izoelektrik çökeltme ve membran proseslerinden yararlanılarak ısı ya da çözücü kaynaklı denatürasyona uğramamış yüksek kalite ve protein konsantrasyonlarına ulaşan protein ürünleri üretilmiştir. Liyofilizasyon yöntemi kullanılarak pilot ölçekte ve toz formda protein izolatları hazırlanmıştır.



Üretilen protein konsantrelerinin fizikokimyasal özellikleri ve teknik fonksiyonellikleri incelenerek farklı gıda ürünü kategorilerine yönelik uygunlukları değerlendirilmiştir. Bu bağlamda, protein konsantrelerinin değerlendirileceği başlıca fonksiyonel özellikleri **çözünürlük, emülsiyon ve köpük oluşturma kapasitesi, yağ ve su tutma, şişme kapasitesi, yağ-su ve hava-su ara yüzeylerinde yüzey aktivitesi** olarak belirlenmiştir. Bu kapsamda, farklı saflık dereceleri ve kompozisyonlardaki izolatların fonksiyonelliklerinin tanımlanması (referans protein olan BSA'ya ve ayrıca kazeinat ve soya proteinine oranla), buna bağlı olarak protein izolatlarının ve bunların karışımlarının fonksiyonel özelliklerinin incelenmesi ve iyileştirilmesi yönünde çalışmalar yürütülecektir. Son olarak, protein izolatlarının gıda uygulamalarına örnek olarak ekmek ürünlerinde denenmesi söz konusu olmuştur. Ulusal bir firmanın yan ürünlerinden yola çıkan bu projede ekmek üretim sektöründe faaliyet gösteren başka bir firmanın (potansiyel son kullanıcı) desteği alınarak üretilen protein izolatlarının ürün kalitesine etkisi incelenmiştir. Bu bağlamda, ekmek üretiminde kullanılan unlara protein konsantreleri eklenmesi yoluyla protein takviyesi yapılarak konsantre ilavesinin son ürün kalitesine etkisi incelenmiştir.

Dolayısıyla, bu projede ülkemize yoğun olarak ithal edilen başlıca gıda bileşenlerinden olan protein konsantre ve izolatlarının sürdürülebilir bitkisel kaynaklardan yerel olarak üretilmesi, bu maddelerin temel fizikokimyasal karakterizasyonunun yapılması, gıda sistemlerinde gözlenen ortalama iyonik yoğunluk, sıcaklık ve pH değerlerinde bu proteinlerin gıda ürünlerine uygulanabilirliğinin incelenmesi, özellikle ekmek üretim sektörüne yönelik olarak unlara protein takviyesi yoluyla üretilen proteince zenginleştirilmiş ürünlerin değerlendirilmesi planlanmıştır.

Bu çalışmaların en kritik tarafı, endüstriyel işbirliği bağlamında bitkisel posaları sağlayacak bir firma (ham madde tedarikçisi) ile Türkiye'de yüksek kapasite ve çeşitlilikte ekmek üretimi ham maddeleri analizi ve tedariki yapan ikinci bir firmadan destek alınarak proje bulgularının kısa sürede ticarileştirilmesi için gerekli aşamaların kaydedilme olasılığı bulunmasıdır. Bu sayede hem bitkisel ürünlerimizin katma değerlendirilmesi, hem de endüstriyel gıda ürünlerinin protein içeriğinin iyileştirilmesi anlamında bir değerlendirmede bulunulmuştur. Bitkisel proteinlerin katma değerlendirilmesine paralel olarak soğuk pres yağların fiyatlarında iyileştirmelerde bulunulması ve besleyicilik anlamında değerli soğuk pres yağların daha yoğun olarak tüketilmesi teşvik edilmiştir.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

Bilim ve Teknoloji Yüksek Kurulu (BTYK) 21. Toplantısı'nda "enerji, su ve gıda alanlarında ulusal Ar-Ge ve yenilik stratejilerinin hazırlanması" karara bağlanmıştır. Buna bağlı olarak, "Bilim, Teknoloji ve Yenilik Politikaları Uygulama Planı 2011-2016" hazırlanmış ve gıda alanında ülkemizin ihtiyaçlarının Ar-Ge ve yenilik yoluyla çözülmesi ve yeniliğe dayalı kalıcı çözümler üretilmesi gerekliliği vurgulanmıştır. Benzer şekilde, Vizyon 2023 Dokümanı'nda da sunulan vizyonu destekleyen Bilim ve Teknoloji Stratejileri geliştirilmiş, ülkemizde ve dünyada gıda ürünü çeşitliliği ile fonksiyonel gıdaların talep ve tüketimlerinin artacağı ön görülmüştür. Buna ek olarak, Ar-Ge yeteneğimizin kısıtlılığı dolayısıyla özel sektör, kamu ve üniversite arasında daha etkin bir koordinasyon sağlanması gereği vurgulanmıştır. Bu bağlamda, **mevcut proje ürün çeşitliliği ve yeni fonksiyonel gıda bileşeni ve gıda ürünü taleplerine cevap vermeye yönelik olarak hazırlanmış bir Üniversite-Endüstri işbirliği projesidir.**

Ülkemizde gıda endüstrisi gerek üretim çeşitliliği, gerekse de kapasite olarak hızlı bir biçimde büyüyen bir yapıdadır. Gıda ürünlerimiz ülkemizde ve çevre ülkelerde yoğun olarak tüketilmekle beraber, teknoloji ve ürün geliştirme alanındaki Ar-Ge altyapılarımız nispeten zayıftır. Bu bağlamda, mevcut projenin de konusu olan gıda katkı maddeleri ya da gıda bileşenleri konularında yeni ürünler ortaya koyma kapasitemiz oldukça kısıtlıdır. Dolayısıyla, gıda ürünlerine teknik ya da biyolojik fonksiyonellik ekleyen gıda bileşenleri genellikle ülkemizde üretilmemekte ve ülke dışından ithal edilmektedir. Buna bağlı olarak gıda endüstrimizin yenilik kabiliyeti ve son ürünlerden edinilecek kar marjı kısıtlı kalmakta ve dışarıdan gelen katkı maddelerinin kontrol ve denetimi devletimiz için ek külfetler getirmektedir. Ülkemizdeki zirai çeşitlilik göz önüne alınarak güçlü bir gıda bileşenleri endüstrisi oluşturulması ve buna bağlı olarak kısa vadede ithalatın önüne geçilmesi, orta vadede ise net bir ihracatçı olunması mümkün görünmektedir. Bu alandaki çabalar ulusal bütçemize ve ülkemizin tanıtımına olumlu katkılarda bulunabilecektir. Son dönemde TÜBİTAK – 1003 ve 1511 programları ile Avrupa Komisyonu'na bağlı Horizon 2020 programlarında (örneğin, "Proteins of the Future" çağrısı kapsamında) da bahsedilen alanlardaki çalışmalara destek sağlanması söz konusu alanın önemini vurgulamaktadır.

Gıda ürünleri, karmaşık kompozisyonlara ve çevresel etkenlerden kolayca etkilenen hassas mikroyapılara sahip maddelerdir. Gıdaların üretim süreçlerini zorlaştıran etkenlerden bazıları ham madde varyasyonu ve gıda işleme süreçlerinde ortaya çıkan varyasyonlardır. Sonuç olarak, bu değişkenlikler gıda ürünlerinin yapısal özelliklerini etkilemekte ve gıdalardan almamız gereken besin unsurlarının biyoyararlılığı da büyük ölçüde gıdaların yapısal özelliklerinden etkilenmektedir (Minekus vd. 2014). Dolayısıyla, gıda ürünlerinin yapısal özelliklerinin ve genel kalitesinin sürdürülebilirliği hem ürünlerin tüketiciler tarafından kabulünü

teşvik etmekte, hem de ürünlerin besleyicilik anlamında da sürdürülebilirliğini garanti altına almaktadır. Dayanıklı, sağlıklı, kaliteli gıda ürünlerinin üretilebilmesi ve bu özelliklerin süreklilik arz etmesi gıda endüstrisi açısından temel bir önemdedir. Proteinler de dâhil olmak üzere, başlıca gıda bileşenlerinin kullanılmasının amacı gıda ürünlerinin üretiminde, bu ölçütlerin sürekli olarak karşılanmasıdır. Bu bağlamda, milli tarımsal ürünlerimizin incelenmesi ve özellikle gıda işleme süreçlerinde ortaya çıkan yan ürünlerden katma değerli yeni ürünler üretilmesi bir zorunluluk halini almaktadır.

Bitkisel gıdaların işlenmesinde ortaya çıkan yan ürünler, sıklıkla teknolojik ya da besleyicilik anlamında değerli olabilecek gıda bileşenleri içermektedirler. Örneğin, soğuk pres yöntemiyle bitkisel yağ üretiminde ortaya çıkan posalar gıda üretiminde değerlendirilebilecek değerli proteinler içermektedirler. Bu posalar, yüksek miktarlarda ve uygun maliyetlerle sürekli erişilebilir olmaları, yüksek protein içerikleri ve toksik malzeme içermeme gibi özellikleri sayesinde gıda üretiminde kullanıma uygun bileşenlerdir (Pickardt vd. 2015). Uygun işleme teknolojileri ile bu proteinlerden bazıları soya proteini kullanmanın getirdiği dezavantajların (örneğin, anti-besin unsurları, mineral bağlama vb.) üstesinden gelebilecektir (Pickardt vd. 2015).

Proteinler, insan vücudunda dokuların yapımı ve onarımında kullanılan, bir enerji kaynağı olarak değerlendirilen, enzimatik ve yapısal işlevleri olan moleküllerdir ve proteinlerin vücudun azot dengesinin korunmasında önemli bir rolleri bulunmaktadır (McCarthy vd. 2013). Protein kalitesi, amino asit kompozisyonu ve sindirilebilirlik özellikleri bağlamında tanımlanabilir. Buna ek olarak, gıdaların işlenmesi ve yeni gıda ürünlerinin geliştirilmesinde yararlı olan fonksiyonel özellikleri ile proteinler gıda ürünlerinin tüketici nezdinde kabul edilebilirliğini ve genel kalitesini de etkilerler (Sze-Tao ve Sathe, 2000).

Proteinlerin fonksiyonel özellikleri üç temel kategoriye bağlı olarak tanımlanabilir (Moure vd. 2006). Bunlardan birincisi, hidrasyona bağlı olarak ortaya çıkan su ve yağ absorpsiyonu, çözünürlük, ıslanma ve kıvam verme özellikleridir. İkinci kategoride, protein yapısı ve sistem reolojisi ile ilgili özellikler sıralanabilir (viskozite, elastisite, jelleşme vb). Son olarak, proteinlerin ara yüzey davranışını ilgilendiren özellikler de proteinlerin fonksiyonel özellikleri bağlamında incelenebilir (emülsifikasyon, köpük oluşturma, protein-lipit filmleri oluşturma vb) (Moure vd. 2006). Dolayısıyla, gıda üretiminde enzimatik kataliz, çözünürlük, aroma, yağ ve su bağlama, kıvam verme, köpük oluşturma, jelleşme ve emülsifikasyon işlemlerinin hepsinde proteinler kullanılabilir (Phillips vd. 1994; Damodaran, 1996; Nakai ve Modler, 1996). Moleküler düzeyde bu fonksiyonel özellikler proteinlerin diğer moleküllere bağlanma, konformasyonel değişimlere gitme, ara yüzeylere adsorbe olma, diğer protein molekülleri ile etkileşime girme gibi temel davranışları sayesinde ortaya çıkmaktadır.

Örneğin, amfifilik karakterleri sayesinde proteinler yüzey aktif özellik kazanarak iki ya da daha fazla fazı ayıran ara yüzeylere adsorbe olurlar (Dickinson, 1999). Ara yüzeylerde konformasyonel değişikliklere uğramaları sayesinde ara yüzeylerdeki diğer proteinlerle etkileşime girerek viskoelastik bir ara yüzey tabakası oluşumuna sebep olurlar (Dickinson, 1992). Proteinlerin suda çözünmeleri su ve suda çözülmüş diğer moleküllerle etkileşimlerine bağlıdır. Su fazı ile etkileşimleri protein-protein etkileşimlerinden kuvvetli olursa suda çözünebilecekleri gibi bu etkileşimlerin termodinamik uygunluk arz etmemesi halinde, proteinlerin su fazından ayrılmaları da mümkündür (Damodaran 1996; Damodaran ve Xu, 1996; Amza vd. 2014). Dolayısıyla, su fazının kompozisyonu, pH değeri gibi özelliklerini değiştirerek protein karışımlarının birbirinden ayrılması ya da birlikte çözünür hale getirilmesi söz konusu olabilir. Proteinlerin diğer fonksiyonel özellikleri üzerindeki olumlu etkisi nedeniyle çözünürlük önemlidir ve yüksek çözünürlük değeri, emülsiyon, köpürme, jelleşme ve çırpılma özelliğinde iyileşme sağlamaktadır (Mohanty vd. 1988; Barbut, 1996). Buna ek olarak, su kaldırma kapasitesi, un kalitesinin bir göstergesi olup protein içeriği yüksek olan iyi kaliteli unların daha fazla su tuttuğu bilinmektedir (Taha vd. 1982).

Köpükler, sürekli bir sıvı fazın (genellikle) içinde, gaz bir fazın dispers halde bulunduğu sistemlerdir. Yoğun olarak tüketilen gıda ürünlerinden ekmek ürünleri ve dondurma bu kategoride incelenebilir. Bu sistemlerde genellikle proteinlerin yüzey aktivitelerinin ürün kararlılığına etki etmesi söz konusudur. Köpüğün oluşması aşamasında protein molekülleri hızlı bir biçimde yeni oluşmakta olan gaz kabarcıklarının yüzeyine adsorbe olarak iki faz arasındaki yüzey gerilimini düşürürler (Dickinson, 1999; Damodaran, 1996). Böylelikle kabarcık yüzeylerinde viskoelastik bir tabaka oluşturarak kabarcıkların birbirleriyle birleşmesini ve faz ayırımına uğramasını engellerler. Bu koruyucu etki ağırlıklı olarak elektrostatik, sterik ve hidrasyona dayalı itme kuvvetleri sayesinde gerçekleşmektedir. Dolayısıyla, köpüklerin temel özellikleri arasında bulunan görünüş, doku, kararlılık gibi karakteristikler sistemde bulunan kabarcıkların sayısına ve boyutuna bağlı değişirken gaz kabarcıklarının özelliklerini de proteinler belirlemiş olur (Damodaran 1996).

Benzer şekilde, proteinler yağ-su ara yüzeylerinde aktivite göstererek uzun dönemli kararlılık gösteren emülsiyonların üretilmesinde değerlendirilirler. Homojenizasyon sırasında hızlıca ara yüzeylere doğru difüzyona uğrayan protein molekülleri yağ damlacıklarının etrafında koruyucu bir membran oluşturarak damlacıkların tekrar birleşmesini engellerler (McClements, 1999). Bu esnada, proteinler kısmi denatürasyona uğrarlar ve reaktif amino asitlerin açığa çıkması ile diğer protein molekülleri ile hidrofobik etkileşimler ve disülfid bağları oluştururlar. Proteinler arasındaki etkileşimlerin artması ile de emülsiyon kararlılığını sağlayan temel unsurlardan olan ara yüzey elastisitesinin arttığı gözlemlenir (McClements, 1999).

Son olarak, proteinlerin jel oluşturma ve kıvam verme özellikleri de bulunmaktadır. Bu karakteristik özellikler birçok gıda ürünüde proteinlerin üç boyutlu bir etkileşim ağı (“network”) oluşturarak ürünün içinde kayda değer miktarlarda su tutmaları sonucu açığa çıkar (Kinsella, 1984). Bu durumda da proteinler arasındaki etkileşim kuvvetleri, jel yapısının sıklığını belirlemektedir (Kinsella, 1984).

Proteince yoğun olan birçok bitki günümüzde hayvan yemi olarak değerlendirilmektedir, ancak bitkisel proteinlerin hayvansal proteinlere dönüşüm verimi oldukça düşüktür (Pimentel ve Pimentel, 2003). Dolayısıyla, hayvansal proteinlere benzer doku ve tat özellikleri olan bitkisel protein konsantre ve izolatları hem sürdürülebilirlik, hem de tüketici taleplerini karşılama anlamında değerli ürünlerdir (Berghout vd. 2014). Yüksek protein içeriği olan bitkisel protein izolatlarının üretiminde ilk aşamada sıklıkla organik çözücülerin kullanılması söz konusudur. Bu işlem sonraki aşamalarda farklı pH değerlerinde uygulanan sulu ekstraksiyon işlemlerini de kapsamaktadır. Protein izolatlarının mutlak saflığından ziyade çözünmez karbonhidratların uzaklaştırılması amaçlanırsa, sulu ekstraksiyona dayanan ve membran prosesleri kullanılarak konsantrasyon yapılabilen yüksek kaliteli ve organik çözücü atıkları oluşturmayan bitkisel protein izolatları üretilebilir (Berghout vd. 2014).

Bitkisel proteinler gıda sistemlerinde gittikçe artan miktarlarda kullanılarak gıdaların fonksiyonel özelliklerine katkıda bulunmaktadır, ancak soya proteinleri ve gluten dışındaki proteinlerin gıda uygulamalarında kullanımı nispeten kısıtlıdır (Karaca vd. 2011). Nispeten yüksek besleyici değeri olan, dengeli bir amino asit dağılımına sahip ve düşük maliyetli bitkisel proteinlerin zaman içinde değer kazanabileceği açıktır. Geçtiğimiz yıl açılan Avrupa Konseyi proje destek alanlarından biri “Geleceğin proteinleri” konusudur. Dolayısıyla, düşük maliyetli endüstriyel yan ürünlerden katma değerli ve ulusal protein ürünlerinin üretilmesinin ülkemize birçok sosyoekonomik getirisi olacaktır.

Bitkisel posalardan izole edilen proteinlerin işleme biçimleri, son ürünlerde gösterilen yağ bağlama, emülsifikasyon aktivitesi, köpük oluşturma kapasitesi ve köpük kararlılığı gibi özellikleri doğrudan etkilemektedir (Chabanon vd. 2007). Bu özellikler genellikle yüzey yükü, hidrofobisite, çözünürlük ve ortamdaki protein olmayan (örneğin, fitik asit, lifler ve polifenoller) bileşiklerin varlığından etkilenmektedir (Chabanon vd. 2007; Karaca vd. 2011). Dolayısıyla, protein fonksiyonelliğini olumsuz etkileyen bileşiklerin uzaklaştırılması ve uygun ısı olmayan işleme ve izolasyon tekniklerinin (örneğin, membran prosesleri, liyofilizasyon) kullanımı ile fonksiyonel özellikleri kontrol edilebilecek protein izolatları üretilebilir.

Membran prosesleri (örneğin, ultrafiltrasyon) sulu protein dispersiyonlarının ısı enerjisi kullanılmadan konsantrasyonu için kullanılan yöntemlerdir. Örneğin, süt kazeinlerinin konsantrasyonu esnasında (Gülseren vd. 2010) ya da soya proteinlerinin fitat içeriğinin

düşürülmesi amacıyla (Ali vd. 2010) bu tekniklerin kullanılabilirdiği bilinmektedir. Bu alandaki başlıca uygulamalar arasında süt endüstrisinde serum proteinlerinin konsantrasyonu, ürünlerde süt proteini içeriğinin standardizasyonu, alkollü ve alkolsüz içecekler ile ilgili uygulamalar ve yumurta ürünlerinin üretimi sayılabilmektedir (Daufin vd. 2001). Dolayısıyla, yeni bitkisel protein izolatlarının üretiminde ultrafiltrasyon ve diyaliz başta olmak üzere membran proseslerinin uygulanması oldukça yerinde bir yaklaşımdır.

Yağlı tohum ve meyveler, günümüz toplumunun bitkisel yağ ihtiyacını karşılayan bir dizi başlıca (majör) ve minör üründen oluşmaktadır. Yüksek yağ içeriğinin yanı sıra bu ürünler genellikle yüksek sayılabilecek konsantrasyonlarda protein içermektedirler. Ülkemizde nispeten daha düşük miktarlarda üretilmekle beraber, günlük kozmetik uygulamalar, gıda takviyeleri, bitkisel alternatif tedaviler ve biyomedikal çalışmalarda kullanımı artmakta olan bir dizi minör bitkisel yağ bulunmaktadır. Bu ürünler genellikle küçük hacimli ambalajlarda son tüketiciye ulaşmakta ve katma değerli ürünler olarak pazarlanmaktadır. Bu ürünler arasında, mevcut projede soğuk pres posaları incelenmekte olan **erik çekirdeği, üzüm çekirdeği, keten tohumu, kabak çekirdeği, nar çekirdeği, çörek otu ve incir çekirdeği** yağları da sayılabilir. Bu ürünlerin özellikle soğuk pres teknolojisiyle üretildiği durumlarda yağı içeriği düşük, protein ve enerji içeriği yüksek bitkisel posalar prosesin yan ürünü olarak ortaya çıkmaktadır. Yağı alınmış birçok yağlı tohumda ürünün posasından bitkisel protein izolatları üretimi üzerine hâlihazırda yayınlanmış çalışmalar bulunmaktadır (örneğin, soya fasulyesi, yarfıstığı, ayçiçeği, badem proteini izolatları vb) (Sze-Tao ve Sathe, 2000).

Soğuk pres tekniği, en yüksek nitelikli bitkisel yağların üretilmesinde kullanılan tekniklerin başında gelmektedir. Soğuk preslenmiş yağlar, ısı işlem olmaksızın sadece mekanik yöntemle elde edilen yağlardır. Proses işlem basamakları yağlı tohum ve meyvelerinin preste sıkılması, filtreden geçirilmesi ve dolum basamaklarından oluşmaktadır. Soğuk pres tekniği ile elde edilen yağlar, proses süresince yüksek derecede ısı işleme maruz kalmamaları (40–50 C°), ham maddeden yağın çıkarılması sırasında solvent kullanılmaması, rafinasyon işlemine tabi tutulmaması ve kimyasal madde kullanılmaması açısından önem arz etmektedir. Soğuk pres yağ üretiminde rafinasyon aşamaları süresince yağdan kısmen uzaklaşan doğal antioksidanlar, fosfatidler, serebrosidler, karotenoidler ve fitosteroller gibi bazı maddeleri daha yüksek oranlarda içerdiklerinden dolayı besleyici değer açısından ön plana çıkmaktadırlar, Ayrıca soğuk pres tekniği ile üretilen yağlar proses esnasında yüksek sıcaklık değerlerine maruz kalmadıkları için trans yağ asitleri oluşmamakta ve bünyesinde bulunan biyoaktif bileşikler de zarar görmemektedir. Yağlı tohum ve meyvelere uygulanan ham yağ çıkartma, rafinasyon ve hidrojenasyon gibi yağ teknolojisinde kullanılan çeşitli işlemler fitosterol içeriklerinde de değişimlere neden olmaktadır.



Bu projede ülkemizde üretilen soğuk pres yağların üretimi esnasında açığa çıkan bitkisel posaların karakterizasyonu ve değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Ülkemizde Oneva markasıyla faaliyet gösteren ve geniş bir ürün yelpazesinde soğuk pres natürel yağlar üreten Neva Ltd. & Sim Ltd. şirketi, 13 farklı bitkisel yağın üretimi alanında uzmanlaşmış bir firmadır. Söz konusu şirket ile Üniversitemiz (İZÜ) arasında “İyi Niyet Protokolü” imzalanmış olup bu alanda ortak Ar-Ge çalışmaları yürütülmesi planlanmaktadır. Şirket bilgileri (<http://www.oneva.com.tr>) ve iki kurum arasındaki temaslar (<http://www.oneva.com.tr/haberler/universite-sanayii-ismirligi-toplantisi>) ile bilgilere İnternet üzerinden ulaşılabilmektedir. Natürel soğuk pres yağların üretiminde kullanılan **erik çekirdeği, üzüm çekirdeği, keten tohumu, kabak çekirdeği, nar çekirdeği, çörek otu ve incir çekirdeği posaları** şirket tarafından tedarik edilerek kurumumuza iletilmiş ve posalardaki değerli proteinler uygun teknikler kullanılarak izole edilmiştir ve bu ürünlerin ekonomimize kazandırılması için gerekli araştırmalar halen yürütülmektedir.

Özellikle sıklıkla tüketilen tahıl, baklagil ve yağlı tohum proteinlerinin izolasyonu, karakterizasyonu ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi alanında kayda değer miktarda bilimsel çalışma bulunmaktadır (Ali vd. 2010; Yalçın vd. 2008; Boye vd. 2010; Villanueva vd. 1999). Öte yandan bu projenin konusunu oluşturan ve nispeten kısıtlı üretimi bulunan yağ alınmış bitkisel posalardaki proteinler, bu proteinlerin temel fonksiyonel özellikleri ve gıda uygulamaları alanı ile özellikle soğuk pres posaları ve onların değerlendirilmesi alanındaki mevcut bilgiler oldukça kısıtlıdır. Bu yağlardan bazıları ile ilgili olarak mevcut literatürde özellikle ekstraksiyon hususunda çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, kabak çekirdeği proteini ekstraksiyonunun RSM metodu ile optimizasyonu yapılarak doğrudan çekirdeklerden (yağ ayrılmadan) ekstraksiyonu yapılmış ve optimum koşullar altında üründe %7,84 ölçüsünde protein alınabileceği bulgulanmıştır (Quanhong ve Caili, 2005). Zencefil eriği (“gingerbread plum”) tabir edilen bitkiden yine çözücü ekstraksiyonu koşulları altında albümin, globülin, glutelin ve prolamin fraksiyonları farklı çözücüler kullanılarak izole edilmiştir (Amza vd. 2014). % Katı madde bazında bakılacak olursa, üzüm çekirdeğinde ve erik çekirdeğinde sırasıyla yaklaşık %8,2 ve %3 oranında protein bulunmaktadır (Kamel vd. 1985; Kamel & Kakuda, 1992). Ülkemizde yabani olarak yetişen erik türlerinin ise yaklaşık %1,6 ham protein içerdiği bulgulanmıştır (Çalışır vd. 2005). Burada incelenen ürünler arasında (**erik çekirdeği, üzüm çekirdeği, keten tohumu, kabak çekirdeği, nar çekirdeği, çörek otu ve incir çekirdeğine** ait soğuk pres posaları), soğuk pres uygulaması alanındaki çalışmalar genellikle söz konusu olmasa da en çok araştırılmış ürünler üzüm çekirdeği ve keten tohumu proteinleridir. Örneğin, yağ alınmış keten tohumu posası ticari olarak piyasada mevcuttur (Udenigwe vd. 2009). Diğer ürünlerle ilgili çalışmalar ise, yukarıda vurgulandığı gibi özellikle gıda uygulamaları alanında oldukça kısıtlıdır.



Bitkilerin tohumlarında bulunan proteinler iki temel kategoriye ayrılabilir: depo proteinleri ile normal hücre metabolizmasının devamlılığını sağlayan “housekeeping” proteinleri. Depo proteinleri, tohumlarda bulunan proteinlerin büyük bir kısmını oluşturmaktadırlar (Higgins, 1984). Bitkinin özelliklerine bağlı olarak tohumlardaki protein miktarı genellikle %10 (örneğin, tahıllar) ile %40 (örneğin, bazı baklagiller ve yağlı tohumlar) arasında değişmektedir (Shewry vd. 1995). Bu durumda, yağı alınmış yağlı tohumların ve çekirdeklerin posalarındaki protein konsantrasyonunun daha da yükseleceği açıktır.

Proteinler arası etkileşimlerin güçlendirilmesi, son dönemlerde birçok gıda uygulamasında su tutma kapasitesi, yağ bağlama gibi bazı fonksiyonel özelliklerin iyileştirilmesi ve jel formdaki gıdalarda jel kuvvetinin artırılması bağlamında artan sıklıklarda kullanılmaktadır (örneğin, Jaros vd. 2006). Proteinler arası etkileşimlerin güçlendirilmesi anlamında glutaraldehit gibi çapraz bağlanma ajanlarının kullanılabileceği bilinmekle birlikte (Gunasekaran vd. 2007), bu ajanların gıda işlemeye uygun olmadıkları da bilinmektedir. Ancak, bu bağlamda kullanılmakta olan başka maddeler de bulunmaktadır. Bunların başında da transglutaminaz enzimi gelmektedir (Bönisch vd. 2008; Zeeb vd. 2013). Örneğin, kazeinlerin transglutaminaz ile etkileşimlerinin rennet hidrolizi sırasında oluşan sistemlerde jel kuvvetini ve su tutma kapasitesini iyileştirdiği bulgulanmıştır (Bönisch vd. 2008). Benzer şekilde, koloidal sistemlerde ara yüzeyde adsorbe halde bulunan sodyum kazeinatın transglutaminaz ile muamelesi ile emülsiyon jellerinin üretilmesinin mümkün olduğu ve bu jellerin özelliklerinin kontrol edilebileceği de belirlenmiştir (Zeeb vd. 2013). Buna ek olarak, mikrobiyal kaynaklı transglutaminaz dışındaki enzimlerin de dispersiyonların kararlılığına katkıları detaylı olarak incelenmiş bir alandır (Zeeb vd. 2014).

Buğday protein miktarı düşük, karbonhidrat miktarı yüksek gıdalar sınıfına girmektedir. Dünyada yetiştirilen buğdayların protein miktarı %6 ile %20, ortalamada yaklaşık %12-%13 olurken karbonhidrat miktarı ise %85-95 arasındadır (Zeleny, 1971). Ülkemizde buğday unu tebliğine göre (2013d) özel amaçlı buğday unu, ekmeçlik buğday unu, tam buğday unu ve gıda amaçlı buğday kepeğinin protein miktarları sırasıyla en az 7,10.5,11 ve aranmaz şeklindedir. Unlu mamuller alanında toplumumuzun beslenme alışkanlıklarının en önemli payını başta beyaz ekmeç olmak üzere fırın ürünleri oluşturmaktadır. Ülkemizde ekmeç tüketiminin yüksekliğine ek olarak aynı zamanda yoğun bir ekmeç israfı söz konusudur. Bu israfın ana nedenlerinin başında ekmeçin çabuk bayatlaması, bayatlamaya bağlı olarak aromatik özelliklerini yitirmesi ve küflenmesi gelmektedir. Dolayısıyla, ekmeç ürünlerinin raf ömrünün uzatılması, tekstürel özelliklerinin iyileştirilmesi, aromatik özelliklerin geliştirilmesi ve protein içeriğinin artırılması ülkemizde ekmeç israfının önüne geçilmesinde değer kazanabilecek yaklaşımlardır.

Günümüzde unlu mamuller alanında tekstür ve duyuşsal özellikler üzerindeki fonksiyonel etkileri dolayısıyla özellikle peynir altı suyu proteinlerinin kullanımı giderek artmaktadır (Özcan ve Delikanlı, 2011). Peynir altı suyu proteinlerinin kıvam artırma, jel oluşumunu güçlendirme, emülsiyon oluşturma, su tutma ve serum ayrılmasını engelleme gibi fonksiyonel özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Bu yönüyle peynir altı suyu proteinleri birçok gıda ürününde duyuşsal ve tekstürel özellikleri iyileştirmek ve dayanıklılığı arttırmak amacıyla kullanılmaktadır (Mleko ve Gustaw, 2002; Herceg ve Lelas, 2005). Peynir altı suyu protein konsantratu, özellikle fırıncılık ürünlerinin besin değerini geliştirmek ve gluten içermeyen ekmek formülasyonlarında ise su absorpsiyonunu arttırmak amacıyla kullanılmaktadır (Gallagher vd. 2004). Taha vd. (1982) tarafından yapılan bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda ayçiçeği proteini konsantratu, soya proteini konsantresi, acı bakla unu, pirinç kepeği unu, balık proteini konsantresi gibi protein ürünleri, buğday ekmeği üretiminde kullanılarak ekmeğin protein değerinde %12 ile 62 arasında protein artışı tespit edilmiş ve ürünün aroma, renk, kırıntı, kabuk rengi, doku, lezzet gibi duyuşsal özelliklerinde iyileşmeler tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada ise, kazein ve albumin izolatları transglutaminaz enzimi ile birlikte pirinç ununa ilave edilerek proteince zenginleştirilmiş glutensiz ekmek yapılmış ve ekmeğin dokusal özelliklerinde iyileşmeler görülmüştür (Storck vd. 2005). Proteince zenginleştirme anlamında tavuk eti ve tozu da ekmek üretiminde ürün kalitesini olumlu etkilemiştir (Çakmak vd. 2013). Dolayısıyla, ülkemizde ekmek ürünlerinin raf ömrünü ve besleyiciliğini artırma anlamında protein takviyelerinin olumlu gelişmeler kaydetme potansiyeli bulunmaktadır. Bu projede izole edilen protein ürünlerinin ve “Yöntem” bölümünde tarif edildiği şekliyle fonksiyonel özellikleri iyileştirilmiş protein izolatlarının ekmek üretiminde protein takviyesi bağlamında kullanımı önerilmektedir. Proteinler aroma bağlayıcı bileşenler olarak aldehit, keton, esterler ve çeşitli aroma bileşikleri ile reaksiyona girmektedir. Gıdaların bileşimine katılan protein katkılarının özelliklerine ve üretim koşullarına bağlı olarak proteinlerin aroma bağlama kapasiteleri değişebilmektedir. Aroma bileşenlerinin proteine bağlanması yolu ile gıdalara istenilen tat ve koku özelliklerinin kazandırıldığı bildirilmektedir (Guichard ve Langourieux, 2000; Guichard, 2006). Buna bağlı olarak, ürünlerde bayatlama süresine ek olarak ürün dokusu ve aromatik özellikler bağlamında da iyileştirmeler yapılabileceği düşünölmektedir.

Dolayısıyla, mevcut projede endüstriyel yan ürünlerimizin yeni gıda bileşenleri (protein konsantre ve izolatları) üretimi amacıyla değerlendirilmesi ve bu yeni ürünler için gıda uygulamaları aranması planlanmaktadır. Genel fonksiyonellik karakterizasyonuna ek olarak, örnek bir gıda ürünü kategorisi (ekmek üretimi) seçilmiş ve bu alandaki başlıca üreticilerimizden olan bir firmanın desteği ile yeni protein ürünlerinin ekmek üretiminde kullanımı projenin başlıca amaçlarından biri olarak belirlenmiştir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Bitkisel posalardan proteinlerin izolasyonu

Soğuk pres yöntemi ile yağı alınmış bitkilere ait posalar (**erik çekirdeği, üzüm çekirdeği, keten tohumu, kabak çekirdeği, nar, çörek otu ve incir çekirdeği posaları**) Neva Ltd. & Sim Ltd. şirketi tarafından tedarik edilerek kurumumuza (İZÜ) iletilmiş ve posalardaki değerli proteinler uygun teknikler kullanılarak izole edilmiştir.

Bitkisel proteinlerin eldesinde sıklıkla kullanılan 3 teknik; izoelektrik çöktürme, misel oluşturma ve tuz çözeltileri kullanılarak yapılan ekstraksiyon işlemleridir (Karaca vd. 2011).

3.2 Posalarda kalan yağın analizi ve uzaklaştırılması

Soğuk pres yöntemi ile yağ üretiminde protein içeriği yüksek bitkisel posalar ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, çözücü ekstraksiyonu uygulanmadığı zaman bir miktar bitkisel yağ posaların içinde kalmaktadır. Posalardaki ve protein izolatlarındaki yağ miktarının analizi amacıyla Bligh ve Dyer (1959) yönteminden yararlanılmıştır.

Mevcut projede, protein denatürasyonunu önlemek amacıyla numunelerde kalan yağın ayrılması için çözücü ekstraksiyonu tercih edilmeyen bir yöntemdir. Ancak, numune özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla bazı numunelere çözücü ekstraksiyon da uygulanmıştır. Öncelikle posalar uygun bir laboratuvar değirmeni kullanılarak yaklaşık 2 mm boyutuna kadar öğütülmüştür. Ekstraksiyon numunelerinde, bu işlemi takiben öğütülmüş posalar hegzan ile muamele edilmiştir (kütlece 1:3, numune: hegzan) ve işlem, 500 rpm hızında ve oda sıcaklığında 40 dakika boyunca sürdürülmüştür. Bu işlemi takiben hegzan dikkatlice süzölmüştür. İşlem taze hegzan ile tekrarlanarak ve filtre kâğıdı (Whatman No:1) kullanılarak fazların ayrımı sağlanmıştır. Yağı alınmış posalar çeker ocak altında 18 saat boyunca kurutularak hegzan uzaklaştırılmıştır (Stone vd. 2014; Rui vd. 2014). Bitkisel proteinlerin çözücü kullanımı ile denatüre olabileceği durumlarda proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin de etkilenmesi beklenebilir. Dolayısıyla, soğuk pres yöntemi ile ortaya çıkan posaların doğallığını korumak ve fonksiyonel özelliklerini korumak (Schutyser ve van der Goot, 2011) amacıyla alternatif bir yöntem olarak organik çözücü muamelesi olmadan da proteinler ayrılabilir. Bu durumda, posaların öğütülmesini ve uygun bir sulu çözelti ile muamelesini takiben yağların ayrılması amacıyla bir santifüj işlemi de çalışmalara eklenebilir (örneğin, 5000xg, 30 dakika). Bu aşamada yağ fazı ayrılarak suda çözünen maddelerin ayırımına ve proteinlerin konsantre edilmesi işlemlerine devam edilmiştir. Gerekli hallerde birden fazla santrifüj aşaması ve sulu çözeltilerle muamele işlemi uygulanmıştır.

3.3 Posaların alkali ve asidik çözeltilerle muamele edilmesi (izoelektrik çökeltme)

Bu yöntemde yağı alınmış posalar, su ile karıştırılarak (kütlece 1:15; numune: su) dispers hale getirilmiştir. Ortamın pH değeri 1 N NaOH çözeltisi kullanılarak pH 9,5'da sabitlenmiştir. Dispersiyon, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır (500 rpm, 1 saat). Karışım 5000xg değerinde 30 dakika santrifüj edilmiştir. Çözünen kısım ayrılmıştır ve 1 N HCl kullanılarak ortamın pH değeri pH 4,5'e getirilmiştir. Böylelikle izoelektrik çökeltme teşvik edilmiştir. Çökelen kısım toplanarak liyofilizasyon işlemine kadar -30°C'de muhafaza edilmiştir (Stone vd. 2014; Boye vd. 2010).

3.4 Tuz çözeltileriyle ekstraksiyon ve diyaliz

Çözünemeyen maddelerin uzaklaştırılması amacıyla posalar %6,4 KCl içeren 100 mM sodyum fosfat tampon çözeltisine alınmıştır (hacmen 1:10; numune: su). Dispersiyon, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır (500 rpm, 24 saat). Karışım 5000xg değerinde 30 dakika santrifüj edilmiştir. Suda çözünen kısım toplanarak diyaliz edilmiştir (6-8 kDa membran). Diyaliz işlemi her gün taze su kullanılarak 3 gün sürdürülmüştür (Stone vd. 2014). Liyofilizasyon işlemine kadar numuneler -30°C'de muhafaza edilmiştir (Stone vd. 2014; Boye vd. 2010).

3.5 Protein miselleri oluşturarak ayırım sağlanması

Farklı proteinlerin bir arada posalardan ayrılması amacıyla posalar 1 N sodyum klorür çözeltisine alınmıştır (hacmen 1:10; numune: su). Dispersiyon, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır (500 rpm, 2 saat). Karışım 5000xg değerinde 30 dakika santrifüj edilmiştir. Suda çözünen kısım alınarak soğuk deiyonize suda (4°C) seyreltilmiştir (hacmen 1:10; numune: su) ve karışım 18 saat boyunca 4°C'de tutulmuştur. Karışım benzer koşullarda tekrar santrifüj edilmiştir ve çökelen kısım toplanmıştır. Liyofilizasyon işlemine kadar numuneler -30°C'de saklanmıştır (Stone vd. 2014).

3.6 İzole edilen proteinlerin konsantrasyonu ve toz halde elde edilmesi

3.6.1 Membran prosesleri

Naturel soğuk pres yağların üretiminde, numunelerdeki proteinlerin yapısal ya da fonksiyonel özelliklerini olumsuz etkileyebilecek pH, sıcaklık ya da organik çözücü kullanımı söz konusu olmadığı için proteinlerin denatürasyona uğramadığı savlanabilir. Ön ayırıştırma işlemleri yapıldıktan sonra proteinlerin sulu dispersiyonları ultrafiltrasyon ve diyaliz uygulamaları ile konsantre edilmiştir. Bu amaçla, laboratuvar tipi bir ultrafiltrasyon ünitesinin (**Vivaflow 200, Sartorius Stedim**) proje bütçesi dahilinde alımı önerilmiş olup projenin ilk döneminde söz konusu donanımın alımı söz konusu olmuştur. Proje boyunca üretilen bütün

protein ürünleri ultrafiltrasyon yoluyla konsantre edilebilecek niteliktedir. Dolayısıyla, projenin başarısı anlamında bu ünitenin teminine ve yüzlerce numunenin konsantrasyonunda kullanılmıştır. Protein dispersiyonları, sıklıkla hacmen en az 4 kat konsantre edilerek liyofilizasyona uygun hale getirilmişlerdir (Gülseren vd. 2010). Tercih edilen moleküler ayırım boyutu 10 kDa olarak belirlenmiştir. Proteinler dışındaki küçük moleküllerin sistemdeki konsantrasyonlarının azaltılması amacıyla gereğinde diyaliz işlemlerinden ya da tuz ayırma kolonlarından da yararlanılmıştır (Gülseren ve Corredig, 2013; Gülseren vd. 2012).

3.6.2 Liyofilizasyon

Membran prosesi uygulamaları ile konsantre edilen proteinlerin hizmet alımı yoluyla liyofilize edilmesi ve bu ürünlerden ısı işlem görmemiş protein izolatları üretilmesi planlanmıştır. Fasıl aktarımı ve kurumsal desteğin kısmen kullanımı ile yerli üretim bir liyofilizatör alınmıştır. Dolayısıyla bu cihaz protein üretim işlemlerinin güçlenmesini sağlamıştır. İlk aşamada, ultrafiltrasyon yöntemi ile konsantre edilen protein dispersiyonları sonraki bölümlerde tarif edilen çözünürlük, köpük ve emülsiyon oluşturma ve kararlılığı deneylerine tabi tutularak sadece nispeten iyi fonksiyonel özellikleri bulunan dispersiyonlar liyofilizasyona tabi tutulmuştur. Bu sayede, ısı denatürasyona uğramamış, protein içeriği yüksek, fonksiyonel özellikleri üstün protein ürünleri üretilmiştir.

3.7 Numunelerin temel karakterizasyonu

İzolatlarda kalan yağ miktarı, Bligh ve Dyer (1959) yöntemine göre analiz edilmiştir. Ham kül analizi Matissek vd. (1989) yöntemine göre yapılmıştır. Nem analizi ise Ludorf ve Meyer (1973)'e göre yapılmıştır.

3.8 Numunelerde protein içeriği (Kjeldahl analizi)

Kjeldahl yöntemi ile numunelerdeki azot miktarı belirlenerek uygun bir düzeltme faktörü kullanılarak numunelerdeki protein miktarı (%) hesap edilmiştir (Anonim, 2003). Bölümümüz laboratuvarlarında ilgili deneyin yapılması için gerekli donanım bulunmaktadır. Alternatif yöntem olarak Lowry yöntemi ile de benzer analizlerin yürütülmüştür.

3.9 Proteinlerin moleküler büyüklüklerinin analizi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE yöntemi ile protein izolatlarındaki proteinlerin analizi, Sze-Tao ve Sathe (2000)'de verilen yöntemine göre yürütülmüştür. Farklı pH koşullarında hazırlanan izolatlar, referans numuneler ile birlikte analiz edilerek proteinlerin yaklaşık moleküler ağırlıkları ve polimerizasyon durumları incelenmiştir (bkz. Şekil 1). Bu yöntemde, %8-25 lineer akrilamit gradienti uygulanarak ayırım sağlanmıştır. Alternatif olarak, gradient içermeyen bir jel de

(örneğin, 15%) tercih edilebilir (Laemmli, 1970). Buna ek olarak, protein agregatlarının davranışının incelenmesi amacıyla da, indirgen olmayan koşullarda SDS-PAGE analizi yapılmıştır (Berghout vd. 2014). Proje boyunca elektroforetik analizler düzenli olarak kullanıldığı için proje desteği kapsamında ilgili düzeneğin temini için destek talep edilmiştir. Yüzlerce numunedeki proteinlerin moleküler ağırlık dağılımları SDS-PAGE elektroforezi ile belirlenmiş; cihazın temini projenin başarısı açısından önem taşımış ve işleyişi kolaylaştırmıştır.

3.10 Protein izolatları ve konsantrelerinin fonksiyonel özelliklerinin değerlendirilmesi

Proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin değerlendirilmesinde makul bir saflık ve fiyat düzeyinde ticari olarak bulunan BSA proteini referans olarak kullanılmıştır. Gereğinde soya protein izolatları ve sodium kazeinat ürünlerinden de yararlanılmıştır.

3.10.1 Su ve yağ tutma kapasitesi

1 g protein izolatu, 10 g su ya da yağ ile aynı santrifüj tüpüne alınmıştır. Vorteks kullanılarak 30 dakika boyunca 5 dakikada bir 30 saniye karıştırma uygulanmıştır. İşlem sonunda karışımlar 3000xg hızında 30 dakika santrifüj edilerek serbest yağ ya da su toplanmıştır ve numune tartılarak çözünen protein miktarı belirlenmiştir (Tsaliki vd. 2004).

3.10.2 Çözünürlük

Protein izolatları, farklı pH değerlerindeki (pH 2-10) tampon çözeltilere eklenerek 30 dakika karıştırılmıştır. İşlem sonunda karışımlar 3000xg hızında 30 dakika santrifüj edilmiş ve çözeltide kalan protein miktarı Lowry metodu kullanılarak belirlenmiştir (750 nm). Protein miktarı, % nitrojen çözünürlük endeksi ("nitrogen solubility index", % NSI) üzerinden tanımlanmıştır (Tsaliki vd. 2004).

3.10.3 Yüzey gerilimi

Üretilen protein izolatlarının temel karakteristiklerinden biri de hava-su ara yüzeylerinde yüzey aktivitesidir. Dolayısıyla, hassas bir biçimde yüzey gerilimi ölçümleri yapılmalıdır. Hava-su ara yüzeylerinde yüzey gerilimi (γ) damla şekli tensiyometresi ("drop shape tensiometry") yöntemi ile bulunabilmektedir (25°C). Proteinler gibi ara yüzeydeki adsorpsiyon tabakası özellikleri zaman bağlı olarak yavaşça değişen sistemler için en uygun yüzey gerilimi tekniklerinden biri, damla şekli yöntemidir (McClements, 2005). Bu deneylerde, yaklaşık olarak 10 μ l hacmi olan yağ damlacığı (ya da hava kabarcığı) otomatik olarak bir numune şırıngasının ucunda oluşturulmuş ve bu esnada şırınga su fazının içinde bulunduğu cam küvete

daldırılmıştır. Yaklaşık 0.5 s^{-1} frekansında ölçüm alınarak damlacık şekli belirlenmiştir ve Young-Laplace denklemi kullanılarak dinamik yüzey gerilimi zamana bağlı olarak analiz edilmiştir (Lucassen-Reynders vd. 2001). Damlacık ya da kabarcık şeklinin takibi için küvet ve şırınga yüksek çözünürlüklü görüntüler sağlayan bir CCD kamera yardımıyla adsorpsiyon takip edilmiştir.

Yüzey gerilimi ölçümleri sıvı protein konsantrasyonlarının ve kurutulup yeniden çözündürülen protein tozlarının etkinliğini belirlemede proje boyunca düzenli olarak kullanıldığı için proje desteği kapsamında alınmıştır. Yüzlerce numunenin hava-su ara yüzeylerindeki davranışı tensiyometrik olarak incelenerek bu numunelerin farklı ürün uygulamalarına yakınlığı sınanmıştır. Bu bağlamda, cihazın temini projenin başarısı açısından kritik bir etkide bulunmuştur. Kurumsal destek kaleminin de kullanımı ile yüzey gerilimi yanında yüzey elastisitesi de ölçen bir tensiyometre alınmıştır (KSV Attension Theta Optical Tensiometer).

3.10.4 Köpük ve emülsiyon oluşturma kapasitesi

Uygun pH değerine getirilen ve %1 oranında protein içeren 50 ml protein izolatu çözeltisi/dispersiyonu, laboratuvar tipi bir blender yardımıyla 3 dakika çırpılmış ve bu işlemi takiben numune 100 ml'lik cam silindirlere alınmıştır. Zamana bağlı olarak köpük hacmi takip edilmiştir. Hacimdeki artış (%), ilk hacim göz önüne alınarak hesaplanmıştır (Sze-Tao ve Sathe, 2000; Sathe ve Salunkhe, 1981).

Benzer şekilde, 5 ml protein izolatu çözeltisi ile 15 ml soya yağı köpük oluşumuna izin verilmeyecek biçimde homojenize edilmiştir (Velp LS karıştırıcı). Emülsiyondan ayrılan yağ miktarı zamana bağlı olarak gözlenmiştir ve 500 nm değerinde numune absorbansı belirlenmiştir. Bu değere bağlı olarak, emülsiyon aktivitesi endeksi hesap edilmiştir (Pearce ve Kinsella, 1978). Yağ fazının kremleşme hızını izlemek amacıyla uygun bir renk maddesi de emülsiyonlara katılmıştır (örneğin, sadece yağda çözünen Oil Blue N) (Karaca vd. 2011).

Her iki durumda da (köpük ya da emülsiyon oluşturma), numunelerin yeterli mekanik enerji ile muamelesi söz konusu olmazsa, alternatif teknoloji olarak ultrasonik homojenizatör kullanılmıştır (Hielscher UP200HT).

3.11 Proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin iyileştirilmesi

Proteinler arası çapraz bağlanmaların artırılması birçok gıda ürünü kategorisinde ürünlerin su tutma kapasitesinin artırılması, jel formdaki ürünlerin sıkılığının ("firmness") kontrolü bağlamında kullanılabilir. Bu bağlamda, izole edilecek proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla transglutaminaz ile muamele edilmesi planlanmıştır. 0-50 mM çapraz bağlama ajanı çözeltilerine konulan proteinler (40°C), bu ortamda 2 saat tutularak çapraz bağlanma gerçekleştirilmiştir.

Çapraz bağlanma işlemlerinden sonra, uygun konsantrasyon ve pH değerlerinde (pH 3-7) fonksiyonellik testleri tekrar uygulanmış (köpük ve emülsiyon oluşturma; su ve yağ tutma; çözünürlük; şişme kapasitesi) ve üretilen protein konsantrelerinin farklı gıda ürünü kategorilerine uygunluğu incelenmiştir.

3.11.1 Maillard konjugatlarının hazırlanması

Yapılan fonksiyonellik analizlerinin sonucunda protein dispersiyonlarının en zayıf fonksiyonel özelliğinin köpük oluşturma kapasitesi olduğuna karar verilmiş ve bu özelliğin Maillard reaksiyonu ile kovalent bağlı protein-karbonhidrat konjugatları oluşturmak suretiyle iyileştirilmesine çalışılmıştır. Bunun için, eldesi nispeten daha kolay ve üzerinde daha az çalışılmış olan AE-IP yöntemi ile elde edilmiş çörek otu protein konsantresi seçilmiş ve bu konsantre glikoz, laktoz ve maltodekstrin ile etkileşime sokulmuştur.

Konjugatlar hazırlanırken glikoz için 3 farklı protein:karbonhidrat oranı seçilmiştir (1:1, 1:2, 1:4). Laktoz ve maltodekstrin için ise sadece 1:2 protein:karbonhidrat oranında çalışılmıştır. Çörek otu protein izolatu (13,65 g) 750 ml deiyonize suyun içinde dispers hale getirilmiştir ve dispersiyon pH'ı 10 M NaOH ile 12'ye ayarlanmıştır. Protein 1 saat boyunca karıştırılmıştır. 1:1, 1:2, 1:4 protein:glikoz oranları için sırasıyla 13,65, 27,3, 54,6 g glikoz çözeltiliye eklenmiştir ve çözelti pH'sı 0,1 M HCl kullanılarak 11'e ayarlanmıştır. Her bir oran için oluşturulan 750 ml çözelti 3 tane borosilikat cam şişeye eşit bir şekilde bölüştürülmüştür. Şişenin bir tanesi hiç sıcaklığa tabi tutulmamıştır. Bir tanesi 15 dakika boyunca 100 °C'de bekletilmiştir. Bir tanesi de 30 dakika boyunca 100 °C'de bekletilmiştir. Su banyosundan çıkartılan çözelti reaksiyonunun devam etmemesi için anında buz havuzuna koyulmuş ve sıcaklık düşürülmüştür. Daha sonra oluşturulan konjugatlar liyofilize edilmiştir (Teknosem TRS 2/2V liyofilizatör, Teknosem Şirketi, İstanbul, Türkiye). Diğer protein:karbonhidrat konjugatları da aynı proses takip edilerek hazırlanmıştır (Li ve ark. 2009).

3.11.2 Transglutaminaz enzimi ile muamele edilmesi

Öncelikle ticari bir transglutaminaz enzimi alınıp numunenin enzim aktivitesi belirlenmiştir. Bunun için; Zeeb vd. (2013) yöntemi bazı modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır ve Z-gln-Gly substratından yararlanılmıştır. 12 mg/ml Z-Gln-Gly, 100 mM hidroksilamin, 10 Mm glutathion (indirgenmiş) ve 5 mM CaCl₂ den oluşan karışım 200 mM Tris bufferın (pH 6) içinde hazırlanmıştır. Hazırlanan reaksiyon kokteyli termomikserde 5 dk boyunca 37 C'de inkübe edilmiştir. Reaksiyon 10 dk sonra %12 w/v TCA çözeltisinden 500 µl eklenerek durdurulmuştur. Son olarak, FeCl₃ solüsyonu (%5 (w/v), 500 µl) 100 mM HCl çözeltisinin içinde hazırlanmış ve

spektrofotometrik ölçüm için solüsyona eklenmiştir. Spektrofotometrik ölçüm 525 nm’de yapılmıştır (Optima SB-3000 UV/VIS spektrofotometre). Aktivitesi bilinen Sigma-Aldrich firmasından alınmış Transglutaminase enzimi (Sigma kodu: T5398) referans olarak kullanılmış ve aktivitesi belirlenmek istenen enzimle aynı muamelelere tabi tutulmuştur. Kontrol olarak saf su kullanılmıştır.

Çörek otu, kabak çekirdeği ve üzüm çekirdeği protein konsantreleri, enzim aktivitesi belirlenen transglutaminaz enzimi ile Sigma firmasından alınan transglutminaz enzim aktivitesine denk gelecek şekilde 37 °C ve pH 7 de muamele edilmiştir.

3.12 Ekmeklik unlar, protein takviyesi içeren unlar ile bu ürünlerden üretilen ekmeklerin analizleri

Ekmeklik buğday unu, tam buğday unu özel amaçlı buğday unu (glütensiz) ve gıda amaçlı buğday kepeği numuneleri temin edilmiştir. Söz konusu numunelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini tespit amacı ile renk (Anonim, 2010a), protein (Anonim, 2014), asitlik ve nem (Anonim, 2012b), kül (Anonim, 2013c), sedimantasyon ve beklemeli sedimantasyon (Anonim, 2010d), düşme sayısı Anonim (2013b) metodları ile analizleri tamamlanmıştır. Unun kalitesi açısından önemli olan glüten (Anonim, 2008c), gluten indeksi (Anonim, 2008b) farinograf (Anonim, 2015a), ekstensograf (Anonim, 2015b) analizleri de **İstanbul Halk Ekmek (İHE)** firmasının Üniversitemize vereceği teknik destek taahhüdü kapsamında ücretsiz olarak yapılması tasarlanmıştır. İlgili firmadaki yoğunluk dolayısıyla söz konusu taahhüt yerine getirilememiştir. Dolayısıyla ekibimiz sektörün önemli firmalarından Polen Gıda ile iletişime geçmiş ve kendilerinin olanaklarına ve takvimine paralel olarak ilgili analizler yeniden kurgulanmıştır.

Her bir un numunesine bitkisel posalardan ekstrakte edilen protein izolatları, %0-5 oranlarında ilave edilerek takviye edilmiş numuneler de benzer şekilde analiz edilmiştir. Son olarak ekmeklik buğday unu ve özel amaçlı buğday unu (glütensiz) numunelerine eklemeler yapılarak normal ekmek ve glütensiz ekmek üretilmiştir. Üretilen ekmek numunelerine protein (Anonim, 2014), nem (Anonim, 2012b) belirtilen metodlar ile yapılırken mikrobiyolojik analizler ve numune hazırlama (Anonim, 2008d), toplam küf-maya analizi (Anonim, 2014b), *Bacillus cereus* (Anonim, 2006), *Clostridium perfringens* (Anonim, 2004a), *E.coli* (Anonim, 2012c) ve mezofilik aerobik bakteri (Anonim, 2004b) analizleri Üniversitemiz laboratuvarında yapılmıştır.

Projede incelenen ekmek ürünlerinin üretimi, **Polen Gıda'da uygulanan standart üretim koşulları** göz önüne alınarak **Polen laboratuvarında** yürütülmüştür. Kendilerinin hâlihazırda kek formülasyonlarına yönelik yürüttüğü çalışmalar bulunmaktadır ve firma ile ekibimizin sonraki projelerde ortak çalışmaya yönelik çabası halen söz konusudur.

3.13 İstatistiksel analiz

Projede yapılacak tüm deneyler en az iki paralel ve iki tekerrürlü olarak yapılmıştır. Deney sonuçları, varyans ve regresyon analizleri ($p < 0,05$ önem düzeyi) üzerinden değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Projenin genel koordinasyonu ve ön hazırlıklar

Proje kapsamında ilk üç (3) ay termin planda belirtildiği gibi genel koordinasyon, projedeki bilimsel çalışmalara başlayabilmek için gerekli altyapının hazırlanması, kimyasal maddelerin sağlanması, proje bursiyerinin (yüksek lisans, Özgenur Özdemir) görevlendirilmesi konularına ayrılmıştır. Bu bağlamda gerekli alım ve kurulumlar yapılmış ve bütün ilgili deney setleri kurulmuştur. Tedarik edilen donanımlar arasında, ultrafiltrasyon cihazı (Şekil 1) ve elektroforez ünitesi (Şekil 2) de bulunmaktadır. Buna ek olarak, ana donanımlardan biri olan tensiyometre, daha nitelikli analizler yapabilmek düşüncesiyle proje bütçesinden ayrılan pay ve yine proje bütçesinden gelen kurum desteğinin bir kısmının birleştirilmesi yoluyla alınmıştır (Şekil 3). Bu cihazın yüzey gerilimi ölçmenin yanında ara yüzey elastisitesi ve temas açısı ölçme kabiliyetleri de bulunmaktadır. Son olarak kurum desteğinin kalan kısmı ve hizmet alımı bütçesinden transfer edilen miktar ile liyofilizatör alımı gerçekleştirilmiştir (Şekil 4).



Şekil 1. Ultrafiltrasyon cihazı (Sartorius Masterflex Ultrafiltration System).



Şekil 2. Elektroforez ünitesi (MiniProtean Tetra Cell).



Şekil 3. Tensiyometre (OneAttention Theta).



Şekil 4. Liyofilizatör (Teknosem TRS 2/2V).

Bu bağlamda Neva Ltd. & Sim Ltd. şirketinden yağı alınmış (soğuk pres) kabak çekirdeği, çörek otu, keten tohumu, üzüm çekirdeği, nar çekirdeği, fındık, susam, incir çekirdeği numuneleri temin edilmiş ve bu numunelerin genel fizikokimyasal analizleri yapılmıştır. Neva firmasında bu dönemde erik çekirdeği numuneleri bulunmadığından bu numuneler analiz edilememiştir. Piyasadan bu numunelerin uygun kalitedeki formlarda tedariki uygun olmamıştır.

4.2 Çörek otu proteinlerinin üretilmesi ve fonksiyonel özelliklerinin değerlendirilmesi

BU BÖLÜMDEKİ ÇALIŞMALAR 8 AĞUSTOS 2017 TARİHİNDE “FOOD HYDROCOLLOIDS” DERGİSİNE GÖNDERİLMİŞTİR. İLGİLİ BELGE, EK 1’DE SUNULMAKTADIR.

Bu çalışmada çörek otu protein konsantreleri üretilerek temel fizikokimyasal ve fonksiyonel özellikleri değerlendirilmiştir. Bu bağlamda öncelikle ekstraksiyon yöntemlerinin protein konsantrelerine etkileri incelenecektir.

4.2.1 Ekstraksiyon yöntemlerinin çörek otu protein konsantrelerine etkisi

Bütün analizlerden önce, soğuk pres yöntemi ile yağı alınan çörek otu posalarının bileşim analizi yapılmıştır. Posaların protein, yağ, kül ve nem içerikleri sırasıyla %26.5, 22.3, 7 ve 6 olarak bulunmuştur. 3 farklı protein izolasyon tekniği kullanılarak (AE-IP, SE veya MP), protein konsantreleri hazırlanmıştır. Tablo 1’de konsantrelerin protein, yağ, kül ve nem içerikleri verilmiştir. AE-IP yöntemine dayanılarak hazırlanan konsantrenin protein içeriği % 54.7 olarak bulunmuştur (Tablo 1). Dolayısıyla, AE-IP işlemlerinden sonra konsantrenin protein içeriğindeki iyileşme derecesi yaklaşık %107 olarak gerçekleşmiştir. Bu numune için solvent (hegzan) ekstraksiyonu protein içeriğinde ek %20’lik bir iyileşme sağlamıştır. SE yöntemi durumunda, prosedür biraz daha karmaşıktır ve muhtemelen endüstriyel bir ölçekte kullanım durumunda daha gelişmiş bir konfigürasyona ihtiyaç duyulacaktır. Ancak, protein geri kazanım derecesi AE-IP yönteminden belirgin derecede yüksektir (% 67.8).

Tablo 1. Numunelerin protein (%), nem (%) ve kül miktarlarının hegzan ekstraksiyonundan önce ve sonra belirlenmesi.

| Numune/Yöntem | Solvent ekstraksiyonu | Protein (%) | Yağ (%) | Nem (%) | Kül (%) |
|----------------------|-----------------------|-------------|----------|----------|----------|
| Soya protein izolatu | - | 88.7±0.4 | | 4.64±0.1 | 6.61±0.1 |
| Yağı alınmış posa | - | 26.47±0.1 | 22.3±0.5 | 6.03±0.8 | 7.04±0.7 |

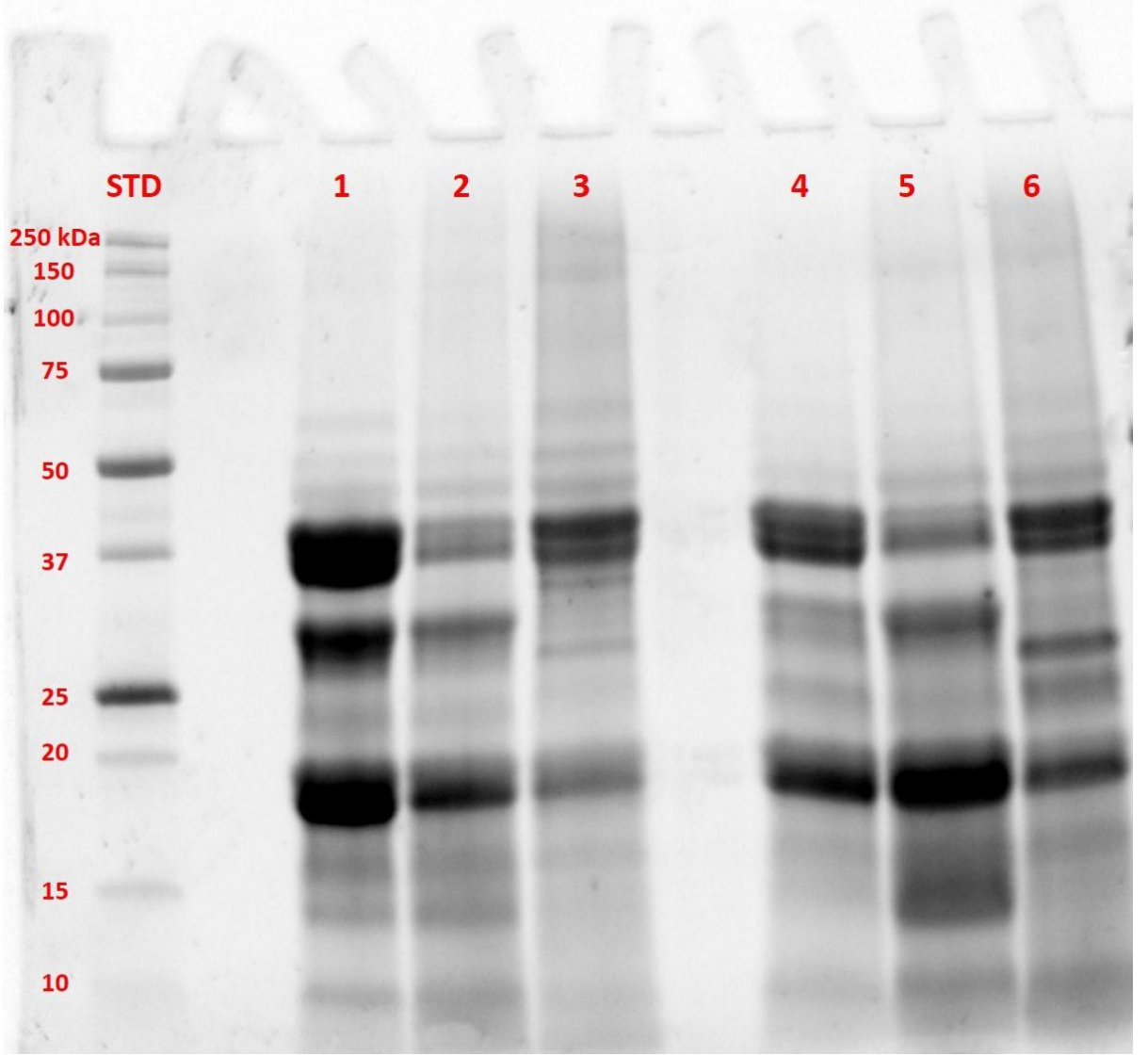
| | | | | | |
|--------------------------|---|-----------|----------|-----------|----------|
| Yağı alınmış posa | + | 37.04±0.1 | | 6.69±0.8 | 7.55±0.4 |
| | - | | 21.56±0. | | |
| AE-IP | | 54.7±0.5 | 1 | 0.84±0.1 | 1.32±0.1 |
| AE-IP | + | 65.83±0.1 | | 6.87±0.3 | 4.32±0.4 |
| | - | | 18.14±0. | | |
| SE | | 67.82±2.1 | 6 | 7.02±0.1 | 3.81±0.1 |
| SE | + | 72.83±0.6 | | 6.89±0.5 | 8.37±0.3 |
| | - | | 18.24±0. | | |
| MP | | 85.49±2.9 | 4 | 9.56±0.2 | 1.85±0.8 |
| MP | + | 90.3±1.2 | | 2.26±0.88 | 3.5±0.6 |

Çoğu durumda, SE ile muamele edilmiş protein konsantrelerinin nem ve kül içeriği, muhtemelen sistemdeki tuz içeriğinden dolayı AE-IP ve MP ile işlenmiş konsantrelerinden daha yüksek kül ve nem içeriğine sahiptir (Tablo 1). Buna ek olarak, AE-IP örneklerinin kül ve nem içeriği, bu yöntemin numunelerden lif ve diğer protein dışı hidrokolooidlerin uzaklaştırılmasında diğer iki yöntemle göre daha etkili olduğunu göstermiştir. Bütün durumlarda sulu ekstraksiyonlar sistemden küçük bir miktar yağın sistemden uzaklaşmasına sebep olmuştur. Öte yandan bütün durumlarda hegzan ekstraksiyonu ile protein konsantrasyonu artmıştır (Tablo 1). Solvent ekstraksiyonunun nem ve kül değerlerine etkisi net bir trend oluşturmamıştır.

4.2.2 Protein konsantrelerinde moleküler büyüklük dağılımı analizi (SDS-PAGE)

Çörek otu tohumlarından elde edilen protein konsantrelerinin moleküler ağırlık dağılımı, hegzan ekstraksiyonundan önce ve sonra SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 5). Öncelikle, başlıca bantların 15-40 kDa arasında yer aldığı gözlenmiştir. Yağı alınan AE-IP numuneleri için (Şerit 1), 10-15 kDa ile >40 kDa arasında diğer soluk bantlar da bulunmuştur. Bir ölçüde, diğer iki şeritte (SE, MP) bulunan başlıca bantlar da, Şerit 1 bantları ile karşılaştırılabilir. Her durumda, üretim metodolojilerinin konsantredeki protein kompozisyonunu etkilediği açıktır. Bazı bantların tüm şeritlerde görünmemesine ek olarak, ortak şeritlerin kalınlığı da genel olarak farklı bulunmuştur. Daha önce Haq ve ark. (1999), çörekotu proteinlerinin 10-200 kDa arasında değişmekte olduğunu bildirmiştir. Bu araştırmacılar proteinleri Rotofor teknolojisi ile parçalara ayırmıştır ve başlıca bantlar yaklaşık 25, 40, 65 ve 200 kDa dolaylarında bulunmuştur. Çalışmadaki ana bantlar, çoğu durumda 15 kDa ve 40 kDa civarında bulunduğu için, mevcut bulgular genel olarak önceki bulgularla tutarlıdır.

Hegzan ekstraksiyonundan sonra özellikle AE-IP numuneleri için bantların genişlediği gözlenmiştir. Daha geniş bantların daha hidrofobik bantları temsil etmesi söz konusu olmakla birlikte solvent ekstraksiyonunun protein bantlarının çeşitliliğini etkilemediği söylenebilir.



Şekil 5. Çörekotu proteinlerinin elektroforetik analizi (SDS-PAGE).

4.2.3 Protein konsantrelerinin fonksiyonel özellikleri

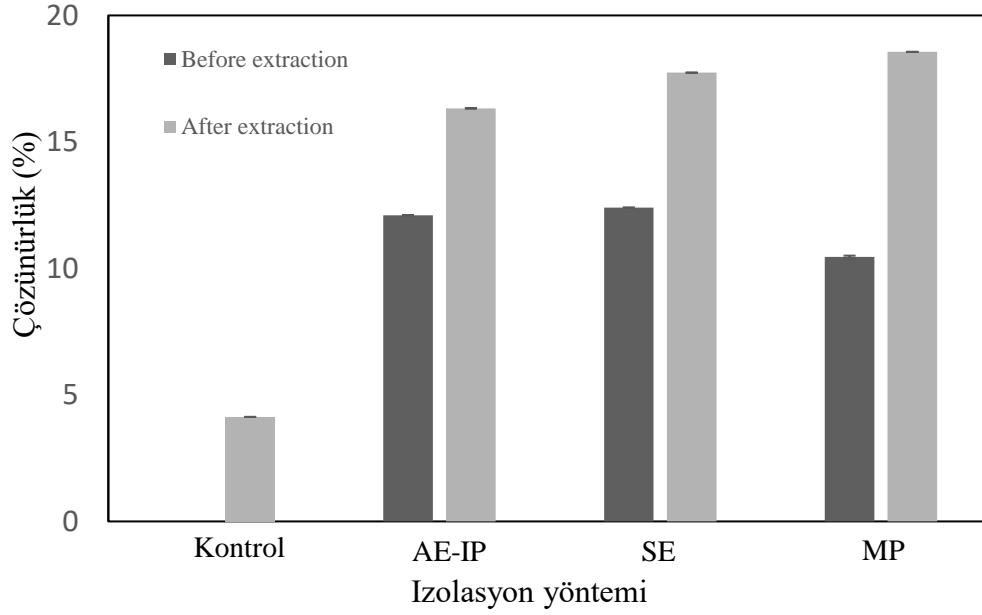
Üretilen konsantrelerin çözünürlük, su ve yağ tutma kapasiteleri, emülsifikasyon ve köpük oluşturma kapasiteleri ve yüzey aktiviteleri incelenmiştir.

4.2.3.1 Çözünürlük

Mevcut protein konsantrelerinin çözünürlük (pH 7.0) karakteristikleri Şekil 6'de sunulmuştur. Solvent ekstraksiyonu bütün durumlarda protein çözünürlüğünü arttırmıştır. Solvent ekstraksiyonundan önce; AE-IP, SE ve MP muameleleri ile üretilen konsantreler sırasıyla ve yaklaşık olarak %12.1, 12.4 ve 10.4 çözünürlüğe sahip bulunmuştur. Hegzan ekstraksiyonundan sonra söz konusu rakamlar %32.2, 37% ve 73 değerlerine yükselmiştir.

Mevcut konsantrenin çözünürlüğü, her durumda referans protein kaynağından (soya proteini izolatu, % 4.13) daha yüksek olarak bulunmuştur. Ancak, soya izolatlarının fonksiyonel

özellikleri ve çeşitli muamelelere duyarlılığı, protein denatürasyonunu ve çözünürlüğünü etkileyen işleme koşullarına göre farklılık göstermektedir. Muhtemelen referans numune performansı da işleme koşullarından etkilenmiştir.

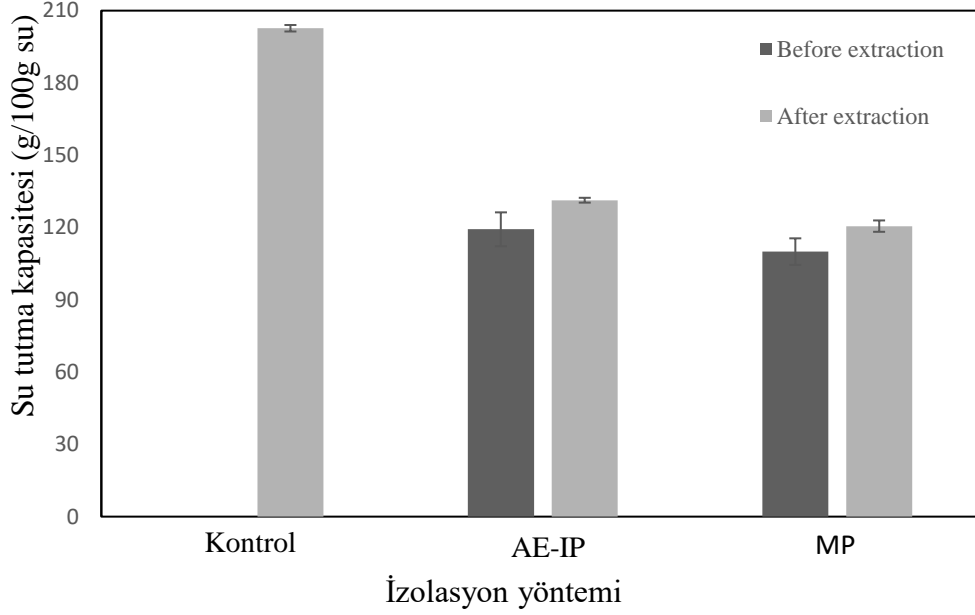


Şekil 6. Proteinlerin çözünürlük özellikleri (ekstraksiyondan önce ve sonra).

4.2.3.2 Su ve yağ tutma kapasitesi

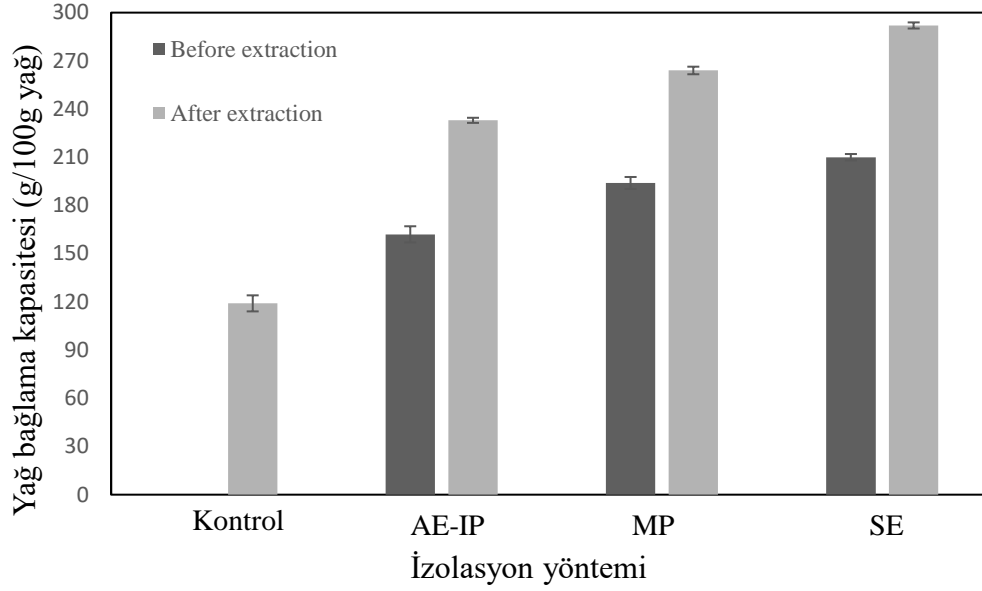
Proteinlerin su veya yağ tutma kapasitesi, belirli bir protein ürününün 1 gramı tarafından absorbe edilebilen su veya yağ miktarı olarak tanımlanır (Stone vd. 2015). Mevcut proteinlerin su tutma kapasitesi (WHC, "water holding capacity") değerleri Şekil 7 üzerinde sunulmuştur. Hegzan ekstraksiyonundan önce AE-IP ve MP yöntemleri ile üretilen konsantrelerin WHC değerleri sırasıyla 119.2 ve 110 (g/100 g su) olarak belirlenmiştir. Ekstraksiyondan sonra bu değerler 131.3 ve 120.5 (g/100 g su) mertebesine yükselmiştir. Bütün durumlarda, soya protein izolatı mevcut numunelerden daha yüksek WHC değerleri göstermiştir (202 g/100g water) (Şekil 7).

Nem içeriği verilerine (Tablo 1) dayanarak, muhtemelen AE-IP örneklerinde lif veya diğer protein dışı hidrokolloidler çok az veya hiç bulunmamaktadır. Yüksek WHC, kısmen hidrofilik glikoproteinlerin varlığına bağlı olabilir.



Şekil 7. Protein konsantrelerinin WHC değerleri.

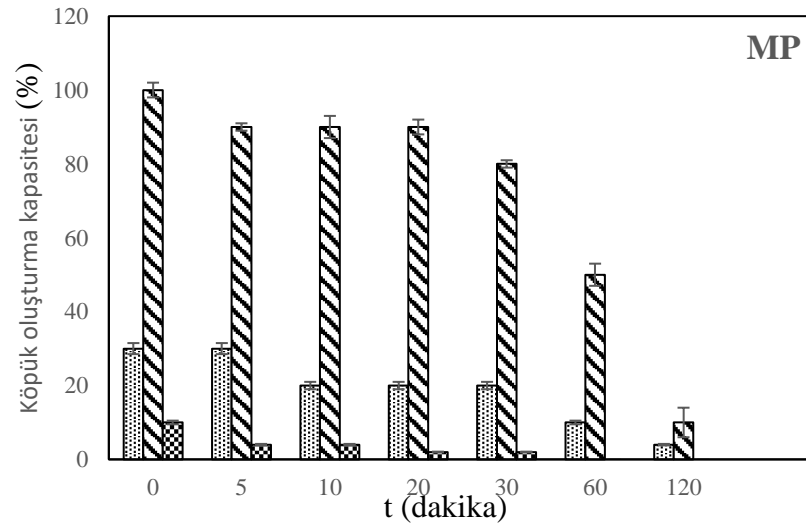
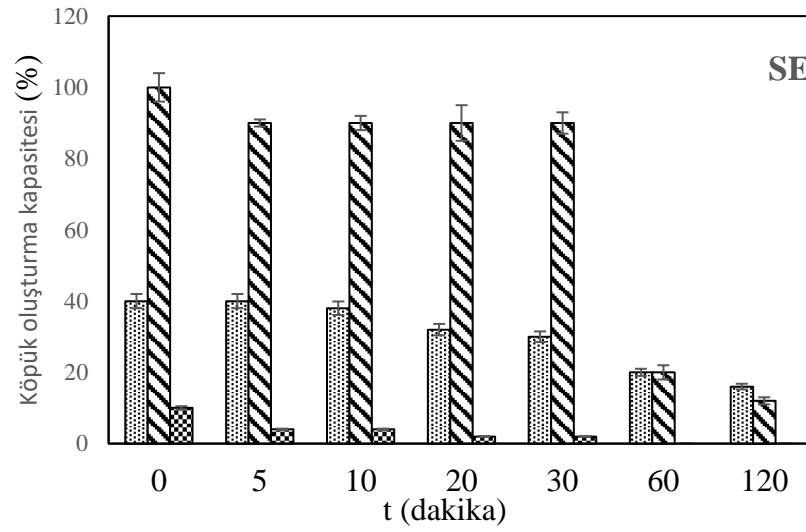
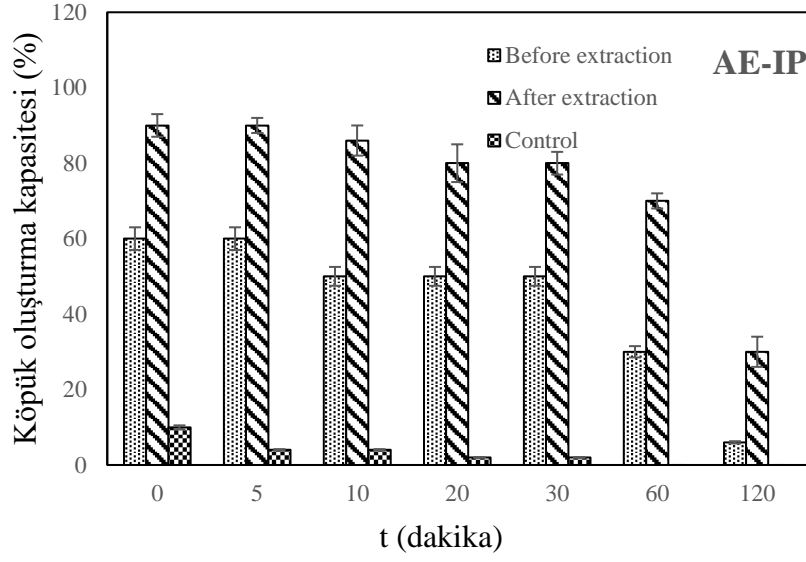
Tüm numuneler için yağ tutma kapasitesi (OHC) değerleri Şekil 8 üzerinde sunulmuştur. Tuz ekstraksiyonu; AE-IP veya MP numunelerinden daha yüksek OHC değerleri ile sonuçlanmıştır (Şekil 8). Ayrıca, solvent ekstraksiyonu her durumda OHC değerlerini arttırmıştır. Hegzan ekstraksiyonundan önce, AE-IP, SE ve MP numuneleri için OHC, sırasıyla 162, 210 ve 194 (g/100 g yağ) olarak belirlenmiştir. Ekstraksiyondan sonra, bu değerler 232, 292 ve 264 (g / 100 g yağ) değerlerine yükselirken, ticari soya proteini izolatu için OHC 119 (g / 100 g yağ) olarak gerçekleşmiştir. Sonuç olarak, mevcut konsantrelerin OHC değerleri, her durumda soya proteini izolatından daha yüksek olarak bulunmuştur.



Şekil 8. Protein konsantrelerinin OHC değerleri.

4.2.3.3 Köpük oluşturma (köpürme) kapasitesi

Köpürme kapasitesi (FC, foaming capacity), bir proteinin pH, sıcaklık ve iyonik kuvvet gibi iyi tanımlanmış deneysel koşullar altında stabil bir köpük oluşturabilme kabiliyetidir. Ekstraksiyon yöntemlerinin mevcut örneklerin FC değerleri üzerindeki etkisi Şekil 5 üzerinde özetlenmiştir. FC değerleri, ekstraksiyon koşulları tarafından net olarak etkilenmiştir. Mevcut protein konsantreleri için FC değerleri % 30-100 arasında geniş bir aralık göstermiştir. Hegzan ekstraksiyonundan önce; AE-IP, SE ve MP numuneleri için köpük stabilize etme kapasiteleri sırasıyla% 60,% 40 ve% 30 olarak bulunmuştur. Ekstraksiyon işleminden sonra, köpürme kapasitesi değerleri, bir kez daha ticari soya proteini izolatınıninkinden daha yüksek olarak bulunmuştur. Deng vd. (2013), soya fasulyesi protein numuneleri için karşılık gelen değeri, pH 7.5'te% 20.23 olarak belirlemiştir. Yağ ekstraksiyonu, her durumda, proteinlerin termal ve çözücü kaynaklı denatürasyonuna neden olarak köpükleme kapasitesini arttırmıştır. Bu değişiklikler ayrıca yukarıda ayrıntılı olarak açıklandığı gibi OHC ve WHC değerlerini de etkileyebilecektir.

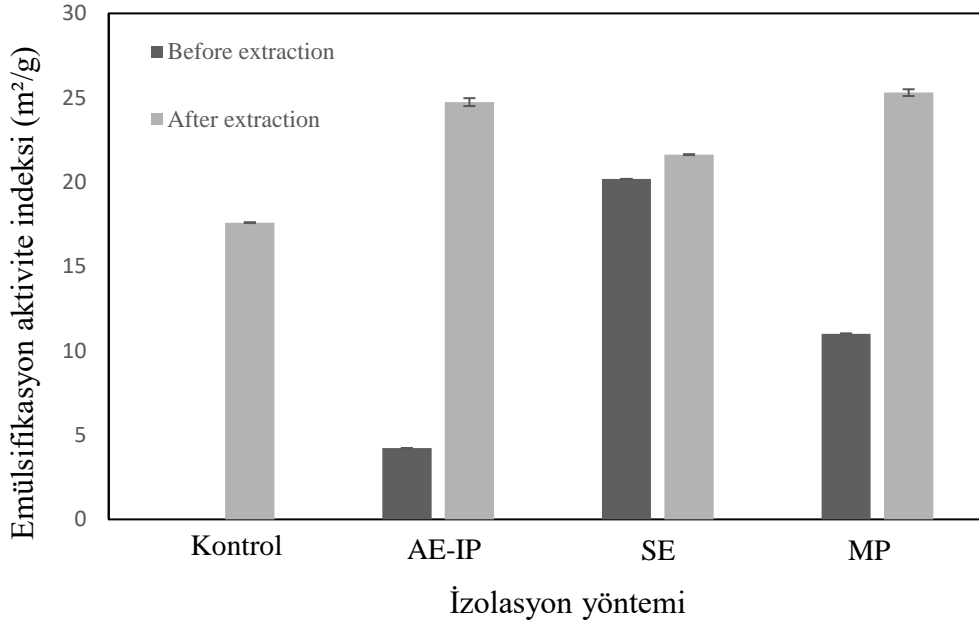


Şekil 9. Zamana ve ekstraksiyon yöntemine bağlı olarak köpürme kapasitesinin incelenmesi.

Köpük kararlılığı zamanın fonksiyonu olarak gösterilmektedir (Şekil 9). Köpüklerin stabilitesi, hem ekstraksiyon yöntemine hem de depolama süresine net olarak bağlı bulunmuştur. Bütün durumlarda köpük hacminde önemli azalma bulunmuştur (0-2 saat).

4.2.3.4 Emülsifikasyon aktivite indeksi (EAI) ve emülsiyon kararlılığı

Emülsifikasyon kapasitesi (EC), belirli bir miktarda protein ile emülsifiye edilebilen yağ miktarının, g başına g cinsinden oranı olarak tanımlanabilir. EC değerlerine ve dispers fazların fiziko-kimyasal özelliklerine dayanarak, emülsifikasyon aktivite indeksi (EAI) tanımlanabilir. EAI, belli bir protein miktarı (m^2/g^{-1}) ile dengelenebilen yüzey alanı miktarını belirtir. Hegzan ekstraksiyonundan önce, AE-IP, SE ve MP numuneleri sırasıyla 4.2, 20.2 ve $11 m^2.g^{-1}$ EAI değerlerine sahip olarak bulunmuştur. Ekstraksiyon işleminden sonra değerler sırasıyla 24.7, 21.6 ve $25.3 m^2.g^{-1}$ 'e yükselmiştir (Şekil 10).



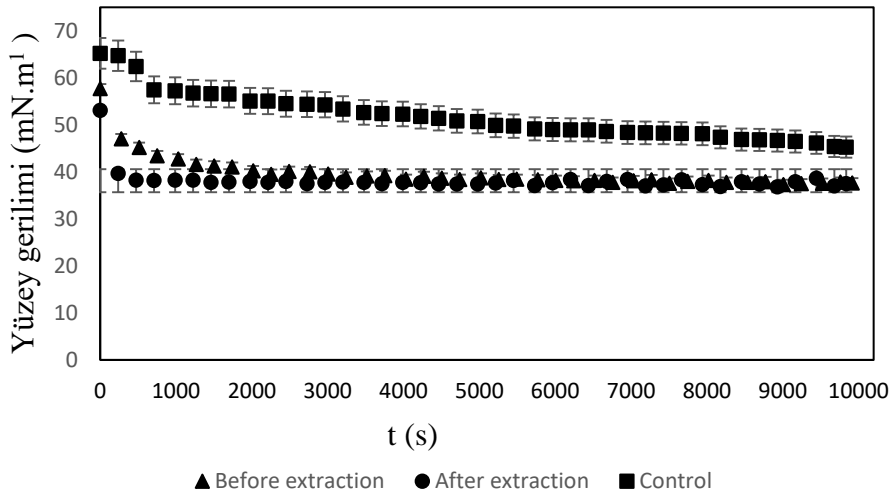
Şekil 10. Mevcut protein konsantrelerinin EAI değerleri.

Çoğu durumda, mevcut örneklerin EAI değerleri, ticari soya proteini izolatının EAI değerlerinden ($17.59 \pm 0.5 m^2.g^{-1}$) daha yüksek bulunmuştur (Şekil 10).

OHC, WHC, emülsifikasyon ve köpürme özellikleri üzerine yapılan çalışmaların hepsi % 1'lik bir sabit protein konsantrasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Mevcut örnekler ile literatür verileri arasındaki uyumsuzlukların bazıları konsantrasyon, pH ve işleme tekniklerindeki farklılıklardan kaynaklanmış olabilir.

4.2.3.5 Dinamik yüzey geriliminin ölçülmesi (Drop shape tensiometry)

Hava-protein çözeltileri ara yüzeyindeki yüzey gerilimi, “drop shape tensiometry” ile belirlenmiştir (Şekil 11). Yağ ekstraksiyonundan önce ve sonra protein konsantrasyonunda (AE-IP) yüzey gerilimi değerleri, 10.000 saniyeden sonra ve %0.1'lik bir protein konsantrasyonunda sırasıyla yaklaşık 37.6 ve 37.5 mN/m olarak belirlenmiştir. Proteinlerin uyguladığı yüzey basıncı, 10,000 saniyeden sonra aynı protein konsantrasyonunda soya proteinden ($\gamma = 49$ mN.m⁻¹) daha üstün olarak değerlendirilmiştir. Her ne kadar hegzan ekstraksiyonundan önceki ve sonraki numuneler için denge yüzey gerilimi değerleri karşılaştırılabilir olsa da, hegzan ile ekstrakte edilen numune, yüzey basıncının bu seviyesine daha kısa sürede ulaşmıştır ve bu da hem adsorpsiyon davranışındaki bazı farklılıklar, hem de plato değerinin daha belirgin biçimde konsantrasyon bağımlılığı anlamına gelebilmektedir. Sistemde kalan yağın proteinlerle etkileşimi; proteinler ve hava fazı arasındaki etkileşimlerin seviyesini olumsuz olarak artırabilir. Bu bulgular burada hazırlanan protein konsantratlarının diğer fonksiyonellik testlerinde de gösterildiği gibi belirgin bir yüzey aktivitesi gösterdiğini bulgulamıştır. Bildiğimiz kadarıyla, önceki literatürde çörekotu protein konsantrasyonu için yüzey gerilimini ölçen başka bir çalışma bulunmamaktadır.



Şekil 11. Protein numuneleri için yüzey geriliminin zamana bağlı değişimi.

Bu çalışmada, basit metodolojilere dayanarak, çörekotu protein konsantrasyonlarının üretilmesinin mümkün olduğu gösterilmiştir. Hegzan ekstraksiyonu; protein-çözücü etkileşimlerinin artırılması ya da proteinlerin kısmen denatürasyonuna bağlı olarak, çoğu durumda fonksiyonel özelliklerini açıkça arttırmıştır. Isıtma veya hegzan ekstraksiyonu ile oluşturulmuş proteinler; sulu ekstraksiyonda elde edilen proteinlerin kötü fonksiyonel

özelliklerini iyileştirmektedir. Su tutma kapasitesi hariç, tüm fonksiyonel özelliklerin, burada kullanılan ticari soya proteini izolatu numunesine kıyaslanabilir veya daha üstün olduğu bulunmuştur.

Söz konusu proteinlerin su tutma özelliklerinin nispeten zayıf olmasına rağmen, birçok gıda ürününün üretiminde etkili olabilecek önemli emülsiyon ve köpük oluşum kapasitelerinin var olduğu gösterilmiştir. Günümüzde mevcut örneklerdeki protein işlevselliğinin yanı sıra potansiyel biyoaktif özelliklerinin geliştirilmesi üzerinde de çalışmaktayız.

4.3 Nar çekirdeği, kabak çekirdeği ve üzüm çekirdeği proteinlerinin üretilmesi ve fonksiyonel özelliklerinin değerlendirilmesi

Bu çalışmada nar çekirdeği, kabak çekirdeği ve üzüm çekirdeği protein konsantreleri üretilerek temel fizikokimyasal ve fonksiyonel özellikleri değerlendirilmiştir.

4.3.1 Nar çekirdeği, kabak çekirdeği ve üzüm çekirdeği protein konsantrelerinin temel fizikokimyasal içeriği

Kabak çekirdeği, üzüm çekirdeği ve nar çekirdeği numunelerinden izoelektrik çökeltme, tuzla ekstraksiyon ve diyaliz ve son olarak misel oluşturarak çökeltme olarak 3 farklı yöntemle protein izole edilmiştir. Daha sonra elde edilen protein konsantreleri liyofilize edilmiştir. Numunelerin temel karakterizasyonunun belirlenmesi açısından protein, nem ve kül analizleri yapılmıştır (Tablo 2).

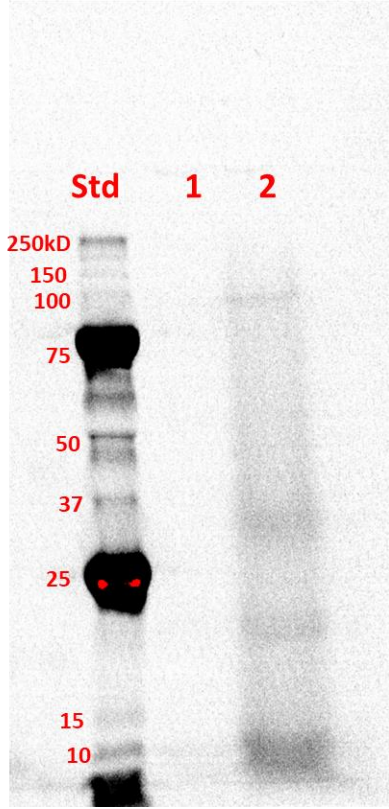
Tablo 2. Protein izolatlarının protein, nem ve kül analiz sonuçları. (AE-IP: Alkali ekstraksiyon izoelektrik çöktürme, SE; Tuzla çöktürme, MP: misel oluşturarak çöktürme)

| Protein konsantratu | Numune | Protein içeriği (%) | Nem (%) | Kül (%) |
|----------------------------|-----------------|----------------------------|----------------|----------------|
| AE-IP | Nar çekirdeği | 45,81±17,89 | 14,30±7,17 | 2.75±0,11 |
| | Kabak çekirdeği | 82,99±1,31 | 5,67±1,04 | 1.71±0,04 |
| | Üzüm çekirdeği | 30,1±14,98 | 5,71±1,28 | 5.45±0,32 |
| SE | Nar çekirdeği | 20,78±0,53 | 7,96±1,34 | 17.13±0,07 |
| | Kabak çekirdeği | 66,1±1,31 | 8,95±0,24 | 12.07±0,10 |
| | Üzüm çekirdeği | 37,1±14,17 | 17,94± 2,64 | 12,59±2,06 |
| MP | Kabak çekirdeği | 86.5967±0.3886 | 11,00±0,21 | 4,06±0,39 |

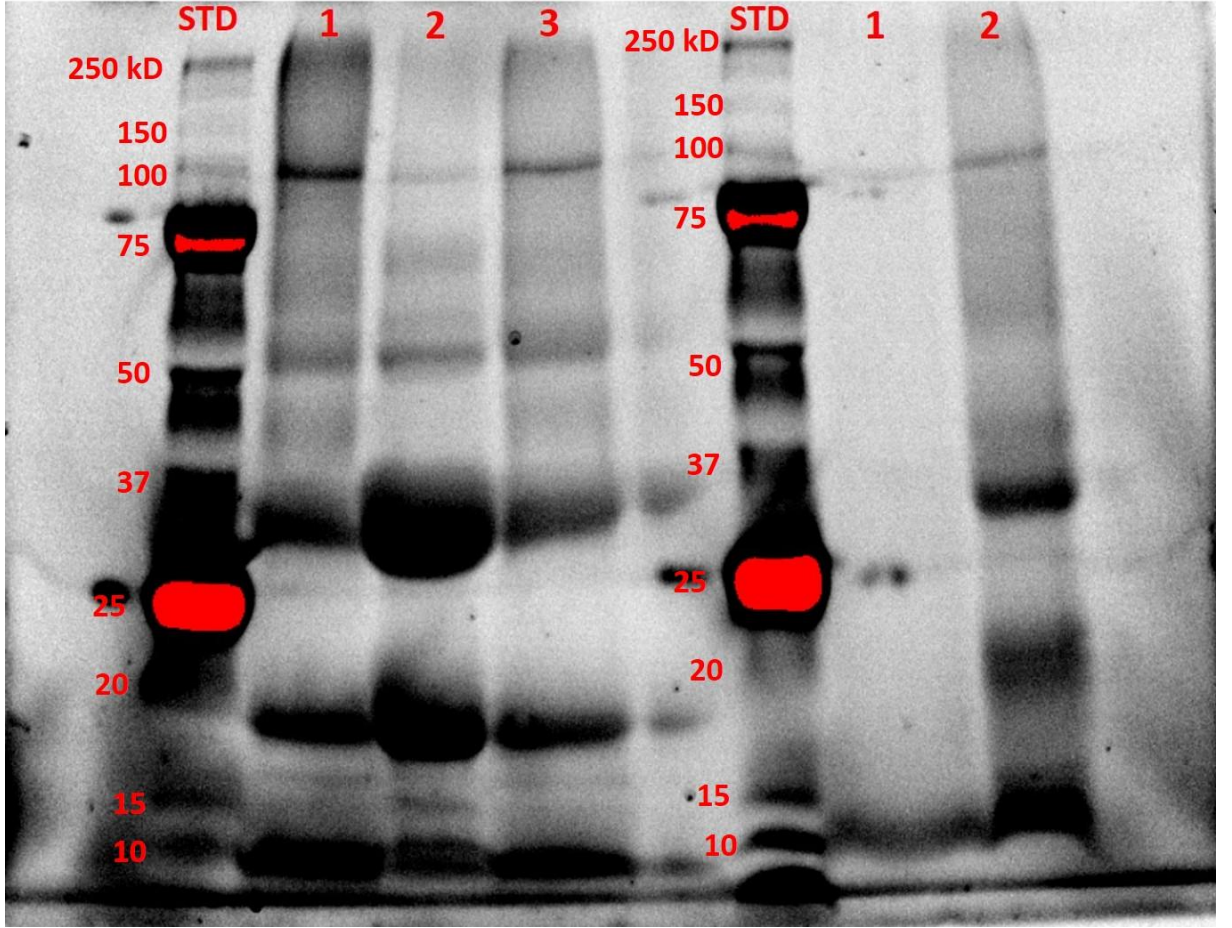
4.3.2 Nar çekirdeği, kabak çekirdeği ve üzüm çekirdeği protein konsantrelerinin karakterizasyonu

Temel karakterizasyonun belirlenmesi açısından Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemiyle numunelerin moleküler ağırlıklarının belirlenmiştir.

Aşağıdaki Şekil 12'de üzüm çekirdeği, Şekil 13'de kabak çekirdeği ve nar çekirdeği numunelerinin SDS-PAGE görüntüsü verilmiştir.



Şekil 12. Üzüm çekirdeği protein izolatlarının SDS-PAGE görüntüsü (%1). 1. Şerit izoelektrik çökelme, 2. Şerit, tuzla muamele.



Şekil 13. Kabak çekirdeği (sol taraf) ve nar çekirdeği (sağ taraf) protein konsantresi SDS-PAGE analizi (%1). 1.şerit AE-IP, 2.şerit SE, 3.şerit MP.

4.3.3 Nar çekirdeği, kabak çekirdeği ve üzüm çekirdeği protein konsantrelerinin temel fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi

4.3.3.1 Çözünürlük

Kabak çekirdeği, nar çekirdeği ve üzüm çekirdeği protein konsantrelerinin çözünürlükleri (%) Tablo 3 'de gösterilmiştir.

Tablo 3. AE-IP, SE ve MP yöntemleriyle hazırlanan kabak çekirdeği, nar çekirdeği ve üzüm çekirdeği protein konsantrelerinin çözünürlükleri (%). Veriler, standart sapma ile üç bağımsız deneyin ortalamasıdır.

| İzolat | Numune | Çözünürlük(%) |
|---------|-----------------|---------------|
| Kontrol | Kazeinat | 17.09±0.01 |
| AE-IP | Nar çekirdeği | 40.81±0.01 |
| | Kabak çekirdeği | 4.95±0.03 |
| | Üzüm çekirdeği | 92.52±0,02 |
| SE | Nar çekirdeği | 28.28±0.1 |
| | Kabak çekirdeği | 39.99±0.04 |
| | Üzüm çekirdeği | 31.65±0,03 |
| MP | Kabak çekirdeği | 12.32±0.02 |

4.3.3.2 Su ve yağ tutma kapasitesi

Kabak çekirdeği, nar çekirdeği ve üzüm çekirdeği protein konsantrelerinin su ve yağ tutma kapasiteleri (%) Tablo 4 üzerinde gösterilmiştir.

Tablo 4. İzoelektrik çöktürme (AE-IP), tuzla ekstraksiyon ve diyaliz (SE), misel oluşturarak çöktürme (MP) yöntemleriyle elde edilen protein izolatlarının % su ve yağ tutma kapasitesi. Sonuçlar 3 bağımsız deneyin ortalamasıdır.

| İzolat | Örnek | Su tutma kapasitesi (g/100 g su) | Yağ tutma kapasitesi (g/100 g yağ) |
|---------|-----------------|----------------------------------|------------------------------------|
| Kontrol | Kazeinat | 50,98±1,5 | 159,38±0,05 |
| AE-IP | Nar çekirdeği | 178,27±8,5 | 337,27±34,2 |
| | Kabak çekirdeği | 175,75±11,9 | 182,16±15,3 |
| | Üzüm çekirdeği | 257,96±5,08 | 414,53±38,6 |
| SE | Nar çekirdeği | 12,21±0,4 | 364,50±35,3 |
| | Kabak çekirdeği | 90,63±33,8 | 240,37±0,43 |
| | Üzüm çekirdeği | 157,66±74,4 | 1131,28±10,8 |
| MP | Kabak çekirdeği | 81,15±5,2 | 267,63±76,3 |

4.3.3.3 Köpük kapasitesi ve stabilitesi

Kabak çekirdeği, nar çekirdeği ve üzüm çekirdeği protein konsantrelerinin köpük kapasitesi (%) Tablo 5 üzerinde gösterilmiştir.

Tablo 5. İzoelektrik çöktürme (AE-IP), tuzla ekstraksiyon ve diyaliz (SE), misel oluşturarak çöktürme (MP) yöntemleriyle elde edilen protein izolatlarının % köpük oluşturma kapasitesi. Sonuçlar 3 bağımsız deneyin ortalamasıdır. (ND: köpük belirlemedi).

| İzolat | Numune | Köpük kapasitesi (%) | | |
|---------|-----------------|----------------------|------|------|
| | | pH=3 | pH=5 | pH=7 |
| Kontrol | Kazeinat | | | |
| AE-IP | Nar çekirdeği | 33,33 | ND | 2 |
| | Kabak çekirdeği | 22,22 | ND | ND |
| | Üzüm çekirdeği | ND | ND | ND |
| SE | Nar çekirdeği | ND | ND | ND |
| | Kabak çekirdeği | 40 | 30 | ND |
| | Üzüm çekirdeği | ND | ND | ND |
| MP | Kabak çekirdeği | ND | ND | ND |

4.3.3.4 Emülsiyon oluşturma kapasitesi ve stabilitesi

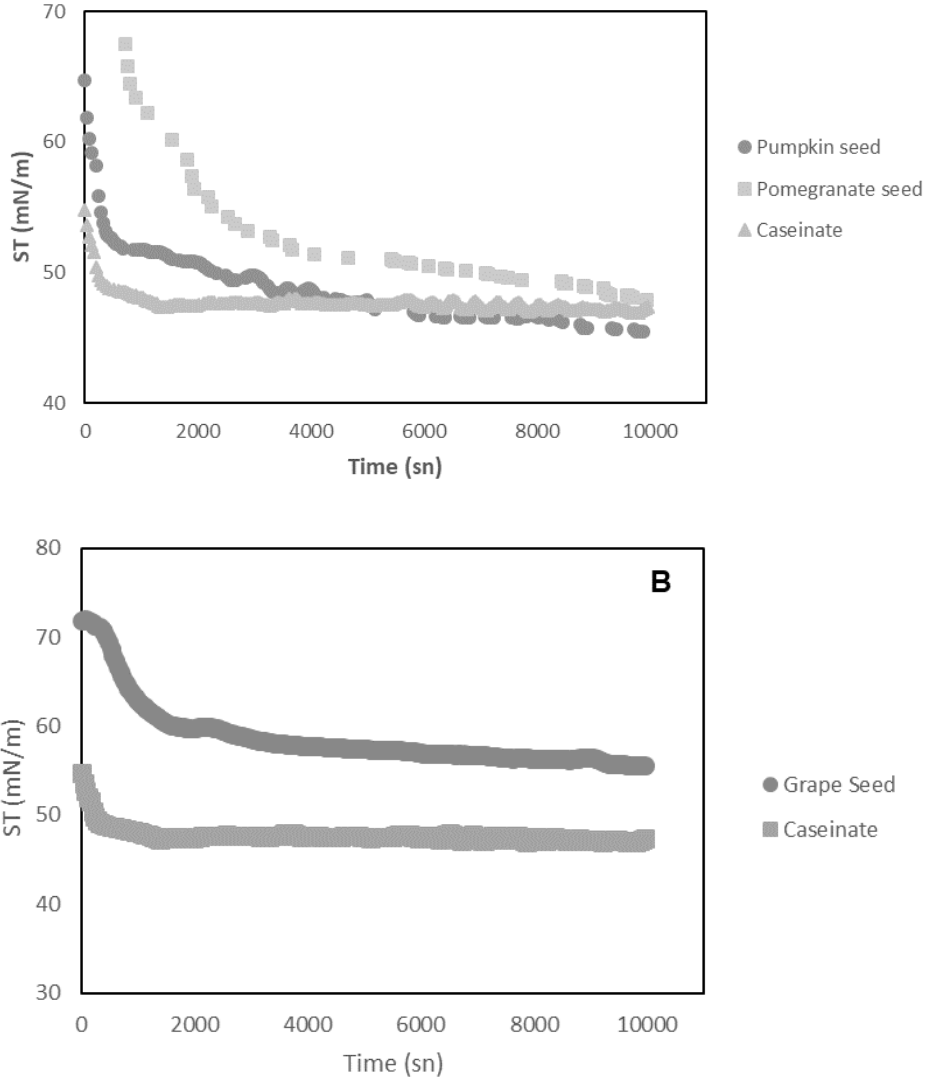
Kabak çekirdeği, nar çekirdeği ve üzüm çekirdeği protein konsantrelerinin emülsiyon oluşturma kapasitesi (%) Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. İzoelektrik çöktürme (AE-IP), tuzla ekstraksiyon ve diyaliz (SE), misel oluşturarak çöktürme (MP) yöntemleriyle elde edilen protein izolatlarının emülsiyon aktivite indeksi (EAI). Sonuçlar 3 bağımsız deneyin ortalamasıdır.

| İzolat | Numune | EAI (m^2/g) |
|----------------|-----------------|-----------------|
| Kontrol | Kazeinat | 40±0.01 |
| AE-IP | Nar çekirdeği | 15.24±0.006 |
| | Kabak çekirdeği | 6.05±0.01 |
| | Üzüm çekirdeği | 22,3±0,01 |
| SE | Nar çekirdeği | 31.26±0.01 |
| | Kabak çekirdeği | 21.02±0.03 |
| | Üzüm çekirdeği | 20,22±0,01 |
| MP | Kabak çekirdeği | 1.57±0.003 |

4.3.3.5 Dinamik yüzey geriliminin ölçülmesi (Drop shape tensiometry)

Kabak çekirdeği, nar çekirdeği ve üzüm çekirdeği protein konsantrelerinin (%0,1) hava-su yüzey gerilimi (mN/m) ölçümleri Şekil 14'de gösterilmiştir.



Şekil 14. Kabak çekirdeği, nar çekirdeği ve üzüm çekirdeği protein konsantresi hava-su yüzey gerilimi (mN/m) ölçümleri. A: Kabak çekirdeği, nar çekirdeği; B: Üzüm çekirdeği (%0,1).

4.4 Fındık ve susam proteinlerinin üretilmesi ve fonksiyonel özelliklerinin değerlendirilmesi

Bu numunelere ek olarak, kurumumuzun bir çalışanı (İZÜ-TTO) ve Namık Kemal Üniversitesi yüksek lisans öğrencisi olan Harun Sami Çiftçi tarafından susam ve fındık posaları ile ilgili çalışmalar da başlatılmıştır. Final raporuna bu alandaki çalışmalar da eklenmiştir. Proje yürütücüsü aynı zamanda söz konusu öğrencinin ikinci danışmanı olarak görevlendirilmiştir.

Tablo 7. Fındık ve susam posalarından elde edilen protein konsantrlerinin nem, kül ve protein değerleri. Bütün ölçümler 3 tekerrürlü yapılmış olup değerlerin ortalamaları standart sapma ile birlikte verilmiştir.

| Örnekler | Nem % | Kül % | Protein İçeriği % |
|----------|-----------|-----------|-------------------|
| Fındık | 2,1±0,35 | 1,3±0,30 | 75,60±0,30 |
| Susam | 1,65±0,20 | 1,50±0,20 | 67,91±0,10 |

Tablo 8. Fındık ve susam posası proteini konsantrlerinin su ve yağ tutma kapasitesi değerleri standart sapmaları ile birlikte verilmiştir. Bütün ölçümler 3 tekerrürlü yapılmış olup değerlerin ortalamaları standart sapma ile birlikte verilmiştir.

| Örnekler | Su Tutma Kapasitesi (g su/g protein) | Yağ Tutma Kapasitesi (ml yağ/g protein) |
|----------|---|--|
| Fındık | 2,08±0,04 | 2,59±0,03 |
| Susam | 1,98±0,06 | 2,38±0,04 |

Tablo 9. Fındık ve susam posası protein konsantrlerinin köpük oluşturma kapasitesi ve köpük stabilitesi değerleri.

| Örnekler | pH | Çırpma öncesi hacim (ml) | Çırpma sonrası hacim (ml) | Köpük kapasitesi | % Hacim artışı |
|----------|----|--------------------------|---------------------------|------------------|----------------|
| Fındık | 3 | 50 | 100,65 | 101,3 | 102,6 |
| | 5 | 50 | 101,45 | 102,9 | 105,8 |
| | 7 | 50 | 102,92 | 105,8 | 111,6 |
| Susam | 3 | 50 | 101,85 | 103,7 | 107,4 |
| | 5 | 50 | 105,87 | 111,6 | 123,2 |
| | 7 | 50 | 111,95 | 123,9 | 147,8 |

| Örnekler | Çırpma öncesi hacim (ml) | Köpük Stabilitesi (%) | | | | | |
|----------|--------------------------|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 0 Dk. | 15 Dk. | 30 Dk. | 45 Dk. | 60 Dk. | 90 Dk. |
| Fındık | 50 | 103 | 80 | 61 | 60 | 57 | 56 |
| Susam | 50 | 112 | 89 | 72 | 68 | 67 | 66 |

Tablo 10. Susam posası protein konsantrlerinin emülsiyon aktivite ve stabilite indeksi kapasite değerleri. Değerler standart sapma ile birlikte verilmiştir.

| Süre (Dakika) | EAI (m ² /g) | ESI (dakika) |
|---------------|-------------------------|--------------|
| 10 | 174,8±1,2 | 49,4±0,7 |
| 30 | 175,2±0,8 | 49,2±0,5 |
| 45 | 175,6±1,5 | 48,8±0,8 |
| 60 | 175,7±0,7 | 48,7±1,3 |
| 120 | 175,6±1,8 | 48,6±0,9 |

Tablo 11. Fındık posası protein konsantrlerinin emülsiyon aktivite ve stabilite indeksi kapasite değerleri. Değerler standart sapmaları ile birlikte verilmiştir.

| Süre (Dakika) | EAI (m ² /g) | ESI (dakika) |
|---------------|-------------------------|--------------|
| 10 | 294,5±1,3 | 49,2±1,2 |
| 30 | 293,6±1,0 | 49±0,9 |
| 45 | 295,8±1,2 | 48,8±0,6 |
| 60 | 296,1±0,8 | 48,6±0,8 |
| 120 | 296,5±1,1 | 48,2±0,5 |

4.5 Keten tohumu proteinlerinin üretilmesi ve fonksiyonel özelliklerinin değerlendirilmesi

Tablo 12. Ham maddelerin %protein ve %nem tayin sonuçları

| Numune | %Protein | %Nem |
|--------------|----------|------|
| Keten tohumu | 35 | 6,6 |

Tablo 13. Protein izolatlarının protein, nem ve kül analiz sonuçları. (AE-IP: Alkali ekstraksiyon-izolektrik çöktürme; SE: Tuzla çöktürme; MP: misel oluşturarak çöktürme)

| Yöntem | Numune | Protein İçeriği (%) | Nem (%) | Kül (%) |
|--------|--------------|---------------------|-----------|-----------|
| AE-IP | Keten tohumu | 8,41±0,48 | 61±0,05 | 2,08±0,22 |
| SE | Keten tohumu | 41,98±1,28 | 20,1±0,56 | 2,42±0,01 |
| MP | Keten tohumu | 28,70±0,29 | 6,79±0,43 | 43,3±1,00 |



Şekil 15. İyot testi sonucunda izolatlarda gözlenen renk değişimleri.

Tablo 14. Protein konsantrlerinin su ve yağ tutma kapasitesi (AE-IP: Alkali ekstraksiyon-izoelektrik çöktürme; SE: Tuzla çöktürme; MP: misel oluşturarak çöktürme).

| İzolasyon yöntemi | Örnek | Su tutma kapasitesi | Yağ tutma kapasitesi |
|-------------------|-----------------|---------------------|----------------------|
| Kontrol | Sodyum kazeinat | 50,98±1,5 | 159,38±0,05 |
| AE-IP | Keten tohumu | 614,45±66,9 | 555,25±81,5 |
| SE | Keten tohumu | 245,63±62,5 | 1337,02±51,4 |
| MP | Keten tohumu | 451,19±28,7 | 738,69±35,4 |

Tablo 15. İzoelektrik çöktürme (AE-IP), tuzla ekstraksiyon ve diyaliz (SE), misel oluşturarak çöktürme (MP) yöntemleriyle elde edilen protein izolatlarının % çözünürlük değerleri. Sonuçlar 3 bağımsız deneyin ortalamasıdır. Sodyum kazeinat referans numune olarak kullanılmıştır.

| İzolasyon yöntemi | Numune | Çözünürlük (%) |
|-------------------|-----------------|----------------|
| Kontrol | Sodyum kazeinat | 17,09±0,01 |
| AE-IP | Keten tohumu | 194,89±0,002 |
| SE | Keten tohumu | 56,73±0,11 |
| MP | Keten tohumu | 36,87±0,03 |

Tablo 16. İzoelektrik çöktürme (AE-IP), tuzla ekstraksiyon ve diyaliz (SE), misel oluşturarak çöktürme (MP) yöntemleriyle elde edilen protein izolatlarının emülsiyon aktivite indeks değerleri. Sonuçlar 3 bağımsız deneyin ortalamasıdır.

| İzolat | Numune | EAI (m ² /g) |
|---------|-----------------|-------------------------|
| Kontrol | Sodyum kazeinat | 0,0259±0,01 |
| AE-IP | Keten tohumu | 0,0986±0,006 |
| SE | Keten tohumu | 0,0219±0,1 |
| MP | Keten tohumu | 0,0222±0,03 |

Tablo 17. İzoelektrik çöktürme (AE-IP), tuzla ekstraksiyon ve diyaliz (SE), misel oluşturarak çöktürme (MP) yöntemleriyle elde edilen protein izolatlarının % köpük oluşturma kapasitesi. Sonuçlar 3 bağımsız deneyin ortalamasıdır.

| İzolat | Numune | Köpük oluşturma kapasitesi (%) | | |
|--------|--------------|--------------------------------|-------|-------|
| | | pH=3 | pH=5 | pH=7 |
| AE-IP | Keten tohumu | 50 | 16,27 | 46,66 |
| SE | Keten tohumu | 20 | 28 | 20 |
| MP | Keten tohumu | 20 | 20 | - |

Bu çalışmalardan sonra özellikle kabak çekirdeği ve çörek otu numunelerinin yoğun miktarda protein içerdiği ve uygun tekniklerle yüksek protein içerikli ve katma değerli protein izolatlarının bu posalardan üretilebileceği anlaşılmaktadır. Buradaki temel bakış açısı, en kolay ve ekonomik yaklaşımlarla bu posaların ticari ürünlere dönüştürülmesine yönelik altyapının oluşturulmasıdır. Dolayısıyla söz konusu ürünler önem arz etmektedir.

Öte yandan müsilaj içeriği yüksek olan keten posalarından mevcut tekniklerle aynı verim alınamamıştır. Mevcut teknolojilere ek olarak enzimatik tekniklerle bu numunelerin muamelesi de gereklidir. Numunelerin verim ve temel özellikleri eklerde sunulan makale taslaklarında da belirtildiği üzere ekstraksiyon yöntemlerinden net bir biçimde etkilenmektedir.

Özellikle üzüm çekirdeği posalarından protein üretiminin oldukça zahmetli ve verim açısından da düşük olduğu anlaşılmaktadır.

Aynı zamanda elde edilen izolatların içerisinde nişasta varlığının tesbit edilmesi için iyot testi yapılmıştır ve izolatlarda nişasta varlığının olmadığı ya da ihmal edilebilir olduğu kanısına varılmıştır (Şekil 15).

MP yöntemi ile bazı posalardan protein üretilmesi mümkün olmamıştır. Dolayısıyla, ilgili numunelerin fonksiyonellik testleri ve diğer analizleri tamamlanamamıştır.

Bu bağlamda yapılmış olan fonksiyonellik testleri üretilen proteinlerin su ve yağ tutma kapasitelerinin iyi olduğunu, ancak emülsiyon ve köpük oluşturma kapasitelerinin kısıtlı olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda gerek ekmek denemeleri gerekse de diğer sistemlerde kullanım değerinin artırılması amacıyla, proje başvuru belgelerinde de öngörüldüğü üzere fonksiyonelliğin iyileştirilmesi çalışmalarına başlanmıştır.

Bu arada, özellikle çörek otu proteinlerinin jelleşme karakteristiklerinin gıda uygulamalarında kullanıma uygun olduğu anlaşılmaktadır. Bu alandaki çalışmalar halen sürdürülmektedir.

Fonksiyonel özelliklerin belirlenmesinin ardından yapılan literatür çalışmaları fonksiyonel özelliklerin iyileştirilmesi için kimyasal reaksiyon ve enzimatik muamele gibi yöntemler kullanılmasının yerinde olacağını göstermiştir.

Bu bağlamda izoelektrik çökmeyle elde edilen çörekotu protein izolatının farklı oranlarda glikoz ile Maillard reaksiyonuna girmesi sağlanmış, çözünürlük ve köpük oluşturma kapasitesindeki değişiklik gözlemlenmiştir. Burada 1:1, 1:2, 1:4 konsantrasyonlarında protein:glikoz kompleksleri (glikoprotein) oluşturulmuştur. Bunun için %1 oranında protein ilgili glikoz oranıyla karıştırılmış, ortamın pH değeri 12'ye getirilerek proteinin çözünmesi sağlanmıştır. Ardından 0,1 M HCl çözeltisi kullanılarak pH 11'e getirilmiş ve sistem, 1 saat karıştırılmıştır. Sonrasında elde edilen çözelti 3 eşit parçaya ayrılmıştır ve birinci parça sıcaklık muamelesine maruz bırakılmazken ikinci parça 100 C sıcaklıkta 15 dk. bekletilmiştir. Üçüncü ve son parça ise 100°C sıcaklıkta 30 dk bırakılmıştır. Numuneler sıcak su banyosundan çıkarıldıktan hemen sonra buzun içerisine konularak reaksiyonun ilerlemesinin önüne geçilmeye çalışılmıştır. Böylece 9 parça deney numunesi (3 muamele ve 3 konsantrasyon oranı) elde edilmiştir. Elde edilen numuneler liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyondan hemen sonra elde edilen toz numuneler, her bir parça için uygun tampon çözeltiler kullanılarak pH 3, pH 5 ve pH 7 değerinde dispersiyonlar hazırlanmış ve böylece açığa çıkan 27 numunenin köpük içeriğine bakılmıştır. Sodyum kazeinat referans olarak kullanılmıştır ve genel itibariyle köpük kapasitesinde artış görülmüştür (Şekil 18). Detaylı bilgilendirme Bölüm 4.7.1'de sunulmaktadır.

4.6 Protein konsantrelerinin detaylı tensiyometrik analizi

Farklı bölümlerde yapılan tensiyometrik analizlere ek olarak proteinlerin yüzey elastisiteleri de değişen ortam koşullarında detaylı olarak ölçülmüştür. Bu verilerin detaylı analizi hâlihazırda sürdürülmekte olup ilgili yayının hazırlanması da halen söz konusudur. Bu aşamada ilgili detaylar henüz sunulabilecek olgunlukta değildir.

4.7 Protein konsantrelerinin fonksiyonel özelliklerinin iyileştirilmesi

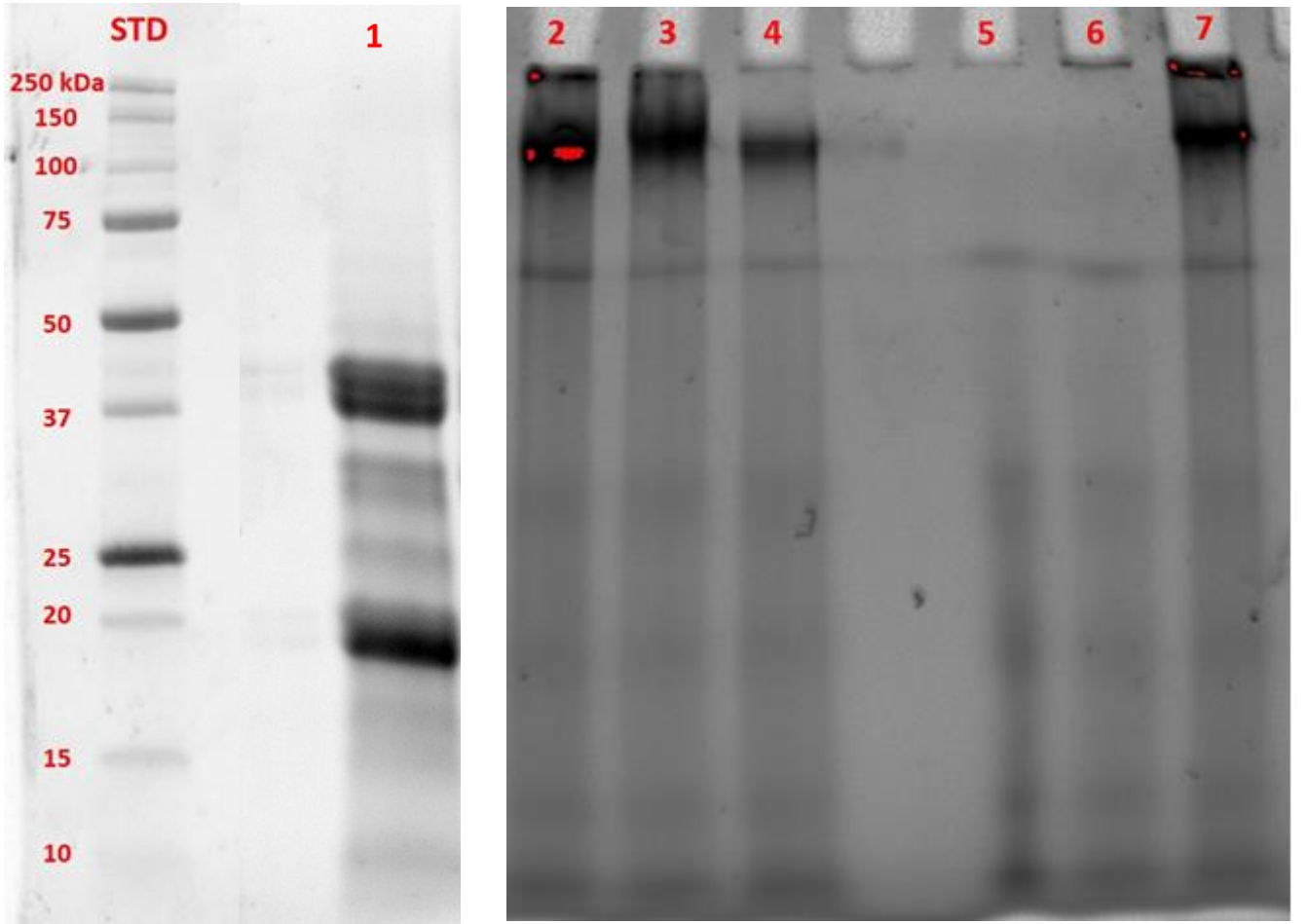
Bu bölümde protein konsantrelerinin fonksiyonel özelliklerinin iyileştirilmesi hedeflenmektedir. Projenin son bölümünde iyileştirilmiş formülasyonlar ekmek üretiminde değerlendirilecektir.

4.7.1 Maillard konjugasyonu

BU BÖLÜMDEKİ ÇALIŞMALAR 15 AĞUSTOS 2017 TARİHİNDE "WASTE and BIOMASS VALORIZATION" DERGİSİNE GÖNDERİLMİŞTİR. İLGİLİ BELGE, EK 2'DE SUNULMAKTADIR.

4.7.1.1 Maillard konjugasyonuna uğramış numunelerin elektroforetik analizi

Çörekotu protein konsantrelerindeki proteinlerin moleküler ağırlık dağılımı, native ve SDS-PAGE yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır (Şekil 16). İlk olarak, Şerit 1'de, muamele edilmemiş protein konsantratlarının SDS-PAGE analizi gösterilmektedir. Başlıca bantlar 15 ila 25 kDa ve yaklaşık 37 kDa dolaylarında ortaya çıkmıştır. Maillard reaksiyonu konjüгатlarının moleküler ağırlık dağılımını doğru bir şekilde analiz etmek için, native PAGE analizi gerçekleştirilmiştir. Bulaşma (smearing) ve jel boyunca bazı zayıf noktalar gözlemlenmesine rağmen, ana bantların, protein: glikoz oranları için 1: 1 ila 1:4 değerlerinde 75 ila 250 kDa'lık (Şerit 2-4) olduğu gösterilmiştir. 1: 4 örnekleri için, bant boyutları oldukça küçük bulunmuştur.



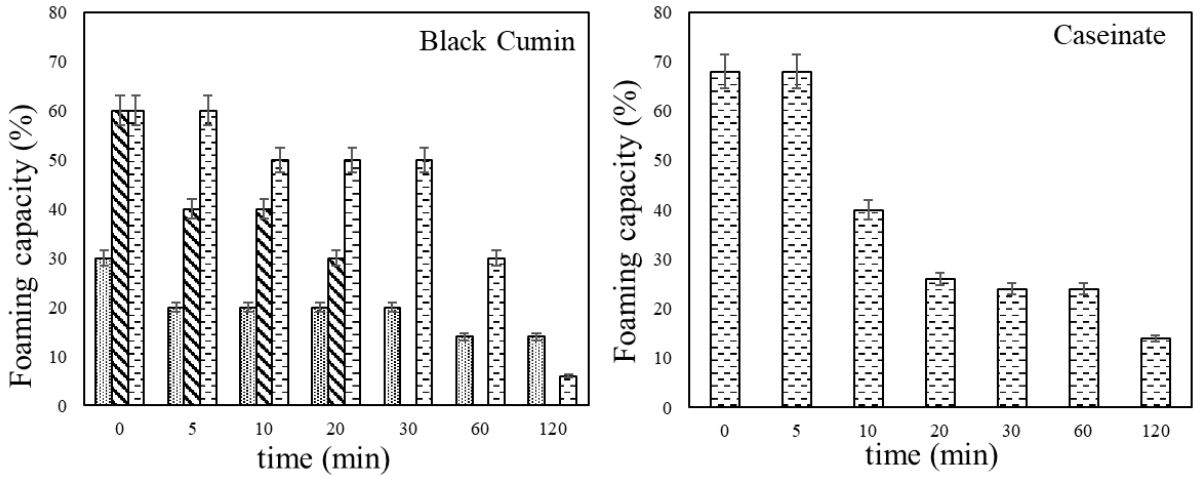
Şekil 16. Protein konsantrelerinin (çörek otu) Maillard konjugasyonuna uğramış ya da uğramamış hallerinin elektroforetik analizi. Deneylede native ya da SDS-PAGE yöntemlerinden yararlanılmıştır.

1: 2'lik bir protein: glukoz oranı ve pH'nın bir fonksiyonu olarak, molekül ağırlıklarının dağılımı araştırılmıştır (Şerit 5-7). Büyük bantlar sadece pH 7'de görüldü, oysa Maillard reaksiyonu daha düşük pH'da (pH 3 ve 5) muhtemelen daha az yoğun olarak gözlenmiştir (Guan vd. 2010; Lertittikul vd. 2007).

Konjugat oluşumunun, saf proteine kıyasla azalmış bir bant yoğunluğuna neden olduğu bilinmektedir (Kato vd. 1995). Bantlar daha yüksek moleküler ağırlık noktalarında bulunduğundan, bu bulgular proteinler ve karbonhidratlar arasındaki kovalent bağlanmayı göstermektedir. Yüksek molar kütleli polisakaritler söz konusu olduğunda, bu bantlar, konjugatların daha yüksek molekül ağırlığını gösteren stacking jel ile resolving jel arasındaki sınırdaki görülmüştür (Kato vd. 1995).

4.7.1.2 Köpük kapasitesi ve kararlılığı

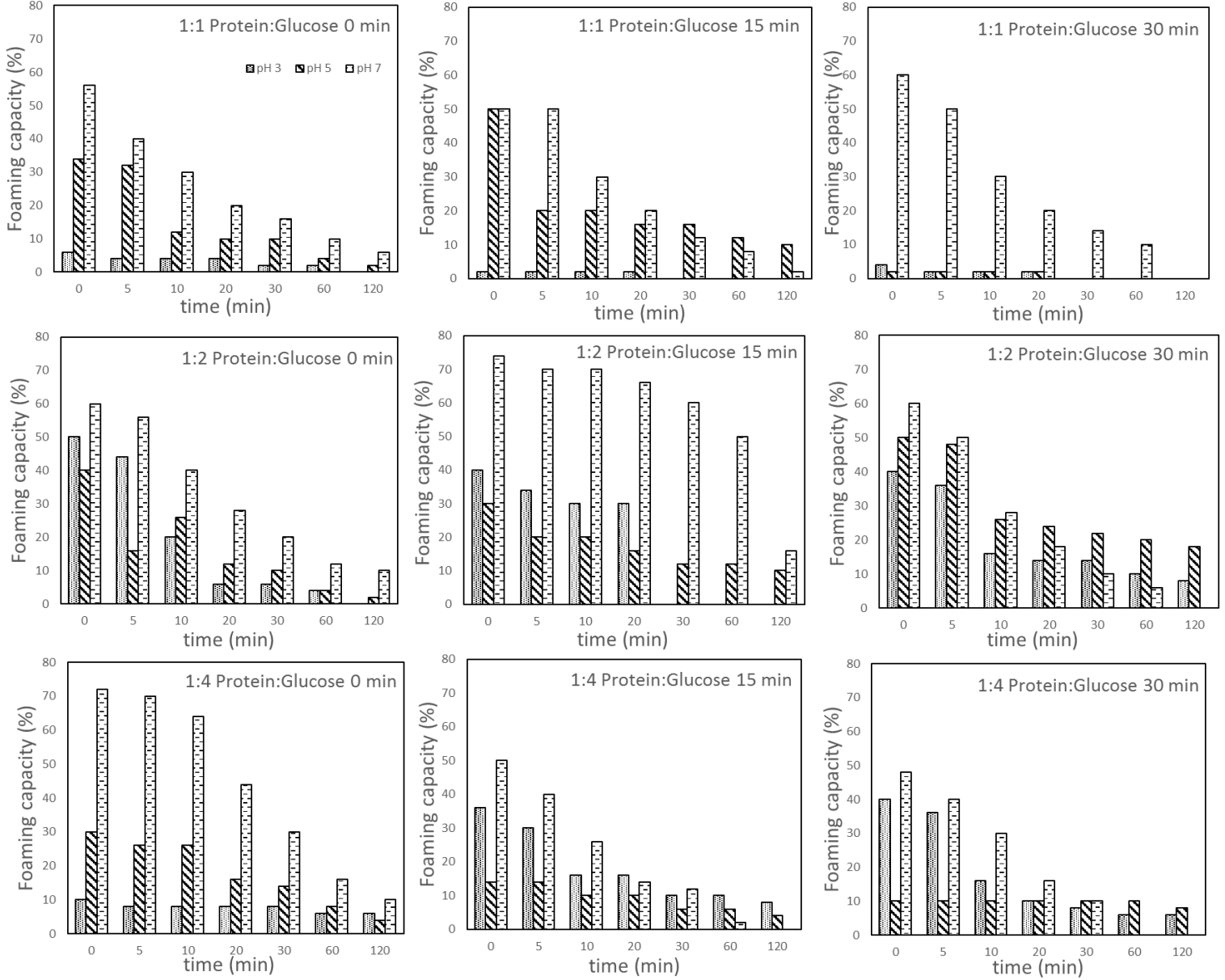
Maillard konjugasyonu için hazırlanan köpüklerin kapasitesi ve stabilitesi üzerine etkilerini anlamak amacıyla muamele edilmemiş protein konsantreleri ile muamele edilmiş çörek otu protein konsantrelerinin (Şekil 17) köpük özellikleri karşılaştırılmıştır. Hazırlama zamanında (t=0), pH 5 ya da pH 7 örneklerinin köpük kapasitesi pH 3 numunelerinden (her durumda % 2 protein) daha yüksek bulunmuştur. Zaman geçtikçe köpüklerin stabilitesi hızla düştü. pH 3 değerinde, hazırlanma sırasındaki stabilite en düşük seviyedeysen, daha uzun sürelerde köpük hacimleri nispeten değişmemiştir. Bununla birlikte, pH değeri 5, örneklerde, çökme hızlıydı ve pH'ı 7 olan numuneler için, köpük hacminin %23'ü oda sıcaklığında depolama 2 saat sonra kaybolmuştur. Kazeinatın performansı pH 7'de diğerlerinden daha iyi olmakla beraber, karşılaştırılabilir koşullar altında hazırlanan sodyum kazeinat numuneleri ve mevcut protein konsantreleri arasındaki fark çoğu durumda % 10 veya daha azdır.



Şekil 17. Çörekotu protein konsantreleri ile hazırlanan köpüklerin köpüklenme kapasitesi (%) ve stabilitesi (pH 3-7, 0-120 min). Sonuçlar kazeinat (2%) ile karşılaştırılmıştır.

Protein: glikoz oranı 1:1 ila 1:4 arasında değişen ve ısıtma işlemine tabi tutulan (100°C'de 0-30 dakika) karışımların köpüklenme davranışı pH 7'de izlenmiştir (Şekil 17). Özellikle 1:2 oranı ve 15 dakikalık ısıtma koşullarında, çörekotu proteinlerinin köpürme kapasitesinin arttığı gözlenmiştir. 1:1 ve 1:2 oranlarında, 15 dakikalık muameleler genel olarak stabilite değerlerinin daha düşük olduğu 30 dakikalık muamelelere göre daha etkili bulunmuştur. Öncelikle en yüksek glikoz konsantrasyonunda, numune viskozitesinin diğer numunelerden biraz daha yüksek olduğu ve bunun da numune viskozitesini olumlu etkileyebileceği düşünülmüştür. Bununla birlikte, köpürme kapasitesi bu koşullarda diğer

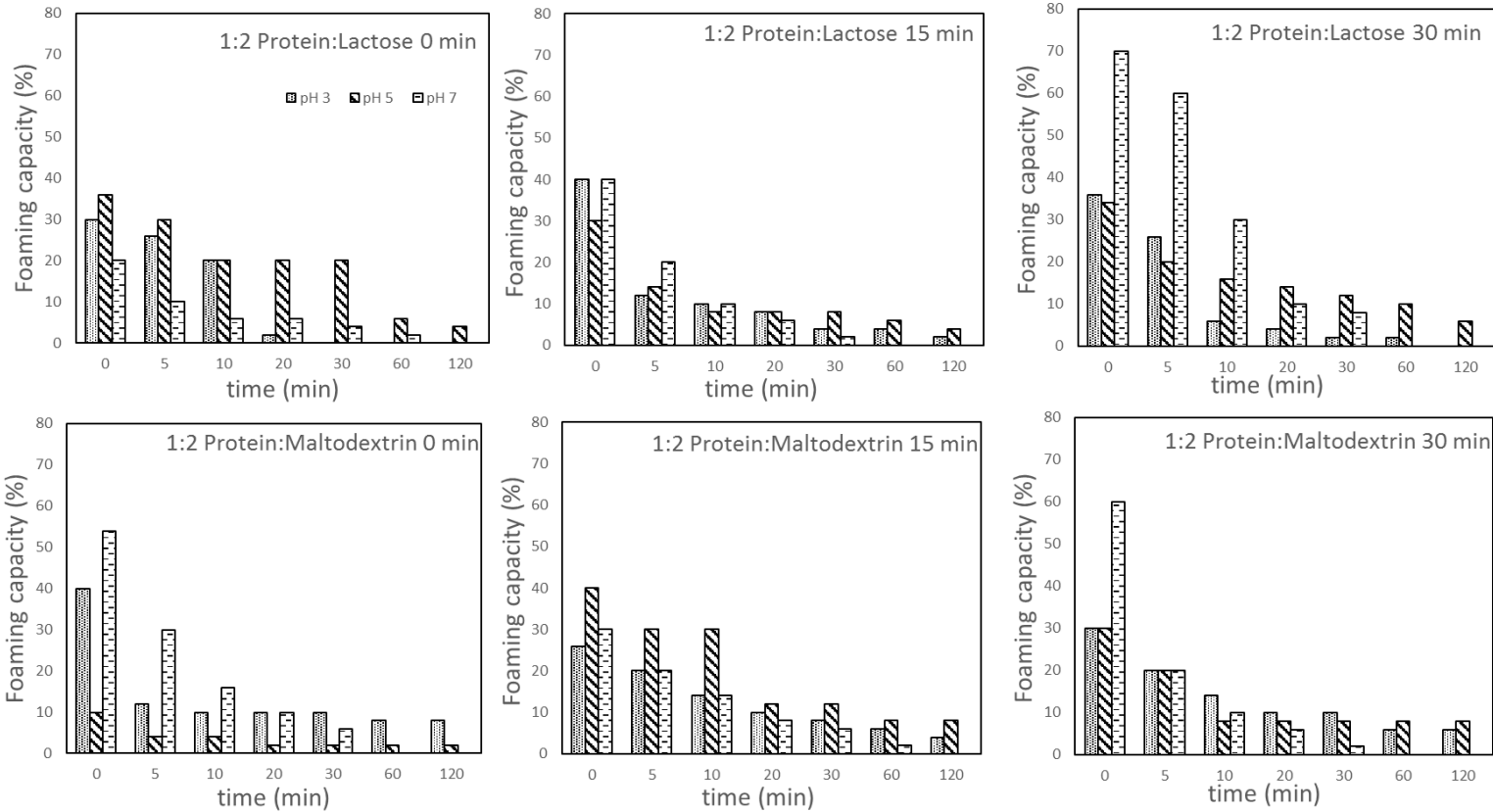
numunelerden daha fazla geliştirilememiştir. Numuneler arasındaki azami gelişme, pH 7'de 15 dakika proste 1: 2 oranında protein: glüköz oranında gerçekleşmiştir ve bu koşullar köpürme kapasitesinde % 23'lük bir iyileşme sağlamıştır. Ekmek çalışmalarında da detaylandırılacağı üzere bu koşullar optimize formülasyonlarda değerlendirilecektir.



Şekil 18. Çörekotu protein konsantreleri ile hazırlanan Maillard konjugatlarının köpüklenme kapasitesi (%) ve stabilitesi (pH 3-7, 0-120 min). Veriler şeker: glüköz oranına (1: 1, 1: 2 ve 1: 4) oranına uygun olarak farklı pH değerlerinde hazırlanmıştır.

Aynı protein: karbohidrat oranında (1: 2), laktöz ve maltodekstrin kullanılarak moleküler büyüklüğün Maillard konjugasyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir (100 ° C'de 0-30 dakika) (Şekil 19). Çörek otu proteini-laktöz veya maltodekstrin konjugatlarının köpürme kapasiteleri glikozla karşılaştırıldığında oldukça düşük bulunmuştur. Çeşitli araştırmalar, monosakkaritlerin

ve disakkaritlerin tepkime mekanizmalarının farklı olduğunu ve monosakkaritlerden elde edilen tepkime ürünlerinin disakkaritlerden elde edilenlerden farklı olduğunu göstermiştir (Kato vd. 1988). DS (“degree of substitution”) ve sakkarit boyutu arasında doğrusal bir korelasyon bildirilmiştir (Nacka vd. 1998). Maltodekstrin ve dekstranın düşük reaktivitesinin, sterik engel etkileriyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kato, 2002). 30 dakika işlemten sonra, köpürme kapasitesi ve stabilite değerleri, özellikle pH 7’de önemli ölçüde iyileştirilmiştir. Muhtemelen bu moleküllerin daha büyük moleküler ağırlıklarından ötürü Maillard reaksiyon hızı oldukça düşüktür (Li vd. 2009). Dolayısıyla bu tepkimelerde moleküler boyutun önemli olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 19. Protein:karbonhidrat oranı olarak 1:2 kullanıldığında pH (3-7) değerinin fonksiyonu olarak çörekotu proteini konsantrelerinin (% 2) laktoz veya maltodekstrin ile oluşturulan konjugatları ile hazırlanan köpüklerin kapasitesi (%) ve stabilitesi. Tepkime süresi 0-30 dakika ve depolama süresi 0-120 dakika olarak belirlenmiştir.

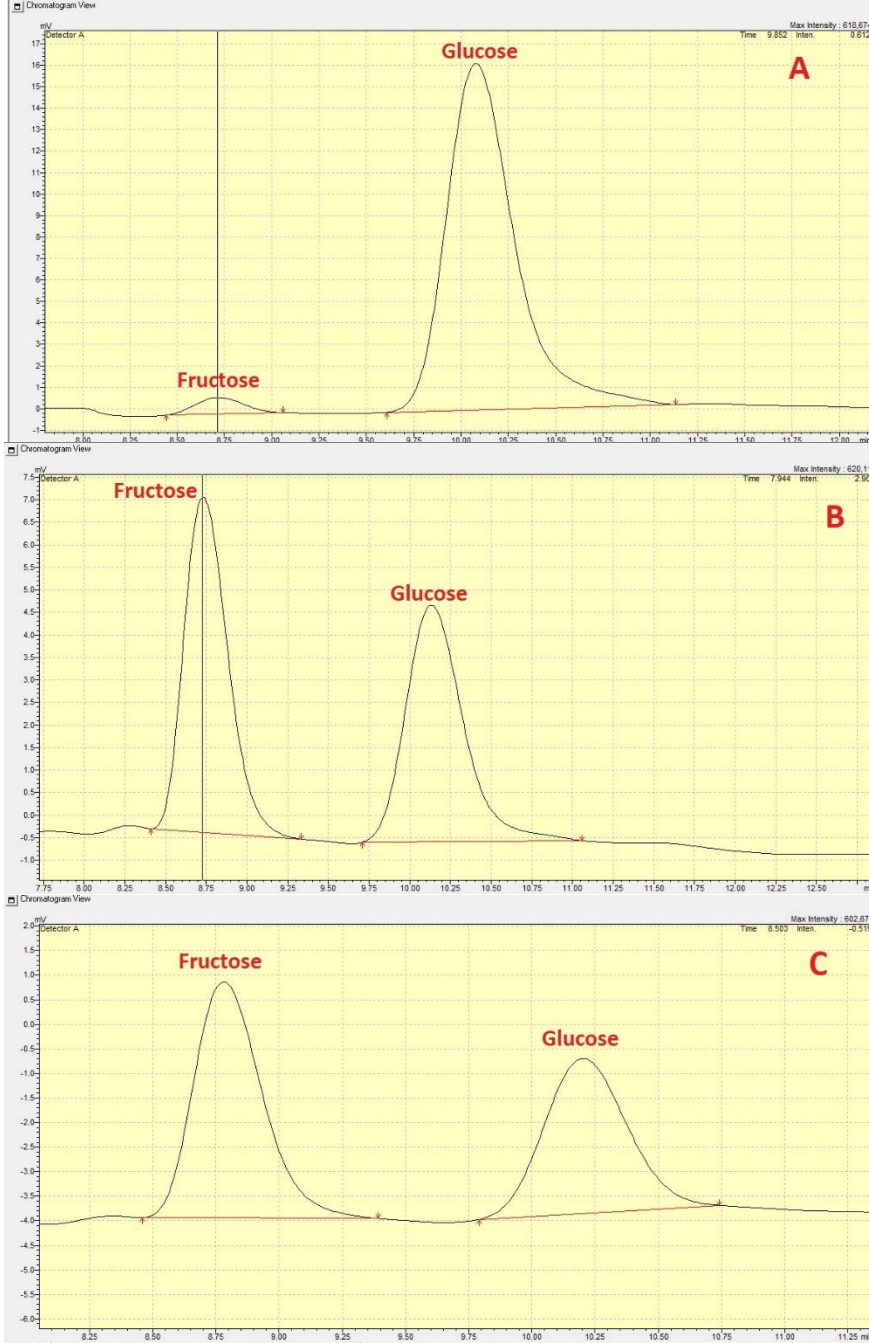
4.7.1.3 RP-HPLC-RID Analizi

HPLC-RID yöntemleri kullanılarak, çörekotu protein konsantrelerinin glikoz bağlama özellikleri belirlenmiştir (Şekil 5 ve Tablo 1). Şekil 5A’da gösterildiği gibi, tepkimeden önce protein örneklerinde az miktarda fruktoz (yaklaşık% 0.013) bulunduğu anlaşılmıştır ve

numuneler nispeten yüksek konsantrasyonlarda glikoz (yaklaşık% 1.3) içerdiği bulunmuştur. Isıl işlem gerçekleştirilirken, termal işleme sırasında önemli miktarda glukoz fruktoza izomerizasyon yoluyla dönüşmüştür. Ancak bütün durumlarda kayda değer bir miktar proteinlere konjuge edilmiştir (Tablo 1). Bu gözlem önceki literatürde bulunan Suzuki ve Tsumura (1972) çalışmasıyla tutarlıdır. Konjugasyon verimliliği, 30 dakikalık işlemde sonra % 85 gibi yüksekti, bu da 15 dk.dakinden (% 75) belirgin biçimde yüksek olarak nitelenebilir. Daha fazla glikoz protein moleküllerine konjuge oldukça, proteinlerin köpürme verimliliğinin düştüğü anlaşılmaktadır. Glikoz moleküllerinin varlığı proteinlerin ara yüzeyde adsorbsiyon özelliklerini (hava-su ara yüzünde) değiştirdiği anlaşılmaktadır. Giderek daha fazla hidrofilik glikoz grupları taşıyan protein molekülleri, ara yüzeye nüfuz etme konusunda zorluk çekebilir ve böylece köpükleri daha az kararlı hale getirebilir. Dolayısıyla kullanılan karbonhidratların moleküler boyutuna ek olarak konjugasyon yoğunluğu da protein moleküllerinin ara yüzey etkinliğini belirlemektedir.

Tablo 18. Maillard konjugasyonu sırasında Çörekotu protein konsantreleri ve glukoz karışımlarında glukoz bağlama (%) ve fruktoz oluşum (%) karakteristikleri. Maillard reaksiyonu 100°C'de ve protein:glukoz oranı olarak 1:2 oranında yürütülmüştür. Veriler zamana bağlı olarak sunulmaktadır.

| HPLC analizinde bulunan konsantrasyon | | | |
|---------------------------------------|-------------|------------|--------------|
| Süre (dakika) | Fruktoz (%) | Glukoz (%) | Bağlanma (%) |
| 0 | 0,013±0,001 | 1,319±0,02 | 34,0 |
| 15 | 0,345±0,04 | 0,491±0,07 | 75,5 |
| 30 | 0,230±0,04 | 0,289±0,04 | 85,5 |



Şekil 20. Çörekotu protein konsantreleri ve glukoz karışımlarından oluşan Maillard ürünlerinin RP-HPLC-RID analizi. Protein:glukoz oranı bütün durumlarda 1:2'dir. **(A)** 25 °C, **(B)** 100 °C, 15 dakika, **(C)** 100 °C, 30 dakika.

4.7.2 Transglutaminaz muamelesi

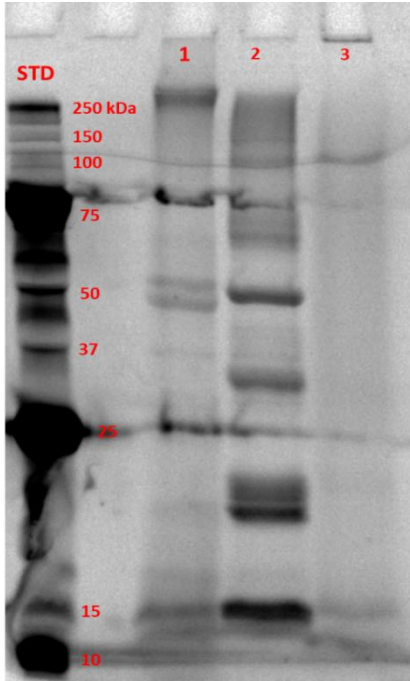
4.7.2.1. Ticari transglutaminaz enziminin enzim aktivitesinin belirlenmesi

Transglutaminaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi için Zeeb vd. (2013) makalesinde bulunan yöntem bazı modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır. Bunun için Z-gln-Gly substrat olarak

kullanılmıştır. 12 mg/ml Z-Gln-Gly, 100 mM hidroksilamin, 10 Mm glutathion (indirgenmiş) ve 5 mM CaCl₂ den oluşan karışım 200 mM Tris bufferın (pH 6) içinde hazırlanmıştır. Hazırlanan reaksiyon kokteyli termomixerda 5 dk boyunca 37 C'de inkübe edilmiştir. Reaksiyon 10 dk sonra %12 w/v TCA çözeltisinden 500 µl eklenerek durdurulmuştur. Son olarak, FeCl₃ solüsyonu (%5 (w/v), 500 µl) 100 mM HCl çözeltisinin içinde hazırlanmış ve spektrofotometrik ölçüm için solüsyona eklenmiştir. Spektrofotometrik ölçüm 525 nm'de yapılmıştır (Optima SB-3000 UV/VIS spektrofotometre). Aktivitesi bilinen Sigma-Aldrich firmasından alınmış Transglutaminase enzimi (Sigma kodu: T5398) referans olarak kullanılmış ve aktivitesi belirlenmek istenen enzimle aynı muamelelere tabi tutulmuştur. Kontrol numunesi olarak saf su kullanılmıştır.

Ticari transglutaminaz enziminin aktivitesi 0,1 ünite/mg bulunmuştur.

4.7.2.2. Transglutaminaz ile muamele edilmiş protein konsantrelerinin SDS-PAGE analizi



Şekil 21. TGase ile muamele edilen çörek otu, kabak çekirdeği ve üzüm çekirdeği protein konsantrelerinin SDS-PAGE analizi. (şerit 1: çörek otu protein konsantresi; şerit 2: kabak çekirdeği protein konsantresi; şerit 3: üzüm çekirdeği protein konsantresi).

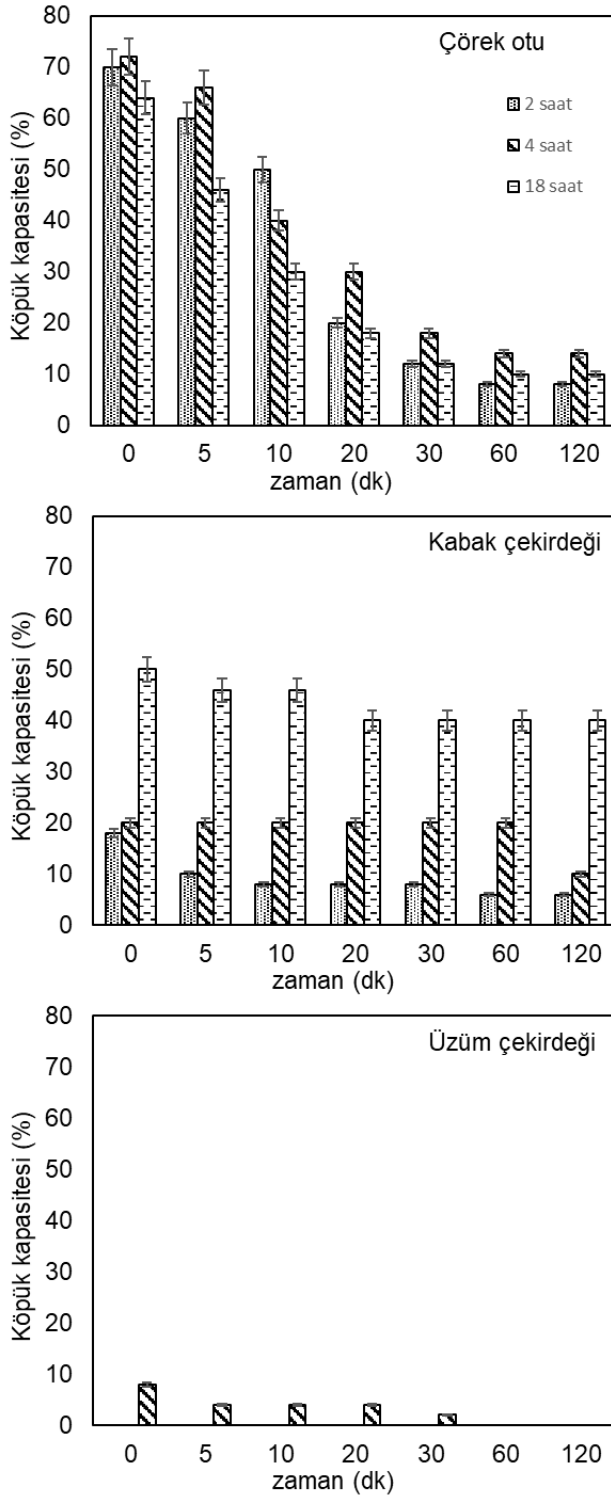
4.7.2.3. Transglutaminaz ile muamele edilmiş protein konsantrelerinin köpük kapasitesi ve stabilitesi

TGase muamelesi yapılan çörek otu, kabak çekirdeği ve üzüm çekirdeği numunelerinin köpük kapasitesinin ve stabilitesinin muamele edilmemiş protein konsantrelerine göre nasıl değiştiğini anlamak için muamele edilen örneklerin köpük özellikleri analiz edilmiştir. Aynı zamanda TGase enziminin optimum çalışma koşullarını belirlemek amacıyla 3 farklı zaman çalışılmıştır. Buna göre; %2'lik çörek otu, kabak çekirdeği ve üzüm çekirdeği dispersiyonları 50 °C sıcaklıkta sodyum fosfat bufferin (100 mM, pH 9) içinde 1 saat karıştırılarak hazırlanmıştır. Kullanılan TGase enziminin aktivitesi belirlendikten sonra 100 mg TGase enzimi hazırlanan dispersiyonlara eklenmiştir ve optimum çalışma zamanını belirlemek için 2 saat, 4 saat ve 18 saat enzimle muamele edilmiştir. (37 °C, pH 7) Bölüm 3.2.3.4'te bahsedilen Sathe ve Salunkhe (1981)' e göre köpük testine tabi tutulmuştur. Çözeltiler 120 dakika boyunca gözlemlenmiş ve böylece köpük stabilitesi de analiz edilmiştir.

Şekil 22'ye göre TGase muamelesi yapılmış çörek otu protein konsantresinin köpük kapasitesi; 2 saat enzimle muamele edildiğinde %70, 4 saat enzimle muamele edildiğinde %72 ve 18 saat enzimle muamele edildiğinde %64 olarak bulunmuştur. TGase ile muamele edilmiş kabak çekirdeği protein konsantresi ise 2 saat enzimle muamele edildiğinde %18, 4 saat enzimle muamele edildiğinde %20 ve 18 saat enzimle muamele edildiğinde %50 olarak bulunmuştur. TGase ile muamele edilmiş üzüm çekirdeği protein konsantresi için TGase ile 2 saat ve 4 saat muamele edildiğinde köpük oluşumu gözlenemezken 18 saat muamelede %8 oranında köpük oluşmuştur. Buna göre kabak çekirdeği ve üzüm çekirdeği için enzimin optimum çalışma zamanının 18 saat olduğu, çörek otu için de 4 saat olduğu söylenebilir.

Önceki sonuçlara baktığımızda muamele edilmemiş üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği protein konsantresinin hiç köpük oluşturmadığı görülmüştür. Buna göre özellikle kabak çekirdeği protein konsantresi için kayda değer bir gelişme yaşandığı söylenebilir. Bunun dışında, çörek otu protein konsantresi için de köpük kapasitesinde %11 oranında gelişim olduğu analiz edilmiştir.










Dolayısıyla mevcut numunelerin fonksiyonel özellikleri bağlamında iyileştirmelerin TGase kullanımı ile söz konusu olduğu anlaşılmaktadır. Özellikle gaz kabarcıklarının tutulmasının ürün özelliklerini olumlu etkilediği ürünlerde bu özellik önem (dolayısıyla, işlem) önem kazanmaktadır. Ekmek ürünlerini de içermek üzere unlu mamuller bu kategoriye dâhildir.



Şekil 22. TGase ile muamele edilmiş çörek otu, kabak çekirdeği ve üzüm çekirdeği protein konsantrelerinin köpük kapasitesi ve stabilitesi.

4.7.2.4. Transglutaminaz ile muamele edilmiş protein konsantrelerinin jelleşme özelliği

TGase muamelesi yapılan protein konsantreleri (%5, 250 mg ticari TGase) farklı pH'lara getirip (pH 3,7,9) 85 °C'de 15 dakika bekletildi. Soğuduktan sonra jelleşip-jelleşmediğine bakıldı. pH 3 de jel olmadı hatta çökelmeler gözlenmiştir. pH 7 de ise kabak çekirdeği protein konsantresi hariç protein konsantreleri viskoz bir sıvı haline gelmiştir. Son olarak, pH 9'da çörek otu ve üzüm çekirdeği protein konsantresinin "self supporting" jel oluşturduğu görülmüştür.

| pH 3 | | | pH 7 | | | pH 9 | | |
|---|--|--|--|--|---|--|--|--|
| Kabak çekirdeği | Çörek otu | Üzüm çekirdeği | Kabak çekirdeği | Çörek otu | Üzüm çekirdeği | Kabak çekirdeği | Çörek otu | Üzüm çekirdeği |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Şekil 23. TGase muamelesi yapılan protein konsantrelerinin (%5) farklı pH değerlerinde jelleşme özelliği.

Bu verilere bağlı olarak gerek Maillard konjugasyonu, gerekse de TGase aktivitesi yöntemlerinin bitkisel posalardan elde edilen proteinlerin teknik özelliklerini olumlu etkilediği anlaşılmaktadır.

4.8 Protein konsantrelerinin ve fonksiyonel özellikleri iyileştirilmiş hallerinin ekmek formülasyonlarında kullanılması

4.8.1 Normal ekmek çalışması

4.8.1.1 Formülasyon

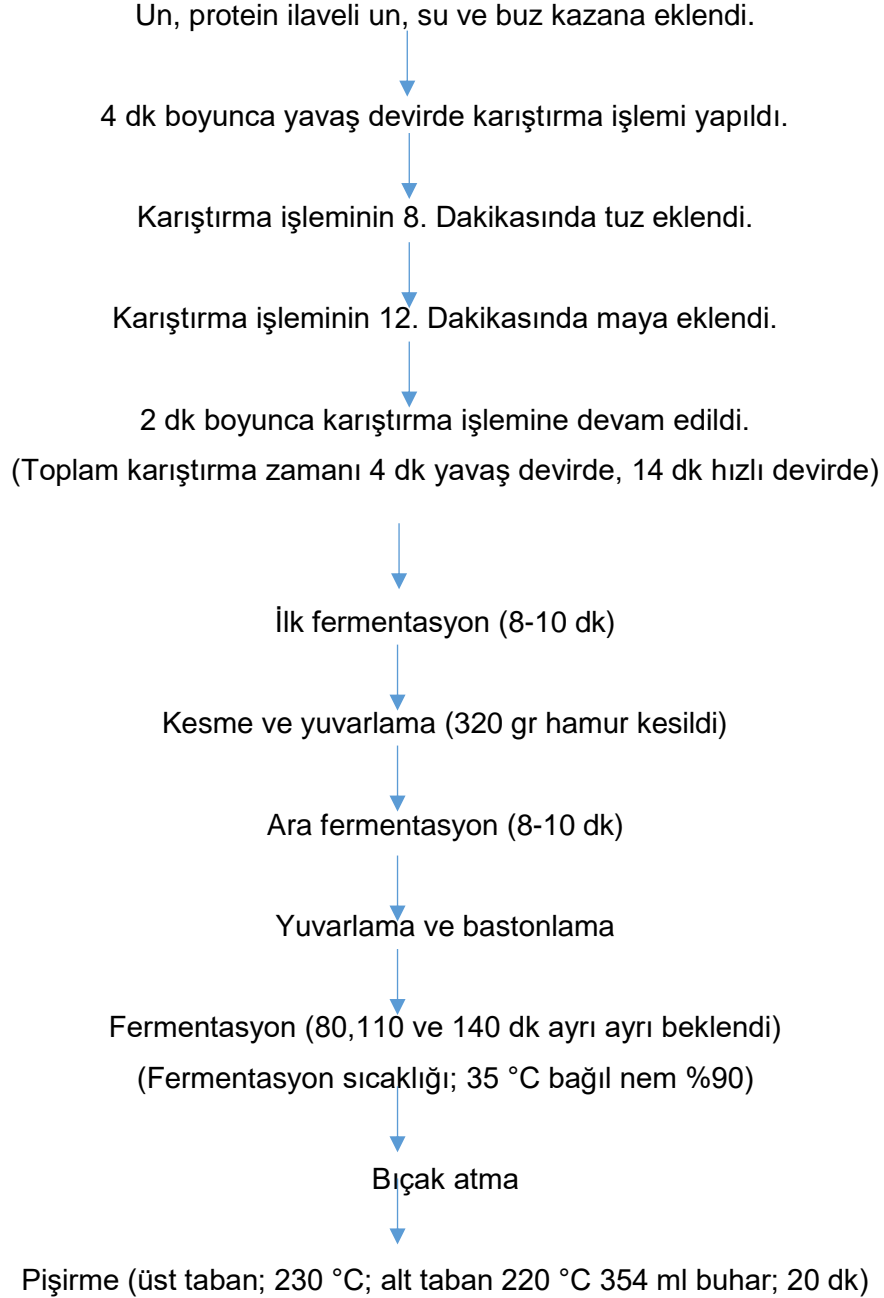
Formülasyon, ilgili firmanın prosedürlerine uygun olarak hazırlanmıştır.

Tablo 19. Ekmek reçetesi. BC: çörek otu; GS: üzüm çekirdeği; PS: kabak çekirdeği.

| İçerik | Kontrol | BC | GS | PS |
|-------------------------------------|---------|--------|---------|---------|
| Su | 430 gr | 430 gr | 430 gr | 430 gr |
| Buz | 200 gr | 200 gr | 200 gr | 200 gr |
| Ekmeklik Un | 1000 g | 1000 g | 1000 g | 1000 g |
| Tuz | 15 g | 15 g | 15 g | 15 g |
| Pres maya | 25 g | 25 g | 25 g | 25 g |
| Çörek otu protein konsantresi | - | 27,4 g | - | - |
| Üzüm çekirdeği protein konsantresi | - | - | 49,83 g | - |
| Kabak çekirdeği protein konsantresi | - | - | - | 18,07 g |

Proje kapsamında üretilen çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği protein konsantreleriyle ekmek üretimi yapılmıştır. Üretilen ekmeklerin formülasyonu Tablo 19 da görülmektedir. Bu bağlamda, her birine 430 gr su, 200 g buz, 1000 g ekmeklik un, 15 g tuz ve 25 g pres maya kullanılmıştır. Protein içeriği her birinde %1,5 olacak şekilde zenginleştirme işlemi uygulanmıştır. Protein içerikleri her birinde değişiklik gösterdiği için eklenen protein miktarı her bir ekmek için farklıdır. Buna göre; çörek otu ile zenginleştirilen ekmeğe 24,4 gr protein konsantresi, kabak çekirdeği ile zenginleştirilen ekmeğe 18,07 gr protein konsantresi ve üzüm çekirdeği ile zenginleştirilen ekmeğe ise 49,83 gr protein konsantresi eklenmiştir.

4.8.1.2 Ekmek yapımı



Şekil 24. Ekmek yapım prosesi

Tablo 19’da belirtilen formülasyonlar kullanılarak Şekil 24’de belirtildiği gibi ekmekler üretilmiştir. Buna göre; tuz ve maya hariç bütün malzemeler 0. Dakikada karıştırma kazanına eklenmiştir. 4 dk boyunca karıştırma yapılmıştır (Diosna, Dierks & Söhne, D-49074, Osnebrück, Germany). Diğer malzemeler de Şekil 24’de belirtildiği gibi eklenip, ekmek hamuru hazırlanmıştır. Hamurlar yuvarlanmış ve baston şekline getirilmiştir (Ekmasan, Ek 37, Bursa, Türkiye). Baston haline getirilen hamurlar Tecnomac, Juniorlev markalı İtalya üretimi fermentöre konulmuştur ve üç farklı fermentasyon zamanı çalışılmıştır. Bu bağlamda, 3 ayrı

protein konsantresi bir de kontrol numunesiyle beraber toplam 4 ekme ve 3 farklı fermentasyon zamanı çalışılmıştır (80,110, 140 dk). Yani toplamda 12 tane normal ekme üretilmiştir. Böylece üretilen ekme için optimum fermentasyon zamanı belirlenmeye çalışılmıştır.

4.8.1.3 Kimyasal kompozisyon

Tablo 20’de belirtildiği üzere; zenginleştirme yapılan unların ve pişirilen ekmeğin protein (%), kül (%), nem (%) ve asitlik (%) tayini yapılmıştır. Zenginleştirilen undaki protein (%) değerleri kontrol numunesi, çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği için sırasıyla 10,6, 11,6, 11 ve 10,6 olarak bulunmuştur. Zenginleştirilen unlarla ekme yapıldıktan sonra protein (%) değerleri ise 8, 8,1, 6,9 ve 8,1 olarak rapor edilmektedir. Buna göre; zenginleştirilen un ve ekmeğin % protein içeriklerinde bir miktar artış gözlemlenmiştir. Kül değerleri un için kontrol numunesi, çörek otu üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği için sırasıyla; 0,55, 0,72, 0,61 ve 0,55 olarak rapor edilmektedir. Ekmekteki kül değerleri ise; 1,20, 1,32, 1,28 ve 1,21 olarak belirtilmektedir. Asitlik değerleri (%) unda kontrol numunesi, çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği için; 3,24, 3,80, 4,10 ve 3,71 olarak belirlenmiştir. Ekmekte asitlik değerleri; 2,20, 3,09, 3,71 ve 3,19 olarak belirlenmiştir. Buna göre; kül(%) ve asitlik (%) içeriklerinde de kontrol numunesine göre artış gözlemlenmiştir. Nem içeriği için unda kontrol, çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği ile zenginleştirilen uneneler için, 12,24, 12,18, 11,81 ve 11,9 bulunmuştur. Bu değerler ekmekte, 46,18, 45,18, 44,38 ve 45,15 olarak belirlenmiştir. Nem (%) içeriklerine baktığımızda genel olarak zenginleştirmenin nem (%) içeriğine etki etmediği gözlemlenmiştir.

Tablo 20. Protein takviyesi yapılmış ekme ve unun kimyasal kompozisyonu

| | Numune | Protein (%) | Kül (%) | Nem (%) | Asitlik (%) |
|--------------|-----------------|-------------|-----------|------------|-------------|
| UN | Kontrol | 10,64±0,09 | 0,55±0,04 | 12,24±0,07 | 3,24±0,35 |
| | Çörek otu | 11,64±0,01 | 0,72±0,07 | 12,18±0,07 | 3,80±0,28 |
| | Üzüm çekirdeği | 11,06±0,14 | 0,61±0,00 | 11,81±0,07 | 4,10±0,13 |
| | Kabak çekirdeği | 10,67±0,26 | 0,55±0,04 | 11,90±0,00 | 3,71±0,35 |
| EKMEK | Kontrol | 8,00±0,00 | 1,20±0,00 | 46,18±0,21 | 2,20±0,38 |
| | Çörek otu | 8,19±0,10 | 1,32±0,07 | 45,18±0,00 | 3,09±0,35 |
| | Üzüm çekirdeği | 6,94±0,08 | 1,28±0,07 | 44,38±0,10 | 3,71±0,12 |
| | Kabak çekirdeği | 8,12±0,07 | 1,21±0,00 | 45,15±0,02 | 3,19±0,28 |

4.8.1.4 Proteinle zenginleştirilen unların analitik ölçümleri

Protein takviyesi yapılan unların yaş gluten, gluten indeksi, sedimentasyon, gecikmeli sedimentasyon, düşme sayısı ve fungal düşme sayısı analizleri Tablo 21’de gösterilmiştir. Buna göre kontrol numunesinin (protein ilavesiz) yaş gluten değeri 25,2 iken çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği protein konsantreleri ile zenginleştirilen unların yaş gluten değerleri sırasıyla 24,9, 27,9 ve 25,1 olarak bulunmuştur. Gluten indeks değerlerine baktığımızda ise kontrol numunesi, çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği için gluten indeks değerleri sırasıyla; 98,5, 97,5, 96 ve 98 olarak bulgulanmıştır. Buna göre zenginleştirmenin gluten içeriğine etki etmediği söylenebilir. Aynı şekilde Normal sedimentasyon değerleri sırasıyla; 30,5,33, 26 ve 31 olarak belirlenmiştir. Gecikmeli sedimentasyon değerleri ise; 37,5, 36,5 32,5 ve 37,5 olarak bulunmuştur. Düşme sayısı unun alfa amilaz enzim aktivitesini belirlemek için yapılan analizdir. Buna göre kontrol numunesinin düşme sayısı 416,5 bulunmuşken, çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği için bu değer sırasıyla 399, 389 ve 378 olarak bulunmuştur. Buna göre protein ilavesinin alfa amilaz enzim aktivitesinin artırdığı söylenebilir. Fungal düşme sayısı ise una sonradan bir enzim ilavesi olup olmadığının belirlenmesi için yapılan analizdir. Kontrol numunesinin fungal düşme sayısı 922 bulunmuştur. Çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği için bu değerler sırasıyla 912,5, 824 ve 905,5 olarak bulgulanmıştır.

Tablo 21. Protein takviyesi yapılan unların analitik kalite parametreleri

| Numune | Yaş glüten | Gluten İndex | N. Sedimentasyon | G. Sedimentasyon | Düşme sayısı | Fungal Düşme Sayısı |
|--------------------------|---------------|-----------------|---------------------|---------------------|-----------------|------------------------|
| Ekmeklik Un (kontrol) | 25,2±0,14 | 98,5±0,07 | 30,5±0,07 | 37,5±0,70 | 416,5±23,3 | 922±0.00 |
| Çörek otu | 24,9±0,14 | 97,5±2,12 | 33±0.00 | 36,5±0,70 | 399±7,1 | 912,5±4,9 |
| Üzüm çekirdeği | 27,9±0,21 | 96±1,41 | 26±0.00 | 32,5±0,70 | 389±8,5 | 824±5,7 |
| Kabak çekirdeği | 25,1±0,07 | 98±1,41 | 31±0.00 | 37,5±0,70 | 378±5,7 | 905,5±7,8 |

4.8.1.5 Protein ilavesi yapılmış unların extensograf analizi

Çörek otu, kabak çekirdeği, üzüm çekirdeği ile zenginleştirilmiş unların extensograf analiz sonuçları Tablo 22’de gösterilmiştir. Çörek otu ve üzüm çekirdeği ile zenginleştirilen unların kontrol numunesinin göre uzamaya karşı direnci artırdığı gözlemlenmiştir. Çörek otu ve üzüm çekirdeği protein konsantresi ile zenginleştirilen unların uzaması da bir miktar azalmıştır (Tablo 22).

Tablo 22. Protein takviyesi yapılmış unların extensograf parametreleri

| Hamur dinlenme zamanı | Numune | Enerji (cm ²) | Uzamaya karşı direnç (BU) | Uzama (mm) | Maximum (BU) | Ratio Number | Ratio Number (max) |
|-----------------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|------------|--------------|--------------|--------------------|
| 45 dk | Kontrol | 70±3,2 | 302±5,9 | 134±4,2 | 375±10,01 | 2,3±0,21 | 2,8±0,1 |
| | Çörek otu | 72±4,1 | 344±6,3 | 128±11,3 | 411±5,9 | 2,7±0,12 | 3,2±0,54 |
| | Üzüm çekirdeği | 85±5,6 | 331±7,2 | 143±3,2 | 448±8,9 | 2,3±0,54 | 3,1±0,74 |
| | Kabak çekirdeği | 73±7,1 | 274±10,2 | 149±6,5 | 364±15,6 | 1,8±0,62 | 2,4±0,85 |
| 90 dk | Kontrol | 100±4,5 | 484±9,5 | 129±4,5 | 554± | 3,7±0,14 | 4,3±0,95 |
| | Çörek otu | 91±5,3 | 540±4,8 | 113±1,2 | 620±30,2 | 4,8±0,47 | 5,5±0,65 |
| | Üzüm çekirdeği | 101±6,2 | 572±3,6 | 116±10,3 | 692±24,8 | 4,9±0,36 | 6±0,34 |
| | Kabak çekirdeği | 87±1,3 | 413±4,2 | 128±4,6 | 508±41,3 | 3,2±0,58 | 4±0,12 |
| 135 dk | Kontrol | 86±2,6 | 473±7,9 | 117±5,3 | 542±12,35 | 4±0,24 | 4,6±0,84 |
| | Çörek otu | 100±6,1 | 544±8,1 | 121±8,2 | 637±26,3 | 4,6±0,14 | 5,3±0,76 |
| | Üzüm çekirdeği | 93±3,2 | 576±11,6 | 111±9,6 | 662±45,6 | 5,2±0,25 | 6±0,24 |
| | Kabak çekirdeği | 78±4,7 | 389±13,9 | 127±4,6 | 476±30,2 | 3,1±0,38 | 3,8±0,85 |

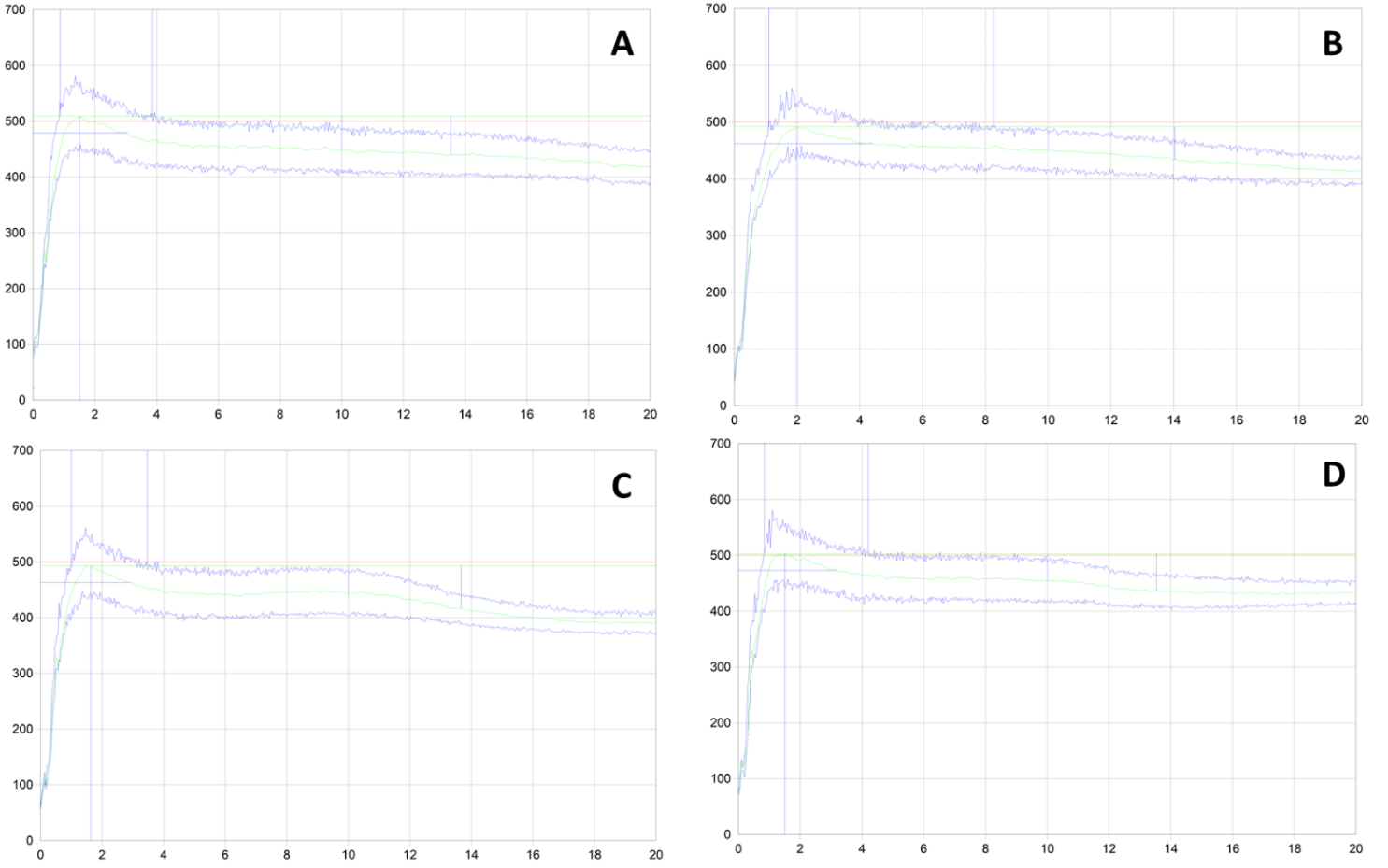
4.8.1.6 Protein ilavesi yapılmış unların farinograf analizi

Çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği ile zenginleştirilen unların yumuşama derecesinin belirlemek için farinograf analizleri yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 23 de belirtilmektedir. Buna göre; deney başladıktan 10 dk sonra yumuşama derecelerinin azaldığı söylenebilir (Tablo 23). Stabilitelerine baktığımız zaman ise; kontrol numunesinin stabilitesinin 3 dk olduğu; çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği numunelerinin stabilitesi de sırasıyla 7,2, 2,5 ve 3,4 dk olarak bulunmuştur. Buna göre üzüm çekirdeği ilavesini stabilizeyi azalttığı söylenebilir. Diğer durumlarda ise stabilize daha yüksektir. Bu durum Şekil 25'de de gösterilmektedir. Üzüm çekirdeği ilave edilen unun stabilitesinin diğerlerine göre daha az olduğu görülmektedir (Şekil 25; C).

Tablo 23. Protein takviyesi yapılmış unların farinograf parametreleri.

| Numune | Su absorpsiyonu (%) | Gelişme Zamanı (dk) | Stabilite (dk) | Yumuşama derecesi (FU) ^a | Yumuşama derecesi (FU) ^b |
|-----------------|---------------------|---------------------|----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Kontrol | 57,2 | 1,5 | 3 | 60 | 69 |
| Çörek otu | 57,8 | 2 | 7,2 | 42 | 58 |
| Üzüm çekirdeği | 56,8 | 1,7 | 2,5 | 50 | 76 |
| Kabak çekirdeği | 57,6 | 1,5 | 3,4 | 48 | 66 |

a: Deney başladıktan 10 dk sonra; b: 12 dk sonra maximum (ICC)



Şekil 25. Protein takviyesi yapılmış unların farinogramları. A: katkısız un (kontrol); B: çörek otu protein konsantresi ilaveli un; C: üzüm çekirdeği protein konsantresi ilaveli un; D: kabak çekirdeği protein konsantresi ilaveli un.

4.8.1.7 Protein ilavesi yapılmış ekmeklerin renk analizi

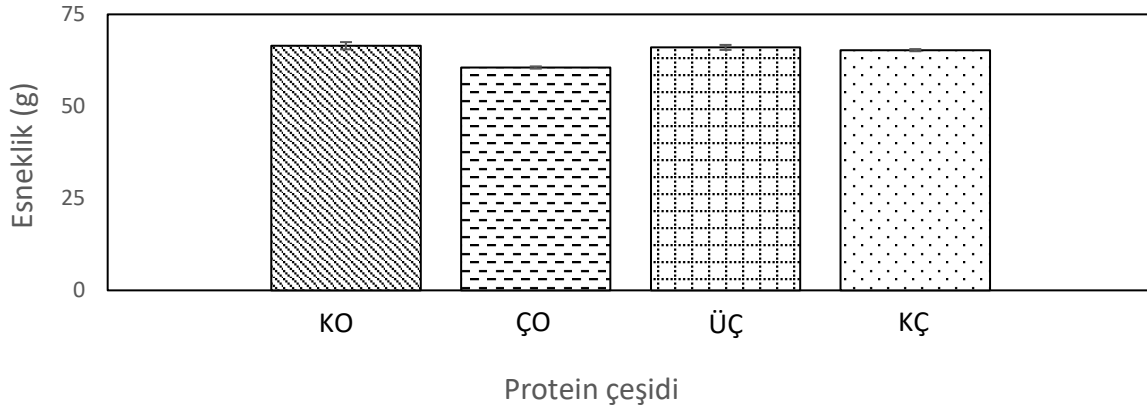
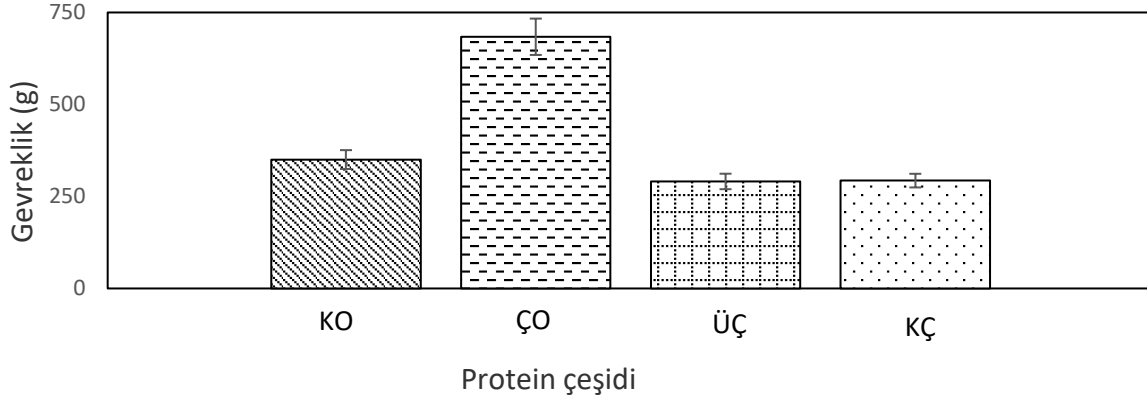
Protein konsantreleriyle zenginleştirilen unlarla yapılan ekmeklerin renk analizi Hunter lab (Colorflex EZ, Germany) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 24' de gösterilmiştir. Buna göre çörek otu protein konsantresi ile zenginleştirilen ekmeğin L^* değerine baktığımız zaman örneğin renginin koyu olduğu kanıtlanmaktadır (3,01). Üzüm çekirdeği ile zenginleştirilen ekmekte çörek otuna oranla daha az koyuluk vardır (32,01) ancak kontrol numunesine oranla (55,6) örneğin rengi koyulaşmıştır. a^* değerlerine baktığımız zaman ise üzüm çekirdeği numunesinin (8,03) üzüm çekirdeği protein konsantresi ile zenginleştirilen ekmeğin rengini kırmızılığını artırdığı diğer numunelere oranla açık ara görülmektedir.

Tablo 24. Ekmek içinin renk parametreleri.

| Numune | L* | a* | b* |
|-----------------|------------|-----------|------------|
| Kontrol | 55,6±0,9 | 2,6±0.5 | 24,09±0,10 |
| Çörek otu | 3,01±0,99 | 2,09±0.07 | 8,95±0,02 |
| Üzüm çekirdeği | 32,01±0,93 | 8,03±0,4 | 13,65±0,5 |
| Kabak çekirdeği | 55,75±0.23 | 2,01±0,45 | 23,45±2,03 |

4.8.1.8 Protein ilavesi yapılmış ekmeklerin tekstür analizi

Çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği ile zenginleştirilen ekmeklerin tekstür analizleri Şekil 26'da gösterilmiştir. Tekstür analizi için ekmeklerin gevreklik (g) ve esneklik (g) parametreleri kontrol edilmiştir. Bu bağlamda protein ilavesiz (kontrol) numunenin gevreklik (g) değeri 350,27 olarak bulunmuştur. Çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği ile zenginleştirilen ekmeklerin gevreklik (g) değerleri sırasıyla, 683,87, 290,74 ve 293,04 olarak bulunmuştur. Analiz edilen bir diğer tekstür parametresi de esneklik değeridir. Buna göre protein ilavesiz numunenin esneklik değeri 66,47 g bulunmuştur. Çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği ile zenginleştirilen numunelerin esneklik değerleri ise sırasıyla 60,56, 66,02 ve 65,27 g olarak rapor edilmektedir.



Şekil 26. Protein takviyesi yapılmış ekmeklerin tekstürel parametreleri. Kontrol (KO), çörek otu (ÇO), üzüm çekirdeği (ÜÇ), kabak çekirdeği (KÇ).

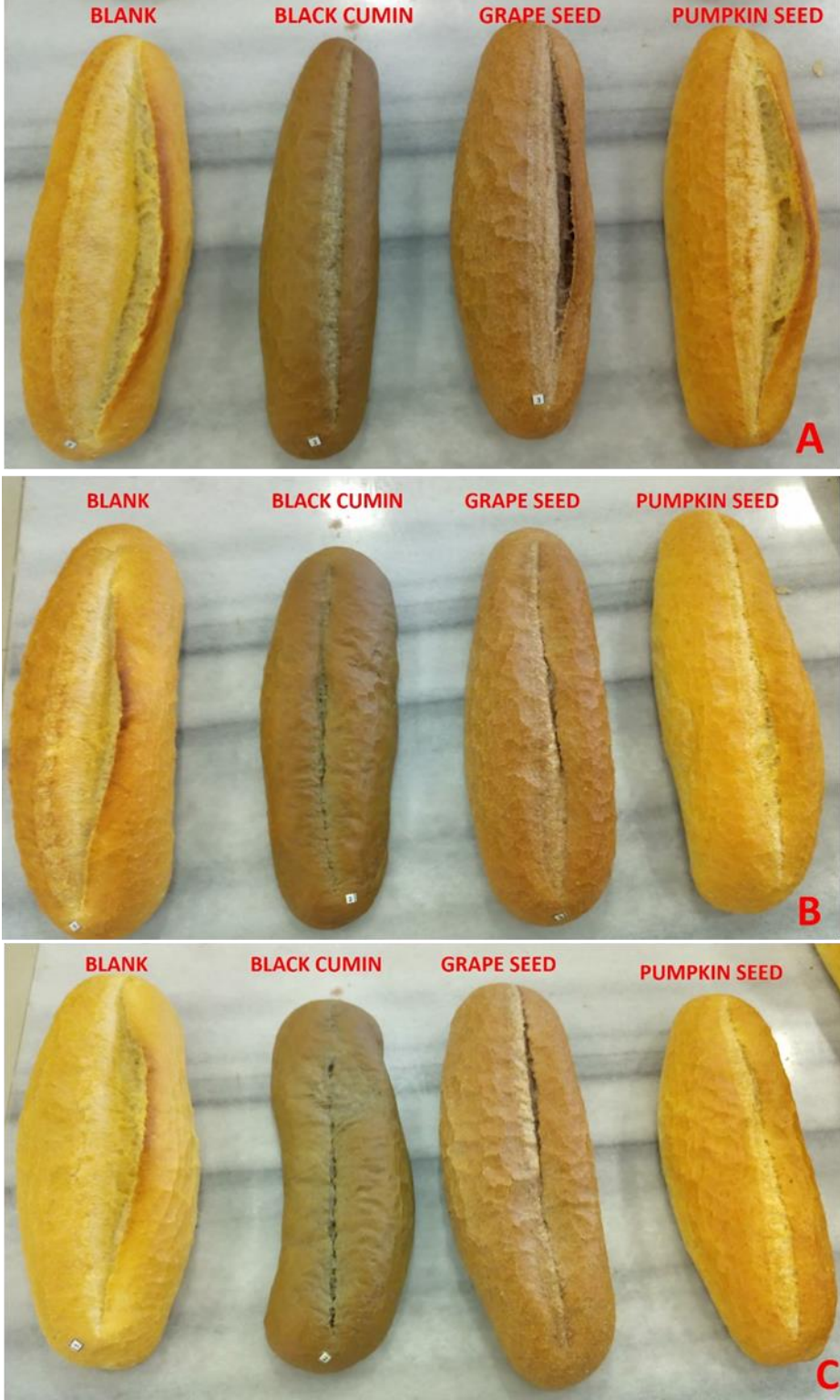
Çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği ile zenginleştirilmiş, farklı fermentasyon (fermentasyon sıcaklığı 35 °C, bağıl nem %90) (Juniorlev fermentörü, Tecnomac firması, İtalya) sürelerine sahip ekmeklerin piştikten sonraki görüntüleri Şekil 27'de gösterilmiştir. Morfolojik olarak ekmeklerin kabarmasına ve şekillerindeki değişikliklere baktığımızda, çörek otu ile zenginleştirilen ekmeğin 80 dk fermentörde kaldıktan sonra pişirildiğinde oluşan ekmeğin bıçak açmasının olmadığını görülmüştür. Bu durum, ekstensograf verileriyle de ilişkilendirildiğinde çörek otu proteinin hamura direnç kazandırdığı için ve açılabilirliğinin azalmasından dolayı olduğu söylenebilir. Yine çörek otu ile zenginleştirilmiş ekmeğin hacminin diğerlerine göre daha az olduğu söylenebilir (Şekil 27, A). 140 dk fermentörde kaldıktan sonra pişirilmiş ekmeklerin dış görünüşüne baktığımızda çörek otu protein konsantresi ile zenginleştirilmiş ekmeğin fermentasyon stabilitesinin olmadığı söylenebilir çünkü 80 dk



fermentörde kalan ekmekle 140 dk fermentörde kalan ekmeğin morfolojik yapısı arasında epey farklılık olduğu görülmüştür.

Ekstensograf değerlerine göre; çörekten sonra en dirençli hamur üzüm çekirdeği ile zenginleştirilen hamur olduğu rapor edilmektedir. Bıçak açma kısımlarına baktığımızda üzüm çekirdeği ile zenginleştirilmiş ekmeğin de yine dirençli bir hamur olduğunu doğrulamıştır.

Dış görünüşe baktığımızda, kabak çekirdeği protein konsantresi ile zenginleştirilen ekmeğin protein ilavesiz (kontrol) ekmeğe en yakın forma sahip ekmek olduğu bulunmuştur.



Şekil 27. Farklı fermentasyon sürelerine sahip ekmeklerin piştikten sonra görünümü. Fermentörde kalma süreleri; A: 80 dk; B: 110 dk; C: 140 dk.

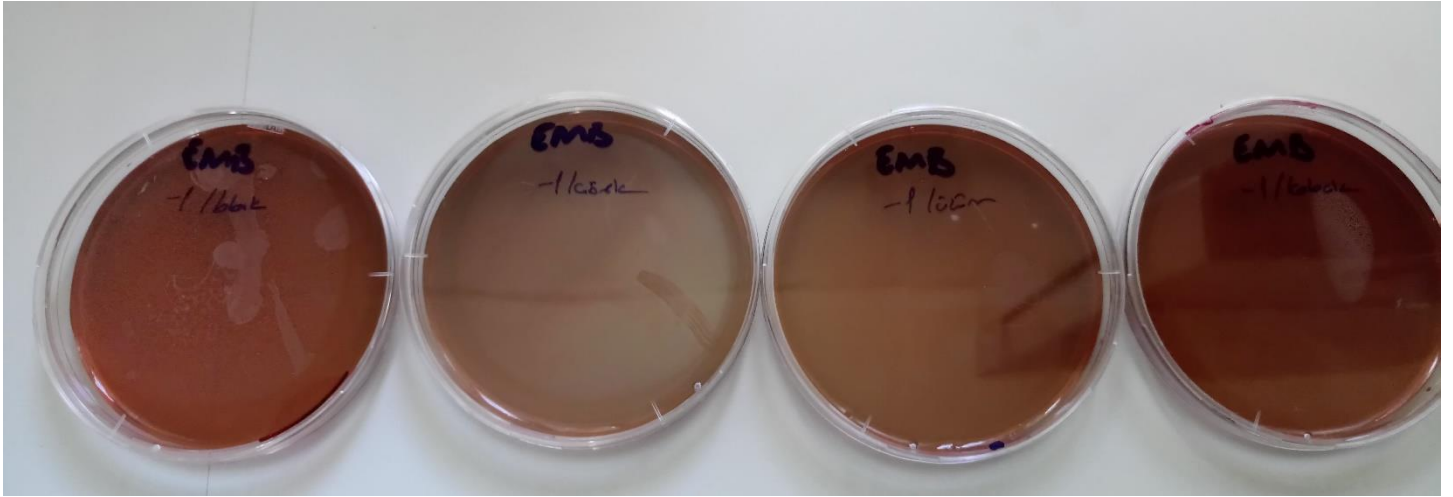
4.8.1.9 Mikrobiyolojik analizler

E.coli

E.coli için 10^{-1} ve 10^{-2} olmak üzere 2 farklı dilisyon sıvısı hazırlandı. **EMB** besiyerine yayma plak yöntemi ile ekim yapıldı. Daha sonra besiyerleri **37 °C'de 24 saat** bekletilerek sonuca ulaşıldı. Sonuçlar Tablo 25 üzerinde görülmektedir.

Tablo 25. Dilisyon derecelerine göre toplam *E.coli* sayısı

| Numune | <i>E.coli</i> koloni sayısı (kob) | |
|-----------------|-----------------------------------|-----------|
| | 10^{-1} | 10^{-2} |
| Kontrol | <100 | <100 |
| Çörek otu | <100 | <100 |
| Üzüm çekirdeği | <100 | <100 |
| Kabak çekirdeği | <100 | <100 |



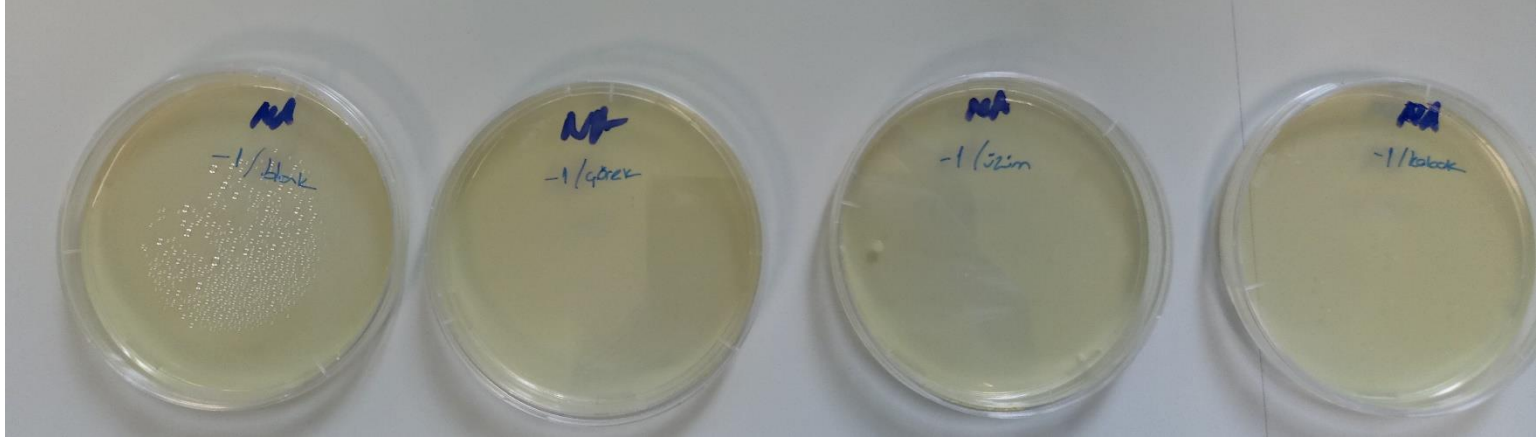
Şekil 28. *E.coli* ekimi yapılan petri kaplarının görüntüsü.

Bacillus cereus

B.cereus için 10^{-1} ve 10^{-2} olmak üzere 2 farklı dilisyon sıvısı hazırlandı. **NA** besiyerine yayma plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. Daha sonra besiyerleri **30 °C'de 24 saat** bekletilerek sonuca ulaşılmıştır. Sonuçlar Tablo 26'da belirtilmektedir.

Tablo 26. Dilisyon derecelerine göre toplam *B.cereus* koloni sayısı

| Numune | <i>B.cereus</i> koloni sayısı (kob) | |
|-----------------|-------------------------------------|------------------|
| | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² |
| Kontrol | <100 | <100 |
| Çörek otu | <100 | <100 |
| Üzüm çekirdeği | <100 | <100 |
| Kabak çekirdeği | <100 | <100 |



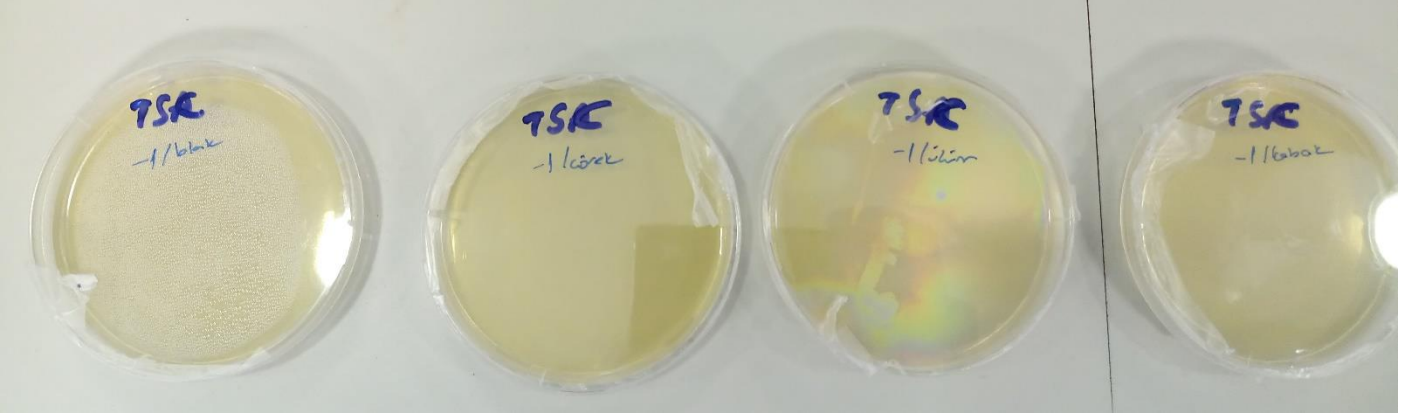
Şekil 29. *B.cereus* ekimi yapılan petri kaplarının görüntüsü.

Clostridium perfringens

C.perfringens için 10-1 ve 10-2 olmak üzere 2 farklı dilisyon sıvısı hazırlanmıştır. TSC besiyerine yayma plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. Daha sonra besiyerleri 44 °C'de 24 saat anaerobik ortamda bekletilerek sonuca ulaşılmıştır. Sonuçlar Tablo 27'de gösterilmiştir.

Tablo 27. Dilisyon derecelerine göre *C.perfringens* toplam koloni sayısı.

| Numune | <i>C.perfringens</i> koloni sayısı (kob) | |
|-----------------|--|------------------|
| | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² |
| Kontrol | <100 | <100 |
| Çörek otu | <100 | <100 |
| Üzüm çekirdeği | <100 | <100 |
| Kabak çekirdeği | <100 | <100 |



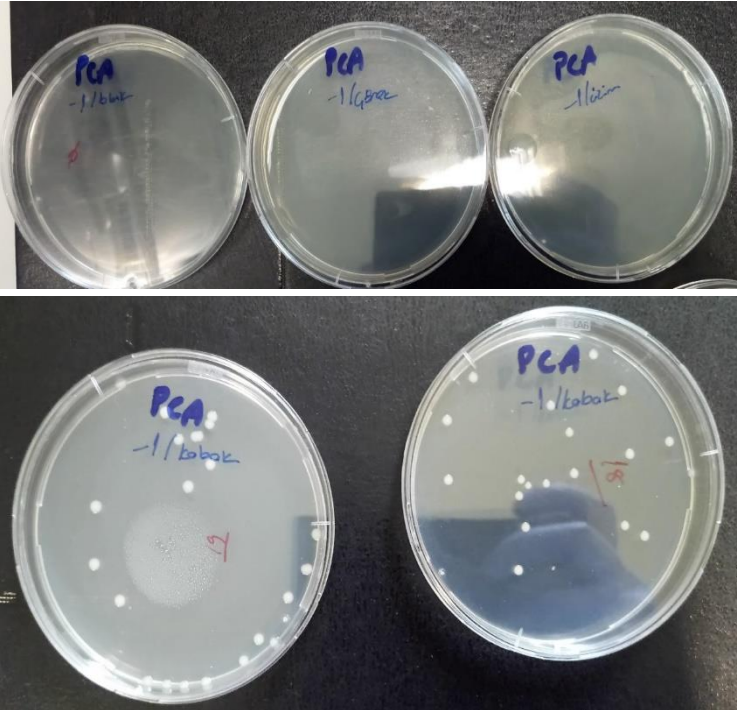
Şekil 30. *C.perfringens* ekimi yapılan petri kaplarının görüntüsü.

Mezofilik aerobik bakteri

Mezofilik aerobik bakteri için 10^{-1} ve 10^{-2} olmak üzere 2 farklı dilisyon sıvısı hazırlandı. PCA besiyerine yayma plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. Daha sonra besiyerleri $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 72 saat bekletilerek sonuca ulaşılmıştır. Sonuçlar Tablo 28'de gösterilmiştir.

Tablo 28. Dilisyon derecelerine göre MAB toplam koloni sayısı

| Numune | MAB Koloni Sayısı (kob) | |
|-----------------|-------------------------|-----------|
| | 10^{-1} | 10^{-2} |
| Kontrol | <100 | <100 |
| Çörek otu | <100 | <100 |
| Üzüm çekirdeği | <100 | <100 |
| Kabak çekirdeği | $18,5\pm 0,7$ | <100 |



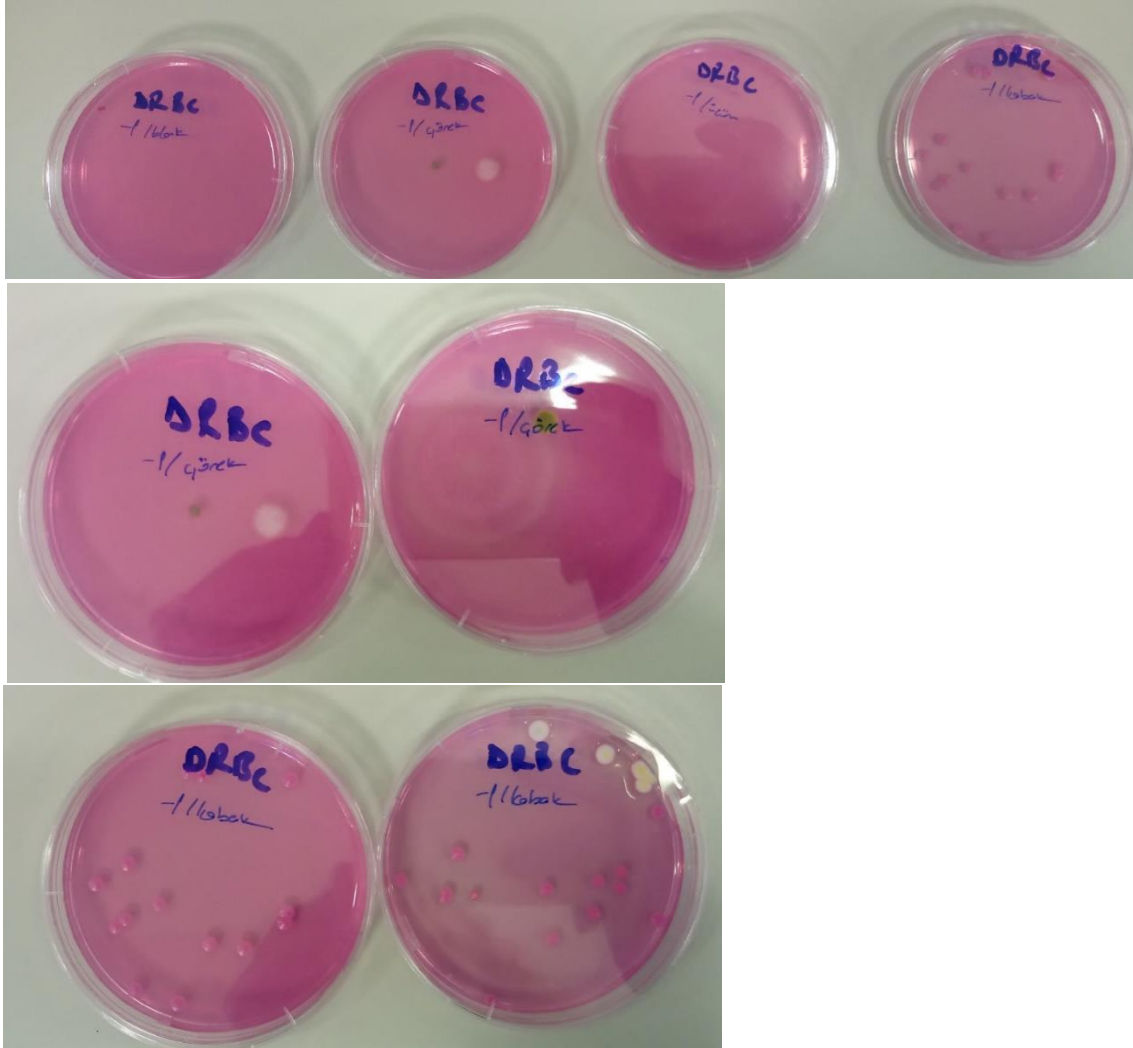
Şekil 31. MAB ekimi yapılan petri kaplarının görüntüsü.

Toplam küf-maya analizi

Toplam küf-maya analizi için 10^{-1} ve 10^{-2} olmak üzere 2 farklı dilisyon sıvısı hazırlandı. DRBC besiyerine yayma plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. Daha sonra besiyerleri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 120 saat bekletilerek sonuca ulaşılmıştır. Sonuçlar Tablo 29'da gösterilmiştir.

Tablo 29. Dilisyon derecelerine göre toplam küf-maya koloni sayısı

| Numune | Küf-maya koloni sayısı (kob) | |
|-----------------|------------------------------|-----------|
| | 10^{-1} | 10^{-2} |
| Kontrol | <100 | <100 |
| Çörek otu | $1\pm 0,0$ | <100 |
| Üzüm çekirdeği | <100 | <100 |
| Kabak çekirdeği | $15\pm 1,41$ | <100 |



Şekil 32. Küf-maya ekimi yapılan petri kaplarının görüntüsü.

4.8.2 Glutensiz ekmek çalışması

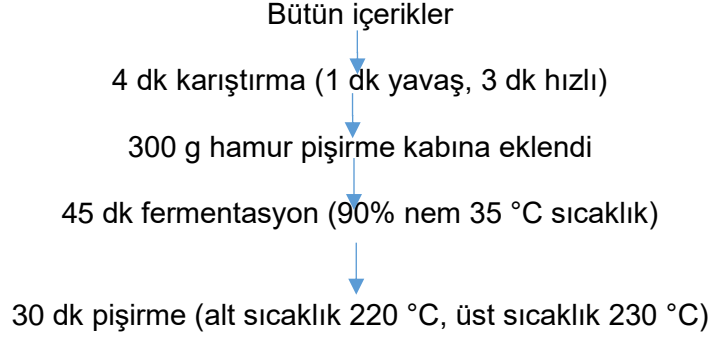
4.8.2.1 Formülasyon

İlgili proje kapsamında üretilen çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği protein konsantrleriyle glutensiz ekmek üretimi yapılmıştır. Üretilen ekmeklerin formülasyonu Tablo 30'da görülmektedir. Bu bağlamda, her birine ilk önce her birine 300 ml su, 200 g buz, 300 g glutensiz un (Sinangil), 3,6 g tuz ve 12 g pres maya kullanılmıştır. Daha sonra su oranı %8 artırılarak diğer parametreler sabit kalacak şekilde 324 ml su eklenmiştir. Son olarak su oranı %15 oranında artırılmış ve yine diğer parametreler sabit bırakılıp, 345 ml su kullanılmıştır. Böylece 3 farklı deneme seti oluşturulup toplam 12 tane ekmek üretimi gerçekleştirilmiştir. Protein içeriği her birinde %1,5 olacak şekilde zenginleştirme işlemi uygulanmıştır. Protein içerikleri her birinde değişiklik gösterdiği için eklenen protein miktarı her bir ekmek için farklıdır. Buna göre; çörek otu ile zenginleştirilen ekmeğe 8,22 gr protein konsantresi, kabak çekirdeği ile zenginleştirilen ekmeğe 5,42 gr protein konsantresi ve üzüm çekirdeği ile zenginleştirilen ekmeğe ise 15 gr protein konsantresi eklenmiştir.

Tablo 30. Glutensiz ekmek formülasyonu. (BCB: çörek otu ekmeği; GSB: üzüm çekirdeği ekmeği; PSB: kabak çekirdeği ekmeği; BCPC: çörek otu protein konsantresi; GSPC: üzüm çekirdeği protein konsantresi; PSPC: kabak çekirdeği protein konsantresi).

| İçerik | Kontrol | BCB | GSB | PSB |
|-------------------------|---------|--------|--------|--------|
| Su | 300 ml | 300 ml | 300 ml | 300 ml |
| Su oranı %8 artırılmış | 300 ml | 324 ml | 324 ml | 324 ml |
| Su oranı %15 artırılmış | 300 ml | 345 ml | 345 ml | 345 ml |
| Glutensiz un | 300 g | 300 g | 300 g | 300 g |
| Tuz | 3,6 g | 3,6 g | 3,6 g | 3,6 g |
| Pres maya | 12 g | 12 g | 12 g | 12 g |
| Ayçiçek yağı | 18 g | 18 g | 18 g | 18 g |
| BCPC | - | 8,22 g | - | - |
| GSPC | - | - | 15 g | - |
| PSPC | - | - | - | 5,42 g |

4.8.2.2 Glutensiz ekmek yapımı



Şekil 33. Glutensiz ekmek yapım prosesi

Tablo 30'da belirtilen formulasyonlar kullanılarak Şekil 33'de belirtildiği gibi ekmekler üretilmiştir. Bütün malzemeler aynı anda set üstü mikserlere konulmuştur (Kenwood set üstü mikser, majör titanium, palet çırpıcı). 3 dk hızlı, 1 dk yavaş karıştırıldıktan sonra 300 gr hamurdan alınıp kek kalıplarına konulmuştur ve fermentörde 45 dk bekletilmiştir (Juniorlev fermentör, Tecnomac firması, İtalya). 30 dk boyunca alt taban 220 °C, üst taban 230 °C'de pişirilmiştir. 3 ayrı protein konsantresi bir de kontrol numunesiyle beraber toplam 4 ekmek ve 3 farklı su oranı olmak üzere toplamda 12 tane glutensiz ekmek üretilmiştir.

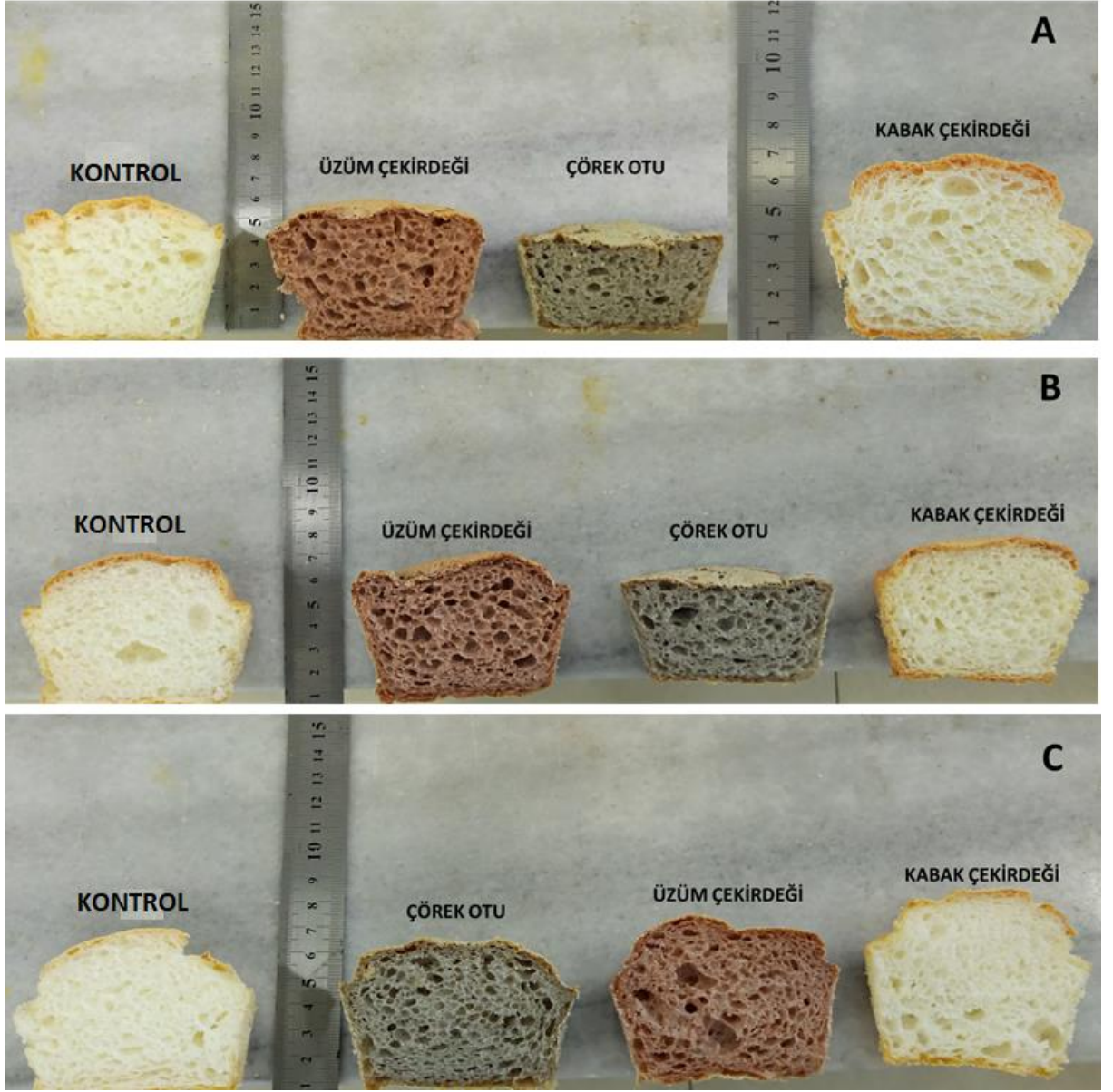
Çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği ile zenginleştirilmiş, farklı su oranlarına sahip (aynı su oranı %8 daha fazla, %15 artırılmış) sahip ekmeklerin piştikten sonraki görüntüleri Şekil 35'de gösterilmiştir. Morfolojik olarak ekmeklerin hacmine baktığımızda, protein ilavesiz numune ile aynı su oranına sahip glutensiz ekmeklerde çörek otu protein konsantresi ile zenginleştirilmiş glutensiz ekmeğin en düşük hacme sahip olduğu söylenebilir. Bu durumun nedeninin proteinlerin su tutma özelliğinden ileri geldiği düşünülmektedir. Üzüm çekirdeği protein konsantresi ile zenginleştirilen glutensiz ekmeğin çörek otuna göre biraz daha hacimli ancak yine de protein ilavesiz numuneye göre daha az kabarık olduğu görülmüştür. Kabak çekirdeği protein konsantresi ile zenginleştirilen glutensiz ekmeğin protein ilavesi ile numune hacminin bir miktar arttığı gözlemlenmiştir.

Protein ilavesiz glutensiz ekmeğe göre protein ilavelilere %8 daha fazla su konularak üretilmiş ekmeklerde çörek otu ve üzüm çekirdeği protein konsantresi ile zenginleştirilen ekmeklerin aynı su oranına göre biraz daha hacim kazandığı ama hala daha kontrol numunesine oranla daha az kabarık olduğu görülmüştür. Bu durumun daha önce de belirtildiği gibi proteinlerin hamurlara belirli bir direnç kazandırmasından ve su tutmasından dolayı olduğu düşünülmektedir. Kabak çekirdeği protein konsantresi ile zenginleştirilen ekmeğin hacminin protein ilavesiz ekmeğe göre daha fazla olduğu bulunmuştur.



Son olarak protein ilavesiz glütensiz ekmeğe göre protein ilavelilere %15 daha fazla su konulduğunda çörek otu, üzüm çekirdeği, kabak çekirdeği protein konsantresi ilave edilen glütensiz ekmeklerin hacminin orijinal su oranına göre oldukça geliştiği görülmektedir.

Ekmeklerin gözenek büyüklüklerine bakıldığında ise çörek otu ve üzüm çekirdeği protein konsantresi ile zenginleştirilen glütensiz ekmeklerin daha büyük gözeneklere sahip olduğu görülmektedir. Kabak çekirdeği protein konsantresi ile zenginleştirilen glütensiz ekmeğin gözenek yapısının kontrol numunesiyle daha fazla benzerlik gösterdiği görülmektedir.



Şekil 34. Çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği protein konsantresi ile zenginleştirilmiş ve farklı su oranları eklenerek pişirilmiş glütensiz ekmek görüntüsü. (A: Aynı su oranı; B: Su oranı %8 artırılmış C: Su oranı %15 artırılmış)

4.8.2.3 Glütensiz ekmeklerin hacim analizi

Ekmeklerin hacim analizi yer değiştirme metoduna göre yapılmıştır. Buna göre belirli bir miktar haşhaş tohumları ile tepeleme dolana kadar bir kabın içine konulmuştur. Daha sonra haşhaş tohumları kaptan çıkartılıp, kaba ekmek konulmuştur ve yine tepeleme bir şekilde boşluklar haşhaş tohumu ile doldurulmuştur. Geriye kala haşhaşlardan ekmeğin hacmi hesap edilmiştir.

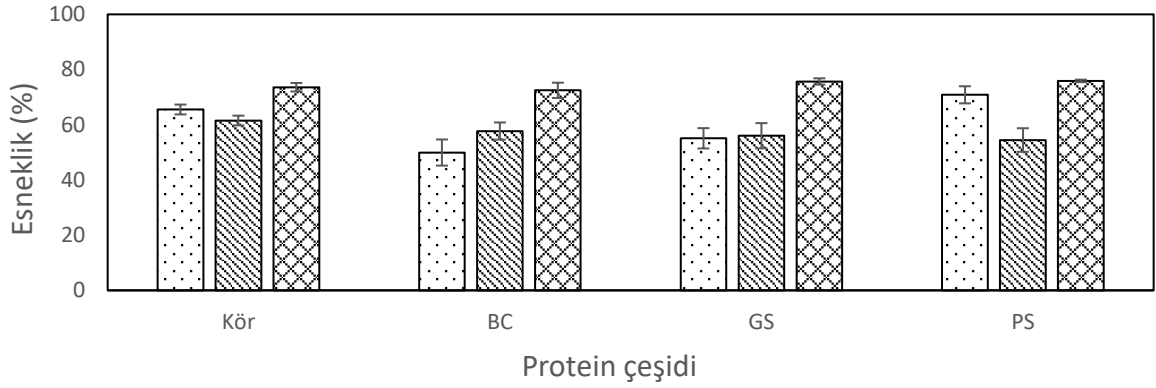
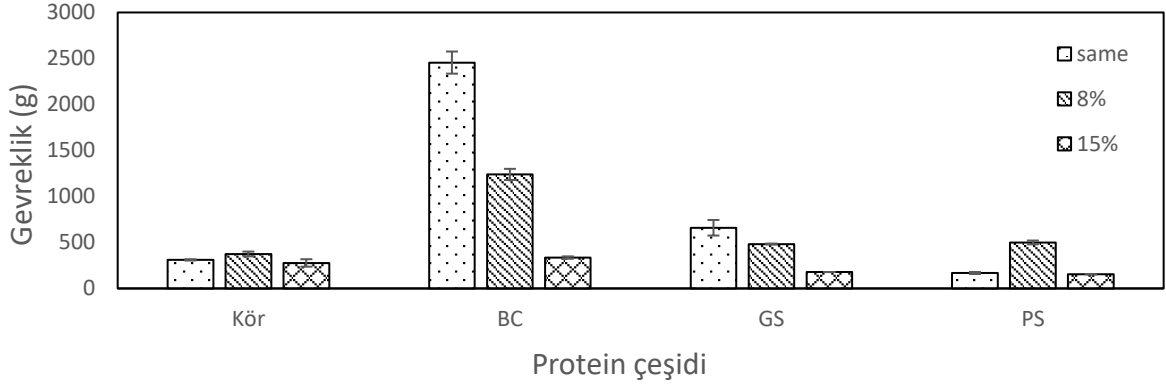
Yer değiştirme ilkesine göre yapılan hacim testinin sonuçları Tablo 31’de belirtilmiştir. Protein ilavesiz (kontrol) numuneyle aynı su oranı konulduğunda çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği protein konsantreleri ile zenginleştirilen glütensiz ekmeklerin hacminin kontrol numunesine göre daha az olduğu bulgulanmıştır. Su oranını arttırdıkça zenginleştirilen ekmeklerin hacmi de artmıştır.

Tablo 31. Glutensiz ekmeklerin hacim parametreleri.

| Numune | Aynı su oranı | %8 su artırma | %15 su artırma |
|-----------------|---------------|---------------|----------------|
| Kontrol | 920±20.85 | 790±28.54 | 715±11.3 |
| Çörek otu | 380±30.56 | 565±25.12 | 800±15.18 |
| Üzüm çekirdeği | 465±16.29 | 850±34.02 | 1000±20.02 |
| Kabak çekirdeği | 850±20.02 | 860±22.74 | 950±15.28 |

4.8.2.3 Glutensiz ekmeklerin tekstür analizi

Çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği protein konsantresi ile zenginleştirilen glütensiz ekmeklerin tekstür analizleri Şekil 35 üzerinde gösterilmiştir. Tekstür analizi için ekmeklerin gevreklik (g) ve esneklik (g) parametreleri kontrol edilmiştir. Bu bağlamda protein ilavesiz (kontrol) numune ile aynı su oranına sahip çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği proteiniyle zenginleştirilen ekmeklerin gevreklik değeri sırasıyla; 2455, 659,7 ve 168,08 g olarak bulunmuştur. Esneklik değerleri ise sırasıyla 49,9, 55 ve 70,8 g olarak bulunmuştur. Kontrol numunesinin gevreklik ve esneklik değeri ise sırasıyla 310,5 ve 65,5 olarak rapor edilmektedir. Kontrol numunesine göre su oranı %8 oranında arttırıldığında yine sırasıyla çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği proteiniyle zenginleştirilen ekmeklerin gevreklik değerleri; 374, 1239,4, 482,7 ve 500 g olarak belirtilirken; esneklik değerleri 61,5, 57,7, 56 ve 54,4 olarak bulunmuştur. Oluşabilecek belirsizlikleri elimine etmek için protein ilavesiz ekmek her sette tekrardan pişirilmiştir. Bu bağlamda %8 su oranı arttırılan sette Kontrol numunesinin gevreklik ve esneklik değerleri sırasıyla 374 ve 61,5 olarak bulunmuştur. Son olarak kontrol numunesine oranla su oranının %15 artırıldığı sette çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği protein ilaveli glütensiz ekmeklerin gevreklik değerleri sırasıyla 335,9, 178,4 ve 154,3 g olarak bulunmuştur. Esneklik değerleri ise 72,4, 75,6 ve 75,8 olarak bulunmuştur. Kontrol numunesinin gevreklik ve esneklik değeri ise 277,2 ve 73,6 olarak belirtilmektedir.



Şekil 35. Protein ilavesiz glütensiz ekmek ve proteinle zenginleştirilmiş glütensiz ekmeklerin tekstür parametreleri. BC: çörek otu; GS: üzüm çekirdeği; PS: kabak çekirdeği protein konsantresi ilave edilmiş glütensiz ekmekler. Veriler iki ölçümün ortalamasıdır ve hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir.

4.8.2.4 Glutensiz ekmeklerin renk parametreleri

Protein konsantreleriyle zenginleştirilen glutensiz ekmeklerin renk analizi sonuçları Tablo 32’de gösterilmiştir. Buna göre çörek otu protein konsantresi ile zenginleştirilen ekmeğin L* değerine baktığımız zaman örneğin renginin koyu olduğu kanıtlanmaktadır (2,68). Üzüm çekirdeği ile zenginleştirilen ekmekte çörek otuna oranla daha az koyuluk vardır (30,60) ancak kontrol numunesine oranla (54,59) örneğin rengi koyulaşmıştır. a* değerlerine baktığımız zaman ise üzüm çekirdeği numunesinin (7,68) üzüm çekirdeği protein konsantresi ile zenginleştirilen ekmeğin rengini kırmızılığını artırdığı diğer numunelere oranla açık ara görülmektedir. Kontrol numunesinin a* değeri 2,43 olarak analiz edilmiştir. Çörek otu ve kabak

çekirdeği proteini ile zenginleştirilen ekmeklerin a* değerleri ise sırasıyla 2,05 ve 1,71 olarak bulunmuştur. Buna göre diğer numunelerin a* değerlerinin kontrol numunesiyle benzerlik göstermiştir. Renk açısından kontrol numunesine en çok benzerlik gösteren numunenin kabak çekirdeği numunesi olduğu görülmüştür.

Tablo 32. Glutensiz ekmeğin renk parametreleri (BC: çörek otu; GS: üzüm çekirdeği; PS: kabak çekirdeği).

| Numune | L* | a* | b* |
|---------|------------|-----------|------------|
| Kontrol | 54,59±0,86 | 2,43±0,12 | 23,34±0,12 |
| BC | 2,68±0,95 | 2,05±0,06 | 8,73±0,06 |
| GS | 30,60±1,23 | 7,68±0,36 | 12,03±0,42 |
| PS | 53,93±0,5 | 1,71±0,24 | 22,62±1,98 |

İki replikasyonun ortalama değeri ± standart sapma.

4.8.3 İyileştirilmiş özellikleri olan protein numuneleri ile ekmek üretimi ve ürün karakterizasyonu

4.8.3.1 Formülasyon

Proje kapsamında izole edilen çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği protein konsantrelerinin özelliklerini iyileştirmek için Maillard konjugasyonu ve TGase muamelesi yapılmıştır. Bu bağlamda Maillard için önceki bölümlerde yapılan çalışmalarda elde edilen optimum koşullar kullanılmıştır (1:2 protein:glikoz oranı pH 7 ,15 dk 100 °C). Proteini (%1,5) suda çözündürmek için, 1 saat boyunca pH 12 de karıştırılmıştır. 1:2 protein:glikoz oranı olacak şekilde glikoz, 1 saatin sonunda çözeltiye eklenmiştir. Protein ile glikozun etkileşmesi için 1 saat boyunca karıştırma işlemine devam edilmiştir. Daha sonra maillard reaksiyonu olması için oluşturulan çözelti 100 °C'de 15 dk boyunca bekletilmiştir. Çözelti su banyosundan çıkartıldıktan hemen sonra Maillard reaksiyonunun devam etmemesi için buz dolu kaba konulup sıcaklığı düşürülmüştür. Oluşan çözelti glütensiz ekmek yapımında kullanılmıştır.

TGase muamelesi için; önceden alınan ticari TGase enziminin aktivitesi belirlenmiş, bununla ilgili çalışmalar yapılmış ve yine optimum koşullara göre TGase muamelesi yapılmıştır. Öncelikle %1,5'luk protein dispersiyonu yapılmıştır. Daha sonra her bir %protein için 50 mg ticari Tgase enzimi kullanılmıştır ve çözelti 37 °C'de 16 saat boyunca karıştırılmıştır. Oluşturulan çözelti glutensiz ekmek yapımında kullanılmıştır.

Glikolizasyon ve TGase muamelesi yapılan çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği protein konsantreleriyle glütensiz ekmek üretimi yapılmıştır. Üretilen ekmeklerin formülasyonu Tablo 33'de görülmektedir. Bu bağlamda, her birine ilk önce her birine 300 ml su, 200 g buz, 300 g glütensiz un (Sinangil), 3,6 g tuz ve 12 g pres maya kullanılmıştır. Daha

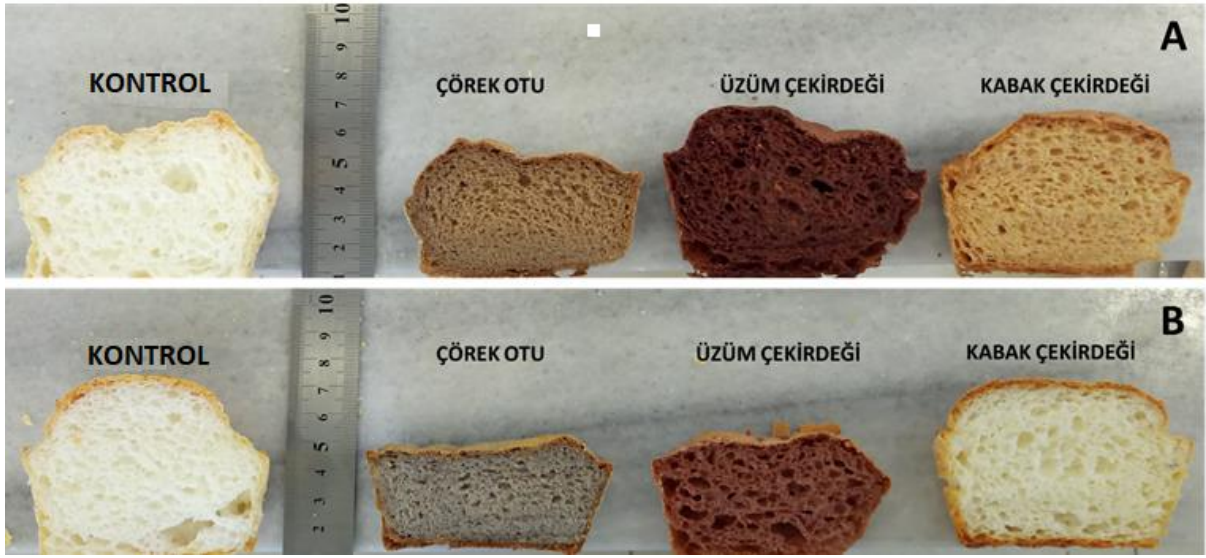
sonra su oranı %8 artırılarak diğer parametreler sabit kalacak şekilde 324 ml su eklenmiştir. Son olarak su oranı %15 oranında artırılmış ve yine diğer parametreler sabit bırakılıp, 345 ml su kullanılmıştır. Böylece 3 farklı deneme seti oluşturulup toplam 12 tane ekmek üretimi gerçekleştirilmiştir. Protein içeriği her birinde %1,5 olacak şekilde zenginleştirme işlemi uygulanmıştır. Protein içerikleri her birinde değişiklik gösterdiği için eklenen protein miktarı her bir ekmek için farklıdır. Buna göre; çörek otu ile zenginleştirilen ekmeğe 8,22 gr protein konsantresi, kabak çekirdeği ile zenginleştirilen ekmeğe 5,42 gr protein konsantresi ve üzüm çekirdeği ile zenginleştirilen ekmeğe ise 15 gr protein konsantresi eklenmiştir.

Tablo 33. Glutensiz ekmek formülasyonları. (BC: çörek otu; GS: üzüm çekirdeği; PS: kabak çekirdeği; BCPC: çörek otu protein konsantresi; GSPC: üzüm çekirdeği protein konsantresi; PSPC: kabak çekirdeği protein konsantresi).

| İçerik | Kontrol | BC | GS | PS |
|--------------|---------|--------|--------|--------|
| Su | 300 ml | - | - | - |
| Glutensiz un | 300 g | 300 g | 300 g | 300 g |
| Tuz | 3,6 g | 3,6 g | 3,6 g | 3,6 g |
| Pres maya | 12 g | 12 g | 12 g | 12 g |
| Ayçiçek yağı | 18 g | 18 g | 18 g | 18 g |
| BCPD | - | 345 ml | - | - |
| GSPD | - | - | 345 ml | - |
| PSPD | - | - | - | 345 ml |

Şekil 36'da iyileştirilmiş özellikleri bulunan (örn; köpük kapasitesi) protein konsantreleriyle üretilmiş glutensiz ekmeklerin görüntüleri verilmiştir. Buna göre glikolizasyon işlemi uygulanmış çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği numuneleriyle üretilmiş glutensiz ekmeklerin görüntüsüne bakıldığında (Şekil 36; A), çörek otu proteini ile üretilmiş glutensiz ekmeğin diğerlerine göre daha az hacme sahip olduğu ancak gözenek büyüklüklerinin daha küçük ve daha homojen olduğu görülmektedir.

TGase muamelesi yapılmış çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği numuneleriyle üretilmiş glutensiz ekmeklerin görüntülerine bakıldığında (Şekil 37; B) kabak çekirdeği numnesinin kontrol numunesine daha yakın hacmi olduğu, çöre kotu ve üzüm çekirdeği protein ilave edilmiş ekmeklerin hacminin kontrol numunesine göre azaldığı görülmektedir. Gözenek büyüklüğü ve homojenliğine bakıldığında ise çörek otunun daha küçük ve daha homojen dağılmış gözeneklere sahip olduğu söylenebilir.



Şekil 36. İyileştirilmiş özellikleri olan çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği protein konsantrisi ile zenginleştirilmiş glütensiz ekmeklerin görüntüsü. (A: Glikolizasyon; B: TGase muamelesi)

4.8.3.2. İyileştirilmiş özellikleri olan protein numuneleri ile üretilmiş ekmeklerin hacim analizi

Yer değiştirme ilkesine göre yapılan hacim testinin sonuçları Tablo 34'de belirtilmektedir. Glikolizasyon yapılan çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği proteinleriyle üretilen glutensiz ekmeklerin hacimleri sırasıyla; 710, 880 ve 905 olarak analiz edilmiştir. Kontrol numunesinin hacmi ise 1010 olarak belirtilmektedir. TGase muamelesi yapılmış çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği numunesinin hacim değerleri sırasıyla 660, 860 ve 905 olarak bulunmuştur. Protein ilavesiz (kontrol) ekmeğin hacim değerine bakıldığında ise 940 olduğu anlaşılmıştır. Buna göre iyileştirilmiş özellikleri bulunan protein konsantrileriyle üretilen glutensiz ekmeklerin kontrol ekmeğinin hacim değerini düşürdüğü söylenebilir.

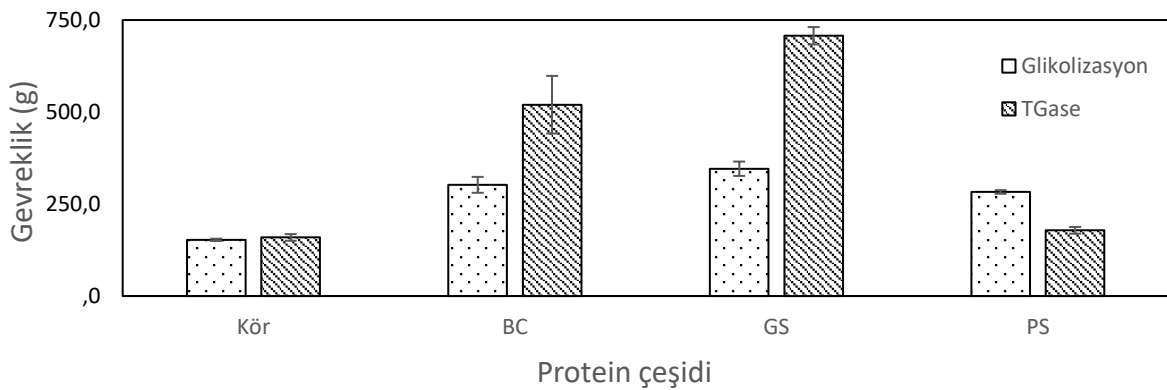
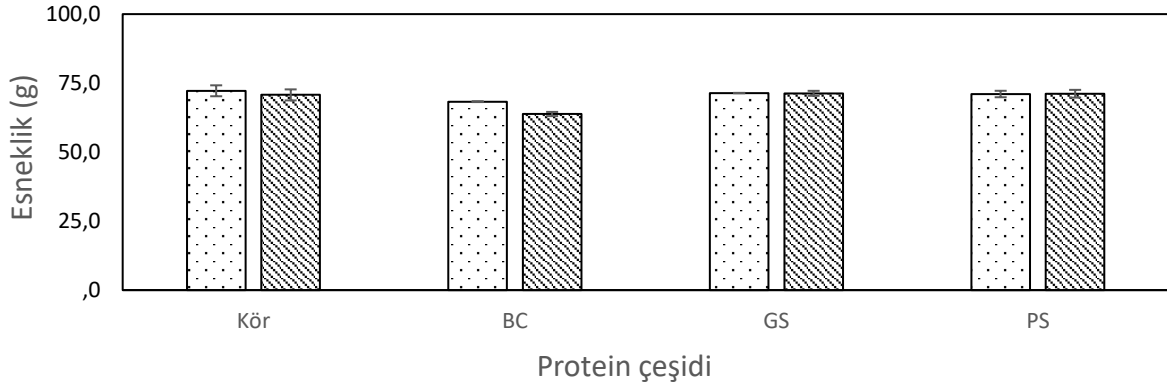
Tablo 34. İyileştirilmiş özellikleri olan protein numuneleri ile üretilmiş glutensiz ekmeklerin hacim sonuçları.

| Numune | Glikolizasyon | TGase muamelesi |
|-----------------|---------------|-----------------|
| Kontrol | 1010±22.45 | 940±25.02 |
| Çörek otu | 710±33.76 | 660±31.23 |
| Üzüm çekirdeği | 880±18.69 | 860±20.56 |
| Kabak çekirdeği | 905±29.12 | 905±13.25 |

4.8.3.3. İyileştirilmiş özellikleri olan protein numuneleri ile üretilmiş ekmeklerin tekstür analizi

Glikozilasyon ve TGase muamelesi yapılan çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği numunelerinin gevreklik (g) ve esneklik (g) değerleri Şekil 37'de gösterilmiştir. Buna göre; glikozilasyon yapılan çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği proteinleriyle üretilen glutensiz ekmeklerin gevreklik değerleri sırasıyla 302,1, 345,9 ve 282,8 g olarak bulunmuştur. Kontrol numunesinin gevreklik değeri ise 152,6 g olarak rapor edilmiştir. Glikozilasyon yapılmış proteinlerle üretilen ekmeklerin esneklik (g) değerleri ise sırasıyla 68,2, 71,3 ve 71 olarak analiz edilmiştir. Kontrol numunesinin esneklik değeri ise 72,2 olarak bulunmuştur.

TGase muamelesi yapılan çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği protein konsantreleriyle üretilen glutensiz ekmeklerinin gevreklik değerleri sırasıyla 519,9, 707,1 ve 178,6 g olarak belirtilmektedir. Esneklik değerleri ise sırasıyla, 63, 71,3 ve 71,14 olarak rapor edilmiştir. Kontrol numunesinin gevreklik ve esneklik değerler ise sırasıyla, 159,2 ve 70 g olarak analiz edilmiştir.



Şekil 37. Protein ilavesiz glutensiz ekmek ve iyileştirilmiş özellikleri olan proteinle zenginleştirilmiş glutensiz ekmeklerin tekstür parametreleri: BC: çörek otu; GS: üzüm çekirdeği; PS: kabak çekirdeği protein dispersiyonu ilave edilmiş glutensiz ekmekler. Veriler iki ölçümün ortalamasıdır ve hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir.

4.8.3.4. İyileştirilmiş özellikleri olan protein numuneleri ile üretilmiş ekmeklerin renk parametreleri

İyileştirilmiş özellikleri olan protein konsantreleriyle zenginleştirilen glutensiz ekmeklerin renk analizi sonuçları Tablo 35' de gösterilmiştir. Buna göre glikolizasyon yapılmış çörek otu (39,8) ve üzüm çekirdeği (24,9) protein konsantresi ile zenginleştirilen ekmeğin L* değerine baktığımız zaman örneğin renginin kontrol numunesine göre (76,84) koyu olduğu kanıtlanmaktadır. Kabak çekirdeği ile zenginleştirilen numune de (53,5) kontrol numunesine göre daha koyudur, ancak çörek otu ve üzüm çekirdeğine oranla daha az koyu olduğu belirtilmektedir. TGase muamelesi yapılmış çörek otu, üzüm çekirdeği ve kabak çekirdeği numunelerinin L* değerleri sırasıyla, 46,9, 35,5 ve 76,6 olarak analiz edilmiştir. Kontrol numunesinin L* değeri ise 78,5 olarak bulunmuştur. Buna göre çörek otunun ve üzüm çekirdeğinin kontrol numunesine göre daha koyu olduğu ancak kabak çekirdeğinin kontrol numunesine benzer koyulukta olduğu söylenebilir.

Tablo 35. Glutensiz ekmeğin renk parametreleri (BC: çörek otu; GS: üzüm çekirdeği; PS: kabak çekirdeği).

| Glikolizasyon | | | | TGase | | |
|---------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Numune | L* | a* | b* | L* | a* | b* |
| Kontrol | 76,84±0,40 | -1,47±0,07 | 10±0,02 | 78,59±0,60 | -1,43±0,14 | 9,89±0,18 |
| BC | 39,89±0,22 | 7,68±0,61 | 22,55±0,71 | 46,9±0,14 | 3,56±0,61 | 11,69±0,43 |
| GS | 24,90±0,14 | 18,85±0,21 | 17,26±0,00 | 35,5±0,70 | 18,77±0,74 | 16,89±0,94 |
| PS | 53,57±0,01 | 11,08±0,70 | 32,10±0,71 | 76,6±0,57 | -1,10±0,13 | 15,65±0,91 |

İki replikasyonun ortalama değeri ± standart sapma.

4.9 Elde edilen proteinlerin proteomik analizi ve muhtemel biyoaktivitelerinin incelenmesi

Bu projede elde edilen bitkisel proteinlerin temel proteomik karakteristiklerinin anlaşılması ve bu proteinlerden elde edilebilecek muhtemel fonksiyonel gıda bileşenlerinin belirlenmesi amacıyla proje desteğine ek olarak kurumumuzun (İZÜ) analizler için hizmet alımı desteği ile bir dizi çalışma yürütülmüştür.

Özellikle ülkemiz açısından önemli olabilecek fındık proteinleri ile ilgili çalışmalar projenin sürdürülebilirliği açısından yürütülmüştür. Bu numunelerle ilgili temel bulgular ve yayın için gönderilmiş bulunan makale taslakları Ek 3-5 arasında sunulmaktadır. Ek 3 2D-

elektroforez başta olmak üzere bazı temel proteomik dataları, Ek 4 fındık proteinlerinin muhtemel biyoaktivitelerinin incelenmesi bağlamında yapılan *in silico* çalışmaları özetleyen bir makaleyi, son olarak Ek 5 fındık konsantrelerinden elde edilen hidrolizatların *in vitro* biyoaktivitelerinin incelenmesini içermektedir. Ek 4 makalesi, 21 Temmuz 2017 tarihinde “Turkish Journal of Biochemistry” dergisine gönderilmiştir. Benzer şekilde, Ek 5 makalesi 8 Ağustos 2017 tarihinde editörlerin görüşüne başvurmak düşüncesiyle “Springer Transfer Desk” gönderim aracına yüklenmiştir.

Proje ekibimizin bitkisel proteinler alanındaki çalışmaları özellikle biyoaktivite alanında genişleyerek sürecektir. Bu bağlamda Türk toplumuna hizmet edebilecek yenilikçi fonksiyonel gıda formülasyonlarının özellikle toplumun başlıca sağlık sorunlarından olan kalp ve dolaşım sistemi hastalıkları ve çeşitli kanserlere karşı koruyucu etki geliştirmesi hedeflenmektedir. Böylelikle hem toplumumuzun genel sağlığına katkıda bulunmak, hem de ulusal ham maddeleri katma değerlendirmek mümkün olacaktır.

5. TARTIŞMA/SONUÇ

Bu çalışmada endüstriyel yan ürünler üretilerek katma değerli protein ürünleri ortaya konulmuştur. Öncelikle bu ürünlerin temel karakterizasyonu yapılmış; bir sonraki aşamada fonksiyonellikleri değerlendirilmiş ve fonksiyonel özelliklerin geliştirilmesi için uygun tekniklerden (Maillard tepkimeleri ve TGase enzimi muamelesi) yararlanılmıştır. Bazı durumlarda bu muamelelerin proteinlerin teknik özelliklerini olumlu etkilediği, bazı durumlarda ise olumsuz sonuçların ortaya çıktığı anlaşılmaktadır. Soğuk pres posaları doğaları gereği bir miktar yağ içermekte ve bu yağ molekülleri organik ekstraksiyon yapılmadan (yani, sadece sulu çözeltilerle) uzaklaştırılamamaktadır. Hegzan muamelesi proteinlerin denatürasyonuna sebep vermekle birlikte çözünürlük, emülsiyon ve köpük oluşturma kapasitesi gibi fonksiyonel özellikleri olumlu etkilediği anlaşılmaktadır. Dolayısıyla bu çalışmada protein içerikleri, ekstraksiyon yöntemleri, kaynakları, teknik özellikleri gibi birçok alanda farklılık arz eden protein konsantreleri hazırlanmış ve gıda uygulamalarına uygun duruma getirilmiştir.

Son bölümde ise söz konusu konsantrelerle birlikte iyileştirilmiş formları da ekme formülasyonlarında (normal ekme ve glutensiz ekme) değerlendirilmiştir. Ekmeklerin fizikokimyasal özellikleri, morfolojileri, fermantasyon kararlılıkları incelenmiştir. Yine uygun koşullar altında konsantreler ve iyileştirilmiş hallerinin kullanımı ekme ürünlerinin tüketilebilirliğini olumlu etkilemiştir. Bu çalışmalar Polen Gıda tesislerinde yürütülmüştür. Kendileri ile ortak çalışmalar halen sürdürülmekte olup ekmeklerin yanında kek ve diğer unlu mamul formülasyonlarında bitkisel proteinlerin kullanılması hedeflenmektedir. Bu bağlamda

hem ürünlerin protein içeriğinin, hem de yeme/tüketme kalitelerinin (hacim, gevreklik vb) iyileştirilmesi hedeflenmektedir. Bazı gelişmeler kaydedilmiş olmakla birlikte çalışmalar sürdürülmektedir. Bu bağlamda Polen Gıda ile ortak çalışmalar için arayışlar sürdürülmektedir. Kısa ve orta vadede bu alanda yeni projeler kurgulanması tasarlanmaktadır.

Proje bulguları arasında 2 adet uluslararası konferans sunumu sayılabilir. Son dönemde çörek otu proteinlerinin özellikleri (EK 1) ve bunların Maillard konjugasyonu konularında (EK 2) 2 makale tamamlanmış ve SCI dergilerine gönderilmiştir. Bunun dışında, diğer proteinler ve bunların özelliklerinin iyileştirilmesi ile bütün protein numunelerinin ekmek denemelerinde değerlendirilmesi alanlarında bir dizi yeni yayının kısa ve orta vadede tamamlanması planlanmaktadır. Proje bursiyeri Özgenur Özdemir'in MS tezi de proje desteği ile tamamlanmak üzeredir. Kendisinin Güz 2017 akademik yarıyılında tezini bitirmesi hedeflenmektedir. Buna ek olarak, önceki kısımlarda da belirtildiği gibi Harun Sami Çiftçi'nin MS tezine de proje yürütücüsü 2. Danışman olarak destek vermiştir (NKÜ). Her iki tezin tamamlandığı noktada TÜBİTAK desteği tezlerde belirtilecektir.

Projenin sürdürülebilirliğinin sağlanması ve katma değerli ve fizyolojik fonksiyonelliği olan protein bileşenleri (özellikle biyoaktif peptitler) üretilmesi alanında çalışmalar sürdürülmektedir (Ek 3-5). Proje bulguları bu anlamda da proje ekibinin önünü açmış ve birçok yeni projenin hazırlanması için gerekli zemini hazırlamıştır.

Referanslar

1. Ali, F., Ippersiel, D., Lamarche, F., Mondor, M. 2010. "Characterization of low-phytate soy protein isolates produced by membrane technologies", *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 162–168.
2. Amza, T., Amadou, I., Balla, A., Zhou, H. 2014. "Antioxidant capacity of hydrolyzed protein fractions obtained from an under-explored seed protein: gingerbread plum (*Neocarya macrophylla*)", *Journal of Food Science and Technology*, Online Yayın.
3. Anonim, 2003. "Nitrogen. Determination in foods and feeds according to Kjeldahl", *Nordic Committee on Food Analysis*, No:6, 4th ed., 8 sayfa.
4. Anonim, 2004a. "Gıda ve hayvan yem maddeleri - *Clostridium perfringens*'in sayımı için yatay yöntem - Koloni sayım yöntemi", TS EN ISO 7937, Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
5. Anonim, 2004b. "Mikrobiyoloji - Gıda ve hayvan yemleri - Mikroorganizmaların sayımı için yatay yöntem - 30°C'ta koloni sayım tekniği", TS 7703 EN ISO 4833, Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
6. Anonim, 2006. Mikrobiyoloji- *Bacillus cereus* sayımı için genel kurallar-Koloni sayım tekniği (30 C'da)", TS EN ISO 7932, Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
7. Anonim, 2007. "Tahıllar-Düşme sayısının tayini", TS EN ISO 3093, Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.

8. Anonim, 2008a. “Buğday ve buğday unu - Gluten içeriği - Bölüm 1: Elle yıkama metodu ile yaş gluten tayini”, TS EN ISO 21415-1, Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
9. Anonim, 2008b. “Buğday ve buğday unu - Gluten içeriği - Bölüm 2: Mekanik yöntemle yaş gluten tayini, yaş gluten ve gluten indeksi”, TS EN ISO 21415-2, Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
10. Anonim, 2008c. “Buğday ve buğday unu - Gluten içeriği - Bölüm 4: Hızlı kurutma metodu ile yaş glutenden kuru gluten tayini”, TS EN ISO 21415-4, Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
11. Anonim, 2008d. “Gıda ve hayvan yemleri mikrobiyolojisi-Deney numunelerinin, başlangıç süspansiyonunun ve ondalık seyreltilerin mikrobiyolojik muayene için hazırlanması: Bölüm 2 Et ve et ürünlerinin hazırlanması için kurallar”, TS EN ISO6887-2. Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
12. Anonim, 2010a. “Buğday unu, unda renk”, TS 4500, Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
13. Anonim, 2010b. “Tahıl ve tahıl ürünleri-Rutubet muhtevası tayini- Referans yöntem”, Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
14. Anonim, 2010c. “Ekmek 300 gr”, TS 5000, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
15. Anonim, 2010d. “Buğday- Sedimentasyon endeksi tayini- Zeleny deneyi”, TS EN ISO 5529, Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
16. Anonim, 2012a. “Tahıllar - Nem ve protein tayini - Bütün tanelerde yakın - Infrared - Spektroskopi kullanma metodu”, TS EN 15948, Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
17. Anonim, 2012b. “Tahıl ve tahıl ürünleri-Rutubet muhtevası tayini- Referans yöntem”, TS EN ISO 712, Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
18. Anonim, 2012c. “Gıda ve hayvan yemleri mikrobiyolojisi-Beta-Glucuronidase-Positive *Escherichia coli*'nin sayımı için yatay yöntem-Bölüm 1: 5-Bromo-4-Chloro-3-İndolyl beta-D-Glucuronide kullanılarak muhtemel sayı yöntemi”, TS ISO/TS 16649-3:2005, Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
19. Anonim, 2013a. “Tahıllar, baklagiller ve yan ürünleri - Yakılarak kül muhtevasının tayini”, TS EN ISO 2171, Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
20. Anonim, 2013b. “Buğday, çavdar ve bunların unları, durum buğdayı ve durum buğdayı irmiği - Hagberg - Pertene göre düşme sayısının tayini”, TS EN ISO 3093, Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
21. Anonim, 2013c. “Tahıllar ve öğütülmüş tahıl ürünleri- Toplam kül muhtevası tayini”, TS EN ISO 2171: 2013, Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
22. Anonim, 2013d. “TÜRK GIDA KODEKSİ BUĞDAY UNU TEBLİĞİ”, TEBLİĞ NO: 2013/9, Ankara: T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı.
23. Anonim, 2014a. “Hububat ve baklagiller - Azot muhtevasının tayini ve ham protein muhtevasının hesaplanması - Kjeldahl yöntemi”, TS EN ISO 20483, Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
24. Anonim, 2014b. “Gıda ve hayvan yemleri mikrobiyolojisi - maya ve küflerin sayımı için yatay yöntem - bölüm 1: su aktivitesi 0,95'ten yüksek olan ürünlerde koloni sayım tekniği, 1.Baskı, TS ISO 21527-1, Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
25. Anonim, 2015a. “Buğday unu- hamurun fiziksel karakteristikleri, bölüm 1: farinograf kullanılarak su absorpsiyonunun ve reolojik özelliklerinin tayini”, TS EN ISO 5530-1, Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
26. Anonim, 2015b. “Buğday unu- Hamurun fiziksel karakteristikleri, bölüm 2: Ekstensograf kullanılarak reolojik özelliklerin tayini”, TS EN ISO 5530-2, Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
27. Barbut, S. 1996. “Water and fat holding”. *In* Methods of testing protein functionality. s187-225. Editör: G.M. Hall, Londra, İngiltere: Chapman & Hall.
28. Berghout, J.A.M., Boom, R.M., van der Goot, A.J. 2014. “The potential of aqueous fractionation of lupin seeds for high-protein foods”, Food Chemistry, 59, 64-70.

29. Bligh, E.G., Dyer, W. J. 1959. "A rapid method of total lipid extraction and purification", *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37,911-917.
30. Boye, J.I., Aksay, S., Roufik, S., Ribereau, S., Mondor, M., Farnworth, E., Rjamohamed, S.H. 2010. "Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques", *Food Research International*, 43(2), 537-546.
31. Bönisch, M.P., Heidebach, T.C., Kulozik, U. 2008. "Influence of transglutaminase protein cross-linking on the rennet coagulation of casein", *Food Hydrocolloids*, 22, 288–297.
32. Buran, T.J., Sandhu, A.K., Li, Z., Rock, C.R., Yang, W.W., Gu, L. 2014. "Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins and polyphenols from blueberries using macroporous adsorbent resins", *Journal of Food Engineering*, 128, 167-173.
33. Chabanon, G., Chevalot, I., Framboisier, X., Chenu, S., Marc, I. 2007. "Hydrolysis of rapeseed protein isolates: kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates", *Process Biochemistry*, 42, 1419-1428.
34. Çakmak, H., Altinel B., Kumcuoglu S., Tavman Ş. 2013. "Chicken meat added bread formulation for protein enrichment", *Food & Feed Research*, 40 (1), 33-42.
35. Çalışır, S., Haciseferoğulları, H., Özcan, M., Arslan, D. 2005. "Some nutritional and technological properties of wild plum (*Prunus* spp.) fruits in Turkey", *Journal of Food Engineering*, 66, 233-237.
36. Damodaran, S. 1996. "Amino acids, peptides, and proteins", *Food Chemistry*. Ed. O. R. Fennema. New York, NY, ABD: Marcel Dekker, Inc.
37. Damodaran, S., Xu, S. Q. 1996. "The role of electrostatic forces in anomalous adsorption behavior of phosvitin at the air/water interface", *Journal of Colloid and Interface Science*, 178(2), 426-435.
38. Daufin, G., Escudier, J.P., Carrera, H., Bérot, S., Filaudeau, L., Decloux, M. 2001. Recent and emerging applications of membrane processes in the food and dairy industry, *Transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part C*, 79, 89-102.
39. Demirci, M. 2012. *Gıda Kimyası, Kişisel Yayın: İstanbul*.
40. Deng J., Sun T., Cao W., Fan D., Chen N., Wang B., Gao H. and Yang H. (2013). Extraction, optimization and functional properties of proteins from kiwi fruit (*Actinidia chinensis* Planch.) seeds. *International Journal of Food Properties*, 17:1612–1625, 2014.
41. Dickinson, E. 1992. "An introduction to food colloids", Oxford, İngiltere: Oxford University Press.
42. Dickinson, E. 1999. "Adsorbed protein layers at fluid interfaces: interactions, structure and surface rheology", *Colloids and Surfaces B- Biointerfaces*, 15, 161-176.
43. Gallagher, E., Gormley, T.R., Arendt, E.K. 2004. "Recent advances in the formulation of gluten-free cereal based products", *Trends Food Science and Technology*, 15(3), 143-152.
44. Gaonkar, A.O. 1991. "Surface and interfacial activities and emulsion characteristics of some food hydrocolloids", *Food Hydrocolloids*, 5, 329-337.
45. Guan, Y. G., Lin, H., Han, Z., Wang, J., Yu, S. J., Zeng, X. A., Liu, Y. Y., Xu, C. H., Sun, W. W. (2010). Effects of pulsed electric field treatment on a bovine serum albumin–dextran model system, a means of promoting the Maillard reaction. *Food Chem.* 123(2):275–280.
46. Guichard, E. 2006. "Flavour retention and release from protein solutions", *Biotechnology Advances*, 24(2), 226-229.
47. Guichard, E., Langourieux, S. 2000. "Interactions between beta-lactoglobulin and flavour compounds", *Food Chemistry*, 71(3), 301-308.

48. Gunasekaran, S., Ko, S., Xiao, L. 2007. "Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications", *Journal of Food Engineering*, 83, 31-40.
49. Gülseren, İ., Alexander, M., Corredig, M. 2010. "Probing the colloidal properties of skim milk using acoustic and electroacoustic spectroscopy. Effect of concentration, heating and acidification", *Journal of Colloid and Interface Science*, 351(2), 493-500.
50. Gülseren, İ., Corredig, M. 2012. "Interactions at the interface between hydrophobic and hydrophilic emulsifiers: polyglycerol polyricinoleate (PGPR) and milk proteins, studied by drop shape tensiometry", *Food Hydrocolloids*, 29, 193-198.
51. Gülseren, İ., Corredig, M. 2013. "Interactions of chitin nanocrystals with beta-lactoglobulin at the oil-water interface, studied by drop shape tensiometry", *Colloids & Surfaces B*, 111, 672-679.
52. Gülseren, İ., Guri, A., Corredig, M. 2012. "Encapsulation of tea polyphenols in nanoliposomes prepared with milk phospholipids and their effect on the viability of HT-29 human carcinoma cells", *Food Digestion*, 3, 36-45.
53. Gülseren, İ., Guzey, D., Bruce, B. D., Weiss, J. 2007. "Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions", *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(2), 173-183.
54. Haq A., Remo N., Al-Sedairy S.T. (1996). Fractionation of black seed (*Nigella sativa* Linn) proteins by using rotofor. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 19(4), 593-599.
55. Herceg, Z., Lelas, V. 2005. "The influence of temperature and solid matter content on the viscosity of whey protein concentrates and skim milk powder before and after tribomechanical treatment", *Journal of Food Engineering*, 66(4), 433-438.
56. Higgins, T.J.V. 1984. "Synthesis and regulation of major proteins in seeds", *Annual Review of Plant Physiology*, 35, 191-221.
57. Jaros, D., Partschefeld, C., Henle, T., Rohm, H. 2006. "Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications", *Journal of Texture Studies*, 37, 113-155.
58. Kamel, B.S., Kakuda, Y. 1992. "Characterization of the seed oil and meal from apricot, cherry, nectarine, peach and plum", *Journal of American Oil Chemists' Society*, 69(5), 492-494.
59. Kamel, B.S., Dawson, H., Kakuda, Y. 1985. "Characteristics and composition of melon and grape seed oils and cakes", *Journal of American Oil Chemists' Society*, 62(5), 881-883.
60. Karaca, A.C., Low, N., Nickerson, M. 2011. "Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction", *Food Research International*, 44, 2742-2750.
61. Kinsella, J. E. 1984. "Milk proteins- physicochemical and functional properties", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 21(3), 197-262.
62. Laemmli, U.K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, 227, 680-685.
63. Lertittikul, Wittayachai, Benjakul, Sottawat, & Tanaka, Munehiko (2007). Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-glucose model system as influenced by pH. *Food Chemistry*, 100(2), 669-677
64. Lucassen-Reynders, E.H., Cagna, A., Lucassen, J. 2001. "Gibbs elasticity, surface dilational modulus and diffusional relaxation in nonionic surfactant monolayers", *Colloids and Surfaces A*, 186, 63-72.
65. Ludorff, W., Meyer, V. 1973. *Fische und Fischerzeugnisse*. Berlin ve Hamburg, Almanya: Verlag Paul Parey.
66. Matissek, R., Schnepel, F.M., Steiner, G. 1989. *Lebensmittelanalytik. Grundzüge, Methoden, Anwendungen*. Berlin/Heidelberg, Almanya: Springer-Verlag.

67. McCarthy, A.L., O'Callaghan, Y.C., O'Brien, N.M. 2013. "Protein hydrolysates from agricultural crops- bioactivity and potential for functional food development", *Agriculture*, 3, 112-130.
68. McClements, D.J. 2005. "Food emulsions", 2nd ed. CRC Press: Baton Rouge, FL, ABD.
69. Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T. vd. 2014. "A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus", *Food & Function*, 5, 1113-24.
70. Mleko, S., Gustaw, W. 2002. "Rheological changes due to substitution of total milk proteins by whey proteins in dairy desert", *Journal of Food Science and Technology*, 39(2), 170-172.
71. Mohanty, B., Mulvihill, D.M., Fox, P.F. 1988. "Hydration-related properties of caseins at pH 2.0-3.0", *Food Chemistry*, 27(28), 225-236.
72. Moure, A., Sineiro, J., Dominguez, H., Parajo, J.C. 2006. "Functionality of oilseed protein products: a review", *Food Research International*, 39, 945-963.
73. Nakai, S., Modler, H. W. 1996. "Food Proteins: properties and characterization", New York, NY, ABD: VCH Publishers.
74. Özcan, T., Delikanlı, B. 2011. "Gıdaların tekstürel özelliklerinin geliştirilmesinde peynir altı suyu protein katkılarının fonksiyonel etkileri", *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25 (2), 77-88.
75. Pearce, K.N., Kinsella, J.E., 1978. "Emulsifying properties of proteins: evaluation of turbidimetric technique", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 716-723.
76. Phillips, L. G., Whitehead, D.M., Kinsella, J. 1994. "Structure-function properties of food proteins". San Diego, CA, ABD: Academic Press.
77. Pickardt, C., Eisner, P., Kammerer, D.R., Carle, R. 2015. "Pilot plant preparation of light-coloured protein isolates from de-oiled sunflower (*Helianthus annuus* L.) press cake by mild-acidic protein extraction and polyphenol adsorption", *Food Hydrocolloids*, 44, 208-219.
78. Pimentel, D., Pimentel, M. 2003. "Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment", *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3), 660S-663S.
79. Quanhong, L., Caili, F. 2005. "Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein", *Food Chemistry*, 92, 701-706.
80. Rui, X., Boye, J.I., Ribereau, S., Simpson, B.K., Prasher, S.O. 2014. "Comparative study of the composition and thermal properties of protein isolates prepared from nine *Phaseolus vulgaris* legume varieties", *Food Research International*, 44, 2497-2504.
81. Sathe, S.K., Salunkhe, D.K. 1981. "Functional properties of great northern bean (*Phaseolus vulgaris*) proteins: Emulsion, foaming, viscosity and gelation properties", *Journal of Food Science*, 46, 71-75.
82. Schutyser, M.A.I., van der Goot, A.J. 2011. "The potential of dry fractionation processes for sustainable plant protein production", *Trends in Food Science & Technology*, 22, 154-164.
83. Shewry, P.R., Napier, J.A., Tatham, A.S. 1995. "Seed storage proteins: structures and biosynthesis", *The Plant Cell*, 7, 945-956.
84. Solorio, L., Zwolinski, C., Lund, A.W., Farrell, M.J., Stegemann, J.P. 2010. "Gelatin microspheres crosslinked with genipin for local delivery of growth factors", *Journal of Tissue Engineering & Regenerative Medicine*, 4(7), 514-523.
85. Storck, C.R., Zavareze, E.R., Gularte M.A., Elias M.C., Rosell, C.M., Dias, A.R.G. 2013. "Protein enrichment and its effects on gluten-free bread characteristics", *LWT - Food Science and Technology*, 53, 346-354.

86. Stone, A.K., Karalash, A., Tyler, R.T., Warkentin, T.D., Nickerson, M.T. 2014. "Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars", Food Research International, Online yayın.
87. Strauss, G., Gibson, S.M. 2004. "Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients", Food Hydrocolloids, 18, 81–89.
88. Suzuki S., and Tsumura, N. (1972). Isomerization of glucose to fructose. Japan Agricultural Research Quarterly, JARQ, 6(4), 245-248.
89. Sze-Tao, K.W.C., Sathe, S.K. 2000. "Functional properties and in vitro digestibility of almond (*Prunus dulcis* L.) protein isolate", Food Chemistry, 69, 153-160.
90. Taha F. S., Attia M., Shehata N. A. 1982. "Protein enrichment of bread: I. Chemical and sensory evaluation", European Journal of Nutrition, 21 (1), 77-82.
91. Tsaliki, E., Pegiadou, S., Doxastakis, G. (2004). "Evaluation of the emulsifying properties of cottonseed protein isolates", Food Hydrocolloids, 18, 631-637.
92. Udenigwe, C.U., Lu, Y.L., Han, C.H, Hou, W.C., Aluko, R.E. 2009. "Flaxseed protein-derived peptide fractions: antioxidant properties and inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophages", Food Chemistry, 116, 277-284.
93. Villanueva, A., Vioque, J., Sanchez-Vioque, R., Clemente, A., Bautista, J., Millan, F. 1999. "Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo- and exo-proteases", Grasas y Aceites, 50(6), 472-476.
94. Yalçın, E., Çelik, S., İbanoğlu, E. 2008. "Foaming properties of barley protein isolates and hydrolysates", European Food Research and Technology, 226, 967-974.
95. Zeeb, B., Beicht, J., Eisele, T., Gibis, M., Fischer, L., Weiss, J. 2013. "Transglutaminase-induced crosslinking of sodium caseinate stabilized oil droplets in oil-in-water emulsions", Food Research International, 54, 1712-21.
96. Zeeb, B., Fischer, L., Weiss, J. 2014. "Stabilization of food dispersions by enzymes", Food & Function, 5, 198-213.
97. Zeleny, L. 1971. "Criteria of wheat quality". In Wheat Chemistry -and Technology, Editör: Y. Pomeranz, St.Paul, MN, ABD: AACC.
- 98.

Ekler

Rapor ana metni içinde yer almayan şekil, makale ve diğer kısımlar, bu bölümde verilmiştir (EK 1-5). ARDEB-PTS'de bu dosyalar ek olarak yüklenmiştir.

Manuscript Details

| | |
|--------------------------|--|
| Manuscript number | FOODHYD_2017_1077 |
| Title | Influence of aqueous and organic extraction on the functionality of black cumin protein concentrates |
| Article type | Research paper |

Abstract

Cold press oils are value-added functional food components that are being increasingly produced globally. Due to the removal of oils from seeds, protein content in cold press deoiled seed meals substantially increase. Here, we made an attempt to manufacture seed protein concentrates from cold press meals of black cumin and studied the influence of aqueous and organic extraction conditions on the functionality of these concentrates. Using 3 different of aqueous protein isolation techniques (alkali extraction-isoelectric precipitation, salt extraction, and micellar precipitation), a variety of protein concentrates with a protein content range of approx. 54-90% were obtained. SDS-PAGE was utilized to determine the molecular weight distribution of black cumin proteins. Functional characteristics of the isolated proteins were investigated based on solubility, water and oil holding capacities, foaming and emulsion forming capacities, and dynamic surface tension analysis (i.e., drop shape tensiometry). The functional characteristics were compared to that of a commercial soy protein isolate. Deoiled meals contained 22.3% oil which was only slightly affected by aqueous protein extraction techniques, while protein concentration increased in all cases. Protein content in the meals was approx. 26.5% which increased to 57.7 and 65.8%, after aqueous (AE-IP) extraction and both aqueous (AE-IP) and hexane extraction, respectively. Solubility, WHC, OHC, emulsification and foam stabilization capacities were found to be improved by hexane extraction, whereas all the functional properties were found to be comparable or superior to soy protein isolate with the exception of water holding capacity. Black cumin proteins demonstrated considerable surface activity at the air-water interface. Surface tension was 37.6 mN.m⁻¹ for black cumin protein dispersion (0.1%) after 10,000 s of adsorption. Based on the current methodology, it could be feasible to manufacture black cumin protein concentrates both at lab and industrial scale.

| | |
|---|---|
| Keywords | Cold press meals; protein concentrates; black cumin; protein functionality; drop shape tensiometry. |
| Taxonomy | Analysis of Proteins, Proteins, Applied Sciences |
| Corresponding Author | İbrahim Gülseren |
| Corresponding Author's Institution | İstanbul S. Zaim University (IZU) |
| Order of Authors | Özgenur Özdemir, İbrahim Gülseren |
| Suggested reviewers | John Coupland, Jochen Weiss, Milena Corredig, Vural Gokmen |

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Submission Letter.doc [Cover Letter]

Highlights.docx [Highlights]

Graphical abstract.tif [Graphical Abstract]

Paper 1 - August 7-No Figs-IG.docx [Manuscript File]

Figure 1.tif [Figure]

Figure 2.tif [Figure]

Figure 3.tif [Figure]

Figure 4.tif [Figure]

Figure 5.tif [Figure]

Figure 6.tif [Figure]

Figure 7.tif [Figure]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.



İbrahim Gülseren, Assistant Professor
İstanbul S. Zaim University (İZÜ)
Dept. of Food Engineering
İstanbul, TURKEY
34303

E-mail: ibrahim.gulseren@izu.edu.tr
<http://akademik.izu.edu.tr/~ibrahim-gulseren>

Phone: +90 (212) 692-9619

Fax: +90 (212) 692-9758

07/08/2017

Prof. P.A. Williams

Materials and Analytical Science,
Glyndwr University, Plas Coch,
Mold Road, LL11 2AW, Wrexham, UK

Dear Prof. Williams:

It is with great pleasure that we submit a new manuscript titled “Influence of aqueous and organic extraction on the functionality of black cumin protein concentrates” coauthored by Özgenur Özdemir & İbrahim Gülseren. In this research, we attempted to prepare protein isolates from cold press deoiled meals of black cumin based on 3 different aqueous extraction methodologies with or without a further hexane extraction stage.

Physicochemical and functional characteristics of the protein isolates were evaluated. A wide range of protein concentrations (54-90%) were shown to be possible in the samples based on the techniques utilized. Although the functional properties of the concentrates were relatively poor after aqueous extraction, hexane treatment significantly enhanced the emulsification and foaming capabilities as well as water and oil holding capacities. Most of these properties as well as surface pressure generated by black cumin protein dispersions were superior or comparable to soy protein isolates in many cases. Samples were shown to perform significant surface activity as investigated by drop shape tensiometry in the presence or absence of hexane extraction.

Thank you very much in advance and we are looking forward to receiving the reviews and comments.

Best regards,
İbrahim Gülseren, Ph.D.

Highlights

Protein concentrates were prepared from cold press meals of black cumin.

A variety of protein isolates with a protein content range of 54-90% were obtained.

Functional properties of aqueous concentrates were relatively poorer.

After hexane extraction, most functional characteristics were superior to soy protein.



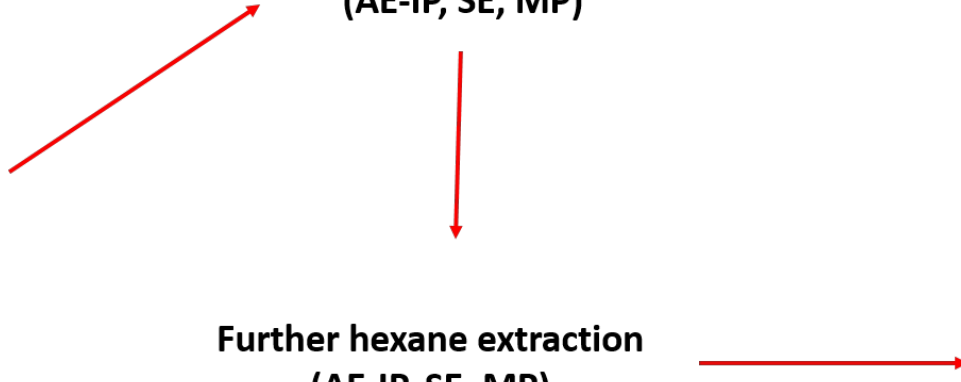
**Cold press deoiled black
cumin meals**

**Aqueous extraction
(AE-IP, SE, MP)**

**Relatively poor technical
functionality**

**Further hexane extraction
(AE-IP, SE, MP)**

**Most functionalities are
superior to commercial
soy protein isolate
including surface activity**



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

Influence of aqueous and organic extraction on the functionality of black cumin protein concentrates

Özgenur Özdemir & İbrahim Gülseren *

Department of Food Engineering, İstanbul Sabahattin Zaim University (İZÜ), Halkalı Campus, 34303, Küçükçekmece, İstanbul, TURKEY

***Corresponding author: E-mail: ibrahim.gulseren@izu.edu.tr**

Phone: +90 (212) 692-9619, Fax: +90 (212) 692-9758

Submitted to *Food Hydrocolloids*

August 7, 2017

26 **Abstract**

27 Cold press oils are value-added functional food components that are being increasingly
28 produced globally. Due to the removal of oils from seeds, protein content in cold press deoiled
29 seed meals substantially increase. Here, we made an attempt to manufacture seed protein
30 concentrates from cold press meals of black cumin and studied the influence of aqueous and
31 organic extraction conditions on the functionality of these concentrates. Using 3 different of
32 aqueous protein isolation techniques (alkali extraction-isoelectric precipitation, salt extraction,
33 and micellar precipitation), a variety of protein concentrates with a protein content range of
34 approx. 54-90% were obtained. SDS-PAGE was utilized to determine the molecular weight
35 distribution of black cumin proteins. Functional characteristics of the isolated proteins were
36 investigated based on solubility, water and oil holding capacities, foaming and emulsion
37 forming capacities, and dynamic surface tension analysis (i.e., drop shape tensiometry). The
38 functional characteristics were compared to that of a commercial soy protein isolate. Deoiled
39 meals contained 22.3% oil which was only slightly affected by aqueous protein extraction
40 techniques, while protein concentration increased in all cases. Protein content in the meals was
41 approx. 26.5% which increased to 57.7 and 65.8%, after aqueous (AE-IP) extraction and both
42 aqueous (AE-IP) and hexane extraction, respectively. Solubility, WHC, OHC, emulsification
43 and foam stabilization capacities were found to be improved by hexane extraction, whereas all
44 the functional properties were found to be comparable or superior to soy protein isolate with
45 the exception of water holding capacity. Black cumin proteins demonstrated considerable
46 surface activity at the air-water interface. Surface tension was 37.6 mN.m⁻¹ for black cumin
47 protein dispersion (0.1%) after 10,000 s of adsorption. Based on the current methodology, it
48 could be feasible to manufacture black cumin protein concentrates both at lab and industrial
49 scale.

50

51

52 **Key words:** Cold press meals; protein concentrates; black cumin; protein functionality;
53 drop shape tensiometry.

54

55

56

57

58

59

60 1. Introduction

61

62 Plant proteins represent an alternative source to animal proteins for utilization in food and other
63 commercial applications. Currently, there is a variety of globally available commercial plant
64 protein products primarily manufactured from legumes, cereals and oilseeds (Moure, Sineiro,
65 Dominguez, & Parajo, 2006). Due to the rapidly increasing global protein demand, the
66 exploration of alternative sources is necessary. The drawback of using plant proteins include
67 the sulfur amino acid deficiency of some plants and the presence of antinutritive agents in the
68 final products (Castriotta & Canella, 1978). However, supplementation with other proteins
69 could generally solve these problems (Moure et al. 2006). While cereals are generally deficient
70 in lysine and rich in methionine, pulses are poor in methionine but rich in lysine, which could
71 require complementarity between the two sets of products (Chardigny & Walrand, 2016).

72 Since the raw materials used in plant protein production are renewable and plant protein
73 demand of the food industry heavily consumes the commercially available plant proteins (Day,
74 2013), there is a potential to increase the market share for novel plant protein products.
75 Especially since only about 15% of plant proteins can be converted to animal proteins, plant
76 protein production generates sustainable protein production at reduced costs (Day, 2013).

77 Oilseeds contain considerably higher amounts of protein compared to cereals (Potter &
78 Hotchkiss, 1995) which renders them useful in protein manufacture. After the extraction of oil,
79 proteins are highly concentrated in the deoiled meals, and consequently plant protein
80 concentrates can be produced from these inexpensive by-products. Protein content could account
81 for up to 60% of the meals (Radha, Kumar, & Prakash, 2007). In 2004/2005 period, total protein
82 meal amount accounted up to 207 million metric tons globally (Ash & Dohlman, 2006) which
83 underlines the importance of their utilization. Soybeans, rapeseed, cottonseed, sunflower seed
84 and peanut meals were the most abundant protein meals in this period and accounted for 69%,
85 12.4%, 6.9%, 5.3% and 2.8%, respectively (Ash & Dohlman, 2006). In addition to economic
86 reasons, manufacture of seed protein products also bring in environmental advantages such as
87 the reduction of waste (Tekeli, 2014). Low cost protein sources are needed to replace the high
88 cost protein sources in animal feeds (Tekeli, 2014) and in foods.

89 Black cumin (*Nigella sativa*) is a valuable and annually flowering medicinal plant from
90 *Ranunculaceae* family (Baydar, 2009) which is native to the East Mediterranean countries,
91 South Europe and Asia Minor (Baytop, 1999; Baydar, 2009). Currently, black cumin is also
92 cultivated in the Middle East, North Africa and Asia (Durani, Chand, Zaka, Sultan, Khattak &

93 Durrani, 2007). According to Commodity Trade Statistics Database, the global consumption of
94 black cumin was estimated to be 187,000 tonnes. While the global market of spices and culinary
95 herbs is approximately worth more than \$2.8 billion, 2.8% of this budget is occupied by black
96 cumin. India cultivates more than 85% of the global production of black cumin, whereas
97 approximately 3.5% and 2.8% are generated by Syria and Turkey, respectively (Anon. 2014).

98 Black cumin seeds are composed of approximately 21% protein, 35% carbohydrates and
99 35 to 38% oil by weight (Baydar, 2009). Consequently, in the deoiled meal, protein content can
100 be anticipated to be >30%. Black cumin seed hydrolysates were previously shown to contain
101 15 different amino acids including 9 essential amino acids which render the seeds a valuable
102 amino acid/protein source (Haq, Remo, & Al-Sedairy, 1996; Babayan, Kootungal, & Halaby,
103 1978). Black cumin seeds can be utilized in medicinal applications and also used as spice or
104 nutritional supplements. Further utilization in industrial applications are unknown to our group.
105 Due to the difficulty of consuming black cumin seeds, protein products generated from this
106 valuable resource could increase its global consumption and its extent of manufacture in our
107 country and elsewhere.

108 Proteins are highly functional biomolecules both in the sense of technical and biological
109 functionality. The major functional properties of proteins are related to their hydration,
110 structural/rheological and interfacial/surface related characteristics. Once utilized in food
111 formulations, novel protein products will be anticipated to be compatible with other food
112 ingredients, demonstrate enzymatic and antioxidant activity in order to sufficiently replace
113 animal proteins (Siebert, 2003; Moure et al. 2006). Consequently functional properties such as
114 water and oil holding capacity, solubility, foam and emulsion formation capacity, and ability in
115 lowering surface/interfacial tension are usually monitored.

116 The aim of this study was to investigate the physicochemical and functional properties
117 of black cumin protein concentrates using multiple aqueous protein isolation methodologies
118 with or without the application of an organic extraction step. Since the information on black
119 cumin protein functionality is limited, the absence of an organic extraction step could enable
120 the preservation and further analysis of the structural attributes. The simple methodologies
121 utilized here are applicable to industrial settings and appropriate for the utilization of industrial
122 by-product streams in order to reduce costs in the processing of cold press valuable oils.

123

124

125 **2. Materials and Methods**

126 **2.1 Materials**

127 Cold press deoiled black cumin meals were generously donated by Oneva (Neva Foods
128 Ltd., İstanbul, Turkey), a local manufacturer of cold press oils. In all cases, the maximum
129 temperature observed by the cold press samples was lower than 40°C. All chemicals used were
130 of reagent grade and purchased from Sigma-Aldrich, except for sodium dodecyl sulfate (SDS)
131 which was purchased from Merck (Millipore Corp, Germany).

132

133 **2.2 Preparation of protein concentrates**

134 Three different aqueous extraction techniques were utilized in order to extract proteins
135 from the deoiled meals. In addition, solvent extraction was utilized to remove remaining black
136 cumin oil from the samples.

137 **2.2.1 Alkali extraction-isoelectric precipitation method**

138 Alkali extraction–isoelectric precipitation (AE-IP) technique was based on the
139 solubilization of protein molecules at basic pH, which was followed by the isoelectric
140 precipitation at acidic pH values. Protein concentrates from deoiled black cumin meals were
141 produced using the method of Boye et al. (2010) with slight modifications. Briefly, 50 g of
142 deoiled meal was dispersed in water (1:15, w/v) and the pH of the medium was adjusted to pH
143 9.5 using 1.0 N NaOH. The dispersions were stirred at 500 rpm for 1 h at 22±1°C. Immediately
144 afterwards, the dispersions were centrifuged at 13500xg for 15 min at 4 °C using a CR22N
145 high-speed refrigerated centrifuge (Hitachi Koki Co., Ltd., Tokyo, Japan). The supernatant
146 containing the solubilized proteins was collected and the medium pH was adjusted to pH 4.5 in
147 order to induce isoelectric precipitation. To ensure the completion of protein precipitation, the
148 supernatant was centrifuged under identical conditions as before. The pellet was collected and
149 immediately frozen at –20 °C. Frozen samples were lyophilized using a Teknosem TRS 2/2V
150 freeze drier (Teknosem Corp., İstanbul, Turkey).

151 **2.2.2 Salt extraction method**

152 Salt extraction (SE) methodology detailed in Liu et al. (2009) was used with slight
153 modifications. 50 g of deoiled meal was mixed with 500 ml of 0.1 M sodium phosphate buffer
154 (pH 8) containing 6.4% KCl. The dispersions were kept stirred (500 rpm, 1 h) at the ambient
155 temperature (22±1°C). Dissolved proteins were recovered by centrifugation at a rate of 13500xg

156 for 15 min at 4 °C. The supernatant was collected and diafiltered using a Sartorius Masterflex
157 Ultrafiltration System (10 kDa cutoff; Sartorius Sedium Biotech GmbH, Goettingen, Germany)
158 against deionized water, until the conductivity decreased to approx. 20 $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$. Immediately
159 afterwards, the extract was frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and kept frozen until lyophilization.

160 **2.2.3 Micellar precipitation method**

161 Micellar precipitation (MP) was performed according to the method of Lampart-
162 Szczapa (1996) with slight modifications. 50 g of deoiled meal was suspended in 500 ml of 1.0
163 N NaCl solution and kept stirred for 2 h at room temperature (500 rpm). The suspension was
164 centrifuged at 13500xg for 15 min at 4 °C. and the supernatant was diluted 10x with cold
165 deionized water (4 °C), which was followed by refrigerated storage (4 °C) for 18 h. Immediately
166 afterwards, the dispersion was centrifuged again under similar conditions. Finally, the pellet
167 was collected and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until lyophilization.

168 **2.2.4 Solvent extraction**

169 Soxhlet extraction system was used for the removal of black cumin oil from the samples
170 (Behr Labortechnik, R106S, Düsseldorf, Germany). Firstly, the samples were treated with
171 hexane (208752, Sigma-Aldrich Corp.) for 7 h at a sample to hexane ratio of 1:50. In order to
172 remove hexane, the samples were kept at 80°C overnight and dried at 55°C until constant weight
173 was reached. Consequently, all samples were subjected to basic physicochemical analysis and
174 functionality tests.

175

176 **2.3 Basic physicochemical analysis of the meals and protein concentrates**

177 The protein, moisture and ash contents of the raw material and the protein concentrate
178 were determined according to AOAC Official Methods 920.87 (%N \times 6.25), 925.10 and 923.03
179 respectively (AOAC, 2003). Fat content analysis were determined according to NMKL 960
180 (1968).

181

182 **2.4 Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)**

183 SDS-PAGE analysis was carried out based on the protocols of Laemmli (1970) under
184 reducing conditions using a Bio-Rad Mini Protean Tetra Cell System (Bio-Rad Laboratories
185 Inc., USA). Firstly, lyophilized protein concentrate (1%) were dispersed in deionized water.
186 Immediately afterwards, protein samples and 2x Laemmli loading buffer containing 0.004%

187 Bromophenol blue, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 4% SDS and 0.125 M Tris-HCl (pH
188 6.8) were mixed 1:1 in Eppendorf tubes (1.5 ml). Samples were heated 5 min at 100°C, cooled,
189 and loaded on a Mini-Protean TGX Stain-Free Precast Gel (12%). Precision Plus protein
190 standards from the same manufacturer were used as the reference sample (Catalog number;
191 161363). Gel electrophoresis was carried out for 45 min using Tris/Glycine/SDS running buffer
192 at 200 V (constant). Imaging was carried out by transferring the gel to a stain-free tray and
193 using Gel Doc EZ System. The images were analyzed using the Image Lab Software (Bio-Rad
194 Laboratories, Inc, USA).

195

196 **2.5 Functional properties of protein concentrate**

197 The functional attributes of the protein concentrates were tested and compared to that
198 of a commercial soy protein isolate under identical conditions (Jem Nutrimax, Sonic Biochem,
199 A Matlani Group Company, India).

200 **2.5.1 Solubility**

201 Protein solubility (%) was determined by dispersing 0.2 g protein (w/v) in 19 ml of 0.1
202 N NaCl solution, adjusting the pH to 7 using 0.5 N HCl or NaOH as necessary, and keeping the
203 dispersion stirred (500 rpm) for 1 h at 50°C. Total solution volume then was brought to 20.0 g
204 with 0.1 N NaCl. The mixtures were left to stand for 10 min to observe the extent of
205 precipitation. The solution was then centrifuged at 4200×g for 10 min at the ambient
206 temperature. Percent solubility was determined in the supernatant using an appropriate protein
207 analysis kit based on a modified Lowry method (TP0300, Sigma Aldrich Corp.). For all the
208 standards and samples, absorbance was measured at 750 nm.

209 **2.5.2 Water or oil holding capacity**

210 1 g protein isolate was added to 10 ml of distilled water (or oil) in a 15 ml centrifuge
211 tube. The contents were stirred for 30 s every 5 min on a vortex stirrer (Vortex, Genie 2-Mixer,
212 Scientific Industrial Inc., Bohemia, NY, USA) and after 30 min the tubes were centrifuged at
213 3000×g for 20 min at the ambient temperature. Once the free water or oil portion was
214 withdrawn, water/oil holding capacity was calculated from the percentage of increase in sample
215 weight due to water or oil holding (Tsaliki, Pegiadou, & Doxastakis, 2004).

216

217

218 **2.5.3 Emulsification activity**

219 Emulsification activity and emulsion stability (o/w) were determined based on the
220 method proposed by Pearce and Kinsella (1978) and Beuschel, Culbertson, Partridge, & Smith,
221 1992). 5 ml of protein concentrate dispersion (1%) at a defined pH value was utilized to
222 homogenize 15 ml soy oil (S7381, Sigma-Aldrich) using an ultrasonic homogenizer (Hielscher
223 Model UP200Ht; full power, 60 s, 1:1 pulse with 1 sec pulses) at the ambient temperature. A
224 small aliquot from the emulsions (80 µl) was diluted to 10 ml with 0.1% sodium dodecyl sulfate
225 (SDS) and sample absorbance was measured at 500 nm (Optima SB-3000 UV/VIS
226 spectrophotometer). Emulsion activity index (EAI) was calculated according to the method of
227 Karaca, Low, & Nickerson, 2011):

228

229
$$EAI(m^2/g) = \frac{2 \times 2.303 \times A_o \times N}{C \times \varphi \times 1000}$$

230

231 where, A_o is the absorbance of the diluted emulsion immediately after homogenization,
232 N is the dilution factor, c is the weight of protein per volume ($g \cdot mL^{-1}$), φ is the oil volume
233 fraction of the emulsion.

234 **2.5.4 Foaming capacity**

235 Foaming capacity of the black cumin protein concentrates and the stability of foams
236 prepared using these concentrates were determined according to the method of Sathe and
237 Salunkhe (1981). Briefly, 50 ml of 1% (w/v) protein isolate solution prepared at a defined pH
238 value was whipped for 3 min in a Waring lab blender (Model no: 8011ES, Waring Products
239 Division, Torrington, CT, USA) at “high stir” setting and then poured into a 100 ml graduated
240 cylinder. Immediately prior to the whipping, pH of protein solutions was adjusted to pH 7 using
241 0.1 N HCl or NaOH. Once total volume of the foam was studied, % increase in sample volume
242 was calculated based on the comparison of foam volumes at a given time and at $t=0$.

243 **2.5.5 Drop shape tensiometry**

244 The surface tension ($mN \cdot m^{-1}$) at the air-aqueous solution interface was determined using
245 drop shape tensiometry (25°C) (Biolin Scientific, Attension Theta, Espoo, Finland). An air
246 bubble was automatically formed at the tip of an inverted syringe which was immersed in a
247 quartz cuvette containing the protein dispersion (0.1%) prepared in 100 mM sodium phosphate

248 buffer (pH 7). The shape of the droplet was automatically analyzed to record the changes in the
249 surface tension over time, as the cuvette and syringe assembly were monitored by a CCD
250 (charge coupled device) camera and high quality image acquisition was utilized (Gülseren,
251 Güzey, Bruce, & Weiss, 2007). Surface tension was calculated based on the Young- Laplace
252 equation using Attension Theta OneAttension version 2.6 (r5305) software. All the
253 measurements were carried out in triplicate. The surface pressure (π) was calculated as the
254 difference in the surface tension of the buffer (72.3 mNm^{-1}) and the protein solution at the air-
255 water interface, as a function of time.

256

257 **3. Results and Discussion**

258 **3.1 Influence of extraction methodologies on protein concentrates**

259 Prior to all further analyses, deoiled cold press meals were analyzed for their
260 compositional characteristics. Protein, fat, ash and moisture contents (%) of black cumin meal
261 were found to be 26.5, 22.3, 7 and 6%, respectively. Using three different protein isolation
262 techniques (AE-IP, SE or MP), protein concentrates were prepared from the deoiled meals.
263 Consequently, protein, moisture and ash content of all samples were determined immediately
264 after freeze-drying (Table 1). Based on the AE-IP method, the protein contents of the
265 concentrate prepared from deoiled meals were 54.7% for black cumin concentrate (Table 1) in
266 the absence of hexane extraction. Consequently, the extent of improvement in the protein
267 contents of black cumin meals was approximately 107% after AE-IP processes. Solvent
268 extraction represented a further 20% improvement in protein content. In the case of SE method,
269 although the procedure was significantly more labor intensive and probably requires a more
270 advanced configuration in the case of an industrial scale-up, the extent of protein recovery was
271 considerably higher than AE-IP method (Table 1). For the SE processed black cumin meals,
272 protein concentration was as high as 67.8%.

273 Boye et al. (2010) reported that UF/DF process yielded protein concentrates with
274 slightly higher protein contents compared with the AE-IP process for pea, chickpea and lentil
275 protein concentrates. Studies conducted by Fuhrmeister and Meuser (2003) also found that
276 wrinkled pea concentrates prepared by ultrafiltration had higher protein content (70–80%) and
277 lower fat content (2.3%) than concentrates obtained by isoelectric precipitation (68% and 3.8%,
278 respectively). In our study for SE treated black cumin protein concentrates had higher protein
279 contents than AE-IP treated protein concentrates. For the MP treatment, the protein content was
280 the highest (approx. 85%), which was further increased to 90% after solvent extraction.

281 In most cases, the moisture and ash contents of the SE treated black cumin protein
282 concentrates had higher ash and moisture content than AE-IP and MP treated black cumin
283 protein concentrates, possibly due to the salt content in the system (Table 1). In addition, the
284 ash and moisture contents of the AE-IP samples were generally lower compared to the other
285 two methodologies which could imply that AE-IP was more efficient in the removal of fiber
286 and other non-protein hydrocolloids in the samples. Sosulski and McCurdy (1987) indicated
287 that strong alkali or acid used in isoelectric precipitation methods may result in salt formation
288 and a subsequent higher ash level in the protein isolate relative to the flour. Since no dialysis
289 was applied after the AE-IP treatment, this could lead to relatively higher ash contents in the
290 samples.

291 In all cases, aqueous extraction lead only to the removal of a small portion of oil in the
292 system, while the protein contents significantly increased with further deoiling (Table 1). The
293 influence of hexane extraction on moisture and ash contents was less clear.

294

295 **3.2 Molecular weight analysis of protein concentrate (SDS-PAGE)**

296 Molecular weight distribution of protein concentrates from black cumin seeds was
297 analyzed by SDS-PAGE before and after hexane extraction (Figure 1). First of all, the major
298 bands were found to lay between 15-40 kDa for the black cumin samples. For the oil extracted
299 AE-IP samples (Lane 1), there were also other faint bands between 10-15 kDa and >40 kDa.
300 To some extent, the major bands on the other two lanes (SE, MP) were comparable to the Lane
301 1 bands. In any case, it was obvious that the manufacturing methodologies affected the protein
302 composition in the concentrates. In addition to the fact that some bands did not appear in all
303 lanes, the thickness of the common bands were generally different as well. Previously Haq et
304 al. (1999) reported that *Nigella sativa* proteins ranged between 10-200 kDa. These investigators
305 further fractionated the proteins by Rotofor technology and mostly found the bands around 25,
306 40, 65 and 200 kDa. Since the major bands in the current study were located around 15 kDa
307 and 40 kDa in most cases, our findings are generally coherent with the previous findings.

308 After the oil extraction, especially for AE-IP samples broadening of the bands were
309 observed which could imply that broader bands could represent more hydrophobic proteins,
310 whereas the influence of solvent extraction on the variety of protein bands was mostly weak.
311 Meanwhile when the samples applied to Lane 5 were treated with hexane, smearing between

312 15 an 20 kDa clearly diminished (see Lane 2) possibly indicating the loss of more hydrophilic
313 proteins.

314

315 **3.3 Functionality of the protein concentrates**

316 Various functional properties of the protein concentrates were tested including
317 solubility, water and oil holding capacities, emulsification and foaming capacities, and surface
318 activity.

319 **3.3.1 Solubility**

320 Amino acid composition and the distribution of their hydrophilic/hydrophobic
321 characteristics throughout the protein molecules influence aqueous solubility of proteins.
322 Consequently protein solubility also has a bearing on the other functional properties such as
323 foam and emulsion formation, gelation and thickening in food dispersions (Damodaran, 1997).

324 Solubility (pH 7.0) characteristics of the current protein concentrates were presented
325 (Figure 2). Solvent extraction clearly increased protein solubility in all cases. Prior to solvent
326 extraction, AE-IP, SE and MP processed concentrates demonstrated approximately 12.1, 12.4
327 and 10.4% aqueous solubility, respectively, while after hexane extraction the numbers rose to
328 32.2%, 37% and 73%. In the previous literature, Karaca et al. (2011) reported that extraction
329 method significantly affected pea protein isolate solubility with AE-IP resulting in higher
330 solubility than SE, which was attributed to the differences in surface characteristics of the
331 proteins that were induced by each extraction method. For example, hydrophobic interactions
332 between proteins reduce the extent of solvent-protein interactions, which in turn lowers
333 solubility. Changes in solubility may also be attributed to conformational changes (Adebowale,
334 Schwarzenbolz, & Henle, 2011) and the stability/destabilization of the native structure
335 (Fuhrmeister & Meuser, 2003). The solubility of the current concentrate were higher than the
336 reference protein source (i.e., soy protein isolate) in all cases (4.13%). Stone et al. (2015) found
337 the solubility of soy protein as 14.9% upon 1% preparation at pH 7. However, functional
338 properties of soy isolates and sensitivity to various treatments differ due to processing
339 conditions, which affect the level of protein denaturation and solubilization.

340

341 **3.3.2 Water and oil holding capacities**

342 Water holding capacity (WHC) is among the most critical characteristics of food
343 proteins. A pronounced WHC inhibits the separation of water due to gravitational forces.

344 Environmental conditions as well as amino acid content and conformational characteristics of
345 proteins determine the interactions between water and proteins (Damodaran, 1997) which in
346 turn influence the sensory and textural attributes of foods (Lawal, 2004). Both the oil and water
347 absorption capacity of the proteins in the oilseed meals were shown to increase due to deoiling
348 of seeds (Moure et al. 2006). Water or oil holding capacity of proteins are defined as the amount
349 of water or oil that can be absorbed by 1 g of a certain protein product (Stone et al. 2015).

350 Water holding capacity (WHC) data for the current samples were presented on Figure
351 3. Once again, solvent extraction was shown to enhance the WHC of the protein concentrates.
352 Prior to solvent extraction AE-IP, SE and MP processed samples demonstrated WHC values of
353 119.2, 5.78 and 110 (g/100 g water), respectively, whereas after the extraction these values
354 increased to 131.3, 8.02 and 120.5 (g/100 g water). In all cases, soy protein concentrate had a
355 higher WHC than the current samples (202 g/100g water) (Figure 3). In various studies,
356 extraction technologies were shown to affect the WHC values of proteins (Sumner et al. 1981;
357 Adebawale et al. 2011; Paredes-Lopez et al. 1991). These authors attributed the higher WHC to
358 greater hydrogen bonding with water by side chains and polar groups exposed on the protein
359 by the micelle method, whereas the isoelectric technique resulted in protein structures that
360 limited the interaction of proteins with water. Proteins with higher amounts of hydrophilic
361 groups near the surface abide more water (Stone et al. 2015). Based on the moisture content
362 data (Table 2), it is likely that AE-IP black cumin samples contained little or no fibers or other
363 non-protein hydrocolloids. Their elevated WHC could be in part due to the presence of
364 hydrophilic glycoproteins.

365 The oil holding capacity (OHC) values for all samples are presented in Figure 4. Salt
366 extraction resulted in significantly ($p < 0.05$) higher OHC values than either AE-IP or MP
367 samples (Figure 4). Once again, extraction techniques were shown to have a bearing on the
368 OHC values of protein concentrates according to Sumner et al. (1981), Adebawale et al. (2011),
369 Abdel-Aal et al. (1986) and Paredes-Lopez et al. (1991). Furthermore, solvent extraction
370 enhanced OHC values in all cases (Figure 4). Prior to hexane extraction, OHC for AE-IP, SE
371 and MP samples were 162, 210 ve 194 (g/100 g oil), respectively. After hexane extraction, these
372 values increased to 232, 292 and 264 (g/100 g oil), while for the commercial soy protein isolate,
373 OHC was 119 (g/100 g oil). Consequently, OHC values of the current concentrates were higher
374 than the soy protein isolate in all cases. (Figure 4).

375

376

377 **3.3.3 Foaming capacity**

378 During foam formation, aqueous phases surround air droplets where air is the non-polar
379 phase. Theoretically, the amphiphilic character of proteins renders them as good foaming agents
380 and inhibits the coalescence of gas bubbles (Zhou et al. 2011). Foaming capacity (FC) is the
381 ability of a protein to form a stable foam under well-defined experimental conditions such as
382 pH, temperature, and ionic strength. The effect of extraction methods on the FC values of the
383 current samples is summarized in Figure 5. However, the FC values demonstrated a broad range
384 between 30-100% for black cumin protein concentrates which was clearly influenced by
385 extraction conditions. Prior to hexane extraction, the foam stabilizing capacities for AE-IP, SE
386 and MP samples were 60%, 40% and 30%, respectively. After the extraction, all of the foaming
387 capacity values significantly (Figure 5), all of which were once again higher than that of the
388 commercial soy protein isolate utilized here. Although a little higher, Deng et al. (2014)
389 determined the corresponding value for soybean protein samples as 20.23% at pH 7.5.
390 Consequently oil extraction enhanced the foaming capacity in all cases, which could be due to
391 the solvent induced and thermal denaturation of the proteins. These changes could also affect
392 the OHC and WHC values as well, as detailed above.

393 On Figure 5, foam stability was also demonstrated as a function of time. Stability of
394 foams was highly dependent both on the extraction method and over a storage duration of 2 h,
395 there was significant reduction in foam volume in all cases.

396 FC values of other plant protein products prepared from Indian chickpeas (Kaur &
397 Singh, 2007), winged beans (Sathe, Deshpande, & Salunkhe, 1982a), mucuna beans
398 (Adebowale & Lawal, 2003), lupin seeds (Sathe, Deshpande, & Salunkhe, 1982b), and pigeon
399 peas (Akintayo, Oshodi, & Esuoso, 1999) have been reported to range between 25-80%, which
400 were coherent with our current results for black cumin protein concentrates.

401

402 **3.3.4 Emulsification activity index and emulsion stability**

403 Proteins are the primary agents in the stabilization of food foams and emulsions due to
404 their abilities in lowering surface/interfacial tension, interfacial adsorption at the freshly formed
405 surfaces and the formation of a viscoelastic film at the interfaces (Graham & Philips, 1976;
406 Hettiarachchy & Ziegler, 1994; Damodaran, 1997).

407 Emulsification capacity (EC) may be defined as the ratio of the amount of oil that can
408 be emulsified by a certain amount of protein on a g per g basis. Based on EC values and the

409 physicochemical characteristics of the dispersed phases, emulsification activity index (EAI)
410 may be defined. EAI refers to the amount of surface area that can be stabilized by a certain
411 amount of protein ($\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$). Prior to hexane extraction, AE-IP, SE and MP samples had EAI
412 values of 4.2, 2.0, and 11 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$, respectively. While after the extraction the values increased
413 in all cases to 24.7, 21.6, and 25.3 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ (Figure 6).

414 In some studies, extraction method was found to affect the EAI values, for example, in
415 faba bean, chickpea and fenugreek protein concentrate (Abdel-Aal et al. 1986), whereas the
416 technique was not influential in pea protein concentrate (Karaca et al. 2011). Based on the data
417 obtained from pulse proteins, however, the current EAI values were comparable (Boye et al.
418 2010). Fuhrmeister and Meuser (2003) reported higher EAI values (10.1 - 27.4 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$) for
419 wrinkled pea protein concentrate prepared by ultrafiltration. Time dependence of EAI values
420 were also investigated throughout a brief storage period of 90 min. The emulsions formed with
421 the current protein concentrates were generally stable (data not shown). In most cases, the EAI
422 values of the current samples were higher than that of the commercial soy protein isolate (17.6
423 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$) (Figure 6).

424 All of the studies on OHC, WHC, emulsification and foaming characteristics were
425 carried out at a constant protein concentration of 1%. Some of the discrepancies between the
426 current samples and the literature data might be attributed to differences in concentrations, pH
427 and processing techniques.

428

429 **3.3.5 Drop shape tensiometry**

430 The surface tension at the air-protein solution surface was determined using drop shape
431 tensiometry (Figure 7). The surface tension values for black cumin protein concentrates (AE-
432 IP) before and after oil extraction were approximately 37.6 and 37.5 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ respectively, at a
433 protein concentration of 0.1% after 10,000 s. The surface pressure exerted by black cumin
434 proteins was superior to that of soy protein ($\gamma = 49 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) at the same protein concentration
435 after 10,000 s. Although the equilibrium values for the samples before and after hexane
436 extraction were comparable, hexane extracted sample reached to this level of surface pressure
437 sooner, which could imply both some differences in adsorption behavior as well as a further
438 concentration dependence of the plateau value. Interactions of the remaining oil in the system
439 in part might negatively increase the extent of interactions between the proteins and the air
440 phase. These findings demonstrated that the protein concentrates prepared here demonstrated

441 significant surface activity as also demonstrated by the functionality tests. Also, the size range
442 of the proteins investigated here (Figure 1) was mostly comparable to that of highly surface
443 active food proteins. To the best of our knowledge, there were no previous studies that
444 measured the surface tension for black cumin protein concentrates. Also, as the long term
445 kinetics of the black cumin protein concentrates were investigated (i.e., $\Delta\Pi$ vs $t^{0.5}$) (Gülseren
446 et al. 2007), maximum surface pressure values of 36.7 (AE-IP, no hexane extraction) and 35.8
447 (AE-IP, with hexane extraction) $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ were predicted for as t approached infinity.

448 The initial stages of protein adsorption are generally limited by diffusional
449 characteristics (Kozhevnikor, Danilenko, Braudo, & Schwenker, 2001). Following adsorption,
450 protein unfold and rearrange at the interfaces (MacRitchie, 1978; Graham and Phillips, 1979).
451 This process is characterized by the rapid increase in surface pressure. In order for surface
452 tension to reach the steady state, penetration, unfolding and molecular rearrangements in the
453 adsorbed film have to be completed (MacRitchie, 1978). In the previous literature, Tsoukala et
454 al. (2006) measured surface pressure for broad bean legumin protein dispersions (0.05% w.v⁻¹)
455 approx. 15 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ and for lupin protein isolate solutions (0.05% w.v⁻¹) approx. 22 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ at 10
456 min. Our results were comparable to these findings.

457

458 **4. Conclusions**

459 The global protein demand is constantly increasing which in turn requires a sustainable
460 supply. Cold press deoiled meals represent a viable and economic source of plant protein
461 manufacture. Here, we have shown that based on simple methodologies, it was possible to
462 generate a variety of concentrates from deoiled black cumin meals. Hexane extraction clearly
463 enhanced the functional characteristics in most cases, either due to the enhancement of protein-
464 solvent interactions in the absence of oil or the partial denaturation of the proteins. Aqueous
465 extraction with no heating or hexane extraction generated protein concentrates with relatively
466 poorer functional characteristics. With the exception of water holding capacity, all functional
467 properties of the hexane treated samples were found to be comparable or superior to the
468 commercial soy protein isolate sample utilized here.

469 Although the water holding characteristics were these proteins were relatively weak,
470 significant emulsion and foam formation capacities were shown to exist, which could be
471 instrumental in the production of many food products. Currently, we are also working on the

472 enhancement of protein functionality in the current samples as well as their potential bioactive
473 characteristics and their utilization in functional foods.

474

475 **Acknowledgements**

476 This study was funded by a grant from TÜBİTAK 3501 Programme (Grant No.
477 115O569; The Scientific and Technological Research Council of Turkey). The authors would
478 like to also express their gratitude to Neva Foods Ltd. (İstanbul, Turkey) for the donation of the
479 deoiled plant meals.

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505 **REFERENCES**

506

- 507 1. Abdel-Aal, E.M., Shehata, A.A., El-Mahdy, A.R., & Youssef, M.M. (1986).
508 Extractability and functional properties of some legume proteins isolated by three
509 different methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37, 553–559.
- 510 2. Adebowale, K.O., & Lawal, O.S. (2003). Foaming, gelation and electrophoretic
511 characteristics of mucuna bean (*Mucuna pruriens*) protein concentrate. *Food Chemistry*,
512 83, 237–246.
- 513 3. Adebowale, Y.A., Schwarzenbolz, U., & Henle, T. (2011). Protein concentrate from
514 Bambara groundnut (*Voandzeia subterranean* L.): chemical characterization and
515 functional properties. *International Journal of Food Properties*, 14, 758–775.
- 516 4. Akintayo, E. T., Oshodi, A. A., & Esuoso, K. O. (1999). Effect of ionic strength and pH
517 on the foaming and gelation of pigeon pea (*Cajanus cajan*) protein concentrates. *Food*
518 *Chemistry*, 66, 51–56.
- 519 5. Anon. (2014). Proposal for new work on Codex Standart for Brown/Black Cumin
520 (Whole and Ground), (prepared by India). Joint FAO/WHO Food Standards
521 Programme.
- 522 6. AOAC (2003). Official methods of analysis of AOAC International (17th ed.).
523 Gaithersburg, MD, USA: Association of Official Analytical Chemists Inc (Revision 2).
- 524 7. Ash, M., & Dohlman, E. (2006). Oil crops situation and outlook yearbook. Electronic
525 outlook report from the Economic Research Service, USDA.
- 526 8. Babayan, V.K., Kootungal, D., Halaby, G.A. (1978). Proximate analysis, fatty acid and
527 amino acid composition of *Nigella sativa* L. seeds. *Journal of Food Science*, 43(4),
528 1314-15.
- 529 9. Baydar, H. (2009). Science and technology of medicinal and aromatic plants (Expanded
530 3rd Ed.). Süleyman Demirel University, Faculty of Agriculture, Isparta, Turkey, Publ.,
531 No. 51: 227-228.
- 532 10. Baytop, T. (1999). Treatment with plants in Turkey. Past and present (Additional
533 Second Edition). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, Turkey.
- 534 11. Beuschel, B.C., Culbertson, J.D., Partridge, J.A., & Smith, D.M. (1992). Gelation and
535 emulsification properties of partially insolubilized whey protein concentrates. *Journal*
536 *of Food Science*, 57, 604- 609, 634.
- 537 12. Boye, J.I., Aksay, S., Roufik, S., Ribereau, S., Mondor, M., Farnworth E.,
538 Rajamohamed, S.H. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea

- 539 and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric
540 precipitation techniques. *Food Research International*, 43(2), 537–546.
- 541 **13.** Castriotta, G., & Canella, M. (1978). Protein classification and nitrogen extractability
542 of grape seed meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3), 763-765.
- 543 **14.** Chardigny, J.M., & Walrand, S. (2016). Plant protein for food: opportunities and
544 bottlenecks. *Oilseeds & Fats Crops and Lipids*, 23(4), D404.
- 545 **15.** Damodaran, S. (1997). Food proteins: An overview. In S. Damodaran & A. Paraf (Eds.),
546 Food proteins and their applications, New York: Marcel Dekker, pp 1-21.
- 547 **16.** Day L. (2013). Proteins from land plants e potential resources for human nutrition and
548 food security. *Trends in Food Science & Technology*, 32 (2013) 25-42.
- 549 **17.** Deng J., Sun T., Cao W., Fan D., Chen N., Wang B., Gao H. and Yang H. (2014).
550 Extraction, optimization and functional properties of proteins from kiwi fruit (*Actinidia*
551 *chinensis* Planch.) seeds. *International Journal of Food Properties*, 17, 1612–1625,
552 2014.
- 553 **18.** Durani, F.R., Chand N., Zaka K., Sultan A., Khattak F.M., & Durrani Z. (2007). Effect
554 of different levels of feed added black seed on the performance of broiler chicks.
555 *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(22), 4164–67.
- 556 **19.** Fuhrmeister, H., & Meuser, F. (2003). Impact of processing on functional properties of
557 protein products from wrinkled peas. *Journal of Food Engineering*, 56, 119–129.
- 558 **20.** Graham, D. E., & Philips, M. C. (1976). The conformation of proteins at the air–water
559 interface and their role in stabilizing foams. In R. J. Akers (Ed.). *Foams*, New York:
560 NY, USA, Academic Press.
- 561 **21.** Graham, D.E., Phillips, M.C. (1979). Proteins at liquid interfaces: I. Kinetics of
562 adsorption and surface denaturation. *Journal of Colloid & Interface Science*, 70, 403-
563 414.
- 564 **22.** Gülseren, İ., Güzey, D., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2007). Structural and functional
565 changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. *Ultrasonics*
566 *Sonochemistry*, 14(2), 173-183.
- 567 **23.** Haq A., Remo N., Al-Sedairy S.T. (1996). Fractionation of black seed (*Nigella sativa*
568 Linn) proteins by using rotofor. *Journal of Liquid Chromatography & Related*
569 *Technologies*, 19(4), 593-599.
- 570 **24.** Hettiarachchy, N.S., & Ziegler, G.R. (1994). Structure–function relationship of food
571 protein. In N. S. Hettiarachchy & G. R. Ziegler (Eds.), *Protein functionality in food*
572 *systems*, New York, NY, USA: Marcel Dekker.

- 573 25. Karaca, A.C., Low, N., & Nickerson, M. (2011). Emulsifying properties of chickpea,
574 faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt
575 extraction. *Food Research International*, 44, 2742-2750.
- 576 26. Kaur M., & Singh N. (2007). Characterization of protein concentrate from different
577 Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 102, 366–374.
- 578 27. Kozhevnikor, G.O., Danilenko, A.N., Braudo E.E., & Schwenker, K.D. (2001).
579 Comparative studies on thermodynamic characteristics of pea legumin and legumin-T
580 thermal denaturation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 29, 225-
581 236.
- 582 28. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head
583 of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- 584 29. Lampart-Szczapa, E. (1996). Preparation of protein from lupin seeds. *Nahrung*, 40, 71–
585 74.
- 586 30. Lawal, O.S. (2004). Functionality of African locust bean (*Parkia biglobossa*) protein
587 isolate: effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. *Food*
588 *Chemistry*, 86, 345–355.
- 589 31. Liu, S.H., Low N.H., & Nickerson, M.T. (2009). Effect of pH, salt, and biopolymer ratio
590 on the formation of pea protein isolate-gum Arabic complexes. *Journal of Agricultural*
591 *and Food Chemistry*, 57, 1521–26.
- 592 32. MacRitchie, F. (1978). Proteins at interfaces. *Advances in Protein Chemistry*, 32, 283-
593 326.
- 594 33. Moure, A., Sineiro, J., Dominguez, H., & Parajo, J.C. (2006). Functionality of oilseed
595 protein products: A review. *Food Research International*, 39, 945–963.
- 596 34. NMKL 960 (1968). Nordic committee on food analysis.
- 597 35. Paredes-Lopez, O., Ordorica-Falomir, C., & Olivares-Vazquez, M.R. (1991). Chickpea
598 protein concentrate: Physicochemical, functional and nutritional characterization.
599 *Journal of Food Science*, 56, 726–729.
- 600 36. Pearce, K. N., & Kinsella, J.E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of
601 a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 26, 716-723.
- 602 37. Potter N., & Hotchkiss J. (1995). Food science (5th ed.). *New York, NY, USA: Springer*
603 *Sciences Business Media* (Chapter 17).
- 604 38. Radha, C., Kumar, P.R., Prakash V. (2007). Preparation and characterization of a
605 protein hydrolysate from an oilseed flour mixture. *Food Chemistry*, 106, 1166-1174.

- 606 **39.** Sathe, S.K., Deshpande, S.S., & Salunkhe, D.K. (1982a). Functional properties of
607 winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* L. DC) proteins. *Journal of Food Science*,
608 47, 503–509.
- 609 **40.** Sathe, S.K., Deshpande, S.S., & Salunkhe, D.K. (1982b). Functional properties of lupin
610 seeds (*Lupinus mutabilis*) proteins and protein concentrates. *Journal of Food Science*,
611 47, 491–497, 499–500.
- 612 **41.** Sathe, S.K., & Salunkhe D.K. (1981). Functional properties of the Great Northern Bean
613 (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: emulsion, foaming, viscosity, and gelation properties.
614 *Journal of Food Science*, 46, 71-74.
- 615 **42.** Siebert, K.J. (2003). Modeling protein functional properties from amino acid
616 composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26),7792–97.
- 617 **43.** Sosulski, F.W., McCurdy A.R. (1987). Functionality of flours, protein fractions and
618 isolates from field peas and faba bean. *Journal of Food Science*, 52(4),1010–14.
- 619 **44.** Stone, A.K., Karalash, A., Tyler, R.T., Warkentin, T.D., Nickerson, M.T. (2015).
620 Functional attributes of pea protein concentrate prepared using different extraction
621 methods and cultivars. *Food Research International*, 76, 31–38.
- 622 **45.** Sumner, A.K., Nielson, M.A., & Youngs, C.G. (1981). Production and evaluation of
623 pea protein isolate. *Journal of Food Science*, 46, 364–372.
- 624 **46.** Tekeli, A. (2014). Nutritional value of black cumin (*Nigella sativa*) meal as an
625 alternative protein source in poultry nutrition. *Journal of Animal Science Advances*,
626 1(4), 797-806.
- 627 **47.** Tsaliki, E., Pegiadou, S., & Doxastakis G. (2004). Evaluation of the emulsifying
628 properties of cottonseed protein concentrate. *Food Hydrocolloids*, 18, 631-637.
- 629 **48.** Tsoukala, A., Papalamprou, E., Makri, E., Doxastakis, G., & Braudo, E.E. (2006).
630 Adsorption at the air–water interface and emulsification properties of grain legume
631 protein derivatives from pea and broad bean. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*,
632 53, 203–208.
- 633 **49.** Zhou, T., Zhang, T., Liu, W., & Zhao G. (2011). Physicochemical characteristics and
634 functional properties of grape (*Vitis vinifera* L.) seeds protein. *International Journal of*
635 *Food Science & Technology*, 46, 635–641.
- 636
637
638
639

640 **Figure Captions**

641 **Figure 1.** SDS-PAGE analysis of black cumin (lane numbers: 1-3 after hexane extraction AE-
642 IP, SE and MP, respectively; 4-6: before hexane extraction AE-IP, SE and MP, respectively)
643 protein concentrate dispersions (1%) manufactured by alkali extraction-isoelectric precipitation
644 (AE-IP), salt extraction (SE) or micellar precipitation (MP) methods.

645 **Figure 2.** Aqueous solubility (%) of black cumin protein concentrates prepared by alkali
646 extraction-isoelectric precipitation (AE-IP), salt extraction (SE), or micellar precipitation (MP)
647 before and after hexane extraction. The data represent the average of three independent
648 experiments with standard deviation. Data for soy protein isolate was added as a reference.

649 **Figure 3.** Water holding capacity (WHC) of black cumin protein concentrates prepared by
650 alkali extraction-isoelectric precipitation (AE-IP), salt extraction (SE) and micellar
651 precipitation (MP) before and after hexane extraction. The data represent the average of three
652 independent experiments with standard deviation. Data for soy protein isolate was added as a
653 reference.

654 **Figure 4.** Oil holding capacity (OHC) of black cumin protein concentrates prepared by alkali
655 extraction-isoelectric precipitation (AE-IP), salt extraction (SE) and micellar precipitation (MP)
656 before and after hexane extraction. The data represent the average of three independent
657 experiments with standard deviation. Data for soy protein isolate was added as a reference.

658 **Figure 5.** Foaming stability of black cumin protein concentrates prepared by **(A)** alkali
659 extraction-isoelectric precipitation (AE-IP), **(B)** salt extraction (SE) and **(C)** micellar
660 precipitation (MP) before and after hexane extraction. The data represent the average of three
661 independent experiments with standard deviation. Data for soy protein isolate was added as a
662 reference.

663 **Figure 6.** Emulsification activity index of black cumin concentrates prepared by alkali
664 extraction-isoelectric precipitation (AE-IP), salt extraction (SE) and micellar precipitation (MP)
665 before and after hexane extraction. The data represent the average of three independent
666 experiments with standard deviation. Data for soy protein isolate was added as a reference.

667 **Figure 7.** Dynamic surface tension of black cumin protein concentrates (0.1%) prepared by
668 alkali extraction-isoelectric precipitation (AE-IP) method as a function of time before and after
669 hexane extraction. A representative run was shown for each sample. Data for soy protein isolate
670 was added as a reference.

671

672

673

674

675

676

677

678

679 TABLES

680 **Table 1.** Protein (%), moisture (%) and ash (%) contents of deoiled black cumin meals and
 681 black cumin protein concentrates before or after hexane extraction. The data represent the
 682 average of three independent experiments and their corresponding standard deviation.

| Sample/Preparation Method | Solvent extraction | Protein Content (%) | Fat Content (%) | Moisture (%) | Ash (%) |
|----------------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------|---------------------|----------------|
| Soy protein isolate | - | 88.7±0.4 | | 4.64±0.1 | 6.61±0.1 |
| Deoiled meal | - | 26.47±0.1 | 22.3±0.5 | 6.03±0.8 | 7.04±0.7 |
| Deoiled meal | + | 37.04±0.1 | | 6.69±0.8 | 7.55±0.4 |
| AE-IP | - | 54.7±0.5 | 21.56±0.1 | 0.84±0.1 | 1.32±0.1 |
| AE-IP | + | 65.83±0.1 | | 6.87±0.3 | 4.32±0.4 |
| SE | - | 67.82±2.1 | 18.14±0.6 | 7.02±0.1 | 3.81±0.1 |
| SE | + | 72.83±0.6 | | 6.89±0.5 | 8.37±0.3 |
| MP | - | 85.49±2.9 | 18.24±0.4 | 9.56±0.2 | 1.85±0.8 |
| MP | + | 90.3±1.2 | | 2.26±0.88 | 3.5±0.6 |

683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

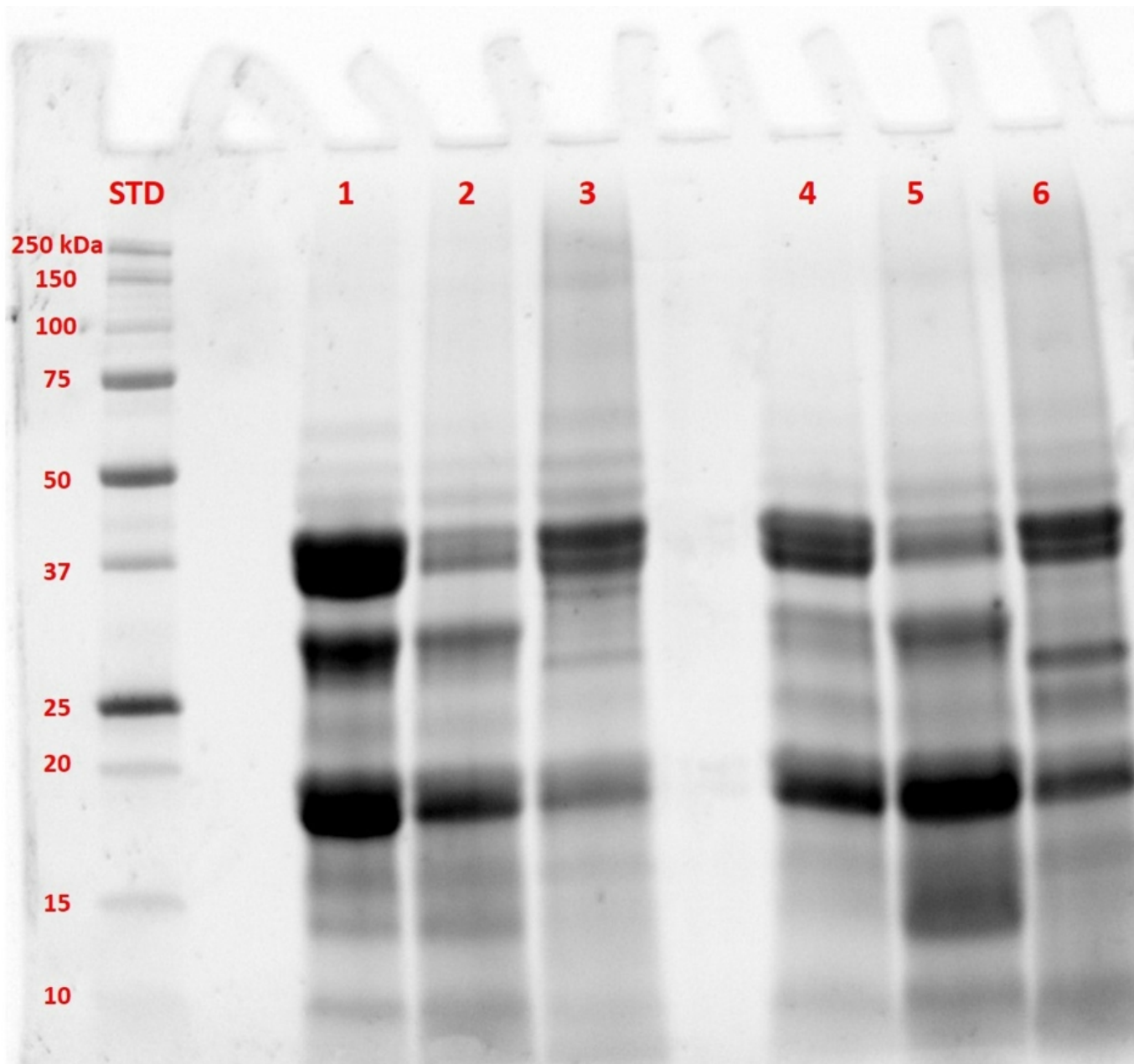
693

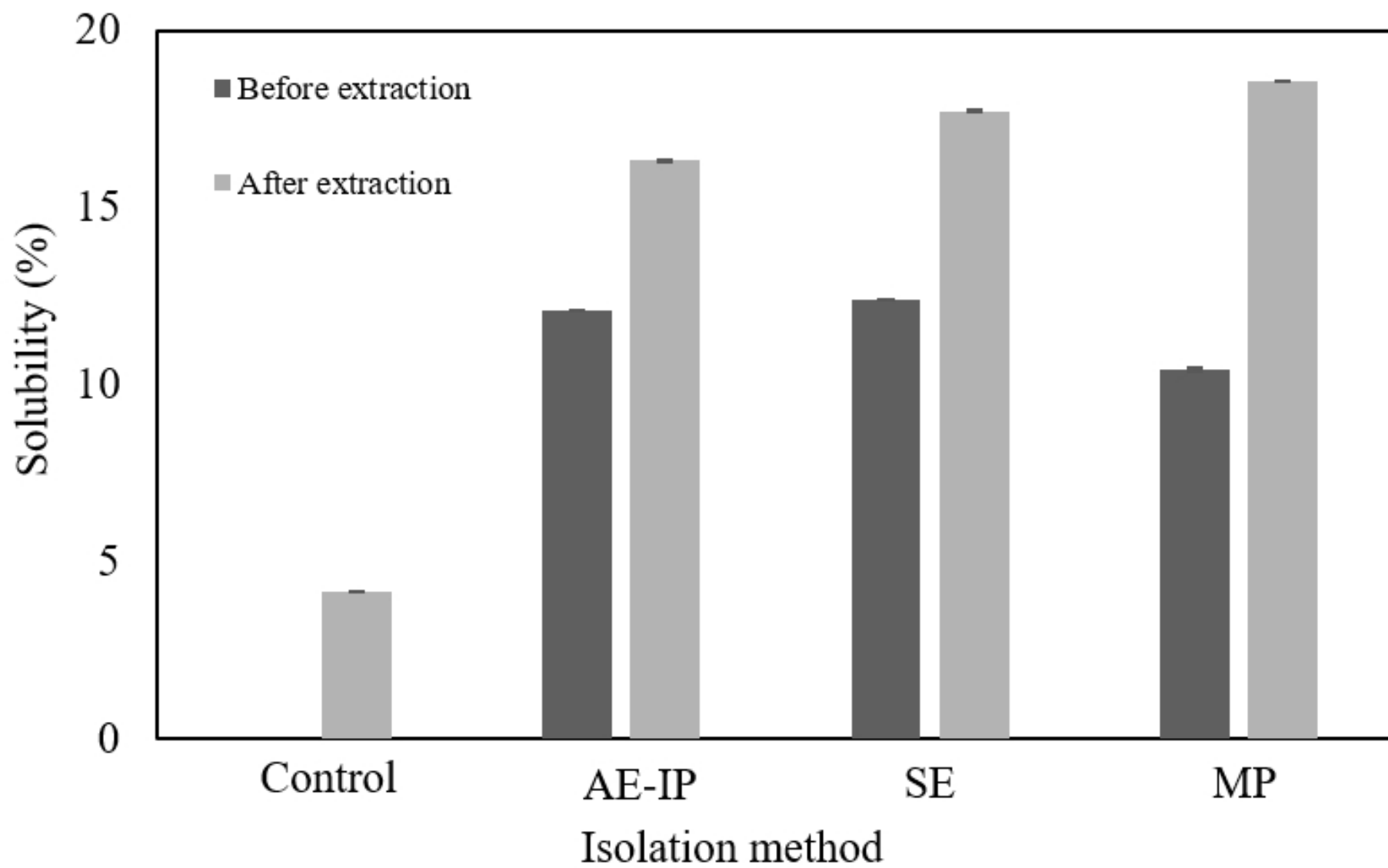
694

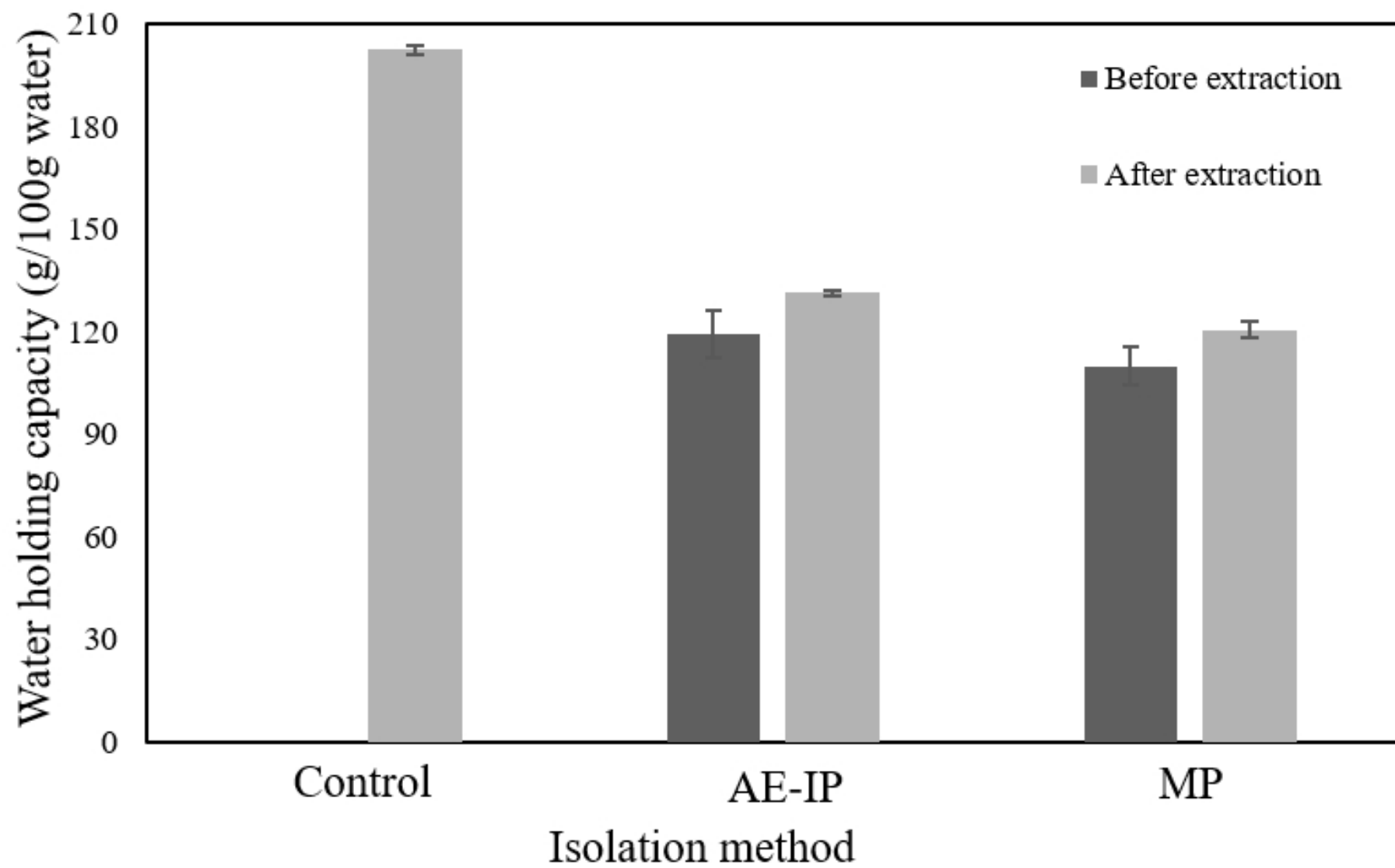
695

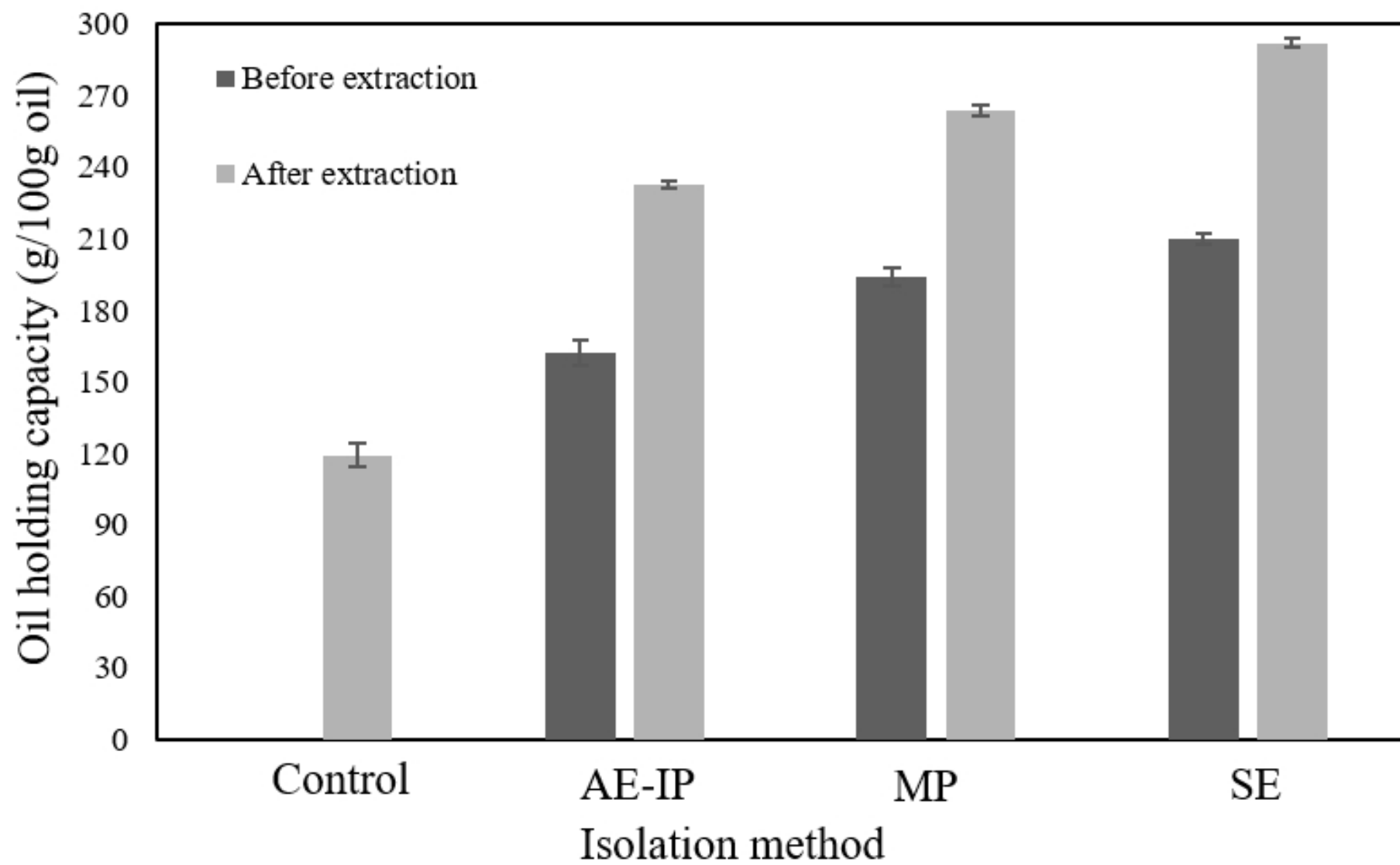
696

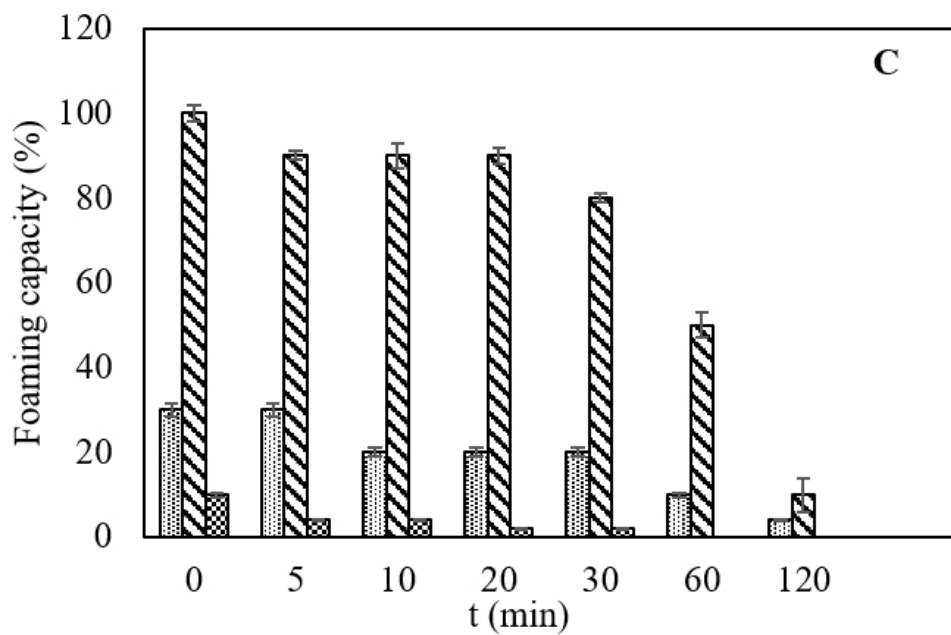
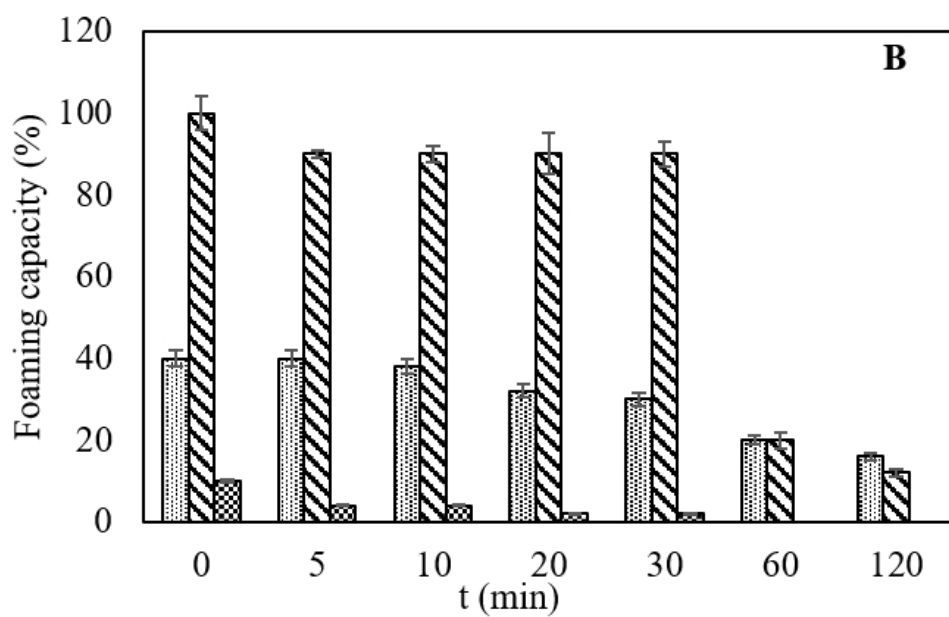
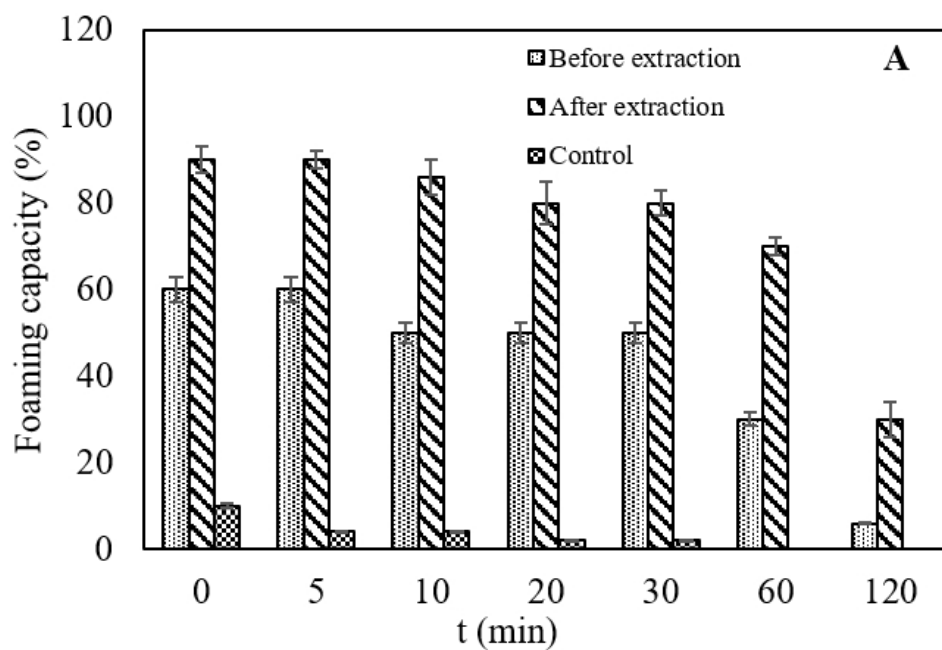
697

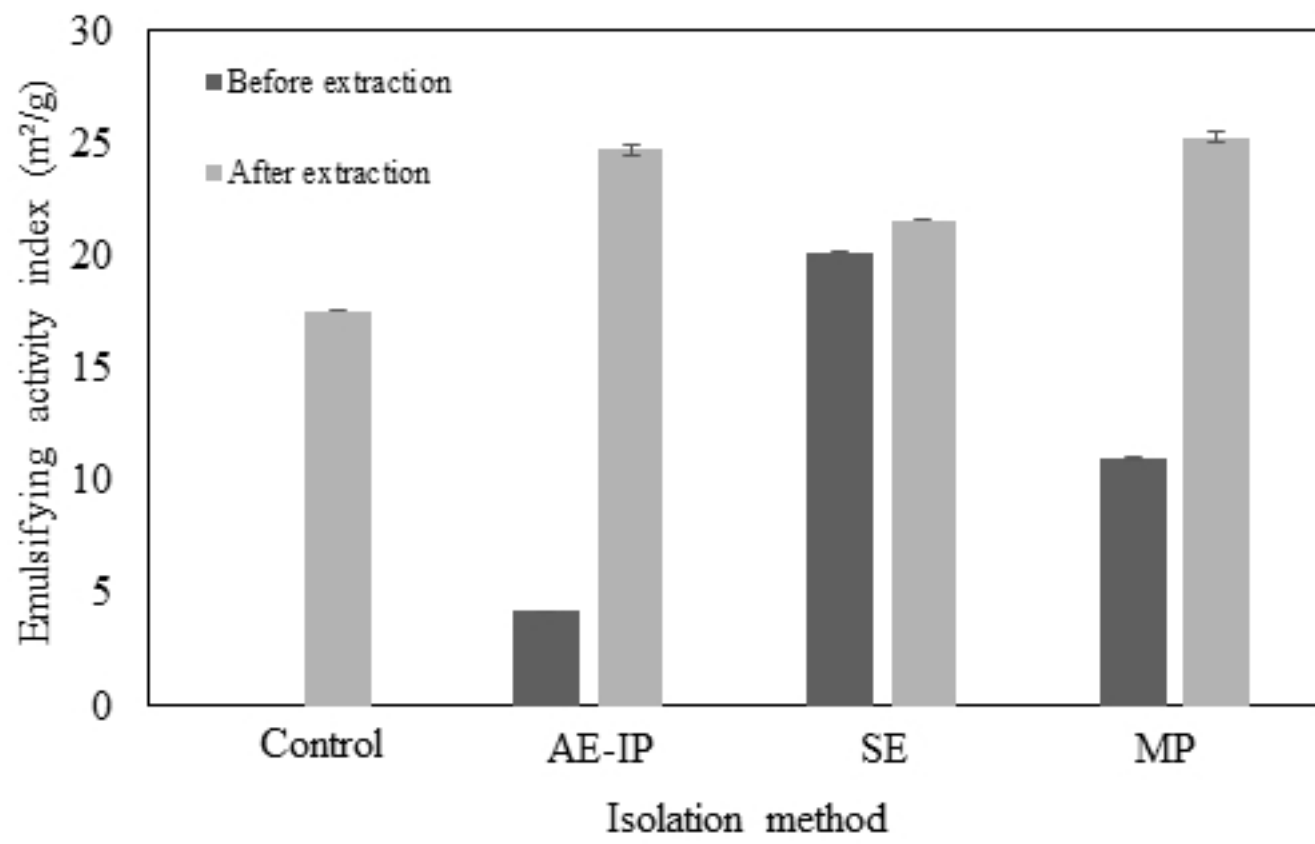


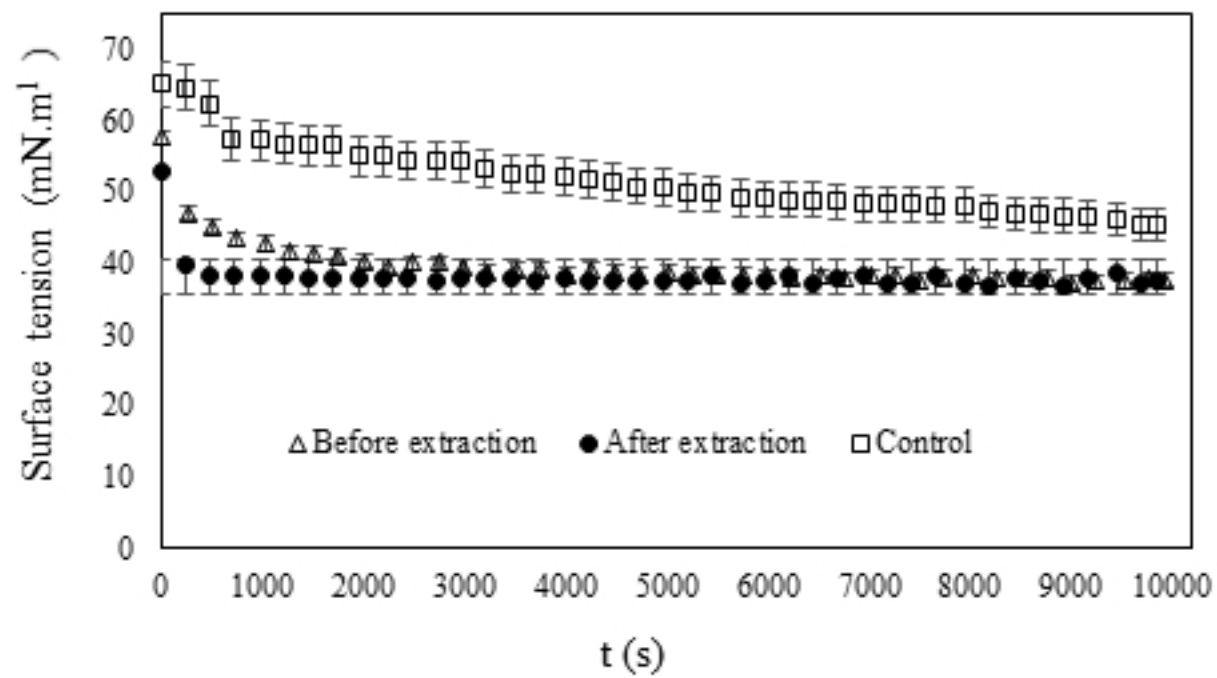












Waste and Biomass Valorization

Enhancement of foaming characteristics of black cumin protein concentrates based on Maillard conjugation --Manuscript Draft--

| | |
|--|--|
| Manuscript Number: | |
| Full Title: | Enhancement of foaming characteristics of black cumin protein concentrates based on Maillard conjugation |
| Article Type: | Original research article |
| Keywords: | Cold press meals; protein isolates; black cumin; glucose; Maillard conjugation; protein functionality; surface activity; foaming capacity. |
| Corresponding Author: | Ibrahim Gulseren, Ph.D. Istanbul Sabahattin Zaim Universitesi İstanbul, TURKEY |
| Corresponding Author Secondary Information: | |
| Corresponding Author's Institution: | Istanbul Sabahattin Zaim Universitesi |
| Corresponding Author's Secondary Institution: | |
| First Author: | Özgenur Özdemir |
| First Author Secondary Information: | |
| Order of Authors: | Özgenur Özdemir Bilal Çakır Ibrahim Gulseren, Ph.D. |
| Order of Authors Secondary Information: | |
| Funding Information: | TUBITAK (115O569) Dr. Ibrahim Gulseren |
| Abstract: | <p>Cold press oils are value-added functional food components that are being increasingly produced globally. Due to the removal of oils from seeds, protein content in cold press deoiled seed meals substantially increase, while nutritional quality is preserved reasonably well. In this study, we made an attempt to enhance the functionality of black cumin seed proteins based on Maillard conjugation under wet conditions. Using 3 different of carbohydrates (namely glucose, lactose and maltodextrin), Maillard conjugates were prepared. The molecular weight distribution (native- or SDS-PAGE) of the conjugates were determined by electrophoretic techniques. The extent of glucose binding was measured by RP-HPLC-RID. Foaming capacity and stability was determined as a function of time and finally surface activity and elasticity was based on drop shape tensiometry. The extent of glucose binding accounted for up to 85% for a protein:glucose ratio of 1:2 at pH 7 for a 15 min heating treatment (100°C). There was a moderate extent of increase in foaming characteristics due to Maillard conjugation in most cases, while the performance was highly dependent on molecular size of carbohydrates, medium pH, and heating parameters. Adsorption rate at the air-aqueous dispersion interface and surface elasticity was highly dependent on molecular size, which in turn determined the surface activity and foaming characteristics of black cumin protein concentrates.</p> |
| Suggested Reviewers: | Fatih Öz Ataturk University, Turkey fatihoz@atauni.edu.tr Expert on Maillard reactions in food materials John N. Coupland Pennsylvania State University, USA coupland@psu.edu |

| | |
|--|--|
| | Expert in utilization of proteins in foods |
| | Seid Mahdi Jafari Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran smjafari@gau.ac.ir Expert in the preparation and utilization of food dispersions |
| | Sedef Nehir El Ege University, Turkey sedef.el@ege.edu.tr Expert in analysis and utilization of food components |
| | Nattapol Tangsuphoom Mahidol University, Thailand nunts@mahidol.ac.th Expert in the isolation and evaluation of food ingredients |

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

Enhancement of foaming characteristics of black cumin protein concentrates based on Maillard conjugation

Özgenur Özdemir¹, Bilal Çakır^{1,2} & İbrahim Gülseren¹ *

**1- Department of Food Engineering, İstanbul Sabahattin Zaim University (İZÜ),
Halkalı Campus, 34303, Küçükçekmece, İstanbul, TURKEY**

**2- Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Institute of Health
Education, Marmara University, 34854, Başbüyük – Maltepe, İstanbul,
TURKEY**

***Corresponding author: E-mail: ibrahim.gulseren@izu.edu.tr**

Fax: +90 (212) 692-9758

Submitted to *Waste and Biomass Valorization*

August 15, 2017

26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55

Abstract

Cold press oils are value-added functional food components that are being increasingly produced globally. Due to the removal of oils from seeds, protein content in cold press deoiled seed meals substantially increase, while nutritional quality is preserved reasonably well. In this study, we made an attempt to enhance the functionality of black cumin seed proteins based on Maillard conjugation under wet conditions. Using 3 different of carbohydrates (namely glucose, lactose and maltodextrin), Maillard conjugates were prepared. The molecular weight distribution (native- or SDS-PAGE) of the conjugates were determined by electrophoretic techniques. The extent of glucose binding was measured by RP-HPLC-RID. Foaming capacity and stability was determined as a function of time and finally surface activity and elasticity was based on drop shape tensiometry. The extent of glucose binding accounted for up to 85% for a protein:glucose ratio of 1:2 at pH 7 for a 15 min heating treatment (100°C). There was a moderate extent of increase in foaming characteristics due to Maillard conjugation in most cases, while the performance was highly dependent on molecular size of carbohydrates, medium pH, and heating parameters. Adsorption rate at the air-aqueous dispersion interface and surface elasticity was highly dependent on molecular size, which in turn determined the surface activity and foaming characteristics of black cumin protein concentrates.

Key words: Cold press meals; protein isolates; black cumin; glucose; Maillard conjugation; protein functionality; surface activity; foaming capacity.

56 **Introduction**

57 Most manufactured food products are made of heterogeneous mixtures where dispersed
58 phase(s) are contained in an aqueous medium. The presence, composition, size, concentration
59 of dispersed particles, their charge characteristics, and interactions with the continuous medium
60 determine the microstructural attributes of the food matrix [1].

61 Proteins are functional biopolymers that enable the stabilization of such dispersed
62 phases. Among the major functional properties of proteins, interfacial and surface related
63 characteristics take place including the ability to stabilize foams [2]. Although most of the
64 commercial protein products utilized by the food industry have originated from animal
65 resources (i.e., dairy proteins), plant proteins become increasingly available.

66 Current availability of commercial plant protein products include proteins manufactured
67 from legumes, cereals and oilseeds [3]. However, the global demand for protein is constantly
68 increasing and novel resources are being highly sought after [4-5]. It would be quite
69 advantageous to utilize renewable raw materials in plant protein production. According to Day
70 [6], the conversion efficiency of plant proteins to animal proteins is roughly 15%, which
71 automatically implies cost efficiency and improved sustainability. Currently the plant protein
72 demand of the food industry is sufficient to consume the commercially available plant proteins
73 [6]. With the utilization of novel resources, it could be possible to target novel uses. In that
74 sense, valorization of industrial waste and/or byproducts in plant protein manufacture is a viable
75 strategy.

76 Compared to cereals, oilseeds contain considerably higher amounts of protein [7] which
77 stresses their importance in plant protein manufacture. Due to the deoiling processes, proteins
78 become highly concentrated in the plant meals, consequently, plant protein concentrates and
79 isolates can be produced from these inexpensive by-products. In the majority of all cases, plant
80 meals are utilized in feed manufacture (for example, [8]), which usually generates low value
81 products compared to foods. Depending on the plant source, protein content could account for
82 up to 60% of deoiled meals [9]. Consequently, seed protein products bring extra benefits to the
83 table such as waste reduction in addition to economic gains [10].

84 Black cumin (*Nigella sativa*) is a valuable and annually flowering medicinal plant from
85 *Ranunculaceae* family [11] native to the Eastern Mediterranean regions, South Europe and Asia
86 Minor [11-12]. According to Commodity Trade Statistics Database, the global consumption of
87 cumin was estimated to be 187,000 tonnes. India cultivates more than 85% of the global

88 production of black cumin, whereas approximately 3.5% and 2.8% are generated by Syria and
89 Turkey, respectively [13].

90 Black cumin seeds contain approximately 21% protein, 35% carbohydrates and 35 to
91 38% oil [11]. In the deoiled meal of the black cumin seeds, one can expect to find a
92 corresponding protein concentration >30%. Black cumin seeds have been traditionally utilized
93 in medicinal applications and as spice or nutritional supplements. Its industrial utilization is
94 fairly limited. Also for the consumers, its direct consumption is difficult. Therefore industrially
95 generated components from black cumin seeds could both increase its extent of consumption
96 and consequently the extent of agricultural production.

97 In our previous studies, we have shown that it was possible to generate protein isolates
98 from black cumin deoiled meals [14]. We found that although the aqueous extraction of proteins
99 generate protein concentrates with relatively poor technical properties, a further stage on hexane
100 extraction enhanced the functional characteristics. Here an attempt was made to enhance the
101 functional characteristics of black cumin proteins in the absence of any organic solvent
102 treatments.

103 In the previous literature, the formation of protein-carbohydrate complexes has been
104 widely studied due to their biological and technical significance. Composition of the protein-
105 carbohydrate mixture, molecular size of both entities, and environmental factors such as pH,
106 ionic strength and temperature determine the type of complexes that might be formed. The
107 aqueous mixture of proteins and carbohydrates could be co-soluble, form soluble or insoluble
108 complexes, or totally phase separate. Especially when soluble complexes forms, due to their
109 limited surface charge, the stability has to be closely monitored. In products such as acidic milk
110 drinks, emulsions and foams, such complexes could be utilized. As well as capitalizing on
111 electrostatic forces, in many studies Maillard conjugates of proteins and simple sugars or
112 polysaccharides were exploited [15-19].

113 The ability of proteins to stabilize interfaces is due to their amphiphilic nature. While
114 the hydrophilic head group is attracted to the aqueous phase, the hydrophobic portions interact
115 with less polar phases such as air bubbles or oil phases. Protein molecules rearrange on the
116 surface of air or oil interfaces, with their hydrophobic moieties (with amino acids such as
117 phenylalanine, leucine, and isoleucine) adsorbing at the surface and the hydrophilic portions
118 protruding into solution [20] which in turn causes partial unfolding of the proteins at the
119 interface [21]. Once proteins are adsorbed at the interface, through intermolecular interactions
120 they create films with different viscoelastic properties [22]. In the case of protein-sugar

121 complexes, in addition to the already existing polar residues of proteins, hydrophilic sugar
122 molecules further protrude into the aqueous phases and generating strong steric protection
123 which extends the stability of emulsions and foams [23-24]. In various studies, molecular size
124 and environmental conditions applied were shown to modulate the effectiveness of such
125 complexes [25]. Consequently, in this study, Maillard conjugation between black cumin
126 proteins and certain carbohydrates (glucose, lactose and maltodextrin) was utilized to enhance
127 the foaming characteristics of these protein concentrates.

128

129 **Materials and Methods**

130 **Materials**

131 Cold press deoiled meals of black cumin were generously donated by a local
132 manufacturer of cold press oils (Neva Foods Ltd., İstanbul, Turkey). In all cases, the maximum
133 temperature observed by the cold press meals was lower than 40°C. All chemicals used were
134 of reagent grade and purchased from Sigma-Aldrich.

135

136 **Methods**

137 **Preparation of black cumin protein isolates**

138 Alkali extraction–isoelectric precipitation (AE-IP) technique was based on the
139 solubilization of protein molecules at basic pH, which was followed by the isoelectric
140 precipitation at acidic pH values. Protein isolates from deoiled meals of black cumin seeds were
141 produced using the method of Boye et al. [26] with slight modifications [14]. Briefly, 50 g of
142 deoiled meal was dispersed in water (1:15, w/v) and the pH of the medium was adjusted to pH
143 9.5 using 1.0 N NaOH. The dispersions were stirred using a magnetic stirrer operating at 500
144 rpm for 1 h at room temperature (22±1°C). Immediately afterwards, the dispersions were
145 centrifuged at a rate of 13500×g for 15 min at 4 °C using a CR22N high-speed refrigerated
146 centrifuge (Hitachi Koki Co., Ltd., Tokyo, Japan). The supernatant containing the solubilized
147 proteins was collected and the medium pH was adjusted to pH 4.5 using 1.0 N HCl in order to
148 induce isoelectric precipitation. To ensure the complete separation of precipitating proteins, the
149 supernatant was centrifuged once again at 13500×g for 15 min. The pellet was collected and
150 immediately frozen at –20 °C. Frozen samples were lyophilized using a Teknosem TRS 2/2V
151 freeze drier (Teknosem Corp., İstanbul, Turkey).

152 **Preparation of Maillard conjugates**

153 In order to prepare Maillard conjugates of black cumin proteins and glucose, 3 different
154 protein:glucose ratios (1:1, 1:2, 1:4) were selected. For comparative purposes, lactose and
155 maltodextrin was also used at a protein:carbohydrate concentration ratio of 1:2. Black cumin
156 protein concentrates were dispersed in 750 ml of deionized water in order to generate a final
157 protein concentration of 1% and dispersion pH was adjusted to pH 12 using 10 M NaOH (Li
158 et al. 2009). The dispersion was kept stirred for 1 h to ensure complete hydration. Thermal
159 processing was carried out at 100°C for 0-30 min using a water-bath. Immediately afterwards,
160 the samples were cooled in an ice bath and then thus formed conjugates were frozen at -20°C
161 and lyophilized (Teknosem TRS 2/2V lyophilizer, Teknosem, İstanbul, Turkey).

162

163 **Native-PAGE or SDS-PAGE analysis**

164 Native-PAGE electrophoresis was carried out in order to analyze Maillard conjugates
165 of black cumin proteins and carbohydrates on an as is basis. Native-PAGE analysis was carried
166 out based on the protocols of Laemmli [27] under non-reducing conditions using a Bio-Rad
167 Mini Protean Tetra Cell System (Bio-Rad Laboratories Inc., USA). Firstly, lyophilized
168 conjugates were dispersed in sodium phosphate buffer (pH 7). Immediately afterwards, protein
169 samples and 2x sample buffer containing 1% Bromophenol blue, 25% glycerol and 62.5 mM
170 Tris-HCl (pH 6.8) were mixed 1:1 in Eppendorf tubes (1.5 ml). Samples loaded on a Mini-
171 Protean TGX Stain-Free Precast Gel (12%). Precision Plus protein standards from the same
172 manufacturer were used as the reference sample. Gel electrophoresis was carried out for 45 min
173 using Tris/Glycine running buffer at 200 V (constant). Imaging was carried out by transferring
174 the gel to a stain-free tray and using Gel Doc EZ System. The images were analyzed using the
175 Image Lab Software (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA). For SDS-PAGE analysis, same gel was
176 utilized along with reducing conditions, SDS addition and heating of samples (100°C, 5 min),
177 as appropriate.

178 **Foaming capacity and stability**

179 Foaming capacity of the conjugates and the stability of foams prepared by these
180 conjugates were determined according to Ref. [28]. Briefly, 50 ml of 2% (w/v) Maillard
181 conjugate solutions prepared at defined pH values were whipped for 3 min using a Waring lab
182 blender at a “high stir” setting and then poured into a 100 ml graduated cylinder. To ensure pH
183 stability, 100 mM sodium citrate buffer was used for pH 3 and pH 5 samples, whereas 100 mM

184 sodium phosphate buffer was utilized for pH 7. Total volume of the foam was studied as a
185 function of time, and % increase in sample volume was calculated based on the following
186 equations at a given time and at t=0. Heat treated black cumin protein isolate dispersions
187 without carbohydrates and caseinate dispersions were also analyzed as references.

$$\begin{aligned} & \text{Volume increase (\%)} \\ & = \frac{(\text{Volume after whipping} - \text{Volume before whipping}) \text{ ml}}{\text{Volume before whipping (ml)}} \times 100 \end{aligned}$$

190

191 **RP-HPLC-RID analysis**

192 The RP-HPLC-RID analyses of the samples were performed on an Shimadzu LC-20AD
193 HPLC system (Shimadzu Scientific Instruments) which consisted of a pump, thermostated
194 column compartment and refractive index detector under previously described conditions and
195 procedures of the manufacturer (Inertsil application-Analysis of Sugars, Data No. LB180-0871,
196 <https://www.gls.co.jp/viewfile/?p=LB180>). The Inertsil, InertSustain NH₂ Column (4.6 mm ID
197 × 250 mm, 5 μm pore size) was used. The mobile phase was composed of an isocratic flow of
198 85% acetonitrile and 15% HPLC water for 25 min.

199 HPLC analysis was carried out at a column temperature of 40°C, at an eluent flow rate
200 of 1 ml.min⁻¹, and using RID (Refractive Index Detector) detection. At least 5 concentration
201 levels of all standard ranging between 0-2% were injected into the HPLC column. The
202 corresponding peak areas were plotted against concentrations. Statistical analysis showed that
203 all standard solutions had good linearity within the concentration range examined as shown by
204 the high correlation coefficients ($r^2 > 0.9998$). The amounts of sugars in the extracts were
205 calculated as % of sample, on the basis of peak areas and by using calibration curves constructed
206 for each standard.

207 After the redispersion of Maillard conjugates, equilibrium dialysis (1:1 by volume) was
208 carried out for 72 h (Product No: D977, Sigma-Aldrich Corp., 14 kDa cutoff). In order to
209 determine the extent of free (i.e., unreacted) sugars, samples were withdrawn from the dialysis
210 permeate and filtered through 0.45 μm PTFE membranes (Isolab, Germany) prior to injection
211 into the HPLC system.

212

213

214

215 **Drop shape tensiometry**

216 The surface tension ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) at the air-aqueous solution interface was determined using
217 drop shape tensiometry (25°C) (Biolin Scientific, Attension Theta, Espoo, Finland). An air
218 bubble was automatically formed at the tip of an inverted syringe which was immersed in a
219 quartz cuvette containing the protein or Maillard conjugate dispersion. The shape of the droplet
220 was automatically analyzed to record the changes in the surface tension over time, as the cuvette
221 and syringe assembly were monitored by a CCD (charge coupled device) camera and high
222 quality image acquisition was utilized [29]. Surface tension was calculated based on the Young-
223 Laplace equation using Attension Theta OneAttension version 2.6 (r5305) software. All the
224 measurements were carried out in triplicate. The surface pressure (π) was calculated as the
225 difference in the surface tension of the buffer (72.3 mNm^{-1}) and the protein solution at the air-
226 water interface, as a function of time.

227 For the interfacial elasticity measurements, equilibration duration of 3000 s was used
228 prior to analysis, when necessary, the adsorption process was allowed to take place
229 continuously overnight. In most cases, however, the difference in measured elastic modulus
230 from a 4 h or an overnight equilibration was negligible. Once the equilibrium was attained,
231 dilational elasticity was determined at a strain amplitude range of 0-0.5 ($\Delta A/A = 0$ to 0.5, A
232 being the bubble surface area) and a sinusoidal oscillation frequency ($\omega = 100 \text{ mHz}$), unless
233 otherwise stated. This extent of dilation lies within the linear viscoelastic range [30]. The
234 method is based on the automatically controlled, sinusoidal compression-expansion of the
235 aqueous droplet at a defined oscillatory frequency and amplitude of dilation. The number of
236 data points shown was reduced for clarity. The interfacial modulus of dilational elasticity was
237 calculated from the change in interfacial tension relative to the change in droplet surface area
238 [30]:

239

240
$$\varepsilon = \frac{d\gamma}{d\ln(A)}$$

241

242 To enable accurate measurements of elasticity in Maillard conjugates (section 2.2.2),
243 their dispersions were treated with α -amylase (Product No: A1031, Sigma-Aldrich Corp., 4 h,
244 20°C) prepared in sodium phosphate buffer (100 mM, pH 7). After the treatment, the samples

245 were subjected to overnight extensive dialysis in buffer solution to ensure the removal of non-
246 protein substrates.

247

248 **Results and Discussion**

249 **Electrophoretic analysis**

250 The molecular weight distribution of proteins in the black cumin protein concentrates
251 was investigated using native- and SDS-PAGE methods (Figure 1). Firstly, on Lane 1, SDS-
252 PAGE analysis of the untreated protein concentrates were shown. The major bands appeared
253 between 15 and 25 kDa, around 37 kDa. In order to analyze the molecular weight distribution
254 of Maillard reaction conjugates accurately, Native-PAGE analysis was also carried out.
255 Although there was smearing and some faint spots were observed throughout the gel, the major
256 bands were shown to lie between 75 and 250 kDa in all cases (Lanes 2-4) for protein:glucose
257 ratios of 1:1 to 1:4. For the 1:4 samples, the size of the band was considerably smaller. At a
258 protein: glucose ratio of 1:2 and as a function of pH, once again the distribution of molecular
259 weights were investigated (Lanes 5-7). Smearing was once again the case at Lanes 5 and 6
260 between 25 and 37 kDa, 20 kDa and 10-15 kDa (Figure 1). At pH 7 (Lane 7), while a broad
261 band was observed between 75 and 250 kDa, it did not exist at pH 3 (Lane 5) or pH 5 (Lane 6).
262 This observation could be related to the potential isoelectric precipitation of proteins at pH 3 or
263 5. Similarly in the previous literature, the major bands of complexes only appeared at pH 7,
264 whereas the likelihood of Maillard reaction taking place was considerably less at lower pH (i.e.,
265 pH 3 and 5) [31-32].

266 Conjugate formation results in a decreased band intensity compared to pure protein [33].
267 Since the bands appears at higher molecular weight spots, these findings indicate covalent
268 binding between the proteins and carbohydrates. In the case of polysaccharides with high molar
269 mass, these bands appear at the border between the stacking gel and the resolving gel [33]
270 indicating the higher molecular weight of the conjugates.

271

272 **Foaming capacity and stability**

273 In order to understand the influence of Maillard conjugation on the foaming
274 characteristics of black cumin protein concentrates, foaming capacity and stability of foams
275 prepared with untreated proten concentrates were prepared (Figure 2) and compared to that of

276 conjugated proteins (Figure 3). At the time of preparation, foam capacity of pH 5 or pH 7
277 samples were higher than pH 3 samples (2% protein in all cases). As time passed, the stability
278 of the foams rapidly decreased. At pH 3, the stability was the lowest at the time of preparation,
279 while at longer durations, the foam volumes were relatively unchanged. However, in the case
280 of pH 5 samples, the collapse was rapid and for the pH 7 samples, approx. 90% of the foam
281 volume was lost after 2 hours of storage at the ambient temperature. When the sample
282 performances were compared to sodium caseinate stabilized foams prepared at comparable
283 conditions, although the performance of caseinate was slightly better than the pH 7 samples, in
284 most cases the differences were in the range or 10%.

285 Influence of protein:glucose ratio (1:1 to 1:4) and heating duration (0-30 min at 100°C)
286 was monitored (pH 7) (Figure 3). Especially at a ratio of 1:2 and 15 min of treatment, the
287 foaming capacity of the black cumin proteins were significantly enhanced. For 1:1 and 1:2
288 ratios, 15 min treatments were generally more effective than the 30 min treatments where the
289 stability values were lower. It has to be considered that at the highest glucose concentration, the
290 sample viscosity is slightly higher than the other samples which in turn could positively affect
291 the sample viscosity. However, the foaming capacity was not improved. The maximum
292 improvement among the samples took place at protein:glucose ratio of 1:2 for 15 min process
293 at pH 7, which represented a 23% improvement in foaming capacity at the time of preparation.
294 These findings were coherent with the previous data (for example, [23-24]). Since proteins
295 demonstrate pronounced surface activity and ability to form thick viscoelastic layers, they are
296 efficient stabilizers of foams. If macromolecules attached to the interface can also be strongly
297 solvated by the aqueous medium, it is clear that foam stability should be significantly improved
298 and protein-polysaccharide complexation essentially falls under this classification [23-24].

299 Based on the same protein:carbohydrate ratio (1:2), the influence of thermal treatment
300 (0-30 min at 100°C) on Maillard conjugation was studied for lactose and maltodextrin as well
301 (Figure 4). The foaming capacity of the samples processed at a protein:lactose ratio of 1:2 (30
302 min, 100 °C and pH 7) was found to be 70% which represented a further 16% increase
303 compared to the unprocessed sample. Maltodextrin conjugation under similar conditions did
304 not significantly improve the performance of the unprocessed sample. Consequently, the
305 foaming capacities of protein concentrates-lactose or maltodextrin conjugates were considerably
306 lower compared to glucose. Several investigations have shown that the reaction mechanisms of
307 monosaccharides and disaccharides differ and that reaction products obtained from
308 monosaccharides are different from those obtained from disaccharides [15, 34]. A previous

309 report indicated a linear correlation between the DS and the saccharide size. The lower
310 reactivity of the maltodextrin and dextran have been reported to be related to steric hindrance
311 effects [33]. After 30 minutes of treatment, the foaming capacity and stability values were
312 significantly improved, especially at pH 7. Possibly due to the larger molecular weights of these
313 molecules, the Maillard reaction rate was considerably lower [15]. Meanwhile the interfacial
314 behavior at the interface remains to be investigated.

315

316 **RP-HPLC-RID Analysis**

317 Using HPLC-RID methods, the glucose binding characteristics of black cumin protein
318 concentrates were determined (Figure 5 and Table 1). As shown on Figure 5A, there was a tiny
319 amount of fructose (approx. 0.013%) in the protein samples and they were mixed with a high
320 concentration of glucose (approx. 1.3%). As the thermal processing was carried out, a
321 considerable amount of glucose was isomerized to fructose during thermal processing, which
322 was coherent with the previous work of Suzuki and Tsumura [35] on isomerization. Meanwhile
323 a certain portion of glucose (Table 1) was in all cases conjugated to the proteins. Conjugation
324 efficiency was as high as 85% after 30 min of processing which is considerably higher than that
325 at 15 min (75%). Since more glucose was conjugated which in turn decreased the foaming
326 efficiency, the interfacial packing characteristics of the glucose molecules had to be altered at
327 the air-water interface. The increasingly hydrophilic and glucose bearing molecular surfaces
328 could have a difficulty at penetrating the interface thus rendering the foams less stable.

329

330 **Drop Shape Tensiometry**

331 In this context, surface adsorption characteristics of the Maillard conjugates were
332 studied (Figure 6) in order to elucidate the interactions between air bubbles and the conjugates
333 using drop shape tensiometry.

334 The surface tension of Maillard conjugates were investigated by means of drop shape
335 tensiometry and the data were compared to the untreated reference (i.e., black cumin protein
336 concentrate) (Figure 6). In the case of the reference, after 3000 s of adsorption, the equilibrium
337 surface tension was approx. 39.6 mN/m, while for the treated samples, the corresponding value
338 was approx. 32 mN/m. However, the kinetics of adsorption between the treated samples were
339 quite different. The time necessary to reach equilibrium increased with the the molecular weight
340 of the carbohydrate unit. Glucose and lactose behaved roughly similar, whereas in the first few

341 hundred seconds, the tension values for maltodextrin treated samples were considerably higher.
342 In all cases, the surface pressure increased more rapidly compared to the reference sample.
343 While the conjugate size had a bearing on the adsorption rate, in all cases Maillard conjugation
344 enhanced the surface activity of black cumin protein concentrates.

345 In order to further elucidate the adsorption characteristics, the surface elasticity of the
346 samples were also investigated. Firstly the linear viscoelastic region (LVR) was established for
347 the samples (data not shown), consequently by the alteration of bubble volume at a constant
348 frequency (0.1 or 0.5 Hz), the surface elasticity of the samples were determined (Table 2). In
349 the case of glucose, although the adsorption was the fastest, surface elasticity was moderate and
350 was found to be frequency dependent. Decreasing surface elasticity with frequency indicated
351 possible deformation of the glucose conjugates at the surface which could affect the foaming
352 capacity and stability. Lactose samples demonstrated the highest surface elasticity values.
353 Consequently since the adsorption kinetics were reasonably fast and the elasticity was
354 pronounced, for delicate foam systems, it could be possible to utilize lactose conjugates.
355 However, the rate of adsorption was slower than glucose counterparts. Finally maltodextrin
356 conjugates demonstrated the slowest rate of adsorption and at neither frequency, the surface
357 elasticity was ideal. Possibly the large hydrophilic groups of maltodextrin both decreased its
358 rate of adsorption and due to the steric effects at the surface the packing was limited,
359 consequently these results could be utilized in the interpretation of foaming data.

360

361 **Conclusion**

362 Valorization of industrial byproducts is a viable and sustainable strategy to generate
363 plant protein products. Since plant proteins are natural ingredients and their Maillard conjugates
364 can be manufactured in the absence of toxic chemicals or organic solvents, it is possible to use
365 them in many foods, cosmetic and pharmaceutical products as foam stabilizers and emulsifiers.
366 Consequently, in this study, Maillard conjugation was exploited in order to generate foaming
367 agents with enhanced foaming capacity and stability. Formation of protein-carbohydrate
368 conjugates enhanced foaming activity, whereas the performance was highly dependent on
369 molecular size of carbohydrates as well as processing conditions such as pH, heating
370 temperature and duration. While conjugation enhanced surface characteristics; adsorption rate
371 and surface elasticity was highly dependent on molecular size, which in turn will determine the
372 surface activity and foaming characteristics of black cumin protein concentrates.

373 **Acknowledgements**

374 This study was funded by a grant from TÜBİTAK 3501 Programme (Grant No.
375 115O569; The Scientific and Technological Research Council of Turkey). The authors would
376 like to also express their gratitude to Neva Foods Ltd. (İstanbul, Turkey) for the donation of all
377 of the deoiled plant meals.

378

379

380

381

382 **References**

- 383 **1.** Dickinson E.: Emulsion gels: the structuring of soft solids with protein-stabilized
384 emulsions. *Food Hydrocoll.* 28, 224-241 (2012).
- 385 **2.** Campbell G.M.: Bubbles in food. Eagen Press, St. Paul, MN, USA (1999).
- 386 **3.** Moure A., Sineiro J., Dominguez H., Parajo J.C.: Functionality of oilseed protein
387 products: A review. *Food Res. Int.* 39, 945–963 (2006).
- 388 **4.** Markiewicz K. The economics of meeting future protein demand (2010). Retrieved from
389 edepot.wur.nl, August 8, 2017.
- 390 **5.** Aiking H., de Boer J., Vereijken, J.M. (Eds). Sustainable protein production and
391 consumption: Pigs or peas? *Environment & Policy* Vol. 45, ISBN 1-4020-4062-8,
392 Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2006.
- 393 **6.** Day L.: Proteins from land plants - potential resources for human nutrition and food
394 security. *Trends Food Sci Technol*, 32, 25-42 (2013).
- 395 **7.** Potter N., Hotchkiss J.: Food science (5th ed.). *New York, NY, USA: Springer Sciences*
396 *Business Media* (Chapter 17) (1995).
- 397 **8.** Vermaut S., De Coninck K., Flo G., Cokelaere M., Onagbesan M., Decuyper E.: Effect
398 of deoiled jojoba meal on feed intake in chickens: Satiating or taste effect? *J Agric Food*
399 *Chem*, 45(8), 3158-63, (1997).
- 400 **9.** Radha C., Kumar P.R., Prakash V.: Preparation and characterization of a protein
401 hydrolysate from an oilseed flour mixture. *Food Chem*, 106, 1166-74, (2007).
- 402 **10.** Tekeli A.: Nutritional value of black cumin (*Nigella sativa*) meal as an alternative protein
403 source in poultry nutrition. *J Anim. Sci. Adv.* 1(4), 797-806 (2014).

- 404 **11.** Baydar H.: Science and technology of medicinal and aromatic plants (Expanded 3rd Ed.).
405 Süleyman Demirel University, Faculty of Agriculture, Isparta, Turkey, Publ., No. 51:
406 227-228, (2009).
- 407 **12.** Baytop T.: Treatment with plants in Turkey. Past and present (Additional Second
408 Edition). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, Turkey (1999).
- 409 **13.** Anon.: Proposal for new work on Codex Standart for Brown/Black Cumin (Whole and
410 Ground), (prepared by India). Joint FAO/WHO Food Standards Programme, (2014).
- 411 **14.** Özdemir Ö., Çakır B., Gülseren İ. Functional and proteomic characterization of protein
412 products from defatted cold press meals. AOCS Annual Meeting, Orlando, FL, USA,
413 (2017).
- 414 **15.** Li Y., Lu F., Luo C., Chen Z., Mao J., Shoemaker C., Zhong F.: Functional properties of
415 the maillard reaction products of rice protein with sugar. *Food Chem.* 117, 69-74 (2009).
- 416 **16.** Qi J., Liao J., Yin S., Zhu J., Yang X.: Formation of acid-precipitated soy protein-dextran
417 conjugates by maillard reaction in liquid systems. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45, 2573-80
418 (2010).
- 419 **17.** Zhu D., Damodaran S., Lucey J.A.: Formation of whey protein isolate (WPI)-dextran
420 conjugates in aqueous solutions. *J. Agric. Food Chem.* 56, 7113-18 (2008).
- 421 **18.** Gu, F., Kim, J. M., Abbas, S., Zhang, X., Xia, S. and Chen, Z. (2010) Structure and
422 antioxidant activity of high molecular weight Maillard reaction products from casein-
423 glucose. *Food Chem.* 120:505-511.
- 424 **19.** Li Y., Zhong F., Ji W., Yokoyama W., Shoemaker C. F., Zhu S., Xia W. Functional
425 properties of Maillard reaction products of rice protein hydrolysates with mono-, oligo-
426 and polysaccharides. *Food Hydrocoll.* 30, 53-60 (2013).
- 427 **20.** Hasenhuettl G.L.: Overview of food emulsifiers. In G. L. Hasenhuettl, & R. W. Hartel
428 (Eds.), *Food emulsifiers and their applications*, 2nd ed. (pp. 1-9). New York: Springer
429 (2008).
- 430 **21.** Haynes C.A., Norde W.: Structures and stabilities of adsorbed proteins. *J. Colloid*
431 *Interface Sci.* 169, 313-328 (1995).
- 432 **22.** Martin A.H., Grolle K., Bos M.A., Cohen Stuart M.A., van Vliet, T. Network forming
433 properties of various proteins adsorbed at the air/water interface in relation to foam
434 stability. *J. Colloid Interface Sci.* 254, 175-183 (2002).
- 435 **23.** Dickinson E., Izgi E. Foam stabilization by protein-polysaccharide complexes. *Colloid*
436 *Surf A* 113, 191-201, (1996).

- 437 **24.** Dickinson E.: Emulsion stabilization by polysaccharides and protein–polysaccharide
438 complexes. In A. M. Stephen (Ed.), *Food polysaccharides and their applications* (pp. 501–
439 515). New York: Marcel Dekker, (1995).
- 440 **25.** Miquelim J.N., LAnnes S.C.S., Mazenga R.: pH Influence on the stability of foams with
441 protein–polysaccharide complexes at their interfaces. *Food Hydrocoll*, 24, 398–405
442 (2010).
- 443 **26.** Boye J.I., Aksay S., Roufik S., Ribereau S., Mondor M., Farnworth E., Rajamohamed
444 S.H.: Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein
445 concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food*
446 *Res. Int.* 43(2), 537–546, (2010).
- 447 **27.** Laemmli U. K.: SDS-page Laemmli method. *Nature*, 227, 680-5 (1970).
- 448 **28.** Sathe S. K., Salunkhe D. K.: Functional properties of the great northern bean (*Phaseolus*
449 *vulgaris* L.) proteins: emulsion, foaming, viscosity, and gelation properties. *Journal of*
450 *Food Science*, 46(1), 71-81 (1981).
- 451 **29.** Gülseren İ., Güzey D., Bruce B. D., Weiss, J.: Structural and functional changes in
452 ultrasonicated bovine serum albumin solutions. *Ultrason. Sonochem.* 14(2), 173-183,
453 (2007).
- 454 **30.** Benjamins J., Cagna A., Lucassen-Reynders E. H. Viscoelastic properties of
455 triacylglycerol/water interfaces covered by proteins. *Colloid Surf A.* 114, 245-254,
456 (1996).
- 457 **31.** Guan Y. G., Lin H., Han Z., Wang J., Yu S.J., Zeng X.A., Liu Y.Y., Xu C. H., Sun W.
458 W. Effects of pulsed electric field treatment on a bovine serum albumin–dextran model
459 system, a means of promoting the Maillard reaction. *Food Chem.* 123(2):275–280, (2010)
- 460 **32.** Lertittikul W., Benjakul S., Tanaka M.: Characteristics and antioxidative activity of
461 Maillard reaction products from a porcine plasma protein–glucose model system as
462 influenced by pH. *Food Chem.* 100(2), 669–677, (2007).
- 463 **33.** Kato A. Industrial applications of Maillard-type protein–polysaccharide conjugates. *Food*
464 *Sci. Tech. Res.* 8, 193–199, (2002).
- 465 **34.** Kato Y., Matsuda T., Kato N., Nakamura, R.: Browning and protein polymerization
466 induced by amino-carbonyl reaction of ovalbumin with glucose and lactose. *J. Agric.Food*
467 *Chem.* 36, 806–809, (1988).

468 **35.** Suzuki S., Tsumura N. Isomerization of glucose to fructose. Japan Agricultural Research
469 Quarterly, JARQ, 6(4), 245-248 (1972).

470

471

472

473 **FIGURE CAPTIONS**

474 **Figure 1.** SDS-PAGE analysis of black cumin protein isolates (2%) (Lane 1). Native-
475 PAGE analysis of black cumin-glucose Maillard reaction products (30 min, pH 7 at 100°C) as
476 a function of protein: glucose ratio of 1:1, 1:2, and 1:4 (Lanes 2-4, respectively). Lane 5-7: 1:2
477 protein: glucose ratio 30 min at pH 3, 5 and 7 respectively.

478 **Figure 2.** Foaming capacity (%) and stability of foams prepared with black cumin
479 protein concentrates (2%) and caseinate (2%) as a function of pH (3-7) and time (0-120 min).

480 **Figure 3.** Foaming capacity (%) and stability of foams prepared with black cumin
481 protein isolates (2%) and glucose as a function of protein:sugar ratio (1:1, 1:2 and 1:4), pH (3-
482 7), reaction duration (0-30 min) and time (0-120 min).

483 **Figure 4.** Foaming capacity (%) and stability of foams prepared with black cumin
484 protein isolates (2%) and lactose or maltodextrin at a protein:sugar ratio of 1:2 as a function of
485 pH (3-7), reaction duration (0-30 min) and time (0-120 min).

486 **Figure 5.** RP-HPLC-RID chromatogram of black cumin-glucose Maillard products
487 prepared at a protein:glucose ratio of 1:2 held at (A) 25 °C, (B) 100 °C for 15 min, (C) 100 °C
488 for 30 min.

489 **Figure 6.** Dynamic surface tension of black cumin protein conjugates and the
490 corresponding untreated sample as a function of time (i.e., bubble age) at the air-conjugate
491 dispersion interface. Heat treatment was carried out at 100°C for 15 min at pH 7 and a
492 protein:carbohydrate concentration ratio of 1:2. Drop shape tensiometry was utilized.
493 Representative runs.

494

495

496

497

498 **TABLES**

499 **Table 1.** Glucose binding (%) and fructose formation (%) characteristics in black cumin
 500 protein isolates due to Maillard reaction (100°C) as a function of time at a protein:glucose ratio
 501 of 1:2.

| Time (min) | Concentration after HPLC | | Binding (%) |
|------------|--------------------------|-------------|-------------|
| | Fructose (%) | Glucose (%) | |
| 0 | 0.013±0.01 | 1.319±0.02 | 34.0 |
| 15 | 0.345±0.04 | 0.491±0.07 | 75.5 |
| 30 | 0.230±0.04 | 0.289±0.04 | 85.5 |

502

503

504

505 **Table 2.** Surface elasticity at the Maillard conjugate dispersion-air interface as a
 506 function of oscillatory frequency (Hz). Standar deviation was < 5% of the sample mean in all
 507 cases.

| Sample | Surface elasticity (mN/m) | |
|--------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | Oscillatory Frequency (0.5 Hz) | Oscillatory Frequency (0.1 Hz) |
| Glucose | 5.66 | 6.18 |
| Lactose | 18.28 | 7.71 |
| Maltodextrin | 9.90 | 4.70 |

508

509

510

511

512

513

514

515

516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541

FIGURES

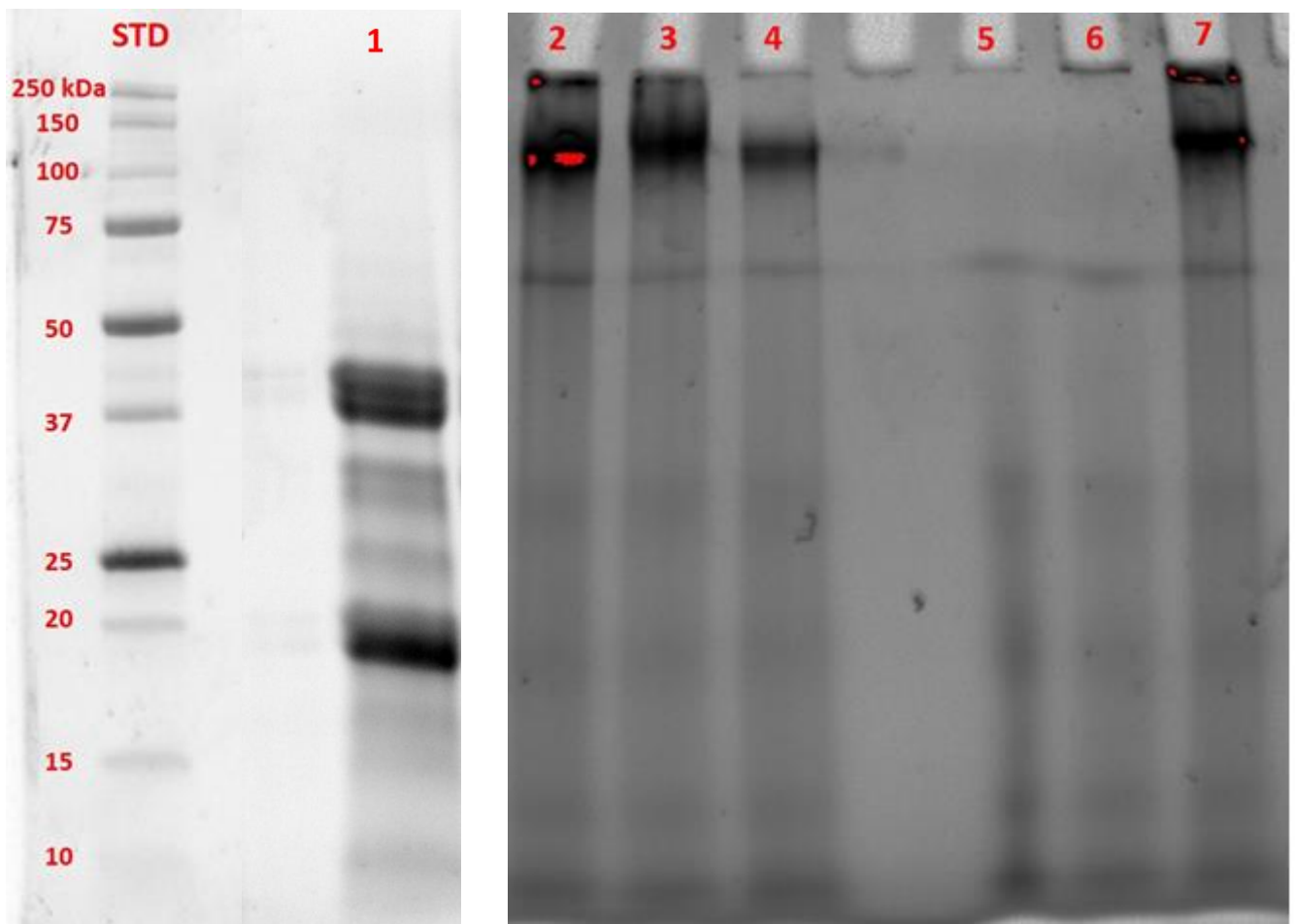
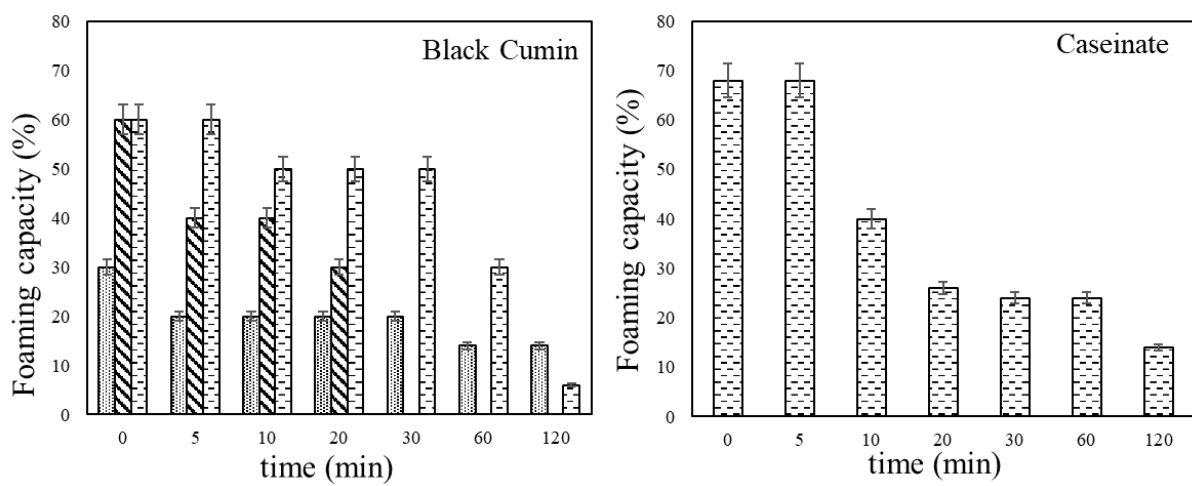


Figure 1

542



543

544

545

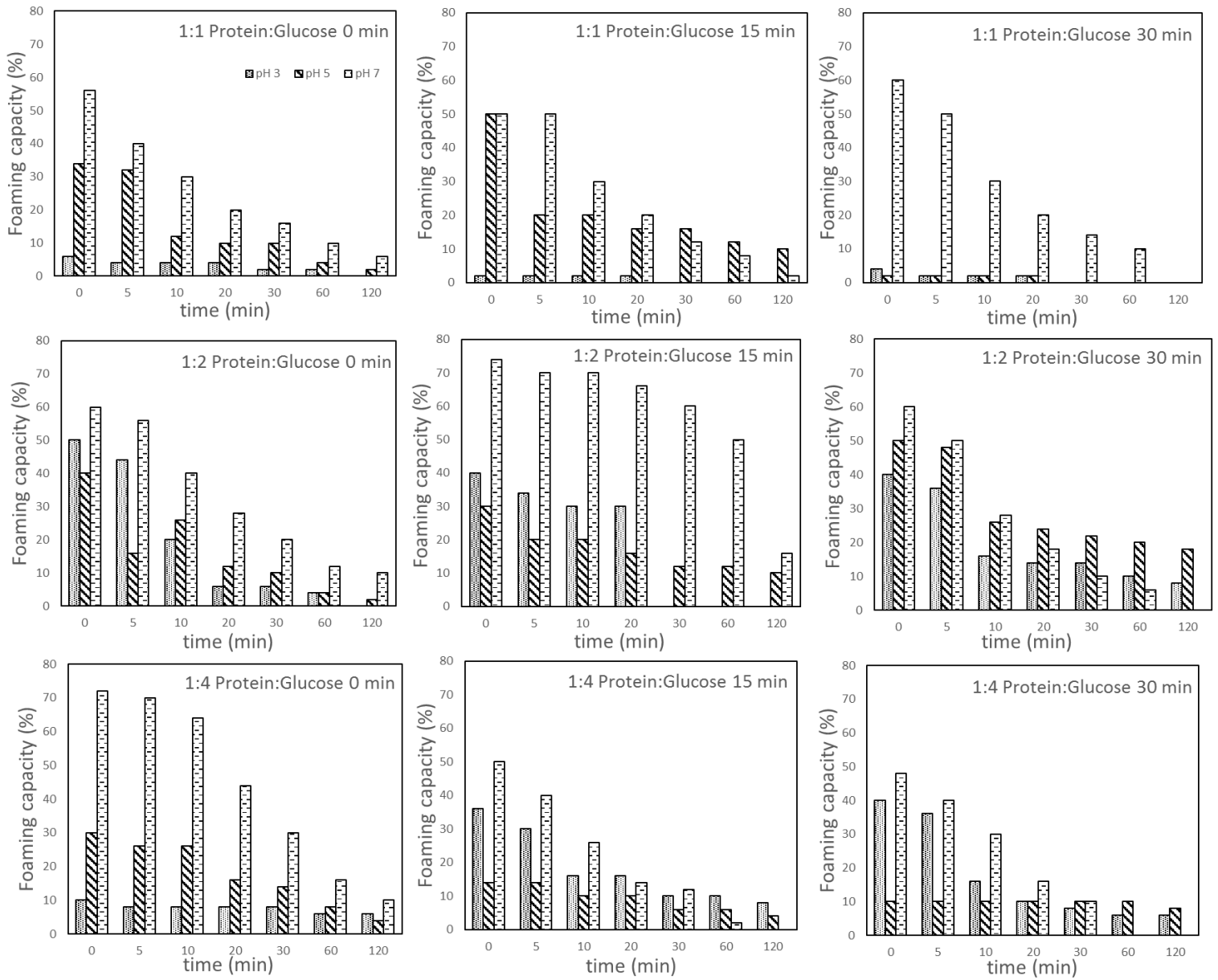
Figure 2

546

547

548

549



550

551 **Figure 3**

552

553

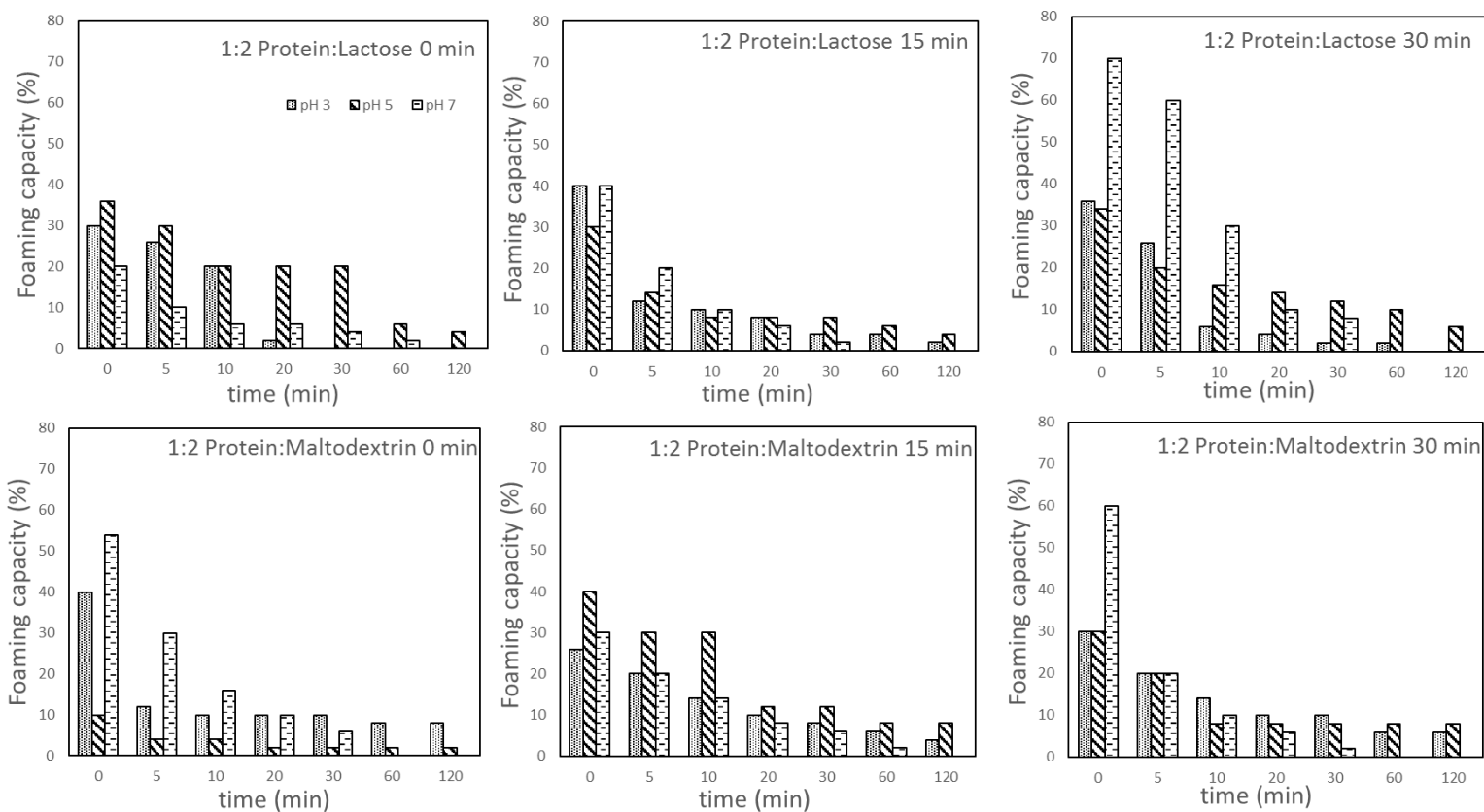
554

555

556

557

558



559

560

Figure 4

561

562

563

564

565

566

567

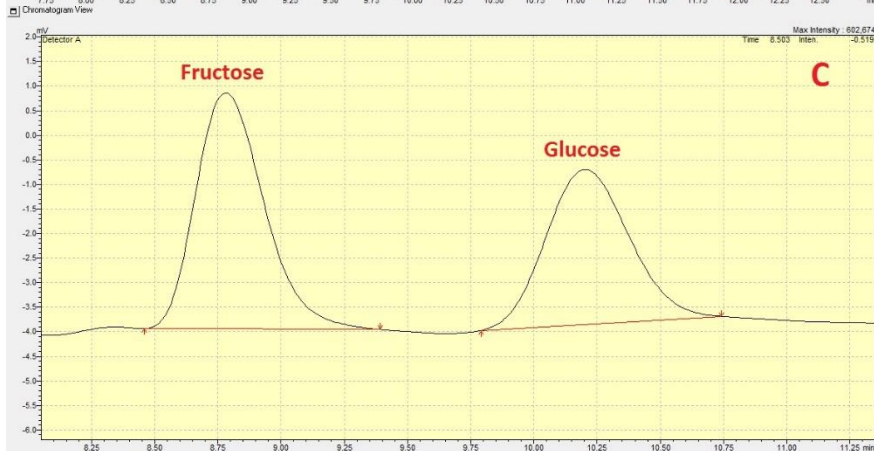
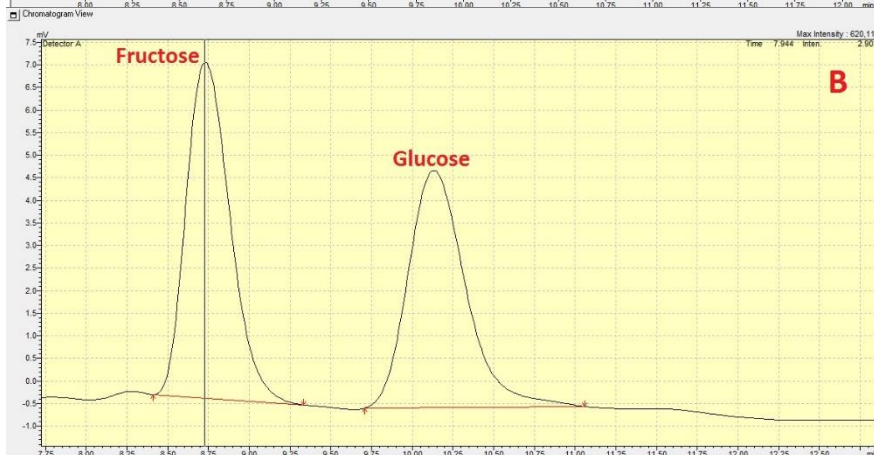
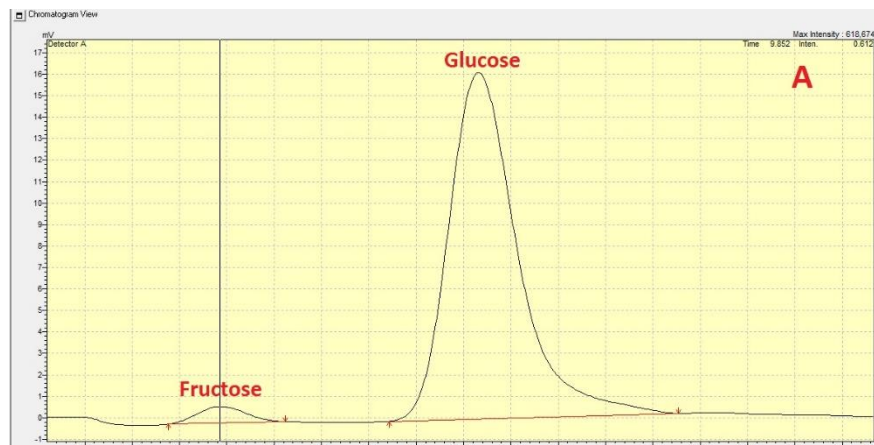
568

569

570

571

572



592

593

Figure 5

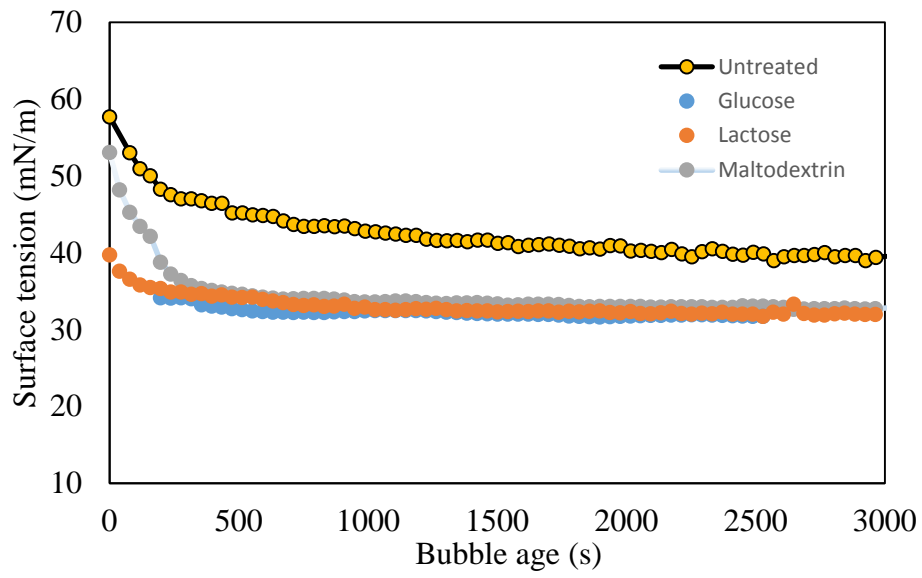
594

595

596

597

598

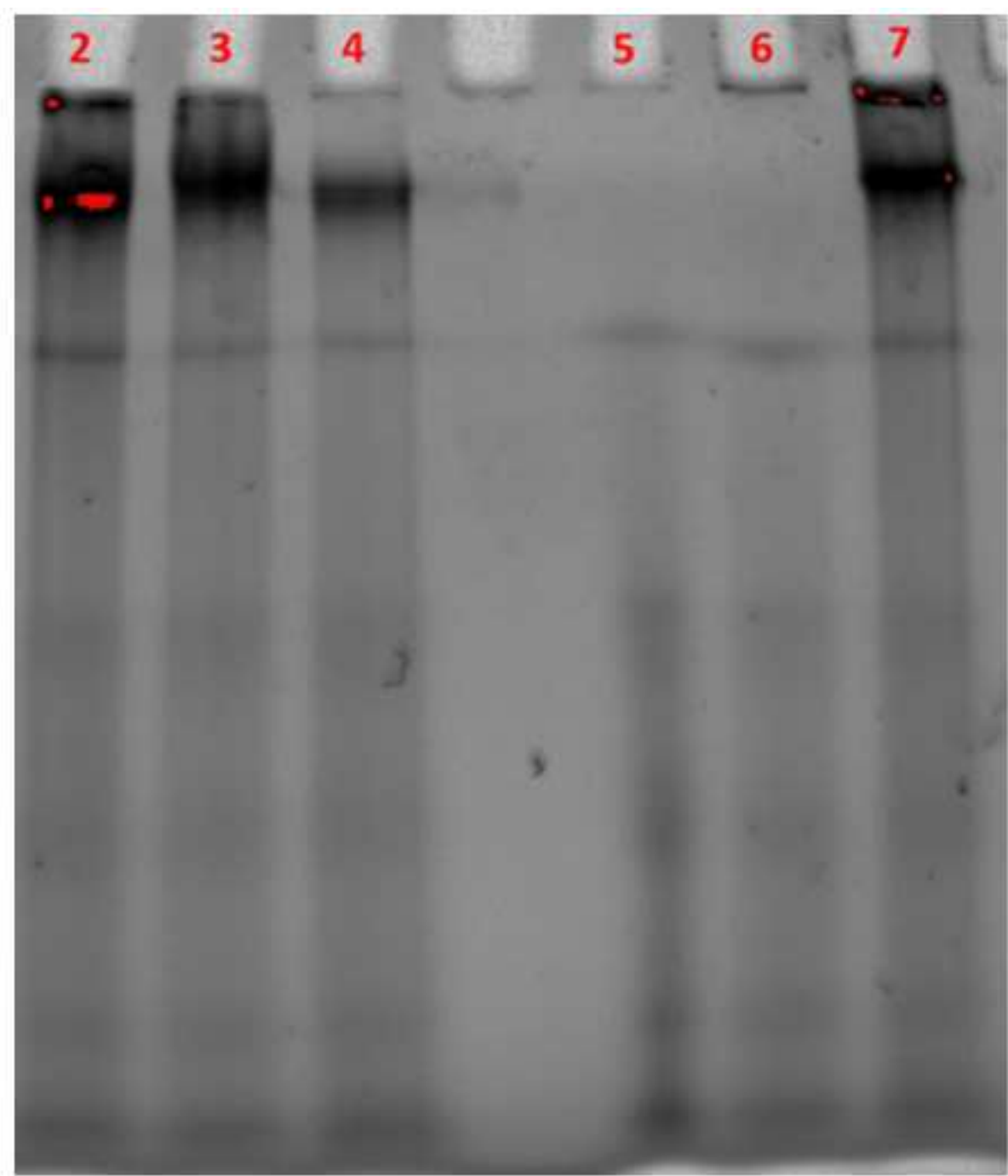
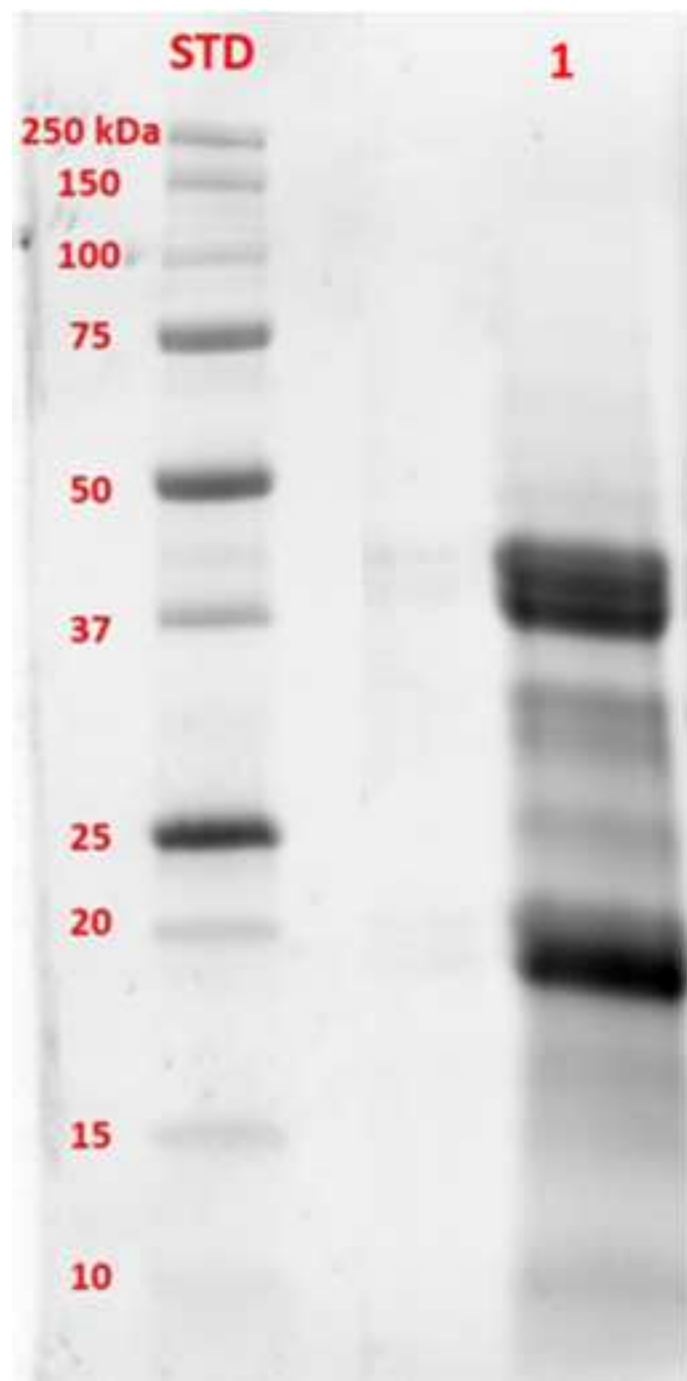


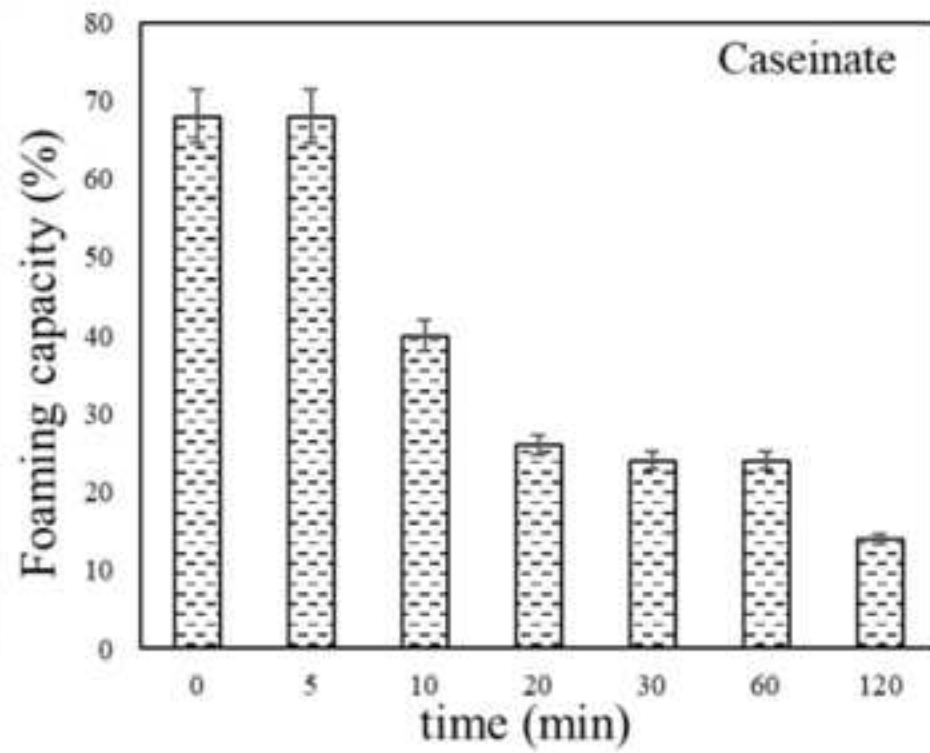
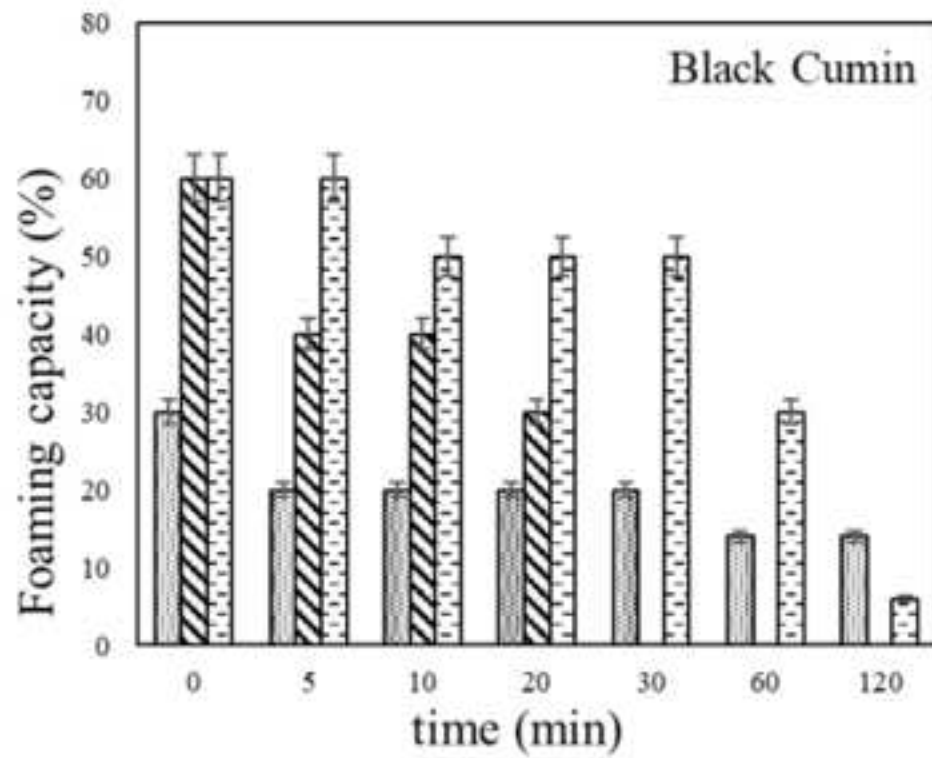
599

600

Figure 6

601





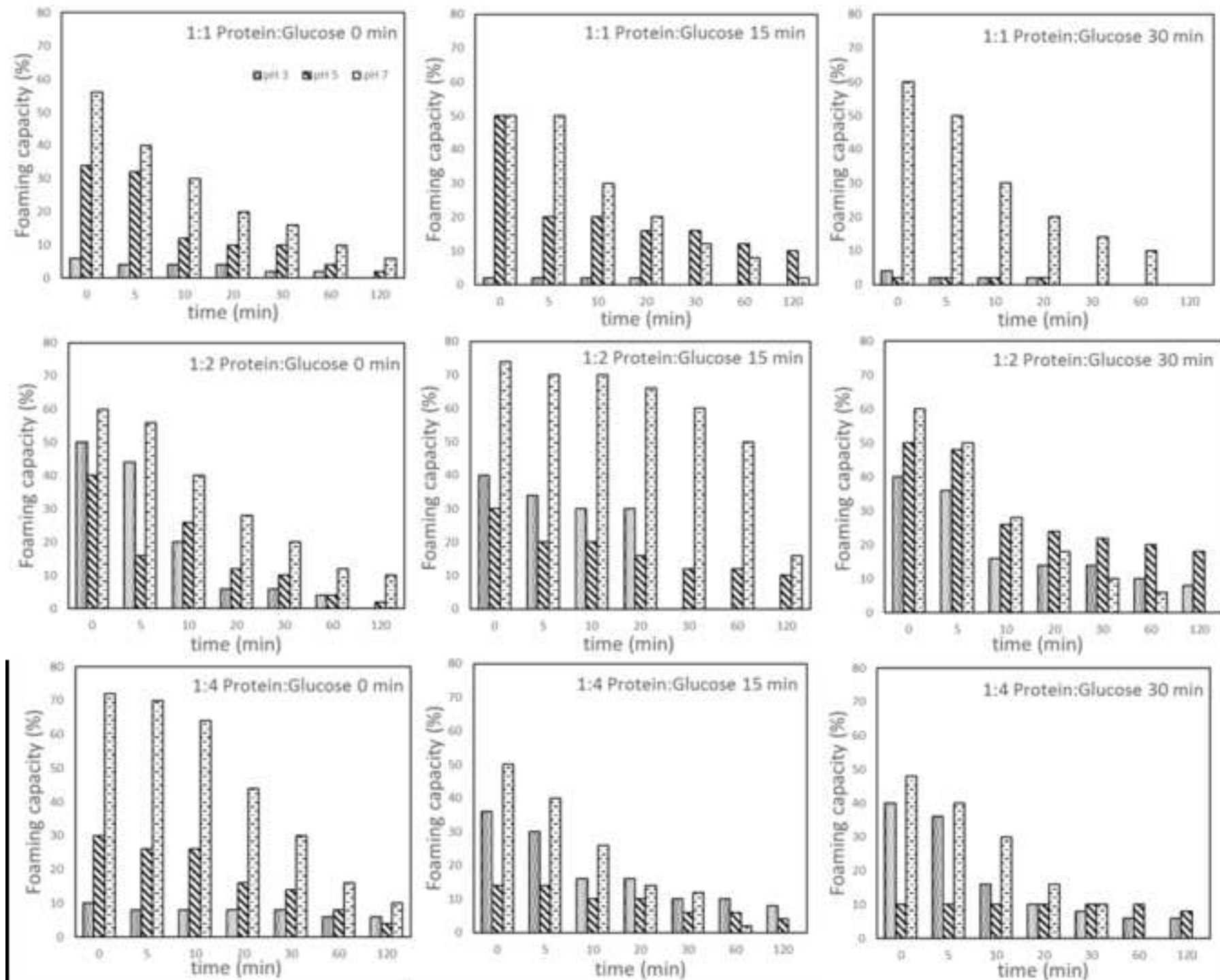
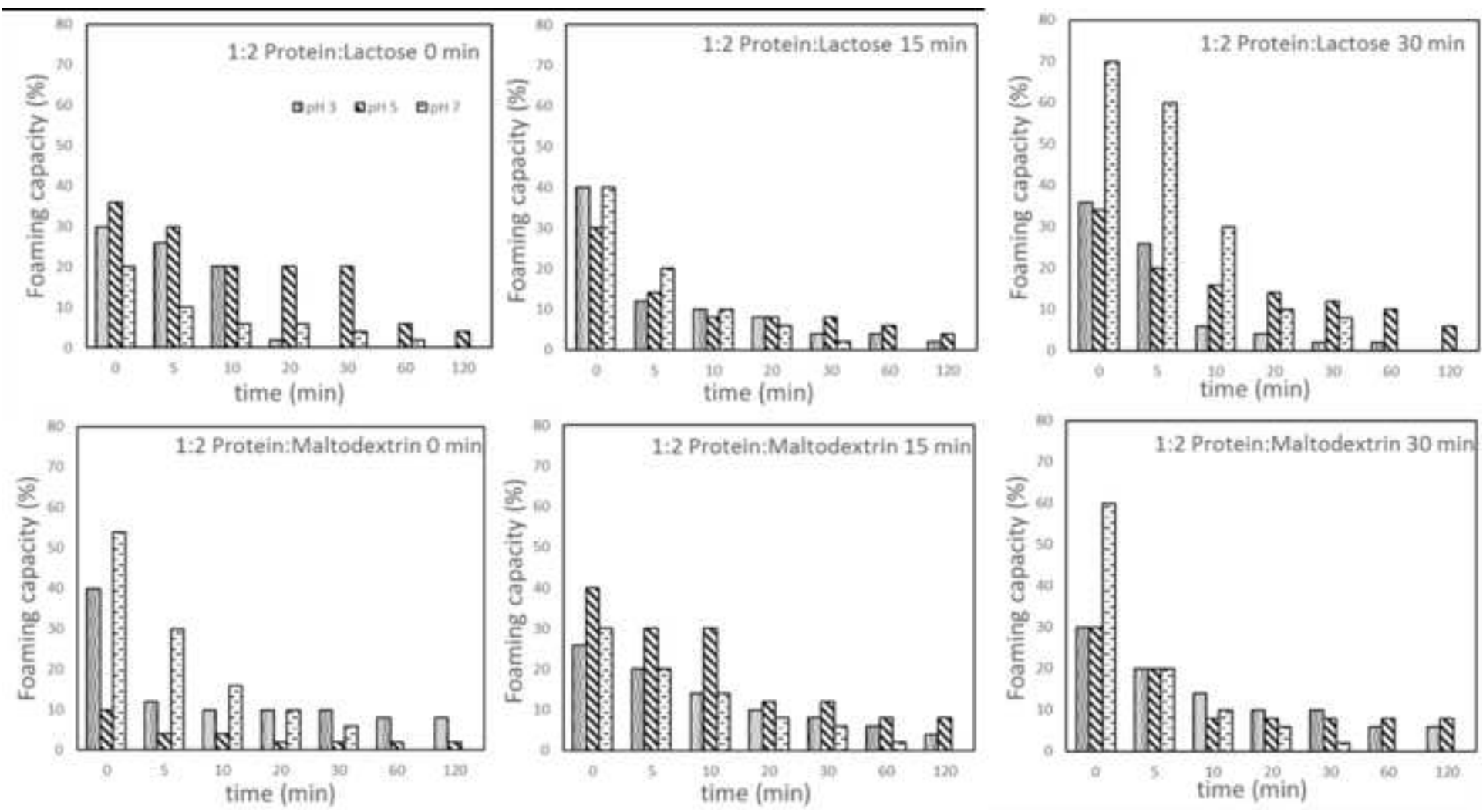
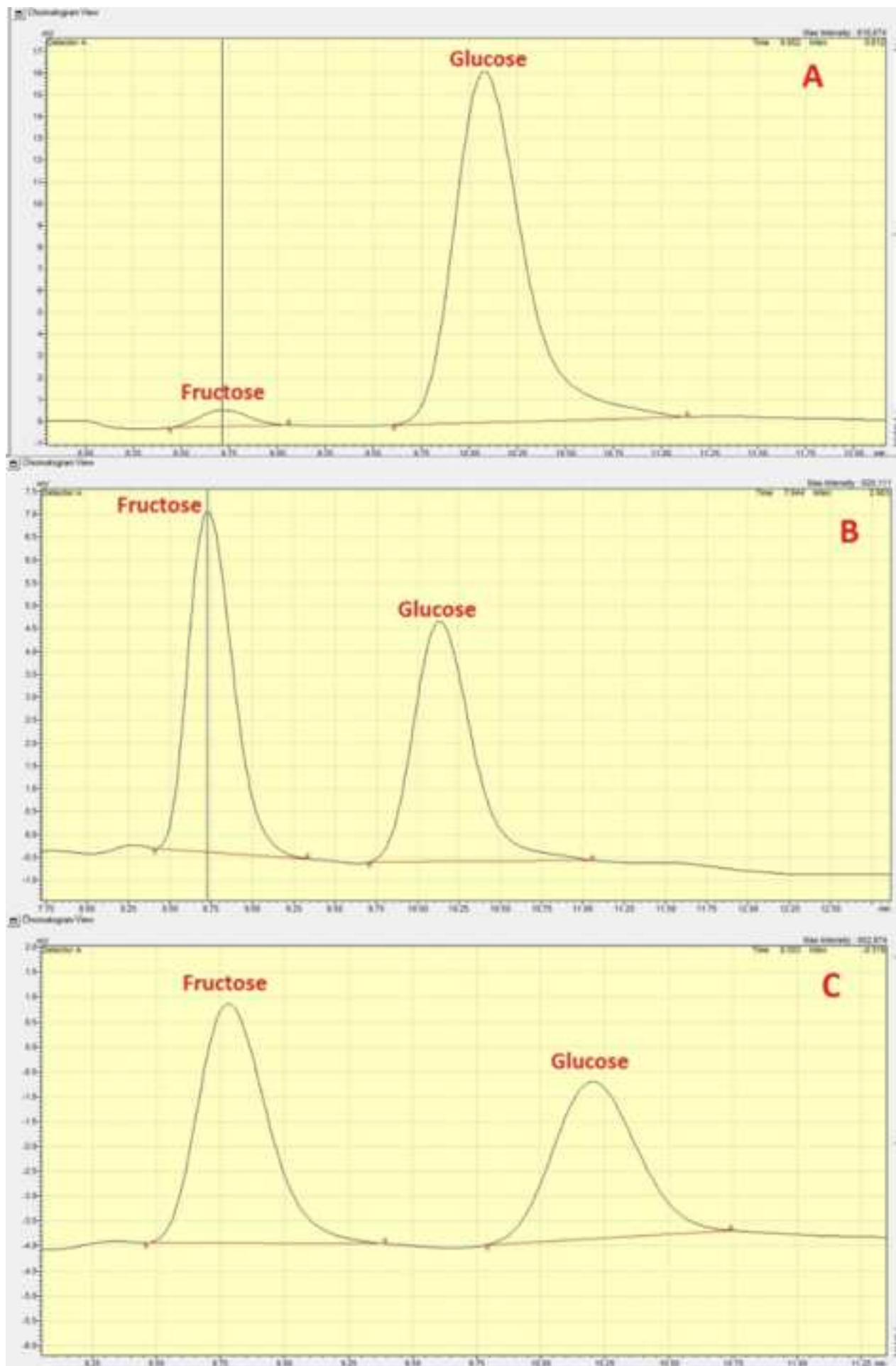
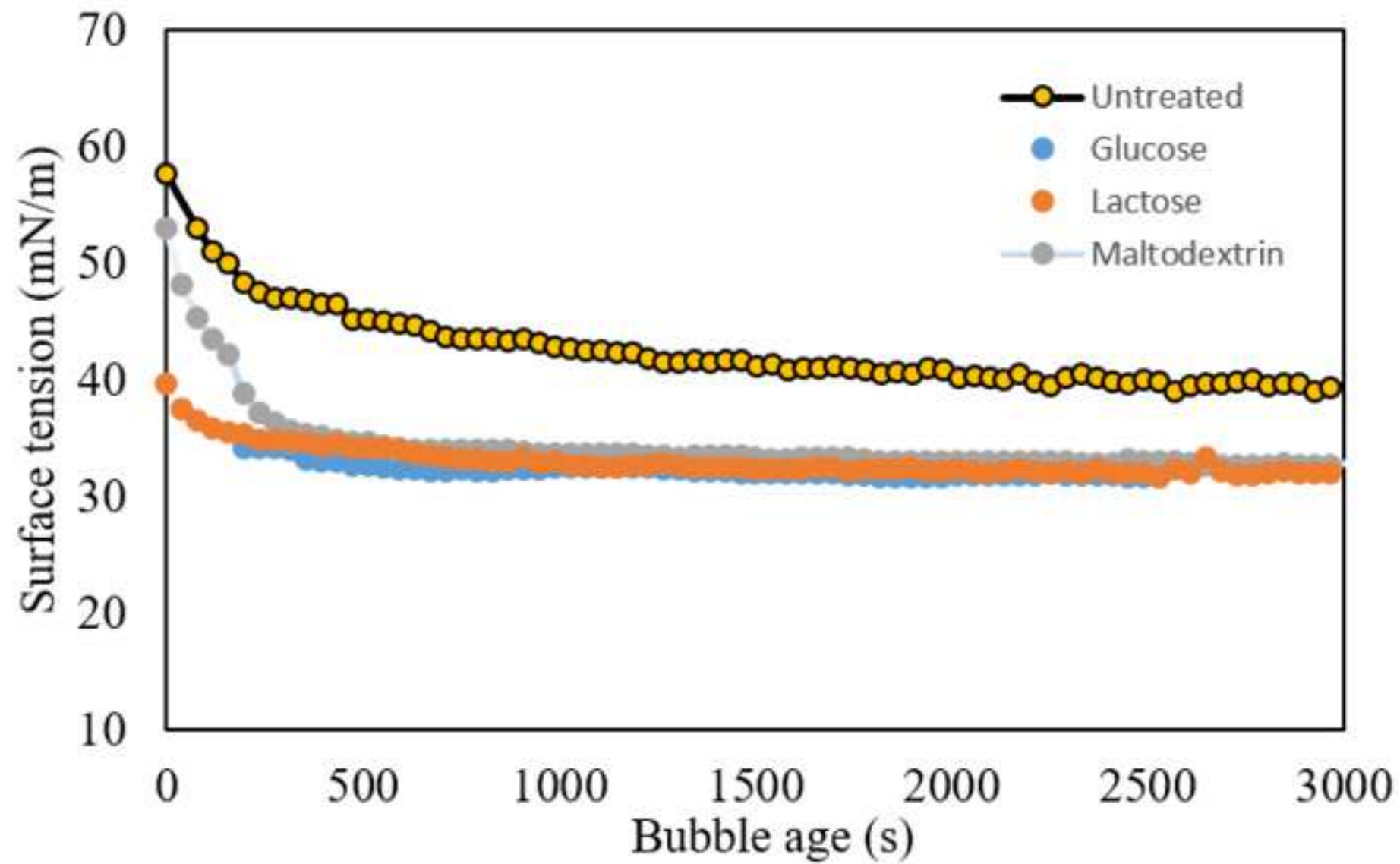


Figure 4



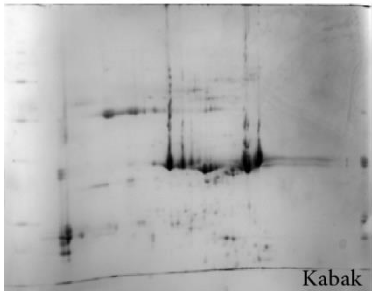
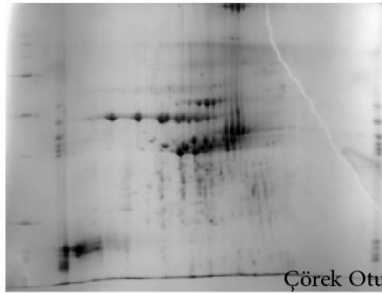
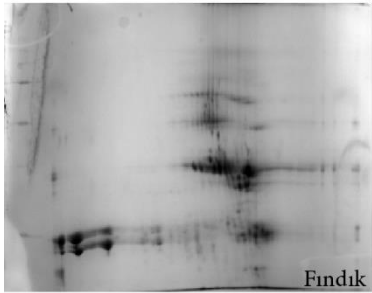
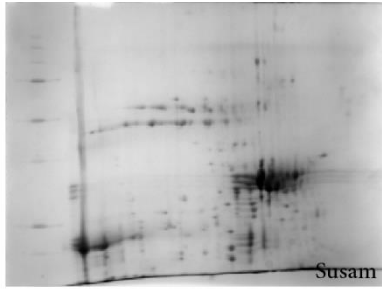
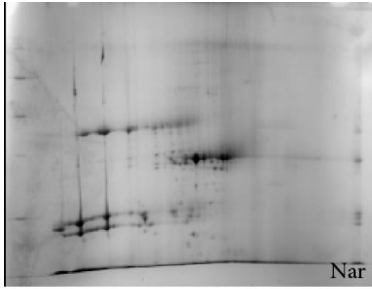


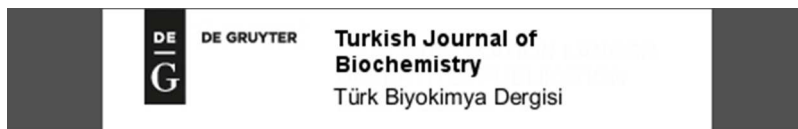


EK 3 – MEVCUT PROTEİN KONSANTRELERİNDE BULUNAN PROTEİNLERİN 2D ELEKTROFORETİK ANALİZİ

Bu çalışmalarda üretilen proteinlerin 2D elektroforetik analizi yürütülmüştür. pH aralığı pH 3-10, moleküler ağırlık aralığı da yaklaşık 20-200 kDa olarak belirlenmiştir.

Burada temel özellikleri (pI ve moleküler ağırlık) belirlenen proteinler, bir sonraki aşamada MALDI-TOF/TOF analizi ve *in silico* yöntemler ile fizikokimyasal özellikleri ve muhtemel biyoaktif etkilerine göre sınıflandırılmaktadır.





In silico ACE and DPP-IV inhibitory activities of ribosomal hazelnut proteins

| | |
|------------------|--|
| Journal: | <i>Turkish Journal of Biochemistry</i> |
| Manuscript ID | Draft |
| Manuscript Type: | research-article |
| Classifications: | Proteins, Bioactive peptides, ACE-inhibitory activity, DPP-IV inhibitory activity |
| Keywords: | Cold press meals, plant protein peptides, common hazelnut, ribosomal proteins, in silico proteolysis |
| | |

SCHOLARONE™
Manuscripts

View Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

***In silico* ACE and DPP-IV inhibitory activities of
ribosomal hazelnut proteins**

Submitted to *Turkish Journal of Biochemistry*

July 21, 2017

For Review Only

1
2
3 30 **Abstract**

4
5 31 **Objective**

6
7 32 In this study, an *in silico* attempt was made to evaluate the biological functionality of
8
9 33 hazelnut (*Corylus avellana* L.) peptides using 3 gastrointestinal (GI) and 3 non-GI
10
11 34 enzymes.

12
13 35 **Methods**

14
15 36 As of March 2017, 469 hazelnut proteins were listed on UniProt database. Here, a
16
17 37 small subset (i.e., 23 ribosomal proteins) was investigated. Using *in silico* proteolysis,
18
19 38 the efficacy of gastrointestinal proteases (i.e., trypsin, pepsin, chymotrypsin)
20
21 39 were compared to various other non-GI proteases such as thermolysin, papain and
22
23 40 bromelain in the generation of bioactive peptides.

24
25 41 **Results**

26
27 42 In most cases, gastrointestinal proteases (i.e., trypsin, pepsin, chymotrypsin) were
28
29 43 shown to be less efficient compared to various other non-GI proteases such as
30
31 44 thermolysin, papain and bromelain in the generation of bioactive peptides. After *in*
32
33 45 *silico* proteolysis, the extent of ACE-inhibitory peptide content (A') accounted for
34
35 46 approximately 5.1, 7.9 and 9.1% of all amino acids present for bromelain, thermolysin
36
37 47 and papain treatments, respectively, while comparable results were obtained for
38
39 48 DPP-IV inhibitory activity (4.8, 8, and 10.9%).

40
41 49 **Conclusion**

42
43 50 In all cases, ACE- and DPP-IV inhibitory activities were dominant. Based on the
44
45 51 current findings, hazelnuts could be considered as a valuable source of bioactive
46
47 52 peptides.

48
49 53
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 54 **Key words:** Cold press meals; plant protein peptides; common hazelnut
4
5 55 (*Corylus avellana* L.); ribosomal proteins; *in silico* proteolysis.
6
7

8 56 **Ribozomal fındık proteinlerinin *in silico* ACE and DPP-IV** 9 10 57 **önleyici aktiviteleri**

11 58 **Özet**

12 59 **Amaç**

13
14
15 60 Bu çalışmada, *in silico* proteoliz kullanılarak fındık (*Corylus avellana* L.)
16
17
18 61 peptitlerinin biyolojik fonksiyonelliğini değerlendirmek amacıyla 3 gastrointestinal (GI)
19
20 62 ve 3 GI olmayan enzim kullanılmıştır.

21 63 **Yöntem**

22
23
24 64 Mart 2017 itibarıyla UniProt veritabanında 469 fındık proteini listelenmiştir. Bu
25
26
27 65 proteinlerden küçük bir alt-grup (23 ribozomal protein) *in silico* proteoliz kullanılarak
28
29 66 incelenmiş ve gastrointestinal proteazların (tripsin, pepsin, kimotripsin) biyoaktif
30
31 67 peptitlerin üretilmesindeki etkinliği termolizin, papain ve bromelain gibi çeşitli diğer GI
32
33 68 olmayan proteazlarla karşılaştırılmıştır.

34 69 **Bulgular**

35
36
37 70 Çoğu durumda GI proteazların (tripsin, pepsin, kimotripsin), biyoaktif
38
39 71 peptidlerin üretilmesinde termolizin, papain ve bromelain gibi GI olmayan proteazlara
40
41 72 kıyasla daha az etkili bulunmuştur. *In silico* proteolizde bromelain, termolizin ve
42
43 73 papain muameleleri için proteinlerde mevcut amino asitlerin sırasıyla yaklaşık % 5.1,
44
45 74 7.9 ve 9.1'i ACE-inhibe edici peptit içeriğini (A') oluştururken DPP-IV inhibisyonu için
46
47 75 de benzer sonuçlar elde edilmiştir (%4.8, 8 ve 10.9).

48 76 **Sonuç**

1
2
3 77 Tüm durumlarda ACE ve DPP-IV inhibisyon aktiviteleri baskın aktivite tipleridir.
4
5 78 Mevcut bulgulara dayanarak fındığın biyoaktif peptit üretimi için değerli bir kaynak
6
7 79 olabileceği anlaşılmaktadır.
8

9
10 80 **Anahtar kelimeler:** Soğuk pres posaları; bitki proteini peptitleri; fındık (*Corylus*
11
12 81 *avellana* L.).
13

14 82

15 83 **Introduction**

16
17
18 84 Plant proteins are a sustainable source of proteins fit for human consumption. The
19
20 85 conversion ratio of plant proteins to animal proteins is approximately 15% [1] which
21
22 86 underlines the importance of plant protein utilization in food systems and other
23
24 87 consumer products, especially since the global demand for protein is constantly
25
26 88 rising. One of the research priorities in our group is the valorization of cold press
27
28 89 deoiled plant meals of oil fruits and oil seeds in order to generate a variety of
29
30 90 economic plant protein products and their hydrolyzates. Since protein content in
31
32 91 these plants are relatively high and proteins are further concentrated upon deoiling,
33
34 92 they represent a viable resource for protein manufacture.
35
36
37
38
39

40 93

41 94 Hazelnuts (*Corylus avellana* L.) are among the major agricultural products of Turkey,
42
43 95 where approximately 80% of the global production is being harvested (roughly
44
45 96 550,000 tonnes per year) [2]. Other Mediterranean countries and western USA are
46
47 97 among the other major producers. While hazelnuts are high in calories due to their oil
48
49 98 content (approx. 60%), a variety of bioactive effects were previously demonstrated.
50
51 99 For example, the cardioprotective effects of hazelnuts were attributed in part to their
52
53 100 mono- and polyunsaturated fatty acid contents, especially that of oleic and linoleic
54
55 101 acids [3]. Polyphenols, tocopherols and squalene are also among the bioactive
56
57
58
59
60

1
2
3 102 compounds of hazelnuts [4-6]. Phytosterols and phytostanols contribute to the
4
5 103 cholesterol lowering and antioxidant properties of hazelnuts [7].
6
7 104

8
9 105 As industrial production of cold press hazelnut oil is increasing, the defatted meal
10
11 106 represents a great potential of valorization (up to 45% protein in the meal, based on
12
13 107 the composition presented in Alphan et al. [8]). Compared to its bioactive
14
15 108 constituents, there is considerably less work on the analysis of hazelnut proteins and
16
17 109 the peptides that could be generated from these proteins. Most of the literature on
18
19 110 hazelnut proteins were focused on the reduction of food allergies [9-11], while the
20
21 111 relative digestive stability of hazelnut allergens were found to be lower compared to
22
23 112 peanut allergens [10]. Aydemir et al. [12] carried out a detailed study on the bioactive
24
25 113 and mechanical properties of isolated hazelnut meal proteins, where the isolates
26
27 114 were shown to demonstrate antioxidative, anti-carcinogenic and anti-hypertensive
28
29 115 properties.
30
31
32
33

34 116
35
36 117 In foods, a wide variety of bioactivities were demonstrated by protein hydrolysates
37
38 118 from dairy, plant, fungal, marine etc. resources, including ACE- and DPP-IV inhibitory
39
40 119 activities. Angiotension I-converting enzyme (ACE) converts angiotensin I to
41
42 120 angiotension II, which is a vasoconstrictor. In addition, ACE hydrolyzes bradykinin,
43
44 121 which is a vasodilator. Consequently, ACE action elevates blood pressure in humans
45
46 122 [13-14]. ACE-inhibitory peptides have the capabilities of reducing blood pressure and
47
48 123 the likelihood of hypertension [14]. Although bioactive peptides are usually not as
49
50 124 efficient as synthetic drug molecules, due to the absence of pronounced side effects,
51
52 125 they can conveniently be utilized in functional foods or food supplements [15].
53
54
55

56 126
57
58
59
60

1
2
3 127 Similarly, dipeptidyl protease IV (DPP-IV) is a critical enzyme that takes place in a
4
5 128 variety of biochemical reactions. Based on its proteolytic activities, for example, DPP-
6
7 129 IV causes the activation or inactivation of peptides. For example, due to DPP-IV
8
9 130 action, the inactivation of incretin hormones that are utilized in the treatment of Type-
10
11 131 2 diabetes takes place. In order to prevent this reaction, a variety of synthetic DPP-IV
12
13 132 inhibitors are commercially available. Once again, a preferred treatment could be the
14
15 133 utilization of bioactive peptides instead of synthetic inhibitors [16].
16
17

18 134 In this study, an attempt was made to predict the potential bioactivities of peptides
19
20 135 generated from hazelnut proteins *in silico* using both gastrointestinal and non-
21
22 136 gastrointestinal enzymes. Due to the large amount of hazelnut proteins that were
23
24 137 listed in the current protein databases, a representative subset (i.e., ribosomal
25
26 138 proteins) of proteins were investigated in this first report. Due to the promising results
27
28 139 presented here, a comprehensive *in vitro* study on the influence of proteolysis on
29
30 140 bioactivities and allergenic characteristics of hazelnut proteins is currently being
31
32 141 planned.
33
34
35

36 142

38 143 **Methods**

40 144 **Sequences of ribosomal hazelnut proteins**

41
42
43 145 The primary sequences of the ribosomal hazelnut proteins were obtained from
44
45 146 UniProtKB database (<http://www.uniprot.org>) on March 10th, 2017. Ribosomal
46
47 147 proteins represented 23 out of 469 proteins for the common hazelnut (*Corylus*
48
49 148 *avellana* L.) on this database. The basic data including the names, accession
50
51 149 numbers and number of amino acids in each protein were listed on Table 1.
52

53 150

56 151 ***In silico* proteolysis and the analysis of bioactive sequences**

1
2
3 152 *In silico* proteolysis of the ribosomal hazelnut proteins were carried out using the
4
5 153 “enzyme action” tool of the BIOPEP webserver
6
7 154 (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>) [17]. Based on the general
8
9
10 155 proteolytic characteristics of every enzyme, BIOPEP predicts the fragments that will
11
12 156 be generated from every input sequence. Consequently, for every input sequence,
13
14 157 an output sequence with varying number of peptides is computed [17].
15

158

159 Proteolytic simulations were conducted separately using 6 different proteases for
160 each protein listed on Table 1. These enzymes were 3 gastrointestinal proteases
161 (trypsin, chymotrypsin and pepsin) and 3 proteases from other resources
162 (thermolysin, bromelain and papain). This selection was based on the previous work
163 of Udenigwe et al. [18]. For every enzyme, the fragments were analyzed for bioactive
164 properties based on the “profiles of biological activity tool” [17]. BIOPEP database
165 provides cataloging of previously determined bioactive peptides and compares the
166 input fragments to the listed active sequences in order to determine the bioactive
167 potential.

168

169 Almost in all cases, the ACE and DPP-IV inhibitory properties were dominant and
170 were reported here in detail. The number of bioactive sequences, total number of
171 amino acids in these bioactive sequences and their corresponding % frequencies
172 compared to the total number of amino acids in each protein were determined.

173

174 **Peptide ranking and bioactivity prediction**

175 For all sequences generated in the previous section (“*In silico* proteolysis and the
176 analysis of bioactive sequences”), PeptideRanker score was computed

1
2
3 177 (PeptideRanker in the Bioware webserver at
4
5 178 <http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb> hosted by the University College,
6
7 179 Ireland) [19]. Based on the previous literature, PeptideRanker determines the
8
9
10 180 likelihood of bioactivity to occur in a given sequence based on established structure–
11
12 181 function patterns. This output, however, is not bioactivity specific and expresses the
13
14 182 potential of being bioactive for every input sequence. A PeptideRanker score
15
16 183 between 0 and 1 was assigned to every input sequence, where higher scores
17
18 184 represented increasing possibility of being bioactive. Since a score of 0.5
19
20 185 represented 50% likelihood of being bioactive, the number of sequences with a score
21
22 186 of ≥ 0.5 were determined. Furthermore, the total number of amino acids in these
23
24 187 sequences and their corresponding % frequencies in their parent proteins were also
25
26 188 calculated.
27
28
29
30 189

31 190 **Results and Discussion**

32
33
34 191 The basic information about the ribosomal proteins of the hazelnut including their
35
36 192 names, number of residues they contain and accession numbers were summarized
37
38 193 on Table 1. The number of residues in the proteins ranged between 25 and 286
39
40 194 amino acids and the average number of amino acids in 23 ribosomal proteins was
41
42 195 133.3 residues per protein. The amino acid sequences of these proteins were
43
44 196 exported from the UniProt database and utilized in further analysis.
45
46
47
48 197

49 198 Using BIOPEP [17], 23 different proteins were treated individually with different
50
51 199 proteases *in silico*. Three of these enzymes were gastrointestinal (GI) enzymes
52
53 200 (pepsin, trypsin, and chymotrypsin), whereas the other three enzymes were non-
54
55 201 gastrointestinal enzymes (bromelain, thermolysin, and papain). Since non-GI
56
57
58
59
60

1
2
3 202 enzymes can be utilized in the manufacture of bioactive peptides [20], these
4
5 203 enzymes were included in the current study. In all cases, enzymatic action generated
6
7 204 multiple peptides from each protein. Peptide sequences that contained two or more
8
9 205 amino acids were recorded for further analysis, whereas single amino acid
10
11 206 sequences were not taken into account.

12
13
14 207

15
16 208 Using the “profiles of biological activity tool” on BIOPEP [17], the potential
17
18 209 bioactivities of all peptide fragments were analyzed (Table 2-4; Figure 1). In
19
20 210 approximately all cases (>90%), the dominant bioactivities were ACE- and/or DPP-IV
21
22 211 inhibition unless the peptide fragments exhibited no bioactivity. Among all 178 cases
23
24 212 (23 proteins x 6 enzymes), in only 44 cases (31.9%) antioxidant activity was
25
26 213 predicted. Antioxidant activity was generally due to multifunctional dipeptides such as
27
28 214 IR, which also could demonstrate ACE- and DPP-IV inhibitory activities, whereas the
29
30 215 antioxidative dipeptide LK was also commonly observed in the current analyses.

31
32
33
34 216

35
36 217 Potential ACE- and/or DPP-IV inhibitory activities of the ribosomal proteins were
37
38 218 reported on Table 2 and 3, respectively. The theoretical frequency of ACE-inhibitory
39
40 219 peptides (A) ranged between 16.67 and 50.23 (Table 2). The relation between A and
41
42 220 B values were relatively weak as also reported by Minkiewicz et al. [17] in both cases
43
44 221 (Tables 2 & 3). However, theoretical A values were higher for DPP-IV inhibitory
45
46 222 activity (50.68 to 76.34) and the corresponding B values were considerably lower
47
48 223 compared to ACE-inhibitory counterparts. In all cases, as expected, after the
49
50 224 proteolysis, the frequency of released bioactive peptides (A') were much lower
51
52 225 compared to the theoretical values (A). Using the gastrointestinal (GI) proteases, the
53
54 226 frequency of released ACE peptides ranged between 1.33-2.5%, whereas a

1
2
3 227 considerably higher frequency took place with the non-GI proteases (5.07-9.09)
4
5 228 (Table 2). Similar results were obtained for DPP-IV inhibitory activity, although the
6
7 229 frequency values were generally higher (Table 3). Consequently, DPP-IV inhibitory
8
9 230 activity was the dominant activity, followed by ACE-inhibitory activity, while the
10
11 231 antioxidative activity was determined to be a distant third category. All the other
12
13 232 bioactivities were observed in much lower frequencies (data not shown).

14
15
16 233 As an example, on Figure 1, the distribution of DPP-IV inhibitory sequences in the
17
18 234 papain hydrolysate of ribosomal protein S7 was reported. In this particular case, all
19
20 235 the active sequences were composed of dipeptides, which was not necessarily the
21
22 236 case for all digests.

23
24
25 237

26
27 238 Finally using PeptideRanker [19], all peptide sequences generated by enzymatic
28
29 239 actions (Tables 2 and 3) were analyzed for their potential bioactivities regardless of
30
31 240 the type of bioactive action predicted by BIOPEP. On Table 4, the average number of
32
33 241 bioactive peptides on each protein, their corresponding average number of residues
34
35 242 and % of bioactive residues in comparison to the size of each protein were listed. In
36
37 243 this computation, a bioactive peptide was defined as “a sequence that has a $\geq 50\%$
38
39 244 probability of being bioactive” based on its PeptideRanker score [19]. Once again,
40
41 245 the number of potentially bioactive sequences for non-GI enzymes was higher than
42
43 246 GI proteases, which implied that non-GI hydrolysates could also be more bioactive
44
45 247 for all sorts of bioactive functions including ACE- and DPP-IV inhibitory activities.
46
47 248 However, when the number of amino acids and their corresponding % frequencies in
48
49 249 these digests were compared (Table 4), there were no clear trends which implied that
50
51 250 some of the larger peptides generated by the GI proteases could be expected to
52
53 251 demonstrate bioactivity as well. For example, some of the antimicrobial peptides tend
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 252 to be larger but still demonstrate activity, since their antimicrobial function does not
4
5 253 necessitate digestion and absorption [21]. That could imply that GI peptides could
6
7 254 demonstrate some additional activities as well. Meanwhile the majority of peptides
8
9 255 generated by non-GI proteases were small peptides as exemplified on Figure 1. The
10
11 256 data were also illustrated in further detail on Figure 2. In the majority of cases, papain
12
13 257 was the most effective protease for the generation of bioactive peptides both in terms
14
15 258 of the number of bioactive peptides (Figure 2A) and the % frequency of bioactive
16
17 259 proteins (Figure 2B) compared to their corresponding parent sequences (Table 1).
18
19
20
21 260

22 261 **Conclusion**

23
24
25 262 In this first report, the potential bioactivities of ribosomal hazelnut proteins were
26
27 263 investigated. In the majority of cases, non-GI-proteases (especially papain) were
28
29 264 more effective than GI-proteases in the generation of bioactive peptides. Again, in
30
31 265 most cases, DPP-IV inhibitory activity, followed by ACE-inhibitory activity were the
32
33 266 most probable bioactive properties. To some extent, antioxidative activity could also
34
35 267 be observed, whereas all the other bioactivities were thought to be less frequent.
36
37
38 268

39
40
41 269 Compared to the recent work of Udenigwe et al. [18], ribosomal hazelnut proteins
42
43 270 had a higher frequency of DPP-IV inhibitory peptides than most food proteins (egg,
44
45 271 soy and milk proteins), whereas ACE-inhibitory peptide contents were relatively lower
46
47 272 (i.e., approx. 60% ACE inhibitors for beta-casein vs 16.67 to 50.23% for hazelnut
48
49 273 proteins). Compared to RuBisCO proteins as well [18], frequency of released
50
51 274 bioactive peptides were generally higher, although the global abundance of hazelnut
52
53 275 proteins are considerably lower. Based on the current findings, the common hazelnut
54
55 276 could be considered as a valuable source of bioactive peptides.
56
57
58
59
60

277

Conflict of Interest

The author declares that he has no competing interests.

280

281

282

References

1. Day L. Proteins from land plants–potential resources for human nutrition and food security. Trends Food Sci Tech 2013;32(1):25-42.

2. Ozdemir F, Akinci İ. Physical and nutritional properties of four major commercial Turkish hazelnut species. J Food Eng 2004;63:341-347.

3. Parcerisa J, Richardson DG, Magdalena R, Codony R, Boatella J. Fatty acid distribution in polar and nonpolar lipid classes of hazelnut oil (*Corylus avellana* L.). J Agric Food Chem 1997;45:3887-90.

4. Alasalvar C, Amaral JS, Shadidi F. Functional lipid characteristics of Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). J Agric Food Chem 2006; 54:10177-83.

5. Alasalvar C, Amaral JS, Satır G, Shadidi F. Lipid characteristics and essential minerals of native Turkish hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.). Food Chem 2009; 113:919-925.

6. Dogan A, Siyakus G, Severcan F. FTIR spectroscopic characterization of irradiated hazelnut (*Corylus avellana* L.). Food Chem 2007;100:1106-14.

7. Miraliakbari H, Shahidi F. Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. Food Chem 2008;111(2):421-427.

- 1
2
3 300 **8.** Alphan E, Pala M, Akurt F, Yilmaz T. Nutritional composition of hazelnuts and its
4
5 301 effects on glucose and lipid metabolism. In: IV International Symposium on Hazelnut
6
7 302 445 (pp. 305-310),1996.
8
9
10 303 **9.** Ortolani C, Ballmer-Weber BK, Hansen KS et al. Hazelnut allergy: a double-blind,
11
12 304 placebo-controlled food challenge multicenter study. J Allergy Clin Immun 2000;
13
14 305 105(3):577-581.
15
16 306 **10.** Vieths S, Reindl J, Mller U, Hoffmann A, Hausteiner D. Digestibility of peanut and
17
18 307 hazelnut allergens investigated by a simple *in vitro* procedure. Eur Food Res
19
20 308 Tech 1999;209(6):379-388.
21
22
23 309 **11.** Flinterman AE, Akkerdaas JH, Knulst AC, Van Ree R, Pasmans SG. Hazelnut
24
25 310 allergy: from pollen-associated mild allergy to severe anaphylactic reactions. Curr
26
27 311 Opin Allergy Clin Immunol 2008;8(3):261-265.
28
29
30 312 **12.** Aydemir LY, Gkbulut AA, Baran Y, Yemeniciolu A. Bioactive, functional and
31
32 313 edible film-forming properties of isolated hazelnut (*Corylus avellana* L.) meal
33
34 314 proteins. Food Hydrocoll 2014;36:130-142.
35
36 315 **13.** Hartmann R, Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from
37
38 316 research to food applications. Curr Opin Biotech 2007;18(2):163-169.
39
40 317 **14.** Vermeirssen V, Van Camp J, Verstraete W. Bioavailability of angiotensin I
41
42 318 converting enzyme inhibitory peptides. Br J Nutr 2004;92:357-366.
43
44
45 319 **15.** Li G, Liu H, Shi Y, Le G. Direct spectrophotometric measurement of angiotensin-
46
47 320 I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. J Pharm
48
49 321 Biomed Anal 2005;37:219-224.
50
51
52 322 **16.** Lacroix IM, Li-Chan EC. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein
53
54 323 hydrolysates. Int Dairy J 2012;25(2):97-102.
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 324 **17.** Minkiewicz P, Dziuba J, Iwaniak A, Dziuba M, Darewicz M. BIOPEP database
4
5 325 and other programs for processing bioactive peptide sequences. J AOAC Int
6
7 326 2008a;91:965-980.
8
9
10 327 **18.** Udenigwe CC, Gong M, Wu S. *In silico* analysis of the large and small subunits of
11
12 328 cereal RuBisCO as precursors of cryptic bioactive peptides. Process
13
14 329 Biochem 2013;48(11):1794-99.
15
16 330 **19.** Mooney C, Haslam NJ, Pollastri G, Shields DC. Towards the improved discovery
17
18 331 and design of functional peptides: common features of diverse classes permit
19
20 332 generalized prediction of bioactivity. PLoS ONE 2012;7(10):e45012.
21
22
23 333 **20.** Gobbetti M, Stepaniak L, De Angelis M, Corsetti A, Di Cagno R. Latent bioactive
24
25 334 peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy
26
27 335 processing. Crit Rev Food Sci Nutr 2002;42(3): 223-239.
28
29
30 336 **21.** Minkiewicz P, Dziuba J, Darewicz M, Iwaniak A, Dziuba M, Nałecz D. Food
31
32 337 peptidomics. Food Tech Biotech 2008b;46(1):1-10.
33
34
35 338
36
37 339
38
39 340
40
41 341
42
43 342
44
45 343
46
47 344
48
49 345
50
51 346
52
53 347
54
55 348
56
57 349
58
59 350
60

1
2
3 351
4 352
5
6 353
7
8 354
9 355
10
11 356
12
13 357
14 358
15
16 359
17
18 360
19
20 361
21 362
22 363

TABLES

Table 1. Randomly assigned order numbers, accession numbers for protein databases and lengths of ribosomal proteins from the common hazelnut (*Corylus avellana* L.).

| Order Number | UniProtKB Swiss-Prot or TrEMBL Accession Number | Protein names | Number of amino acids |
|--------------|---|--------------------------------------|-----------------------|
| 1 | Q9TGB0 | Ribosomal protein small 3 (Fragment) | 25 |
| 2 | A0A1I9RG92 | Ribosomal protein S19 | 92 |
| 3 | A0A1I9RG90 | Ribosomal protein L23 | 93 |
| 4 | A0A1I9RG93 | Ribosomal protein S12 | 124 |
| 5 | A0A1I9RG73 | Ribosomal protein S7 | 155 |
| 6 | A0A1I9RG76 | Ribosomal protein L32 | 56 |
| 7 | A0A1I9RG53 | Ribosomal protein S18 | 101 |
| 8 | A0A1I9RG91 | Ribosomal protein L2 | 286 |
| 9 | A0A1I9RG19 | Ribosomal protein S16 | 65 |
| 10 | A0A1I9RG65 | Ribosomal protein L14 | 122 |
| 11 | A0A1I9RG35 | Ribosomal protein S4 | 201 |
| 12 | A0A1I9RG66 | Ribosomal protein L16 | 136 |
| 13 | A0A1I9RG31 | Ribosomal protein S14 | 100 |
| 14 | A0A1I9RG67 | Ribosomal protein S3 | 219 |
| 15 | A0A1I9RG62 | Ribosomal protein S11 | 138 |
| 16 | A0A1I9RG70 | Ribosomal protein L2 | 287 |
| 17 | A0A1I9RG52 | Ribosomal protein L33 | 73 |
| 18 | A0A1I9RG25 | Ribosomal protein S2 | 241 |
| 19 | A0A1I9RG63 | Ribosomal protein L36 | 42 |
| 20 | A0A1I9RG68 | Ribosomal protein L22 | 169 |
| 21 | A0A1I9RG85 | Ribosomal protein S15 | 90 |
| 22 | A0A1I9RG64 | Ribosomal protein S8 | 134 |
| 23 | A0A1I9RG54 | Ribosomal protein L20 | 117 |

364
365

366
367
368
369
370
371
372

373 **Table 2.** The extent (%) of released ACE-inhibitory peptides from ribosomal proteins
374 of the common hazelnut (*Corylus avellana* L.) by the utilization of various proteases.
375 *In silico* proteolysis of 23 ribosomal hazelnut proteins was carried out using 6
376 different proteases. Comparison to the theoretical frequency of bioactive residues (A,
377 %) and potential bioactivity of protein fragments (B, μM^{-1}) were also carried out. The
378 abbreviation “nd” stands for “not detected”.

| Number | A (%) | B (μM^{-1}) | Trypsin | Pepsin | Chymotrypsin | Bromelain | Thermolysin | Papain |
|--------------------|-------|--------------------------|---------|--------|--------------|-----------|-------------|--------|
| 1 | 40.00 | 0.0121 | nd | 8.00 | nd | 20.00 | 8.00 | 28.00 |
| 2 | 39.13 | 0.0114 | nd | 2.17 | 2.17 | 6.52 | 6.52 | 4.35 |
| 3 | 41.94 | 0.0133 | 2.15 | nd | nd | 2.15 | 12.90 | 11.83 |
| 4 | 41.94 | 0.0201 | 3.23 | nd | nd | 8.87 | 8.87 | 15.32 |
| 5 | 43.23 | 0.0163 | 1.29 | 1.29 | 7.10 | 9.03 | 7.74 | 12.90 |
| 6 | 48.21 | 0.0094 | nd | nd | 3.57 | 3.57 | 17.86 | 7.14 |
| 7 | 34.65 | 0.0059 | nd | nd | nd | 1.98 | 7.92 | 5.94 |
| 8 | 49.65 | 0.0184 | 1.40 | 2.10 | 4.20 | 7.69 | 6.64 | 7.69 |
| 9 | 40.00 | 0.0135 | nd | nd | nd | 6.15 | 18.46 | 6.15 |
| 10 | 49.18 | 0.0250 | nd | 1.64 | 6.56 | 3.28 | 8.20 | 5.74 |
| 11 | 39.80 | 0.0115 | 1.00 | 1.99 | 5.47 | 2.49 | 8.96 | 9.45 |
| 12 | 47.06 | 0.0271 | 2.94 | nd | nd | 4.41 | 11.76 | 7.35 |
| 13 | 46.00 | 0.0226 | 6.00 | 2.00 | 4.00 | 2.00 | 7.00 | 8.00 |
| 14 | 50.23 | 0.0117 | 0.91 | 0.91 | 1.83 | 4.57 | 14.16 | 13.24 |
| 15 | 44.93 | 0.0080 | 3.62 | 1.45 | 1.45 | 2.90 | 1.45 | 13.77 |
| 16 | 49.83 | 0.0184 | 1.39 | 2.09 | 4.18 | 7.67 | 6.62 | 7.67 |
| 17 | 27.40 | 0.0024 | 2.74 | 2.74 | 2.74 | 2.74 | 5.48 | 5.48 |
| 18 | 42.74 | 0.0206 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 1.66 | 1.66 |
| 19 | 16.67 | 0.0028 | nd | nd | nd | nd | nd | 4.76 |
| 20 | 40.83 | 0.0384 | 7.69 | 1.18 | 3.55 | 5.33 | 2.37 | 10.06 |
| 21 | 36.67 | 0.0037 | 4.44 | 2.22 | 4.44 | 2.22 | 6.67 | 6.67 |
| 22 | 38.81 | 0.0111 | nd | nd | 3.73 | 4.48 | 8.96 | 8.96 |
| 23 | 43.59 | 0.0110 | 5.13 | nd | 1.71 | 7.69 | 3.42 | 6.84 |
| AVERAGE (%) | | | 1.95 | 1.33 | 2.50 | 5.07 | 7.90 | 9.09 |

379
380

381
382
383
384
385
386
387

388 **Table 3.** The extent (%) of released DPP IV-inhibitory peptides from ribosomal
389 proteins of the common hazelnut (*Corylus avellana* L.) by the utilization of various
390 proteases. *In silico* proteolysis of 23 ribosomal hazelnut proteins was carried out
391 using 6 different proteases. Comparison to the theoretical frequency of bioactive
392 residues (A, %) and potential bioactivity of protein fragments (B, μM^{-1}) were also
393 carried out. The abbreviation “nd” stands for “not detected”.

| Number | A (%) | B (μM^{-1}) | Trypsin | Pepsin | Chymotrypsin | Bromelain | Thermolysin | Papain |
|--------|-------|--------------------------|---------|--------|--------------|-----------|-------------|--------|
| 1 | 56 | - | nd | nd | nd | nd | 8.00 | 8.00 |
| 2 | 70.65 | 0.002 | nd | 2.17 | 2.17 | 6.52 | 6.52 | 6.52 |
| 3 | 76.34 | 0.0004 | nd | nd | nd | 2.15 | 6.45 | 6.45 |
| 4 | 66.94 | 0.0003 | 6.45 | nd | nd | 6.45 | 4.84 | 16.13 |
| 5 | 67.1 | 0.0006 | 1.29 | nd | 3.87 | 10.32 | 9.03 | 24.52 |
| 6 | 55.36 | 0.0002 | 3.57 | nd | 3.57 | 7.14 | 21.43 | 17.86 |
| 7 | 60.40 | 4.96 E-5 | 3.96 | 7.92 | 5.94 | 5.94 | 3.96 | 9.90 |
| 8 | 66.43 | 0.0002 | 0.70 | 1.40 | 2.80 | 11.19 | 8.39 | 11.89 |
| 9 | 61.54 | 0.0002 | nd | 6.15 | 12.31 | 3.08 | 15.38 | 3.08 |
| 10 | 63.93 | 0.0005 | nd | 1.64 | 6.56 | 1.64 | 9.84 | 4.92 |
| 11 | 66.17 | 0.0003 | 3.98 | 2.99 | 8.46 | 1.99 | 8.46 | 8.96 |
| 12 | 65.44 | 0.0004 | 4.41 | nd | 1.47 | 5.88 | 7.35 | 17.65 |
| 13 | 61 | 0.0007 | 2.00 | 2.00 | 4.00 | 6.00 | 4.00 | 12.00 |
| 14 | 63.01 | 0.0004 | 1.83 | 2.74 | 1.83 | 5.48 | 11.87 | 10.96 |
| 15 | 65.94 | 8.45 E-5 | nd | 1.45 | 1.45 | 4.35 | 7.25 | 11.59 |
| 16 | 66.2 | 0.0002 | 0.70 | 1.39 | 2.79 | 11.15 | 8.36 | 11.85 |
| 17 | 50.68 | 2.24 E-5 | 2.74 | 2.74 | 2.74 | 2.74 | 5.48 | 10.96 |
| 18 | 62.66 | 0.0005 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 1.66 | 3.32 |
| 19 | 59.52 | 2.54 E-5 | nd | nd | nd | 4.76 | 4.76 | 4.76 |
| 20 | 63.91 | 0.0002 | 1.18 | nd | 2.37 | 2.37 | 5.92 | 9.47 |

| | | | | | | | | |
|--------------------|-------|----------|-------|------|------|------|-------|-------|
| 21 | 60 | 0.0002 | 11.11 | 2.22 | 4.44 | nd | 6.67 | 15.56 |
| 22 | 67.91 | 0.0003 | 2.99 | 4.48 | 5.97 | 5.97 | 11.94 | 11.94 |
| 23 | 70.94 | 7.99 E-5 | 6.84 | nd | 1.71 | 5.13 | 6.84 | 11.97 |
| AVERAGE (%) | | | 2.37 | 1.74 | 3.27 | 4.83 | 8.02 | 10.88 |

394

395

396

397

398 **Table 4.** Average number of bioactive peptides, amino acids in those peptides and
 399 their corresponding % frequencies compared to the total number of amino acids in
 400 the parent protein. The average number of amino acids in 23 ribosomal proteins was
 401 133.3 residues per protein. *In silico* proteolysis of 23 ribosomal hazelnut proteins was
 402 carried out using 6 different proteases. A bioactive peptide was defined as “a
 403 sequence that has a $\geq 50\%$ probability of being bioactive” based on its PeptideRanker
 404 score.

| | Trypsin | Pepsin | Chymotrypsin | Bromelain | Thermolysin | Papain |
|--|----------------|---------------|---------------------|------------------|--------------------|---------------|
| Average number of bioactive peptides | 4.09 | 3.13 | 3.96 | 4.83 | 6.09 | 7.78 |
| Average number of amino acids in bioactive peptides | 22.96 | 17.48 | 17.17 | 18.78 | 18.43 | 24.09 |
| Percentage of amino acids in bioactive peptides (%) | 17.22 | 13.11 | 12.88 | 14.09 | 13.83 | 18.07 |

405

406

407

408

409 **FIGURE CAPTIONS**

410 **Figure 1.** The distribution of DPP-IV inhibitory sequences (shown in bold) that are
 411 released by papain from ribosomal protein S7. Note that in this specific case, all the
 412 active sequences including 64-65 and 66-67 in the hydrolysate were dipeptides.

413

414 **Figure 2. (A)** The number of potentially bioactive sequences, and **(B)** their
 415 corresponding % frequencies in the parent proteins. *In silico* proteolysis of 23
 416 ribosomal hazelnut proteins was carried out using 6 different proteases. The
 417 likelihood of being bioactive was determined by the PeptideRanker. A bioactive
 418 peptide was defined as “a sequence that has a $\geq 50\%$ probability of being bioactive”
 419 based on its PeptideRanker score.

419

420

421

422

423

424

425

1
2
3
4
5
6
7 1 MSRRGTAE EK **TAKSDPIYRN RLVNMLVNRI** LKHGK KSLAY QIIYRAMK KI
8 51 QQKTETNPLS VLR**QAIRGVT** PDIA**VKARRV** GGSTHQVPIE IGSA**QGKALA**
9 101 **IRWLLGASRK RPGRNMAFKL** SSELVDAAKG SGDAIRKKEE **THRMAEANRA**
10 151 **FAHFR**
11
12
13
14
15
16

17 Figure 1. The distribution of DPP-IV inhibitory sequences (shown in bold) that are released by papain from
18 ribosomal protein S7. Note that in this specific case, all the active sequences including 64-65 and 66-67 in
19 the hydrolysate were dipeptides.

20 477x133mm (96 x 96 DPI)
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

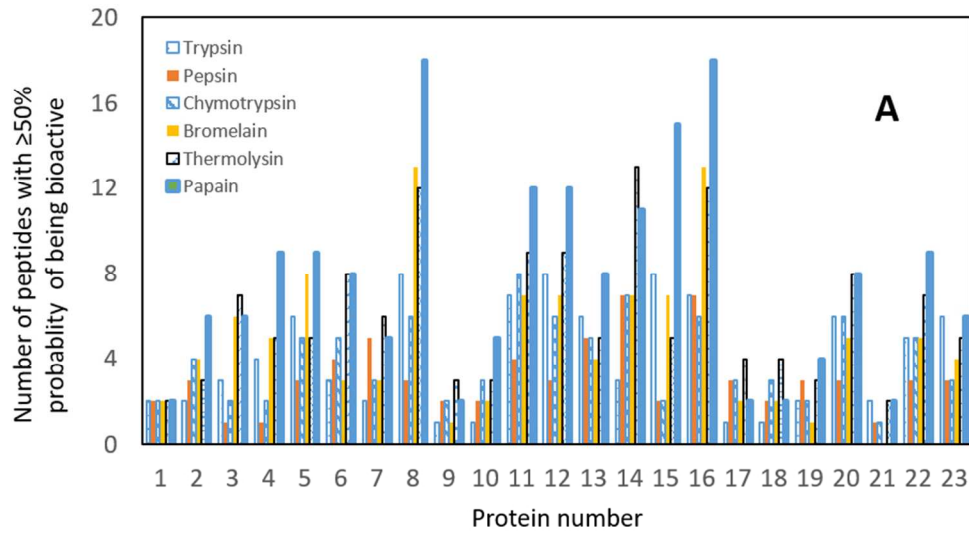


Figure 2. (A) The number of potentially bioactive sequences, and (B) their corresponding % frequencies in the parent proteins. In silico proteolysis of 23 ribosomal hazelnut proteins was carried out using 6 different proteases. The likelihood of being bioactive was determined by the PeptideRanker. A bioactive peptide was defined as “a sequence that has a $\geq 50\%$ probability of being bioactive” based on its PeptideRanker score.

246x135mm (96 x 96 DPI)

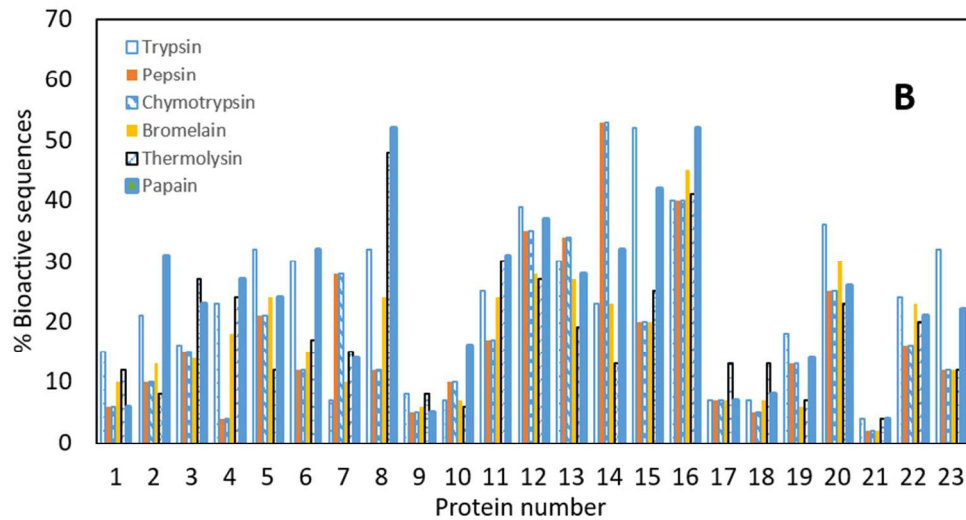


Figure 2. (A) The number of potentially bioactive sequences, and (B) their corresponding % frequencies in the parent proteins. In silico proteolysis of 23 ribosomal hazelnut proteins was carried out using 6 different proteases. The likelihood of being bioactive was determined by the PeptideRanker. A bioactive peptide was defined as "a sequence that has a $\geq 50\%$ probability of being bioactive" based on its PeptideRanker score.

246x135mm (96 x 96 DPI)

Transfer Desk

Preliminary investigations on in silico and in vitro ACE-inhibitory activities of hazelnut tryptic peptides --Manuscript Draft--

| | |
|--|---|
| Manuscript Number: | DESK-D-17-10699R1 |
| Full Title: | Preliminary investigations on in silico and in vitro ACE-inhibitory activities of hazelnut tryptic peptides |
| Article Type: | Springer Original Paper |
| Abstract: | <p>Among other valuable ingredients, the common hazelnut is also a rich source of proteins which are further concentrated in the deoiled meals during the manufacture of hazelnut oil. In this study, both an in silico and in vitro attempt was made to evaluate the biological functionality of tryptic hazelnut (<i>Corylus avellana</i> L.) peptides. Firstly, using the data listed on protein databases, a specific subset of hazelnut proteins (i.e., 23 ribosomal proteins) was chosen. Secondly, based on in silico proteolysis, the influence of trypsin activity on these proteins were investigated. In most cases (15 out of 23 proteins), tryptic hazelnut peptides were predicted to demonstrate angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. Consequently, hazelnut protein concentrates were produced from cold press deoiled hazelnut meals and subjected to tryptic hydrolysis (37°C; 1:1000 enzyme to substrate ratio). The progress of trypsinolysis was monitored using size exclusion chromatography (SEC) and Raman spectroscopy. While the protein concentrates had limited ACE-inhibitory activity, after 240 min of trypsinolysis, even at a moderate protein concentration, ACE-inhibitory activity was approximately 40%. Although further clarifications are necessary, current findings demonstrated that hazelnuts could be considered as a valuable source of ACE-inhibitory peptides.</p> |
| Corresponding Author: | İbrahim Gülseren, Ph.D. Istanbul Sabahattin Zaim Universitesi Istanbul, TURKEY |
| Corresponding Author Secondary Information: | |
| Corresponding Author's Institution: | Istanbul Sabahattin Zaim Universitesi |
| Corresponding Author's Secondary Institution: | |
| First Author: | İbrahim Gülseren, Ph.D. |
| First Author Secondary Information: | |
| Order of Authors: | İbrahim Gülseren, Ph.D. Bilal Çakır |
| Order of Authors Secondary Information: | |
| Author Comments: | 1) Free online colour. |
| Response to Reviewers: | <p>Based on the feedback from Springer, this manuscript was submitted to Springer Transfer Desk, August 8, 2017.</p> <p>Journal Preferences: 1.Plant Foods for Human Nutrition 2.The Protein Journal 3.Journal of Food Science and Technology</p> |

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

Preliminary investigations on *in silico* and *in vitro* ACE-inhibitory activities of hazelnut tryptic peptides

İbrahim Gülseren *, Bilal Çakır

Department of Food Engineering, İstanbul Sabahattin Zaim University (İZÜ), Halkalı Campus, 34303, Küçükçekmece, İstanbul, TURKEY

***Corresponding author: E-mail: ibrahim.gulseren@izu.edu.tr**

Phone: +90 (212) 692-9619

Submitted to *Springer Transfer Desk*, August 8, 2017

Journal Preferences:

- 1. Plant Foods for Human Nutrition**
- 2. The Protein Journal**
- 3. Journal of Food Science and Technology**

26 **Abstract**

1
2 27 Among other valuable ingredients, the common hazelnut is also a rich source of proteins which
3
4 28 are further concentrated in the deoiled meals during the manufacture of hazelnut oil. In this
5
6 29 study, both an *in silico* and *in vitro* attempt was made to evaluate the biological functionality
7
8 30 of tryptic hazelnut (*Corylus avellana* L.) peptides. Firstly, using the data listed on protein
9
10 31 databases, a specific subset of hazelnut proteins (i.e., 23 ribosomal proteins) was chosen.
11
12 32 Secondly, based on *in silico* proteolysis, the influence of trypsin activity on these proteins were
13
14 33 investigated. In most cases (15 out of 23 proteins), tryptic hazelnut peptides were predicted to
15
16 34 demonstrate angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. Consequently, hazelnut
17
18 35 protein concentrates were produced from cold press deoiled hazelnut meals and subjected to
19
20 36 tryptic hydrolysis (37°C; 1:1000 enzyme to substrate ratio). The progress of trypsinolysis was
21
22 37 monitored using size exclusion chromatography (SEC) and Raman spectroscopy. While the
23
24 38 protein concentrates had limited ACE-inhibitory activity, after 240 min of trypsinolysis, even
25
26 39 at a moderate protein concentration, ACE-inhibitory activity was approximately 40%. Although
27
28 40 further clarifications are necessary, current findings demonstrated that hazelnuts could be
29
30 41 considered as a valuable source of ACE-inhibitory peptides.
31
32 42

32 43 **Key words:** Cold press meals; plant protein peptides; common hazelnut (*Corylus*
33
34 44 *avellana* L.); ribosomal proteins; *in silico* proteolysis; trypsinolysis.
35
36 45
37
38
39
40 46
41
42
43 47
44
45
46 48
47
48
49 49
50
51 50
52
53
54 51
55
56 52
57
58
59 53
60
61
62
63
64
65

1. Introduction

Due to the ever increasing global demand for proteins, affordable and high quality protein products are highly sought after. In that sense, plant proteins represent a sustainable source of proteins for human diets. Since the conversion efficiency of plant proteins to animal proteins is fairly poor (approximately 15%) (Day, 2013), it makes perfect sense to search for alternative ways to utilize plant proteins in foods and other consumer products. Consequently one of the research priorities in our group is the valorization of cold press and other oil processing by-products (deoiled meals of oil fruits and oil seeds) with the aim of generating a variety of economic plant protein products and their hydrolyzates. Since protein content in oilseeds and oil fruits is relatively high and proteins are further concentrated upon deoiling, they represent a reasonably economic and sustainable resource for protein manufacture.

Hazelnuts (*Corylus avellana* L.) are among the major agricultural products of Turkey, where approximately 80% of the global production is carried out (roughly 550,000 tonnes per year) (Ozdemir & Akinci, 2004) while the other major producers include other Mediterranean countries and western USA. Hazelnuts are rich in oil content (approx. 60%) and known to demonstrate various bioactivities including their cardioprotective effects. This effect is possibly due to the mono- and polyunsaturated fatty acids in the hazelnuts (Parcerisa et al. 1997). Other bioactive compounds of the hazelnuts include polyphenols, tocopherols and squalene (Alasalvar et al. 2006 ; Alasalvar et al. 2009; Dogan et al. 2007). Phytosterols and phytostanols contribute to the cholesterol lowering and antioxidant properties of hazelnuts (Miraliakbari & Shahidi, 2008).

Industrial production of cold press hazelnut oil is also increasing which means the deoiled meal represents an increasing potential of valorization. According to the data provided by Alphan et al. (1996), it is possible to anticipate up to 45% proteins in the meal. Although there is some data on the technical functionality of hazelnut proteins (Tatar vd. 2015), the data on possible bioactive characteristics of hazelnut proteins (Aydemir et al. 2014) and their hydrolysates are truly scarce. Most of the literature related to the hazelnut proteins so far focused heavily on the reduction of food allergies (Ortolani et al. 2000; Vieths et al. 1999; Flinterman et al. 2008). It is noteworthy that the relative digestive stability of hazelnut allergens were found to be lower compared to peanut allergens (Vieths et al. 2008).

87 Bioactive peptides may occur during the processing or digestion of protein-containing foods
88 (Vermeirssen et al. 2004). Using proteases, bioactive peptides can be produced by breaking
89 down food proteins *in vitro*. Enzymatic preparation of bioactive peptides are highly
90 advantageous since the use of toxic chemicals and organic solvents can be avoided and the final
91 products are suitable for use in food, cosmetics and pharmaceutical products (Agyei and
92 Danquah, 2011).

93
94 Angiotension I-converting enzyme (ACE) converts angiotensin I to angiotensin II, which is a
95 vasoconstrictor. Also, ACE hydrolyzes bradykinin, which is a vasodilator peptide.
96 Consequently, ACE action elevates blood pressure in humans (Vermeirssen et al. 2004;
97 Hartmann & Meisel, 2007). ACE-inhibitory peptides have the capabilities of reducing blood
98 pressure and the likelihood of hypertension (Vermeirssen et al. 2004). Although bioactive
99 peptides are usually not as efficient as synthetic drug molecules, due to the absence of
100 pronounced side effects, they can conveniently be utilized in functional foods or food
101 supplements (Li et al. 2005). Furthermore, it is thought that the rate of bioactive peptide removal
102 from the body is lower than that of synthetic drugs and the affinity to tissues is higher (Erdmann
103 et al. 2008).

104
105 In this study, an attempt was made to predict the potential bioactivities of peptides generated
106 from hazelnut proteins *in silico and in vitro* using trypsin. Due to the promising results
107 presented here, a comprehensive *in vitro* study on the influence of various proteases on
108 bioactivities and allergenic characteristics of hazelnut proteins is currently being planned.

2. Materials and Methods

2.1 *In silico* analysis

2.1.1 Sequences of ribosomal hazelnut proteins

113 The primary sequences of the ribosomal hazelnut proteins were obtained from UniProtKB
114 database (<http://www.uniprot.org>) on March 10th, 2017. Ribosomal proteins represented 23 out
115 of 469 proteins for the common hazelnut (*Corylus avellana* L.) on this database. The basic data
116 including the names, accession numbers and number of amino acids in each protein were listed
117 on Table 1.

121 **2.1.2 *In silico* proteolysis and the analysis of bioactive sequences**

122 *In silico* proteolysis of the ribosomal hazelnut proteins were carried out using the “enzyme
123 action” tool of the BIOPEP webserver
124 (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>) (Minkiewicz et al. 2008a). Based on
125 the general proteolytic characteristics of trypsin, BIOPEP predicted the fragments that should
126 be generated from every input sequence. Consequently, for every input sequence, an output
127 sequence with varying number of peptides was computed (Minkiewicz et al. 2008a).

128
129 Proteolytic simulations were conducted using trypsin for each protein listed on Table 1. The
130 tryptic fragments were analyzed for bioactive properties based on the “profiles of biological
131 activity tool” and ACE-inhibitory sequences were recorded (Minkiewicz et al. 2008a). BIOPEP
132 database provides cataloging of previously determined bioactive peptides and compares the
133 input fragments to the listed active sequences in order to determine the bioactive potential.

134 135 **2.2 *In vitro* analysis**

136 **2.2.1 Manufacture of protein concentrates**

137 Cold press deoiled hazelnut meals were generously donated by Oneva (Neva Foods Ltd.,
138 İstanbul, Turkey), a local manufacturer of cold press oils. In all cases, the maximum
139 temperature observed by the cold press samples was lower than 35°C. All chemicals used were
140 of reagent grade and purchased from Sigma-Aldrich, unless otherwise stated.

141
142 Protein extraction was based on the alkali extraction-isoelectric precipitation (AE-IP)
143 method. In this technique, firstly, solubilization of protein molecules at basic pH is carried out,
144 which was followed by the isoelectric precipitation at acidic pH values (Boye et al. 2010).
145 Briefly, 50 g of deoiled meal was dispersed in water (1:15, w/v) and the pH of the medium was
146 adjusted to pH 9.5 using 1.0 N NaOH. The dispersions were kept stirred at 500 rpm at ambient
147 temperature (22±1°C). Immediately afterwards, the dispersions were centrifuged at 10000xg
148 for 15 min at 4 °C using a CR22N high-speed refrigerated centrifuge (Hitachi Koki Co., Ltd.,
149 Tokyo, Japan). The supernatant containing the solubilized proteins was collected and the
150 medium pH was adjusted to pH 4.5 in order to induce isoelectric precipitation. To ensure the
151 completion of protein precipitation, the supernatant was once again centrifuged at identical
152 conditions. The pellet was collected and immediately frozen at -20 °C. Frozen samples were
153 lyophilized using a Teknosem TRS 2/2V freeze drier (Teknosem Corp., İstanbul, Turkey).

155 **2.2.2 *In vitro* trypsinolysis**

156 Trypsinolysis was carried out based on the previous literature (Gülseren & Corredig, 2013). An
157 aqueous dispersion of the protein concentrate (1%) was prepared in 50 mM sodium phosphate
158 buffer (pH 7) by stirring for 1 h. Trypsin was obtained from Sigma Aldrich Corp. (T1426).
159 Tryptic digestion was carried out for 2 h at an enzyme to protein ratio of 1:1000 on a
160 thermomixer (MIULAB Thermo Shaker Incubator, 37°C, 1000 rpm). Immediately afterwards,
161 the digest was heated to 95°C and held at this temperature for 5 min. The samples were rapidly
162 cooled using ice. Upon reaching the ambient temperature, the samples were centrifuged for 30
163 min at 5000xg to remove insoluble aggregates. Prior to chromatographic analysis, all samples
164 were filtered through 0.45 µm PTFE syringe filters (İsolab, Germany).

166 **2.2.3 Size exclusion chromatography (SEC)**

167 In order to monitor the progress of trypsinolysis, size exclusion chromatography was utilized
168 on a Shimadzu LC-20AD HPLC system (Shimadzu Scientific Instruments) which consisted of
169 a pump, thermostated column compartment and photodiode array detector. Immediately after
170 trypsinolysis, the molecular size distribution of the partially hydrolyzed peptides were analyzed
171 using a desalting column (HiTrap™ desalting column, Product No: 17-408-01, GE
172 Healthcare, Uppsala, Sweden). The column equilibration and elution buffer was 50 mM
173 phosphate buffer (pH 7) which contained 0.5 M NaCl. An isocratic flow was utilized (1 ml.min⁻¹
174 and 40°C). The detection wavelength was 214 nm. As a molecular size reference, a
175 standardized BSA solution was used (Product No: P5619, Sigma-Aldrich Corp).

177 **2.2.4 Raman spectroscopy**

178 Raman spectroscopy was carried out using a Rigaku Progeny X2 instrument. The spectral range
179 was 200 – 2000 cm⁻¹, while the spectral resolution was 7 – 10 cm⁻¹. TE cooled CCD detection
180 was used at a wavelength of 785 nm. Once again, the same BSA reference solution was utilized
181 for comparative purposes.

183 **2.2.5 Measurement of ACE inhibitory activity**

184 All the solutions and reactants used in this assay were prepared in 100 mM sodium borate buffer
185 (pH 8.3). ACE-inhibition assay was carried out based on the method described by Sheih et al.
186 (2009) with slight modifications. 200 µl of 5 mM HHL was mixed with peptide dispersions
187 prepared by trypsinolysis (Section 2.2.2). The mixture was incubated at 37°C for 10 min.

188 Immediately afterwards, 20 μ l of concentrated trypsin solution was added to generate an
189 enzyme concentration of 1.68 mU in the mixture. The incubation was carried out for 0-4 h at
190 37°C and stopped by the addition of 250 μ l HCl (1 M). The final mixture was injected into the
191 HPLC device for the determination of hippuric acid (Sheih et al. 2009). Ascentis C18 Column
192 (4.6 mm ID \times 250 mm, Supelco) with a particle diameter of 5 μ m was used in the analysis. The
193 mobile phase was composed of 1:1 mixture of ethanol and water by volume containing 1 ml/L
194 TFA. The absorbance was detected at 228 nm. The analysis was carried out at 40°C at a flow
195 rate of 1 ml.min⁻¹. In order to determine % ACE inhibition, the performance of the peptide
196 samples was compared to the blank sample (i.e., water was added instead of peptide dispersion).
197 0.02% sodium azide was added to all samples and solutions as a bacteriostatic in all cases.

3. Results and Discussion

3.1 *In silico* analysis of tryptic hazelnut peptides

202 The basic information about the ribosomal hazelnut proteins including their names, number of
203 residues and accession numbers were summarized on Table 1. The number of residues in the
204 proteins ranged between 25 and 286 amino acids and the average number of amino acids in 23
205 ribosomal proteins was 133.3 residues per protein. The amino acid sequences of these proteins
206 were exported from the UniProt database and utilized in further analysis.

208 Using BIOPEP (Minkiewicz et al. 2008), 23 different proteins were treated with trypsin *in*
209 *silico*. Peptide sequences that contained two or more amino acids were recorded for further
210 analysis, whereas single amino acid sequences were not taken into account. Using the “profiles
211 of biological activity tool” on BIOPEP (Minkiewicz et al. 2008), the potential bioactivities of
212 all peptide fragments were analyzed and the frequency of released bioactive peptides (A’) were
213 determined (Figure 1). Using trypsin, the frequency of released ACE peptides ranged between
214 0.91-7.69%. The average frequency for ACE-inhibitory peptide content was approx. 1.95%
215 among all 23 proteins, whereas the highest predicted frequency was 7.69% (protein 20 on Table
216 1 and Figure 1). Compared to the recent work of Udenigwe et al. (2013) where cereal RuBisCO
217 proteins were predicted to yield to 0.59-0.84% bioactive peptides (all activities not ACE-
218 inhibition only), ribosomal hazelnut proteins had a higher frequency of bioactive peptides.
219 Since these findings were promising, *in vitro* analysis was also carried out for the protein
220 concentrates.

3.2 *In vitro* analysis of tryptic hazelnut peptides

222 Firstly, using a thermomixer, trypsinolysis of hazelnut protein concentrates was carried out
223 (37°C, 1000 rpm and an enzyme: substrate ratio of 1:1000). The progress in hydrolysis (0-4 h)
224 was monitored based on size exclusion chromatography (Figure 2). As time passed, the peaks
225 slightly shifted to the right-hand side of the spectrum indicating that there were smaller moieties
226 in the samples due to enzymatic hydrolysis (Figure 2A). Since the total number of moles in the
227 system might have increased and some of the peptide bonds (i.e., 214 nm detection) became
228 more detectable, in some cases the total peak area significantly increased as well. Variations in
229 the molar extinction coefficients could also lead to this observation. BSA was used as a
230 molecular weight reference (66 kDa) as well (Figure 2B). Since the reference had a peak around
231 1.9 min which was comparable to that of the peptides, it is safe to assume some of the proteins
232 in the concentrates were comparable in size to BSA and as trypsinolysis took place, increasingly
233 more moieties were smaller peptides.
234

235
236 In order to confirm the data obtained from HPLC-SEC analysis, Raman spectroscopy was
237 utilized in the analysis of identical samples (Figure 3). BSA was once again added as a reference
238 protein to this measurement. Firstly, at all levels of trypsinolysis, the main features in the
239 spectrum were Amide I and III bands and C-C bands. In most cases while the duration of
240 enzymatic treatment increased, the intensity of these bands became more intense possibly
241 indicating that amide bands were more available for detection due to hydrolysis of the proteins.
242

243 Amide I band is generally characterized by C-O bond stretching and N-H bond bending in
244 peptides and proteins. In addition, its intensity is a measure of the presence of α -helical proteins.
245 Increase in the intensity of this band could point out to the fact that during trypsinolysis α -
246 helical protein content increased for the current samples. Meanwhile Amide III band is
247 characterized by C-N bond stretching and N-H bond bending (Li-Chan, 1996; Herrero, 2008a,
248 b). Based on the changes in Amide III band, it might be possible to hypothesize that structural
249 changes including secondary and tertiary level took place due to enzymatic hydrolysis. This
250 will most probably be influential on the technical functionality of the proteins as well, such as
251 their water and/or oil binding, solubility, and hydrophilicity/hydrophobicity characteristics
252 (Herrero et al. 2008).

255 Aliquots from tryptic digests studied in the SEC and Raman experiments were collected and
1 256 further investigated in the ACE-inhibition assays (Figure 4). Although small, the untreated
2 357 protein concentrate had a limited ACE-inhibitory activity (7.6%). With the increasing extent of
3 458 hydrolysis (Figures 2&3), the extent of ACE-inhibitory activity also increased and reached to
4 559 about 40% inhibition after 4 h of trypsinolysis (Figure 4). These results showed that hazelnuts
5 660 could be considered as a valuable source of ACE-inhibitory peptides, and hazelnut consumption
6 761 could lead to cardioprotective effects due to the combined effects of both its oil and protein
7 862 fractions. Meanwhile the potential influence of hazelnut proteins and peptides on other
8 963 bioactivities remain largely unexplored.
9 1064

18 265 4. Conclusions

20 266
21 267 In this preliminary report, firstly, the potential ACE-inhibitory activities of ribosomal hazelnut
22 268 proteins were investigated *in silico*. Compared to cereal RuBisCO proteins (Udenigwe et al.
23 269 2013), for example, frequency of released bioactive peptides were generally higher, although
24 270 the global abundance of hazelnut proteins are considerably lower. Based on these promising
25 271 findings, *in vitro* studies were carried out using hazelnut protein concentrates and a modest
26 272 extent of ACE-inhibitory activities were detected for all aliquots withdrawn from the
27 273 trypsinolysis experiments. %ACE-inhibition increased with the extent of trypsin treatment.
28 274 Based on the Raman data, changes in ACE-inhibition characteristics were most probably
29 275 accompanied by changes in secondary structural attributes (i.e., increase in α -helical content).
30 276 While studies on other bioactivities remain unexplored so far, we are in the process of studying
31 277 the influence of protein isolation methodologies, protein concentrations, and various proteases
32 278 in order to fully elucidate the bioactive potential of hazelnut peptides as well as identifying the
33 279 cardioprotective proteins and peptides from the hazelnuts. Circulatory system diseases are the
34 280 primary cause of all death events in Turkey (approx. 40%) (Anon. 2015) which practically
35 281 implies the cardioprotective potential of hazelnuts has to be fully exploited.
36 282

51 283 Acknowledgements

52 284 This work was supported by a grant from TÜBİTAK 3501 Programme [grant number
53 285 115O569; 2015-2017; The Scientific and Technological Research Council of Turkey)]. The
54 286 authors would like to also express their gratitude to Neva Foods Ltd. (İstanbul, Turkey) for the
55 287 donation of the deoiled plant meals. The Raman spectrometer used in this study was acquired
56 288 based on a grant from Istanbul Development Agency (ISTKA) (grant no: TR10/16/YNY/0051).
57
58
59
60
61
62
63
64
65

289 **References**

- 290 **1.** Alasalvar C, Amaral JS, Shadidi F. Functional lipid characteristics of Turkish Tombul
291 hazelnut (*Corylus avellana* L.). J Agric Food Chem 2006; 54:10177-83.
- 292 **2.** Alasalvar C, Amaral JS, Satır G, Shadidi F. Lipid characteristics and essential minerals of
293 native Turkish hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.). Food Chem 2009; 113:919-925.
- 294 **3.** Alphan E, Pala M, Ačkurt F, Yılmaz T. Nutritional composition of hazelnuts and its effects
295 on glucose and lipid metabolism. In: IV International Symposium on Hazelnut 445 (pp. 305-
296 310),1996.
- 297 **4.** Anon (2015). “Ölüm nedeni istatistikleri, 2014” (in Turkish).
298 <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=18855>. Accessed on: August 2nd, 2017.
- 299 **5.** Aydemir LY, Gökbulut AA, Baran Y, Yemenicioğlu A. Bioactive, functional and edible
300 film-forming properties of isolated hazelnut (*Corylus avellana* L.) meal proteins. Food
301 Hydrocoll 2014;36:130-142.
- 302 **6.** Boye, J.I., Aksay, S., Roufik, S., Ribereau, S., Mondor, M., Farnworth, E., Rjamohamed,
303 S.H. 2010. “Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein
304 concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques”, Food
305 Research International, 43(2), 537-546.
- 306 **7.** Day L. Proteins from land plants–potential resources for human nutrition and food
307 security. Trends Food Sci Tech 2013;32(1):25-42.
- 308 **8.** Dogan A, Siyakus G, Severcan F. FTIR spectroscopic characterization of irradiated hazelnut
309 (*Corylus avellana* L.). Food Chem 2007;100:1106-14.
- 310 **9.** Flinterman AE, Akkerdaas JH, Knulst AC, Van Ree R, Pasmans SG. Hazelnut allergy: from
311 pollen-associated mild allergy to severe anaphylactic reactions. Curr Opin Allergy Clin
312 Immunol 2008;8(3):261-265.
- 313 **10.** Gülseren, İ. & Corredig, M. Storage stability and physical characteristics of tea polyphenol
314 bearing nanoliposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids. J Agric Food
315 Chem 2013;61(13): 3242-51.
- 316 **11.** Hartmann R, Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to
317 food applications. Curr Opin Biotech 2007;18(2):163-169.
- 318 **12.** Herrero AM, Raman spectroscopy a promising technique for quality assessment of meat
319 and fish: A review. Food Chem 2008a;107:1642-51.
- 320 **13.** Herrero AM, Raman spectroscopy for monitoring protein structure in muscle food systems.
321 Crit Rev Food Sci Nutr 2008b; 48:512–513.

- 322 **14.** Herrero AM, Carmona P, Cofrades S, Jiménez-Colmenero F, Raman spectroscopic
1 323 determination of structural changes in meat batters upon soy protein addition and heat
2 324 treatment. *Food Res Int* 2008;41:765–772.
- 3 325 **15.** Li G, Liu H, Shi Y, Le G. Direct spectrophotometric measurement of angiotensin-I-
4 326 converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. *J Pharm Biomed Anal*
5 327 2005;37:219-224.
- 6 328 **16.** Li-Chan ECY, The applications of Raman spectroscopy in food science. *Trends Food Sci*
7 329 *Tech* 1996;7:361–370.
- 8 330 **17.** Minkiewicz P, Dziuba J, Iwaniak A, Dziuba M, Darewicz M. BIOPEP database and other
9 331 programs for processing bioactive peptide sequences. *J AOAC Int* 2008;91:965-980.
- 10 332 **18.** Miraliakbari H, Shahidi F. Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food*
11 333 *Chem* 2008;111(2):421-427.
- 12 334 **19.** Ortolani C, Ballmer-Weber BK, Hansen KS et al. Hazelnut allergy: a double-blind,
13 335 placebo-controlled food challenge multicenter study. *J Allergy Clin Immun* 2000; 105(3):577-
14 336 581.
- 15 337 **20.** Ozdemir F, Akinci İ. Physical and nutritional properties of four major commercial Turkish
16 338 hazelnut species. *J Food Eng* 2004;63:341-347.
- 17 339 **21.** Parcerisa J, Richardson DG, Magdalena R, Codony R, Boatella J. Fatty acid distribution in
18 340 polar and nonpolar lipid classes of hazelnut oil (*Corylus avellana* L.). *J Agric Food Chem*
19 341 1997;45:3887-90.
- 20 342 **22.** Sheih, I. C., Fang, T. J., Wu, T. K. 2009. “Isolation and characterisation of a novel
21 343 angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste”, *Food*
22 344 *Chemistry*, 115(1), 279-284.
- 23 345 **23.** Tatar, F., Tunç, M. T., & Kahyaoglu, T. (2015). Turkish Tombul hazelnut (*Corylus*
24 346 *avellana* L.) protein concentrates: functional and rheological properties. *Journal of food science*
25 347 *and technology*, 52(2), 1024-1031.
- 26 348 **24.** Udenigwe CC, Gong M, Wu S. *In silico* analysis of the large and small subunits of cereal
27 349 RuBisCO as precursors of cryptic bioactive peptides. *Process Biochem* 2013;48(11):1794-99.
- 28 350 **25.** Vermeirssen V, Van Camp J, Verstraete W. Bioavailability of angiotensin I converting
29 351 enzyme inhibitory peptides. *Br J Nutr* 2004;92:357-366.
- 30 352 **26.** Vieths S, Reindl J, Müller U, Hoffmann A, Haustein D. Digestibility of peanut and hazelnut
31 353 allergens investigated by a simple *in vitro* procedure. *Eur Food Res Tech* 1999;209(6):379-388.
- 32 354
- 33 355

356 **TABLES**1
2 3573
4 358 **Table 1.** Randomly assigned order numbers, accession numbers for protein databases and
5 359 lengths of ribosomal proteins from the common hazelnut (*Corylus avellana* L.).
6

| Order Number | UniProtKB Swiss-Prot or TrEMBL Accession Number | Protein names | Number of amino acids |
|--------------|---|--------------------------------------|-----------------------|
| 1 | Q9TGB0 | Ribosomal protein small 3 (Fragment) | 25 |
| 2 | A0A1I9RG92 | Ribosomal protein S19 | 92 |
| 3 | A0A1I9RG90 | Ribosomal protein L23 | 93 |
| 4 | A0A1I9RG93 | Ribosomal protein S12 | 124 |
| 5 | A0A1I9RG73 | Ribosomal protein S7 | 155 |
| 6 | A0A1I9RG76 | Ribosomal protein L32 | 56 |
| 7 | A0A1I9RG53 | Ribosomal protein S18 | 101 |
| 8 | A0A1I9RG91 | Ribosomal protein L2 | 286 |
| 9 | A0A1I9RG19 | Ribosomal protein S16 | 65 |
| 10 | A0A1I9RG65 | Ribosomal protein L14 | 122 |
| 11 | A0A1I9RG35 | Ribosomal protein S4 | 201 |
| 12 | A0A1I9RG66 | Ribosomal protein L16 | 136 |
| 13 | A0A1I9RG31 | Ribosomal protein S14 | 100 |
| 14 | A0A1I9RG67 | Ribosomal protein S3 | 219 |
| 15 | A0A1I9RG62 | Ribosomal protein S11 | 138 |
| 16 | A0A1I9RG70 | Ribosomal protein L2 | 287 |
| 17 | A0A1I9RG52 | Ribosomal protein L33 | 73 |
| 18 | A0A1I9RG25 | Ribosomal protein S2 | 241 |
| 19 | A0A1I9RG63 | Ribosomal protein L36 | 42 |
| 20 | A0A1I9RG68 | Ribosomal protein L22 | 169 |
| 21 | A0A1I9RG85 | Ribosomal protein S15 | 90 |
| 22 | A0A1I9RG64 | Ribosomal protein S8 | 134 |
| 23 | A0A1I9RG54 | Ribosomal protein L20 | 117 |

41 360

42 361

43 362

44 363

45 364

46 365

47 366

48 367

49 368

50 369

51 370

52

53

54

55

371 **FIGURE CAPTIONS**

1
2 372 **Figure 1.** The extent (%) of released ACE-inhibitory peptides from ribosomal proteins of the
3 373 common hazelnut (*Corylus avellana* L.) during *in silico* trypsinolysis. 15 out of 23 proteins
4 374 were predicted to demonstrate ACE-inhibitory activity.

5
6 375
7
8 376 **Figure 2.** Size exclusion chromatography (SEC) analysis of trypsin treated hazelnut protein
9 377 concentrates. Enzymatic digestion was carried out at 37°C at an enzyme: substrate ratio of
10 378 1:1000. In order to enhance the reproducibility, a thermomixer was utilized (1000 rpm). **A)**
11 379 Time of hydrolysis (0-240 min) increased in the direction of the arrow. Every curve represented
12 380 a single time point in trypsinolysis (0, 15, 30, 60, 120 and 240 min). **B)** Reference sample (BSA)
13 381 with no trypsin treatment.

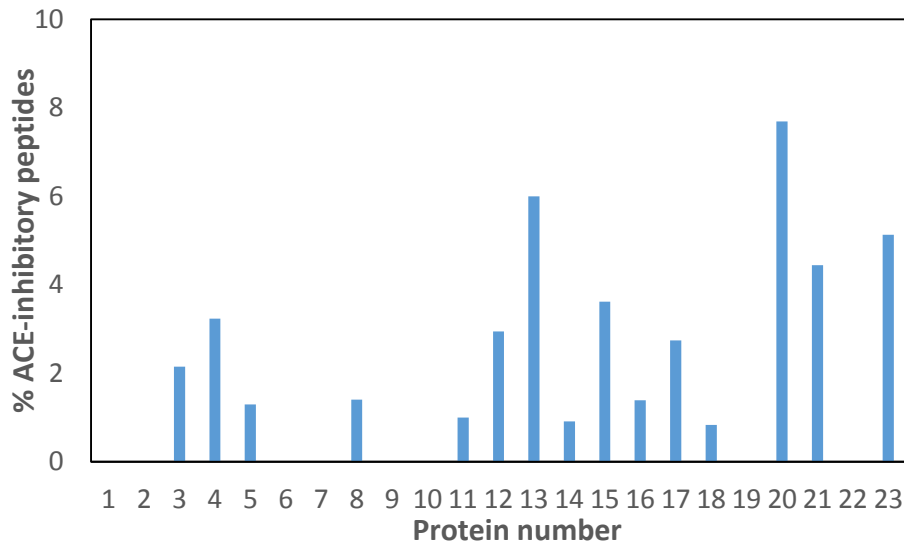
14 382
15
16
17 383 **Figure 3.** Raman spectroscopy analysis of trypsin treated hazelnut protein concentrates.
18 384 Enzymatic digestion was carried out at 37°C at an enzyme: substrate ratio of 1:1000. In order
19 385 to enhance the reproducibility, a thermomixer was utilized (1000 rpm). Every curve represented
20 386 a single time point in trypsinolysis (0, 15, 30, 60, 120 and 240 min). Reference sample was
21 387 BSA with no trypsin treatment.

22 388
23
24 389 **Figure 4.** % ACE inhibitory activity of tryptic peptides from the hazelnut protein concentrates
25 390 as a function of time. % inhibition was calculated in comparison to a blank sample where ACE
26 391 activity was taken as 100%.

27 392
28 393
29 394
30 395
31 396
32 397
33 398
34 399
35 400
36 401
37 402
38 403
39 404
40 405
41 406

407 **FIGURES**

408



409

410 **Figure 1**

411

412

413

414

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29 415
30
31 416
32
33 417
34
35 418
36
37 419
38
39 420
40
41 421
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

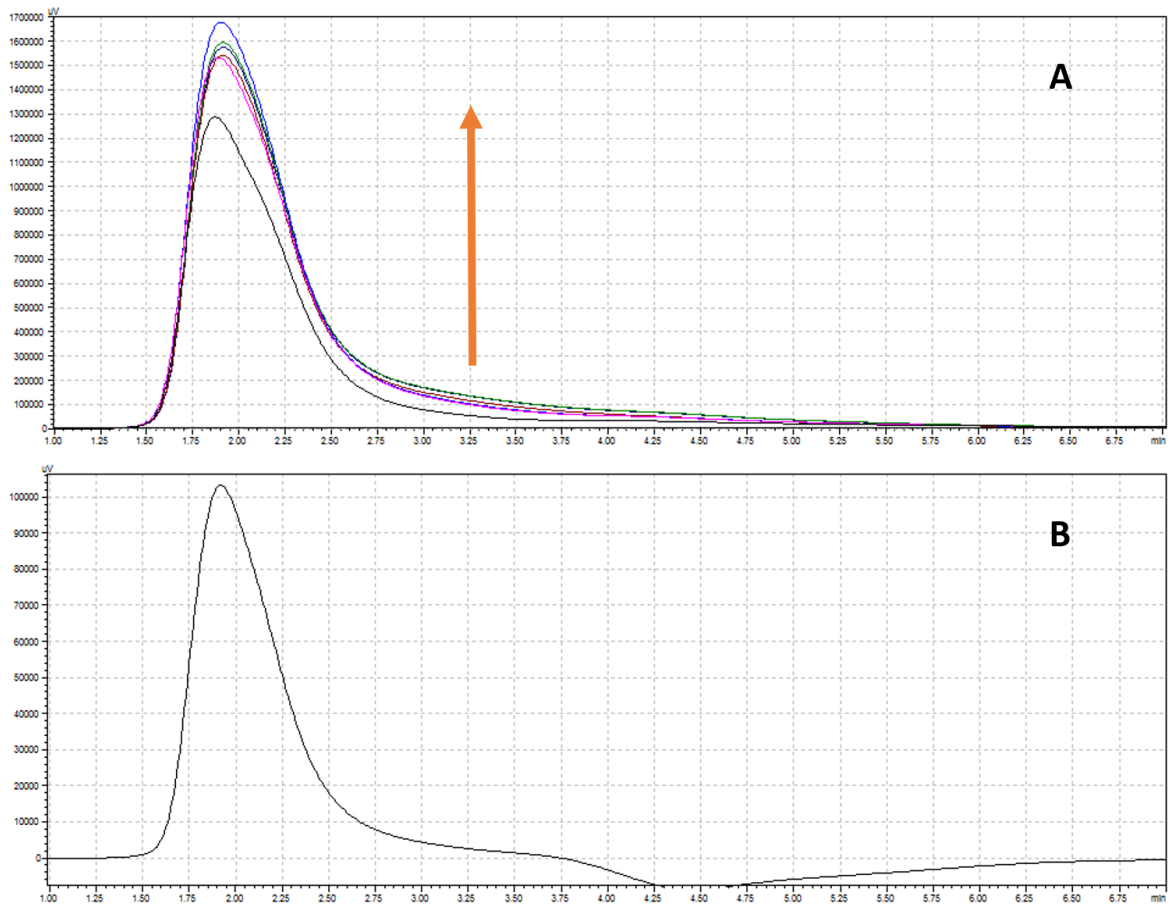


Figure 2

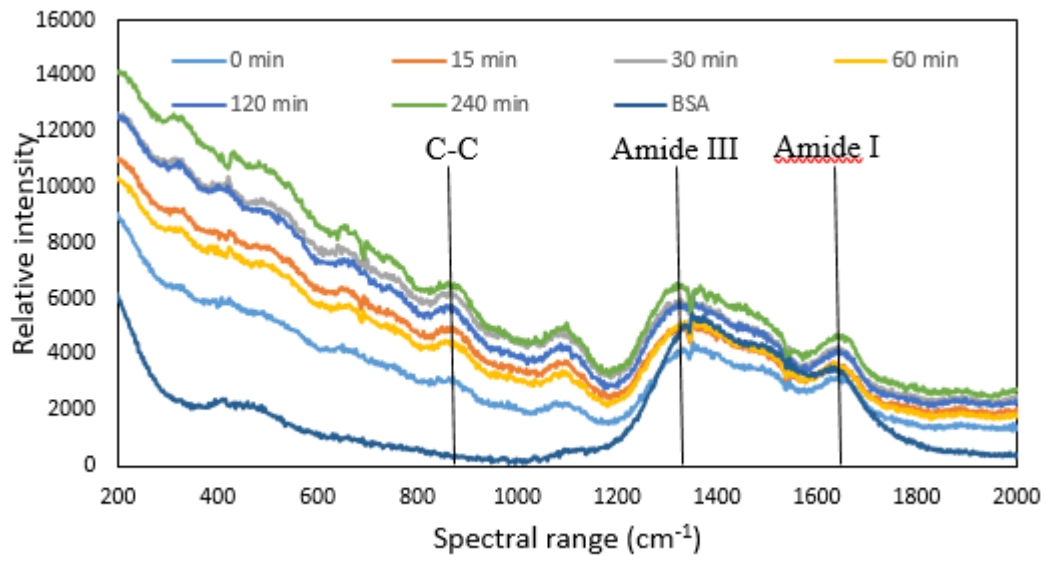
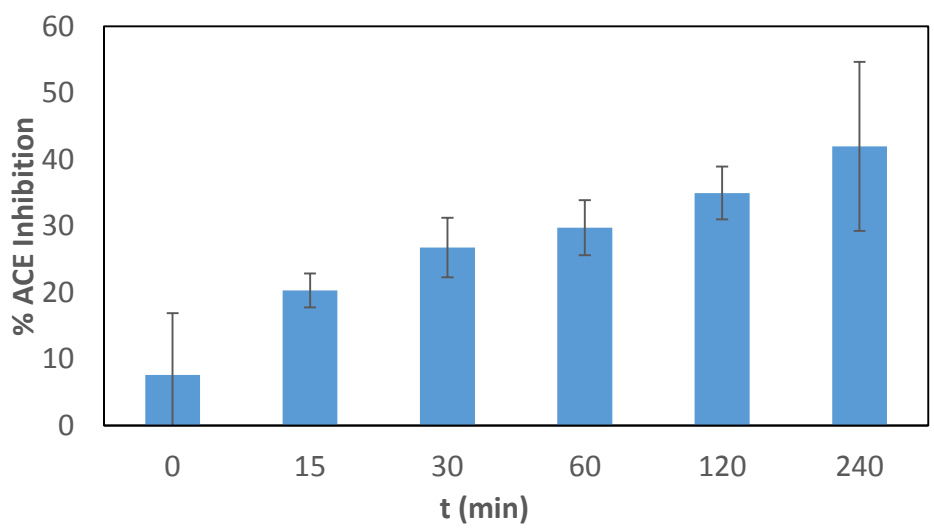


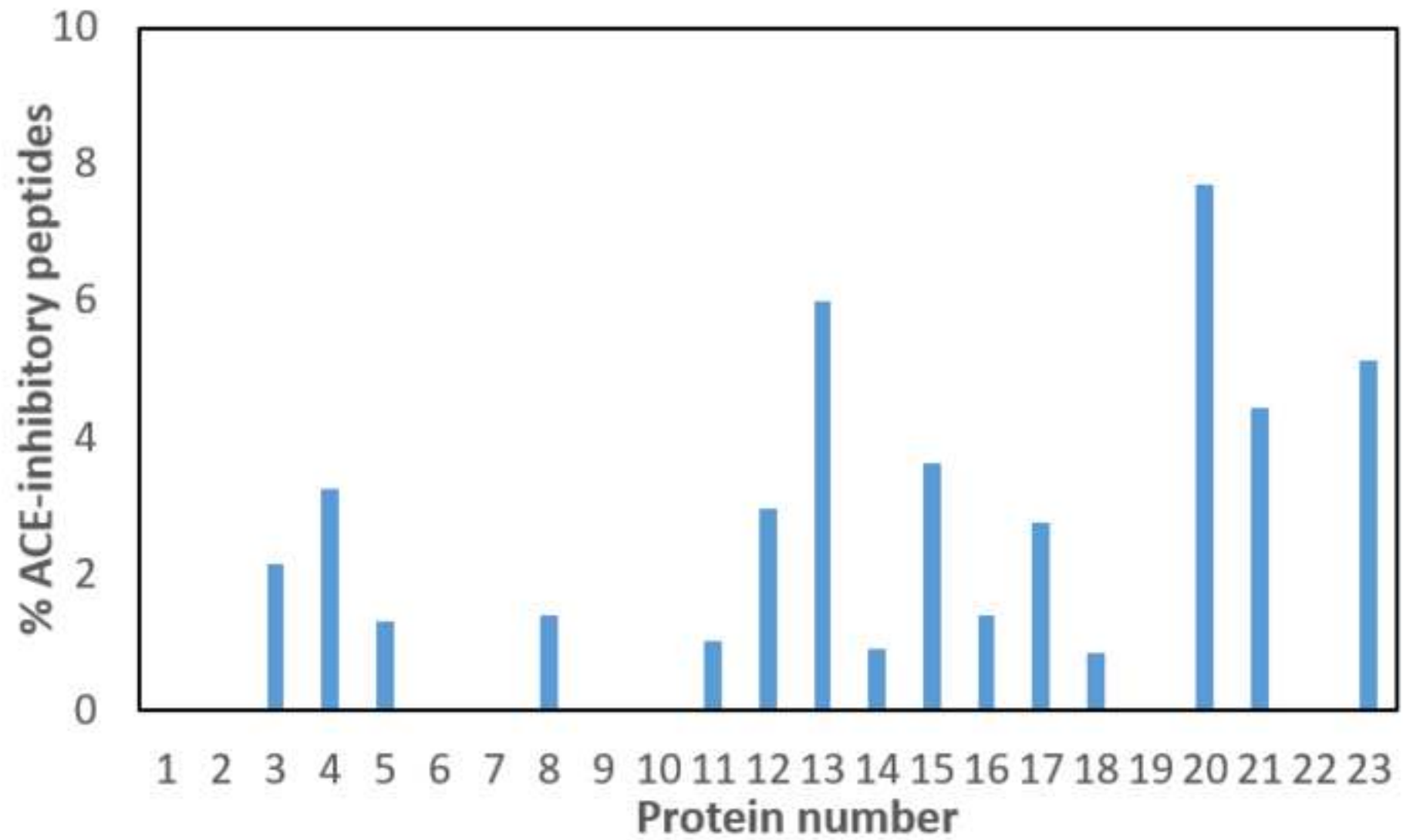
Figure 3

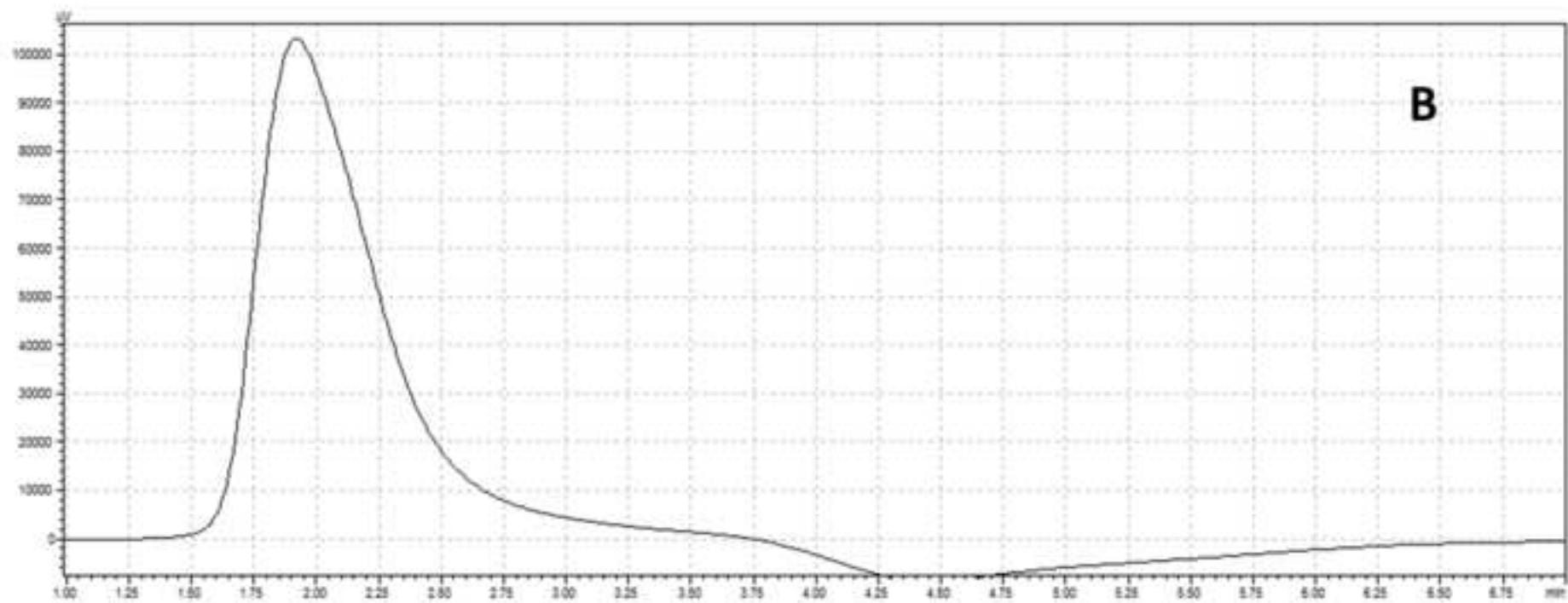
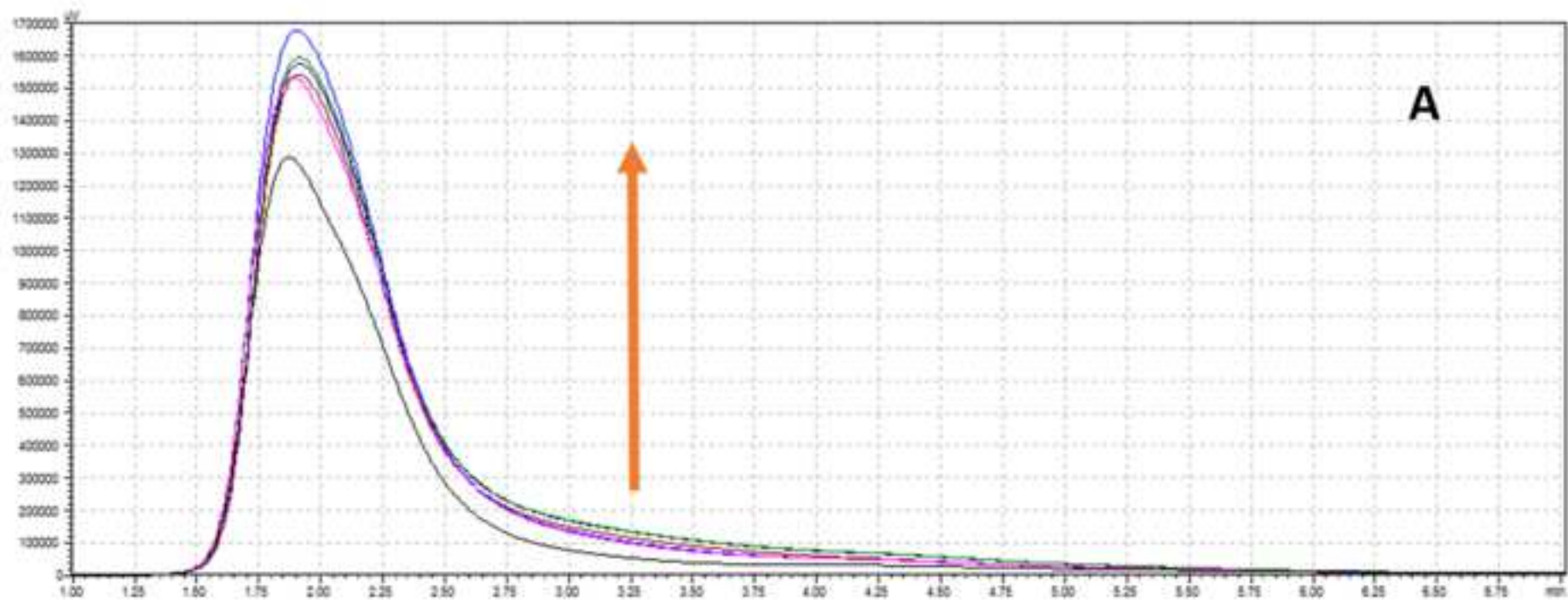
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20 422
21
22 423
23
24 424
25
26 425
27
28 426
29
30 427
31
32 428
33
34 429
35
36 430
37
38 431
39
40 432
41
42 433
43
44 434
45
46 435
47
48 436
49
50 437
51
52 438
53
54 439
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

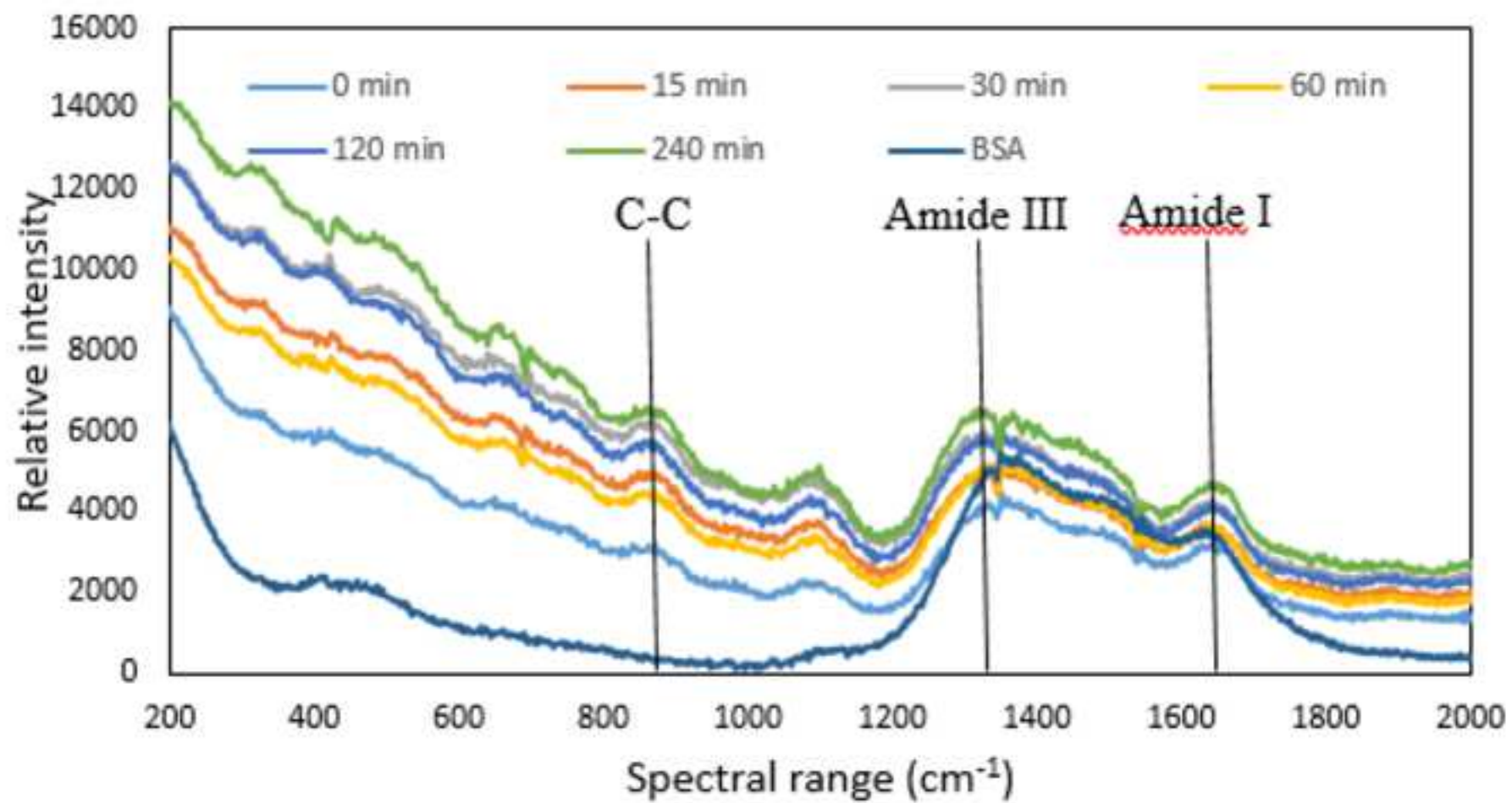
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

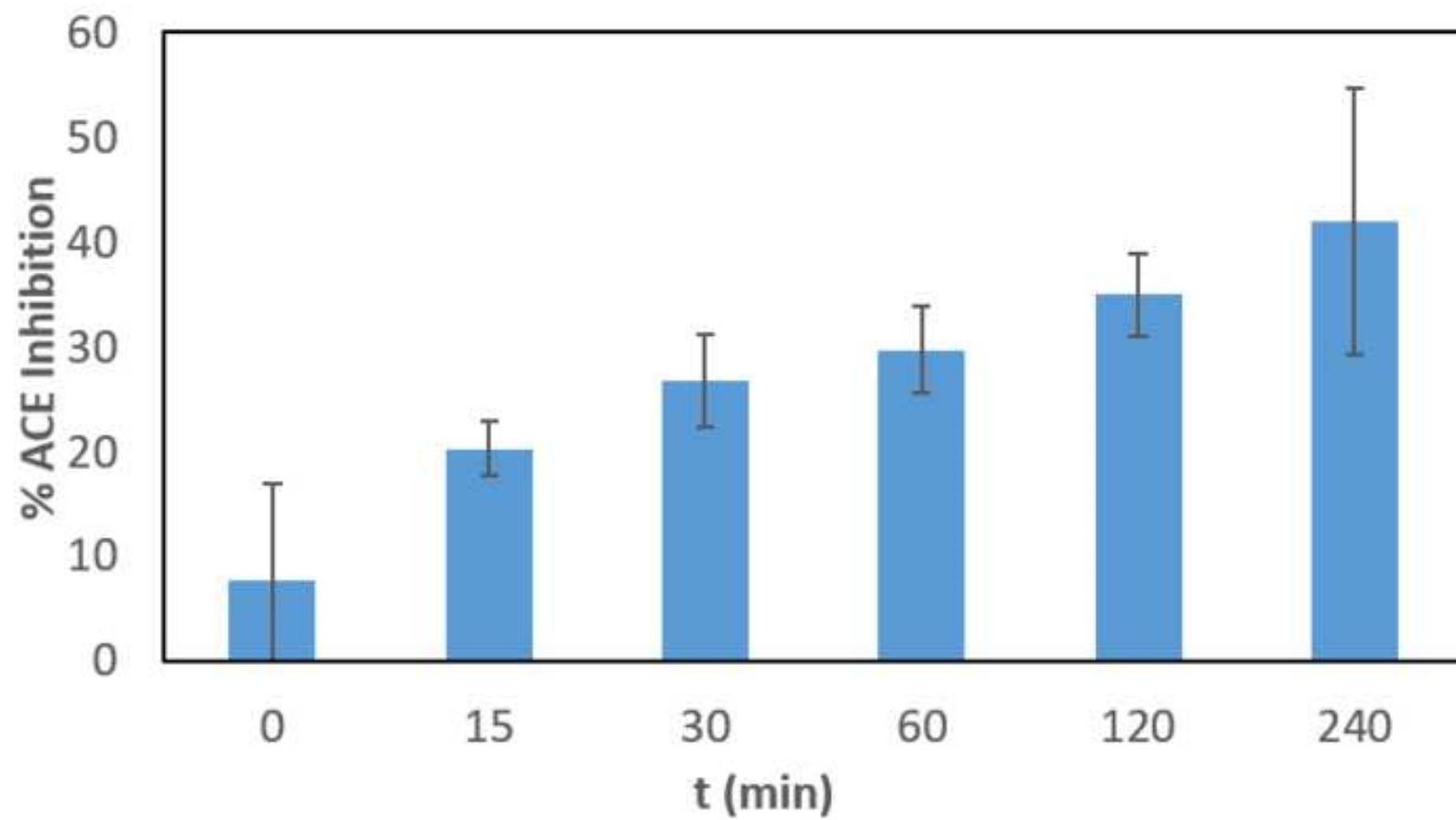


440
441 **Figure 4**









TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

| | |
|---|--|
| Proje Yürütücüsü: | Yrd. Doç. Dr. İBRAHİM GÜLSEREN |
| Proje No: | 115O569 |
| Proje Başlığı: | Bitkisel Yağ Olarak Değerlendirilebilen Yağlı Tohum ve Meyvelerin Posalarından Protein Konsantresi ve İzolatlarının Üretilmesi ve Bunların Değerlendirilmesi |
| Proje Türü: | 3501 - Kariyer |
| Proje Süresi: | 20 |
| Araştırmacılar: | HALİME PEHLİVANOĞLU |
| Danışmanlar: | HÜSEYİN HÜSNÜ GÜNDÜZ |
| Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: | İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM Ü. MÜHENDİSLİK VE DOĞA BİLİMLERİ F. GIDA MÜHENDİSLİĞİ B. |
| Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: | 15/10/2015 - 15/06/2017 |
| Onaylanan Bütçe: | 270595.0 |
| Harcanan Bütçe: | 263228.08 |
| Öz: | <p>Bu projede uygun sulu ve organik ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak soğuk pres posalarından protein konsantreleri üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda kullanılan başlıca numuneler arasında çörek otu, kabak çekirdeği, üzüm çekirdeği, nar çekirdeği, keten tohumu, susam ve fındık posaları sıralanabilir. 3 temel sulu ekstraksiyon yöntemi ile protein üretimi yapılmış ve uygun durumlarda numunelerde kalmış olan yağ molekülleri de hegzan ekstraksiyonu yoluyla uzaklaştırılmıştır. Ekstraksiyon prosesleri sonunda liyofilizasyon yoluyla protein konsantreleri elde edilmiştir. Numunelerdeki protein içeriği geniş bir aralıkta seyretmekte olup (yaklaşık %25-90) bu değerler kullanılan kaynak ve uygulanan ekstraksiyon koşullarından etkilenmektedir.</p> <p>Üretilen protein konsantrelerinin ve izolatlarının fizikokimyasal özellikleri ve teknik fonksiyonellikleri incelenerek farklı gıda ürünü kategorilerine yönelik uygunlukları değerlendirilmiştir. Bu bağlamda, protein konsantreleri ve izolatlarının değerlendirilen başlıca fonksiyonel özellikleri çözünürlük, emülsiyon ve köpük oluşturma kapasitesi, yağ ve su tutma, şişme kapasitesi ve hava-su ara yüzeylerinde yüzey aktivitesidir.</p> <p>Fonksiyonellikleri değerlendirilen numunelerin fonksiyonelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla Maillard konjugasyonu ve transglutaminaz muamelesi gibi yöntemlerden yararlanılmıştır. Yukarıda bahsedilen ekstraksiyon yöntemleri ile izole edilen ya da iyileştirme teknikleri ile özellikleri iyileştirilen numuneler fonksiyonellik testlerinin yanında ekmek üretiminde değerlendirilmiştir.</p> <p>Polen Gıda firmasının desteği ile firmanın tesislerinde protein konsantreleri normal ve glutensiz ekmek formülasyonlarında kullanılmış ve ekmeklerin özellikleri değerlendirilmiştir. Bu çalışmalar sonunda gerek proteince zenginleştirilmiş, gerekse de teknik özellikleri iyileştirilmiş bazı ekmek ürünleri ortaya çıkarılmıştır. Dolayısıyla, ulusal bir firmamızın yan ürününün başka bir ulusal firmamızın formülasyonlarında test edilmesi mümkün olmuştur.</p> |
| Anahtar Kelimeler: | Soğuk pres posaları; protein konsantreleri; proteinlerin fonksiyonel özellikleri; ekmek ürünleri. |
| Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?: | Hayır |
| Projeden Yapılan Yayınlar: | 1- Characterization and enhancement of functional characteristics of black cumin protein isolates (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), 2- Functional and proteomic characterization of protein products from defatted cold press meals. (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), |