T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

SUSAM PROTEİN İZOLATININ YAPISAL VE FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE YÜKSEK BASINÇLI HOMOJENİZASYON UYGULAMASININ ETKİSİ

TUĞBA BASKINCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DOÇ. DR. OSMAN GÜL

2022
KASTAMONU

TAAHHÜTNAME

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu; ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını, bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini bildirir ve taahhüt ederim.

Tuğba BASKINCI

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SUSAM PROTEİN İZOLATININ YAPISAL VE FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE YÜKSEK BASINÇLI HOMOJENİZASYON UYGULAMASININ ETKİSİ

TUĞBA BASKINCI

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN: DOÇ. DR. OSMAN GÜL

Bitkisel proteinlerin hayvansal kaynaklı proteinlere iyi bir alternatif olabilmesi için, besleyici özelliklerine ek olarak gelişmiş fonksiyonel özelliklere sahip olması, gıda ürününün daha iyi yapı ve depo stabilitesi sağlaması açısından iyileştirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında, yağ endüstrisinin bir yan ürünü olan susam posasından elde edilen susam protein izolatının (SPİ), yüksek basınçlı homojenizasyon (YBH) teknolojisi ile modifikasyonu sağlanarak yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ekstrakte edilen susam proteinine 0, 50, 100 ve 150 MPa basıçlarında YBH uygulanmış ve hem işlem görmemiş hem de modifiye proteinlerin bazı fizikokimyasal, fonksiyonel ve reolojik özellikleri incelenmiştir. YBH, proteinlerin sekonder yapıları ve alt fraksiyonlarında genel olarak bir değişikliğe neden olmamıştır. Buna rağmen SPİ'lerin bazı temel fizikokimyasal özelliklerinde önemli farklılıklar belirlenmiştir. Susam proteinleri, 100 MPa basınçta en küçük partikül boyutuna ve en yüksek zeta potansiyeline sahip olup 150 MPa basınç uygulaması proteinin kısmi agregasyonuna neden olduğundan partikül boyutunda hafif bir artış gözlenmiştir. Bu durum mikroyapı görüntüleriyle de desteklenmiştir. Aynı şekilde 100 MPa basınca kadar artan homojenizasyon basıncı ile, SPİ'nin yüzey hidrofobisitesi, serbest/toplam –SH grupları ve suda çözünürlüğü de önemli bir artış sergilemiştir. Fonksiyonel özelliklerdeki değişimler incelendiğinde en gelişmiş su/yağ bağlama kapasitesine, köpürme kapasitesine ve emülsiyon oluşturabilme özelliklerine 100 MPa basınçtaki homojenizasyon ile ulaşılmıştır. İşlenmemiş SPİ'de 32,2 m^2/g olan emülsiyon aktivite değeri, 100 MPa YBH ile en yüksek değerini alarak 64,63 m^2/g olmuştur. 44,06 dakika olan emülsiyon stabilite değeri de, 100 MPa basınç ile 59,84 dakika olarak maksimum halini almıştır. Benzer şekilde, başlangıçta %78,33 olan köpük kapasitesi 100 MPa basınç uygulamasıyla %191,66 olarak oldukça önemli bir artış göstermiştir. En stabil köpük oluşumu ise 150 MPa basınç ile sağlanmıştır. En yüksek viskozite 0 MPa ile işlenmiş protein süspansiyonuda gözlenirken, en düşük viskozite 50 MPa basınç ile işlenenlerde tespit edilmiştir. SPİ süspansiyonlarının akış özellikleri analiz sonuçları Oswalt-de-Waele modeline tam uyum sağlamıştır (R^2=0,997-0,999). 50 MPa basınç

ile muamele edilmiş proteinler hariç diğer tüm örneklerde, frekansın artmasıyla viskoelastik karakter baskın hale geçmiştir (G′ > G″). YBH ile modifikasyon işlemi SPİ'nin jelleşme sıcaklığında yaklaşık 15 ºC azalma sağlamıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Susam proteini, fonksiyonel özellikler, protein modifikasyonu, yüksek basınçlı homojenizasyon

Aralık 2022, 98 Sayfa

ABSTRACT

MSC THESIS

THE EFFECT OF HIGH PRESSURE HOMOGENIZATION ON STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPOTIES OF SESAME PROTEIN ISOLATE

TUĞBA BASKINCI

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING

SUPERVISOR:ASSOC. PROF. DR. OSMAN GÜL

In order for plant based proteins to be a good alternative to animal based proteins, it is very important to have improved functional properties in addition to their nutritional properties in terms of better storage stability and better structure of the food product. Therefore, in this thesis, it was aimed to improve the functional properties of sesame protein isolate (SPI), which was obtained from sesame meal, which is a by-product of the oil industry, by providing modification with high pressure homogenization (HPH) technology. For this purpose, HPH was applied to the extracted sesame proteins at pressures of 0, 50, 100 and 150 MPa and some physicochemical, functional and rheological properties of both unprocessed and modified proteins were investigated. HPH did not cause a general change in the secondary structures and subfractions of the proteins. However, significant differences were determined in some basic physicochemical properties of SPIs. Sesame proteins had the smallest particle size and highest zeta potential at 100 MPa pressure, but a slight increase in particle size was observed as 150 MPa pressure caused partial aggregation of the protein. This was also supported by microstructure images. Likewise, with increasing homogenization pressure up to 100 MPa, the surface hydrophobicity, free/total –SH groups and water solubility of SPI also increased significantly. When the changes in functional properties were examined, the most developed water/oil binding capacity, foaming capacity and emulsification properties were achieved by homogenization at 100 MPa pressure. The emulsion activity value, which was 32,2 m^2/g in the untreated SPI, was 64,63 m^2/g with 100 MPa YBH. The emulsion stability value, which was 44,06 minutes, reached its maximum state as 59,84 minutes with 100 MPa pressure. Similarly, the foam capacity, which was 78,33% at the beginning, increased significantly to 191,66% with the application of 100 MPa pressure. The most stable foam formation was achieved with a pressure of 150 MPa. While the highest viscosity was observed in the protein suspension treated with 0 MPa, the lowest viscosity was determined in the treated with 50 MPa pressure. The analysis results of the flow properties of the

SPI suspensions were well fitted to Oswalt-de-Waele model (R^2=0,997-0,999). In all samples except 50 MPa pressure-treated proteins, the viscoelastic character became dominant with increasing frequency (G′ > G″). Modification with YBH resulted in a decrease of about 15 ºC in the gelation temperature of SPI.

KEYWORDS: Sesame protein, high pressure homogenization, protein modification, functional proporties

December 2022, 98 Page

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecimin başlangıcından itibaren deneyim ve bilgilerini benden esirgemeyen, yüksek lisans eğitimim süresince çeşitli projelere katılmama olanak sağlayan, tezimin araştırma ve gerçekleştirme aşamalarında beni sürekli yönlendiren ve öğrencisi olmaktan dolayı çok şanslı hissettiğim danışman hocam Sayın Doç. Dr. Osman GÜL'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu yüksek lisans tezi, TÜBİTAK ARDEB tarafından 120O773 numaralı 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projesi olarak desteklenmiş olup maddi desteği sağladığı için TÜBİTAK kurumuna teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen ve her zorlukta benim yanımda olan sevgili arkadaşlarım Merve ÇELİK ve Melike Şeyda ŞAHİN'e, tüm eğitim hayatım boyunca ne olursa olsun her zaman arkamda olan, destek ve sevgilerini her zaman hissetiğim sevgili aileme ve özellikle bu süreçte pes etmemem için bana motivasyon kaynağı olan canım babam Ömer BASKINCI'ya en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

TUĞBA BASKINCI

Kastamonu, 2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAYI ..... **ii**
TAAHHÜTNAME ..... **iii**
ÖZET ..... **iv**
ABSTRACT ..... **vi**
TEŞEKKÜR ..... **viii**
İÇİNDEKİLER ..... **ix**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xi**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **xiii**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xiv**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **6**
2.1 Proteinler 6
2.1.1 Genel Tanım 6
2.1.2 Konformasyonel Yapıları 7
2.1.2.1 Proteinlerin primer (birincil) yapısı 7
2.1.2.2 Proteinlerin sekonder (ikincil) yapısı 8
2.1.2.2.1 Sarmal yapılar 8
2.1.2.2.2 β-sheet (tabaka) yapısı 9
2.1.2.3 Proteinlerin tersiyer (üçüncül) yapısı 10
2.1.2.4 Proteinlerin kuarterner (dördüncül) yapısı 12
2.1.3 Proteinlerin Fonksiyonel Özellikleri 13
2.1.3.1 Çözünürlük 14
2.1.3.2 Su bağlama ve tutma kapasitesi 15
2.1.3.3 Proteinlerin arayüzey özellikleri 16
2.1.3.4 Emülsiyon oluşturma 17
2.1.3.5 Köpük oluşturma 18
2.1.3.6 Jelleşme 19
2.1.3.7 Viskozite 20
2.2 Susam ve Susam Proteininin Özellikleri 21
2.3 Protein Modifikasyonunda Uygulanan Isıl Olmayan Yeni Teknolojiler 23
2.3.1 Yüksek Basınçlı Homojenizasyon 24
2.4 Bitkisel Proteinlerin Fonksiyonel Özelliklerinin Modifikasyonunda Yüksek Basınçlı Homojenizasyon Teknolojisinin Rolü 25
3. MATERYAL VE YÖNTEM **32**
3.1 Materyal 32
3.2 Yöntem 32
3.2.1 Susam Posasından Proteininin Saflaştırılması 32
3.2.2 Yüksek Basınçlı Homojenizasyon (YBH) Tekniği ile Protein Modifikasyonu 33
3.2.3 Susam Posası ve Susam Protein İzolatının Bileşiminin Belirlenmesi 34
3.2.3.1 Kuru madde tayini 34
3.2.3.2 Kül tayini 35

3.2.3.3 Protein tayini 35
3.2.3.4 Yağ tayini 36
3.2.4 Susam Proteinlerinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi 36
3.2.4.1 Morfolojik yapı 36
3.2.4.2 Partikül boyut dağılımı 36
3.2.4.3 Sodyum dodesil sülfat poli akrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) 37
3.2.4.4 Zeta potansiyeli 37
3.2.4.5 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (FTIR) 38
3.2.4.6 Serbest ve toplam sülfidril (-SH) grupların belirlenmesi 38
3.2.4.7 Yüzey hidrofobisitesi 39
3.2.4.8 Protein çözünürlüğü 39
3.2.5 Susam Proteinlerinin Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi 40
3.2.5.1 Su ve yağ bağlama kapasitesi 40
3.2.5.2 Köpük oluşturma özellikleri 41
3.2.5.3 Emülsiyon oluşturma özellikleri 41
3.2.6 Susam Proteinlerinin Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi 42
3.2.6.1 Akış özellikleri 42
3.2.6.2 Dinamik reolojik özellikler 42
3.2.6.3 Sıcaklık taraması 43
3.2.7 İstatistiksel Analizler 43
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 44
4.1 Susam Posası ve Susam Protein İzolatının Bileşimi 44
4.2 Susam Proteinlerinin Fizikokimyasal Özellikleri 44
4.2.1 Morfolojik Yapı 44
4.2.2 Mikroyapı (SEM) 47
4.2.3 Partikül Boyut Dağılımı 49
4.2.4 Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) 51
4.2.5 Zeta Potansiyeli 53
4.2.6 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) 55
4.2.7 Serbest ve Toplam Sülfidril (-SH) Grupların Belirlenmesi 57
4.2.8 Yüzey Hidrofobikliği 60
4.2.9 Protein Çözünürlüğü 62
4.3 Susam Proteinlerinin Fonksiyonel Özellikleri 64
4.3.1 Su ve Yağ Bağlama Kapasitesi 64
4.3.2 Köpük Oluşturma Özellikleri 67
4.3.3 Emülsiyon Oluşturma Özellikleri 69
4.4 Susam Proteinlerinin Reolojik Özellikleri 73
4.4.1 Akış Özellikleri 73
4.4.2 Dinamik Reolojik Özellikler 76
4.4.3 Sıcaklık Taraması 79
5. SONUÇ VE ÖNERİ 83
KAYNAKLAR 88
ÖZGEÇMİŞ 98

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Peptit bağı oluşumu. 7
Şekil 2.2 Polipeptid zinciri..... 8
Şekil 2.3 Polipeptitlerin uzaysal düzenlemesi ile α-heliks oluşumu..... 9
Şekil 2.4 Antiparalel (a) ve paralel (b) β-sheet yapılar.. 10
Şekil 2.5 β-laktoglobulin..... 11
Şekil 2.6 Proteinlerde dimer ve tetramer oluşumunun şematik gösterimi 13
Şekil 2.7 Proteinlerde çözünürlük ve agregasyon dengesi..... 14
Şekil 2.8. Hava-su arayüzünde proteinlerin adsorpsiyon olasılığı üzerinde yüzey hidrofobik yamaların rolünün şematik gösterimi. 17
Şekil 2.9 Yüksek basınçlı homojenizatörün şematik gösterimi 25
Şekil 3.1 Öğütülmüş susam posası (A), saflaştırılmış susam protein ekstraktı (B), liyafilizatörde kurutulmuş susam protein ekstaktı (C) ve öğütülmüş susam protein tozu (D). 33
Şekil 3.2 Susam protein izolatının yüksek basınçlı homojenizasyon ile modifikasyonu. 34
Şekil 3.3 Biuret yönteminde kullanılan sığır serum albümininin standart eğrisi 40
Şekil 4.1 Modifikasyon işlemi uygulanmamış susam proteinlerinin mikroskop görüntüleri 45
Şekil 4.2 Yüksek basınçlı homojenizasyon ile modifiye edilmiş susam proteinlerinin mikro-yapısal görüntüleri.. 46
Şekil 4.3 Yüksek basınçlı homojenizasyon tekniği ile modifiye edilmiş susam proteinlerinin mikro-yapısal görüntüleri 48
Şekil 4.4 Yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi uygulanmış susam proteinlerinin partikül boyut dağılımları 50
Şekil 4.5 Kontrol ve yüksek basınçlı homojenizasyon ile modifiye edilmiş susam protein fraksiyonlarının SDS-PAGE görüntüleri 52
Şekil 4.6. Yüksek basınçlı homojenizasyon tekniği ile modifiye edilmiş susam proteinlerinin zeta potansiyel değerleri 54
Şekil 4.7 Susam proteinlerinin yüksek basınçlı homojenizasyon işleminden sonraki FT-IR spektrumları 56
Şekil 4.8 Yüksek basınçlı homojenizasyon tekniği ile modifiye edilmiş susam proteinlerinin serbest ve toplam –SH grupları 59
Şekil 4.9 Yüksek basınçlı homojenizasyon tekniği ile modifiye edilmiş susam proteinlerinin yüzey hidrofobisite değerleri 61
Şekil 4.10 Kontrol ve yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi uygulanmış susam protein izolatlarının çözünürlüğü 63
Şekil 4.11 Kontrol ve yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi uygulanmış susam protein izolatlarının su ve yağ bağlama kapasiteleri 66
Şekil 4.12 Kontrol ve yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi uygulanmış susam protein izolatlarının köpük kapasitesi ve stabilitesi 68
Şekil 4.13 Kontrol ve yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi uygulanmış susam protein izolatlarının emülsiyon oluşturma özellikleri 71

Şekil 4.14 Kontrol ve yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi uygulanmış susam protein izolatlarının akış özellikleri..... 75
Şekil 4.15 Modifiye edilmemiş susam proteinlerinin dinamik reolojik özellikleri 77
Şekil 4.16 Yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi ile modifiye edilmiş susam proteinlerinin dinamik reoloji sonuçları..... 78
Şekil 4.17 Yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi uygulanmamış susam proteinlerinin sıcaklık tarama testine ait sonuçlar..... 80
Şekil 4.18 Yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi ile modifiye edilmiş susam protein süspansiyonlarının sıcaklık tarama test sonuçları... 82

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 4.1 Susam posası ve susam protein izolatının kimyasal bileşimi 44
Tablo 4.2 Yüksek basınçlı homojenizasyon işlemiyle susam proteinlerinin partikül boyutu parametrelerinde meydana gelen değişimler 51
Tablo 4.3 Kontrol ve YBH ile modifiye edilmiş SPİ'lerin serbest ve toplam –SH grup miktarları..... 59
Tablo 4.4 Kontrol ve YBH ile modifiye edilmiş SPİ'lerin yüzey hidrofobisite değerleri 60
Tablo 4.5 Kontrol ve YBH ile modifiye edilmiş SPİ'lerin suda çözünürlük değerleri..... 62
Tablo 4.6 Kontrol ve YBH ile modifiye edilmiş SPİ'lerin su ve yağ bağlama kapasiteleri 65
Tablo 4.7 Kontrol ve YBH ile modifiye edilmiş SPİ'lerin köpük oluşturma özellikleri..... 67
Tablo 4.8 Kontrol ve YBH ile modifiye edilmiş SPİ'lerin emülsiyon oluşturma özellikleri..... 70
Tablo 4.9 Yüksek basınçlı homojenizasyon işlemiyle kesme kuvveti-kayma hızı grafiğine Oswalt-de-Waele model parametreleri 76

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	: Yüzde
°	: Derece
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µmol	: Mikromol
$D_{3,2}$	: Yüzey ağırlıklı ortalama
$D_{4,3}$	: Hacim temelli ortalama partikül boyutu
d_{50}	: Ortalama partikül boyutu
G′	: Depolama modülü
g	: Gram
g	: Gravity
G″	: Kayıp modulü
K	: Kıvam indeksi
kDa	: Kilodalton
kV	: Kilovolt
L	: Litre
M	: Molar
Mbar	: Megabar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
MPa	: Megapaskal
mV	: Milivolt
n	: Akış davranış indeksi
nm	: Nanometre
^{o}C	: Santigrat Derece
p	: Probability, olasılık
Pa	: Pascal
pH	: Potansiyel hidrojen
R	: Radikal
R^2	: Belirleme katsayısı
rad/s	: Radyan/saniye
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
–SH	: Sülfidril
T_{jel}	: Jelleşme sıcaklığı
vd.	: Ve diğerleri
w/v	: Kütle/hacim
α	: Alfa
β	: Beta
µg	: Mikrogram
ϕ	: Phi açısı
ψ	**:** Psi açısı

Kısaltmalar

ANS	: 1-anilino-8-naphathalene-sulfonate
EAI	: Emülsiyon aktivitesi indeksi
EC	: Emülsiyon kapasitesi
ESI	: Emülsiyon stabilitesi indeksi
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
FC	: Köpürme kapasitesi
FS	: Köpük stabilitesi
FT-IR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi
H_2SO_4	: Sülfirik asit
HCl	: Hidroklorik asit
KM	: Kuru madde
NaOH	: Sodyum hidroksit
RFI	: Relatif floresan yoğunluğunun
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poli akrilamid jel elektroforezi
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SPİ	: Susam protein izolatı
YBH	: Yüksek basınçlı homojenizasyon

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun gün geçtikçe hızlı bir şekilde artması, gıda ve gıda hammaddelerine olan talebi de doğru orantılı olarak artırmaktadır. Dünya genelinde 500 milyondan fazla insanın protein yönünden eksik beslendiği ve buna bağlı olarak önemli sağlık sorunları ile karşılaştığı bildirilmektedir. İnsan beslenmesinde büyük öneme sahip olan proteinler, vücut için gerekli en temel gıda bileşenleridir ve 20 farklı α-amino asidin bir araya gelmesinden oluşmaktadır (Ghaly ve Alkoaik, 2010). Proteinler, kasları iyi durumda tutmak, bağışıklık tepkilerini kontrol etmek, hücreleri onarmak ve sinyallerini iyileştirmek için gerekli oldukları için insan diyetlerinde kritik bileşenlerdir (Wen vd., 2019). Diyette yeterli protein alımı, sağlığı korumak ve kwashiorkor gibi protein eksikliğinden kaynaklanan bazı spesifik hastalıkları önlemek için çok önemli bir faktördür (Görgüç vd., 2019). Ayrıca proteinler, insan diyetine çeşitli aminoasitler sağlamanın yanı sıra, gıdalarda viskozite sağlama, jelleşme, emülsifiye etme, köpürme, su tutma ve yağ bağlama gibi arzu edilen işlevsellikleri nedeniyle gıda formülasyonlarında çok önemli bileşenler olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, proteinler çeşitli gıda ürünlerinde çok yönlü bileşenlerdir (Nasrabadi vd., 2021).

Hayvansal proteinler, yüksek verim ve dengeli esansiyel aminoasit içeriği gibi arzu edilen özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde farklı uygulamalarda kullanılmaktadır (Wen vd., 2019). Bu avantajlara rağmen, çevre üzerindeki olumsuz etkileri, yüksek maliyeti, sınırlı bulunabilirliği ve vejetaryenler/veganlar gibi bazı tüketiciler tarafından sınırlı kabulü nedeniyle hayvansal bazlı proteinlere yenilenebilir ve sürdürülebilir alternatifler arayışı büyük ilgi görmüştür (Richter vd., 2015). Hayvansal kaynaklı proteinler gerek besinsel yönden, gerekse sindirilebilirlik yönünden bitkisel kaynaklı proteinlerden daha üstün olmasına rağmen, bitkisel kaynakların kolay üretilmesi, yenilenebilir ve sürdürülebilir olmaları ve bol miktarda bulunmaları bitkisel kaynaklı proteinlerin iyi bir alternatif olarak değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca, protein ve besleyicilik yönünden zengin hayvansal kaynakların fazla tüketilmesi, kalp-damar rahatsızlıkları ve yüksek tansiyon gibi hastalıkları da beraberinde getirmektedir. Bitkisel proteinlerin serum kolesterolünü

düşürücü etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Jenkins vd., 2000). Ayrıca epidemiyolojik araştırmalar, yüksek miktarda hayvansal protein alımının tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve kolorektal kanser riskini artırdığını, bitkisel proteinlerin ise bu tür hastalıklara karşı önemli ölçüde koruyucu etki sağladığını göstermektedir (Mattila vd., 2018).

Bitkisel kaynaklı ürünler, daha düşük enfeksiyon ve kontaminasyon insidansı, daha az kültürel ve dini gıda sınırlamaları, vejetaryen/vegan tüketicilere hitap etmesi, çok yönlülükleri ve daha düşük maliyetli olmaları gibi avantajlarından dolayı son zamanlarda gıda ve ilaç endüstrilerinde gittikçe ilgi görmektedirler (Jafari vd., 2020; Nasrabadi vd., 2019). Bitkisel bazlı ürünlerin bir diğer önemli avantajı, çevresel ve tarımsal açıdan daha yüksek sürdürülebilirliğe sahip olmasıdır (Nasrabadi vd., 2019). Ayrıca, hayvancılığa kıyasla çok daha az arazi gerektirdiği ve çok daha az sera gazı saldığı için üretimleri daha az ormansızlaşma ve iklim değişikliği ile ilişkili bulunmaktadır (Poore ve Nemecek, 2018). Tarım mahsullerinden ve yağ endüstrisi ürünlerinden elde edilen bitkisel kaynaklı atıklar gibi sürdürülebilir ve ucuz kaynaklardan değerlendirilmesi gıda atıklarının azaltılmasında önemli bir alternatif olabilir (Nasrabadi vd., 2021).

Günümüzde tarımsal kaynaklı gıdaların işlenmesiyle tonlarca gıda atığı/yan ürünü açığa çıkmakta ve bunlar çeşitli prosesler vasıtasıyla, ya hayvansal yemlere dönüştürülmekte ya da imha edilmektedir. Yağlı tohumlardan soğuk pres yöntemiyle yağın alınması, geriye protein içeriği yönünden oldukça zengin, önemli miktarda posanın kalmasına neden olmaktadır (Fıratlıgil-Durmuş, 2008). Yağ endüstrisinde yağlık tohumlardan soğuk pres tekniği ile yağın alınmasından sonra geriye kalan posalar %35-60 arasında değişen oranlarda protein içeriğine sahip olduğundan, bu posalar atık ve/veya yan ürün (hayvansal yem kaynağı) olarak değerlendirilme potansiyeline sahiptir. Bu kapsamda ay çiçeği (Dabbour vd., 2018), fındık (Aydemir vd., 2014), kanola (Manamperi vd., 2011), ceviz (Hu vd., 2017), fıstık (Ma vd., 2010) ve susam (Achouri vd., 2012) gibi yağı alınmış posalardan gerçekleştirilen protein saflaştırma ile ilgili çalışmalar son zamanlarda yaygınlaşmıştır. Yağlı tohumlardan olan susam (*Sesamum indicum* L.), eski zamanlardan beri kullanılan ve besinsel açıdan oldukça değerli bir gıda maddesi olup, susam yağının yanı sıra, tahin

ve tahin helvası üretiminde de doğrudan hammadde olarak kullanılmaktadır (Batu ve Elyıldırım, 2009). Önemli bir yağlı tohum kaynağı olmasının yanı sıra, susam tohumu potansiyel bir protein kaynağıdır. Susam yağı endüstrisinde, susam yağı ya organik çözücüler kullanılarak ya da mekanik presleme ile ekstrakte edilmektedir. Susam posası, yağın çıkarılmasından sonra oluşan bir yan üründür (Onsaard, 2012). Yaklaşık %50 protein içeren yağsız susam posası, hem fonksiyonel gıda bileşenleri hem de besin takviyeleri amaçlı kullanım için değerli bir protein kaynağı olarak görülmektedir. Bu nedenle, susam proteinlerinin fonksiyonel ve moleküler özelliklerini anlamak giderek artan bir ilgi konusu olmuştur (Achouri vd., 2012).

Proteinlerin fonksiyonel özellikleri, çevre ve diğer gıda bileşenlerinin etkisi altındaki konformasyonu, yapısı, bileşimi ve fizikokimyasal özellikleri arasındaki karmaşık etkileşimleri temsil etmektedir (Klompong vd., 2007). Kinsella ve Melachouris (1976), proteinlerin fonksiyonel özelliklerini 'depolama, pişirme ve tüketim sırasında gıda sistemlerindeki protein davranışını etkileyen fizikokimyasal özellikler' olarak tanımlamışlardır. Bundan dolayı, köpükler, emülsiyonlar, sol yapılar, jel ve filmler gibi ağsı yapıları oluşturma ve/veya stabilize etme yetenekleri proteinlerin ana fonksiyonel özellikleridir. Fonksiyonel özelliklerin anlaşılması için belirtilen farklı mekanizmalar şunlardır: (1) proteinin su/yağ adsorpsiyonunu, ıslanabilirliğini, çözünürlüğünü ve koyulaştırma özelliklerini etkileyebilen hidrasyon; (2) protein-lipit filmlerin oluşumunu, köpürme ve emülsiyonlaştırma aktivitelerini etkileyebilen hidrofobiklik, hidrofiliklik, net yük veya yük dağılımı gibi protein yüzey aktivitesi; (3) viskozite, elastikiyet, yapışkanlık, agregasyon ve jelasyon dahil olmak üzere reolojik karakteristikleri değiştirebilen şekil, boyut, amino asit kompozisyonu ve sekans gibi protein yapısındaki değişikliklerdir. Ayrıca, dış ortama tepki olarak moleküler esneklik/sertlik ve diğer gıda bileşenleri ile etkileşim gıdalardaki proteinlerin fonksiyonel davranışını etkileyebilmektedir (Speroni vd., 2009).

Bitkisel bazlı proteinler, koyulaştırıcı ve jelleştirici maddeler, emülsiyon ve köpük stabilizatörleri, yağ ve su için bağlayıcı maddeler dahil olmak üzere gıda formülasyonlarında çeşitli rollere sahip fonksiyonel bileşenler olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, bitkisel bazlı proteinlerin çoğu, suda az çözünmeleri ve pH, iyonik yük ve sıcaklığa karşı duyarlılıkları nedeniyle zayıf fonksiyonel özelik

göstermekte, bu durum uygulamalarını sınırlamaktadır. Bu nedenle, işlevselliklerini geliştirmek için özelliklerinin modifikasyonu son derece gereklidir. Bitkisel kaynaklı proteinlerin farklı tekniklerle modifikasyonu, onların fizikokimyasal ve fonksiyonel özelliklerini değiştirerek ve sınırlamalarını ele alarak onları gıda sistemleri için oldukça işlevli bileşenler haline getirme fırsatı sunmaktadır. "Protein modifikasyonu" terimi, bir proteinin moleküler yapısını veya birkaç kimyasal grubunu, tekno-fonksiyonellik ve biyoaktivite iyileştirme amacıyla özel yöntemlerle değiştirme prosesini ifade etmektedir. Genel olarak, protein modifikasyon yöntemleri fiziksel, kimyasal, biyolojik ve diğer yeni yöntemler olarak sınıflandırılmaktadır (Nasrabadi vd., 2021). Kimyasal modifikasyonunun toksisite, gıda alerjisi ve beslenme bozukluğu gibi olumsuz sağlık problemlerine neden olması, enzimatik modifikasyonun yeterli ve uygun olmaması, ısıl işlem, donma-çözünme, ekstrüzyon gibi fiziksel modifikasyonun ise yeterli olmaması ve maliyetlerinin yüksek olmasından dolayı son zamanlarda proteinlerin modifikasyonu için yeni işleme tekniklerinden yararlanılmaktadır (Bhargava ve Jelen, 1995; Camire, 1991; Mirmoghtadaie vd., 2016; Van Beilen ve Li, 2002). Bu amaçla günümüzde proteinlerin fonksiyonelliğini geliştirmek ve ürünün raf ömrünü arttırmak için kimyasal ve ısıl işlem temelli olmayan yüksek hidrostatik basınç, yüksek basınçlı homojenizasyon, ışınlama, ultrason, ultrafiltrasyon, plazma teknolojisi gibi yeni teknolojilerle ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Özellikle uygulama kolaylığının bulunması ve mevcut endüstriyel sistemlere adaptasyonu daha kolay olması açısından yüksek basınçlı homojenizasyon ile proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin modifikasyonu ön plana çıkmaktadır.

Yüksek basınçlı homojenizasyonun prensibi, dar bir delikten sıvının sürekli akmasına odaklanır, bu da hızı arttırır ve yüksek basınçtan atmosferik basınca düşüş gerçekleşir. Bu yüksek basınç düşüşü de yüksek türbülansa, kesme gerilimine ve kavitasyona yol açar. Böylece, sıvı içindeki makromoleküllere ve parçacıklara yüksek mekanik stres uygulanır ve moleküller açılır, katlanır, deforme olur ve hatta ayrılır (Floury vd., 2004). Yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi ile, protein süspansiyonları dar bir aralıktan geçmeye zorlanarak partikül boyutlarında önemli azalmalar meydana getirilmekte ve proteinlerin yüzey özellikleri modifiye

edilebilmektedir. Bu şekilde proteinlerin fonksiyonel, yapısal ve reolojik özellikleri de değiştirilebilmektedir.

Bitkisel proteinlerin sahip oldukları fonksiyonel özelliklerin iyileştirilmesi ve/veya geliştirilmesi amacıyla çeşitli yeni teknolojilerden yararlanılmakta ve böylece proteinlerin su ve yağ bağlama, çözünürlük, emülsiyon, köpük ve jel oluşturma gibi özellikleri modifiye edilebilmektedir. Dolayısıyla bu tez çalışmasıyla yüksek basınçlı homojenizasyon işleminden yararlanılarak bitkisel kaynaklı bir protein olan susam proteininin fonksiyonel özelliklerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Proteinler

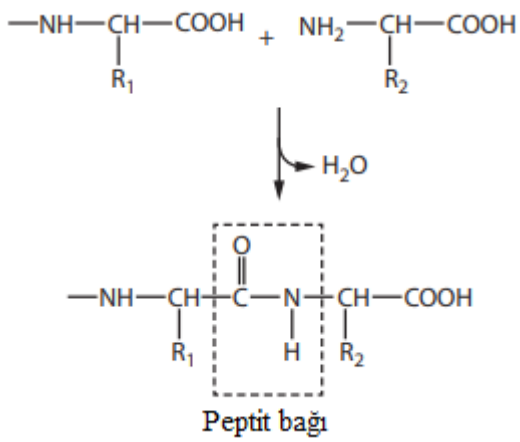
2.1.1 Genel Tanım

Proteinler, 20 farklı amino asitten oluşan oldukça karmaşık polimerlerdir. Amino asit bileşenleri, ikame edilmiş amit bağları aracılığıyla doğrusal bir dizide birbirine bağlanmaktadır (Damodaran ve Parkin, 2017). Hepsi α-amino asit olan 20 amino asit de, α-karbon olarak isimlendirilen asimetrik bir karbon atomunu merkezinde bulundurmaktadır. Tüm amino asitlerde α-karbon atomuna, bir amino grubu, bir karboksil grubu, bir hidrojen atomu ve değişken bir radikal (R) grup olmak üzere 4 farklı grup bağlanmaktadır. Yalnızca glisin amino asidinin α-karbon atomunda, biri radikal grup olan iki adet hidrojen atomu bulunmaktadır. Bu durum glisinin, asimetrik karbon atomu içermeyen tek amino asit olmasını sağlamaktadır. Yan zincir olarak da bilinen radikal grup, amino asidin taşıdığı özelliklere göre farklılık sergilemektedir. Değişken R grubunun boyutu, yapısı, yükü ve suda çözünürlüğü gibi fizikokimyasal özellikleri, bulunduğu amino asidin kendine has fonksiyonunu belirlemektedir. Bu nedenle amino asitlerin gruplandırılması, taşıdığı radikal grubun fizikokimyasal özellikleri (asidik, bazik, hidrofobik, hidrofilik gibi) esas alınarak gerçekleştirilmektedir (Demiralp vd., 2014). Proteinlerin ve peptitlerin yapısı, çözünürlüğü ve yağ bağlama gibi özelliklerini etkileyen en önemli faktörlerden biri, amino asit kalıntılarının hidrofobikliğidir. Proteinlerde, bu amino asit kalıntıları kendilerini proteinin içinde ve sudan uzakta, çevrenin polaritesinin bir organik fazınkine benzer olduğu yerde konumlandırma eğilimindedir. Proteinlerin fonksiyonel çeşitliliği temelde, proteinlerdeki amino asit dizisinin yeniden düzenlenmesiyle üretilebilen çok sayıda üç boyutlu konformasyondan ileri gelmektedir (Damodaran ve Parkin, 2017).

2.1.2 Konformasyonel Yapıları

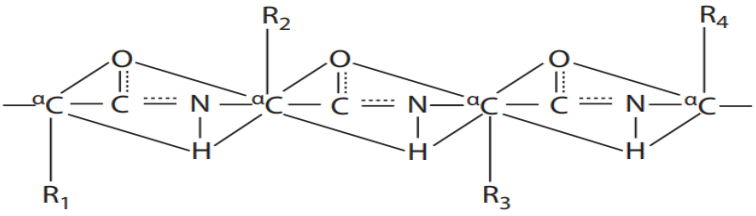
2.1.2.1 Proteinlerin primer (birincil) yapısı

Bir proteinin birincil yapısı, kurucu aminoasitlerin aynı zamanda peptit bağları olarak da bilinen amit bağları yoluyla kovalent olarak bağlandığı doğrusal diziyi ifade etmektedir. Bu dizide, serbest α-amino grubu N terminali ve serbest α-karboksil grubu ise C terminali olarak bilinmektedir. Genel olarak, birincil yapı bilgisi belirtildiğinde, N-terminali polipeptit zincirinin başlangıcını ve C-terminali de sonunu temsil etmektedir.



Şekil 2.1 Peptit bağı oluşumu (Damodaran ve Parkin, 2017).

Peptit bağları, omurgadaki toplam kovalent bağların yaklaşık üçte birini oluşturduğu için sınırlı dönme özgürlüğüne sahiptir ve bu durum omurga esnekliğini büyük ölçüde azaltmaktadır. Yalnızca N−C^{α} ve C^{α}−C bağları dönme özgürlüğüne sahiptir ve bunlar sırasıyla ϕ (phi) ve ψ (psi) dihedral açıları olarak adlandırılmaktadır. N−C^{α} ve C^{α}−C bağlarının ϕ ve ψ dihedral açıları teorik olarak 360° dönme özgürlüğüne sahip olsa da, gerçekte dönme özgürlükleri yan zincir atomlarından kaynaklanan sterik engellerle sınırlıdır. Bu kısıtlamalar, polipeptit zincirinin esnekliğini daha da azaltmaktadır (Damodaran ve Parkin, 2017).



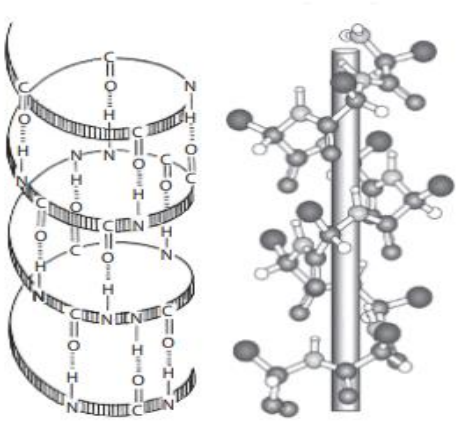
Şekil 2.2 Polipeptid zinciri (Damodaran ve Parkin, 2017).

2.1.2.2 Proteinlerin sekonder (ikincil) yapısı

Sekonder yapı, polipeptit zincirinin belirli bölümlerindeki amino asit kalıntılarının periyodik uzaysal düzenlemesine karşılık gelmektedir. Periyodik yapılar, bir segmentteki ardışık aminoasit kalıntıları aynı ϕ ve ψ burulma açılarını aldığında ortaya çıkmaktadır. ϕ ve ψ açılarının bükülmesi, aminoasit yan zincirleri arasındaki kovalent olmayan etkileşimler tarafından yönlendirilmektedir. Periyodik olmayan veya rastgele yapı ise, ardışık amino asit kalıntılarının farklı ϕ ve ψ burulma açıları sergilemesiyle oluşmaktadır. Yüksek seviyelerde prolin kalıntısı içeren proteinler rastgele veya periyodik olmayan bir yapıya sahip olma eğilimindedir (Damodaran ve Parkin, 2017). En yaygın olarak gözlenen sekonder yapılar α-heliks ve β-sheet yapısıdır.

2.1.2.2.1 Sarmal yapılar

Ardışık amino asit kalıntıları, aynı ϕ ve ψ açılarında döndürüldüğünde protein sarmal yapıları oluşmaktadır. Farklı ϕ ve ψ açı kombinasyonlarını seçerek, teorik olarak farklı geometrilere sahip birkaç tipte sarmal yapı oluşturmak mümkündür. α-heliks, tüm sarmal yapıların en kararlısı olduğu için proteinlerde bulunan baskın sarmal yapıdır. Bu konfigürasyonda, aminoasit yan zincirleri, sarmalın eksenine dik olarak yönlendirilmektedir (Kamtekar vd., 1993; Mak vd., 1980)



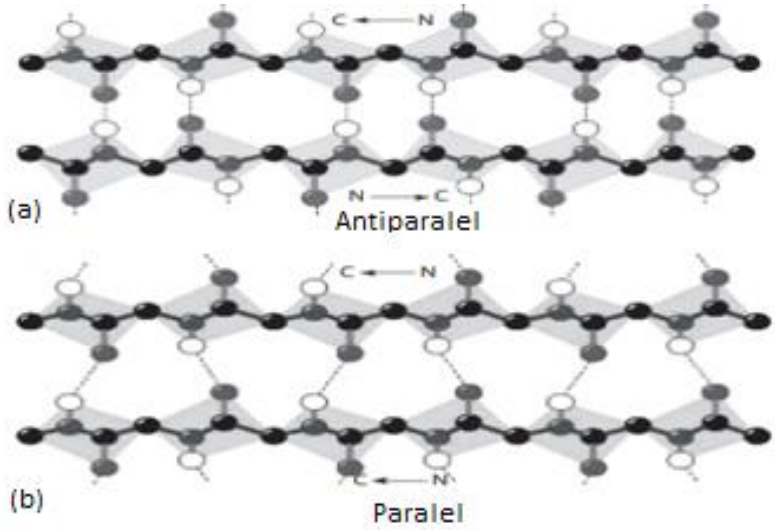
Şekil 2.3 Polipeptitlerin uzaysal düzenlemesi ile α-heliks oluşumu (Damodaran ve Parkin,2017).

α-heliks, her 4 aminoasitte bir hidrojen bağlarının kurulması ile şeklini koruyan sarmal bir yapıdır ve bu sarmal yapıdan dolayı dayanıklıdır. Hidrojen bağları polipeptid zincirinin farklı kısımları arasında veya iki farklı polipeptid zinciri arasında kurulabilmektedir. İkincil yapı oluşumlarında iyonik bağlar da yer almaktadır (Demiralp vd., 2014). α-sarmal oluşumunun ayrıntıları, aminoasit dizisinde ikili bir kod olarak gömülü bulunmaktadır. İkili kod, dizideki polar ve polar olmayan kalıntıların düzenlenmesi ile ilgilidir. Proteinlerde bulunan α-sarmal yapıların çoğu doğada amfifiliktir, yani sarmalın yüzeyinin yarısı hidrofobik kalıntılar ve diğer yarısı hidrofilik kalıntılar tarafından işgal edilmiştir. Çoğu proteinde, sarmalın polar olmayan yüzeyi proteinin iç kısmına bakar ve genellikle diğer polar olmayan ortamlar ile hidrofobik etkileşimlerde bulunur (Damodaran ve Parkin, 2017).

2.1.2.2.2 β-sheet (tabaka) yapısı

β-sheet yapısında, C=O ve N−H grupları zincirin yönüne dik olarak yönlendirilmektedir. Bu nedenle hidrojen bağı oluşumu yalnızca segmentler arasında (intersegment) mümkündür ve bir segment içinde (intrasegment) mümkün değildir. β-iplikleri genellikle yaklaşık 5-15 aminoasit kalıntısı uzunluğundadır. Proteinlerde iki β-ipliği, hidrojen bağıyla etkileşime girerek β-sheet olarak bilinen tabaka benzeri bir yapı oluşturmaktadır. Bu tabaka benzeri yapıda, yan zincirler levha düzlemine dik (yukarı ve aşağı) yönlendirilmektedir. İplerin N→C yönlü yönelimlerine bağlı

olarak, paralel β-sheet ve antiparalel β-sheet olmak üzere iki tip β-sheet yapısı oluşmaktadır. Paralel β-sheet yapılarda, β-ipliklerin N→C yönleri birbirine paralel uzanırken, antiparalel yapıda birbirlerine zıt uzanmaktadır. Zincir yönlerindeki bu farklılıklar, hidrojen bağlarının geometrisini etkilemektedir. Antiparalel β-sheet yapılarda, N−H···O atomları, hidrojen bağının kararlılığını artıran düz bir çizgide uzanırken, paralel β-sheet yapıda, hidrojen bağlarının kararlılığını azaltan bir açıda uzanır (Damodaran ve Parkin, 2017).

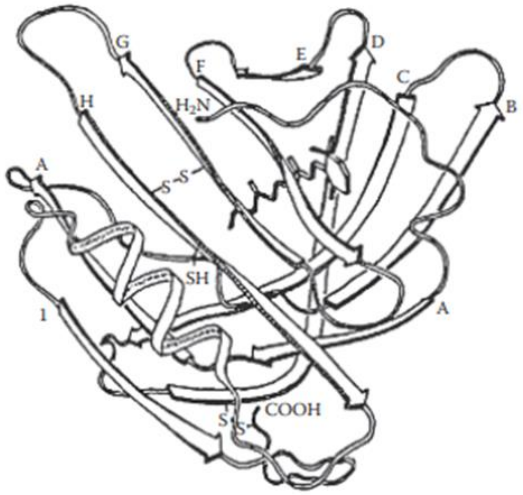


Şekil 2.4 Antiparalel (a) ve paralel (b) β-sheet yapılar. Noktalı çizgiler, peptit grupları arasındaki hidrojen bağlarını temsil etmektedir (Damodaran ve Parkin, 2017).

β-sheet yapısı genellikle α-heliks yapısından daha kararlıdır. Büyük oranlarda β-sheet yapısı içeren proteinler, genellikle yüksek denatürasyon sıcaklıkları sergilemektedir. α-heliks tipi proteinlerin çözeltileri ısıtıldığında ve soğutulduğunda, α-heliks genellikle β-sheet yapıya dönüşmektedir. Bununla birlikte, proteinlerde β-sheet yapıdan α-heliks yapıya ısı kaynaklı dönüşüm gözlenmemiştir (Pan vd., 1993).

2.1.2.3 Proteinlerin tersiyer (üçüncül) yapısı

Sekonder yapı unsurlarının daha fazla katlanmasıyla oluşan tersiyer yapı, özellikle radikal (R) gruplar arasındaki etkileşimler ile gerçekleşmektedir. Van der Waals ve hidrofobik bağlar, üç boyutlu tersiyer yapı oluşumuna katılan başlıca etkileşimlerdir. Ek olarak hidrojen bağları, iyonik bağlar, disülfit kovalent bağları ve tuz köprüleri de tersiyer yapının oluşmasında görev almaktadır (Demiralp vd., 2014).



Şekil 2.5 β-laktoglobulin. Oklar β-sheet ipliklerini ve silindir α-helix yapısını gösterir (Papiz vd., 1986).

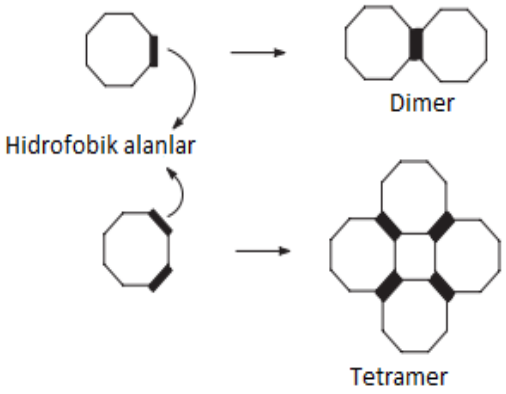
Moleküler seviyede bir proteinin üçüncül yapısının oluşumu için detaylar aminoasit sekansında mevcuttur. Yani doğal bir protein denatürasyona uğradığında, denatüranın çıkarılması üzerine orijinal tersiyer yapıya geri katlanmaktadır. Termodinamik bir bakış açısında tersiyer yapının oluşumu, bir protein molekülü içindeki çeşitli uygun kovalent olmayan etkileşimlerin (hidrofobik, elektrostatik, van der Waals ve hidrojen bağı) optimizasyonunu içermektedir. Böylece bu kuvvetler, polipeptit zincirinin konformasyonel entropisinin dengesizleştirici etkisini değiştirir ve molekülün net serbest enerjisi mümkün olan minimum değere indirgenir (Pace vd., 2014). Üçüncül yapı oluşumu sırasında serbest enerjideki azalmaya eşlik eden en önemli yeniden düzenleme, hidrofobik kalıntıların çoğunun protein yapısının içine ve sulu ortamdan uzağa taşınması ve hidrofilik kalıntıların çoğunun, özellikle de yüklü kalıntıların, protein-su arayüzüne yeniden konumlandırılmasıdır (Miller vd., 1987).

Protein katlanmasını açıklamak için öne sürülen teorilerden biri, hariç tutulan hacim etkisidir. Hariç tutulan hacim etkisi temelde protein-su arayüzündeki gerilimle ilişkilidir ve protein-su arayüzey alanını en aza indirmek için protein katlanması meydana gelmektedir. Birincil yapıdaki hidrofilik ve hidrofobik kalıntıların fraksiyonu ve dağılımı, proteinin çeşitli fizikokimyasal özelliklerini etkilemektedir. Örneğin, katlanmış bir protein molekülünün şekli aminoasit dizisi tarafından belirlenmektedir. Bir protein, sekansı içinde eşit olarak dağılmış çok sayıda hidrofilik kalıntı içeriyorsa uzun veya çubuk benzeri bir şekil almaktadır. Bunun nedeni, uzatılmış bir şeklin büyük bir yüzey alan/hacim oranına sahip olması ve bu nedenle

suyla temas halinde yüzeye daha fazla hidrofilik kalıntı yerleştirilebilmesidir. Öte yandan, bir protein çok sayıda hidrofobik kalıntı içeriyorsa, en az yüzey alan/hacim oranına sahip olan küresel bir şekil alarak proteinin iç kısmına çok sayıda hidrofobik kalıntının gömülmesini sağlamaktadır (Graziano, 2009a; Graziano, 2009b).

2.1.2.4 Proteinlerin kuarterner (dördüncül) yapısı

Kuaterner yapı, birden fazla polipeptit zinciri içeren bir proteinin uzaysal düzenlenmesini ifade etmektedir. Dimer, trimer, tetramer, vb. olarak adlandırılan biyolojik olarak önemli birkaç protein vardır. Oligomerler olarak da adlandırılan kuaterner kompleksler, aynı polipeptitlerin veya farklı polipeptitlerin alt birimlerinden (tersiyer yapılarını kazanmış monomerler) oluşmaktadır. Oligomerik yapıların oluşumu, belirli protein-protein etkileşimlerinin bir sonucudur. Bunlar esas olarak hidrojen bağı, hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler gibi kovalent olmayan etkileşimler tarafından yönlendirilmektedir. Bir proteindeki hidrofobik aminoasit kalıntılarının fraksiyonu, oligomerik yapılar oluşturma eğilimini tetiklemektedir. Kuaterner yapının oluşumu, temel olarak alt birimlerin açıkta kalan hidrofobik yüzeylerini gömmek için termodinamik gereksinim tarafından yönlendirilmektedir. Bir proteinin hidrofobik aminoasit içeriği %30'dan fazla olduğunda, polar olmayan tüm kalıntıların iç kısımda gömülü olduğu bir tersiyer yapı (monomer) oluşturmak fiziksel olarak imkansız hale gelmektedir. Sonuç olarak, daha büyük bir yüzeyde bu geniş hidrofobik parçalara sahip olma olasılığı ile bu parçalar arasında gerçekleştirilen hidrofobik etkileşimler dimer, trimer vb. yapıların oluşumuna yol açmaktadır (Damodaran ve Parkin, 2017).



Şekil 2.6 Proteinlerde dimer ve tetramer oluşumunun şematik gösterimi (Damodaran ve Parkin, 2017).

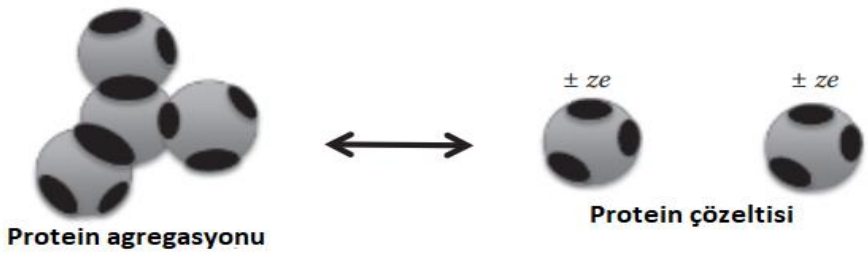
2.1.3 Proteinlerin Fonksiyonel Özellikleri

Proteinler, termodinamik olarak en kararlı olan ve serbest enerjinin en düşük değeriyle ilişkilendirilen doğal bir yapı (primer, sekonder, tersiyer ve kuaterner yapı) ile karakterize edilmektedir. Proteinin içinde bulunduğu ortamın kimyasal özelliklerinin varyasyonları (pH ve iyonik kuvvet gibi) ve fiziksel streslerin uygulanması (ısıtma ve basınç artışı gibi) proteinin doğal yapısını değiştirebilir veya geri döndürülemez değişimlere yol açabilir (Maresca vd. 2017). Proteinin moleküler yapısını büyük ölçüde değiştirmeyen yapıdaki ince değişiklikler genellikle "konformasyonel uyarlanabilirlik" olarak kabul edilirken, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılarda omurga peptit bağlarının bölünmesi olmaksızın gerçekleşen büyük değişiklikler "denatürasyon" olarak kabul edilmektedir. Gıda proteinlerinde denatürasyon, genellikle çözünürlük gibi bazı özelliklerin kaybına neden olsa da kısmi denatürasyonlar bazı fonksiyonel özelliklerin gelişmesini sağlamaktadır (Damodaran ve Parkin, 2017). Gıdalarda yer alan proteinlerin; üretim, hazırlama, depolama ve tüketim esnasında davranışlarını belirleyen fiziksel ve kimyasal özellikler proteinlerin fonksiyonel özellikleri olarak ifade edilmektedir. Proteinlerin fonksiyonel özellikleri; proteinlerin boyutları, şekilleri, aminoasit komposizyonu ve dizilimi, yük dağılımı, hidrofobite/hidrofilite oranı, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapıları, moleküllerin esneklik/sertlik durumu ve diğer moleküllerle etkileşim yeteneği gibi faktörlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Protein izolatının elde edildiği ürün, elde edilme yöntemi veya uygulanan diğer işlemler proteinlerin

fonksiyonel özelliklerini etkilemektedir (Özcan ve Delikanlı, 2011; Yavuz ve Özçelik, 2016).

2.1.3.1 Çözünürlük

Proteinlerin köpürme, emülsifiye etme ve jelleşme gibi fonksiyonel özellikleri genellikle protein çözünürlüğünden etkilenmektedir. Çözünürlük, proteinlerin bir sıvı içerisinde homojen dağılabilmesi açısından önemlidir (Özcan ve Delikanlı, 2011). Protein çözünmezliğine yol açan proteinlerin suda agregasyonu (toplanması), Şekil 2.7'de gösterildiği gibi, çözünmeyi kolaylaştıran itici elektrostatik etkileşim ile çökelmeyi destekleyen çekici van der Waals ve hidrofobik etkileşim arasında bir denge içerir.



Şekil 2.7 Proteinlerde çözünürlük ve agregasyon dengesi. Koyu lekeler, protein yüzeyindeki hidrofobik yamaları temsil eder ve z ve e, sırasıyla bir elektronun net yük ve yük sayısıdır (Damodaran ve Parkin, 2017).

Bir proteinin çözünmesi için net serbest enerji değişimi şu şekilde ifade edilebilmektedir:

$$E_{net} = E_{elec} + E_{vdW} + E_{H\phi} \quad (2.1)$$

Eğer itici (negatif) elektrostatik potansiyel enerjisi (E_{elec}), çekici (pozitif) van der Waals ve hidrofobik potansiyel enerjilerinin (E_{vdW} ve $E_{H\phi}$) toplamından daha büyükse, yani, E_{net} negatif ise, o zaman protein çözelti içinde çözünmektedir. Aksine, prosesin E_{net} değeri pozitif olursa, protein toplanarak çökelmektedir (Damodaran ve Parkin, 2017). Özellikle protein yüzeyindeki hidrofilik/hidrofobiklik dengesi, protein çözünürlüğünü etkilemektedir. Daha yüksek çözünürlük, düşük sayıda hidrofobik

alanın varlığı, yüksek yük ve izoelektrik pH'ın üstünde ve altındaki pH'da meydana gelen elektrostatik itme ve iyonik hidrasyon ile ilgili bulunmuştur (Moure vd., 2006). Çözünürlüğü artıran herhangi bir muamele, yüzey aktivitesi, reolojik ve hidrodinamik özellikler gibi proteinlerin gelişmiş fonksiyonel özelliklerine yol açabilmektedir. Bu nedenle çözünürlük, ilaç, gıda ve içecek endüstrilerinde kullanılacak proteinlerin temelde en önemli fizikokimyasal özelliklerinden biri olarak görülmektedir (Gharibzahedi ve Smith, 2020).

2.1.3.2 Su bağlama ve tutma kapasitesi

Su molekülleri, proteinlerdeki birkaç gruba bağlanmaktadır. Bunlar, yüklü gruplar (iyon-dipol etkileşimleri), omurga peptit grupları, tüm dipol-dipol etkileşimleri ve polar olmayan kalıntılardır (hidrofobik hidrasyon). Proteinlerin su bağlama kapasitesi, kuru bir protein tozu %90-95 bağıl nemde su buharı ile dengelendiğinde protein gramına bağlanan gram su olarak tanımlanmaktadır. Gıda uygulamalarında bir proteinin su tutma kapasitesi, su bağlama kapasitesinden daha önemli bulunmaktadır. Su tutma kapasitesi, suyu yerçekimine karşı tutma yeteneği ile ilgilidir ve bağlı su, hidrodinamik su ve fiziksel olarak hapsolmuş suyu (kılcal su) içermektedir. Proteinlerle ilişkili su miktarı, amino asit profili ile yakından ilişkilidir ve yüklü kalıntıların sayısı pH, sıcaklık, iyonik kuvvet ve protein konsantrasyonu ile değişmektedir. Yüklü gruplara sahip amino asit kalıntıları, yüksüz kalıntılara kıyasla amino asit kalıntısı başına daha fazla molde su bağlamaktadır. Bu nedenle, bir proteinin su bağlama kapasitesi kısmen amino asit bileşimi ile ilişkilidir ve yüklü kalıntıların sayısı arttıkça, su bağlama kapasitesi de artmaktadır. Proteinler en az izoelektrik pH'larında hidratlanmaktadır. İzoelektrik pH'ın üstünde ve altında, net yük ve itme kuvvetlerindeki artış nedeniyle proteinler şişer ve daha fazla su bağlarlar. Çoğu proteinin su bağlama kapasitesi pH 9-10'da diğer pH'lardan daha yüksektir. Bunun nedeni, sülfhidril ve tirozin kalıntılarının iyonlaşması olarak görülmektedir (Damodaran ve Parkin, 2017; Moure vd., 2006).

2.1.3.3 Proteinlerin arayüzey özellikleri

Proteinler amfifilik moleküllerdir ve kendiliğinden hava-su ara yüzüne veya yağ-su ara yüzüne göç ederler. Proteinlerin bir sıvı kütlesinden bir ara yüzeye bu kendiliğinden göçü, proteinlerin serbest enerjisinin ara yüzeyde, sulu fazdakinden daha düşük olduğunu göstermektedir. Bu nedenle denge sağlandığında, ara yüzey bölgesindeki protein konsantrasyonu her zaman sulu fazdaki konsantrasyonundan çok daha fazladır. Arzu edilen yüzey aktif proteinlerin üç özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir: (1) ara yüze hızlı bir şekilde adsorbe olma yeteneği, (2) ara yüzde hızla açılma ve yeniden yönlendirme yeteneği ve (3) ara yüzde termal ve mekanik hareketlere dayanabilen güçlü bir kohezif, viskoelastik film oluşturma yeteneğidir (Damodaran, 2005; Dickinson, 1998). Proteinlerin yüzey aktivitesini etkileyen en önemli özellik moleküler esnekliğidir. Bu, bir proteinin bir yığın sulu fazdan bir ara yüzeye aktarıldığında, hızlı yapısal değişime uğrama yeteneği ile ilgilidir. Bir ara yüzeydeki protein filmin mekanik mukavemeti moleküller arası kohezif etkileşimlere bağlıdır. Bunlar çekici elektrostatik etkileşimleri, hidrojen bağını ve hidrofobik etkileşimleri içermektedir. Adsorbe edilmiş proteinlerin disülfit-sülfhidril değişim reaksiyonları yoluyla ara yüzey polimerizasyonu da proteinin viskoelastik özelliklerini artırmaktadır. Bu nedenle, stabil bir viskoelastik film oluşturmak için, çekici, itici ve hidrasyon etkileşimlerinin uygun bir dengesi gereklidir. Emülsiyonların ve köpüklerin oluşumu ve stabilitesiyle ilgili temel ilkeler çok benzerdir. Bununla birlikte, bu ara yüzeylerin enerjileri farklı olduğu için, bu ara yüzeylerdeki protein işlevselliği için moleküler gereksinimler de farklıdır. Diğer bir deyişle, iyi bir emülgatör olan bir protein, iyi bir köpürme ajanı olmayabilmektedir (Damodaran ve Parkin, 2017).



Şekil 2.8. Hava-su arayüzünde proteinlerin adsorpsiyon olasılığı üzerinde yüzey hidrofobik yamaların rolünün şematik gösterimi (Damodaran ve Parkin, 2017).

2.1.3.4 Emülsiyon oluşturma

Emülsiyon, birbiri ile karışmayan iki sıvı karışımından birinin diğeri içinde küçük damlacıklar halinde dağıtılması olarak tanımlanmaktadır. Proteinler yağ damlacıkları etrafında bir film oluşturarak emülsifikasyon sağlamaktadırlar (Yavuz ve Özçelik, 2016). Yağ-su arayüzünde protein adsorpsiyonu termodinamik olarak elverişlidir. Çünkü protein omurgasının hidrofobik kalıntıları, sulu yığın fazdan çıkarak arayüzeyde proteinin yapısal yeniden düzenlenmesinin ardından yağ fazına doğru yönlenmektedir. Sonuç olarak, adsorbe edilmiş protein yapısı, doğal durum ile tamamen denatüre durum arasında bir yerde bulunmaktadır (Raikos, 2010). Proteinlerin emülsifikasyondan önce kısmi denatürasyonu, genellikle bunların emülsifiye edici özelliklerini geliştiren artan moleküler esneklik ve yüzey hidrofobikliği ile sonuçlanmaktadır. Kısmi denatüre olmuş ve açılmış durumda serbest sülfhidril grupları ve disülfit bağları içeren proteinler, disülfit-sülfhidril değişim reaksiyonu yoluyla yavaş bir polimerizasyona uğramaktadır. Bu durum da, yağ-su arayüzünde oldukça viskoelastik bir film oluşumuna yol açmaktadır (Dickinson ve Matsummura, 1991). Çözünürlük de emülsifikasyonda rol oynamaktadır. Ancak %100 çözünürlük mutlak bir gereklilik değildir. Bununla birlikte, bir protein filminin yağ-su arayüzündeki adsorpsiyonu, hem yağ hem de sulu fazlar ile uygun etkileşimlere bağlı olduğundan, bir dereceye kadar suda çözünürlük gerekmektedir (Damodaran ve Parkin, 2017).

Gıda proteinlerinin emülsifiye edici özellikleri, emülsiyon aktivitesi indeksi (EAI), emülsiyon kapasitesi (EC) ve emülsiyon stabilitesi indeksi (ESI) gibi çeşitli değerler ile değerlendirilmektedir. EAI, proteinin birim ağırlığı başına stabilize edilmiş yağ/su arayüzey alanı olarak tanımlanır. EC, faz değişimi veya emülsiyon çökmesi olmaksızın bir protein tarafından emülsifiye edilebilen maksimum yağ hacmi (mL) olarak ifade edilir. ESI ise, emülsiyon özelliğinin zamanla meydana gelen değişimlere karşı gösterdiği dayanıklılıktır. Proteinlerin emülsifiye edici özellikleri temel olarak, yüzey gerilimini düşürme, damlacıkların birleşmesini önleme ve genel protein hidrofobikliğinden ziyade yüzey hidrofobikliğini artırma yeteneklerine bağlıdır (Dakhili vd., 2019). Emülsiyonlar termodinamik olarak kararsız sistemlerdir. Faz dönüşümü, flokülasyon, kremalaşma, koalesans ve faz ayrışması dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar tarafından kararsız hale gelme eğilimindedir. Emülsiyonların kararsızlığı genellikle homojenleştirme sırasında oluşan, arayüzeyi tamamen kaplayacak yetersiz yüzey aktif maddenin varlığında meydana gelmektedir (Damodaran ve Sengupta, 2003).

2.1.3.5 Köpük oluşturma

Köpük, lamellar faz olarak adlandırılan ince sürekli bir sıvı katman ile ayrılan hava hücrelerinden oluşan iki fazlı bir sistem olarak tanımlanmaktadır. Gıda köpükleri genellikle gazlar, sıvılar, katılar ve yüzey aktif cisimlerinin bir karışımını içeren karmaşık sistemlerden oluşmaktadır (German vd., 1985). Köpük oluşurken proteinler, sıvı faz ve hava kabarcıklarının ara yüzeyine yerleşmektedir. Bu ara yüzeyde protein fraksiyonları birbirinin üzerine katlanır ve apolar kısımları hava yüzeyinde kalacak şekilde yönelir (Yavuz ve Özçelik, 2016). Ara yüzeydeki katlanmış fraksiyonlar arasında oluşan bazı kovalent olmayan etkileşimler ve disülfit çapraz bağlar, mükemmel viskoelastik ve mekanik özelliklere sahip olan jel benzeri bir ağın oluşumunu desteklemektedir. Bir proteinin köpürme kapasitesi (FC), protein tarafından oluşturulan ara yüzey alanı miktarını ifade ederken; köpük stabilitesi (FS), proteinin köpüğü yerçekimi ve mekanik streslere karşı stabilize etme kabiliyetini ifade etmektedir. Köpük stabilitesi, köpük hacminde %50 azalma için gereken süre olarak da tanımlanmaktadır (Damodaran ve Parkin, 2017).

Hava-su ara yüzeyinin serbest enerjisi, yağ-su ara yüzeyinden önemli ölçüde daha fazladır. Bu nedenle bir proteinin hava-su ara yüzeyini stabilize edebilmesi için, yeni oluşturulan ara yüzeye hızla adsorbe olma ve yüzey gerilimini anında düşük bir değere düşürme yeteneğine sahip olması gerekmektedir. Ara yüzey geriliminin düşürülmesi, proteinin ara yüzeydeki hidrofobik grupları hızlı bir şekilde açma, yeniden düzenleme ve yönlendirme yeteneğine bağlıdır (Xu ve Damodaran, 1993). Bu nedenle, proteinin ara yüzeydeki moleküler esnekliği çok önemlidir. Moleküler esnekliğin yanı sıra, hidrofobiklik de proteinlerin köpürtülebilirliğinde bir rol oynamaktadır. İyi köpürme özelliği gösteren bir proteinin iyi bir köpük stabilizatörü olması gerekmemektedir. Köpürebilirlik, adsorpsiyon, esneklik ve hidrofobiklik oranından etkilenirken; stabilite, protein filminin reolojik özelliklerine bağlıdır. Filmlerin reolojik özellikleri hidrasyona, kalınlığa, protein konsantrasyonuna ve moleküller arası etkileşimlere bağlıdır. Yalnızca kısmen açılan ve bir dereceye kadar katlanmış yapıyı koruyan proteinler, hava-su ara yüzeyinde tamamen açılanlardan genellikle daha kalın, daha yoğun filmler ve daha kararlı köpükler oluşturmaktadır (Damodaran ve Parkin, 2017).

2.1.3.6 Jelleşme

Protein jelleşmesi, bir proteinin "sol" durumundan "jel benzeri (projel)" bir duruma dönüşümünü ifade etmektedir. Kendi kendine duran bir jel ağı oluşturmak için, en az jel konsantrasyonu olarak da bilinen minimum protein konsantrasyonu gerekmektedir (Gosal ve Ross-Murphy, 2000). Agregasyon ve çözünürlük arasındaki sınırda kısmi jelleşme meydana gelmektedir. Jelleşmede, üçüncül yapının açılması sırasında kovalent bağların kırılmadan uzun zincirler oluşturabilmesi için kısmi denatürasyon arzu edilmektedir. Ağ oluşumunda yer alan etkileşimler öncelikle hidrojen bağları, hidrofobik ve elektrostatik etkileşimlerdir. Çekici hidrofobik etkileşimler ve itici elektrostatik etkileşimler arasındaki denge, jelleşme mekanizmasını ve jel görünümünü temelde kontrol etmektedir. Bu iki kuvvet, bir jelleşme sistemindeki protein-protein ve protein-çözücü etkileşimleri arasındaki dengeyi fiilen kontrol etmektedir. İlki ikinciden çok daha büyükse, bir çökelti oluşması muhtemeldir. Protein-çözücü etkileşimleri baskın ise, sistem jelleşmeyebilir. Bu kuvvetlerin nispi katkıları; protein türü, ısıtma koşulları,

denatürasyon derecesi ve çevresel koşullara göre değişmektedir. Jelleşmeyi etkileyen çevresel faktörler; pH, iyonik kuvvet, indirgeyici maddeler, sıcaklık, protein olmayan bileşenlerin varlığı ve sisteme uygulanan mekanik kuvvetlerdir (Moure vd., 2006).

Bir proteinin oluşturduğu jelin türü, moleküler özellikleri ve çözelti koşullarına bağlı olarak yarı şeffaf veya koagül (pıhtı) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Büyük miktarlarda polar olmayan aminoasit kalıntısı içeren proteinler, denatürasyon üzerine hidrofobik agregasyona (kümelenme) uğramaktadır. Bu çözünmeyen agregalar daha sonra rastgele birleşerek geri dönüşü olmayan koagül tipi bir jel haline gelmektedir. Bu jellerin opaklığı, çözünmeyen protein agregalarının neden olduğu ışık saçılmasından kaynaklanmaktadır. Koagül tipi jeller genellikle zayıftır ve sinerezise (su atımına) meyillidir. Hidrojen bağlanma etkileşimleriyle oluşturulan şeffaf jeller, pıhtı tipi jellerden daha fazla su tutar ve sinerezise daha az meyillidir. Birincil olarak kovalent olmayan etkileşimlerle sürdürülen jel ağları termal olarak tersine çevrilebilir; yani, yeniden ısıtmanın ardından projel haline eriyebilir. Bu, özellikle hidrojen bağlarının ağa en büyük katkıda bulunanlar olduğu durumlarda geçerlidir. Hidrofobik etkileşimler yüksek sıcaklıklarda güçlü olduğundan, esas olarak hidrofobik etkileşimlerle oluşturulan jel ağları termal olarak geri döndürülemezdir (Damodaran ve Parkin, 2017).

2.1.3.7 Viskozite

Çeşitli sıvı ve yarı katı tipteki yiyeceklerin (örneğin, sulu içecekler, çorbalar, içecekler) tüketici tarafından kabul edilebilirliği, ürünün viskozitesine veya kıvamına bağlıdır. Bir çözeltinin viskozitesi, uygulanan bir kuvvet (veya kesme gerilimi) altında akışa karşı direnci ile ilgilidir. İdeal bir çözelti için, kesme gerilimi (yani, birim alan başına kuvvet, F/A), kesme hızı ile doğru orantılıdır. Bu ifadeye uyan akışkanlara “newtonyen” akışkanlar denir. Çözeltilerin akış davranışı, çözünen madde türünden büyük ölçüde etkilenmektedir. Büyük moleküler ağırlıklı çözünür polimerler, çok düşük konsantrasyonlarda bile viskoziteyi büyük ölçüde artırmaktadır. Protein çözeltileri dahil çoğu makromoleküler çözelti, özellikle yüksek konsantrasyonlarda, newtonyen davranış göstermemektedir. Bu sistemler için kesme hızı arttığında viskozite azalır. Bu davranış "psödoplastik" olarak bilinmektedir.

Protein çözeltilerinin psödoplastik davranışı, protein moleküllerinin ana eksenlerini akış yönünde yönlendirme eğiliminden kaynaklanmaktadır. Zayıf bir şekilde tutulan dimerlerin ve oligomerlerin monomerlere ayrışması da psödoplastik davranışa katkıda bulunmaktadır. Kesme veya akış durdurulduğunda viskozite, protein moleküllerinin rastgele yön belirlemede gevşeme hızına bağlı olarak orijinal değere dönebilir veya dönmeyebilir. Lifli protein çözeltileri, örneğin jelatin ve aktomiyosin genellikle yönlü kalır ve bu nedenle hızlı bir şekilde orijinal viskozitelerini geri kazanamaz. Öte yandan, küresel proteinlerin çözeltileri, örneğin soya proteinleri ve peynir altı suyu proteinleri, akış durduğunda hızla viskozitelerini geri kazanabilir. Bu tür akışkanlara "tiksotropik" denmektedir. Yüksek protein konsantrasyonlarında veya protein-protein etkileşimlerinin çok sayıda ve güçlü olduğu protein jellerinde ise, proteinler plastik viskoelastik davranış sergilemektedir. Bu durumlarda, akışı başlatmak için belirli miktarda kuvvet gerekmektedir (Rao vd., 1986; Damodaran ve Parkin, 2017).

2.2 Susam ve Susam Proteininin Özellikleri

Susam (*Sesamum indicum* L), yemeklik yağ için yetiştirilen en eski çeşni ve mahsullerden biridir. Tohum, yüksek yağ verimi ve kalitesi nedeniyle “yağlı tohum bitkisinin kraliçesi” olarak adlandırılmıştır (Gandhi ve Srivastava, 2007). Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)’nün 2020 yılı susam üretim miktarlarına bakıldığında Dünyada toplamda 6,8 milyon ton üretim gerçekleştirildiği görülmektedir. Sudan (2,7 milyon ton), Myanmar (1,8 milyon ton), Tanzanya (1,4 milyon ton) ve Hindistan (1,3 milyon ton), susam üretiminde başta gelen ülkeler olarak dikkat çekmektedir. Türkiye’de ise 2020 yılında 18.648 ton susam üretimi gerçekleşmiştir. Susam üretim miktarı ülkemizde ihtiyacı karşılayacak düzeyde olmamasına rağmen, susamın doğrudan hammadde olarak kullanıldığı tahin ve tahin helvası üretimi ülkemizde oldukça yaygındır. Bu nedenle Türkiye 2020 yılında 223.162 ton ile en fazla susam ithalatı yapan 2. ülke konumundadır (FAOSTAT, 2022).

Susam tohumu yaklaşık %40-50 yağ, %20-25 protein, %18-20 karbonhidrat ve %5-6 kül içermektedir. Tohum, fitatlar ve okzalatlar gibi beslenme karşıtı faktörler içermesine rağmen, bunlar işleme sırasında önemli ölçüde en aza indirilmektedir

(Gandhi ve Srivastava, 2007). Susam tohumu ve yağı, gıda endüstrisinin yanı sıra ilaç ve kozmetik endüstrilerinde de kullanılmaktadır. Susam yağının kullanımına yönelik artan ilgi, insanlarda hipokolesterolemik etkileri olduğu bildirilen doymamış yağ asitleri ve antioksidan lignanların (sesamin, sesamolin ve sesaminol) yüksek içeriğinden kaynaklanmaktadır (Achouri vd., 2012). Susamda fenolik bileşikler olarak flavonoidler ve flavonollerin varlığı da bildirilmiştir (Şahin vd., 2018)

Önemli bir yağlı tohum kaynağı olmasının yanı sıra, susam tohumu potansiyel bir protein kaynağıdır. Susam yağı endüstrisinde, susam yağı ya organik çözücüler kullanılarak ya da mekanik presleme ile ekstrakte edilmektedir. Susam posası, yağın çıkarılmasından sonraki yan üründür**.** Yağın ekstraksiyonu, yağı alınmış susam posasının protein içeriğinin artmasına (%41,15-49,58) yol açmaktadır. Kabuk ayırma da, posadaki protein içeriğini artırmaktadır. Kabuk esas olarak liflerden oluşmakta ve kabuktan ayırma, enzimatik sindirilebilirliği geliştirmektedir. Susam posası, gıda endüstrisinde protein kaynağı bir bileşen olarak kullanılabilmektedir (Onsaard, 2012). Literatürde susam proteinleri, alkali veya tuz ekstraksiyonu ve izoelektrik çökeltme gibi çeşitli yöntemlerle ekstrakte edildiğine yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Cano-Medina vd., 2011; Inyang vd., 1996; Rivas vd., 1981). Rivas vd. (1981), çalışmasında yağsız susam posalarına hem alkali hem de tuz ekstraksiyonu uygulamıştır. Elde edilen proteinlerin alkali ve tuz izolatlarındaki ham protein oranları sırasıyla %95,5 ve %97,0 olarak belirlenmiştir. Inyang vd. (1996) ise izoelektrik çökeltme yöntemini kullanarak protein ekstraksiyonu sağlamış ve son aşamada elde ettiği protein konsantresinden %70,7 ham protein oranı elde etmiştir.

Susam proteinleri, dört protein sınıfında sınıflandırılmış olup bunlar, suda çözünür albüminler, tuzda çözünür globulinler, alkol/su karışımlarında çözünür prolaminler ve seyreltik asit veya alkalide çözünür glutelinlerdir (Onsaard, 2012). Rivas vd. (1981), susam unu içindeki proteinlerin %8,6 albümin, %67,3 globulin, %1,4 prolamin ve %6,9 glutelinden oluştuğunu bildirmişlerdir. Ayrıca susam proteinlerinin 11S globulin (α-globulin) ve 2S albümin (β-globulin) olarak iki ana depolama proteini içerdiği de belirtilmiştir (Onsaard, 2012). Susam proteininin temel özelliklerinden biri, yüksek metionin ve triptofan içermesidir. Aslında susamı diğer

yağlı tohumlardan ayıran bu metionin içeriğidir. Ancak susam, lizin ve izolösin bakımından yetersizdir (Cano-Medina vd., 2011).

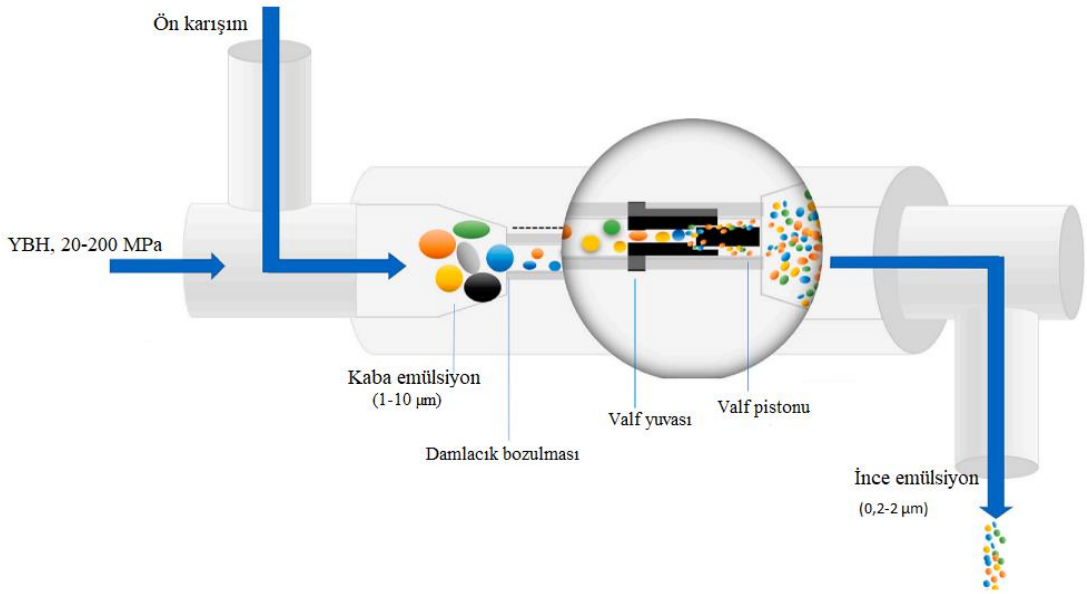
2.3 Protein Modifikasyonunda Uygulanan Isıl Olmayan Yeni Teknolojiler

"Protein modifikasyonu", bir proteinin moleküler yapısını veya birkaç kimyasal grubunu, tekno-fonksiyonellik ve biyoaktivite iyileştirme amacıyla özel yöntemlerle değiştirme sürecini ifade etmektedir. Bitkisel bazlı proteinlerin modifikasyonu, fizikokimyasal özelliklerini değiştirerek ve sınırlamalarını (zayıf suda çözünürlükleri, karmaşıklıkları ve pH, iyonik yük ve sıcaklığa karşı duyarlılıkları gibi) ele alarak onları gıda sistemleri için oldukça işlevli bileşenler haline getirme fırsatı sunmaktadır. Genel olarak, protein modifikasyon yöntemleri fiziksel, kimyasal, biyolojik ve diğer (kompleksleştirme ve amiloid fibrilasyonu) yeni yöntemler olarak sınıflandırılmaktadır. Proteinlerin işlevselliğini artırmaya yönelik fiziksel yöntemler, kimyasallara veya enzimlere dayanmayan basit yaklaşımlardır. Bu protein modifikasyon yöntemleri, işleme sırasında hiçbir kimyasal kullanılmadığından ve dolayısıyla olası kimyasal kalıntıların zararlı sonuçlarından kaçınıldığından önemli ölçüde ilgi görmüştür. Proteinler için bugüne kadar kullanılmış olan fiziksel modifikasyon yöntemleri, işlem sürecinde ısı uygulaması içerenler ve ısıl olmayanlar olarak iki grup altında incelenmektedir. Isıl olan fiziksel modifikasyon yöntemleri geleneksel ısıtma, ohmik ısıtma, mikrodalga ısıtma ve kızılötesi ışınlama gibi teknikleri içermektedir. Isıl olmayan fiziksel modifikasyon yöntemleri ise; gama ışınlaması, elektron ışını ile ışınlama, ultraviyole radrasyon, vurgulu elektrik alanı, soğuk atmosferik plazma, ultrafiltrasyon, ekstrüzyon, bilyalı değirmen işlemi, yüksek hidrostatik basınç, yüksek basınçlı homojenizasyon ve sonikasyon olarak belirtilmiştir (Nasrabadi vd., 2021). Termal teknikler, her ne kadar uygulama kolaylığı sağlasa da ısıl işlemin az veya çok uygulanmasına bağlı olarak yetersiz işleme veya geri dönüşü olmayan denatürasyon gibi bazı olumsuz olgular sergileyebilmektedir. Bu nedenle bitkisel bazlı proteinlerin yapısal modifikasyonunu istenilen ölçüde gerçekleştirmek ve bunları daha işlevsel hale getirerek gıda ürünlerinde kullanımını kolaylaştırmak için ısıl olmayan yeni teknolojiler ile ilgili çalışmalar gittikçe hız kazanmaktadır. Isıl olmayan bir fiziksel teknoloji olan yüksek basınçlı homojenizasyon (YBH) büyük ilgi görmektedir. YBH teknolojisinin en

avantajlı yönü çevre dostu olması, kimyasal ilave gerektirmemesi ve proteinlerin besinsel özelliklerini etkilememesidir (Sarıcaoğlu, 2020).

2.3.1 Yüksek Basınçlı Homojenizasyon

Yüksek basınçlı homojenizasyon (YBH), bir sıvının dar bir delikten akışını zorlamaya dayalı olan ve 250–300 MPa kadar basınçlara ulaşabilen bir teknolojidir (Nasrabadi vd., 2021). YBH ilk olarak hücre parçalanması ve hücre içi biyo-ürünlerin geri kazanılması için kullanılmıştır. Bu teknolojinin, mikrobiyal hücreler üzerindeki etkilerine ek olarak, gıda bileşenleri ve özellikle proteinler/enzimler üzerinde de etki ederek fonksiyonel özelliklerini ve aktivitelerini değiştirdiği bildirilmiştir (Patrignani ve Lanciotti, 2016). Teknolojik bir bakış açısından, bu homojenleştirici esas olarak bir pompa ve bir homojenleştirme valfinden oluşmaktadır. Pompa, akışkanı homojenizasyonun gerçekleştiği valfe zorlamak için kullanılmaktadır (Diels ve Michiels, 2006). Homojenleştirme valfinde akışkan, valf ile valf yuvası arasındaki küçük bir delikten geçiş için basınç altında zorlanmaktadır. Çalışma basıncı, valf ile valf yuvası arasındaki mesafe ayarlanarak kontrol edilmektedir (Patrignani ve Lanciotti, 2016). Yüksek hız ve ani basınç düşüşü nedeniyle yoğun kesme, türbülans ve kavitasyon meydana gelmektedir. YBH uygulamasının, makromoleküllerin parçalanmasına neden olan bu mekanik kuvvetler nedeniyle protein parçacıklarının boyutunu küçülterek, parçacık-parçacık etkileşimlerinden daha fazla parçacık-çözücü etkileşimleri meydana getirebildiği düşünülmektedir. Protein denatürasyonundan dolayı partikül boyutunda bir artış da gözlenebilmektedir. Bu denatürasyon, basınç düşüşündeki mekanik kuvvetlerin ve homojenleştirici vanada ulaşılan yüksek sıcaklıkların bir sonucu olarak görülmektedir (Nasrabadi vd., 2021). Homojenizasyon sırasında valften aşağıya hareket eden akışkanda, kullanılan gıdaya bağlı olarak, sıcaklıkta bir artış (10MPa başına yaklaşık 2,5 °C) gözlenebilmektedir. Bu durum genellikle akışkan hareketindeki yüksek hızın neden olduğu viskoz streslere atfedilmektedir (Patrignani ve Lanciotti, 2016).



Şekil 2.9 Yüksek basınçlı homojenizatörün şematik gösterimi. Homojen olmayan karışım küçük bir delikten artan hız ve düşen basınç ile geçer. Yoğun enerji, kaba emülsiyonu tekdüze, kararlı parçacıklara bölen türbülansa veya kavitasyona neden olur (Roobab vd., 2021).

2.4 Bitkisel Proteinlerin Fonksiyonel Özelliklerinin Modifikasyonunda Yüksek Basınçlı Homojenizasyon Teknolojisinin Rolü

Yüksek basınçlı homojenizasyon teknolojisinin, bitkisel kaynaklı protein izolatlarının fonksiyonel özellikleri üzerindeki etkisi farklı çalışmalarda incelenmiştir. Dong vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada 0,1 (kontrol), 40 ve 80 MPa basınçta YBH'nun yer fıstığı proteini üzerindeki etkisi araştırılmış ve YBH uygulamasının yer fıstığı proteininin mikro yapısının değişimine neden olduğu, böylece gıda endüstrisinde kullanılabilecek çözünürlük, emülsifikasyon, köpürme özelliği ve su tutma kapasitesi gibi fonksiyonel özelliklerini geliştirdiği gözlenmiştir. Bu çalışmada, YBH işlemiyle geliştirilmiş çözünürlük, büyük ölçüde pH değerine bağlı bulunmuştur. Özellikle 40 MPa basınçta uygulanan YBH işlemi, pH 4-7'de fıstık proteininin çözünürlüğünü iyileştirmiş, ancak pH 8-10'da çözünürlüğün kısmen düşmesine neden olmuştur. Buna rağmen maksimum çözünürlük, pH 10'da uygulanan 80 MPa'lık YBH işlemi ile sağlanmıştır. YBH uygulanan yer fıstığı proteininin emülsiyon oluşturma özellikleri ise birbirlerine zıt bir değişim göstermiştir. Özellikle YBH işleminde basınç 0,1'den 80 MPa seviyesine yükseldiğinde EAI'da önemli bir artış meydana gelirken ESI'da azalma gözlenmiştir.

Artan basınç seviyesi köpürme kapasitesinde EAI'ya benzer bir değişim sağlamıştır. Fıstık proteininin köpürme stabilitesi ise 40 MPa'lık bir basınç ile artmış, ancak 80 MPa'lık basınç uygulaması ile azalmıştır. 80 MPa'da YBH işleminden sonra protein izolatının hem emülsiyon hem de köpürme stabilitesindeki azalma, proteinin fazla açılmasının olumsuz bir etkisi olan, moleküller arasındaki daha az etkileşim sayısına bağlı olarak gelişen viskoelastisite azalması ile açıklanmıştır. Son olarak YBH ile muamele edilmiş yer fıstığı protein izolatının çok iyi su tutma kapasitesi sergilediği ve proteininin su tutma kapasitesinin artan basınç ile önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir (Dong vd., 2011).

Farklı bir çalışmada, acı bakla (*L. albus* L. ve *L. angustifolius* L.) protein izolatlarının fonksiyonel özellikleri üzerine YBH'nin etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla acı bakla proteinleri 0 ve 150 MPa basınç aralığında homojenize edilmiştir. Yüksek basınçlı homojenizasyon, *L. albus* L. acı bakla proteinlerinin fonksiyonel özelliklerini geliştirirken, *L. angustifolius* proteinlerinin fonksiyonel özellikleri homojenizasyondan sonra aynı kalmıştır. *L. albus* L. proteinlerinin çözünürlüğü, 0 MPa'da %67 iken 150 MPa'da %73 olarak hafif bir artış göstermiştir. *L. albus* L. proteinlerinin EC'si 50 ve 100 MPa'lık basınçlarda homojenleştirme ile hafifçe yükselirken, 150 MPa'lık bir basınçta önemli ölçüde artma sağlanmıştır. Emülsifiye edici özelliklere ek olarak homojenize edilmiş protein numunelerinin jel kuvvetleri de araştırılmış ve *L. angustifolius* L.'nin işlenmemiş ve işlenmiş acı bakla protein izolatları için %15 konsantrasyonda hiçbir jel elde edilemediği gözlenmiştir. Bunun aksine, *L. albus* L. protein izolatları ise, %15 konsantrasyonda protein jelleri oluşturmuş ve bu protein izolatlarının jel kuvveti, 150 MPa'da yüksek basınçlı homojenizasyondan sonra yaklaşık 4 kat artmıştır (Bader vd., 2011).

Liu ve Kuo (2016)'nun gerçekleştirdiği bir çalışmada tam yağlı soya ununa 100 ve 150 MPa basınç seviyelerinde yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi uygulanmış ve soya unundaki protein çözünürlüğünün, her iki homojenizasyon basıncında da azaldığı gözlenmiştir. Bu durum yüksek basınçlı homojenizasyon işleminin soya unu içindeki proteinlerin denatürasyonuna neden olabileceğini göstermiştir. Soya unu içindeki bu denatüre proteinler ise büyük agregatlar oluşturarak çözünürlüğün azalmasına yol açmıştır.

Yang vd. (2018), bakla proteininin çözünürlüğü, emülsiyon ve köpürme gibi bazı foksiyonel özellikleri üzerindeki etkilerini değerlendirebilmek için 6 geçiş olacak şekilde sırasıyla 103 MPa ve 207 MPa basınçlarında homojenizasyon işlemi gerçekleştirmişlerdir. Yapılan bu çalışmaya göre, pH 7'de işlenmemiş bakla proteinlerinin çözünürlüğü %35 iken, sırasıyla 103 ve 207 MPa'da yüksek basınçlı homojenizasyon işleminden sonra %98 ve 99 olarak ölçülmüştür. Çözünürlükteki bu önemli artış, yüksek basınçlı homojenizasyon yoluyla büyük çözünmeyen protein agregatların çözünür agregatlara ayrıştırılmasının bir sonucudur. Basınç arttıkça bakla proteinin FC'si büyük ölçüde gelişirken FS'de önemli bir fark gözlenmemiştir. İşlenmemiş bakla proteininin FC'si %91 iken, 103 ve 207 MPa'da yüksek basınçlı homojenizasyondan sonra FS'si sırasıyla %210 ve %259'a yükselmiştir. Tüm olumlu etkilerin aksine yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi, bakla proteininin EC ve ESI değerleri üzerinde olumsuz bir etki göstermiştir. İşlenmiş bakla proteinlerinin köpük ve emülsiyon oluşturma özelliklerinde oluşan bu zıt etkinin nedeni olarak ise adsorbe olmamış çözünebilir agregaların neden olduğu flokülasyon ihtimalleri üzerinde durulmuştur.

0 MPa (kontrol) ile 150 MPa basınç değerleri arasında gerçekleştirilen YBH, fındık unu proteinlerinin fonksiyonel özellikleri üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada, 100 MPa basınca kadar homojenizasyon işleminin fındık unu proteininin fonksiyonel özelliklerini geliştirdiği belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre YBH, partikül boyutunu azaltmış, daha yüksek zeta potansiyeli sağlamış ve dolayısıyla suda çözünürlüğü iyileştirmiştir. Özellikle homojenizasyon basıncının 0'dan 75 MPa'ya yükselmesi, fındık unu proteinlerinin açılmasını indüklediği ve protein-çözücü etkileşimini artırdığı için çözünürlüğü önemli şekilde arttırdığı tespit edilmiştir. Ancak homojenizasyon basıncının 100 MPa'dan 150 MPa'ya yükselmesi, proteinlerin daha fazla açılmasına, hidrofobik grupların ve -SH kalıntılarının açığa çıkmasına ve protein agregasyonuna neden olduğu için çözünürlüğü olumsuz etkilediği gözlenmiştir. Fındık unu proteinlerinin emülsifiye edici ve köpürtücü özellikleri de, 100 MPa'ya kadar artan ve sonra 150 MPa'da azalan protein çözünürlüğü sonuçlarıyla iyi bir uyum içinde bulunmuştur. Son olarak fındık unu protein süspansiyonlarının viskozitesinin homojenizasyon basıncının artmasıyla azaldığı belirlenmiştir (Sarıcaoğlu vd., 2018).

Sarıcaoğlu (2020) gerçekleştirdiği bir çalışmada, yüksek basınçlı homojenizasyon ile muamele edilen mercimek protein izolatı süspansiyonlarının fonksiyonel, yapısal ve reolojik değişiklikleri araştırmıştır. Mercimek protein izolatı süspansiyonları, 0, 25, 50, 75, 100 ve 150 MPa'da yüksek basınçlı homojenizatör ile işlenmiştir. Basınç 25'ten 50 MPa'ya ve ardından 75 MPa'ya yükseldiğinde, protein izolatının suda çözünürlüğü önemli ölçüde artmış ve 75 MPa'da en yüksek çözünürlüğe ulaşmıştır. Basınç 75'ten 100 MPa'ya yükseldiğinde ise çözünürlükte hafif bir azalma gözlenmiştir. 150 MPa basınçta ise, muhtemelen proteinlerin daha fazla açılmasını, hidrofobik grupların, SH kalıntı oluşumunun ve buna bağlı olarak protein agregasyonunun artmasını indüklediği için çözünürlüğün önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. EAI ile ESI ve FC ile FS sonuçları, protein süspansiyonlarının çözünürlük sonuçlarına benzer olarak, basıncın 50 MPa'dan 100 MPa seviyesine yükselmesi ile artış göstermiştir. Basıncın 150 MPa'ya yükselmesi sonucu ise önemli bir azalma gözlenmiştir. Son olarak 50-150 MPa basınçları arasında muamele edilen numuneler, muamele edilmeyen ve 25 MPa basınca kadar muamele edilen numunelere göre, artan depolama modülü (G') değerleri nedeniyle daha belirgin jelleşme gösterdiği saptanmıştır.

Farklı bir çalışmada düşük basınçta (1~40 MPa) homojenizasyonun soya proteini izolatlarının yapısal ve fonksiyonel özellikleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar, doğal soya proteini çözünürlüğünün %66,86 olduğunu ve homojenizasyon basıncıyla arttığını, ancak 20 MPa'dan daha yüksek basınçlı bir homojenizasyon uygulaması ile protein agregasyonuna bağlı olarak protein çözünürlüğünün azaldığını göstermiştir. Yine de her basınç seviyesinde kontrolden daha fazla bulunan çözünürlüğün artışı homojenizasyonun kesme ve darbe kuvveti nedeniyle azalan parçacık boyutu ve artan suyla etki alanı sonucu hidrojen bağlarının ve elektrostatik etkileşimlerin artması ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmaya göre 10 MPa ve daha yüksek basınçlarda homojenizasyon uygulanan soya proteinlerinin emülsiyon ve köpük oluşturma aktiviteleri de gelişme göstermiştir. 10 MPa homojenizasyon basıncının soya proteininin emülsiyon ve köpük oluşturma gibi ara yüzey özelliklerindeki olumlu etkisi, bu basınçtan sonra oluşan protein açılmasına bağlı olarak artan yüzey hidrofobikliğine bağlanmıştır (Li vd., 2020).

Levy vd. (2021), alternatif bir bitkisel protein kaynağı olan patates protein izolatı ile stabilizatör ilave etmeden yoğurt benzeri fermente bir ürün oluşturmak için yüksek basınçlı homojenizasyon (0,1 MPa, 30-200 MPa) kullanımının etkisini incelemişlerdir. Çalışmada yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak protein çözeltileri 200 MPa basınçta, 15 °C giriş sıcaklığında homojenizasyona tabi tutulmuş, protein emülsiyonları oluşturulduktan sonra ise 30–200 MPa basınç aralığında ve 25 °C giriş sıcaklığında tekrar yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi uygulanmıştır. Bu çalışmaya göre, ön işlem olarak uygulanan 200 MPa basınç ve 15 °C giriş sıcaklığındaki homojenizasyon işlemi protein çözünürlüğünü önemli ölçüde geliştirmiştir. Ön işlem uygulandıktan sonra gerçekleştirilen homojenizasyon işlemi ise tüm basınç parametrelerinde (30-200 MPa) ön işlem uygulanmayanlara kıyasla emülsifikasyon sonrası tortu oluşumunu azaltmıştır. Artan homojenizasyon basıncı ile patates protein emülsiyonlarındaki faz ayrılmasına karşı stabilite artırılmıştır. Bu sonuçlarla bağlantılı olarak, 200 MPa'da oluşturulan emülsiyondan fermente edilen yoğurt alternatiflerinde en az faz ayrımı ve en yüksek sertlik değeri gözlenmiştir. Buna karşın patates proteini jel benzeri sistemlerin su bağlama kapasitelerinde artan homojenizasyon basıncının bir etkisi gözlenmemiştir. Sonuç olarak bu çalışmaya göre yüksek basınçlı homojenizasyon kullanımı, stabilizatör içermeyen ve daha yüksek protein içeriğine sahip alerjenik olmayan patates protein izolatından bir yoğurt alternatifi üretilmesine olanak sağlamıştır.

Guo vd. (2021), barbunya proteinlerinin yapısal ve emülsifiye edici özellikleri üzerinde termal agregasyonun ve termal agregasyon sonrası yüksek basınçlı homojenizasyonun etkilerini belirlemeyi amaçlamıştır. Bu çalışmaya göre düşük basınçta (30, 60 MPa) YBH, moleküller arasında disülfid bağlarının oluşumunu destekleyerek proteinde çözünür agregaların oluşumuna yol açmıştır. Bu, partikül boyutunu ve görünür viskoziteyi artırmıştır. YBH'den sonra barbunya proteinleri tarafından stabilize edilen emülsiyonların EAI ve ESI değerleri de basınç uygulamasıyla önce artmış, 60 MPa basınç uygulaması ile en yüksek değerlerini almış ve sonra azalma göstermiştir.

Zhang vd. (2022)'nin gerçekleştirdiği bir çalışmada, yer bademi (*Cyperus esculentus* L.) proteinlerinin emülsifiye edici özellikleri üzerine yüksek basınçlı (0-140 MPa) homojenizasyon tekniğinin etkileri araştırılmıştır. Homojenizasyon basıncıyla kademeli olarak artan yer bademi proteininin EAI ve ESI değerleri 100 MPa'da maksimuma ulaşmıştır. Homojenizasyon basıncının 100 MPa'yı aştığında ise, bu değerler önemsiz bir düzeyde azalmıştır. Protein emülsiyonunun partikül boyutu da homojenleştirme basıncı arttıkça azalma göstermiş ve 100 MPa'da minimum değerini almıştır. Yer bademi proteini ile stabilize edilen emülsiyonların reolojik özellikleri incelendiğinde ise, YBH işleminin bu emülsiyonların görünen viskozitelerini azalttığı ve akışkanlığını artırdığı bildirilmiştir.

Luo vd. (2022), yüksek basınçlı homojenizasyonun (0, 10, 30, 50 MPa) kinoa protein izolatı süspansiyonlarının fiziko-kimyasal, mikroyapısal ve reolojik özelliklerini geliştirmek için mükemmel bir modifikasyon tekniği olabileceğini belirtmişlerdir. 50 MPa'da YBH işleminden sonra, büyük protein agregatları bozulmuş ve parçacık boyutu önemli ölçüde azalmıştır. Buna bağlı olarak 50 MPa basınçtaki işlem ile, suda çözünürlük, emülsifiye etme ve köpürme kabiliyeti önemli ölçüde artarak en yüksek değerini almıştır. Özellikle 50 MPa basınçta YBH ile modifiye edilmiş kinoa protein izolatının çözünürlüğü, %9'dan %33'e yaklaşık altı kat atarken, köpürme kapasitesi ise işlenmemiş proteininkine göre neredeyse iki kat daha yüksek bulunmuştur. Son olarak bu çalışmada, YBH ile muamele edilmiş kinoa proteini süspansiyonlarının, daha kompakt ve homojen bir protein ağı mikro yapısı ile daha güçlü bir jel mukavemeti sergilediği de rapor edilmiştir.

Farklı bir çalışmada, bezelye proteini süspansiyonları 150 MPa'ya kadar artan basınçlarda, 1 veya 3 geçiş olacak şekilde homojenleştirmiştir. En yüksek çözünürlük değerlerine 3 geçişte uygulanan 70 ve 100 MPa basınçlardaki homojenizasyon ile ulaşılmıştır. Bu sonuç, proteinlerin dağılmasını ve hidrasyonunu destekleyen parçacık boyutu küçülmesine atfedilmiştir. 3 geçişte gerçekleştirilen 150 MPa'lık yüksek basınçlı homojenizasyonda ise topaklanma oluşumunun gözlemlenmesine bağlı olarak çözünürlük azalmıştır. Bu durum aynı zamanda, 3 geçiş ve 70 MPa basınçlı homojenizasyon ile maksimum değere ulaşan yağ bağlama kapasitesinin de gelişimini etkilemiştir (Melchior vd., 2022).

Literatür çalışmalarının geneline bakıldığında, YBH teknolojisinin belli bir basınç parametresine kadar bitki bazlı proteinlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerini geliştirdiği ifade edilebilir. YBH sağladığı kesme kuvveti, türbülans ve kavitasyon etkileri ile büyük partiküllerin boyutunu küçülterek ve bitkisel protein moleküllerinin yapılarını açarak onların yapısal özelliklerini değiştirmiş ve buna bağlı olarak fonksiyonel özelliklerini geliştirmiştir. Yalnızca bazı bitkisel proteinlerin çok yüksek homojenizasyon basınçlarıyla modifiye edilmesi, partiküllerde agregasyonu uyararak fonksiyonel özelliklerdeki gelişimi azaltmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

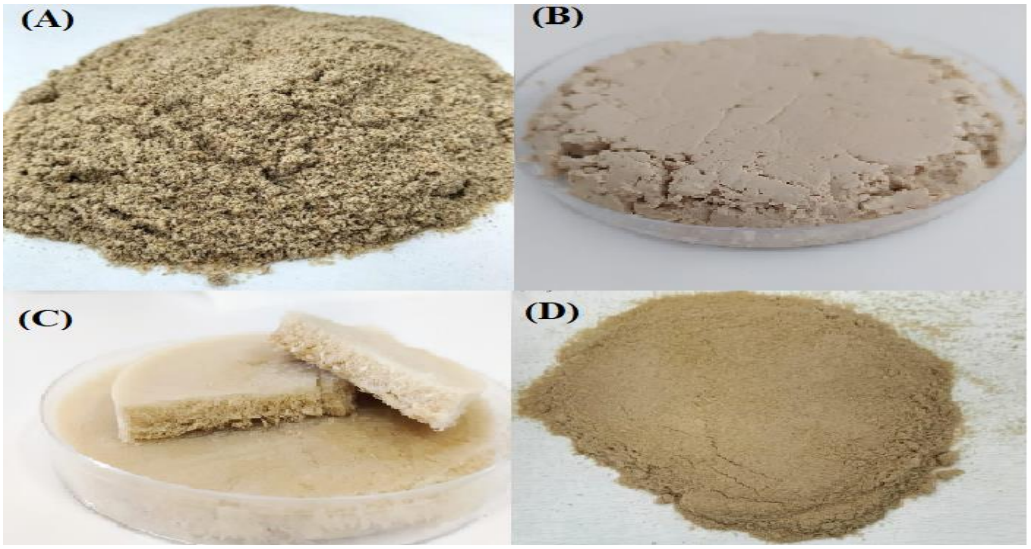
3.1 Materyal

Beyaz susam örnekleri Aslan Susam ve Tahin Gıda Mad. San ve Tic. Ltd. Şti (Eskişehir) tarafından tedarik edilmiştir. Susamların, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde soğuk pres ile yağ ekstraksiyonu işlemi ile susam posaları elde edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Susam Posasından Proteininin Saflaştırılması

Susam posasından proteinlerin ekstraksiyonu Gandhi ve Srivastava (2007) tarafından önerilen yöntemin kısmi modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir. İlk olarak pelet halindeki susam posaları bir öğütme (Waring 80011S model, ABD) ve ardından eleme işlemiyle toz forma dönüştürülmüştür. Ardından 1:9 (w/v) oranında saf su ile karıştırılmış ve bu karışım bir ultraturrax (Daihan, HG-15D, Gang-Won-Do, Güney Kore) yardımıyla 9.000 rpm hızında 3 dakika süre ile homojenize edilmiştir. Elde edilen süspansiyonun pH'si 1 M NaOH ile 10'a ayarlanmıştır. Posadaki proteinlerin suya geçmesi için süspansiyon manyetik karıştırıcı kullanılarak 1 saat süreyle karıştırılmıştır. Çözünen proteinleri çözünmeyen kısımlardan ayırmak için süspansiyon 8.000 rpm hızda 4 °C'de 10 dakika süreyle santrifüj (Nüve NF-800R model, Türkiye) edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant bir beher içerisinde toplanmış ve pH'sı 1 M HCl ile 4,5'e ayarlanarak izoelektrik pH'da proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. Ardından tekrar aynı koşullarda santrifüj edilmiş ve çökelti kısmı toplanmıştır. Toplanan çökelti önce -24 °C'de 24 saat süre ile dondurulmuş, ardından liyofilizatör (Teknosem, Toros TRS-4/4, Türkiye) yardımıyla -56 °C sıcaklıkta 10^{-3} mbar basınçta kurutulmuş ve kahve öğütücüsü ile öğütülerek protein tozları elde edilmiştir. Susam posasından elde edilen susam protein izolatı (SPİ) aşamalar halinde Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Öğütülmüş susam posası (A), saflaştırılmış susam protein ekstraktı (B), liyafilizatörde kurutulmuş susam protein ekstaktı (C) ve öğütülmüş susam protein tozu (D).

3.2.2 Yüksek Basınçlı Homojenizasyon (YBH) Tekniği ile Protein Modifikasyonu

SPİ, ağırlıkça %4 protein içerecek şekilde saf su ile karıştırılmış ve yüksek çözünürlük değerlerine ulaşılması amacı ile karışımın pH'sı 1 M NaOH ile 9'a ayarlanmıştır. Daha sonra 0, 50, 100 ve 150 MPa basınç değerlerinden 1 kez yüksek basınçlı homojenizatörden (Panda PLUS, 2000; GEA Niro Soavi, Parma, Italy) geçirilmiştir (Şekil 3.2). Homojenizasyon öncesi SPİ süspansiyonu sıcaklığı 7 °C olup homojenizasyon sonrası sıcaklıklar, uygulanan basınca bağlı olarak, 13-33 °C arasında ölçülmüştür. Homojenizasyon sonrası protein süspansiyonları -24 °C'de 24 saat boyunca bekletilerek dondurulmuş ve ardından liyofilizatör ile dondurarak kurutma işlemine tabi tutularak toz haline getirilmiştir.



Şekil 3.2 Susam protein izolatının yüksek basınçlı homojenizasyon ile modifikasyonu.

3.2.3 Susam Posası ve Susam Protein İzolatının Bileşiminin Belirlenmesi

Susam posasında ve ekstrakte edilen protein izolatının nem, protein, yağ ve kül analizleri AOAC (2000) tarafından önerilen yöntemler esas alınarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1 Kuru madde tayini

Susam posası ve susam protein izolatlarının toplam kuru madde tayini için darası alınmış paslanmaz çelik kaplara 2'şer gram örnek tartılmış ve 105 ºC'lik etüvde sabit tartıma ulaşılana kadar bekletilmiştir. Bu süre sonunda kaplar desikatöre alınmış ve soğuduktan sonra örneklerin son ağırlıkları belirlenmiştir. Sabit tartım elde edildikten sonra yüzde (%) kuru madde miktarı eşitlikteki gibi hesaplanmıştır.

$$\%\ Kuru\ Madde\ (KM) = \frac{(Son\ Tartım - Kap\ Darası)}{Örnek\ Miktarı} x100 \qquad (3.1)$$

3.2.3.2 Kül tayini

Susam posası ve susam protein izolatlarının kül tayini için darası alınmış porselen krozeler içerisine 2'şer gram örnek tartılmış ve örnekler kül fırınına yerleştirilmiştir. Kül fırınının derecesi kademeli bir şekilde artırılarak 550 ºC'ye getirilmiş ve beyaz renkte kül elde edilinceye kadar yakma işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra yakılan örnekler desikatöre alınarak soğutulmuş ve son ağırlıkları kaydedilmiştir. Yüzde kül miktarı Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\%\ Kül\ Miktarı = \frac{(Son\ Tartım - Kap\ Darası)}{Örnek\ Miktarı} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.3.3 Protein tayini

Susam posası ve protein izolatlarının protein içeriği Kjeldahl yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntem yakma, distilasyon ve titrasyon işlemlerinden oluşmaktadır. İlk olarak yakma ünitesindeki cam tüplere 0,5 g numune tartımıştır. Tüplerden biri kör olarak belirlenmiş ve boş bırakılmıştır. Kör dahil her tüpe 2 adet Kjeldahl tableti ve 20 ml H_2SO_4 ilave edilmiş ve 2 saat boyunca yakma işlemi gerçekleştirilmiştir. Distilasyon için yakma ünitesinden alınan tüpler, 60 ml borik asit ve birkaç damla indikatör içeren beherlerle teker teker distilasyon cihazına alınmış ve sırasıyla reagent 1 (saf su) ve reagent 2 (NaOH) kullanılarak distile edilmiştir. Distilasyon işleminin ardından beherlerdeki karışıma 0,1 N H_2SO_4 ile titrasyon işlemi uygulanmış ve kullanılan H_2SO_4 miktarına göre numunelerin önce %N daha sonra % Protein miktarları aşağıdaki denklemler yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\%N(Azot) = \frac{(V_1 - V_0) \times N_S \times 1{,}401}{Örnek\ miktarı\ (g)} \quad (3.3)$$

$$\%Protein = \%Azot \times 6{,}25 \quad (3.4)$$

V_1=Numune için sarf edilen H_2SO_4 miktarı, V_0= Kör için sarf edilen H_2SO_4 miktarı ve N_S= H_2SO_4'in normalitesi

3.2.3.4 Yağ tayini

Susam posası ve ekstrakte edilen protein izolatlarının yağ içeriği klasik soxhlet ekstraksiyonu ile belirlenmiştir. Klasik soxhlet ekstraksiyonu için öncelikle ölçülü balonlar 105 °C'de kurutulmuş ve ardından tartılarak ağırlıkları kaydedilmiştir. 2 g numune kartuşlara tartılmış ve üzerlerine birer parça pamuk konulmuştur. Ardından soxhlet ekstraktörüne yerleştirilmiştir. 200 mL dietil eter eklenen balonlar, aspiratör ve soğutucu birbirine bağlanarak ısıtıcıya yerleştirilmiştir. Isıtıcı derecesi ayarlanarak solventin yavaşça kaynaması sağlanmıştır. 6 saat ekstraksiyon uygulandıktan sonra solventin kalan kısmı 105 °C'lik etüvde buharlaştırılmış ve ardından numunelerin ağırlıkları kaydedilmiştir. Son olarak yağ içeriği, aşağıdaki denklem (3.5) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Yağ\ (\%) = \frac{Son\ tartım - Balon\ dara}{Örnek\ miktarı} \times 100 \quad (3.5)$$

3.2.4 Susam Proteinlerinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.4.1 Morfolojik yapı

Kontrol ve yüksek basınçlı homojenizasyon ile modifiye edilmiş SPİ süspansiyonlarının görüntüsü ışık mikroskobu (Leica, DM 500) ile 40× büyütme katsayısı kullanılarak elde edilen fotoğraflarla değerlendirilmiştir.

Modifikasyon işleminin SPİ partiküllerinin yüzey mikroyapıları üzerine etkisi taramalı elektron mikroskobu (SEM, FEI, Quanta FEG 250, Japonya) ile de belirlenmiştir. Protein örnekleri 10 nm kalınlıkta altın-paladyum tabakası ile kaplandıktan sonra 5 kv hızlanma voltajında 5.000 × büyütme katsayısı ile görüntülenmiştir.

3.2.4.2 Partikül boyut dağılımı

Susam proteinlerinin sulu dispersiyonlardaki (%4) partikül boyut dağılımları lazer difraksiyon partikül boyutu ölçüm cihazı (Malvern Instruments, Mastersizer 3000

model, İngiltere) ile gerçekleştirilmiştir. Ölçüm için protein süspansiyonları 1:100 oranında ultra saf su ile seyreltilerek 25 °C'de analiz edilmiştir.

3.2.4.3 Sodyum dodesil sülfat poli akrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Susam proteinlerinin SDS-PAGE analizleri Laemmli (1970) tarafından önerilen yönteme göre %12 ayırma ve %4 yığma jelleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Jellere tatbik edilecek örneklerin hazırlanması için %2,5 (w/v) konsantrasyonunda hazırlanan kontrol ve modifiye edilmiş susam proteini stok çözeltileri ile 2-merkaptoetanollü örnek tamponu (0,5 M Tris-HCl tampon (pH 6,8), %10 (w/v) SDS, % 20 (w/v) gliserol ve 2-merkaptoetanol) 1:1 oranında karıştırılmış ve üzerlerine ayrı ayrı 25 µL bromfenol mavisi ilave edilmiştir. 5 dakika boyunca kaynayan suda bekletilip ardından hemen soğutulan örnekler, standart ile birlikle elektroforez tankına yerleştirilen jellere tatbik edilmiştir. Tank içi, tampon çözeltisi (0,025 M Tris, 0,192 M glisin ve %10 (w/v) SDS) ile doldurulduktan sonra elektroforez ünitesi doğru akım ünitesine bağlanarak elektroforez işlemine başlanmıştır. Örnekler yığma jelinden ayırma jeline ininceye kadar (yaklaşık 90 dakika) 100 voltluk akıma maruz bırakılmış, daha sonra akım 110 volta çıkarılarak izleme boyası (bromfenol mavisi) jelin alt kısmına ininceye dek bekletilmiştir. Jeller, %0,1 coomassie brillant mavisi, %40'lık metanol ve %7'lik asetik asit içeren boyama çözeltisinde 1 gece bekletilmiş, daha sonra 4-5 saat süreyle %40 metanol ve %7 asetik asit içeren boya giderici çözeltide tutulmuştur. Ayrılan protein bantları, molekül ağırlıkları bilinen standart protein bantları ile karşılaştırılarak tanımlanmıştır.

3.2.4.4 Zeta potansiyeli

Kontrol ve modifiye protein örneklerinin zeta potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla test çözeltisi (1 mg/mL) elde etmek için protein örnekleri distile suda disperse edilmiştir. Bir mL protein çözeltisi zeta hücresine enjekte edilmiş ve Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, İngiltere) kullanılarak zeta potansiyeli ölçülmüştür.

3.2.4.5 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (FTIR)

Toz formundaki proteinlerin kimyasal bağ yapılarındaki muhtemel değişim FTIR (Perkin Elmer, Spektrum Two model, ABD) analizi ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla toz numuneler 4.000-650 cm^{-1} dalga boyu aralığında 4 cm^{-1} çözünürlükte analiz edilmiştir.

3.2.4.6 Serbest ve toplam sülfidril (-SH) grupların belirlenmesi

Protein modifikasyon işleminin -SH grupları üzerine etkilerinin belirlenmesi Ellman (1959) tarafından esas alınan yöntemin modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Serbest –SH gruplarının belirlenmesi için 0,086 M Tris- (hidroksimetil) aminometan, 0,09 M glisin ve 4 mM etilendiamin-tetra asetik asit disodyum tuzu ile pH 7 olacak şekilde tampon çözeltisi hazırlanmıştır. Kontrol ve modifiye edilmiş protein tozları, %0,2 (w/v) protein içerecek şekilde tampon çözeltisi ile karıştırılmış ve 4 °C'de 8.000 rpm hızında 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan fazdan 3 mL alınmış ve üzerine tampon içerisinde çözündürülen 4 mg/ml Ellman ajanından (5',5-dithiobis 2-nitrobenzoik asit, DTNB) 0,03 mL ilave edilmiştir. Karışım 20 °C'de karanlık ortamda 15 dakika bekletildikten sonra spektrofotometrede (Shimadzu, UV-1800 240V, Japonya) 412 nm dalga boyunda absorbans okunarak serbest –SH grupları belirlenmiştir (Hu vd., 2013). Toplam -SH gruplarının belirlenmesi amacıyla ise tampon çözeltisine 6 M üre ve %0,5 (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS) ilave edilmiş ve yukarıda bahsedilen işlemler aynen uygulanmıştır (Arzeni vd., 2012).

$$\mu Mol\ SH/g = (73{,}53 \times A_{412} \times D)/C \qquad (3.6)$$

Bu denklemde, A_{412}, 412 nm'deki absorbansı; C, protein çözeltisinin konsantrasyonunu (mg/mL); D, dilisyon faktörünü ifade etmektedir. Faktör (73,53), $10^6/(1{,}36 \times 10^4)$'den türetilmiştir. 1,36x10^4 molar soğurma sabitidir.

3.2.4.7 Yüzey hidrofobisitesi

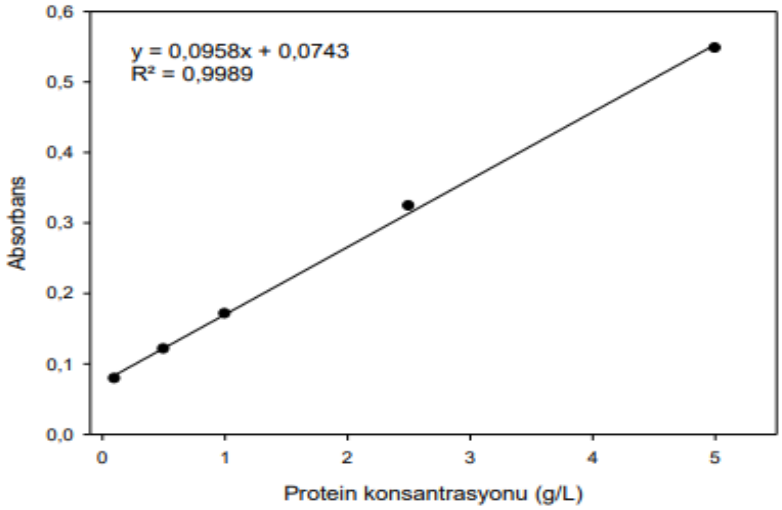
Protein süspansiyonlarının yüzey hidrobofisitesi Kato ve Nakai (1980) tarafından önerilen yöntem esas alınarak Arzeni vd. (2012)'nin kullandığı yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kontrol ve modifiye edilmiş protein örnekleri konsantrasyonları 0,4 mg/ml olacak şekilde pH 7'deki 0,1 M fosfat tamponu ile hazırlanmış, 1 saat manyetik karıştırıcıda çözündürülmüş ve 1.000g'de 10 dakika santrifüj uygulanmıştır. Daha sonra her örneğin ayrı ayrı 0,025-0,2 mg/mL konsantrasyon aralığında protein süspansiyonları hazırlanmıştır. 0,0024 g/ml konsantrasyonundaki 1-anilino-8-naphathalene-sulfonate (ANS) (fosfat tamponunda çözündürülmüş) çözeltisinden 40 µL farklı konsantrasyonlarda hazırlanan protein süspansiyonlarının ve saf suyun (kör için) üzerine eklenmiş, oda sıcaklığında 15 dakika karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Son olarak kuvars küvetlere yerleştirilen süspansiyonların bir spektroflorometre yardımıyla 25 °C'de 390 ve 468 nm dalga boylarında floresan yoğunlukları belirlenmiştir. Yüzey hidrofobisitesi, protein konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak floresan yoğunluğu grafiğinin başlangıçtaki eğimi olarak belirlenmiştir. Çözeltilerin yüzey hidrofobisite indeksi değerleri, dilüsyonların protein konsantrasyonuna karşı relatif floresan yoğunluğunun (RFI) ilk eğiminden hesaplanmıştır. RFI, $RFI = (F - F_0)/F_0$ denklemi ile tanımlanmıştır. Burada F, protein-ANS konjugatının floresan okumasıdır ve F_0, proteinsiz ANS çözeltisinin okumasıdır (Segat vd., 2014).

3.2.4.8 Protein çözünürlüğü

Modifiye edilmiş ve modifikasyona uğramamış susam proteinlerinin suda çözünürlükleri Klompong vd. (2007) tarafından önerilen metot kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 0,2 g örnek 20 mL saf su ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Hazırlanan protein süspansiyonları santrifüj tüplerine aktarılmış ve 8.000 rpm'de 4 °C'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kullanılarak Biüret metodu ile protein çözünürlüğü gerçekleştirilmiştir (Robinson ve Hogden, 1940). Bu amaçla süpernatant ve Biuret reaktifi 1:1 oranında karıştırılmış ve karışım 500 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Santrifüj sonrası süpernatantın protein miktarı sığır

serum albümini standart eğrisinden yararlanılarak hesaplanmış (Şekil 3.3) ve susam proteinlerinin suda çözünürlükleri aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlenmiştir.

$$\text{Çözünürlük } (\%) = \frac{Süpernatant\ protein\ miktarı}{Toplam\ protein\ miktarı} \times 100 \quad (3.7)$$



Şekil 3.3 Biuret yönteminde kullanılan sığır serum albümininin standart eğrisi

3.2.5 Susam Proteinlerinin Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.5.1 Su ve yağ bağlama kapasitesi

Susam proteinlerinin su ve yağ bağlama kapasiteleri Ogunwolu vd. (2009) tarafından önerilen yöntem baz alınarak belirlenmiştir. Su bağlama kapasitesini belirlemek amacıyla yaklaşık 0,1 g örnek darası bilinen bir tüp içerisine tartılmış ve 1 mL su ile karıştırılmıştır. Daha sonra tüp içeriğine 1.800 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj uygulanmıştır. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüpler 45° açıyla 10 dakika bekletilmiş, biriken su dökülmüş ve ardından tartılarak aradaki ağırlık farkından bağlanan su miktarı hesaplanmıştır. Su bağlama kapasitesi ise aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır.

$$Su\ bağlama\ kapasitesi = \frac{Bağlanan\ su\ miktarı}{Protein\ miktarı} \quad (3.8)$$

Yağ bağlama kapasitesinin belirlenmesi amacıyla 0,1 g protein izolatı tüp içerisine tartıldıktan sonra 1 mL ayçiçeği yağı ile karıştırılmıştır. Daha sonra tüp 8.000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek süpernatantı uzaklaştırılmıştır. Tüpler 45° açıyla 20 dakika bekletilmiş, biriken yağ dökülmüş ve ardından tartılarak aradaki ağırlık farkından bağlanan yağ miktarı belirlenmiştir. Yağ bağlama kapasitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Yağ\ bağlama\ kapasitesi = \frac{Bağlanan\ yağ\ miktarı}{Protein\ miktarı} \quad (3.9)$$

3.2.5.2 Köpük oluşturma özellikleri

Proteinlerin köpük kapasitesi ve köpük stabilitesinin belirlenmesi amacıyla 0,3 g protein örneği 30 mL saf su ile karıştırılmış ve karışım 100 mL'lik bir ölçü silindirine aktarılmıştır. Karışım 3 dakika süreyle 14.000 rpm'de ultra-turrax ile homojenize edilmiş ve homojenizasyondan hemen sonraki hacmi ile 30 dakika sonraki hacmi kaydedilerek köpük kapasitesi ve stabilitesi sırası ile aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır (Ogunwolu vd., 2009).

$$Köpük\ kapasitesi\ (\%) = \frac{V_S - V_Ö}{V_Ö} \quad (3.10)$$

$$Köpük\ stabilitesi\ (\%) = \frac{V_{30} - V_Ö}{V_Ö} \quad (3.11)$$

V_S; homojenizasyon sonrası hacmi (mL), $V_Ö$; homojenizasyon öncesi hacmi (mL) ve V_{30}; homojenizasyondan 30 dakika sonraki hacmidir (mL).

3.2.5.3 Emülsiyon oluşturma özellikleri

Kontrol ve modifiye edilmiş SPİ'lerin emülsiyon aktivitesi ve emülsiyon stabilitesi Pearce ve Kinsella (1978) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla 0,3 g protein örneği 30 mL saf su ile karıştırılmış, karışımın üzerine 10 mL ayçiçek yağı ilave edilmiş ve karışım 15.000 rpm'de 1 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Emülsiyon oluştuktan hemen sonra ve 10 dakika sonra 50 µL emülsiyon örneği bir tüp içerisine aktarılmış, üzerine 5 mL %0,1'lik sodyum dodesil

sülfat (SDS) çözeltisi ilave edilmiş ve karışımın absorbansı spektrofotometrede 500 nm'de okutulmuştur. Emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Emülsiyon\ aktivitesi\ (EAI) = \frac{2 \times 2{,}303 \times A_0}{0{,}25 \times örnek\ miktarı\ (g)} \quad (3.12)$$

$$Emülsiyon\ stabilitesi\ (ESI) = \frac{A_{10} \times \Delta t}{\Delta A} \quad (3.13)$$

Bu formüllerdeki A_0, emülsiyon oluştuktan hemen sonraki absorbans değerini; A_{10}, emülsiyon oluştuktan 10 dakika sonraki absorbans değerini; Δt;10 dakika ve ΔA; başlangıç ve 10 dakika sonraki absorbans değeri arasındaki farkı ifade etmektedir.

3.2.6 Susam Proteinlerinin Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.6.1 Akış özellikleri

Kontrol ve YBH ile modifiye edilmiş susam proteinlerinin 25±0,1 °C sıcaklıkta akış özellikleri 2° konik açılı ve 25 mm çaplı, konik-düzlem geometriye sahip reometre cihazı (Anton Paar, MCR 302 model, Avusturya) ile belirlenmiştir. Bu amaçla %4 protein içerecek şekilde süspansiyonlar hazırlanmış ve analizler gerçekleştirilmiştir. Süspansiyonlar 0-100 s^{-1} arası değişen kayma hızında 300 saniye boyunca ölçüme tabi tutulmuştur. Süspansiyonların akış özelliği verileri Ostwald-de-Waele modeli ile uyumlanmış ve Eşitlik 3.14 yardımıyla bazı akış parametreleri belirlenmiştir.

$$\tau = K \times \dot{\gamma}^{n} \quad (3.14)$$

τ, akış gerilimini (Pa); K, kıvam indeksini ($Pa.s^n$); n, akış davranış indeksini ve $\dot{\gamma}$, kayma hızını (s^{-1}) ifade etmektedir.

3.2.6.2 Dinamik reolojik özellikler

Susam proteinlerinin viskoelastik özelliklerinin belirlenmesi için dinamik reolojik testler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla %4 protein içerecek şekilde saf su ile

süspansiyon hazırlanmış ve çözeltinin lineer viskoelastik bölgesinin belirlenmesi için 0,01-10 Pa aralığında ve 0,681 rad/s sabit frekansta stres tarama analizi yapılmıştır. Daha sonra, belirlenen lineer viskoelastik bölgede (0,2 Pa olarak belirlenmiştir) 0,681-46,42 rad/s aralığında frekans tarama analizi gerçekleştirilmiştir. Ölçümler 25±0,1 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.3 Sıcaklık taraması

Susam proteinlerinde gerçekleştirilen modifikasyon işlemlerinin proteinlerin jel oluşturma özelliklerine etkisi reometre cihazında sıcaklık tarama analizi ile belirlenmiştir. Bu amaçla %4 konsantrasyonda hazırlanan protein süspansiyonu, 2° konik açılı ve 25 mm çaplı konik-düzlem geometri ile lineer viskoelastik bölgede sabit frekansta (0,681 rad/s) 10 °C'den 95 °C'ye kadar 10 °C/dakika artış hızında ısıtılmıştır. Isıtma esnasında örnek çeperlerinden buharlaşmayı önlemek amacıyla silikon yağı kullanılmıştır. Sabit basınç ve frekans değerlerinde sıcaklık artışına bağlı olarak proteinlerin depolama (G′) ve kayıp (G″) modülleri kaydedilmiş ve bu modüllerde meydana gelen değişime bağlı olarak jelleşme sıcaklıkları tespit edilmiştir.

3.2.7 İstatistiksel Analizler

Ekstrakte edilen susam proteinlerinin yüksek basınçlı homojenizasyon ile modifikasyonu 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen protein tozları ise en az 3 tekrarlı olacak şekilde analiz edilmiş ve sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Elde edilen analiz verilerinin istatistiksel değerlendirmesi SPSS Statistics 21.0 programı (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) ile gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilen proteinlerde gerçekleştirilmiş analizlerin sonuçları ayrı ayrı tek yönlü varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuş ve ortalamalar arasındaki farklılık Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. Reolojik sonuçlar ise, reometrenin yazılım paket programı (Anton-Paar, Rheo Compass v1.21, Avusturya) ile değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Susam Posası ve Susam Protein İzolatının Bileşimi

Susam posasının ve ekstrakte edilen protein izolatının nem, protein, yağ ve kül değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir. Alkali ekstraksiyonu sonrası elde edilen susam protein izolatının protein içeriği %90,33 olup, literatürde yer alan bitkisel kaynaklardan ekstrakte edilmiş protein izolatlarının protein sonuçlarından daha yüksektir. He vd. (2014) yer fıstığı proteini izolatında %86,46 oranında protein belirlerken, Ahmed vd. (2018)'nin çalışmasında barbunya proteini izolatında %80,82 oranında protein elde edilmiştir. Ekstrakte edilen mercimek proteini izolatında %84,02 (Sarıcaoğlu, 2020), nohut protein izolatında %88,8 (Wang vd., 2020) ve ceviz protein izolatında %80,32 (Zhu vd., 2018) oranında protein bulunmuştur.

Tablo 4.1 Susam posası ve susam protein izolatının kimyasal bileşimi

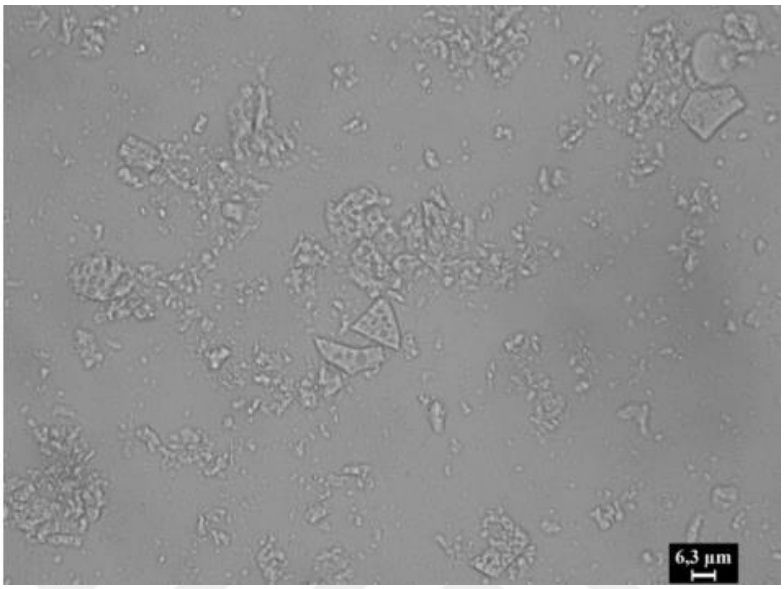
Özellikler	Susam posası	Protein izolatı
Kuru madde (%)	95,08±0,05	97,40±0,04
Protein (%)	38,07±0,12	90,33±0,13
Yağ (%)	11,56±1,29	1,21±0,13
Kül (%)	6,63±0,19	1,01±0,02
Karbonhidrat (%)	38,81±1,15	4,85±0,18

4.2 Susam Proteinlerinin Fizikokimyasal Özellikleri

4.2.1 Morfolojik Yapı

Susam posası proteinlerine uygulanan yüksek basınçlı homojenizasyon ile modifikasyon işleminin proteinlerin mikroyapısal özellikleri üzerine etkisi proteinlerin birçok özelliklerini etkilemektedir. Bu bağlamda işlem uygulanmamış susam proteini süspansiyonunun mikroyapısal görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir. Liyofilizasyon işlemi ile kurutulan proteinlerin sulu fazda kolay ve hızlı dağılım gösterdiği tespit edilmiş ve bu nedenle çok büyük partikül boyutları gözlenmemiştir. Ancak şekilde görüldüğü gibi kontrol örneğinde, sulu fazda dağıtılmış susam

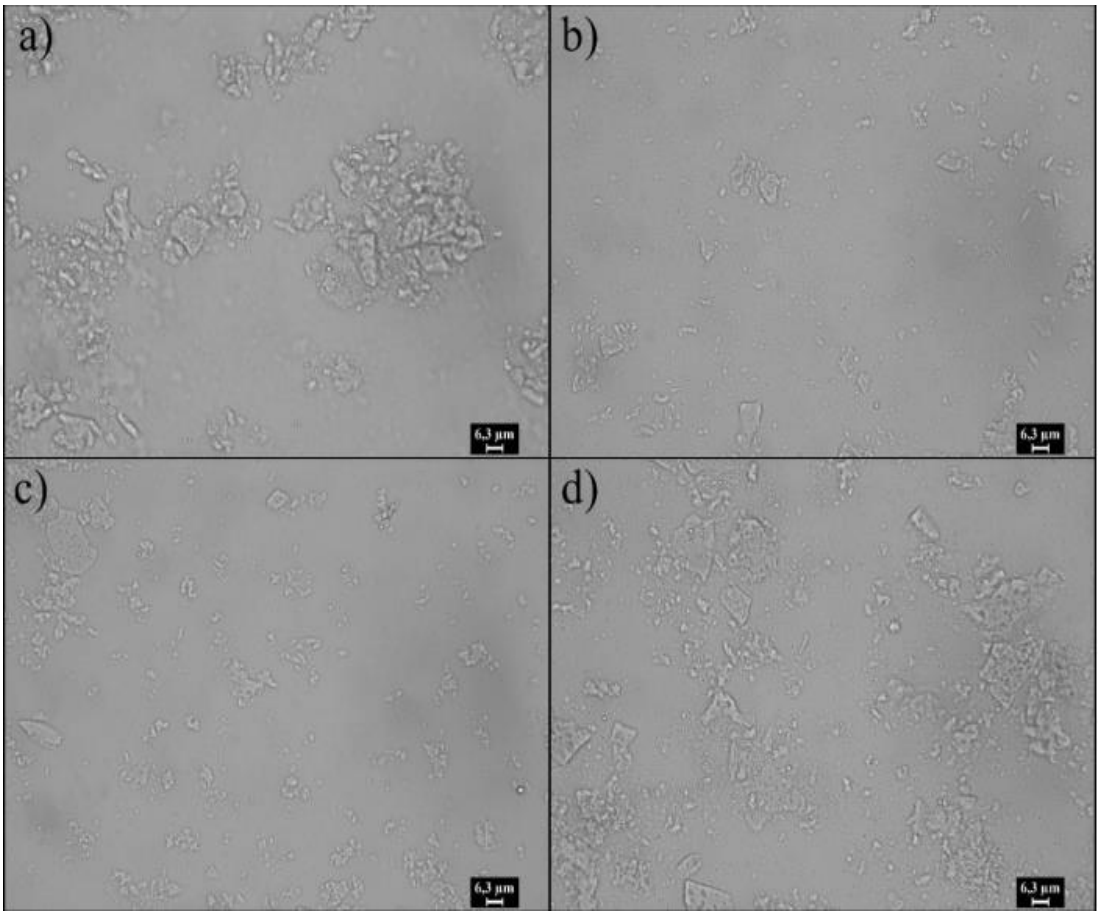
proteinlerinin farklı boyutlarda partiküllerden oluştuğu gözlenmektedir. Bazı partiküllerin küçük boyutlarda olduğu, bazılarının ise dağılmadan yığın halinde kaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.1 Modifikasyon işlemi uygulanmamış susam proteinlerinin mikroskop görüntüsü

Yüksek basınçlı homojenizasyon tekniği ile modifiye edilmiş susam proteinlerinin sulu çözeltilerinin mikroskop görüntüleri ise Şekil 4.2'de gösterilmektedir. Şekilde görüldüğü gibi, basınç uygulanmamış kontrol örneği (Şekil 4.1) ile 0 MPa YBH uygulanmış susam proteinlerinin mikroskop görüntüleri birbiriyle benzerlik göstermiştir. Protein süspansiyonundaki katı partiküller çok fazla dağılım göstermemiş ve suyla fazla bir etkileşime girmemiştir. Buna karşın 50 ve 100 MPa basınç uygulanan örneklerin sulu dispersiyonlarında oldukça düşük partiküller gözlemlenmiş ve yüksek homojenizasyon basıncının proteinlerde küçük partikülleri oluşturduğu tespit edilmiştir. Modifiye susam proteini süspansiyonlarının mikroskop görüntülerinde gözlemlenen bu durum, partikül boyut dağılımı analiz sonuçlarıyla da tutarlı bulunmuştur. Partikül boyutlarındaki bu azalmalar proteinlerin diğer fonksiyonel özelliklerini de (çözünürlük, su ve yağ bağlama, emülsiyon oluşturma, köpük oluşturma özellikleri) olumlu düzeyde etkilemiştir. Susam proteinlerine uygulanan 150 MPa homojenizasyon basıncı ise partikül boyutlarında kısmi bir artışa neden olmuştur. Bu durum proteinlerin yüksek basınç düzeylerinde agregatlar oluşturması ile ilişkilendirilmiştir. Basıncın artması ile proteinlerin partikül

boyutlarındaki artış, hücrelerin parçalanması ve hücre duvarı yapısında bulunan parçacıkların serbest kalması ile partikül-partikül etkileşimlerinin artması ile açıklanabilmektedir (Augusto vd., 2012).



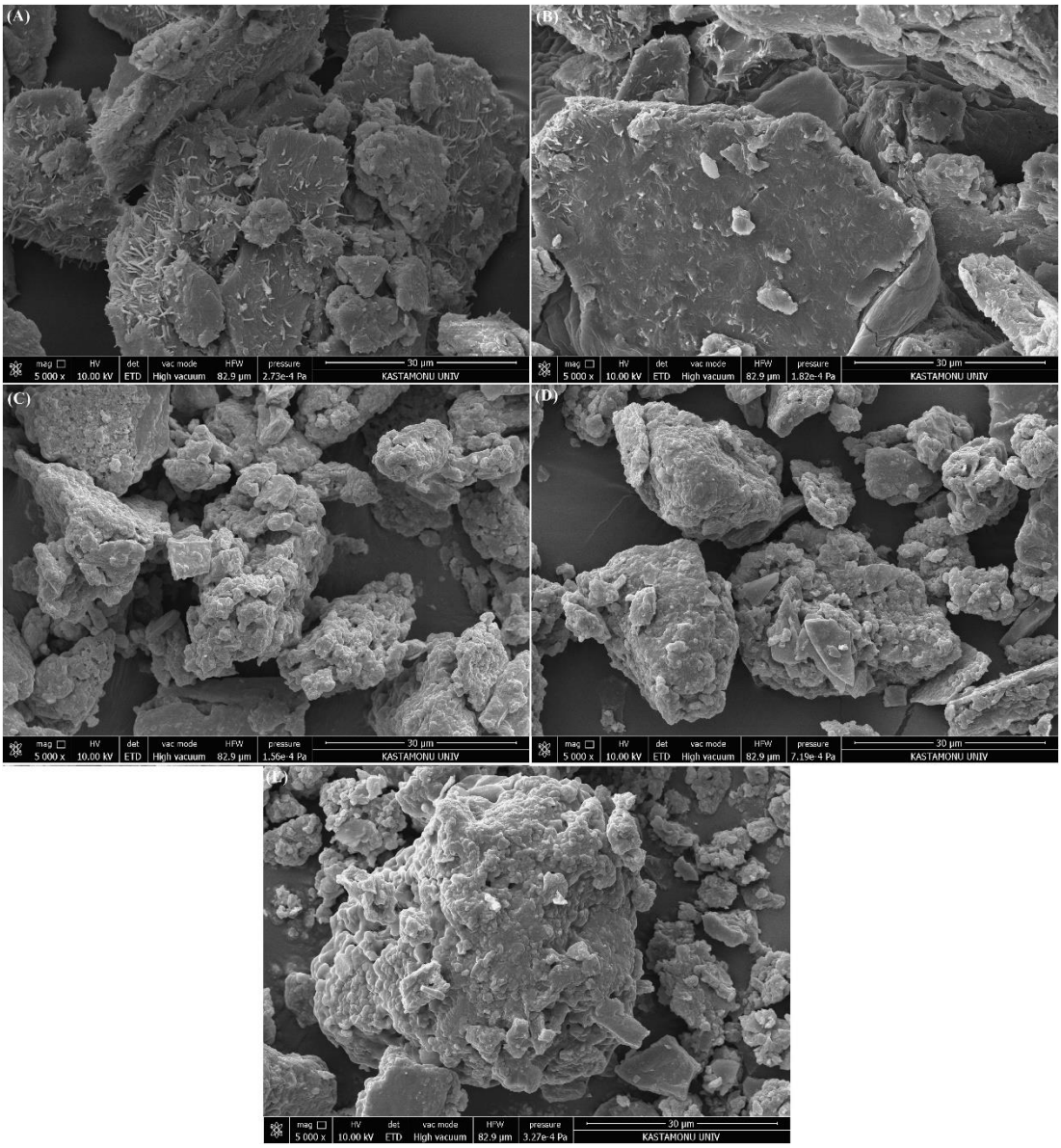
Şekil 4.2 Yüksek basınçlı homojenizasyon ile modifiye edilmiş susam proteinlerinin mikro-yapısal görüntüleri. a) 0 MPa, b) 50 MPa, c) 100 MPa ve d) 150 MPa.

Sarıcaoğlu (2020)'nun mercimek proteini izolatlarını yüksek basınçlı homojenizasyon işlemiyle modifiye ettiği çalışmasına göre, homojenizasyon basıncının süspansiyon halindeki protein parçacıkları üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Esas olarak düzensiz şekilli, deforme olabilen ve hidrofobik karakterden dolayı kümelenebilen partiküllerden oluşan mercimek proteini süspansiyonu, homojenizasyon basıncının artmasıyla partikül boyutu küçülen ve daha iyi dağılan bir yapı sergilemiştir. Özellikle 75, 100 ve 150 MPa basınç uygulamalarında homojen bir süspansiyon mikro yapısı gözlenmiştir. Benzer sonuçlar fındık sütlerinin homojenleştirilmesi ile de elde edilmiştir. Ancak her ne kadar fındık sütündeki partiküllerin boyutu yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi

ile önemli ölçüde azalsa da, homojenizasyon basıncının 50 MPa'ya ulaşmasıyla küçük partiküllerde agregasyon gözlenmiştir. Ek olarak, 75-150 MPa'da işlenen numunelerde daha küçük partiküller gözlenmesine rağmen diğer tüm numunelere göre daha büyük yağ damlacıkları belirlenmiştir (Gül vd., 2017).

4.2.2 Mikroyapı (SEM)

Kontrol ve yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi ile modifiye edilmiş liyofilize susam protein izolatlarının SEM görüntüleri Şekil 4.3'te görülmektedir. Şekilden de anlaşıldığı gibi kontrol ve 0 MPa basınç uygulanan protein örneklerinin mikroyapıları, cukur ve delik içermeyen çoğunlukla pürüzsüz ve düz bir yüzeye sahiptir. Ancak homojenizasyon basıncının artması ile birlikte proteinlerin mikroyapılarında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Şekil 4.3C'de görüldüğü üzere, 50 MPa basınç uygulanan protein partiküllerinin boyutu azalmış ve yüzeyi pürüzlü bir hale gelmiştir. Ayrıca basıncın etkisi ile birlikte yüzeylerde boşluklar da meydana gelmiştir. Uygulanan homojenizasyon basıncının 100 MPa'ya yükseltilmesiyle birlikte kısmen daha büyük partiküller oluşmuş ancak oluşan yapılar genel olarak 50 MPa basınç uygulananlara benzer görünüşte bulunmuştur. Homojenizasyon basıncının 150 MPa seviyesine arttırılması sonucunda ise daha büyük partiküllerin meydana geldiği, ancak yüzey karakterizasyonunun değişmediği gözlenmiştir (Şekil 4.3E). Protein çözeltisi birkaç saniye içinde homojenizasyon valfindeki dar bir boşluktan geçmeye zorlandığında, türbülans, güçlü kesme gerilimi ve yüksek basınçlı homojenizasyonun kavitasyonu, protein parçacıklarının ayrışmasına, yeniden düzenlenmesine veya toplanmasına neden olmaktadır. Tüm bu mekanik kuvvetler, hem partikül toplanmasına hem de agregatın bozulmasına yol açabilmektedir (Liu vd., 2021).



Şekil 4.3 Yüksek basınçlı homojenizasyon tekniği ile modifiye edilmiş susam proteinlerinin mikro-yapısal görüntüleri A) kontrol, B) 0 MPa, C) 50 MPa, D) 100 MPa ve E) 150 MPa

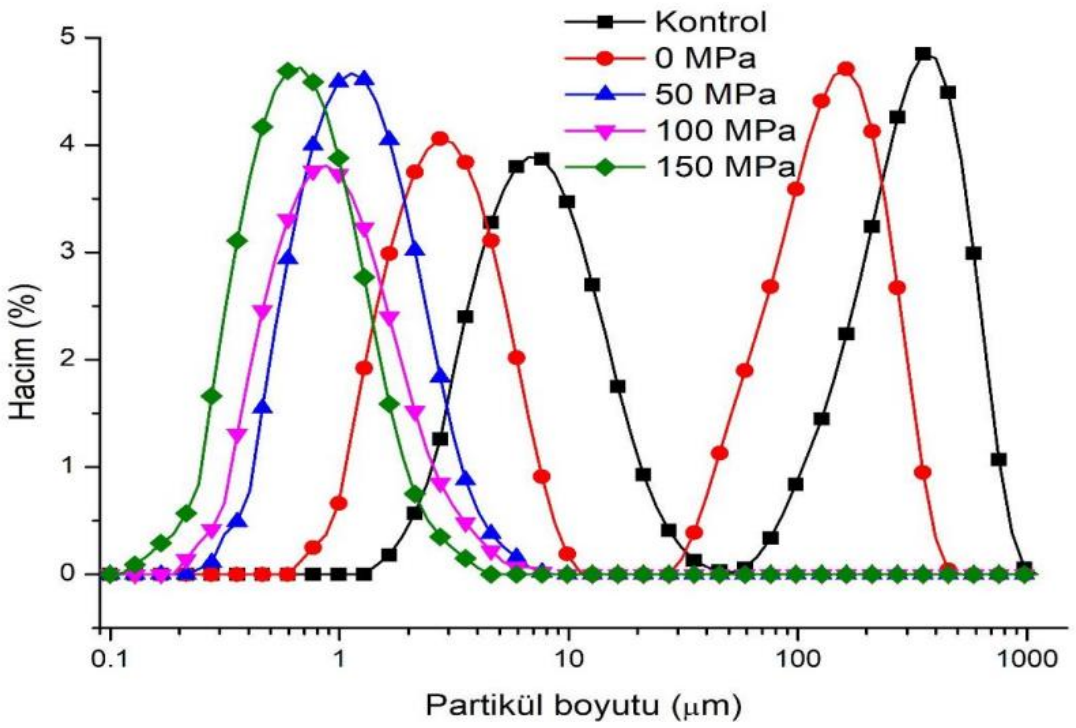
Zhang vd. (2022), yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi uygulanmamış yer bademi proteininin düzensiz ve büyük pul şeklinde partiküllere sahip olduğunu, homojenizasyon işlemi sonrasında ise partiküllerin küçülerek homojen bir şekilde dağıldığını rapor etmişlerdir. Buna ek olarak literatürdeki bazı çalışmalarda da modifiye bitkisel proteinlerle stabilize edilen emülsiyonların mikro-yapıları incelenmiş ve yüksek basınçlı homojenizasyon ile ara yüzey özellikleri gelişmiş daha küçük partiküllü proteinler ve buna bağlı olarak daha homojen emülsiyonlar elde edildiği gözlenmiştir (Fernandez-Avila vd., 2015; Melchior vd., 2022). Bu

çalışmalardan birinde yüksek basınçlı homojenizasyon ve geleneksel homojenizasyon ile modifiye edilmiş soya proteinlerinin stabilize ettiği emülsiyonların mikrografları incelenmiş ve yüksek basınçlı homojenizasyonun, proteinlerin arayüzeye adsorpsiyonunu daha fazla teşvik edebileceği farkedilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, sadece geleneksel homojenizasyon uygulanan emülsiyonların YBH ile işlenenlere kıyasla daha büyük protein agregatları içerdiği belirtilmiştir (Fernandez-Avila vd., 2015).

4.2.3 Partikül Boyut Dağılımı

YBH işlemi ile modifiye edilmiş susam proteinlerine ait partikül boyut dağılım grafiği Şekil 4.4'te verilmiştir. Kontrol ve 0 MPa basınç ile işlem gören proteinlerin partikül boyut dağılımları 2 tepeli olacak şekilde görülmüş olup bimodal dağılım sergilemiş ve küçük ve büyük boyutlu partiküllerin yoğunlukta olduğu tespit edilmiştir. Ancak, basıncın artması ile proteinlerde tek tepeli bir (monomodal) dağılım gözlenmiş, partikül boyutunun azaldığı ve homojen bir dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuç, YBH'nin genellikle toz haline getirilmiş protein konsantrelerinin seyreltilmesiyle hazırlanan sulu sistemlerde gözlenen büyük çözünmeyen protein agregatlarının ayrışmasını sağlama konusundaki yeteneğine atfedilebilmektedir (Song vd., 2013; Yang vd., 2018). Susam proteinlerine uygulanan YBH işlemine bağlı olarak gözlenen partikül boyut dağılımındaki bu azalma, yakın zamanda Melchior vd. (2022)'nin bezelye proteini üzerine gerçekleştirdiği çalışmada da gözlenmiştir. Bu çalışmaya göre kontrol ve 70 MPa basınç uygulanan numuneler, bir ana tepe noktası ve sırasıyla küçük parçacıklara ve agregatlara atfedilebilen diğer iki ek tepe noktası ile çok tepeli bir dağılım göstermiştir. Ancak daha yüksek basınç ve geçiş sayılarıyla işlenen numuneler, giderek daha düşük boyutlarda gözlenen tek tepeli bir dağılım ile karakterize edilmiştir. Ancak Melchior vd. (2022)'nin çalışmasında en yüksek yoğunlukta (150 MPa, 3 geçiş) işlenen bezelye proteinlerinde tekrar çok tepeli bir partikül boyut dağılımı ve ortalama parçacık boyutunda artış gözlenmiştir. Luo vd. (2022)'nin gerçekleştirdiği bir çalışmada da büyük ve küçük boyutlu agregatlar içeren işlem görmemiş kinoa protein izolatı süspansiyonları iki modlu bir partikül boyut dağılımı gösterdiği saptanmıştır. Farklı boyutlardaki bu agregalar YBH (0-50 MPa) işlemine farklı tepki vermiştir. Daha

büyük kümeler (~8,6 µm) nispeten daha kolay parçalanırken, daha küçük kümeler (~0,2 µm) ise YBH uygulamasına karşı daha dirençli bulunmuştur. Farklı bir çalışmada ise barbunya proteininin termal olarak çözünebilir agregatlarına uygulanan 60 MPa basınçtaki homojenizasyon işlemi daha fazla agregasyona neden olarak barbunya proteinlerinin partikül boyutlarını artırırken, daha yüksek basınçta (90, 120 MPa) uygulanan YBH bunların partikül boyutlarını azaltmıştır (Guo vd., 2021).



Şekil 4.4 Yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi uygulanmış susam proteinlerinin partikül boyut dağılımları

İşlem görmemiş (kontrol) ve yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi uygulanmış susam proteinlerinin partikül boyutu sonuçları Tablo 4.2'de verilmiştir. Kontrol örneği için ortalama partikül boyutu değeri (d_{50}) 3,28 µm iken, uygulanan basınç değerlerinin artmasıyla partikül boyut değerlerinde azalma meydana gelmiştir. Minimum partikül boyutu 100 MPa basınç uygulanmış örneklerde 0,79 µm olarak tespit edilmiştir. 150 MPa basınç uygulanmış örneklerin de ise topaklanma sonucu ortalama partikül boyutu değerinde artış meydana gelmiş ve d_{50} değeri 1,04 µm olarak belirlenmiştir. Susam protein izolatlarının hacim temelli ortalama partikül boyut ($D_{4,3}$) değeri d_{50} değerine benzer değişim göstermiştir. Kontrol örneğinin 8,04

µm olan $D_{4,3}$ değeri 100 MPa basınç uygulamasıyla 0,97 µm değerine düşerken ($p<0.05$), 150 MPa basınç değerinde ise hafif artış meydana gelmiştir ($p>0,05$).

Tablo 4.2 Yüksek basınçlı homojenizasyon işlemiyle susam proteinlerinin partikül boyutu parametrelerinde meydana gelen değişimler

Örnek	d_{50} (µm)	$D_{3,2}$ (µm)	$D_{4,3}$ (µm)
Kontrol	$3,28\pm0,28^{a}$	$0,51\pm0,09^{b}$	$8,04\pm0,09^{a}$
0 MPa	$2,05\pm0,12^{b}$	$0,55\pm0,01^{b}$	$7,81\pm0,19^{a}$
50 MPa	$1,35\pm0,11^{c}$	$1,54\pm0,47^{a}$	$2,14\pm0,35^{b}$
100 MPa	$0,79\pm0,05^{d}$	$1,02\pm0,08^{ab}$	$0,97\pm0,07^{c}$
150 MPa	$1,04\pm0,08^{cd}$	$0,53\pm0,08^{b}$	$1,41\pm0,13^{c}$

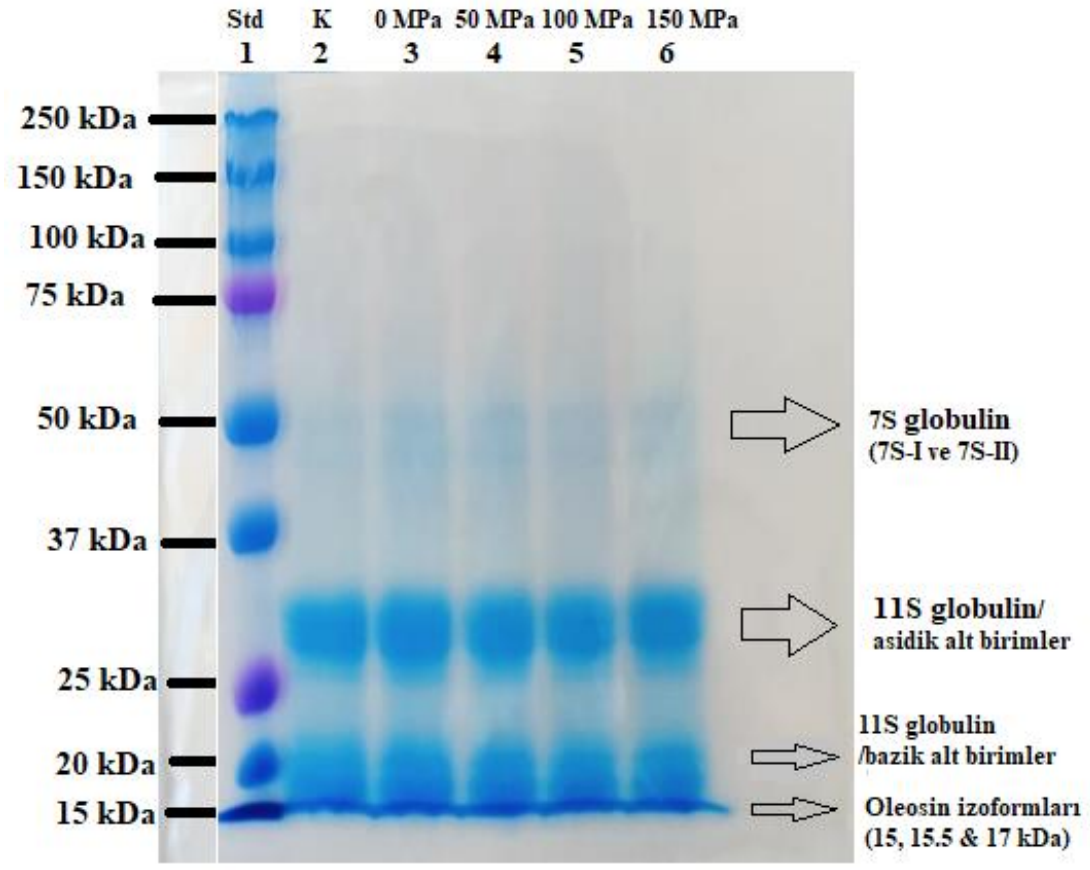
Aynı sütundaki değerlerde bulunan farklı harfler (a-d), ortalamalar arasında önemli farklılık olduğunu göstermektedir ($p<0,05$).

Literatürde yer bademi proteinlerine uygulanan yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi ile, başlangıçta 12,29 µm olan $D_{4,3}$ değeri 100 MPa seviyesine kadarki basınç değerlerinde kademeli olarak düşüş göstermiş olup minimum değer, 100 MPa basınçta 4,79 µm olarak belirlenmiştir. 120 ve 140 MPa basınç değerlerinde ise 100 MPa basınç değerine kıyasla az miktarda artış olmuş ancak bu artış önemli bulunmamıştır ($p>0,05$) (Zhang vd., 2022). Benzer şekilde Sarıcaoğlu (2020) 'nun gerçekleştirdiği bir çalışmada da mercimek poteininin en yüksek partikül boyutu sonuçları kontrol numunesinde gözlenmiştir. Mercimek proteininin $D_{4,3}$ değeri ise homojenizasyon basıncının 100 MPa'ya kadar artmasıyla ($p<0,05$) önemli ölçüde azalırken, basınç 100 MPa'dan 150 MPa değerine yükseltildiğinde ise sadece hafif bir azalma belirlenmiştir ($p>0,05$). Örneklerde $D_{4,3}$ değerinin $D_{3,2}$ değerinden yüksek çıkması yapıda büyük topak yapıların yoğunluğu ile ilgili olduğu bilinmekledir (Valencia-Flores vd., 2013). Bu çalışmada, sadece 100 MPa basınç uygulamasında, $D_{3,2}$ değeri, $D_{4,3}$ değerinden fazla bulunmuştur. Bu durum, topak yapıların 100 MPa basınç altında daha iyi dağıldığını göstermekte olup, ışık mikroskobunun görüntüleri ile uyumlu bulunmuştur.

4.2.4 Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

İşlenmemiş ve modifiye susam proteinleri, moleküler ağırlıkları ~15-50 kDa arasında değişen farklı bileşenler göstermiştir (Şekil 4.5). Susam proteini numunelerinde yaklaşık 50 kDa molekül ağırlığına denk gelen 7S globulin (toplam proteinlerin %1-

2'si) alt birimleri belirlenmiştir. Ek olarak, 15 ile 37 kDa arasındaki bant aralığında 11S globulinin asidik ve bazik alt birimleri gözlenirken, yaklaşık 15 kDa molekül ağırlığında belirlenen polipeptit bantlarının ise oleosin izoformlarına karşılık geldiği düşünülmektedir (Achouri vd., 2012). Literatüre göre 11S globulin ve 2S albüminin, toplam susam proteinlerinin %80-90'ını oluşturduğu ifade edilmektedir (Onsaard, 2012). Elde edilen SDS-PAGE verilerine göre YBH ile modifiye edilmiş susam proteinlerindeki 7S globulin alt birimleri, kontrol örneğine kıyasla daha görünür hale gelmiştir. YBH işlemi susam proteinin yapısını açmış ve susam proteininde düşük miktarlarda bulunan bu fraksiyonun yoğunluğunu artırmıştır. Protein modifikasyonu, işlenmemiş susam proteini numunesinde gözlenen diğer alt fraksiyonlarda ise gözle görülür bir değişikliğe neden olmamıştır.



Şekil 4.5 Kontrol ve yüksek basınçlı homojenizasyon (0, 50, 100 ve 150 MPa) ile modifiye edilmiş susam protein fraksiyonlarının SDS-PAGE görüntüleri

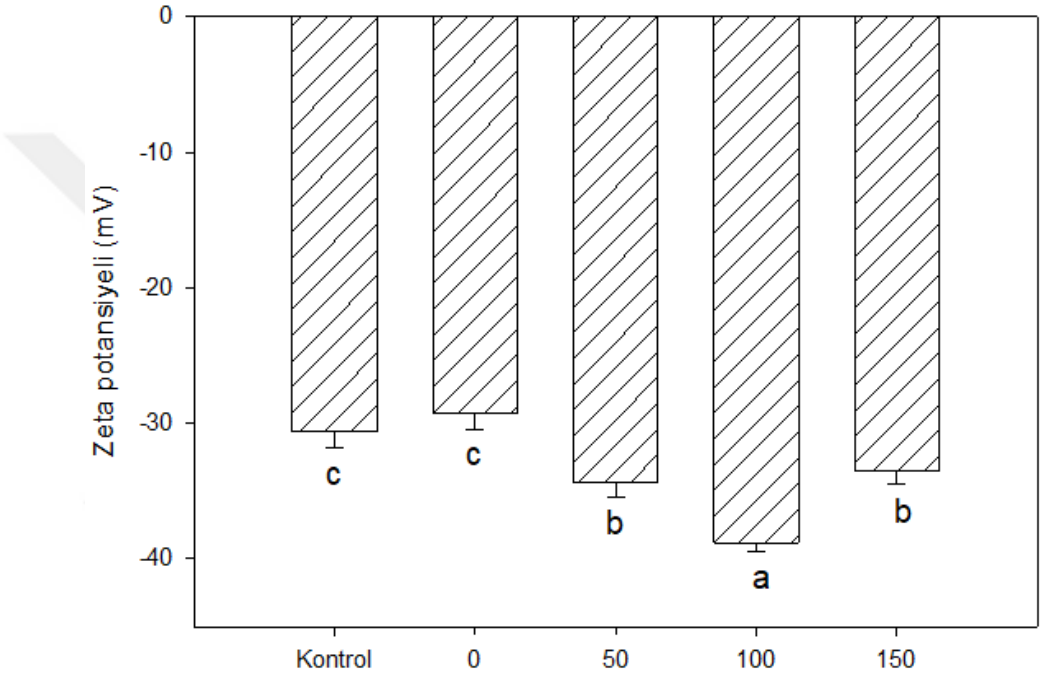
Benzer şekilde literatürde, işlenmemiş ve YBH ile muamele edilmiş mercimek proteini süspansiyonlarının protein bantları arasında önemli bir fark gözlenmemiş

olup bu sonuç 150 MPa basınca kadar YBH muamelesinin mercimek proteininin açılması için yeterli olmadığını düşündürmüştür (Sarıcaoğlu, 2020). Sarıcaoğlu vd. (2018)'nin fındık proteini üzerinde gerçekleştirdiği bir diğer çalışmada da YBH ile muamele edilmiş fındık proteinlerinin basınç uygulamasından sonra genel protein bantlarının değişmeden kaldığı sonucuna varılmıştır. Yalnızca basıncın 150 MPa seviyesine yükseltildiğinde 15 kDa ve 30 kDa civarındaki protein bantlarının yoğunluğunun hafifçe azaldığı gözlenmiş ve bu durumun yüksek basınç uygulamasıyla hafifçe azalan suda protein çözünürlüğüne atfedilmiştir. Liu ve Kuo (2016)'nun gerçekleştirdiği bir çalışmada ise, kontrol ve yüksek basınçlı homojenizasyon (100 MPa ve 150 MPa, 2 ve 3 geçiş) ile muamele edilmiş soya unu içindeki çözünür ve parçacıklı proteinlerin alt birim bileşimindeki değişiklikler, ısıl işlem (95 °C, 10 dakika) uygulamasındaki kadar belirgin bulunmamıştır. Kontrol ile karşılaştırıldığında, soya ununun çözünür ve partikül proteinlerindeki 7S alt birimlerinin ve 11S bazik alt biriminin miktarı, YBH işleminden sonra gözle görülür bir şekilde azalmıştır. En belirgin değişiklik ise 100 MPa ile muamele edilmiş soya ununda gözlenmiştir.

4.2.5 Zeta Potansiyeli

Zeta potansiyeli, karmaşık parçacıkların yüzeyindeki net yükü ölçmek için önemli bir göstergedir (Wang vd., 2021). Kolloidal sistemlerin kararlılığı, büyük ölçüde asılı ve bitişik parçacıklar arasındaki elektrostatik itmeye bağlı bulunmaktadır. Zeta potansiyeli analizi, dağılımları ve kümeleşmeleri saptanan emülsiyonların veya kolloidal sistemlerin kararlılığını belirlemek için sıklıkla kullanılmaktadır (Sarıcaoğlu vd., 2018). Zeta potansiyeli ne kadar yüksek olursa, partiküller birbirini iter ve kolloidal sistem flokülasyon, agregasyon ve Ostwald olgunlaşması gibi destabilizasyon süreçlerine karşı stabil kalır (Shariffa vd., 2016). Kolloidal sistemlerde agregasyonu önlemek, fiziksel olarak kararlılığı korumak ve damlacıklar arasında yeterli elektrostatik itme için ±30 mV zeta potansiyel değeri gereklidir (Yin vd., 2009). Yüksek basınçlı homojenizasyon uygulanmamış (kontrol) ve uygulanmış susam protein izolatlarının zeta potansiyel değerleri Şekil 4.6'da verilmiştir. Yüksek basınçlı homojenizasyon işleminden sonra proteinlerin mutlak yükü basıncın artmasına bağlı olarak artış göstermiş ve en yüksek değer (38,83 mV), 100 MPa

basınçta elde edilmiştir. Partikül boyutu verileriyle uyumlu bulunan bu bulgulara bakılarak, 100 MPa basınçlı homojenizasyon uygulaması, susam proteini izolatlarında daha yüksek elektrik yüküne sahip daha küçük parçacıklar oluşmasını sağlamıştır. Homojenizasyon basıncının 150 MPa değerine çıkarılması ile zeta potansiyel değerinde önemli bir azalma gözlenmiştir ($p<0,05$). Basınç 150 MPa seviyesine yükseltildiğinde zeta potansiyelinin azalması, kısmen protein denatürasyonuna ve agrega oluşumuna bağlanabilmektedir (Yu vd., 2016).



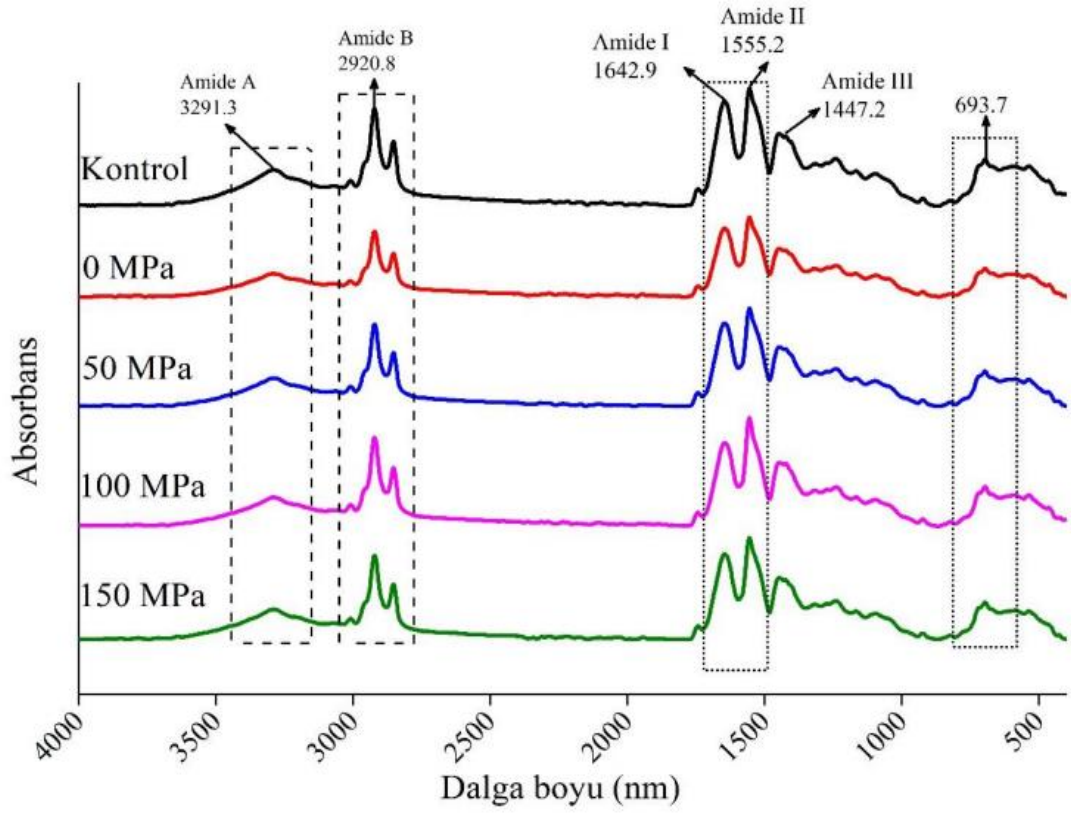
Şekil 4.6. Yüksek basınçlı homojenizasyon tekniği ile modifiye edilmiş susam proteinlerinin zeta potansiyel değerleri

Benzer sonuçlar barbunya (Guo vd., 2021), fındık (Sarıcaoğlu vd., 2018) ve yer bademi (Zhang vd., 2022) proteinlerinin yüksek basınçlı homojenizasyon tekniği ile modifikasyonu sonucunda elde edilmiş olup, 100 MPa basınca kadar mutlak zeta potansiyelinin arttığı ve daha yüksek basınçlarda ise azalma meydana geldiği bildirilmiştir. Nispeten düşük basınçtaki YBH teknolojisi, proteinlerin negatif yüzey yükünü artırarak protein dispersiyonlarının gelişmiş stabilitesine atfedilebilecek moleküller arası elektrostatik itmeyi güçlendirebilmektedir (Jiang vd., 2014). Bernat vd. (2015), ısıl işlemlerin (85 ve 121 °C) badem sütünün zeta potansiyelini önemli ölçüde etkilemediğini, ancak yüksek basınçlı homojenizasyon işleminin badem sütlerindeki dağılmış parçacıkların daha yüksek negatif yük sergilemesine yol

açtığını bildirmişlerdir. Bu çalışmaların aksine Cheng vd. (2022) ise, yüksek basınçlı homojenizasyon işleminin bezelye protein izolatı örneklerinin zeta potansiyel değerlerini bütün basınç uygulamalarında (0-240 MPa) azalttığını bildirmişlerdir. Azalan zeta potansiyeli, bu teknolojinin bezelye protein izolatında agregasyonu teşvik ettiğini göstermektedir.

4.2.6 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR)

Tanımlanmamış bir maddenin tanımlanması ve moleküler yapısının ortaya konması amacıyla kızılötesi spektroskopi tekniklerinden yararlanılmaktadır. Bir kızılötesi spektrum, değişen dalga boylarına (cm^{-1}) karşılık gelen emilim (absorbans) veya % geçirgenlik (transmittans) gibi dedektörden alınan sonuçlarla tanımlanmaktadır. Örnek ile etkileşime giren bir radyasyon frekansı, belirli bir moleküler grup için gerekli olan karakteristik enerjiye ait bir emilim bandı üretmekte ve bu bantların ortak konumu ve biçimi, herhangi bir özel bileşikte bulunan moleküler grupların birleşimini belirtmektedir (Abdurazık, 2016). Susam proteinlerinin yüksek basınçlı homojenizasyondan önce ve sonra konformasyon değişikliğini araştırmak için protein izolatlarının ikincil yapısı FT-IR ile belirlenmiştir. Yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi ile muamele edilmemiş ve farklı basınçlardan geçirilmiş proteinlerin FT-IR spektrumları Şekil 4.7'de verilmiştir. Protein molekülleri kızılötesi spektrumlarda birçok titreşim frekansı göstermektedir. Bu frekanslardan 3291 cm^{-1} dalga boyundaki Amide-A ve 2920.8 cm^{-1} dalga boyundaki Amide-B sırasıyla serbest, moleküller içi ve moleküller arası suyla ilişkilendirilen O-H gerilme titreşimlerini ve C-H bağlarının gerilme titreşimlerini ifade etmektedir (Antoniou vd., 2014). Amide-A bandının absorbans yoğunluğunda YBH işlemine bağlı olarak kısmi bir azalma gözlenmiştir. Buna karşın, Amide-B bandı ise 0 MPa işlem uygulanmış örneklerde kısmi bir azalma gösterirken, diğer basınç uygulanan numunelerde kontrole kıyasla önemli bir değişiklik göstermemiştir.



Şekil 4.7 Susam proteinlerinin yüksek basınçlı homojenizasyon işleminden sonraki FT-IR spektrumları

Proteinlerin yapıya özel parmak izlerini ortaya koyan esas bantlar Amide I, II ve III bantlarıdır. Proteinlerin ikincil yapıları üzerindeki değişimleri belirlemeye yarayan Amide-I bandı 1700-1600 cm^{-1} dalga boylarında görülmekte ve C=O gerilme titreşimleri ile ilişkilendirilmektedir (De Maria vd., 2016). Amide-II bandı ise genellikle N-H bükme ve C-N gerilme titreşimlerinden sorumludur ve 1600-1500 cm^{-1} dalga boyu aralığında gözlenmektedir. Bu bantlarda çok belirgin bir değişim gözlenmezken, Amide III bandı 0 MPa işlem görmüş örneklerde azalmış ve diğer basınçlarda işlem gören proteinlerde artış sergilemiştir. Amide III bandı C-N gerilme ve N-H dönme titreşimleri ile ilişkilendirilmektedir. Basınçlı homojenizasyon işlemi ile proteinlerin temel yapısal karakteristikleri sabit kalırken, bant yoğunluklarında kısmi değişimler meydana gelmiştir. Bu durum muhtemelen uygulanan fiziksel deformasyonlar sonucunda protein yapısında bulunan bazı H bağlarının ve/veya kovalent bağların kopması veya oluşmasından kaynaklanmıştır.

Literatürdeki bir çalışmada bakla proteinlerinin FT-IR spektrumlarına göre β-sheet yapının bakla proteininin baskın ikincil yapısı olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada,

yüksek basınçlı homojenizasyonun hidrojen bağları üzerinde belirli bir etkiye sahip olduğu ve bakla proteinlerinin ikincil yapısında bazı değişikliklere yol açtığı da belirlenmiştir. 207 MPa basınç uygulamasından sonra, bakla proteinlerindeki Amide I bandında α-heliks ve β-turn yapılarında azalma gerçekleşmiştir. Ancak bakla proteininin ikincil yapılarının çoğu, 207 MPa basınç ile homojenize edildikten sonra bile korunmuştur (Yhang vd., 2018). Li vd (2020) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada da soya protein izolatının baskın ikincil yapısı benzer şekilde β-sheet yapısı olarak belirlenmiştir. Düşük basınçlarda uygulanan homojenizasyonun soya proteininin ikincil yapısı üzerindeki etkisi incelendiğinde ise, homojenizasyon basıncı 10 MPa'dan 20 MPa'ya yükseldiğinde β-sheet içeriği azalırken düzensiz yapılarda önemli ölçüde artış gözlenmiştir. Homojenizasyon basıncının 20 MPa'dan 40 MPa'a yükselmesi ile birlikte β-sheet içeriğinde de artış tespit edilmiştir. β-sheet yapısının azalan miktarı, çözünür protein agregasyonu oluşumuna atfedilirken, β-sheet içeriğindeki artış protein agregasyonuna bağlanmıştır. Farklı bir çalışmada, YBH uygulanan bezelye proteininde α-heliks ve β-turn içeriğinde hiçbir fark saptanmazken, β-sheet içeriğinde önemli bir azalma ve random coil (rastgele iplikler) oluşumunda bir artış gözlenmiştir. Ancak bu değişiklikler, basınç yoğunluğundan ve geçiş sayısından bağımsız gerçekleşmiştir (Melchior vd., 2022). Zhang vd. (2022)'nın çalışmasında ise homojenizasyon basıncı 0'dan 140 MPa'ya yükselmesi ile yer bademi proteinlerinin β-sheet içeriği %4,3 oranında azalırken, α-heliks ve random coil miktarı sırasıyla %3,5 ve %2,01 oranlarında artmıştır. YBH'nin neden olduğu yoğun kesme ve kavitasyon, proteinlerin kinetik enerjisini, Brownian hareketini ve buna bağlı olarak protein molekülleri arasındaki çarpışmaları artırmıştır. Bu durum da, β-sheet içeriğinde bir azalmaya yol açan protein moleküllerinin agregasyonunu teşvik etmiştir. Rastgele sarmallardaki artış ise, proteinin düzenli bir yapıdan düzensiz bir yapıya dönüştüğünü göstermiştir (Zhang vd., 2022).

4.2.7 Serbest ve Toplam Sülfidril (-SH) Grupların Belirlenmesi

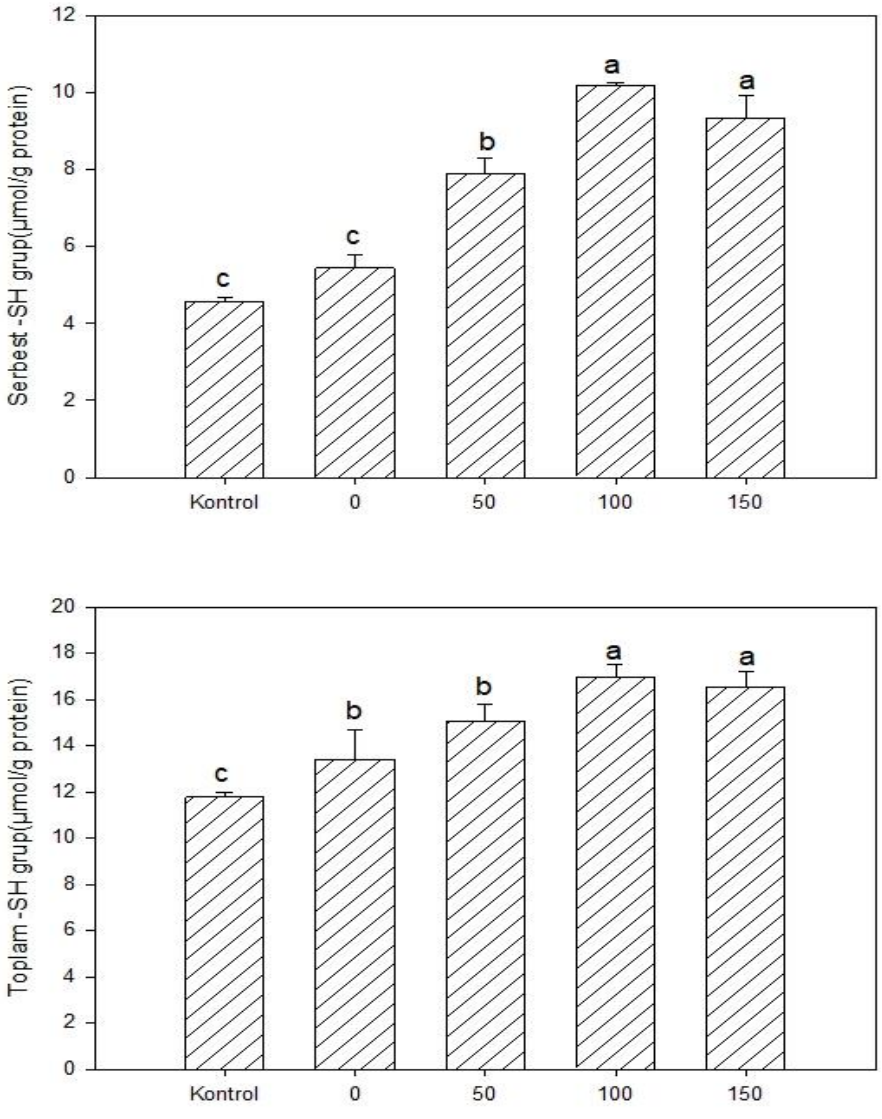
Serbest -SH grubu, Ellman reaktifi ile reaksiyona girmek için proteinin yüzeyinde bulunan erişilebilir bir grubu ifade etmektedir. Toplam -SH grupları ise, yüzey serbest -SH gruplarını ve protein molekülleri içindeki gömülü serbest -SH gruplarını

kapsamaktadır (Shen vd., 2017). Susam protein izolatının farklı basınçlarda homojenizasyon tekniği ile modifikasyonu sonucu serbest ve toplam -SH gruplarında meydana gelen değişiklik Tablo 4.3 ve Şekil 4.8'de görülmektedir. 100 MPa basınca kadar uygulanan homojenizasyon ile birlikte serbest -SH grubunda önemli bir artış meydana gelmiştir ($p<0,05$). Proteinler doğal hallerindeyken, çoğu -SH grubu, zor erişilebilir protein bölgelerinin içinde gizlenmektedir. YBH'nin sağladığı kesme kuvvetleri ve kavitasyon etkileri, proteinin açılmasına, molekül içi ve moleküller arası S-S bağlarının bölünmesine ve bunun sonucunda -SH gruplarının açığa çıkmasına neden olabilmektedir (Melchior vd., 2022). Bununla birlikte 150 MPa basınçta gerçekleştirilen homojenizasyon işlemi ile istatistiksel olarak önemli olmayan bir azalma meydana gelmiştir ($p>0,05$). Luo vd. (2022) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada kinoa protein izolatlarının serbest -SH içeriğinin 50 MPa'ya kadar artan homojenizasyon basıncı ile önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. Melchior vd. (2022)'nın gerçekleştirdiği çalışmada ise bezelye proteinine uygulanan homojenizasyon basıncının 150 MPa'ya kadar yükseltilmesi serbest -SH içeriğini önemli düzeyde artırırken, 150 MPa basınçta homojenizasyon döngüsünün artırılması bu durumu olumsuz etkilemiştir. Bezelye protein izolatına uygulanan 0, 60, 120, 180 ve 240 MPa basınçlı YBH'den sonra S-S bağ miktarında kademeli ve önemli bir azalış gözlemlenirken, özellikle 180 MPa basınca kadarki prosesin proteindeki serbest SH grubunu önemli düzeyde artırdığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Azalan S-S bağ miktarı, proteindeki farklı amino asit zincirleri arasındaki S-S bağlantısını kıran ve YBH tarafından uygulanan güçlü kuvvetlere atfedilmiştir. Her ne kadar artan serbest -SH içeriği S-S bağlarının bölünmesine bağlansa da, bu durum, doğal formlarındayken proteinin iç hidrofobik çekirdeği içinde saklanan serbest olmayan -SH gruplarının protein açılımının bir sonucu olarak açığa çıkmasıyla da ilişkilendirilebilmektedir (Cheng vd., 2022). Susam protein izolatının homojenizasyon işlemi öncesi 11,77 μmol/g protein olan toplam -SH içeriği homojenizasyon işlemi ile birlikte artış göstermiş ve 100 MPa basınçta en yüksek değerini almıştır. Daha yüksek basınçta (150 MPa) ise toplam -SH içerinde kısmi bir azalma tespit edilmiştir ($p>0,05$). Literatürde, bulgularımızın aksine, 100 ve 150 MPa basınç ile homojenizasyon işlemi uygulanmış soya unu proteinlerinin kontrol grubuna göre daha düşük toplam -SH içeriğine sahip olduğu bildirilmiştir (Liu ve Kuo, 2016).

Tablo 4.3 Kontrol ve YBH ile modifiye edilmiş SPİ'lerin serbest ve toplam –SH grup miktarları

Örnek	Serbest –SH grubu (µmol/g protein)	Toplam –SH grubu (µmol/g protein)
Kontrol	4,56±0,11[c]	11,77±0,29[c]
0 MPa	5,44±0,35[c]	13,42±1,26[b]
50 MPa	7,90±0,38[b]	15,05±0,76[b]
100 MPa	10,18±0,06[a]	16,98±0,54[a]
150 MPa	9,34±0,56[a]	16,52±0,71[a]

Aynı sütundaki değerlerde bulunan farklı harfler (a-c), ortalamalar arasında önemli farklılık olduğunu göstermektedir ($p<0,05$).



Şekil 4.8 Yüksek basınçlı homojenizasyon tekniği ile modifiye edilmiş susam proteinlerinin serbest ve toplam –SH grupları

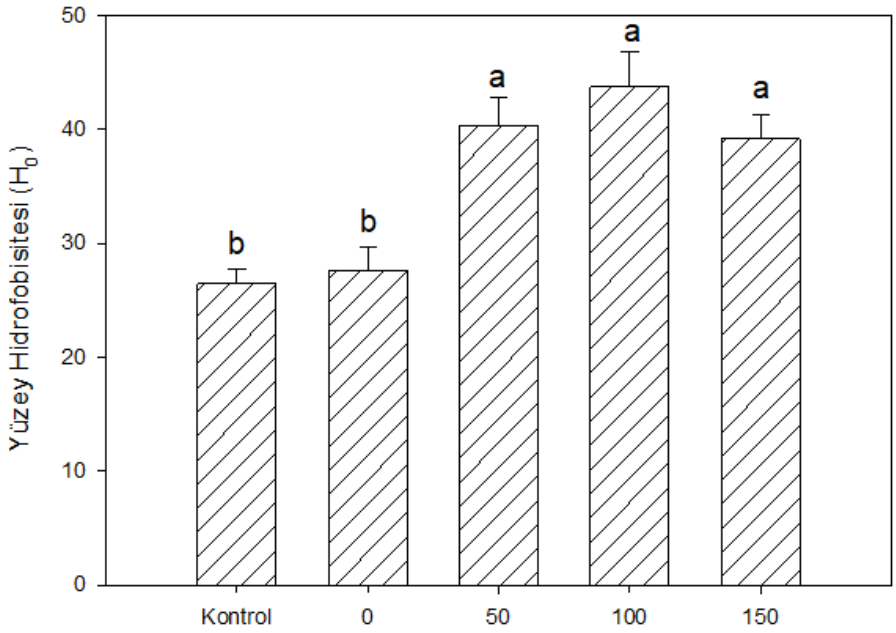
4.2.8 Yüzey Hidrofobikliği

Yüzey hidrofobikliği, polar sulu ortamla temas halinde olan protein molekülünün yüzeyindeki hidrofobik grupların indeks sayısıdır ve fonksiyonel özellikleriyle yakından ilişkilidir (Li vd., 2020). Bu parametre, ANS ile açığa çıkan hidrofobik gruplar arasındaki etkileşimden türetilen floresan ölçülerek değerlendirilmiştir (Valencia-Flores vd., 2013). Susam protein izolatlarının yüksek basınçlı homojenizasyon tekniği ile modifikasyonu sonrası yüzey hidrofobisite değerlerindeki değişimi Tablo 4.4 ve Şekil 4.9'da verilmiştir. 100 MPa homojenizasyon basıncına kadar işlenen susam protein izolatlarının yüzey hidrofobikliği önemli düzeyde artış gösterirken ($p<0,05$), 150 MPa basınçla homojenize edildiğinde hafif bir azalış sergilenmiştir ($p>0,05$). 100 MPa basınç değerine kadar yüzey hidrofobikliğinin artması, homojenizasyon işleminin oluşturduğu mekanik etki ile proteinlerin açılmasına ve proteinin iç bölgesinde yer alan daha fazla hidrofobik grubun yüzeye hareket etmesine bağlanmaktadır.

Tablo 4.4 Kontrol ve YBH ile modifiye edilmiş SPİ'lerin yüzey hidrofobisite değerleri

Örnek	Yüzey hidrofobisitesi (H_0)
Kontrol	$26,44\pm1,30^{b}$
0 MPa	$27,61\pm2,12^{b}$
50 MPa	$40,32\pm2,44^{a}$
100 MPa	$43,74\pm3,08^{a}$
150 MPa	$39,17\pm2,17^{a}$

Aynı sütundaki değerlerde bulunan farklı harfler (a-b), ortalamalar arasında önemli farklılık olduğunu göstermektedir ($p<0,05$)



Şekil 4.9 Yüksek basınçlı homojenizasyon tekniği ile modifiye edilmiş susam proteinlerinin yüzey hidrofobisite değerleri

Uygun basınçta yüksek basınçlı homojenizasyon işleminin, protein agregatlarının ayrılması veya proteinlerin açılması ve böylece katlanmış yapının içinde gömülü olan hidrofobik bölgelerin açığa çıkması için etkili bir yol olduğu literatürdeki çeşitli çalışmalarla da kanıtlanmıştır (Liu vd., 2021; Wu vd., 2019). Elde edilen bulgulara benzer olarak Liu ve Kuo (2016)'nun gerçekleştirdiği çalışmada, 100 MPa basınçta homojenize edilmiş soya unu içindeki çözünür proteinlerin yüzey hidrofobisite değerinin kontrolden daha yüksek bulunduğu ve 150 MPa basınç muamelesinin bu değeri kısmi olarak azalttığı bildirilmiştir. Bakla proteinine uygulanan 103 MPa basınçlı homojenizasyon işlemi de yüzey hidrofobikliğini işlenmemiş proteine kıyasla önemli düzeyde geliştirmiştir (Yang vd., 2018). Cheng vd. (2022)'nin bezelye proteinine uyguladığı 60 MPa üzeri basınçlardaki homojenizasyon işlemi de yüzey hidrofobikliğini önemli düzeyde yükseltmiştir. Her ne kadar 60 MPa basınçtaki YBH işleminden sonra bezelye proteininin yapısı açılmış olsa da, bu tür bir açılma yüzey hidrofobikliğini değiştirebilecek derecede bulunmamıştır. YBH teknolojisinin yüzey hidrofobikliğini olumlu etkilediği tüm bu çalışmaların aksine, 20 MPa üzerinde homojenizasyon basıncı ile muamele edilen soya proteini izolatının yüzey hidrofobikliğinde düşüş gözlenmiş ve bu durum protein agregasyonuna atfedilmiştir (Li vd., 2020).

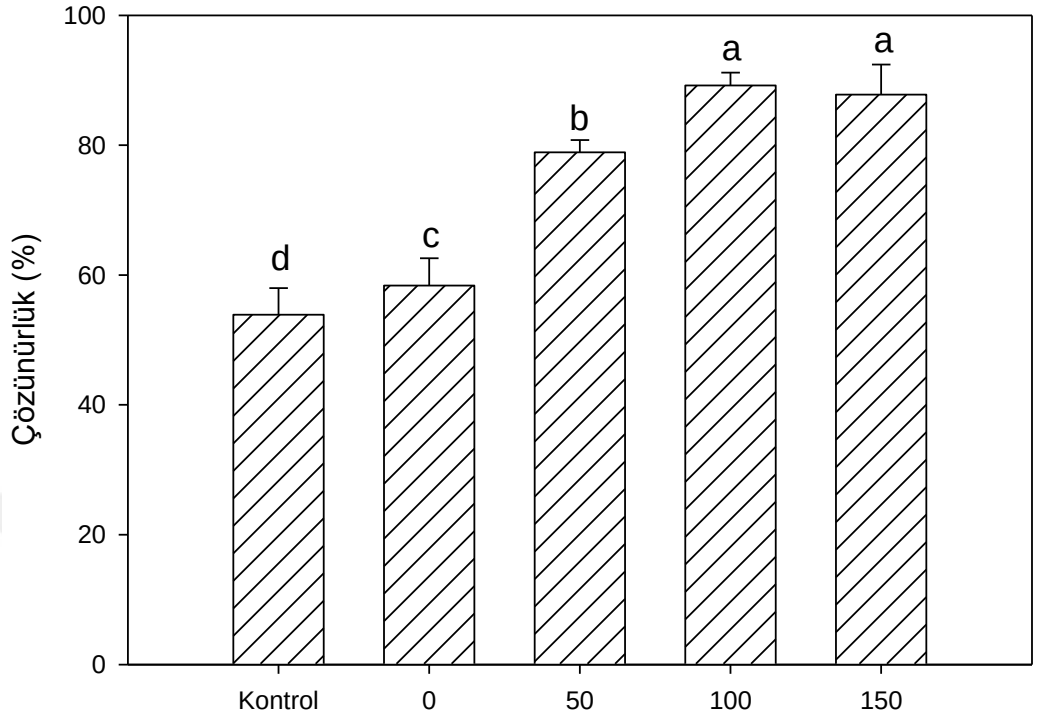
4.2.9 Protein Çözünürlüğü

Homojenizasyon uygulanmamış susam protein izolatının suda çözünürlük değeri %53,89 olarak tespit edilmiş olup homojenizasyon işlemi ile birlikte basınca bağlı olarak çözünürlük değeri %58,39 ile %89,21 arasında belirlenmiştir (Tablo 4.5). Susam protein izolatlarının çözünürlük değerleri 100 MPa basınç değerine kadar önemli düzeyde artış gösterirken ($p<0,05$), basıncın 150 MPa'a çıkması çözünürlükte istatistiksel olarak önemli olmayan bir azalmaya neden olmuştur ($p>0,05$). Çözünürlüğün artış nedeni yüksek basınçlı homojenizasyonun kesme ve darbe kuvveti nedeniyle azalan parçacık boyutu ve artan suyla etki alanı sonucu hidrojen bağlarının ve elektrostatik etkileşimlerin artması olarak gösterilmektedir (Li vd., 2020).

Tablo 4.5 Kontrol ve YBH ile modifiye edilmiş SPİ'lerin suda çözünürlük değerleri

Örnek	Çözünürlük (%)
Kontrol	$53,89\pm4,09^{d}$
0 MPa	$58,39\pm4,19^{c}$
50 MPa	$78,90\pm1,90^{b}$
100 MPa	$89,21\pm1,98^{a}$
150 MPa	$87,78\pm4,64^{a}$

Aynı sütundaki değerlerde bulunan farklı harfler (a-d), ortalamalar arasında önemli farklılık olduğunu göstermektedir ($p<0,05$)



Şekil 4.10 Kontrol ve yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi uygulanmış susam protein izolatlarının çözünürlüğü

Literatürde yüksek basınçlı homojenizasyon işleminin bitkisel protein izolatlarının çözünürlük değerlerini önemli düzeyde arttırdığına dair sonuçlar mevcuttur. Mercimek ve fındık unu proteinlerine 150 MPa basınç değerine kadar homojenizasyon işleminin uygulandığı çalışmalarda, 100 MPa seviyesine kadar YBH'nin, protein açılmasına ve solvent-protein etkileşimlerinin artmasına neden olabileceği ve bu nedenle proteinin suda çözünürlüğünü artırabileceği belirtilmiştir. Ancak bu çalışmalarda bizim bulgularımızdan farklı olarak, 150 MPa basınçta uygulanan işlem ile muhtemel basıncın aşırı işleme etkisinden dolayı proteinlerin daha fazla açılmasıyla, hidrofobik grupların, -SH kalıntı oluşumunun ve buna bağlı olarak protein agregasyonunun artması uyarıldığı için çözünürlük önemli ölçüde azalma gösterdiği ortaya konmuştur (Sarıcaoğlu vd., 2018; Sarıcaoğlu, 2020). Bulgularımıza benzer sonuçlar elde eden bir diğer çalışmaya göre de, işlenmemiş bakla proteinlerinin çözünürlüğü %35 iken, sırasıyla 103 ve 207 MPa basınçta yüksek basınçlı homojenizasyon işleminden geçirildikten sonra çözünürlük sırası ile %98 ve %99'a yükselmiştir. Çözünürlüğün artması, büyük çözünmeyen protein

agregatlarının yüksek basınçlı homojenizasyon yoluyla dağılarak çözünür agregatlar oluşturmasına atfedilmiştir (Yang vd., 2018). YBH'nin bezelye proteinine etkisini inceleyen farklı bir çalışmada da en yüksek çözünürlük değerleri 3 geçişte uygulanan 70 ve 100 MPa basınçlardaki homojenizasyon işlemi elde edilmiştir. Başlangıçta %22,27 olan çözünürlük değeri, 100 MPa basınçtan 3 kez geçirme ile %34 değerlerine ulaşmıştır. Ancak 150 MPa basınçtan 3 kez geçirme sonucunda topaklanma oluşumu gözlemlenmiş ve çözünürlüğün %19,94 değerine, yani işlenmemiş örneğin çözünürlüğünden daha düşük bir değere düştüğü tespit edilmiştir (Melchior vd., 2022). Yüksek basınçlı homojenizasyon işleminin, uygulanan basınç parametrelerine bağlı olarak, bitkisel kaynaklı proteinlerin suda çözünürlüklerini olumlu yönde geliştirebildiği bu çalışmalara karşın Liu ve Kuo (2016)'nun gerçekleştirdiği bir çalışmada, tam yağlı soya ununa 100 ve 150 MPa basınç seviyelerinde YBH işlemi uygulanmış ve soya unundaki protein çözünürlüğünün her iki homojenizasyon basıncında da önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir.

4.3 Susam Proteinlerinin Fonksiyonel Özellikleri

4.3.1 Su ve Yağ Bağlama Kapasitesi

Homojenizasyon işlemi uygulanmamış ve farklı basınçlarda uygulanmış susam protein izolatlarının su ve yağ bağlama kapsitesileri Tablo 4.6 ve Şekil 4.11'de verilmiştir. 100 MPa basınca kadar uygulanan yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi susam protein izolatlarının su ve yağ bağlama özelliklerini önemli düzeyde geliştirmiştir ($p<0,05$). İşlem görmemiş susam proteini için su bağlama kapasitesi değeri 1,77 g su/g protein iken, en fazla su bağlama 100 MPa basınç uygulanan protein örneğinde (2,2 g su/g yağ) belirlenmiştir. Benzer şekilde Dong vd. (2011)'nin yer fıstığı proteinlerine 40 ve 80 MPa basınç uyguladığı homojenizasyon işlemi ile su bağlama kapasitesi önemli düzeyde artmış ($p<0,05$), başlangıçta %189,3 olan su bağlama kapasitesi, 80 MPa basınç uygulamasından sonra %394,5 olmuştur. Proteinlerin su bağlama kapasitelerindeki bu gelişimin nedeni ise, yüksek basınçlı homojenizasyon işleminin jel oluşumu sırasında protein-protein etkileşimine, partikül boyutunun küçülmesine ve protein yüzey alanının genişlemesine katkıda bulunması olarak gösterilmiştir (Dong vd., 2011). Literatürdeki bir diğer çalışmada

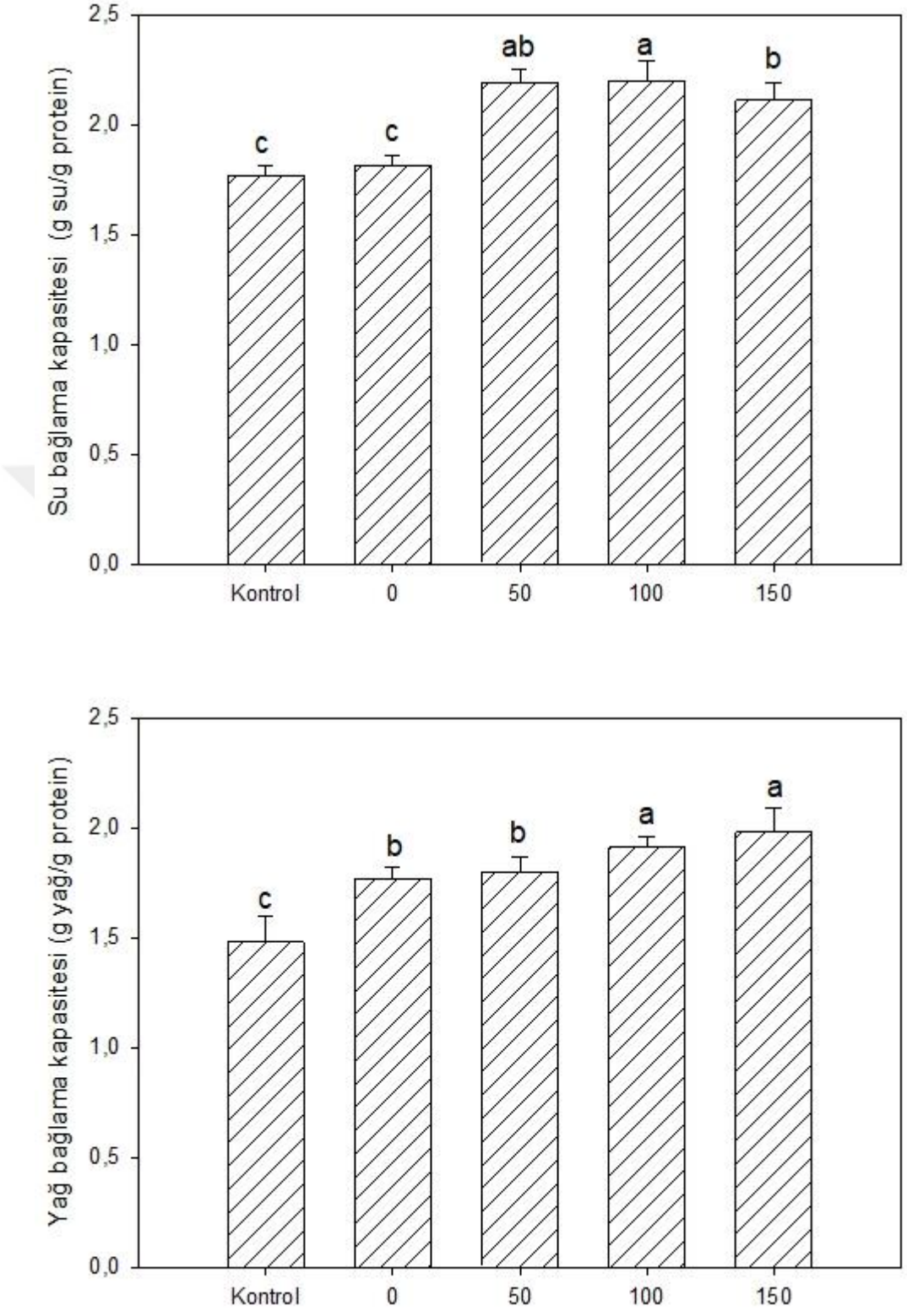
ise, patates protein izolatı ile stabilizatör ilave etmeden yoğurt benzeri fermente bir ürün oluşturmak için yüksek basınçlı homojenizasyon (0,1 MPa, 30-200 MPa) kullanımının etkisi incelenmiştir. Jel benzeri sistemlerin, süt bazlı yoğurt ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek su tutma kapasitesi gösterdiği belirlenirken homojenizasyon basıncının su tutma kapasitesi üzerinde anlamlı farklar oluşturmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$) (Levy vd., 2021).

Yağ bağlama kapasitesi de su tutma kapasitesine benzer bir gelişim göstererek artan homojenizasyon basıncı ile artma eğilimi sergilemiştir. İşlem görmemiş protein izolatında 1,48 g yağ/g protein olarak belirlenen yağ bağlama kapasitesi, 150 MPa basınç uygulanan protein örneğinde maksimum değere ulaşarak 1,98 g yağ/g protein olarak ölçülmüştür. Melchior vd. (2022)'nin gerçekleştirdiği çalışmada yüksek basınçlı homojenizasyonun, bezelye proteininin yağ bağlama kapasitesi üzerindeki olumlu etkisi gözlenmiş ve en yüksek yağ bağlama kapasitesi 70 MPa basınçta ve 3 geçişte gerçekleştirilen modifikasyon ile elde edilmiştir.

Tablo 4.6 Kontrol ve YBH ile modifiye edilmiş SPİ'lerin su ve yağ bağlama kapasiteleri

Örnek	Su bağlama kapasitesi (g su/g protein)	Yağ bağlama kapasitesi (g yağ/g protein)
Kontrol	$1,77\pm0,04^{c}$	$1,48\pm0,12^{c}$
0 MPa	$1,81\pm0,05^{c}$	$1,77\pm0,05^{b}$
50 MPa	$2,19\pm0,06^{ab}$	$1,80\pm0,07^{b}$
100 MPa	$2,20\pm0,09^{a}$	$1,91\pm0,05^{a}$
150 MPa	$2,11\pm0,08^{b}$	$1,98\pm0,11^{a}$

Aynı sütundaki değerlerde bulunan farklı harfler (a-c), ortalamalar arasında önemli farklılık olduğunu göstermektedir ($p<0,05$)



Şekil 4.11 Kontrol ve yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi uygulanmış susam protein izolatlarının su ve yağ bağlama kapasiteleri

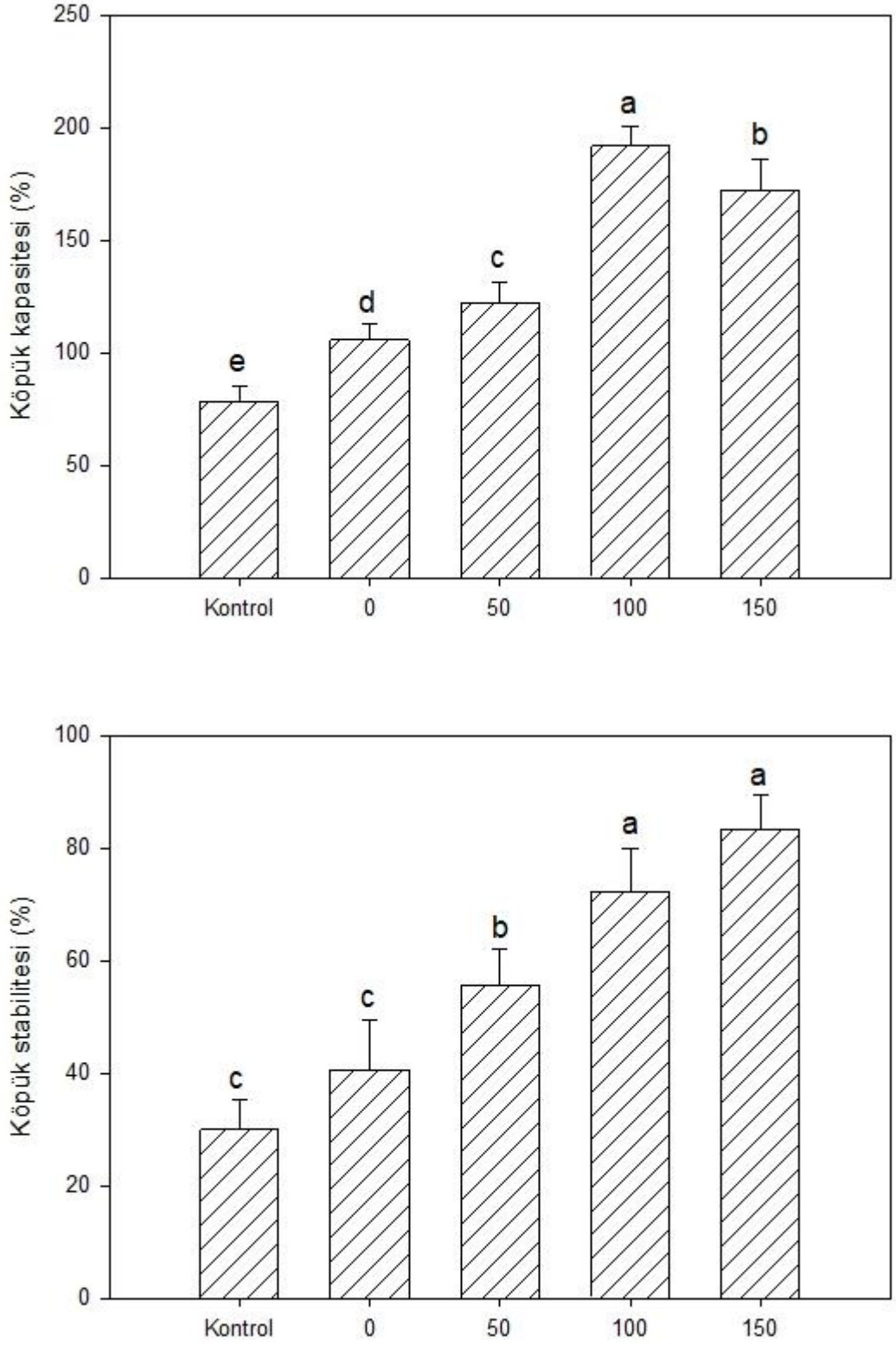
4.3.2 Köpük Oluşturma Özellikleri

Susam protein izolatlarının Tablo 4.7 ve Şekil 4.12'de verilen köpük kapasitesi değerleri çözünürlük değerlerine benzer eğilim göstermiştir. Kontrol örneğinde %78,33 olan köpük kapasitesi 100 MPa basınç uygulamasıyla maksimum %191,66 olarak önemli bir artış sergilemiştir ($p<0,05$). Ancak 100 MPa'dan sonra köpük kapasitesi değerinde önemli düzeyde azalma meydana gelmiştir ($p<0,05$). Kontrol örneği için %30 olan köpük stabilitesi ise, 150 MPa basınçlı homojenizasyon uygulamasından sonra en yüksek değerini alarak %83,33 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda, modifiye olmuş susam protein izolatlarının esnek protein yapısına sahip olduğu ve su-hava ara yüzeyinde etkileşime girerek işlem görmemiş örneklere kıyasla daha stabil bir köpük oluşturabildiği belirlenmiştir. Yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi ile artan köpürme özellikleri, suda çözünürlüğün artmasına ve büyük protein agregatlarının hava-su arayüzüne doğru hızla göç etmesine olanak sağlayan çözünür agregatlara ayrışmasına bağlanmaktadır (Jarpa-Parra vd., 2016; Yuan vd., 2012). Ayrıca literatüre göre, YBH uygulamalarının proteinlerin hidrofobik etkileşimlerini ve iyonik bağlarını bozması muhtemeldir ve bu durum da protein moleküllerinin açılarak daha hızlı adsorbe olmak için daha esnek hale gelmesiyle sonuçlanabilmektedir (Sarıcaoğlu vd., 2018)

Tablo 4.7 Kontrol ve YBH ile modifiye edilmiş SPİ'lerin köpük oluşturma özellikleri

Örnek	Köpük kapasitesi (%)	Köpük stabilitesi (%)
Kontrol	$78,33\pm6,57^{e}$	$30,00\pm5,16^{c}$
0 MPa	$105,55\pm7,21^{d}$	$40,55\pm9,04^{c}$
50 MPa	$122,25\pm8,93^{c}$	$55,56\pm6,61^{b}$
100 MPa	$191,66\pm9,13^{a}$	$72,22\pm7,53^{a}$
150 MPa	$172,22\pm13,6^{b}$	$83,33\pm5,96^{a}$

Aynı sütundaki değerlerde bulunan farklı harfler (a-e), ortalamalar arasında önemli farklılık olduğunu göstermektedir ($p<0,05$)



Şekil 4.12 Kontrol ve yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi uygulanmış susam protein izolatlarının köpük kapasitesi ve stabilitesi

Literatürde yerfıstığı, bakla, fındık, mercimek, soya ve kinoa proteinlerine uygulan yüksek basınç işlemiyle protein izolatlarının köpük kapasiteleri, işlem görmemiş izolatlara kıyasla önemli ölçüde yüksek bulunmuştur (Dong vd., 2011; Li vd., 2020; Luo vd., 2022; Sarıcaoğlu vd., 2018; Sarıcaoğlu, 2020; Yang vd., 2018). Meydana gelen artışın proteinlerin yapısındaki değişimden kaynaklandığı ve köpük kapasitesinde meydana gelen değişimlerin etkisinin protein çeşidine bağlı olarak değişebileceği belirtilmiştir (Hall ve Moraru, 2021). Uygulanan yüksek basınçlı homojenizasyon literatürdeki bitkisel proteinlerin köpük stabilitelerini ise farklı şekillerde etkilemiştir. Yang vd. (2018)'nin işlenmemiş ve modifiye bakla proteinleri ile stabilize ettikleri köpüklerin stabilitelerinde önemli bir fark gözlemlenmemiştir. Her ikisi de 30 dakika sonra yaklaşık %95 köpük hacmi tutarak yüksek köpük stabilitesi göstermiştir. Fındık ve mercimek protein izolatlarına uygulanan yüksek basınçlı homojenizasyon köpük stabilitesini, bizim bulgularımıza benzer şekilde, 100 MPa basınca kadar önemli düzeyde geliştirirken (Sarıcaoğlu vd., 2018, Sarıcaoğlu, 2020), Li vd. (2020)'nin gerçeklekleştirdiği çalışmada düşük basınçta homojenizasyon (0-40 MPa), soya protein izolatının köpük stabilitesini önemli şekilde azaltmıştır.

4.3.3 Emülsiyon Oluşturma Özellikleri

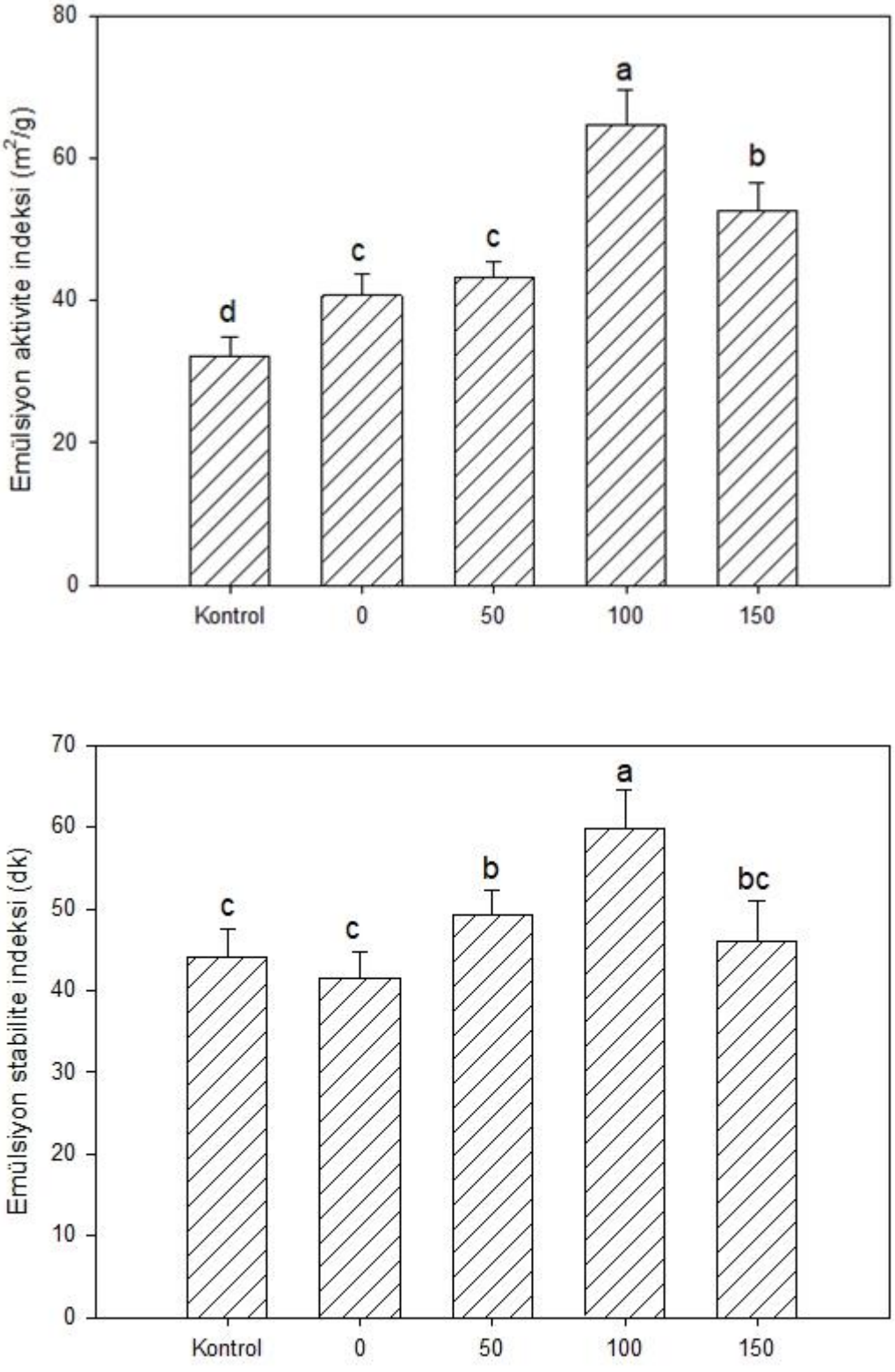
Proteinlerin emülsiyon oluşturma özelliklerinin belirlenmesinde emülsiyon aktivite indeksi ve emülsiyon stabilite indeksi terimlerinden yararlanılmaktadır. Emülsiyon aktivite indeksi, proteinlerin emülsiyon oluşumu esnasında su-yağ ara yüzeyine hızlı bir şekilde tutunabilme yeteneğini yansıtmaktadır. Emülsiyon stabilite indeksi ise, proteinlerin ilave edildikleri emülsiyonları belirli bir süre kararlı halde tutma yeteneğidir. Kontrol ve yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi uygulanmış protein izolatlarının emülsiyon oluşturma özellikleri Tablo 4.8 ve Şekil 4.13'te verilmiştir Emülsiyon aktivite ve stabilite indeksleri, 100 MPa basınca kadar homojenizasyon işlemi ile birlikte işlem görmemiş izolatlara kıyasla önemli düzeyde artış gösterirken ($p<0,05$), 100 MPa basınçtan sonra azalma eğilimi göstermiştir. Kontrol örneğinde 32,2 m^2/g olan emülsiyon aktivite değeri, 100 MPa basınçlı homojenizasyon uygulamasıyla en yüksek değer olan 64,63 m^2/g olarak belirlenmiştir. Susam proteininin emülsiyon aktivitesinde 100 MPa basınca kadar gözlenen anlamlı artış,

çözünürlük ve partikül boyut dağılımı verileriyle uyumlu bulunmuştur. 100 MPa basınca kadar gerçekleştirilen homojenizasyon uygulamasıyla elde edilen protein partikül boyutundaki azalma, yağ damlacıklarının yüzeyinde daha fazla protein molekülünün adsorbe edilmesine izin vererek, yağ damlacıklarının topaklaşmasını ve birleşmesini engellemiştir (Zhang vd., 2022). Kontrol için 44,06 dakika olan emülsiyon stabilite değeri de, en fazla değerini 100 MPa basınç altında, 59,84 dakika olarak göstermiştir.

Tablo 4.8 Kontrol ve YBH ile modifiye edilmiş SPİ'lerin emülsiyon oluşturma özellikleri

Örnek	**Emülsiyon aktivite indeksi (m^2/g)**	**Emülsiyon stabilite indeksi (dakika)**
Kontrol	$32,20\pm2,69^{d}$	$44,06\pm3,36^{c}$
0 MPa	$40,69\pm3,13^{c}$	$41,54\pm3,24^{c}$
50 MPa	$43,31\pm2,04^{c}$	$49,31\pm2,99^{b}$
100 MPa	$64,63\pm4,92^{a}$	$59,84\pm4,67^{a}$
150 MPa	$52,70\pm3,83^{b}$	$46,04\pm4,92^{bc}$

Aynı sütundaki değerlerde bulunan farklı harfler (a-d), ortalamalar arasında önemli farklılık olduğunu göstermektedir ($p<0,05$)



Şekil 4.13 Kontrol ve yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi uygulanmış susam protein izolatlarının emülsiyon oluşturma özellikleri

Şekil 4.13'te görüldüğü gibi, susam proteinlerine 100 MPa'dan daha yüksek basınçlarda uygulanan homojenizasyon işlemi, susam proteinlerinin hem emülsiyon aktivitesi hem de emülsiyon stabilitesi değerlerini önemli düzeyde azaltmıştır ($p<0.05$). Bu durum, 100 MPa üzerindeki homojenizasyon basıncının susam protein izolatlarında agregasyon oluşumuna yol açtığını düşündürtmüştür. Bu basınç uygulamasının üstünde protein agregatlarının oluşumu, 100 MPa basınç sonrası artış gösteren partikül boyutu analiz verileriyle de uyumlu bulunmuştur. Protein agregasyonu, çözünürlüğün azalmasına ve protein ara yüzey aktivitesinin değişmesine yol açarak, emülsiyon aktivitesinin ve emülsiyon stabilitesinin azalmasına neden olabilmektedir (Li vd., 2020).

Yüksek basınçlı homojenizasyon, kayma gerilimi, türbülans, kavitasyon ve darbe gibi çeşitli etkiler yoluyla protein agregatlarının dağılmasını teşvik ederek proteinin kararlı yapısını bozabilmektedir. YBH'nin neden olduğu bu etkiler doğal protein yapısının orta derecede ayrışmasına ve açılmasına neden olabilmektedir (Zhang vd., 2022). Proteinlerin emülsiyon aktivitesi, proteinlerin yeni oluşan ara yüzeylere difüze olabilmelerine, yapılarının açılmasına, ara yüzey gerilimini düşürecek şekilde yeniden diziliş gösterebilmelerine ve gerçekleştirdikleri disülfit, hidrofobik etkileşimler sayesinde ara yüzeyde viskoelastik bir film oluşturabilmelerine bağlıdır. Farklı bir deyişle yüksek basınçlı homojenizasyon ile artan emülsifiye edici özellikler, proteinlerin daha yüksek hidrofobik ve hidrofilik etkileşimi ile sonuçlanan protein yapısının kısmi ayrışmasına ve açılmasına atfedilebilmektedir. YBH işlemi ile, hidrofobik protein grupları iç yüzeyden dış yüzeye doğru hareket ettiğinden, literatürde çeşitli proteinlerin yüzey hidrofobikliği artmıştır (Xu vd., 2018; Yu vd., 2018). Hidrofobik grupların yüzeye hareketi, özellikle yağ-su ara yüzeyinde protein esnekliğini arttırmaktadır. Ayrıca, suda protein çözünürlüğü de, yağ-su arayüzüne difüzyonu kolaylaştırması nedeniyle emülsifiye edici özelliklerle yakından ilişkilidir (Sarıcaoğlu, 2020). Yukarıda bahsedildiği gibi emülsiyon aktivitesi, protein hidrofobikliği ve çözünürlüğünün bir fonksiyonu iken, emülsiyon stabilitesi, proteinlerin toplam konsantrasyonu ile ilgili bulunmaktadır (Li vd., 2020).

Literatürde proteinlerin emülsiyon özelliklerinde belirli basınç değerlerine kadar artış gözlemlendiği, belirli bir basınçtan sonra azalmaların meydana geldiği çalışmalar

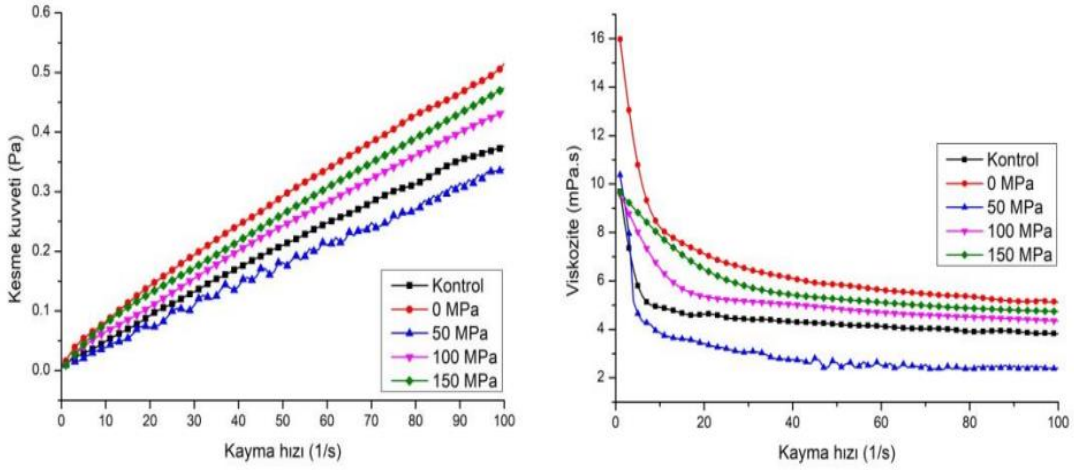
mevcuttur. Bunlara örnek vermek gerekirse; fındık ve mercimek protein izolatlarının emülsiyon aktiviteleri, 25 MPa'ya kadar YBH uygulamasından önemli ölçüde etkilenmemiş, ancak basınç 50 ile 100 MPa arasında değiştiğinde, her iki bitkisel kaynaklı protein izolatı da en yüksek emülsiyon aktivite değerlerini göstermiştir. Basıncın 150 MPa seviyesine kadar artması da bu proteinlerin emülsiyon aktivitelerinde önemli bir azalmaya neden olmuştur. YBH ile modifiye edilmiş fındık ve mercimek protein izolatlarının emülsiyon stabiliteleri için de benzer davranış gözlemlenmiştir (Sarıcaoğlu vd., 2018; Sarıcaoğlu, 2020). Bir diğer çalışmada yer bademi proteinine yüksek basınçlı homojenizasyon işleminin uygulanmasıyla emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi değerlerinde 100 MPa basınca kadar önemli artış görülürken, 120 ve 140 MPa basınçların uygulanmasıyla değerlerde azalma tespit edilmiştir. 100 MPa basınçtan sonra gözlenen azalma, protein moleküllerinin aşırı denatürasyonu nedeniyle proteinlerin etkileşime girmesine ve tekrar topak yapının oluşmasına bağlanmıştır (Zhang vd., 2022). Levy vd. (2021)'nin gerçekleştirdiği bir çalışmaya göre de, YBH basıncı (0,1 MPa, 30-200 MPa) arttıkça patates protein izolatı ile oluşturulan emülsiyonların faz ayrılmasına karşı stabilitelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Literatürde Yang vd. (2018)'nin bakla proteini üzerine gerçekleştirdiği bir çalışmada yüksek basınçlı homojenizasyonun emülsiyon oluşturma özellikleri üzerindeki olumsuz etkisi gözlemlenmiştir. Bu çalışmaya göre işlenmemiş bakla proteini için emülsiyon aktivite indeksi 27 m^2/g'den, 103 ve 207 MPa basınçlarla modifiye edildikten sonra sırasıyla 22,7 ve 19,7 m^2/g'ye düşmüştür. Homojenizasyon basıncı arttıkça emülsiyon stabilitesi de önemli düzeyde azalma göstermiştir. Bu durum arayüzey filminin azaltılmış viskoelastisitesiyle ilgili bulunmuştur.

4.4 Susam Proteinlerinin Reolojik Özellikleri

4.4.1 Akış Özellikleri

İşlenmemiş ve yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi ile modifiye edilmiş susam proteinlerinin akış davranış özellikleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.14'te verilmiştir. Tipik bitkisel protein süspansiyonlarında olduğu gibi (Fernandez-Avila vd., 2015; Gül vd., 2017; Sarıcaoğlu vd., 2018; Saricaoglu, 2020) susam

proteinlerinin viskozite değerleri artan kayma hızına karşılık azalma eğilimi göstermekte olup kayma incelmesi davranışı sergilemektedirler. Homojenizasyon işlemi ile birlikte susam protein izolatının viskozite değerinde değişim meydana gelmiştir. Düşük kayma hızında (1-10 s^{-1}) en yüksek viskozite, 0 MPa basınçta homojenizasyon işlemi uygulanmış örnekte tespit edilmiştir. Diğer örneklerin viskozite değerleri kayma hızının en düşük olduğu seviyede benzer bulunmuştur. Kayma hızı 50 s^{-1} olarak sabit alındığında kontrol örneğine kıyasla 100 ve 150 MPa basınç uygulanmış örneklerin viskozite değerinde artış tespit edilirken, en düşük viskozite de 50 MPa basınçla homojenize edilen örnekte tespit edilmiştir. Literatürdeki bir çalışmada, fındık protein izolatının artan homojenizasyon basıncıyla (0-150 MPa) işlenmesi viskozitede kademeli bir düşüşe neden olmuştur. 0 MPa basınçla homojenize edilen örneğin viskozitesi ise, hemen hemen tüm kayma hızlarında YBH ile muamele edilmiş örneklerden çok daha yüksek bulunmuştur (Sarıcaoğlu vd., 2018). Sarıcaoğlu (2020)'nun mercimek proteini izolatı ile gerçekleştirdiği çalışmada da, 1-10 s^{-1} gibi düşük kesme hızlarında en yüksek viskozite homojenize edilmemiş protein süspansiyonu olan kontrol numunesinde belirlenirken, 150 MPa ile homojenize edilmiş mercimek protein süspansiyonu en düşük viskoziteyi göstermiştir. Benzer şekilde yer bademi proteininin viskozitesi de, artan homojenleştirme basıncı ile azalmış ve 100 MPa'lık homojenleştirme basıncında minimum bir değere ulaşmıştır (Zhang vd., 2022). Literatüre göre, YBH uygulaması badem sütünün viskozitesinde önemli bir değişikliğe neden olmazken, artan homojenizasyon basıncı fındık sütlerinin viskozitesini artırmıştır. Bu durum fındık proteinlerinin badem proteinlerine göre basınca daha duyarlı olduğunu göstermiştir (Bernat vd., 2015).



Şekil 4.14 Kontrol ve yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi uygulanmış susam protein izolatlarının akış özellikleri

Kesme kuvveti-kayma hızı grafiğine Oswalt-de-Waele model uygulanmış ve sonuçlar Tablo 4.9'da verilmiştir. Oswalt-de-Waele modeline uygun R^2 değerleri tüm örnekler için 0,997-0,999 arasında bulunmuştur. İşlem görmemiş ve yüksek basınçlı homojenizasyon işlemiyle modifiye olmuş susam proteinlerin akış davranış indeks değerlerinin 1'in altında belirlenmesi tüm izolatların psödoplastik akış özelliği (kayma incelmesi) gösterdiğini işaret etmektedir. Bu akış davranışı literatürdeki bitkisel proteinlerin çoğunda benzer şekilde gözlemlenmiştir (Fernandez-Avila vd., 2015; Gül vd., 2017; Saricaoglu vd., 2018; Saricaoglu, 2020; Zhang vd., 2022). Ancak, Bernat vd. (2015)'nin gerçekleştirdiği çalışmaya göre işlenmemiş badem sütlerinde kayma kalınlaşması davranışı (n=1,18) gözlenirken, homojenleştirilmiş badem sütlerinde neredeyse Newtonyen davranış ($n \approx 1$) sergilenmiştir. Basınç değerinin artmasıyla susam protein izolatlarının kıvam indekslerinde (K değeri) 100 MPa basınca kadar azalış gözlemlenirken, kontrol numunesinden sonraki en yüksek kıvam indeksi 0,011 $Pa.s^n$ olarak 150 MPa basınçla muamele edilmiş örnekte belirlenmiştir. Homojenizasyon basıncının artması numunelerin akış davranış indekslerinde ise K değerlerindeki değişimin tam tersi bir etki sağlamıştır. Susam protein izolatının akış davranış indeksi (n değeri), 100 MPa basınç değerine kadar artarken, en düşük akış davranış indeksi 0,82 olarak 150 MPa basınç uygulanmış örneklerde tespit edilmiştir. En düşük viskoziteyi sergileyen 50 MPa basınçla işlenmiş numunelerde ise, en yüksek n değeri (0,93) ve en düşük K değeri (0,005) belirlenmiş ve akıcılıkta artış gözlenmiştir. Badem ve fındık sütlerine uygulanan 62,

103 ve 172 MPa basınçlarındaki YBH, her iki ürünün de K ve n değerlerini farklı etkilemiştir. Badem sütüne uygulanan bu basınçlar K değerinde önemli bir değişikliğe neden olmazken ($p>0,05$), 103 MPa basınç 1,18 olan n değerini 0,925'e düşürerek badem sütünün akış davranışını kayma kalınlaşmasından kayma incelmesine dönüştürmüştür. Aynı çalışmada fındık sütüne uygulanan bu basınçlar K ve n değerlerini önemli ölçüde etkilemiştir ($p<0,05$). Başlangıçta 1,1 $Pa.s^n$ olan K değeri 103 MPa basınç uygulamasıyla 8 $Pa.s^n$ olarak maksimum halini almıştır. Basınç uygulanmadığında 1,08 olan n değeri ise en düşük değerini aynı şekilde 103 MPa basınç ile olarak 0,79 olmuştur (Bernat vd., 2015). Zhang vd. (2022)'nin gerçekleştirdiği çalışmada da 100 MPa basınç değerinden sonraki basınç seviyelerinde, bulgularımızla benzer şekilde, K değeri artışa n değeri ise azalışa geçmiştir.

Tablo 4.9 Yüksek basınçlı homojenizasyon işlemiyle kesme kuvveti-kayma hızı grafiğine Oswalt-de-Waele model parametreleri

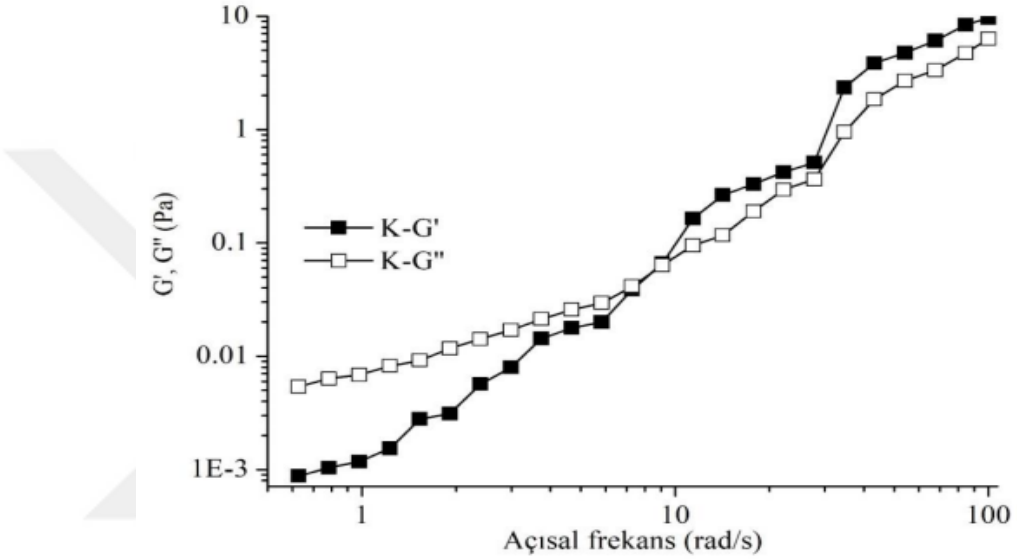
Örnekler	K ($Pa.s^n$)	n (-)	R^2
Kontrol	0,013	0,79	0,999
0 MPa	0,007	0,87	0,999
50 MPa	0,005	0,93	0,997
100 MPa	0,008	0,85	0,999
150 MPa	0,011	0,82	0,999

K: Kıvam indeksi; n: akış davranış indeksi; R^2: Oswalt-de-Waele model denkleminin belirleme katsayısı

4.4.2 Dinamik Reolojik Özellikler

Protein süspansiyonlarının dinamik reolojik özellikleri, maddenin içyapısı hakkında kapsamlı bilgiler elde edilmesine yardımcı olmaktadır. Dinamik reoloji ölçümleri neticesinde elde edilen depo (G′) ve kayıp (G″) modülleri sırasıyla maddenin viskoelastik ve viskoz özellikleri hakkında bilgiler vermektedir. Susam proteinlerine uygulanan YBH işleminin proteinlerin viskoelastik veya viskoz özellikleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla dinamik reolojik ölçümler gerçekleştirilmiş ve YBH işlemi uygulanmamış kontrol örneklerinin dinamik reolojik özellikleri Şekil 4.15'te verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi modifiye edilmemiş susam proteinlerinin 10 rad/s açısal frekans değerine kadar viskoz özelliklerinin baskın olduğu ($G″ > G′$), ancak bu frekans değerinden sonra süspansiyonların viskoelastik karakter sergilediği

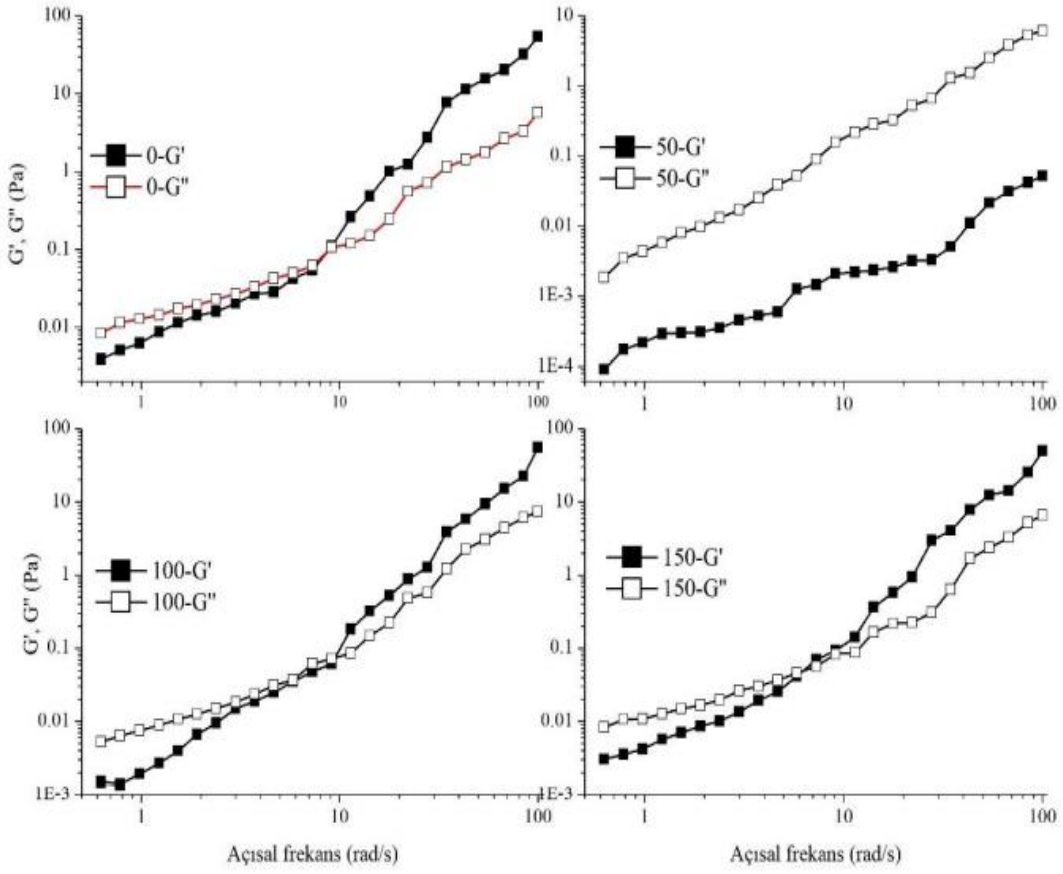
tespit edilmiştir (G′ > G″). Proteinlerin analiz edilmesi amacıyla %4 protein içerecek şekilde pH 7'de süspansiyonlar hazırlanmış ve analizler gerçekleştirilmiştir. Grafikten anlaşılacağı üzere, bitkisel esaslı proteinlerin viskoelastik bir yapıya sahip olabilmeleri için %4 oranında süspanse edilmesinin yetersiz olduğu görülmektedir. Ancak, lineer viskoelastik bölgede uygulanan deformasyon kuvvetinin (0,01 Pa) frekansı arttıkça susam protein süspansiyonları viskoelastik yapıya geçiş yapmıştır.



Şekil 4.15 Modifiye edilmemiş susam proteinlerinin dinamik reolojik özellikleri

Proteinler YBH işlemine maruz kaldıktan sonra elde edilen tozların dinamik reolojik analizlerine ait sonuçlar Şekil 4.16'da gösterilmiştir. Başlangıçta tüm numunelerde G″ değerleri G′ değerlerinden yüksek bulunmuş ve tüm süspansiyonların viskoz karakterinin baskın olduğu tespit edilmiştir. Ancak, 50 MPa basınç ile muamele edilmiş proteinler hariç diğer tüm örneklerde frekansın artmasıyla viskoelastik karakter baskın hale geçmiştir (G′ > G″). 50 MPa basınç ile muamele edilen numuneler tüm frekans aralıklarında viskoz yapıya sahip olmuş ve bu durum viskozite, partikül boyutu ve mikro-yapısal görüntüler ile uyum göstermiştir. Literatürde yer alan mercimek protein süspansiyonları ile ilgili çalışmada tüm açısal frekans aralıklarında G′, her zaman G″ 'den daha yüksek bulunmuş, bu da YBH ile muamele edilmiş süspansiyonlarda elastik karakterin viskoz karakterden ziyade baskın olduğu ve dolayısıyla tüm numunelerin zayıf jel benzeri bir yapı ile tanımlanabileceğini göstermiştir. Ek olarak artan frekans, özellikle 10 rad/s'den

sonra, mercimek protein süspansiyonlarında daha yüksek bir G′ artışına neden olmuştur. Homojenizasyonun etkisi ise basıncın 100 MPa'ya yükselmesiyle G′ modülünün frekansa bağımlılığının artması şeklinde gözlenmiştir. Bu da G′ modülünün artan frekansla daha fazla artış sergilemesini sağlamıştır (Sarıcaoğlu, 2020). Benzer şekilde fındık posası protein süspansiyonlarının da G′ ve G″ değerleri, artan salınım frekansı ile artan bir eğilim göstermiş ve tüm numuneler için depolama modülü (G′), tüm salınım frekanslarında her zaman kayıp modülünden (G″) daha yüksek bulunmuştur. Ancak homojenizasyon basıncının artması ile, salınım frekansına bağlı olarak her iki modülün de artışında azalma gözlenmiştir. Basınç 100 MPa'ya yükseldikten sonra G′ modülünün eğimi azalırken, G″ modülünün eğimi homojenizasyon basıncının 75 MPa'ya yükselmesiyle artmış, daha yüksek basınç değerlerinde ise azalmıştır (Sarıcaoğlu vd., 2018).



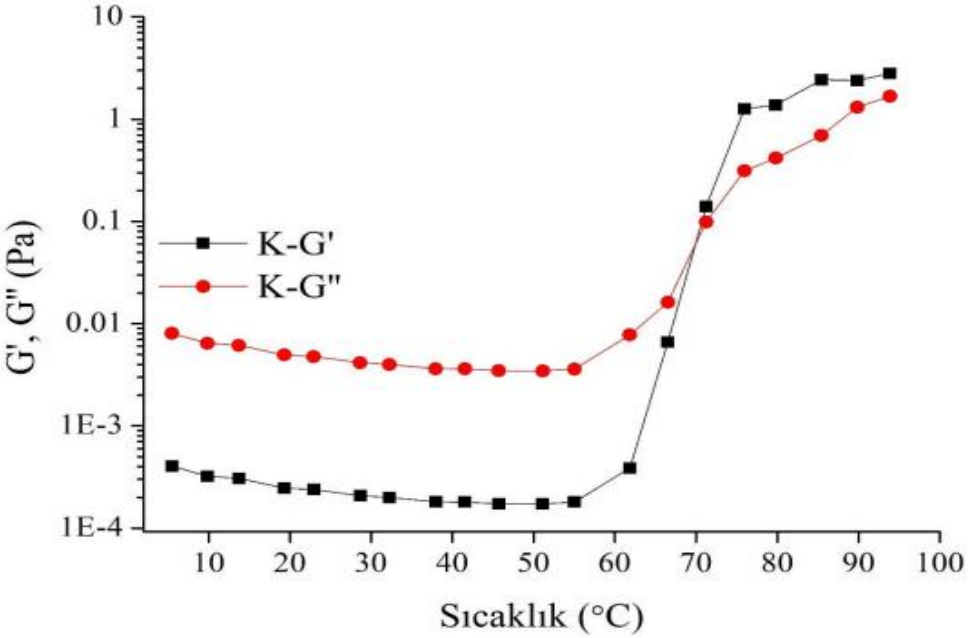
Şekil 4.16 Yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi ile modifiye edilmiş susam proteinlerinin dinamik reoloji sonuçları

Bitkisel proteinlerin zayıf jel yapısına sahip olmaları ve düşük konsantrasyonlu süspansiyonlarının jelleşmemesi çeşitli çalışmalarda da gözlemlenmiştir. Yapılan bir çalışmada bezelye protein izolatlarının jelleşmesi incelenmiş ve bezelye proteinlerinin minimum jel oluşturma konsantrasyonunun %8,4 olduğu tespit edilmiştir (O'Kane vd., 2004). Başka bir çalışmada da %5 protein konsantrasyonlu bezelye proteini süspansiyonları, artan basınçlarda (150 MPa'ya kadar) ve geçiş sayısında (3'e kadar) homojenizasyon uygulanmış ve tüm numuneler çalışmamıza benzer şekilde zayıf jel davranışı sergilemiştir (G′ > G″). G′, YBH uygulamasının 3 geçişte 70 MPa olarak gerçekleştirilmesiyle maksimuma ulaşmış ve daha yüksek sayıda elastik etkileşim ve katı benzeri davranış ortaya çıkmıştır (Melchior vd., 2022). Farklı basınçlarda homojenize edilmiş %5 konsantrasyonlu patates proteini emülsiyonlarından elde edilen yoğurt benzeri yapının depolama modülü de (G'), test edilen tüm frekans aralığında kayıp modülünden (G") daha yüksek bulunmuştur. Ek olarak bu bitkisel protein içerikli yoğurt alternatifinin G' ve G" eğrileri, stabilizatör içermeyen inek sütlü yoğurt ile karşılaştırılmış ve daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçtan, inek sütlü yoğurtta patates proteinli yoğurt alternatiflerine kıyasla daha düşük bir ağ gücünün oluştuğu anlamı çıkarılmıştır. Ancak bu durum, patates proteini emülsiyonundaki daha yüksek protein içeriğine atfedilmiştir (Levy vd., 2021). Görüldüğü üzere, bitkisel proteinlerin jel oluşturma özelliklerinin zayıf olması, daha yüksek konsantrasyonlarda viskoelastik karakter sergilemelerine neden olmaktadır. Bu nedenle susam proteinlerinde de benzer bir durumla karşılaşılmış ve %4 protein konsantrasyonunun viskoelastik karakter sergilemek için yetersiz olduğu anlaşılmıştır. Ancak, bu konsantrasyonlarda bile artan frekans ile susam proteinlerinin zayıf da olsa viskoelastik karakter sergileyebildiği belirlenmiştir. Ayrıca, 50 MPa hariç, diğer tüm basınç uygulamalarında frekans tarama testi sonucunda örnekler yüksek G′ değerine ulaşmıştır. Bu durum, uygulanan deformasyonun frekansının artmasıyla susam proteinlerinin viskoelastik özelliklerinin geliştiğini göstermektedir.

4.4.3 Sıcaklık Taraması

İşlenmemiş ve yüksek basınçlı homojenizasyon ile muamele edilmiş susam protein süspansiyonlarının sıcaklığa bağımlılığı, 0,681 rad/s sabit açısal frekansta ve lineer

viskoelastik bölgede sıcaklık tarama testi ile de değerlendirilmiştir. Yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi uygulanmamış protein süspansiyonlarının viskoz veya viskoelastik özelliklerinin sıcaklığa bağlı olarak değişimleri Şekil 4.17'de görülmektedir. Protein süspansiyonlarının viskoz yapıları sıcaklık tarama testinin başlarında baskın olduğu belirlenmiştir. Benzer durum dinamik reolojik özellikler testinde de gözlenmiştir. Ancak sıcaklığın artması, viskoz ve viskoelastik yapının hızlı bir şekilde artmasına ve yaklaşık 70 ºC'de depo (G′) modülünün kayıp (G″) modülü üzerine çıkarak viskoelastik karakterin baskın hale gelmesine neden olmuştur. Bu sıcaklık, jelleşme sıcaklığı (Tjel) olarak düşünülmektedir.

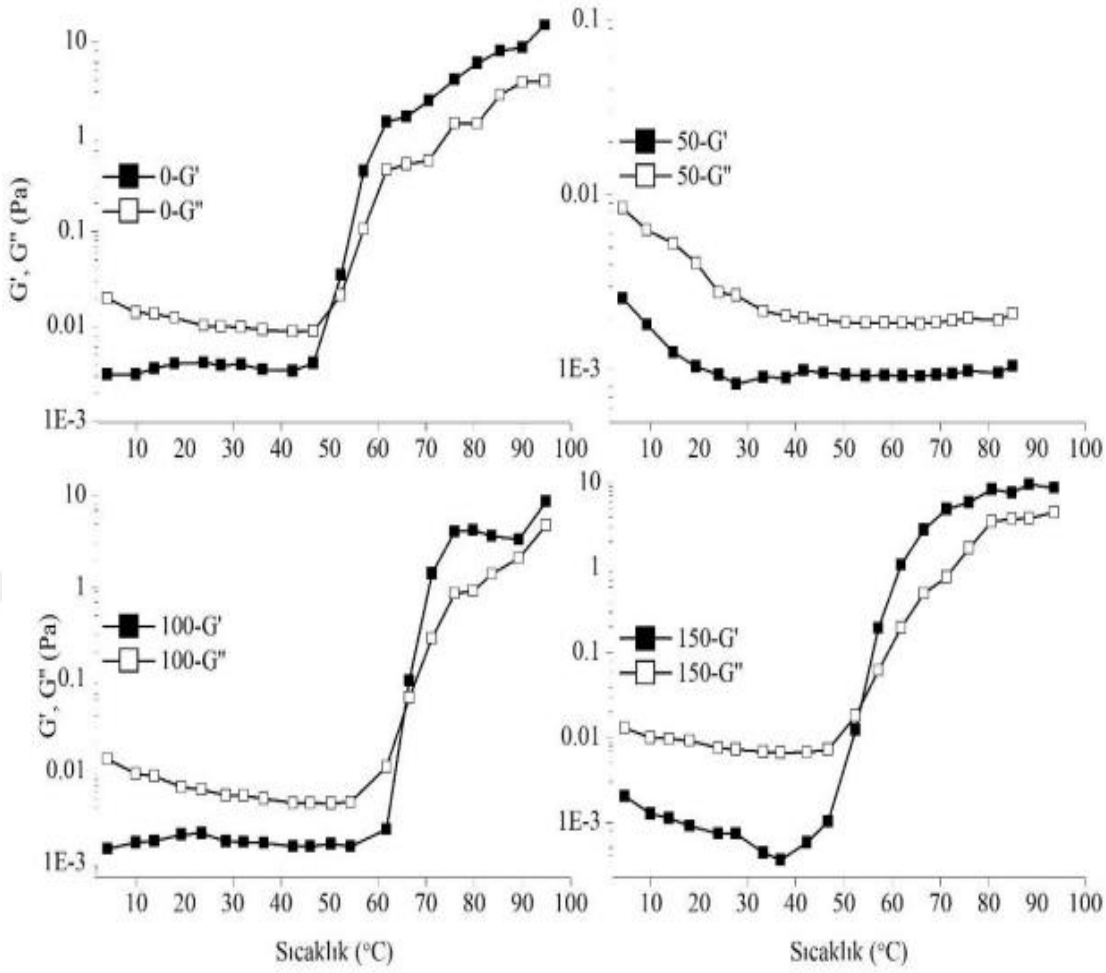


Şekil 4.17 Yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi uygulanmamış susam proteinlerinin sıcaklık tarama testine ait sonuçlar

Yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi ile modifiye edilmiş susam proteinlerinin sıcaklık tarama test sonuçları Şekil 4.18'de verilmiştir. Susam proteinlerinin yüksek basınçlı homojenizasyon işlemine maruz bırakılması sıcaklık taraması verilerini önemli ölçüde etkilemiştir. Başlangıçta tüm protein süspansiyonları viskoz bir karakter sergilese bile, artan sıcaklık uygulaması ile bu durum değişmiştir. 0 MPa basınçta dahi homojenizasyon uygulanması, proteinlerin jel oluşturma sıcaklıklarını önemli ölçüde azaltmış ve yaklaşık 55 °C'de jel oluşumunu sağlayarak viskoelastik karakterleri baskın hale getirmiştir. Ancak, 50 MPa basınç uygulaması proteinlerin

yapısında daha farklı bir etki göstermiş ve bu protein süspansiyonlarında sıcaklığa bağlı olarak jel oluşumu gözlenmemiştir. Bu yapısal farklılık partikül boyutu, mikro-yapısal ve viskozite analizleri sonuçları ile de desteklenmiştir. Basıncın 100 ve 150 MPa seviyelerine çıkarılması da proteinlerin jel oluşturma sıcaklıklarını değiştirmiştir. 100 MPa homojenizasyon basıncı ile muamele edilmiş susam proteinlerinde 70 °C'nin altında jel oluşumu gözlenirken, 150 MPa basınçta homojenizasyon uygulanan proteinler yaklaşık 55 °C'de jel oluşturmuşlardır.

Sarıcaoğlu (2020)'nun mercimek proteini ile gerçekleştirdiği çalışmada elastik karakterin baskınlığını ifade eden G′ değerlerinin her zaman G″ değerlerinden yüksek olduğu görülmüştür. Kontrol ve 0 MPa ile muamele edilmiş mercimek proteininin sıcaklığa bağımlılığı hemen hemen benzer bulunmuş ve bu protein süspansiyonlarının 51,78 °C'den sonra jelleşmeye başladığı gözlenmiştir. 51,78 °C'den sonra, 50 MPa ve daha yüksek basınçlarla muamele edilen mercimek proteini süspansiyonlarında gözlenen jelleşme daha belirgin bulunmuştur. Bu durum, YBH işlemi ile partikül boyutunun azalması, suda çözünürlüğün artması ve muhtemelen artan yüzey alanı ile daha fazla protein molekülünün sıcaklığa maruz kalması ile ilişkilendirilmiştir. Ek olarak bu çalışmada 50 ile 150 MPa arasında YBH uygulaması, jelleşme sıcaklığına kadar G′ değerlerinin düşmesine de neden olmuştur (Sarıcaoğlu, 2020). Artan sıcaklıkla birlikte G′ değerlerindeki bu azalma, jel ağının stabilize edilmesinde hidrojen bağlarının önemli rol oynadığı jellerin tipik davranışı olarak görülmektedir (Joshi vd., 2014). Farklı bir çalışmada ise fındık sütlerinin Tjel değeri 48 °C olarak belirlenmiş ve homojenizasyon basıncının 0'dan 150 MPa'a yükselmesi bu jelleşme sıcaklığını önemli düzeyde etkilemediği tespit edilmiştir. Fındık sütü jellerinin sıcaklığa bağımlılığı değerlendirildiğinde ise, sıcaklık 40 ve 60 °C arasındayken her iki modülde de bir artış ve protein agregasyonu sayesinde güçlü ağ yapısı oluşumu belirlenirken, sıcaklık 60'dan 85 °C'ye yükseldiğinde her iki modülde de azalma oluştuğu ve protein denatürasyonu nedeniyle ağın gücünün azaldığı gözlenmiştir (Gül vd., 2017).



Şekil 4.18 Yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi ile modifiye edilmiş susam protein süspansiyonlarının sıcaklık tarama test sonuçları

5. SONUÇ VE ÖNERİ

İnsan sağlığının korunması ve çeşitli hastalıkların engellenmesi açısından elzem makromoleküllerden olan proteinler, bulundukları gıda ürünlerine çeşitli fonksiyonel özellikler (su/yağ bağlama, köpük oluşturma, emülsiyon oluşturma, koyulaştırma ve jelleşme gibi) katarak bu ürünlerin yapısal olarak da geliştirebilmesinde önemli rol oynamaktadır. Gelişen dünya nüfusu ve değişen dünya düzeni, insanları proteinlerin eldesi için geleneksel hayvansal kaynaklara (et, süt, balık, yumurta) alternatif yollar bulmaya itmiştir. Bitkisel kaynaklı proteinler, çoğu dini, kültürel ve etik beslenme kurallarına uygun olmasına ek olarak, hijyen, mali ve çevresel konularda da avantajlara sahip olması nedeniyle geleneksel hayvansal kaynaklı proteinlere iyi bir alternatif olabilmektedir. Özellikle tarım ürünlerinin işlenmesi sonrası açığa çıkan bitkisel posalardan protein eldesi, endüstriyel atıkların değerlendirilmesi açısından da oldukça değerlidir. Genellikle hayvan beslenmesine dahil edilen bu posaların, artan insan popülasyonu ve azalan gıda kaynakları nedeniyle insan diyetine de dahil edilmesi önemlidir. Ancak bitkisel proteinlerin zayıf işlevsellik sergilemesi, onların gıda ürünlerinde kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenle, uygun teknikler ile bitkisel proteinlerin modifikasyonu sağlanmalı ve fonksiyonel özellikleri geliştirilmelidir. Protein modifikasyonu için özellikle kimyasal ve termal olmayan yeni teknolojiler son zamanlarda dikkat çekmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında bu tez ile, bir gıda atığı olan susam posasından ekstrakte edilen proteinlerin gıda formülasyonlarına uygulanabilirliğini artırmak için, yüksek basınçlı homojenizasyon teknolojisi ile çeşitli fonksiyonel özelliklerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla gerçekleştirdiğimiz tez çalışmasında, susam protein izolatına uygulanan farklı basınç seviyelerindeki (0, 50, 100 ve 150 MPa) yüksek basınçlı homojenizasyonun, susam proteininin fizikokimyasal, fonksiyonel ve reolojik özelliklerine etkisi incelenmiştir. İlk olarak yağı uzaklaştırılmış ve protein içeriği %38,07 olan susam posasından protein ekstrakte edilmiş ve ekstraksiyon işlemi başarıyla tamamlanarak %90,33 oranında protein içeren susam protein izolatı (SPİ) elde edilmiştir. Daha sonra protein modifikasyonu için hazırlanan SPİ çözeltileri 0, 50, 100 ve 150 MPa basınçlarında ayarlanan yüksek homojenizasyon cihazından 1'er

kez geçirilmiştir. Yüksek basınçlı homojenizasyon teknolojisi, doğrudan veya dolaylı olarak oluşturduğu mekanik etki sayesinde proteinlerin fonksiyonel özelliklerini geliştirebilmektedir. Fonksiyonel özelliklerde gözlemlenen bu değişim, YBH'nin sağladığı mekanik etkinin proteinlerin konformasyonel yapılarını stabilize eden bağları bozarak, proteinin açılmasını ve fizikokimyasal özelliklerinin değişmesini sağlamasıyla gerçekleşmiştir. Bu değişimin gözlemlenebilmesi için çeşitli analizler gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, SPİ'nin farklı basınçlarda YBH'den geçirilmesinden sonra mikroyapısal özelliklerindeki farklılıklar hem protein süspansiyonu düzeyinde hem de partikül düzeyinde incelenmiştir. Elde edilen mikroskop görüntülerine göre, işlenmemiş ve 0 MPa YBH uygulanmış protein süspansiyonlarının, farklı boyutlarda partiküllerden oluştuğu belirlenirken, 50 ve 100 MPa basınç ile homojenize edilen süspansiyonların oldukça küçük partiküllere sahip olduğu gözlemlenmiştir. 150 MPa homojenizasyon basıncı ise agregasyonu uyararak protein süspansiyonlarının partikül boyutlarında kısmi bir artış sağlamıştır. Susam protein izolatlarının partikül düzeyinde yüzey karakterizasyonları incelendiğinde, örnekler arasında bazı farklılıklar gözlemlenmiştir. Buna göre, kontrol ve 0 MPa ile modifiye edilmiş partikül mikroyapıları pürüzsüz bir yüzey sergilerken, boyutu azalan 50 MPa basınç uygulanmış partiküllerin yüzeyi pürüzlü hale gelmiş ve basınç etkisiyle oluşan boşluklar gözlemlenmiştir. 100 ve 150 MPa basınç ise partikül yüzey karakterizasyonunda önemli değişikliklere neden olmamıştır. SPİ'lerin partikül boyut dağılımları da, basınca bağlı partikül boyutlarındaki değişimi doğrulamış ve en küçük partikül boyutuna 100 MPa'daki YBH ile ulaşılmıştır. Çalışmamıza göre 100 MPa basınçlı homojenizasyon, proteinlerin yalnızca partikül boyutunu küçültmekle kalmayıp, bu küçük partiküllerin en yüksek elektrik yüküne sahip olmasını sağlamıştır. Artan homojenizasyon basıncı, susam proteininin yüzey hidrofobisitesi, serbest/toplam –SH grupları ve suda çözünürlüğünde de anlamlı bir artışa neden olmuştur. Bu değerlerin artışı 100 MPa basınca kadar gerçekleşirken, 150 MPa basınç uygulaması bu artışta önemli bir fark yaratmamıştır. YBH uygulaması, 7S globulin alt birimleri dışında, susam proteini alt fraksiyonlarında gözle görülür bir değişime neden olmamıştır. Ancak basınç artışı, susam proteininde düşük miktarlarda bulunan 7S globulin fraksiyonunun yoğunluğunu artırmıştır. Susam proteininin sekonder yapısı da, bant yoğunluklarındaki kısmi değişimler dışında, büyük ölçüde benzer kalmıştır.

Susam proteinlerinin fizikokimyasal özelliklerinde gerçekleşen tüm bu değişiklikler, fonksiyonel özellikleri de önemli düzeyde etkilemiştir. Özellikle 100 MPa basınçlı homojenizasyon ile elde edilen minimum partikül boyutu ile maksimum hidrofobisite, zeta potansiyeli, -SH grupları ve çözünürlük değerleri, gelişmiş fonksiyonel özelliklerin gözlemlenmesinde önemli rol oynamıştır. Proteinlerin fonksiyonel özelliklerinden olan su ve yağ bağlama kapasiteleri, 100 MPa basınca kadar uygulanan YBH ile önemli ölçüde artış göstermiştir. Aynı şekilde köpürme özelliklerindeki artış da benzer bir eğilim göstermiştir. 100 MPa ile modifiye edilen SPİ'nin köpürme kapasitesi, kontrolün köpürme kapasitesinin yaklaşık 2,4 katı kadar yüksek bulunmuştur. Ancak basınç 150 MPa'ya çıktığında bu değerde istatistiki olarak anlamlı olmasa da azalma gözlemlenmiştir. 50 MPa ve üstündeki basınçlarda işlenen tüm SPİ'ler kontrole kıyasla çok daha stabil köpükler oluşturabilmiştir. Başlangıçta %30 olan köpük stabilitesi, özellikle 150 MPa basınçlı homojenizasyondan sonra %83,33 olarak maksimum değerini almıştır. YBH sonrası susam proteinlerinin gelişmiş ara yüzey özellikleri, köpürmede olduğu gibi emülsifikasyonu da olumlu yönde etkilemiştir. 100 MPa basınçlı homojenizasyonla modifiye edilmiş SPİ'lerin en gelişmiş emülsiyon özelliklerine sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak 150 MPa basınç uygulaması, proteinin partikül boyutlarında agregasyona bağlı artışa neden olarak emülsiyon özelliklerinin zayıflamasına neden olmuştur. Pseudoplastik davranış gösteren SPİ'lerin viskozitelerindeki YBH etkisi incelendiğinde (kayma hızı 50 s^{-1} olarak sabit alındığında), 0 MPa basınç ile homojenizasyon uygulanmış örneklerin en yüksek viskoziteyi, 50 MPa basınçla homojenize edilen örneklerin ise en düşük viskoziteyi sergilediği tespit edilmiştir. Ayrıca kesme kuvveti-kayma hızı grafiğine Oswalt-de-Waele modeli uygulanmış, kıvam indeksi ve akış indeksi gibi değerlendirilerek susam proteinlerinin akış özellikleri karşılaştırılmıştır. 50 MPa'ya kadar artan basınç ile SPİ'lerin kıvam indekslerinde azalma gözlemlenirken, homojenizasyon basıncındaki artış, numunelerin akış davranış indekslerinde bu değişimin tam tersi bir etki sağlamıştır. Kontrol ve YBH ile işlenmiş SPİ'lerin dinamik reolojik özelliklerine göre ise, %4 protein konsantrasyonlarında bile artan frekansla susam proteinlerinin zayıf da olsa viskoelastik karakter sergileyebildiği belirlenmiştir. Başlangıçta tüm numunelerde G″ değerleri G′ değerlerinden yüksek çıkmış ve tüm süspansiyonların viskoz karakterinin baskın olduğu tespit edilmiştir. Ancak, 50 MPa basınç ile muamele

edilmiş proteinler hariç diğer tüm örneklerde, frekansın artmasıyla viskoelastik karakter baskın hale geçmiştir (G′ > G″). Son olarak sıcaklık tarama testi ile protein izolatlarının basınca bağlı jelleşme sıcaklıklarında gerçekleşen değişim incelenmiştir. İşlenmemiş SPİ'nin jelleşme sıcaklığı, yani viskoelastik karakterin baskın hale geldiği sıcaklık (G′> G″), yaklaşık 70 ºC olarak belirlenirken, YBH ile bu sıcaklık 55 °C'ye kadar düşüş göstermiştir. Yalnızca 50 MPa basınç ile muamele edilmiş proteinlerde sıcaklığa bağlı jel oluşumu sergilenmemiştir.

Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz analiz sonuçlarının tümü incelendiğinde, 100 MPa basıncındaki YBH'nin SPİ'lerin fonksiyonel özelliklerinin gelişimindeki önemli etkisi anlaşılmaktadır. 100 MPa basınç ile homojenize edilen örneklerin maksimum zeta potansiyeline, serbest –SH grubuna, suda çözünürlüğe ve minimum partikül boyutuna sahip olması, proteinlerin gelişmiş fonksiyonel özellikler sergileyebilmeleri için gerekli olan temel değişimlerin gerçekleştiğini bize göstermektedir. Yani, 100 MPa basınçlı YBH sonrası gözlenen fizikokimyasal özelliklerdeki bu değişimler bize gelişmiş fonksiyonel özelliklerin sinyalini vermektedir. Buna ek olarak modifiye edilmiş SPİ'lerin su ve yağ bağlama, emülsifikasyon ve köpürme gibi fonksiyonel özellikleri incelendiğinde de maksimum gelişimin 100 MPa basınç ile sağlandığı belirlenmiştir. SPİ'nin reolojik özelliklerindeki maksimum gelişim üzerine spesifik bir basınç değeri veremesek de, 50 MPa dışındaki basınç parametrelerinde SPİ'nin baskın viskoelastik karakter sergileyebildiği belirlenmiştir (10 rad/s'den büyük açısal frekanslarda).

Sonuç olarak bu tez çalışması ile, susam proteinlerine uygulanan 100 MPa basınçlı YBH'nin, bu proteinlerin fonksiyonel özellikleri üzerinde en yüksek gelişimi sağladığı anlaşılmıştır. Susam proteinlerinin fonksiyonel özelliklerinde gözlenen bu gelişim, çeşitli vegan gıda ürünlerine sağlayabileceği yapısal faydayı göz önüne alınca umut verici bulunmuştur. Susam proteininin de, vegan ürünlerin yapısal gelişimini ve stabilitesini sağlamak için yaygın kullanılan soya ve nohut proteini vb. bitkisel proteinler gibi gıda endüstrisinde yer bulabileceği düşünülmektedir. Özellikle bir yan ürün olan susam posasının bu şekilde gıda üretimine katılması gıda atıklarının katma değeri yüksek katkı maddesi olarak değerlendirilmesi açısından da önemli bulunmaktadır. Bu nedenle gelecek çalışmalarda, YBH ile modifiye edilmiş

susam proteinlerinin çeşitli gıda ürünlerine uygulanması ve gıdanın yapısal gelişiminin ve raf ömrünün değerlendirilmesi, hem literatürde bu konudaki eksiklikleri doldurabilmek hem de bu proteinin endüstride kullanımına bir adım daha yaklaşabilmek için gerekli bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

Achouri, A., Nail, V., & Boye, J. I. (2012). Sesame protein isolate: Fractionation, secondary structure and functional properties. *Food Research International*, *46*(1), 360-369.

Ahmed, J., Al-Ruwaih, N., Mulla, M., & Rahman, M. H. (2018). Effect of high pressure treatment on functional, rheological and structural properties of kidney bean protein isolate. *LWT-Food Science and Technology*, *91*, 191-197.

Antoniou, J., Liu, F., Majeed, H., Qazi, H. J., & Zhong, F. (2014). Physicochemical and thermomechanical characterization of tara gum edible films: Effect of polyols as plasticizers. *Carbohydrate Polymers*, *111*, 359-365.

AOAC. (2000). Official methods of analysis. In (17th ed. ed.): Association of Official Agricultural Chemists.

Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O. E., & Pilosof, A. M. R. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, *108*(3), 463-472.

Augusto, P. E., Ibarz, A., & Cristianini, M. (2012). Effect of high pressure homogenization (HPH) on the rheological properties of tomato juice: Time-dependent and steady-state shear. *Journal of Food Engineering*, *111*(4), 570-579.

Aydemir, L. Y., Gökbulut, A. A., Baran, Y., & Yemenicioğlu, A. (2014). Bioactive, functional and edible film-forming properties of isolated hazelnut (Corylus avellana L.) meal proteins. *Food Hydrocolloids*, *36*, 130-142.

Bader, S., Bez, J., & Eisner, P. (2011). Can protein functionalities be enhanced by high-pressure homogenization?–A study on functional properties of lupin proteins. *Procedia Food Science*, *1*, 1359-1366.

Batu, A., & Elyıldırım, F. (2009). Geleneksel helva üretim teknolojisi. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, *4*(3), 32-43.

Bernat, N., Chafer, M., Rodríguez-García, J., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2015). Effect of high pressure homogenisation and heat treatment on physical properties and stability of almond and hazelnut milks. *LWT-Food Science and Technology*, *62*(1), 488-496.

Bhargava, A., & Jelen, P. (1995). Freezing of whey protein concentrate solutions and its effect on protein functionality indicators. *International Dairy Journal*, *5*(6), 533-541.

Camire, M. E. (1991). Protein functionality modification by extrusion cooking. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *68*(3), 200-205.

Cano-Medina, A., Jiménez-Islas, H., Dendooven, L., Herrera, R. P., González-Alatorre, G., & Escamilla-Silva, E. M. (2011). Emulsifying and foaming capacity and emulsion and foam stability of sesame protein concentrates. *Food Research International*, *44*(3), 684-692.

Cheng, J., Li, Z., Wang, J., Zhu, Z., Yi, J., Chen, B., & Cui, L. (2022). Structural characteristics of pea protein isolate (PPI) modified by high-pressure homogenization and its relation to the packaging properties of PPI edible film. *Food Chemistry*, *388*, 132974.

Dabbour, M., He, R., Ma, H., & Musa, A. (2018). Optimization of ultrasound assisted extraction of protein from sunflower meal and its physicochemical and functional properties. *Journal of Food Process Engineering*, *41*(5), e12799.

Dakhili, S., Abdolalizadeh, L., Hosseini, S. M., Shojaee-Aliabadi, S., & Mirmoghtadaie, L. (2019). Quinoa protein: Composition, structure and functional properties. *Food Chemistry*, *299*, 125161.

Damodaran, S. & T. Sengupta. (2003). Dynamics of competitive adsorption of s-casein and-casein at the oilwater interface: Evidence for incompatibility of mixing at the interface. *J. Agric. Food Chem*. 51:1658–1665.

Damodaran, S. (2005). Protein stabilization of emulsions and foams. *J. Food Sci.* 70:R54–R66.

Damodaran, S. (2017). Amino Acids, Peptides, and Proteins. S. Damodaran & K. L. Parkin (Eds.), *Fennema's Food Chemistry* (pp. 235-357). 5, CRC Press.

De Maria, S., Ferrari, G., & Maresca, P. (2016). Effects of high hydrostatic pressure on the conformational structure and the functional properties of bovine serum albumin. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *33*, 67-75.

Dickinson, E. (1998). Proteins at interfaces and in emulsions: Stability, rheology and interactions. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 88:2973–2985.

Dickinson, E., & Matsumura, Y. (1991). Time-dependent polymerization of β-lactoglobulin through disulphide bonds at the oil-water interface in emulsions. *International Journal of Biological Macromolecules*, *13*(1), 26-30.

Diels, A. M., & Michiels, C. W. (2006). High-pressure homogenization as a non-thermal technique for the inactivation of microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*, *32*(4), 201-216.

Dong, X., Zhao, M., Yang, B. A. O., Yang, X., Shi, J., & Jiang, Y. (2011). Effect of high-pressure homogenization on the functional property of peanut protein. *Journal of Food Process Engineering*, *34*(6), 2191-2204.

Dünya Gıda ve Tarım Örgütü İstatistiksel Araştırmalar Birimi. (2022). Production quantities of Sesame seed by country. http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC. Son erişim tarihi: 1 Ekim 2022.

Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *82*(1), 70-77.

Fernández-Ávila, C., Escriu, R., & Trujillo, A. J. (2015). Ultra-high pressure homogenization enhances physicochemical properties of soy protein isolate-stabilized emulsions. *Food Research International*, *75*, 357-366.

Fıratlıgil Durmuş, E. (2008). Kırmızı biber tohumunun endüstriyel olarak değerlendirilmesi: protein ekstraksiyonu, fonksiyonel özellikleri ve mayonez üretiminde kullanımı. Doktora Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul.

Floury, J., Bellettre, J., Legrand, J., & Desrumaux, A. (2004). Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern. *Chemical Engineering Science*, *59*(4), 843-853.

Gandhi, A. P., & Srivastava, J. (2007). Studies on the production of protein isolates from defatted sesame seed (Sesamum indicum) flour and their nutritional profile. *ASEAN Food Journal*, *14*(3), 175.

German, J. B., O'neill, T. E., & Kinsella, J. E. (1985). Film forming and foaming behavior of food proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *62*(9), 1358.

Ghaly, A. E., & Alkoaik, F. N. (2010). Extraction of protein from common plant leaves for use as human food. *American Journal of Applied Sciences*, *7*(3), 331.

Gharibzahedi, S. M. T., & Smith, B. (2020). The functional modification of legume proteins by ultrasonication: A review. *Trends in Food Science and Technology*, *98*, 107-116.

Görgüç, A., Özer, P., & Yılmaz, F. M. (2020). Microwave-assisted enzymatic extraction of plant protein with antioxidant compounds from the food waste sesame bran: Comparative optimization study and identification of metabolomics using LC/Q-TOF/MS. *Journal of Food Processing and Preservation*, *44*(1), e14304.

Gosal, W. S. & S. B. Ross-Murphy. (2000). Globular protein gelation [Review]. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci*. 5(3–4):188–194.

Graziano, G. (2009a). Dimerization thermodynamics of large hydrophobic plates: A scaled particle theory study. *J. Phys. Chem B*. 113:11232–11239. 12.

Graziano, G. (2009b). Role of salts on the strength of pairwise hydrophobic interaction. *Chem. Phys. Lett.* 483:67–71.

Gul, O., Saricaoglu, F. T., Mortas, M., Atalar, I., & Yazici, F. (2017). Effect of high pressure homogenization (HPH) on microstructure and rheological properties of hazelnut milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *41*, 411-420.

Guo, Z., Huang, Z., Guo, Y., Li, B., Yu, W., Zhou, L., ... & Wang, Z. (2021). Effects of high-pressure homogenization on structural and emulsifying properties of thermally soluble aggregated kidney bean (Phaseolus vulgaris L.) proteins. *Food Hydrocolloids*, *119*, 106835.

Hall, A. E., & Moraru, C. I. (2021). Structure and function of pea, lentil and faba bean proteins treated by high pressure processing and heat treatment. *LWT-Food Science and Technology*, *152*, 112349.

Han, Z., Cai, M. J., Cheng, J. H., & Sun, D. W. (2018). Effects of electric fields and electromagnetic wave on food protein structure and functionality: A Review. *Trends in Food Science and Technology*, *75*, 1-9.

He, X. H., Liu, H. Z., Liu, L., Zhao, G. L., Wang, Q., & Chen, Q. L. (2014). Effects of high pressure on the physicochemical and functional properties of peanut protein isolates. *Food Hydrocolloids*, *36*, 123-129.

Hu, H., Fan, T., Zhao, X., Zhang, X., Sun, Y., & Liu, H. (2017). Influence of pH and salt concentration on functional properties of walnut protein from different extraction methods. *Journal of Food Science and Technology*, *54*(9), 2833-2841.

Hu, H., Li-Chan, E. C., Wan, L., Tian, M., & Pan, S. (2013). The effect of high intensity ultrasonic pre-treatment on the properties of soybean protein isolate gel induced by calcium sulfate. *Food Hydrocolloids*, *32*(2), 303-311.

Jafari, S. M., Doost, A. S., Nasrabadi, M. N., Boostani, S., & Van der Meeren, P. (2020). Phytoparticles for the stabilization of Pickering emulsions in the formulation of novel food colloidal dispersions. *Trends in Food Science and Technology*, 98, 117-128.

Jarpa-Parra, M., Tian, Z., Temelli, F., Zeng, H., & Chen, L. (2016). Understanding the stability mechanisms of lentil legumin-like protein and polysaccharide foams. *Food Hydrocolloids*, *61*, 903-913.

Jenkins, D. J., Kendall, C. W., Garsetti, M., Rosenberg-Zand, R. S., Jackson, C. J., Agarwal, S., ... & Vidgen, E. (2000). Effect of soy protein foods on low-density lipoprotein oxidation and ex vivo sex hormone receptor activity-a controlled crossover trial. *Metabolism*, 49(4), 537-543.

Jiang, L., Wang, J., Li, Y., Wang, Z., Liang, J., Wang, R., ... & Zhang, M. (2014). Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. *Food Research International*, *62*, 595-601.

Joshi, M., Aldred, P., Panozzo, J. F., Kasapis, S., & Adhikari, B. (2014). Rheological and microstructural characteristics of lentil starch–lentil protein composite pastes and gels. *Food Hydrocolloids*, *35*, 226-237.

Kamtekar, S., J. Schiffer, H. Xiong, J. M. Babik, & M. H. Hecht. (1993). Protein design by binary patterning of polar and nonpolar amino acids. *Science, 262,* 1680–1685.

Kato, A., & Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-Protein Structure*, *624*(1), 13-20.

Kinsella, J. E., & Melachouris, N. (1976). Functional properties of proteins in foods: a survey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *7*(3), 219-280.

Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (Selaroides leptolepis) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, *102*(4), 1317-1327.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680-685.

Levy, R., Okun, Z., Davidovich-Pinhas, M., & Shpigelman, A. (2021). Utilization of high-pressure homogenization of potato protein isolate for the production of dairy-free yogurt-like fermented product. *Food Hydrocolloids*, *113*, 106442.

Li, C., Dou, Z., Ma, P., Wang, C., & Jiang, L. (2020). Effect of Homogenization at a Lower Pressure on Structural and Functional Properties of Soy Protein Isolate. *Journal of Oleo Science*, *69*(11), 1417-1426.

Liu, H. H., & Kuo, M. I. (2016). Ultra high pressure homogenization effect on the proteins in soy flour. *Food Hydrocolloids*, *52*, 741-748.

Liu, Y. F., Oey, I., Bremer, P., Carne, A., & Silcock, P. (2019). Modifying the functional properties of egg proteins using novel processing techniques: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *18*(4), 986-1002.

Liu, Z., Guo, Z., Wu, D., Fei, X., Ei-Seedi, H. R., & Wang, C. (2021). High-pressure homogenization influences the functional properties of protein from oyster (Crassostrea gigas). *LWT-Food Science and Technology*, *151*, 112107.

Luo, L., Cheng, L., Zhang, R., & Yang, Z. (2022). Impact of high-pressure homogenization on physico-chemical, structural, and rheological properties of quinoa protein isolates. *Food Structure*, *32*, 100265.

Ma, T., Wang, Q., & Wu, H. (2010). Optimization of extraction conditions for improving solubility of peanut protein concentrates by response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, *43*(9), 1450-1455.

Mak, A., L. B. Smillie, & G. Stewart. (1980). A comparison of the amino acid sequences of rabbit skeletal muscle and tropomyosins. *J. Biol. Chem. 255*, 3647–3655.

Manamperi, W. A., Wiesenborn, D. P., Chang, S. K., & Pryor, S. W. (2011). Effects of protein separation conditions on the functional and thermal properties of canola protein isolates. *Journal of Food Science*, *76*(3), 266-273.

Maresca, P., Ferrari, G., Júnior, B. R. D. C. L., Zanphorlin, L. M., Ribeiro, L. R., Murakami, M. T., & Cristianini, M. (2017). Effect of dynamic high pressure on functional and structural properties of bovine serum albumin. *Food Research International*, *99*, 748-754.

Mattila, P., Mäkinen, S., Eurola, M., Jalava, T., Pihlava, J. M., Hellström, J., & Pihlanto, A. (2018). Nutritional value of commercial protein-rich plant products. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(2), 108-115.

Melchior, S., Moretton, M., Calligaris, S., Manzocco, L., & Nicoli, M. C. (2022). High pressure homogenization shapes the techno-functionalities and digestibility of pea proteins. *Food and Bioproducts Processing*, *131*, 77-85.

Miller, S., Janin, J., Lesk, A. M., & Chothia, C. (1987). Interior and surface of monomeric proteins. *Journal of Molecular Biology*, *196*(3), 641-656.

Mirmoghtadaie, L., Aliabadi, S. S., & Hosseini, S. M. (2016). Recent approaches in physical modification of protein functionality. *Food Chemistry*, *199*, 619-627.

Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2006). Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Research International*, *39*(9), 945-963.

Nasrabadi, M. N., Doost, A. S., & Mezzenga, R. (2021). Modification approaches of plant-based proteins to improve their techno-functionality and use in food products. *Food Hydrocolloids*, 118, 106789.

Nasrabadi, M. N., Goli, S. A. H., Doost, A. S., Roman, B., Dewettinck, K., Stevens, C. V., & Van der Meeren, P. (2019). Plant based Pickering stabilization of emulsions using soluble flaxseed protein and mucilage nano-assemblies. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 563, 170-182.

Ogunwolu, S. O., Henshaw, F. O., Mock, H. P., Santros, A., & Awonorin, S. O. (2009). Functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew (Anacardium occidentale L.) nut. *Food Chemistry*, *115*(3), 852-858.

O'Kane, F. E., Happe, R. P., Vereijken, J. M., Gruppen, H., & van Boekel, M. A. (2004). Heat-induced gelation of pea legumin: Comparison with soybean glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(16), 5071-5078.

Onsaard, E. (2012). Sesame proteins. *International Food Research Journal*, 19(4), 1287-1295

Özcan, T., & Delikanli, B. (2011). Gıdaların tekstürel özelliklerinin geliştirilmesinde peynir altı suyu protein katkılarının fonksiyonel etkileri. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, *25*(2), 77-88.

Özel Demiralp, D., İğci, N., Peker, S., & Ayhan, B. (2014). Proteinlerin Genel Yapı ve Özellikleri. *Temel Proteomik Stratejiler* (pp.1-15). 1, Ankara:Ankara Üniversitesi Yayınevi.

Pace, C. N., Scholtz, J. M., & Grimsley, G. R. (2014). Forces stabilizing proteins. *FEBS Letters*, *588*(14), 2177-2184.

Pan, K.-M., M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, …& I. Mehlhorn. (1993). Conversion of α-helices into β-sheets features in the formation of the crappie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90*, 10962–10966.

Papiz, M. Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E. E., North, A. C. T., Findlay, J. B. C., Sivaprasadarao, R., Jones, T. A., Newcomer, M. E., & Kraulis, P. J. (1986). The structure of β-lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*, *324*(6095), 383-385.

Patrignani, F., & Lanciotti, R. (2016). Applications of high and ultra high pressure homogenization for food safety. *Frontiers in Microbiology*, *7*.

Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *26*(3), 716-723.

Poole, S., S. I. West, & C. L. Walters. (1984). Protein-protein interactions: Their importance in the foaming of heterogeneous protein systems. *J. Sci. Food Agric*. 35:701–711.

Poore, J., & Nemecek, T. (2018). Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science*, 360(6392), 987-992.

Raikos, V. (2010). Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. A review. *Food Hydrocolloids*, *24*(4), 259-265.

Rao, M. A., S. Damodaran, J. E. Kinsella, & H. J. Cooley. (1986). Flow properties of 7S and 11S soy protein fractions. *In Food Engineering and Process Applications*, M. Le Maguer & P. Jelen (Eds.), Elsevier Applied Science, New York, pp. 39–48.

Richter, C. K., Skulas-Ray, A. C., Champagne, C. M., & Kris-Etherton, P. M. (2015). Plant protein and animal proteins: do they differentially affect cardiovascular disease risk?. *Advances in Nutrition*, 6(6), 712-728.

Rivas R, N., Dench, J. E., & Caygill, J. C. (1981). Nitrogen extractability of sesame (Sesamum indicum L.) seed and the preparation of two protein isolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *32*(6), 565-571.

Robinson, H. W., & Hogden, C. G. (1940). The biuret reaction in the determination of serum proteins. 1. A study of the conditions necessary for the production of a stable color which bears a quantitative relationship to the protein concentration. *Journal of Biological Chemistry*, *135*, 707-725.

Şahin, S., & Elhussein, E. A. A. (2018). Assessment of sesame (Sesamum indicum L.) cake as a source of high-added value substances: from waste to health. *Phytochemistry Reviews*, *17*(4), 691-700.

Sarangapani, C., Patange, A., Bourke, P., Keener, K., & Cullen, P. J. (2018). Recent advances in the application of cold plasma technology in foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, *9*, 609-629.

Saricaoglu, F. T. (2020). Application of high-pressure homogenization (HPH) to modify functional, structural and rheological properties of lentil (Lens culinaris) proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, *144*, 760-769.

Saricaoglu, F. T., Gul, O., Besir, A., & Atalar, I. (2018). Effect of high pressure homogenization (HPH) on functional and rheological properties of hazelnut meal proteins obtained from hazelnut oil industry by-products. *Journal of Food Engineering*, *233*, 98-108.

Segat, A., Misra, N. N., Fabbro, A., Buchini, F., Lippe, G., Cullen, P. J., & Innocente, N. (2014). Effects of ozone processing on chemical, structural and functional properties of whey protein isolate. *Food Research International*, *66*, 365-372.

Shariffa, Y. N., Tan, T. B., Abas, F., Mirhosseini, H., Nehdi, I. A., & Tan, C. P. (2016). Producing a lycopene nanodispersion: The effects of emulsifiers. *Food and Bioproducts Processing*, *98*, 210-216.

Shen, X., Zhao, C., & Guo, M. (2017). Effects of high intensity ultrasound on acid-induced gelation properties of whey protein gel. *Ultrasonics Sonochemistry*, *39*, 810-815.

Song, X., Zhou, C., Fu, F., Chen, Z., & Wu, Q. (2013). Effect of high-pressure homogenization on particle size and film properties of soy protein isolate. *Industrial Crops and Products*, *43*, 538-544.

Speroni, F., Beaumal, V., de Lamballerie, M., Anton, M., Añón, M. C., & Puppo, M. C. (2009). Gelation of soybean proteins induced by sequential high-pressure and thermal treatments. *Food Hydrocolloids*, *23*(5), 1433-1442.

Valencia-Flores, D. C., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2013). Comparing the effects of ultra-high-pressure homogenization and conventional thermal treatments on the microbiological, physical, and chemical quality of almond beverages. *Journal of Food Science*, *78*(2), 199-205.

Van Beilen, J. B., & Li, Z. (2002). Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, *13*(4), 338-344.

Wang, N., Zhou, X., Wang, W., Wang, L., Jiang, L., Liu, T., & Yu, D. (2021). Effect of high intensity ultrasound on the structure and solubility of soy protein isolate-pectin complex. *Ultrasonics Sonochemistry*, *80*, 105808.

Wang, Y., Ghosh, S., & Nickerson, M. T. (2019). Effect of pH on the formation of electrostatic complexes between lentil protein isolate and a range of anionic polysaccharides, and their resulting emulsifying properties. *Food Chemistry*, *298*, 125023.

Wang, Y., Wang, Y., Li, K., Bai, Y., Li, B., & Xu, W. (2020). Effect of high intensity ultrasound on physicochemical, interfacial and gel properties of chickpea protein isolate. *LWT-Food Science and Technology*, *129*, 109563.

Wen, C., Zhang, J., Yao, H., Zhou, J., Duan, Y., Zhang, H., & Ma, H. (2019). Advances in renewable plant-derived protein source: The structure, physicochemical properties affected by ultrasonication. *Ultrasonics Sonochemistry*, 53, 83-98.

Wu, F., Shi, X., Zou, H., Zhang, T., Dong, X., Zhu, R., & Yu, C. (2019). Effects of high-pressure homogenization on physicochemical, rheological and emulsifying properties of myofibrillar protein. *Journal of Food Engineering*, *263*, 272-279.

Xu, S., & Damodaran, S. (1993). Comparative adsorption of native and denatured egg-white, human, and T4 phage lysozymes at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, *159*(1), 124-133.

Xu, Y., Wang, G., Wang, X., Yu, J., Wang, J., Zhang, Z., & Li, R. (2018). Effects of homogenization on the molecular flexibility and emulsifying properties of soy protein isolate. *Food Science and Biotechnology*, *27*(5), 1293-1299.

Yang, J., Liu, G., Zeng, H., & Chen, L. (2018). Effects of high pressure homogenization on faba bean protein aggregation in relation to solubility and interfacial properties. *Food Hydrocolloids*, *83*, 275-286.

Yavuz, M., & Özçelik, B. (2016). Bitkisel protein izolatlarının fonksiyonel özellikleri. *Akademik Gıda*, *14*(4), 424-430.

Yin, L. J., Chu, B. S., Kobayashi, I., & Nakajima, M. (2009). Performance of selected emulsifiers and their combinations in the preparation of β-carotene nanodispersions. *Food Hydrocolloids*, *23*(6), 1617-1622.

Yu, C., Wu, F., Cha, Y., Zou, H., Bao, J., Xu, R., & Du, M. (2018). Effects of high-pressure homogenization on functional properties and structure of mussel (Mytilus edulis) myofibrillar proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, *118*, 741-746.

Yu, Z. Y., Jiang, S. W., Cao, X. M., Jiang, S. T., & Pan, L. J. (2016). Effect of high pressure homogenization (HPH) on the physical properties of taro (Colocasia esculenta (L). Schott) pulp. *Journal of Food Engineering*, *177*, 1-8.

Yuan, B., Ren, J., Zhao, M., Luo, D., & Gu, L. (2012). Effects of limited enzymatic hydrolysis with pepsin and high-pressure homogenization on the functional properties of soybean protein isolate. *LWT-Food Science and Technology*, *46*(2), 453-459.

Zhang, A., Wang, L., Song, T., Yu, H., Wang, X., & Zhao, X. H. (2022). Effects of high pressure homogenization on the structural and emulsifying properties of a vegetable protein: Cyperus esculentus L. *LWT-Food Science and Technology*, *153*, 112542.

Zhang, L., Wang, L. J., Jiang, W., & Qian, J. Y. (2017). Effect of pulsed electric field on functional and structural properties of canola protein by pretreating seeds to elevate oil yield. *LWT-Food Science and Technology*, *84*, 73-81.

Zhu, Z., Zhu, W., Yi, J., Liu, N., Cao, Y., Lu, J., ... & McClements, D. J. (2018). Effects of sonication on the physicochemical and functional properties of walnut protein isolate. *Food Research International*, *106*, 853-861.