



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ÇEMEN OTU TOHUMUNDAN KLASİK VE ULTRASONİK
YÖNTEMLERLE PROTEİNLERİN EKSTRAKSİYONU, ELDE EDİLEN
PROTEİN İZOLATLARININ KARAKTERİZASYONU VE KAP KEK
ÜRETİMİNDE KULLANILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gamze Nur OLGUN

Danışman: Doç. Dr. Hilal İŞLEROĞLU

TOKAT- 2023

Her hakkı saklıdır.



Bu tez çalışması;

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje No: 2022/114)
tarafından maddi olarak desteklenmiştir.

ETİK SÖZLEŐME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Hilal İŞLEROĞLU danışmanlığında hazırlamış olduğum “Çemen Otu Tohumundan Klasik ve Ultrasonik Yöntemlerle Proteinlerin Ekstraksiyonu, Elde Edilen Protein İzolatlarının Karakterizasyonu ve Kap Kek Üretiminde Kullanılması” adlı Yüksek Lisans tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

29/08/2023

Gamze Nur OLGUN

Gamze Nur OLGUN tarafından hazırlanan “Çemen Otu Tohumundan Klasik ve Ultrasonik Yöntemlerle Proteinlerin Ekstraksiyonu, Elde Edilen Protein İzolatlarının Karakterizasyonu ve Kap Kek Üretiminde Kullanılması” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 29 AĞUSTOS 2023 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Doç. Dr. Hilal İşleroğlu
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye
Doç. Dr. Banu Koç
Gaziantep Üniversitesi

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Tokatlı
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

ONAY

Doç. Dr. Yusuf TEMÜR

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

31/08/2023

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile her zaman yoluma ışık tutan, tez sürecinde sabırla ve özenle benden yardımını ve ilgilerini esirgemeyen, beraber çalışmaktan ve öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyduğum değerli ve saygıdeğer danışmanım Doç. Dr. Hilal İŞLEROĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte yol gösterici tavrı ile desteklerini ve değerli zamanını esirgemeyen Arş. Gör. İzzet TÜRKER'e çok teşekkür ederim.

Tez sürecim boyunca büyük desteği ile yanımda olan canım ablam İremnur ÇOLAK'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Ayrıca canım annem, babam ve kız kardeşim Merve'ye her zaman yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Tezime mali yönden destek olan Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne (Proje No: 2022/114) teşekkürlerimi sunarım.

Gamze Nur OLGUN
29 Ağustos 2023

ÖZET

ÇEMEN OTU TOHUMUNDAN KLASİK VE ULTRASONİK YÖNTEMLERLE PROTEİNLERİN EKSTRAKSİYONU, ELDE EDİLEN PROTEİN İZOLATLARININ KARAKTERİZASYONU VE KAP KEK ÜRETİMİNDE KULLANILMASI

Olgun, Gamze Nur

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hilal İşleroğlu

Ağustos 2023, xi + 93 sayfa

Bu tez çalışmasında, çemen otu tohumunda bulunan proteinler klasik ekstraksiyon ve ultrasonik destekli ekstraksiyon (UDE) işlemleri ile farklı işlem koşullarında ekstrakte edilmiş ve en yüksek ekstraksiyon verimini sağlayan optimum koşullar belirlenmiştir. Klasik ekstraksiyon ve UDE işleminde tüm ekstraksiyon koşullarında elde edilen protein izolatlarının koagüle protein yüzdesi, su tutma kapasitesi, yağ tutma kapasitesi, köpük özellikleri (köpük kapasitesi ve köpük stabilitesi), emülsifikasyon özellikleri (emülsiyon aktivitesi, emülsiyon stabilitesi ve emülsiyon kapasitesi) ve çözünürlük özellikleri tespit edilmiştir. Optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen protein izolatlarının moleküler ağırlıkları, amino asit kompozisyonu, yapısal ve termal özellikleri belirlenmiştir. Ayrıca, karakterizasyonları sağlanan çemen otu tohumu protein izolatları kullanılarak kap kek üretimi gerçekleştirilmiştir.

Klasik ekstraksiyon işleminde pH ve katı-çözgen oranı, UDE işleminde sonikasyon genliği (%) ve katı-çözgen oranı bağımsız işlem değişkenleri olarak seçilmiştir. Klasik ekstraksiyon işleminde en yüksek verim (94.3 ± 0.3) pH'nın 11.47 ve katı-çözgen oranının 34.50 g/L olduğu, UDE işleminde ise en yüksek verim (98.8 ± 0.5) sonikasyon genliğinin 67.51 ve katı-çözgen oranının 43.83 g/L olduğu koşullarda elde edilmiştir. UDE işleminde elde edilen verimin klasik ekstraksiyona göre daha yüksek olduğu görülmüş, daha yüksek ekstraksiyon verimine 8 kat daha kısa işlem süresinde ulaşıldığı belirlenmiştir. Karakterizasyon sonuçlarına göre, UDE işlemi ile elde edilen protein izolatlarının emülsiyon aktivitesi haricindeki tüm özelliklerinin klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein izolatlarına göre daha yüksek olduğu bulgulanmıştır. UDE ve klasik ekstraksiyon işlemleri ile elde edilen protein izolatlarının moleküler ağırlıkları ve yapısal özelliklerinin birbirine oldukça benzer olduğu görülmüştür. Her iki protein izolatu için 22-175 kDa aralığında üç belirgin bant (46, 59 ve 80 kDa) elde edilmiştir. Protein ikincil yapıları Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) spektrumları kullanılarak belirlenmiş ve çemen otu tohumu protein izolatlarında β -tabaka yapılarının yüksek oranda mevcut olduğu belirlenmiştir. Protein izolatlarının termal özellikleri Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile ortaya konmuştur. Klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatları için denatürasyon sıcaklıkları sırası ile 119°C ve 135°C , denatürasyon entalpileri ise 28 mJ/g ve 53 mJ/g olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, çemen otu tohumu protein izolatının amino asit kompozisyonu belirlenmiş ve esansiyel amino asitlerce (317.97 g amino asit/kg protein izolatu) zengin olduğu bulgulanmıştır. Klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile elde edilen protein izolatları kullanılarak kap kek üretimi gerçekleştirilmiş ve keklerin renk özellikleri, nem, su aktivitesi, pişme verimi, yağın yoğunluk, sertlik, hacim, simetri ve üniformite indeksleri ile hamurların kıvam ve

yoğunluk değerleri tespit edilmiştir. Genel olarak çemen otu tohumu protein izolatu katkısının hamur ve kap keklerin özelliklerini olumsuz etkilemediği belirlenmiştir. Duyusal analiz sonuçlarına göre, %10 protein izolatu katkılı kap kek görünüş, kabuk rengi, tekstür, tat, aroma ve genel beğeni açısından diğer örneklerle üstünlük sağlamıştır.

ANAHTAR KELİMELEER: Çemen Otu Tohumu, Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon, Protein İzolatı, Koagüle Protein, Amino Asit Kompozisyonu, Kap Kek.



ABSTRACT

EXTRACTION OF PROTEINS FROM FENUGREEK SEEDS BY CLASSICAL AND ULTRASONIC METHODS, CHARACTERIZATION OF OBTAINED PROTEIN ISOLATES AND USAGE IN CUPCAKE PRODUCTION

Olgun, Gamze Nur

Master's Thesis, Food Engineering Division

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Hilal İşleroğlu

August 2023, xi + 93 pages

In this thesis, proteins from fenugreek seeds were extracted using both classical extraction and ultrasonic-assisted extraction (UAE) processes under different conditions to determine the optimal conditions that ensuring the highest extraction efficiency. The coagulated protein percentage, water-holding capacity, oil-holding capacity, foaming properties (foaming capacity and foam stability), emulsification properties (emulsion activity, emulsion stability, and emulsion capacity), and solubility properties of protein isolates obtained under all extraction conditions in classical extraction and UAE processes were determined. The molecular weights, amino acid compositions, structural, and thermal properties of protein isolates obtained under optimal extraction conditions were determined. Additionally, characterized protein isolates of fenugreek seeds were used for cupcake production.

The pH and solid-solvent ratio in the classical extraction process and the sonication amplitude (%) and solid-solvent ratio in the UAE process were chosen as independent process variables. The highest yield in the classical extraction process ($94.3 \pm 0.3\%$) was achieved at a pH of 11.47 and a solid-solvent ratio of 34.50 g/L, while the highest efficiency ($98.8 \pm 0.5\%$) was obtained at a sonication intensity of approximately 67.51% and a solid-solvent ratio of 43.83 g/L in the UAE process. The obtained yield in the UAE process was found to be higher compared to classical extraction, and it was determined that a higher extraction yield was achieved in 8 times shorter processing time. According to the characterization results, it was found that the properties of the protein isolates obtained by UAE, except for emulsion activity, were higher than those obtained by classical extraction. The molecular weights and structural properties of protein isolates obtained by UAE and classical extraction processes were found to be quite similar. For both protein isolates, three distinct bands (46, 59, and 80 kDa) were obtained in the range of 22-175 kDa. The protein's secondary structures were determined using Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectra, revealing a high presence of β -sheet structures in fenugreek seeds protein isolates. The thermal properties of protein isolates were determined using Differential Scanning Calorimetry (DSC). The denaturation temperatures for protein isolates obtained by classical extraction and UAE processes were calculated as $\sim 119^\circ\text{C}$ and 135°C , and the denaturation enthalpies were 28 mJ/g and 53 mJ/g, respectively. Additionally, the amino acid composition of the fenugreek seeds protein isolate was determined, and it was found to be rich in essential amino acids (317.97 g amino acids/kg protein isolate). The protein isolates obtained by classical extraction and UAE processes were used for cupcake production, and the color properties, moisture content, water activity, cooking yield, bulk density, hardness, volume, symmetry and uniformity indices values of the cakes, as well as the consistency and density values

of the dough, were determined. Overall, it was determined that the addition of fenugreek seeds protein isolate did not adversely affect the properties of the dough and cupcakes. According to the sensory analysis results, cupcakes with 10% protein isolate showed superiority in terms of appearance, crust color, texture, taste, aroma, and overall acceptance compared to other samples.

KEY WORDS: Fenugreek Seeds, Ultrasonic-Assisted Extraction, Protein Isolate, Coagulated Protein, Amino Acid Composition, Cupcake.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	v
ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Proteinlerin yapısı.....	3
2.2 Proteinlerin Fonksiyonel Özellikleri	7
2.3 Bitkisel Kaynaklı Proteinler	10
2.4 Alternatif Bir Bitkisel Protein Kaynağı Olarak Çemen Otu Tohumu	12
2.4.1 Çemen otu (<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.).....	12
2.4.2 Çemen otu tohumu proteinleri.....	15
2.5 Protein Ekstraksiyon Teknikleri	16
2.5.1 Klasik alkali ekstraksiyon.....	16
2.5.2 Ultrasonik destekli ekstraksiyon.....	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1 Materyal.....	22
3.2 Klasik Ekstraksiyon İşlemi.....	22
3.3 Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon İşlemi	23
3.4 Protein İzolatlarının Üretimi.....	24
3.5 Protein İzolatlarının Karakterizasyonu	25
3.5.1 Koagüle protein yüzdesinin belirlenmesi	25
3.5.2 Su ve yağ tutma kapasitelerinin belirlenmesi	25
3.5.3 Köpük özelliklerinin belirlenmesi	26
3.5.4 Emülsifikasyon özelliklerinin belirlenmesi	26
3.5.5 Çözünürlük özelliklerinin belirlenmesi	28
3.5.6 Moleküler ağırlığın belirlenmesi	29

3.5.7	Yapısal özelliklerin belirlenmesi	29
3.5.8	Termal özelliklerin belirlenmesi.....	30
3.5.9	Amino asit kompozisyonunun belirlenmesi	31
3.6	Çemen Otu Tohumu Protein İzolatı Katkılı Kap Kek Üretimi.....	31
3.6.1	Hamurda kıvam ve yoğunluk ölçümü	32
3.6.2	Hamur ve kap keklerin renk özelliklerinin belirlenmesi	32
3.6.3	Kap keklerin nem içeriği ve su aktivitesinin belirlenmesi	32
3.6.4	Pişme veriminin belirlenmesi	33
3.6.5	Yığın yoğunluğun belirlenmesi	33
3.6.6	Sertlik tayini	33
3.6.7	Hacim, simetri ve üniformite indeksinin belirlenmesi	33
3.6.8	Duyusal Analiz	34
3.7	İstatistiksel Analiz	34
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	36
4.1	Çemen Otu Tohumundan Proteinlerin Ekstraksiyonu.....	36
4.1.1	Klasik ekstraksiyon işlemi.....	36
4.1.2	Ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemi.....	39
4.2	Protein İzolatlarının Karakterizasyonu	43
4.2.1	Koagüle protein yüzdesi	43
4.2.2	Su ve yağ tutma kapasiteleri.....	44
4.2.3	Köpük özellikleri	46
4.2.4	Emülsifikasyon özellikleri.....	47
4.2.5	Çözünürlük özellikleri	52
4.2.6	Moleküler ağırlık	56
4.2.7	Yapısal özellikler.....	57
4.2.8	Amino asit kompozisyonu	60
4.2.9	Termal özellikler.....	62
4.3	Çemen Otu Tohumu Protein İzolatı Katkılı Kap Kek Üretimi.....	64
4.3.1	Hamurda kıvam ve yoğunluk	64
4.3.2	Hamur ve kap keklerin renk özellikleri	65
4.3.3	Kap keklerin nem içeriği ve su aktivitesi	67
4.3.4	Kap keklerde pişme verimi, yığın yoğunluk ve sertlik.....	68

4.3.5	Hacim, simetri ve üniformite indeksi	68
4.3.6	Duyusal analiz	70
5.	SONUÇ	72
6.	KAYNAKLAR	76
7.	ÖZGEÇMİŞ	88
EKLER		89



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α_i	Model katsayıları
β_0	Model katsayıları
C.V.	Varyasyon katsayısı
düz- R^2	Düzeltilmiş regresyon katsayısı
k	Kodlanmış faktör sayısı
p	Önemlilik derecesi
PRESS	Tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı
R^2	Regresyon katsayısı

Kısaltmalar

Açıklama

ANOVA	Varyans analizi
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi
HPLC-FLD	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-flüoresans dedektör
SD	Serbestlik derecesi
UDE	Ultrasonik destekli ekstraksiyon
UFLC	Ultra hızlı sıvı kromatografisi
UV	Ultraviyole dedektör

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Amino asitlerin genel yapısı	4
Şekil 2.2. Proteinlerin üç boyutlu yapıları	6
Şekil 2.3. Bitkisel protein kaynakları.....	12
Şekil 2.4. (a) Çemen otu ve (b) çemen otu tohumu	13
Şekil 3.1. Bradford metodunda kullanılan standart kurve	28
Şekil 3.2. Protein izolatlarına ait Amid I bantları (a) Klasik ekstraksiyon (b) UDE işlemi ile elde edilen protein izolatı	30
Şekil 3.3. Hacim, simetri ve üniformite indekslerinin ölçümünde kullanılan şablon .	34
Şekil 4.1. (a) Klasik ekstraksiyon işlemi için yanıt yüzey grafiği, (b) tahminlenen ve deneysel veriler arasındaki ilişki	39
Şekil 4.2. (a) Ultrasonik destekli ekstraksiyon için yanıt yüzey grafiği (b) tahminlenen ve deneysel veriler arasındaki ilişki	43
Şekil 4.3. Klasik ekstraksiyon (KE) ve UDE işlemlerinde optimum koşullarda elde edilen protein izolatlarının çözünürlükleri	56
Şekil 4.4. Klasik ekstraksiyon (KE) ve UDE işlemleri ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatı için SDS-PAGE jel görüntüsü	57
Şekil 4.5. Çemen otu tohumu protein izolatlarına ait FT-IR spektrumu	59
Şekil 4.6. DSC termogramları (a) Klasik ekstraksiyon işlemi ve (b) UDE işlemi ile elde edilen protein izolatı.....	63

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin gıda uygulamaları ile ilişkilendirilmesi.....	8
Çizelge 2.2. Taze çemen otu ve çemen otu tohumlarının bileşimi	14
Çizelge 2.3. Klasik alkali ekstraksiyon yöntemi kullanılarak protein ekstraksiyonu gerçekleştirilen çalışmalar	18
Çizelge 3.1. Klasik ekstraksiyon işlemi deneme planı	23
Çizelge 3.2. Ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemi deneme planı	24
Çizelge 3.3. Kontrol grubu kap kek formülasyonu.....	31
Çizelge 4.1. Klasik ekstraksiyon işleminde protein ekstraksiyon verimleri.....	37
Çizelge 4.2. Klasik ekstraksiyon işlemi için oluşturulan ANOVA tablosu ve istatistiksel parametreler.....	38
Çizelge 4.3. Ultrasonik destekli ekstraksiyon işleminde protein ekstraksiyon verimleri.....	41
Çizelge 4.4. Ultrasonik destekli ekstraksiyonda için oluşturulan ANOVA tablosu ve istatistiksel parametreler.....	42
Çizelge 4.5. Klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein izolatlarının karakterizasyonu.....	50
Çizelge 4.6. UDE işlemi ile elde edilen protein izolatlarının karakterizasyonu.....	51
Çizelge 4.7. Klasik ekstraksiyon işleminde elde edilen protein izolatlarının çözünürlükleri (g/L).....	54
Çizelge 4.8. UDE işleminde elde edilen protein izolatlarının çözünürlükleri (g/L).....	55
Çizelge 4.9. Protein ikincil yapı fraksiyonlarının yüzde (%) oranları	60
Çizelge 4.10. Çemen otu tohumu protein izolatının amino asit kompozisyonu	61
Çizelge 4.11. Çemen otu tohumunda bulunan amino asitlerin sınıflandırılması.....	62
Çizelge 4.12. Hamur, kek iç ve kabuk kısmı için L^* , a^* , b^* değerleri.....	66
Çizelge 4.13. Kap kek iç ve kabuk kısmı için toplam renk değişimi (ΔE) ve esmerleşme indeksi (BI) değerleri.....	67
Çizelge 4.14. Kap keklerin nem içerikleri ve su aktivitesi (a_w) değerleri.....	67
Çizelge 4.15. Hamur yoğunluğu ve Bostwick değerleri.....	65
Çizelge 4.16. Kap keklerin hacim, simetri ve üniformite indeksi değerleri	70

Çizelge 4.17. Kap keklerin pişme verimi, yığın yoğunluk ve sertlik değerleri	68
Çizelge 4.18. Çemen otu tohumu protein izolatu katkılı kap kek duyusal analiz sonuçları	71



1. GİRİŞ

Gün geçtikçe artan dünya nüfusunun 2050 yılına kadar dokuz milyardan fazla olması beklenmektedir (Sim ve ark., 2021). Artan nüfusla birlikte artan beslenme ve gıdaya olan talep yeni kaynakların araştırılması zorunluluğunu gerektirmektedir. Bitkisel kaynaklar besleyici özellikleri, sağlık yararları ve çeşitlilikleriyle artan gıda talebini karşılamada özellikle son yıllarda ön plana çıkmaktadır. Ayrıca, günümüzde tüketiciler yaşam kalitelerini artırmak için sağlıklı ve sürdürülebilir diyetleri tercih etmekte, et ve et ürünleri tüketimlerini azaltmaya çalışmaktadır. Bu nedenle, bitki bazlı ürünler ve et alternatifleri insan beslenmesinin ve gıda endüstrisinin geleceği için büyük bir potansiyele sahiptir (Langyan ve ark., 2022). Karbonhidratlar, proteinler ve yağlar bitkilerde bulunan en önemli birincil metabolitlerdir ve bu birincil metabolitler arasında yer alan proteinler tüm yaşamın temel taşıdır. Proteinler, bir veya daha fazla amino asit zincirinin peptit bağları ile oluşturduğu yapı şeklinde tanımlanabilir. Amino asit kompozisyonları ve moleküler boyutlarına bağlı olarak farklı türde yapısal ve işlevsel özelliklere sahiptirler (Arif ve Pauls, 2018). İnsan beslenmesinde protein gereksinimini karşılamak için hayvansal proteinler en iyi seçenek olarak kabul edilse de et tüketimine bağlı hastalıklar ve hayvansal ürünlerin sağlık açısından riskli yönleri, insanları alternatif protein kaynakları arayışına yönlendirmiştir. Bitki bazlı proteinler, düşük maliyetleri, bol miktarda bulunmaları ve beslenme açısından gerekli olan yeterli miktarda esansiyel amino asit içerikleri ile hayvansal proteinlere alternatif olarak kullanılabilirler (Langyan ve ark., 2022).

Buy otu olarak da bilinen çemen otu, baklagiller familyasına ait olan tek yıllık otsu bir bitkidir ve çemen otu tohumları bitkinin en değerli kısımları olarak kabul edilir. Çemen otu tohumu birçok ülkede baharat olarak kullanılmaktadır. Buna karşın, çemen otu tohumunda yağ, protein ve diyet lifi bol miktarda bulunmaktadır (Srinivasan, 2006; Daştan, 2022). Çemen otu tohumlarında %15-35 düzeylerinde protein bulunduğu bildirilmiştir. Ancak, literatürde çemen otu tohumu proteinlerinin değerlendirilmesine dair az sayıda çalışma bulunmaktadır (Feyzi ve ark., 2015). Çemen otu tohumlarının sahip olduğu protein içeriği sebebiyle yapısındaki proteinlerin yüksek verimde ekstraksiyonu, izolasyonu ve karakterizasyonu ile alternatif bir protein kaynağı olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Ekstraksiyon işlemi bitkisel materyallerde bulunan proteinler gibi biyoaktif bileşenlerin elde edilmesinde kullanılan bir tekniktir. Bitki materyallerinden proteinlerin ekstraksiyonunda kullanılacak olan yöntem protein verimi ve protein fonksiyonelliği açısından önem taşımaktadır. Protein ekstraksiyonunda genel olarak klasik alkali ekstraksiyon işlemi kullanılmakta, ancak klasik ekstraksiyonda işlem uzun zaman alabilmekte ve fazla miktarda çözgen kullanımına ihtiyaç duyulabilmektedir. Klasik ekstraksiyon işleminin dezavantajlarının önüne geçilebilmesi için ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemi yenilikçi bir yöntem olarak protein ekstraksiyonunda sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Qiaoyun ve ark., 2017). Ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemi ile geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine göre daha yüksek ekstraksiyon verimine, daha düşük ekstraksiyon süresi ve sıcaklıklarında ulaşılabilir (Vilkhu ve ark., 2010). Ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemi ile proteinlerin ekstraksiyonunda yüksek verim elde edilebilmesinin yanında, düşük sıcaklıkların kullanılabilmesi sayesinde ekstrakte edilen proteinlerin denatürasyonu azaltılabilmekte ve proteinlerin fonksiyonel özellikleri iyileştirilebilmektedir (Kumar ve ark., 2021).

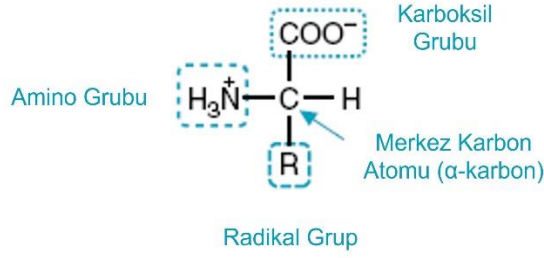
Bu tez çalışmasında, çemen otu tohumunda bulunan proteinler klasik ekstraksiyon ve ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemleri ile ekstrakte edilmiş ve en yüksek protein ekstraksiyon veriminin sağlandığı işlem koşulları belirlenmiştir. İki farklı ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein ekstraktlarından izoelektrik noktada çöktürme yöntemi ile çemen otu tohumu protein izolatları elde edilmiştir. Elde edilen protein izolatlarının fonksiyonel, yapısal ve termal özellikleri ile amino asit kompozisyonları belirlenerek karakterizasyonları sağlanmıştır. Ayrıca, çemen otu tohumu protein izolatu katkılı kap kek üretimi gerçekleştirilerek keklerin bazı kalite özelliklerindeki değişim incelenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Proteinlerin yapısı

Proteinler tüm canlılar için önemli azotlu bileşiklerdir. İnsan vücudunda temel yapıtaşı olarak bilinen proteinler karmaşık yapıya sahip, hayati fonksiyonların düzenlenmesinde ve bu fonksiyonların devamlılığının sağlanmasında görevli maddelerdir (Saldamlı ve Temiz, 2017). Bitkilerde ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan proteinler, tüm hücrelerin protoplazmasının temel bileşeni olup yaşam için gereklidirler (Morris ve ark., 1992). Proteinler en temel tanımları ile 20 amino asidin birbirine kovalent bağlar ile bağlanmasıyla oluşmuş polipeptit yapılardır. Proteinlerde, diğer biyolojik olarak aktif bileşiklerden daha büyük bir kimyasal bileşim çeşitliliği vardır. Çeşitli hayvan ve bitki hücrelerindeki proteinler, bu dokulara karakteristik özelliklerini vermektedir (Belitz ve ark., 2009). Proteinlerin yapısında bulunan amino asitlerin 8 tanesi esansiyel amino asittir. Esansiyel amino asitler vücut tarafından sentezlenemezler ve bu nedenle vücudun metabolik ve fizyolojik faaliyetlerinde görevli olan protein sentezinin gerçekleştirilebilmesi için bu amino asitlerin dışardan alınması gerekmektedir. Esansiyel amino asitler arjinin, fenilalanin, histidin, izolösin, lizin, lösin, triptofan ve valindir. Arjinin ve histidin ise çocuklar için elzem olan ve büyüme çağında üretilmeyen esansiyel amino asitlerdir (Litwack, 2018).

Proteinleri oluşturan amino asitler, merkezde bulunan karbon atomuna bağlı bir hidrojen atomu, karboksil grubu, amino grubu ve radikal grup olmak üzere dört farklı gruptan meydana gelen yapılardır. Yapıda bulunan radikal grup proteinlere birbirinden farklı özellikler kazandırmaktadır. Proteinlerin oluşumu amino asitlerin sayısı, diziliş ve oranları ile doğrudan ilişkili olduğundan sonsuz sayıda farklı protein yapısı mümkün olmaktadır (Berg ve ark., 2015). Amino asitlerin genel yapısı Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



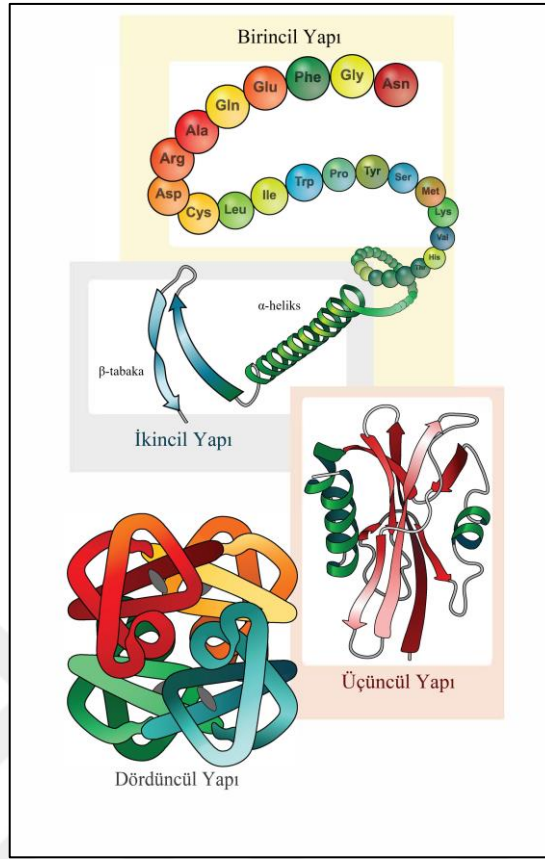
Şekil 2.1. Amino asitlerin genel yapısı

Proteinler tüm biyolojik organizmalarda bulunan, karbon, hidrojen, azot, oksijen ve sülfür elementlerini içeren makro moleküllerdir. Tüm proteinler amino asit polimeridir. Proteinler fiziksel olarak sınıflandırıldıklarında 1-100 nm arasında boyutlara sahip olan nanopartiküller olarak tanımlanabilirler. Proteinler biyolojik aktivitelerini gösterebilmeleri için bir veya daha fazla katlanarak spesifik konformasyonlar oluştururlar. Bu konformasyonel yapıların oluşması hidrojen bağları, iyonik interaksyonlar, van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik bağlar ile gerçekleşmektedir. Moleküler düzeyde proteinlerin fonksiyonlarının anlaşılabilmesi için üç boyutlu yapılarının tanımlanması gereklidir (Kannan ve ark., 2012).

Proteinlerde ilk incelenen yapı birincil (primer) yapıdır. Bir proteinin birincil yapısı polipeptit zincirinin spesifik bileşimi ile gösterilir. Amino asitler peptit bağları ile birleşerek polipeptit zincirinin temelini oluştururlar. Her proteinin farklı amino asit dizilimine sahip benzersiz birer polipeptit zinciri mevcuttur. Bir zincirde doğrusal olarak düzenlenmiş amino asitler, proteinlerin birincil yapısını göstermektedir. Proteinin birincil yapısı, proteinin üç boyutlu şeklinin yani üçüncül (tersiyer) yapısının tespit edilmesinde büyük önem taşımaktadır. Proteinlerin ikincil (sekonder) yapıları olan α -heliks ve β -tabaka, polipeptit omurgasında bulunan amino asit kalıntılarının interaksyonları sonucunda üç boyutlu protein yapısının oluşmasını sağlamaktadır. α -heliks, proteinlerin ikincil yapılarında sıklıkla görülen, N-H grubunun amino asitlerin C=O grubuna bir hidrojen bağı vermesi ile oluşan sarmal bir yapıdır. α -heliks yapısında bulunan amino asitler soldan sağa dönen bir yapı oluşturur ve heliks yapısında bulunan her amino asit 100° 'lik bir dönüş yapar. Amino asitler bu sarmal yapının ekseninden 0.15 nm ötelenmiş pozisyonda bulunmaktadır. β -tabaka yapısı proteinlerde bulunan bir diğer ikincil yapıdır ve bu yapılar beş veya daha fazla hidrojen bağının yan yana sıralanması ile meydana gelen

katlanmış bir levha görünümüne sahip zincirlerdir. β -tabaka yapılarında polipeptit zincirleri birbirlerine paralel veya paralel olmayan konumda bulunabilmektedirler (Hames ve Hooper, 2006; Kannan ve ark., 2012). İkincil yapıya ek olarak, proteinlerde ikincil yapıya bitişik olan ve kompakt yapıda üç boyutlu yapılara sahip olan süper ikincil yapılar görülebilmektedir. Süper ikincil yapılar proteinin katlanmasında tetikleyici olarak görev alabilmektedirler. β -ribbon, omega halka, çinko parmak (zinc finger), heliks-ilmek-heliks (helix-loop-helix) ve Yunan anahtar motifi (Greek key) yapıları süper sekonder yapılara örnek olarak gösterilebilir (Chiang ve ark., 2007).

Üçüncül (tersiyer) yapı, esas olarak ikincil yapının katlanması ve üç boyutlu bir yapının ortaya çıkması sonucunda gözlenmektedir. Bir proteinin katlanması, yani üçüncül yapının oluşabilmesi bazı fiziksel ve kimyasal faktörlerin etkisi ile gerçekleşebilmektedir. İyonik interaksiyonlar, disülfid bağları, hidrojen bağları ve hidrofobik interaksiyonlar üçüncül yapının stabil olarak kalmasını sağlar (Nelson ve Cox, 2005). Proteinlerde son olarak dördüncül (kuarterner) yapılar görülmektedir. Birçok alt birimin birleşmesi ile proteinlerde dördüncül yapı oluşmaktadır. Hemoglobin ve DNA polimeraz enzimi dördüncül yapının gözlendiği karakteristik proteinlerdir (Berg ve ark., 2002). Ayrıca, protein-protein interaksiyonları da dördüncül yapı başlığı altında incelenmektedir. Proteinlerin temel yapılarının, birincil ve ikincil yapı elementlerinin bilinmesi, bir proteinin bütün yapısının tespiti ve anlaşılabilmesi için büyük önem taşımaktadır. Yapının ortaya konması ile proteinin fonksiyonelliği belirlenebilir. Amino asitlerin özellikleri, temel yapısı ve yapıda etkili olan kuvvetlerin bilinmesi, peptitlerin ve proteinlerin yapılarının açığa kavuşturulmasını sağlayabilecektir. Proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Proteinlerin üç boyutlu yapıları (Kannan ve ark., 2012)

Proteinler kimyasal reaksiyonlarıyla da karakterize edilebilir. Çoğu protein suda, alkolde, seyreltik alkali ortamda veya çeşitli konsantrasyonlarda tuz çözeltilerinde çözünür. Proteinler, birincil polipeptit zincirindeki amino asitlerin dizisi ve her bir amino asidin alfa karbonuna bağlı radikal grupların stereo konfigürasyonu tarafından belirlenen karakteristik sarmal yapıya sahiptir (Belitz ve ark., 2009). Yapılarına göre, basit veya konjuge (karmaşık) olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Basit proteinler hidrolize uğradığında amino asitleri ve nadiren karbonhidrat bileşiklerini verirler. Bu proteinlere örnek olarak albüminler, globülinler, glutelinler, albuminoidler, histonlar ve protaminler verilebilir. Konjuge proteinler, moleküle bağlı protein olmayan kimyasal (prostetik) gruplara sahiptir. Bunlar vücuttaki bazı protein olmayan materyallerle birleştirilmiş basit proteinlerdir. Prostetik gruplarla konjugasyon, proteinlerin çeşitliliğini daha da artıran çok işlevli proteinler üretir. Konjuge proteinler, fosfoproteinler, glikoproteinler, lipoproteinler, metaloproteinler ve nükleoproteinler gibi molekülün amino asit olmayan bileşenine göre kategorize edilir (Nadathur ve ark, 2017). Proteinler ayrıca şekillerine göre fibröz veya küresel olarak sınıflandırılır. Fibröz proteinler, çubuk şeklinde, lifli veya

iplik benzeri olan uzatılmış polipeptit zincirlerinden oluşur. Küresel proteinler, ikincil yapıları oluşmuş ve helezonlaşmış proteinlerin yumak şeklinde kendi üzerinde katlanmaları ile meydana gelmektedirler (Lakemond ve Vereijken, 2003). Proteinler, hem apolar (hidrofobik) amino asitlere, hem de dışa doğru açıkta kalan polar (hidrofilik) yan zincir amino asit kalıntılarına sahiptir (Aryee ve ark., 2018).

2.2 Proteinlerin Fonksiyonel Özellikleri

İnsan vücudu tarafından sindirilebilen ve besleyici özelliği olan, toksik olmayan, gıda uygulamalarında kullanılabilir işlevlere sahip ve sürdürülebilir bir şekilde üretilen proteinler gıda proteinleri olarak kabul edilir. Gıda proteinleri, vücut ihtiyacını (insan beslenmesi) ve gıda sistemlerinin oluşturulmasındaki gereksinimleri (gıda fonksiyonellikleri) karşılar (Belitz ve ark., 2009; Nadathur ve ark., 2017). Proteinler, yaşam için temel işlevleri ve birçok gıda sistemine sağladıkları özellikler nedeniyle önemli biyomoleküllerdir (Li-Chan ve Lacroix, 2018). Proteinler fonksiyonel özellikleri açısından incelendiklerinde gıda işlemede ve gıda formülasyonlarında oldukça önemli bir role sahiptir. Proteinlerin fonksiyonel özellikleri gıdaların üretim, depolama veya tüketimi sırasında protein davranışını etkileyen fiziksel ve kimyasal özelliklerdir (Yavuz ve Özçelik, 2016). Köpük oluşturma, emülsifikasyon özelliği, çözünürlük, su ve yağ tutma kapasitesi gibi özellikler gıdaların işlenmesi sırasında önem taşıyan fonksiyonel özelliklerdir. Farklı gıda uygulamalarında proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin etkisi Çizelge 2.1’de sınıflandırılmıştır. Fonksiyonel özellikler temel olarak hidrasyon özellikleri, protein yapısı ve reolojik özellikler ile ilgili özellikler ve yüzey özellikleri olmak üzere üç grupta sınıflandırılmıştır (Kızılalp ve Dirim, 2019). Proteinlerin amino asit bileşimi, yüzey hidrofobikliği ile protein ekstraksiyonu ve kurutma gibi temel işlemlerin özellikleri proteinlerin fonksiyonel özellikleri üzerinde etki göstermektedir (Tulbek ve ark., 2017).

Çizelge 2.1. Proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin gıda uygulamaları ile ilişkilendirilmesi (Kinsella, 1987)

Fonksiyonel Özellik	Etki
Organoleptik ve kinestetik özellikler	Renk, tat, koku, tekstür, ağız hissi, yumuşaklık, kumluluk, bulanıklık
Hidrasyon/su tutma kapasitesi	Çözünürlük, dağılabilirlik, ıslanabilirlik, su absorpsiyonu, şişme kapasitesi, kıvamlaştırma, jelleşme, su tutma kapasitesi, sineresis, viskozite, hamur oluşturma kapasitesi
Yüzey özellikleri	Emülsifiye etme, köpük oluşturma, aerasyon, protein/yağ filmi oluşturma, yağ tutma, aroma bağlama, stabilize etme
Yapısal, tekstürel ve reolojik özellikler	Elastikiyet, çiğnenebilirlik, viskozite, çapraz bağlanma, topaklanma, jelleşme

Proteinlerin hidrasyon özellikleri çözünürlük, su tutma kapasitesi ve yağ tutma kapasitesi ile ilişkilendirilmektedir. Gıdaların tekstürel özelliklerine etki edebilmesi için proteinlerin çözünebilir olması gerekmektedir. Bitkisel proteinlerin çözünürlüklerinin artırılmasında enzimatik ve kimyasal reaksiyonlar kullanılabilmektedir (Yavuz ve Özçelik, 2016). Proteinlerin su tutma kapasitesini belirleyen faktörler amino asit bileşimi, üç boyutlu yapı ve yüzey hidrofobisite/polaritesidir. Ayrıca gıda işleme metotları da proteinlerin üç boyutlu yapısı ve hidrofobisitesi üzerinde önemli etkiye sahiptir (Barbut, 1999). Su tutma kapasitesi çorba, hamur ve fırıncılık ürünleri gibi viskozitesi yüksek gıda maddeleri için kritik bir fonksiyonel özelliktir. Bu ürünlerde proteinlerin çözünmeden suyu tutmaları ve bu sırada viskoziteyi arttırıp kıvam ve yapı kazandırmaları gerekir (Seena ve Sridhar, 2005). Proteinlerin yağ ile etkileşimi, gıdaların lezzet ve yapısını belirlemesi nedeniyle gıda sistemlerinde oldukça önemlidir (Barbut, 1999). Gıda emülsiyonları termodinamik açıdan stabil olmayan su-yağ karışımlarıdır. Emülsiyonun oluşması ve stabilitesi mayonez gibi gıda sistemlerinde çok önemlidir. Proteinler yüklü-yüksüz, polar-apolar aminoasitler içerebilmektedir. Bu aminoasitler proteinlere, hidrofilik ve hidrofobik özellikleri bir arada bulunduran yüzey aktif madde niteliği kazandırmaktadır. Bu sayede proteinler gıda sistemlerinde hem yağ hem de su fazı ile etkileşime girebilmektedir. Proteinlerin stabilize ettiği emülsiyonları pH, iyonik kuvvet, sıcaklık, düşük molekül ağırlığa sahip yüzey aktif maddelerin varlığı, şekerler, yağ fazı ve protein tipi gibi

faktörler de etkilemektedir (Saldamlı ve Temiz, 2017). Çözünmez ve yüksek düzeyde apolar nitelik gösteren proteinlerin büyük miktarda yağ bağlayabildikleri bilinmektedir. Küçük partikül boyutlu, düşük yoğunluklu proteinler yüksek yoğunluklu proteinlerden daha fazla yağ tutarlar (Cheftel ve ark., 1985).

Protein yapısı ve reoloji ile ilgili özelliklerden en önemlisi jelleşmedir. Jel, sıvı-katı arasında yer alan bir fazdır. Protein jelleri, protein zincirlerinin kısmi etkileşimi sonucunda suyun hapsedildiği üç boyutlu bir ağ yapısıdır. Proteinlerin jelleşme özellikleri, puding, jöle, birçok tatlı ve et ürününde (salam, sosis gibi) arzu edilen ve gıdaların hazırlanmasında önem taşıyan özellikleridir (Kinsella, 1979).

Proteinlerin yüzey özellikleri, emülsifikasyon ve köpürme özellikleri ile ilişkilendirilmektedir. Proteinlerin emülsifikasyon özelliklerinin tanımlanmasında emülsiyon aktivitesi ve emülsiyon stabilitesi kavramları kullanılmaktadır. Bu parametrelerden emülsiyon aktivitesi proteinde emülsifiye olabilen yağ miktarını gösterir. Emülsiyon stabilitesi ise emülsiyonun belli bir zaman aralığında yapısının bozulmasına karşı gösterdiği dirençtir (Boye ve ark., 2010). Proteinlerin köpük oluşturma özellikleri incelenirken köpük kapasitesi ve köpük stabilitesi kavramları açığa çıkmıştır. Proteinler köpük oluşumunda sıvı faz ile hava kabarcıkları ara yüzeyinde konumlanmaktadır. Ara yüzeyde bulunan protein fraksiyonları birbiri üzerine katlanarak hava yüzeyine apolar kısımları yerleşir. Hava kabarcığı yüzeyinde bulunan kısmi denatürasyona uğramış proteinler bir tabaka oluşturarak hava kabarcıklarını hapseder ve bu hava kabarcıkları birleşemeyerek köpüğün korunması sağlanır (Krause ve ark., 2002).

Proteinlerin fonksiyonel özellikleri çorbalar, içecekler, çırpılmış kremler, ekstrüde edilmiş ve fırınlanmış ürünlerde etki göstermektedir (Boye ve ark, 2010; Foegeding ve Davis, 2011; Lam ve Nickerson, 2013). Proteinlerin fonksiyonel özellikleri, protein katkılı ürünlerde lezzet, doku ve tat gibi duyuşal özellikleri etkilediğinden ürünün tüketici tarafından kabul edilebilirliğine katkı sağlamaktadır. Protein fonksiyonelliği hem içsel (fizikokimyasal özellikler, protein yapısı, konformasyon, amino asit bileşimi, hidrofobik ve/veya hidrofilik özellik) hem de dışsal faktörlerden (pH, sıcaklık, süre gibi ekstraksiyon koşulları, diğer gıda bileşenlerinin etkisi ve etkileşimi) etkilenir (Aryee ve ark., 2018).

2.3 Bitkisel Kaynaklı Proteinler

Hayvansal kaynaklı proteinlerin bitkisel kaynaklı proteinlere göre en önemli avantajı, elzem amino asitlerin tümünü içermeleri ve sindirilebilirliklerinin daha yüksek olmasıdır. Buna karşın bitkisel kaynaklı proteinler, hayvansal proteinler gibi tüketildiklerinde kolesterol ve kalp-damar hastalıkları riskini artırmamaktadır. Ayrıca, hayvansal ürünlerin maliyeti ve tüketici bilincinin artışı nedeniyle sürdürülebilirlik kavramı kapsamında bitkisel kaynaklı proteinler insan beslenmesinde her geçen gün önem kazanmaktadır (Nielsen ve ark., 2018; Langyan ve ark., 2022). Hayvansal proteinler insan beslenmesinde protein ihtiyacını gidermeye yönelik en önemli kaynaklar olarak kabul edilmelerine karşın, et tüketimi sonucunda meydana gelebilen obezite, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve kolesterol gibi rahatsızlıklar nedeniyle alternatif protein kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır (Taşçı, 2019). Bitkisel proteinler bu ihtiyacı gidermeye yönelik önemli kaynaklardır ve düşük maliyetleri, bol miktarda temin edilebilmeleri ve insan sağlığına zararlı olmamaları gibi nedenlerle günümüzde sıklıkla tercih edilmektedir. Marsh ve ark. (2012), hayvansal protein kaynakları yerine bitkisel proteinlerin tercih edildiği diyet sonucunda diyabet hastası tüketicilerin böbrek hastalığına yakalanma olasılıklarının azaldığını bildirmişlerdir. Ek olarak, bitkisel proteinler vejetaryen/vegan tüketici gruplarının odak noktasında bulunmaktadır (Langyan ve ark., 2022).

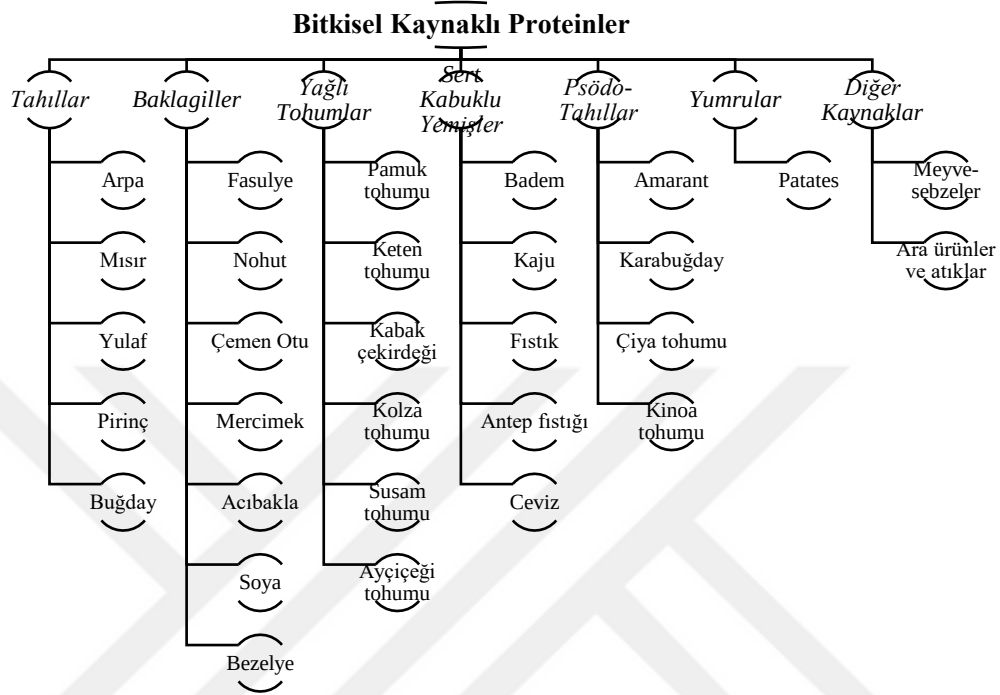
Bitkisel kaynaklı proteinlerin fizikokimyasal özellikleri, yapısal özellikleri, amino asit bileşimi ve fonksiyonel özellikleri gıda işleme endüstrisinde büyük ilgi görmektedir (Kumar ve ark., 2022). Beslenme açısından bakıldığında bitkisel kaynaklı proteinler, hayvansal kaynaklı proteinlere göre nispeten daha düşük besin değerine sahiptir (Jiménez-Munoz ve ark., 2021). Bitkisel kaynaklı proteinler, vücut bakımında kritik bir rol oynayan bir veya daha fazla esansiyel amino asit bakımından yetersizdir. Örneğin, baklagil proteinleri yüksek seviyelerde lizin içerir. Ancak, genellikle kükürt içeren amino asitlerce (metiyonin ve triptofan) fakirdir. Aksine, tahıl proteinleri daha yüksek seviyelerde kükürt içeren amino asitlere ve sınırlı lizin içeriğine sahiptir. Bu nedenle, proteinlerin tamamlayıcı esansiyel amino asit profilleri ile doğru kombinasyonu, eksiksiz ve iyi dengelenmiş bir amino asit bileşimi sağlayabilir (Monnet ve ark., 2019). Hayvansal proteinlerin gıdaya tekstürel özelliklerini ve duyuşal niteliklerini veren jelleşme, emülsifikasyon ve köpürme gibi teknolojik işlevselliğinin bitki bazlı proteinden daha

üstün olduğu düşünülmektedir (Kim ve ark., 2020). Buna karşın bitkisel kaynaklı proteinlerin sayısının artırılması ile farklı fonksiyonel özelliklere sahip ürünler elde edilebileceğinden gıda endüstrisinde bitkisel kaynaklı proteinlerin kullanımının yaygınlaşacağı düşünülmektedir.

Bitkisel kaynaklı proteinler tahıllar, baklagiller, yağlı tohumlar, sert kabuklu yemişler, psödo-tahıllar, yumrular, meyve ve sebzelerden elde edilebilmektedir (Iqbal ve ark., 2006; Muzquiz ve ark., 2012; Sun-Waterhouse ve ark., 2014; Lonnie ve ark., 2020). Bitkisel kaynaklı proteinlerin sınıflandırılması Şekil 2.3'te gösterilmiştir. Tahıllar yüksek nişasta ve lif içerikleri nedeniyle önemli bir gıda grubudur. Diğer yandan, tahılların önemli oranda protein içerdikleri de çeşitli çalışmalar ile ortaya konmuştur. Buğdayın %8-15, yulafın %10-17, mısırın ise %9-12 oranında protein içerdiği bildirilmiştir (Wrigley, 1996; Anderson ve Lamsal, 2011; Sterna ve ark., 2016). Yağlı tohumlar genellikle yüksek yağ içerikleri nedeniyle gıda endüstrisinde yağ üretiminde kullanılırlar. Ancak günümüzde önemli birer bitkisel protein kaynağı olarak dikkat çekmektedirler. Yağlı tohumların ~%15 oranında protein içerdikleri bilinmektedir (Kotecka-Majchrzak ve ark., 2020). Kabuklu yemişlerden ise badem, ceviz, kaju, fıstık ve Antep fıstığı önemli bitkisel protein kaynakları olarak bildirilmiştir (Langyan ve ark., 2022). Yumru türü bir bitki olan patatesin tahıllardan ve yağlı tohumlardan daha düşük oranda protein içerdiği bilinmesine karşın (~150 g olan orta boy bir patates için 4 g protein), patates proteininde bulunan elzem amino asitler patates proteinin ticari değerini ve beslenme açısından önemini artırmaktadır (Beals, 2019). Bitkisel kaynaklı proteinler, meyve posaları, bitkisel atıklar, yağ sanayi atıkları, pres küspeleri ile tahıl ve baklagillerin işleme atıklarından üretilmektedir (Langyan ve ark., 2022).

Baklagiller bir diğer önemli protein kaynağı olarak kabul edilmektedir. Nohut, börülce, mercimek ve bezelye ile yapılan bir çalışmada protein içerikleri sırasıyla %24, %25, %26 ve %25 olarak tespit edilmiştir. Acı bakla ile yapılan bir çalışmada ise protein içeriği %33-35 olarak belirlenmiştir (Shrestha ve ark., 2021). Soya, bitkisel kaynaklı proteinler arasında en yüksek öneme sahip ürünlerden biridir. Soyanın protein içeriği yaklaşık %40 olarak bildirilmiştir ve soyada bulunan en önemli protein grubu globülinlerdir (Langyan ve ark., 2022). Baklagiller familyasına ait olan çemen otunun tohumlarının benzer şekilde yüksek protein içerdiği bilinmektedir. Çemen otu tohumlarının protein içeriğinin tür ve

iklimsel değişikliklere bağlı olarak %15-30 arasında değiştiği bildirilmiştir (Srinivasan, 2006).



şekil 2.3. Bitkisel protein kaynakları (Langyan ve ark., 2022)

2.4 Alternatif Bir Bitkisel Protein Kaynağı Olarak Çemen Otu Tohumu

2.4.1 Çemen otu (*Trigonella foenum-graecum* L.)

Çemen otu (*Trigonella foenum graecum* L.) dünyanın birçok yerinde baharat olarak kullanılmak üzere yetiştirilen bir baklagil bitkisidir. Çemen otu *Leguminosae* familyasından küçük tohumlu, tek yıllık, kendi kendine tozlaşan bir bitkidir (Slinkard ve ark., 2006). Kara ırkları ve *Trigonella* türleri Asya, Avrupa, Afrika ve Avustralya kıtalarında bulunmuştur. Çemen otu kayıtlı tarihte bilinen en eski şıfalı bitkilerden biri olup Batı Avrupa'dan Çin'e kadar yetiştirilmektedir (Acharya ve ark., 2006; Altuntaş ve ark., 2005). Türkiye'de ise Konya, Kayseri, Çankırı, Ankara, Gaziantep, Kahramanmaraş, Afyon, Urfa, Hatay ve Tokat olmak üzere çeşitli illerde yetiştirildiği bilinmektedir (Özdemir ve Gürbüz, 1998).

Çemen otu vitamin ve mineral bakımından zengin olup, çemen otu tohumunun protein oranı yüksektir ve önemli bir diosgenin kaynağıdır. Çemen otunun neredeyse 260 adet türünün var olduğu bilinmektedir ve günümüzde 18 adet tür tanımlanmıştır (Acharya ve ark., 2006). Cins içindeki türlerin kesin sayısındaki belirsizlik, büyük ölçüde türler arasındaki morfoloji, büyüme alışkanlığı, çiçek rengi, yapraklar ve kimyasal bileşimdeki değişkenliğe bağlanır (Niknam ve ark., 2021). Çemen otunun en çok kullanılan kısımları yapraklar ve tohumlarıdır (Şekil 2.4). Taze veya kurutulmuş çemen otu yaprakları ve yumuşak sapları yenilebilir özelliktedir. Çemen otu yaprakları yüksek miktarda mineral ve vitamin içermektedir ve özellikle kolin açısından zengindir. Çemen otu yaprakları özellikle Hindistan'da yeşil yapraklı sebzeler olarak tüketilir. Yaprak proteininin gerçek sindirilebilirlik değeri %77, biyolojik değeri ise %84'tür (Srinivasan, 2006). Çemen otunun tohumları bitkinin en önemli kısmıdır ve ticari değere sahiptir. Çemen otu tohumları aromatik ve kendine has acı bir tada sahiptir. Çemen otu tohumlarının gaz giderici, galaktagog ve antibakteriyel özellikleri mevcuttur. Endüstride genellikle çemen otu tohumu un olarak kullanılmakla birlikte tedavi amacıyla çiğ veya pişmiş olarak da tüketilebilir (Alm, 2002). Çemen otu tohumu protein, sabit yağlar ve mineraller açısından zengindir. Bu nedenle oldukça besleyicidir. Çemen otu tohumu proteinin lizin içeriği yüksek olup insan vücudunun protein ihtiyacını karşılaması bakımından soya fasulyesi proteini ile yarışabilecek düzeydedir (Hidvegi ve ark., 1984). Çemen otu tohumu ve taze çemen otu yapraklarının besinsel bileşimi Çizelge 2.2.'de verilmiştir (Srinivasan, 2006).



(a)



(b)

Şekil 2.4. (a) Çemen otu ve (b) çemen otu tohumu

Çizelge 2.2. Taze çemen otu ve çemen otu tohumlarının bileşimi (Srinivasan, 2006)

Bileşen	Taze çemen otu	Çemen otu tohumu
Nem	86.0 g	
Protein	4.4 g	30 g
Yağ	1.0 g	7.5 g
Lif	1.0 g	50 g
Sapogeninler	-	2 g
Trigonellin	-	380 mg
Ca	395 mg	160 mg
Mg	67 mg	160 mg
P	51 mg	370 mg
Fe	16.5 mg	14 mg
Na	76 mg	19 mg
K	31 mg	530 mg
Cu	0.26 mg	33 mg
S	167 mg	16 mg
Cl	165 mg	165 mg
Mn	-	1.5 g
Zn	-	7.0 mg
Cr	-	0.1 mg
Kolin	1.35 g	50 mg
Vitamin C	52 mg	43 mg
β-karoten	2.3 mg	96 µg
Tiamin	40 µg	340 µg
Riboflavin	310 µg	290 µg
Nikotinik Asit	800 µg	1.1 mg
Folik Asit	-	84 µg

*Bileşen miktarları 100 g ot/tohum için verilmiştir.

Literatürde çemen otu tohumlarının bileşiminin belirlendiği bazı çalışmalar mevcuttur. Çemen otu tohumlarının 370 mg/100g toplam fosfor, 160 mg/100g kalsiyum, 14.1 mg/100g demir ve 19 mg/100g sodyum içerdiği belirlenmiştir (Shankaracharya ve Natarajan, 1972). Çemen otu tohumları yüksek protein içeriği (%25), çözünür (%20) ve çözünmez (%28) diyet lifi, lizin, triptofan ve trigonellinin yanı sıra kalsiyum, demir ve β-karoten içermektedir (Sharma, 1986). Çemen otu tohumunun biyolojik değeri içeriğindeki amino asitler, nitrojen bileşikler, steroidler, polifenolik maddeler ve uçucu bileşenlerden ileri gelmektedir (Mehrafarin ve ark., 2010). Raju ve Bird (2006), çemen otu tohumlarında %3.0-3.9 kül, %3.2-5.4 nem, %25.2-30.1 protein, %7.2-9.3 lipid, %20.1-25.3 çözünmez lif, %20.4-30.2 galaktomannan ve %5.3-7.3 saponin bulunduğunu, ayrıca çemen otu tohumunun uçucu yağlar ve serbest amino asitleri içerdiğini bildirmişlerdir. Buna karşın, çemen otu tohumunun bileşimi yetiştirildiği bölgenin toprak özelliklerine, türe ve iklime göre çeşitlilik gösterebilmektedir. Çemen otu tohumunun bir

steroid sapogenin olan diosgenini içerdği bildirilmiştir. Çemen otu tohumunda bulunan diğer sapogeninler ise gitogenin, yamogenin, neotigenin ve tigogenindir. Çemen otu tohumu ayrıca gentianin, trigonellin ve karpain bileşikleri gibi alkaloidler içerir (Mullaicharam ve ark., 2013). Çemen otu tohumlarının yağ asidi profili, esas olarak linolenik, linoleik, palmitik ve oleik asitlerden oluşmaktadır. Çemen otu tohumu, %44.64 toplam karbonhidrat ve %14.90 galaktoz ve çözülebilir bir lif olan mannan parçalarına sahiptir (Schryver, 2002). Yüksek lif içeriği nedeniyle, çemen otu tohumu bazı özel amaçlarla gıda dokusunu değiştirmek için gıda stabilizatörü, yapıştırıcı ve emülsifiye edici ajan olarak kullanılabilir. Ayrıca, yapılan bazı çalışmalar, çemen otu tohumunun antidiyabetik, antikanserojenik, hipokolesterolemik ve hipoglisemik etkileri olduğunu ve çemen otu tohumunun antioksidan ve antibakteriyel ajan, gastrik uyarıcı ve anti-anoreksiya ajanı olarak kabul edilebileceğini göstermiştir (Khorshidian ve ark., 2016). Şimdiye kadar, çemen otu tohumlarından başlıca polisakkaritler, saponinler, alkaloidler, polifenoller ve flavonoidler dahil olmak üzere birçok fitokimyasal izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Taylor ve ark., 1997; Rayyan ve ark., 2010; Mandegary ve ark., 2012; Król-Kogus ve ark., 2014). Badami ve Kalburgi (1969), çemen otu tohumu yağ asitlerini analiz etmişler ve heksadekanoik asit tespit etmişlerdir. Baccou ve ark. (1978), farklı ülkelerden çemen otu tohumu yağının yağ asidi bileşimini incelemişler ve linoleik-linolenik asit yüzdelerinin bitkinin yetiştirildiği yer ve koşullara göre değiştiğini belirtmişlerdir. Türker ve ark. (2022), yağı giderilmiş çemen otu tohumundan çözünür ve çözünmez diyet lifi ekstraksiyonu gerçekleştirmişler ve çemen otu tohumunun %78 oranında diyet lifi içerdiğini bildirmişlerdir. Çemen otu tohumunun bileşen miktar ve özelliklerinin belirlenmesine yönelik literatürde çalışmalar mevcut olsa da, çemen otu tohumu proteinlerinin ekstraksiyon ve karakterizasyonları ile ilgili çalışmaların sınırlı sayıda olduğu görülmüştür.

2.4.2 Çemen otu tohumu proteinleri

Çemen otu tohumlarının protein içeriği (%15–34), soya fasulyesi (%38–42) ve bakla (%31–34) ile yarışabilir düzeyde olmasına rağmen protein kaynağı olarak değerlendirilmesi için sınırlı sayıda araştırma yapılmıştır (Feyzi ve ark., 2015). Çemen otu tohumu proteininin asidik ve alkali pH'larda nötre yakın pH'lara göre daha fazla çözünür olduğu belirlenmiştir. Çemen otu tohumu proteinlerinin emülsifikasyon ve

köpük oluşturma özelliklerinin diğer baklagillerden daha yüksek olduğu ve salata sosu, et, dondurma, kek hamurları ve mayonez gibi gıda sistemlerinde önemli bir rol oynadığı bulgulanmıştır (El Nasri ve El Tinay, 2007). Çemen otu tohumu yüksek miktarda glutamik asit, aspartik asit, lösin, tirozin ve arjinin içerdiğinden kaliteli bir amino asit profiline sahiptir. Çemen otu tohumu proteinlerinde bulunan esansiyel amino asitlerin önemli bir ticari protein kaynağı olan soya proteinlerinin esansiyel amino asit içeriğinden daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Çemen otu tohumu fazla miktarda biyoaktif peptit içerir ve proteinlerinin hidrolizi ile mevcut biyoaktif peptitlerin miktarı artar. Çemen otu tohumunda bulunan proteinlerin çemen otu tohumlarının yüksek antioksidan aktivitesinden sorumlu olduğu belirlenmiştir (Feyzi ve ark., 2015). Çemen otu tohumlarının ham protein içeriğine ilişkin analitik veriler, insan tüketimi için ucuz bir alternatif protein kaynağı olma potansiyelinin yüksek olduğunu göstermektedir (El Nasri ve El Tinay, 2007).

2.5 Protein Ekstraksiyon Teknikleri

Ekstraksiyon işlemi, potansiyel biyoaktif bileşiklerin tüketime sunulabilmesi veya gıdalarda kullanılabilmesi için bitki materyallerinden ayrılmasında önemli bir adımdır. Hem kullanılan çözücü hem de kullanılan ekstraksiyon yöntemi, biyoaktif bileşenlerin aktivitelerinin yanı sıra insan sağlığı ve çevre üzerindeki etkilerini önemli ölçüde etkileyen kritik faktörlerdir. Protein ekstraksiyonunda geleneksel ve yenilikçi birçok yöntem kullanılmaktadır. Geleneksel yöntemler klasik alkali ekstraksiyon, organik çözügenler ile ekstraksiyon, su ve asidik çözügen temelli ekstraksiyon olarak sınıflandırılabilir. Yenilikçi yöntemler ise enzim destekli ekstraksiyon, ultrasonik destekli ekstraksiyon (UDE), vurgulu elektrik alan destekli ekstraksiyon ve yüksek basınç destekli ekstraksiyon olarak sınıflandırılmıştır (Qiaoyun ve ark., 2017; Kumar ve ark., 2021).

2.5.1 Klasik alkali ekstraksiyon

Klasik alkali ekstraksiyon kimyasal bir ekstraksiyon yöntemidir. Bu yöntem bitkisel kaynaklı proteinlerin ekstraksiyonunda uygulama kolaylığı ve düşük maliyeti nedeniyle en sık başvurulan yöntem olarak göze çarpar (Qiaoyun ve ark., 2017). NaOH ve KOH gibi bazik karakterde kimyasal bileşikler kullanılarak ortam pH değeri alkali duruma

getirilir ve protein çözünürlüğü artırılarak ekstraksiyon sağlanır. pH değerinin artırılması ile proteinde bulunan disülfid bağları kırılır ve protein ekstraksiyonu gerçekleşir (del Mar Contreras ve ark., 2019). Asidik ve nötr amino asitlerin yüksek pH değerlerinde iyonlaşması nedeniyle çözücünün pH değerindeki artışla proteinlerin çözünürlüğü artar. Bu nedenle, proteinin alkali ortamda ekstraksiyonu daha yüksek protein verimi sağlar (Kumar ve ark., 2021).

Klasik ekstraksiyonda sıcaklık önemli bir rol oynamaktadır. Protein üç boyutlu yapısının ve protein yapısında bulunan kovalent interaksiyonların korunması klasik ekstraksiyonda büyük önem arz etmektedir. Katı:çözgen oranı, alkali konsantrasyonu ve ekstraksiyon süresi sıcaklığa ek olarak göz önünde bulundurulması gereken işlem değişkenleridir ve en yüksek protein ekstraksiyon veriminin sağlanabilmesi için bu parametrelerin optimizasyonunun sağlanması gerekir (Zhang ve ark., 2014). Klasik yöntemler her ne kadar maliyet açısından tercih edilen yöntemler olsalar da uzun süreler alan ve çevre dostu olmayan tekniklerdir. Klasik alkali ekstraksiyonda yüksek verimlere ulaşılabildiği bilinmektedir ancak bu yöntem protein sindirilebilirliğini azaltmakta, lizin ve sistein amino asitlerinin parçalanmasına sebebiyet vererek ekstrakte edilen proteinin kalitesine olumsuz etki etmektedir. Protein kalitesini olumsuz etkileyen bu durumlar ancak alkali konsantrasyonu ve protein verimi arasında bir denge kurularak giderilebilmektedir (Kumar ve ark., 2021). Literatürde proteinlerin ekstraksiyonu amacıyla klasik alkali ekstraksiyon uygulanan birçok farklı ürün bulunmaktadır ve bu çalışmaların bir kısmı Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Klasik alkali ekstraksiyon yöntemi kullanılarak protein ekstraksiyonu gerçekleştirilen çalışmalar

Bitkisel Materyal	Kimyasal	Ekstraksiyon koşulları				Verim (%)
		Katı:çözgen oranı (g/mL)	Sıcaklık (°C)	Süre (dak)	pH	
Çay (Qiaoyun ve ark., 2017)	0.5 M NaOH	1:50	70	60	12	29.71
Pamuk tohumu (Zhang ve ark., 2009)	0.1 N KOH	1:2	60	40	12.5	>70
Hint ayvası çekirdeği (Vaidya ve ark., 2017)	0.6-2.0 M NaOH	1:2.5	65	30	10.4	51.58
Kırmızı biber tohumu (Firatligil-Durmus ve Evranuz, 2010)	0.5 N NaOH	1:21	31	20	8.8	12.24
Mürdümük (Feyzi ve ark., 2018a)	1 M NaOH	1:15	25	58	9.96	14.25
Maş fasulyesi (Du ve ark., 2018)	1 M NaOH	1:20	40	-	9.0	77.12
Domates (Shao ve ark., 2014)	0.5 N NaOH	1:30	25	60	9-11	26.29
Domates çekirdeği (Mechmeche ve ark., 2017)	0.5 M NaOH	1:83	30	~3000	7.5	80.37
Pirinç kepeği (Bernardi ve ark., 2018)	1 M NaOH	6:34	52	300	10	34.51
Fıstık (Uddin ve ark. (2018)	0.2 M NaOH	1:20	40	60	9-10	85.2
Kuşkonmaz (Zhang ve ark., 2014)	0.1 M NaOH	1:40	95	240	-	95
Arpa samanı (Zhang ve ark., 2014)	0.1 M NaOH	1:40	95	240	-	95

2.5.2 Ultrasonik destekli ekstraksiyon

Protein ekstraksiyonu için yeni teknolojilerin kullanılması, protein ekstraksiyon verimini, tekno-işlevsel ve beslenme özelliklerini geliştirir. Ayrıca, bu teknolojilerin düşük maliyetli, güvenli ve çevre dostu alternatifler olarak bitkisel protein üretiminde önemli rol oynayabilecekleri düşünülmektedir (Tiwari, 2015). Ancak, sayısız avantajına rağmen yeni teknolojilerin endüstriyel ölçekte uygulamaları hala sınırlıdır (Liu ve ark., 2016). Bitkisel kaynaklardan elde edilen proteinlerin fonksiyonel özellikleri ekstraksiyon yöntemi ile doğrudan ilişkilidir. Dolayısıyla kullanılacak yöntemin proteinlerin fonksiyonel özelliklerini olumsuz etkilemeyecek şekilde seçilmesi gerekir (Pojić ve ark., 2018). Bitkisel ürünlerden fenolik bileşikler ya da uçucu yağlar gibi bileşenlerin ekstraksiyonunda olduğu gibi protein ekstraksiyonunda da yenilikçi ve doğa dostu yeşil

ekstraksiyon teknikleri günümüzde daha sık kullanılmaktadır. Bu tip ekstraksiyon teknikleri arasında gıda endüstrisinde kullanılan en önemli yöntemlerden biri ultrasonik destekli ekstraksiyon (UDE) işlemidir (Vilkhu ve ark., 2010). UDE işleminde 20 kHz ile 100 MHz aralığında ses dalgaları üretilir ve bu ses dalgaları uygulamanın gerçekleştirildiği çözelti içerisinde kavitasyon yaratır. Gaz kabarcıkların oluşması, büyümesi ve geri sönümlenmesi anlamına gelen kavitasyon sonucunda bitki hücre duvarına mekanik olarak zarar verilerek ekstraksiyon verimi ve ekstrakte edilecek bileşen miktarı artırılabilir (Dzah ve ark., 2020). Ses dalgalarının kütle transferini artırması ile birlikte bitkisel ürünlerin hücre duvarında yapışık halde bulunan ya da hücre içinde bulunan materyallerin ekstraksiyonu geleneksel yöntemlere kıyasla daha hızlı ve etkili şekilde gerçekleştirilebilir (Pojić ve ark., 2018). Protein ekstraksiyonunda UDE işleminin kullanımı ile ekstraksiyon süresinin azaltılması, enerji kullanımının en aza indirilmesi, çözügen kullanım miktarının düşürülmesi, çözeltinin homojenitesinin artırılması, sıcaklık gradyanının azaltılması ve daha yüksek proses kontrolünün sağlanması hedeflenmektedir (Chemat ve ark., 2017). Genel olarak ekstraksiyon verimindeki artış, çözgüde ultrasesin oluşturduğu mikro düzeyde kabarcıkların asimetrik olarak çökmesi ile proteinlerin çözgüye geçişinin kolaylaşması ile açıklanmaktadır (Bernardi ve ark., 2021). UDE işlemi kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon çalışmaları incelendiğinde, ultrasonik güç, katı:çözgen oranı ve ekstraksiyon süresinin ekstraksiyon verimini etkilediği görülmektedir (Pojić ve ark., 2018). Dolayısıyla, farklı bitkisel kaynaklar için optimum ekstraksiyon koşullarının deneysel olarak belirlenmesi gerekmektedir.

Bezelyeden UDE işlemi ile protein ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada, optimum ekstraksiyon koşullarında %82.6 düzeyinde protein izolatu verimine ulaşıldığı bildirilmiştir. Çalışmada optimum koşullar pH 9.6, 13.5 dakika ekstraksiyon süresi, 1:11.5 (g/mL) katı:çözgen oranı, ve %33.7 ultrasonik genlik olarak tespit edilmiş ve UDE işlemi ile yüksek verimde ve kalitede bezelye proteini üretilebileceği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2020). Yağı giderilmiş pirinç kepeğinden UDE işlemi ve klasik alkali ekstraksiyon ile protein ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada, klasik ekstraksiyon ile %20-30 düzeyinde elde edilen protein veriminin, UDE işlemi ile %64.5 düzeyine kadar çıkarılabildiği tespit edilmiştir (Ly ve ark., 2018). Gadalkar ve Rathod (2020) UDE işlemi ile karpuz çekirdeği proteinlerinin ekstraksiyonunu

gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar, pH 9.0, 1:50 (g/mL) katı:çözgen oranı, 90 W güç ve 25 kHz frekansta ultrases kullanımı ile 9 dakikada %87 protein ekstraksiyon verimi elde etmişlerdir. Klasik ekstraksiyonda 120 dakikada ulaşılan en yüksek verim ise %75 olarak kaydedilmiştir. Ayrıca, klasik ekstraksiyona göre UDE işlemi ile kullanılan çözgenin %20 oranında azaltıldığı bildirilmiş, UDE ile elde edilen protein izolatlarının fonksiyonel özelliklerinin klasik ekstraksiyon örneklerine göre daha üstün olduğu tespit edilmiştir (Gadalkar ve Rathod, 2020). Yağı giderilmiş ceviz ununda UDE işlemi ile klasik alkali yöntemlere göre protein ekstraksiyon veriminin %30 ve protein saflığının %16 düzeyinde artırıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, ekstraksiyon süresinin UDE işleminde %25 daha kısa olduğu bildirilmiştir. UDE işlemi ile elde edilen protein izolatlarının emülsiyon stabiliteleri, köpük stabiliteleri ve yığın yoğunluk değerlerinin klasik yöntem örneklerine göre sırasıyla %34.5, %39.8 ve %6.1 oranında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Zhu ve ark., 2018). Yagoub ve ark. (2017) UDE işlemi ile kolza tohumlarından protein ekstraksiyon koşullarının optimizasyonunu yanıt yüzey metodolojisi kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Optimum ekstraksiyon koşulları pH 11.71, 41.48 dakika ekstraksiyon süresi ve 240 W ultrasonikasyon gücü (güç yoğunluğu 0.228 W/cm²) olarak tespit edilmiştir. Klasik ekstraksiyona kıyasla UDE ile ekstraksiyonda protein veriminin %43 oranında artırıldığı bildirilmiştir (Yagoub ve ark., 2017). Biber tohumlarından protein ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği başka bir çalışmada, 350 W güçte 13 dakikalık UDE uygulaması ile (pH 11.0, 1:36 g/mL katı:çözgen oranı) protein ekstraksiyon veriminin klasik ekstraksiyona kıyasla %15 oranında artırıldığı tespit edilmiştir (Li ve ark., 2016). UDE işlemi ile sümbül fasulyeden (*Dolichos lablab* L.) protein ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada, pH 10.0, 30 dakika ekstraksiyon süresi ve 1:60 g/mL katı:çözgen oranı optimum ekstraksiyon koşulları olarak seçilmiştir. Klasik alkali ekstraksiyonda elde edilen %41 oranında verime karşın, UDE işlemi ile %70 oranında bir verime ulaşılmıştır (Zhao ve ark., 2021). Zhu ve ark. (2009) buğday tohumlarından protein ekstraksiyonu gerçekleştirdikleri çalışmada ultrasonik prob kullanımı ile klasik alkali ekstraksiyona göre protein veriminin aynı sürede %37-57 oranında arttığını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde, ultrasonik prob kullanımı ile Karki ve ark. (2010) soya tohumlarından protein ekstraksiyonunda verimin %46, Li ve ark. (2017) pirinç tozundan protein ekstraksiyonunda verimin %90 oranında arttığını belirlemişlerdir. UDE işlemi ile protein ekstraksiyonunda yüksek verim ve düşük

ekstraksiyon süresi gibi önemli bulgulara ek olarak proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin geliştirildiği de bildirilmiştir (Li ve ark., 2017). Ultrasonikasyon uygulaması ile proteinlerin boyutunun küçülmesine bağlı olarak soya proteinlerinin çözünürlüğünün arttığı tespit edilmiştir (Jambrak ve ark., 2009; Hu ve ark., 2015). Jambrak ve ark. (2009) 20 kHz frekansta prob kullanılarak sonikasyon işlemi uygulanan soya protein izolatlarının emülsifiye etme özelliklerinin sonikasyon işlemi uygulanmayan örneklerle göre önemli oranda artış gösterdiğini bildirmişlerdir. UDE işlemi ile proteinlerin iki ve üç boyutlu yapılarında meydana gelen değişimin proteinlerin çözünürlüğünü ve emülsifiye etme özelliklerini olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (Jiang ve ark., 2014). Morales ve ark. (2015), UDE işleminin soya protein izolatının köpük oluşturma kapasitesini önemli oranda artırdığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, Hu ve ark. (2013) UDE işlemi ile elde edilen soya protein izolatlarının %95.53 oranında su tutma kapasitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Genel olarak, literatürde gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde, UDE işleminin klasik ekstraksiyon yöntemlerine göre hem protein ekstraksiyon verimini artırdığı hem de proteinlerin fonksiyonel özelliklerini geliştirdiği görülmüştür.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Çemen otu tohumları Tokat'ta bulunan yerel bir marketten temin edilmiş ve içerisinde bulunan yabancı maddeler görsel olarak el ile uzaklaştırılmıştır. Sonrasında çemen otu tohumları bir ev tipi blender (Sinbo SHB 3020, Türkiye) kullanılarak öğütülmüştür. Öğütülen tohumlar 630 µm çapındaki elekten geçirilmiş ve elek altına geçen örnekler toplanmıştır. Elek altı fraksiyonun yüksek oranda yağ içermesi (16.15±1.02%) sebebiyle örnekler n-hekzan kullanılarak yağ giderme işlemi uygulanmıştır. Yağı giderilen örneklerin toplam protein içeriği %17.13±0.10 olarak belirlenmiş ve tez çalışmasında bu örnekler kullanılmıştır.

3.2 Klasik Ekstraksiyon İşlemi

Çemen otu tohumlarından protein ekstraksiyonu amacıyla uygulanan klasik ekstraksiyon işleminde, bağımsız değişkenler olarak seçilen çözügen pH değeri ve katı-çözügen oranı için sınır koşullar yapılan ön denemeler ile belirlenmiştir. Ön denemeler neticesinde, ekstraksiyon ortamı (çözügen) pH değeri 6.0-12.0 ve katı-çözügen oranı 20-60 g/L aralığında seçilmiş ve iki değişkenli 13 noktalı bir 'Merkezi Tümlleşik Tasarım' oluşturulmuştur (Çizelge 3.1). Deneme planına uygun olarak hazırlanan örnekler toplam hacim 250 mL olacak şekilde manyetik karıştırıcıda 750 rpm hızda 4 saat boyunca karıştırılmıştır. Süre sonunda örnekler 50 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmış ve 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj işlemi sonunda elde edilen süpernatant faza Bradford protein tayini (Bradford, 1976) uygulanmış ve katı örnekte bulunan başlangıç protein miktarı ile süpernatantta bulunan protein miktarı oranlanarak ekstraksiyon verimi hesaplanmıştır (Eşitlik 3.1).

$$\text{Ekstraksiyon verimi (\%)} = \frac{\text{Ekstraktta bulunan protein miktarı (g)}}{\text{Katı örnekteki protein miktarı (g)}} \times 100 \quad (3.1)$$

Çizelge 3.1. Klasik ekstraksiyon işlemi deneme planı

Deneme No.	Katı-Çözgen (g/L)	pH
1	40	9.0
2	20	6.0
3	60	9.0
4	40	9.0
5	40	9.0
6	20	12.0
7	60	12.0
8	40	12.0
9	40	9.0
10	40	9.0
11	40	6.0
12	20	9.0
13	60	6.0

3.3 Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon İşlemi

Çemen otu tohumlarından protein ekstraksiyonu amacıyla uygulanan ultrasonik destekli ekstraksiyon (UDE) işleminde, klasik ekstraksiyon ile belirlenen ve proteinlerin çözünürlüğünün en yüksek olduğu pH değeri (pH 11.47) kullanılmış ve sabit tutulmuştur. UDE işleminde bağımsız değişkenler olarak katı-çözgen oranı (20-60 g/L) ve sonikasyon genliği (%30-80) seçilmiş ve bir deneme planı oluşturulmuştur (Çizelge 3.2). UDE işleminde sonikasyon genliği '%' ile ifade edilmiş olup, sonikatör ucunun uzunlamasına oluşturabileceği dalga mesafesini temsil etmektedir. Çalışmada ½" çaplı proba sahip laboratuvar ölçekli bir sonikatör (Q 500, Q Sonica, 500 W, 20 kHz, ABD) kullanılmıştır. Kullanılan prob (½") için %100 ayarında iken ~120 µm'lik bir genliğe ulaşılmakta ve genliğin artırılmasıyla sıvı içindeki kavitasyon yoğunluğu artmaktadır. Örneklerin aşırı ısınmasını engellemek amacıyla α değeri 0.8 olarak belirlenmiş ve $\alpha = t_{\text{açık}} / (t_{\text{açık}} + t_{\text{kapalı}})$ olacak şekilde hesaplanmıştır. Burada $t_{\text{açık}}$ sonikasyonun aktif olduğu süreyi (s) ve $t_{\text{kapalı}}$ sonikasyonun pasif olduğu süreyi (s) ifade etmektedir. Ayrıca, örneklerin aşırı ısınmasının engellenmesi ve ekstraksiyon sıcaklığının sabit tutulması (~25°C) amacıyla bir buz banyosu düzeneği kullanılmıştır. Deneme planına uygun olarak hazırlanan örneklerle, ön denemeler ile belirlenen 30 dakikalık sabit ekstraksiyon süresi boyunca farklı genlik (%) değerlerinde sonikasyon işlemi uygulanmıştır (Çizelge 3.2). Sonikasyon

işleminin bitmesinin ardından klasik ekstraksiyon işleminde olduğu gibi örneklerle santrifüj işlemi uygulanmış ve ekstraksiyon verimi hesaplanmıştır (Eşitlik 3.1).

Çizelge 3.2. Ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemi deneme planı

Deneme No.	Katı-Çözgen (g/L)	Genlik (%)
1	60	30
2	40	55
3	40	55
4	60	55
5	20	30
6	40	80
7	40	55
8	40	55
9	40	55
10	20	80
11	60	80
12	40	30
13	20	55

3.4 Protein İzolatlarının Üretimi

Klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri için uygulanan deneme planlarına göre tüm koşullarda elde edilen süpernatant fazlar, çemen otu proteinlerinin izoelektrik noktası olan pH 4.0'a (Feyzi ve ark., 2018) getirilerek 6 saat boyunca oda sıcaklığında çöktürme işlemine tabi tutulmuştur. Sürenin sonunda örneklerle santrifüj işlemi (9000 rpm, 60 dakika) uygulanmış ve presipitat pH 4.0'a ayarlı saf su ile yıkanarak tekrar santrifüjlenmiştir (6000 rpm, 5 dakika). Uygulanan bu yıkama işlemi üç kez tekrarlanmıştır. Daha sonra, yıkanmış presipitatlar pH 7.2'ye ayarlanmış az miktarda saf su içinde çözündürülüp -18°C'de 12 saat dondurulduktan sonra liyofilize edilmiştir (Christ Alpha 1-4 LSC Plus, Almanya). Liyofilize protein izolatları analizlerde kullanılıncaya kadar -18°C'de muhafaza edilmiştir.

3.5 Protein İzolatlarının Karakterizasyonu

Klasik ekstraksiyon ve UDE işleminde tüm ekstraksiyon koşullarında elde edilen protein izolatlarının koagüle protein yüzdesi, su tutma kapasitesi, yağ tutma kapasitesi, köpük özellikleri (köpük kapasitesi ve köpük stabilitesi), emülsifikasyon özellikleri (emülsiyon aktivitesi, emülsiyon stabilitesi ve emülsiyon kapasitesi) ve çözünürlük özellikleri belirlenmiştir. Her iki ekstraksiyon işlemi için optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen protein izolatlarının moleküler ağırlıkları, yapısal ve termal özellikleri ortaya konmuştur. Ayrıca, UDE işleminde optimum koşullarda elde edilen protein izolatlarının amino asit profili belirlenmiştir.

3.5.1 Koagüle protein yüzdesinin belirlenmesi

Protein izolatlarının koagüle protein yüzdesi Kramer ve Kwee (1977) tarafından tanımlanan yöntem kullanılarak tespit edilmiştir. Bu amaçla 0.2 g protein izolatı 0.025 M derişimde 10 ml sitrat-fosfat çözeltisi (pH 7.0) ile çözündürülerek santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Süpernatant faza Biüret reaktifi eklenerek çözelti karanlık ortamda bekletilmiştir. Ardından çözelti 100°C'de 15 dakika tutularak soğutulmuştur. Soğutma işleminin ardından ısıtma işlemi bir kez daha uygulanmıştır. Isıtma öncesi (A_1) ve ısıtma sonrası (A_2) örneklerin absorbansları 540 nm'de okunarak % koagüle protein değeri Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Koagüle protein (\%)} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \quad (3.2)$$

3.5.2 Su ve yağ tutma kapasitelerinin belirlenmesi

Protein izolatlarının su tutma kapasitesini belirlemek amacıyla, 250 mg protein izolatına 15 ml saf su eklenerek vortekslenmiş ve örnekler 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. 3000 rpm hızında 20 dakikalık santrifüj sonrasında, süpernatant faz uzaklaştırılarak kalan örnek tartılmıştır. Su tutma kapasitesi, g su/g kuru örnek cinsinden hesaplanmıştır. Yağ tutma kapasitesinin belirlenmesi için su tutma kapasitesinde uygulanan yöntem su yerine

natürel sızma zeytinyağı kullanılarak tekrarlanmıştır. Yağ tutma kapasitesi g yağ/g kuru örnek cinsinden ifade edilmiştir (Li ve ark., 2022).

3.5.3 Köpük özelliklerinin belirlenmesi

Protein izolatlarının köpük kapasitesi ve köpük stabilitesi Timilsena ve ark. (2016) tarafından önerilen yöntem ile belirlenmiştir. 20 g/L konsantrasyonda protein izolatu sulu çözeltileri homojenizatör yardımı ile (Ultra-Turrax IKA T-18 Basic, ABD) 10000 rpm’de 5 dakika homojenize edilmiştir. Köpük kapasitesi (%), homojenizasyon öncesi toplam hacim V_0 ve homojenizasyon sonrası toplam hacim V_1 olacak şekilde Eşitlik 3.3 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Köpük kapasitesi (\%)} = \frac{(V_1 - V_0)}{V_0} \times 100 \quad (3.3)$$

Köpük stabilitesi ise, homojenizasyon işlemi uygulanmış örneğin oda sıcaklığında 60 dakika bekletildikten sonra toplam hacminin (V_2) belirlenmesi ile hesaplanmıştır (Eşitlik 3.4).

$$\text{Köpük stabilitesi (\%)} = \frac{(V_2 - V_0) \times 100}{(V_1 - V_0)} \quad (3.4)$$

3.5.4 Emülsifikasyon özelliklerinin belirlenmesi

Protein izolatlarının emülsiyon aktivitesi ve emülsiyon stabilitesi Pearce ve Kinsella (1978) tarafından geliştirilen ve Feyzi ve ark. (2018b) tarafından modifiye edilen bulanıklık yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, 22.5 mg örnek 15 mL’lik bir tüpe tartılarak üzerine 4.5 mL fosfat tampon çözeltisi (pH 7.0) eklenmiş ve örnek 1 dakika boyunca vortekslenmiştir. Bu karışıma çözelti hacminin 1/3’ü oranında ayçiçeği yağı (1.5 mL) aktarılmış ve 22000 rpm’de 2 dakika homojenizasyon işlemi uygulanmıştır.

Emülsiyon stabilitesinin belirlenmesi için, homojenizasyon işleminin hemen ardından ($t=0$) 250 μ L emülsiyon, 1 g/L konsantrasyonda 50 mL sodyum dodesil sülfat ile karıştırılmış ve bu karışımın 500 nm’deki absorbans değeri kaydedilmiştir (A_0). Benzer şekilde, 15 dakika oda sıcaklığında bekletilen başlangıç emülsiyona aynı işlem

uygulanmış ve 500 nm'deki absorbansı kaydedilmiştir (A_{15}). Emülsiyon stabilitesi (dak) Eşitlik 3.5 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Emülsiyon stabilitesi (dak)} = \frac{A_0}{(A_0 - A_{15})} \times t \quad (3.5)$$

Emülsiyon aktivitesinin hesaplanması amacıyla, $t=0$ anında alınan 800 μL emülsiyon, yağ hacim fraksiyonunun (Φ) belirlenmesi için 120°C 'deki etüvde 2 saat süre ile kurutulmuştur. Sabit tartıma gelen örnek desikatöre alındıktan sonra tartılmış ve içindeki kütsel yağ fraksiyonu belirlenmiştir. Ardından yağın özgül ağırlığı (0.918 g/mL) kullanılarak Φ değeri hesaplanmıştır. Emülsiyon aktivitesi (m^2/g) Eşitlik 3.6 kullanılarak belirlenmiştir.

$$\text{Emülsiyon aktivitesi (m}^2/\text{g)} = \frac{2T \times D}{\Phi \times C} = \frac{(2 \times 2.303 \times A_0 \times D)}{(\Phi \times C \times L)} \quad (3.6)$$

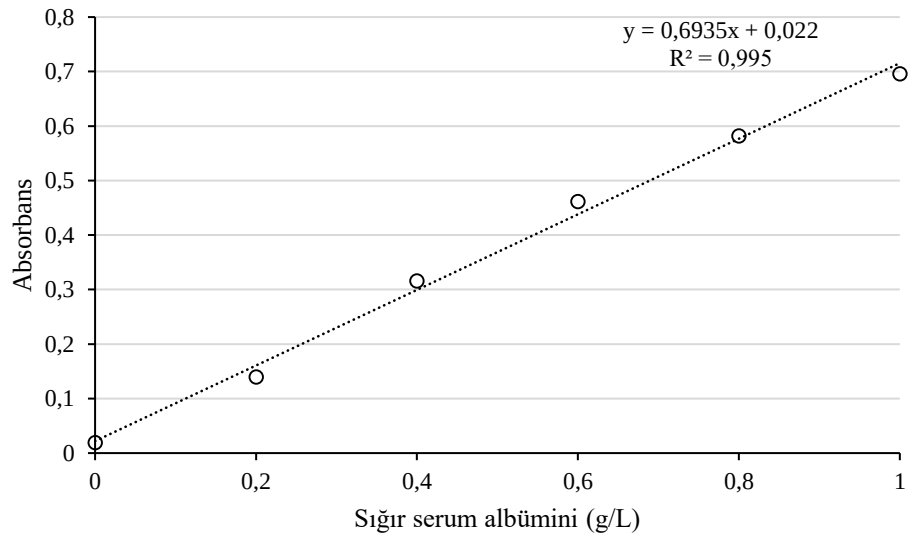
Burada, T türbidite ($T = 2.303 \times A_0/L$), D seyreltme faktörü (200), Φ emülsiyon yağ hacim fraksiyonu (g yağ/g örnek), C çözeltideki protein konsantrasyonu (0.005 g/mL), L küvet yol uzunluğudur (10^{-2} m).

Protein izolatlarının emülsiyon kapasitesi ise Neto ve ark. (2001) tarafından bildirilen ve Feyzi ve ark. (2018b) tarafından modifiye edilen yöntemle göre belirlenmiştir. 10 mL protein izolatu çözeltisine (10 g/L) eşit hacimde ayçiçek yağı eklenmiş ve 7200 rpm'de 2 dakika homojenize edilerek emülsiyon oluşturulmuştur. Daha sonra, elde edilen emülsiyonlara 3250 rpm'de 2 dakika santrifüj uygulanmıştır (EBA Hettich Universal 320 R, Almanya). Santrifüj işlemi uygulanmadan önce tüpte bulunan emülsiyonun toplam yüksekliği H_0 (cm), üst faz yüksekliği ise H_1 (cm) olarak ifade edilmiş ve emülsiyon kapasitesi (%) Eşitlik 3.7 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Emülsiyon kapasitesi (\%)} = \frac{H_1}{H_0} \times 100 \quad (3.7)$$

3.5.5 Çözünürlük özelliklerinin belirlenmesi

Protein izolatlarının çözünürlükleri (g/L) Feyzi ve ark. (2018b) tarafından bildirilen yöntem ile belirlenmiştir. 10 g/L konsantrasyonda saf su ile hazırlanan protein izolatu çözeltilerinin pH değerleri HCl ve NaOH kullanılarak 2.0-12.0 aralığında değerlere ayarlanmıştır. Oda sıcaklığında 30 dakika karıştırılan örnekler 6000 rpm’de 15 dakika santrifüj (Hettich Eba 21, Almanya) işlemi uygulanmıştır. Örneklerin süpernatant fazında protein içeriği Bradford metodu (Bradford, 1976) ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Yöntemde 0.1 mL süpernatant faz üzerine 5 mL Bradford çözeltisi eklenerek karışım vorteks ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakikalık inkübasyondan sonra örneklerin absorbansları 595 nm’de ölçülmüştür. Standart olarak 0-1.0 g/L konsantrasyonlarda sığır serum albümini (BSA) kullanılmıştır. Bradford metodu için hazırlanan standart kurve Şekil 3.1’de verilmiştir.



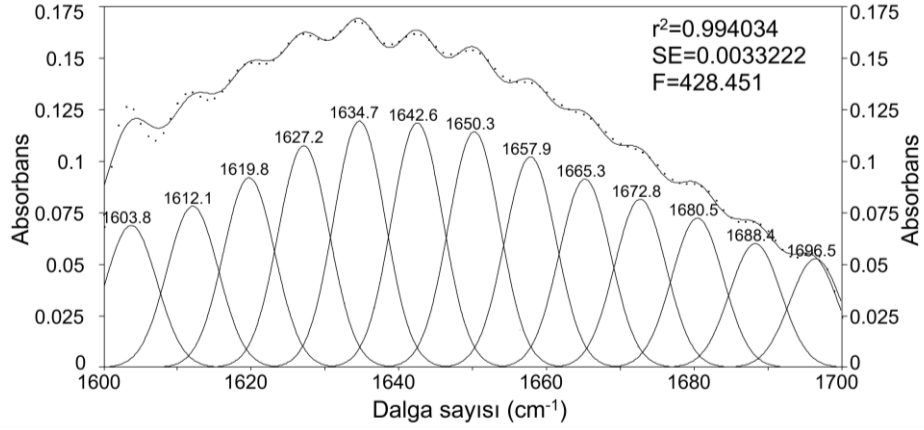
Şekil 3.1. Bradford metodunda kullanılan standart kurve

3.5.6 Moleküler ağırlığın belirlenmesi

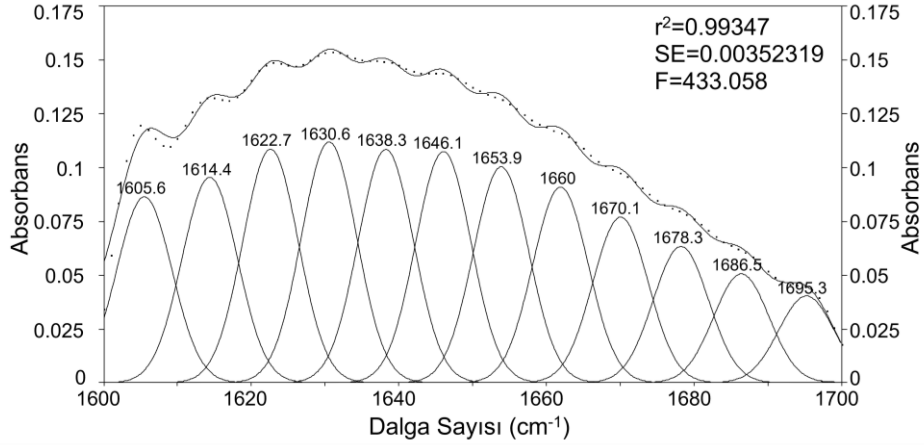
Klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile optimum koşullarda elde edilen protein izolatlarında bulunan proteinlerin moleküler ağırlıklarının belirlenmesi amacıyla SDS-PAGE yöntemi (Laemmli, 1970) kullanılmıştır. SDS-PAGE analizi dikey elektroforezde Comassie boyama tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada %12'lik jel kullanılmış ve her örnek için 10 ve 50 µg örnek yüklenmiştir. Örnekler 200 V gerilim altında 50 dakika boyunca yürütülmüş ve jel Comassie Brilliant Blue R-250 ile boyanmıştır. ~10-180 kDa molekül ağırlığına sahip 'Thermo Fischer PageRuler Prestained Protein Ladder' standart olarak kullanılmıştır. Örneklerin molekül ağırlıkları Thermo Fischer Gel Analyzer 19.1 paket programı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.5.7 Yapısal özelliklerin belirlenmesi

Klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile optimum koşullarda elde edilen protein izolatlarının yapısal özellikleri Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi (FT-IR) Spektrometresi (Perkin Elmer 400, ABD) kullanılarak ortaya konmuştur (Byler ve Susi, 1986). Analizde Elmas ATR metodu kullanılmış ve 4000-400 cm^{-1} spektrum aralığında ölçümler gerçekleştirilmiştir. FT-IR spektrumlarında Amid I bant bölgesi (1600-1700 cm^{-1}) dikkate alınarak protein izolatlarının protein ikincil yapıları Peakfit v4.12 paket programı (Systat Software, ABD) yardımı ile belirlenmiştir. Protein ikincil yapılarının yüzdelik olarak tespitinde pik merkez noktaları baz alınmıştır ve program tarafından pik için hesaplanan alanlar kullanılmıştır. Paket program tarafından oluşturulan Amid I bölgesine ait piklerin dağılımı Şekil 3.2'de verilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 3. 2. Protein izolatlarına ait Amid I bantları (a) Klasik ekstraksiyon (b) UDE işlemi ile elde edilen protein izolatı

3.5.8 Termal özelliklerin belirlenmesi

Klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile optimum koşullarda elde edilen protein izolatlarının denatürasyon sıcaklıkları (T_d , °C) ve denatürasyon entalpileri (ΔH_d , mJ/g) Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) cihazı (Perkin Elmer DSC 8000, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Analizler, azot ortamında 10 mg örnek kullanılarak 20-200°C sıcaklık aralığında ve 5°C/dakika ısıtma hızında gerçekleştirilmiştir.

3.5.9 Amino asit kompozisyonunun belirlenmesi

Çemen otu tohumu protein izolatının amino asit kompozisyonunun belirlenmesi amacıyla UDE işlemi ile elde edilen protein izolatı örneklerine asit hidrolizi uygulanmış ve örneklerin amino asit kompozisyonları ultra hızlı sıvı kromatografisi (UFLC) yöntemi ile ultraviyole dedektör (UV) kullanılarak (Shimadzu 20A, Japonya) tespit edilmiştir. Kompozisyon analizleri aspartik asit, glutamik asit, serin, glisin, histidin, arjinin, treonin, alanin, prolin, trozin, valin, metiyonin, izolösin, lösin, fenilalanin, lizin ve triptofan için gerçekleştirilmiştir. Triptofan miktarı tayininde ise yüksek performanslı sıvı kromatografisi-flüoresans dedektör (HPLC-FLD) (Shimadzu 20A, Japonya) kullanılmıştır.

3.6 Çemen Otu Tohumu Protein İzolatı Katkılı Kap Kek Üretimi

Klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile optimum koşullarda elde edilen protein izolatları kullanılarak kap kek üretimi gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak üretilen ve protein izolatı içermeyen kap kek formülasyonu Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Kontrol grubu kap kek formülasyonu

<i>Bileşen</i>	<i>%</i>
Un	23.5
Şeker	20
Yumurta	18
Ayçiçek Yağı	18
Kabartma Tozu	1
Su	19.5
<i>Toplam</i>	100

Protein izolatı katkılı kap kek üretimi için, verilen formülasyondaki (Çizelge 3.3) un miktarı, %5, %10 ve %20 oranında klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile optimum koşullarda elde edilen protein izolatları ile değiştirilmiştir. Hazırlanan hamurlar (~40 g) alüminyum kap kek kalıplarına aktarıldıktan sonra konvektif bir fırında 180°C'de 15 dakika pişirilmiştir.

3.6.1 Hamurda kıvam ve yoğunluk ölçümü

Hamur örneklerinin kıvam ölçümü Bostwick konsistometresi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve örneklerin Bostwick değerleri (cm) belirlenmiştir (Baeva ve ark., 2000). Hamur yoğunluğu analizinde kek hamuru ağırlığı bilinen ve darası alınmış bir kaba konularak tartılmıştır. Aynı cam kaba sıcaklığı (25°C) ve yoğunluğu (997 kg/m³) belli olan saf su konulmuş ve su ağırlığı tartılmıştır. Hamur örneklerinin yoğunluk değerleri (kg/m³) hamur ağırlıklarının saf su ağırlığına oranlanması ve saf suyun yoğunluğu ile çarpılması sonucunda hesaplanmıştır.

3.6.2 Hamur ve kap keklerin renk özelliklerinin belirlenmesi

Hamur ile kap keklerin iç ve kabuk kısımlarının renk özellikleri CIE L^* , a^* ve b^* değerleri ölçülerek (Minolta, CR-300) belirlenmiştir. Kap keklerin iç ve kabuk kısımlarında toplam renk değişimi (ΔE) Eşitlik 3.8, kap keklerin esmerleşme indeksi (BI) Eşitlik 3.9 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (3.8)$$

Burada, $\Delta L^* = L_s^* - L_0^*$, $\Delta a^* = a_s^* - a_0^*$, $\Delta b^* = b_s^* - b_0^*$, ve '0' alt indisi hamur kontrol örneği için ölçülen değerleri, 's' indisi protein izolatı katkılı kap kekler için ölçülen değerleri ifade etmektedir.

$$BI = \frac{\left[100 \times \left(\frac{a^* + 1.79L^*}{5.645L^* + a^* - 3.012b^*} - 0.31 \right) \right]}{0.17} \quad (3.9)$$

3.6.3 Kap keklerin nem içeriği ve su aktivitesinin belirlenmesi

Kap keklerin nem içeriği, bütün bir kek ev tipi bir blender (Sinbo SHB 3020, Türkiye) ile parçalandıktan sonra, 70°C'de kızılötesi nem tayin cihazı (Shimadzu MOC-63U, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir. Kap keklerin su aktivitesi (a_w) değerleri, su aktivitesi ölçüm cihazı (AquaLab Model Series 3TE, ABD) kullanılarak ölçülmüştür. Kek üretiminde kullanılan hamurların ortalama nem içeriği %35.5±0.4, ortalama su aktivitesi ise 0.937±0.006 olarak belirlenmiştir.

3.6.4 Pişme veriminin belirlenmesi

Aynı koşullarda pişirilen kap kekler için pişme verimi, pişmiş ve soğutulmuş kek ağırlığının kalıba konan hamur ağırlığı ile oranlanması ve yüzde olarak ifadesi ile hesaplanmıştır (Eşitlik 3.10) (Majzoobi ve ark., 2014).

$$\text{Pişme verimi} = \frac{\text{Kap kek ağırlığı (g)}}{\text{Hamur ağırlığı (g)}} \times 100 \quad (3.10)$$

3.6.5 Yığın yoğunluğun belirlenmesi

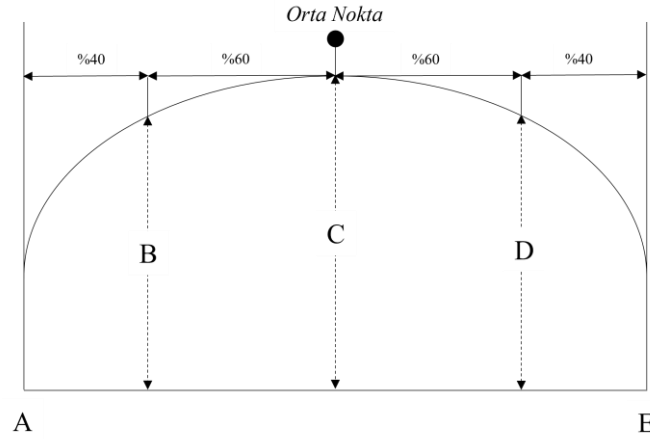
Kap keklerde yığın yoğunluk (kg/m^3), kek ağırlığının kek hacmiyle oranlanması ile hesaplanmıştır. Kap kek ağırlıkları hassas terazi ile ölçülmüş, hacmi ise kolza tohumunun yer değiştirme prensibi ile belirlenmiştir (AACC, 2000).

3.6.6 Sertlik tayini

Kap kek örnekleri için sertlik analizi, sertlik test cihazı kullanılarak (Zwick z0.5, Almanya) gerçekleştirilmiştir (Wirkijowska ve ark., 2020). Üretilen kekler bütün olarak silindirik probun (37.9 mm çap) altına yerleştirilmiştir. Cihazda başlangıç kuvveti 0.03 N ve örneğin sıkıştırma mesafesi (ΔL) 25 mm olarak seçilmiştir. Probun hareket hızı 35 mm/dakika olarak kullanılmıştır. Sıkıştırma işlemi bittiğinde sonuçlar cihaz ekranından Newton (N) olarak okunmuş ve kaydedilmiştir. Tüm analizler üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.6.7 Hacim, simetri ve üniformite indeksinin belirlenmesi

Kap keklerin hacim, simetri ve üniformite indekslerinin ölçümünde mekanik kumpas kullanılmıştır. Kekler dikey olarak merkezlerinden bıçak yardımıyla düzgünce kesilmiş ve boyutlar (B, C, D yükseklikleri) milimetrik şablondan (Şekil 3.3) okunmuştur. C kekin dikey yüksekliği (mm), B ve D ise kekin orta noktasından kek yatay uzunluğunun sağ ve sol tarafına %60 oranındaki uzaklığındaki noktalarda ölçülen dikey yüksekliklerdir (mm) (Şekil 3.3). Hacim indeksi Eşitlik 3.11, simetri indeksi Eşitlik 3.12 ve üniformite indeksi Eşitlik 3.13 kullanılarak hesaplanmıştır (Bekar, 2017).



Şekil 3.3. Hacim, simetri ve üniformite indekslerinin ölçümünde kullanılan şablon

$$\text{Hacim indeksi (mm)} = B + C + D \quad (3.11)$$

$$\text{Simetri İndeksi (mm)} = 2C - B - D \quad (3.12)$$

$$\text{Üniformite İndeksi (mm)} = B - D \quad (3.13)$$

3.6.8 Duyusal Analiz

UDE işlemi ile elde edilen protein izolatu katkılı kap kekler için duyusal analiz 9-nokta hedonik skala kullanılarak 10 yarı eğitimli panelist ile gerçekleştirilmiştir (Lawless ve ark., 2010). Protein izolatu içermeyen kontrol örneği ile formülasyondaki un miktarının %5, %10 ve %20 oranında protein izolatu ile yer değiştirdiği çemen otu tohumu protein izolatu katkılı kap kek örnekleri panelistler tarafından görünüş, renk, tekstür, tat, aroma ve genel beğeni bakımından değerlendirilmiştir. Panelistler için hazırlanan kap kek duyusal değerlendirme formu EK-I’de verilmiştir.

3.7 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 21.0 (SPSS Inc., USA) ve Design Expert 7.0 paket programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tahminlenen değerler ile deneysel veriler arasında fark olup olmadığını belirlemeye yönelik tek örnek t-testi ile örneklerin karşılaştırılmasında kullanılan ‘Univariate Varyans Analizi, Duncan post hoc’ testi SPSS 21.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm işlem değişkenlerinin etkisinin belirlenmesinde uygulanan regresyon analizi, istatistiksel analizler, izohips grafikleri,

yanıt yüzey grafikleri ve optimizasyon işlemleri Design Expert 7.0 (Stat-Ease, Inc., USA) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Klasik ekstraksiyon ve UDE işlemlerinin optimizasyonu için ekstraksiyon verimi yanıt olarak seçilmiş ve istenebilirlik (desirability) fonksiyonu yaklaşımı ile en yüksek ekstraksiyon verimini sağlayan koşullar belirlenmiştir. Regresyon analizi için kullanılan model Eşitlik 3.14'te verilmiştir.

$$\text{Ekstraksiyon Verimi (\%)} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_{ij} \quad (3.14)$$

$k=1, 2$

Burada, β_0 sabit katsayıyı, β_i i'inci gözlemin katsayısını, β_{ij} i'inci gözlemin j'inci katsayısını, k bağımsız değişken sayısını, X_i i'inci bağımsız değişkeni, X_{ij} ise i'inci gözlemin j'inci bağımsız değişkenini ifade etmektedir.

Elde edilen sonuçlara göre işlem değişkenlerinin yanıt üzerindeki etkisi varyans analizi (ANOVA) tablosu kullanılarak belirlenmiştir. Varyans analizleri Design Expert Version 7.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca, her bir bağımsız değişkenin yanıt üzerindeki lineer, interaksiyon ve kuadratik etkilerinin istatistiksel olarak önemliliği de belirlenmiştir. Etkilerin istatistiksel olarak model açısından önemliliği 'p' değerinden bulunmuştur. Ayrıca, deneysel dizaynların merkez noktalarında yapılan tekrarlar ile kalıntı hata değerleri, saf deneysel hata ve model uygunsuzluğu olarak ayrılmış ve ANOVA çizelgesinde gösterilmiştir. Belirlenen optimum koşullarda üç adet deneme yapılarak doğrulama testleri gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Çemen Otu Tohumundan Proteinlerin Ekstraksiyonu

4.1.1 Klasik ekstraksiyon işlemi

Çemen otu tohumunda bulunan proteinlerin klasik ekstraksiyon işlemi için kullanılan deneysel tasarım ve elde edilen ekstraksiyon verimleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Sonuçlara göre, en yüksek ekstraksiyon verimi (93.13 ± 1.36) katı-çözgen oranının 20 g/L, pH değerinin 12.0 olduğu koşulda elde edilmiştir. En düşük ekstraksiyon verimi ise katı-çözgen oranının 60 g/L, pH değerinin 6.0 olduğu koşulda belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Tüm pH’larda katı-çözgen oranının en yüksek olduğu (60 g/L) koşulda en düşük ekstraksiyon verimleri gözlenmiştir. Protein ekstraksiyon verimlerinin katı-çözgen oranının yüksek olduğu durumlarda azalması, ekstraksiyon ortamında bulunan protein harici bileşenlerin (gam, müsilaaj vb.) protein ekstraksiyonunu zorlaştırması ile açıklanabilmektedir (Tan ve ark., 2021). Düşük katı-çözgen oranlarında (20-40 g/L) daha etkin bir karıştırma işlemi sağlanması ve katı-çözgen temas yüzeyinin artması ile protein ekstraksiyonu verim değerlerinin artış gösterdiği düşünülmektedir. Klasik protein ekstraksiyonu işleminde bir diğer bağımsız değişken olarak seçilen pH değerinin de ekstraksiyon verimini etkilediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Tüm katı-çözgen oranlarında artan pH değerlerinde ekstraksiyon verimlerinin arttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Artan pH değerlerinde ekstraksiyon veriminin artması, çemen otu tohumunda bulunan proteinlerin yüksek pH değerlerinde çözünürlüğünün artması ile ilişkilendirilmektedir. Feyzi ve ark. (2015) benzer şekilde alkali ortamda (pH 9.25) çemen otu tohumu proteinlerinin çözünürlüklerinin artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Jarpa-Parra ve ark. (2014), mercimekten protein ekstraksiyonunda $pH \geq 9.0$ değerlerinin kullanılması ile ekstraksiyon veriminin ve elde edilen proteinlerin saflığının arttığını bildirmişlerdir. Gao ve ark. (2020), çemen otu tohumu gibi baklagiller familyasına ait olan sarı bezelyeden protein ekstraksiyonunu klasik alkali yöntem kullanarak gerçekleştirmişler ve pH artışı ile protein ekstraksiyon veriminin artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Gerçekleştirilen tez çalışmasında elde edilen sonuçların literatürde gerçekleştirilen klasik alkali ekstraksiyon çalışmaları ile uyum içinde olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.1. Klasik ekstraksiyon işleminde protein ekstraksiyon verimleri

Katı-Çözgen (g/L)	pH	Ekstraksiyon verimi (%)
40	9.0	84.72 (± 0.68)
20	6.0	58.62 (± 1.36)
60	9.0	68.30 (± 0.72)
40	9.0	83.76 (± 0.41)
40	9.0	85.96 (± 0.27)
20	12.0	93.13 (± 1.36)
60	12.0	80.12 (± 0.63)
40	12.0	91.71 (± 0.54)
40	9.0	85.00 (± 0.54)
40	9.0	84.43 (± 0.81)
40	6.0	54.52 (± 1.08)
20	9.0	85.46 (± 1.90)
60	6.0	41.14 (± 0.27)

Çemen otu tohumunda bulunan proteinlerin klasik ekstraksiyon işleminin optimizasyonu için ekstraksiyon verimi yanıt olarak seçilmiş ve ikinci dereceden polinomiyal bir model oluşturulmuştur. Çizelge 4.2’de verilen ANOVA tablosuna göre, oluşturulan model istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$), model uygunsuzluğu ise istatistiksel olarak anlamsız ($p > 0.05$) bulunmuştur. Katı-çözgen oranı ve pH’nın ekstraksiyon verimine olan lineer ve kuadratik etkilerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Buna karşın katı-çözgen oranı-pH interaksiyonunun ekstraksiyon verimine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$) (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Klasik ekstraksiyon işlemi için oluşturulan ANOVA tablosu ve istatistiksel parametreler

Varyasyon Kaynağı	SD	Kareler Toplamı	F Değeri	p - Değeri
Model	5	3055.79	417.80	< 0.0001
X ₁	1	378.55	258.79	< 0.0001
X ₂	1	2041.64	1395.72	< 0.0001
X ₁ X ₂	1	5.00	3.42	0.1069
X ₁ ²	1	114.18	78.06	< 0.0001
X ₂ ²	1	286.98	196.19	< 0.0001
Kalıntı	7	10.24		
Model Uygunsuzluğu	3	7.62	3.88	0.1118
Saf Hata	4	2.62	417.80	< 0.0001
Toplam	12	3066.03		

R²: 0.9967, düz-R²: 0.9943, Yeterli Tahminleme: 64.234, Tahminlenmiş Kalıntı Hata Kareler Toplamı: 60.10, Varyasyon Katsayısı (%):1.58

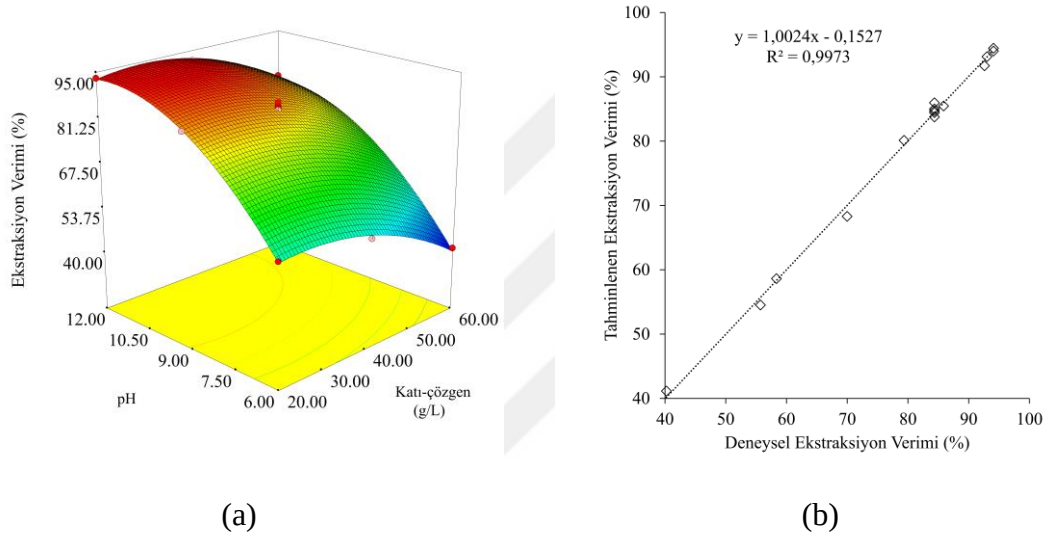
X₁: katı-çözgen oranı, X₂: pH

Faktörlerin gerçek değerleri cinsinden yazılan model eşitliği Eşitlik 4.1’de verilmiştir. Yanıt için oluşturulan bu model için Çizelge 4.2’de R², düzeltilmiş R² (düz-R²), yeterli tahminleme (adequate precision), tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı (PRESS) ve varyasyon katsayısı (C.V.) değerleri ayrıca gösterilmiştir. İstatistiksel veriler ile modelin uygunluğu tekrar doğrulanmıştır. Ayrıca, R² ve düz-R² değerlerinin birbirine yakın olması, modelin istatistiksel olarak önemsiz terimleri içermediğinin ifadesidir.

$$\text{Ekstraksiyon verimi (\%)} = -65.85 + 0.72X_1 + 25.79X_2 - 0.02X_1^2 - 1.13X_2^2 \quad (4.1)$$

Çemen otu tohumundan klasik ekstraksiyon işlemi ile protein ekstraksiyonunun optimizasyonu istenebilirlik (desirability) fonksiyonu yaklaşımı ile gerçekleştirilmiştir. En yüksek istenebilirlik değerinin (d=1.0) elde edildiği katı-çözgen oranının 34.50 g/L ve pH’nın 11.47 olduğu belirlenmiş ve bu koşullar optimum ekstraksiyon işlem koşulları olarak seçilmiştir. Belirlenen optimum koşullarda tahminlenen protein ekstraksiyon veriminin %94.08 olduğu görülmüştür. Optimum koşulun deneysel olarak doğrulanması için doğrulama denemeleri üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve deneysel ekstraksiyon verimi %94.29±0.26 olarak tespit edilmiştir. Yanıt için optimum nokta

doğrulama denemelerinden elde edilen ortalama sonuçlar ile modelden tahminlenen değerler arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark olup olmadığı tek örnek t–testi uygulanarak belirlenmiş, deneysel ekstraksiyon veriminin istatistiksel olarak tahminlenen değerden farklı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Şekil 4.1’de bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (Şekil 4.1a) ile tahminlenen ve deneysel veriler arasındaki ilişkiyi gösteren grafik (Şekil 4.1b) verilmiştir. Oluşturulan modelin uygunluğu, tahminlenen ve deneysel değerlerin birbirine yakınlığı ile doğrulanmıştır.



Şekil 4.1. (a) Klasik ekstraksiyon işlemi için yanıt yüzey grafiği, (b) tahminlenen ve deneysel veriler arasındaki ilişki

4.1.2 Ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemi

Çemen otu tohumlarında bulunan proteinlerin ekstraksiyonu için uygulanan ultrasonik destekli ekstraksiyon (UDE) işleminde, klasik ekstraksiyonda optimum koşulda belirlenen ve proteinlerin çözünürlüğünün en yüksek olduğu çözgen pH değeri (pH 11.47) sabit tutulmuştur. UDE işlemi için kullanılan deneysel tasarım ve elde edilen ekstraksiyon verimleri Çizelge 4.3’te verilmiştir. Ultrasonikasyon genlik değerinin düşük olduğu noktalarda düşük verim değerlerinin elde edildiği görülmüştür. Sonuçlara göre, en yüksek ekstraksiyon verimi 98.48 ± 0.79 ile katı-çözgen oranının 60 g/L, genlik değerinin %80 olduğu koşulda elde edilmiştir. En düşük ekstraksiyon verimi ise katı-çözgen oranının 60 g/L, genlik değerinin %30 olduğu koşulda 51.10 ± 1.07 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Klasik ekstraksiyonda 120 dakikalık ekstraksiyon süresi sonunda elde edilen en

yüksek ekstraksiyon verimi ~%93 olmasına karşın, UDE işlemi ile 30 dakikalık sürede ekstraksiyon verimi ~%98'e ulaşmıştır. UDE işleminde ekstraksiyon süresi çok daha kısa olmasına rağmen daha yüksek ekstraksiyon verimleri elde edilmesi bu işlemin klasik ekstraksiyona göre üstünlüğünü ortaya koymuştur. Ayrıca, klasik ekstraksiyon işleminde yüksek katı-çözgen oranlarında ekstraksiyon verimi düşerken, UDE işleminde yüksek katı-çözgen oranlarında yüksek ekstraksiyon verimleri elde edilmiştir. Bu durum çözgen tüketiminin de azaltılmasını sağlamıştır. UDE işleminin etkinliği, ekstraksiyon ortamında gerçekleşen mekanik titreşimlerin katı ile çözgen arasındaki temas yüzey alanını artırması ile açıklanabilmektedir. Ayrıca, ultrasonikasyon ile meydana gelen kavitasyonun hücre duvarını parçalaması, moleküler düzeyde bağları kırması ve kütle transfer hızını artırması neticesinde daha etkili bir ekstraksiyon sağlanabilmektedir (Görgüç ve ark., 2019). Chemat ve ark. (2017) protein ekstraksiyonunda UDE işleminin ekstraksiyon süresini kısalttığını, enerji kullanımını düşürdüğünü, çözgen kullanım miktarını azalttığını, çözeltinin homojenitesini artırdığını, sıcaklık gradyanını azalttığını ve daha iyi proses kontrolü sağladığını vurgulamışlardır.

Wang ve ark. (2020)'nın, bezelye proteinlerini ekstrakte ettikleri çalışmalarında, klasik ekstraksiyonda 30 dakikada elde edilen ~%72 ekstraksiyon verimi, UDE işlemi ile 13.5 dakikada ~%83 seviyesine çıkartılmıştır. Zhu ve ark. (2009) buğday tohumlarından protein ekstraksiyonunu gerçekleştirdikleri çalışmada, ekstraksiyon veriminin ultrasonik prob kullanımı ile klasik ekstraksiyon işlemine göre aynı ekstraksiyon süresinde %37-57 oranında arttığını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Karki ve ark. (2010) soya tohumlarından protein ekstraksiyonunda ultrasonik probun kullanımı ile verimin klasik ekstraksiyon işlemine göre %46 artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Li ve ark. (2017), pirinç tozundan ultrasonik probun kullanımı ile toplam protein veriminin %90 olduğunu tespit etmişlerdir. Literatürde gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde genel olarak UDE işleminin klasik ekstraksiyona göre protein ekstraksiyon verimini artırdığı, ekstraksiyon süresini kısalttığı ve çözgen kullanımını azalttığı görülmüştür.

Çizelge 4.3. Ultrasonik destekli ekstraksiyon işleminde protein ekstraksiyon verimleri

Katı-Çözgen (g/L)	Genlik (%)	Ekstraksiyon verimi (%)
60	30	51.10 (±1.07)
40	55	94.20 (±0.77)
40	55	94.72 (±0.59)
60	55	92.13 (±1.03)
20	30	61.24 (±0.59)
40	80	91.89 (±1.39)
40	55	96.01 (±0.59)
40	55	93.95 (±1.18)
40	55	94.72 (±1.18)
20	80	85.58 (±0.80)
60	80	98.48 (±0.79)
40	30	56.61 (±0.80)
20	55	92.53 (±1.56)

Çemen otu tohumunda bulunan proteinlerin UDE işlemi ile ekstraksiyonunun optimizasyonu için ekstraksiyon verimi bağımlı değişken olarak seçilmiş ve ikinci dereceden polinomiyal bir model oluşturulmuştur. Çizelge 4.4'te verilen ANOVA tablosuna göre, oluşturulan polinomiyal model istatistiksel olarak anlamlı olup ($p<0.05$), model uygunsuzluğu istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0.05$). Katı-çözgen oranının lineer ve kuadratik etkileri istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$). Buna karşın, ultrasonikasyon genliğinin lineer ve kuadratik etkilerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Ayrıca, katı-çözgen oranı-genlik interaksiyonunun ekstraksiyon verimi üstündeki etkisi istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$) (Çizelge 4.4). Faktörlerin gerçek değerleri cinsinden yazılan model eşitliği Eşitlik 4.2'de verilmiştir. Çizelge 4.4'te ekstraksiyon verimi için oluşturulan modele ait R^2 , düzeltilmiş R^2 , yeterli tahminleme, tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı ve varyasyon katsayısı değerleri ayrıca gösterilmiştir. İstatistiksel veriler ile modelin uygunluğu tekrar doğrulanmıştır. Ayrıca, R^2 ve düz- R^2 değerlerinin birbirine yakın olması, modelin istatistiksel olarak önemsiz terimleri içermediğinin ifadesidir.

$$\text{Ekstraksiyon verimi (\%)} = -19.32 + 3.66X_2 + 0.01X_1X_2 - 0.03X_2^2 \quad (4.2)$$

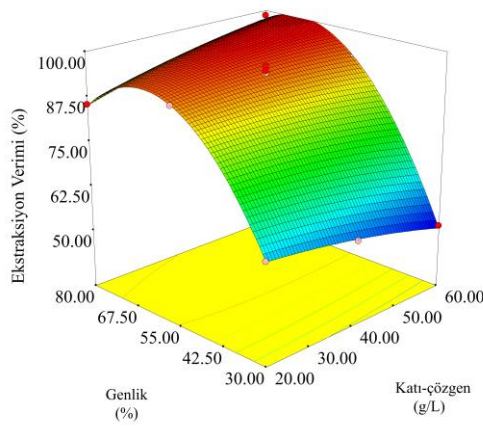
Çizelge 4.4. Ultrasonik destekli ekstraksiyonda için oluşturulan ANOVA tablosu ve istatistiksel parametreler

Varyasyon Kaynağı	SD	Kareler Toplamı	F Değeri	p - Değeri
Model	5	3323.70	650.23	< 0.0001
X ₁	1	0.93	0.91	0.3715
X ₂	1	1907.73	1866.08	< 0.0001
X ₁ X ₂	1	132.77	129.87	< 0.0001
X ₁ ²	1	4.71	4.61	0.0690
X ₂ ²	1	1038.19	1015.53	< 0.0001
Kalıntı	7	7.16		
Model Uygunsuzluğu	3	4.64	2.45	0.2030
Saf Hata	4	2.52	650.23	< 0.0001
Toplam	12	3330.85		

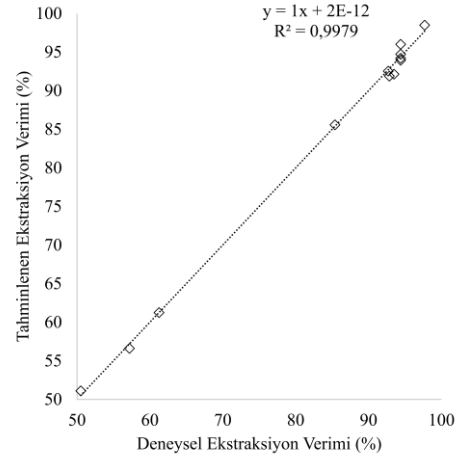
R²: 0.9979, düz-R²: 0.9963, Yeterli Tahminleme: 68.692, Tahminlenmiş Kalıntı Hata Kareler Toplamı: 39.22, Varyasyon Katsayısı. (%):1.01

X₁: katı-çözgen oranı, X₂: genlik

Çemen otu tohumundan UDE işlemi ile protein ekstraksiyonunun optimizasyonu istenebilirlik (desirability) fonksiyonu yaklaşımı ile belirlenmiştir. En yüksek istenebilirlik değerinin (d=1.0) elde edildiği durumda katı-çözgen oranının 43.83 g/L ve genlik değerinin %67.51 olduğu belirlenmiş ve bu koşullar optimum ekstraksiyon işlem koşulları olarak seçilmiştir. Bu koşullarda tahminlenen protein ekstraksiyon verimi (%99.06) ile gerçekleştirilen deneysel doğrulama test sonuçları (%98.74±0.49) arasında istatistiksel olarak belirgin bir fark olmadığı görülmüştür (p>0.05). Şekil 4.2’de bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (Şekil 4.2a) ile tahminlenen ve deneysel veriler arasındaki ilişkiyi gösteren grafik (Şekil 4.2b) gösterilmiştir. Oluşturulan modelin uygunluğu, tahminlenen ve deneysel değerlerin birbirine yakınlığı ile doğrulanmıştır.



(a)



(b)

Şekil 4.2. (a) Ultrasonik destekli ekstraksiyon için yanıt yüzey grafiği (b) tahminlenen ve deneysel veriler arasındaki ilişki

4.2 Protein İzolatlarının Karakterizasyonu

Çemen otu tohumunda bulunan proteinler klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile ekstrakte edildikten sonra, izoelektrik noktada çöktürülmüş, liyofilize edilmiş ve elde edilen protein izolatları karakterize edilmiştir. Klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri için tüm ekstraksiyon koşullarında protein izolatu üretimi gerçekleştirilmiştir ve protein izolatlarının görüntüleri EK-II’de verilmiştir. Farklı ekstraksiyon koşullarında elde edilen protein izolatlarının koagüle protein yüzdesi, çözünürlük, su tutma kapasitesi, yağ tutma kapasitesi, köpük kapasitesi, köpük stabilitesi, emülsiyon stabilitesi, emülsiyon aktivitesi ve emülsiyon kapasitesi ortaya konmuştur. Ayrıca, klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile optimum koşullarda ekstrakte edilerek üretilen protein izolatlarının molekül ağırlıkları, yapısal özellikleri, termal özellikleri ve amino asit kompozisyonu belirlenmiştir.

4.2.1 Koagüle protein yüzdesi

Koagüle protein, 100°C’de 15 dakikalık süre ile uygulanan ısı işlem sonrasında koagüle olan çözünür durumdaki proteinlerin yüzdesini ifade etmektedir (Feyzi ve ark., 2017). Klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının koagüle

protein değerlerinin %3.01-4.96 aralığında değiştiği belirlenmiştir. Klasik ekstraksiyon işleminde artan pH değerlerinde koagüle protein değerlerinde azalma saptanmıştır ($p<0.05$) (Çizelge 4.5). Klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein izolatlarının belirlenen koagüle protein yüzdelerinin, Feyzi ve ark. (2015) tarafından çemen otu tohumu kullanarak gerçekleştirdikleri çalışma ile uyumlu olduğu görülmüştür. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada koagüle protein değerini %3.17 olarak belirlemişler ve klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen proteinlerin, düşük koagüle protein yüzdeleri sebebiyle, yüksek besin değerine sahip içeceklerin ve protein katkılı meyve sularının üretiminde kullanılabileceğini vurgulamışlardır (Feyzi ve ark., 2015). UDE işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu proteinlerinin koagüle protein değerlerinin %15.82-31.17 aralığında değiştiği belirlenmiştir. UDE işleminde genlik değeri arttıkça koagüle protein yüzdesinin arttığı tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.6). Tez çalışmasında UDE işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının koagüle protein yüzdelerinin klasik ekstraksiyon örneklerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ultrasonikasyon işleminin proteinlerin koagülasyon özelliklerini artırdıkları bildirilmiştir (Akdeniz ve Akalın, 2019). UDE işlemi ile elde edilen proteinlerin yüksek koagüle protein yüzdeleri bu protein izolatlarının jel ve köpük oluşturmada kullanılabileceğini göstermektedir (Kramer ve Kwee, 1977; Butt ve Rizwana, 2010).

4.2.2 Su ve yağ tutma kapasiteleri

Proteinlerin su tutma kapasitesi hazır çorbalar gibi viskoz ürünler, şekerlemeler, makarnalar, hamur ve fırıncılık ürünleri için önem taşıyan fonksiyonel bir özelliktir. Bu tip ürünlerde, proteinlerin çözünürlük özelliklerine bağlı olmadan suyu emmesi ile istenilen viskozite düzeyine ulaşılması arzu edilmektedir (Wani ve ark., 2011). Tez çalışmasında, klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının su tutma kapasitelerinin 2.04-2.73 g/g aralığında değiştiği tespit edilmiştir. En yüksek su tutma kapasitesi değerlerinin pH 12.0'de ekstrakte edilen örneklerle ait olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Gerçekleştirilen diğer çalışmalarda, çemen otu tohumu protein konsantratu için su tutma kapasitesi değeri 1.56 g/g (El Nasri ve El Tinay, 2007), çemen otu tohumu protein izolatı için 2.70 g/g (Feyzi ve ark., 2015) ve 3.52 g/g (Abdel-Aal ve ark., 1986) olarak belirlenmiştir. Literatürde klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen bitkisel kaynaklı bazı proteinler için su tutma kapasitelerinin tespit edildiği

çalışmalar mevcuttur. Liu ve ark. (2023) keten tohumundan klasik ekstraksiyon işlemiyle protein izolatu ürettikleri çalışmalarında, keten tohumu protein izolatlarını karakterize etmişler ve 0.83–1.05 g/g aralığında su tutma kapasitesi değerlerine ulaşmışlardır. Kaur ve Ghosal (2022) yağı giderilmiş ayçiçeği küspesinden protein izolatu ürettikleri çalışmada su tutma kapasitesi değerini 2.00 g/g olarak belirlemişlerdir. Yancheshmeh ve ark. (2022) fiğ tohumundan protein izolatu elde ettikleri çalışmada su tutma kapasitesi değerinin 2.01 g/g olduğunu bildirmişlerdir. Literatürde yapılan çalışmalar ile kıyaslandığında, klasik ekstraksiyon işleminde optimum koşullarda elde edilen çemen otu tohumu protein izolatu için belirlenen 2.64 ± 0.04 g/g su tutma kapasitesi değerinin birçok bitkisel kaynaklı protein izolatına göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

UDE işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının su tutma kapasitesi değerlerinin 2.18-3.15 g/g aralığında değiştiği, optimum koşullarda üretilen çemen otu tohumu protein izolatının su tutma kapasitesi değerinin ise 2.68 ± 0.01 g/g olduğu belirlenmiştir. UDE işleminde özellikle düşük genlik değerleri kullanıldığında su tutma kapasitesi değerlerinin önemli oranda artış gösterdiği görülmüştür ($p < 0.05$) (Çizelge 4.6). UDE işleminde yüksek güç veya yüksek genlik değerleri kullanıldığında, partikül boyutunun küçülmesine bağlı olarak su tutma kapasitesi değerlerinin azalabileceği bildirilmiştir (Mir ve ark., 2019).

Klasik ekstraksiyon işlemi ile ekstrakte edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının yağ tutma kapasitesi değerlerinin 1.46-2.10 g/g aralığında değiştiği tespit edilmiştir. En yüksek yağ tutma kapasitesi değerlerinin, su tutma kapasitesi değerlerine benzer şekilde, pH 12.0'de gerçekleştirilen ekstraksiyonlar sonucunda üretilen protein izolatları için elde edildiği görülmüştür ($p < 0.05$) (Çizelge 4.5). Optimum koşullarda elde edilen yağ tutma kapasitesi değerinin ise 2.00 ± 0.01 g/g olduğu belirlenmiştir. El Nesri ve El Tinay (2007) çemen otu tohumu protein konsantratu için yağ tutma kapasitesi değerini 1.56 g/g olarak tespit etmişlerdir. Feyzi ve ark. (2015), çemen otu tohumu protein izolatu için yağ tutma kapasitesi değerini 6.06 ± 0.28 g/g olarak belirlemişlerdir. Farklı yağ tutma kapasitesi değerlerinin ekstraksiyon koşulları ve tohumların yetiştirildiği iklim ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Feyzi ve ark., 2015).

UDE işlemleri ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının yağ tutma kapasitesi değerlerinin 2.60-4.09 g/g aralığında değiştiği tespit edilmiştir. En yüksek yağ tutma kapasitesi değerlerinin genlik değerinin %80 olduğu koşullarda elde edildiği belirlenmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.6). UDE işleminde optimum koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyonda elde edilen protein izolatu için yağ tutma kapasitesi 3.85 ± 0.02 g/g olarak tespit edilmiştir. Bu değerin, klasik ekstraksiyon işlemi ile optimum koşulda elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının yağ tutma kapasitesi değerinden %92.5 daha yüksek olduğu belirlenmiştir. UDE işlemi neticesinde yağ tutma kapasitesindeki artış, uygulanan ultrasonikasyonun proteinlerin yapısındaki hidrofobik grupları açığa çıkarması ile açıklanabilir (Resendiz-Vazquez ve ark., 2017).

4.2.3 Köpük özellikleri

Köpük kapasitesi, proteinlerin çırpma veya köpürme esnasında hava-sıvı ara yüzeyinde hızlı bir şekilde adsorbe olma ve moleküller arası etkileşimler yoluyla kohezif visko-elastik bir film oluşturma kabiliyetinin göstergesidir (Mine, 1995). Köpük kapasitesi, homojenizasyon işleminden hemen sonra örnekte elde edilen köpüğün toplam örnek hacmine oranı olarak ifade edilirken, köpük stabilitesi homojenizasyon işleminden belirli bir süre sonra köpük hacminin hangi oranda korunduğunu ifade etmektedir (Figueroa-González ve ark., 2022). Klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının köpük kapasiteleri %10.67-18.00 ve köpük stabilitesi %51.92-69.67 aralığında tespit edilmiştir. En yüksek köpük kapasitesi ve köpük stabilitesi değerlerinin pH 12.0'de gerçekleştirilen ekstraksiyonlar sonucunda elde edildiği belirlenmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.5). Klasik ekstraksiyon işleminde optimum koşulda elde edilen protein izolatu için köpük kapasitesi 19.00 ± 1.00 ve köpük stabilitesi 74.13 ± 2.16 olarak belirlenmiştir. Feyzi ve ark. (2018b), liyofilize çemen otu tohumu protein izolatu için köpük kapasitesi ve köpük stabilitesi değerlerini sırası ile 60.00 ± 0.31 ve 86.43 ± 1.05 olarak belirlemişlerdir.

UDE işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının köpük kapasiteleri %16.33-21.33 ve köpük stabilitesi %59.68-78.06 aralığında tespit edilmiştir. %30 genlik değeri kullanıldığında köpük stabilitesi değerlerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Düşük sonikasyon genliği değerlerinde istatistiksel olarak

anlamalı artış gösteren köpük stabilitesinin genlik arttıkça azaldığı bulgulanmıştır ($p<0.05$) (Çizelge 4.6). UDE işleminde optimum koşulda elde edilen protein izolatu için köpük kapasitesi $\%21.67\pm0.58$ ve köpük stabilitesi $\%69.26\pm1.87$ olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda, UDE işleminde elde edilen protein izolatlarının klasik ekstraksiyonla elde edilen izolatlarla göre daha düşük köpük stabilitesine sahip olmasının sebebinin, UDE işleminde elde edilen proteinlerin çözünürlüğünün daha yüksek olması olduğu düşünülmektedir. UDE işleminde optimum noktada elde edilen protein izolatlarının köpük kapasitesindeki artış ultrasonikasyonun proteinlerin hidrofobik gruplarını açığa çıkarması ve protein yapısında meydana gelen kısmi denatürasyon ile açıklanabilmektedir (Wang ve ark., 2020). Tez çalışmasına benzer şekilde Feyzi ve ark. (2018b), çemen otu tohumu protein izolatu için köpük kapasitesi değerini $\%19$, köpük stabilitesi değerini ise $\%65$ olarak belirlemişlerdir.

4.2.4 Emülsifikasyon özellikleri

Proteinler amfifilik yapıları gereği birbiri ile karışmayan ve termodinamik olarak stabil olmayan su-yağ ara yüzeyinde, yağ damlacıkları çevresinde bir katman oluşturarak topaklanma ve kremalaşmayı önleyebilmektedir (McClements, 2005). Bitkisel kaynaklı proteinlerin emülsifikasyon özellikleri gıda endüstrisinde kullanılabilmeleri için büyük önem taşımaktadır. Çemen otu tohumu protein izolatlarının emülsifikasyon özellikleri emülsiyon stabilitesi, emülsiyon aktivitesi ve emülsiyon kapasitesi belirlenerek ortaya konmuştur. Emülsiyon kapasitesi, belirli bir miktar protein tarafından emülsifiye edilebilecek maksimum yağ miktarı olarak tanımlanmakta ve yüzde olarak ifade edilmektedir (Pearce ve Kinsella, 1978). Emülsiyon aktivitesi bulanıklığı esas alarak spektrofotometrik olarak ölçülen, birim protein başına meydana gelen maksimum emülsiyon yüzey alanı olarak tanımlanmaktadır (Yi-Shen ve ark., 2018). Emülsiyon stabilitesi ise zamanla bulanıklıkta izlenen değişim esas alınarak tespit edilmektedir (Kiosseoglou ve ark., 2021). Klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının emülsiyon stabilitelerinin 23.65-28.06 dakika aralığında değiştiği gözlenmiştir (Çizelge 4.5). Klasik ekstraksiyon işleminde optimum koşulda elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının emülsiyon stabilitesi ise 28.73 ± 0.35 dakika olarak belirlenmiştir. Feyzi ve ark. (2018b), farklı çözgenler kullanarak yağ giderme işlemi gerçekleştirdikleri çemen otu tohumlarından ekstrakte ettikleri protein izolatları için

emülsiyon stabilitesi değerlerini 11.59-22.23 dakika aralığında belirlemişlerdir. Tez çalışmasında elde edilen emülsiyon stabilitesi değerlerinin literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür. UDE işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının emülsiyon stabilitelerinin 30.20-34.50 dakika aralığında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.6). UDE işleminde optimum koşulda elde edilen protein izolatları için emülsiyon stabilitesi değeri 34.65 ± 0.28 dakika olarak bulgulanmıştır. UDE işlemi neticesinde izole edilen çemen otu tohumu proteinlerinin emülsiyon stabilitelerinin, klasik ekstraksiyon ile elde edilenlere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ultrasonikasyon işleminin moleküler esnekliği artırması sonucunda protein moleküllerinin su-yag ara yüzüne daha etkin şekilde adsorbe olduğu düşünülmektedir (YanJun ve ark., 2014).

Klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının emülsiyon aktivitelerinin $75.82-80.95 \text{ m}^2/\text{g}$ aralığında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Klasik ekstraksiyon işleminde optimum koşulda elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının emülsiyon aktivitesi ise $78.21 \pm 0.28 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak tespit edilmiştir. Feyzi ve ark. (2018b) çemen otu tohumlarından ekstrakte ettikleri protein izolatları için emülsiyon aktivitesi değerlerini $70.00-93.28 \text{ m}^2/\text{g}$ aralığında belirlemişlerdir. Tez çalışmasında elde edilen emülsiyon aktivitesi değerlerinin literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür. UDE işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının emülsiyon aktiviteleri $73.83-76.79 \text{ m}^2/\text{g}$ aralığında tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). UDE işleminde optimum koşulda elde edilen protein izolatları için emülsiyon aktivitesi $73.86 \pm 0.27 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak belirlenmiştir. Genlik değerleri ile emülsiyon aktivitesi değerleri arasında herhangi bir korelasyon gözlenmemiş ve klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein izolatları için elde edilen değerler ile benzer sonuçlar bulgulanmıştır. Klasik ekstraksiyon ve UDE işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının emülsiyon aktivitesi değerlerinin soya proteini (L'hocine ve ark., 2006), moringa tohumu proteini (Cattan ve ark., 2022), bezelye proteini (Wang ve ark., 2020) ve kudret narı proteininden (Horax ve ark., 2011) yüksek, keten tohumu proteininden (Kaushik ve ark., 2016) düşük olduğu belirlenmiştir.

Klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının emülsiyon kapasitelerinin $\%18.30-26.00$ aralığında değiştiği görülmüştür (Çizelge 4.5). Klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının yüksek

pH değerlerinde ekstrakte edildiklerinde daha yüksek emülsiyon kapasitesine sahip oldukları belirlenmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.5). Klasik ekstraksiyon işleminde optimum koşulda elde edilen ĉemen otu tohumu protein izolatlarının emülsiyon kapasitesi $\%26.52\pm0.26$ olarak tespit edilmiştir. Feyzi ve ark. (2018b) ĉemen otu tohumu protein izolatı için en yüksek emülsiyon kapasitesini pH 3.0 için $\%39$, pH 10 için $\%34$ olarak belirlemişlerdir. UDE işlemi ile elde edilen ĉemen otu tohumu protein izolatlarının emülsiyon kapasitelerinin $\%26.89-30.52$ aralığında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.6). UDE işleminde optimum koşulda elde edilen ĉemen otu tohumu protein izolatlarının emülsiyon kapasitesi ise $\%31.19\pm0.26$ olarak tespit edilmiştir. Tez alışmasında UDE işleminin tüm koşulları için elde edilen emülsiyon kapasitesi değerlerinin klasik ekstraksiyona göre daha yüksek olduğu bulgulanmıştır (Çizelge 4.5, Çizelge 4.6). Bu durum, protein çözünürlüğünün azaldığı durumda emülsiyon kapasitesinin azalması ve UDE işlemi ile elde edilen protein izolatının yağ tutma kapasitesinin daha yüksek olması ile açıklanabilir (Çizelge 4.5, Çizelge 4.6) (Liang ve Tang, 2014, Feyzi ve ark., 2018b).

Çizelge 4.5. Klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein izolatlarının karakterizasyonu

	Katı- pH Çözgen (g/L)	Köpük kapasitesi (%)	Köpük stabilitesi (%)	Su tutma (g/g)	Yağ tutma (g/g)	Koagüle protein (%)	Emülsiyon stabilitesi (dak)	Emülsiyon aktivitesi (m ² /g)	Emülsiyon kapasitesi (%)
6	20	11.50 (±0.71) ^c	52.80 (±2.45) ^d	2.13 (±0.03) ^d	1.57 (±0.02) ^d	4.81 (±0.26) ^a	23.65 (±0.03) ^g	77.46 (±0.25) ^e	19.26 (±0.34) ^f
	40	11.50 (±0.71) ^c	68.06 (±1.20) ^{ab}	2.04 (±0.01) ^e	1.52 (±0.03) ^e	4.98 (±0.26) ^a	24.03 (±0.09) ^f	76.55 (±0.12) ^f	19.93 (±0.34) ^{ef}
	60	10.67 (±0.58) ^c	51.92 (±2.72) ^d	2.04 (±0.03) ^e	1.46 (±0.04) ^f	5.06 (±0.13) ^a	23.83 (±0.06) ^{fg}	76.15 (±0.21) ^{fg}	18.30 (±0.34) ^g
9	20	14.00 (±1.00) ^b	60.66 (±2.60) ^c	2.18 (±0.02) ^c	1.91 (±0.02) ^c	3.69 (±0.13) ^c	25.15 (±0.12) ^e	76.11 (±0.24) ^{fg}	20.96 (±0.68) ^d
	40	15.00 (±1.00) ^b	63.33 (±4.71) ^{bc}	2.18 (±0.03) ^c	1.98 (±0.02) ^b	4.02 (±0.28) ^{bc}	25.59 (±0.09) ^d	75.82 (±0.10) ^g	20.52 (±0.56) ^{de}
	60	14.00 (±0.00) ^b	61.25 (±1.77) ^c	2.19 (±0.01) ^c	1.89 (±0.01) ^c	4.15 (±0.18) ^b	25.49 (±0.23) ^d	78.53 (±0.46) ^d	21.85 (±0.68) ^c
12	20	17.00 (±0.00) ^a	64.29 (±0.00) ^{abc}	2.66 (±0.02) ^b	2.07 (±0.04) ^a	3.07 (±0.27) ^d	28.30 (±0.24) ^a	79.62 (±0.26) ^c	25.19 (±0.34) ^b
	40	18.00 (±0.00) ^a	69.67 (±1.30) ^a	2.65 (±0.04) ^b	2.09 (±0.03) ^a	3.08 (±0.21) ^d	27.78 (±0.13) ^c	80.39 (±0.29) ^b	26.15 (±0.46) ^a
	60	17.00 (±0.00) ^a	69.44 (±3.93) ^a	2.73 (±0.02) ^a	2.10 (±0.02) ^a	3.16 (±0.18) ^d	28.06 (±0.04) ^b	80.95 (±0.22) ^a	26.00 (±0.22) ^a

^{a-g}Aynı sütunda farklı harf verilmiş ortalama değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p<0.05).

Çizelge 4.6. UDE işlemi ile elde edilen protein izolatlarının karakterizasyonu

Genlik (%)	Katı-Çözgen (g/L)	Köpük kapasitesi (%)	Köpük stabilitesi (%)	Su tutma kapasitesi (g/g)	Yağ tutma kapasitesi (g/g)	Koagüle protein (%)	Emülsiyon stabilitesi (dak)	Emülsiyon aktivitesi (m ² /g)	Emülsiyon kapasitesi (%)
30	20	16.33 (±0.58) ^d	75.49 (±0.85) ^a	3.14 (±0.02) ^a	2.65 (±0.05) ^{fg}	16.64 (±0.17) ^e	30.20 (±0.15) ^e	74.86 (±0.17) ^d	27.11 (±0.44) ^{cd}
	40	18.33 (±0.58) ^c	74.56 (±2.88) ^a	3.07 (±0.02) ^b	2.60 (±0.02) ^g	16.06 (±0.33) ^f	30.40 (±0.19) ^e	73.83 (±0.22) ^f	26.89 (±0.22) ^d
	60	16.67 (±0.58) ^d	78.06 (±2.76) ^a	3.15 (±0.02) ^a	2.69 (±0.06) ^f	15.82 (±0.16) ^f	30.31 (±0.24) ^e	76.63 (±0.11) ^a	27.85 (±0.13) ^c
55	20	20.33 (±1.53) ^{ab}	68.87 (±0.99) ^b	2.96 (±0.03) ^d	3.01 (±0.02) ^e	21.60 (±0.41) ^d	31.88 (±0.15) ^c	74.14 (±0.14) ^e	29.33 (±0.44) ^b
	40	21.33 (±0.58) ^{ab}	74.96 (±3.11) ^a	2.96 (±0.01) ^d	3.16 (±0.01) ^d	24.28 (±0.34) ^c	31.83 (±0.17) ^c	75.03 (±0.07) ^{cd}	30.15 (±0.68) ^a
	60	19.00 (±1.00) ^{bc}	68.55 (±3.61) ^b	3.02 (±0.03) ^c	3.15 (±0.03) ^d	26.03 (±0.34) ^b	30.78 (±0.04) ^d	76.79 (±0.25) ^a	28.67 (±0.38) ^b
80	20	20.67 (±0.58) ^a	59.68 (±2.40) ^c	2.18 (±0.01) ^g	4.00 (±0.06) ^b	30.72 (±0.17) ^a	34.50 (±0.17) ^a	76.04 (±0.07) ^b	30.52 (±0.64) ^a
	40	21.00 (±1.00) ^a	62.00 (±2.96) ^c	2.32 (±0.03) ^f	3.97 (±0.02) ^c	30.87 (±0.16) ^a	33.14 (±0.21) ^b	74.94 (±0.10) ^d	30.22 (±0.22) ^a
	60	20.00 (±1.00) ^{ab}	66.70 (±1.71) ^b	2.38 (±0.04) ^e	4.09 (±0.02) ^a	31.17 (±0.25) ^a	34.41 (±0.19) ^a	75.27 (±0.14) ^c	30.52 (±0.68) ^a

^{a-g}Aynı sütunda farklı harf verilmiş ortalama değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p<0.05).

4.2.5 Çözünürlük özellikleri

Klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu proteinlerinin farklı pH değerlerindeki çözünürlükleri Çizelge 4.7’de verilmiştir. Tüm ekstraksiyon koşullarında elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının çözünürlükleri g/L cinsinden hesaplanmıştır. Klasik ekstraksiyon için, pH 2.0-12.0 aralığında belirlenen sonuçlarına göre, elde edilen çözünürlük değerlerin 0.23-8.87 g/L aralığında değiştiği tespit edilmiştir. En düşük çözünürlük değerlerinin pH 4.0’te elde edildiği görülmüştür (Çizelge 4.7). Bu durum, çemen otu tohumu proteinlerinin pH 4.0-4.5 aralığında bir izoelektrik noktaya sahip olması ile açıklanabilmektedir. Feyzi ve ark. (2018b), çemen otu tohumu proteinleri için tespit ettikleri izoelektrik noktanın pH 4.5 olduğunu bildirmişlerdir. İzoelektrik noktada negatif ve pozitif yüklü iyonların arasında bir denge olduğundan net yük sıfır olmaktadır. Böylelikle elektrostatik itme kuvvetinde azalma meydana geldiğinden hidrofobik interaksiyonlar sonucunda proteinler çözünürlüğünü yitirerek çökmektedir. Diğer yandan, her protein için farklı olabilen izoelektrik noktanın dışındaki asidik ve alkali koşullarda yüklü iyonların arasında oluşan elektrostatik itme kuvveti proteinlerin çözünmesini sağlamaktadır (Singh ve ark., 2005). Yüksek pH’larda çözünürlükler incelendiğinde en yüksek değerlerin pH 11.0 ve pH 12.0’de elde edildiği görülmüştür ($p<0.05$) (Çizelge 4.7). Çemen otu tohumu proteinlerinin yüksek pH değerlerinde daha iyi çözünmesi, daha fazla sayıda olan negatif yüklü iyonların itici kuvveti sayesinde protein agregatlarının oluşumunun engellemesi ile açıklanabilir (Feyzi ve ark., 2015). Ayrıca, klasik ekstraksiyon işleminde deneysel tasarımda kullanılan pH 12.0’de yüksek verimlerin elde edilmesi ve optimum noktanın pH 11.47 olarak tespit edilmesi çemen otu tohumu proteinlerinin yüksek pH değerlerinde daha iyi çözündüğünü göstermiştir. Literatürde bitkisel kaynaklı proteinler için benzer sonuçlar soya protein izolatı, *Moringa oleifera* tohumu protein izolatı, kudret narı protein izolatı, keten tohumu protein izolatı ve nohut protein izolatı için de elde edilmiştir (Heywood ve ark., 2002; Kaur ve Singh, 2007; Horax ve ark., 2011; Kaushik ve ark., 2016; Cattan ve ark., 2022).

UDE işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının farklı pH değerlerindeki çözünürlükleri Çizelge 4.8’de verilmiştir. pH 2.0-12.0 aralığında ölçülen sonuçlarına göre, çözünürlük değerlerin 0.22-9.38 g/L aralığında değiştiği tespit

edilmiştir. En düşük çözünürlük değerlerinin, klasik ekstraksiyonda olduğu gibi, pH 4.0'te elde edildiği görülmüştür. Benzer şekilde en yüksek çözünürlük değerleri pH 11.0 ve pH 12.0'de elde edilmiştir (Çizelge 4.8). Buna karşın, UDE işlemi ile elde edilen protein izolatlarının çözünürlük değerlerinin klasik ekstraksiyon ile elde edilenlere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7, Çizelge 4.8). Protein çözünürlüğü moleküler büyüklük ve moleküler yapı ile ilişkilidir (Yu ve ark., 2019). Hu ve ark. (2013) ultrasonikasyon işleminin partikül boyutunu düşürdüğünü ve buna bağlı olarak protein ile su molekülleri arasındaki interaksiyonun arttığını bildirmişlerdir. Tez çalışmasında UDE işlemi ile elde edilen protein izolatlarının daha yüksek çözünürlüğe sahip olmasının nedenlerinden birinin partikül boyutu olabileceği düşünülmektedir. Ultrasonikasyon uygulamasının protein çözünürlüğünü artırdığı soya proteini, kara fasulye proteini, peynir altı suyu proteini ve istiridye proteini ile yapılan çalışmalarla da ortaya konmuştur (Hu ve ark., 2013; Jiang ve ark., 2014; Shen ve ark., 2017; Yu ve ark., 2019). Klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile optimum koşullarda ekstrakte edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının çözünürlükleri Şekil 4.3'te verilmiştir. Sonuçlara göre, UDE işlemi ile elde edilen protein izolatlarının klasik ekstraksiyona göre tüm pH değerlerinde daha yüksek çözünürlüğe sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, tez çalışmasında en yüksek çözünürlük değerine (9.45 g/L) uygulanan UDE işleminin optimum koşullarında (43.83 g/L katı-çözgen oranı, %67.51 genlik) ulaşılmıştır.

Çizelge 4.7. Klasik ekstraksiyon işleminde elde edilen protein izolatlarının çözünürlükleri (g/L)

Ekstraksiyon Koşulları		pH											
pH	K-Ç (g/L)	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	
6	20	5.31 (±0.11) ^{aD}	2.17 (±0.09) ^{cE}	0.61 (±0.05) ^{bH}	1.19 (±0.07) ^{bcG}	1.68 (±0.04) ^{cF}	5.27 (±0.11) ^{aD}	5.90 (±0.05) ^{aC}	7.20 (±0.07) ^{cB}	7.98 (±0.04) ^{eA}	8.11 (±0.11) ^{deA}	8.12 (±0.16) ^{eA}	
	40	5.15 (±0.11) ^{bD}	2.31 (±0.04) ^{bE}	0.72 (±0.07) ^{abH}	1.25 (±0.07) ^{bG}	1.94 (±0.10) ^{bF}	5.12 (±0.13) ^{aD}	5.94 (±0.03) ^{aC}	7.44 (±0.07) ^{bB}	7.93 (±0.04) ^{eA}	8.05 (±0.08) ^{eA}	8.08 (±0.14) ^{eA}	
	60	5.10 (±0.09) ^{bD}	2.48 (±0.07) ^{aE}	0.77 (±0.09) ^{aH}	1.43 (±0.07) ^{aG}	2.07 (±0.08) ^{aF}	5.14 (±0.11) ^{aD}	5.94 (±0.07) ^{aC}	7.49 (±0.06) ^{bB}	7.90 (±0.04) ^{eA}	7.97 (±0.11) ^{eA}	8.08 (±0.24) ^{eA}	
9	20	4.61 (±0.08) ^{dE}	1.65 (±0.04) ^{gF}	0.44 (±0.04) ^{cH}	0.96 (±0.03) ^{dG}	1.50 (±0.05) ^{dF}	4.57 (±0.07) ^{deE}	5.32 (±0.04) ^{eD}	7.19 (±0.05) ^{cC}	8.15 (±0.03) ^{dB}	8.29 (±0.12) ^{cdAB}	8.34 (±0.21) ^{bcA}	
	40	4.79 (±0.09) ^{cE}	1.76 (±0.05) ^{fF}	0.64 (±0.07) ^{bi}	1.13 (±0.04) ^{cH}	1.43 (±0.05) ^{dG}	4.85 (±0.04) ^{bcE}	5.73 (±0.03) ^{bD}	7.48 (±0.05) ^{bcC}	8.15 (±0.05) ^{dB}	8.35 (±0.13) ^{cA}	8.37 (±0.19) ^{bcA}	
	60	4.85 (±0.08) ^{cD}	1.89 (±0.08) ^{eE}	0.77 (±0.03) ^{aH}	1.25 (±0.05) ^{bG}	1.44 (±0.10) ^{dF}	4.88 (±0.08) ^{bD}	5.64 (±0.05) ^{cC}	7.43 (±0.05) ^{bB}	8.27 (±0.04) ^{cA}	8.39 (±0.14) ^{cA}	8.41 (±0.20) ^{bcA}	
12	20	4.36 (±0.11) ^{eF}	1.95 (±0.04) ^{eG}	0.23 (±0.08) ^{dJ}	0.77 (±0.04) ^{fi}	1.25 (±0.05) ^{eH}	4.51 (±0.04) ^{eE}	5.45 (±0.07) ^{dD}	7.45 (±0.08) ^{bcC}	8.32 (±0.04) ^{cB}	8.47 (±0.10) ^{bcA}	8.49 (±0.16) ^{bA}	
	40	4.55 (±0.07) ^{dE}	2.06 (±0.03) ^{dF}	0.33 (±0.08) ^{dI}	0.86 (±0.07) ^{eH}	1.17 (±0.05) ^{eG}	4.58 (±0.05) ^{deE}	5.39 (±0.03) ^{deD}	7.65 (±0.03) ^{aC}	8.64 (±0.08) ^{aB}	8.87 (±0.14) ^{aA}	8.87 (±0.19) ^{aA}	
	60	4.70 (±0.05) ^{cdE}	2.17 (±0.07) ^{cF}	0.45 (±0.05) ^{cH}	1.10 (±0.04) ^{cG}	1.12 (±0.07) ^{eG}	4.71 (±0.12) ^{cdE}	5.77 (±0.04) ^{bD}	7.54 (±0.04) ^{bcC}	8.46 (±0.09) ^{bB}	8.61 (±0.05) ^{bA}	8.63 (±0.10) ^{abA}	

K-Ç: Katı-çözgen oranı

^{a-g}Aynı sütunda farklı harf verilmiş ortalama değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p<0.05).

^{A-J}Aynı satırda farklı harf verilmiş ortalama değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p<0.05).

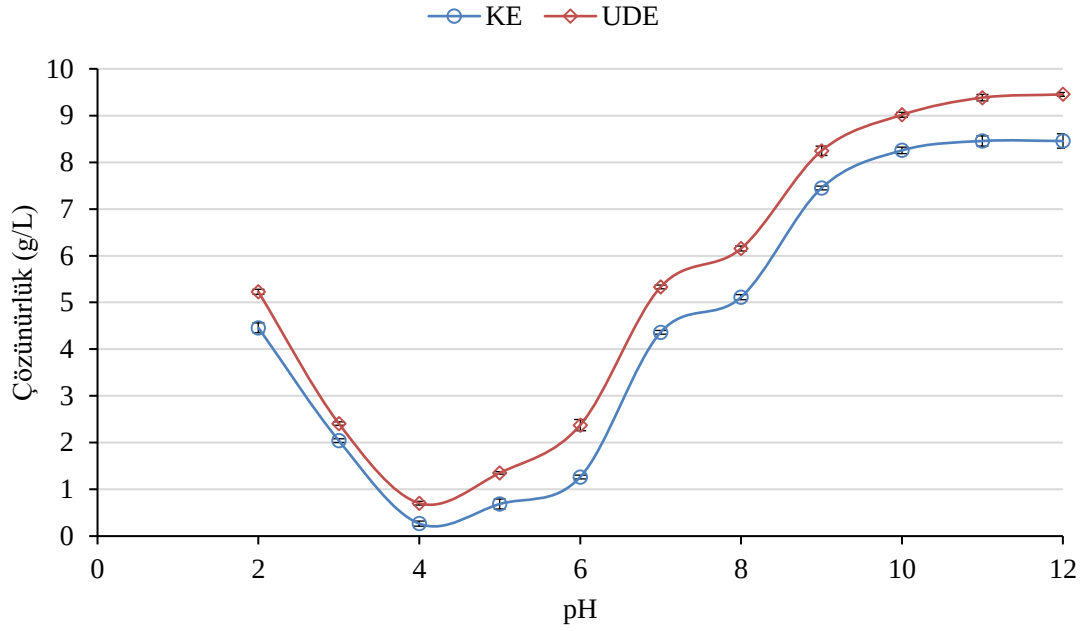
Çizelge 4.8. UDE işleminde elde edilen protein izolatlarının çözünürlükleri (g/L)

Ekstraksiyon Koşulları		pH										
Genlik (%)	K-Ç (g/L)	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0
30	20	4.49 (±0.04) ^{dD}	1.67 (±0.03) ^{dE}	0.30 (±0.03) ^{eH}	1.09 (±0.11) ^{cG}	1.26 (±0.04) ^{eF}	4.39 (±0.05) ^{eD}	5.65 (±0.08) ^{cC}	7.75 (±0.04) ^{eB}	8.81 (±0.17) ^{bcA}	8.84 (±0.07) ^{cA}	8.88 (±0.06) ^{cA}
	40	4.82 (±0.07) ^{cD}	1.64 (±0.05) ^{dF}	0.33 (±0.05) ^{eI}	0.98 (±0.05) ^{dH}	1.23 (±0.10) ^{eG}	4.58 (±0.11) ^{dE}	5.66 (±0.09) ^{cC}	7.80 (±0.04) ^{eB}	8.74 (±0.05) ^{cA}	8.81 (±0.09) ^{cA}	8.87 (±0.04) ^{cA}
	60	4.52 (±0.05) ^{dE}	1.58 (±0.04) ^{dF}	0.22 (±0.03) ^{fI}	0.90 (±0.04) ^{dH}	1.16 (±0.04) ^{eG}	4.58 (±0.12) ^{dE}	5.58 (±0.05) ^{cD}	7.69 (±0.08) ^{eC}	8.53 (±0.08) ^{dB}	8.67 (±0.12) ^{dA}	8.68 (±0.10) ^{dA}
55	20	4.87 (±0.03) ^{cF}	2.24 (±0.03) ^{cG}	0.52 (±0.04) ^{dJ}	1.17 (±0.05) ^{bcl}	2.03 (±0.05) ^{cH}	5.10 (±0.04) ^{cE}	5.94 (±0.03) ^{bD}	8.17 (±0.04) ^{cdC}	8.82 (±0.07) ^{bcB}	9.05 (±0.05) ^{bA}	9.08 (±0.08) ^{bA}
	40	4.90 (±0.08) ^{cF}	2.22 (±0.05) ^{cG}	0.61 (±0.04) ^{cl}	1.23 (±0.04) ^{bH}	2.17 (±0.09) ^{bG}	5.15 (±0.09) ^{cE}	5.95 (±0.08) ^{bD}	8.22 (±0.04) ^{bcC}	9.00 (±0.07) ^{abB}	9.25 (±0.05) ^{aA}	9.36 (±0.03) ^{aA}
	60	4.91 (±0.05) ^{cF}	2.21 (±0.12) ^{cG}	0.45 (±0.05) ^{dJ}	1.09 (±0.08) ^{cl}	1.89 (±0.05) ^{dH}	5.18 (±0.03) ^{bcE}	5.94 (±0.03) ^{bD}	8.10 (±0.08) ^{dC}	8.81 (±0.08) ^{bcB}	8.99 (±0.08) ^{bA}	9.04 (±0.05) ^{bA}
80	20	5.39 (±0.09) ^{aE}	2.45 (±0.03) ^{bF}	0.84 (±0.05) ^{aH}	1.43 (±0.07) ^{aG}	2.45 (±0.11) ^{aF}	5.38 (±0.10) ^{aE}	6.18 (±0.08) ^{aD}	8.28 (±0.09) ^{bC}	8.98 (±0.20) ^{abB}	9.25 (±0.09) ^{aA}	9.32 (±0.17) ^{aA}
	40	5.28 (±0.04) ^{bF}	2.44 (±0.04) ^{bG}	0.83 (±0.03) ^{aJ}	1.41 (±0.04) ^{al}	2.28 (±0.04) ^{bH}	5.38 (±0.09) ^{aE}	6.18 (±0.03) ^{aD}	8.21 (±0.04) ^{bcC}	9.07 (±0.09) ^{aB}	9.36 (±0.03) ^{aA}	9.34 (±0.09) ^{aA}
	60	5.36 (±0.05) ^{abE}	2.55 (±0.04) ^{aF}	0.71 (±0.05) ^{bl}	1.38 (±0.03) ^{aH}	2.40 (±0.03) ^{aG}	5.32 (±0.10) ^{abE}	6.24 (±0.04) ^{aD}	8.39 (±0.04) ^{aC}	9.11 (±0.05) ^{aB}	9.34 (±0.08) ^{aA}	9.38 (±0.10) ^{aA}

K-Ç: Katı-çözgen oranı

^{a-f} Aynı sütunda farklı harf verilmiş ortalama değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p<0.05).

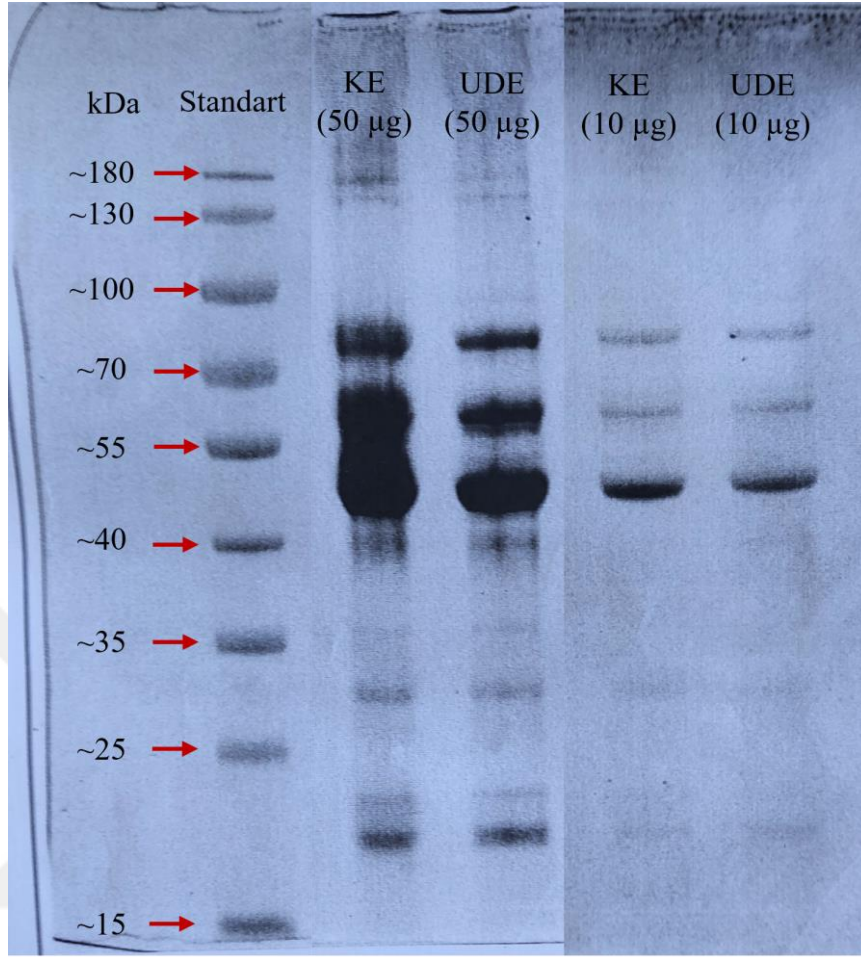
^{A-J} Aynı satırda farklı harf verilmiş ortalama değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p<0.05).



Şekil 4.3. Klasik ekstraksiyon (KE) ve UDE işlemlerinde optimum koşullarda elde edilen protein izolatlarının çözünürlükleri

4.2.6 Moleküler ağırlık

Çemen otu tohumu protein izolatlarının molekül ağırlıklarının tespiti amacıyla SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır (Laemmli, 1970). Sonuçlar incelendiğinde klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile elde edilen protein izolatları için benzer bantların elde edildiği görülmüştür (Şekil 4.4). Her iki örnek için de moleküler ağırlık dağılımının ~175 kDa ile ~22 kDa aralığında olduğu belirlenmiştir. Protein izolatları için yaklaşık 175, 159, 80, 59, 46, 38, 31, 27, 23 ve 22 kDa molekül ağırlıklarında 10 adet bant tespit edilmiştir. Her iki protein izolatının 3 adet belirgin bant verdiği gözlenmiştir. En belirgin olan bu üç bant ~80, 59 ve 46 kDa olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Benzer sonuçlar Feyzi ve ark. (2015) tarafından da elde edilmiştir. Feyzi ve ark. (2015), çemen otu tohumu protein izolatında, molekül ağırlıkları 11-240 kDa aralığında tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada benzer sonuçlar ticari soya protein izolatı için de elde edilmiştir (Feyzi ve ark., 2015).



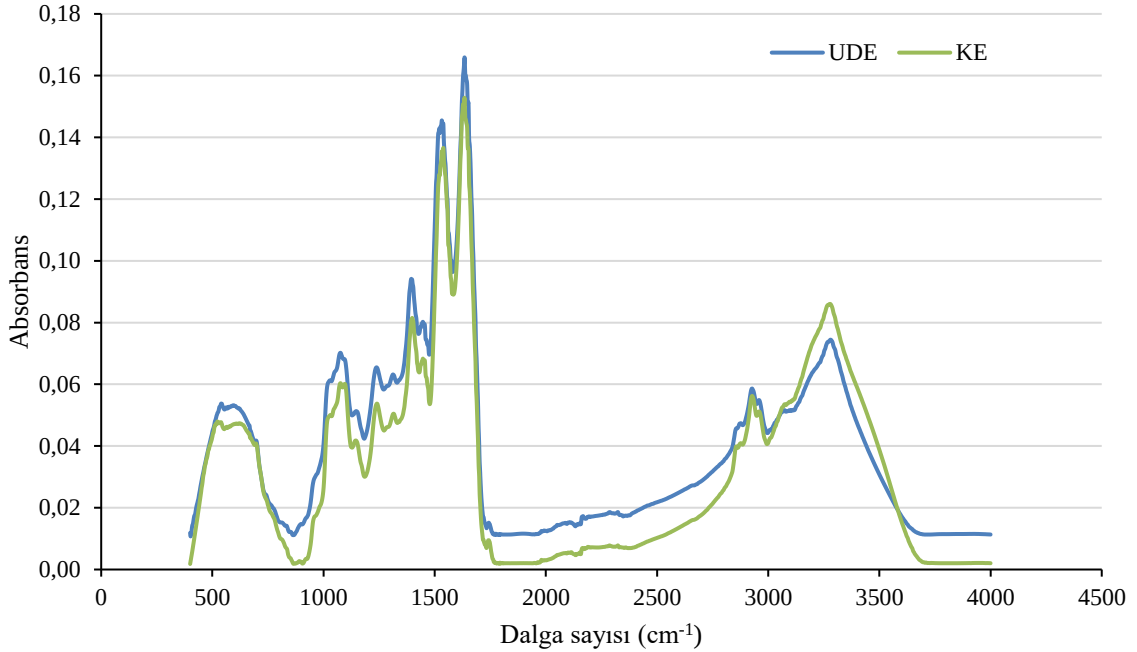
Şekil 4.4. Klasik ekstraksiyon (KE) ve UDE işlemleri ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatu için SDS-PAGE jel görüntüsü

4.2.7 Yapısal özellikler

Klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile optimum koşullarda ekstrakte edilen ve izoelektrik noktada çöktürme işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının yapısal özellikleri Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) analizi ile ortaya konmuştur. FT-IR; kızıl ötesi radyasyonun kimyasal bağlarca absorbe edilip moleküllerin gerilme, büzülme ve bükülme gibi titreşim hareketlerine neden olarak, titreşimde oluşan değişimlerin spektral pikleri meydana getirmesi esasına dayanmaktadır. Oluşan pikler temel olarak fonksiyonel gruplara özgüdür (Kılıç ve Karahan, 2010). Proteinlerin ikincil yapısının belirlenmesinde FT-IR spektrumunda Amid I bölgesi ($1600-1700\text{ cm}^{-1}$) esas alınmaktadır. Bu bölgede yaklaşık olarak %80 oranında peptit bağındaki C=O gerilme titreşimi, %20 civarında N-H bükülme titreşimi izlenmektedir (Kong ve

Yu, 2007; Carbonaro ve ark., 2008). Şekil 4.5'te klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile optimum koşullarda elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarına ait FT-IR spektrumları görülmektedir. Klasik ekstraksiyon ve UDE işlemlerinde optimum koşullarda elde edilen protein izolatlarına ait FT-IR spektrumları incelendiğinde belirgin bir farklılık görülmemiştir (Şekil 4.5). Bu durum, uygulanan ultrasonikasyon işleminin proteinlerin yapısını önemli ölçüde değiştirmedikçe göstermiştir. Her iki protein izolatu için de Amid I bandı $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısında gözlenmiştir (Şekil 4.5). $1480-1585\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı arasındaki bölge Amid II bölgesi olarak tanımlanmaktadır ve bu bölgede %40-60 civarı N-H bükülme titreşimi, %18-40 civarı ise C-N gerilme titreşimi izlenmektedir. Elde edilen protein izolatları için sırasıyla 1447 , 1515 ve 1532 cm^{-1} dalga sayısında elde edilen piklerin Amid II bölgesinde bulunduğu görülmüştür (Şekil 4.6). Amid I ve Amid II bantlarının tespiti, protein yapısının varlığının mutlak göstergesi olarak kabul edilmektedir (Withana-Gamage ve ark., 2011). Amid III bölgesi $1200-1400\text{ cm}^{-1}$ arasındaki dalga sayılarında izlenmektedir ve protein ile karbonhidratlar gibi diğer makromoleküller arasındaki etkileşimlerin varlığını göstermektedir (Barth ve Zscherp, 2002; de la Rosa-Millán ve ark., 2018). Protein gibi yapılarda bu bölgenin varlığı yan halka yapısına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bu bölgede C-N gerilme titreşimleri ve N-H bükülme titreşimi izlenmektedir (Barth ve Zscherp, 2002). Çemen otu tohumu protein izolatları için $1240-1394\text{ cm}^{-1}$ dalga sayılarında elde edilen piklerin Amid III bölgesinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5). 3200 ile 3500 cm^{-1} aralığındaki bantlar, Amid A bölgesini temsil etmekte olup proteinlerin kendi içinde ya da onlara yakın olan su molekülleriyle bağ yapması ile ilgilidir. Bu piklerin görüldüğü bölgede proteinler, su molekülleri ile hidrojen bağları varlığında birleşmiştir (Barth ve Zscherp, 2002; Feyzi ve ark, 2018b). Klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile elde edilen protein izolatları için sırasıyla 3278 ve 3280 cm^{-1} dalga sayılarında izlenen piklerin Amid A bölgesinde bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.5). $\sim 2925\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısının temsil ettiği bölge Amid B bölgesi olarak adlandırılmaktadır. Bu bölgedeki pikler nötral lipid, protein ve karbonhidratların C-H gerilme titreşimini göstermektedir (Barth, 2007). Çemen otu tohumu protein izolatları için 2927 cm^{-1} dalga sayısında izlenen piklerin Amid B bölgesinde bulunduğu düşünülmektedir (Şekil 4.5). $1000-1200\text{ cm}^{-1}$ aralığında tespit edilen pikler C-H gerilme titreşimine karşılık gelmekte ve ortamda protein yapısına bağlı olmayan selüloz ve/veya nişasta gibi makromoleküllerin varlığını göstermektedir (Barth

ve Zscherp, 2002). 1076 cm^{-1} dalga sayısında görülen pikler, ortamda serbest karbonhidratların varlığını göstermektedir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Çemen otu tohumu protein izolatlarına ait FT-IR spektrumu

FT-IR spektrumunda Amid I bant bölgesinde ($1600-1700 \text{ cm}^{-1}$) bulunan pikler kullanılarak çemen otu tohumu protein izolatlarının ikincil yapıları belirlenmiştir. Proteinlerin Amid I bandında α -heliks, β -tabaka, rastgele halka (random coil) ya da β -kırılma (β -turn) bileşenleri mevcuttur (Barth, 2007). β -tabaka yapısının $1612-1640$ ve $1689-1695 \text{ cm}^{-1}$ (Kong ve Yu, 2007; Shen ve ark., 2014), α -heliks yapısının $1651-1660 \text{ cm}^{-1}$ (Van Stokkum ve ark., 1995; Wang ve ark., 2020), rastgele halka yapısının $1641-1650 \text{ cm}^{-1}$ (Van Stokkum ve ark., 1995; Purcell ve ark., 1999) ve β -kırılma yapısının $1661-1688 \text{ cm}^{-1}$ (Kudre ve ark., 2013; Wang ve ark., 2020) dalga sayılarında izlendiği bildirilmiştir. Amid I bant bölgesinde 13 adet pik gözlenmiş ve bu piklere ait alanlar paket program ile hesaplanarak protein ikincil yapısında yer alan fraksiyonların oranı belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Sonuçlar incelendiğinde, her iki protein izolatı için ikincil yapıları ait yüzdelik oranların genel olarak benzerlik gösterdiği ve en yüksek orana sahip yapının β -tabaka olduğu görülmüştür (Çizelge 4.9). β -tabaka yapılarının yüksek oranda

bulunması, protein izolatlarının yüksek ısıl stabiliteye sahip olduğunu göstermektedir (Wang ve ark., 2020).

Literatürde bazı bitkisel kaynaklardan elde edilen protein izolatları için ikincil yapıların tespit edildiği çalışmalar mevcuttur. Endüstride önemli bir protein kaynağı olarak değerlendirilen soya protein izolatı için gerçekleştirilen FT-IR analizi sonucunda en yüksek orana sahip grubun β -tabaka olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark., 2011). Kenevir tohumundan UDE işlemi ile elde edilen protein izolatı için β -tabaka yapısının sonikasyon uygulaması ile yaklaşık %6 oranında arttığı bulgulanmıştır (Karabulut ve ark., 2022). Benzer sonuçlar, tez çalışması kapsamında çemen otu tohumu protein izolatları için de elde edilmiş ve UDE işlemi ile yaklaşık %4'lük bir artış tespit edilmiştir.

Çizelge 4.9. Protein ikincil yapı fraksiyonlarının yüzde (%) oranları

Örnek	β -tabaka	Rastgele Halka	α -heliks	β -kıvrılma	Yan Halka
KE-PI	38.69	10.39	18.96	26.76	5.20
UDE-PI	42.62	10.90	20.00	20.57	5.92

KE-PI: Klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein izolatı, UDE-PI: Ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein izolatı

4.2.8 Amino asit kompozisyonu

Amino asit kompozisyonunun belirlenmesi amacıyla UDE işlemi ile optimum koşullarda elde edilen örnekler kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.10'da verilmiştir. Toplam esansiyel amino asit içeriği 317.97 g aminoasit/kg protein izolatı olarak belirlenen çemen otu tohumu protein izolatının lizin içeriğinin yüksek, histidin ve metiyonin miktarının ise düşük olduğu görülmüştür (Çizelge 4.10). Genel olarak, tahıl ürünlerinin düşük lizin, yüksek histidin ve metiyonin miktarı göz önüne alındığında (Galili ve Amir, 2013), çemen otu tohumu protein izolatının kek, ekmek ve atıştırmalıklar gibi fırıncılık ürünlerinde kullanılması ile besinsel kalitenin artırılabilirliği düşünülmektedir. Esansiyel amino asitlerden lösin ve lizin, esansiyel olmayan amino asitlerden ise arjinin ve glutamik asit miktarlarının diğer amino asitlere oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Esansiyel amino asitlerden lizin açısından zengin olduğu belirlenen çemen otu tohumu protein izolatı için benzer sonuçlar Khalil ve Sarkadi (1991)

ve Feyzi ve ark. (2015) tarafından da bildirilmiştir. Feyzi ve ark. (2015) çemen otu tohumu protein izolatının, tez çalışmasına benzer şekilde, lizin açısından zengin, histidin ve metiyonin açısından fakir bir amino asit kompozisyonuna sahip olduğunu belirlemişlerdir. Gorissen ve ark. (2018), ticari olarak farklı bitkisel kaynaklardan (soya, mısır, keten tohumu, çeltik) üretilen protein izolatlarının amino asit kompozisyonlarını belirlemişler ve bitkisel kaynaklı proteinlerde metiyonin içeriğinin hayvansal kaynaklı proteinlere göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada farklı kaynaklardan elde edilen protein izolatlarında esansiyel amino asit ve lösün içeriğinin düşük olduğu bildirilmiş olsa da tez kapsamında çemen otu tohumu protein izolatları için lösün ve esansiyel amino asit içeriğinin yüksek olduğu bulgulanmıştır (Çizelge 4.10). Bu durum, çemen otu tohumu protein izolatının besinsel kalitesini ortaya koymakla beraber yeni ve fonksiyonel ürünlerde kullanım potansiyelini göstermektedir.

Çizelge 4.10. Çemen otu tohumu protein izolatının amino asit kompozisyonu

Esansiyel Amino Asitler (g amino asit /kg protein izolatı)		Esansiyel Olmayan Amino Asitler (g amino asit /kg protein izolatı)	
Histidin	16.82	Tirozin	27.60
Treonin	27.11	Aspartik asit	17.87
Valin	47.67	Glutamik asit	46.71
Metiyonin	18.22	Serin	23.93
Fenilalanin	45.89	Glisin	32.87
İsolösün	40.90	Arjinin	47.15
Lösün	62.71	Alanin	40.48
Lizin	58.65	Prolin	38.89
		Triptofan	10.99
<i>Toplam</i>	317.97	<i>Toplam</i>	334.01

Temel amino asitler; lizin, arjinin ve histidin, asidik amino asitler; aspartik asit ve glutamik asit, hidrofobik amino asitler; alanin, isolösün, lösün, metiyonin, fenilalanin, valin, prolin ve triptofan, yüksüz polar amino asitler; glisin, serin, tirozin ve treonin, yüklü polar amino asitler temel amino asitler ve asidik amino asitlerin tümü; sülfür içeren amino asitler ise metiyonin olacak şekilde sınıflandırılmaktadır (De Groot ve ark., 1969). Bu sınıflandırmaya uygun olarak, çemen otu tohumu protein izolatına ait amino asit miktarları Çizelge 4.11’de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, hidrofobik amino asitlerin miktarının diğer gruplara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Çemen otu

tohumu protein izolatında sülfür içeren amino asitlerin ise (metiyonin) düşük miktarda bulunduğu belirlenmiştir.

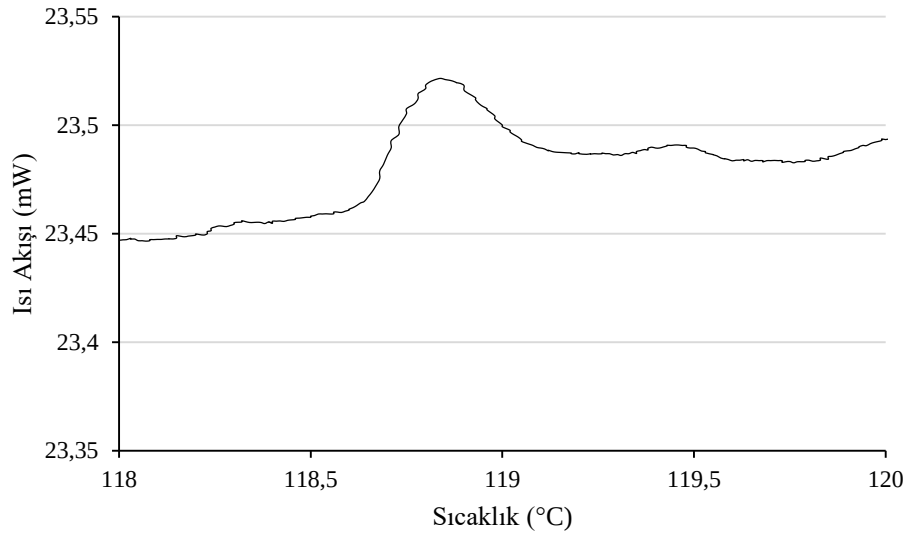
Çizelge 4.11. Çemen otu tohumunda bulunan amino asitlerin sınıflandırılması

Grup	g amino asit /kg protein izolatı
Temel	122.62
Asidik	64.58
Hidrofobik	305.75
Yüksüz polar	111.51
Yüklü polar	187.20
Sülfür içeren	18.22

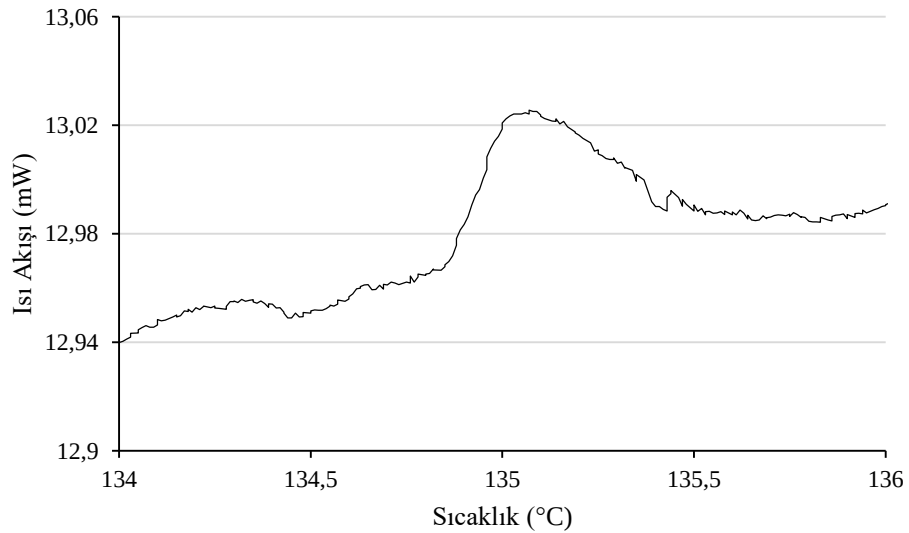
4.2.9 Termal özellikler

Klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının denatürasyon sıcaklıkları (T_d) ve denatürasyon entalpileri (ΔH_d) Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) termogramları kullanılarak tespit edilmiştir. Şekil 4.6’da elde edilen termogramlar gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, denatürasyonun gerçekleşmesi için enerji gerektiği, endotermik pikler ile ortaya konmuştur. Klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile elde edilen protein izolatları için denatürasyon sıcaklıkları (T_d) sırasıyla 118.85°C ve 135.08°C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6). Kovalent interaksiyonların yanında hidrofobik interaksiyonlar proteinlerin ısıl stabilitesine etki etmektedir (Olivos-Lugo ve ark., 2010). Hidrofobik amino asitlerin fazla miktarda bulunması, proteinin daha kompakt ve düzgün dağılımlı bir yapıya sahip olmasını sağlamaktadır ve bu durum denatürasyon sıcaklıklarının oldukça yüksek olmasına neden olabilmektedir (Zuber, 1988). Amino asit kompozisyonunda hidrofobik karakter gösteren amino asitlerin miktarının fazla olması çemen otu tohumu protein izolatının yüksek ısıl stabiliteye sahip olabileceğini ortaya koymuştur. Literatürde, börülce protein izolatı için 91°C (Shevkani ve ark., 2015), keten tohumu protein izolatı için 95°C (Tang ve ark., 2006), ayva çekirdeği protein izolatı için 103°C (Deng ve ark., 2019) ve çemen otu tohumu protein izolatı için 105°C (Feyzi ve ark., 2015) denatürasyon sıcaklıkları bildirilmiştir. Klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile elde edilen protein izolatlarının denatürasyon entalpi değerleri (ΔH_d) hesaplanmış ve sırasıyla 28 mJ/g ve 53 mJ/g olarak belirlenmiştir. Düşük ΔH_d değeri yapının daha hızlı bozularak

denatürasyonun daha kolay gerçekleşeceğini ifade etmektedir (Ahmed ve ark., 2007; Zhang ve ark., 2020). Protein ikincil yapıları incelendiğinde, her ne kadar büyük değişiklikler gözlenmemiş olsa da UDE işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatının sahip olduğu yüksek β -tabaka oranının (Çizelge 4.10), klasik ekstraksiyon ile elde edilenlere göre daha yüksek denatürasyon sıcaklığı ve denatürasyon entalpisi sağladığı düşünülmektedir.



(a)



(b)

Şekil 4.6. DSC termogramları (a) Klasik ekstraksiyon işlemi ve (b) UDE işlemi ile elde edilen protein izolatı

4.3 Çemen Otu Tohumu Protein İzolatı Katkılı Kap Kek Üretimi

Klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile optimum koşullarda elde edilen protein izolatları kullanılarak kap kek üretimi gerçekleştirilmiştir. Farklı oranlarda protein izolatı içeren örnekler ile kontrol grubu için, hamur ve kap keklerin iç ve kabuk kısımlarının renk özellikleri, kap keklerin nem içeriği ve su aktivitesi, hamurların kıvam ve yoğunluk değerleri, pişme verimi, kap keklerin hacim, simetri ve üniformite indeksleri ile kap keklerin yığın yoğunluk ve sertlik değerleri belirlenmiştir. Farklı oranlarda protein izolatı içeren hamur ve kek örneklerine ait görseller sırasıyla EK III ve EK IV'te verilmiştir.

4.3.1 Hamurda kıvam ve yoğunluk

Hamur için yoğunluk ve Bostwick değerleri Çizelge 4.15'te verilmiştir. Hamura çemen otu tohumu protein izolatı ilavesinin hamur yoğunluğunu düşürdüğü görülmüştür (Çizelge 4.15). Benzer sonuçlar Majzoobi ve ark. (2014) tarafından farklı oranlarda protein izolatı ilave edilen kek hamurları için de tespit edilmiş ve %30 soya protein izolatı ilavesi ile hamur yoğunluğu değerinin 396 kg/m^3 'ten 366 kg/m^3 değerine gerilediği bildirilmiştir.

Bostwick değeri, hamurun akma yeteneğini göstermektedir ve hamurun kıvamı ile ters orantılı olarak değişmektedir. Bostwick değeri, kek hamurlarının taşınması ve kalıplanması açısından önemli bir parametredir (Majzoobi ve ark., 2020). Tez çalışmasında, protein izolatı oranı arttıkça Bostwick değerlerinin azaldığı ve hamur kıvamının arttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.15). Benzer sonuçlar soya protein izolatı katkılı kek üretiminde de elde edilmiştir. Majzoobi ve ark. (2014), soya protein izolatı içermeyen kontrol hamurunda 8.6 cm olan Bostwick değerinin, %30 soya protein izolatı katkılı (un ikamesi olarak) hamurda 5.6 cm'e gerilediğini bildirmişlerdir. Çemen otu tohumu protein izolatının yüksek su tutma kapasitesinin hamur kıvamında artışa neden olduğu düşünülmektedir. Su tutma kapasitesine sahip bileşenlerin serbest suyun miktarını azaltarak hamurda bulunan partiküllerin hareketini azalttığı bilinmektedir (Dogan ve ark., 2005; Roccia ve ark., 2009).

Çizelge 4.12. Hamur yoğunluğu ve Bostwick değerleri

Örnek	Yoğunluk (kg/m^3)	Bostwick değeri (cm)
Kontrol	578.92 (± 13.63) ^a	12.45 (± 0.14) ^a
KE-PI %5	560.17 (± 1.81) ^b	11.75 (± 0.01) ^b
KE-PI %10	532.68 (± 5.43) ^c	11.18 (± 0.11) ^c
KE-PI %20	479.64 (± 1.01) ^e	9.25 (± 0.07) ^e
UDE-PI %5	565.20 (± 1.64) ^b	11.65 (± 0.14) ^b
UDE-PI %10	520.63 (± 0.90) ^d	10.88 (± 0.18) ^d
UDE-PI %20	476.35 (± 1.28) ^e	8.95 (± 0.14) ^f

KE-PI: Klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein izolatu, UDE-PI: Ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein izolatu

4.3.2 Hamur ve kap keklerin renk özellikleri

Hamur ile kap kek iç ve kabuk renk özellikleri için elde edilen sonuçlar incelendiğinde, hamur için L^* değerlerinin 63.33-82.48 aralığında değiştiği görülmüştür (Çizelge 4.12). Hamurda, en yüksek L^* değeri protein izolatu içermeyen kontrol örneği için elde edilmiştir ($p < 0.05$). Buna karşın, en düşük L^* değeri UDE işlemi ile elde edilen protein izolatının %20 oranında un ikamesi olarak kullanıldığı örneklerde belirlenmiştir ($p < 0.05$). Ayrıca her iki ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein izolatlarının katkı oranı arttıkça kontrol grubuna göre hamur L^* değerlerinin azaldığı gözlenmiştir ($p < 0.05$). Çalışmada hamur için a^* değerlerinin -2.26 ve 4.78 aralığında değiştiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.12). Hamurda protein izolatu ilavesi ile L^* değerlerinde azalma görülürken, protein izolatu oranının artışı ile a^* değerlerinin arttığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Hamur için b^* değerlerinin 24.82-27.93 aralığında değiştiği gözlenmiştir (Çizelge 4.12). UDE işlemi ile elde edilen protein izolatının %20 oranında ilavesi ile b^* değerlerinde en yüksek artış elde edilmiştir ($p < 0.05$) (Çizelge 4.12). Kap keklerin iç kısımlarına ait L^* değerlerinin 55.26-67.63, a^* değerlerinin -3.19-2.29, b^* değerlerinin ise 20.44-23.25 aralığında değiştiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.12). Hamur örneklerine benzer şekilde, en yüksek L^* değerine sahip örneğin kontrol örneği, en düşük L^* değerine sahip örneğin ise %20 oranında UDE işlemi ile elde edilen protein izolatu katkılı örnek olduğu görülmüştür ($p < 0.05$) (Çizelge 4.12). Kap keklerin kabuk kısımlarında L^* değerlerinin 50.25-58.42, a^* değerlerinin 8.35-12.06, b^* değerlerinin 34.13-39.79 aralığında değiştiği tespit edilmiştir (Çizelge

4.9). Keklerde kullanılan protein oranının artışı ile kabuk kısmında L^* değerlerinin önemli oranda azaldığı görülmüştür ($p<0.05$) (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.13'te kap kek iç ve kabuk için hesaplanan toplam renk değişimi (ΔE) değerleri verilmiştir. Kap keklerin kabuk kısımları için elde edilen ΔE değerleri incelendiğinde protein oranının artması ile değerlerin artış gösterdiği görülmüştür ($p<0.05$). Hem iç hem de kabuk için en yüksek ΔE değerleri %20 oranında UDE işlemi ile elde edilmiş protein izolatu katkılı kap keklerde, en düşük değerler ise kontrol örneklerinde belirlenmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.13).

Esmerleşme indeksi (BI), kabuktaki kahverengileşme derecesini gösteren bir parametredir ve enzimatik ve/veya enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarının gerçekleşme durumunu ortaya koymaktadır (Palou ve ark., 1999). Genel olarak keklerin dış rengi pişme sırasında gerçekleşen Maillard ve karamelizasyon reaksiyonları sonucunda şekillenir. Tez çalışmasında, UDE işlemi ile elde edilen protein izolatu katkılı kap keklerde BI değerlerinin kontrol örneklerine oranla daha yüksek olduğu bulgulanmıştır ($p<0.05$) (Çizelge 4.13). İndirgen şekerler ve serbest amino grupları arasında yüksek sıcaklıkta gerçekleşen reaksiyonlar sonucunda oluşan koyu renkli bileşiklerin keklerin dış renginde koyulaşmaya neden olduğu düşünülmektedir. Benzer sonuçlar, formülasyonlarında yumurta yerine nohut suyu (Aslan ve Ertaş, 2020), un ikamesi olarak üzüm çekirdeği tozu (Bekar, 2017), nar kabuğu tozu ve soya protein izolatu kullanılan (Majzoobi ve ark., 2014) kekler için de elde edilmiştir.

Çizelge 4.13. Hamur, kek iç ve kabuk kısmı için L^* , a^* , b^* değerleri

Örnek	Hamur			İç			Kabuk		
	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*
Kontrol	82.48 (± 1.51) ^a	-2.26 (± 0.09) ^f	24.82 (± 1.21) ^d	67.63 (± 0.73) ^a	-3.19 (± 0.15) ^g	21.67 (± 1.45) ^b	58.42 (± 0.98) ^a	9.29 (± 0.31) ^c	38.04 (± 0.30) ^c
KE-PI %5	76.32 (± 0.88) ^b	1.16 (± 0.14) ^d	27.19 (± 0.70) ^a	63.26 (± 0.93) ^c	-0.73 (± 0.28) ^d	21.86 (± 0.50) ^b	57.47 (± 0.32) ^b	10.06 (± 0.48) ^b	37.32 (± 0.37) ^d
KE-PI %10	72.85 (± 1.35) ^c	1.85 (± 0.07) ^c	25.96 (± 0.79) ^{bc}	60.71 (± 0.27) ^e	0.18 (± 0.07) ^c	20.44 (± 0.46) ^c	55.57 (± 0.88) ^c	10.25 (± 0.28) ^b	34.13 (± 0.45) ^f
KE-PI %20	65.98 (± 1.28) ^e	4.78 (± 0.25) ^a	26.87 (± 0.76) ^{ab}	56.23 (± 0.75) ^f	2.29 (± 0.18) ^a	23.25 (± 0.36) ^a	52.28 (± 0.53) ^e	12.06 (± 0.30) ^a	32.39 (± 0.64) ^g
UDE-PI %5	72.03 (± 0.86) ^c	0.57 (± 0.21) ^e	25.66 (± 1.10) ^{cd}	65.51 (± 2.03) ^b	-2.42 (± 0.13) ^f	21.01 (± 0.18) ^{bc}	54.13 (± 1.23) ^d	9.17 (± 0.93) ^c	39.79 (± 0.46) ^a
UDE-PI %10	69.67 (± 1.25) ^d	1.29 (± 0.19) ^d	25.91 (± 1.62) ^{bc}	62.08 (± 0.62) ^d	-1.13 (± 0.14) ^e	22.98 (± 1.11) ^a	52.32 (± 0.86) ^e	8.45 (± 0.89) ^d	38.76 (± 0.34) ^b
UDE-IP %20	63.33 (± 0.88) ^f	3.93 (± 0.46) ^b	27.93 (± 0.52) ^a	55.26 (± 1.55) ^f	0.40 (± 0.15) ^b	21.63 (± 0.38) ^b	50.25 (± 0.80) ^f	8.35 (± 0.34) ^d	35.26 (± 0.63) ^e

KE-PI: Klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein izolatu, UDE-PI: Ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein izolatu

Çizelge 4.14. Kap kek iç ve kabuk kısmı için toplam renk değişimi (ΔE) ve esmerleşme indeksi (BI) değerleri

Örnek	ΔE		BI
	İç	Kabuk	
Kontrol	15.27 (± 0.68) ^e	29.78 (± 0.92) ^e	116.07 (± 3.78) ^c
KE-PI %5	19.51 (± 0.92) ^c	30.56 (± 0.41) ^{de}	116.79 (± 2.16) ^c
KE-PI %10	22.34 (± 0.28) ^b	31.11 (± 0.84) ^d	109.57 (± 3.11) ^d
KE-PI %20	26.69 (± 0.76) ^a	34.28 (± 0.41) ^{bc}	114.11 (± 2.52) ^c
UDE-PI %5	17.42 (± 1.96) ^d	34.05 (± 1.23) ^c	137.92 (± 5.93) ^a
UDE-PI %10	20.54 (± 0.61) ^c	34.93 (± 0.66) ^{ab}	138.84 (± 3.33) ^a
UDE-PI %20	27.54 (± 1.50) ^a	35.51 (± 0.77) ^a	128.94 (± 4.76) ^b

KE-PI: Klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein izolatu, UDE-PI: Ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein izolatu

4.3.3 Kap keklerin nem içeriği ve su aktivitesi

Farklı oranlarda protein izolatu eklenerek üretilen kap keklerin protein oranı arttıkça nem içeriklerinde artış görüldüğü tespit edilmiştir (Çizelge 4.14). Bu durumun protein izolatlarının yüksek su tutma kapasitesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6). %20 oranında UDE işlemi ile üretilen çemen otu tohumu protein izolatu ikamesinin kekin nem içeriğinde %1.07'lik artışa neden olduğu belirlenmiştir. Kap kek örnekleri için su aktivitesi değerlerinin 0.862-0.880 aralığında değiştiği bulgulanmıştır. İstatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunmasına karşın genel olarak su aktivitesi değerlerinin birbirine yakın olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.15. Kap keklerin nem içerikleri ve su aktivitesi (a_w) değerleri

Örnek	Nem (%)	a_w
Kontrol	23.57 (± 0.41) ^d	0.880 (± 0.005) ^a
KE-PI %5	23.93 (± 0.39) ^{cd}	0.874 (± 0.004) ^{bc}
KE-PI %10	24.42 (± 0.31) ^{ab}	0.870 (± 0.006) ^{cd}
KE-PI %20	24.76 (± 0.15) ^a	0.864 (± 0.003) ^e
UDE-PI %5	23.59 (± 0.30) ^d	0.879 (± 0.006) ^{ab}
UDE-PI %10	24.20 (± 0.15) ^{bc}	0.866 (± 0.002) ^{de}
UDE-PI %20	24.64 (± 0.30) ^a	0.862 (± 0.004) ^e

KE-PI: Klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein izolatu, UDE-PI: Ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein izolatu

4.3.4 Kap keklerde pişme verimi, yığın yoğunluk ve sertlik

Kap kekler için elde edilen pişme verimi, yığın yoğunluk ve sertlik değerleri Çizelge 4.16’da verilmiştir. Protein izolatu katkılı kap kekler ve kontrol grubu için pişme verimi değerlerinin %82.69-84.86 aralığında değiştiği belirlenmiştir. Pişme verimi için birbirine yakın sonuçlar elde edilmiş olsa da en yüksek pişme verimi %20 oranında çemen otu tohumu protein izolatu katkılı keklerde elde edilmiştir ($p>0.05$) (Çizelge 4.16). Kap keklerin yığın yoğunluk değerleri incelendiğinde, yığın yoğunlukların artan protein katkı oranı ile artış gösterdiği görülmüştür ($p<0.05$) (Çizelge 4.16). En yüksek yığın yoğunluk değeri %20 oranında UDE işlemi ile elde edilmiş çemen otu tohumu protein izolatu katkılı kap keklerde, en düşük yığın yoğunluk değeri ise kontrol örneğinde tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.16). Sertlik (N), sıkıştırma uygulanan örneğin gösterdiği maksimum kuvvet olarak tanımlanmaktadır (Majzoobi ve ark., 2014). Tez çalışmada elde edilen sonuçlara göre, protein katkı oranı arttıkça örneklerin sertlik değerleri azalmıştır ($p<0.05$) (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16. Kap keklerin pişme verimi, yığın yoğunluk ve sertlik değerleri

Örnek	Pişme Verimi (%)	Yığın yoğunluk (kg/m^3)	Sertlik (N)
Kontrol	82.91 (± 0.49) ^{de}	420.47 (± 7.21) ^g	3.44 (± 0.04) ^a
KE-PI %5	82.69 (± 0.66) ^e	450.00 (± 9.79) ^e	3.07 (± 0.04) ^b
KE-PI %10	83.49 (± 1.07) ^{cd}	479.28 (± 5.17) ^c	2.64 (± 0.13) ^c
KE-PI %20	84.86 (± 0.45) ^a	515.67 (± 7.54) ^a	2.41 (± 0.09) ^d
UDE-PI %5	83.55 (± 1.06) ^e	440.38 (± 2.55) ^f	3.10 (± 0.05) ^b
UDE-PI %10	83.75 (± 0.65) ^{bc}	462.08 (± 4.51) ^d	2.60 (± 0.04) ^c
UDE-PI %20	84.33 (± 0.43) ^{ab}	504.63 (± 6.25) ^b	2.36 (± 0.05) ^d

KE-PI: Klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein izolatu, UDE-PI: Ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein izolatu

4.3.5 Hacim, simetri ve üniformite indeksi

Çemen otu protein izolatu katkılı kap keklerin hacim, simetri ve üniformite indeksi değerleri Çizelge 4.17’de verilmiştir. Hacim indeksi, pişme sonrasında kekin iç kısmında hapsolan hava miktarının bir göstergesidir (Brooker, 1993; Zhou ve ark., 2011). Elde edilen sonuçlara göre, hacim indeksi değerlerinin çemen otu tohumu protein izolatu katkılı kap keklerde kontrol grubu örneklerine göre daha düşük olduğu bulgulanmıştır ($p<0.05$).

Ayrıca, klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatu oranı arttıkça hacim indeksi değerlerinin azaldığı görülmektedir (Çizelge 4.17). Kekte kabarma, yumurta ve şekerin çırpılması sonucunda oluşan hava kabarcıklarının pişme sırasında unun oluşturduğu yapı içerisinde hapsolması ile meydana gelmektedir (Majzoobi ve ark., 2014; Majzoobi ve ark., 2020). Formülasyonda artan protein izolatu oranlarında azalan unla birlikte yapıdaki gluten miktarının azalması sonucunda, hava kabarcıklarını tutan yapının zayıflamasının hacim indeksi değerlerinde düşüşe neden olduğu düşünülmektedir. Benzer sonuçlar, un ikamesi olarak, kek üretiminde nar kabuğu tozu ve ekmek üretiminde nar posası ilave edilen çalışmalarda da gözlenmiştir (Bhol ve ark., 2016; Topkaya, 2017).

Simetri indeksi, kekin üst yüzeyinin karakteristik özelliklerinin tespitinde kullanılan sayısal bir değerdir. Yüksek simetri indeksi değerine sahip olan keklerin bombeli bir yapıya sahip olduğu, düşük simetri indeksi değerine sahip olan keklerin ise daha düz bir yüzeye sahip olduğu bilinmektedir (Rahmati ve ark., 2014). Sonuçlar incelendiğinde, klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile üretilmiş protein izolatu oranı arttıkça simetri indeksi değerlerinin azaldığı görülmüştür ($p<0.05$) (Çizelge 4.17). Sadece %5 oranında UDE işlemi ile elde edilen protein izolatu katkılı kap kekin simetri indeksi ile kontrol grubu örneğinin simetri indeksi arasında istatistiksel açıdan farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$). Üniformite indeksi, pişmiş kekin yanal simetrisinin bir ölçüsüdür ve en ideal üniformite indeksi değeri sıfırdır. Pişmiş kekin görsel olarak düzgün bir yapıya sahip olabilmesi için üniformite indeksi değerinin sıfıra yakın olması arzu edilir (Topkaya, 2017). Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, en yüksek üniformite indeksi değeri kontrol grubunda tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.13). Diğer yandan, sıfıra en yakın üniformite indeksi, %20 oranında UDE işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatu ilave edilmiş kap kek örneğinde belirlenmiştir. Ayrıca, çemen otu tohumu protein izolatu oranı arttıkça üniformite indeksi değerlerinin sıfıra yaklaştığı görülmüştür (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17. Kap keklerin hacim, simetri ve üniformite indeksi değerleri

Örnek	Hacim İndeksi (mm)	Simetri İndeksi (mm)	Üniformite İndeksi (mm)
Kontrol	106.20 (± 0.32) ^a	24.23 (± 0.47) ^a	1.28 (± 0.33) ^a
KE-PI %5	103.75 (± 0.29) ^b	23.23 (± 0.24) ^b	0.63 (± 0.21) ^b
KE-PI %10	99.55 (± 0.25) ^d	21.13 (± 0.46) ^d	0.43 (± 0.10) ^{bcd}
KE-PI %20	97.78 (± 0.10) ^e	20.20 (± 0.22) ^e	0.20 (± 0.08) ^{de}
UDE-PI %5	103.83 (± 0.17) ^b	24.35 (± 0.47) ^a	0.55 (± 0.06) ^{bc}
UDE-PI %10	100.93 (± 0.15) ^c	23.05 (± 0.30) ^b	0.35 (± 0.19) ^{de}
UDE-PI %20	99.60 (± 0.32) ^d	22.05 (± 0.10) ^c	0.10 (± 0.00) ^e

KE-PI: Klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein izolatu, UDE-PI: Ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemi ile elde edilen protein izolatu

4.3.6 Duyusal analiz

UDE işlemi ile optimum koşullarda elde edilen çemen otu tohumu protein izolatu katkılı kap kekler için duyusal analiz gerçekleştirilmiş ve duyusal değerlendirme için kullanılan form EK III'te verilmiştir. %5, %10 ve %20 protein izolatu katkılı kap kekler ve protein izolatu içermeyen kontrol grubu kap kek örneklerine ait görünüş, kabuk rengi, iç rengi, tekstür, tat, aroma özellikleri ve örneklerin genel beğeni düzeyleri duyusal olarak değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.18'de verilmiştir.

Örneklerin görünüşleri panelistler tarafından kabarma ve simetri açısından incelenmiştir. En düşük puanın %20 oranında protein izolatu katkılı kap kek için elde edildiği belirlenmiş ve bu sonuçların ölçülen simetri indeksi değerleri (Çizelge 4.16) ile uyumlu olduğu görülmüştür. Örneklerin kabuk rengi ve iç rengi için verilen puanlar incelendiğinde, en düşük puanlar %20 oranında protein izolatu katkılı örneklerde gözlenmiş ancak istatistiksel olarak farklılık tespit edilmemiştir ($p > 0.05$) (Çizelge 4.12). Örneklerin tekstürel özellikleri incelendiğinde oldukça yakın sonuçlar elde edildiği görülmüştür ($p > 0.05$) (Çizelge 4.18). Örneklerin tat-aroma ve genel beğeni açısından değerlendirilmesi sonucunda, %10 protein izolatu katkılı kap kek için verilen puanların daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.18). Bu durum, çemen tohumunun kendine has aromasından kaynaklı oluşan tat ve aromanın tüketiciler tarafından beğenildiğini ve/veya bu tat ve aromanın kontrol örneğine göre olumsuz olarak değerlendirilmediğini ortaya koymuştur.

Çizelge 4.18. Çemen otu tohumu protein izolatu katkılı kap kek duyusal analiz sonuçları

Örnek	Görünüş (Kabarma ve Simetri)	Kabuk Rengi	İç Rengi	Tekstür	Tat	Aroma	Genel Beğeni
Kontrol	7.50 (±1.18) ^a	7.40 (±1.17) ^a	7.50 (±1.65) ^a	7.60 (±1.51) ^a	7.70 (±1.16) ^a	7.30 (±1.34) ^a	7.35 (±0.88) ^{ab}
PI %5	7.40 (±1.07) ^a	6.90 (±1.79) ^a	6.90 (±1.66) ^a	7.00 (±2.21) ^a	7.00 (±1.63) ^a	7.10 (±1.60) ^a	7.40 (±1.17) ^{ab}
PI %10	8.00 (±0.82) ^a	7.70 (±0.82) ^a	7.10 (±1.60) ^a	7.80 (±0.79) ^a	7.80 (±0.63) ^a	7.70 (±0.82) ^a	7.90 (±0.57) ^a
PI %20	7.00 (±1.25) ^a	6.50 (±1.43) ^a	6.70 (±1.57) ^a	7.00 (±1.56) ^a	7.00 (±1.49) ^a	6.70 (±1.83) ^a	6.70 (±1.49) ^{ab}

PI: Protein izolatu

5. SONUÇ

Tez çalışması kapsamında, klasik ekstraksiyon ve ultrasonik destekli ekstraksiyon (UDE) işlemleri ile çemen otu tohumunda bulunan proteinler ekstrakte edilmiş ve en yüksek ekstraksiyon veriminin sağlandığı koşullar belirlenmiştir. İzoelektrik noktada çöktürme prensibi ile elde edilen protein izolatlarının karakterizasyonu sağlanmış ve çemen otu tohumu protein izolatu katkılı kap kekler üretilmiştir. Tüm ekstraksiyon koşullarında elde edilen protein izolatlarının koagüle protein yüzdesi, su tutma kapasitesi, yağ tutma kapasitesi, köpük özellikleri, emülsifikasyon özellikleri ve çözünürlük özellikleri belirlenmiştir. Ayrıca, optimum koşullarda klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile elde edilen protein izolatlarının moleküler ağırlıkları, yapısal ve termal özellikleri tespit edilmiş, UDE işlemi ile elde edilen protein izolatlarının amino asit profili belirlenmiştir.

Çemen otu tohumundan klasik ekstraksiyon işlemi ile proteinlerin ekstraksiyonunda, ekstraksiyon ortamı pH değeri (pH 6.0-12.0) ve katı-çözgen oranı (20-60 g/L) bağımsız değişkenler olarak seçilmiş, ekstraktta bulunan protein miktarı katı örnekteki protein miktarına oranlanarak ekstraksiyon verimi hesaplanmıştır. Katı-çözgen oranının en düşük olduğu durumda (20 g/L) ekstraksiyon veriminin arttığı gözlenirken, pH'nın artışı ile verim değerlerinin artış gösterdiği tespit edilmiştir. Klasik ekstraksiyonda en düşük ekstraksiyon verimleri ise katı-çözgen oranının en yüksek (60 g/L) olduğu noktalarda gözlenmiştir. Klasik ekstraksiyon işleminde en yüksek verimin (%94.29±0.26) elde edildiği optimum koşullar (11.47 pH, 34.50 g/L katı-çözgen oranı) istenebilirlik fonksiyonu yaklaşımı ile belirlenmiştir. Çemen otu tohumu proteinlerinin UDE işlemi ile ekstraksiyonunda, klasik ekstraksiyonda belirlenen optimum ekstraksiyon ortamı pH değeri (pH 11.47) sabit tutulmuştur. Sonikasyon genliği (%30-80) ve katı-çözgen oranı (20-60 g/L) bağımsız işlem değişkenleri olarak seçilmiş ve en yüksek ekstraksiyon veriminin elde edildiği koşullar istenebilirlik fonksiyonu yaklaşımı ile belirlenmiştir. UDE işleminde genlik değerinin yüksek olduğu koşullarda (%55 ve %80) ekstraksiyon veriminin arttığı gözlenmiştir. Ayrıca, klasik ekstraksiyon işlemi ile kıyaslandığında daha yüksek katı-çözgen oranlarında daha yüksek verim değerlerine ulaşıldığı görülmüştür. Böylelikle, kullanılan çözgen miktarının UDE işlemi ile azaltılabileceği ortaya konmuştur. Her iki ekstraksiyon işlemi, işlem süreleri açısından kıyaslandığında, UDE işleminde daha yüksek verime 8 kat daha kısa sürede ulaşıldığı belirlenmiştir. UDE işlemi

için optimum koşullarda en yüksek verime (98.74 ± 0.49), ~ 44 g/L katı-çözgen oranı ve ~ 68 genlik değerinde ulaşılmıştır.

Klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile elde edilen ekstraktlardan proteinler izole edilerek çemen otu tohumu protein izolatları üretilmiş ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının $0.23-8.87$ g/L, UDE işlemi ile elde edilen izolatların $0.22-9.38$ g/L aralığında değişen çözünürlük değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. En yüksek çözünürlük değerleri pH 11.0 ve pH 12.0, en düşük çözünürlük değerleri ise pH 4.0 değeri için elde edilmiştir. Klasik ekstraksiyon işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının koagüle protein değerlerinin $\sim 3.0-5.0$, su tutma kapasitelerinin $\sim 2.0-2.7$ g/g, yağ tutma kapasitelerinin $\sim 1.5-2.1$ g/g, köpük kapasitelerinin $\sim 10.7-18.0$, köpük stabilite değerlerinin $\sim 51.9-69.67$, emülsiyon stabilite değerlerinin $\sim 23.6-28.1$ dakika, emülsiyon aktivitelerinin $\sim 75.8-80.9$ m²/g ve emülsiyon kapasitelerinin $\sim 18.3-26.0$ aralıklarında değiştiği tespit edilmiştir. UDE işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının ise koagüle protein değerlerinin $\sim 15.8-31.2$, su tutma kapasitelerinin $\sim 2.2-3.2$ g/g, yağ tutma kapasitelerinin $\sim 2.6-4.1$ g/g, köpük kapasitelerinin $\sim 16.3-21.3$, köpük stabilite değerlerinin $\sim 59.7-78.1$, emülsiyon stabilite değerlerinin $\sim 30.2-34.5$ dakika, emülsiyon aktivitelerinin $\sim 73.8-76.8$ m²/g ve emülsiyon kapasitelerinin $\sim 26.9-30.5$ aralıklarında değiştiği belirlenmiştir. Fonksiyonel özellikler genel olarak incelendiğinde, UDE işlemi ile elde edilen çemen otu tohumu proteinlerinin daha üstün özelliklere sahip olduğu gözlenmiştir.

Çemen otu tohumundan klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile optimum koşullarda elde edilen protein izolatlarının SDS-PAGE ile molekül ağırlıkları belirlenmiş ve her iki örnek için benzer moleküler ağırlık dağılımı tespit edilmiştir. Protein izolatları için, $22-175$ kDa aralığında 46 , 59 ve 80 kDa moleküler ağırlıklarında üç belirgin bant tespit edilmiştir. Protein izolatlarının yapısal özellikleri ise FT-IR analizleri ile ortaya konmuş, klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile elde edilen protein izolatlarının FT-IR spektrumlarında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Çemen otu tohumu proteinlerinin fonksiyonel özelliklerini olumlu etkileyen UDE işleminin, yapısal özelliklerde büyük bir değişikliğe yol açmadığı ortaya konmuştur. Ayrıca, protein izolatlarının protein ikincil yapıları tespit edilmiş, β -tabaka yapılarının yüksek oranda mevcut olduğu belirlenmiştir.

Çemen otu tohumu protein izolatına ait amino asit kompozisyonunun belirlenmesi amacıyla UDE işlemi ile optimum koşullarda elde edilen örnekler kullanılmış ve toplam esansiyel amino asit içeriği 317.97 g amino asit/kg protein izolatı olarak belirlenmiştir. Çemen otu tohumu protein izolatının histidin ve metiyonin miktarının düşük, lizin içeriğinin yüksek olduğu görülmüştür. Klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının denatürasyon sıcaklıkları ve denatürasyon entalpileri Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) termogramları kullanılarak belirlenmiştir. Klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatları için denatürasyon sıcaklıkları sırası ile $\sim 119^{\circ}\text{C}$ ve $\sim 135^{\circ}\text{C}$, denatürasyon entalpileri ise sırası ile 28 mJ/g ve 53 mJ/g olarak hesaplanmıştır.

Klasik ekstraksiyon ve UDE işlemleri ile optimum koşullarda elde edilen protein izolatları kullanılarak kap kek üretimi gerçekleştirilmiş, hamur ve kap keklerin renk özellikleri, hamurların kıvam ve yoğunluk değerleri, kap keklerin nem içeriği, su aktivitesi, pişme verimi, hacim, simetri ve üniformite indeksleri, yığın yoğunluk ve sertlik değerleri tespit edilmiştir. Farklı protein izolatlarının ilavesi ile hamur yoğunluğunun azaldığı ve kıvamının arttığı tespit edilmiştir. Renk değerleri incelendiğinde, UDE işlemleri ile elde edilen çemen otu tohumu protein izolatı katkılı kap keklerin esmerleşme indeksi (BI) değerlerinin klasik ekstraksiyon işlemleri ile elde edilen protein izolatı katkılı kap keklerle göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Farklı protein izolatı katkılı kap keklerin nem ve su aktivitesi değerlerinin birbirine yakın olduğu bulgulanmıştır. Kap keklerin hacim, simetri ve üniformite indeksleri incelendiğinde, UDE işlemi ile elde edilen protein katkılı kap keklerin fiziksel olarak daha düzgün bir dış yapıya sahip olduğu ortaya konmuştur. Kap keklerin yığın yoğunluk değerlerinin artan protein katkı oranları ile artış gösterdiği görülürken, örneklerin pişme verimleri arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Ayrıca, protein katkı oranı arttıkça örneklerin sertlik değerlerinin azaldığı belirlenmiştir. Protein katkılı kap kekler için gerçekleştirilen duyusal analiz sonucunda, %10 protein izolatı katkılı kap kek için görünüş, kabuk rengi, tekstür, tat, aroma ve genel beğeni açısından verilen puanların daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, çemen otu tohumu protein izolatı katkılı keklerin tüketiciler tarafından beğenildiğini göstermiştir.

Tez çalışması neticesinde elde edilen sonuçlar, karakterize edilen çemen otu tohumu protein izolatlarının sahip oldukları fonksiyonel ve yapısal özelliklerinin yanı sıra amino asit profili ile de hayvansal proteinlere alternatif olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca, tez çalışması ile proteinlerin ekstraksiyonunda ultrasonik yöntemlerin klasik yöntemlere göre avantajları ortaya konmuştur. Sonuç olarak, ülkemizde birçok bölgede yetiştirilen, ucuz ve doğal bir bitkisel kaynak olan çemen otu tohumundan elde edilecek protein izolatlarının gıda endüstrisinde farklı kullanım olanaklarına sahip olabileceği düşünülmektedir.



6. KAYNAKLAR

- AACC, 2000. Method 10-05.01. Guidelines for measurement of volume by rapeseed displacement. Approved Methods of Analysis, 11th edition. St. Paul, MN: AACC International.
- Abdel-Aal, E.S.M., Shehata, A.A., El-Mahdy, A.R. ve Youssef, M.M., 1986. Extractability and functional properties of some legume proteins isolated by three different methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37(6), 553-559.
- Acharya, S.N., Thomas, J.E. ve Basu, S.K., 2006. Fenugreek: an “old world” crop for the “new world”. *Biodiversity*, 7(3-4), 27-30.
- Ahmed, J., Ramaswamy, H.S., Ayad, A., Alli, I. ve Alvarez, P., 2007. Effect of high-pressure treatment on rheological, thermal and structural changes in Basmati rice flour slurry. *Journal of Cereal Science*, 46(2), 148-156.
- Akdeniz, V. ve Akalın, A.S., 2019. New approach for yoghurt and ice cream production: High-intensity ultrasound. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 392-398.
- Alm, T., 2002. Bukkehornkløver *Trigonella foenum-graecum* i folketradisjonen i Norge. *Blyttia*, 60(4), 213-224.
- Altuntaş, E., Özgöz, E. ve Taşer, Ö.F., 2005. Some physical properties of fenugreek (*Trigonella foenum-graceum* L.) seeds. *Journal of Food Engineering*, 71(1), 37-43.
- Anderson, T.J. ve Lamsal, B.P., 2011. Zein extraction from corn, corn products, and coproducts and modifications for various applications: a review. *Cereal Chemistry*, 88(2), 159-173.
- Arif, M. ve Pauls, K.P., 2018. Properties of Plant Proteins. *Plant Bioproducts*, Chen, G., Weselake, R., Singer, S. (eds). Springer, New York 121-142.
- Aryee, A.N.A., Agyei, D. ve Udenigwe, C.C., 2018. Impact of processing on the chemistry and functionality of food proteins. *Proteins in food processing*. Woodhead Publishing 27-45.
- Aslan, M. ve Ertaş, N., 2020. Possibility of using chickpea aquafaba as egg replacer in traditional cake formulation. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 24(1), 1-8.
- Baccou, J.C., Sauvaire, Y., Olle, M. ve Petit, J., 1978. L’huile de Fenugreek: composition, properties, possibilities d’utilisation sans l’industrie des peintures et vernis. *Rue Francaise des Corps Gars*, 25, 353-359.
- Badami, R.C. ve Kalburgi, G.S., 1969. Component acids of *Trigonella foenum-graecum* (Fenugreek) seed oil. *The Karnatak University Journal Science*, 14, 16-19.
- Baeva, M.R., Panchev, I.N. ve Terzieva, V.V., 2000. Comparative study of texture of normal and energy reduced sponge cakes. *Food/Nahrung*, 44(4), 242-246.
- Barbut, S., 1999. Determining water and fat holding. In G. M. Hall (Ed.), *Methods of testing protein functionality*. Blackie Academic and Professional, 186-225.
- Barth, A., 2007. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767(9), 1073-1101.
- Barth, A. ve Zscherp, C., 2002. What vibrations tell about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 35(4), 369-430.
- Beals, K.A., 2019. Potatoes, nutrition and health. *American Journal of Potato Research*, 96(2), 102-110.

- Bekar, E., 2017. Üzüm Çekirdeği İlavesinin Keklerin Kalite Özelliklerine Etkisi (Doktora Tezi), Bursa Uludağ Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Belitz, H.D., Grosch, W. ve Schieberle, P., 2009. Legumes. *Food Chemistry*, 746-769.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. ve Stryer, L., 2002. Protein structure and function. *Biochemistry*, 262, 159-173.
- Berg, J.M., Stryer, L., Tymoczko, J.L. ve Gatto, G.J., 2015. *Biochemistry*. 8th Edition, WH Freeman, 1120 p.
- Bernardi, S., Corso, M. P., Baraldi, I.J., Colla, E. ve Canan, C., 2018. Obtaining concentrated rice bran protein by alkaline extraction and stirring–optimization of conditions. *International Food Research Journal*, 25(3), 1133-1139.
- Bernardi, S., Lupatini-Menegotto, A.L., Kalschne, D.L., Moraes Flores, É.L., Bittencourt, P.R.S., Colla, E. ve Canan, C., 2021. Ultrasound: A suitable technology to improve the extraction and techno-functional properties of vegetable food proteins. *Plant Foods for Human Nutrition*, 76, 1-11.
- Bhol, S., Lanka, D. ve Bosco, S.J.D., 2016. Quality characteristics and antioxidant properties of breads incorporated with pomegranate whole fruit bagasse. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 1717-1721.
- Boye, J.I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E. ve Rajamohamed, S.H., 2010. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43(2), 537-546.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brooker, B.E., 1993. The stabilisation of air in cake batters-the role of fat. *Food Structure*, 12(3), 2.
- Butt, M.S. ve Rizwana, B., 2010. Nutritional and functional properties of some promising legumes protein isolates. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(4), 373-379.
- Byler, D. M. ve Susi, H., 1986. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 25(3), 469-487.
- Carbonaro, M., Maselli, P., Dore, P. ve Nucara, A., 2008. Application of Fourier transform infrared spectroscopy to legume seed flour analysis. *Food Chemistry*, 108(1), 361-368.
- Cattan, Y., Patil, D., Vaknin, Y., Rytwo, G., Lakemond, C. ve Benjamin, O., 2022. Characterization of Moringa oleifera leaf and seed protein extract functionality in emulsion model system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 75, 102903.
- Cheftel, J.C., Cuq, J.L., Lorient, D., 1985. Amino Acids, Peptides and Proteins. Ch. 5 in *Food Chemistry* O.R. Fennema (Ed.), pp.246-369. Marcel Dekker, Inc., New York
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S. ve Abert-Vian, M., 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.
- Chen, R., Wang, X.J., Zhang, Y.Y., Xing, Y., Yang, L., Ni, H. ve Li, H.H., 2019. Simultaneous extraction and separation of oil, proteins, and glucosinolates from Moringa oleifera seeds. *Food Chemistry*, 300, 125162.

- Chiang, Y.S., Gelfand, T.I., Kister, A.E. ve Gelfand, I.M., 2007. New classification of supersecondary structures of sandwich-like proteins uncovers strict patterns of strand assemblage. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 68(4), 915-921.
- Conrad, Z., Niles, M.T., Neher, D.A., Roy, E.D., Tichenor, N. E. ve Jahns, L., 2018. Relationship between food waste, diet quality, and environmental sustainability. *PloS One*, 13(4), e0195405.
- Daniel, I.O. ve Kassa, M.T., 2021. Advances in Food Development with Plant-Based Proteins from Seed Sources. In *Grain and Seed Proteins Functionality*. IntechOpen.
- Daştan, S., 2022. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon İşlemi ile Çemen Otu Tohumundan Bazı Biyoaktif Bileşenlerin Ekstraksiyonu, Elde Edilen Bileşenlerin Karakterizasyonu ve Stabilitelerinin Belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi), Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi. Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tokat.
- De Groot, A.P. ve Slump, P., 1969. Effects of severe alkali treatment of proteins on amino acid composition and nutritive value. *The Journal of Nutrition*, 98(1), 45-56.
- de la Rosa-Millán, J., Orona-Padilla, J.L., Flores-Moreno, V.M. ve Serna-Saldívar, S.O., 2018. Physicochemical, functional and ATR-FTIR molecular analysis of protein extracts derived from starchy pulses. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(6), 1414-1424.
- del Mar Contreras, M., Lama-Muñoz, A., Gutiérrez-Pérez, J.M., Espínola, F., Moya, M. ve Castro, E., 2019. Protein extraction from agri-food residues for integration in biorefinery: Potential techniques and current status. *Bioresource Technology*, 280, 459-477.
- Deng, Y., Huang, L., Zhang, C., Xie, P., Cheng, J., Wang, X. ve Li, S., 2019. Physicochemical and functional properties of Chinese quince seed protein isolate. *Food Chemistry*, 283, 539-548.
- Dogan, S.F., Sahin, S. ve Sumnu, G., 2005. Effects of soy and rice flour addition on batter rheology and quality of deep-fat fried chicken nuggets. *Journal of Food Engineering*, 71(1), 127-132.
- Du, M., Xie, J., Gong, B., Xu, X., Tang, W., Li, X. ve Xie, M., 2018. Extraction, physicochemical characteristics and functional properties of Mung bean protein. *Food Hydrocolloids*, 76, 131-140.
- Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G. ve Ma, H., 2020. The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 35, 100547.
- El Nasri, N.A. ve El Tinay, A.H., 2007. Functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein concentrate. *Food Chemistry*, 103(2), 582-589.
- Feyzi, S., Milani, E. ve Golimovahhed, Q.A., 2018a. Grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protein isolate: The effect of extraction optimization and drying methods on the structure and functional properties. *Food Hydrocolloids*, 74, 187-196.
- Feyzi, S., Varidi, M., Zare, F. ve Varidi, M.J., 2015. Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seed protein isolate: extraction optimization, amino acid composition, thermo and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(15), 3165-3176.
- Feyzi, S., Varidi, M., Zare, F. ve Varidi, M.J., 2017. A comparison of chemical, structural and functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein

- isolates produced using different defatting solvents. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 27-35.
- Feyzi, S., Varidi, M., Zare, F. ve Varidi, M.J., 2018b. Effect of drying methods on the structure, thermo and functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein isolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(5), 1880-1888.
- Figuerola-González, J.J., Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E.J., Aguirre-Mandujano, E., Alvarez-Ramirez, J. ve Martínez-Velasco, A., 2022. Modifying the structure, physicochemical properties, and foaming ability of amaranth protein by dual pH-shifting and ultrasound treatments. *LWT-Food Science and Technology*, 153, 112561.
- Firatligil-Durmus, E. ve Evranuz, O., 2010. Response surface methodology for protein extraction optimization of red pepper seed (*Capsicum frutescens*). *LWT-Food Science and Technology*, 43(2), 226-231.
- Foegeding, E.A. ve Davis, J.P., 2011. Food protein functionality: A comprehensive approach. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1853-1864.
- Gadalkar, S.M. ve Rathod, V.K., 2020. Extraction of watermelon seed proteins with enhanced functional properties using ultrasound. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 50(2), 133-140.
- Galili, G. ve Amir, R., 2013. Fortifying plants with the essential amino acids lysine and methionine to improve nutritional quality. *Plant Biotechnology Journal*, 11(2), 211-222.
- Gao, Z., Shen, P., Lan, Y., Cui, L., Ohm, J. B., Chen, B. ve Rao, J., 2020. Effect of alkaline extraction pH on structure properties, solubility, and beany flavor of yellow pea protein isolate. *Food Research International*, 131, 109045.
- Görgüç, A., Bircan, C. ve Yılmaz, F.M., 2019. Sesame bran as an unexploited by-product: Effect of enzyme and ultrasound-assisted extraction on the recovery of protein and antioxidant compounds. *Food Chemistry*, 283, 637-645.
- Gorissen, S.H., Crombag, J.J., Senden, J.M., Waterval, W.H., Bierau, J., Verdijk, L.B. ve van Loon, L.J., 2018. Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates. *Amino Acids*, 50, 1685-1695.
- Hames, D. ve Hooper, N., 2006. *Biochemistry*, Taylor & Francis Group, United Kingdom, 29-75.
- Heywood, A.A., Myers, D.J., Bailey, T.B. ve Johnson, L.A., 2002. Functional properties of low-fat soy flour produced by an extrusion-expelling system. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79, 1249-1253.
- Hidvegi, M., Lasztity, R., Bekes, F. ve El Kady, A., 1984. Contributions to the nutritional characterization of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L. 1753). *Acta Alimentaria*, 13(4), 315-324
- Horax, R., Hettiarachchy, N., Kannan, A. ve Chen, P., 2011. Protein extraction optimisation, characterisation, and functionalities of protein isolate from bitter melon (*Momordica charantia*) seed. *Food Chemistry*, 124(2), 545-550.
- Hu, H., Wu, J., Li-Chan, E.C., Zhu, L., Zhang, F., Xu, X. ve Pan, S., 2013. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. *Food Hydrocolloids*, 30(2), 647-655.
- Hu, H., Zhu, X., Hu, T., Cheung, I.W., Pan, S. ve Li-Chan, E., 2015. Effect of ultrasound pre-treatment on formation of transglutaminase-catalysed soy protein hydrogel as

- a riboflavin vehicle for functional foods. *Journal of Functional Foods*, 19, 182-193.
- Iqbal, A., Khalil, I.A., Ateeq, N. ve Khan, M.S., 2006. Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry*, 97(2), 331-335.
- Jambrak, A.R., Lelas, V., Mason, T.J., Krešić, G. ve Badanjak, M., 2009. Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of Food Engineering*, 93(4), 386-393.
- Jarpa-Parra, M., Bamdad, F., Wang, Y., Tian, Z., Temelli, F., Han, J. ve Chen, L., 2014. Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2), 461-469.
- Jiang, L., Wang, J., Li, Y., Wang, Z., Liang, J., Wang, R. ve Zhang, M., 2014. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. *Food Research International*, 62, 595-601.
- Jiménez-Munoz, L.M., Tavares, G.M. ve Corredig, M., 2021. Design future foods using plant protein blends for best nutritional and technological functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 113, 139-150.
- Kannan, A., Hettiarachchy, N. ve Marshall, M., 2012. Food Proteins–Peptides: Chemistry and Structure. *Food Proteins and Peptides*, 1-24.
- Karabulut, G., Feng, H. ve Yemiş, O., 2022. Physicochemical and Antioxidant Properties of Industrial Hemp Seed Protein Isolate Treated by High-Intensity Ultrasound. *Plant Foods for Human Nutrition*, 77(4), 577-583.
- Karki, B., Lamsal, B.P., Jung, S., van Leeuwen, J. H., Pometto III, A.L., Grewell, D. ve Khanal, S.K., 2010. Enhancing protein and sugar release from defatted soy flakes using ultrasound technology. *Journal of Food Engineering*, 96(2), 270-278.
- Kaur, M. ve Singh, N., 2007. Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 102(1), 366-374.
- Kaur, R. ve Ghoshal, G., 2022. Sunflower protein isolates-composition, extraction and functional properties. *Advances in Colloid and Interface Science*, 306, 102725.
- Kaushik, P., Dowling, K., McKnight, S., Barrow, C.J., Wang, B. ve Adhikari, B., 2016. Preparation, characterization and functional properties of flax seed protein isolate. *Food Chemistry*, 197, 212-220.
- Khalil O.M. ve Sarkadi S.L., 1991. Biochemical studies of some non-conventional sources of protein. V, Extraction and characterization of protein from fenugreek seed (*Trigonella foenum* L.). *Nahrung (Weinheim)*, 35(3), 303-308.
- Khorshidian, N., Yousefi Asli, M., Arab, M., Adeli Mirzaie, A. ve Mortazavian, A.M., 2016. Fenugreek: potential applications as a functional food and nutraceutical. *Nutrition and Food Sciences Research*, 3(1), 5-16.
- Kılıç, G.B. ve Karahan, A.G., 2010. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve laktik asit bakterilerinin tanısında kullanılması. *Gıda*, 35(6), 445-452.
- Kim, W., Wang, Y. ve Selomulya, C., 2020. Dairy and plant proteins as natural food emulsifiers. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 261-272.
- Kinsella, J.E., 1987. Physical properties of food and milk components: research needs to expand uses. *Journal of Dairy Science*, 70(11), 2419-2428.
- Kinsella, J.E., 1979. Functional Properties of Soy Proteins. *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 56, 242-258.

- Kiosseoglou, V., Paraskevopoulou, A. ve Poojary, M.M., 2021. Functional and physicochemical properties of pulse proteins. In *Pulse Foods* (pp. 113-146). Academic Press.
- Kızılalp, G. ve Dirim, S.N., 2019. Production and characterization of plant protein concentrates from shells of kidney bean, pea and cowpea and their effects on freezing and freeze drying of kiwi puree. *Akademik Gıda*, 17(2), 157-166.
- Kong, J. ve Yu, S., 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8), 549-559.
- Kotecka-Majchrzak, K., Sumara, A., Fornal, E. ve Montowska, M., 2020. Oilseed proteins—properties and application as a food ingredient. *Trends in Food Science & Technology*, 106, 160-170.
- Kramer, A. ve Kwee, W.H., 1977. Functional and nutritional properties of tomato protein concentrates. *Journal of Food Science*, 42(1), 207-211.
- Krause, J.P., 2002. Comparison of the effect of acylation and phosphorylation on surface pressure, surface potential and foaming properties of protein isolates from rapeseed (*Brassica napus*). *Industrial Crops and Products*, 15(3), 221-228.
- Król-Kogus, B., Głód, D., Krauze-Baranowska, M., & Matławska, I., 2014. Application of one-and two-dimensional high-performance liquid chromatography methodologies for the analysis of C-glycosylflavones from fenugreek seeds. *Journal of Chromatography A*, 1367, 48-56.
- Kudre, T.G., Benjakul, S. ve Kishimura, H., 2013. Comparative study on chemical compositions and properties of protein isolates from mung bean, black bean and bambara groundnut. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(10), 2429-2436.
- Kumar, K., Srivastav, S. ve Sharanagat, V.S., 2021. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325.
- Kumar, M., Tomar, M., Punia, S., Dhakane-Lad, J., Dhumal, S., Changan, S. ve Kennedy, J.F., 2022. Plant-based proteins and their multifaceted industrial applications. *LWT-Food Science and Technology*, 154, 112620.
- Lawless, H.T., Sinopoli, D. ve Chapman, K.W., 2010. A comparison of the labeled affective magnitude scale and the 9-point hedonic scale and examination of categorical behavior. *Journal of Sensory Studies*, 25, 54-66.
- Laemmli, U.K., 1970. SDS-PAGE Laemmli method. *Nature*, 227, 680-685.
- Lakemond, C.M.M. ve Vereijken, J.M., 2003. Soybean proteins: Structure and function. In *Industrial proteins in perspective*. *Progress in Biotechnology* 23 (pp. 55-62). Elsevier.
- Lam, R.S. ve Nickerson, M.T. 2013. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach. *Food Chemistry*, 141(2), 975-984.
- Langyan, S., Yadava, P., Khan, F.N., Dar, Z.A., Singh, R. ve Kumar, A., 2022. Sustaining protein nutrition through plant-based foods. *Frontiers in Nutrition*, 8, 772573.
- L'hocine, L., Boye, J.I. ve Arcand, Y., 2006. Composition and functional properties of soy protein isolates prepared using alternative defatting and extraction procedures. *Journal of Food Science*, 71(3), C137-C145.
- Li, J., Fu, J., Ma, Y., He, Y., Fu, R., Qayum, A. ve Wang, L., 2022. Low temperature extrusion promotes transglutaminase cross-linking of whey protein isolate and enhances its emulsifying properties and water holding capacity. *Food Hydrocolloids*, 125, 107410.

- Li, K., Ma, H., Li, S., Zhang, C. ve Dai, C., 2017. Effect of ultrasound on alkali extraction protein from rice dreg flour. *Journal of Food Process Engineering*, 40(2), e12377.
- Li, M., Ni, Y., Peng, Y., Wen, X. ve Wang, Y., 2016. Optimization of ultrasound-assisted extraction of capsicum seed protein isolate. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 32(24), 309-314.
- Liang, H.N. ve Tang, C.H., 2014. Pea protein exhibits a novel Pickering stabilization for oil-in-water emulsions at pH 3.0. *LWT-Food Science and Technology*, 58(2), 463-469.
- Li-Chan, E C.Y. ve Lacroix, I.M.E., 2018. Properties of proteins in food systems: an introduction. In *Proteins in food processing* (pp. 1-25). Woodhead Publishing.
- Litwack, G., 2018. Proteins. In: *Human biochemistry*. Springer, New York, pp 63–94.
- Liu, J.J., Gasmalla, M.A.A., Li, P. ve Yang, R., 2016. Enzyme-assisted extraction processing from oilseeds: Principle, processing and application. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 35, 184-193.
- Liu, M., Toth, J.A., Childs, M., Smart, L.B. ve Abbaspourrad, A., 2023. Composition and functional properties of hemp seed protein isolates from various hemp cultivars. *Journal of Food Science*, 88(3), 942-951.
- Lonnie, M., Laurie, I., Myers, M., Horgan, G., Russell, W.R. ve Johnstone, A.M., 2020. Exploring health-promoting attributes of plant proteins as a functional ingredient for the food sector: a systematic review of human interventional studies. *Nutrients*, 12(8), 2291.
- Ly, H.L., Tran, T.M. C., Tran, T.T.T., Ton, N.M.N. ve Le, V.V.M., 2018. Application of ultrasound to protein extraction from defatted rice bran. *International Food Research Journal*, 25(2), 695-701.
- Majzoobi, M., Ghiasi, F., Habibi, M., Hedayati, S. ve Farahnaky, A., 2014. Influence of soy protein isolate on the quality of batter and sponge cake. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(3), 1164-1170.
- Majzoobi, M., Mohammadi, M. ve Farahnaky, A., 2020. Simultaneous reduction of fat and sugar in cake production; effects of changing sucrose, oil, water, inulin, and Rebaudioside A on cake batter properties. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(10), e14733.
- Mandegary, A., Pournamdari, M., Sharififar, F., Pournourmohammadi, S., Fardiar, R. ve Shooli, S., 2012. Alkaloid and flavonoid rich fractions of fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum* L.) with antinociceptive and anti-inflammatory effects. *Food and Chemical Toxicology*, 50(7), 2503-2507.
- Marsh, K., Zeuschner, C. ve Saunders, A., 2012. Health implications of a vegetarian diet: a review. *American Journal of Lifestyle Medicine*, 6(3), 250-267.
- McClements, D.J., 2005. *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press.
- Mechmeche, M., Kachouri, F., Chouabi, M., Ksontini, H., Setti, K. ve Hamdi, M., 2017. Optimization of extraction parameters of protein isolate from tomato seed using response surface methodology. *Food Analytical Methods*, 10, 809-819.
- Mehrafarin, A., Qaderi, A., Rezazadeh, S.H., Naghdi, B.H., Nourmohammadi, G.H. ve Zand, E., 2010. Bioengineering of important secondary metabolites and metabolic pathways in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Journal of Medicinal Plants*, 35(9), 1-18.
- Mine, Y., 1995. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 6(7), 225-232.

- Mir, N.A., Riar, C.S. ve Singh, S., 2019. Physicochemical, molecular and thermal properties of high-intensity ultrasound (HIUS) treated protein isolates from album (*Chenopodium album*) seed. *Food Hydrocolloids*, 96, 433-441.
- Monnet, A F., Laleg, K., Michon, C. ve Micard, V., 2019. Legume enriched cereal products: A generic approach derived from material science to predict their structuring by the process and their final properties. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 131-143.
- Morales, R., Martínez, K.D., Ruiz-Henestrosa, V.M.P. ve Pilosof, A.M., 2015. Modification of foaming properties of soy protein isolate by high ultrasound intensity: Particle size effect. *Ultrasonics Sonochemistry*, 26, 48-55.
- Morris, A.L., MacArthur, M.W., Hutchinson, E.G. ve Thornton, J.M., 1992. Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 12(4), 345-364.
- Mullaicharam, A.R., Deori, G. ve Maheswari, R.U., 2013. Medicinal values of fenugreek-a review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 4(1), 1304-1313.
- Muzquiz, M., Varela, A., Burbano, C., Cuadrado, C., Guillamón, E. ve Pedrosa, M.M., 2012. Bioactive compounds in legumes: pronutritive and antinutritive actions. Implications for nutrition and health. *Phytochemistry Reviews*, 11, 227-244.
- Nadathur, S.R., Wanasundara, J.P.D. ve Scanlin, L., 2017. Proteins in the diet: Challenges in feeding the global population. In *Sustainable protein sources* (pp. 1-19). Academic Press.
- Nelson, D.L. ve Cox, M.M., 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Çeviri Editörü: Prof. Dr. Nedret Kılıç, Üçüncü Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık. 115-138
- Neto, V.Q., Narain, N., Silva, J.B. ve Bora, P.S., 2001. Functional properties of raw and heat processed cashew nut (*Anacardium occidentale*, L.) kernel protein isolates. *Food/Nahrung*, 45(4), 258-262.
- Nielsen, L.V., Kristensen, M.D., Klingenberg, L., Ritz, C., Belza, A., Astrup, A. ve Raben, A., 2018. Protein from meat or vegetable sources in meals matched for fiber content has similar effects on subjective appetite sensations and energy intake—a randomized acute cross-over meal test study. *Nutrients*, 10(1), 96.
- Niknam, R., Kiani, H., Mousavi, Z.E. ve Mousavi, M., 2021. Extraction, detection, and characterization of various chemical components of *Trigonella foenum-graecum* L.(fenugreek) known as a valuable seed in agriculture. *Fenugreek: Biology and Applications*, 189-217.
- Olivos-Lugo, B.L., Valdivia-López, M.Á. ve Tecante, A., 2010. Thermal and physicochemical properties and nutritional value of the protein fraction of Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.). *Food Science and Technology International*, 16(1), 89-96.
- Özdemir, B. ve Gürbüz, B., 1998. Research on the yield and production characteristics of some selected Fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) lines. *Journal of Central Research Institute for Field Crops*, 7(2), 10-17.
- Palou, E., López-Malo, A., Barbosa-Cánovas, G.V., Welte-Chanes, J. ve Swanson, B.G., 1999. Polyphenoloxidase activity and color of blanched and high hydrostatic pressure treated banana puree. *Journal of Food Science*, 64(1), 42-45.
- Pearce, K.N. ve Kinsella, J.E., 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3), 716-723.

- Pojić, M., Mišan, A. ve Tiwari, B., 2018. Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 93-104.
- Purcell, M., Novetta-Delen, A., Arakawa, H., Malonga, H. ve Tajmir-Riahi, H.A., 1999. Interaction of RNase A with VO₃-and VO₂⁺ ions. Metal ion binding mode and protein secondary structure. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 17(3), 473-480.
- Qiaoyun, C., Xinghong, N., Liang, Z., Zheng, T., Jin, L., Kang, S. ve Xinghui, L., 2017. Optimization of protein extraction and decoloration conditions for tea residues. *Horticultural Plant Journal*, 3(4), 172-176.
- Rahmati, N.F. ve Mazaheri Tehrani, M., 2014. Influence of different emulsifiers on characteristics of eggless cake containing soy milk: Modeling of physical and sensory properties by mixture experimental design. *Journal of Food Science and Technology*, 51, 1697-1710.
- Raju, J. ve Bird, R.P., 2006. Alleviation of hepatic steatosis accompanied by modulation of plasma and liver TNF- α levels by *Trigonella foenum graecum* (fenugreek) seeds in Zucker obese (fa/fa) rats. *International Journal of Obesity*, 30(8), 1298-1307.
- Rayyan, S., Fossen, T. ve Andersen, Ø.M., 2010. Flavone C-glycosides from seeds of fenugreek, *Trigonella foenum-graecum* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7211-7217.
- Resendiz-Vazquez, J.A., Ulloa, J.A., Urías-Silvas, J.E., Bautista-Rosales, P.U., Ramírez-Ramírez, J.C., Rosas-Ulloa, P. ve González-Torres, L.J.U.S., 2017. Effect of high-intensity ultrasound on the technofunctional properties and structure of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed protein isolate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 436-444.
- Roccia, P., Ribotta, P.D., Pérez, G.T. ve León, A.E., 2009. Influence of soy protein on rheological properties and water retention capacity of wheat gluten. *LWT-Food Science and Technology*, 42(1), 358-362.
- Saldamlı, İ., Temiz, A., 2017 Amino Asitler, Peptitler, Proteinler. *Gıda Kimyası*, Saldamlı, İ. (Baş ed.), 227-317 Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, Türkiye.
- Schryver, T., 2002. Fenugreek. *Total health*, 24(4), 42-44.
- Seena, S., Sridhar, K.R., 2005. Physiochemical, functional and cooking properties of Canavalia. *Journal of Food Chemistry*, 32, 406-412.
- Shankaracharya, N.B. ve Natarajan, C.P., 1972. Fenugreek chemical composition and values. *Indian Spices*, 1, 2-12.
- Shao, D., Atungulu, G.G., Pan, Z., Yue, T., Zhang, A. ve Fan, Z., 2014. Characteristics of isolation and functionality of protein from tomato pomace produced with different industrial processing methods. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 532-541.
- Sharma, R.D., 1986. Effect of fenugreek seeds and leaves on blood glucose and serum insulin responses in human subjects. *Nutrition Research*, 6(12), 1353-1364.
- Shen, F., Niu, F., Li, J., Su, Y., Liu, Y. ve Yang, Y., 2014. Interactions between tea polyphenol and two kinds of typical egg white proteins—ovalbumin and lysozyme: Effect on the gastrointestinal digestion of both proteins in vitro. *Food Research International*, 59, 100-107.

- Shen, X., Shao, S. ve Guo, M., 2017. Ultrasound-induced changes in physical and functional properties of whey proteins. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(2), 381-388.
- Shevkani, K., Singh, N., Kaur, A. ve Rana, J.C., 2015. Structural and functional characterization of kidney bean and field pea protein isolates: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 43, 679-689.
- Shrestha, S., van't Hag, L., Haritos, V.S. ve Dhital, S., 2021. Lupin proteins: Structure, isolation and application. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 928-939.
- Sim, S.Y.J., Srv, A., Chiang, J.H. ve Henry, C.J., 2021. Plant proteins for future foods: A roadmap. *Foods*, 10(8), 1967.
- Singh, N., Kaur, M. ve Sandhu, K.S., 2005. Physicochemical and functional properties of freeze-dried and oven dried corn gluten meals. *Drying Technology*, 23(4), 975-988.
- Slinkard, A.E., McVicar, R., Brenzil, C., Pearse, P., Panchuk, K. ve Hartley, S., 2006. Fenugreek in Saskatchewan. *Saskatchewan Agriculture and Food*.
- Srinivasan, K., 2006. Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*): A review of health beneficial physiological effects. *Food Reviews International*, 22(2), 203-224.
- Sterna, V., Zute, S. ve Brunava, L., 2016. Oat grain composition and its nutrition benefice. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 8, 252-256.
- Sun-Waterhouse, D., Zhao, M. ve Waterhouse, G.I., 2014. Protein modification during ingredient preparation and food processing: approaches to improve food processability and nutrition. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 1853-1893.
- Tan, X.Y., Misran, A., Daim, L.D.J. ve Lau, B.Y.C., 2021. Optimization of protein extraction for proteomic analyses of fresh and frozen "Musang King" durian pulps. *Food Chemistry*, 343, 128471.
- Tang, C.H., Ten, Z., Wang, X.S. ve Yang, X.Q., 2006. Physicochemical and functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 54(23), 8945-8950.
- Taşçı, F., 2019. Et ve işlenmiş et tüketiminin halk sağlığına etkileri. *Bilge International Journal of Science and Technology Research*, 3(2), 231-245.
- Taylor, W.G., Zaman, M.S., Mir, Z., Mir, P.S., Acharya, S.N., Mears, G.J. ve Elder, J.L., 1997. Analysis of steroidal sapogenins from amber fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) by capillary gas chromatography and combined gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 753-759.
- Timilsena, Y.P., Adhikari, R., Barrow, C.J. ve Adhikari, B., 2016. Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from Australian chia seeds. *Food Chemistry*, 212, 648-656.
- Tiwari, B.K., 2015. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100-109.
- Topkaya, C., 2017. Nar kabuğu tozu ilavesinin keklerin besinsel, duyuusal ve mikrobiyolojik özelliklerine etkisi (Master's thesis, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Tulbek, M.C., Lam, R.S.H., Asavajaru, P. ve Lam, A., 2017. Pea: A sustainable vegetable protein crop. In *Sustainable protein sources* (pp. 145-164). Academic Press.
- Türker, İ., Daştan, S. ve İşleroğlu, H., 2022. Alkali extraction of dietary fiber from *Trigonella-foenum graecum* L. seeds (dietary fiber of fenugreek seeds). *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 10(4), 621-628.

- Uddin, M.S., Islam, M.A., Rahman, M.M., Uddin, M.B. ve Mazumder, A.R., 2018. Isolation of protein from defatted peanut meal and characterize their nutritional profile. *Chemistry Research Journal*, 3(2), 187-196.
- Vaidya, A.M., Saxena, D.C. ve Somani, V.B., 2017. Response surface methodology for optimization of protein isolate preparation from custard apple seed flour (*Annona squamosa*). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(9), 3079-3089.
- Van Stokkum, I.H.M., Linsdell, H., Hadden, J.M., Haris, P.I., Chapman, D. ve Bloemendal, M., 1995. Temperature-induced changes in protein structures studied by Fourier transform infrared spectroscopy and global analysis. *Biochemistry*, 34(33), 10508-10518.
- Vilkhu, K., Manasseh, R., Mawson, R. ve Ashokkumar, M., 2010. Ultrasonic recovery and modification of food ingredients. In *Ultrasound technologies for food and bioprocessing* (pp. 345-368). New York, NY: Springer New York.
- Wang, C., Jiang, L., Wei, D., Li, Y., Sui, X., Wang, Z. ve Li, D., 2011. Effect of secondary structure determined by FTIR spectra on surface hydrophobicity of soybean protein isolate. *Procedia Engineering*, 15, 4819-4827.
- Wang, Y., Wang, Y., Li, K., Bai, Y., Li, B. ve 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.
- Wani, A.A., Sogi, D.S., Singh, P., Wani, I.A. ve Shivhare, U.S., 2011. Characterisation and functional properties of watermelon (*Citrullus lanatus*) seed proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(1), 113-121.
- Wirkijowska, A., Zarzycki, P., Sobota, A., Nawrocka, A., Blicharz-Kania, A. ve Andrejko, D., 2020. The possibility of using by-products from the flaxseed industry for functional bread production. *LWT-Food Science and Technology*, 118, 108860.
- Withana-Gamage, T.S., Wanasundara, J.P., Pietrasik, Z. ve Shand, P.J., 2011. Physicochemical, thermal and functional characterisation of protein isolates from Kabuli and Desi chickpea (*Cicer arietinum* L.): A comparative study with soy (*Glycine max*) and pea (*Pisum sativum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(6), 1022-1031.
- Wrigley, C.W., 1996. Giant proteins with flour power. *Nature*, 381(6585), 738-739.
- Yagoub, A.A., Ma, M. ve Zhou, C., 2017. Ultrasonic-assisted extraction of protein from rapeseed (*Brassica napus* L.) meal: Optimization of extraction conditions and structural characteristics of the protein. *International Food Research Journal*, 24(2), 621.
- Yancheshmeh, B.S., Marvdashti, L.M., Emadi, A., Abdolshahi, A., Ebrahimi, A. ve Shariatifar, N., 2022. Evaluation of physicochemical and functional properties of *Vicia villosa* seed protein. *Food Analytical Methods*, 1-16.
- Yanjun, S., Jianhang, C., Shuwen, Z., Hongjuan, L., Jing, L., Lu, L. ve Jiaping, L., 2014. Effect of power ultrasound pre-treatment on the physical and functional properties of reconstituted milk protein concentrate. *Journal of Food Engineering*, 124, 11-18.
- Yavuz, M. ve Özçelik, B., 2016. Bitkisel protein izolatlarının fonksiyonel özellikleri. *Akademik Gıda*, 14(4), 424-430.
- Yi-Shen, Z., Shuai, S. ve FitzGerald, R., 2018. Mung bean proteins and peptides: Nutritional, functional and bioactive properties. *Food & Nutrition Research*, 62.

- Yu, C., Wu, F., Cha, Y., Zou, H., Guo, Y., Piao, H. ve Du, M., 2019. Structural and functional changes in ultrasonicated oyster protein isolates. *International Journal of Food Engineering*, 15(3-4), 20180190.
- Zhang, B., Cui, Y., Yin, G., Li, X. ve Zhou, X., 2009. Alkaline extraction method of cottonseed protein isolate. *Modern Applied Science*, 3(3), 77-82.
- Zhang, C., Sanders, J.P. ve Bruins, M.E., 2014. Critical parameters in cost-effective alkaline extraction for high protein yield from leaves. *Biomass and Bioenergy*, 67, 466-472.
- Zhang, F., Jiang, S., Feng, X., Wang, R., Zeng, M. ve Zhao, Y., 2020. Effect of heat treatment on physicochemical state and in vitro digestion of salt-soluble protein from Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *LWT-Food Science and Technology*, 134, 110126.
- Zhao, Y., Wen, C., Feng, Y., Zhang, J., He, Y., Duan, Y. ve Ma, H., 2021. Effects of ultrasound-assisted extraction on the structural, functional and antioxidant properties of *Dolichos lablab* L. Protein. *Process Biochemistry*, 101, 274-284.
- Zhou, J., Faubion, J.M. ve Walker, C.E., 2011. Evaluation of different types of fats for use in high-ratio layer cakes. *LWT-Food Science and Technology*, 44(8), 1802-1808.
- Zhu, K.X., Sun, X.H. ve Zhou, H.M., 2009. Optimization of ultrasound-assisted extraction of defatted wheat germ proteins by reverse micelles. *Journal of Cereal Science*, 50(2), 266-271.
- Zhu, Z., Zhu, W., Yi, J., Liu, N., Cao, Y., Lu, J. ve McClements, D.J., 2018. Effects of sonication on the physicochemical and functional properties of walnut protein isolate. *Food Research International*, 106, 853-861.
- Zuber, H., 1988. Temperature adaptation of lactate dehydrogenase Structural, functional and genetic aspects. *Biophysical Chemistry*, 29(1-2), 171-179.

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Öğrenim Bilgileri

İş Deneyimi

EKLER

EK I.	Çemen otu tohumu protein izolatı katkılı kap kek duyusal değerlendirme formu.....	90
EK II.	Optimum noktada üretilen protein izolatlarına ait görüntüler	91
EK III.	Hamur ve kap kek örneklerine ait görüntüler	92
EK IV.	Farklı oranlarda protein izolatları ile zenginleştirilmiş kap kek örnekleri...	93



EK I

Panelistin,

Tarih:

Adı-Soyadı:

PROTEİN KATKILI KAP KEK DUYUSAL DEĞERLENDİRME FORMU

Bu duyusal değerlendirme panelinde 4 adet örnek değerlendirmeye alınacaktır. Örnekleri görünüş, renk, tekstür, tat ve aroma bakımından puanlama tablosunda belirtilen rakamları kullanarak beğeninize göre değerlendiriniz. Panele başlamadan önce ve her örnek arasında bir önceki örneğin tadının giderilmesi adına lütfen su tüketiniz. ±

PUANLAMA

9	Kesinlikle beğendim
8	Çok beğendim
7	Orta derecede beğendim
6	Az beğendim
5	Ne beğendim ne beğenmedim
4	Pek beğenmedim
3	Orta derecede beğenmedim
2	Beğenmedim
1	Kesinlikle beğenmedim

DEĞERLENDİRME KRİTERLERİ

<u>Örnek Kodu</u>	<u>Görünüş (Kabarma ve simetri)</u>	<u>Kabuk Rengi</u>	<u>İç Rengi</u>	<u>Tekstür</u>	<u>Tat</u>	<u>Aroma</u>	<u>Genel Değerlendirme</u>

Notlar:

--

EK II



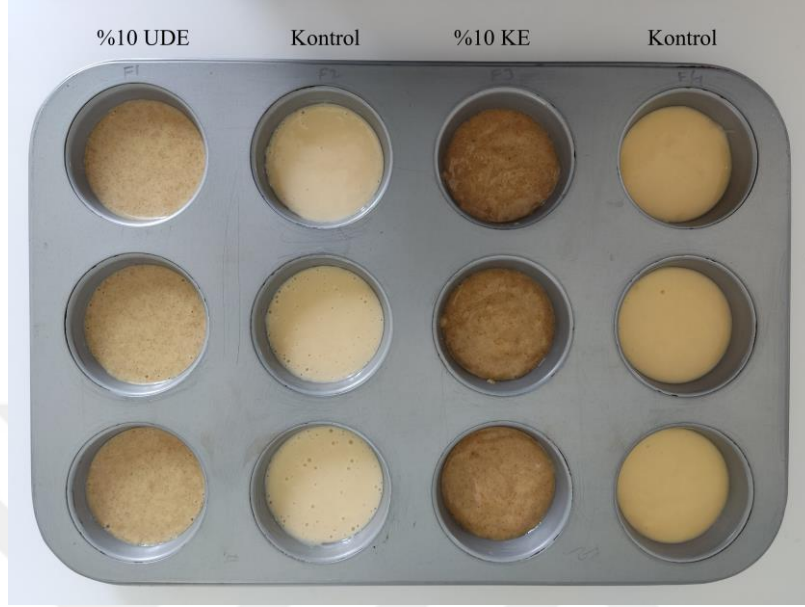
(a)



(b)

Ek Şekil 1. Optimum noktada üretilen protein izolatlarına ait görüntüler: (a) Klasik ekstraksiyon işlemi (b) ultrasonik-destekli ekstraksiyon işlemi ile üretilen protein izolatları

EK III



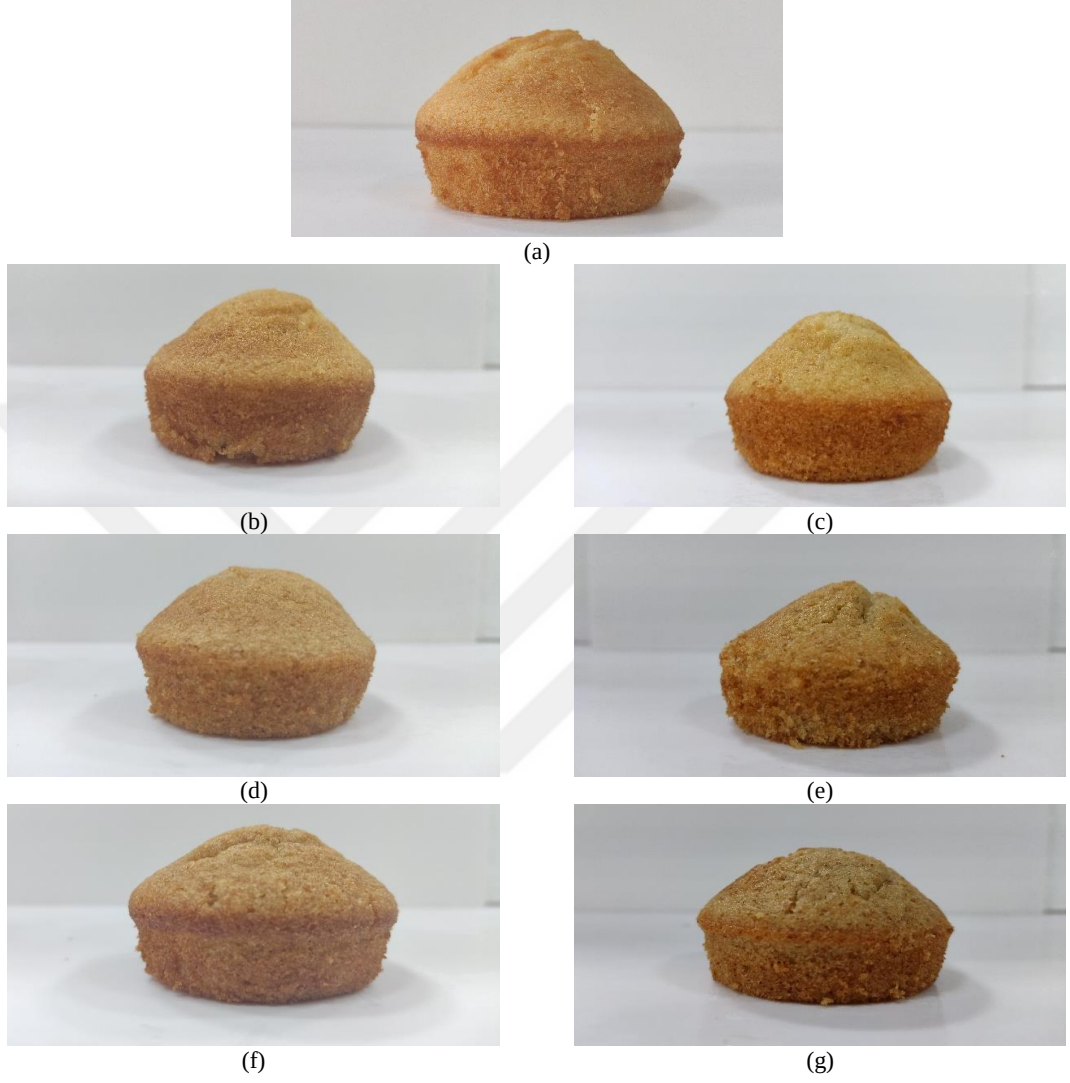
(a)



(b)

Ek Şekil 2. (a) Pişme öncesi hamur ve (b) pişmiş kap kek örnekleri

EK IV



Ek Şekil 3. Kap kek örnekleri: (a) Kontrol, (b) %5 KE, (c) %5 UDE, (d) %10 KE, (e) %10 UDE, (f) %20 KE, (g) %20 UDE