

T.C.
ANAkkALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

SOĞUK PRESTEN ÇIKAN KAPYA BİBER TOHUMU UNLARINDAN
PROTEİN İZOLASYONU VE FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ

Zişan HÜRİYET

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih:25/06/2014

Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Emin YILMAZ

ANAkkALE

Zişan HÜRİYET tarafından Doç.Dr. Emin YILMAZ yönetiminde hazırlanan ve 25/06/2014 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “Soğuk Presten Çıkan Kapy Biber Tohumu Unlarından Protein İzolasyonu ve Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda MühendisliğıAnabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİolarak oybirliğı ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Doç. Dr.Emin YILMAZ

.....

Başkan

Doç. Dr. N.Barış TUNCEL

.....

Üye

Yrd. Doç. Dr.Sibel MENTEŞE

.....

Üye

Sıra No:.....

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Zişan HÜRİYET

TEŞEKKÜR

Başta tez çalışmamın danışmanlığını yapan, çalışmamın her aşamasında benden yardımlarını ve önerilerini esirgemeyen, laboratuarda bana her türlü yardımcı olan, saygıdeğer hocam Doç. Dr. Emin YILMAZ'a, laboratuvar çalışması boyunca yardımlarını benden esirgemeyen doktora öğrencisi Dilek DÜNDAR EMİR'e ve yüksek lisans öğrencisi Ayşen UYGUR'a, hocalarım Arş. Gör. Buket AYDENİZ'e, Arş. Gör. Onur GÜNEŞER'e, Doç. Dr. Barış TUNCEL'e ve Öğr. Gör. Mustafa ÖĞÜTÇÜ'ye teşekkürü bir borç bilirim. Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca beni hiç yalnız bırakmayan ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen en büyük destekçim İbrahim ÇÖLGEÇEN'e sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisans eğitimi konusunda kıymetli destekleri için değerli büyüğüm Mustafa ÖZBAĞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Zişan HÜRİYET

Çanakkale, Haziran 2014

SİMGELER VE KISALTMALAR

ANOVA	Varyans Analizi
AOAC	American Official Analytical Chemist
cP	Centipoise
dk	Dakika
DSC	Differential Scanning Calorimeter
FAO	Food and Agriculture Organization
FT-IR	Fourier Transform Infrared
GC-MS	Gas chromatography–Mass spectrometry
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer
pI	İzoelektrik nokta
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
km	Kuru Madde
kD	Kilodalton

ÖZET

SOĞUK PRESTEN ÇIKAN KAPYA BİBER TOHUMU UNLARINDAN PROTEİN İZOLASYONU VE FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Zişan HÜRİYET

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman : Doç. Dr. Emin YILMAZ

25/06/2014, 79

Çanakkale ilinde önemli miktarlarda üretilen ve işlenen kapyra biberinden yan ürün olarak açığa çıkan kapyra biber tohumlarından elde edilen yağsız un çalışmanın ham maddesidir. Çalışmanın konusu farklı ön hazırlık işlemleri uygulanan tohumlardan elde edilen yağsız unların ve protein izolatlarının fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi; ön işlem farklılıklarının protein kalitesinde meydana getirebileceği değişimlerin ortaya konulmasıdır. Hiçbir ön hazırlığın olmadığı kontrole karşılık kavurma ve enzim işlemi uygulanan tohumlardan aynı koşullarda soğuk presleme ile yağ eldesi sonunda kapyra biber unu elde edilmiştir. Solvent ekstraksiyonu ile undaki yağ giderilmiştir. Yağsız un analizleri, protein izolasyonu ve protein fonksiyonellik testleri gerçekleştirilmiştir. Yağsız unda % nem, yağ, protein, kül gibi genel bileşen analizleri, fitik asit, tanen, viskozite, aleysel renk ve mineral madde analizleri yapılmıştır. Yağsız undan protein izolasyonu koşulları optimize edilerek, maksimum verimle protein izolatları elde edilmiştir. Bunun için en uygun pH ve tuz konsantrasyonları belirlenmiştir. Bu aşamada proteinlerin izoelektrik noktası ve çözünürlük özellikleri de belirlenmiştir. Yağsız unlar ve protein izolatlarında fonksiyonellik testleri olarak; emülsiyon ve köpüklenme özellikleri, su tutma ve yağ tutma kapasitesi ve en düşük jelleşme konsantrasyonu belirlenmiştir. Ayrıca protein izolatlarında vizkozite, SDS-PAGE elektroforezi, amino asit bileşiminin belirlenmesi, FT-IR spektroskopisi ve DSC analizleri yapılmıştır. Sonuç olarak, kapyra biber unlarının ve protein izolatlarının insan gıdası olarak farklı ürünlerde kullanılabilecekleri ortaya konulmuştur.

Anahtar sözcükler: Kapyra Biber, Kavurma, Enzim, Protein İzolatı, Fonksiyonel Özellik.

ABSTRACT

ISOLATION AND DETERMINATION OF FUNCTIONAL PROPERTIES OF PROTEINS FROM COLD PRESSED CAPIA PEPPERSEED FLOURS

Zişan HÜRİYET

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School

Chair of Food Engineering Thesis of Master of Science

Advisor : Doç. Dr. Emin YILMAZ

25/06/2014, 79

The material of this study was the oil free capia pepperseed flour which was prepared from the pepperseeds as the by products of pepper processing which is produced and processed in large quantities at Çanakkale province. The topics of the study were to determine the functional properties of the oil free flours and protein isolates from the pepperseeds which were cold pressed with different pre-treatments and the determination of the differences in protein quality based on the pre-treatments applied to the seeds. There were roasting and enzyme treatments of the seeds against control before cold pressing, and the seeds were pressed under the same conditions to get the capia pepperseed flour. The remaining oil in the flour was removed by solvent extraction. Analysis of oil free flour, protein isolation and functionality tests of the proteins were accomplished. In oil free flour, percent moisture, oil, protein, ash analyses, phytic acid, tannins, viscosity, instrumental color and mineral composition were measured. The conditions of protein isolation from oil free flour were optimized and proteins were isolated with maximum yield. To achieve this, the most suitable pH and salt concentrations were determined. At this stage, the isoelectric point and solubility properties of the proteins were determined as well. As the functionality tests in oil free flours and protein isolates, emulsion and foam properties, water and oil holding capacities and minimum gelation concentrations were measured. Furthermore, viscosity, SDS-PAGE electrophoresis, amino acid composition, FT-IR spectroscopy and DSC analysis of the protein isolates were completed. In conclusion, it was determined that capia pepperseed flours and protein isolates can be utilized as human foods in different food products.

Keywords: Capia Pepper, Roasting, Enzyme, Protein Isolate, Functional Property.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ BELGESİ.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
BÖLÜM 1 – GİRİŞ.....	1
1.1. Kapyra Biber Tohumu.....	1
1.2. Soğuk Pres İşlemi İle Elde Edilen Kapyra Biber Tohum Unu.....	2
1.3. Yağlı Tohum Proteinleri.....	2
1.4. Yağlı Tohumların Protein Karakteristikleri.....	2
1.5. Yağlı Tohum Proteinlerinin Fonksiyonel Özellikleri.....	3
1.5.1. Su tutma kapasitesi.....	4
1.5.2. Çözünürlük ve absorpsiyon kapasitesi.....	5
1.5.3. Emülsiyon ve yağ bağlama özellikleri.....	5
1.5.4. Köpüklenme özellikleri.....	7
1.5.5. Jelleşme.....	7
1.5.6. Vizkozite ve kıvamlaştırma.....	8
1.5.7. Diğer özellikler.....	8
1.6. Yağlı Tohum Proteinlerinin Kullanımını Limitleyen Faktörler.....	9
1.6.1. Lif.....	9
1.6.2. Proteinaz inhibitörleri.....	9
1.6.3. Fitik asit.....	9
1.6.4. Oksalik asit.....	10
1.6.5. Fenolik bileşenler.....	10
1.6.6. Tanenler.....	10
1.6.7. Glikozidler ve glukozinatlar.....	11
1.6.8. Alerjenik proteinler.....	11
1.7. Yağlı Tohumlardan Protein Ekstraksiyonu ve İzolasyonu.....	11

1.7.1. Kabukların ayrılması.....	11
1.7.2. Yağ ekstraksiyonu koşulları.....	12
1.7.3. Kaba una yapılan ön uygulamalar.....	12
1.7.4. Protein çözünürlüğü.....	12
1.7.5. Proteinin çökeltilmesi ve geri kazanılması.....	13
1.7.6. Diğer saflaştırma aşamaları.....	14
BÖLÜM 2 – ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	15
BÖLÜM 3 – MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1 Tohum kekinin hazırlanması.....	20
3.2.1.1 Kontrol grubu.....	20
3.2.1.2. Kavurma ön işlemi.....	21
3.2.1.3. Enzim ön işlemi.....	21
3.2.2. Kekten yağın uzaklaştırılması ve yağsız un eldesi.....	21
3.2.3. Yağsız kopya biber unlarının temel analizleri.....	22
3.2.3.1. Nem miktarının tespiti.....	22
3.2.3.2. Yağ miktarının tespiti.....	22
3.2.3.3. Protein miktarının tespiti.....	22
3.2.3.4. Kül miktarının tespiti.....	22
3.2.3.5. Fitik asit miktarının tespiti.....	22
3.2.3.6. Tanen içeriğinin tespiti.....	23
3.2.3.7. Aletsel renk.....	24
3.2.3.8. Vizkozitenin belirlenmesi.....	24
3.2.3.9. Mineral madde içeriklerinin belirlenmesi.....	24
3.2.4. Yağsız kopya biber unlarının fonksiyonellik testleri.....	24
3.2.4.1. Su bağlama kapasitesi.....	24
3.2.4.2. Yağ bağlama kapasitesi.....	24
3.2.4.3. Emülsiyon aktivitesi ve emülsiyon stabilitesi.....	25
3.2.4.4. Köpüklenme kapasitesi ve köpük stabilitesi.....	25
3.2.4.5. En düşük jelleşme konsantrasyonu.....	26
3.2.5. Yağsız unlardan protein izolasyonu.....	26
3.2.5.1. Ekstraksiyon için optimum tuz konsantrasyonu ve pH değerinin belirlenmesi.....	27

3.2.5.2. İzoelektrik noktaların (pI) belirlenmesi.....	27
3.2.5.3. Protein izolasyonu ve protein veriminin belirlenmesi.....	28
3.2.6. Protein izolatlarında yapılan analizler.....	28
3.2.6.1. Protein çözünürlüğü.....	28
3.2.6.2. Renk ölçümü.....	29
3.2.6.3. Görünür viskozitenin belirlenmesi.....	29
3.2.6.4. Protein fonksiyonellik testleri.....	29
3.2.6.4.1. Su bağlama kapasitesi.....	29
3.2.6.4.2. Yağ bağlama kapasitesi.....	30
3.2.6.4.3. Emülsiyon aktivitesi ve emülsiyon stabilitesi.....	30
3.2.6.4.4. Köpüklenme kapasitesi ve köpük stabilitesi.....	30
3.2.6.4.5. En düşük jelleşme konsantrasyonu.....	31
3.2.6.5. Amino asit bileşimlerinin belirlenmesi.....	31
3.2.6.6. DSC (DiferansiyelTaramalıkalorimetre)analizi.....	31
3.2.6.7. FT-IR (Fourier Transform Infrared)Spektroskopisi analizi.....	32
3.2.6.8. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez) analizi.....	32
3.2.7. İstatistiksel analizler.....	33
BÖLÜM 4 – ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	34
4.1. Yağsız Kappa Biber Unlarının Temel Analizleri.....	34
4.2. Yağsız Kappa Biber Unlarının Mineral Madde İçerikleri.....	37
4.3. KappaBiber Yağsız Unlarının Fonksiyonellik Testleri.....	38
4.4. Kappa Biber Yağsız Unlarından Protein İzolatlarının Hazırlanması.....	42
4.4.1.Optimum Tuz Konsantrasyonu ve pH Değerinin Belirlenmesi.....	42
4.4.2. İzoelektrik Noktanın Belirlenmesi.....	44
4.4.3. Protein Konsantratlarının Hazırlanması ve Protein Verimi.....	45
4.5. Protein İzolatlarında Yapılan Analizler.....	46
4.5.1. Protein Çözünürlüğü.....	46
4.5.2. Protein İzolatlarının Fiziksel Analizleri.....	48
4.5.3. Protein İzolatlarının Fonksiyonellik Özellikleri.....	50
4.5.4. Kappa Biber Proteinlerinin Aminoasit İçerikleri.....	56
4.5.5. Kappa Biber Proteinlerinin Termal Özellikleri.....	58
4.5.6. Kappa Biber Proteinlerinin FT-IR Analizleri.....	59
4.5.7. Kappa Biber Proteinlerinin SDS-PAGE Analizleri.....	62

BÖLÜM 5 – SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
KAYNAKLAR.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 3.1.	Tanen analizi kateşin standart kurvesi.....	23
Şekil 3.2.	Bovine serum albumine (BSA) standart kurvesi.....	27
Şekil 4.1.	Kapya biber yağsız unlar.....	36
Şekil 4.2.	Protein izolatlarının çözünürlük grafiği.....	45
Şekil 4.3.	Kapya biber protein izolatlarının çözünürlük grafikleri.....	47
Şekil 4.4.	Kapya biber protein izolatları.....	49
Şekil 4.5.	Kapya Biber Protein İzolatlarının FT-IR spektrumları (En üstten alta doğru örnek adları şöyledir: kontrol, kavrulmuş, enzim).....	61
Şekil 4.6.	Protein izolatlarının SDS-PAGE elektroforez bandları.....	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Kırmızı biber tohumunun kimyasal kompozisyonu (% kuru madde).....	1
Çizelge 1.2. Yağlı tohumlar ve insan beslenmesi açısından uygun olan ana depo proteinleri.....	3
Çizelge 1.3. Yağlı tohumların dünya protein ihtiyacını % olarak karşılama miktarları.....	4
Çizelge 4.1. Kapyra biber yağsız unlarına ait fiziko-kimyasal analiz sonuçları.....	34
Çizelge 4.2. Kapyra biber yağsız unlarının mineral madde içerikler.....	37
Çizelge 4.3. Kapyra biber yağsız unların fonksiyonellik özellikleri.....	38
Çizelge 4.4. Kapyra biber yağsız unlarının jelleşme özellikleri.....	41
Çizelge 4.5. Kapyra biber proteini izolasyonunda optimum tuz konsantrasyonları ve pH değerleri.....	43
Çizelge 4.6. Kapyra biber proteinlerinin izoelektrik noktalarının belirlenmesi.....	44
Çizelge 4.7. Kapyra biber protein izolatlarının üretim verimleri.....	45
Çizelge 4.8. Kapyra biber protein izolatları çözünürlük özellikleri.....	46
Çizelge 4.9. Kapyra biber protein izolatlarının fiziksel özellikleri.....	49
Çizelge 4.10. Kapyra biber protein izolatlarının fonksiyonellik özellikleri.....	50
Çizelge 4.11. Kapyra biber protein izolatlarının jelleşme özellikleri.....	56
Çizelge 4.12. Kapyra biber protein izolatlarının aminoasit içerikleri.....	57
Çizelge 4.13. Kapyra biber protein izolatlarının termal özellikleri.....	58
Çizelge 4.14. Peptid bağlarına ait karakteristik infrared bantları.....	60

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1. Kapyra Biber Tohumu

Biberler *Capsicum* cinsine aittir. En yaygın olarak yetiştirilen türü *C. annuum* L. olarak bilinmektedir. Kurutma ve öğütme sonrası tohumları baharat olarak kullanılsa dahunlar esas olarak meyvesi için yetiştirilmektedir. Biberlerin boyut ve şekilleri geniş biraralıkta değişmektedir. Renkleri ve tatları da çeşitlidir. Tatlarıtatlıdan çeşitli derecedeki acılığa doğru değişir (Bernadac ve ark., 2002; Fıratlıgil Durmuş, 2008). Yemek hazırlamada sayısız kullanım alanına sahip olmasibiberi önemli birsebze haline getirmektedir. Biberler; kurutulmuş ürünlere, salamura biberlere, donmuş ürünlere işlenmektedirler. Aynı zamanda lezzet veya renk vermek amacı ile sos, salça, püre veya tozgibi ürünlere de işlenmektedirler. Biber üretimi yapan ülkeler içinde Türkiye, Çin ve Meksika'dan sonra gelmektedir. Yıllık 1.745.000 ton üretimle dünyada üçüncü sırada yer almaktadır (FAO, 2008). Konserveye işlenmiş ve dondurulmuş biber ürünlerinin üretiminden arta kalan sap, yaprak ve tohumlar gibi katı atıkların değerlendirilmesisanayi için önemli bir görev olarak belirmiştir (Fıratlıgil Durmuş, 2008).

Kırmızı biberin (*Capsicum*) ülkemiz ihracatında önemli bir yerinin olması onu ve işleme sırasında açığa çıkan artıklarını ilgi çekici hale getirmektedir. Çünkü kırmızı biberin kurutma, dondurma ve konserveye işleme sırasında açığa çıkan artıklarından biri olan kırmızı biber tohumları sadece yem olarak değerlendirilebilmektedir. Bu tohumların protein, yağ ve lif içeriği oldukça zengindir. Kırmızı biber tohumunun kimyasal kompozisyonu aşağıdaki **Çizelge 1.1.** 'de gösterilmektedir (Fıratlıgil Durmuş, 2008).

Çizelge 1.1. Kırmızı biber tohumunun kimyasal kompozisyonu (% km)

Nem	9.30 ± 0.12
Yağ	19.32 ± 0.04
Protein	23.64 ± 0.02
Kül	3.55 ± 0.08
Karbonhidrat	48.98 ± 0.07

Tohumların besin öğelerinin fonksiyonel özellikleri nedeniyle gıda sanayinde değerlendirilerek kullanılması önemli hale gelmektedir. Çünkü işleme sonrasında açığa çıkan bu yan ürünlerin besin bileşimi açısından değerli olması onların insan gıdası olarak kullanılma potansiyelini arttırmaktadır (Fıratlıgil Durmuş, 2008).

1.2. Soğuk Pres İşlemi İle Elde Edilen Kapsa Biber Tohum Unu

Haşhaş, keten, çörek otu gibi az işlenilen tohumlarda çoğunlukla soğuk pres tekniğiyle yağ üretilmektedir. Soğuk pres ucuz ve kaliteli yağ veren alternatif bir üretim tekniğidir. Yağ verim oranı biraz düşük olsa da, ısıtma, ısıl işlem, enzim muamelesi gibi ön hazırlık işlemleri uygulayarak ve soğuk pres koşullarını optimize ederek verimliliği kabul edilebilir seviyeye çıkarmak ve rafinasyon gerektirmeyen kaliteli ve yenilebilir yağ üretmek mümkündür (Singh ve Bargale, 2000; Aydeniz ve ark., 2014).

Soğuk pres işlemi sonucu açığa çıkan ve bir miktar yağ içeren kek, küspe olarak da adlandırılmaktadır. Bu küspe kimyasal kalıntı içermediği için elde edildiği hammaddenin durumuna bağlı olarak insan gıda kaynağı ve aynı zamanda yem hammaddesi olarak değerlendirilebilmektedir. Kekten solvent ekstraksiyonu ile kalan yağ uzaklaştırılmaktadır veya amaca göre kalan yağ ile birlikte değerlendirilmektedir. Ardından ısıtma ile solventin de uzaklaştırılması sonucu kalan kitle yağsız un olarak adlandırılmaktadır. Elde edilen bu yan ürün yağsız kek olarak çeşitli amaçlarla işlenebilmektedir.

1.3. Yağlı Tohum Proteinleri

Yağlı tohumlar genellikle insan beslenmesinde primer protein kaynağı olarak kullanılmazlar. Fakat yağ içeren bitkilerde önemli miktarlarda protein bulunması sebebiyle insan diyeti açısından potansiyel kullanımları mevcuttur. Soya, ayçiçeği, kanola, aspir, mısır, yer fıstığı, susam, kenevir, pamuk ve keten tohumu kullanımı söz konusu olan yağlı tohumlardır. Bu grupta yer alan soya protein içeriği açısından en fazla bilineni ve kullanılandır (Arntfield, 2000; Moure ve ark., 2006; Rodrigues ve ark., 2012).

1.4. Yağlı Tohumların Protein Karakteristikleri

Yağlı tohumlarda bulunan proteinler iki grupta sınıflandırılmaktadır. İlk grup biyolojik olarak aktif olan proteinlerdir. Enzimler biyolojik olarak aktif proteinlere örnektir. Diğer grup yapısal veya depo proteinleri olarak sınıflandırılır. İnsan beslenmesi açısından önem taşıyan ve yağlı tohumlardaki en önemli proteinler depo proteinleridir. Bu tohumlar arasında

aspirdeki protein içeriği % 13-17 aralığında değişmektedir. Soyada ise % 37'ye kadar çıkmaktadır. Protein seviyeleri farklı olmasına rağmen yağlı tohum proteinleri arasında pek çok benzerlik de bulunmaktadır. Hasat edilen tüm ürünler suda çözünen albuminleri, tuzda çözünen globulinleri ve alkalide çözünen glutelinleri karışım halinde içermektedirler. Aynı zamanda bu proteinlerin hemen hepsi sedimentasyon katsayıları 2S, 7S, 11S (12S) ve 15S olan aynı dört adet protein fraksiyonunu içerirler (Arntfield, 2000; Moure ve ark., 2006; Foegeding ve Davis, 2011; Rodrigues ve ark., 2012).

Aşağıdaki **Çizelge 1.2.**'de insan beslenmesi açısından potansiyel protein kaynağı olabilecek yağlı tohumlar ve bu tohumlardaki baskın depo proteinlerinin isimleri belirtilmiştir (Arntfield, 2000).

Çizelge 1.2. Yağlı tohumlar ve insan beslenmesi açısından uygun olan ana depo proteinleri (Arntfield, 2000).

Botanik İsmi	Yağlı Tohum İsmi	Ana Depo Proteini
<i>Brassica türleri</i>	Kanola / Kolza	Cruciferin veya 12S protein
<i>Zea mays L.</i>	Mısır	Zein
<i>Gossypium türleri</i>	Pamuk Çiğidi	11S protein
<i>Linum usitatissimum L.</i>	Keten	12S protein
<i>Cannabis sativa L.</i>	Kenevir	12S protein
<i>Arachis hypogaea L.</i>	Yer Fıstığı	Arachin
<i>Carthamus tinctorius L.</i>	Aspir	Carmin
<i>Sesamum indicum</i>	Susam	α -globulin
<i>Glycine max</i>	Soya	Glycinin
<i>Helianthus annuus</i>	Ayçiçeği	Helianthin

1.5. Yağlı Tohum Proteinlerinin Fonksiyonel Özellikleri

Hayvansal proteinlere alternatif olarak gıda ve kozmetik uygulamalarında bitkisel kaynaklı proteinler kullanılmaktadır. Bitkisel kaynaklı proteinlerin kullanılabilmesinin başlıca sebepleri ham bitkisel materyalin yenilebilir olması, geniş alanlara yayılmış olması ve kolay ulaşılmasıdır. Özellikle baklagil, tahıl ve yağlı tohum gibi kaynakların çeşitli olması da kullanım kolaylığı sağlamaktadır. Protein içeren gıdalar arasında en sık kullanılanları soya, kolza, pamuk çiğidi, ayçiçeği tohumu ve yer fıstığıdır. Bu tohumların dünya protein

ihtiyacının karşılanmasıdaki %katkıları **Çizelge 1.3.**'de gösterilmektedir (Moure ve ark., 2006).

Çizelge 1.3. Yağlı tohumların dünya protein ihtiyacını % olarak karşılama miktarları(Moure ve ark., 2006).

Yağlı tohum	İhtiyacı karşılama oranı(%)
Soya	69
Kolza	12.4
Pamuk Çiğidi	6.9
Ayçiçeği Tohumu	5.3
Yer fıstığı	2.8

Bazı bitkisel proteinler hayvansal kaynaklı proteinlere kıyasla sülfürlü amino asitler yönünden yetersizdirler. Ayrıca anti-beslenme faktörleri içerirler. Bitkisel proteinlerin kullanımını limitleyen bu faktörlere rağmen diğer proteinler ile bitkisel kaynakların desteklenmesi ve fizikokimyasal uygulamalar yağlı tohum proteinlerinin insan beslenmesinde kullanılmasına önemli katkılar sağlamaktadır (Moure ve ark., 2006;Foegeding ve Davis, 2011; Rodrigues ve ark., 2012).

Bitkisel proteinlerin sahip oldukları fonksiyonel özellikleri de butohum proteinlerinin kullanımına katkı sağlamaktadır. Proteinlerin fonksiyonel özellikleriyle; proteinlerin gıda sistemlerinde işleme, saklama, pişirme ve tüketim aşamaları süresince davranışlarını etkileyen fiziksel ve kimyasal özellikleri kastedilmektedir. Bu özellikler ebat, şekil, amino asit kompozisyonu ve amino asit dizilimi, net yük, yük dağılımı, hidrofobik ve hidrofilik özellikleri, sekonder, tersiyer veya quarterner olarak yapısı, moleküler esneklik/sertlik olarak sıralanabilmektedir. Ayrıca pH, sıcaklık, tuz konsantrasyonu gibidiş çevre faktörleriyle ve diğer gıda bileşenleri ile interaksiyonlardır.Etkilenen fizikokimyasal niteliklere göre proteinlerin fonksiyonel özellikleri sınıflandırılabilir. Proteinin su tutma kapasitesi, çözünürlüğü, yağ bağlama ve emülsiyon özelliği, köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi, jelleşme ve viskozite gibi bazı özellikleri ürün kalitesine önemli etkileri olan fonksiyonel özellikleridir (Moure ve ark., 2006; Fıratlıgil Durmuş, 2008).

1.5.1. Su tutma kapasitesi

Belirli koşullar altında gıda maddesi tarafından tutulan su miktarı gıdaların su tutma kapasitesi olarak tanımlanmaktadır (Fıratlıgil Durmuş, 2008). Bu özellik protein moleküllerinin bileşimi ve yapısal özelliklerine bağlıdır. Proteinin hidrofilik grubu ile su molekülü arasında hidrojen bağı oluşmaktadır. Proteinin polipeptid grupları arasındaki hidrojen bağları ile su tutulmaktadır. Ayrıca su tutma özelliği amino, karboksil, hidroksil, karbonil ve sülfidril gibi polar hidrofilik gruplara da bağlıdır. Polipeptid zinciri içindeki bu grupların sayısı ve türü proteinlerin su tutma kapasitelerini etkilemektedir (Zayes, 1997; Fıratlıgil Durmuş, 2008).

Proteinlerle ilgili olan su miktarı, amino asit profili ile yakından ilgilidir ve su tutma özellikleri amino asit kompozisyonlarından tahminlenebilir. Ayrıca yük kalıntıları, pH, sıcaklık, iyonik güç ve protein konsantrasyonu ile birlikte su tutma kapasitesi değişmektedir (Zayes, 1997; Moure ve ark., 2006; Fıratlıgil Durmuş, 2008; Foegeding ve Davis, 2011; Rodrigues ve ark., 2012).

1.5.2. Çözünürlük ve absorpsiyon kapasitesi

Protein içeren ürünün belirli koşullar altında içerdiği çözünür haldeki azot miktarı protein çözünürlüğü olarak tanımlanmaktadır (Vojdani, 1996; Fıratlıgil Durmuş, 2008). Çözünürlük sıklıkla diğer fonksiyonel özelliklerin göstergesi olarak kullanılır. Yani protein çözünürlüğü diğer fonksiyonel özellikler ile ilişkisi olan bir fizikokimyasal özelliktir. Örneğin optimum jel, köpük ve emülsiyon oluşturma özelliklerine sahip bir gıda elde edebilmek için oldukça yüksek çözünürlüğe sahip bir protein tercih edilmelidir (Damodaran, 1997; Zayes, 1997; Fıratlıgil Durmuş, 2008).

Amino asit kompozisyonuna bağlı olarak özellikle protein yüzeyindeki hidrofiliklik/hidrofobiklik dengesi proteinlerin çözünürlüğüne etki etmektedir. Yüksek çözünürlük düşük sayıdaki hidrofobik kalıntıların varlığına, yüksek elektrik yüküne, elektrostatik itme gücüne ve izoelektrik pH değerlerinin üzerinde veya altında olma durumuna bağlı olarak değişmektedir. Denatürasyon yüzeyin hidrofobiklik/hidrofiliklik oranını değiştirdiği için protein çözünürlüğünü etkilemektedir. Bundan dolayı kalınlaşma, köpüklenme, emülsifikasyon ve jelleşme özellikleri de etkilenmektedir (Moure ve ark., 2006; Foegeding ve Davis, 2011; Rodrigues ve ark., 2012).

1.5.3. Emülsiyon veyağ bağlama özellikleri

Birbiri ile karışmayan iki sıvı karışımından birinin diğeri içinde küçük damlacıklar halinde dağıtılması emülsiyon olarak tanımlanmaktadır. Birçok hazır gıdanın üretiminde kaliteyi belirleyen emülsiyon oluşturma işlemi önemli işlem basamaklarından biridir. Gıda emülsiyonları yağda su ve suda yağ tipleri şeklinedirler(Fıratlıgil Durmuş, 2008).

Proteinlerin emülsiyon özelliklerini proteinin kaynağı, protein konsantrasyonu, pH, iyonik kuvvet, çözünürlük, sıcaklık, viskozite ve emülsiyon oluşturmada kullanılan metot ve ekipman gibi çok sayıda faktör etkilemektedir(Santiago ve ark., 1998; Bilgi ve Çelik, 2004; Fıratlıgil Durmuş, 2008).

Çözünürlük proteinlerin emülsiyon özelliklerinde önemli bir role sahiptir. Çözünürlüğü az olan protein zayıf emülsiyon özelliği göstermektedir(Damodaran, 1994; Fıratlıgil Durmuş, 2008). Protein malzemesinin çözünür olması, yüzeylerde hızlı adsorblama yeteneğine sahip olması, iyi dağılmış elektriksel yük taşıyan gruplara sahip olması ve kuvvetli film oluşturma kabiliyetine sahip olması stabil bir emülsiyon oluşturmak için istenen niteliklerdendir (Zayes, 1997; Fıratlıgil Durmuş, 2008).

Emülsiyonların oluşumları protein yüzey aktivitesinden de önemli oranda etkilenmektedir. Emülsifyerler ara yüzey gerilimini düşürmekte ve stabil yağ-su veya hava-su ara yüzeyleri oluşumunu iyileştirmektedirler. Proteinler yüzey gerilimini düşürmede daha düşük etkinlik göstermektedirler. Fakat proteinlerin surfaktan olarak kullanıldığı emülsiyonlar daha stabildir. Proteinler konformasyonları ve esneklik,konformasyonel stabilite, hidrofilik ve hidrofobik kalıntıların ana yapıdaki dağılımları gibi moleküler faktörler tarafından belirlenen ara yüzeylerde yayılma kabiliyetlerine bağlı olarak farklı yüzey aktiviteleri gösterirler. Aynı zamanda pH, iyonik güç, sıcaklık, diğer proteinlerin ve lipidlerin arayüzeyde olası yarışmalı adsorpsiyonları gibi dış faktörlere göre de yüzey aktiviteleri değişmektedir. Bu sebeplerden dolayı gıdalarda emülsiyon oluşturma amacıyla düşük molekül ağırlıklı surfaktanlara kıyasla proteinler tercih edilmektedir (Moure ve ark., 2006; Foegeding ve Davis, 2011; Rodrigues ve ark., 2012).

Gıdaların dokusal ve diğer kalite özelliklerini yağların proteinlere bağlanması da etkilenmektedir. Protein tozlarında yağ bağlama özelliği protein toz partiküllerinin büyüklüğünden etkilenmektedir. Yüksek yoğunluklu protein tozlarına nazaran düşük yoğunluğa ve küçük partikül boyutuna sahip protein tozları daha fazla yağ absorplamaktadırlar. Yağ bağlama mekanizması proteinin mikro yapısı hakkındaki bilgiler

ile açıklanabilir. Protein molekülünün polar olmayan kısımları, yağ-protein etkileşiminin gerçekleştiği ana bölgelerdir. Yağ-protein etkileşimleri hidrofobik, elektrostatik, hidrojen ve kovalent olmayan bağlar içermektedirler. Yüksek yağ tutma kapasitesine sahip olan proteinler çözünür olmayan ve hidrofobik proteinlerdir (Zayes, 1997; Fıratlıgil Durmuş, 2008).

1.5.4. Köpüklenme özellikleri

Gıda sanayinde ekmek, kek, çırpılmış krema ve dondurma gibi ürünlerde proteinlerin stabil köpük oluşturma özelliklerinden faydalanılmaktadır. Hava hücrelerinin ince ve sürekli bir sıvı faz ile ayrıldığı iki fazlı sistemler köpük olarak adlandırılmaktadır (Ralet ve Gueguen, 2001; Fıratlıgil Durmuş, 2008).

Köpük oluşturma üç aşama içermektedir. Birinci aşamada globüler proteinlerin hava/su yüzeyine difüz olmaları ve yüzey gerilimini azaltmaları gerçekleşmektedir. İkinci aşamada suya doğru olan polar parçaların oryantasyonu gerçekleşmekte ve yüzeydeki proteinlerin katlanmış yapısı açılmaktadır. Proteinlerin katlanmış yapısının açılması ile sıvı ve sıvı olmayan fazlarda hidrofilik ve hidrofobik grupların oryantasyonu gerçekleşmektedir. Üçüncü aşamada ise polipeptidler denatürasyon ve koagülasyon ile film oluşturmak için birbirlerini etkilemektedirler. Proteinlerin yüzeyden hızla adsorbe edilmesi ve kabarcıkların etrafında stabil bir film oluşturmalarıyla köpük oluşumu gerçekleşmektedir (Zayes, 1997; Moure ve ark., 2006; Fıratlıgil Durmuş, 2008; Foegeding ve Davis, 2011; Rodrigues ve ark., 2012).

Proteinlerin köpüklerdeki en temel fonksiyonu yüzey gerilimini azaltmak, sıvı fazın viskoz ve elastik özelliklerini artırmak ve kuvvetli filmler oluşturmaktır. Proteinlerin hava-sıvı yüzeyindeki yüzey gerilimini azaltma kapasiteleri onların köpük oluşturma kabiliyetleri ile orantılıdır (Zayes, 1997).

Protein kaynağı, protein izolasyonu, sıcaklık, pH, protein konsantrasyonu, karıştırma süresi ve köpük oluşturma metodu gibi işlem metotları ve ısı parametreleri proteinlerin köpük oluşturma özelliklerini etkilemektedirler. Proteinler arasındaki elektrostatik etkileşimler en yüksek izoelektrik pH'da elde edilmektedir. Bu noktada ise proteinler daha iyi köpük oluşturmaktadır. Protein konsantrasyonu ise ne kadar yüksek olursa ara yüzey filminin kalınlığı artacağı için daha yoğun ve stabil köpükler elde edilebilecektir (Zayes, 1997; Fıratlıgil Durmuş, 2008).

1.5.5. Jelleşme

Jel katı ve sıvı arasında yer alan ara bir hal olarak adlandırılmaktadır. Gıda sistemlerinde sıvı sudur ve moleküler ağ proteinlerden, polisakkaritlerden veya her ikisinden birden oluşmaktadır. Proteinler karbonhidratlara nazaran daha etkili jelleşme ajanlarıdır. Bunun nedenleri proteinlerin daha büyük molekülere sahip olmaları ve bunların üç boyut arasında çapraz bağ oluşturma yeteneklerinin daha iyi olmasıdır. Jelleşme özelliği protein ebatı ile iyileşmektedir. Bunun sebebi büyük moleküllerin üç boyut arasında geniş çapraz bağlar oluşturmaları, esneklik ve denatürasyon özelliklerine sahip olmaları olarak açıklanmaktadır (Moure ve ark., 2006; Foegeding ve Davis, 2011; Rodrigues ve ark., 2012).

Proteinlerin jel oluşturma kabiliyetleri gıda üretiminde önemli bir fonksiyonel özellik olarak karşımıza çıkmaktadır. Çünkü jel oluşturma, et ve balık ürünlerinde, meyve jelleri, tart ve pasta dolguları gibi ürünlerin üretiminde temel prosestir. Protein jellerinin en önemli özelliği katı malzeme gibi davranmaları fakat aynı zamanda sıvıların çoğu özelliğini göstermeleridir. Jel oluşması ile viskozite artmakta ve su tutma özelliği gelişmektedir. Proteinlerin üç boyutlu yapısı jellerin bu spesifik özelliklerini belirlemektedir (Zayes, 1997; Fıratlıgil Durmuş, 2008).

Proteinlerin jel oluşturma yetenekleri su tutma ve yağ bağlama gibi diğer fonksiyonel özellikleri de etkilemektedir. Emülsiyon ve köpük stabilitesinde de önemli role sahiptir. Proteinlerin jel oluşturarak üç boyutlu yapı içerisinde önemli miktarda şeker, aroma ve diğer gıda bileşenlerini tutması özelliğinden gıda proseslerinde ve yeni gıda ürünü geliştirilmesinde yararlanılmaktadır (Zayes, 1997; Fıratlıgil Durmuş, 2008).

1.5.6. Viskozite ve kıvamlaştırma

Proteinlerin reolojik özelliklerinde rol oynayan faktörler çözünürlük, hidrodinamik özellikler, hidrofobiklik ve proteinlerin mikro yapılarıdır. Artan protein konsantrasyonu ile birlikte viskozite katlanarak artmaktadır. Bunun nedeni olarak hidrate proteinler arasındaki interaksiyonların, su absorpsiyonun ve şişmenin artması gösterilebilir. Total su/absorplanan su oranının 1'e yaklaşması görünür viskozitenin artmasına neden olduğu belirlenmiştir (Moure ve ark., 2006; Foegeding ve Davis, 2011; Rodrigues ve ark., 2012).

1.5.7. Diğer özellikler

Yağlı tohum proteinlerinin termal özellikleri Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC-Differential Scanning Calorimeter) ile araştırılmaktadır. Tohumlarından izole edilen proteinlerin termal denatürasyon sıcaklıkları, entalpi değişimleri ve faz değişim sıcaklıkları belirlenebilmektedir. Bunların yanı sıra yağlı tohum proteinlerinde, protein yapısındaki değişimleri belirlemek için FT-IR (Fourier Transform Infrared) çalışmaları da yapılmaktadır. Doğal yapıda oluşan değişimin oranı ve şekli belirlenebilmektedir (Yin ve ark.,2011).

1.6. Yağlı Tohum Proteinlerinin Kullanımını Limitleyen Faktörler

Bütün bitkilerde büyümeleri için gerekli olan ve böcekler ile mikroorganizmalara karşı savunma faktörlerini oluşturan çeşitli kimyasal maddeler sentezlenmektedir. Yağlı tohumlarda bu bitkilere dâhildir. Sentezlenen bu bileşenler yağlı tohumlarda yağ ekstraksiyonundan sonra arta kalan kekte bulunmaktadırlar. Bunlar insan beslenmesinde proteinlerin kullanımları açısından problem oluşturmaktadır (Arntfield, 2000; Tan ve ark, 2011).

1.6.1. Lif

Pek çok yağlı tohumda ekstraksiyon sonrasında oluşan kekteki lif içeriği yüksektir. Bu yüksek lif içeriği besin maddelerinin varlığını ve kullanılabilirliğini sınırlarken proste problemler oluşturmaktadır. Lif miktarı geniş anlamda tohum kabuğu ile ilgili olduğu için, proste kabukların ayrılması aşaması lif içeriğinin azaltılmasında etkili bir uygulama olarak karşımıza çıkmaktadır (Arntfield, 2000; Tan ve ark., 2011).

1.6.2. Proteinaz inhibitörleri

Proteinaz inhibitörleri genellikle suda çözünebilen düşük molekül ağırlıklı proteinlerdir. Bu proteinler bitkiyi böceklerden ve mikroorganizmalardan korumaktadırlar. Bu bileşikler tüketildiğinde ise sorun oluşturlar. Çünkü bu maddeler vücutta bulunan tripsin ve kimotripsin gibi proteinazlar ile kompleks yaparlar ve bu şekilde bu enzimleri inaktif hale getirme kabiliyetleri bulunmaktadır. Bu durum ise pankreatik aktivitenin azalmasına ve büyüme geriliğine neden olmaktadır (Arntfield, 2000).

Yağlı tohum proteinleri tüketimden önce genellikle ısıya maruz bırakılırken pek çok proteinaz inhibitörleri tüketim öncesi inaktif hale gelmiş olmaktadır. Termal olarak

stabilinhibitörlerin varlığı ise ısı uygulamasının tek başına anti besleyici faktörleri tamamen elimine etmede yeterli olmadığını ortaya koymaktadır. Bu nedenle proteinaz inhibitörlerinin canlılığı yağlı tohumlardan protein ürünlerinin elde edilme süresi boyunca kontrol altında tutulmalıdır (Arntfield, 2000).

1.6.3. Fitik asit

Fitik asit ve fitatlar, fitik asidin tuzlarıdır ve bitkinin fosfat depoları olarak görev yapmaktadırlar. Yüksek oranda yüklü fosfat grupları fitik asit molekülünü reaktif hale getirirler. Bu gruplar eğer gıda maddesinde mevcut iseler kalsiyum, demir, çinko ve magnezyum gibi divalent katyonları bağlayarak beslenme açısından yararsız hale getirmektedirler (Arntfield, 2000; Tan ve ark., 2011).

Fitik asidin varlığı yağlı tohum proteinlerinin fitat olarak proseslenmesinde sorunlar oluşmaktadır. Bunun nedeni fitatların proteinler ile interaksiyona girerek protein çözünürlüğünü değiştirmeleridir. Bu nedenle yağlı tohumlardan protein kaynağı hazırlanması sırasında fitik asit ve fitatların uzaklaştırılması gerekmektedir (Arntfield, 2000).

1.6.4. Oksalik asit

Fitik asitte mevcut olan mineral bağlama problemi oksalik asit ve oksalat tuzları için de geçerlidir. Bu problem çoğunlukla susam tohumlarında görülmektedir (Arntfield, 2000).

1.6.5. Fenolik bileşenler

Fenolik bileşikler yağlı tohum proteinleri ile olan interaksyonları sebebiyle önemlidir. Bu fenolik bileşikler genelde fenolik asitler veya uçucu taninler şeklinde bulunmaktadır. Kafeik, vanillik, siringik ve kumarik asit serbest, esterleşmiş veya bağlı formlarda bulunan fenolik asitlerdir. Bu maddeler ekşi-acı aromadan, koyu renkten sorumludurlar. Aynı zamanda mineral varlığını azaltırlar (Arntfield, 2000; Tan ve ark., 2011).

Fenolik asitlerin yağlı tohum proteinleri ile interaksyonu proteinlerinin insan beslenmesinde kullanılmasında engel teşkil etmektedir. Elde edilen protein ürünlerinde renk ve tat problemlerine neden olmakta ve protein izolatlarında renk bozulmalarına neden olmaktadır (Arntfield, 2000).

1.6.6. Tanenler

Tanenler molekül ağırlıkları 500-3000 dalton arasında değişen kompleks yapılardır. Hidrolize olmaları sonucu fenolik asitler ve antosiyaninler oluşmaktadır. Uçucu olan tanenler yaprak proteinlerinden kanola kabuğuna kadar geniş bir yayılım göstermektedirler. Yağlı tohum kekinde bulunan tanenler proteinleri çöktürmeye neden olmaktadır. Aynı zamanda amino asitler ve mineraller ile kompleks oluşturarak izole edilen proteinlerin besleyici değerinin düşmesine neden olmaktadır(Arntfield, 2000; Tan ve ark., 2011).

1.6.7. Glikozidler ve glukozinatlar

Pek çok yağlı tohumda glukozinatlar ve glikozidler bulunmaktadır. Kolza ve kanolada beslenme problemi açısından belkide en iyi bilinen glukozinolatlar bulunmaktadır. Kanolada bulunan glukozinolat seviyelerinin önemli derecede düşürüldüğü çeşitler bulunmasına rağmen kanola proteinin insan beslenmesi açısından kullanılmasında halen engel bulunmaktadır. Aspirde fenolik glukozitler, yer fıstığında ise siyanogenik glikozitler bulunmaktadır (Arntfield, 2000; Tan ve ark., 2011).

1.6.8. Alerjenik proteinler

Yağlı tohum kekinde anti-besleyici faktörlerin bulunması sebebiyle protein izolasyonu işlemi sonrasında proteinlerin insan gıdası olarak kullanılabilmesi için uygun hale getirilmesi gereklidir. Problem proteinin kendisinden kaynaklanıyorsa mesela, bir kişi soya veya yer fıstığı proteinine karşı alerjik reaksiyon gösteriyor ise bu proteinin izole edilmesinin bir faydası bulunmamaktadır. Bu sebeple izole edilen proteinlerin insan tüketimi amacıyla sunulmadan önce alerjik potansiyeli gözden geçirilmelidir(Arntfield, 2000; Tan ve ark., 2011).

1.7. Yağlı Tohumlardan Protein Ekstraksiyonu ve İzolasyonu

Yağlı tohumlardan ve/veya bunların küspelerinden protein ekstraksiyonu sıralı bazı işlemlerle gerçekleştirilmektedir.

1.7.1. Kabukların ayrılması

Yağlı tohumlarda kabukların ayrılması, lif içeriğinin azaltılmasında etkili bir yoldur. Aynı zamanda besleyici değeri olmayan fitik asit ve fenolik bileşikler gibi maddelerin giderilmesinde de etkili olmaktadır. Soya, pamuk çigidi ve ayçiçeği gibi bazı yağlı tohumların kabukları değirmende veya mekanik aşınma ile kolaylıkla giderilebilmektedir. Ancak kabuğu endosperme yapışık olan kanola gibi küçük tohumlarda bu yolla ayrım güç

olmaktadır. Kanolada kabuk ayrılması için mekanik kabuk ayırma öncesinde, infrared ısıtma ile hidrotermal uygulama adı verilen birkaç ön uygulama mevcuttur. Bu uygulama tohumların ıslatılması ve kurutulmasıdır. Bu uygulamalar aynı zamanda kabuk ayırmada etkinliği arttırmakta ve lif içeriğini düşürmektedir. Kabukların ayrılması işlemi keten tohumunda ise protein çözünürlüğünü arttırmaktadır. Bu nedenlerden dolayı protein izolasyon prosesinde kabukların giderilmesi işlemi önemli ve istenen bir aşamadır (Arntfield, 2000).

1.7.2.Yağ ekstraksiyonu koşulları

Pek çok yağ bitkisinden yağ elde etmek amacıyla presleme ve hekzan ekstraksiyonu kullanılmaktadır. Proteinin daha sonraki kullanımları göz önüne alındığında hekzanın en uygun solvent olduğu görülmüştür. Farklı tohumlarda farklı ekstraksiyon koşulları da mevcuttur. Örneğin kabuksuz ayçiçeği tohumlarında hekzan yerine isopropanol solvent olarak kullanıldığında besleyici değerde önemli artış kaydedilmiştir. Metanol-amonyak-hekzan karışımı ile kanola tohumlarının ekstraksiyonunda glukozinolatlar ve fenolik bileşiklerin azaldığı görülmüş, esansiyel amino asitlerde minimal değişimler olmuş ve hedeflenen protein verim oranlarında hiç değişim gözlenmemiştir. Benzer yaklaşım ile mısırdaki alkali ve etanol kullanılarak yağ ekstraksiyonu ve protein izolasyonu yapılmıştır (Arntfield, 2000).

1.7.3.Kaba una yapılan ön uygulamalar

Protein izolasyonunda kaba unun hekzan ekstraksiyondan sonra metanol ile muamele edilmesi ayçiçeğinde, kararma yapan klorojenik asit seviyesinin azalmasına neden olmaktadır. Kaba unun izoelektrik pH'a yakın değerlere sahip su ile yıkanması da yine ayçiçeği proteinlerinin izolasyonunda beslenme değeri olmayan maddelerin azaltılmasında kullanılmaktadır. Uygulanan diğer bir yöntem ise yağsız ve kabukları ayrılmamış ayçiçeği kaba ununun pH 4.5 değerindeki su ile üç ayrı fraksiyona ayrılması yöntemidir. Bu yöntem ile çözünmeyen proteince zengin fraksiyon, çözünebilen polifenolik bileşikleri ve karbonhidratları içeren fraksiyon ile çoğunlukla kabuk kaynaklı lignoselülozik materyal içeren üstte yüzen bir tabaka oluşmaktadır. Ayrılan proteince zengin fraksiyon protein izolasyonu için kullanılmaktadır (Arntfield, 2000; Moure ve ark., 2006; Foegeding ve Davis, 2011; Rodrigues ve ark., 2012).

1.7.4. Protein çözünürlüğü

Yağlı tohumlardan protein elde etmede çözelti olarak birkaç farklı çözücü kullanılmaktadır. En fazla kullanılan çözücü sıvı alkali solüsyonudur. Bu çözücü mısır, pamuk çiğidi, aspir, susam tohumu, yerfıstığı, ayçiçeği ve kanoladan protein elde etmede kullanılmaktadır. Yüksek çözünürlük sağlaması alkali kullanılmasının en önemli nedenidir. Alkali ekstraksiyon işleminde çözelti pH'ı 9.0-12.5 arasında değişmektedir. Yüksek protein verimi ise yüksek pH değerleri ile ilişkilidir. Özellikle pH 12.0 ve üzerinde iyi kalitede izolatlar ortaya çıkmaması sebebiyle araştırmacılar proteinleri çözmek için düşük alkalilikte solüsyonlar tercih etmektedirler (Arntfield, 2000; Chove ve ark., 2001; Bilgi ve Çelik, 2004; Moure ve ark., 2006; Foegeding ve Davis, 2011; Rodrigues ve ark., 2012).

Çözücü ajan olarak çeşitli tuz çözeltileri de kullanılmaktadır. En fazla kullanılanı ise NaCl'dir. Yağlı tohum proteinlerinin tuz çözeltilerinde alkali solüsyonlara nazaran daha az çözünmelerine rağmen, protein çözünürlüğünün arttırılmasında alkali ve tuz çözeltilerinin karışımı sıklıkla kullanılmaktadır. Keten, aspir, ayçiçeği, ve kanola proteinleri için tuzlu su ile ekstraksiyon kullanılmaktadır. Tuz çözeltisinin tercih edilmesinin sebepleri pH dengesizlikleri ve buna bağlı protein yapısında oluşabilecek değişimlerin engellenmesi ve tuzun kabul edilebilir bir gıda ingrediyesi olması olarak sıralanmaktadır (Arntfield, 2000).

Protein çözünürlüğünü arttırmak için kullanılan alternatif bir diğer yöntem özellikle ayçiçeğinde uygulanan enzim kullanımıdır. Kabuksuz tohumların pektinaz enzimi ile muamelesi sonucu kararmaya neden olan klorojenik asit miktarını azaltmakta, böylece proteince zengin bir fraksiyon oluşmaktadır. Daha sonra bu fraksiyon pH'ı 4.8-5.0 olan su ile yıkanmakta ve yağ ekstraksiyonu yapılmaktadır. Fungal proteazlar ve tripsin gibi proteolitik enzimlerde proteinleri yüksek oranda çözünür hale getirir ve böylece su ile ekstraksiyon yapılabilir. Bu uygulamalara benzer olarak hücre duvarını yıkan enzimler kullanılarak kolza tohumunda kabuksuz proteince zengin öğünler elde edilmektedir (Arntfield, 2000; Moure ve ark., 2006; Foegeding ve Davis, 2011; Rodrigues ve ark., 2012).

1.7.5. Proteinin çökeltilmesi ve geri kazanılması

Çözünen proteinlerin geri kazanılmasında pek çok yaklaşım bulunmaktadır. Protein çökeltmesinde en fazla ön planda olan yaklaşım protein ekstraksiyonunda alkali solüsyonlar kullanılması sebebiyle pH ayarlamasıdır. Çöktürme için uygun pH değerleri susam proteinleri için pH 4.9, kolza proteinleri için pH 4.1, yerfıstığı ve ayçiçeği proteinleri için ise pH 4.5' tur. Tuzla ekstrakte edilen kanola proteinlerinde uygulanan ana metot ise dializ veya ekstrakte edilen proteinin dilüsyonu ile iyonik dayanımın azaltılmasıdır. Bu

dilüsyon tekniği aynı zamanda ayçiçeği proteinlerine de uygulanabilmektedir (Arntfield, 2000; Moure ve ark., 2006; Foegeding ve Davis, 2011; Rodrigues ve ark., 2012).

1.7.6.Diğer saflaştırma aşamaları

Protein izolasyon prosedüründe protein saflaştırmak için kullanılabilecek ekstraksiyon ve çöktürme gibi basit uygulamalara ek olarak birkaç ekstra aşama bulunmaktadır. Çöktürmenin ardından izolatın, pH'ı ayarlanan sıvı bir çözelti ile yıkanması protein yapısında olmayan komponentlerin azaltılmasında etkilidir. Dilüsyon tekniği ile protein çöktürme esnasında ultrafiltrasyon ile protein konsantrasyonunun arttırılması gereklidir ve sıklıkla kullanılmaktadır. Bu uygulamanın nedeni proteinlerin birbirleri ile interaksiyona girmelerini teşvik ederek miseller oluşturmalarını sağlamaktır. Ultrafiltrasyon aşamasının diğer bir yararı ise düşük molekül ağırlıklı besleyici olmayan fenolikler, glukozinolatlar ve fitik asit gibi maddelerin ayrılmasını sağlamasıdır(Arntfield, 2000).

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

El-Adawy ve Taha (2001), paprika cinsi biberin tohumlarının protein ve yağ fraksiyonlarının bileşimi ve karakteristiğini ilk kez değerlendirmişlerdir. Paprika tohumlarının iyi bir protein (%24), yağ (%26) ve diyet lif (%35) kaynağı olduklarını belirlemişlerdir. Fıratlıgil Durmuş'un, 2008'de yaptığı çalışmanın sonuçlarına göre, kırmızı biber tohumu (*Capsicum frutescens*) için elde edilen yağ (%19.32) (% km) ve protein (%23.64) (% km) değerleri, El-Adawy ve Taha (2001) tarafından paprika türü kırmızı biber tohumu (*Capsicum annuum*) için elde edilen %24.23 (% km) protein ve %25.61 (% km) yağ içeriği değerlerinden düşüktür. Bu ve benzeri bileşim farklılıklarının, tür, yetiştirme koşulları ve biberin olgunluğundaki farklılıktan ortaya çıkabileceği belirtilmiştir (Liadakis ve ark., 1995; Guerrero ve ark., 2002; Fıratlıgil Durmuş, 2008). Ayrıca diğer protein kaynaklarında elde edilen protein miktarları; karpuz tohumu (% 27.1) (Wani ve ark., 2006), domates tohumu (%25.5) (Liadakis ve ark., 1995), filizlenmiş balkabağı tohumu (%24.5-36) (Quanhang ve Caili, 2005), güvercin bezelyesi (% 15.5-28.8) (Mizubuti ve ark., 2000), yer fıstığı (% 22.04) (Rustom ve ark., 1991), kolza tohumu (% 38.9) (Oomah ve ark., 1994) olarak belirlenmiştir.

Yağı alınmış biber tohum unundan en yüksek protein içeriği distile su ile ekstraksiyon sonucu elde edildiği görülmüştür (Fıratlıgil Durmuş, 2008). Aynı çalışmada kırmızı biber tohum unundan protein ekstraksiyonu için optimum koşulların çözgen/un oranı için 21:1 (hacim/kütle), ekstraksiyon süresi 20 dakika, pH 8.8 ve sıcaklık 31°C olduğu belirlenmiştir. Kırmızı biber tohumunu dışında antep fıstığı (Ayrancı ve Dalgıç, 1992), keten tohumu (Krause ve ark., 2002), pirinç kabuğu (Gupta ve ark., 2008), yer fıstığı (Rustom ve ark., 1991), kolza tohumu (Mahajan ve Dua, 1994), fasulye (Rahma ve ark., 2000), bakla tohumu (Cepeda ve ark., 1998) gibi bitkisel kaynaklı ürünlerden protein ekstraksiyonunda distile su en uygun çözgen olarak tespit edilmiştir. Su ile ekstraksiyon dışında acı bakladan (El-Adawy ve ark., 2001), domates çekirdeğinden (Liadakis ve ark., 1998), keten tohumundan (Krause ve ark., 2002), güvercin bezelyesinden (Mwasaru ve ark., 1999) sodyum klorür ile ekstraksiyon metoduyla da protein elde etmişlerdir.

Genellikle protein izolatının elde edilmesi proteince zengin malzemenin alkali çözelti içerisinden ekstrakte edilmesi ve sonra pH 4.0-5.0 aralığındaki izoelektrik pH değerlerinden

çöktürülmesiyle gerçekleştirilir(Mwasaru ve ark., 2000; Aluko veMcIntosh, 2001; Chavan ve ark., 2001; Chove ve ark., 2001; Lqari ve ark., 2002; Bilgi ve Çelik, 2004; Aluko ve McIntosh, 2005). Ekstraksiyon sonrası izoelektrik noktada çöktürme metodu ile proteinlerin çökmesi sağlanır. Ceviz (Sze-Tao ve Sathe, 2000), antep fıstığı (Ayrancı ve Dalgıç, 1992), yer fıstığı (Kim ve ark., 1992), susam (Bandyopadhyay ve Ghosh, 2002), kolza tohumu (Mahajan ve Dua, 1994), soya fasulyesi (Chove ve ark., 2001), ayçiçeği tohumu (Ordenez ve ark., 2001), keten tohumu (Oomah ve ark., 1994), nohut (Sanchez-Vioque ve ark., 1999), domates çekirdeği (Liadakis ve ark., 1995) proteinlerinde izoelektrik noktada çöktürme metodu başarılı şekilde uygulanmıştır. Kırmızı biber tohum proteini için izoelektrik pH 3.0 (Fıratlıgil Durmuş, 2008),haşhaş proteinleri için izoelektrik pH 5.0 (Eklund ve Agren, 1975), domates tohum proteini için izoelektrik pH 3.9 (Liadakis ve ark., 1995), kavun tohumu, yer fıstığı, antep fıstığı ve keten tohumu proteini için izoelektrik pH 4.5(Ayrancı ve Dalgıç 1992; Kim ve ark., 1992; Khalil, 1998; Krause ve ark., 2002) olarak belirlenmiştir.

Protein çözünürlüğü izoelektrik pH değerine kadar azalmaktadır. İzoelektrik pH değerinden sonra bazik pH değerlerine doğru yükselmektedir(Bilgi ve Çelik, 2004). Buna benzer eğriler keten tohumu (Krause ve ark., 2002), kaju fıstığı (Neto ve ark., 2001) proteinleri için de belirlenmiştir.

Achouri ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada susam proteinlerini için 1 M tuz konsantrasyonu, pH 7.5 olarak belirlenen optimum koşullarda % 54.6 verim elde etmişlerdir. Bandyopadhyay ve Ghosh(2002) susam proteinleri üzerine yaptıkları çalışmada ise alkali ortamda ekstraksiyon ve izoelektrik çöktürme metodu uygulanarak elde edilen susam proteini izolatında verimi % 47 olarak rapor etmişlerdir. Fıratlıgil Durmuş (2008) kırmızı biber tohumunun içerdği proteinin %35.42 ile %52.41'lik kısmını, Liadakis ve ark. (1995) ise domates tohumu unundaki proteinlerin % 43.9-57.3'lük kısmını ekstrakte edebilmiştir.

Mahajan ve Dua (1994) tarafından yapılan çalışmada kolza tohumundan yağ uzaklaştırma işleminin %40 oranında protein çözünürlüğünü arttırdığını belirlemişlerdir. Aynı zamanda yağı uzaklaştırmak amacıyla kullanılan petrol eteri ve hekzan çözümlerinin çözünürlüğe aynı etkiyi gösterdiklerini gözlemlemişlerdir.

Fıratlıgil Durmuş (2008) yapmış olduğu çalışmada kırmızı biber tohum proteini için en düşük çözünürlük değerini pH 4.0,en yüksek çözünürlük değerini ise pH 10.0 olarak elde etmiştir. Tohum proteininin çözünürlüğünün asidik pH koşullarında izoelektrik noktaya

kadar azaldığını ve sonra bazik pH değerlerinde arttığını tespit etmiştir. Benzer çözünürlük profili susam proteini (Inyang ve Nwadinikpa, 1992), mısır proteini (Myers ve ark., 1994), börülce ve güvercin bezelyesi proteini (Mwasaru ve ark., 2000), keten tohumu proteini (Krause ve ark., 2002), pirinç kepeği proteini (Gupta ve ark., 2008), arpa protein konsantresi (Bilgi ve Çelik, 2004), acı bakla tohumu protein izolatu (El-Adawy ve ark., 2001), keten tohumu proteinleri (Martinez-Flores ve ark., 2002), sabun ağacı tohumu proteinleri (Yin ve ark., 2011) için de elde edilmiştir.

Fıratlıgil Durmuş'un, 2008'de yaptığı çalışmada yağsız kırmızı biber tohumunun, protein konsantresine işlenmesi ile protein içeriğinin %26.02 (% km)'den %70.31 (% km) değerine çıktığı yani kırmızı biber tohum proteininin 2.7 kat konsantre edildiği rapor edilmiştir.

Farklı tohumlardan elde edilen izolatların su ve yağ bağlama kapasitelerine dair birçok çalışma yapılmıştır. Bazı yağlı tohum proteinlerine ait su ve yağ bağlama kapasiteleri sırasıyla; buğday tohum proteinleri için 1.66 g/g ve 1.73 g/g (Ahmedna ve ark., 1999), keten tohumu proteinleri için 2.7 g/g ve 1.18 g/g (Martinez-Flores ve ark., 2002), kanola proteinlerinde 2.5 g/g ve 1.2 g/g (Manamperi ve ark., 2007), susam protein izolatu için 3.02 g/g ve 1.29 g/g (Kanu ve ark., 2007), kırmızı biber tohum proteini için 1.89 g/g ve 3.20 g/g (Fıratlıgil Durmuş, 2008), domates tohum proteini için 2.76 g/g ve 3.17 g/g (Liadakis ve ark., 1998) olarak bildirilmiştir.

Ahmedna ve ark. (1999) tarafından yapılan çalışmada emülsiyon aktivitesi buğday protein izolatu için % 87, soya protein izolatu için % 87.5, sodyum kazeinat için % 79, kurutulmuş yumurta beyazı için % 53, yağsız kuru süt proteini için % 58 olarak bildirilmiştir. Martinez-Flores ve ark. (2002) kolza protein konsantratları için pH 6.0 da emülsiyon aktivitesini % 84.4 olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca farklı çalışmalarda elde edilen emülsiyon aktivitesi değerleri; domates tohum protein izolatu için %35.4 (Liadakis ve ark., 1998), lima fasulyesi protein izolatu için %50-57 (Mwasaru ve ark., 2000), kolza tohum protein izolatu için %56.1 (Xu ve Disady, 1994) olarak tespit edilmiştir.

Martinez-Flores ve ark.(2002) tarafından yapılan çalışmada da keten tohumu konsantratlarında pH 6.0 da en düşük köpüklenme kapasitesi % 12 ve maksimum köpük stabilitesi de % 83.3olarakbelirlenmiştir.Latif ve Anwar (2011) tarafından yapılmış olan çalışmada susam protein konsantratlarında maksimum köpüklenme kapasitesinin 5.0'ınaltındaki pH değerlerinde % 240 olarak, minimum köpük stabilitesiise pH 7.6'nın

üzerindeki değerlerde % 50.4olarak tespit edilmiştir.Kanu ve ark.,(2007) pH 7.0 da susam proteini için köpüklenme kapasitesi % 79 ve 30 dk sonraki köpük stabilitesi ise % 80 olarak tespit edilmiştir. Farklı çalışmalardaki köpük kapasitesi susam protein konsantresi için % 9-97(Inyang ve Iduh, 1996), kişniş tohum protein konsantresi için % 85-210(Aluko ve McIntosh, 2001), fasulye unu protein konsantresi için % 70-160(Guerrero ve ark., 2002), güvercin bezelyesi protein konsantresi için % 80-140 (Akintayo ve ark., 1999) aralığında değişim göstermektedir.

Sharma ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışma sonucu en düşük jelleşme konsantrasyonları badem proteini için % 6, brezilya cevizi ve kestane proteinleri için % 8, fındık proteinleri için % 12, çam fıstığı proteini için % 12, antepfıstığı proteini için % 10 ve soya proteini için % 16 olarak rapor edilmiştir. Kırmızı biber tohum proteini için %4 (Fıratlıgil Durmuş, 2008),acı bakla protein izolatu için %12 (Lqari ve ark., 2002), Şili fındığı protein konsantresi için %14 (Moure ve ark., 2002), güvercin bezelyesi (%8) ve börölce (%10) protein izolatu (Mwasaru ve ark., 2000) en düşük jelleşme konsantrasyonları olarak elde edilen değerlerdir.

Yağılı tohum proteinlerinin amino asit içeriklerinin belirlenmesi üzerine de çalışmalar bulunmaktadır. Eklund ve Agren (1975) haşhaş proteini konsantratında; 314 mg/g N izolösin, 486 mg/g N lösin, 264 mg/g N lisin, 309 mg/g N fenilalanin, 284 mg/g N tirosin, 87 mg/g N sistein, 168 mg/g N metiyonin, 265 mg/g N treonin, 80 mg/g N triptofan, 407 mg/g N valin amino asit içeriğı belirlemiştir. Sirinivas ve Narasinga Rao (1981) tarafından iki haşhaş çeşidinin aminoasit içerikleri; aspartik asit (9.27-10.25 g/100g protein), treonin (3.66-4.00 g/100g), serin (4.39-4.48 g/100g), glutamik asit (24.26-25.40 g/100g), prolin (4.20-4.37 g/100g), glisin (4.19-4.46 g/100g), alanin (4.03-4.32 g/100g), valin (5.29-5.99 g/100g), metiyonin (2.54-2.66 g/100g), izolösin (4.35-4.50 g/100g), lösin (7.22-7.79 g/100g), tirosin (4.17-4.23 g/100g), fenilalanin (4.99-5.40 g/100g), histidin (2.54-2.70 g/100g), lisin (3.48-3.51 g/100g), triptofan (1.02-1.03 g/100g) olarak rapor edilmiştir.El-Adawy ve Taha (2001) paprika tohumunun, toplam esansiyel amino asitler, lisin, treonin ve triptofan içeriğı bakımından zengin olduğunu belirlemişlerdir.

Protein izolatlarının FT-IR analizleri yapılarak protein moleküllerinin yapısı hakkında bilgi edinilmiştir.Achouri ve ark. (2012) tarafından susam protein izolatlarıyla yapılan bir çalışmada FT-IR spektrumun amide I bölgesi kullanılarak proteinlerin tuz, amonyum sülfat ve ısıtma sonucunda ne tür yapısal değişimlere uğradıkları ölçölmeye çalışılmıştır. Çözeltiye

0.2 M tuz eklenmesinin daha düşük dalga sayısına doğru (1642 cm^{-1}) bir kayma olduğu bildirilmiştir. Çözeltilerin $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ de ısıtılmasıyla $1622\text{-}1636\text{ cm}^{-1}$ bandında artış olduğu tespit edilmiştir. Amonyun sülfatla çöktürülmüş protein örneklerinde ise gelişigüzel kıvrımlardan oluşan konformasyona ait olan karakteristik bandın $1640\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ yükseldiği bildirilmiştir.

Proteinlerin moleköl ağırlıklarını belirlemek amacıyla Sirinivas ve Narasinga Rao (1981) tarafından haşhaş tohumunda yapılan bir çalışmada haşhaş proteinlerinin poliakrilamid jel elektroforez analizinde yedi adet band gözlenmiştir. Bu bandların iki adedi düşük mobilite kalanları ise yüksek mobilite göstermiştir. Sirinivas ve Narasinga Rao (1987) tarafından haşhaş tohumunda yapılan bir başka çalışmada ise haşhaş tohumunun düşük moleköl ağırlıklı proteinleri incelenmiştir. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez) analizinde üç band gözlenmiş ve moleköl ağırlıklarının 18, 16 ve 13 kD denk geldiği belirlenmiştir. Biber tohumu proteinlerinde ise literatürde bu konuda bir bilgiye rastlanmamıştır.

Bu çalışmanın amacı yan ürün olan kapy biber tohumlarının insan gıdası olarak değerlendirilebilmesini araştırmaktır. Farklı ön işlem uygulanmış kapy biber tohumlarından yağsız un eldesi, yağsız un analizleri, bu yağsız keklerden protein izolasyonu ve protein izolat analizleri ilk kez çalışılmıştır. Kavurma ve enzim ön işlemlerinin yağsız un ve protein izolatlarına olan etkisi araştırılmıştır. Analizler sonucu kapy biber tohumunu ve proteinlerinin besleyici değeri literatürdeki diğer tohumlarla karşılaştırılarak belirlenmiştir. Bunun sonucunda ise kapy biber un ve proteinlerinin insan gıda olarak ve gıda sistemleri içerisine bir kaynak olarak kullanılabilme potansiyeli ortaya konmuştur.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada materyal olarak kapy biber tohumundan (*Capsicum annuum* Linnaeus) iki tekerrürlü olarak soğuk pres yöntemiyle yağ ekstre edildikten sonra çıkan küspe (yağlı kek) materyal olarak kullanılmıştır.

Analizlerde kullanılan olan coomassie brilliant blue R-250, 2-mercaptoethanol, borik asit, di-sodium tetraborate decahydrate, asetik asit (glasiyel), amonyum sulfat, di-sodyum hidrojen fosfat (anhydrous), sodyum dihidrojen fosfat dihidrat, sodyum hidrojen karbonat, sodyum dodesil sulfat, bovine serum albumin çözeltisi (% 30), trichloroacetic asit, gliserol çözeltisi, nitrik asit 65%, hidroklorik asit 37%, Dowex® 1x4 chloride, Mini-PROTEAN TGX pre-cast jel (4-15%), precision plus protein all Blue Standards, laemmli sample buffer, Tris/Glycine/SDS, gel drying solution, dietil eter, etanol, petrol eteri, izooktan, n-hekzan, kloroform kimyasalları Merck (Darmstadt, Almanya), Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) ve Bio-Rad (Hercules, ABD) firmalarından satın alınarak temin edilmiştir. Enzim muamelesinde kullanılan Hemiselülaz (Ferzim, 60.000 U/g aktivite, 55-65 °C sıcaklık ve 4.0-6.5 pH arasında aktif) ve Proteaz (Alphamalt BK Quick, 12 U/g aktivite, 40-65 °C ve 4.5-6.0 pH arasında aktif) enzimleri yurt içi firmalardan temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1 Tohum kekinin hazırlanması

Çalışmada kontrol, kavurma ve enzim olmak üzere 3 farklı şekilde ön işleme tabi tutulmuş tohumlardan soğuk pres işlemi ile elde edilen kapy biber tohumu keki kullanılmıştır. Tohumlara presleme öncesi uygulanan ön işlemler aşağıda tanıtılmıştır.

3.2.1.1 Kontrol grubu

Kontrol grubunda tohumlara sadece soğuk pres öncesi tavlama işlemi uygulanmıştır. Ön denemelerde belirlenen % nem oranına sabitlenmesi için su ile tavlama yapılmıştır. Kontrol gruplarında, kavurma ve enzim uygulaması uygulanan gruplarda, işlem sonrası tohum nem oranları tavlama işlemiyle sabitlenmiştir.

Tavlama için gerekli su miktarı başlangıç tohum % nem değerlerinden aşağıdaki eşitlik(3.1) ile hesaplanmıştır. Taneler üzerine püskürtülmek suretiyle gerekli su eklenmiş ve

kapalı hava sızdırmaz kapta 24 saat dengeleme yapılmıştır.

$$\text{Tohum eklenenecek su miktarı} = \left[\left(\frac{A}{B} \right) \times C \right] - C \quad (3.1)$$

A: tohum kuru maddesi (%)

B: tohumda istenen kuru madde(%)

C: tohum miktarı (g)

3.2.1.2. Kavurma ön işlemi

Kavurma işlemi için Luxell Lx3530 (Kumtel, Türkiye) tip fırın (1450 W) kullanılmış ve her bir tekerrür için ön ısıtma uygulanan fırında, tohumlar metal tepsilere 2 cm kalınlığında serilerek 150 °C sıcaklıkta 30 dakika süreyle kavurma işlemi uygulanmıştır. Tohumlarda termometre ile belirlenen yığın iç sıcaklığı 150 °C'ye ulaştığında kronometre ile kavurma süresi başlatılmış, 10'ar dk aralıklarla 2'şer kez karıştırılmıştır. Tohum sıcaklığının oda sıcaklığı seviyelerine inmesi sonrasında son nem seviyeleri ölçülmüştür. Tavlama işlemi için gereken su miktarı hesaplanmıştır ve eklenmiştir. Püskürtme yoluyla su eklemesi yapıldıktan sonra kapalı ve hava sızdırmaz kapta 24 saat süreyle nem içeriğinin dengelenmesi sağlanmıştır.

3.2.1.3. Enzim ön işlemi

Hemiselülaz ve proteaz enzimleri her bir grupta 1:1 w/w (tohum:enzim) oranında kullanılmıştır. Her tekerrür için gereken enzim miktarı tartılarak 600 ml buffer (0.1 M Na₂PO₄ + 0,1 M Sitrik asit, pH 6.0) içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. Hemiselülaz enzimi 100U/g tohum ve proteaz enzimi 0.25 U/g tohum oranlarında kullanılmıştır. Enzim solusyonları yayvan ve derin kap içerisinde tohumlar üzerine eklenerek etkili şekilde karıştırma ve homojen dağılım sağlanmıştır. Etüv içerisinde 60 °C de önce hemiselülazla 3 saat ve daha sonra proteazla ek 1 saat süreyle inkübasyon uygulanmıştır. Enzim inaktivasyonu için etüvde 100 °C de 2 saat tutulan tohumlar soğuduktan sonra son nem seviyeleri ölçülmüştür. Gerekmesi durumunda tavlama yapılmıştır. Nemin fazla olduğu durumda ise su 100 °C etüvde uçurulmuştur.

Tohumlardan soğuk pres işlemiyle elde edilen yağlı kek, öğütücüden geçirilerek boyutu küçültülmüş ve uygun buzdolabı poşetleri ile paketlenip, etiketlenmiş ve -20 °C’de derin dondurucuda analize alınincaya kadar muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Kekten yağın uzaklaştırılması ve yağsız un eldesi

Üç ön işlemlili kapy biber yağlı kekinde kalan yağın uzaklaştırılması için bazı modifikasyonlar yapılarak Manamperi ve ark. (2007) ile Onsaard ve ark. (2010) tarafından uygulanan metotlar modifiye edilerek uygulanmıştır. Kekte kalan yağ miktarını azaltmak amacıyla her un örneği 1:2 (w/v) oranında hekzan ile üçer kez ekstrakte edilmiştir. Her ekstraksiyon aşamasında 150 rpm devir hızı ile 1 saat süreyle çalkalama işlemi gerçekleştirilmiştir. İşlem sonrası süzme yapılarak yağlı hekzan fazı ayrılmıştır. Kalan kek kısmından ise çeker ocak altında doğal hava akımı ile 24 saat süreyle solventin uçması ile kuru örnekler elde edilmiştir. Bu örnekler elekten geçecek seviyeye kadar öğütülmüştür. Ambalajlanan ve etiketlenen yağsız un örnekleri analize alınincaya kadar -20 °C de saklanmıştır.

3.2.3. Yağsız kapy biber unlarının temel analizleri

Elde edilen yağsız kapy biber unu örneğinde aşağıdaki analizler gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. Nem miktarının tespiti

Analiz OHAUS-IR MB45 hızlı nem tayin cihazı kullanılarak (107 °C, 1 gr örnek, 10 dk) nem miktar tespiti gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.2. Yağ miktarının tespiti

Otomatik Soxhelet ekstraktör cihazı ile AOAC 920.39 metoduna göre gerçekleştirilmiştir (AOAC, 1984).

3.2.3.3. Protein miktarının tespiti

Kjheldal yöntemi ile AOS Aa 5-38 metoduna göre protein miktarının tespiti gerçekleştirilmiştir (AOCS, 1987).

3.2.3.4. Kül miktarının tespiti

Kül analizi AOCS Ba 5a-49 metoduna göre gerçekleştirilmiştir (AOCS, 1987).

3.2.3.5. Fitik asit miktarının tespiti

Yağsız kapy biber unu örneğinde fitik asit miktarının tespiti AOAC Official Method 986.11 (AOAC, 1986) adapte edilerek gerçekleştirilmiştir. 2 g örnek 40 mL % 2.4'lik HCl çözeltisi ile 150 rpm devirde 25 °C sıcaklıkta 3 saat süreyle çalkalanmıştır. Daha sonra Whatman No.1 filtre kağıdından süzülerek ekstraktlar hazırlanmıştır. Dowex® AG1x4 chloride resin (100-200 µm) kullanılarak ion-exchange kolon hazırlanmış ve 1/1 oranında Na₂EDTA-NaOH eklenen ekstrakt 25 mL'ye seyreltilerek analiz metoduna göre kolondan geçirilmiştir. Örnek içerisinde bulunan fitatlar 0.7 M NaCl çözeltisi kullanılarak kolonda tutulmuştur. Erlene alınan fitat içeren süzüntüye derişik olarak 0.5 mL H₂SO₄+3 mL HNO₃ eklenerek Kjeldahl yakma ünitesinde sarı buhar oluşumu gözleninceye kadar yaş yakma uygulanmıştır. Elde edilen fitat tuzları üzerine 10 mL distile su eklenerek 100 °C de su banyosunda yaklaşık 10 dk bekletilmiş ve böylece fitat tuzlarının çözünmesi sağlanmıştır. Fitat ekstraktları üzerine 2 mL molybdate solüsyonu ve 1 mL sulfonik asit eklenerek distile su ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. 15 dk sonunda reaksiyon tamamlanınca 640 nm de spektrofotometrede okumalar yapılmıştır. Potasyum asit fosfat kullanılarak elde edilen fosfat standart kurvesi yardımıyla örneklerdeki fitik asit miktarları denklem (3.2.) yardımıyla belirlenmiştir.

$$\text{Fitat, mg/g} = (\text{"ortalama } K" \times A \times 20) / (0,282 \times 1000) \quad (3.2.)$$

A: örneğin absorbans değeri

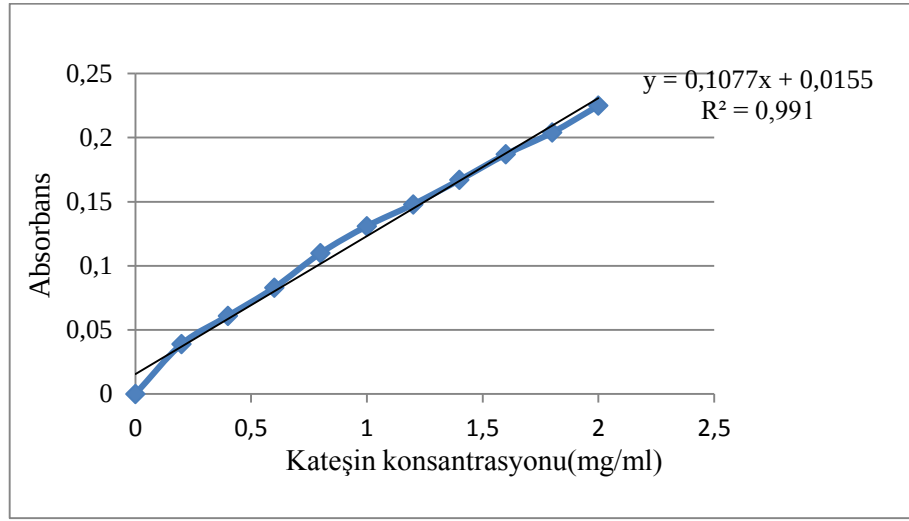
"ortalama K": standart P (µg)/A/n(standartlar)

Fitat: 28,2% P

3.2.3.6. Tanen içeriğinin tespiti

Yağsız kapy biber unu örneğinin kondanse tanen içerikleri Hagerman (2002) tarafından ifade edilen vanillin metodu kullanılarak Price ve ark. (1978)'e göre belirlenmiştir. 0.5 gr yağsız un örneği 10 mL methanol ile 30 dk süreyle oda sıcaklığında çalkalanarak kondanse tanenlerin ekstraksiyonu sağlanmıştır. Daha sonra ise 2291×g de 10 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır. Her örnek için tüplere 5'er mL ekstrakt alınmış, bir tüp seti de kör için hazırlanmıştır. Örnek ve kör tüplerine 5'er mL % 1'lik vanilya (% 8'lik HCl ile hazırlanmış) çözeltisi 1'er dk aralıklarla eklenmiş, sonrasında tüplere yine 1'er dk aralıklarla % 4'lük HCl ilave edilerek 30 °C su banyosunda karanlık ortamda 20 dk bekletilmiştir. Beklenen süre sonunda örnek ve körlere ait absorbans değerleri 500 nm'de

spektrofotometrede okunmuştur. Standart olarak kateşin kullanılarak, **Şekil 3.1**'de denklemi gösterilen kateşin standart kurvesi oluşturulmuş ve kondanse tanen içerikleri kateşin eşdeğeri olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Tanen analizi kateşin standart kurvesi

3.2.3.7. Aletsel renk

Minolta CR-300 Reflektans kolorimetresi (Osaka, Japonya) kullanılmıştır. Renk ölçümünde CIE'in sistemi kullanılarak L , a^* ve b^* değerleri belirlenmiştir.

3.2.3.8. Viskozitenin belirlenmesi

Khalid ve ark. (2003) tarafından uygulanan metoda göre yağsız kapyra biber unu ile % 30'lik örnek dispersiyonları hazırlanmıştır. Örneklerin pH değerleri 1 N HCl veya 1 N NaOH kullanılarak 7.0 olarak ayarlanmıştır. 1 dk vorteksleme sonucunda oda sıcaklığında Brookfield viskozimetre-model DV II+Pro (with Rheocalc software) kullanılarak No. 34 spindle yardımıyla görünür viskozite değerleri santipois (cP) olarak belirlenmiştir.

3.2.3.9. Mineral madde içeriklerinin belirlenmesi

Yağsız kapyra biber unu örneklerinin mineral madde içerikleri ICP-MS (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer) cihazı kullanılarak, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Merkez Laboratuvarında hizmet alımı ile belirlenmiştir. Mineral madde içeriği İşleten ve ark., (2007) tarafından uygulanan metot modifiye edilerek tespit edilmiştir. ICP-MS cihazına enjeksiyon öncesinde, örnekler yaş yakma uygulanmıştır. Yaş yakma amacıyla 0.5 g örnek tartılmış ve her bir örnek için yaklaşık 100 mL nitrik asit kullanılarak hot plate üzerinde kademeli ısı artışları ile (90 °C-30 dk, 100 °C- 30 dk, 150 °C-30 dk, 200 °C-30 dk,

300 °C berrak renk oluşana kadar) kontrollü bir yakma işlemi uygulanmıştır. Uygulama sonucu elde edilen örnek distile su ile 25 mL'e seyreltilmiştir. Perkin Elmer Optical Emission Spectrometer Optima 8000-Perkin Elmer S10 autosampler (ABD) ile okuma yapılmıştır.

3.2.4. Yağsız kapyra biber unlarının fonksiyonellik testleri

3.2.4.1. Su bağlama kapasitesi

Moure ve ark. (2002) ile Manamperi ve ark. (2007) tarafından uygulanan metotlar esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Dara ağırlığı kaydedilen falkon tüplere 5 g örnek tartılmış ve üzerine 20 ml distile su eklenmiştir. Örneklerin pH değerleri 1 N HCl veya 1 N NaOH kullanılarak 7.0 olarak ayarlanmıştır. 1'er dk vorteksleme uygulandıktan sonra örnekler oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra 2291×g'de 15 dk sanrifüjlenmiştir. Supernatant kısmı atılarak, tüpler ters çevrilmiş ve kalan sıvının giderilmesi için 30 dk bekletilmiştir. Sonrasında ise falkon tüplerinin tartımı alınmıştır. Absorbe edilen su miktarı; ilk ağırlık ile son ağırlık arasındaki farkın örnek miktarına oranlanması ile tespit edilmiştir. Su bağlama kapasitesi g su/g un olarak ifade edilmiştir.

3.2.4.2. Yağ bağlama kapasitesi

Manamperi ve ark. (2007) tarafından uygulanan metoda göre 2 gr yağsız un, dara ağırlığı kaydedilen falkon tüplere tartılarak üzerine 10 mL ayçiçek yağı eklenmiştir. Örneklerin pH değerleri 1 N HCl veya 1 N NaOH kullanılarak 7.0 olarak ayarlanmıştır. 1'er dk vorteksleme sonucunda örnekler oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra 2291×g'de 15 dk sanrifüjleme uygulanmıştır. Üst kısımda toplanan yağ kısmı atılarak, tüpler ters çevrilmiş, kalan yağın giderilmesi için 1 saat bekletilmiş ve sonrasında falkon tüplerinin tartımı alınmıştır. Absorbe edilen yağ miktarı; ilk ağırlık ile son ağırlık arasındaki farkın örnek miktarına oranlanması ile tespit edilmiştir. Yağ bağlama kapasitesi g yağ/g un olarak ifade edilmiştir.

3.2.4.3. Emülsiyon aktivitesi ve emülsiyon stabilitesi

Emülsiyon aktivitesi ve stabilitesinin belirlenmesi Wu (2001) tarafından uygulanan metod esas alınarak gerçekleştirilmiştir. 7:100:100 (w:v:v) oranı esas alınarak 1,05 gr yağsız un tartılmış, üzerine 15 mL distile su eklenmiştir. 1 N HCl veya 1 N NaOH kullanılarak pH değeri 7.0 olarak ayarlanmıştır. Örneğe 15 mL ayçiçek yağı eklenerek 1 dk vortekslenmiş ve sonrasında 2291×g'de 5 dk sanrifüj edilerek emülsiyon aktivitesi (EA) denklem

(3.3)kullanılarak belirlenmiştir. Emülsiyon stabilitesinin belirlenmesi için ise örnekler 80 °C su banyosunda 30 dk bekletilmiştir. Süre sonunda akan su altında ve buz ile hızlıca soğutulmuştur. Örnekler tekrar 2291×g’de 5 dk santrifüjlenmiş ve emülsiyon stabilitesi (ES) denklem (3.4) kullanılarak belirlenmiştir.

$$(EA)= 100 \times (\text{emülsiyon tabakasının uzunluğu-mm}) / (\text{tüp içeriğinin total uzunluğu-mm}) \quad (3.3)$$

$$(ES)= 100 \times (\text{kalan emülsiyon tabakasının uzunluğu-mm}) / (\text{tüp içeriğinin total uzunluğu-mm}) \quad (3.4)$$

3.2.4.4. Köpüklenme kapasitesi ve köpük stabilitesi

Latif ve Anwar (2011) ile Kanu ve ark. (2007) tarafından uygulana metod esas alınarak gerçekleştirilmiştir. 3 g yağsız kaypa biber unu ile 100 mL distile su kullanılarak örnek dispersiyonları hazırlanmıştır. Dispersiyonların pH değerleri 1 N HCl veya 1 N NaOH kullanılarak 2 dk karıştırma ile 7.0 olarak ayarlanmıştır. Oda sıcaklığında 3 dk süreyle yüksek hızda çalkalanan örnekler hızlıca 250 mL’lik mezürlere alınmıştır. Hemen total hacim ve sıvı hacimleri kaydedilerek köpüklenme kapasitesi (FC) belirlenmiştir. Oda sıcaklığında 30 dk bekletme sonucunda kalan köpük miktarı tekrar kaydedilerek elde edilen değerler ile de köpük stabilitesi (FS) belirlenmiştir. FC ve FS denklemleri sırasıyla (3.5) ve (3.6) olarak gösterilmektedir.

$$FC= (\text{toplam hacim-sıvı hacmi}) \times 100 \quad (3.5)$$

$$FS=(\text{kalan köpüğün hacmi/ilk köpük hacmi}) \times 100 \quad (3.6)$$

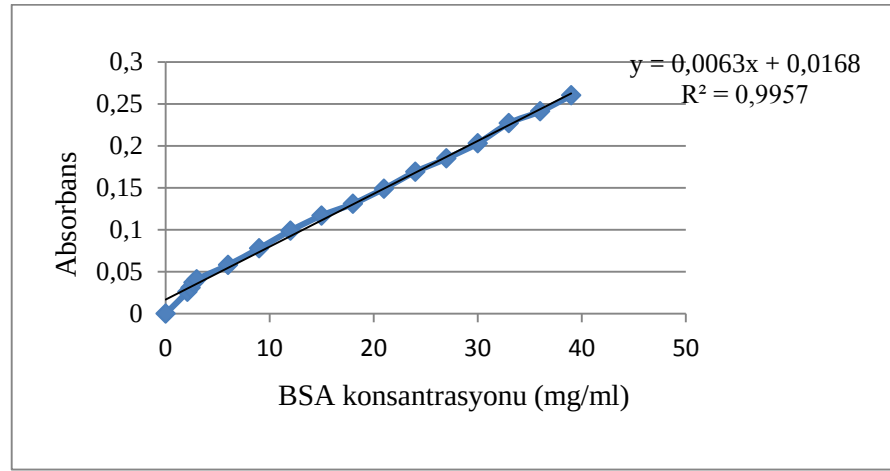
3.2.4.5. En düşük jelleşme konsantrasyonu

Moure ve ark. (2002) tarafından uygulanan metoda göre distile su ile % 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 28, 32 (w/v) oranlarında yağsız un dispersiyonları hazırlanmıştır. Yapılan ön denemelerde % 2, 4, 6, 8 (w/v) oranlarında pıhtılaşma dahi oluşmadığından tüm örnekler için analiz setleri %10 oranından başlatılmıştır. Enzimli örneklerde ilave olarak %34 ve 38 konsantrasyonları da denenmiştir. Dispersiyonların pH değerleri 1 N HCl veya 1 N NaOH kullanılarak 2 dk karıştırma ile 7.0 olarak ayarlanmıştır. Dispersiyonların sıvı kısımlarından 5 ml test tüplerine alınmış ve 100 °C sıcak su banyosunda 1 saat tutulmuştur. Sonrasında akan su altında ve buz ile hızlıca soğutulan örnekler +4 °C de 24 saat süresince

soğumaya bırakılmıştır. Ertesi günü gözlem yapılan tüplerde, katı ve tüp çeperinden düşmeyen jel yapısı gözlenen örnek konsantrasyonları saptanmıştır.

3.2.5. Yağsız unlardan protein izolasyonu

Yağsız un örneklerinden yüksek verimle kapy a biber protein izolatlarının elde edebilmek için her şeyden önce optimum şartlar belirlenmiştir. Protein izolasyonunda literatürde birçok teknik bulunmaktadır. Fakat uygulamadan önce her materyal için bir optimizasyon (ön-deneme) önerilmektedir. Özellikle proteinlerin çözünme ve izoelektrik nokta farklılıklarına göre en iyi ekstraksiyon şartları belirlenmelidir. Ortamda NaCl varlığında yağlı tohum proteinlerinin daha iyi çözünebildiğine dair literatür bilgileri bulunmaktadır. Bu bilgilere dayanılarak maksimum protein verimini sağlayan en uygun tuz konsantrasyonu ve pH değerleri belirlenmiştir. Ayrıca her örnek için izoelektrik nokta tespiti yapılmıştır. Çalışmanın bütün aşamalarında protein tayini Bradford (1976) tekniği kullanılarak yapılmıştır. Protein tayini için Bovine Serum Albumin standart olarak kullanılmış ve 595 nm de çizilen **Şekil 3.2**'deki kurve yardımıyla protein miktar belirlemeleri yapılmıştır.



Şekil 3.2. Bovine serum albumine (BSA) standart kurvesi

3.2.5.1. Ekstraksiyon için optimum tuz konsantrasyonu ve pH değerinin belirlenmesi

Örneklere ait ekstraksiyon için optimum tuz konsantrasyonu ve pH değerinin belirlenmesi amacıyla Achouri ve ark. (2012) tarafından susam tohumu için geliştirilen teknik bazı modifikasyonlar ile uygulanmıştır. Protein ekstraksiyonunu optimize edilebilmek için, tohum total proteinlerinin ekstraksiyonu pH'ın fonksiyonu olarak farklı tuz

konsantrasyonlarında (0-1 M) araştırma yapılmıştır. 0.2 M, 0.6 M ve 1 M konsantrasyonlarındaki tuz çözeltileri ve distile su (kontrol-0 M NaCl) kullanılarak % 10 (w/v) oranında örnek süspansiyonları hazırlanmıştır. Örnek süspansiyonları, sabit oda sıcaklığında (25 °C) 150 rpm de 2 saat çalkalanmıştır. Kontrol ve NaCl süspansiyonları (0.2, 0.6 ve 1 M NaCl) yaklaşık 10'ar ml olarak test tüplerine alınmıştır. pH değerleri 1 N HCl veya 1 N NaOH kullanılarak 1'er birim arttırarak 2-12 aralığında ayarlanmıştır. Örnekler 30 dk boyunca sonikasyona maruz bırakılmış ve daha sonra 2060xg'de 30 dk santrifüjlenmiştir. Supernatant kısımlarının protein içerikleri Bradford (1976) metodu ile belirlenmiştir. Protein ekstraksiyonu amacıyla optimum koşul en yüksek protein içeriğinin belirlendiği tuz konsantrasyonu ve pH değeri seçilmiştir.

3.2.5.2. İzoelektrik noktaların belirlenmesi

Örneklere ait izoelektrik noktaların belirlemek için Manamperi ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmadan yararlanılmıştır. Achouri ve ark. (2012) metoduna göre; her bir örnek için belirlenen optimum konsantrasyondaki NaCl çözeltileri ile % 10'luk örnek dispersiyonları hazırlanarak ekstraksiyon için belirlenen optimum pH değerine ayarlanmıştır. Örnekler sabit oda sıcaklığında (25 °C) 150 rpm hızla 2 saat süreyle çalkalanmıştır. Süre sonunda örneklerin sıvı kısmından 6'şar adet santrifüj tüpüne 10'ar ml alınarak 0,5 birim değişim ile pH değerleri 3.5 - 6.0 arasına ayarlanmış ve 1'er dk vortekslenmiştir. Daha sonra örnekler 3000xg de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısımlarının protein içeriği Bradford (1976) metodu ile belirlenmiştir. Örneğe ait izoelektrik nokta en düşük protein içeriğinin tespit edildiği pH değeri olarak saptanmıştır.

3.2.5.3. Protein izolasyonu ve protein veriminin belirlenmesi

Yapılan çalışmalar sonucunda kontrol ve enzim örnekleri için 0.6 M NaCl ve pH 9, kavrulmuş örnekleri için ise 0.2 M NaCl ve pH 9 değerleri belirlenmiştir. Bu değerler kullanılarak %10'luk (w/v) örnek dispersiyonları hazırlanmış ve oda sıcaklığında 2 saat süreyle çalkalama (150 rpm) uygulanmıştır. Çalkalama sonrası süzme işlemi uygulanarak, çözünen proteinleri içeren supernatant kısmı elde edilmiştir. Çöktürme öncesi supernatantın protein miktarı Bradford (1976) metodu ile belirlenmiştir. pH değerleri izoelektrik noktaya getirilerek proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. 18 saat süreyle +4 °C de bekletilmiştir. Bekleme sonucu çöken proteinleri kazanmak için 2291xg'de 15 dk santrifüjleme yapılarak, üst kısımda ayrılan serumda tekrar Bradford (1976) metodu ile protein miktar tespiti yapılmıştır. Elde edilen kapa biber protein izolatları freeze-dry (Labfreeze FD-10 MR

Bench-Top Freeze Dryer, Xiangtan city-Hunan China) cihazı ile kurutulmuş ve analize alınincaya kadar -20 °C de muhafaza edilmiştir. Bovine serum albumine (BSA) eşdeğeri olarak belirlenen mg cinsinden protein miktarları kullanılarak aşağıdaki denklem (3.7) ile protein kazanım verimleri belirlenmiştir.

$$\text{Protein verimi (\%)}: [(P1-P2)/P3] \times 100 \quad (3.7)$$

P1: supernatant protein içeriği (mg)

P2: çökme sonrası kalan serumun protein içeriği (mg)

P3: %10 luk yağsız un dispersiyonun mL 'sinde çözünen protein miktarı (mg), yağsız unun başlangıç protein içeriği kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.6. Protein izolatlarında yapılan analizler

Kapya biber protein izolatlarında karakterizasyon analizleri ve fonksiyonellik testleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.1. Protein çözünürlüğü

Protein çözünürlüğütespiti Yin ve ark. (2011)'e göre belirlenmiştir. Distile su kullanılarak % 1'lik protein çözeltileri hazırlanmıştır. Örnekler 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Her bir örnek için 11'er adet santrifüj tüpü hazırlanmıştır. Santrifüj tüplerine 10'ar mL protein çözeltisi konulmuş ve 1 pH değeri artışla 2-12 arasında deney seti oluşturulmuştur. pH ayarlaması yapılan çözeltiler 2 dk vortekslenmiştir. Daha sonra 2291×g'de 5 dk santrifüjlenmiş ve supernatant kısmında bulunan protein içeriği Bradford (1976) metodu ile belirlenmiştir. Çözünürlüğün en fazla olduğu pH, tespit edilen protein içeriklerinden (mg/mL) en yüksek olanının belirlendiği pH değeri olarak tespit edilmiştir.

3.2.6.2. Renk ölçümü

Freeze-dry ile kurutulan kapya biber protein izolatlarında renk belirlemesi Minolta CR-300 Reflektans kolorimetresi (Osaka, Japonya) ile yapılmıştır. Renk ölçümünde CIE'in sistemi kullanılarak *L*, *a** ve *b** değerleri belirlenmiştir.

3.2.6.3. Görünür viskozitenin belirlenmesi

Khalid ve ark. (2003) ile Kanu ve ark. (2007) tarafından uygulanan metotlar kullanılarak görünür viskozite belirlenmiştir. Kapyra biber proteini ve distile su ile % 20'lik örnek dispersiyonları hazırlanmış ve pH değerleri 1 N HCl veya 1 N NaOH kullanılarak 7.0 olarak ayarlanmıştır. 1 dk vortekslenmiş ve örnekler analize hazırlanmıştır. Yüksek sıcaklık olarak 60 °C ve orta sıcaklık değeri olarak 40 °C seçilmiştir. Brookfield viskozimetre-model DV II+Pro (with Rheocalc software) cihazı (örnek haznesi sıcak su ile belirlenen sıcaklıklara ısıtılarak) ile No. 18 spindle yardımıyla görünür vizkozite değerleri cP olarak ölçülmüş ve kaydedilmiştir.

3.2.6.4. Protein fonksiyonellik testleri

Kapyra biber protein izolatlarında aşağıdaki fonksiyonellik analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.4.1. Su bağlama kapasitesi

Su bağlama kapasitesi Onsaard ve ark. (2010) tarafından uygulanan metotlar esas alınarak tespit edilmiştir. Dara ağırlığı kaydedilen tüplere 0.5 g örnek tartılmış ve üzerine 10 ml distile su eklenmiştir. 1 N HCl veya 1 N NaOH kullanılarak örneklerin pH değerleri 7.0 olarak ayarlanmış ve 1'er dk vortekslenmiştir. 30 dk oda sıcaklığında bekletilen örnekler, süre sonunda 2291×g'de 15 dk santrifüjlenmiştir. Supernatant kısmı atılarak, tüpler ters çevrilmiş kalan sıvının giderilmesi için 30 dk bekletilmiştir. Tüplerin tartımı alınmıştır. Absorbe edilen su miktarı ilk ağırlık ile son ağırlık arasındaki farkın örnek miktarına oranlanması ile tespit edilmiştir. Su bağlama kapasitesi g su/g protein olarak ifade edilmiştir.

3.2.6.4.2. Yağ bağlama kapasitesi

Yağ bağlama kapasitesi Sharma ve ark. (2010) ile Manamperi ve ark. (2007) tarafından uygulanan metotlar esas alınarak tespit edilmiştir. 0,5 g protein, dara ağırlığı kaydedilen tüplere tartılarak üzerine 5 mL ayçiçek yağı eklenmiştir. 1 N HCl veya 1 N NaOH kullanılarak örneklerin pH değerleri 7.0 olarak ayarlanmıştır. 30 sn vorteksleme sonucunda örnekler oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiştir. Süre sonunda 2291×g'de 15 dk santrifüjleme uygulanmıştır. Maksimum devirde 5 dk daha ilave santrifüjleme yapılarak proteinlerin iyice yapışması sağlanmıştır. Santrifüj sonrası üst kısımda toplanan yağ fazı atılarak tüpler ters çevrilmiş, kalan yağın giderilmesi için 1 saat bekletilmiştir. Sonrasında tüplerin tartımı alınmıştır. Absorbe edilen yağ miktarı; ilk ağırlık ile son ağırlık arasındaki farkın örnek

miktarına oranlanması ile tespit edilmiştir. Yağ bağlama kapasitesi g yağ/g protein olarak ifade edilmiştir.

3.2.6.4.3. Emülsiyon aktivitesi ve emülsiyon stabilitesi

Emülsiyon aktivitesi ve stabilitesinin belirlenmesinde Wu (2001) tarafından uygulanan metod esas alınmıştır. 0.5 gr protein tartılarak, üzerine 10 mL distile su eklenmiştir. 1 N HCl veya 1 N NaOH kullanılarak örneklerin pH değeri 7.0 olarak ayarlanmıştır. Örneğe 10 ml ayçiçek yağı eklenmiş, 1 dk vortekslenmiştir. Daha sonra $2291 \times g$ 'de 15 dk santrifüj edilerek emülsiyon aktivitesi (EA) denklem (3.3) kullanılarak hesaplanmıştır. Emülsiyon stabilitesinin belirlenmesi için örnekler 80 °C'lik su banyosunda 30 dk ısıtılmıştır. Isıtma sonrasında akan su altında ve buz kullanılarak örnekler hızlıca soğutulmuştur. Örnekler tekrar $2291 \times g$ 'de 5 dk santrifüjlenmiş ve emülsiyon stabilitesi (ES) denklem (3.4) kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.6.4.4. Köpüklenme kapasitesi ve köpük stabilitesi

Sharma ve ark. (2010) tarafından izlenen metod esas alınarak köpüklenme kapasitesi ve köpük stabilitesi tespit edilmiştir. %1'lik protein dispersiyonları (0.5 g protein+50 ml distile su) hazırlanmıştır. 1 N HCl veya 1 N NaOH kullanılarak 2 dk karıştırma ile dispersiyonların pH değerleri 7.0 olarak ayarlanmıştır. Oda sıcaklığında 3 dk süreyle blender ile yüksek hızda çalkalanan örnekler hızlıca 100 ml'lik mezürlere alınmıştır. Total hacim ve sıvı hacimleri kaydedilmiş ve köpüklenme kapasitesileri (FC) denklem (3.5) ile belirlenmiştir. Oda sıcaklığında 30 dk bekletme sonucunda kalan köpüğün hacmi kaydedilerek köpük stabilitesi (FS) denklem (3.6) yardımıyla belirlenmiştir.

3.2.6.4.5. En düşük jelleşme konsantrasyonu

Proteinlerin jelleşme özelliklerini belirlemek için Sharma ve ark. (2010) metodu bazı modifikasyonlarla uygulanmıştır. Kappa biber proteinlerinden % 20'lik stok çözelti hazırlanmıştır. Çözeltinin pH değeri 1 N HCl veya 1 N NaOH ile 7.0 olarak ayarlanmıştır. Stok çözeltiden 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 % (w/v) oranlarında örnek içerecek şekilde dilüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan bu dilüsyonlar 100 °C sıcak su banyosunda 30 dk süresince bekletilmiştir. Süre sonunda akan su altında ve buz kullanılarak hızlıca soğutulmuştur. +4 °C de 18 saat süreyle bekletilen örneklerin jelleşme durumları incelenmiştir. Katı ve tüp çeperinde hareket etmeden kalan jel yapısının olduğu en düşük konsantrasyon kaydedilmiştir.

3.2.6.5 Amino asit bileşimlerinin belirlenmesi

Örneklere ait amino asit içeriklerini belirlemek için öncelikle protein hidrolizi yapılmıştır. Protein hidrolizi amacıyla Nergiz (2006) metoduna göre; 50 mg protein örneği schoot şişelere tartılarak üzerine 3 mL 6 N HCl eklenmiş ve vakumlu etüvde 110 °C de 24 saat tutularak protein hidrolizi sağlanmıştır. Süre sonunda etüvden alınan örneklerdeki HCl, ısı tablası üzerinde kontrollü şekilde uçurulmuştur. Şişe içerisinde kalan örneğe 10 mL buffer (9.8 g trisodyum sitrat dihidrat, 14 g sitrik asit, 5 mL thiodiethanol, 0.100 mL oktanoik asit karışımı distile su ile 500 mL'ye tamamlanmış, pH 2.20) eklenerek vortekslenmiş ve örneğin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen ekstrakt 0.45 µm membran filtreden süzölmüş ve amino asit içeriklerinin miktarı Çanakkale Onsekizmart Üniversitesi Merkez Laboratuvarında belirlenmiştir. Ölçümler Thermo-Finnigan GS-MS(Gas Chromatography–Mass Spectrometry) (USA) cihazında Zebron-Capillary GC Coloumn-ZB-5ms (% 5-polysilarylene, %95-polydimethysiloxane, 0,25 µm thickness, 0.25 mm I.D., 30 m length) ile yapılmıştır. Cihaz koşulları: initial temp. 110 °C, max. Temp. 320 °C, rate 32 °C/min, split flow 23 mL/min, split ratio 15, MS transfer line 220 °C. Dedektör koşulları: Flame on, air 350 mL/min, H₂ 35 mL/min, Detector base temp. 300 °C, ECD temp. 320 °C, reference current 1.0 nA, pulse amplitude 50 V, pulse width 1.0 µsec.

3.2.6.6. DSC analizi

Kapya biber protein izolatlarının termal özellikleri DSC cihazı (Perkin Elmer DSC 4000, ABD) ile Yin ve ark. (2011) tarafından uygulanan metot esas alınarak belirlenmiştir. 10 mM fosfat buffer (pH 7.0) ile %10'luk (w/v) örnek dispersiyonları hazırlanmıştır. Alüminyum örnek panlarına 10 µL protein dispersiyonu alınmış ve hermetik olarak kapatılmıştır. Burada örnek ağırlığı dara hariç olacak şekilde belirlenmiştir. Aynı zamanda boş bir alüminyum pan da referans olarak kullanılmıştır. Kalorimetrede kullanılan programda; başlangıç sıcaklığı olarak 25 °C belirlenmiş ve 10 °C/dk artışlar ile son sıcaklık 120 °C olarak ayarlanmıştır. Denaturasyon başlangıç (on-set) (T_o) sıcaklığı, denaturasyon sıcaklığı (T_d) ve denaturasyonun entalpi değişimi (ΔH) değerleri elde edilen termogramlardan Pyris 1 Manager Software yardımıyla hesaplanmıştır.

3.2.6.7. FT-IR Spektroskopisi analizi

Kapya biber tohumlarına uygulanan ön işlemlerin proteinlerde oluşturduğu yapısal değişimlerin oranı FT-IR Spektroskopisi (Perkin-Elmer FT-IR Spectrometer, ABD) ile belirlenmiştir. Cihazın ATR kısmına yaklaşık 1 mg seviyesinde örnek konularak 4'er adet

okuma yapılmıştır. Okumaların ortalamaları alınmıştır. Örneklerdeki aktif molekül grupları, titreşimlerin meydana geldiği ve pik oluşturduğu dalga boyları kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır.

3.2.6.8. SDS-PAGE Elektroforez analizi

Kapya biber proteinlerinin moleküler ağırlıklarını belirlenmek için Achouri ve ark. (2012) ile Yin ve ark. (2011) tarafından uygulanan metotlar modifiye edilerek SDS-Page Elektroforez analizleri yapılmıştır. 15 mg ve 30 mg olarak ayrı örnekler tartılarak üzerlerine 0.950 µL Laemmli sample (65.8 mM Tris-HCl-pH 6.8, %26.3 w/v gliserol, %2.1 sodyum dodesil sulfat-SDS, %0,01 bromfenol blue - Biorad, ABD) ve 0,50 µL 2-mercaptoethanol (Biorad, ABD) eklenerek 5 dk vortekslenmiştir. Örnekler 100 °C su banyosunda 5 dk bekletilerek protein denaturasyonu sağlanmıştır. Sonrasında ise buz üzerinde örnekler soğutulmuştur. Örnekler 10 °C sıcaklıkta 5 dk santrifüj (1000×g) edilmiştir. SDS-Page Elektroforez ünitesine yerleştirilen jelde (Mini-protean precast gels, %4-15, ABD) ilk kuyuya 10 µL protein standardı (Precision plus protein all blue standards, 10-250 kD, Biorad-ABD) dikkatli bir şekilde yüklenmiştir. Diğer kuyulara sırayla numaralanan örnekler 15 mg'lık örnekten 10µL, 30 mg'lık örnekten 5'er µL olarak yüklenmiştir. 200 V elektrik akımı altında buffer ortamında (10xTris/Glycine/SDS buffer, Biorad-ABD) örnekler jelde yürütülmüştür. Yürümesi sona erdiğinde % 0.1'lik (1.0 g coomassive blue R250+450 mL distile su+450 mL methanol+100 mL glasiyel asetik asit) boya çözeltisi içerisine alınan jelin, çalkalayıcı üzerinde 4 saat süreyle boyanması sağlanmıştır. Boyama işleminden sonra ilk önce distile su ile yıkanan jel, daha sonra hazırlanan yıkama çözeltisi içerisine alınmıştır. Boyanın akması ve protein şeritlerinin görünür hale gelmesi amacıyla çalkalayıcı üzerinde 24 saat süre bekletilmiştir. Elde edilen jel iki selofan arasına çok dikkatlice alınarak, 45 °C sıcaklıkta ortalama 2 saat süre beklenilerek kuruması sağlanmıştır.

3.2.7. İstatistiksel analizler

Kontrol, kavurma ve enzim muamelesi olmak üzere üç farklı işlem seviyesi bulunmaktadır. Her işlem 2 tekerrürlü olarak uygulanmış, tekerrürlerde yapılacak analizler 2 paralelli uygulanmış ve ortalama değerleri alınmıştır. Analizlerin sonucunda elde edilen veriler SPSS ve MINITAB bilgisayar programları yardımıyla Varyans analizi(ANOVA) ve çoklu karşılaştırma Tukey testi ile değerlendirilmiştir. Tüm istatistik analizlerde en düşük

güvenirlik seviyesi %95 olarak alınmıştır. Ölçümlere ilişkin tanıtıcı veriler ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$) (ortalama $\pm$ standart hata) şeklinde sunulmaktadır.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Farklı ön işlem uygulanmış kapyra biber tohumlarından soğuk pres yöntemiyle yağ eldesi sonucu geriye kalan yağlı keklerde yağ giderme işlemi uygulanmış ve elde edilen yağsız unlarda fiziko-kimyasal ve fonksiyonellik analizleri gerçekleştirilmiştir. Yağsız unlardan protein izolasyonu amacıyla optimum koşullar belirlenmiş, belirlenen bu koşullarda tohum proteini izole edilmiş ve protein verimleri belirlenmiştir. Kapyra biber proteinlerinde bazı yapısal karakterizasyonlar yapılmıştır. Ayrıca proteinlerin fonksiyonellik özellikleri de belirlenmiştir. Her işlem 2 tekerrürlü olarak uygulanmış ve tekerrürlerde yapılacak analizler en az 2 paralelli uygulanmıştır. Ölçümlere ilişkin tanıtıcı veriler ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$) (ortalama $\pm$ standart hata) şeklinde sunularak, istatistik analizleriyle birlikte aşağıda tartışılmıştır.

4.1. Yağsız Kapyra Biber Unlarının Temel Analizleri

Yağsız kapyra biber unlarında temel bileşen analizleri yapılmış ve aynı zamanda anti beslenme faktörleri olarak fitik asit ve tanen içerikleri de belirlenmiştir. Sonuçlar **Çizelge 4.1.** 'de gösterilmiştir.

Kapyra biber tohumuna ait unlar fiziksel ve kimyasal özelliklerin büyük çoğunluğu açısından farklılık göstermektedir ve muameleler arasındaki farklar istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Yağsız unlarda belirlenen nem, yağ ve kül miktarları ile Fıratlıgil Durmuş (2008)'un çalışmasındaki veriler arasında yakınlık bulunmaktadır. Sadece elde edilen protein (%21.17) değeri Fıratlıgil Durmuş (2008) tarafından elde edilen % 23.64 protein değerinden düşüktür. Bu farklılığın biberin türü, çeşidi, yetiştirme koşulları ve olgunluğundaki farklılıktan kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Fıratlıgil Durmuş, 2008; Liadakis ve ark., 1995; Guerrero ve ark., 2002). Ayrıca diğer protein kaynaklarında elde edilen protein miktarları; karpuz tohumu (% 27.1) (Wani ve ark., 2006), domates tohumu (%25.5) (Liadakis ve ark., 1995), filizlenmiş balkabağı tohumu (%24.5-36) (Quanhang ve Caili, 2005), güvercin bezelyesi (% 15.5-28.8) (Mizubuti ve ark., 2000), yer fıstığı (% 22.04) (Rustom ve ark., 1991), kolza tohumu (% 38.9) (Oomah ve ark., 1994) olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Kapy biber yağsız unlarına ait fiziko-kimyasal analiz sonuçları

Özellik	Kontrol	Kavrulmuş	Enzim	Total	<i>p</i> değeri
Nem (%)	8.89±0.11 ^{B*}	9.13±0.07 ^B	10.20±0.00 ^A	9.40±0.62	<i>p</i> =0.001
Protein (%) (N×6,25)	19.29±0.25 ^A	19.60±0.14 ^A	20.20±0.38 ^A	19.70±0.46	<i>p</i> =0.098
Yağ (%)	2.86±0.00 ^B	5.00±0.03 ^A	5.00±0.00 ^A	4.29±1.10	<i>p</i> =0.000
Kül (%)	6.28±0.14 ^A	4.22±0.04 ^C	4.94±0.02 ^B	5.14±0.94	<i>p</i> =0.000
<i>L</i>	62.25±0.02 ^C	65.96±0.00 ^A	63.36±0.00 ^B	63.85±1.70	<i>p</i> =0.000
<i>a</i>*	4.00±0.02 ^B	4.50±0.00 ^A	3.82±0.00 ^C	4.11±0.31	<i>p</i> =0.000
<i>b</i>*	28.64±0.03 ^B	29.04±0.01 ^A	26.76±0.01 ^C	28.14±1.09	<i>p</i> =0.000
Vizkozite 25 °C (cP)	958±7.77 ^B	1053±14.14 ^A	1093±7.77 ^A	1034±62.59	<i>p</i> =0.002
Fitik asit (mgP g⁻¹)	11.36±0.01 ^B	10.34±0.03 ^C	11.54±0.02 ^A	11.08±0.58	<i>p</i> =0.000
Tanen (mgCE g⁻¹)	1.66±0.03 ^A	1.54±0.02 ^A	1.65±0.03 ^A	1.62±0.06	<i>p</i> =0.054

* Aynı satırdaki büyük harfler aynı çeşitten elde edilen her bir yağsız un örneğinde tespit edilen değerlerin tohumlara uygulanan ön işlemlere göre karşılaştırılmalarını göstermektedir.

Farklı ön işlem uygulanmış unlardaki protein içeriği istatistik olarak önemli bulunmamıştır (*p*=0.098). Kalan yağ miktarı uygulanan solvent ekstraksiyonunun etkenliğiyle ilgilidir. Yağ oranı %5'in altına düşürülmüştür. Bunun daha da azaltılması amacıyla solvent miktarı, ekstraksiyon süresi ve tekrar sayısı artırılabilir.

Kapy biber tohum unlarında fitik asit içerikleri açısından ön işlemlerin istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur (*p*=0.000). Eklund ve Agren (1975) çalışmasında haşhaş tohum ununda 8.08 mg/g seviyesinde fitat-P bulmuştur. Bu çalışmada fitik asit miktarı bu değerden biraz daha yüksek bulunmuştur.

Tanen içeriklerinin tüm ön işlem grupları açısından istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur (*p*=0.054). Kavrma uygulanan grup en düşük tanen içeriğine sahiptir. Sharma

ve ark., (2010) tarafından yapılan çalışmada bazı yağlı tohumlardan elde edilen proteinlerin tanen içerikleri belirlenmiştir. Badem için 0.7 mg/g, brezilya cevizinde 0.3 mg/g, kestane 0.3 mg/g, fındıkta 0.9 mg/g, macadamia fıstığında 0.3 mg/g, çam fıstığında 0.0 mg/g, antepfıstığında 1.3 mg/g, soya fasulyesi W82 çeşidinde ise 0.2 mg/g olarak tespit edilmiştir. Kapyra biber unu tanen içeriği bu tohum proteinlerindeki tanen içeriklerinden daha yüksek bulunmuştur. Fakat protein ekstraksiyonu sırasında undaki tanenin bir kısmının kaybedilmesi mümkündür.



Şekil 4.1. Kapyra biber yağsız unları

CIE renk ölçüm sisteminde $L = 0$ (siyah), $L = 100$ (beyaz), a^* değeri ($+a^* =$ kırmızı, $-a^* =$ yeşil) ve b^* değeri ($+b^* =$ sarı, $-b^* =$ mavi) olarak belirlenmiştir (Pomeranz ve Meloan, 1994). Kavurma ve enzim muamelesi ön işlemleri yağsız keklerin renk özellikleri üzerinde oldukça etkilidir ($p \leq 0.005$). Yağsız unlara ait elde edilen total aletsel renk verileri L (63.85 ± 1.70), a^* (4.11 ± 0.31) ve b^* (28.14 ± 1.09) ile Fıratlıgil Durmuş (2008)'un yaptığı çalışmada elde ettiği veriler (L (71.4 ± 0.4), a^* (10.8 ± 0.3), b^* (22.3 ± 0.4)) karşılaştırıldığında bu çalışmada kullanılan kırmızı biber türünün parlaklığının ve kırmızılığının daha düşük, sarılığının ise daha yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Kapyra biber yağsız unları **Şekil 4.1**'de gösterilmektedir.

Yağsız un ile hazırlanan % 30'luk dispersiyonlarda vizkozite değerleri oda sıcaklığı şartlarında ölçülmüştür. Kıvam açısından bakıldığında, görünür vizkozitenin kavurma ve enzim muamelesi sonucu arttığı görülmektedir. Ingyang ve Nwadinikpa (1992) yaptıkları çalışma sonucu yağsız susam unu ile hazırlanan %1'lik dispersiyonların vizkozitesini 2.5 cP, %10'luk dipersiyonların vizkozitesini ise 7.0 cP olarak bildirmişlerdir. Bu veriler kırmızı

biber tohum unu ile kıyaslandığında oldukça düşük değerlerdir. Bunun sebebi çalışmamızda kullanılan dispersiyonlardaki örnek oranının çok fazla olması (%30) olarak düşünülmüştür.

Mouro ve ark. (2006) çözünürlük, hidrodinamik özellikler, hidrofobiklik ve proteinlerin mikro yapılarının proteinlerin reolojik özellikleri üzerinde önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Soya protein izolatlarının görünür vizkozitelerinin çözünen ve çözünmeyen proteinlerin su ve hidrate partiküller ile arasındaki interaksiyona bağlı olduğu yapılan çalışma ile tespit edilmiştir. Protein konsantrasyonu ile birlikte vizkozite üstel bir artış gösterir. Bunun nedeni; hidrate proteinler arasındaki interaksiyonun artışı, su absorpsiyonu ve oluşan şişmedir. Total su/protein içine alınan su oranı 1'e yaklaştığında, değişik protein konsantrasyonları ile birlikte, görünür vizkozitede artış belirlenmiştir (Anon ve ark.,2001). Kısmi protein denaturasyonu proteinlerin çökmesi ile birlikte hidrodinamik alanlardaki artışa bağlı olarak vizkoziteyi arttırmaktadır (Mouro ve ark., 2006).Bu durum kavurma ve enzim ön işlemi uygulanmış örneklerin kontrole göre daha yüksek viskozite değerlerine sahip olmasıyla bizim çalışmamızda da görülmektedir.

4.2.Yağsız Kappa Biber Unlarının Mineral Madde İçerikleri

Kappa biber unlarının mineral madde içerikleri ICP-MS cihazı ile belirlenmiştir. Kappa biber unlarında bulunan mineral madde içerikleri; Zn (0.02- 0.14mg/L), Fe (0.008- 0.06mg/L), B (0.01- 0.06mg/L), Mn (0.02- 0.03mg/L), Mg (2.38- 2.47mg/L), Ca (1.01- 1.27mg/L), Cu (0.02-0.03mg/L), Al (0.05- 0.142mg/L), Na (2.26- 236.73mg/L), K (21,7- 496.1mg/L) olarak sıralanmaktadır. Kurşun, kobalt, kadmiyum, nikel, baryum ve krom metalleri analiz edilmiş ancak tespit edilememiştir. Kappa biber unlarının mineral madde içerikleri **Çizelge 4.2.**'de gösterilmiştir.

Magnezyum hariç belirlenen minerallerin tamamında ön işlemlerin etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p \leq 0.005$). Kappa biber unları magnezyum, kalsiyum, sodyum ve potasyum bakımından zengin bulunmuştur. Fakir oldukları mineraller ise çinko, demir, mangan, bakır ve alüminyumdur. Haşhaş kek ununda 110.8 mg/g demir ve 260.8 mg/g da fosfor bulunmuştur (Eklund ve Agren, 1975). Bu çalışma dışında kek unlarının mineral içerikleri ile ilgili başka çalışmaya tesadüf edilmemiştir.

Çizelge 4.2. Kapa biber yağsız unlarının mineral madde içerikleri

Mineral madde (mg/L)	Kontrol	Kavrulmuş	Enzim	Total	p değeri
Zn	0.068±0.001 ^{B*}	0.022±0.001 ^C	0.147±0.001 ^A	0.079±0.054	p=0.000
Pb	TEDB	TEDB	TEDB		
Co	TEDB	TEDB	TEDB		
Cd	TEDB	TEDB	TEDB		
Ni	TEDB	TEDB	TEDB		
Ba	TEDB	TEDB	TEDB		
Fe	0.008±0.000 ^C	0.020±0.000 ^B	0.063±0.001 ^A	0.030±0.025	p=0.000
B	0.064±0.000 ^A	0.063±0.003 ^A	0.019±0.000 ^B	0.049±0.022	p=0.000
Mn	0.030±0.000 ^B	0.027±0.000 ^C	0.033±0.000 ^A	0.030±0.002	p=0.000
Cr	TEDB	TEDB	TEDB		
Mg	2.380±0.024 ^A	2.407±0.069 ^A	2.473±0.021 ^A	2.420±0.056	p=0.096
Ca	1.277±0.033 ^A	1.010±0.023 ^B	1.218±0.049 ^A	1.168±0.125	p=0.000
Cu	0.039±0.000 ^A	0.021±0.000 ^C	0.022±0.000 ^B	0.027±0.008	p=0.000
Al	0.055±0.000 ^C	0.064±0.002 ^B	0.142±0.003 ^A	0.087±0.041	p=0.000
Na	2.265±0.108 ^B	2.736±0.544 ^B	236.73±28.539 ^A	88.78±112.404	p=0.000
K	21.74±0.82 ^C	224.4±31.57 ^B	496.1±14.29 ^A	247.4±206.84	p=0.000

*Aynı satırdaki harfler aynı çeşitten elde edilen her bir yağsız un örneğinde tespit edilen değerlerin tohumlara uygulanan ön işlemlere göre karşılaştırılmalarını göstermektedir.

TEDB: Tespit edilebilir düzeyde bulunamadı.

4.3. Kapyra Biber Yağsız Unlarının Fonksiyonellik Testleri

Yağsız unların fonksiyonellik test sonuçları **Çizelge 4.3** 'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.3. Kapyra biber yağsız unların fonksiyonellik özellikleri

Özellik	Kontrol	Kavrulmuş	Enzim	Total	<i>p</i> değeri
Su bağlama kapasitesi(g/g)	2.46±0.07 ^{C*}	2.86±0.03 ^B	3.19±0.00 ^A	2.84±0.33	<i>p</i> =0.001
Yağ bağlama kapasitesi(g/g)	1.38±0.04 ^A	1.33±0.07 ^A	1.22±0.17 ^A	1.31±0.11	<i>p</i> =0.458
Emülsiyon aktivitesi (%)	45.92±0.75 ^B	45.80±0.49 ^B	65.77±0.54 ^A	52.49±10.29	<i>p</i> =0.000
Emülsiyon stabilitesi (%)	45.92±0.75 ^B	45.80±0.49 ^B	65.77±0.54 ^A	52.49±10.29	<i>p</i> =0.000
Köpüklenme kapasitesi (%)	116,67±23.56 ^A	96.50±2.12 ^A	90.50±2.12 ^A	101.22±16.22	<i>p</i> =0.281
Köpük stabilitesi (%)	74.00±11.31 ^A	50.50±0.70 ^A	57.50±3.53 ^A	6067±12.02	<i>p</i> =0.086

*Aynı satırdaki harfler aynı çeşitten elde edilen her bir yağsız un örneğinde tespit edilen değerlerin tohumlara uygulanan ön işlemlere göre karşılaştırılmalarını göstermektedir.

Çizelge 4.3.'den de görüldüğü gibi tohumlara uygulanan farklı ön işlemler yağsız unların bazı fonksiyonel özellikleri üzerinde önemli etkiler yapmıştır. Proteinlerin su ve yağ bağlama kapasiteleri polar ve non-polar amino asit kompozisyonu ile ilişkilidir (Martinez-Flores ve ark., 2002).Proteinler tarafından bağlanan su miktarı amino asit profili, konformasyonel yapı, hidrofobiklik, pH, sıcaklık, iyonik güç ve protein konsantrasyonu ile yakından ilgili olup, yüklü kalıntı kısımları arttıkça artış gösterir(Moure ve ark., 2006).

Kapyra biber keklerinin su bağlama kapasiteleri üzerinde muamele etkisi (*p*= 0.001) istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Su bağlama kapasiteleri 2.46-3.19 g/g arasında değişmektedir. En yüksek değer enzim örneğinde tespit edilmiştir. Yani enzim muamelesi işlemi su bağlama kapasitesinin yükselmesine neden olmuştur.

Fıratlıgil Durmuş(2008)'un kırmızı biber tohumunu için 2.68 g/g su tutma kapasitesi değeri elde etmiştir. Bu çalışmada elde edilen 2.46 g/g su tutma kapasitesi değeri ile

benzerlik göstermektedir. Ayrıca lima fasulyesi unu (2.65 g/g) (Guerro ve ark., 2002), çin kolza unu (2.48 g/g) (Xu ve Diosady, 1994), kanola unu (2.61 g/g) (Xu ve Diosady, 1994), güvercin bezelyesi unu (2.13g/g) (Mwasaru ve ark., 1999), mucuna fasulyesi unu (1,40-2,20 g/g) (Adebawale ve ark., 2005) için elde edilen değerler ile de yakınlık göstermektedir. Srinivas ve Narasinga Rao (1986) tarafında haşhaş unlarında tespit edilen 1.24 g/g su bağlama kapasitesinden ise oldukça yüksektir. Su bağlama kapasitesi soslar, çorbalar, hamur ve fırıncılık ürünleri gibi gıdalarda proteinlerin önemli bir fonksiyonel özelliğidir. Kappa biber yağsız unu, su bağlama özelliği bakımından gıda sistemi içinde kullanılabilecek bir kaynak olarak görülebilir.

Kappa biber unlarının yağ bağlama kapasiteleri üzerinde muamele etkisi ($p= 0.458$) istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Kontrol örneğinde en yüksek değer elde edilmiş ve kavurma ve enzim muameleleri yağ bağlama kapasitesini düşürmüştür. Fıratlıgil Durmuş (2008) tarafından belirlenen kırmızı biber tohum unu yağ tutma kapasitesi (2.81 g/g) bizim çalışmamızdaki sonuca göre yüksektir. Ayrıca haşhaş unu (2.5 g/g) (Srinivas ve Narasinga Rao., 1986a), mucuna fasulyesi yağsız unu (2.1-2.6 g/g) (Adebawale ve ark., 2005), jack fasulyesi unu (3.15 g/g) (Guerro ve ark., 2002) için elde edilen değerlerden düşük sonuç elde edilmiştir.

Yağlı tohumlarda yağ giderme işlemi protein çözünürlüğünü ve kaba unun su ile yağ absorblama kapasitelerini arttırmaktadır. Su absorpsiyon kapasitesi çimlenme, fermentasyon, ön ıslatma veya termal uygulamalar (kavurma, otoklavlama) ile gelişmektedir (Moure ve ark., 2006). Çalışmamızda kavurma işlemi su bağlama kapasitesinde artışa neden olurken, yağ bağlama kapasitesinde az bir düşüşe neden olmuştur. Ham keten tohumu unlarında (Madhusudhan ve Singh, 1985) su bağlama kapasitesi 3.45 g/g iken ısı uygulamasıyla 4.43 g/g tespit edilmiştir. Yağ bağlama kapasitesi ise 2.36 g/g iken 1.37 g/g olarak tespit edilmiştir. Isı uygulanan fasulye unlarında su bağlama kapasitesi % 38 oranında arttığı bildirilmiştir (Narayana ve Narasinga Rao, 1982). Isıl işlem gören nohut unlarının su bağlama kapasiteleri 2.4 g/g dan 3,6 g/g'a yükseldiği rapor edilmiştir (Abbey ve Ibeh, 2006).

Örneklerin emülsiyon aktiviteleri %45.92 ile %65.77 arasında değişmektedir. Emülsiyon aktivitesi üzerinde muamelelerin etkisi ($p= 0.000$) istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. En iyi emülsiyon özellikleri enzim uygulanmış muamele grubunda gözlenmiştir. Elde edilen veriler kırmızı biber tohum unu üzerinde yapılan çalışma ile uyumludur (Fıratlıgil Durmuş, 2008). Örneklerin 80 °C sıcaklıkta 30 dk ısıtılması sonrası

belirlenen emülsiyon stabilite değerleri emülsiyon aktivitesi değerleri ile aynı olarak kaydedilmiştir. Yani bütün muamelelerde kapy biber tohum unu emülsiyon stabilitesi açısından dayanıklıdır. Bu sonuç Fıratlıgil Durmuş (2008)'un kırmızı biber tohum unu emülsiyon stabilite sonuçları ile paralellik göstermektedir. Fıratlıgil Durmuş(2008)'un yaptığı çalışma sonucu kırmızı biber tohum unu için elde edilen emülsiyon özellikleri bu ürünün sosis, mayonez ve salata sosu gibi ürünlerde emülgatör olarak kullanılabilceğini belirtmiştir. Keten tohumu üzerine yapılan bir çalışmada ise ısı işlem uygulamasının emülsiyon aktivisinde düşüşe neden olduğu rapor edilmiştir (Madhusudhan ve Singh, 1985). Narayana ve Narasinga Rao (1982) tarafından yapılan fasulye unlarında yapılan çalışmada, ısı uygulaması ile emülsiyon kapasitelerinin %18 oranında azaldığı bildirilmiştir.

Çalışmada örneklerin köpüklenme kapasiteleri (pH 7.0) ile oda sıcaklığı şartlarında 30 dk sonrası köpük stabilite de tespit edilmiştir. Kontrol grubunda kavurma ve enzim gruplarına nazaran daha yüksek köpüklenme kapasite değerleri elde edilmiştir. Köpüklenme kapasite ve stabilite özelliği üzerinde muamelenin etkisinin (kapasite için $p=0.281$, stabilite için $p=0.086$) istatistiksel olarak önemli olmadığı sonucuna varılmıştır. Yalnız muamele sonucu köpüklenme kapasite ve stabilite değerlerinin azaldığı gözlenmiştir. Fıratlıgil Durmuş(2008)'un kırmızı biber tohum ununda pH 6.0 için % 191.3 ve pH 8.0 için % 195.3 köpük kapasitesi değerleri elde etmişlerdir. Bu değerler bu çalışmadaki sonuçlardan daha yüksektir. Bu sonucun çeşit etkisinden ve yağsız unların düşük protein içeriklerinden kaynaklandığı düşünülebilir. Srinivas ve Narasinga Rao (1986) yapmış oldukları çalışmada yağsız haşhaş ununun köpüklenme kapasitesini pH 6.5 için % 104 ve pH 8.0 için %106 olarak belirlemişlerdir. Protein içeriğinin yanı sıra, proteinlerin çeşidi de köpüklenme özelliklerini belirleyen önemli bir faktördür (Sharma ve ark., 2010).

Çalışmada 30 dk sonraki stabilite değerleri % 50 ile %74 değerleri arasındadır. Kırmızı biber tohum unu için yapılan çalışma sonuçları ile paralellik göstermektedir (Fıratlıgil Durmuş,2008). Haşhaş yağsız unlarında yapılan çalışmada belirlenen 30 dk sonraki stabilite değeri (pH 8.0) % 40'tır (Srinivas ve Narasinga Rao, 1986a). Adebowale ve ark. (2005) tarafından mucuna fasulyesinde yapılan çalışmada yağsız unların köpüklenme kapasitesi %50.0-84.3 arasında, 30 dk sonraki köpük stabilitesi ise %74.0-94.0 arasındadır.

Kapy biber yağsız unlarının jelleşme özellikleri pH 7.0'de incelenerek katı jel oluşumunun gözlemlendiği en düşük konsantrasyonlar **Çizelge 4.4.**'de belirlenmiştir.

Çizelge 4.4.Kapya biber yağsız unlarının jelleşme özellikleri

Muamele	Konsantrasyon										
	10%	12%	14%	16%	18%	20%	24 %	28%	32	34	38
									%	%	%
Kontrol	sıvı	viskoz	viskoz	pıhtı	sıvı jel	sıvı jel	katı jel	katı jel	katı jel	-	-
Kavrulmuş	sıvı	viskoz	viskoz	pıhtı	pıhtı	sıvı jel	sıvı jel	sıvı jel	katı jel	-	-
Enzim	sıvı	sıvı	sıvı	sıvı	viskoz	viskoz	viskoz	pıhtı	pıhtı	pıhtı	pıhtı

Ön denemelerde %10'un altındaki örnek konsantrasyonlarında sadece pıhtı+sıvı oluşumu gözlemlendiğinden örnekler %10 ve üzerindeki konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. En düşük jelleşme konsantrasyonları %24-32 arasında değişmektedir. Kavurma işlemi jelleşme özelliği üzerinde olumsuz etki gösterdiği görülmüştür. Kavurma gruplarında en düşük jelleşme konsantrasyonu %32 olarak bulunmuştur. Enzim muamelesi kapya biber yağsız unlarının jelleşme özellikleri üzerinde olumsuz etki göstermiştir. % 38 konsantrasyona kadar gidildiğinde dahi pıhtı oluşumu gözlenmiş, katı bir yapı oluşumu gözlenmemiştir. Fıratlıgil Durmuş(2008)'un yaptığı çalışma sonucu kırmızı biber tohum unlarının en düşük jelleşme konsantrasyonları % 18 olarak bulunmuş olup, bu çalışma sonuçları ile paralellik göstermektedir. Jelleşme özellikleri, su bağlama kapasitesi ile paralellik göstermektedir ve düşük su absorblama kapasitesine sahip unların yetersiz jeller oluşturduğu bilinmektedir (Adebawale ve ark., 2005).

Yağsız kabak çekirdeği ununda yapılan bir başka çalışmada en düşük jelleşme konsantrasyonu % 8 olarak tespit edilmiştir (Lazos, 1992). Nohut unları üzerine yapılan çalışmalar ham unların en düşük jelleşme konsantrasyonlarının %16 iken, ısıtma işlemi uygulaması sonucunda %18'e yükseldiğini göstermiştir (Abbey ve Ibeh, 2006). Ingyang ve Nwadike (1992) tarafından yapılan çalışmada ise yağsız susam ununun en düşük jelleşme konsantrasyonu %6 olarak belirlenmiştir. Ancak bu konsantrasyonda zayıf jel olduğu güçlü bir jel yapısının ancak %10 un konsantrasyonu ile sağlandığı bildirilmiştir.

4.4. Kappa Biber Yağsız Unlarından Protein İzolatlarının Hazırlanması

4.4.1. Optimum Tuz Konsantrasyonu ve pH Değerinin Belirlenmesi

Farklı ön işlem uygulanmış yağsız un örneklerinden yüksek verimle kappa biber protein izolatlarının elde edilmesi amacıyla öncelikle optimum şartlar belirlenmiştir. Proteinlerin çözünme ve izoelektrik nokta farklılıklarına göre en iyi ekstraksiyon koşullarını belirlemek amaçlanmıştır. Bunun için Achouri ve ark. (2012) tarafından susam tohumunda uygulanan teknik bazı modifikasyonlar ile birlikte uygulanmıştır. En yüksek protein içeriğinin belirlendiği optimum tuz konsantrasyonu ve pH değeri sonuçları aşağıda **Çizelge 4.5.**'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Kappa biber proteini izolasyonunda optimum tuz konsantrasyonları ve pH değerleri

Örnek	pH Değerleri	Protein miktarı (mg/ml)			
		0 M	0.2 M	0.6 M	1.0 M
Kontrol	7	5.428±0.008	10.190±0.000	16.920±0.222	15.443±0.050
	8	7.095±0.005	12.095±0.156	19.310±0.352	18.440±0.204
	9	17.079±0.109	16.187±0.207	21.619±0.429	19.076±0.214
	10	15.190±0.000	10.031±0.076	19.079±0.441	16.630±0.170
	11	16.380±0.118	14.230±0.123	18.760±0.417	17.175±0.117
	12	11.380±0.091	13.841±0.141	18.820±0.444	15.820±0.032
Kavrulmuş	7	11.388±0.145	16.900±0.138	15.680±0.336	13.680±0.009
	8	12.336±0.109	18.085±0.476	16.390±0.395	16.320±0.154
	9	14.630±0.343	21.380±0.436	18.845±0.487	18.050±0.503
	10	14.230±0.379	20.039±0.320	18.360±0.484	17.090±0.436
	11	13.046±0.265	18.845±0.345	16.230±0.228	15.190±0.387
	12	13.360±0.226	18.923±0.305	16.310±0.103	12.790±0.202
Enzim	7	10.350±0.046	12.570±0.035	18.520±0.324	13.680±0.173
	8	15.590±0.117	17.940±0.309	19.741±0.315	14.660±0.203
	9	18.440±0.352	19.174±0.036	20.350±0.346	18.368±0.122
	10	15.190±0.108	16.060±0.033	16.646±0.301	14.233±0.260
	11	12.170±0.016	13.922±0.221	17.790±0.219	12.170±0.119
	12	11.022±0.017	13.525±0.162	17.240±0.222	11.282±0.035

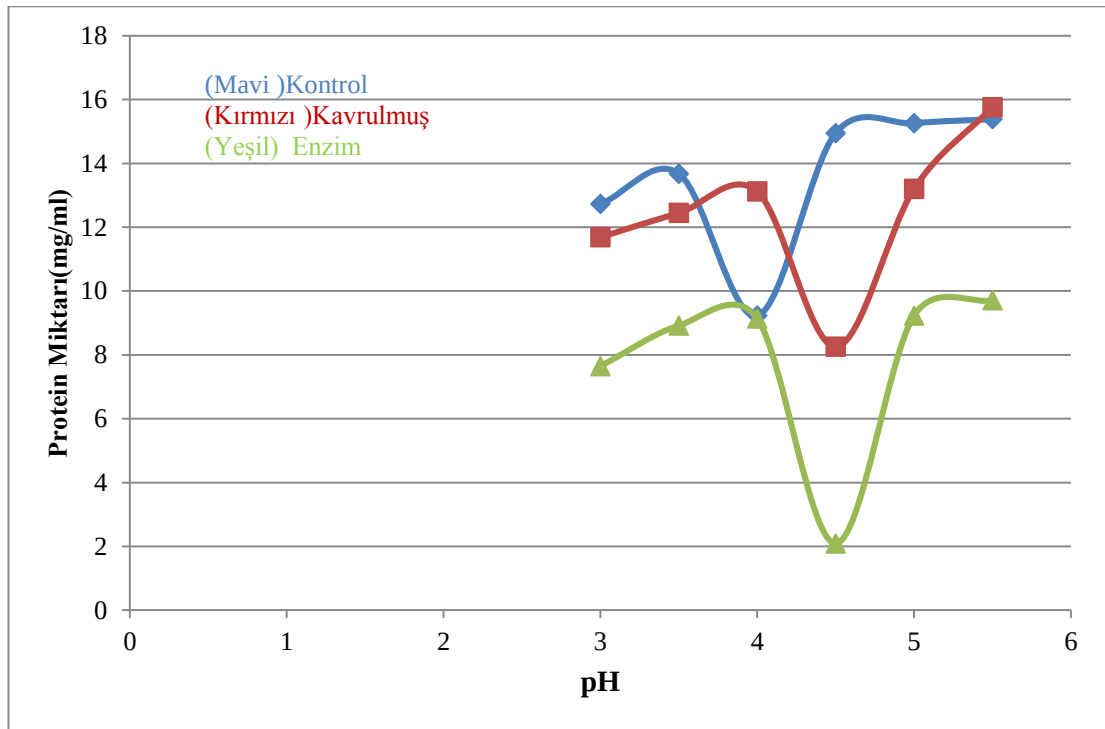
Fıratlıgil Durmuş(2008) tarafından yapılan çalışmada kırmızı biber tohum unundan en yüksek protein veriminin elde edildiği koşullarda protein ekstraksiyonu için belirlenen optimum koşullar distile su ile pH 8.8 olarak tespit edilmiştir. Eklund ve Agren (1975) haşhaş proteinleri için en uygun ekstraksiyon koşulları olarak 1 M NaCl çözeltisi ve pH 9.0 değerini belirlemişlerdir. Achouri ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada susam proteini izolasyonu için optimum şartlar pH 7.5 ve 1 M NaCl konsantrasyonu olarak tespit edilmiştir. Liadakis ve ark. (1995) domates tohumundan protein ekstraksiyonu üzerine çalışmış ve optimum ekstraksiyonun, bir kısım domates tohumunun 30 kısım su (kütle/hacim) ve pH 11.5 ile başarılabileceğini tespit etmiştir. Mizubuti ve ark.(2000) tarafından belirlenen güvercin bezelyesinden protein ekstraksiyonu için optimum koşullar NaCl kullanılmadan pH 8.5 olarak saptanmıştır. Oomah ve ark. (1994) 0.8 M NaCl ve pH 8.0 koşullarının kolza tohumu unundan protein ekstrakte etmek için optimum koşullar olduğunu tespit etmiştir. Bu çalışmada kapyra biber tohumu unu materyal olarak kullanılarak, üç farklı muamele uygulanması nedeniyle distile su haricinde 0.2 M, 0.6 M ve 1 M tuz konsantrasyonlarının denenmesi uygun görülmüştür. Ayrıca bazik pH değerlerinde yağlı tohum proteinlerinin çözünme özelliklerinin iyi olduğu literatür bilgisine dayanılarak pH 7-12 aralığı seçilmiştir. Bradford (1976) metodu ile çözünen protein miktarları tespit edilerek en yüksek protein değerinin elde edildiği tuz konsantrasyonu ve pH değeri o örnek için optimum ekstraksiyon koşulu olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak **Çizelge 4.5.**'de görüldüğü gibi kontrol ve enzimgrupları için optimum şartlar 0.6 M NaCl konsantrasyonu ve pH 9.0 iken, kavrulmuş grupların şartları 0.2 M tuz konsantrasyonu ve pH 9.0 olarak belirlenmiştir.

4.4.2. İzoelektrik Noktanın Belirlenmesi

Örneklere ait izoelektrik noktaların belirlenmesi amacıyla Manamperi ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmadan yararlanılmıştır. Achouri ve ark. (2012) metoduna göre; her bir örnek için belirlenen optimum konsantrasyondaki NaCl çözeltileri ile %10'luk örnek dispersiyonları hazırlanarak ekstraksiyon için belirlenen optimum pH değerine ayarlanmıştır. İzoelektrik nokta tespit etmek için 0.5 birim değişim ile pH 3.5 - 6.0 değerleri arasında çalışılmıştır. Örneklerin supernatant kısımlarının protein içeriği Bradford(1976) metodu ile belirlenmiştir. Bunun sonucunda **Çizelge 4.6.** ve **Şekil 4.2.**'de görüldüğü gibi en düşük protein içeriğinin tespit edildiği pH değeri kapyra biberlerine ait proteinlerin izoelektrik noktası olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6. Kapyabiberproteinlerinin izoelektrik noktalarının belirlenmesi

Örnek	Protein miktarı (mg/ml)					
	pH 3.0	pH 3.5	pH 4.0	pH 4.5	pH 5.0	pH 5.5
Kontrol	12.73±0.03	13.68±0.02	9.23±0.07	14.95±0.02	15.26±0.09	15.39±0.06
Kavrulmuş	11.69±0.11	12.45±0.13	13.12±0.08	8.26±0.00	13.20±0.06	15.76±0.04
Enzim	7.65±0.01	8.92±0.00	9.14±0.07	2.09±0.05	9.23±0.08	9.71±0.04



Şekil 4.2. Protein izolatlarının çözünürlük grafiği

İzoelektrik noktalara ait pH değerleri 4.0-4.5 arasında değişim göstermiştir. Kontrol grubu için pH 4.0, enzim ve kavrulmuş gruplar için pH 4.5 değerleri izoelektrik nokta olarak belirlenmiştir. Fıratlıgil Durmuş (2008) kırmızı biber tohum proteininin izolasyon işlemini pH 3.0 olarak belirlediği izoelektrik noktada gerçekleştirmiştir. Eklund ve Agren (1975) haşhaş proteinlerinin izolasyonunda izoelektrik noktayı pH 5.0 değeri olarak kullanmışlardır. Domates tohum proteini için izoelektrik pH 3.9 (Liadakis ve ark., 1995), kavun tohumu, yer fıstığı, antep fıstığı ve keten tohumu proteini için izoelektrik pH 4.5 (Ayrancı ve Dalgıç 1992; Kim ve ark., 1992; Khalil, 1998; Krause ve ark., 2002) olarak belirlenmiştir.

4.4.3. Protein Konsantratlarının Hazırlanması ve Protein Verimi

Kapya biber proteinlerinin izolasyonunda elde edilen verimler **Çizelge 4.7.**'de gösterilmiş olup, % 15-40 arasında değişmektedir. Verimler üzerinde muamelenin etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($p= 0.000$). En yüksek verim kontrol örneklerinde elde edilmiştir. En düşük verim ise enzim ile muamele edilen örneklerde tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. Kapya biber protein izolatlarının üretim verimleri

Protein verimi (%)				
Kontrol	Kavrulmuş	Enzim	Total	<i>p</i> değeri
40.50±0.44 ^A	32.73±0.44 ^{B*}	15.00±0.29 ^C	29.41±11.696	$p= 0.000$

*Aynı satırdaki büyük harfler aynı çeşitten elde edilen her bir protein izolatı verim değerlerinin tohumlara uygulanan ön işlemlere göre karşılaştırılmalarını göstermektedir.

Achouri ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada susam proteinlerini belirlenen optimum koşullarda (1 M tuz konsantrasyonu, pH 7.5) % 54.6 verim ile elde etmişlerdir. Susam proteinleri üzerine yapılan başka bir çalışmada ise alkali ortamda ekstraksiyon ve izoelektrik çöktürme metodu uygulanarak elde edilen susam proteini izolatında tespit edilen verim% 47 olarak rapor edilmiştir (Bandyopadhyay ve Ghosh, 2002). Fıratlıgil Durmuş (2008) kırmızı biber tohumunun içinde bulunduğu proteinin %35.42 ile %52.41'lik kısmını ekstrakte edebilmiştir. Liadakis ve ark. (1995) ise domates tohumu unundaki proteinlerin % 43.9-57.3'lük kısmını ekstrakte etmiştir. Bu çalışmadaki kontrol örneklerinin verim değerleri de bu değerlere yakınlık göstermektedir. Kavurma ve enzim muamelesinin protein verimini oldukça olumsuz etkilediği sonucuna varılmıştır.

4.5. Protein İzolatlarında Yapılan Analizler

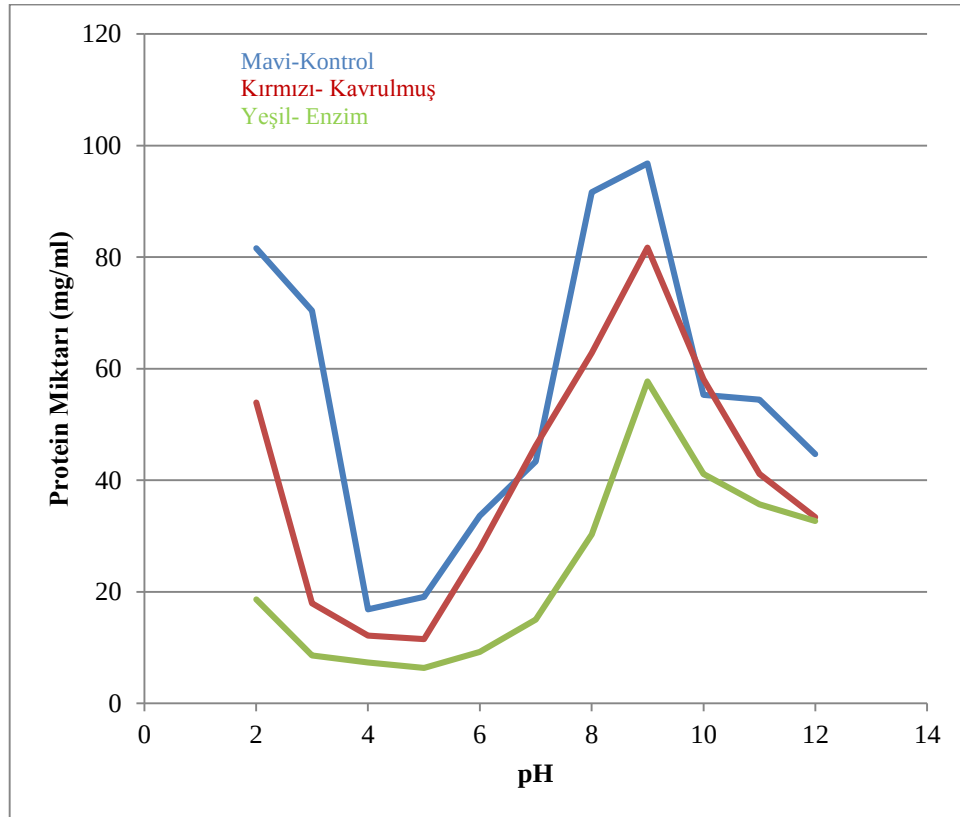
İzole edilen kapya biber proteinlerinde aşağıda incelenen bazı önemli yapısal ve fonksiyonellik analizleri yapılmıştır.

4.5.1. Protein çözünürlüğü

Proteinlerin çözünürlük özellikleri birer birimlik artışla pH 2.0 ile pH 12.0 arasında analiz edilmiş ve sonuçlar **Çizelge 4.8**ve **Şekil 4.3.**'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Kalya biber protein izolatları çözünlük özellikleri

Örnek Adı	Protein Miktarı (mg/ml)										
	pH 2.0	pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0	pH 10.0	pH 11.0	pH 12.0
Kontrol	81.61 ±0.21	70.42 ±1.01	16.85 ±0.22	19.08 ±0.44	33.64 ±0.61	43.36 ±3.14	91.61 ±0.21	96.77 ±0.11	55.31 ±0.27	54.47 ±0.22	44.71 ±1.23
Kavrulmuş	53.91 ±0.78	17.96 ±0.22	12.17 ±0.56	11.54 ±0.33	27.78 ±2.16	46.17 ±0.84	62.81 ±0.55	81.69 ±0.33	58.09 ±1.18	41.14 ±0.90	33.38 ±0.03
Enzim	18.64 ±2.19	8.60± 0.45	7.33± 0.45	6.34± 0.47	9.22± 0.65	15.03 ±05.6	30.31 ±1.40	57.69 ±1.40	41.14 ±0.90	35.70 ±2.29	32.72 ±0.44



Şekil 4.3. Kalya biberprotein izolatlarının çözünlük grafikleri

Kapya biber protein izolatlarının çözünürlük özellikleri Yin ve ark (2011)'e göre belirlenmiştir. pH 2-12 aralığında muamele grupları test edilmiştir. Supernatant kısmında bulunan protein içeriği Bradford (1976) metodu ile tespit edilmiştir. Supernatantda en yüksek protein miktarının (mg/ml) tespit edildiği değer çözünürlüğün en iyi olduğu pH değeri olarak belirlenmiştir. **Çizelge 4.8.**'de görüldüğü gibi kontrol, kavurma ve enzim gruplarında çözünürlüğün en fazla olduğu pH değeri 9.0 olarak görülmektedir. Protein izolatlarının hazırlanması öncesinde yapılan optimizasyon çalışmalarımız da kanya biber proteinlerinin en iyi pH 11.0 ve 12.0 da çözündüğünü göstermiştir.

Kanya biber protein izolatlarının çözünürlüğü, uygulanan tüm muamelelerde beklenildiği şekilde proteinin izoelektrik noktasında en düşüktür ve izoelektrik noktadan itibaren asidik ve bazik pH değerlerine doğru gidildikçe artmaktadır. **Şekil 4.3.** bunu açık bir şekilde göstermektedir.

Fıratlıgil Durmuş (2008) kırmızı biber tohum proteini için en düşük çözünürlük değerini pH 4.0'de elde etmiştir. Aynı zamanda bu değeri kırmızı biber tohum proteininin izoelektrik noktası olarak kaydetmiştir. En yüksek çözünürlük değerini ise pH 10.0'da %99.9 olarak elde etmiştir. Kırmızı biber tohum proteininin çözünürlüğünün asidik pH koşullarında izoelektrik noktaya kadar azaldığını ve sonra bazik pH değerlerinde arttığını tespit etmiştir. Benzer çözünürlük profili susam proteini (Inyang ve Nwadinakpa, 1992), mısır proteini (Myers ve ark., 1994), börölce ve güvercin bezelyesi proteini (Mwasaru ve ark., 2000), keten tohumu proteini (Krause ve ark., 2002), pirinç kepeği proteini (Gupta ve ark., 2008), arpa protein konsantresi (Bilgi ve Çelik, 2004), acı bakla tohumu protein izolatı (El-Adawy ve ark., 2001) için de belirlenmiştir.

Eklund ve Agren (1975) tarafından yapılan çalışmada; haşhaş pres keklerinde çözücü olarak su kullanılması durumunda azot çözünürlüğünün pH 9.0 da % 77 ve pH 10.0 da % 81 olduğunu tespit etmişlerdir. pH 3-6 aralığında tohum toplam azotunun sadece % 20'sinin çözünebilir halde olduğunu ve en düşük çözünürlüğün bu aralıkta gözlemlendiğini belirlemişlerdir.

Martinez-Flores ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada; keten tohumu proteinlerinin çözünürlüğünün pH 6.0 üzerinde artarak maksimum çözünürlüğün pH 10.0 da görüldüğünü rapor etmişlerdir. En düşük çözünürlüğün ise keten tohumlarının izoelektrik noktası olan pH 5.0 yakınlarında olduğunu tespit etmişlerdir.

Yin ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada; sabun ağacı tohumu proteinlerinin globulin fraksiyonlarının çözünürlüğü pH 5.0-6.0 arasında minimum olarak tespit edilmiştir. pH 5.0 altında ve pH 6.0 üzerinde de çözünürlüğün arttığı rapor edilmiştir. Genel olarak; yüksek pH değerlerinde protein üzerindeki net negatif yük artışı protein agregatlarında dağılmaya neden olmaktadır ve bu nedenle çözünürlük artmaktadır. Düşük pH değerlerinde ise; bunun tersi olarak artan net pozitif yük çözünürlüğe katkıda bulunmaktadır.

4.5.2. Protein İzolatlarının Fiziksel Analizleri

Dondurarak kurutma (Freeze-dry) ile kurutulma sonucu elde edilen kapy biber protein izolatları **Şekil 4.4.**'de görülmektedir. Kapy biber protein izolatlarının fiziksel özellikleri **Çizelge 4.9'** da gösterilmektedir.



Şekil 4.4. Kapy biber protein izolatları

Çizelge 4.9. Kapy biber protein izolatlarının fiziksel özellikleri

Özellik	Kontrol	Kavrulmuş	Enzim	Total	p değeri
Vizkozite (cP) 40 °C	18.55±0.07 ^{A*}	17.95±0.35 ^A	13.45±0.07 ^B	16.65±2.49	p=0.000
Vizkozite (cP) 60 °C	20.65±0.35 ^{AB}	21.55±0.49 ^A	18.30±0.84 ^B	20.17±1.57	p=0.026
L	60.89±0.01 ^C	62.01±0.01 ^B	65.73±0.05 ^A	62.88±2.26	p=0.000
a*	3.42±0.00 ^B	4.17±0.00 ^A	2.47±0.00 ^C	3.35±0.76	p=0.000
b*	24.84±0.00 ^B	25.76±0.01 ^A	21.25±0.02 ^C	23.95±2.13	p=0.000

*Aynı satırdaki büyük harfler aynı çeşitten elde edilen her bir protein örneğinde tespit edilen değerlerin tohumlara uygulanan ön işlemlere göre karşılaştırılmalarını göstermektedir.

Kapya biber protein izolatlarında renk belirlemesi Minolta CR-300 Reflektans kolorimetresi (Osaka, Japonya) ile yapılmıştır. Renk ölçümünde CIE'in sistemi kullanılarak belirlenen L , a^* ve b^* değerleri yukarıdaki **Çizelge 4.9.**' da gösterilmiştir.

Veriler incelendiğinde; protein izolatlarının her üç renk bileşeni (L , a^* , b^*) üzerinde muamele etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu görülmektedir ($p=0.000$). L değeri 60.89-65.73, a^* değeri 2.47-4.17, b^* değeri ise 21.25-25.76 arasında tespit edilmiştir. En yüksek parlaklık değeri (L) 65.73 olarak tespit edilmiş olup enzim muameleli örnekten izole edilen proteinden elde edilmiştir. En yüksek a^* (kırmızılık) değeri 4.17 olup kavrulmuş örnekte tespit edilmiştir. Sarılığı ifade eden en yüksek b^* değeri (25.76) yine kavrulmuş örnekte yer almıştır. L değeri enzim ön işlemi uygulanan örneklerden elde edilen protein izolatlarında kontrol örneklerine göre yüksek iken, a^* ve b^* değerleri düşüktür.

Görünür vizkoziteyi belirlenmek için kanya biber proteini ve distile su ile % 20'lik örnek dispersiyonları hazırlanmış, pH 7.0 da 60 °C ve 40 °C sıcaklıklarda Brookfield viskozimetre-model DV II+Pro (with Rheocalc software) ile ölçümler yapılmıştır.

Kanya biber protein izolatlarının görünür vizkozite değerleri üzerinde 40 °C için muamele etkisinin istatistik olarak önemli olduğu, 60 °C için ise istatistik olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir (40 °C için $p=0.000$; 60 °C için $p=0.026$).Beklenildiği gibi sıcaklık artışı ile birlikte vizkozite değerlerinde artış meydana gelmiştir.

40°C sıcaklıkta en yüksek vizkozite değeri 18.55cP ile kontrol örneğinde tespit edilirken, 60 °C sıcaklıkta en yüksek vizkozite değeri 21.55 cP kavrulmuş örnekte tespit edilmiştir. Her iki sıcaklıkta da enzim ön uygulaması protein çözeltilerinde kontrol gruplarına oranla vizkozitede düşüşe neden olmuştur. Globuler proteinlerin vizkozitelerinin pH ve sıcaklıktaki düşüş ile beraber azaldığı ve her ikisinde meydana gelen artış ile de arttığı rapor edilmiştir (Kanu ve ark., 2007).

Kanu ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışma susam protein izolatları ile hazırlanan çözeltilerin vizkozitelerinin sıcaklık artışı ile birlikte arttığını ve pH 7.0 da 40 °C sıcaklıktaki vizkozite değerinin 50 cP altında olduğunu tespit etmiştir.40°C sıcaklıktaki be değerler bu çalışma değerleri ile uyushmaktadır. Ancak pH 7.0 da 60 °C sıcaklıktaki vizkozite değerleri 100-150 cP arasında tespit edilmiştir.60 °C sıcaklıktaki kanya biber protein izolatlarının vizkoziteleri bu değerin oldukça altındadır. Tohum farklılığı ve tohum proteinlerinin sıcaklığa karşı olan reaksiyon farklılığının bu sonuçta etkisi olması muhtemeldir.Khalid ve ark. (2003) tarafından susam protein izolatları üzerine yapılan başka bir çalışmada ise, %

20'lik susam protein izolatlarının 25 °C sıcaklıkta ve pH 7.0 koşullarında vizkozitesi 53.10 cP, 70 °C sıcaklıkta ve pH 7.0 koşullarında ise 178.90 cP olarak rapor edilmiştir.

4.5.3. Protein İzolatlarının Fonksiyonellik Özellikleri

Elde edilen protein örneklerinde altı farklı protein fonksiyonel özelliği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar **Çizelge 4.10**'da görülmektedir.

Çizelge 4.10. Kapsa biber protein izolatlarının fonksiyonellik özellikleri

Özellik	Kontrol	Kavrulmuş	Enzim	Total	p değeri
Su bağlama kapasitesi (g/g)	1.76±0.02 ^{A*}	1.91±0.03 ^A	2.10±0.14 ^A	1.925±0.16	p= 0.064
Yağ bağlama kapasitesi (g/g)	2.16±0.02 ^A	2.18±0.02 ^A	2.54±0.18 ^A	2.29±0.20	p= 0.065
Emülsiyon aktivitesi (%)	18.75±8.83 ^A	31.25±8.83 ^A	18.75±8.83 ^A	22.92±9.41	p= 0.385
Emülsiyon stabilitesi (%)	9.37±4.41 ^A	25.00±17.67 ^A	9.37±4.41 ^A	14.58±11.63	p= 0.374
Köpüklenme kapasitesi (%)	116.22±5.90 ^A	96.90±1.69 ^B	91.65±1.13 ^B	101.59±11.90	p= 0.013
Köpük stabilitesi (%)	55.70±0.98 ^B	57.55±0.63 ^{AB}	61.25±1.76 ^A	58.17±2.70	p= 0.044

*Aynı satırdaki büyük harfler aynı çeşitten elde edilen her bir protein örneğinde tespit edilen değerlerin tohumlara uygulanan ön işlemlere göre karşılaştırılmalarını göstermektedir.

İncelemede enzim grubundan izole edilen proteinleri yüksek su bağlama (2.10 g/g) ve yağ bağlama (2.54 g/g) kapasitesine sahip olduğu sonucuna varılmaktadır. Proteinlerin su ve

yağ absorbe etme yetenekleri polar ve non-polar amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Protein izolatlarının su ve yağ bağlama özellikleri üzerinde muamele etkisinin (sırasıyla $p=0.064$ ve $p=0.065$) istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür. Kavrulmuş örneklerin su bağlama oranları kontrol gruplarına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bunun en önemli nedeni, meydana gelen protein denatürasyonu sonucu proteinlerin globuler yapısında oluşan değişim olarak düşünülmektedir.

Kapya biber proteininin su bağlama kapasitesi (1.92 g/g), kapya biber yağsız ununun su bağlama kapasitesinden (2.84 g/g) daha düşük olduğu anlaşılmaktadır. Baranzini ve ark. (1995) da nohut proteininin su tutma kapasitesinin nohut ununa nazaran daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Benzer sonuç acı bakla unu ve proteini için de tespit edilmiştir (Lqari ve ark. 2002).

Farklı tohumlardan elde edilen izolatların su ve yağ bağlama kapasitelerine dair birçok çalışma yapılmıştır. Bazı yağlı tohum proteinlerine ait su ve yağ bağlama kapasiteleri sırasıyla; buğday tohum proteinleri için 1.66 g/g ve 1.73 g/g (Ahmedna ve ark., 1999), keten tohumu proteinleri için 2.7 g/g ve 1.18 g/g (Martinez-Flores ve ark., 2002), kanola proteinlerinde 2.5 g/g ve 1.2 g/g (Manamperi ve ark., 2007), susam protein izolatı için 3.02 g/g ve 1.29 g/g (Kanu ve ark., 2007), kırmızı biber tohum proteini için 1.89 g/g ve 3.20 g/g (Fıratlıgil Durmuş, 2008), domates tohum proteini için 2.76 g/g ve 3.17 g/g (Liadakis ve ark., 1998) olarak bildirilmiştir. Kapya biber proteinlerinin su bağlama değerleri 1.76-2.10 g/g arasında, yağ bağlama kapasiteleri ise 2.16-2.54 g/g olarak belirlenmiş olup literatür ile uyumludur.

Khattab ve Arntfield (2009) yapmış oldukları çalışmada kanola tohumlarına kavurma ve haşlama işlemi uygulanmasının kanola tohum proteinlerinin su ve yağ bağlama kapasitelerinde önemli artışa neden olduğunu tespit etmişlerdir. Kolza tohum proteinlerinin, proteolitik enzim uygulaması sonucunda elde edilen hidrolizatlarının su ve yağ bağlama özelliklerinin kontrole oranla oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (Vioque ve ark., 2000). Isı ve enzim uygulamasının genel olarak su ve yağ bağlama özellikleri üzerindeki olumlu etkisi bizim çalışma sonuçlarımızda da görülmektedir.

Çalışmamızda kapya biber çeşidine ait proteinlerin emülsiyon aktiviteleri ve stabilitelerinin uygulanan ön işlemlerden nasıl etkilendiği de araştırılmıştır. Protein izolatlarının emülsiyon aktivitelerinin (% 18.75-31.25) ve stabilitelerinin (% 9.37-25.00) oldukça düşük olduğu görülmektedir. Emülsiyon aktivitesi üzerinde muamele ($p=0.385$)

etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir. Kavurma işlemi uygulanmasının ardından emülsiyon aktivitelerinde artış gözlenmiştir. Denaturasyon hidrofobik alanı ve esnekliği arttırması sebebiyle proteinlerin emülsiyon özelliklerini geliştirebilmektedir (Kanu ve ark., 2007). Bundan dolayı kavurma uygulanan örneklerin emülsiyon aktivitelerindeki artış beklenen bir durumdur.

Ahmedna ve ark. (1999) tarafından yapılan çalışmada emülsiyon aktivitesi buğday protein izolatu için % 87, soya protein izolatu için % 87.5, sodyum kazeinat için % 79, kurutulmuş yumurta beyazı için % 53, yağsız kuru süt proteini için % 58 olarak bildirilmiştir. Martinez-Flores ve ark. (2002) kolza protein konsantratları için pH 6.0 da emülsiyon aktivitesini % 84.4 olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca farklı çalışmalarda elde edilen emülsiyon aktivitesi değerleri; domates tohum protein izolatu için %35.4 (Liadakis ve ark., 1998), lima fasulyesi protein izolatu için %50-57 (Mwasaru ve ark., 2000), kolza tohum protein izolatu için %56.1 (Xu ve Disady, 1994) olarak tespit edilmiştir.

Susam protein konsantratları üzerine yapılan bir çalışmada; maksimum emülsiyon kapasitesi (% 38.0) 40-65 g/L oranında protein konsantratu kullanılması durumunda ve 9.0 üzeri ile 5.0 altındaki pH değerlerinde belirlenmiştir. En düşük emülsiyon kapasitesi (% 19.2) ise daha düşük protein konsantrasyonlarında ve pH 4.6-6.8 aralığında elde edilmiştir. pH değerinde oluşan artışın susam proteinlerinin emülsiyon aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir. Bu çalışma sonuçlarından anlaşıldığına göre; emülsiyon aktivitesi üzerinde kullanılan proteinin miktarı ve pH değeri etkili olup, izoelektrik noktaya yaklaştıkça çözünürlük azaldığı için emülsiyon aktivitesi düşmektedir (Latifve Anwar 2011). Ayrıca kırmızı biber protein konsantrasyonunun %2'den daha yüksek değerlerde emülsiyon aktivitesi ve kapasitesi üzerinde istatistiksel olarak önemli bir değişime yol açmadığını tespit etmişlerdir (Fıratlıgil Durmuş, 2008). Aynı sonuç bakla fasulyesi proteini (Cepeda ve ark., 1998), arpa proteini (Bilgi ve Çelik, 2004) içinde elde edilmiştir. Bu çalışmada kapya biber proteinlerinin emülsiyon aktiviteleri pH 7.0 da incelenmiş olup örneklerin izoelektrik noktaları pH 4.0-4.5 aralığındadır. Kullanılan protein miktarı ise yaklaşık 25 g/L civarındadır. Düşük emülsiyon aktivitesinin nedenleri bunlar olabilir.

Kanu ve ark. (2007) tarafından susam proteinleri üzerine yapılan farklı bir çalışmada, emülsiyon aktivitesinin pH 2.0 ile 7.0-10.0 aralığında oldukça yüksek olduğu ancak pH 3, 4, 5 ve 6 da düştüğü rapor edilmiştir. Bitkisel orijinli pek çok protein pI alanı altında ve üzerinde iyi çözünürlük özellikleri göstermektedir. Ayrıca protein izolatlarının hazırlanması

sırasında kullanılan tuz ile pH ayarlaması için kullanılan HCl ve NaOH'in proteinlerin denatürasyonuna katkı sağladığı ve böylece emülsiyon özelliklerinin geliştiği tespit edilmiştir.

Emülsiyonlar potansiyel olarak stabil değildirler. Stabil emülsiyon denildiğinde ısıtma ve/veya çalkalama sonucunda kremleşme, folikül oluşumu, dağılma ve/veya faz ayrımı oluşmaksızın emülsiyonun değişmemesi anlaşılmaktadır (Ahmedna ve ark.,1999). Kapyra biber proteinlerinin emülsiyon stabiliteyi incelendiğinde emülsiyon aktivitelerine benzer bir durum gözlenmektedir. Emülsiyon stabilitesi üzerinde muamele etkisinin ($p=0.374$) istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir. Kavurma işlemi ile emülsiyon stabilitesi gelişme göstermiştir.

Ahmedna ve ark. (1999) tarafından yapılan çalışma sonucu buğday protein izolatlarının emülsiyon stabiliteyi % 79 olarak tespit edilmiş ve soya protein izolatu ile sodyum kazeinata benzer olduğu rapor edilmiştir.

Latifve Anwar (2011) tarafından yapılan çalışma sonucu susam protein konsantratlarının emülsiyon stabiliteyi asidik koşullarda (% 50.6) bazik koşullara oranla (% 44.8) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. pH değerlerinin nötrale yaklaşması ile birlikte emülsiyon stabiliteyi dereceli olarak azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca en düşük stabilite değeri olan % 35.6'nın düşük protein konsantrasyonlarında belirlendiği rapor edilmiştir. Bu durum bizim kapyra biber protein örneklerimize ait stabilite değerlerinin düşüklüğü ile ilgili bilgi vermektedir.

Diğer bir çalışmada ise Fıratlıgil Durmuş(2008) bazik pH koşullarının kırmızı biber tohum proteininin emülsiyon özelliklerini asidik koşullara göre daha çok geliştirdiğini tespit etmiştir. Fakat emülsiyon oluşturmada kullanılan metot, süre, yağ tipi emülsiyon özelliklerini etkilediği için elde edilen bütün sonuçların kıyaslanması mümkün olamamaktadır.

Çalışmada kapyra biber protein izolatlarının köpüklenme kapasiteleri ve köpük stabiliteyi de incelenmiştir. Köpüklenme kapasitesi ve köpük stabilitesi üzerinde muamelelerin (sırasıyla $p=0.013$ ve $p=0.044$) etkisi istatistik olarak önemli bulunmuştur. Örneklerin köpüklenme kapasiteleri % 116.22-91.65 arasında değişmekte olup, en yüksek değer (% 116.22) kontrol örneğinde tespit edilmiştir. Uygulanan kavurma ve enzim muamelesi ön işlemleri köpüklenme kapasitelerinde düşüşe neden olmuştur. Tohumların

enzim ile ön işlemden geçirilmesi köpük stabilitelerinde artışa neden olmuştur. Örneklerin köpük stabilite değerleri % 55.70-61.25 arasında değişmekte olup, 30 dk oda sıcaklığında bekletme sonucunda kalan köpüğün yüzde olarak miktarıdır.

Düşük köpüklenme kapasiteleri, yetersiz elektrostatik etkileşimlere, düşük çözünürlüğe ve sonuç olarak protein-protein interaksiyonlarının yetersizliğine bağlanmaktadır. Diğer yandan, yüksek köpüklenme kapasitesi iyi hidrate olmuş köpüklere bağlı iken, köpük stabilitesinde ki azalma denaturasyona bağlıdır (Appiah ve ark., 2011). Köpüklenme kapasitesi ile çözünürlüğün yüksek ilişkisi ve bizim çalışmamızda köpüklenme testlerinin pH 7.0 da yapılmış olması elde edilen düşük kapasitelerin nedeni olarak düşünülmektedir.

Martinez- Flores ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada da keten tohumu konsantratlarında en düşük köpüklenme kapasitesi % 12 olarak pH 6.0 da belirlenmiştir. Ancak maksimum köpük stabilitesi de (% 83.3) yine bu pH değerinde elde edilmiştir. Bunun sebebi olarak izoelektrik nokta civarında protein molekülleri içersindeki itme ve çekme kuvvetlerinin yeterli oranda dengede oluşması gösterilir. Böylece köpük oluşumu gözlenerek maksimum köpük stabilitesine neden olması açıklanmıştır. Aynı çalışmada en yüksek köpük kapasiteleri ise % 40 ile pH 2.0 da ve % 42 ile pH 10.0 da tespit edilmiştir.

Latif ve Anwar (2011) tarafından yapılmış olan çalışmada susam protein konsantratlarında maksimum köpüklenme kapasitesinin (% 240) 5.0'ın altındaki pH değerlerinde elde edildiği bildirilmiştir. Minimum köpük stabilitesi ise (% 50.4) ile pH 7.6'nın üzerindeki değerlerde tespit edilmiştir. pH değeri azaldıkça köpük stabilitesinin arttığı rapor edilmiştir. Bu sonuç Fıratlıgil Durmuş(2008)'un soya protein konsantresinin köpük stabilitesine pH'ın etkisi sonuçlarında da görülmektedir.

Susam proteinleri üzerine yapılan başka bir çalışmada; köpüklenme kapasitesinin pH'a bağlı olduğu, en düşük verilerin ise izoelektrik nokta aralığında (pH 4-5.5) tespit edildiği rapor edilmiştir. pH 7.0 da susam proteini için köpüklenme kapasitesi % 79 ve 30 dk sonraki köpük stabilitesi ise % 80 olarak tespit edilmiştir. pH 5.5'un üzerinde ve özellikle pH 10-11'de köpüklenme kapasitesinin önemli oranda arttığı görülmüştür. Bu iki pH değerinde protein molekülü üzerindeki net yükler artmaktadır. Bu sebeple hidrofobik interaksiyonlar zayıflamakta fakat proteinin esnekliği artmaktadır. Net yükün artmasının sağlanması yağlı tohum proteinleri için pH 7-11 aralığında uygulanabilir. pH 12-14 olduğunda ise net yük azalır. Protein molekülü üzerindeki net yükün artması sonucu, protein su-hava ara fazına

hızlı diffüze olur ve hava moleküllerini hızlı çevrelemesini sağlayarak köpük oluşumu iyileşmektedir (Kanu ve ark., 2007).

Protein konsantrasyonu ne kadar yüksek olursa ara yüzey filminin kalınlığı artacağı için daha yoğun ve stabil köpükler elde edilebilir (Zayes, 1997). Akintayo ve ark. (1999) güvercin bezelyesi protein konsantresinin köpük özelliklerinin, düşük iyonik kuvvetli ortam, artan protein konsantrasyonu ve orta düzeydeki tuz konsantrasyonu ile geliştirilebildiğini tespit etmişlerdir. Wang ve Johnson (2001), soya proteininin köpük özelliklerinin uygulanan hidrotermal pişirme ile geliştirilemediğini belirlemişlerdir.

Farklı çalışmalardaki köpük kapasitesi susam protein konsantresi için %9-97(Inyang ve Iduh, 1996), kışniş tohum protein konsantresi için %85-210(Aluko ve McIntosh 2001), fasulye unu protein konsantresi için %70-160(Guerrero ve ark., 2002), güvercin bezelyesi protein konsantresi için %80-140 (Akintayo ve ark., 1999) aralığında değişim göstermektedir. Bitkisel kaynaklı proteinlerin köpük özelliklerindeki bu farklılıklar, proteinlerindeki farklılıktan ve uygulanan konsantrasyonlardaki farklılıktan meydana gelmektedir (Akintayo ve ark., 1999).

Kapya biber protein izolatlarının jelleşme özelliklerinin belirlenmesi amacıyla % 20'lik stok çözeltiden 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 % (w/v) oranlarında örnek içerecek şekilde dilüsyonlar hazırlanmış ve metot uygulanmıştır. Jelleşme durumları **Çizelge 4.11.**' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11.Kapya biber protein izolatlarının jelleşme özellikleri

Konsantrasyon										
Muamele	2%	4%	6%	8%	10%	12%	14%	16%	18%	20%
Kontrol	sıvı	sıvı	viskoz	viskoz	pıhtı	sıvı	sıvı	katı	katı	katı
						jel	jel	jel	jel	jel
Kavrulmuş	sıvı	viskoz	viskoz	pıhtı	sıvı	sıvı	katı	katı	katı	katı
					jel	jel	jel	jel	jel	jel
Enzim	sıvı	sıvı	sıvı	viskoz	viskoz	viskoz	pıhtı	sıvı	sıvı	katı
								jel	jel	jel

Kontrol grubu için en düşük jelleşme konsantrasyonu % 16 olarak belirlenmiştir. Kavurma işlemi ile örneklerin en düşük jelleşme konsantrasyonları % 14'e gerilerken, enzim

uygulanması durumunda en düşük jel oluşturma konsantrasyonun % 20 olduğu görülmektedir.

Sharma ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışma sonucu en düşük jelleşme konsantrasyonları badem proteini için % 6, brezilya cevizi ve kestane proteinleri için % 8, fındık proteinleri için % 12, çam fıstığı proteini için % 12, antepfıstığı proteini için % 10 ve soya proteini için % 16 olarak rapor edilmiştir. Kırmızı biber tohum proteini için %4 (Fıratlıgil Durmuş, 2008),acı bakla protein izolatu için %12 (Lqari ve ark., 2002), Şili fıncığı protein konsantresi için %14 (Moure ve ark., 2002), güvercin bezelyesi (%8) ve börölce (%10) protein izolatu (Mwasaru ve ark., 2000) en düşük jelleşme konsantrasyonları olarak elde edilen değlerlerdir. Çalışmada elde edilen farklı tür bitkilere ait proteinlerin en düşük jelleşme konsantrasyonları genel olarak kapy a biber proteinlerine oranla düşük olmakla beraber, soya proteinine ait değ er çalışma verilerimiz ile benzerlik göstermektedir.

4.5.4. Kapy a Biber Proteinlerinin Aminoasit İçerikleri

Kontrol, kavurma, enzim grubuna ait protein ö rneklerinin tamamında 17 adet aminoasit tespit edilmiştir. Tespit edilen amino asitler ve miktarları **Ç izelge 4.12.**'de gösterilmiştir.

Belirlenen aminoasitler alanin (822.11-1318.25 nmol/mL), asparajin (14.46-24.15 nmol/mL), aspartik asit (389.36-1123.53 nmol/mL), glutamin (38.91-103.13 nmol/mL), glutamik asit (232.27-2077.88 nmol/mL), glisin (982.32-1041.14 nmol/mL), histidin (161.85-306.46 nmol/mL), izolö sin (495.02-586.48 nmol/mL), lö sin (860.16-933.03 nmol/mL), lisin (412.69-645.54 nmol/mL), metiyonin (35.76-126.70 nmol/mL), fenilalanin (463.63-601.12 nmol/mL), prolin (634.24-710.38 nmol/mL), serin (375.27-594.05 nmol/mL), treonin (413.77-434.47 nmol/mL), tiro sin (166.63-191.75 nmol/mL) ve valin (619.31-775.37 nmol/mL)dir.

Özellikle çocuklar için gerekli olan yarı esansiyel aminoasitler olan arjinin ve sistein ö rneklerin hiç birisinde tespit edilmemiştir. Esansiyel aminoasitlerden olan triptofan ise sadece enzim muameleli ö rneklerde 3.03 nmol/mL bulunmuştur. Kontrol ve kavrulmuş ö rneklerde bulunmamaktadır. Kapy a biber proteinlerinin diğ er esansiyel aminoasitler olan fenilalanin, lö sin, lisin ve valin bakımından iyi birer kaynak oldu ğ u görö lmüştür.

Çizelge 4.12. Kappa biber protein izolatlarının aminoasit içerikleri

Amino Asit İçeriği	Amino Asit Miktarı (nmol/mL)		
	Kontrol	Kavrulmuş	Enzim
Ala	822.11±0.05	867.04±0.04	1318.25±0.09
Arg	TEDB	TEDB	TEDB
Asn	14.46±0.03	15.35±0.07	24.15±0.05
Asp	1123.53±0.6	1034.99±0.09	389.36±0.05
Cys	TEDB	TEDB	TEDB
Gln	38.91±0.07	41.10±0.01	103.13±0.08
Glu	1616.59±0.00	2077.88±0.05	232.27±0.08
Gly	982.32±0.04	1026.83±0.08	1041.14±0.06
His	262.84±0.01	306.46±0.05	161.85±0.03
Ile	586.48±0.04	513.69±0.01	495.02±0.06
Leu	925.59±0.09	933.03±0.07	860.16±0.05
Lys	567.37±0.01	645.54±0.04	412.69±0.01
Met	35.76±0.04	41.56±0.01	126.70±0.06
Phe	582.18±0.09	601.12±0.03	463.63±0.03
Pro	706.65±0.05	710.38±0.02	634.24±0.09
Ser	553.94±0.05	594.05±0.06	375.27±0.00
Thr	419.65±0.08	434.47±0.03	413.77±0.05
Trp	0.000	0.000	3.03±0.03
Tyr	169.62±0.05	191.75±0.02	166.63±0.08
Val	775.37±0.04	723.31±0.08	619.31±0.08

(TEDB: Tespit edilebilir düzeyde bulunamadı, Ala:Alanin, Arg:Arjinin, Asn: Asparajin Asp:Aspartik asit, Cys:Sistein, Gln:Glutamin, Glu:Glutamik asit, Gly:Glisin, His:Histidin, Ile:İzolösin, Leu:Lösin, Lys:Lisin, Met:Metiyonin, Phe:Fenilalanin, Pro:Prolin, Ser: Serin, Thr:Treonin, Trp:Triptofan, Tyr:Tirosin, Val:Valin)

Örnekler fenilalanin açısından incelendiğinde, fenilalanin içeriği kavurma işlemi ile artış gösterirken, enzim uygulaması sonucunda düşme göstermiştir. Lösin, lisin, treonin, aspartik asit, glutamik asit, histidin, serin, prolin ve tirosin içeriği açısından da benzer bir tablo gözlenmiştir. İzolösin ve valin içeriği en yüksek olan örnekler kontrollerdir. Kavurma işlemi sonucunda izolosin ve valin içeriği azalma göstermiştir. Enzim uygulaması da bu aminoasitlerin azalmasına neden olmuştur.

Amino asit içerikleri incelendiğinde kavurma işleminin aminoasit miktarlarında genel bir artışa, enzim uygulamasının ise azalmaya neden olduğu görülmektedir. Enzim ön işleminin miktarlar üzerinde azalmaya neden olarak besleyici değeri düşürdüğü söylenebilir.

Eklund ve Agren (1975) haşhaş proteini konsantratında yapmış oldukları çalışma sonucu; 314 mg/g N izolösin, 486 mg/g N lösin, 264 mg/g N lisin, 309 mg/g N fenilalanin, 284 mg/g N tirosin, 87 mg/g N sistein, 168 mg/g N metiyonin, 265 mg/g N treonin, 80 mg/g N triptofan, 407 mg/g N valin belirlemişlerdir. Sirinivas ve Narasinga Rao (1981) tarafından

haşhaş proteinleri üzerine yapılan bir başka çalışmada sonucu iki haşhaş çeşidinin aminoasit içerikleri belirlenmiştir. Çeşitlerde tespit edilen aminoasitler; aspartik asit (9.27-10.25 g/100g protein), treonin (3.66-4.00 g/100g), serin (4.39-4.48 g/100g), glutamik asit (24.26-25.40 g/100g), prolin (4.20-4.37 g/100g), glisin (4.19-4.46 g/100g), alanin (4.03-4.32 g/100g), valin (5.29-5.99 g/100g), metiyonin (2.66-2.54 g/100g), izolösin (4.35-4.50 g/100g), lösin (7.22-7.79 g/100g), tirosin (4.17-4.23 g/100g), fenilalanin (4.99-5.40 g/100g), histidin (2.54-2.70 g/100g), lisin (3.48-3.51 g/100g), triptofan (1.02-1.03 g/100g) dır.El-Adawy ve Taha (2001) paprika tohumunun, toplam esansiyel amino asitler, lisin, treonin ve triptofan içeriği bakımından zengin olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada elde edilen verilerle karşılaştırıldığında genelde aynı amino asitlerin belirlendiğini görmekteyiz. Amino asit miktarları ise bu sonuçlarla kısmen benzerlik göstermektedir.

4.5.5. Kappa Biber Proteinlerinin Termal Özellikleri

Tüm muamele gruplarından izole edilen proteinlerin termal özellikleri Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) termogramları ile incelenmiştir. **Çizelge 4.13.**'de kappa biber proteinlerinin termal karakteristiklerine ait veriler gösterilmektedir.

Çizelge 4.13. Kappa biber protein izolatlarının termal özellikleri

Özellik	Kontrol	Kavrulmuş	Enzim	Total	p değeri
T ₀ (°C)	82.77±3.30 ^{A*}	35.52±4.48 ^B	25.13±2.27 ^B	47.81±27.60	p= 0.001
T _d (°C)	93.05±0.53 ^A	57.98±0.17 ^B	48.20±1.59 ^C	66.41±21.10	p= 0.000
ΔH (J/g)	968.8±24.49 ^A	1329.9±393.32 ^A	933.9±10.22 ^A	1077.5±263.69	p= 0.299

To: denaturasyon başlangıç (on-set) sıcaklığı , Td: termal denaturasyon sıcaklığı, ΔH: major endotermin entalpi değişimi.

*Aynı satırdaki büyük harfler aynı çeşitten elde edilen her bir protein örneğinde tespit edilen değerlerin tohumlara uygulanan ön işlemlere göre karşılaştırılmalarını göstermektedir.

“T_d” değeri proteinin termal denaturasyon sıcaklığıdır. Özellikle tersiyer yapı ile birlikte quarterner yapıyı devam ettiren hidrojen bağlarının yok olmasını ifade etmektedir. ΔH ise örnek içerisindeki denature olmayan proteinin oranını ifade eder. Protein içerisindeki düzenli yapıların miktarı ile korelasyon göstermektedir (Yin ve ark., 2011). T₀ ve T_d değerlerinin yüksek çıkması protein içerisindeki, ısıya karşı daha az kararlı olan bir grubun proses sırasında denature olduğunu göstermektedir. Proteinlerin denaturasyon işlemi sırasında molekül önemli miktarda ısı almaktadır. DSC termogramında endotermik bir pik

olarak görülür. Transfer edilen ısı ΔH ile ifade edilmektedir ve endotermin altında kalan alanın integrali alınarak hesaplanmaktadır. Bu denature olmayan proteinin oranını belirlemek için kullanılır. Entalpinin yüksek olması protein içersindeki denaturasyona dayanıklı kısımların çokluğunu göstermektedir (Bukya ve Poongodi Vijayakumar, 2013).

Kapya biber protein izolatlarının T_d ve T_o termal özellikleri üzerinde muamele etkisi (sırasıyla $p=0.000$ $p=0.001$) istatistik olarak önemli bulunmuştur. ΔH üzerinde muamelenin etkisi ise ($p=0.299$) istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Kontrol grubunun $T_o(82.77^\circ\text{C})$, $T_d(93.05^\circ\text{C})$ değerleri kavurma ve enzim muameleli örneklerden daha yüksektir. Bu kontrol grubuna ait proteinlerin sıcaklığa daha dayanıklı olduğunu, molekülün düzenli yapısını bozarak denatürasyon sağlanması için daha yüksek sıcaklıkların gerekli olduğunu göstermektedir.

Kavurma işleminin $T_o(35.52^\circ\text{C})$, $T_d(57.98^\circ\text{C})$ enzim muamelesine nazaran $T_o(25.13^\circ\text{C})$, $T_d(48.20^\circ\text{C})$ denatürasyon sıcaklığının yükselmesine neden olduğu görülmektedir. Enzim örnekleri ise termal olarak en dayanıksız gruptur.

4.5.6 Kapya biber proteinlerinin FT-IR analizleri

Kapya biber protein izolatlarının FT-IR analizleri yapılarak protein moleküllerinin yapısı hakkında bilgi edinmek amaçlanmıştır. Uygulanan ön işlemlerin proteinlerde oluşturduğu yapısal değişimlerin oranı belirlenmiştir. FT-IR spektroskopisi proteinlerin sekonder yapısal kompozisyonu ve yapısal dinamiklerini tespit etmek için kullanılmaktadır. FT-IR spektroskopisi, dalgaboyunun ve örnek tarafından absorplanan infrared (IR) radyasyonun ölçümüne dayanmaktadır. Yüksek polimerlerin IR spektral dataları genellikle yapısal olarak tekrar eden grupların vibrasyonlarından tahmin edilmektedir. Poliipeptid ve protein moleküllerinde mevcut olan tekrar eden gruplar dokuz adet karakteristik IR absorpsiyon bandı verirler. Karakteristik IR absorpsiyon bandları amid A, B ve I-VII bandlarıdır. Amid I ve II bandları proteinlerin omurgasında yer alan en önemli vibrasyonel bandlar olarak tanınmaktadır. Proteinlerin sekonder yapısal komponentlerine en hassas spektral alan, bu bandlardan amid I içeren $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ bandıdır. Bu alan ortalama % 80, yani neredeyse tamamen peptid bağlarındaki C=O esneklik titreşimlerini verir. Proteinlerin her bir sekonder yapısal elementi ile amid I bandı komponentlerinin sıklığı yakın korelasyon gösterir. Amid II bandı ise düzlemsel NH bükülmeleri ve CN esneme vibrasyonlarından kaynaklanır. Bu band protein yapısal duyarlılığını daha az gösterir. Diğer amid vibrasyonel

bandları oldukça komplekstir. Bu bandlar güç alanı, yan zincirlerin türü ve hidrojen bağları gibi detaylara bağlıdır. Bu detaylar protein konformasyonel çalışmalarında çok az ele alınmıştır (Kong ve Yu, 2007). Proteinlerde ölçülen IR frekanslarına dair karakteristik bağ tanımlamaları aşağıda **Çizelge 4.14.**'de gösterilmektedir (Kong ve Yu, 2007).

Çizelge 4.14.Peptid bağlarına ait karakteristik infrared bantları

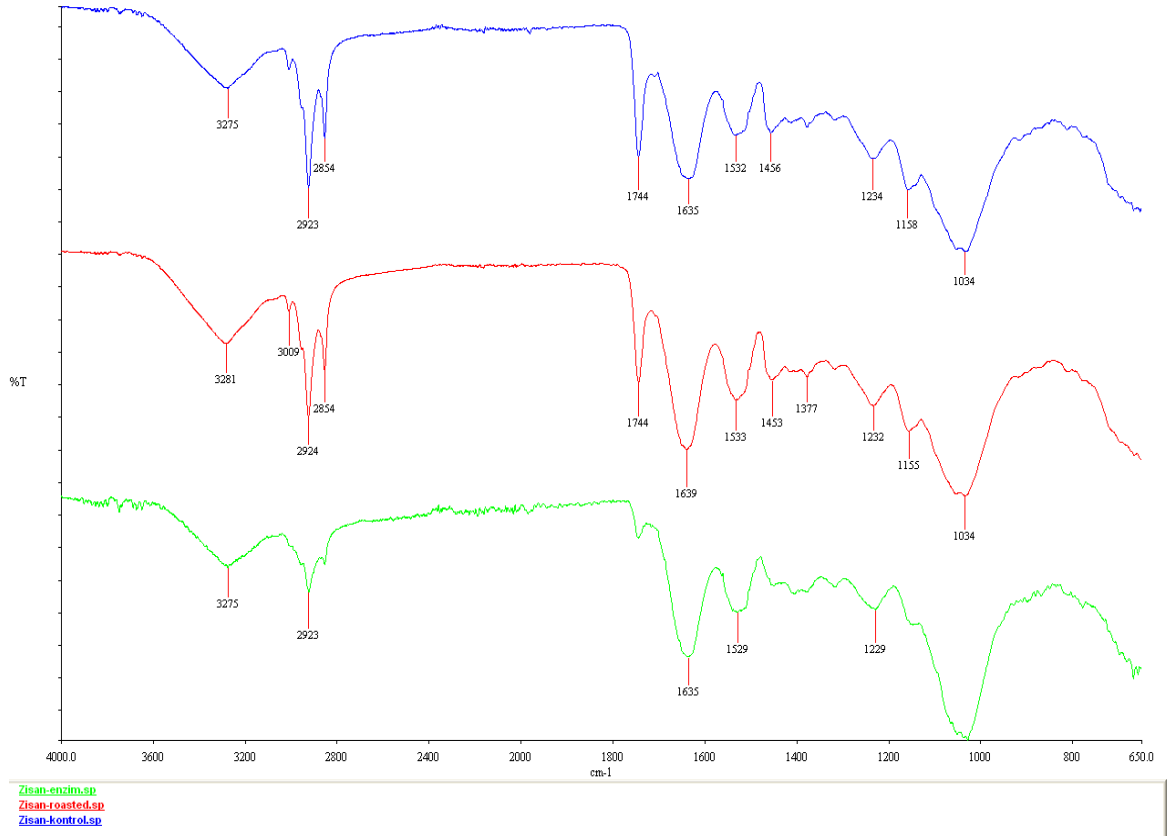
Bandın ismi	Dalga sayısı (cm⁻¹)	Tanımı
Amid A	3300	NH esneklik
Amid B	3100	NH esneklik
Amid I	1600-1690	C=O esneklik
Amid II	1480-1575	CN esneklik, NH bükülme
Amid III	1229-1301	CN esneklik, NH bükülme
Amid IV	625-767	OCN bükülme
Amid V	640-800	Düzlem dışına NH bükülme
Amid VI	537-606	Düzlem dışına C=O bükülme
Amide VII	200	İskelet burulma

Amid I bandının detaylı bileşenleri proteinlerin sekonder yapısı bilinirse frekanslar incelenerek tespit edilebilir. Amid I bandı 1700-1600 cm⁻¹ de titreşim verir. Enerjinin %80'i amid gruplarındaki C=O esneklik titreşimleri ve %20 düzlemsel NH bükülmelerinden oluşmaktadır. Bu titreşim bandının sıklığı, C=O ve NH kısımlarını içeren hidrojen bağlarının doğasına bağlıdır. Yani bandın sıklığı sırasıyla polipeptid zinciri tarafından kabul edilen sekonder yapı, omurgayı oluşturan yapı ve hidrojen bağları tarafından belirlenmektedir. Gözlenen amid I bandı birbiri ile örtüşen bandları içererek protein ve polipeptidlerin biçimini oluşturur. Bu örtüşen bandlar α -heliks, β -sheets, turn ve rastgele yapıları belirler. IR spektrumu ile protein sekonder yapısının bileşenleri arasında ilişki kurulduğunda; proteinlerin su ortamındaki çözeltilerinde 1654-1658 cm⁻¹ arasındaki bandlar α -heliks yapıya, 1642-1624 cm⁻¹ arasındaki bantlar ise β -sheet bileşenlerine işaret etmektedir. Globular proteinlerde ortalama olarak aminoasit kalıntıların %30'unun β -turn konformasyonlarında yer aldığı tespit edilmiştir. 1688, 1680, 1672 ve 1666 cm⁻¹ spektrumunda yer alan bandlar β -turn yapılarına atanmıştır. Gelişigüzel kıvrımlardan oluşan konformasyona ait olan karakteristik band ise 1648 $\pm$ 2 cm⁻¹spektrumunda yer almaktadır (Kong ve Yu, 2007).

Achouri ve ark. (2012) tarafından susam protein izolatlarıyla yapılan bir çalışmada FT-IR spektrumun amide I bölgesi kullanılarak proteinlerin tuz, amonyum sülfat ve ısıtma sonucunda ne tür yapısal değişimlere uğradıkları ölçülmeye çalışılmıştır. Çözeltiye 0.2 M

tuz eklenmesinin daha düşük dalga sayısına doğru (1642 cm^{-1}) bir kayma olduğu bildirilmiştir. Çözeltilerin $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ de ısıtılmasıyla $1622\text{-}1636\text{ cm}^{-1}$ bandında artış olduğu tespit edilmiştir. Amonyun sülfatla çöktürülmüş protein örneklerinde ise gelişigüzel kıvrımlardan oluşan konformasyona ait olan karakteristik bandın $1640\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ yükseldiği bildirilmiştir.

Kapya biber tohumunun üç farklı ön işleme muameleedilmesinden sonra ekstrakte edilen protein örneğine ait FT-IR tüm spektrumları **Şekil 4.5.**'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Kapsa Biber Protein İzolatlarının FT-IR spektrumları (En üstten alta doğru örnek adları şöyledir: kontrol, kavrulmuş,enzim)

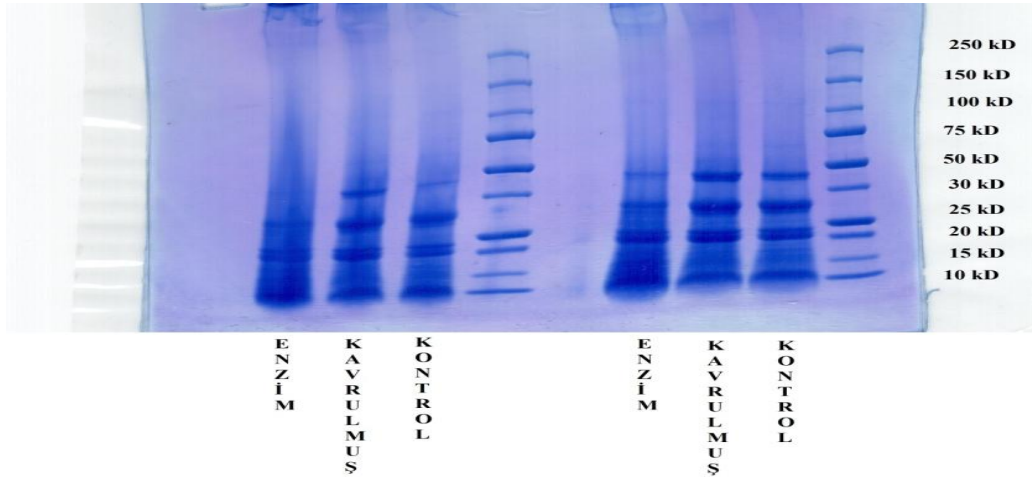
Kapsa biber proteinlerinin FT-IR spektrumları incelendiğinde; tüm muamele gruplarında $1635\text{-}1639\text{ cm}^{-1}$ spektrumunda titreşim görülmüş olup amid I bandları (C=O bağları) olduğu görülmektedir. Buna göre proteinlerin sekonder yapısının β -sheet bileşenlerinden oluştuğu söylenilebilir. Tüm örneklerde $1529\text{-}1533\text{ cm}^{-1}$ spektrumunda amid II bandları (CN ve CH bağları) olduğu da belirlenmiştir. Tüm örneklerde $200\text{-}767\text{ cm}^{-1}$ spektrumunda hiç titreşim görülmemiştir. Amid IV, V, VI, VII bandlarının bulunmadığı

sonucuna ulaşılabilir.Önceki analizlerde proteinlerde görülen düşük viskozite de bu nedene bağlanabilir.

Sadece kontrol ve kavrulmuş örnekspektrumlarında yaklaşık 1744 cm^{-1} dalga sayısında bir band görülmektedir. Bu bandınAchouri ve ark., (2012) tarafından susam tohumu için elde ettikleri bilgilere dayalı olarak anti-paralel β -tabakalarını ve kümelenmiş yapıları gösterdiği şeklinde yorumlanabilir. Sonuç olarak, özellikle enzim muamelesiyle ve kısmen de ön-kavurma işlemleriyle tohum proteinlerinin sekonder yapılarında bazı değişimlerin oluştuğu ortaya konulmuştur.

4.5.7. Kapa Biber Proteinlerinin SDS-PAGE Elektroforez Analizleri

Kapa biber protein izolatlarında ön işlemlerin etkisini görmek üzere elektroforez yapılmıştır. Proteinlerinin SDS-PAGE analizi sonucunda elde edilen jellerde 6 adet ana band **Şekil 4.6'** da görülmektedir. Bandların molekül ağırlıkları standart protein ile karşılaştırıldığında 10, 15, 20, 30, 40, 50 kD'na denk geldiği belirlenmektedir. 75-250 kD aralığındaki daha yüksek molekül ağırlıklı proteinler ise jelde görülememektedir.



Şekil 4.6.Protein izolatlarının SDS-PAGE elektroforez bandları

Şekil 4.6.'daki SDS-PAGE jelini incelediğimizde, kavrulmuş örneklerde band yoğunluğunun diğerlerine nazaran daha fazla olduğu görülmektedir. En düşük yoğunluklu bandların ise enzim muameleli örneklerinde bulunduğu söyleyebiliriz. Kontrol ve kavurma uygulanan örneklerde 20, 25 ve 30 kD hizasına denk gelen bandların daha yoğun olduğu görülmektedir. Enzim uygulanan örneklerde ise bu bandların yoğunluklarının düşük olduğu

belirgin olarak görülmektedir. Yani enzim muamelesinin örneklerde protein kayıplarına neden olduğu açıkça görülmektedir. Enzim etkisiyle proteinlerin parçalandığını söyleyebiliriz. Enzim uygulanan örneklerde düşük molekül ağırlıklı proteinlerin yoğunluğu fazladır. Kavrulmuş örneklerde aynı bölgedeki bandlarda kontrole göre daha fazla koyulukbulunması, kavurma işleminin proteinin daha serbest hale gelmesine yardımcı olduğu sonucuna ulaştırabilir.

Srinivas ve Narasinga Rao (1981) tarafından haşhaş tohumunda yapılan bir çalışmada haşhaş proteinlerinin poliakrilamid jel elektroforez analizinde yedi adet band gözlenmiştir. Bu bandların iki adedi düşük mobilitate kalanları ise yüksek mobilitate göstermiştir. Srinivas ve Narasinga Rao (1987) tarafından haşhaş tohumunda yapılan bir başka çalışmada ise haşhaş tohumunun düşük molekül ağırlıklı proteinleri incelenmiştir. SDS-PAGE analizinde üç band gözlenmiş ve molekül ağırlıklarının 18, 16 ve 13 kD denk geldiği belirlenmiştir. Kopya biberde yapılan çalışma sonucunda tüm muamele gruplarında, standardın en düşük molekül ağırlıkları olan 10 ve 15 kD molekül ağırlıklığına denk gelen bandlar tespit edilmiştir.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapy biberin (*Capsicum annuum* Linnaeus) işlenmesi sırasında artık olarak açığa çıkan kapy biber tohumlarının insan gıdası olarak kullanılabilecek ürünlere dönüştürülmesini araştırmaktadır. Kontrol, kavurma, enzim muamelesi ön işlemlerine tabi tutulmuş tohumlardan soğuk pres yöntemiyle üretilen biber yağlı kek hammadde olarak kullanılmıştır. Elde edilen yağlı kekta yağ giderme işlemi yapılarak, yağsız kapy biber unları elde edilmiştir. Yağ giderme işlemi sonucu yağsız unların yağ içerikleri düşürülmüştür. Yağsız unların fiziko-kimyasal analizleri ve fonksiyonellik testleri gerçekleştirilmiştir. Yağsız un ile hazırlanan % 30'luk dispersiyonlarda viskozite değerleri belirlenmiştir.

Protein yararlılığını etkileyen bileşenler olan tanen ve fitik asit miktarları da yağsız unlarda belirlenmiştir. Fitik asit miktarları pekçok yağlı tohumla kıyaslandığında yüksek olduğu için kapy biber proteinlerinin zenginleştirme amacıyla katılabileceği gıda ortamlarında proteinlerin bio-yararlılığını olumsuz etkileyecektir.

Yağsız unların mineral madde içerikleri analiz edildiğinde; yağsız kapy biber unlarının özellikle potasyum, sodyum, magnezyum ve kalsiyum bakımından zengin oldukları belirlenmiştir. Demir, mangan, bakır, çinko ve alüminyum açısından fakir oldukları görülmüştür. Ağır metaller olan kurşun, kobalt, kadmiyum, nikel, krom, baryum ise tespit edilmemiştir.

Yağsız unlarda fonksiyonellik testleri olarak su ve yağ bağlama testleri yapılmış, emülsiyon ve köpüklenme özellikleri incelenmiş ve en düşük jelleşme konsantrasyonları belirlenmiştir. En yüksek su bağlama değerleri enzim muamelesi uygulanan örneklerde görülürken, kavurma ile su bağlamada kontrole göre artış gözlenmiştir. Su bağlama kapasitesi soslar, çorbalar, et ürünleri, hamur ve fırıncılık ürünleri gibi gıdalarda proteinlerin önemli bir fonksiyonel özelliği olarak karşımıza çıkmaktadır. Kapy biber yağsız unu, su bağlama özelliği bakımından gıda sistemi içinde kullanılabilecek bir kaynak olarak görülebilir. Yağsız unların yağ absorblama kapasitelerinde ise kavurma ve enzim muamelesi ile yağ bağlamada azalma gözlenmiştir.

Yağsız unların emülsiyon aktiviteleri ve stabilite de incelenmiştir. Kavurma işlemi örneklerin emülsiyon aktivitelerinde ve stabilite de azalmaya neden olurken, enzim işlemi uygulanan örneklerde en yüksek aktivite ve stabilite değerleri tespit edilmiştir.

Örneklerin 80 °C sıcaklıkta 30 dk ısıtılması sonrası belirlenen emülsiyon stabilite değerleri emülsiyon aktivitesi değerleri ile aynı olarak kaydedilmiştir. Yani bütün muamelelerde kapy biber tohum unu emülsiyon stabilitesi açısından dayanıklıdır.

Yapılan çalışmada kapy biber yağsız unlarının kontrol grubunda kavurma ve enzim gruplarına nazaran daha yüksek köpüklenme kapasite ve köpük stabilite değerleri elde edilmiştir.

Yağsız unlarının katı jel oluşumunun gözlemlendiği en düşük jelleşme konsantrasyonları % 24-32 arasında değişmekte olup oldukça yüksektir. Kavurma işleminin jelleşme üzerinde olumsuz etki göstermiş, kavurma gruplarına ait en düşük jelleşme konsantrasyonu (%32) kontrol gruplarına ait en düşük jelleşme konsantrasyonundan(%24) yüksek olduğu görülmüştür. Enzim uygulaması yağsız unların jelleşme özellikleri son derece olumsuz etkilenmiş, % 32 örnek konsantrasyonunda dahi oluşum gözlenmediğinden % 38'e kadar gidilmiş, ancak bu değerde dahi pıhtı oluşumu gözlenmiş, tam anlamıyla katı stabil bir jel yapısı oluşmadığı gözlenmiştir.

Fiziko-kimyasal özellikleri belirlenen haşhaş yağsız unlarından optimum verim ile protein izolasyonu yapılabilmesi amacıyla en uygun tuz konsantrasyonu ve pH değeri tespit edilmiştir. En uygun izolasyon şartları olarak kontrol ve enzim grubunda 0.6 M tuz konsantrasyonu ve pH 9.0 değeri belirlenirken, kavurma grubunda en yüksek protein çözünürlüğü 0.2 M tuz konsantrasyonu ve pH 9.0 da tespit edilmiştir.

Kapy biber tohum protein örneği için izoelektrik noktalar belirlenmiş ve 4.0-4.5 arasında olduğu tespit edilmiştir. Belirlenen izolasyon şartları kullanılarak izoelektrik çöktürme ile elde edilen protein izolatlarında verim hesaplanmıştır. Verim değerleri %15.00-40.50 arasındadır. En yüksek protein verimleri kontrol örneklerinde elde edilmiştir. En düşük protein verimleri ise enzim ile muamele edilen grupta tespit edilmiştir.

Kapy biber protein izolatlarında çözünürlük özellikleri incelenmiştir. Kontrol, enzim ve kavurma gruplarında çözünürlüğün en fazla olduğu pH değeri 9.0 olarak belirlenmiştir. Protein izolatlarının hazırlanması öncesinde yapılan optimizasyon çalışmalarımız da kapy biber proteinlerinin en iyi pH 9.0 da çözündüğünü göstermiştir. Tüm muamelelerde, beklenildiği gibi çözünürlük proteinin izoelektrik noktasında en düşüktür ve izoelektrik noktadan asidik ve bazik pH değerlerine doğru gidildikçe artmaktadır.

Proteinlerin vizkozite özelliklerinin belirlenmesi amacıyla orta sıcaklık derecesi olarak 40 °C ve yüksek sıcaklık olarak da 60 °C belirlenmiştir. % 20'lik protein dispersiyonlarında beklenildiği gibi sıcaklık artışı ile birlikte vizkozite değerlerinde artış meydana gelmiştir. Her iki sıcaklıkta enzim ile muamele protein izolat dispersiyonlarında kontrol gruplarına oranla vizkozitede düşüş görülmüştür.

Protein izolatlarının su bağlama kapasitesi yağsız unlarda tespit edildiği gibi en yüksek su bağlama değerleri enzim muamelesi uygulanan örneklerde görülmüştür. Kavurma işlemi ile su bağlamada kontrole göre artış gözlenmiştir. Yağ bağlama kapasitelerinde de benzer ilişki tespit edilmiştir.

Çalışmamızda proteinlerin emülsiyon aktiviteleri ve stabilitelerinin uygulanan ön işlemlerden nasıl etkilendiği de araştırılmıştır. Protein izolatlarının emülsiyon aktivitelerinin ve stabilitelerinin kapyra biber yağsız ununa kıyasla düşük olduğu görülmüştür. Kavurma işlemi uygulanmasıyla emülsiyon aktivitelerinde ve emülsiyon stabilitelerinde artış gözlenmiştir. Enzim ön işlemi kontrol grubuyla benzer emülsiyon aktivite ve stabilite özellikleri göstermiştir.

Proteinlere uygulanan kavurma ve enzim ön işlemleri köpüklenme kapasitelerinde düşüşe neden olmuştur. Tohumların enzim ile ön işleminden geçirilmesi yağsız unda olduğu gibi köpük stabilitelerinde artışa neden olmuştur.

Kontrol grubu için en düşük jelleşme konsantrasyonu % 16 olarak belirlenmiştir. Kavurma işlemi proteinlerin jelleşme özellikleri üzerinde olumlu etkiler oluşturmıştır. Kavurma işlemi ile en düşük jelleşme konsantrasyonları % 14'e gerilemiştir. Enzim uygulanması durumunda ise en düşük jel oluşturma konsantrasyonun % 20 olduğu görülmektedir.

Kontrol, kavurma, enzim grubuna ait protein örneklerinin tamamında 17 adet aminoasit tespit edilmiştir. Alanin, asparajin, aspartik asit, glutamin, glutamik asit, glisin, histidin, izoleüsin, lösin, lisin, metiyonin, fenilalanin, prolin, serin, treonin, tirozin ve valin belirlenen aminoasitlerdir.

Özellikle çocuklar için gerekli olan yarı esansiyel aminoasitler olan arjinin ve sistein örneklerin hiç birisinde tespit edilmemiştir. Esansiyel aminoasitlerden olan triptofan ise sadece enzim muameleli örneklerde bulunmuştur. Kontrol ve kavurulmuş örneklerde

bulunmamaktadır. Kapsa biber proteinlerinin diğ er esansiyel aminoasitler olan fenilalanin, l osin, lisin ve valin bakımından iyi birer kaynak olduğu görülmüştür.

Elde edilen protein izolatlarının termal özelliklerinin belirlenmesi diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Kontrol  rneklerinde T_0 , T_d değerleri kavurma ve enzim muameleli örneklerden yüksek belirlenmiştir. Kontrol grubu proteinlerinin sıcaklığa daha dayanıklı olduğu düşünülebilir. Enzim  rnekleri termal olarak en dayanıksız olan gruptur. Enzim  n işlemli örneklerin fonksiyonel özelliklerini de dikkate alırsak, ısı uygulanmayan soğuk işlenen dondurma gibi ürünlerde kullanılabilme potansiyeli bulunduğu söylenilebilir.

Kapsa biber proteinlerinin FT-IR spektrumları incelendiğinde özellikle enzim muamelesiyle ve kısmen de  n-kavurma işlemleriyle tohum proteinlerinin sekonder yapılarında bazı değişimlerin olduğu ortaya konulabilir.

Kapsa biber protein izolatlarında  n işlemlerin etkisini görmek üzere elektroforez analizi de yapılmıştır. Proteinlerinin SDS-PAGE analizi sonucunda elde edilen jellerde 6 adet ana band gözlenmiştir. Bandların molek l ağırlıkları standart protein ile karşılaştırıldığında 10, 15, 20, 30, 40, 50 kD'na denk geldiği belirlenmektedir. 75-250 kD aralığındaki daha yüksek molek l ağırlıklı proteinler ise jelde görülememektedir.

Bu çalışmanın genel sonucu olarak kapsa biber proteinlerinin izolasyonunda alkali pH'larda tuz çözeltisi ile çözündürme ve izoelektrik çökeltme ile yüksek verim ile izolat elde edilebileceği ortaya çıkmıştır. Yağsız unlarının ve protein izolatlarının özellikle mineral madde ve aminoasit bileşenleri açısından besleyici değerlerinin yüksek olduğu g r lm ştir. Uygulanan kavurma ve enzim  n işlemlerinin bu besin elementleri üzerinde olumsuz etkilerinin olmadığı g r lm ştir. Ancak yağsız unlarda anti-besleyici faktörlerden tanen içeriği düşük olmasına karşın fitik asit miktarı oldukça yüksektir. Uygulanan protein fonksiyonellik testleri arasında su ve yağ bağlama özellikleri hem yağsız unlar hemde protein izolatlarında oldukça iyidir. Bu sonuç kapsa biber un ve proteinlerinin; özellikle sos, çorba, hamur işleri, fırıncılık ürünleri ve et ürünleri gibi gıdalarda gıda sistemi içerisinde bir kaynak olarak kullanılabilir. Protein izolatlarının jelleşme özelliklerinin iyi olması farklı gıdalarda kıvam arttırıcı olarak kullanılması açısından önemlidir. Kapsa biber protein izolatlarında emülsiyon aktivitesi, emülsiyon stabilitesi, köpüklenme kapasitesi ve köpük stabilitesi fonksiyonellik testleri nötr pH değerinde gerçekleştirilmiş olup düşük seviyede değerler elde edilmiştir. Bu nedenle protein izolatlarının fonksiyonellik özelliklerinin daha

geniş pH aralığında çalışmanın gerekli olduğu düşünülmüştür. Soğuk pres işlemiyle elde edilen yağlı kekin insan gıdası olarak kullanılma potansiyeli olduğu belirlenmiştir. Kapyra biber yağsız ununun besleyici bileşenler açısından zengin, sağlığı olumsuz etkileyebilecek bir niteliği bulunmayan verimli bir protein kaynağı olabileceği çalışmalarımızda ortaya konmuştur. Sonuç olarak bir yan ürün olarak açığa çıkan kapyra biber tohumunun yağ için işlendikten sonra açığa çıkan ikincil yan ürünü olan yağlı keklerin ve çeşitli işlemlerden sonra bu yağlı keklerden elde edilen yağsız un ve protein izolatlarının yine insan gıdası olarak değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

- Abbey B.W., Ibeh G.O., 2006. Functional Properties of Raw and Heat Processed Cowpea (*Vigna unguiculata*, Walp) Flour. *Journal of Food Science*, 53 (6):1775–1777.
- Achouri A., Nail V., Boye J.I., 2012. Sesame Protein Isolate: Fractionation, Secondary Structure and Functional Properties. *Food Research International*, 46: 360–369.
- Adebowale Y.A., Adeyemi I. A., Oshodi A.A., 2005. Functional And Physicochemical Properties Of Flours Of Six *Mucuna* Species. *African Journal of Biotechnology*, 4 (12), 1461-1468.
- Ahmedna M., Prinyawiwatukul W., Rao R.M., 1999. Solubilized Wheat Protein Isolate: Functional Properties and Potential Food Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:1340-1345.
- Akintayo E.T., Oshodi A.A., Esuoso K.O., 1999. Effects Of NaCl, Ionic Strength And Ph On Foaming And Gelation Of Pigeon Pea (*Cajanus cajan*) Protein Concentrates. *Food Chemistry*, 66: 51-56.
- Aluko R.E., McIntosh T., 2001. Polypeptide Profile And Functional Properties Of Defatted Meals And Protein Isolates Of Canola Seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 391-396.
- Aluko R.E., McIntosh T., 2005. Limited Enzymatic Proteolysis Increases The Level Of Incorporation Of Canola Proteins Into Mayonnaise. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6: 195-202.
- Anon M.C., Sorgentini C.A., Wagner J.R., 2001. Relationships Between Different Hydration Properties of Commercial and Laboratory Soybean Isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4852–4858.
- AOAC, *Official Method 986.11*: Phytate in Foods. (1986).
- AOAC, *Official Method 920.39*: Fat (crude) or Ether Extract in Animal Feed, Hydrolytic Extraction Gas Chromatographic Method (1987).

- AOCS, *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society*, Ba 5a-49, Aa 5-38, Cc 10c-95, Ca 5a-40, Cd 8-53, Cd 1-25, T1 1a-64: Champaign, 1984, IL, ABD.
- Appiah F., Asibuo J.Y., Kumah P., 2011. Physicochemical and Functional Properties of Bean Flours of Three Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) varieties in Ghana. *African Journal of Food Science*, 5(2): 100 – 104.
- Arntfield S.D., 2000. Proteins from Oil-producing Plants. *Proteins in Food Processing*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 146-167.
- Aydeniz B., Güneşer O., Yılmaz, E., 2014. Physico-Chemical, Sensory And Aromatic Properties Of Cold Press Produced Safflower Oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 91:99-110.
- Ayrancı E., Dalgıç A.C., 1992. Preparation Of Protein Isolates From *Pistacia terebinthus* L. and Examination Of Some Functional Properties. *LWT-Food Science and Technology*, 25: 442-444.
- Bandyopadhyay K., Ghosh S., 2002. Preparation and Characterization of Papain-Modified Sesame (*Sesamum indicum* L.) Protein Isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:6854-6857.
- Bernadac A., Latche A., Roustan J.P., Bouzayen M., Pech J.C., 2002. Cucurbits, Pepper, Eggplant, Legumes And Other Vegetables in Fruit and Vegetable Biotechnology. Cambridge, England. 325-410.
- Bilgi B., Çelik S., 2004. Solubility And Emulsifying Properties Of Barley Protein Concentrate. *European Food Research Technology*, 218: 437-441.
- 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*, 72:248–54.
- Bukya A., Vijayakumar T.P., 2013. Properties of Industrial Fractions of Sesame Seed (*Sesamum indicum* L.). *International Journal of Agricultural and Food Science*, 3(3): 86-89.

- Cepeda E., Villaran M.C., Aranguiz N., 1998. Functional Properties Of Faba Bean (*Vicia faba*) Protein Flour By Spray Drying And Freeze Drying. *Journal of Food Engineering*, 36: 303-310.
- Chavan U.D., McKenzie D.B., Shadidi F., 2001. Functional Properties Of Protein Isolates From Beach Pea (*Lathyrus maritimus* L.). *Food Chemistry*, 74: 177-187.
- Chove B.E., Grandison A.S., Lewis M.J., 2001. Emulsifying Properties Of Soy Protein Isolate Fractions Obtained By Isoelectric Precipitation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 759-763.
- Damodaran S., 1994. Structure-Function Relationship Of Food Proteins. in *Protein Functionality in Food Systems*, , Eds. Hettiarachchy, N.S. ve Ziegler, G.R., Mercel Dekker Inc., New York. 1-39.
- Damodaran S., 1997. Food Proteins: An overview, in *Food Proteins and Their Applications*, Eds. Damodaran, S. and Paraf, A., Marcel Dekker, Inc., New York. 1-56.
- Eklund A., Agren G., 1975. Nutritive Value of Poppy Seed Protein. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 52:188-190.
- El-Adawy T.A., Taha K.M., 2001. Characteristics And Composition Of Watermelon, Pumpkin, And Paprika Seed Oils And Flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1253-1259.
- El-Adawy T.A., Rahma E.H., El-Bedawey A.A., Gafar A.F., 2001. Nutritional Potential And Functional Properties Of Sweet And Bitter Lupin Seed Protein Isolates. *Food Chemistry*, 74: 455-462.
- FAO, 2008. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Databases. <http://faostat.fao.org>
- Fıratlıgil Durmuş E., 2008. Kırmızı Biber Tohumunun Endüstriyel Olarak Değerlendirilmesi: Protein Ekstraksiyonu, Fonksiyonel Özellikleri ve Mayonez Üretiminde Kullanımı (Doktora Tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- Foegeding E.A., Davis J.P., 2011. Food Protein Functionality: A Comprehensive Approach. *Food Hydrocolloids*, 1-12.

- Guerrero L.C., Perez-Flores V., Betancur-Ancona D., Davilla-Ortiz G., 2002. Functional Properties Of Flours And Protein Isolates From *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 584-591.
- Gupta S., Chandi G.K., Sogi D.S., 2008. Effect Of Extraction Temperature On Functional Properties Of Rice Bran Protein Concentrates. *International Journal of Food Engineering*, 4: 1-18.
- Hagerman A.E., 2002. Vanillin Assay. <http://chemistry.ouohio.edu/hagerman>
- Inyang U.E., Nwadiukpa C.U., 1992. Functional Properties Of Dehulled Sesame (*Sesamum indicum* L.) Seed Flour. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69 (8): 819-822.
- Inyang U.E., Iduh A.O., 1996. Influence Of Ph And Salt Concentration On Protein Solubility, Emulsifying And Foaming Properties Of Sesame Protein Concentrate. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71 (12): 1663-1667.
- İşleten M., Uysal-Pala Ç., Karagül-Yüceer Y., 2007. Ezine Peynirinin Mineral Madde İçeriği. *Gıda*, 32 (4): 173-179.
- Kanu P.J., Kerui Z., Ming Z.H., Haifeng Q., Kanu J.B., Kexue Z., 2007. Sesame Protein 11: Functional Properties of Sesame (*Sesamum indicum* L.) Protein Isolate as Influenced by pH, Temperature, Time and Ratio of Flour to Water During its Production. *Asian Journal of Biochemistry* 2 (5): 289-301.
- Khalil M.M., 1998. Factors Affecting Production Of Melon Seed Kernel Protein: Yield, Composition And Protein Isolates Quality. *Nahrung*, 42: 295-297.
- Khalid E.K., Babiker E.E., El Tinay A.H., 2003. Solubility and Functional Properties of Sesame Seed Proteins as Influenced by pH and/or Salt Concentration. *Food Chemistry*, 82: 361-366.
- Khattab R.Y., Arntfield S.D., 2009. Functional Properties of Raw and Processed Canola Meal. *LWT - Food Science and Technology*, 42: 1119-1124.
- Kim N., Kim Y.J., Nam Y.J., 1992. Characteristics And Functional Properties Of Protein Isolates From Various Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Cultivars. *Journal of Food Science*, 57 (2): 406-410.

- Kong J., Yu S., 2007. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8): 549–559.
- Krause J.P., Schultz M., Dudek S., 2002. Effect Of Extraction Conditions On Composition, Surface Activity And Rheological Properties Of Protein Isolates From Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 82: 970-976.
- Liadakis G.N., Tzia C., Oreopoulou V., Thomopoulos C.D., 1995. Protein Isolation From Tomato Seed Meal Extraction Optimization. *Journal of Food Science*, 60 (3): 477-482.
- Liadakis G.N., Tzia C., Oreopoulou V., Thomopoulos C.D., 1998. Isolation of Tomato Seed Meal Proteins With Salt Solutions. *Journal of Food Science*, 63 (3): 450-453.
- Latif S., Anwar F., 2011. Aqueous Enzymatic Sesame Oil and Protein Extraction. *Food Chemistry*, 125: 679–684.
- Lazos E.S., 1992. Certain Functional Properties Of Defatted Pumpkin Seed Flour. *Plant Foods for Human Nutrition*, 42 (3), 257-273.
- Lqari H., Pedroche V.J., Millan F., 2002. *Lupinus angustifolius* Protein Isolates, Chemical Composition, Functional Properties And Protein Characterization. *Food Chemistry*, 76: 349-356.
- Madhusudhan K.T., Singh N., 1985. Effect of Heat Treatment on the Functional Properties of Linseed Meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(6):1222–1226.
- Mahajan A., Dua S., 1994. Comparison Of Processing Treatments On The Composition And Functional Properties Of Rapeseed Preparations (*Brassicacampestris* L. var. *toria*). *Nahrung*, 38 (6): 578-587.
- Manamperi W.A., Pryor S.W, Chang S.K.C, 2007. Separation and Evaluation of Canola Meal and Protein for Industrial Bioproducts. *An ASABE Section Meeting Presentation Paper Number: RRV-07116*.
- Martínez-Flores H.E., Soto E.B., Garnica-Romo M.G., Saldaña A.L., Meilgaard P., Penagos C.J.C., 2002. Chemical and Functional Properties of Flaxseed Protein Concentrate

- Obtained using Surface Response Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6515-6520.
- Mizubuti I.Y., Junior O.B., Souza L.W.O., Silva R.S.S.F., Ida E.I., 2000. Response Surface Methodology For Extraction Optimization Of Pigeon Pea Protein. *Food Chemistry*, 70: 259-265.
- Moure A., Dominguez H., Zuniga M.E., Soto C., Chamy R., 2002. Characterisation of Protein Concentrates From Pressed Cakes of Guevina Avellana (Chilean Hazelnut). *Food Chemistry*, 78: 179–186.
- Moure A., Sineiro J., Dominguez H., Parajo J.C., 2006. Functionality of Oilseed Protein Products: A review. *Food Research International*, 39: 945–963.
- Mwasaru M.A., Muhammed K., Bakar J., Man Y.B.C., 1999. Effects Of Isolation Technique And Conditions On The Extractability, Physicochemical And Functional Properties Of Pigeonpea (*Cajanus cajan*) And Cowpea (*Vigna unguiculate*) Protein Isolates II Functional Properties. *Food Chemistry*, 67: 452.
- Mwasaru M.A., Muhammed K., Bakar J., Man Y.B.C., 2000. Influence Of Altered Solvent Environment On The Functionality Of Pigeonpea (*Cajanuscajan*) And Cowpea (*Vigna unguiculata*) Protein Isolates. *Food Chemistry*, 71: 157-165.
- Myers D.J., Hojilla-Evangelista M.P., Johnson L.A., 1994. Functional Properties Of Protein Extracted From Flaked, Defatted, Whole Corn By Ethanol/Alkali During Sequential Extraction Processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71 (11):1201-1204.
- Narayana K., Narasinga Rao M.S., 1982. Functional Properties of Raw and Heat Processed Winged Bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) Flour. *Journal of Food Science*, 47(5):1534–1538.
- Nergiz R., 2006. Ankara Piyasasında Satışa Sunulan Isıl İşlem Geçirmemiş Sütlerle Uygulanan Geleneksel Kaynatma İşleminin, Sütün Protein ve Serbest Aminoasit Düzeylerine Etkisi, (Yüksek Lisans Tezi), Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

- Neto V.Q, Narain N., Silva J.B., Bora P.S., 2001. Functional Properties Of Raw And Heat Processed Cashew Nut (*Anacardium occidentale* L.) Kernel Protein Isolates, *Nahrung*, 45 (4): 258-262.
- Oomah B.D., Mazza G., Cui W., 1994. Optimization Of Protein Extraction From Flaxseed Meal. *Food Research International.*, 27: 355-361.
- Onsaard E., Pomsamud P., Audtum P., 2010. Functional Properties of Sesame Protein Concentrates from Sesame Meal. *Asian Journal of Food and Agriculture-India*, 3(04): 420-431.
- Ordóñez C., Asenjo M.G., Benítez C., González J.L., 2001. Obtaining Aprotein Concentrate From Integral Defatted Sunflower Flour. *BioresourceTechnology*, 78 (2): 187-190.
- Quanhang L., Caili F., 2005. Application Of Response Surface Methodology For Extraction Of Germinant Pumpkin Seeds Protein, *Food Chemistry*, 92: 701-706.
- Price M.L., Van Scoyoc S., Butler L.G., 1978. A Critical Evaluation Of The Vanillin Reaction As An Assay For Tannin In Sorghum Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 1214-1218.
- Pomeranz Y., Meloan C.E., 1994. *Food Analysis: Theory and Practice*. Chapman & Hall Pub. Co, New York.
- Rahma E.H., Dudek S., Mothes R., Gornitz E., Schwenke K.D., 2000. Physicochemical Characterisation Of Mung Bean (*Phaseolus aureus*) Protein Isolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 477-483.
- Ralet M.C., Gueguen J., 2001. Foaming Properties Of Potato Raw Proteins And Isolated Fractions. *LWT-Food Science and Technology*, 34: 266-269.
- Rodrigues I.M., Coelho J.F.J., Carvalho G.V.S. 2012. Isolation and Valorisation of Vegetable Proteins from Oilseed Plants: Methods, Limitations And Potential. *Journal of Food Engineering*, 109: 337-346.
- Rustom I.Y.S., Lopez-Leiva M.H., Nair B.M., 1991. Optimization Of Extraction Of Peanut Proteins With Water By Response Surface Methodology. *Journal of Food Science*, 56 (6): 1660-1663.

- Santiago L.G., Gonzalez R.J., Remondetto G.E., Bonaldo A.G., 1998. Emulsifying Ability Of Proteins Evaluated By Response Surface Methodology, *LWT-Food Science and Technology*, 31: 259-264.
- Sanchez-Vioque R., Clemente A., Vioque J., Bautista J., Millan F., 1999. Protein Isolates From Chickpea (*Cicer arietinum* L.), Chemical Composition, Functional Properties And Protein Characterization. *Food Chemistry*, 64: 237-243.
- Sharma G.M., Su M., Joshi A.U., Roux K.H., Sathe S.K., 2010. Functional Properties of Select Edible Oilseed Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5457-5464.
- Singh J., Bargale P.C., 2000. Development of a Small Capacity Double Stage Compression Screw Press For Oil Expression. *Journal of Food Engineering*, 43: 75-82.
- Srinivas H., Narasinga Rao M.S., 1981. Studies on the Proteins of Poppy Seed (*Papaver somniferum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29:1232-1235.
- Srinivas H., Narasinga Rao M.S., 1986. Functional Properties of Poppy Seed Meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34:222-224.
- Srinivas H., Narasinga Rao M.S., 1987. Studies on the Low Molecular Weight Proteins of Poppy Seed (*Papaver somniferum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35:12-14.
- Sze-Tao K.W.C., Sathe S.K., 2000. Walnuts (*Juglans regia* L.), Proximate Composition, Protein Solubility, Protein Amino Acid Composition And Protein In Vitro Digestibility. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (9): 1393-1401.
- Tan S.H., Mailer R.J., Blanchard C.L., Agboola S.O., 2011. Canola Proteins for Human Consumption: Extraction, Profile, And Functional Properties. *Journal of Food Science*, 76:16-28.
- Vioque J., Sánchez-Vioque R., Clemente A., Pedroche J., Millán F., 2000. Partially Hydrolyzed Rapeseed Protein Isolates with Improved Functional Properties. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 77(4): 447-450.
- Vojdani F., 1996. Solubility, in *Methods of Testing Protein Functionality*, Eds. Hall, G.M., Blackie Academic&Professional, London. 11-55.

- Wang C., Johnson L.A., 2001. Functional Properties Of Hydrothermally Cooked Soy Protein Products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78 (2):189-195.
- Wani A.A., Sogi D.S., Grover L., Saxena D.C., 2006. Effect Of Temperature, Alkali Concentration, Mixing Time And Meal/Solvent Ratio On The Extraction Of Watermelon Seed Proteins-A Response Surface Approach. *Biosystems Engineering*, 94: 67-73.
- Wu Y.V., 2001. Emulsifying Activity and Emulsion Stability of Corn Gluten Meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81:1223-1227.
- Xu L., Diosady L.L., 1994. Functional Properties Of Chinese Rapeseed Protein Isolates. *Journal of Food Science*, 59 (5): 1127-1130.
- Yin S.W., Chen J.C., Sun S., Tang C.H., Yang X.Q., Wen Q.B., Qi J.R., 2011. Physicochemical and Structural Characterisation of Protein Isolate, Globulin and Albumin from Soapnut Seeds (*Sapindus mukorossi* Gaertn.). *Food Chemistry*, 128, 420–426.
- Zayas S.F., 1997. Functionality of Proteins in Food, Springer, New York.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Zişan HÜRİYET

Doğum Yeri : Çanakkale

Doğum Tarihi : 31.01.1989

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Gıda
Mühendisliği Bölümü-2012

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

İLETİŞİM

E-posta Adresi : zisan_hryt@hotmail.com