



# Nohut proteininin ultrases destekli özütlenmesinin optimizasyonu ve teknolojik özellikleri

## Optimization of ultrasound-assisted extraction of chickpea protein and technological properties

Merve Akalan<sup>1</sup> , Mehmet Şükrü Karakuş<sup>2</sup> , Bülent Başyigit<sup>3</sup> , Asliye Karaaslan<sup>4</sup>   
Mehmet Karaaslan<sup>5,\*</sup> 

<sup>1,3,5</sup> Harran Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 63300, Şanlıurfa Türkiye

<sup>2</sup> Harran Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 63300, Şanlıurfa Türkiye

<sup>4</sup> Harran Üniversitesi, Gıda Teknoloji Programı, 63200, Şanlıurfa Türkiye

### Öz

Bu çalışmada nohuttan protein eldesi için pH ve ultrasesin eş zamanlı sistematik yaklaşımı ve yanıt yüzey metodolojisi (RSM) ile optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Protein özütlenme aşamasında özütlenme süresi, ultrases cihaz genliği ve solvent pH'sının protein tozu verimine etkisi değerlendirilmiştir. Optimum özütlenme koşulları (protein tozu verimi: %9.55) özütlenme süresi 42.41 dk, genlik %61.39 ve pH:8.38 olarak belirlenmiştir. Nohut protein tozunun karakteristik yapısı Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile doğrulanmıştır. Nihai tozun teknolojik özellikleri detaylı araştırılmıştır. Proteinin su tutma kapasitesi (STK) %240.24, yağ bağlama kapasitesi (YBK) %213.68, köpürme kapasitesi %37.50, köpük stabilitesi (10-30. dk) %73.33-60.00 bulunmuştur. Emülsiyon özellikleri ise emülsiyon aktivite indeksi (EAI) ve emülsiyon stabilite indeksi (ESI) (10-30. dk), stabilite katsayısı (R) ve santrifüj çökme oranı (CPR) dahil olmak üzere sırasıyla 15.36 m<sup>2</sup>/g, 62.24-181.30, 0.68 ve %14.60 bulunmuştur. Sonuç olarak, proteinlerin hammaddelerden özütlenmesinde ultrases ve pH eş zamanlı uygulaması yenilikçi ve umut verici bir yöntem olabilir.

**Anahtar kelimeler:** Nohut proteini, Ultrases destekli özütlenme, FTIR spektroskopisi, Tekno-fonksiyonel özellikler, Emülsiyon

### 1 Giriş

Toplumlarda zaman içerisinde ortaya çıkan problemlere bağlı olarak son yıllarda dünya genelinde bitkisel kaynaklı proteinlere olan talep artmıştır. Bu problemlerden ilki ve en önemlisi artan küresel nüfusun beslenme gereksinimlerinin karşılanması ile ilgilidir. Vegan/vejetaryen tüketicilerin ve popülasyonlarda çölyak hastalığının artışı ise diğer göz ardı edilmemesi gereken nedenler olarak verilebilir [1,2]. Bitkisel proteinler her ne kadar belirtilen gereksinimlere doğrudan cevap verme potansiyelleri olsa da hayvansal kaynaklı proteinlerle kıyaslandığında teknolojik özellikler açısından sergilemiş oldukları davranışlar istenilen

### Abstract

In this study, the simultaneous systematic approach of pH and ultrasound for protein extraction from chickpea was optimized by response surface methodology (RSM). The effect of extraction time, ultrasonic device amplitude, and solvent pH on protein powder yield was evaluated in the protein extraction step. The optimum extraction conditions (protein powder yield: 9.55%) were determined as extraction time 42.41 min, amplitude 61.39% and pH: 8.38. The characteristic structure of chickpea protein powder was confirmed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Techno-functional properties of the final powder were investigated. Water holding capacity (WHC) of protein was 240.24%, fat binding capacity (FBC) was 213.68%, foaming capacity was 37.50%, foam stability (10-30 min) was 73.33-60.00%. Emulsion properties including emulsion activity index (EAI) and emulsion stability index (ESI) (10-30 min), stability coefficient (R) and centrifugal precipitation rate (CPR) were 15.36 m<sup>2</sup>/g, 62.24-181.30, 0.68 and 14.60%, respectively. In conclusion, the simultaneous application of ultrasound and pH can be an innovative and promote method for the extraction of proteins from raw materials.

**Keywords:** Chickpea protein, Ultrasound-assisted extraction, FTIR spectroscopy, Techno-functional properties, Emulsion

seviyelerde değildir [3]. Ayrıca, pazarda yer alan soya proteini gibi bitkisel kaynakların tüketimine bağlı olarak alerjenite problemlerinin ortaya çıktığı yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir [4]. Belirtilen noktalar halihazırda piyasada var olan bitkisel kaynaklı proteinlerin endüstride doğrudan kullanımını sınırlamaktadır. Bu yüzden alternatif bitkisel kaynaklı proteinlerin pazara sunulması bilimsel literatürün ve endüstrinin öncelikli hedefleri arasında yer almaktadır. Doğada var olan bitkisel materyallerin tamamından protein elde etmek mantıklı bir yaklaşım olarak görülmemektedir. Proteinlerin elde edileceği ham maddenin bazı özelliklere sahip olması bu noktada önem arz etmektedir. İyi bir

\* Sorumlu yazar / Corresponding author, e-posta / e-mail: mk385@cornell.edu (M. Karaaslan)

Geliş / Received: 12.05.2023 Kabul / Accepted: 11.08.2023 Yayınlanma / Published: 15.10.2023

doi: 10.28948/ngumuh.1296312

kaynağın olabildiğince yüksek oranda protein içermesi ve alerjen özelliklerin minimum seviyelerde olması gerekmektedir. Belirtilen noktalar göz önüne alındığında içermiş olduğu protein miktarı (%13-31) ve düşük alerjen içeriği nedeniyle nohut ön plana çıkmaktadır [5]. Ayrıca nohut dünyanın farklı bölgelerinde yetiştirilmekte ve yıllık bazda en fazla yetiştirilen ilk üç baklagil türünden birisidir ki bu durum hammaddeye ulaşım noktasında oluşabilecek problemlerin minimum seviyelerde olduğunun açık bir göstergesidir [6].

Nohut proteinlerinin de içinde yer aldığı farklı bitkisel kaynaklı proteinlerin özütlenmesinde alkali uygulamaların başarısı önceki çalışmalarda not edilmiştir [7]. Kenevir tohumu [8], kayısı çekirdeği [9] ve bezelye [10] proteinleri alkali koşullarda elde edilen bitkisel kaynaklı proteinlere birer örnektir. Çalışmalarda özütleme solventi olarak ya da doğrudan sodyum hidroksit farklı konsantrasyonları ya da farklı pH değerlerine sahip saf su kullanılmıştır [11,12]. Bu çalışmalarda kullanılan solventin pH değeri başta özütleme verimi olmak üzere nihai protein tozlarının karakteristik özellikleri üzerine etkisinin önemli olduğunu vurgulanmıştır. Ayrıca özütleme için uygun pH değerinin ham maddeye göre değişiklik gösterdiği not edilmiştir. Dolayısıyla tesadüfi seçilen bir alkali pH değerinde protein özütleme işleminin efektif bir şekilde yürütülebileceğinin kesinliği söz konusu değildir.

Gıda endüstrisinde yenilikçi teknolojilerin (mikrodalga, enzim ve ultrases destekli vb.) kullanımı ile alkali yöntemlere kıyasla daha yüksek protein verimi elde edildiği yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir [13,14]. Son yıllarda çevre dostu teknolojiler arasında yer alan ultrases destekli özütleme sistemleri de bitkisel kaynaklardan proteinlerin elde edilmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu sistemlerde özütleme işleminde kullanılan çözücü ham maddeye daha iyi nüfus eder, kütle transferi daha hızlı olur ve hücre duvarı bozulan ham maddeden özütlenecek materyaller daha yüksek oranlarda salınırlar [15]. Sonuç olarak ultrases destekli özütleme sistemlerinde proses yüksek verimde neticelendirilir [16]. Literatür verilerinde bu verimin, özütleme zamanı, cihaz genliği, cihaz gücü, ham maddenin parçacık boyutu, özütleme sıcaklığı ve sıvı-katı oranı gibi çeşitli parametrelere bağlı olduğu ortaya konulmuştur [17].

Belirtilen hususlar dikkate alındığında bitkisel kaynaklı proteinlerin özütlenmesinde kullanılan yöntemlerden olan alkali ve ultrases destekli özütleme koşullarının optimize edilmesi gerekliliği net bir şekilde görülmektedir. Optimizasyon işleminde tek değişken yaklaşımı zaman alıcı, pahalı ve verimsizdir [18]. Bu yüzden tek değişken yerine sınırlı sayıda çalışma ile daha fazla bilgiye ulaşmak için deneysel tasarım yaklaşımlarını kullanmak daha makul görülmektedir [19].

Solvent olarak farklı pH değerlerine sahip su kullanarak nohuttan proteinlerin ultrases destekli sistemler yardımıyla özütlenmesine yönelik literatürdeki veri setleri sınırlıdır. Bu yüzden bu çalışmada ilgili bitkiden proteinlerin eldesi için özütleme süresi, ultrases cihaz genliği ve solvent pH'sı eş zamanlı olarak sistematik yaklaşımla optimize edilmiştir. Optimum koşullarda üretilen protein tozlarının karakteristik

yapısı FTIR spektroskopisi ile araştırılmıştır. Ayrıca tozların detaylı tekno-fonksiyonel özellikleri su tutma kapasitesi (STK), yağ bağlama kapasitesi (YBK), köpük kapasitesi/stabilitesi, Emülsiyon aktivite indeksi (EAI), emülsiyon stabilite indeksi (ESI), stabilite indeks, stabilite katsayısı (R) ve santrifüj çökme oranı (CPR) analizleri ile ortaya konmuştur.

## 2 Materyal ve metot

### 2.1 Materyal

Protein eldesinde ham madde olarak kullanılan nohut örnekleri Şanlıurfa'da faaliyet gösteren yerel firmalardan temin edilmiştir (Protein oranı: 18.2 g/100g). Özütleme öncesi ham maddenin yüzey alanı laboratuvar tipi bir öğütücü (DMS253, Demisan, Türkiye) kullanılarak artırılmıştır (Partikül çapı: 1-2 mm). Çalışmada Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD) ve Merck (Darmstadt, Almanya) firmalarından temin edilen analitik saflığa sahip kimyasallar kullanılmıştır.

### 2.2 Protein özütlemesi

Protein özütleme deney tasarımı özütleme süresi, ultrases cihaz genliği ve solvent pH'sı bağımsız değişkenler olarak belirlenmiştir. Bu değişkenlerin protein verimi üzerindeki etkileri yanıt yüzey metodolojisi (RSM) kullanılarak merkezi tümleşik tasarım ile araştırılmıştır. Deney tasarımı, merkez noktasında 6 tekrar olmak üzere 20 denemeden oluşmuştur.

Protein özütlemesi için, öğütülmüş nohut örnekleri ve distile su 1:10 (w/v) oranında karıştırılmıştır. Deney tasarımına göre farklı özütleme süresi (5-60 dk), farklı genlik (%20-100) ve 1M NaOH ve/veya 1M HCl ile farklı pH (2-10) değerlerine ayarlanan solüsyonlar ultrases cihazında (Wiseclean WUC-D10H) eş zamanlı olarak özütlemeye tabi tutulmuştur. Belirlenen süreler sonunda solventler 4 °C'de 4000 rpm'de 15 dk santrifüjlendikten sonra, süpernatantlar toplanmış ve pH değerleri 1M HCl ile 4.5'e ayarlanmıştır. Daha sonra proteinlerin tamamen çökmesi için ilgili solüsyonlar bir gece boyunca 4 °C'de bekletilmiştir. Süre sonunda santrifüjleme (4 °C'de 4000 rpm'de 15 dk) işlemine tabi tutulan örneklerden süpernatantlar uzaklaştırılmış ve dipte kalan çökeltiler (proteinler) dondurarak kurutma cihazı (CoolerMed, Türkiye) ile kurutulmuştur. Elde edilen tozlar analizler gerçekleştirilinceye kadar 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

### 2.3 FTIR spektroskopisi

Optimum noktada elde edilen protein tozlarının spektrumları FTIR cihazı (Shidmadzu, Japonya) kullanılarak 500-4500 cm<sup>-1</sup> aralığında, 32 sn tarama süresi ve 1 cm<sup>-1</sup> çözünürlüğünde ölçülmüştür [20].

### 2.4 Tekno-fonksiyonel özellikler

#### 2.4.1 Su tutma ve yağ bağlama kapasitesi

Proteinin STK ve YBK özellikleri önceki bir çalışmaya göre belirlenmiştir [21]. Bir gram numune santrifüj tüpüne alınarak STK için 10 mL saf su, YBK için 10 mL ayçiçek yağı ile karıştırılmıştır. Numuneler 1 sa boyunca belli aralıklarla vortekslendikten sonra 24 °C'de 5000 rpm'de 10

dk santrifüjlenmiştir. Süre sonunda tüpler 45 °C açıyla 30 dk boyunca filtre edilerek süpernatant süzülüş ve nihai tartım not edilmiştir. Numunelerin son ağırlıklarının başlangıçtaki ağırlıklarına oranı ile STK ve YBK değerleri hesaplanmıştır.

#### 2.4.2 Köpürme kapasitesi ve stabilitesi

Köpürme kapasitesi için, %1'lik protein (pH 7.0) solüsyonu hazırlanmıştır. Yüz mL'lik ölçüm silindire aktarılan solüsyonun ilk hacmi not edilmiştir. Daha sonra homojenizatör (IKA-T18 Basic, Japonya) ile 12.000 rpm'de 1 dk boyunca karıştırılmış ve süre sonunda oluşan hacim kaydedilmiştir. Köpürme stabilitesi için 10. ve 30. dk'lardaki hacimler kaydedilmiştir. Köpürme kapasitesi ve stabilitesi, aşağıdaki denklemlere göre hesaplanmıştır (Denklem (1) ve (2)).

$$\text{Köpürme kapasitesi (\%)} = \frac{v_a - v_b}{v_b} * 100 \quad (1)$$

$$\text{Köpürme stabilitesi (\%)} = \frac{v_t}{v_a} * 100 \quad (2)$$

$V_a$ = Homojenleştirmeden sonraki solüsyon hacmi,  $V_b$ = Homojenleştirmeden önceki solüsyon hacmi,  $V_t$ = Homojenleştirmeden sonra ilgili zamandaki solüsyon hacmi.

#### 2.4.3 Emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi

Emülsiyon hazırlamak için, 100 mL 10 mM potasyum fosfat tampon (pH 7.0) içerisinde 0.5 g protein çözündürülmüştür. Su içinde yağ emülsiyonları (%25 v/v) oluşturmak için bir behere alınan protein solüsyonu (7.5 mL) ve mısır yağı (2.5 mL) 12.000 rpm'de 1 dk boyunca Ultra-Turrax homojenizatör (IKA-T18 Basic, Japonya) ile karıştırılmıştır [22].

Taze hazırlanan emülsiyon (50 µL) ve % 0.1 (w/v)'lik sodyum dodesil sülfat (5 mL) bir tüp içerisinde karıştırılmıştır. Emülsiyon aktivitesini belirlemek için karışımın absorbansı 500 nm'de UV-Vis spektrofotometre (Model UV-1280, Shimadzu, Japonya) ile okunmuştur. Emülsiyon stabilitesi için ise hazırlanan karışımın 10. ve 30. dk'da absorbans değerleri kaydedilmiştir. Emülsiyon aktivitesi ve emülsiyon stabilitesi değerlerini hesaplamak için aşağıdaki denklemler kullanılmıştır (Denklem (3) ve (4)).

$$\text{Emülsiyon aktivitesi (m}^2/\text{g)} = \frac{2 * 2.303 * A_i * SF}{C * \varphi * \theta * 1000} \quad (3)$$

$$\text{Emülsiyon stabilitesi (dk)} = \frac{A_0}{A_0 - A_t} * t \quad (4)$$

$A_i$ : homojenizasyon işleminden hemen sonra okunan absorbans değeri; SF: Seyreltme faktörü; C: Protein konsantrasyonu;  $\varphi$ : Optik yol;  $\theta$ : Yağ hacim fraksiyonu;  $A_t$ : Homojenizasyon işleminden sonra ilgili zamanda okunan absorbans değeri.

#### 2.4.4 Stabilite indeksi

Taze hazırlanan 10 mL emülsiyon, 15 mL lik santrifüj tüpüne ilave edilerek 4000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme süresi sonunda emülsiyonun tüp içerisindeki

faz ayırımı gözlemlenerek emülsiyon stabilitesi yorumlanmıştır. [23,24].

#### 2.4.5 Stabilite katsayısı

On mL taze emülsiyon, 2000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Süre sonunda süpernatantın başlangıç hali ve 100 kat seyreltilmiş hali UV-Vis spektrofotometre kullanılarak 750 nm'de okunmuştur. Stabilite katsayısı aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır (Denklem (5)) [25].

$$\text{Stabilite katsayısı (R)} = \frac{A_2}{A_1} \quad (5)$$

$A_1$ : Süpernatantın orijinal halinin absorbans değeri;  $A_2$ : Süpernatantın seyreltilmiş halinin absorbans değeri.

#### 2.4.6 Santrifüj çökme oranı

Taze hazırlanan 10 mL emülsiyon, 2500 rpm'de 40 dk santrifüjlenmiştir. Daha sonra sıvı kısım uzaklaştırılarak içerisinde tortu bulunan santrifüj tüpleri 30 dk boyunca ters tutulmuştur. Süre sonunda santrifüj tüpünde kalan çökeltinin ağırlığı tartılarak aşağıdaki denkleme göre santrifüj çökme oranı hesaplanmıştır (Denklem (6)).

$$\text{Santrifüj çökme oranı} = \frac{m_2}{m_1} * 100 \quad (6)$$

$m_1$ : Başlangıçtaki emülsiyon ağırlığı;  $m_2$ : Çökelti ağırlığı.

#### 2.4.7 İstatistiksel analizler

Analizler üç tekerrürlü yürütülmüş ve sonuçlar ortalama±standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. Datalar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirilmiştir. Ortalama değerler arasındaki istatistiksel farklar SPSS 22 paket programı (SPSS Inc., Şikago, IL, ABD) TUKEY HSD kullanılarak değerlendirilmiştir. Özütleme optimizasyonunda, tekli ve çoklu dereceden model denklemlerini araştırmak amacıyla Design-Expert yazılımı (Stat Ease, Design Expert 7.0, ABD) kullanılmıştır.

### 3 Bulgular ve tartışma

#### 3.1 Özütleme optimizasyonu

Ultras destekli özütleme, bitkisel ve hayvansal kaynaklardan proteinleri özütmek için kullanılan, yeşil çevre dostu popüler bir tekniktir. Yöntem, numuneye yüksek frekanslı ses dalgalarının uygulanmasını içermekte ve bu da hücrelerin parçalanmasına ve içeriklerinin salınmasına neden olmaktadır. Böylelikle elde edilen proteinlerin verimi ve kalitesi artırılabilir [26]. Ultras destekli özütleme etkinliği, özütleme süresi ve ultras cihaz genliği gibi parametreler ile tespit edilmektedir [27]. Ayrıca protein özütlemede pH faktörünün etkisi de yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir [28]. Nohut proteininin ultras destekli özütleme ile ilgili literatürde çalışmalar olmasına rağmen, özütleme süresi, ultras cihaz genliği ve solvent pH'sı parametrelerinin nohut protein tozu verimini nasıl etkilediğini gösteren sistematik çalışmaların eksikliği bulunmaktadır. Toz ürünün verimini maksimum seviyeye çıkarmak için nohut proteininin ultras destekli özütleme yanıt yüzeyi metodolojisi (RSM) kullanılarak optimize edilmiştir. Merkezi tümleşik tasarımına göre, özütleme

süresi, ultrases genliği ve çözücü pH'sının toz verimi üzerindeki etkilerini araştırmak için 6 tekrarlı 20 deneme yapılmış ve deneysel sonuçlar **Tablo 1**'de sunulmuştur. Deneysel plana ait toz verimi değerlerinin %1.20-10.90 aralığında değiştiği belirlenmiştir (**Tablo 1**). Toz veriminin pH, genlik ve süreden etkilendiği tespit edilmiştir. **Tablo 1** incelendiğinde toz verimi yanıtının özütlenme süresi, genlik ve pH değişkenleri arttıkça arttığını göstermiştir.

**Tablo 1.** Nohut proteini ultrases destekli özütlenme deney tasarımı

Bağımsız değişkenler			Bağımlı değişkenler
Özütlenme süresi (dk)	Genlik (%)	pH	Toz verimi (%)
16	89	8.38	6.95
33	100	6.00	6.14
49	89	3.62	3.42
16	36	3.62	1.20
16	89	3.62	3.47
49	36	8.38	8.06
16	36	8.38	4.78
48	36	3.62	1.97
33	60	6.00	5.66
60	60	6.00	7.64
33	20	6.00	1.94
33	60	6.00	7.62
33	60	6.00	7.44
33	60	6.00	7.19
33	60	10.00	10.90
33	60	2.00	5.33
49	89	8.38	6.70
33	60	6.00	7.69
5	60	6.00	2.22
33	60	6.00	7.01

Toz verimi tahmin edilen değerleri regresyon modelleri kullanılarak hesaplanmış ve deneysel değerlerle karşılaştırılmıştır (**Tablo 2**). Doğrusal, 2FI ve kübik modellerin istatistiksel analiz sonuçlarının birbiriyle uyumsuz olması sonucunda Kuadratik modele ait  $R^2$  ve  $R^2_{adj}$  değerlerinin yüksek olması, uyum eksikliğinin önemsiz olması ve p-değerinin oldukça önemli olmasından dolayı en uygun model olarak seçilmiştir (**Tablo 2**). **Tablo 2**'de yer alan varyans analizi (ANOVA) sonuçları incelendiğinde, belirleme katsayısı ( $R^2$ ) ve düzeltilmiş belirleme katsayısı ( $R^2_{adj}$ ), p ve uyum eksikliği değerleri model belirlemede belirleyici rol oynamışlardır.  $R^2$  ve  $R^2_{adj}$  değerleri sırasıyla 0.8917 ve 0.7941 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, modelin test verileri için doğru bir şekilde yorumlandığını ve verilerin tahmin edilen değerlerle uyumlu olduğu saptanmıştır. Ayrıca p-değerinin  $p < 0.001$  olması modellemenin istatistiki açıdan oldukça önemli olduğu belirlenmiştir. Modellerin geçerliliği, varyasyonu doğru bir şekilde tahmin etmek amacıyla modellerin uygunluğunu gösteren uyum eksikliği testi ( $p > 0.05$ ) kullanılarak doğrulanmıştır [29]. Toz verimi yanıtı için uyum değeri eksikliğinin önemsiz olması ( $p > 0.05$ ), modelin deneysel verilere uygunluğunu göstermiştir. Toz verimi üzerine pH  $p < 0.001$ , süre ve genlik değişkenleri ise  $p < 0.05$  düzeyinde önemli bulunmuştur (**Tablo 3**). Ayrıca toz verimi üzerine süre  $\times$  süre ve genlik  $\times$  genlik etkileşimlerinin sırasıyla  $p < 0.05$  ve  $p < 0.01$  düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir. En yüksek toz verimi özütlenme süresinin 42.41 dk, genliğin %61.39 ve pH: 8.38

olduğu deneme noktasında belirlenmiştir. Optimum nokta belirlendikten sonra elde edilen özütler dondurarak kurutma ile toz forma dönüştürülmüş ve analizlerde kullanılmıştır.

**Tablo 2.** Nohut proteininin ultrases destekli özütlemesine ait yanıt yüzey istatistikleri

Bağımlı değişken	Modeller	Std. sp.	$R^2$	$R^2_{adj}$	p-değeri	Uyum eksikliği
Toz verimi	Doğrusal	1.85	0.5650	0.4835	0.0033**	0.0150
	2FI	1.97	0.5975	0.4117	0.0367*	0.0095
	Kuadratik	1.17	0.8917	0.7941	0.0009***	0.0846
	Kübik	1.02	0.9499	0.8413	0.0071**	0.0565

İstatistiksel farklılıklar \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ ) olarak belirtilmiştir.

**Tablo 3.** Nohuttan protein özütlenme optimizasyonuna ait model katsayıları

Model katsayıları/Değer	Toz verimi
$\beta_0$	7.13***
<b>Kuadratik</b>	
$\beta_1$ (Süre)	0.94*
$\beta_2$ (Genlik)	0.85*
$\beta_3$ (pH)	1.86***
<b>Etkileşimli</b>	
$\beta_{12}$ (Süre $\times$ Genlik)	-0.54
$\beta_{13}$ (Süre $\times$ pH)	0.29
$\beta_{23}$ (Genlik $\times$ pH)	-0.37
<b>İkinci derece</b>	
$\beta_{11}$ (Süre $\times$ Süre)	-0.99*
$\beta_{22}$ (Genlik $\times$ Genlik)	-1.30**
$\beta_{33}$ (pH $\times$ pH)	0.14

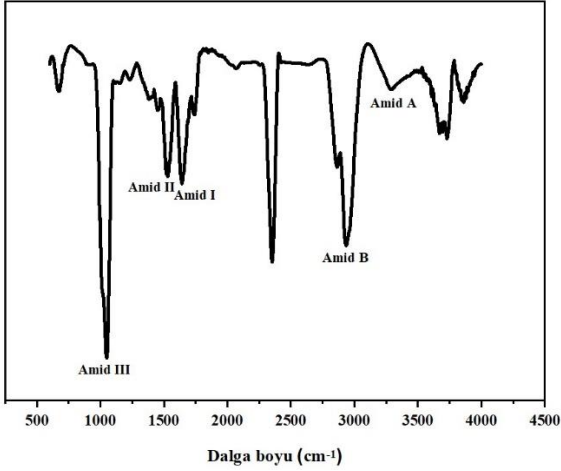
**Model:** Toz verimi (Bağımlı değişken) =  $\beta_0 + \beta_1(\text{Süre}) + \beta_2(\text{Genlik}) + \beta_3(\text{pH}) + \beta_{12}(\text{Süre} \times \text{Genlik}) + \beta_{13}(\text{Süre} \times \text{pH}) + \beta_{23}(\text{Genlik} \times \text{pH}) + \beta_{11}(\text{Süre} \times \text{Süre}) + \beta_{22}(\text{Genlik} \times \text{Genlik}) + \beta_{33}(\text{pH} \times \text{pH})$   
\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$

### 3.2 FTIR spektroskopisi

Bir proteinin yapısındaki peptid bağları ve aminoasit yan zincirleri gibi fonksiyonel grupların titreşim hareketi sonucu dipol momentumunun değişimi, spektrum olarak pik verir [30]. Nohut proteini FTIR spektrumu **Şekil 1**'de sunulmuştur. FTIR spektrumlarında amid I (1700-1600  $\text{cm}^{-1}$ ) amid II (1600-1500  $\text{cm}^{-1}$ ) amid III (1300-1000  $\text{cm}^{-1}$ ) amid A (3000-3500  $\text{cm}^{-1}$ ) ve amid B (2850-2980  $\text{cm}^{-1}$ ) olarak bilinen dalga boyları proteinlerin parmak izi bölgesi olarak tanımlanır [31,32]. **Şekil 1**'e bakıldığında nohut proteini karakteristik bantlarından C=O esnemesini belirten amid I bandı 1649  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyunda, N-H deformasyonunu belirten amid II bandı 1528  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyunda, C-N esnemesini belirten amid III bandı ise 1046  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyunda görülmüştür. Ayrıca N-H gerilmesi, H bağlarının sayısına atfedilen amid A (3292  $\text{cm}^{-1}$ ) bandı ve =CH ve -NH<sub>3</sub> gruplarının asimetric titreşimine atfedilen amid B (2957  $\text{cm}^{-1}$ ) bandı da belirgin olarak görülmektedir. FTIR spektrumunda bu karakteristik bantların varlığı, pH ve ultrasesin eş zamanlı uygulaması ile protein özütlemesinin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini doğrulamaktadır. FTIR spektroskopisi kullanılarak ketencik tohumu proteini yapısını doğrulamak için yapılan çalışmada amid grubunun



proteinlerin karakteristik grubu olduğu bildirilmiştir. Amid I bandı  $1642\text{ cm}^{-1}$ , amid II bandı  $1544\text{ cm}^{-1}$  ve amid III bandı  $1236\text{ cm}^{-1}$  ile tanımlanmıştır [33]. Çalışmada elde edilen sonuçların literatürle uyumlu olduğu ve protein yapısını doğruladığı saptanmıştır.



Şekil 1. Nohut proteini FTIR spektrumu

### 3.3 Tekno-fonksiyonel özellikler

Bitkisel proteinlerin STK değerleri, protein türü, kimyasal bileşimlere, yapılarına ve elde edildiği kaynağa göre değişebilmektedir [34]. STK değeri, proteinlerin şekil, büyüklük, proteinler üzerindeki amino asit dengesi, çözünürlük ve pH gibi fizikokimyasal parametrelere bağlıdır [35]. Bu çalışmada elde edilen nohut protein tozunun STK değeri %240.24 olarak belirlenmiştir (Tablo 4). Farklı kurutma tekniklerinin nohut proteini üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada STK değerleri 206.34-270.84 g/100g aralığında bildirilmiştir [36]. Literatürde iki farklı nohut çeşidi üzerine kavurma ve çimlendirme muamele etkisinin incelendiği çalışmada alkali özütleme uygulanan nohut örneklerinde STK değerleri %193 (Arerti) ve %180 (Natoli) olarak tespit edilmiştir [37]. Bir başka çalışmada ise alkali özütleme sonrası elde edilen nohut proteinin STK değeri yaklaşık %120 olarak rapor edilmiştir [38]. Yapılan bir çalışmada vişne çekirdeği, nar çekirdeği ve bezelye proteinlerinin STK değerleri sırasıyla %208, %191 ve %398 olarak bulunmuştur [39]. Yüksek STK değeri, daha az miktarda çözünür protein kaybından ve yüksek miktarda polar amino asitlerin varlığından kaynaklanmaktadır [36]. Yüksek STK'li proteinler daha fazla su tutabilmekte ve tekstürel özellikler üzerinde iyileştirici etkiye sahip olabilmektedirler. Bir proteinin YBK'sı, belirli bir miktarda protein tarafından bağlanabilen yağ miktarı olarak tanımlanmıştır. YBK, protein içeriği, yüzey alanı, hidrofobiklik, yük ve topografya, yağın likiditesi ve kullanılan yöntem gibi bir dizi faktörden etkilendiği bildirilmiştir [40]. Yağın gıda bileşenlerine, özellikle proteinlere ve karbonhidratlara bağlanması, dokusal ve diğer gıda kalitesi özelliklerini etkilemektedir. Proteinlerin YBK'sı, emülsiyonlarda ve diğer gıda sistemlerinde lipitlerle etkileşime girme yeteneği, gıda formülasyonlarında önem arz etmektedir [41]. Bu çalışmada örneğin YBK değeri

%213.68 olarak bulunmuştur (Tablo 4). Kurutma yöntemlerinin nohut protein konsantrasyonlarının fizikokimyasal ve fonksiyonel özelliklerine etkisinin incelendiği çalışmada YBK değerleri %191.39-277.05 arasında rapor edilmiştir [36]. Ultrases uygulamadan alkali özütleme ile elde edilen nohut proteinlerinin YBK değeri %188 olarak bildirilmiştir [42]. Vişne çekirdeği, nar çekirdeği ve bezelye gibi farklı bitki bazlı proteinlerin YBK değerleri sırasıyla %162, %284 ve %92 olarak belirlenmiştir [39]. Vişne çekirdeği proteinin tekno-fonksiyonel özelliklerinin araştırıldığı çalışmada YBK değeri %155 olarak tespit edilmiştir [43]. YBK'nın yüksek olması, proteinlerin gelişmiş hidrofobik özelliklerine ve polar olmayan amino asit yan zincirlerinin üstün yağ bağlama performansına bağlanmıştır [44]. Yüksek YBK'nın, yağlı gıdalara ilave edilerek daha iyi lezzet profili oluşturduğu ve gıda ürünlerinin raf ömrünü uzattığı bildirilmiştir [45]. Köpürme kapasitesi oluşturulan bir köpüğün hacmini, köpük stabilitesi ise süre boyunca köpük hacmindeki değişimi ölçmektedir [46]. Köpüğün kalitesi, proteinlerin çözünürlükleri, hidrofobiklikleri ve moleküller arası bağ oluşturma yetenekleri gibi yapısal ve fonksiyonel özelliklerine bağlıdır. Bitki proteinleri, amino asit bileşimlerine, moleküler ağırlıklarına ve diğer faktörlere bağlı olarak köpürme kapasiteleri ve stabilitesi bakımından farklılık göstermektedir [47]. Çalışmada elde edilen köpürme kapasitesi %37.50, köpük stabilitesi ise 10. ve 30. dk için sırasıyla %73.33 ve %60.00 olarak belirlenmiştir (Tablo 4). Literatürde yer alan bir çalışmada nohut proteinlerinin köpürme kapasiteleri %41.93-58.06 olarak saptanmıştır [36]. Farklı bitkisel proteinler ile yapılan başka bir çalışmada proteinlerin köpürme kapasiteleri incelenmiştir (Vişne çekirdeği proteini: %39; nar çekirdeği proteini: %46.50 ve bezelye proteini: %92.50). Aynı çalışmada proteinlerin köpük stabilitesi de incelenmiş ve vişne çekirdeği (%0.00), nar çekirdeği (%9.02) ve bezelye (%83.50) proteinleri rapor edilmiştir [39]. Ayrıca dondurarak kurutma ile elde edilen vişne çekirdeği proteinlerinin köpürme kapasitesi ve köpük stabilitesi değerleri sırasıyla %9.00 ve %4.00 olarak bildirilmiştir [43].

EAI, bir proteinin bir emülsiyonu stabilize etme yeteneğinin bir ölçüsüdür. Belirli koşullar altında belirli bir miktarda su içinde yağ emülsiyonunu stabilize etmek için gereken protein miktarını belirtmektedir. ESI ise, bir proteinin, bir emülsifiye edici madde tarafından bir arada tutulan ve birbiriyle karışmayan iki sıvının (genellikle yağ ve su) karışımı olan bir emülsiyonu stabilize etme yeteneğini ifade etmektedir [46]. Örneğin EAI değeri  $15.36\text{ m}^2/\text{g}$ , ESI 10. ve 30. dk için sırasıyla  $62.24$  ve  $181.30$  olarak tespit edilmiştir. EAI'nın yüksek olması, hidrofobik amino asit kalıntılarının açığa çıkmasına yol açan ve sonuç olarak yüzey aktivitesini ve yağ ve su arayüzünde adsorpsiyonu artıran küresel proteinlerin ayrışması ve kısmen açılmasından kaynaklanabileceğine atfedilmiştir [48]. Nohut proteini izolatu ile yapılan çalışmada EAI değeri  $1.08\text{ m}^2/\text{g}$  olarak tespit edilmiştir [42]. Ayrıca nohut proteini üzerine yapılan başka çalışmalarda EAI değerleri  $5.7$ - $253\text{ m}^2/\text{g}$  aralıklarında bildirilmiştir [49-51].

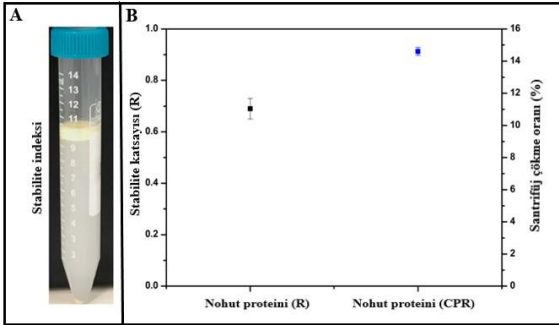
**Tablo 4.** Nohut proteininin tekno-fonksiyonel özellikleri

Parametreler	Değerler
Su tutma kapasitesi (%)	240.24±2.47
Yağ bağlama kapasitesi (%)	213.68±1.96
Köpürme kapasitesi (%)	37.50±0.91
Köpük stabilitesi (%) (10 dk)	73.33±1.76
Köpük stabilitesi (%) (30 dk)	60.00±1.25
Emülsiyon aktivitesi indeksi (EAI) (m <sup>2</sup> /g)	15.36±0.72
Emülsiyon stabilite indeksi (ESI10)	62.24±1.45
Emülsiyon stabilite indeksi (ESI30)	181.30±1.78

Veriler, üç kopyanın (n=3) ortalama ± standart sapması olarak verilmiştir.

### 3.4 Stabilite indeksi, stabilite katsayısı ve santrifüj çökme oranı

Stabilite indeksi, su içinde yağ emülsiyonunun kararlılığını belirlemek amacıyla santrifüj sonrası oluşan faz ayrımına göre belirlenebilmektedir. Kararsız bir yapı sergileyen emülsiyonlarda yağ fazı ve serum fazı ayrılmakta, dolayısıyla emülsiyon stabilitesini koruyamamaktadır. Bu yüzden faz ayrımının en düşük seviyede olması emülsiyon kararlılığı açısından tercih edilmektedir [52]. Nohut proteini ile hazırlanan emülsiyonların stabilite indeksi Şekil 2A' da sunulmuştur. Santrifüjleme işlemi sonrası oluşturulan emülsiyonda yağ fazı ayrımı görülmemiştir. Bu durum nohut proteininin yüzey aktif madde özelliğini ortaya çıkarmaktadır. R ve CPR da su içinde yağ emülsiyonlarının kararlılığını belirleyen parametrelerdendir. Bu değerler, emülsiyon kararlılığı açısından ters korelasyon gösterirler. Stabilitesi yüksek olan emülsiyonların R değeri yüksek, CPR değeri düşük olur [25].



**Şekil 2.** Nohut proteininin stabilite indeksi, stabilite katsayısı ve santrifüj çökme oranı.

Nohut proteini ile hazırlanan emülsiyon için R değeri 0.68, CPR değeri ise %14.60 bulunmuştur (Şekil 2B). Li ve ark., (2019) kolza proteini ile oluşturulan emülsiyonun stabilitesini araştırdıkları çalışmalarında, 0 ile 1 arasında olan R değerinin 1'e yaklaştıkça emülsiyonun kararlılığının arttığı ve daha stabil bir yapı gösterdiği, kolza proteini içeren emülsiyonda R değerinin 0.40 olduğu, CPR değerinin ise yaklaşık %43 olduğu rapor edilmiştir [25]. Nohut proteininin R değerinin (0.68) daha yüksek, CPR değerinin (%14.60) ise düşük olması, bu proteinin emülsiyon içerisinde sergilemiş olduğu davranışı ortaya koymaktadır. Ayrıca emülsiyon

aktivitesi, emülsiyon stabilitesi analizleri sonuçlarının da bu durumu desteklediği görülmüştür.

## 4 Sonuçlar

Son yıllarda, ekolojik, sağlık ve hayvan refahı üzerindeki etkileri nedeniyle hayvansal protein kaynakları yerini bitkisel kökenli proteinlere bırakmaya başlamıştır. Bitkisel bazlı proteinler arasında soya, bezelye ve nohut gibi protein kaynakları ön plana çıkmaktadır. Bu çalışmada, ultrases ve çözücü pH'sının eş zamanlı uygulama yaklaşımı ile optimize edilmiş nohut proteininin spektrofotometrik, tekno-fonksiyonel ve emülsiyon özellikleri araştırılmıştır. Ultrases ile özütleme nohut proteininin emülsifiye edici ve köpük oluşturma özelliklerine sahip olduğu ve bu sayede çeşitli gıda uygulamaları için kabul edilebilir olabileceği tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan bu çalışma, protein kaynaklarının çeşitlendirilmesine, gıda uygulamalarında nohut proteininin yüzey aktif madde ve doğal emülgatör olarak kullanımına yönelik çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

### Çıkar çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

### Benzerlik oranı (iThenticate): % 11

### Kaynaklar

- [1] R. Dias, C.B. Pereira, R. Pérez-Gregorio, N. Mateus, and V. Freitas, Recent advances on dietary polyphenol's potential roles in Celiac Disease, Trends in Food Science & Technology, 107, 213–225, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.033>.
- [2] S. Redecillas-Ferreiro, A. Moráis-López, and J. Manuel Moreno-Villares, Position paper on vegetarian diets in infants and children. Committee on Nutrition and Breastfeeding of the Spanish Paediatric Association, Anales de Pediatría (English Edition). 92, 306.e1-306.e6, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.anpede.2019.10.004>.
- [3] M. Nikbakht Nasrabadi, A. Sedaghat Doost, and R. Mezzenga, Modification approaches of plant-based proteins to improve their techno-functionality and use in food products, Food Hydrocolloids, 118, 106789, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106789>.
- [4] X. Pi, Y. Sun, X. Deng, D. Xin, J. Cheng, and M. Guo, Investigation of differences in allergenicity of protein from different soybean cultivars through LC/MS-MS, International Journal of Biological Macromolecules, 220, 1221–1230, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.154>.
- [5] C. Bi, S. Chi, T. Zhou, J. Zhang, X. Wang, J. Li, W. Shi, B. Tian, Z. Huang, and Y. Liu, Effect of low-frequency high-intensity ultrasound (HIU) on the physicochemical properties of chickpea protein, Food Research International, 159, 111474, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111474>.
- [6] J. Glusac, S. Isaschar-Ovdat, and A. Fishman, Transglutaminase modifies the physical stability and digestibility of chickpea protein-stabilized oil-in-water emulsions, Food Chemistry, 315, 126301, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126301>.

- [7] E.M. Papalamprou, G.I. Doxastakis, C.G. Biliaderis, and V. Kiosseoglou, Influence of preparation methods on physicochemical and gelation properties of chickpea protein isolates, *Food Hydrocolloids*, 23, 337–343, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.03.006>.
- [8] F. Potin, E. Goure, S. Lubbers, F. Husson, and R. Saurel, Functional properties of hemp protein concentrate obtained by alkaline extraction and successive ultrafiltration and spray-drying, *International Journal of Food Science & Technology*, 57, 436–446, 2022. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15425>.
- [9] M. Mutlu, and A.A. Hayaloglu, Determination of bioactivity of seed protein hydrolysates and amygdalin content for some apricot (*Prunus armeniaca L.*) varieties grown in Malatya, Turkey, *Food Analytica Group*, 2022. <https://doi.org/10.57252/10.57252.2022.2>.
- [10] Z. Gao, P. Shen, Y. Lan, L. Cui, J.-B. Ohm, B. Chen, and J. Rao, Effect of alkaline extraction pH on structure properties, solubility, and beany flavor of yellow pea protein isolate, *Food Research International*, 131, 109045, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109045>.
- [11] M. Çelik, M. Güzel, and M. Yildirim, Effect of pH on protein extraction from sour cherry kernels and functional properties of resulting protein concentrate, *Journal of Food Science & Technology*. 56, 3023–3032, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03785-8>.
- [12] L.M. Devi, and L.S. Badwaik, Influence of temperature, time and alkali concentration on protein extraction from muskmelon seed meal, *Indian Chemical Engineer*, 64, 219–226, 2022. <https://doi.org/10.1080/00194506.2021.1915887>.
- [13] A. Ochoa-Rivas, Y. Nava-Valdez, S.O. Serna-Saldívar, and C. Chuck-Hernández, Microwave and Ultrasound to Enhance Protein Extraction from Peanut Flour under Alkaline Conditions: Effects in Yield and Functional Properties of Protein Isolates, *Food and Bioprocess Technology*, 10, 543–555, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1838-3>.
- [14] M. Tirgar, P. Silcock, A. Carne, and E.J. Birch, Effect of extraction method on functional properties of flaxseed protein concentrates, *Food Chemistry*, 215, 417–424, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.002>.
- [15] Hao Feng, Gustavo Barbosa-Canovas, and Jochen Weiss, *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*, Springer New York, New York, NY, 2011. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7472-3>.
- [16] B.K. Tiwari, Ultrasound: A clean, green extraction technology, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100–109, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>.
- [17] K. Kumar, S. Srivastav, and V.S. Sharanagat, Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review, *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>.
- [18] N. Teslić, N. Bojanić, D. Rakić, A. Takači, Z. Zeković, A. Fišteš, M. Bodroža-Solarov, and B. Pavlić, Defatted wheat germ as source of polyphenols—Optimization of microwave-assisted extraction by RSM and ANN approach, *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 143, 107634, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.107634>.
- [19] H. Alasalvar, and Z. Yildirim, Ultrasound-assisted extraction of antioxidant phenolic compounds from *Lavandula angustifolia* flowers using natural deep eutectic solvents: An experimental design approach, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 22, 100492, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100492>.
- [20] M. Lei, F.-C. Jiang, J. Cai, S. Hu, R. Zhou, G. Liu, Y.-H. Wang, H.-B. Wang, J.-R. He, and X.-G. Xiong, Facile microencapsulation of olive oil in porous starch granules: Fabrication, characterization, and oxidative stability, *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 755–761, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.051>.
- [21] S.M. Cho, K.S. Kwak, D.C. Park, Y.S. Gu, C.I. Ji, D.H. Jang, Y.B. Lee, and S.B. Kim, Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage, *Food Hydrocolloids*, 18, 573–579, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2003.10.001>.
- [22] H.W. Lee, Y. Lu, Y. Zhang, C. Fu, and D. Huang, Physicochemical and functional properties of red lentil protein isolates from three origins at different pH, *Food Chemistry*, 358, 129749, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129749>.
- [23] W. Wang, G. Du, C. Li, H. Zhang, Y. Long, and Y. Ni, Preparation of cellulose nanocrystals from asparagus (*Asparagus officinalis L.*) and their applications to palm oil/water Pickering emulsion, *Carbohydrate Polymers*, 151, 1–8, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.052>.
- [24] B. Başıyigit, Arap Zamkı, Karboksimetil Selüloz ve Maltodekstrin ile Stabilize Edilmiş Su İçinde Yağ Bazlı Emülsiyon Sistemlerinin Stabilitate Davranışları, *Journal of the Institute of Science and Technology*, 341–351, 2023. <https://doi.org/10.21597/jist.1201844>.
- [25] Q. Li, Z. Wang, C. Dai, Y. Wang, W. Chen, X. Ju, J. Yuan, and R. He, Physical stability and microstructure of rapeseed protein isolate/gum Arabic stabilized emulsions at alkaline pH, *Food Hydrocolloids*, 88, 50–57, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.020>.
- [26] F. Chemat, Zill-e-Huma, and M.K. Khan, Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction, *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 813–835, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>.
- [27] M.C. Herrera, and M.D. Luque de Castro, Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection, *Journal of*



- Chromatography A, 1100, 1–7, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.09.021>.
- [28] I.Y. Mizubuti, O. Biondo Júnior, L.W. de Oliveira Souza, R.S. dos Santos Ferreira da Silva, and E.I. Ida, Response surface methodology for extraction optimization of pigeon pea protein, Food Chemistry, 70, 259–265, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00078-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00078-9).
- [29] L. Quanhong, and F. Cai, Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein, Food Chemistry, 92, 701–706, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.042>.
- [30] P.I. Haris, Probing protein–protein interaction in biomembranes using Fourier transform infrared spectroscopy, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1828, 2265–2271, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.04.008>.
- [31] J. Kong, and S. Yu, Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures, Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 39, 549–559, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x>.
- [32] S.E. Ebrahimi, A. Koocheki, E. Milani, and M. Mohebbi, Interactions between *Lepidium perfoliatum* seed gum – Grass pea (*Lathyrus sativus*) protein isolate in composite biodegradable film, Food Hydrocolloids, 54, 302–314, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.10.020>.
- [33] J. Liu, M. Wu, M. Wang, Y. Zou, Z. Tan, D. Wang, and X.S. Sun, Predicting the content of camelina protein using FT-IR spectroscopy coupled with SVM model, Cluster Computing, 22, 8401–8406, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10586-018-1838-3>.
- [34] M.C. Cortez-Trejo, M. Gaytán-Martínez, M.L. Reyes-Vega, and S. Mendoza, Protein-gum-based gels: Effect of gum addition on microstructure, rheological properties, and water retention capacity, Trends in Food Science & Technology, 116, 303–317, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.030>.
- [35] A.K. Jukanti, P.M. Gaur, C.L.L. Gowda, and R.N. Chibbar, Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review, British Journal of Nutrition, 108, S11–S26, 2012. <https://doi.org/10.1017/S0007114512000797>.
- [36] A.M. Ghribi, I.M. Gafsi, C. Blecker, S. Danthine, H. Attia, and S. Besbes, Effect of drying methods on physico-chemical and functional properties of chickpea protein concentrates, Journal of Food Engineering, 165, 179–188, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.06.021>.
- [37] N. Mesfin, A. Belay, and E. Amare, Effect of germination, roasting, and variety on physicochemical, techno-functional, and antioxidant properties of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein isolate powder, Heliyon, 7, 2021.
- [38] M.N. Perović, B.S. Pajin, and M.G. Antov, The effect of enzymatic pretreatment of chickpea on functional properties and antioxidant activity of alkaline protein isolate, Food Chemistry, 374, 131809, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131809>.
- [39] B. Başığit, M. Yücepete, A. Karaaslan, and M. Karaaslan, High efficiency microencapsulation of extra virgin olive oil (EVOO) with novel carrier agents: Fruit proteins, Materials Today Communications, 28, 102618, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2021.102618>.
- [40] T.A. El-Adawy, Functional properties and nutritional quality of acetylated and succinylated mung bean protein isolate, Food Chemistry, 70, 83–91, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00079-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00079-0).
- [41] J.F. Zayas, Oil and Fat Binding Properties of Proteins, in: Functionality of Proteins in Food, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 228–259, 1997. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-59116-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-59116-7_5).
- [42] G. Zhu, Y. Li, L. Xie, H. Sun, Z. Zheng, and F. Liu, Effects of enzymatic cross-linking combined with ultrasound on the oil adsorption capacity of chickpea protein, Food Chemistry, 383, 132641, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132641>.
- [43] B. Başığit, A. Görgüç, E. Gençdağ, Ü. Cansu, F.M. Yılmaz, and M. Karaaslan, Functional characterization of high-yield plant protein powder valorized from de-oiled sour cherry seed using microwave-assisted enzymatic extraction followed by spray- and freeze-drying, Biomass Conversion and Biorefinery, 2022. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03225-2>.
- [44] J.E. Kinsella, and N. Melachouris, Functional properties of proteins in foods: A survey, C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 7, 219–280, 1976. <https://doi.org/10.1080/10408397609527208>.
- [45] C.J. Zhao, A. Schieber, and M.G. Gänzle, Formation of taste-active amino acids, amino acid derivatives and peptides in food fermentations – A review, Food Research International, 89, 39–47, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.042>.
- [46] I.A. Wani, D.S. Sogi, U.S. Shivhare, and B.S. Gill, Physico-chemical and functional properties of native and hydrolyzed kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates, Food Research International, 76, 11–18, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.027>.
- [47] S.E. Molina Ortiz, and J.R. Wagner, Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties, Food Research International, 35, 511–518, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00149-1](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00149-1).
- [48] I. Nir, Y. Feldman, A. Aserin, and N. Gartu, Surface Properties and Emulsification Behavior of Denatured Soy Proteins, Journal of Food Science, 59, 606–610, 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb05573.x>.
- [49] T. Zhang, B. Jiang, W. Mu, and Z. Wang, Emulsifying properties of chickpea protein isolates: Influence of pH and NaCl, Food Hydrocolloids, 23, 146–152, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.12.005>.
- [50] J.I. Boye, S. Aksay, S. Roufik, S. Ribéreau, M. Mondor, E. Farnworth, and S.H. Rajamohamed,



- Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques, *Food Research International*, 43, 537–546, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.021>.
- [51] A.C. Karaca, N. Low, and M. Nickerson, Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction, *Food Research International*, 44, 2742–2750, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.012>.
- [52] D.J. McClements, Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 611–649, 2007. <https://doi.org/10.1080/10408390701289292>

