



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



PROTEİN ÇEŞİDİ VE ISITMA ŞARTLARININ
NANOFİBRİLE PROTEİNLERİN
ÖZELLİKLERİNE ETKİSİ

Canan KURU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Temmuz-2025
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Canan KURU tarafından hazırlanan “Protein çeşidi ve ısıtma şartlarının nanofibrile proteinlerin fiziksel kimyasal ve teknolojik özelliklerine etkisi” adlı tez çalışması 10/07/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Unvanı Adı SOYADI

.....

Danışman

Doç. Dr. İsmail TONTUL

.....

Üye

Unvanı Adı SOYADI

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Havvanur UÇBEYİAY
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından 1230687 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Canan KURU

Tarih: Temmuz 2025

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROTEİN ÇEŞİDİ VE ISITMA ŞARTLARININ NANOFİBRİLE PROTEİNLERİN ÖZELLİKLERİNE ETKİSİ

Canan KURU

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İsmail TONTUL

2025, 50 Sayfa

Jüri

Doç. Dr. İsmail TONTUL

Prof. Dr. Nilgün ERTAŞ

Dr. Öğr. Üyesi Hümeysra ÇETİN BABAĞLU

Bu çalışmanın amacı, farklı kaynaklı (peynir altı suyu proteini, pirinç proteini izolatu, bezelye proteini izolatu ve gluten) proteinleri asidik ortamda belirli sürelerle ısıtarak düz ve kıvrımlı nanofibriller oluşturmak ve bu nanofibrille proteinlerin ikincil yapısal dönüşümlerini, fizikokimyasal özelliklerini ve fonksiyonel performanslarını kapsamlı olarak değerlendirmektir.

FTIR ve dairesel dikroizm spektroskopisi sonuçları, nanofibrilasyonun özellikle β -plaka ve antiparalel β -plaka oranlarını artırdığını ve peynir altı suyu ile pirinç proteininin bu dönüşümde en başarılı profili sergilediğini göstermiştir. Bezelye proteini, yüksek sıcaklığa karşı daha duyarlı bulunmuş, gluten ise tüm sürelerde tutarlı fibril özellikleri ortaya koymuştur.

Morfolojik optimizasyon açısından düz fibril oluşumu için 36 saatlik ısıtma, kıvrımlı fibril oluşumu için ise 24 saatlik ısıtma en elverişli koşullar olarak belirlenmiştir. 48 saatlik uzun süreli işlem bazı örneklerde fibril yapının bozulmasına yol açmıştır.

Fizikokimyasal analizler, kıvrımlı nanofibrillerin daha yüksek yüzey hidrofobisitesi, higroskopisite ve yoğunluk değerlerine; düz nanofibrillerin ise daha iyi akışkanlık ve düşük kohezifliğe sahip olduğunu ortaya koymuştur. Emülsiyon aktivite ve stabilite testleri, özellikle peynir altı suyu proteini nanofibrillerinin üstün performans sergilediğini ve 36 saatlik ısıtmanın stabiliteyi maksimize ettiğini göstermiştir.

Sonuç olarak, protein kaynağı ve ısıtma süresi nanofibril özelliklerini belirlemede kritik rol oynamaktadır. Elde edilen bulgular, fonksiyonel gıda ve yüzey-aktif ajan uygulamalarında nanofibril tasarımı için yol gösterici niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Asidik ısıtma, emülsifiye edici özellikler, ikincil yapılar, modifiye proteinler, nanofibrilasyon

ABSTRACT

MS THESIS

THE EFFECT OF PROTEIN TYPE AND HEATING CONDITIONS ON THE PROPERTIES OF NANOFIBRILLATED PROTEINS

Canan KURU

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN FOOD ENGINEERING**

Advisor: Assoc. Prof. Dr. İsmail TONTUL

2025, 51 Pages

Jury

Assoc. Prof. Dr. İsmail TONTUL

Prof. Dr. Nilgün ERTAŞ

Assist. Prof. Dr. Hümeyra ÇETİN BABAÖĞLU

The objective of this study was to generate both straight and curled nanofibrils by subjecting proteins from different sources (whey protein, rice protein isolate, pea protein isolate and gluten) to acidic heat treatment for defined durations, and to comprehensively evaluate the secondary structural transformations, physicochemical characteristics and functional performance of these nanofibrillated proteins.

FTIR and circular dichroism spectroscopy results demonstrated that the nanofibrillation process markedly increased the β -sheet and antiparallel β -sheet contents, with whey protein and rice protein exhibiting the most pronounced structural conversion profiles. Pea protein proved more sensitive to elevated temperatures, whereas gluten consistently maintained its fibrillar characteristics across all treatment times.

In terms of morphological optimization, a 36-hour heat treatment was identified as optimal for straight fibril formation, while a 24-hour treatment yielded the most favorable curled fibrils. Extended processing for 48 hours led to fibril degradation in certain samples.

Physicochemical analyses revealed that curled nanofibrils possessed higher surface hydrophobicity, hygroscopicity and density values, whereas straight nanofibrils exhibited superior flowability and lower cohesiveness. Emulsion activity and stability assays showed that whey protein nanofibrils delivered exceptional performance, and that a 36-hour treatment maximized emulsion stability.

In conclusion, protein source and heating duration critically govern nanofibril properties. The findings provide guidance for nanofibril design in functional food and surface-active agent applications.

Keywords: Acidic heating, emulsifying properties, modified proteins, nanofibrillation, secondary structures

ÖNSÖZ

Proteinlerin çeşitli yöntemlerle modifiye edilmesi yoluyla işlevsel özelliklerinin iyileştirilmesi, yeni nesil gıda bileşenlerinin geliştirilmesine olanak tanımaktadır. Nanofibrilasyon, bu amaçla kullanılan ve potansiyeli yüksek olan bir tekniktir. Özellikle emülsifiye edici özellikleri artırılmış, kontrollü higroskopisiteye ve istenilen yoğunluk özelliklerine sahip nanofibril proteinler; soslar, içecekler, et ikameleri, yüksek proteinli atıştırmalıklar ve enkapsülasyon sistemleri gibi birçok uygulamada katkı maddesi veya taşıyıcı sistem olarak değerlendirilebilir. Ayrıca bitkisel protein kaynaklarının bu süreçle fonksiyonel hale getirilmesi, sürdürülebilirlik ve temiz etiketli ürün trendleriyle uyumlu çözümler sunmaktadır. Bu bağlamda çalışma, protein bazlı gıda bileşenlerinin yeniden yapılandırılması yoluyla daha stabil, fonksiyonel ve tüketici odaklı ürünlerin geliştirilmesine bilimsel altyapı sağlamaktadır.

Tez sürecimin her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren değerli hocam Doç. Dr. İsmail TONTUL'a minnettarım. Ayrıca laboratuvar çalışmalarım sırasında her zaman desteklerini hissettiren Arş. Gör. Dr. Vildan EYİZ ve Dr. Merve AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmaya 1230687 numaralı proje kapsamında finansal destek sağlayan TÜBİTAK'ın değerli yetkililerine ve emeği geçen tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca bana her koşulda destek olan, sevgisini ve inancını daima hissettiren aileme gönülden teşekkürlerimi iletirim.

Canan KURU
KONYA-2025

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Proteinlerin Beslenme için Önemi	3
2.2. Proteinlerin Teknolojik Özellikleri	3
2.3. Modifiye Proteinler	4
2.3.1 Fiziksel modifikasyon	5
2.3.2 Kimyasal modifikasyon	5
2.3.3 Enzimatik modifikasyon	6
2.4. Nanofibrilasyon	6
2.4.1 Hayvansal Protein Fibrilleri	9
2.4.2 Bitkisel Protein Nanofibrilleri	9
2.4.3 Nanofibrile proteinlerin teknolojik özellikleri	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	14
3.1. Materyal	14
3.2. Protein nanofibrillerin elde edilmesi	14
3.3. Analizler.....	15
3.3.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi.....	15
3.3.2 Floresans spektroskopi.....	15
3.3.3 Dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi	15
3.3.4 Kuru madde miktarı	15
3.3.5 Protein içeriği.....	15
3.3.6 Yığın yoğunluğu ve parçacık yoğunluğu tayini.....	16
3.3.7 Yüzey hidrofobisitesi	16
3.3.8 Emülsifikasyon özelliklerinin belirlenmesi	17
3.3.9 Higroskoposite	17
3.3.10 İstatiksel analizler	17
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	18
4.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi.....	18
4.2. Floresans spektroskopi.....	26
4.3. Dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi	31
4.4. Kuru madde içeriği	36
4.5. Protein İçeriği	37

4.6.	Yığın yoğunluğu ve sıkıştırılmış yoğunluk	39
4.7.	Akışkanlık ve koheziflik	40
4.8.	Higroskopisite	42
4.9.	Yüzey hidrofobisitesi	43
4.10.	Emülsifikasyon özellikleri	44
4.11.	Genel değerlendirme	47
5.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	48
5.1.	Sonuçlar	48
5.2.	Öneriler	49
6.	KAYNAKLAR	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

XRD	X-ışını kırınımı
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
CD	Dairesel dikroizm
SDS	Sodyum dodesil sülfat
EAI	Emülsiyon aktivite indeksi
ESI	Emülsiyon stabilite indeksi
PASPI	Peynir altı suyu protein izolatu
24NW	24 saat ısıtma ile elde edilmiş düz peynir altı suyu proteini nanofibrili
24CW	24 saat ısıtma ile elde edilmiş kıvrımlı peynir altı suyu proteini nanofibrili
36NW	36 saat ısıtma ile elde edilmiş düz peynir altı suyu proteini nanofibrili
36CW	36 saat ısıtma ile elde edilmiş kıvrımlı peynir altı suyu proteini nanofibrili
48NW	48 saat ısıtma ile elde edilmiş düz peynir altı suyu proteini nanofibrili
48CW	48 saat ısıtma ile elde edilmiş kıvrımlı peynir altı suyu proteini nanofibrili
BPI	Bezelye protein izolatu
24NB	24 saat ısıtma ile elde edilmiş düz bezelye proteini nanofibrili
24CB	24 saat ısıtma ile elde edilmiş kıvrımlı bezelye proteini nanofibrili
36NB	36 saat ısıtma ile elde edilmiş düz bezelye proteini nanofibrili
36CB	36 saat ısıtma ile elde edilmiş kıvrımlı bezelye proteini nanofibrili
48NB	48 saat ısıtma ile elde edilmiş düz bezelye proteini nanofibrili
48CB	48 saat ısıtma ile elde edilmiş kıvrımlı bezelye proteini nanofibrili
PPI	Pirinç protein izolatu
24NP	24 saat ısıtma ile elde edilmiş düz pirinç proteini nanofibrili
24CP	24 saat ısıtma ile elde edilmiş kıvrımlı pirinç proteini nanofibrili
36NP	36 saat ısıtma ile elde edilmiş düz pirinç proteini nanofibrili
36CP	36 saat ısıtma ile elde edilmiş kıvrımlı pirinç proteini nanofibrili
48NP	48 saat ısıtma ile elde edilmiş düz pirinç proteini nanofibrili
48CP	48 saat ısıtma ile elde edilmiş kıvrımlı pirinç proteini nanofibrili
G	Gluten
24NG	24 saat ısıtma ile elde edilmiş düz gluten nanofibrili
36NG	36 saat ısıtma ile elde edilmiş düz gluten nanofibrili
48NG	48 saat ısıtma ile elde edilmiş düz gluten nanofibrili

1. GİRİŞ

Yaşamı sürdüren faaliyetler için gerekli olan makro besin maddelerinden proteinler, yalnızca beslenme açısından değil, aynı zamanda yapı oluşturucu özellikleri ile önemlidir (Meng ve ark., 2022). Doğal içeriklere yönelik artan talebe yanıt olarak, yenilebilir proteinlerin yapı oluşturucu özelliklerinin geliştirilmesine yönelik büyük bir çaba harcanmaktadır. Denatürasyon, hidroliz ve agregasyon proteinlerin özelliklerini değiştirmektedir. Proteinlerin işleme şartlarına ve iyonik kuvvete bağlı olarak ısı denatürasyonu, esnek yapılar, fibriller ve nano ya da mikro boyutlu partiküller gibi farklı ürünler oluşturmaktadır (Mohammadian ve ark., 2018).

Yüksek asidite ve düşük iyonik kuvvete sahip ortamlarda, proteinlere ısı işlem uygulanması öncelikle denatürasyona neden olmaktadır. Daha sonra oluşan amino asit ve peptitler arasında gerçekleşen hidrofobik etkileşimler, elektrostatik kuvvetler, hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetleri sonucu kendi kendine düzenlenerek protein fibrillerini meydana getirebilmektedir. Amiloid fibriller, diğer küresel ya da düzensiz protein birikimlerinden farklı olarak, yüksek uzunluk-çap oranına sahip doğrusal ve çubuk benzeri yapılar oluşturan özgül denatüre protein agregatlarıdır (Meng ve ark., 2022). Amiloid fibriller, diğer küresel veya rastgele kümelerden farklı, doğrusal yapılara ve yüksek en-boy oranlarına sahip çubuk şeklindeki yapılar olan denatüre protein kümeleri olarak tanımlanabilmektedir. Protein fibrillerinin çoğunun çapı 100 nm'den küçük olduğu için nanofibriller olarak da adlandırılmaktadır (Wawer ve ark., 2019).

Gıda nanofibrillerindeki çok sayıda çapraz β -tabaka ve "sterik fermuar" yapıları, onlara belirli çevresel koşullar altında istenen yapı ve özellik stabilitesini sağlamaktadır (Riek ve Eisenberg, 2016). Bu nedenle protein fibrillerinin oluşum mekanizmasının anlaşılması ile fibrilasyon koşulları ve etkileyen faktörler konusunda bilgi sahibi olmak oldukça önemlidir. Doğal proteinler ile karşılaştırıldığında, protein nanofibrilleri hem biyolojik olarak hem de viskozite, jelleşme, emülsifikasyon, köpürme, antioksidan ve antimikrobiyal aktivite gibi teknolojik açıdan önemli farklılıklar göstermektedir (Mohammadian ve Madadlou, 2018).

Bu çalışmanın amacı hayvansal ve bitkisel kaynaklı 4 farklı proteinden düz ve kıvrımlı morfolojiye sahip nanofibrillerin eldesidir. Bu amaçla farklı ısıtma sürelerinde ısı işlem uygulanarak ısı işlemin etkileri de incelenmiştir. Elde edilen nanofibrille

yapıların fiziksel, kimyasal ve teknolojik özellikleri analiz edilerek, protein kaynağı, nanofibril morfolojisi ve ısıtma süresinin bu özellikler üzerine etkileri araştırılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Proteinlerin Beslenme için Önemi

Proteinler, insan beslenmesinde temel makro besin öğelerinden biri olup, büyüme, gelişme, doku onarımı ve metabolik fonksiyonların sürdürülmesinde hayati rol oynar. Amino asitlerden oluşan bu büyük moleküller, vücutta enzim, hormon, antikor ve taşıyıcı proteinlerin yapımında kullanılır. Özellikle kaslar, organlar ve bağ dokular gibi yapısal bileşenlerin temelini oluştururlar.

Vücudumuz, 20 amino asitten 9'unu sentezleyemez. Elzem amino asitler olarak adlandırılan bu amino asitler diyetle alınmalıdır. Yeterli miktarda ve dengeli amino asit profiline sahip proteinler, büyüme, bakım ve sağ kalım için gereklidir. Protein kalitesi, bir proteinin sindirilebilirliği ve elzem amino asit içeriğiyle değerlendirilir. Yüksek kaliteli proteinler, sindirimi kolay olan ve tüm elzem amino asitleri yeterli miktarda sağlayan proteinlerdir (Calvez ve ark., 2024).

Diyetle alınan proteinler, sindirim sırasında oluşan peptitler aracılığıyla iştah düzenlemesi, glukoz ve lipid metabolizması, kan basıncı, kemik metabolizması ve bağışıklık fonksiyonları gibi birçok fizyolojik süreci etkiler. Ayrıca, proteinlerin sindirimi sırasında oluşan biyoaktif peptitler, bağırsak mikrobiyotasıyla etkileşime girerek sağlık üzerinde olumlu etkiler sağlayabilir (Jahan-Mihan ve ark., 2011; Shahnaz ve ark., 2024).

Yetersiz protein alımı, özellikle gelişmekte olan ülkelerde ciddi sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Protein eksikliği, büyüme geriliği, bağışıklık sistemi zayıflığı, anemi, kas kaybı ve hatta ölüme sonuçlanabilir. Dünya genelinde yaklaşık bir milyar insanın kronik protein yetersizliği yaşadığı tahmin edilmektedir (Wu 2016).

Gelişmiş ülkelerde ise protein alımı genellikle yeterli olsa da yaşlılar, vejetaryenler ve veganlar gibi belirli gruplarda protein kalitesi ve miktarı açısından eksiklikler görülebilmektedir. Düşük kaliteli protein kaynaklarına dayalı diyetler, elzem amino asitlerin yetersiz alımına ve dolayısıyla sağlık sorunlarına neden olabilmektedir (Moughan ve ark., 2024).

2.2. Proteinlerin Teknolojik Özellikleri

Proteinler, gıda endüstrisinde sadece besin ögesi olarak değil, aynı zamanda ürünlerin yapısal ve duyuşal özelliklerini belirleyen temel bileşenler olarak da önemli rol oynar. Bu teknolojik özellikler, proteinlerin fiziksel ve kimyasal davranışlarını ifade

eder ve gıda ürünlerinin işlenmesi, stabilitesi, dokusu ve tüketici kabulü üzerinde doğrudan etkilidir.

Proteinlerin teknolojik özellikleri arasında çözünürlük, su ve yağ bağlama kapasitesi, emülsifiye etme, köpük oluşturma ve stabilizasyon, jel oluşturma yeteneği ve viskozite gibi fonksiyonel özellikler bulunur (Pojić ve ark., 2018; Qamar ve ark., 2020). Her ne kadar hem hayvansal hem de bitkisel proteinler çeşitli fonksiyonel özelliklere sahip olsa da genel olarak hayvansal proteinler teknolojik özellikler açısından daha üstündür. Nitekim özellikle süt kaynaklı peynir altı suyu proteini ve sodyum kazeinat gibi proteinler film oluşturuucu, emülsifiye edici ve kıvam artırıcı özellikleri nedeniyle çeşitli gıda formülasyonlarında katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Ancak hem ucuz olmaları hem de sürdürülebilirlik ve etiksel avantajları nedeniyle bitki proteinlerine olan ilgi artış göstermektedir (Day ve ark., 2022).

Özellikle bitki bazlı gıdalara olan ilginin artması üreticileri çok yönlü katkı maddelerini kullanmaya itmektedir. Nitekim hayvansal gıdalara benzer yapısal özelliklerin sağlanması için bazı gıdalarda onlarca farklı katkı maddesi kullanmayı gerektirebilmektedir (Jaeger ve ark 2024). Bu nedenle özellikle bitkisel proteinlerin teknolojik özelliklerini geliştirmek veya yenilikçi özellikler kazandırmak amacıyla çeşitli işlemler uygulanmaktadır.

2.3. Modifiye Proteinler

Bitkisel proteinlerin kısıtlı fizikokimyasal işlevsellikleri, genel olarak gıda ürünlerinde kullanımlarını sınırlamaktadır. Bir proteinin çözünürlüğünün düşük olması gıda formülasyonuna dahil edilmesini zorlaştırmakta ve kompakt, kümelenmiş ve esnek olmayan yapısı, ara yüzleri stabilize etme yeteneklerini sınırlamaktadır (Day ve ark., 2022).

Hayvansal ve bitkisel proteinler arasındaki yapısal farklılıklar, duyuusal özellikler üzerinde büyük etki de dâhil olmak üzere birçok üründe doğrudan ikameyi engellemektedir. Ancak, proteinlere uygulanan çeşitli işlemlerle, özelliklerinin değiştirilmesi ve fonksiyonelliğinin geliştirilmesi mümkündür. Böylece tüketiciler tarafından kabul edilebilirliği yüksek yenilikçi bitkisel protein çözümleri tasarlanabilmektedir (Day ve ark., 2022). Geliştirilmesi istenen teknolojik özelliğe bağlı olarak farklı modifikasyon uygulamaları gerekmektedir (Phillips, 2013). Nitekim protein tek başına veya diğer bileşenlerle kombinasyon halinde fiziksel, kimyasal

ve/veya enzimatik (biyokimyasal) işlemlerle modifiye edilebilmektedir (Day ve ark., 2022).

2.3.1 Fiziksel modifikasyon

Protein yapısını izole olarak veya bir gıda matrisinin parçası olarak değiştirmek için bazı kuvvet alanlarının uygulanmasını içeren protein modifikasyon yaklaşımları fiziksel modifikasyon olarak sınıflandırılabilir. Genellikle, bu teknikler protein boyutunun küçültülmesine veya yeniden dağıtılmasına, yapının açılmasına veya protein konformasyonunun kalıcı denatürasyonuna sebep olmaktadır (Akharume ve ark., 2021). Fiziksel işlemler ısı işlem, yüksek hidrostatik basınç (Balasubramaniam ve ark., 2015), ultrason (Gharibzahedi ve Smith, 2020), basınçlı homojenizasyon, darbeli elektrik alanları (Zhang ve ark., 2021) veya diğer kesme işlemleri (Bekard ve ark., 2011) gibi prosesleri içermektedir. Ayrıca, ekstrüzyon ve soğuk plazma teknolojisi de fiziksel işlemlerle modifikasyon prosesine dâhildir (Akharume ve ark., 2021).

2.3.2 Kimyasal modifikasyon

Kimyasal modifikasyonlar, kimyasal ajanlar kullanılarak orijinal protein yapılarının bütünlüğünü değiştiren bağların kırılması veya yeni bağların oluşmasına neden olan reaksiyonlarla gerçekleşmektedir. Bu yaklaşımla, protein yan zincirlerinin (amino, karboksil, disülfür/sülfidril, imidazol, indol, fenolik ve tiyoester gibi) kimyasal reaksiyondaki reaktifliğinden yararlanılarak, protein biyofiziksel özellikleri ve fonksiyonelliği düzenlemektedir. Böylece, bazı amino asit kalıntılarının ϵ -amino grubunu veya diğer amino ve hidroksil gruplarını ikame ederek protein üzerindeki net yük değişmektedir (Panyam ve Kilara, 1996). Kimyasal olarak modifiye edilmiş proteinlerin doğal moleküllere kıyasla gelişmiş fonksiyonel özellik gösterdiği belirlenmiştir. Ancak, kimyasal modifikasyon tekniklerinin ticarileştirilmesi toksik kimyasal yan ürünlerin oluşumu, maliyet ve tüketici kabulünün düşüklüğü gibi nedenlere sınırlıdır (Sun-Waterhouse ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2018). Bu nedenle, kimyasal modifikasyon, temiz etiketli ürünlere olan ilgiden ötürü, gıda endüstrisinde daha az tercih edilen bir modifikasyon tekniğidir. Kimyasal modifikasyonlar deamidasyon (Webb ve ark., 2002; Yao ve Zhao, 2015), süksinilasyon (Delahaije ve ark., 2014), asetilasyon (Yin ve ark., 2009) fosforilasyon (Li ve ark., 2010) ve glikozilasyon (Akharume ve ark., 2021) reaksiyonlarını içermektedir.

2.3.3 Enzimatik modifikasyon

Bir proteinin yapısal özelliklerini değiştirmek için proteolitik ve proteolitik olmayan enzimlerin kontrollü uygulaması enzimatik modifikasyon tekniklerini oluşturmaktadır. İlgi duyulan fonksiyonel özelliklere bağlı olarak, enzimatik modifikasyon, istenen fonksiyonelliği elde etmek için bir protein yapısını parçalamak veya oluşturmak için uygulanabilir. Proteolitik enzimler (pepsin, papain, tripsin ve alkalaz gibi) hidroliz sürecinde fonksiyonelliği değiştirmek için protein birincil amino asit dizisindeki peptit bağlarını kesmek için uygulanırken, proteolitik olmayan enzimler (transglutaminazlar gibi) çapraz bağlama yoluyla proteinin yapıyı değiştirmek ve dokusal özellikleri iyileştirmek için kullanılmaktadır (Buchert ve ark., 2010). Proteolitik enzimler, tripsin, lizin ve arginin gibi temel kalıntıları kesip, kimotripsin, fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi aromatik kalıntıları parçalarken, mikrobiyal transglutaminazlar proteinin glutamin ve lizin kalıntılarını çapraz bağlamaktadır (Ma ve ark., 2005; Gaspar ve de Góes-Favoni, 2015; Akharume ve ark., 2019). Genellikle, enzimatik modifikasyon, hızlı reaksiyon süresi, enzimlerin özgülüğü ve reaksiyon koşulları nedeniyle kimyasal modifikasyona göre daha fazla tercih edilmektedir (De Eslye ve Cheryan, 1981; Buchert ve ark, 2010).

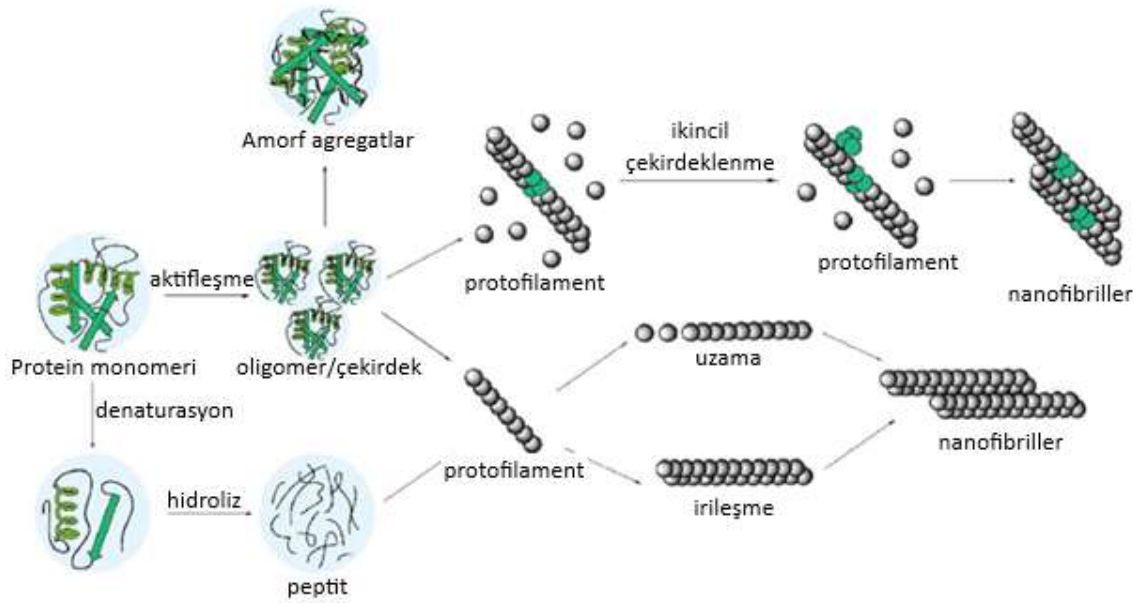
2.4. Nanofibrilasyon

Nanofibrilasyon genellikle karmaşık hiyerarşik sistemlere entegre edilebilen çok küçük yapılar (1 ile 100 nm arasında değişen ölçeklerde) üretmek için kullanılan teknolojiler topluluğunu ifade etmektedir (Chen ve ark., 2001). Nanofibriller ince yapılı, genellikle 2–10 nm çapında ve genellikle 1 µm'den uzun olup iki veya daha fazla spiral olarak düzenlenmiş bir şekildedir.

Protein fibrillerinin oluşumuna dair farklı mekanizmalar ve teoriler geliştirilmiştir. En yaygın şekilde kabul edilen “çekirdeklenmeye bağlı polimerizasyon” modeli, gecikme, gelişme ve olgunluk aşaması olmak üzere üç kademedir oluşmaktadır (Chatani ve Yamamoto 2019). Fibrilasyonun ilk aşaması olarak kabul edilen gecikme dönemi, sıralı yapıları oluşturan kendiliğinden çekirdeklenme sürecini tetikler.. Bu süreç yavaş ilerlemektedir. İkinci aşama, protein veya peptitlerin fibril yapılarına dönüşme oranının en yüksek seviyeye ulaştığı gelişme aşamasıdır. Bu aşamada, oluşan protofilamentler sürekli bir genişleme süreciyle hızla büyümeye devam eder. (Šarić ve ark., 2016). Protein fibrillerinin dengeye ulaşması veya protein rezervlerinin

tükenmesiyle sona eren ve nispeten stabil bir özellik gösteren aşama, olgunluk aşaması olarak tanımlanır.

Protein fibrilasyon süreci için materyal temeline göre, monomer modeli ve polipeptit modeli önerilmektedir. Monomer modeli, proteinlerin denatürasyon ve aktivasyonundan sonra fibriler protein agregatları oluşturabileceğini ileri sürmektedir (Bolder ve ark., 2007). Öte yandan bazı araştırmalar, nanofibril oluşumunda bozulmamış protein monomerlerinden çok, proteoliz sonucu ortaya çıkan peptitlerin daha belirleyici bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Bu yaklaşım ise geniş ilgi gören, polipeptit modeli olarak adlandırılmaktadır (Akkermans ve ark., 2008). Bu modele göre, protein ilk olarak, bu işlem sırasında çekirdek olarak kullanılacak peptitleri üretmek için hidrolize olmaktadır. Fakat, daha yakın zamanda yapılan çalışmalarda protein fibrillerinin ana bileşeninin, protein monomerleri ve peptitleri olduğu belirtilmiştir (Wei ve Huang, 2020).bu mekanizma ve modellere ilave olarak ikincil çekirdeklenme süreci de protein fibril oluşumuna dair en sık araştırılan süreçlerden biri olmuştur. İkincil çekirdeklenme modeline göre, mevcut polimerizasyon ile oluşan birincil çekirdeklerin yüzeyine oligomerlerin eklenmesi ve böylece belirli bir ölçekte polimerleşmesi esasına dayanmaktadır. Yüksek serbest enerjiye sahip "kritik çekirdek" olarak adlandırılan bir yapı, protein monomerlerine göre daha güçlü bir polimerizasyon kapasitesiyle çekirdek oluşturabilmektedir. Böylece, protein monomerleri "çekirdeğin" yüzeyine yapışarak sürekli olarak uzamakta ve olgun protein fibrillerini oluşturmaktadır (Şekil 2.1) (Cao ve ark., 2020). Bu modelde fibril parçalanması, ikincil çekirdeklenme sürecinin temel göstergelerinden biri olarak kabul edildiğinden, dış kaynaklı mekanik kesme kuvvetleri kritik bir rol oynamaktadır.



Şekil 2.1. Protein fibrillerinin oluşum sürecinin ve mekanizmasının şematik diyagramı

Nötr bir pH değerinde, proteinin düşük net yükü daha küçük bir itici kuvvet üretir. Daha sonra, protein molekülleri, opak granüler jeller oluşturmak için hidrofobik etkileşimler, disülfür bağları ve hidrojen bağları yoluyla rastgele agrega oluşturur (Urbonaitė ve ark., 2016). pH izoelektrik noktadan uzaklaştığında, yüksek yüklü protein molekülleri nanofibriller oluşturmak için kendiliğinden birleşmektedir.

Protein konformasyon değişiklikleri, hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler ve hidrofobik etkileşimler gibi moleküller arası etkileşimleri kolaylaştırarak protein fibrilasyonunu teşvik eder (Adamcik ve Mezzenga, 2012). Gıda proteinlerinin çoğu, asidik bir koşulda (örneğin pH 2.0) belirli bir sıcaklıkta veya nötr pH değerinde alkoller veya kaotropik/indirgeyici ajanların varlığında fibrilasyona uğramaktadır (Jansens ve ark., 2019; Lambrecht ve ark., 2019). Yüksek sıcaklık ve asidik koşullarda ısıtma ile katlanmamış proteinler daha fazla hidrolize olarak fibrilasyon sırasında önemli rol oynayan peptitleri serbest bırakır (An ve ark., 2022). Hayvan ve bitki kaynaklı proteinlerin yapısal özelliklerindeki farklılıklar, fibrilasyon sürecinde peptitlerin serbest bırakılma şeklini farklılaştırmaktadır. Örneğin, soya proteini izolatının karmaşık protein bileşimi, fibrilasyon sırasında çeşitli bileşenlerin farklı hidroliz hassasiyetlerine sahip olması nedeniyle çok aşamalı peptit salımına yol açar (Tang ve Wang, 2010)

Nanofibrillerin yapıları, X-ışını kırınımı (XRD), Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi gibi teknikler ile incelenmektedir (Riek ve Eisenberg, 2016).

2.4.1 Hayvansal Protein Fibrilleri

Süt proteinleri esas olarak kazein ve peynir altı suyu proteinlerinden oluşmaktadır. İnek sütündeki kazein, β -kazein, α_{S1} -kazein, α_{S2} -kazein ve κ -kazein olmak üzere birbiriyle ilişkisiz dört protein fraksiyonunun karışımıdır (Wang ve ark., 2020a). κ -kazeinin ve α_{S2} -kazein kolayca nanofibrilasyona uğrar. Bununla birlikte, oluşum süreci klasik çekirdeklenme teorisini izlemez (Lee ve ark., 2019). Öte yandan, β -kazein ve α_{S1} -kazein, fibril agregatlarının oluşumunu etkin biçimde engelleyen ve doğru protein katlanmasını destekleyen koruyucu özellikler sergiler. Ancak heperan sülfatın varlığında, bu proteinler nanofibril yapılar oluşturabilmektedir. Bu durumda bağlanma tepkimesi, moleküler düzeyde hidrojen bağları ve β -kazein ile gerçekleşen hidrofobik etkileşimler aracılığıyla kendiliğinden meydana gelir (Wang ve ark., 2020a).

Yumurtadan elde edilen pek çok protein de uygun koşullar altında kendiliğinden birleşerek fibriller oluşturabilmektedir. Ovalbumin, küresel yapılı bir glikoprotein olup, yumurta beyazında en bol bulunan proteindir. Ovalbuminden, pH 2.5 ve oda sıcaklığında 10 günlük inkübasyon ile fibriller üretebilirken, 15 gün sonra süper fibriller yapılarına sahip agregatlar gözlenmektedir (Pearce ve ark., 2007).

Apo-miyoglobinin fibril oluşum sürecini inceleyen araştırmalar, fibril oluşum zorluğunun protein denatürasyonunun derecesi ile ilişkili olduğu sonucuna varmıştır. (Fändrich ve ark., 2003). Et işleme endüstrisinde, çevresel stres faktörlerine karşı yüksek direnç gösteren ve yapısal stabilitesini sürdürebilen apo- hemoglobin fibrillerinin üretimi amacıyla, kandaki apo-hemoglobin fibrilasyon aşamasına tabi tutulmaktadır (Jayawardena ve ark., 2017).

2.4.2 Bitkisel Protein Nanofibrilleri

Tahıl ve baklagil kaynaklı birçok protein doğrudan ya da saflaştırıldıktan sonra nanofibrilasyon işlemine tabi tutularak elde edilen yapıların özellikleri analiz edilmiştir.

Bitkisel proteinlerin nanofibril yapılar oluşturmadaki potansiyelleri, yalnızca protein fraksiyonlarının yapısal özellikleriyle değil, aynı zamanda içerdiği amino asit kompozisyonuyla da yakından ilişkilidir. Histidin gibi bazı amino asitler, aromatik yapıları ve hidrofil yan zincirleri sayesinde fibril oluşumu sırasında protein-protein

etkileşimlerini kuvvetlendirmekte ve oluşan yapının stabilitesini artırmaktadır. Bu nedenle histidin açısından zengin bitkisel proteinler (soya, bezelye, nohut gibi) nanofibrilasyon çalışmalarında tercih edilen protein kaynakları arasında yer almaktadır.(Wu, 2013; Zhou ve Regenstein, 2005)

Soya proteini, bitkisel kaynaklı proteinler arasında en erişilebilir ve yaygın olarak kullanılanlardan biridir. Çalışmalar, soya proteinin iki ana depolama proteini olarak glisinin (11S globulin) ve β -konglisininden (7S globulin) nanofibrile yapılar üretilbildiği ve proteinde bulunan dahili β -yaprakların fibrilasyon sürecinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. (An ve Li, 2020). İki protein yüksek düzeyde sekans ve yapısal benzerlik göstermesine rağmen, yapılan araştırmalar bu proteinlerin fibril oluşturma kapasitesinin birbirinden farklı olduğunu ortaya koymuştur. β -konglisinin, grisinine kıyasla kendi kendine fibril polimerlerini oluşturma konusunda daha yüksek bir yeteneğe sahiptir ve meydana gelen fibriller daha fazla dallanma göstermektedir (Josefsson ve ark., 2019). Aynı zamanda, soya globulin fibrillerinin bazı özellikleri süt proteinlerinden olan β -laktoglobuline benzerdir. Nitekim, glisin kökenli fibrillerin, hayvansal proteinlerden elde edilen fibril yapılara kıyasla daha yüksek kararlılık ve dayanıklılık sergilediği belirlenmiştir (Wan ve Guo, 2019). Glisin molekülündeki asidik ve bazik yapı birimleri ayrıldığında, asidik alt birimler fibril yapıların oluşumuna daha yatkınken, bazik alt birimler bu oluşumu engellemeye eğilimlidir. Soya proteini fibrillerinin stabilitesi, özellikle çözeltinin pH seviyesi ile doğrudan ilişkilidir. Bu özellik, soya proteini fibrillerinin daha geniş bir uygulama alanına sahip olmasını sınırlayan temel faktörlerden biridir. Wan ve Guo (2019), çevresel pH koşullarının artışı ile birlikte, SPI fibrillerinin yüzeyindeki pozitif yükün korunabilmesi amacıyla katyonik polimerlerin eklenmesi önerilmektedir.

Bezelye proteini besleyici ve hipoalerjenik özellikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılan bir bitki proteini. Albümin ve globülinden oluşan bezelye proteininin esas depo proteinleri, 11S (legumin) ve 7S (vicilin ve convicilin) globulinlerdir. Munialo ve ark., (2014) ısıtma işlemi sırasında tüm bezelye proteinlerinin peptidler oluşturmak üzere hidrolize edildiğini ve bunların yalnızca yarısının protein fibrilleri oluşturmak için kendi kendine bir araya gelebildiğini göstermiştir. Bezelye proteini ile hazırlanan fibriler yapılar, kıvrılmış solucan benzeri ve oldukça yumuşak özellikler göstermiş ve peynir altı suyu proteini fibril yapılarına kıyasla daha fazla dallanma ve kıvrılma özelliklerine sahip olmuştur.

Liu ve Tang (2013) tarafından gerçekleştirilen araştırmada, barbunya proteininin, maş fasulyesi ve kırmızı barbunya proteinlerine kıyasla belirgin şekilde daha yüksek bir fibrilasyon kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca, üç proteinde oluşan fibrillerin sayısı, artan protein konsantrasyonu ile aşamalı olarak artmıştır. Barbunya fasulyesi proteini iyonik kuvvete bağlı bir şekilde fibrilasyon yeteneğini büyük ölçüde geliştirirken, diğer iki proteini ise hafifçe etkilemiştir. Wang ve ark., (2020b) börölce proteini, nohut proteini ve mercimek proteininden nanofibrile protein oluşumunu araştırmışlardır. Asidik ısıtma koşulları altında, bu baklagil proteinleri ilk aşamada denatürasyona uğramış ve protein yapıları bozularak parçalanmıştır. Isıtma süresinin uzamasıyla, düşük moleküler ağırlıklı peptitlerin çoğu, fibriller oluşturmak için daha fazla kümeleşme eğilimi göstermiştir. Çalışma sonuçlarına göre börölce proteini, nanofibrilasyona daha elverişli olmuş bu nedenle daha uzun esnek fibril kümeleri gözlemlenebilmiştir. Buna karşın, diğer iki protein ise yarı esnek ve sert yapıda fibriller oluşturmuştur (Wang ve ark., 2020b).

Pirinç proteini, nötral pH değerlerinde çözünürlük göstermez. Bir araştırmada ise, farklı çevresel faktörlerin pirinç kepeği protein agregatlarının fibrilasyon dinamiği üzerindeki etkileri incelenmiştir. (Li ve ark., 2020). 90 °C ve pH 2.0 koşullarında, pirinç kepeği proteinindeki küresel granüler proteinler, kademeli olarak çubuk şeklinde fibrillere dönmüş ve ısıtma süresinin artışıyla birlikte bu fibriller nihayetinde lineer agregatlara evrilmiştir. Fibrillerin ortalama uzunluğu 500 nm'yi aşmıştır. Ayrıca, başlangıçtaki protein konsantrasyonunun yüksek olması, agrega oluşum hızını artırarak fibrilasyon sürecini daha verimli hale getirmiştir. pH 2.0'de elde edilen fibrillerin kuvveti pH 7.0'de elde edilenlere göre daha güçlüdür (Zhang ve ark., 2014).

Son yıllarda, zeinin kendi kendine agregasyon yoluyla oluşturduğu fibril yapılar üzerine yapılan araştırmalar önemli bir artış göstermiştir. Zein, mısırda bulunan, biyobozunur, güvenli ve hipoalerjenik özelliklere sahip, amfifilik bir depolama proteindir. Başlıca α -zein formunu içerirken, daha düşük miktarlarda β -, γ - ve δ -zein izotiplerine de sahiptir (Sun ve ark., 2020). α -zein, belirli koşullar altında nanofibrillerin oluşumuna olanak tanıyan hidrofobik bir proteindir. Fibrillerin morfolojik yapısı, protein ile çözücü arasındaki hidrofobik ve hidrofilik etkileşimlere bağlı olarak şekillenmektedir. Bir çalışma, nötre yakın pH değerleri ve düşük etanol içeriğinde, kararlı fibriller agregatlar oluşturulabileceğini göstermiştir. Dispersiyon asidik koşullar ve yüksek etanol bileşimi altındayken, dispersiyon içindeki hidrofobinin hidrofobik etkileşimi ve etanolün fibrillerin sentezini inhibe etmesi nedeniyle daha önce oluşan

fibril yapıları yok edilmekte ve küresel agregatlar elde edilmektedir (An ve ark., 2016). Ayrıca, proteinin buharlaşma kaynaklı kendi kendine bir araya gelme davranışı, zeinin ikincil yapısındaki α -helikslerin β -yapraklarına dönüşmesine neden olabilmektedir. Keskin ve ark., (2020) etanol-sulu çözücüsündeki α -zein mikro yapısının ısı işlem uygulamalarıyla nasıl değiştiğini incelemek amacıyla atomik kuvvet mikroskopu (AFM) kullanmışlardır. 90 °C ve pH 4.0 koşulları altında, ısıtma süresinin sürekli uzamasıyla α -zein dispersiyonunda düzensiz agregaların yanı sıra düzenli küresel parçacıklar ortaya çıkmış ve 8 saat ısıtma ile protein fibriller yapıları oluşmaktadır.

Buğday gluteni, glutamin grupları bakımından zengin olup, çapraz β -yapıların oluşumunu destekleyen hidrofobik etkileşimler sağlayan çok sayıda hidrofobik amino aside sahiptir. Ayrıca β -plakaların katlama eğilimi yüksek yapısal özelliklere sahiptir. Bu özellikler, buğday gluteninin amiloid fibrilleri oluşturmak için iyi bir yüksek kaliteli protein kaynağı haline getirmektedir (Zhang ve ark. 2023).

2.4.3 Nanofibrille proteinlerin teknolojik özellikleri

Doğal proteinlere göre iyi biyouyumluluğa ve toksik olmayan özelliklere sahip olan nanofibril proteinler (Mazaheri ve ark., 2015) kıvam artırıcı, jelleştirici ve köpürtücü özellikleri nedeniyle (Feng ve ark., 2018; Meng ve ark., 2022) gıda bilimi, biyotıp ve nanoteknoloji gibi farklı alanlarda kullanılabilme potansiyeline sahiptir (Wang ve ark., 2015).

Isıyla indüklenen nanofibriller, protein çözeltilerinin düşük konsantrasyonlarda bile jel oluşturmasını sağlar. Fibriller, yüksek yük altındaki elektrostatik itici kuvvetlerle ince telli, şeffaf veya daha az yükte partiküler, opak jeller oluşturur (Bolder ve ark., 2006). pH, iyonik güç ve sıcaklık, fibril agregasyon hızını ve dolayısıyla jel morfolojisini kontrol eder. Ön ısıtma ve pH ayarıyla elde edilen fibriller, klasik ısıtma jellerine göre hem daha düşük kritik jelasyon konsantrasyonuna hem de daha yüksek mekanik dayanıklılığa ulaşır (Jansens ve ark., 2019).

Nanofibriller, yağ-su ve hava-su arayüzlerinde monomerlerden farklı davranış sergiler. Fibril içeren dispersiyonlar, yüzey gerilimini daha hızlı düşürebilir (Rühs ve ark., 2013). Hem yüzey kesme hem de dilatasyon modüllerini artırarak daha elastik filmler oluşturur (Humblet-Hua ve ark., 2013). Bu özellik, özellikle pH ve iyonik güç ayarlandığında, fibrillerin yük durumuna ve eklenen yardımcı peptit veya fibril dışı materyalin varlığına bağlı olarak değişir (Jansens ve ark., 2019).

Protein fibrilleri, hava–su arayüzüne hızla adsorbe olarak ince, dayanıklı bir viskoelastik film oluşturur (Jansens ve ark., 2019). Bu film, drenajı yavaşlatarak ve film yırtılmasını engelleyerek köpük stabilitesini artırır. Nanofibriller, doğal proteinlere kıyasla daha yüksek köpürme kapasitesi ve uzun süreli stabilite sunar. Bu sayede düşük konsantrasyonlarda bile etkili köpük ajanı olarak kullanılabilir (Mohammadian ve Madadlou, 2016).

Su içinde yağ emülsiyonu sistemlerinde fibriller hem arayüzde sıkıca yerleşerek hem de sürekli fazda viskoziteyi oluşturarak damlacık koalesansını engeller (Jansens ve ark., 2019). Fibril fragmentleri, uzun fibrillere kıyasla küçük damlacık yüzeylerini daha etkin kaplayabilir. Ayrıca fibril yoğunluğu ve esnekliği, emülsiyon stabilitesini optimize ederken, yüksek sıcaklıklarda bile koalesansı önleyerek dayanıklı nanoemülsiyonların elde edilmesine imkan tanır (Moayedzadeh ve Madadlou, 2015).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada, dört farklı protein kaynağı olarak peynir altı suyu proteini (Hardline Nutrition, Kocaeli, Türkiye), gluten (Vatan Enzymes, İstanbul, Türkiye), pirinç protein izolatu (Naturiga Natural Foods, İstanbul, Türkiye) ve bezelye protein izolatu (Proteinocan, Ankara, Türkiye) kullanılmıştır.. Nanofibrilasyon ve analiz sürecinde kullanılan kimyasallar Merck Gmbh (Darmstad, Almanya)'dan temin edilmiş olup, analitik saflıktadır.

3.2. Protein nanofibrillerin elde edilmesi

Nanofibrilasyon işleminde fibril morfolojisini kontrol değiştirmek için işlem iki farklı solüsyon (saf su ve 150 mM NaCl) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Isıl işlemin etkilerini incelemek için 3 farklı sürede (24, 36 ve 48 saat) üretim gerçekleştirilmiştir. Glutenin 150 mM NaCl içerisinde çözülmesi nedeniyle fibrilasyon gerçekleşmemiştir. Buna göre 12 düz morfolojiye ve 9 kıvrımlı morfolojiye sahip olmak üzere 21 farklı nanofibrile protein örneği elde edilmiştir. Ayrıca, doğal örnekler de denemelerde kontrol olarak doğrudan kullanılmıştır.

Protein nanofibrilleri Ma ve Jing (2020)'in yönteminden modifiye edilerek üretilmiştir. Bu amaçla, proteinler 30 mg/mL konsantrasyonunda suda veya NaCl çözeltisinde çözüldürülmüştür. Tam çözünürlük sağlamak amacıyla çözeltiler, manyetik karıştırıcıda 2 saat süreyle karıştırılmıştır. Ardından, proteinlerin tam hidrasyonu için çözeltiler 4 °C'de bir gece bekletilmiştir. Buzdolabından alınan çözeltilerin pH değeri, 6M HCl çözeltisi ile 2'ye ayarlanmış ve ardından 90 °C su banyosunda sırasıyla 24, 36 ve 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Isıl işlem sonunda karışımlar buzlu su içerisinde hızla soğutulmuştur. Örneklerin pH değerleri 6M NaOH kullanılarak 3.7'ye ayarlanmıştır. Nanofibrile proteinler 0.5 cm kalınlıkta olacak şekilde dondurarak kurutucu tepsilerine aktarılmıştır. Dondurma işlemi -80 °C'de 1 saat bekletilerek sağlanmıştır. Dondurarak kurutma pilot ölçekli bir dondurarak kurutucuda (Befatek Makina, Konya, Türkiye) 24 saatte gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nanofibrile proteinler kahve öğütücüde toz haline getirildikten sonra analizlere kadar -18 °C'de depolanmıştır.

3.3. Analizler

3.3.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), bir maddenin kızılötesi ışık ile etkileşimi sonucunda ortaya çıkan absorpsiyon veya emisyon spektrumlarını analiz etmek amacıyla kullanılan bir tekniktir. FTIR analizleri, Thermo Scientific – Nicolet iS20 (Sunnyvale, CA, USA) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümler, $4000-600\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında, 2 cm^{-1} çözünürlük ve her spektrum için 1 cm/s tarama hızı ile yapılmış ve elde edilen verilerden spektrum grafiği çıkarılmıştır.

3.3.2 Floresans spektroskopisi

Floresans spektrumları Agilent Cary Eclipse (Agilent, Germany) cihazı ile belirlenmiştir. Emisyon spektrumları, $1,0\text{ cm}$ 'lik bir kuvars küvette 280 nm 'lik bir uyarma dalga boyu (yarık genişliği 5 nm) ile $300-400\text{ nm}$ arasında kaydedilmiştir. Ölçüm yapılmadan önce kuvars hücre termostatik banyoya yerleştirildikten sonra tüm örnekler 5 dakika bekletilmiştir.

3.3.3 Dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi

Proteinlerin ikincil yapısındaki konformasyonel değişiklikler, oda sıcaklığı ve sabit nitrojen yıkaması koşulu altında bir Jasco-815 spektropolarimetre (Tokyo, Japonya) ile kaydedilmiştir. Spektrumlar, 100 nm/dk tarama hızı ve $1,0\text{ nm}$ spektral çözünürlük ile $190-300\text{ nm}$ aralığında kaydedilmiştir.

3.3.4 Kuru madde miktarı

Örneklerin kuru madde miktarı gravimetrik olarak $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tartıma kadar kurutulmasıyla belirlenmiştir (Tontul ve ark. 2018).

3.3.5 Protein içeriği

Örneklerin protein içerikleri, Leco FP-828 nitrojen mikro analizörü (Leco Corporation, St. Joseph, MI, ABD) kullanılarak belirlenmiştir (Bengoechea ve ark., 2008). Bunun için alüminyum numune kaplarına $0,15\text{ g}$ örnek tartılmış ve cihaza yerleştirilmiştir. Sonuçlar yüzde azotun $5,30$ ile çarpılması ile hesaplanmıştır.

3.3.6 Yığın yoğunluğu ve parçacık yoğunluğu tayini

Örneklerin yığın yoğunluğu Beristain ve ark. (2001)'e göre belirlenmiştir. Bu amaçla, bir miktar örnek (m) mezüre tartılarak, ilk hacmi (V_1) kaydedilmiştir. Bu ağırlık ve hacim kullanılarak yığın yoğunluğu hesaplanmıştır (Eşitlik 1). Daha sonra, bu mezür 30 mm mesafeden 100 kez serbest düşmeye bırakılarak örneğin son hacmi (V_2) kaydedilmiştir. Örnek ağırlığının kaydedilen hacme bölünmesiyle sıkıştırılmış yoğunluk kg/m^3 cinsinden belirlenmiştir (Eşitlik 2).

$$\text{Yığın yoğunluğu (kg/m}^3\text{)} = \frac{m}{V_1} \quad \text{Eşitlik 1}$$

$$\text{Sıkıştırılmış yoğunluk (kg/m}^3\text{)} = \frac{m}{V_2} \quad \text{Eşitlik 2}$$

Örneklerin akışkanlık ve koheziflik özelliklerini tahmin etmek için yığın ve sıkıştırılmış yoğunluğu değerleri kullanılarak Carr indeksi (Eşitlik 3) ve Hausner oranı (Eşitlik 4) hesaplanmıştır (Başyigit ve Çam, 2017).

$$\text{Hausner oranı} = \frac{\text{Sıkıştırılmış yoğunluk}}{\text{Yığın yoğunluğu}} \quad \text{Eşitlik 3}$$

$$\text{Carr indeksi} = \frac{\text{Sıkıştırılmış yoğunluk} - \text{Yığın yoğunluğu}}{\text{Sıkıştırılmış yoğunluğu}} \quad \text{Eşitlik 4}$$

3.3.7 Yüzey hidrofobisitesi

Protein tozlarının yüzey hidrofobisitesi Tontul ve ark. (2018) tarafından bildirilen bromfenol mavisi (BPB) bağlama metodu ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bu amaçla örnekler 5 mg/mL konsantrasyonda fosfat tamponu (pH 7, 20 mM) içerisinde hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden 1 mL alınarak 200 μL BPB çözeltisi (1 mg/mL) ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir. Kör olarak protein içermeyen tampon ile BPB çözeltisi karıştırımı da hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrası 2000 g'de 10 dk santrifüj uygulanmış, süpernatant absorbansı spektrofotometre kullanılarak fosfat tamponuna karşı 595 nm'de kaydedilmiştir. Örneklerin yüzey hidrofobisitesi bağlı BPB miktarından Eşitlik 5'e göre hesaplanmıştır.

$$\text{Bağlı BPB miktarı } (\mu\text{g}) = 200\mu\text{g} \times \frac{\text{Abs}_{\text{kör}} - \text{Abs}_{\text{örnek}}}{\text{Abs}_{\text{kör}}} \quad \text{Eşitlik 5}$$

3.3.8 Emülsifikasyon özelliklerinin belirlenmesi

Nanofibril protein tozlarının emülsifiye edici özellikleri Tontul ve ark. (2018) tarafından bildirilen yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 3 birim protein çözeltisine (saf suda %0,5) 1 birim ayçiçek yağı eklenmiş ve çözeltinin pH değeri 1, 7 ve 9'a ayarlanmıştır. Karışım bir IKA T25 Ultra-Turrax (Almanya) ile 1 dakika boyunca 20000 rpm'de homojenize edilmiştir. Bu emülsiyondan 25 µL alınarak %0,1 sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi ile 5 mL'ye seyreltilmiştir. Seyreltilmiş emülsiyonun absorbansı emülsifikasyonu takiben (Abs_0) ve 10 dakika bekletildikten sonra (Abs_{10}) 500 nm'de kaydedilmiştir. Emülsiyon aktivite indeksi (EAI) (Eşitlik 6) ve emülsiyon stabilite indeksi (ESI) (Eşitlik 7) hesaplanmıştır.

$$EAI(m^2/g) = 16,4 \times Abs_0 \quad \text{Eşitlik 6}$$

$$ESI(min) = \frac{Abs_0 \times 10}{Abs_0 - Abs_{10}} \quad \text{Eşitlik 7}$$

3.3.9 Higroskoposite

Yaklaşık 0,2 g nanofibril protein tozu ve izolatları 50 mL'lik cam beherlere tartılarak ortam bağıl neminin %79,5 olmasını sağlayacak potasyum nitrat (KNO_3)'ın doymuş tuz çözeltisi bulunan desikatörde oda sıcaklığında ($25^\circ C$) 1 hafta bekletilmiştir. 1 hafta sonunda örnekler tartılmış ve örneklerin higroskopisitesi aşağıda belirtilen eşitlik (Eşitlik 8) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$higroskoposite (\%) = \frac{\frac{x}{ah} + W_i}{1 + \frac{x}{ah}} \times 100 \quad \text{Eşitlik 8}$$

Bu eşitlikte x bekletme sürecinde gerçekleşen ağırlık artışını, ah nanofibril protein tozu ve protein izolat miktarını, W_i ise nanofibril protein tozu ve protein izolatının başlangıçtaki nem miktarını göstermektedir (Syamaladevi ve ark., 2012).

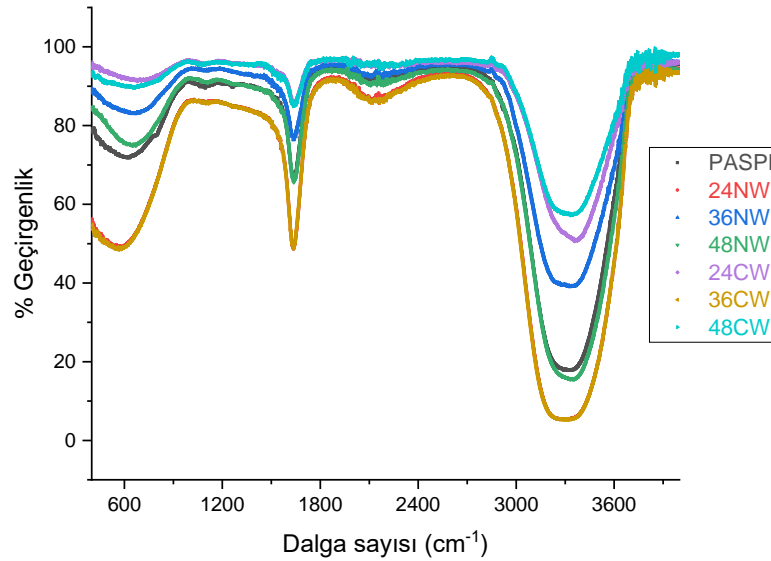
3.3.10 İstatiksel analizler

Üretimler 2 tekerrürlü, analizler iki paralel örnek üzerinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, varyans analizi ile incelenmiş ve anlamlı farklılıklar, Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak SAS yazılımı (SAS Institute, NC, USA) ile belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi

PASPI ve nanofibrile formlarında gerçekleştirilen FTIR sepkrumları Şekil 4.1’de verilmiştir. Bu sepkrumlara göre 2950-3700 cm^{-1} aralığında derin bir negatif pik gözlenmiştir. Bu negatif pik kontrol örnekleri ile kıyaslandığında 36CW ve 24NW örneklerinde yoğun şekilde, 48NW örneğinde ise kısmen daha derindir. Diğer örneklerde ise (36NW, 24CW ve 48CW) bu derinlik doğal proteine yöre daha sığ olarak tespit edilmiştir. Bu bant aralığı, başta N–H ve O–H gerilme titreşimleri olmak üzere proteinin peptid bağlarındaki hidrojen bağı ve serbest hidroksil (–OH) gruplarının titreşimsel imzasını taşır. Tipik olarak, geniş bir bant hâlinde gözlenen kuvvetli bir absorpsiyon; “serbest” veya zayıf birleşmiş O–H/N–H gruplarına, daha yüksek enerjili gerilme titreşimlerine işaret eder. Bu nedenle özellikle 36CW ve 24NW örneklerinde protein yapısındaki N–H/O–H gruplarının büyük oranda yeniden düzenlenerek daha güçlü hidrojen bağı oluşturma yeteneği kazandığı anlaşılmaktadır.



Şekil 4.1. Peynir altı suyu proteini ve bu proteinden elde edilen düz ve kıvrımlı nanofibrillere ait FTIR sepkrumları

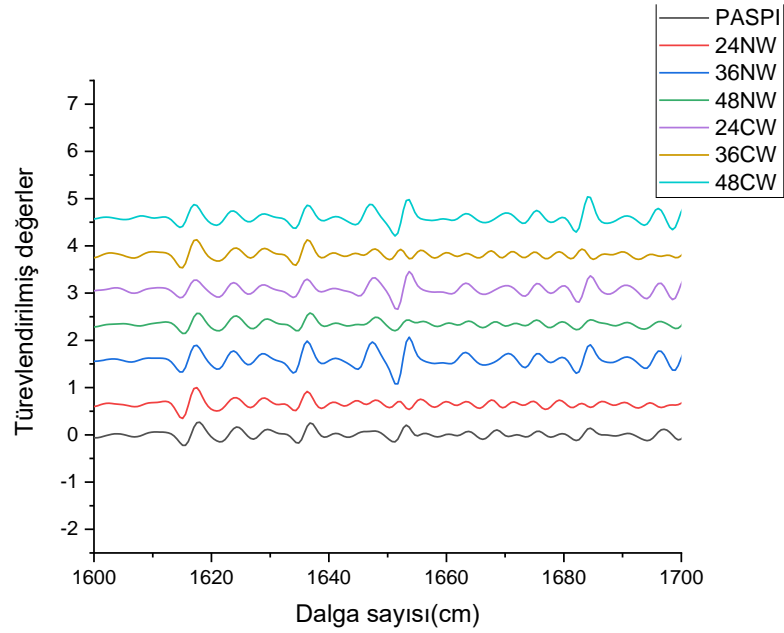
Spektrumda ikinci dikkati çeken bölüm 1500-1700 cm^{-1} aralığıdır. Bu bant aralığı, proteinlerdeki Amid I ($\approx 1600\text{--}1700 \text{ cm}^{-1}$, esas olarak C=O gerilme titreşimi) ve Amid II ($\approx 1500\text{--}1600 \text{ cm}^{-1}$, N–H bükülme + C–N gerilme titreşimleri) bantlarını içerir. Amid I bölgesi, peptid bağı karbonil gruplarının H-bağı düzenine çok duyarlıdır ve

özellikle ikincil yapıyı (α -heliks, β -sarmal, β -plaka vb.) doğrudan yansıtır. Amid II bölgesi yapısal değişimlerde ikincil öneme sahip olmakla birlikte, Amid I sinyaline kıyasla genellikle daha zayıf bir bant şiddetine sahiptir. Nanofibrilasyon süresince yoğun ısıtma işlemi ve asidik şartlara bağlı olarak yapıda daha farklı değişimlerin gerçekleşmesi de beklenen bir olgudur. Bu nedenle protein yapısını ilgilendiren bu bölüme ilişkin verilere Savitsky–Golay türevlendirmesi uygulanmış olup elde edilen grafikler Şekil 4.2’de verilmiştir.

Savitsky-Golay türevlendirmesi sonucu elde edilen grafiklerde protein yapıları 1600-1700 cm^{-1} aralığındaki bölge üzerinden incelenmektedir. Buna göre bu grafiklerin önemli bölgeleri şunlardır:

- 1610–1642 cm^{-1} arası bantlar genellikle β -plaka yapılarına işaret eder
- 1643–1650 cm^{-1} aralığında bantlar, düzensiz (random coil) yapıdaki peptid dizilerine karşılık gelir
- 1650–1659 cm^{-1} arasında görülen bantlar (özellikle 1652 cm^{-1} civarı) α -heliks yapıyı temsil eder
- 1660 – 1699 cm^{-1} arası bantlar β -dönüş ve anti-paralel β -plaka yapılarına işaret eder (Sadat ve Joye 2020; Cobb ve ark. 2020).

Buna göre özellikle peynir altı suyu proteininde β -plaka, α -heliks ve β -dönüş yapıları dikkati çekmektedir (Şekil 4-2). Öte yandan 24NW, 48NW ve 36CW örneklerinin ikincil yapıları büyük ölçüde doğal protein ile benzer bulunmuştur. Öte yandan 36NW, 24CW ve 48CW örneklerinin ikincil yapılarında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Özellikle 1647 cm^{-1} ’de doğal proteinde gözlenmeyen pik bu örneklerde düzensiz yapıların arttığını göstermektedir. Ayrıca 1653 cm^{-1} bantta görülen pik daha da belirginleşmiştir. Buna göre bu örneklerde α -heliks yapılarında da artış gözlenmiştir. Ek olarak 1663 ve 1684 cm^{-1} bantlarda da artış gözlenmiş olup, bu bantların ilkinin β -dönüş, ikincisinin ise anti-paralel β -plakalardan kaynaklı olabileceği değerlendirilmiştir.



Şekil 4.2. Peynir altı suyu proteini ve bu proteinden elde edilen düz ve kıvrımlı nanofibrillere ait ikinci türev spektrumları

Dolayısıyla düz fibriller için 36 saat ısıtma, kıvrımlı fibrillerde ise 24 veya 48 saat ısıtma sonucunda fibriller yapıların elde edildiği söylenebilir. Öte yandan diğer ısıtma sürelerinde doğal proteine benzer yapının elde edilmiş olması fibriller yapının oluşması için yeterli ısıl işlemin uygulanmadığını ya da oluşan yapının artan ısıl stres sonucunda parçalandığını göstermektedir.

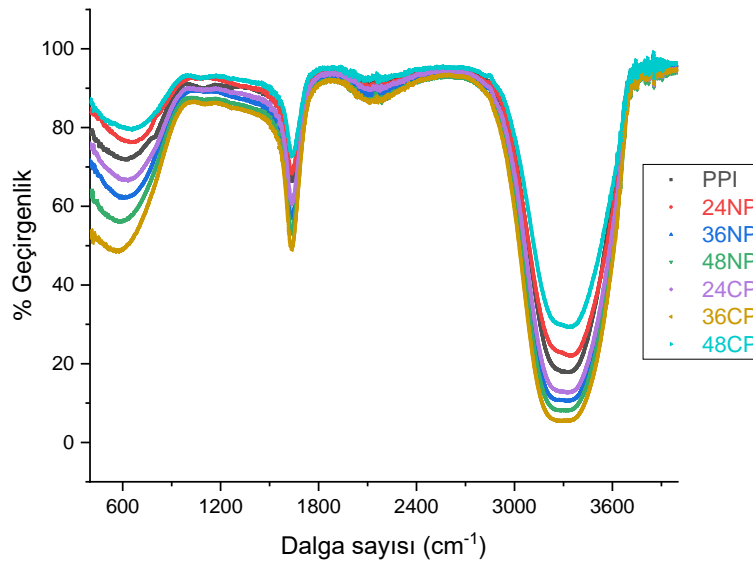
Şekil 4.1’de dikkati çeken diğer önemli bir bölge C–O, C–C, C–N gerilme titreşimlerini, aromatik halkalarını, yan zincir titreşimlerini ve yapısal yan gruplar ve bazı omurga deformasyonlarını kapsayan $400-1000\text{ cm}^{-1}$ aralığıdır. Bu bölge, protein molekülündeki düşük frekanslı titreşimlerin (özellikle yan zincir hareketliliği ve üç boyutlu yapısal reorganizasyon) önemli bir göstergesidir. Bu yüzden bu bölgede gözlenen daha derin pik, proteinin doğal haliyle karşılaştırıldığında daha düzenli, sıkı ve kısıtlanmış yapılar kazandığını gösterir. Dolayısıyla asidik ısıtma sonucunda 24NW ve 36CW örneklerinin daha düzenli ve sıkı bir yapıya dönüştüğü söylenebilir.

FTIR spektrumunda dikkat çeken diğer bir bölge ise $1950-2350\text{ cm}^{-1}$ aralığında gözlenen banttır. Bu aralık, genellikle doğrudan proteinlerin omurga titreşimleriyle ilişkili olmayan, ancak çevresel etkileşimler (CO_2 bağlanması, karbamat oluşumu, yüzeysel grup yeniden yapılanmaları) hakkında dolaylı bilgi verir. 24NW ve 36CW örneklerinde gözlenen negatif fark piki, nanofibrillerin daha fazla bu gruplara sahip

olduğunu, yani yüzey fonksiyonel gruplarında artış ve yeniden yapılanma olduğunu gösterebilir.

Pirinç protein izolatu ve bu proteinden elde edilmiş nanofibrile yapılara ait FTIR spektrumları Şekil 4-3'te verilmiştir. Peynir altı suyu proteinine benzer şekilde pirinç protein izolatında da 4 ana bölge dikkati çekmektedir. Bu bölgeler $2950-3700\text{ cm}^{-1}$, $1500-1700\text{ cm}^{-1}$, $400-1000\text{ cm}^{-1}$ ve $1950-2350\text{ cm}^{-1}$ bant aralıklarıdır.

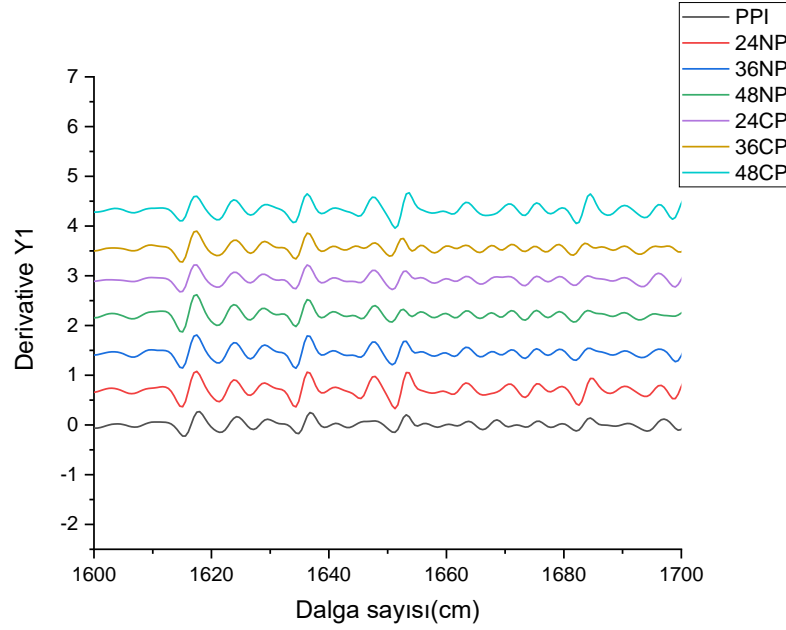
Şekil incelendiğinde tüm bant boyunca 36CP, 48NP, 36NP ve 24CP örneklerinin pik derinlikleri doğal pirinç proteinine kıyasla daha yoğun şekildedir. Öte yandan 24 NP ve 48 CP örneklerinin bant derinlikleri daralmıştır. Buna göre 36CP, 48NP, 36NP ve 24CP örneklerinde etkin yeniden düzenlenme meydana geldiği söylenebilir. Düz fibrillerde bu yeniden düzenlenme reaksiyonları için 36 saat ve üzeri ısıtma gerekirken, kıvrımlı fibrillerde 24 saatlik ısıtma yeterli bulunmuştur. Öte yandan kıvrımlı fibriller 36 saat ısıtma sonucunda tam olgunluğa erişmiş, 48 saatte ise yapıda bozulmalar meydana gelmiştir.



Şekil 4.3. Pirinç protein izolatu ve bu proteinden elde edilen düz ve kıvrımlı nanofibrillere ait FTIR spektrumları

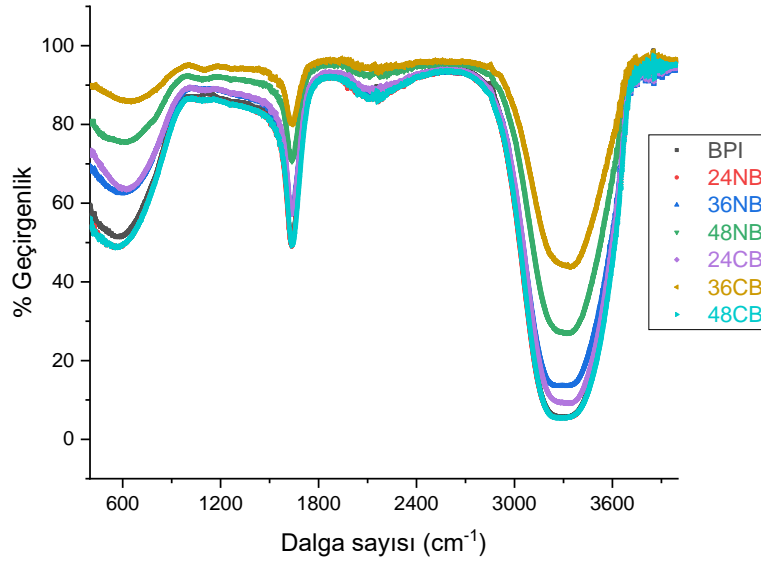
Pirinç protein izolatu ve nanofibrile formlarına ait FTIR spektrumlarının Savitsk-Golay türevlendirmesi sonucu elde edilen grafikler Şekil 4-4'te verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, doğal pirinç protein izolatu ile kıyaslandığında nanofibrile proteinler β -plaka yapılarında (1617 ve 1636 cm^{-1}) önemli bir artışa neden olmuştur. 24NP ve

48CP örneklerinde α -heliks yapılarını gösteren bant aralığındaki ($1650\text{--}1659\text{ cm}^{-1}$) piklerde genel olarak artış gözlenmiştir. Bu örneklerde nanofibrilasyonun tamamlanmadığı ya da yeterli düzeyde gerçekleşmediği söylenebilir. Öte yandan bu iki örnekte (24NP ve 48CP) 1684 bandında da (β -dönüş) artış gözlenmiştir. Dolayısıyla yapı nanofibrile proteinlerde beklenen β -plaka yapılarından çok α -heliks ve β -dönüş yapılarını içermektedir.



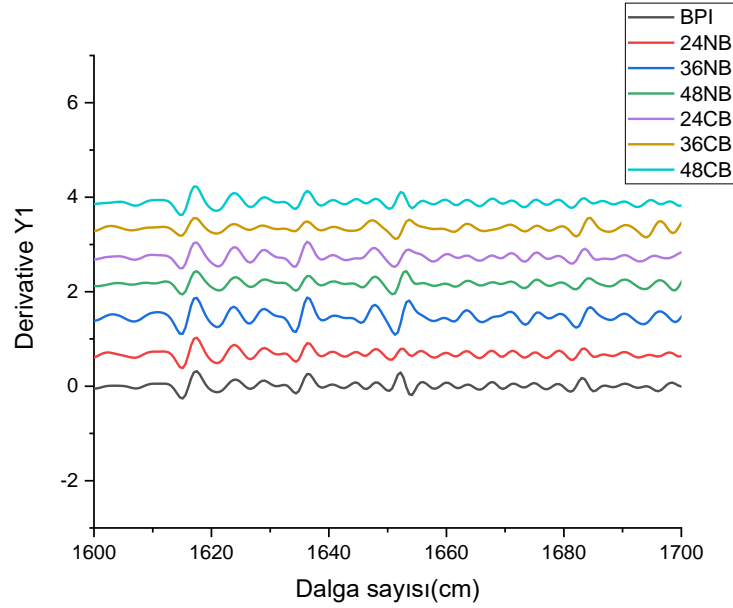
Şekil 4.4. Pirinç protein izolatu ve bu proteinden elde edilen düz ve kıvrımlı nanofibrillere ait ikinci türev spektrumları

Bezelye protein izolatu ve bu proteinden elde edilmiş nanofibrile yapılar a ait FTIR spektrumları Şekil 4-5'te verilmiştir. Nanofibrile bezelye proteinleri ile doğal proteinlerin FTIR spektrumları karşılaştırıldığında diğer proteinlerden farklı bir seyir gözlenmiştir. Nitekim, nanofibrile proteinlerde izlenen % geçirgenlik değerleri 48CB örneği dışında doğal proteine kıyasla daha düşük olarak gerçekleşmiştir. Öte yandan 48CB örneği ile doğal protein arasında da $400\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ bant aralığı dışında önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Daha önce de değinildiği gibi bu bölge, protein molekülündeki yan zincir hareketliliğinin ve üç boyutlu yapısal yeniden yapılanmanın önemli bir göstergesidir. 48CB örneğinde bu bölgede gözlenen daha derin pikler, doğal proteine göre daha düzenli, sıkı ve kısıtlanmış yapılar içerdiğini göstermektedir.



Şekil 4.5. Bezelye protein izolatu ve bu proteinden elde edilen düz ve kıvrımlı nanofibrillere ait FTIR spektrumları

Bezelye protein izolatu ve nanofibrile formlarına ait FTIR spektrumlarının Savitsk-Golay türevlendirmesi sonucu elde edilen grafikler Şekil 4-6'da verilmiştir. Protein ikincil yapılarının detaylı incelemesine göre β -plaka yapıları özellikle 36NB, 24NB ve 48 CB örneklerinde artış göstermiştir. 48NB ve 36CB örneklerinde ise azalış gözlenmiştir. 1652-1653 cm^{-1} bandında görülen pikler α -heliks yapılar 36NB dışındaki nanofibrile örnekler için doğal proteine göre düşmüştür. 1696 cm^{-1} nanofibrile proteinlerde belirgin bir pik gözlenmiş olup, bu pikin anti-paralel β -plakalardan kaynaklı olabileceği değerlendirilmiştir. Dolayısıyla bezelye protein izolatları için ısıtma sıcaklığının yüksek ve çalışma kapsamında denenen en kısa ısıtma süresi olan 24 saatin bile çok uzun olabileceği değerlendirilmiştir. Yapılan bir çalışmada 85°C'de 48 saat ısıtma ile elde edilen bezelye proteini nanofibrillerinin β -plaka ve düzensiz yapı içeriğinde artış meydana geldiği bildirilmiştir (Chen ve ark. 2024). Karabulut (2025) yaptığı çalışmada doğal ve nanofibrile bezelye proteinden film üretimi gerçekleştirmiştir. Bu çalışmaya göre nanofibrile proteinle üretilen filmlerin β -plakaya karşılık gelen bantlar daha derinleşmiştir. Çalışmalar arasında meydana gelen farklılıkların proteinlerin içerdiği safsızlıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

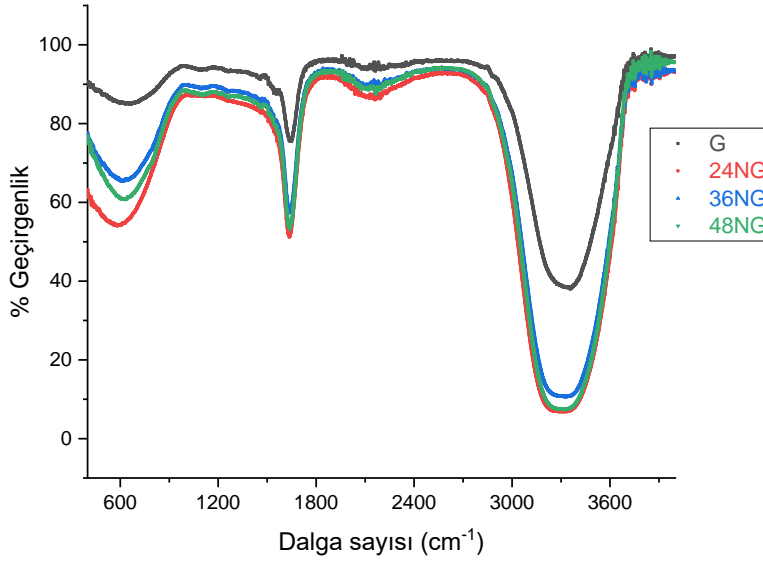


Şekil 4.6. Bezelye protein izolatu ve bu proteinden elde edilen düz ve kıvrımlı nanofibrillere ait ikinci türev spektrumları

FTIR spektrumları Şekil 4.7’de sunulan gluten ve bu proteinden elde edilen düz morfolojili nanofibril yapılar, spektral özellikler açısından diğer üç proteinle karşılaştırıldığında belirgin bir farklılık göstermektedir. Glutenin nanofibrilasyonu, tüm dalga boyu aralığında % geçirgenlik değerlerinin düşmesine neden olmuştur. Bu durum, fibrilasyon sürecinin glutenin hem omurga yapısında hem de yan zincirlerinde daha kompakt veya yoğun bir yapı oluşturduğunu göstermektedir.

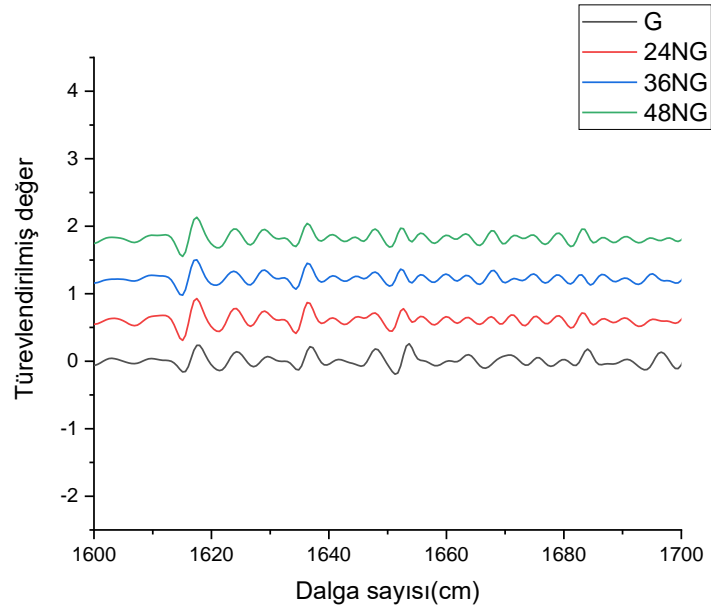
Farklı ısıtma süreleriyle elde edilen nanofibril örnekleri, 400–1000 cm^{-1} aralığı hariç, spektrumun diğer bölgelerinde benzer geçirgenlik profilleri sergilemiştir. Bu da glutenin nanofibrilasyon sürecinde zaman parametresinin özellikle yan zincir titreşimlerinin yer aldığı 400–1000 cm^{-1} bölgesinde daha belirgin etkili olduğunu, buna karşın O–H/N–H (2950–3700 cm^{-1}), amid I–II (1500–1700 cm^{-1}) ve yüzeysel grup etkileşimlerini temsil eden (1950–2350 cm^{-1}) bölgelerde morfolojik yapıların ve süre

farklarının geçirgenlikte sınırlı değişikliğe neden olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 4.7. Gluten ve bu proteinden elde edilen düz nanofibrillere ait FTIR spektrumları

Gluten ve nanofibrile formlarına ait FTIR spektrumlarının Savitsk-Golay türevlendirmesi sonucu elde edilen grafikler Şekil 4.8’de verilmiştir. Buna göre spektrumun β -plakaları temsil eden bölümünde ($1600-1642\text{ cm}^{-1}$) nanofibrilasyon sonucunda önemli düzeyde artış meydana gelmiştir. Öte yandan α -heliks yapıları işaret eden bölümünde ise ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) azalış meydana gelmiştir. Ayrıca nanofibrilasyon ile 1663 cm^{-1} bandında artış ile 1684 ve 1696 cm^{-1} bantlarında da azalış gözlenmiştir. Bu nedenle β -dönüş yapılarda artış, anti-paralel β -plaka yapılarında ise azalış olduğu söylenebilir.



Şekil 4.8. Gluten ve bu proteinden elde edilen düz nanofibrillere ait ikinci türev spektrumları

Sonuç olarak FTIR analizi ile nanofibrilasyon süresince proteinlerin bağları ve ikincil yapılarındaki değişimler incelenmiştir. Buna göre peynir altı suyu proteini ve pirinç proteininde beklenen değişimler bazı ısıtma şartlarında gözlenmiştir. Gluten ise tüm ısıtma şartlarında beklenen yapısal özelliklere kavuşmuştur. Öte yandan bezelye proteinden beklenen değişimler gözlenmemiştir. Bu nedenle protein kaynağı ve ısıtma şartlarının nanofibrilasyon sürecinde önemli etki gösterdiği tespit edilmiştir.

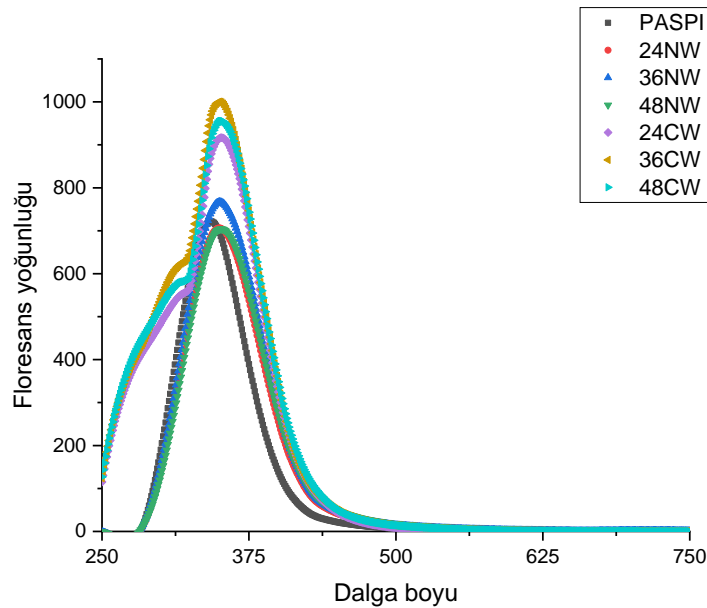
4.2. Floresans spektroskopisi

280nm'de uyarılan floresan spektrumları esas olarak protein ikincil yapısındaki değişikliklere duyarlı olan triptofan ve tirozin kalıntılarının floresan emisyonuna atfedilmektedir.

Peynir altı suyu proteini ve bu proteinden elde edilen nanofibril yapılarına ait floresans spektrumları, Şekil 4.9'da verilmiştir. Peynir altı suyu proteini, bu aralıkta yalnızca tek bir karakteristik pik göstermiştir. Yaklaşık 280 nm'de başlayan ve 560 nm'de sonlanan bu pikin, tepe noktası 342 nm dalga boyunda ve yaklaşık 700 a.u. şiddetindedir. Bu durum, proteinin iç yapısında sınırlı sayıda aromatik amino asidin çözültide aktif olarak floresans verdiğini ve yapının kompakt formda olduğunu göstermektedir.

24NW ve 48NW örnekleri, doğal proteine benzer spektral karakter sergilemekle birlikte, tepe noktalarının 350 nm civarına kaydığı gözlemlenmiştir. Bu kırmızı kayma, protein yapısındaki peptit zincirlerinin uzadığına (Tong ve ark. 2022) ve α -heliks yapıların azaldığına (Zhang ve ark. 2021) atfedilmektedir. 36NW örneği, doğal proteine vediger düz morfolojili nanofibrillere göre daha yüksek bir floresans şiddeti (yaklaşık 775 a.u.) sergilemiştir. Bu artış, protein zincirlerinin daha düzenli bir fibril yapıya katlandığını ve bu yapıların floresans aktif grupları daha etkin biçimde yüzeye çıkardığını göstermektedir. Böylece, 36 saatlik ısıl işlemin düz nanofibril oluşumu için optimum süre olabileceği öngörülmektedir. Elde edilen bulguların aksine Zhang ve ark. (2021), nanofibrile peynir altı suyu proteinlerinin floresans şiddetinin, doğal proteinden az olduğunu ve ısıtma süresinin uzaması ile floresans şiddetinin azaldığını bildirmiştir.

Buna karşın, kıvrımlı morfolojiye sahip örneklerde spektral davranış dikkat çekici biçimde farklılaşmıştır. Bu örneklerde, 200 nm civarında başlayan geniş bir sinyal kolu görülmekte ve bu sinyal 320 nm’de diğer örneklerdeki ana pikle birleşmektedir. Tepe noktalarının şiddeti 920 ile 1010 a.u. arasında değişmektedir, yani doğal proteine ve düz morfolojili nanofibrillere göre önemli derecede artmış bir floresans yanıtı mevcuttur. Bu yapıdaki geniş koltuklu pik ve yüksek şiddet, kıvrımlı fibrillerin hem daha fazla aromatik yapı açığa çıkardığını hem de protein agregasyonuna bağlı olarak π - π etkileşimleri gibi sekonder floresans artırıcı faktörlerin devreye girdiğini düşündürmektedir. Bu nedenle, kıvrımlı nanofibrillerin daha karmaşık, yüzey aktif ve potansiyel olarak daha fonksiyonel yapılara sahip olduğunu işaret etmektedir.



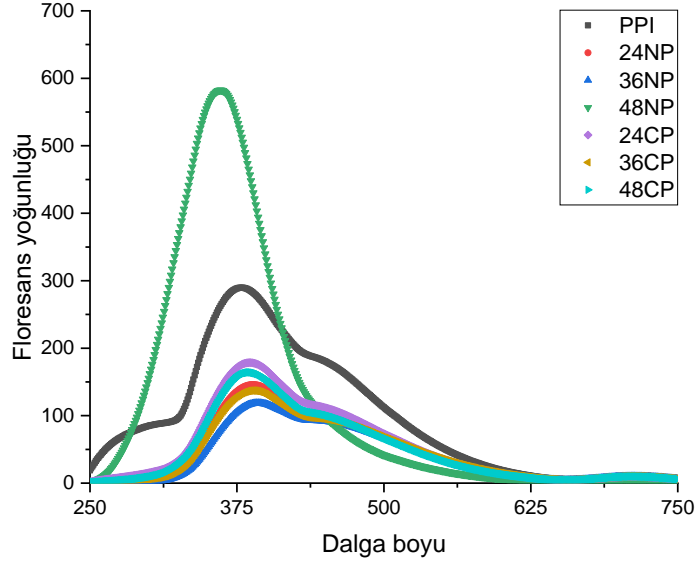
Şekil 4.9. Peynir altı suyu proteini ve bu proteinden elde edilen düz ve kıvrımlı nanofibrillere ait floresans spektrumları

Şekil 4.10'da verilen doğal pirinç protein izolatının floresans spektroskopisi sonuçları incelendiğinde, spektrumda üç karakteristik pik gözlemlenmektedir: ön koltuk (200-325 nm), ana pik (378 nm) ve son koltuk (430-630 nm). Ana pik 378 nm'de ve şiddeti 291 au olarak belirlenmiştir. Bu yapı, doğal proteinlerin özgün konformasyonunu ve ortamındaki floresans veren amino asitlerin varlığını yansıtmaktadır.

Düz fibriller olan 24NP ve 36NP örneklerinde ön pikin kaybolması dikkat çekmektedir. Bu durum, protein yapısında meydana gelen konformasyonel değişikliklerin ve muhtemelen protein katlanmasının bozulmasının bir göstergesidir. Ayrıca, bu örneklerin maksimum piklerinin doğal proteine kıyasla hafifçe kırmızıya kayması, protein moleküllerindeki peptid zincirinin uzamasına işaret etmektedir. Şiddet değerlerinin 146 au ve 117 au olarak azalması ise, proteinlerin floresans yapan gruplarının çevresel etkileşimlerinde azalma ya da kısmi gömülme olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim nanofibrille proteinleri konu alan birçok çalışmada nanofibrilasyon sonucunda floresans şiddetinde azalma olduğu bildirilmektedir (Panda ve ark. 2023, Tong ve ark. 2022, Zhang ve ark. 2021). 48NW örneğinde ise spektrum tamamen farklı bir profil sunmaktadır. Bu örnekte tek pik gözlemlenmiş ve 361 nm'deki maksimum şiddeti 582 au olarak kaydedilmiştir. Bu belirgin şiddet artışı, uzun süreli ısıtma ve nanofibril oluşumu sonucunda proteinlerin farklı bir yapısal düzenlemeye uğrayarak daha yoğun bir floresans sinyali oluşturduğunu göstermektedir. Aynı zamanda, pik konumundaki doğal proteine kıyasla maviye kayma (kısa dalga boyuna doğru) meydana gelmiştir. Mavi kayma polar olmayan bir ortam sağladığından, bu daha kompakt bir protein yapısı anlamına gelebilir. Böyle kompakt bir yapı ancak ısı kaynaklı moleküller arası etkileşimler veya agregasyon nedeniyle ortaya çıkabilir (Panda ve ark. 2023).

Kıvrımlı pirinç proteini nanofibrillerinde, ön pik kaybolmuş ve pikin tepe noktası 378-386 nm arasında değişirken şiddet değerleri 135-180 au arasında sınırlı kalmıştır (Şekil 4.10). Bu, asidik şartlarda ısıtılan ve kıvrımlı yapı kazanan proteinlerin floresans özelliklerinin daha stabilize olduğu ve ortamında daha homojen bir yapı oluştuğunu işaret etmektedir. Ayrıca, şiddet değerlerinin doğal proteinden ve düz

nanofibrile örneklerden daha düşük kalması, kıvrımlı morfolojinin protein içindeki floresans amino asitlerin çevresel etkileşimlerinde farklılık yarattığını göstermektedir.

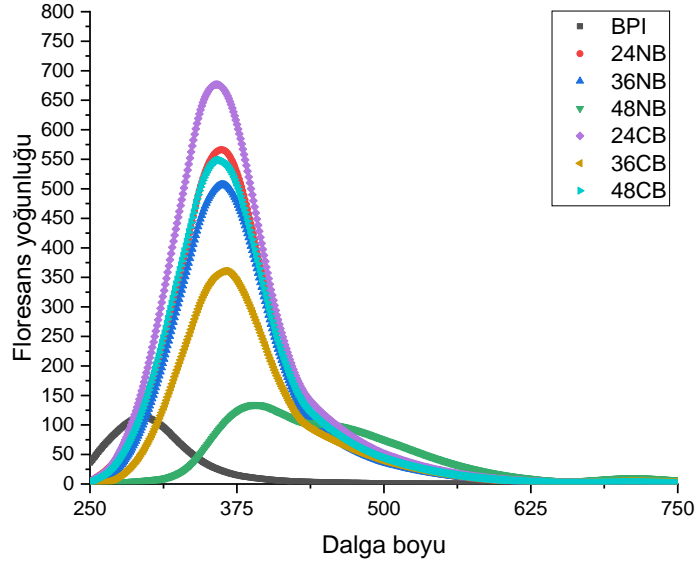


Şekil 4.10. Pirinç protein izolatu ve bu proteinden elde edilen düz ve kıvrımlı nanofibrillere ait floresans spektrumları

Doğal bezelye protein izolatının floresans spektroskopi sonuçları, dar bir pik ile karakterize edilmiştir (Şekil 4.11). Nanofibrile bezelye proteinleri ise farklı bir seyir göstermiştir. Nitekim nanofibrile proteinler daha geniş bir aralığa yayılan bir pik vermiştir. Bu genişleme, protein yapısında meydana gelen konformasyonel bozulmaların ve yeni floresans merkezlerinin oluşumunun göstergesidir. 24NB’de maksimum pik 360 nm’de ve 570 au şiddetindeyken, 36NB’de aynı dalga boyunda fakat 505 au şiddetinde bir pik gözlenmiştir. Bu yüksek şiddet değerleri, proteinlerin ısıtma süresiyle birlikte floresans etkinliğinin arttığını ve yapısal yeniden düzenlenmenin yoğunluğunu yansıtmaktadır. 48NB örneğinde ise spektrumda iki tepe noktası ortaya çıkmıştır. Bu çift pik yapısı, uzun süreli ısıtma ile proteinlerin farklı konformasyonel bölgelerinin ya da farklı floresans kaynaklarının ortaya çıktığını göstermektedir. Özellikle 467 nm civarındaki ikinci pik, proteinlerin çevresel değişikliklere bağlı olarak daha geniş bir floresans aralığı sunduğunu işaret eder.

Kıvrımlı morfolojiye sahip fibrillerde, spektrum tek bir pik ile temsil edilmektedir. Maksimum şiddet veren dalga boyu 355-365 nm arasında değişirken, şiddet değerleri ısıtma süresine bağlı olarak farklılık göstermektedir. 24 saat ısıtma

sonrası şiddet 680 au ile en yüksek seviyeye ulaşırken, 36 saatte azalarak 362 au'ya düşmekte ve 48 saatte tekrar artış göstererek 545 au'ya çıkmaktadır. Bu dinamik değişimler, kıvrımlı morfolojinin ısıtma süresi ile birlikte proteinlerin yapısal esnekliğinde ve floresans amino asitlerin çevresindeki mikroçevredeki etkileşimlerde değişiklikler olduğunu ortaya koymaktadır.

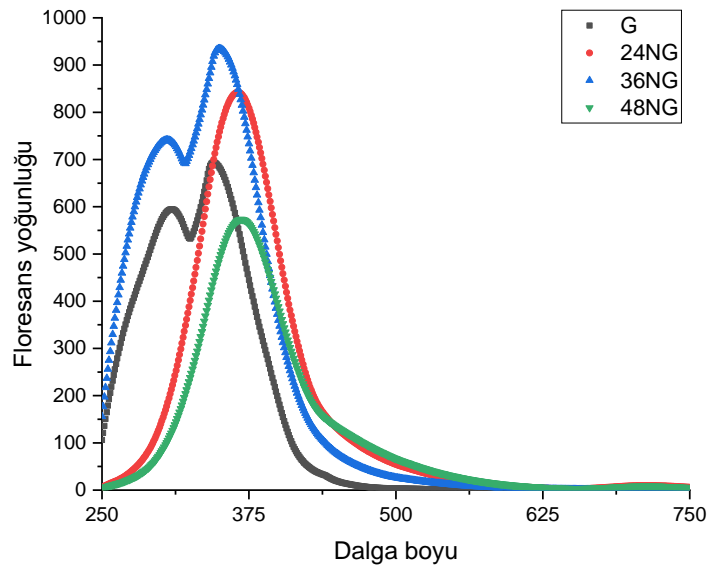


Şekil 4.11. Bezelye protein izolatu ve bu proteinden elde edilen düz ve kıvrımlı nanofibrillere ait floresans spektrumları

Doğal glutenin floresans spektrumunda belirgin bir ön koltuk gözlenmekte olup, maksimum pik 345 nm'de ve yüksek şiddette (695 au) ölçülmüştür (Şekil 4.12). Bu ön koltuk, glutenin özgün yapısal konformasyonu ve floresans veren amino asitlerin düzenli çevresi hakkında bilgi vermektedir.

36NG örneğinde spektrum yapısı genel olarak doğal glutenle benzerlik göstermekte, ancak piklerin şiddeti artarak daha yoğun floresans sinyalleri ortaya çıkarmaktadır. Bu durum, 36 saatlik ısıtmanın proteindeki floresans kaynaklarını daha fazla aktive ettiğini ya da yapısal reorganizasyona yol açtığını göstermektedir. Öte yandan 24NG ve 48NG örneklerinde ön koltuk kaybolmuş ve maksimum pik dalga boyu 366 nm'ye kaymıştır. Bu kırmızıya kayma, proteinlerin çevresel polaritesindeki değişiklikleri ve konformasyonel esneklikte artışı işaret eder. Şiddet değerleri ise 24NG'de 850 au ile zirve yapmış, ancak 48NG'de 570 au'ya düşmüştür. Bu azalma,

uzun süreli ısıtmanın protein yapısında kısmi denatürasyon veya agregasyon etkisiyle floresans sinyalinde azalmaya neden olduğunu düşündürmektedir.



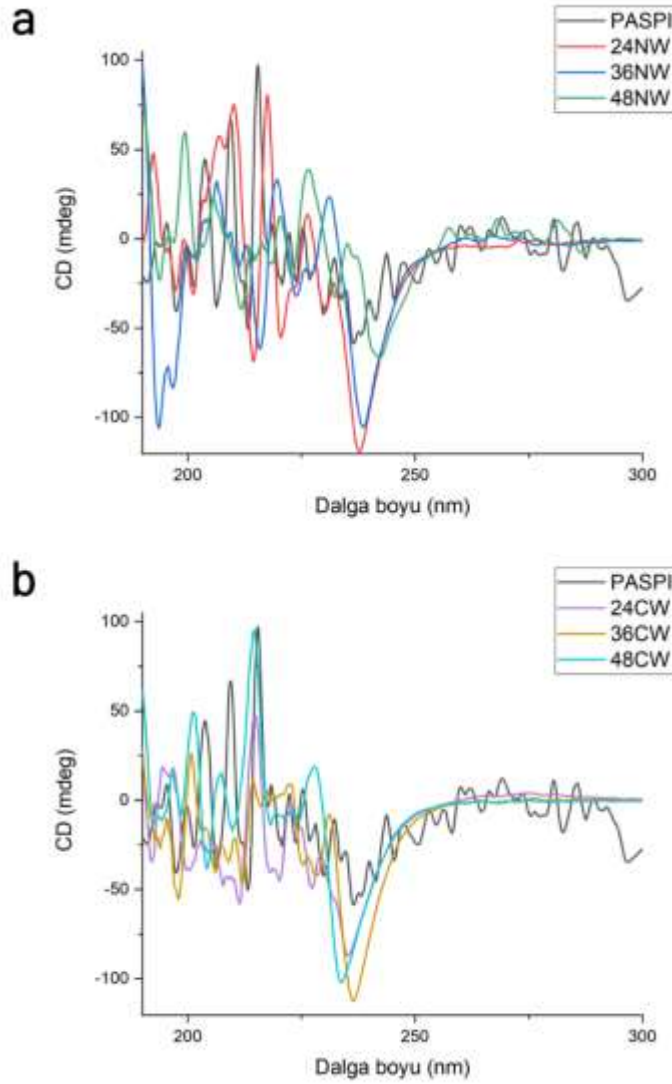
Şekil 4.12. Gluten ve bu proteinden elde edilen düz nanofibrillere ait floresans spektrumları

4.3. Dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi

Dairesel dikroizm spektroskopisi, çalışmada kullanılan proteinlerden elde edilen nanofibrillerin ikincil yapısal özelliklerini değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır.

Şekil 4.13'de peynir alı suyu proteini ve nanofibrile formları için elde edilen dairese dikroizm spektrumları verilmiştir. Fibrilasyon öncesi spektrumlarında yüksek oranda β -dönüş ve antiparalel β -plaka ile düşük oranda β -plaka ve düzensiz sarmal yapılar dikkati çekmektedir. Ancak düz nanofibrillerde beklenildiği üzere β -plaka yapılarında artış gözlenmiştir (Şekil 4.13a). Nitekim doğal proteinde %7 düzeyinde bulunan bu yapılar, ısıtma süresine bağlı olarak düz nanofibrillerde %29.6 ile %36.0 arasında değişim göstermiştir. Nanofibrilasyon ayrıca anti-paralel β -plaka yapılarının oluşumunu da teşvik etmiştir. Ancak 48 saat ısıtma sonucunda %20.6 düzeyinde α -heliks yapısı oluşumu gözlenmiştir. Öte yandan Şekil 4.13b'de verilen kıvrımlı peynir altı suyu protein nanofibrillerinde farklı bir seyir gerçekleşmiştir. Nitekim, bu örneklerde 24 saat ısıtma sonunda α -heliks yapılarında çok ciddi bir artış (%61) meydana gelmiştir. Ancak ısıtma süresinin uzaması ile kademeli bir azalış gözlenmiştir. En yüksek β -plaka oranı (%23.7) 36 saat ısıtma sonucunda elde edilmiştir. Ancak ısıtma

süresinin 48 saate çıkarılması oluşan β -plaka yapılarının β -dönüş ve diğer yapılara dönüşmesine neden olmuştur.

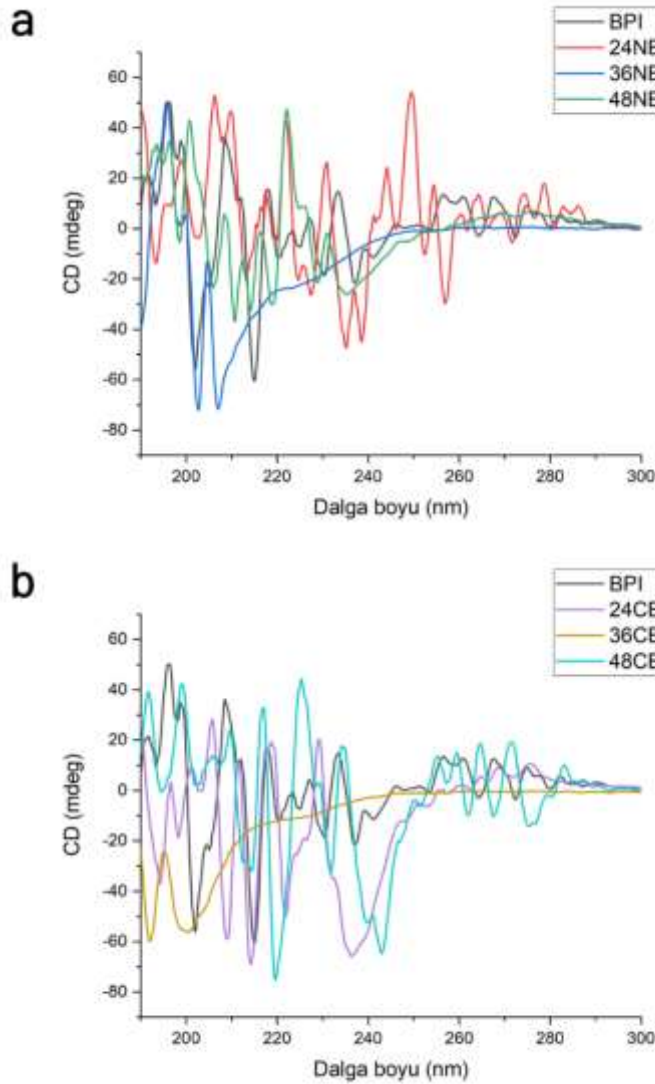


Şekil 4.13. Peynir altı suyu proteini ve bu proteinden elde edilen (a) düz ve (b) kıvrımlı nanofibrillere ait dairesel dikroizm spektrumları

Dairesel dikroizm spektrumları bezelye protein izolatının büyük ölçüde düzensiz yapılardan oluştuğunu ve düşük oranda antiparalel β -plaka (%12.5) ile α -heliks (%10.5) içerdiğini göstermektedir (Şekil 4.14). Düz morfolojide nanofibriller elde etmek için uygulanan asidik ısıtma sonucunda özellikle 24 veya 36 saat ısıtma ile düzensiz yapılar tamamen ortadan kalkmış ancak 24 saatte antiparalel β -plaka (%37.1), β -dönüş (%17.7) ve α -heliks (%20.3) yapıların oluşumu, 36 saatte ise neredeyse tamamen α -heliks

(%91.8) oluşumu sağlanmıştır. 48 saatlik ısıtma sonucunda en yüksek β -plaka oranına (%30.6) ulaşılmakla birlikte düzensiz yapılar (%23.8) da tekrar ortaya çıkmıştır (Şekil 4.14a).

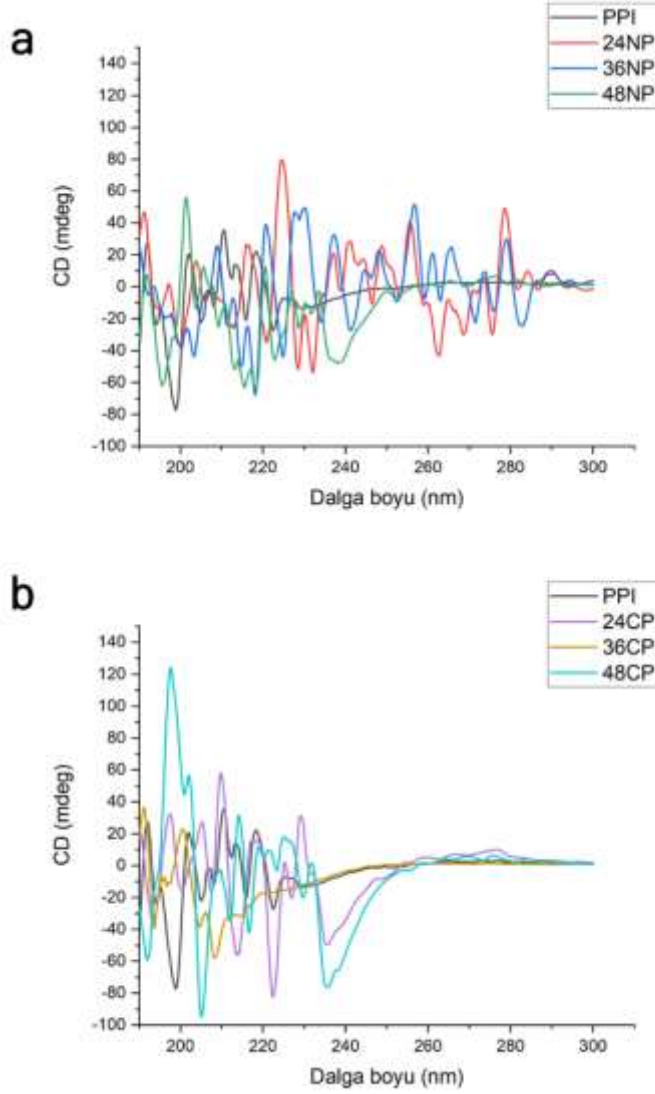
Kıvrımlı bezelye proteini nanofibrillerinde ise 24 saat ısıtma sonunda düzensiz yapılar %9.9 seviyesine düşüş göstermiş, ancak ısıtma süresinin uzamasına bağlı olarak tekrar artış göstererek 48 saatte %42 seviyesine ulaşmıştır. Bu örnekler arasında en yüksek β -plaka oranına (%41.5) 24 saatlik ısıtma ile ulaşılmıştır. Öte yandan 36 saatlik ısıtma süresinde β -plaka yapısı gözlenmemiştir (Şekil 4.14b).



Şekil 4.14. Bezelye protein izolatu ve bu proteinden elde edilen (a) düz ve (b) kıvrımlı nanofibrillere ait dairesel dikroizm spektrumları

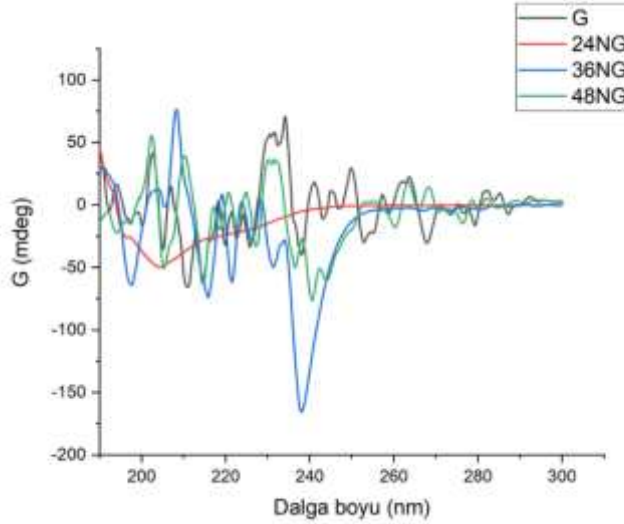
Pirinç protein izolatu ve bu proteinden elde edilen nanofibrile proteinlere ait dairesel dikroizm spektrumları Şekil 4.15'te verilmiştir. Buna göre doğal pirinç protein izolatuının ikincil yapıları antiparalel β -plaka (%41,6), β -dönüş (%38,4) ve düzensiz yapılardan oluşmaktadır. Saf su içinde asidik ısıtma ile elde edilen düz pirinç protein nanofibrillerinde ısıtma süresinin uzamasına bağılı olarak β -plaka yapılarında artış (24 saatte %1,1'den, 48 saatte %53,0) gözlenmiştir. Bu örneklerde 36 saate kadar ısıtma düzensiz yapılarda artışa neden olmuşken, 48 saat sonunda herhangi bir düzensiz yapı tespit edilememiştir. 48 saat ısıtma ile elde edilen düz pirinç proteini nanofibrilleri tamamen paralel ve antiparalel β -plaka yapılarından oluşmaktadır (Şekil 4.15a).

Kıvrımlı pirinç protein nanofibrillerinde ise β -plaka yapıları sadece 24 saat ısıtma sonunda (%31,9) gözlenmiştir. Ancak ısıtma süresinin uzamasına bağılı olarak antiparalel β -plaka ve α -heliks yapıların oluşumu teşvik edilmiştir. 36 saat ve üzerinde ısıtma sonucunda ortamda herhangi bir düzensiz yapı tespit edilememiştir (Şekil 4.15b).



Şekil 4.15. Pirinç protein izolatu ve bu proteinden elde edilen (a) düz ve (b) kıvrımlı nanofibrillere ait dairesel dikroizm spektrumları

Gluten ve glutenden elde edilen düz nanofibrillere ait dairesel dikroizm spektrumları Şekil 4.16’da verilmiştir. Gluten ikincil yapı olarak antiparalel β -plaka (%72,1), düzensiz yapılar (%22,1) ve β -dönüş (%5,9) içermektedir. 24 saat sonunda düzensiz yapılar ile β -dönüş tamamen ortadan kalkmış ve antiparalel β -plaka (%50,4) ve α -heliks (%49,6) yapılar oluşmuştur. Isıtmanın 36 saate uzatılması ciddi oranda (%47,5) β -plaka oluşumunu teşvik etmiş ancak bu sırada yine önemli oranda (%25,1) düzensiz yapılarda gözlenmiştir. Ancak ısıtma süresinin uzaması oluşan β -plaka yapıların parçalanmasına ve düzensiz yapılar, antiparalel β -plaka ve β -dönüş yapıların oluşmasına neden olmuştur.



Şekil 4.16. Gluten ve bu proteinden elde edilen düz kıvrımlı nanofibrillere ait dairesel dikroizm spektrumları

4.4. Kuru madde içeriği

Farklı protein kaynakları kullanılarak farklı şartlarda asidik ısıtma uygulanarak elde edilen nanofibrillerin kuru madde miktarlarına ilişkin verilere ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.1’de özetlenmiştir. Ham verilere göre örneklerin kuru madde içeriği 91,9–99,9 g/100g arasında değişim göstermiştir.

Çalışma sonuçları nanofibril morfolojisi ve protein kaynağına bağlı olarak istatistiksel olarak önemli bir farklılığa neden olmadığını göstermiştir. Çalışma kapsamında elde edilen örnekler mümkün olduğunca benzer nem içeriğine kadar kurutulmuştur. Bu nedenle farklılık gözlenmemesi beklenen bir durumdur.

Öte yandan farklı ısıtma sürelerinde elde edilen nanofibrile proteinler arasında önemli farklılıklar ($p < 0,05$) gözlenmiştir. Nitekim 24 ve 36 saat ısıtma ile elde edilen örneklerin kuru madde miktarı, 48 saatte elde edilen nanofibrile proteinlere göre önemli düzeyde yüksektir. Kimyasal yapı analizlerinde detaylandırıldığı üzere nanofibrilasyon sürecinde protein yapısında büyük değişiklikler meydana gelmekte ve yeni yapılar açığa çıkmaktadır. Elde edilen bu yapıların su ile etkileşimi ve higroskopisitesinde farklılıklar olabileceği ve bu durumunda kuru madde miktarına gözlenen bu değişimlere neden olduğu değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.1. Nanofibrile proteinlerin kuru madde miktarı

Varyasyon kaynakları	N	Kuru madde miktarı (g/100g)	
Nanofibril morfolojisi	Düz nanofibril	24	98,6±0,3a
	Kıvrımlı nanofibril	18	98,4±0,5a
Isıtma süresi	24 saat	14	99,2±0,2a
	36 saat	14	99,5±0,1a
	48 saat	14	96,9±0,6b
Protein kaynağı	Peynir altı suyu proteini	12	97,8±0,6a
	Bezelye protein izolatı	12	98,9±0,3a
	Pirinç protein izolatı	12	99,0±0,2a
	Gluten	6	98,3±1,3a

Ortalama±standart hata, N: örnek sayısı, aynı varyasyon kaynağındaki farklı harfler p < 0,05 düzeyinde farklılığı göstermektedir.

4.5. Protein İçeriği

Farklı protein kaynakları kullanılarak farklı şartlar altında üretilen nanofibrillere ait protein içeriği sonuçları Çizelge 4.2.'de verilmiştir. Çizelgede görüldüğü üzere kıvrımlı nanofibriller düz nanofibrillere kıyasla daha düşük protein içeriğine sahip olmuştur. Bu durumun ısıtma süresince meydana gelen çözünmez yapılardan kaynaklandığı değerlendirilmiştir. Nanofibrile proteinlerin protein içeriği ısıtma süresine bağlı olarak daha az değişiklik göstermiştir. Buna göre 36 saat ısıtma, 24 veya 48 saat ısıtmaya kıyasla daha düşük protein içeriğine sahip olmuştur. Nanofibrilasyon proteinlerin mekanik olarak daha dayanıklı hale gelmesini sağlayan bir işlemdir. Ancak nanofibriller sıcaklığa tabi tutulduklarında zamanla yapısı parçalanarak düzeni bozulabilmektedir. Bu nedenle nanofibrilasyon süresinin artması ile protein içeriğinde azalma olduğu düşünülmektedir. Liu ve arkadaşları (2024), bezelye protein izolatını 2-20 saat arasında fibrilasyona tabi tutarak bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Isıtma süresinin artışıyla birlikte, protein moleküllerinin küçük moleküler ağırlıklı peptitlere ayrıldığını ve bu peptitlerin zamanla nanofibrillere dönüştüğünü belirtmişlerdir. Başlangıçta fibrillerin uzunluğu ısıtma süresiyle artarken, sürenin uzamasıyla birlikte uzunluklarında azalma gözlemlenmiş ve bu durum fibril parçalanmasıyla ilişkilendirilmiştir.

Protein kaynağı, örneklerin protein içeriği üzerine istatistiksel olarak önemli ($p < 0,05$) bir etki göstermiştir. Nitekim protein içeriği yüksekten düşüğe doğru gluten, PASP, pirinç protein izolatı ve bezelye protein izolatı şeklinde sıralanmıştır. Farklı kaynaklardan elde edilen proteinlerin farklı protein içeriğine sahip olması, amino asit

kaynaklarının ve ikincil yapılarının değişkenlik göstermesinden kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir. Ayrıca glutenden kıvrımlı nanofibrile proteinlerin elde edilememiş olması da bu sonucu etkilemiştir. Nitekim kıvrımlı nanofibriller, düz nanofibrillere göre %20 oranında daha düşük protein içeriğine sahip olmuştur.

Pirinç glutelini, pirinç proteininin %80'ini oluşturur ve asidik amino asit (aspartik asit ve glutamik asit) ve hidrofobik amino asitlerce zengindir. Asidik koşullarda ısıtıldığında protein fibrilleri eldesi için uygun bir protein kaynağı olarak kullanılabilir. Baklagil tohumlarının depo proteinini ise globulinler (%60-80), albüminler (%15-25), glutelinler ve prolaminler (%5'ten az) oluşturmaktadır. Baklagillerdeki en fazla bulunan depo proteini olan globulinler, sedimentasyon katsayılarına göre genel olarak 7S globulin ve 11S globulin olarak alt gruplara ayrılmaktadır. Bu proteinin sadece az bir kısmı fibrilasyona katılabilir (Qi ve ark., 2023). Çünkü gıda proteinleri için dönüşüm oranı genellikle %50 veya daha az olup geri kalanı ise peptitler veya amorf protein kümeleri şeklinde gerçekleşmektedir.

Gluten fibrillerinin oluşumunda hem glutenin hem de gliadin ortak rol oynamaktadır. Gliadinden gelen hidrofobik peptitler fibril çekirdeği olarak rol oynamaktadır. Gluten, yüksek düzeyde glutamin ve doğal β -tabakalar (amiloid fibrillerin kendi kendine birleşmesinde katkısı olan) içerdiği için fibril oluşumu için mükemmel bir moleküler yapısal temele sahiptir (Jansens ve ark., 2019; Liu ve ark., 2023). Hem glutenin hem de gliadin peptitleri, uzun ve düzgün gluten fibrillerinin oluşumuna katkıda bulunmaktadır.

β -laktoglobulin en önemli peynir altı suyu proteindir. Bu proteinin pH 2'de ısıtılma sırasında peptitlere hidrolize olduğu ve bu peptitlerin bir kısmının fibrillerde mevcut olduğu gösterilmiştir. Peynir altı suyu proteini izolatları β -laktoglobulinin yanı sıra α -laktalbumin ve sığır serum albümini gibi diğer küresel peynir altı suyu proteinlerini de içermektedir. α -laktalbumini ve sığır serum albümini fibril oluşturmazken, saf β -laktoglobulin çözeltilerinde oluşmaktadır. Esansiyel amino asitlerin, dallı zincirli amino asit varlığı proteinlerin fibril oluşumunu ve mekanik özelliklerini etkilemektedir (Mohammadian vd 2019). Çalışmada kullanılan protein izolatlarının (gluten, peynir altı suyu proteini, bezelye ve pirinç) amino asit içeriği ve yapısal özellikler bakımından birbirlerinden farklılık göstermesinden dolayı protein miktarları da farklı bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Farklı protein kaynakları kullanılarak farklı şartlar altında üretilen nanofibrillere ait protein içeriği sonuçları

Varyasyon kaynakları		N	Protein miktarı (g/100g)
Nanofibril morfolojisi	Düz nanofibril	24	78,3±0,9a
	Kıvrımlı nanofibril	18	63,8±0,9b
Isıtma süresi	24 saat	14	72,7±2,1a
	36 saat	14	70,7±2,3b
	48 saat	14	72,8±2,4a
Protein kaynağı	Peynir altı suyu proteini	12	74,5±2,7b
	Bezelye protein izolatı	12	66,3±2,2d
	Pirinç protein izolatı	12	72,1±1,9c
	Gluten	6	78,6±0,8a

Ortalama±standart hata, N: örnek sayısı, aynı varyasyon kaynağındaki farklı harfler p < 0,05 düzeyinde farklılığı göstermektedir.

4.6. Yığın yoğunluğu ve sıkıştırılmış yoğunluk

Yığın yoğunluğu, toz halindeki malzemenin, partiküller arası boşluklar da dahil edilerek, birim hacimdeki kütesinin belirlenmesi olarak tanımlanır. Sıkıştırılmış yoğunluk ise, tozun belirli titreşim, yüksekten bırakma veya presleme işlemleri sonrasında parçacıklarının yeniden düzenlenmesiyle elde edilen, boşluk oranı azaltılmış yoğunluk değeridir. Bu değerler, tozun paketleme ve işleme aşamasındaki davranışlarını anlamada kritik rol oynar (Ortega-Rivas, 2009; Tontul ve Topuz, 2018).

Protein tozları için bu yoğunluk değerleri, ürünün akışkanlığı, paketlenme verimliliği ve yeniden çözünme özellikleri açısından büyük önem taşımaktadır. Yüksek yığın yoğunluğu, taşıma ve depolama sırasında daha az hacim kaplamasını sağlarken, sıkıştırılmış yoğunluk tozun mekanik işlem ve taşıma sırasında nasıl yerleşeceğini; akışkanlığını, topaklanma eğilimini ve nihai tüketici deneyimini etkiler (Ortega-Rivas, 2009). Özellikle protein tozlarında, yoğunluk ölçümleri, kalite kontrol ve üretim optimizasyonu açısından belirleyici olup, ürünün son kullanım performansını iyileştirmede temel referanslar olarak kullanılmaktadır.

Çalışma kapsamında test edilen deneysel faktörlerden nanofibril morfolojisi ve protein kaynağı yığın yoğunluğu ve sıkıştırılmış yoğunluk değerleri üzerinde istatistiksel olarak önemli ($p < 0,05$) etki gösterirken, ısıtma süresi ise herhangi bir etki göstermemiştir (Çizelge 4.3). Kıvrımlı nanofibrile proteinlerin, düz nanofibrile proteinlere göre yığın yoğunluğu ve sıkıştırılmış yoğunluk değerleri yaklaşık 1,5 kat daha yüksek olarak bulunmuştur. Düz nanofibriller oldukça yüksek en/boy oranına

sahiptir, bu nedenle yığın halde iken toz partiküllerinin arasında daha fazla boşluk kalmakta ve bu nedenle daha düşük ağırlığa sahip olmaktadır. Öte yandan daha sıkı paketlenmiş yapıdaki kıvrımlı fibrillerde daha az hava boşluğu kalmaktadır.

Protein kaynakları arasında en büyük farklılık glutende görülmüştür. Glutenden yalnızca düz fibrillerin elde edilmiş olması nedeniyle diğer protein kaynaklarına kıyasla daha düşük yığın yoğunluğu ve sıkıştırılmış yoğunluk değerlerine sahip olmuştur. Öte yandan peynir altı suyu proteininden elde edilen nanofibrillerin yığın yoğunluk ve sıkıştırılmış yoğunluk değerleri bezelye proteinine göre önemli düzeyde düşük olarak tespit edilmiştir. Hayvansal bir protein olan peynir altı suyu proteininin bitkisel proteinlere göre daha düşük yığın yoğunluğu ve sıkıştırılmış yoğunluk değerlerine sahip olmasının hayvansal proteinlerin daha yüksek en/boy oranına sahip nanofibrillerin elde edilmesine imkan vermesinden kaynaklı olabileceği değerlendirilmiştir. Ancak bu durumun doğrulanması için görüntüleme analizlerinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Çizelge 4.3. Farklı protein kaynakları kullanılarak farklı şartlar altında üretilen nanofibrillerin yığın ve sıkıştırılmış yoğunluk değerleri

Varyasyon kaynakları		N	Yığın yoğunluğu (kg/m ³)	Sıkıştırılmış yoğunluk (kg/m ³)
Nanofibril morfolojisi	Düz nanofibril	24	128,8±14,2b	200,7±22,9b
	Kıvrımlı nanofibril	18	268,8±19,8a	495,1±36,0a
Isıtma süresi	24 saat	14	182,0±29,5a	295,1±56,2a
	36 saat	14	177,7±19,2a	314,1±40,7a
	48 saat	14	206,5±33,2a	371,5±60,1a
Protein kaynağı	Peynir altı suyu proteini	12	160,6±27,7b	285,8±51,5b
	Bezelye protein izolatı	12	251,5±23,4a	423,8±49,6a
	Pirinç protein izolatı	12	212,1±28,5ab	381,1±57,3ab
	Gluten	6	73,0±17,5c	106,9±20,3c

Ortalama±standart hata, N: örnek sayısı, aynı varyasyon kaynağındaki farklı harfler p < 0,05 düzeyinde farklılığı göstermektedir.

4.7. Akışkanlık ve koheziflik

Carr indeksi, tozların akışkanlık özelliklerini değerlendirmek için kullanılan önemli bir parametredir. Bu indeks, tozun serbest haldeki yığın yoğunluğu (bulk density) ile sıkıştırılmış veya taplanmış yoğunluğu (tapped density) arasındaki farkın, taplanmış yoğunluğa oranlanmasıyla hesaplanır. Düşük Carr indeksi, tozun daha iyi

akabildiğine işaret ederken, yüksek değerler yüksek topaklanma eğilimi anlamına gelmektedir (Juarez-Enriquez ve ark., 2022).

Hausner oranı ise aynı iki yoğunluk değeri kullanılarak tozun kohezifliğini değerlendirmede kullanılır. Düşük Hausner oranı ($<1,11$), tozun düşük kohezifliğe ve bu nedenle iyi akışkanlığa sahip olduğunu gösterirken; $1,35$ 'in üzerindeki değerler zayıf akışkanlık ve yüksek koheziflik anlamına gelir (Juarez-Enriquez ve ark., 2022). Bu parametreler, özellikle protein tozları gibi gıda ürünlerinde, üretim, paketlenme ve son kullanım özelliklerini optimize etmek, topaklanmayı engellemek ve ürün kalitesini garanti altına almak için kritik öneme sahiptir (Düsenberg ve ark., 2023).

Çizelge 4.4.'te nanofibrile örneklerin ortalama Carr indeksi ve Hausner oranı değerleri görülmektedir. Carr indeksi değerleri $33,6$ ile $45,8$ Hausner oranı ise $1,57$ ile $1,85$ arasında değişmiştir. Bu değerler elde edilen toz proteinlerin akış özelliklerinin çok zayıf olduğunu ve çok yüksek oranda kohezif bir yapıda olduğunu göstermektedir.

Çalışma kapsamında test edilen deneysel faktörlerin tamamı akışkanlık ve koheziflik değerini etkilemiştir. Düz fibriller kıvrımlı fibrillere göre daha iyi akış ve koheziflik özellikleri göstermiştir. Ayrıca ısıtma süresinin uzaması akış özelliklerini olumsuz etkilemiştir. Kıvrımlı morfoloji ve ısıtma süresinin artmasına bağlı olarak oluşan düzensiz ikincil yapılar partiküller arası etkileşimi artırıcı etki göstermesi nedeniyle bu sonucun elde edildiği düşünülmektedir.

Protein kaynakları arasında en iyi akış özellikleri glutende tespit edilmiştir. Bu durumun daha kötü akışkanlık ve koheziflik özelliklerine sahip kıvrımlı morfolojinin bu protein için üretilmemesi ile ilişkilendirilmiştir. Diğer üç protein arasında bezelye protein izolatu kısmen daha iyi akışkanlık ve koheziflik özellikleri sağlamıştır.

Çizelge 4.4. Farklı protein kaynakları kullanılarak farklı şartlar altında üretilen nanofibrillerin akışkanlık ve koheziflik değerleri

Varyasyon kaynakları		N	Carr indeksi	Hausner oranı
Nanofibril morfolojisi	Düz nanofibril	24	$35,2 \pm 2,2b$	$1,59 \pm 0,06b$
	Kıvrımlı nanofibril	18	$45,8 \pm 0,5a$	$1,85 \pm 0,02a$
Isıtma süresi	24 saat	14	$34,0 \pm 3,1c$	$1,56 \pm 0,08c$
	36 saat	14	$40,6 \pm 2,1b$	$1,71 \pm 0,06b$
	48 saat	14	$44,7 \pm 1,9a$	$1,83 \pm 0,05a$
Protein kaynağı	Peynir altı suyu proteini	12	$42,1 \pm 1,7a$	$1,74 \pm 0,05a$
	Bezelye protein izolatu	12	$38,4 \pm 2,9b$	$1,66 \pm 0,07b$

Pirinç protein izolatı	12	41,8±3,0a	1,76±0,08a
Gluten	6	33,6±5,7c	1,57±0,16c

Ortalama±standart hata, N: örnek sayısı, aynı varyasyon kaynağındaki farklı harfler p < 0,05 düzeyinde farklılığı göstermektedir.

4.8. Higroskopisite

Higroskopisite, bir malzemenin çevresindeki nemi çekme eğilimini ifade eder. İnce parçacıklardan oluşan protein tozlarında bu özellik, su moleküllerinin partikül yüzeyine adsorbe olmasıyla ortaya çıkar ve malzemenin yapısal düzenini bozarak topaklanma, akışkanlık kaybı ve çözünme performansında azalma gibi problemlere yol açabilir. Partikül boyutu, yüzey alanı ve kimyasal yapı gibi faktörler higroskopik davranışın şiddetini belirler ve ürünün fiziksel stabilitesi üzerinde doğrudan etki yapar (Tontul ve Topuz 2018). Nurhadi ve ark., (2012) %20'den daha az higroskopisite değerine olan tozların düşük higroskopik olarak sınıflandırılabilceğini belirtmiştir.

Çizelge 4.5'te verilen higroskopisite değerleri %18,3 ile %49 arasında değişim göstermiştir. Kıvrımlı morfolojiye sahip nanofibriller düz olanlara kıyasla çok daha yüksek higroskopisite değerlerine sahip olmuştur. Bu durumun nanofibrilasyon sırasında oluşan geniş yüzey alanı ve higroskopisitesi yüksek bileşenlerin açığa çıkmasından kaynaklandığı değerlendirilmiştir. Isıtma süresinin uzaması higroskopisite değerlerinde kısmi artışa neden olmuş ve 48 saatlik ısıtma ile üretilen nanofibriller diğer ısıtma sürelerine göre daha yüksek higroskopisite değerleri sağlamıştır. Dolayısıyla ısıtma süresinin uzaması hidrofilik amino asitlerin yüzeye taşınmasını sağladığı söylenebilir. Protein kaynakları arasında ise kıvrımlı nanofibril üretilmeyen gluten en düşük higroskopisite değerlerine sahip olmuş, diğer proteinler arasında ise önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Dolayısıyla higroskopisite üzerine protein kaynağının etkisinin düşük olduğu değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı protein kaynakları kullanılarak farklı şartlar altında üretilen nanofibrillere ait higroskopisite sonuçları

Varyasyon kaynakları		N	Higroskopisite (%)
Nanofibril morfolojisi	Düz nanofibril	24	23,2±1,3b
	Kıvrımlı nanofibril	18	49,0±2,3a
Isıtma süresi	24 saat	14	32,7±3,6b
	36 saat	14	33,7±3,5b
	48 saat	14	36,4±5,1a
Protein kaynağı	Peynir altı suyu proteini	12	34,6±3,0ab

Bezelye protein izolatu	12	37,1±3,3a
Pirinç protein izolatu	12	39,1±6,0a
Gluten	6	18,3±0,7c

Ortalama±standart hata, N: örnek sayısı, aynı varyasyon kaynağındaki farklı harfler $p < 0,05$ düzeyinde farklılığı göstermektedir.

4.9. Yüzey hidrofobisitesi

Yüzey hidrofobisitesi, protein tozları gibi malzemelerin yüzeyinin su moleküllerini itme eğilimini tanımlar. Bu özellik, partiküllerin yüzeyinde bulunan hidrofobik grupların açığa çıkmasıyla ilişkilidir. Yüzey hidrofobisitesi, protein molekülünün boyutuna ve şekline, amino asit bileşimine ve dizisine ve ayrıca herhangi bir molekül içi veya moleküller arası çapraz bağa bağlı değişim göstermektedir (Jiang ve ark., 2015). Isıl işlem gibi uygulamalar protein yapısında kısmi açılmaya neden olarak normalde gömülü olan hidrofobik bölgeleri ortaya çıkarır ve yüzey hidrofobisitesini artırır. Bu durum tozun suda çözünme, dispersiyon ve paketleme özelliklerini doğrudan etkileyerek, ürünün fonksiyonelliğinde belirleyici rol oynar.

Örneklerin yüzey hidrofobisitesi değerleri Çizelge 4.6.'da verilmiştir. Buna göre kıvrımlı fibriller, düz fibrillere göre daha yüksek yüzey hidrofobisitesine sahip olmuştur. Bu durum protein yapısının merkezinde gömülü olan hidrofobik amino asitlerin kıvrımlı nanofibrillerin üretimi sırasında daha fazla yüzeyde konumlanmasından kaynaklanmaktadır. Isıtma süresinin uzaması da yüzey hidrofobisitesini artırmış olup, en yüksek değer 48 saat ısıtma sonucunda gözlenmiştir. Protein kaynağı da yüzey hidrofobisitesi üzerine istatistiksel olarak önemli etki göstermiştir. Nitekim pirinç proteini en yüksek yüzey hidrofobisitesine sahipken bunu bezelye proteini izlemiştir. Bu durumun proteinlerin içerdiği amino asit iskeletlerinden kaynaklı olduğu değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı protein kaynakları kullanılarak farklı şartlar altında üretilen nanofibrillere ait yüzey hidrofobisitesi sonuçları

Varyasyon kaynakları		N	Yüzey hidrofobisitesi (μg)
Nanofibril morfolojisi	Düz nanofibril	24	63,0±4,9b
	Kıvrımlı nanofibril	18	102,9±4,7a
Isıtma süresi	24 saat	14	72,0±9,7b
	36 saat	14	81,8±7,7a
	48 saat	14	86,5±6,4a
Protein kaynağı	Peynir altı suyu proteini	12	63,3±6,0c

Bezelye protein izolatu	12	85,3±9,6b
Pirinç protein izolatu	12	100,9±7,2a
Gluten	6	61,5±8,5c

Ortalama±standart hata, N: örnek sayısı, aynı varyasyon kaynağındaki farklı harfler $p < 0,05$ düzeyinde farklılığı göstermektedir.

4.10. Emülsifikasyon özellikleri

Proteinler, yağ-su arayüzünde hızla adsorbe olarak yağ damlacıklarının etrafında viskoelastik bir tabaka oluşturabilen doğal emülsifikatörlerdir. Amfifilik yapıları, yani hidrofobik ve hidrofilik bölgelerin varlığı, yüzey gerilimini azaltarak ince, kararlı ve homojen bir emülsiyon filmi meydana getirir. Bu işlevsellik; protein kaynağı, ortam pH değeri, iyonik güç ve uygulanan ısıl veya mekanik işlemlere bağlı olarak değişir. Proteinin arayüzdeki konformasyonel değişimleri ve açılan hidrofobik bölgeler, damlacık stabilitesini doğrudan etkileyerek koalesans ve faz ayrışmasını engeller (Kim ve ark., 2020).

Çalışma kapsamında emülsifiye edici özellikler 1, 7 ve 9 olmak üzere 3 farklı pH değerinde belirlenmiştir. Bu amaçla hem emülsiyon aktivite indeksi hem de emülsiyon stabilite indeksi hesaplanmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 4.7.'de verilmiştir. Farklı pH değerleri arasında en iyi emülsiyon aktivite indeksi pH 7'de, emülsiyon stabilite indeksi ise genel olarak pH 1'de tespit edilmiştir. Emülsiyon aktivite indeksi açısından kıvrımlı nanofibriller, düz nanofibrillere göre daha iyi sonuçlar sağlamıştır. Ancak pH 7 dışında emülsiyon stabilite indeksi açısından önemli bir farklılık gözlenmemiştir. pH 7'de ise düz nanofibriller, kıvrımlılara göre daha iyi stabilite sağlamıştır.

Isıtma süreleri karşılaştırıldığında pH değerinden bağımsız olarak istatistiksel olarak en iyi emülsiyon stabilite indeksi değeri sağlayan ısıtma süresi 36 saat olarak tespit edilmiştir. Emülsiyon stabilite indeksi açısından ise pH 1 ve pH 9'da en yüksek değeri 24 saat ısıtma sağlarken, pH 7'de 48 saat sağlamıştır. pH değerinin protein yapısına etkisinden dolayı bu bulguların gözlemlendiği değerlendirilmektedir. Dong ve ark. (2023) çalışmalarında, farklı sürelerde elde edilen yumurta akı protein fibrillerinin emülsiyon aktivite aktivitesinin 8 saate kadar artış gösterdiğini, daha uzun ısıtma sürelerinin ise azalmaya neden olduğunu bildirmiştir. Ancak emülsiyon stabilite indeksi ise ısıtma süresinin uzaması ile artış göstermiştir. Bu çalışmada bildirilen emülsiyon

aktivite ve stabilite indeksi değerleri mevcut çalışmada elde edilen değerlere göre oldukça düşüktür.

Protein kaynakları arasında hem emülsiyon aktivite indeksi hem de emülsiyon stabilite indeksi açısından en iyi değerleri peynir altı suyu proteini sağlamıştır. Peynir altı suyu proteinin yüzey aktif özellikleri halihazırda bilinmekte ve gıda endüstrisinde emülsifiye edici özellikleri nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır (Yamauchi ve ark., 1980). Emülsiyon stabilitesi açısından ise peynir altı suyu proteini nanofibrilleri ile bezelye protein izolatı nanofibrilleri arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Gluten ise pH 7 dışındaki pH değerlerinde oldukça düşük emülsiyon aktivite ve stabilite indeksi değerleri sağlamıştır.

Çizelge 4.7. Farklı protein kaynakları kullanılarak farklı şartlar altında üretilen nanofibrillerin emülsifikasyon özellikleri

Varyasyon kaynakları		N	Emülsiyon aktivite indeksi (m ² /g)			Emülsiyon stabilite indeksi (dk)		
			1 pH	7 pH	9 pH	1 pH	7 pH	9 pH
Nanofibril morfolojisi	Düz nanofibril	24	4,1±0,6b	8,2±0,8b	4,9±1,0b	445,4±98,3a	487,0±127,8a	246,7±56,2a
	Kıvrımlı nanofibril	18	7,2±0,8a	9,6±1,0a	6,1±0,8a	309,0±151,6a	159,2±57,8b	408,6±170,7a
Isıtma süresi	24 saat	14	4,7±0,7b	6,8±0,5b	4,3±1,2b	568,0±193,3a	271,6±72,5ab	424,2±179,6a
	36 saat	14	6,0±1,1a	10,0±1,3a	7,3±1,3a	439,2±148,6ab	195,9±44,8b	278,8±137,5a
	48 saat	14	6,1±1,0a	9,7±1,2a	4,7±0,7b	153,6±51,5b	572,1±218,8a	245,2±86,6a
Protein kaynağı	Peynir altı suyu proteini	12	8,3±1,1a	13,8±1,3a	10,3±1,2a	436,0±187,8a	326,1±84,9a	592,7±210,8a
	Bezelye protein izolatu	12	5,6±0,6b	6,4±0,5b	3,2±0,7c	522,8±173,3a	443,2±218,1a	335,2±157,2ab
	Pirinç protein izolatu	12	4,7±0,6b	7,0±0,4b	4,7±0,3b	379,6±149ab	212,7±85,2a	147,0±33,5b
	Gluten	6	0,4±0,3c	7,3±0,4b	1,7±1,1d	31,8±6,7b	461,6±291,3a	63,0±11,9b

Ortalama±standart hata, N: örnek sayısı, aynı varyasyon kaynağındaki farklı harfler $p < 0,05$ düzeyinde farklılığı göstermektedir.

4.11. Genel değerlendirme

Yapılan analiz ve araştırma sonuçlarına göre protein içeriği açısından 48 saat ısı işlem uygulanmış düz nanofibril glütenin, en fazla protein oranına sahip örnek olduğu görülmektedir.

Yığın yoğunluğu ve sıkılaştırılmış yoğunluk analiz sonuçlarına göre, depolamada ve paketlemede avantaj sağlayacak örneğin 48 saat ısı işlem uygulanmış kıvrımlı bezelye nanofibril proteini olduğunu söyleyebiliriz.

Sektör kullanımında önemli bir veri olan akışkanlık ve koheziflik analizine göre, en iyi akışkanlık sağlayan örneğin 24 saat ısı işlem uygulanmış düz nanofibril gluten proteini olduğu anlaşılmaktadır.

Sektör kullanımında bir diğer önemli parametre olan, ortam nemini çekme eğilimini gösteren higroskoposite analiz sonuçlarına bakıldığında, bu konuda en kullanışlı örneğin 24 saat ısı işlem uygulanmış düz nanofibril gluten örneği olduğu görülmektedir.

Suda çözünme, dispersiyon ve paketleme özelliklerinde etkisi olan yüzey hidrofobisi analizine göre en avantajlı örnek, 48 saat ısı işlem uygulanmış kıvrımlı nanofibril bezelye proteini dir.

Gıda endüstrisinde önemli bir özellik olan emülsifiye etme kabiliyetinin, emülsifikasyon analzi sonuçlarına göre asidik gıdalarda kullanım için en uygun örneğin 48 saat ısı işlem uygulanmış kıvrımlı nanofibril peynir altı proteini olduğu, bitkisel alternatifin de hemen onun ardından gelen bezelye proteini olduğu görülmektedir. Daha nötr ve nötre yakın gıdalarda, bitkisel olarak 36 saat ısı işlem uygulanmış kıvrımlı gluten proteini kullanıma uygun bulunmuştur. Bazik gıdalarda ise emülsifikasyon aktivite açısından hayvansal gıdaya alternatif olarak 36 saat ısı işlem uygulanmış kıvrımlı pirinç proteini en uygun örnek olarak görülmektedir.

Bir karışımın emülsifiye edilmesi kadar emülsifikasyon sonrası stabil kalması da önem arz etmektedir. Emülsifikasyon stabilitesi sonuçlarına bakıldığında asidik gıdalarda kullanılmak üzere hayvansal proteine alternatif olarak en uygun örneğin, 24 saat ısı işlem uygulanmış düz pirinç proteini olduğu söylenebilir. Nötr ve nötre yakın gıdalarda kullanıma en uygun örnek 48 saat ısı işlem uygulanmış düz gluten örneği iken bazik gıdalarda ise emülsifikasyon stabilitesini korumak için kullanılacak, hayvansal proteine alternatif olabilecek örnek 24 saat ısı işlem uygulanmış düz nanofibril bezelye örneğidir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışmada farklı kaynaklardan elde edilen proteinlerin (peynir altı suyu proteini, pirinç proteini izolatu, bezelye proteini izolatu ve gluten) asidik koşullarda farklı sürelerde ısıtılmasıyla düz ve kıvrımlı morfolojilere sahip nanofibril yapılar oluşturulmuş, bu yapıların yapısal, kimyasal ve fonksiyonel özellikleri çok yönlü olarak değerlendirilmiştir.

FTIR ve dairesel dikroizm analizleri, nanofibrilasyon işlemi sonucunda proteinlerin ikincil yapılarında önemli değişikliklerin meydana geldiğini ortaya koymuştur. Özellikle β -plaka ve antiparalel β -plaka yapılarında anlamlı artış gözlenmiş, bu durum nanofibril oluşumunun belirgin bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Peynir altı suyu ve pirinç proteini bu yapısal dönüşüm açısından daha başarılı sonuçlar vermiştir. Gluten tüm ısıtma sürelerinde istenilen fibril yapı özelliklerini gösterirken, bezelye proteini izolatu yüksek ısıya karşı daha duyarlı bir yapı sergilemiş ve fibril oluşumu açısından daha sınırlı bir potansiyel göstermiştir.

Nanofibril morfolojisi ve ısıtma süresi, proteinlerin fizikokimyasal ve fonksiyonel özellikleri üzerinde belirleyici etkilere sahip olmuştur. Düz nanofibriller genellikle 36 saatlik ısıtma sonucunda optimum yapıya ulaşırken, kıvrımlı yapılar için 24 saatlik süre yeterli bulunmuştur. 48 saatlik ısıtma bazı örneklerde fibril yapının bozulmasına neden olmuş, bu durum floresans spektroskopisi ve dairesel dikroizm sonuçlarıyla da desteklenmiştir.

Protein içeriği, kuru madde miktarı ve fiziksel yoğunluk ölçümleri, protein kaynağına ve nanofibril morfolojisine bağlı olarak değişkenlik göstermiştir. Genel olarak kıvrımlı fibrillerin daha düşük protein içeriğine sahip olduğu, bunun ise ısıtma süresince meydana gelen çözünmez yapı oluşumları ve kısmi peptit ayrışmaları ile ilişkili olduğu değerlendirilmiştir.

Yüzey hidrofobisitesi, higroskopisite, yığın yoğunluğu ve sıkıştırılmış yoğunluk gibi teknolojik özellikler incelendiğinde, kıvrımlı nanofibriller düz yapılara kıyasla daha yüksek değerlere ulaşmıştır. Bu durum kıvrımlı yapıların daha fazla yüzey alanı sunması ve protein içindeki hidrofobik grupların açığa çıkmasıyla açıklanmıştır. Buna karşılık, düz fibriller daha iyi akışkanlık ve düşük koheziflik özellikleri sergileyerek endüstriyel işleme açısından daha avantajlı bulunmuştur.

Emülsifiye edici potansiyel bakımından en başarılı sonuçlar peynir altı suyu proteininden elde edilen nanofibrillerde gözlenmiştir. pH 7’de en yüksek emülsiyon aktivitesi sağlanırken, emülsiyon stabilitesinde ise kıvrımlı nanofibriller avantajlı bulunmuştur. Isıtma süresi açısından ise 36 saatlik işlem emülsiyon stabilitesini maksimum düzeye ulaştırmıştır. Glutenin, pH 7 dışındaki değerlerde düşük performans sergilemesi ve kıvrımlı yapılarının oluşturulamamış olması bu farklılığı açıklamaktadır.

Bu çalışma, protein kaynağı ve fibrilasyon koşullarının nanofibril yapıların oluşumu ve fonksiyonel özellikleri üzerinde belirleyici olduğunu göstermiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda, nanofibrilasyon işlemlerinde protein tipi ve ısıtma süresi gibi değişkenlerin dikkatle optimize edilmesi gerektiği anlaşılmaktadır.

5.2. Öneriler

Gelecekte yapılacak çalışmalarda, nanofibril oluşum mekanizmasının daha iyi anlaşılması amacıyla ileri görüntüleme teknikleri (SEM, TEM) ile morfolojik analizlerin desteklenmesi önerilmektedir. Ayrıca enzimatik ön işlemler, ultrasonik uygulamalar veya çapraz bağlayıcı ajanlar gibi farklı tekniklerle özellikle bitkisel proteinlerin fibril verimliliğinin artırılması mümkündür. Endüstriyel uygulamalar açısından, emülsifiye edici özelliği yüksek ve düşük higroskopisiteye sahip nanofibrillerin, fonksiyonel gıda formülasyonları, içecek sistemleri, enkapsülasyon teknolojileri ve farmasötik taşıyıcı sistemler gibi alanlarda geniş kullanım potansiyeline sahip olduğu değerlendirilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Adamcik, J. and Mezzenga, R. 2012, Proteins fibrils from a polymer physics perspective. *Macromolecules*, 45(3), 1137-1150.
- Akharume, F. U., Aluko, R. E. and Adedeji, A. A. 2021, Modification of plant proteins for improved functionality: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 198-224.
- Akharume, F., Xiong, Y. L., and Adedeji, A. 2019, Effects of transglutaminase in product formulation on physico-textural properties of protein rich extruded snacks. In 2019 ASABE Annual International Meeting (p. 1). *American Society of Agricultural and Biological Engineers*.
- Akkermans, C., Venema, P., van der Goot, A. J., Gruppen, H., Bakx, E. J., Boom, R. M. and van der Linden, E. 2008, Peptides are building blocks of heat-induced fibrillar protein aggregates of β -lactoglobulin formed at pH 2. *Biomacromolecules*, 9(5), 1474-1479.
- An, D., Ban, Q., Du, H., Wang, Q., Teng, F., Li, L., and Xiao, H. 2022, Nanofibrils of food-grade proteins: Formation mechanism, delivery systems, and application evaluation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(6), 4847-4871.
- An, F., An, G., An, Q., Antonelli, V., Baussan, E., Beacom, J. and Sinev, V. 2016, Neutrino physics with JUNO. *Journal of Physics G: Nuclear and Particle Physics*, 43(3), 030401.
- Balasubramaniam, V. M., Martinez-Monteaagudo, S. I. and Gupta, R. 2015, Principles and application of high pressure-based technologies in the food industry. *Annual review of food science and technology*, 6(1), 435-462.
- Bekard, I. B., Asimakis, P., Bertolini, J. and Dunstan, D. E. 2011, The effects of shear flow on protein structure and function. *Biopolymers*, 95(11), 733-745.
- Bengoechea, C., Romero, A., Villanueva, A., Moreno, G., Alaiz, M., Millán, F., Guerrero, A. and Puppo, M. C. 2008, Composition and structure of carob (*Ceratonia siliqua* L.) germ proteins. *Food chemistry*, 107(2), 675-683.
- Bolder, S. G., Hendrickx, H., Sagis, L. M. and van der Linden, E. 2006, Fibril assemblies in aqueous whey protein mixtures. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(12), 4229-4234.
- Bolder, S. G., Sagis, L. M., Venema, P., and van der Linden, E. 2007, Effect of stirring and seeding on whey protein fibril formation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(14), 5661-5669.
- Buchert, J., Ercili Cura, D., Ma, H., Gasparetti, C., Monogioudi, E., Faccio, G. and Kruus, K. 2010, Crosslinking food proteins for improved functionality. *Annual review of food science and technology*, 1(1), 113-138.

- Calvez, J., Azzout-Marniche, D., and Tomé, D. 2024, Protein quality, nutrition and health. *Frontiers in Nutrition*, 11, 1406618.
- Cao, Y., Tang, X., Yuan, M. and Han, W. 2020, Computational studies of protein aggregation mediated by amyloid: Fibril elongation and secondary nucleation. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 170, 461-504.
- Chatani, E. and Yamamoto, N. 2018, Recent progress on understanding the mechanisms of amyloid nucleation. *Biophysical reviews*, 10(2), 527-534.
- Chen, X., Yi, J., Wen, Z. and Fan, Y. 2024, Ultrasonic pretreatment and epigallocatechin gallate incorporation enhance the formation, apparent viscosity, and antioxidant activity of pea protein amyloid-like fibrils. *Food Hydrocolloids*, 149, 109630.
- Chen, Y. ve Pepin, A. 2001, Nanofabrikasyon: Geleneksel ve geleneksel olmayan yöntemler. *Elektroforez*, 22 (2), 187-207.
- Cobb, J. S., Zai-Rose, V., Correia, J. J. and Janorkar, A. V. 2020, FT-IR spectroscopic analysis of the secondary structures present during the desiccation induced aggregation of elastin-like polypeptide on silica. *ACS omega*, 5(14), 8403-8413.
- Day, L., Cakebread, J. A. and Loveday, S. M. 2022, Food proteins from animals and plants: Differences in the nutritional and functional properties. *Trends in Food Science and Technology*, 119, 428-442.
- De ESLIE, W. D. and Cheryan, M. 1981, Continuous enzymatic modification of proteins in an ultrafiltration reactor. *Journal of Food Science*, 46(4), 1035-1042.
- Delahaije, R. J., Wierenga, P. A., Giuseppin, M. L. and Gruppen, H. 2014, Improved emulsion stability by succinylation of patatin is caused by partial unfolding rather than charge effects. *Journal of colloid and interface science*, 430, 69-77.
- Dong, W., Zhang, X., Ding, L., Liu, C., Ai, M., Jin, Y., Isobe, K., Handa, A. and Cai, Z. 2023, Enhancement of emulsification properties by modulation of egg white protein fibril structure with different heating times. *Food Hydrocolloids*, 135, 108203.
- Düsenberg, B., Schmidt, J., Sensoy, I. and Bück, A. 2023, Flowability of plant based food powders: Almond, chestnut, chickpea, coconut, hazelnut and rice. *Journal of Food Engineering*, 357, 111606.
- Fändrich, M., Forge, V., Buder, K., Kittler, M., Dobson, C. M. and Diekmann, S. 2003, Myoglobin forms amyloid fibrils by association of unfolded polypeptide segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 15463-15468.
- Feng, Z., Wu, G., Liu, C., Li, D., Jiang, B., Zhang, X. 2018, Edible coating based on whey protein isolate nanofibrils for antioxidation and inhibition of product browning. *Food Hydrocolloids*, 79, 179-188.

- Gaspar, A. L. C. and de Góes-Favoni, S. P. 2015, Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review. *Food chemistry*, 171, 315-322.
- Gharibzahedi, S. M. T. and Smith, B. 2020, The functional modification of legume proteins by ultrasonication: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 98, 107-116.
- Humblet-Hua, N. P. K., van der Linden, E. and Sagis, L. M. C. 2013, Surface rheological properties of liquid-liquid interfaces stabilized by protein fibrillar aggregates and protein-polysaccharide complexes. *Soft Matter*, 9(7), 2154–2165.
- Jaeger, S. R., Jin, D. and Roigard, C. M. 2024, Plant-based alternatives need not Be inferior: findings from a sensory and consumer research case study with cream cheese. *Foods*, 13(4), 567.
- Jahan-Mihan, A., Luhovyy, B. L., El Khoury, D. and Anderson, G. H. 2011, Dietary proteins as determinants of metabolic and physiologic functions of the gastrointestinal tract. *Nutrients*, 3(5), 574–603.
- Jansens, K. J., Lambrecht, M. A., Rombouts, I., Monge Morera, M., Brijs, K., Rousseau, F. and Delcour, J. A. 2019, Conditions governing food protein amyloid fibril formation—Part I: Egg and cereal proteins. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 18(4), 1256-1276.
- Jansens, K. J., Rombouts, I., Grootaert, C., Brijs, K., Van Camp, J., Van der Meeren, P., Rousseau, F., Schymkowitz, J. and Delcour, J. A. 2019, Rational design of amyloid-like fibrillary structures for tailoring food protein techno-functionality and their potential health implications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(1), 84-105.
- Jayawardena, N., Kaur, M., Nair, S., Malmstrom, J., Goldstone, D., Negrón, L. and Domigan, L. J. 2017, Amyloid fibrils from hemoglobin. *Biomolecules*, 7(2), 37.
- Jiang, L., Wang, Z., Li, Y., Meng, X., Sui, X., Qi, B. and Zhou, L. 2015, Relationship between surface hydrophobicity and structure of soy protein isolate subjected to different ionic strength. *International Journal of Food Properties*, 18(5), 1059-1074.
- Josefsson, T., Ivarsson, A., Gustafsson, H., Stenling, A., Lindwall, M., Tornberg, R. and Böröy, J. 2019, Effects of mindfulness-acceptance-commitment (MAC) on sport-specific dispositional mindfulness, emotion regulation, and self-rated athletic performance in a multiple-sport population: an RCT study. *Mindfulness*, 10, 1518-1529.
- Juarez-Enriquez, E., Olivas, G. I., Zamudio-Flores, P. B., Perez-Vega, S., Salmeron, I., Ortega-Rivas, E. and Sepulveda, D. R. 2022, A review on the influence of water on food powder flowability. *Journal of Food Process Engineering*, 45(5), e14031.
- Karabulut, G. 2025, Advancing sustainable packaging through self-assembly induced amyloid fibrillization of soy and pea protein nanofilms. *Food Chemistry*, 463, 141302.

- Keskin, A. V., Gençten, M., Bozar, S., Arvas, M. B., Güneş, S. and Sahin, Y. 2020, Preparation of anatase form of TiO₂ thin film at room temperature by electrochemical method as an alternative electron transport layer for inverted type organic solar cells. *Thin Solid Films*, 706, 138093.
- Kim, W., Wang, Y. and Selomulya, C. 2020, Dairy and plant proteins as natural food emulsifiers. *Trends in Food Science and Technology*, 105, 261-272.
- Lambrecht, M. A., Jansens, K. J., Rombouts, I., Brijs, K., Rousseau, F., Schymkowitz, J. and Delcour, J. A. 2019, Conditions governing food protein amyloid fibril formation. Part II: Milk and legume proteins. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 18(4), 1277-1291.
- Lee, J., Lee, J. H., Paik, S. R., Yeom, B. and Char, K. (2019). Thermally triggered self-assembly of κ -casein amyloid nanofibrils and their nanomechanical properties. *Polymer*, 179, 121626.
- Li, C. P., Enomoto, H., Hayashi, Y., Zhao, H. and Aoki, T. 2010, Recent advances in phosphorylation of food proteins: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 43(9), 1295-1300.
- Li, D., Zhao, Y., Wang, X., Tang, H., Wu, N., Wu, F. and Elfalleh, W. 2020, Effects of (+)-catechin on a rice bran protein oil-in-water emulsion: Droplet size, zeta-potential, emulsifying properties, and rheological behavior. *Food Hydrocolloids*, 98, 105306.
- Liu, C., Wu, D., Wang, P., McClements, D. J., Cui, S., Liu, H., Leng, F., Sun, Q. and Dai, L. 2024, Study on the formation mechanism of pea protein nanofibrils and the changes of structural properties of fibril under different pH and temperature. *Food Hydrocolloids*, 150, 109735.
- Liu, J. and Tang, C. H. 2013, Heat-induced fibril assembly of vicilin at pH 2.0: Reaction kinetics, influence of ionic strength and protein concentration, and molecular mechanism. *Food research international*, 51(2), 621-632.
- Liu, L., Yang, S., Chen, C., Fang, Y., Li, L. and Ban, Z. 2023, High-performance films fabricated by food protein nanofibrils loaded with vanillin: Mechanism, characterization and bacteriostatic effect. *Food Packaging and Shelf Life*, 37, 101080.
- Ma, W., Tang, C. and Lai, L. 2005, Specificity of trypsin and chymotrypsin: loop-motion-controlled dynamic correlation as a determinant. *Biophysical journal*, 89(2), 1183-1193.
- Mackintosh, S. H., Meade, S. J., Healy, J. P., Sutton, K. H., Larsen, N. G., Squires, A. M. and Gerrard, J. A. 2009, Wheat glutenin proteins assemble into a nanostructure with unusual structural features. *Journal of Cereal Science*, 49(1), 157-162.
- Mazaheri, M., Moosavi-Movahedi, A. A., Saboury, A. A., Khodaghali, F., Shaerzadeh, F. and Sheibani, N. 2015, Curcumin protects β -lactoglobulin fibril formation and fibril-induced neurotoxicity in PC12 cells. *PLoS One*, 10(7), e0133206.

- Meng, Y., Wei, Z. and Xue, C. 2022, Protein fibrils from different food sources: A review of fibrillation conditions, properties, applications and research trends. *Trends in Food Science and Technology*, 121, 59-75.
- Meng, Y., Wei, Z. and Xue, C. 2022, Protein fibrils from different food sources: A review of fibrillation conditions, properties, applications and research trends. *Trends in Food Science and Technology*, 121, 59-75.
- Moayedzadeh, S. and Madadlou, A. 2015, Formation mechanisms, handling and digestibility of food protein nanofibrils. *Trends in Food Science and Technology*, 45(1), 50-59.
- Mohammadian, M. and Madadlou, A. 2016, Characterization of fibrillated antioxidant whey protein hydrolysate and comparison with fibrillated protein solution. *Food Hydrocolloids*, 52, 221-230.
- Mohammadian, M. and Madadlou, A. 2018, Technological functionality and biological properties of food protein nanofibrils formed by heating at acidic condition. *Trends in Food Science and Technology*, 75, 115-128.
- Mohammadian, M., Salami, M., Momen, S., Alavi, F., Emam-Djomeh, Z. and Moosavi-Movahedi, A. A. 2019, Enhancing the aqueous solubility of curcumin at acidic condition through the complexation with whey protein nanofibrils. *Food Hydrocolloids*, 87, 902-914.
- Moughan, P. J., Fulgoni, V. L., 3rd, and Wolfe, R. R. 2024, The Importance of Dietary Protein Quality in Mid- to High-Income Countries. *The Journal of nutrition*, 154(3), 804–814.
- Munialo, C. D., Martin, A. H., Van Der Linden, E. and De Jongh, H. H. 2014, Fibril formation from pea protein and subsequent gel formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(11), 2418-2427.
- Nurhad, B., Andoyo, R. and Indiarto, R. 2012, Study the properties of honey powder produced from spray drying and vacuum drying method. *International Food Research Journal*, 19(3).
- Ortega-Rivas, E. 2009, Bulk properties of food particulate materials: an appraisal of their characterisation and relevance in processing. *Food and Bioprocess Technology*, 2, 28-44.
- Panda, C., Sharma, L. G. and Pandey, L. M. 2023, Experimental procedures to investigate fibrillation of proteins. *MethodsX*, 11, 102445.
- Panyam, D. and Kilara, A. 1996, Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in food science and technology*, 7(4), 120-125.
- Pearce, F. G., Mackintosh, S. H. and Gerrard, J. A. 2007, Formation of amyloid-like fibrils by ovalbumin and related proteins under conditions relevant to food processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(2), 318-322.
- Phillips, L. G. (2013). *Structure-function properties of food proteins*. Academic Press.

- Phillips, L. G. 2013, Structure-function properties of food proteins. Academic Press.
- Pojić, M., Mišan, A. and Tiwari, B. 2018, Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. *Trends in Food Science and Technology*, 75, 93-104.
- Qamar, S., Manrique, Y. J., Parekh, H. and Falconer, J. R. 2020, Nuts, cereals, seeds and legumes proteins derived emulsifiers as a source of plant protein beverages: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(16), 2742-2762.
- Qi, X., Li, Y., Li, J., Rong, L., Pan, W., Shen, M. and Xie, J., 2023, Fibrillation modification to improve the viscosity, emulsifying, and foaming properties of rice protein, *Food Research International*, 166, 112609.
- Ridgley, D. M., Claunch, E. C., Lee, P. W. and Barone, J. R. 2014, The role of protein hydrophobicity in conformation change and self-assembly into large amyloid fibers. *Biomacromolecules*, 15(4), 1240-1247.
- Riek, R. and Eisenberg, D. S. 2016, The activities of amyloids from a structural perspective. *Nature*, 539(7628), 227-235.
- Riek, R. and Eisenberg, D. S. 2016, The activities of amyloids from a structural perspective. *Nature*, 539(7628), 227-235.
- Rühs, P. A., Affolter, C., Windhab, E. J. and Fischer, P. 2013, Shear and dilatational linear and nonlinear subphase controlled interfacial rheology of β -lactoglobulin fibrils and their derivatives. *Journal of Rheology*, 57(3), 1003-1022.
- Sadat, A. and Joye, I. J. 2020, Peak fitting applied to fourier transform infrared and raman spectroscopic analysis of proteins. *Applied Sciences*, 10(17), 5918.
- Šarić, A., Michaels, T. C., Zacccone, A., Knowles, T. P. and Frenkel, D. 2016, Kinetics of spontaneous filament nucleation via oligomers: Insights from theory and simulation. *The Journal of chemical physics*, 145(21).
- Shahnaz, T., Fawole, A. O., Adeyanju, A. A. and Onuh, J. O. 2024, Food Proteins as Functional Ingredients in the Management of Chronic Diseases: A Concise Review. *Nutrients*, 16(14), 2323.
- Sun, C., Xiong, Z., Zhang, J. and Fang, Y. 2020, Environmental parameters-dependent self-assembling behaviors of α -zein in aqueous ethanol solution studied by atomic force microscopy. *Food chemistry*, 331, 127349.
- Sun-Waterhouse, D., Zhao, M. and Waterhouse, G. I. 2014, Protein modification during ingredient preparation and food processing: approaches to improve food processability and nutrition. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 1853-1893.
- Syamaladevi, R. M., Insan, S. K., Dhawan, S., Andrews, P. and Sablani, S. S., 2012, Physicochemical properties of encapsulated red raspberry (*Rubus idaeus*) powder: Influence of high-pressure homogenization, *Drying Technology*, 30 (5), 484-493.

- Tong, X., Cao, J., Tian, T., Lyu, B., Miao, L., Lian, Z., Cui, W., Liu, S., Wang, H. and Jiang, L. 2022, Changes in structure, rheological property and antioxidant activity of soy protein isolate fibrils by ultrasound pretreatment and EGCG. *Food Hydrocolloids*, 122, 107084.
- Tontul, I. and Topuz, A. 2017, Spray-drying of fruit and vegetable juices: Effect of drying conditions on the product yield and physical properties. *Trends in food science and technology*, 63, 91-102.
- Tontul, İ., Kasimoglu, Z., Asik, S., Atbakan, T. and Topuz, A. 2018, Functional properties of chickpea protein isolates dried by refractance window drying. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 1253-1259.
- Urbonaite, V., Van der Kaaij, S., De Jongh, H. H. J., Scholten, E., Ako, K., Van der Linden, E. and Pouvreau, L. 2016, Relation between gel stiffness and water holding for coarse and fine-stranded protein gels. *Food Hydrocolloids*, 56, 334-343.
- Wan, Y. and Guo, S. 2019, The formation and disaggregation of soy protein isolate fibril: Effects of pH. *Food Biophysics*, 14(2), 164-172.
- Wang, J., Zhu, H., Gan, H., Meng, Q., Du, G., An, Y. and Liu, J. 2020a, The effect of heparan sulfate on promoting amyloid fibril formation by β -casein and their binding research with multi-spectroscopic approaches. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 202, 111671.
- Wang, X., Li, Y. and Zhong, C. 2015, Amyloid-directed assembly of nanostructures and functional devices for bionanoelectronics. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(25), 4953-4958.
- Wang, Y., Wang, Y., Li, K., Bai, Y., Li, B. and Xu, W. 2020b, Effect of high intensity ultrasound on physicochemical, interfacial and gel properties of chickpea protein isolate. *Lwt*, 129, 109563.
- Wawer, J., Kaczkowska, E., Karczewski, J., Olszewski, M., Augustin-Nowacka, D. and Krakowiak, J. 2019, Amyloid fibril formation in the presence of water structure-affecting solutes. *Biophysical Chemistry*, 254, 106265.
- Webb, M. F., Naeem, H. A. and Schmidt, K. A. 2002, Food protein functionality in a liquid system: a comparison of deamidated wheat protein with dairy and soy proteins. *Journal of Food Science*, 67(8), 2896-2902.
- Wei, Z. and Huang, Q. 2020, In vitro digestion and stability under environmental stresses of ovotransferrin nanofibrils. *Food Hydrocolloids*, 99, 105343.
- Wu, G. 2013, Functional amino acids in nutrition and health. *Amino acids*, 45(3), 407-411.
- Yamauchi, K., Shimizu, M. and Kamiya, T. 1980, Emulsifying properties of whey protein. *Journal of food science*, 45(5), 1237-1242.

- Yang, W., Wang, Z., Zhou, Y., Ye, X., Shi, L., Cheng, L. and Zhang, X. 2013, Study on the control of pore sizes of membranes using chemical methods Part IV. The role of organic acids. *Desalination*, 324, 57-64.
- Yao, X. T. and Zhao, X. H. 2015, Effects of caseinate deamidation on transglutaminase-induced glucosamine conjugation and cross-linking as well as properties of the treated caseinates. *CyTA-Journal of Food*, 13(3), 400-407.
- Yin, S. W., Tang, C. H., Wen, Q. B. and Yang, X. Q. 2009, Functional and structural properties and in vitro digestibility of acylated hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolates. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12), 2653-2661.
- Zhang, C., Fu, Y., Li, Z., Li, T., Shi, Y., Xie, H., Li, Y., Su, H. and Li, Z. 2021, Application of whey protein isolate fibrils in encapsulation and protection of β -carotene. *Food Chemistry*, 346, 128963.
- Zhang, H., Lv, S., Jin, C., Ren, F. and Wang, J. 2023, Wheat gluten amyloid fibrils: Conditions, mechanism, characterization, application, and future perspectives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 126435.
- Zhang, Q., Li, L., Lan, Q., Li, M., Wu, D., Chen, H. and Yang, W. 2019, Protein glycosylation: A promising way to modify the functional properties and extend the application in food system. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(15), 2506-2533.
- Zhang, S., Sun, L., Ju, H., Bao, Z., Zeng, X. A. and Lin, S. 2021, Research advances and application of pulsed electric field on proteins and peptides in food. *Food Research International*, 139, 109914.
- Zhang, Y. H., Huang, L. H. and Wei, Z. C. 2014, Effects of additional fibrils on structural and rheological properties of rice bran albumin solution and gel. *European Food Research and Technology*, 239(6), 971-978.
- Zhou, P. and Regenstein, J. M. 2005, Effects of alkaline and acid pretreatments on Alaska pollock skin gelatin extraction. *Journal of food science*, 70(6), c392-c396.