



## Protein Çöktürme Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Ayça AKYÜZ<sup>1\*</sup>

Seda ERSUS BİLEK<sup>1</sup>

### Özet

Canlıların beslenmesinde yer alan proteinler, büyüme, gelişme, hormon ve enzimlerin sentezi gibi birçok hayati mekanizmada yer alan hücresel fonksiyonların yerine getirilmesinde önemli bir role sahiptir. Proteinler, bitkisel ve hayvansal kaynaklı proteinler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Genellikle hayvansal kaynaklı beslenmeden başta et ve et ürünleri olmak üzere protein ihtiyacımızı karşılıyor olsak da bitkisel proteinlerde beslenmemizde hem direkt protein kaynağı olan hammaddelerle hem de ekstrakt olarak yer aldıkları ürünlerin tüketimi ile yer almaktadır. Protein izolatları bitkisel kaynaklardan izoelektrik ve tuz çöktürmesi yöntemleri ile ayrıştırılmakta ve elde edilen proteinler fonksiyonel özelliklerine göre gıda formülasyonlarında kullanılmaktadır. Bu derlemede, izoelektrik ve tuz çöktürmesi yöntemlerinin ayrı ayrı protein izolatlarının üretilmesine olan etkilerinin araştırılması, elde edilen izolatların verimliliği ve fonksiyonel özelliklerinin karşılaştırılması konusunda bilgi verilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Bitkisel protein, izoelektrik çöktürme, amonyum sülfat çöktürme

## Comparison of Protein Precipitation Methods

### Abstract

The proteins involved in living organisms have an important role in the fulfillment of cellular functions involved in many vital mechanisms such as growth, development, synthesis of hormones and enzymes. Proteins are divided into two groups as plant and animal derived proteins. Although we generally compensate our protein needs from animal derived proteins especially meat and meat products, plant proteins in our diet are included with both direct source of raw materials and extracts in the consumption of products. Protein isolates are separated from plant sources by isoelectric and salt precipitation methods and the proteins obtained are used in food formulations according to their functional properties. In this review, the effects of isoelectric and salt precipitation methods on the production of individual protein isolates were investigated, and the efficiency and functional properties of the isolates were compared.

**Keywords:** Plant protein, isoelectric precipitation, ammonium sulphate precipitation

### Giriş

Proteinler, vücutta dokuların önemli bir bileşeni olmakla birlikte hormon, antikor, nükleik asit ve enzim gibi önemli biyolojik faaliyetlerde yer alan moleküllerin yapı taşıdır. Enzimlerin yapı taşı olan proteinler, biyokimyasal tepkimelerde katalizör işlevi görür ve metabolizma için yaşamsal bir role sahiptirler. Proteinlerin bir kısmı insan vücudu tarafından sentezlenebilirken bir kısmı sentezlenemez ve insan vücudunun sentezleyemediği amino asitlerin (esansiyel amino asitler) dışarıdan besin

yoluyla vücuda alınması gerekir (Nelson ve Cox, 2005).

Günümüzde, artan nüfus ile beraber beslenme için gerekli olan protein kaynaklarına olan ihtiyaç da artmaktadır. Mevcut ve artan nüfusun dengeli beslenmesi için gerekli olan hayvansal protein açığının karşılanması giderek güçleşmektedir. Bu açığın karşılanmasında bitkisel proteinlerin kullanımı giderek önem kazanmaktadır. Ayrıca sağlıklı beslenme ve kişisel gelişim konusunda bilgilerin günümüzde çok fazla gündemde olması nedeniyle de

vejetaryen ya da vegan olma konusuna olan ilgi artmaktadır. Dolayısıyla bitkisel protein eldesinde protein içeriği yüksek yeni hammaddeler bulunmalıdır. Ticari olarak pazarda bitkisel kaynaklı en fazla üretim ve tüketime sahip olan protein grubu soya proteinleridir. Ancak, soya fasulyesinin gıda alerjilerinin %90'ını oluşturan 8 besin grubundan biri olduğu tahmin edilmektedir (FDA, 2004). Bu nedenle son yıllarda, soyaya alternatif bezelye, acı bakla, fasulye, patates, mısır, pirinç ve ayçiçeği proteinleri üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Özdemir ve ark., 2013). Yapılan çalışmalarda, soyaya alternatif çeşitli bitkisel kaynaklar için maksimum verim sağlamak amacıyla alkali, asit ve su ekstraksiyonu/izoelektrik çöktürme, tuz ekstraksiyonu/misel çöktürme ve ultrafiltrasyon yöntemleri protein konsantrisi veya izolatu üretme yöntemleri olarak kullanılmaktadır (Boye ve ark., 2010). Elde edilen protein konsantrileri veya izolatları, direkt protein kaynağı olarak kullanılabilmesi gibi ürünün fonksiyonel özelliklerini geliştirmek amacıyla işlenmiş et ürünlerine, fırıncılık ve pastacılık ürünlerine ve ekstrüde ürünlere ikame edilerek de kullanılmaktadır (Klupsaitte ve Juodeikiene, 2015). Protein elde etme yöntemleri, farklı hammaddeler için protein verimi açısından farklılıklara sebep olmaktadır. Bu nedenle, farklı hammaddeler için en uygun ekstraksiyon/çöktürme yönteminin bulunması gerekmektedir. Aynı zamanda, bitkisel kaynaklardan farklı ekstraksiyon/çöktürme yöntemleriyle üretilen protein konsantrileri veya izolatlarının farklı fonksiyonel özelliklere sahip olması, bu yöntemlerin hangisinin hammaddeye uygunluğunun bulunması bu konuda yapılan çalışmaların önemini artırmaktadır (Karaca ve ark., 2011).

### Protein ayırma ve saflaştırma yöntemleri

Proteinlerin ayrılması ve saflaştırılması, hammaddenin ekstraksiyonu ile proteinlerin izole edilmesi ve istenmeyen kontaminantların uzaklaştırılması olarak tanımlanmaktadır (Ünlüsayın, 2009).

Ayırma ve saflaştırma yöntemleri proteinlerin çözünürlük, boyut, yük ve bağlama afinitesi gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerinden

yararlanılarak uygulanmaktadır (Berg ve ark., 2015). Proteinlerin bu özelliklerine göre uygulanan ayırma yöntemleri Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre protein ayırma yöntemleri (Kumar ve Sharma, 2015)

Ayırma İşlemleri	Özellik
1. Çöktürme	
-Amonyum sülfat	Çözünürlük
-İzoelektrik	Çözünürlük, pH
2. Kromatografi	
-İyon Değişimi K.	Yük, yük dağılımı
-Jel Filtrasyon K.	Boyut, şekil
3. Elektroferez	Yük, boyut, şekil
4. Santrifüj	Boyut, şekil
5. Ultrafiltrasyon	Boyut, şekil

Proteinlerin çöktürerek eldesi hem hızlı bir ayrılma hem de istenilen saflıkta ürün eldesi için daha ekonomik ve güvenilir bir yöntem olması sebebiyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Sivasankar, 2005). Çöktürerek elde etme yönteminde proteinlerin çözünürlük özelliği kullanılmaktadır ve proteinlerin çözelti içerisindeki çözünürlüğü, yapısındaki amino asitlerin hidrofobik ve hidrofilik grupların dağılımına bağlı olmakla birlikte sıcaklık, pH değeri, iyonik kuvvet ve tuz konsantrasyonu gibi faktörler ile değişmektedir (Bonner, 2007). Çözünürlüğü etkileyen bu faktörler kullanılarak çeşitli çöktürme yöntemleri uygulanmaktadır.

### İzoelektrik noktaya bağlı çöktürme

İzoelektrik çöktürme yöntemi ile proteinler, çözeltinin pH değeri ayarlanarak çöktürülmektedir. Proteinlerin yapı taşı olan amino asitler,  $\alpha$ -karbon atomuna bağlı bir karboksil grubu (COOH), bir amino grubu (NH<sub>2</sub>), bir hidrojen atomu (H) ve değişken grup (R: Radikal grup) olmak üzere 4 gruptan oluşmaktadır (Saldamlı ve Temiz, 2017). Proteinler, yapısında bulunan karboksil (COOH) ve amino (NH<sub>2</sub>) grubu nedeniyle hem pozitif yüklü hem de negatif yüklü gruplar ile kaplıdır. Proteinler, asidik ortamda baz gibi, bazik ortamda asit gibi davranma özelliğine sahiptir. Proteinin net yükünün sıfır olduğu pH değeri ise o proteinin izoelektrik noktası (pI)

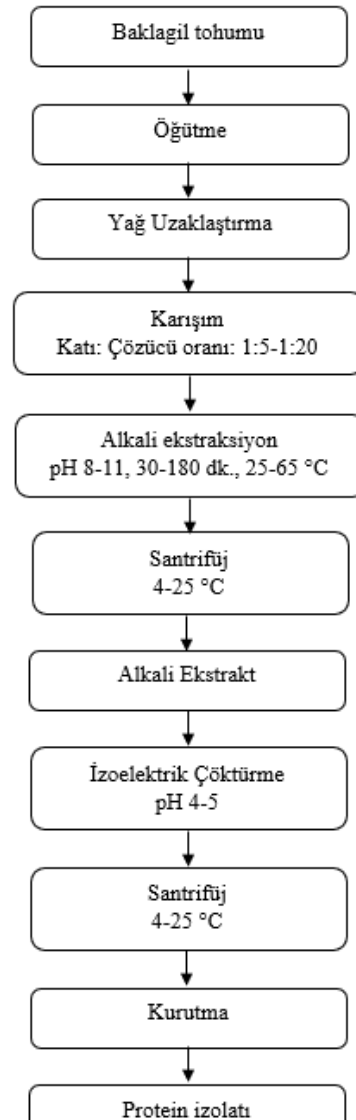
## Protein Çöktürme Yöntemlerinin Karşılaştırılması

olarak adlandırılmaktadır. İzoelektrik noktada artı ve eksi yükler eşit olması sebebiyle benzer moleküller arasında elektrostatik itmeler yerine çekmeler oluşması proteinlerin çökmesine neden olur (Novak ve Havlí, 2016).

İzoelektrik çöktürme özellikle baklagil proteinlerinin elde edilmesinde sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir (Fernandez ve ark., 1997; Aydemir ve Yemenicioğlu, 2013; Muranyi ve ark., 2016; Iyenagbe ve ark., 2017; Lara-Rivera ve ark., 2017; Chao ve Aluko, 2018; de la Rosa-Millan ve ark., 2018; Pazmino ve ark., 2018). Genel olarak izoelektrik çöktürme yönteminde hammadde belirli bir orandaki çözücüde karıştırılarak karışımın pH değeri alkali (8-11) olarak ayarlanır ve belirli bir süre ve sıcaklıkta protein ekstraksiyonu sağlanır. Bir sonraki aşamada ise karışımın pH değeri (4-5) izoelektrik noktasına getirilerek proteinler çöktürülür ve santrifüj işlemi ile proteinler elde edilir (Boye ve ark., 2010). Bu ürünlerin kuru maddede içerdikleri protein miktarı minimum %65 ve üzerindeyse protein konsantrisi; %90 ve üzerinde ise protein izolatu olarak adlandırılır (Uzzan, 1988). Alkali ekstraksiyon ve izoelektrik çöktürme yönteminin akış diyagramı Şekil 1'de gösterilmiştir.

Bu yöntem ile yapılan çalışmalarda yüksek oranda protein içeriğine sahip protein konsantrileri ve izolatları elde edildiği görülmektedir. Ivanova ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada, izoelektrik çöktürme yöntemi ile pH 12 değerinde (40 °C, 75 dk.) kolza tohumu küspesinden proteinler ekstrakte edilmiş, pH 4.5 değerinde çöktürülmüş ve %86.86 oranında protein içeren protein konsantrileri elde edildiği görülmüştür. Aryee ve Boye (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, 25 °C'de, pH 9 değerinde ve 1:10 katı:sıvı oranında proteinler ekstrakte edilmiş ve pH 4.5 değerinde çöktürme işlemine tabi tutulmuş mercimek protein izolatının protein içeriği %90.15 olarak bulunmuştur. Mune ve Sogi (2015) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, hammadde olarak börülce ve bambara fasulyesi seçilmiş ve ön işlem olarak tohumlardan yağ uzaklaştırılma işlemi uygulanmıştır. Elde edilen protein konsantrilerinin protein içeriği börülce ve bambara fasulyesi için sırasıyla %78.15 ve 73.70 olarak bulunmuştur. Çalışmada, proteinler pH 10

değerinde oda sıcaklığında 120 dakika ekstrakte edilirken, çöktürme işlemi pH 4.5 değerinde gerçekleştirilmiş ve sonrasında sırasıyla santrifüj ve dondurarak kurutma işlemleri uygulanarak protein konsantrileri elde edilmiştir. Bir diğer çalışmada ise, siyah mercimek su ile seyreltilmiş (1:10 v/v, pH 10, 1 saat, oda sıcaklığı), ardından santrifüj işlemi ile ayrılan süpernatantın pH değeri 4.5'e ayarlanarak proteinler çöktürülmüş ve santrifüj ve liyofilizasyon işlemleri ile elde edilen protein konsantrilerinin protein içeriği %86.83 olarak bulunmuştur (Wani ve ark., 2015). Wani ve ark. (2014) tarafından yapılan bir



Şekil 1. İzoelektrik çöktürme yöntemi akış diyagramı (Boye ve ark., 2010).

diğer çalışmada ise benzer ekstraksiyon koşullarında barbunyanadan üretilen protein konsantrelerinin protein içeriği %83.96 olarak bulunmuştur. Lopez ve ark. (2018) tarafından chia tohumu proteinleri üzerine yapılan çalışmada ise pH değerinin çöktürme işlemine etkisi araştırılmıştır. Ekstraksiyon aşamasında karışımın pH değeri 10 ve 12 olarak ayarlanırken çöktürme aşamasında ise pH değeri 4.5 olarak belirlenmiştir. Chia tohumu proteinleri için protein içeriği pH 10 değerinde (782 g/kg) pH 12 değerine (775 g/kg) göre daha yüksek iken geri kazanım oranlarına bakıldığında pH 12 değerinin (%17) pH 10 değerine (%13) göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Maş fasulyesi proteinleri üzerine yapılan bir çalışmada ise protein ekstraksiyonu Yanıt Yüzey Metodu (Response Surface Methodology: RSM) ile optimize edilmiş ve bağımsız değişken parametreler çözücü:kati oranı, başlangıç pH değeri ve ekstraksiyon sıcaklığı olarak seçilmiştir. Yanıt Yüzey Metodu (RSM) sonuçlarına göre optimum noktada (çözücü:kati oranı 19.79 mL/g, pH 9.12 değeri ve ekstraksiyon sıcaklığı 40 °C) protein ekstraksiyon verimi 77.12 g protein ekstrakt/100 g olarak bulunmuştur. Ekstraksiyondan sonra izoelektrik çöktürme (pH 4.5 değeri), santrifüj ve dondurarak kurutma işlemleri ile elde edilen protein konsantrelerinin protein içeriği %86.94 olarak bulunmuştur (Du ve ark., 2018). Lam ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada ise 6 farklı bezelye türü ile çalışılmış ve elde edilen protein izolatlarının protein içeriği %89.7-92.5 arasında bulunmuştur. Ayrıca, elde edilen bezelye protein izolatları fonksiyonel özellikleri bakımından soya proteini ile karşılaştırılmış ve çözünürlük haricindeki diğer fonksiyonel özellikleri (köpürme kapasitesi, köpürme stabilitesi, yağ tutma kapasitesi ve emülsiyon stabilitesi) soya proteinleri ile benzer bulunmuştur. Keten tohumu ile yapılan bir çalışmada ise protein ekstraksiyonu için tris tamponu (pH=8.6) kullanılmış ve proteinleri çöktürmek için pH değeri 4.2'ye ayarlanmıştır. Elde edilen protein izolatlarının protein içeriği %90.6 olarak bulunmuştur. Ayrıca elde edilen keten tohumu protein izolatlarının emülsiyon aktivite indeksi ve emülsiyon stabilite indeksi gibi fonksiyonel özelliklerinin yaygın olarak

kullanılan soya protein izolatlarından yüksek olduğu belirlenmiştir (Kaushik ve ark., 2016). İzoelektrik çöktürme yöntemi, alkali ekstraksiyon ve asidik ortamda çöktürme olmak üzere 2 temel aşamadan oluşmaktadır. Alkali ekstraksiyon (pH=8-11) ve asidik çöktürme (pH=4.5-5) işlemleri sırasında pH değeri değişimi nedeniyle elde edilen protein konsantrelerinin veya izolatlarının fonksiyonel özellikleri olumlu veya olumsuz yönde etkilenebilmektedir (Salcedo-Chávez ve ark., 2002). Bu nedenle, ekstraksiyon ve çöktürme aşamalarında pH değerinde yapılan değişiklikler ile istenilen özellikte protein eldesi mümkün olmaktadır.

### Tuz ile çöktürme

Tuz ile çöktürme yöntemi yüksek tuz konsantrasyonu ile iyonik şiddeti artırarak proteinlerin çözünürlüğünü azaltma prensibine dayanan bir protein eldesi yöntemidir (Bonner, 2007). Protein çözeltilerinde düşük konsantrasyonlarda nötral tuz ilavesinde proteinlerin çözünürlükleri artar ve bu olaya 'salting in' denir. Ancak çok miktarda tuz ilavesi ile proteinlerin genellikle iç kısımlarında yer alan hidrofobik gruplar etrafındaki su molekülleri tuz iyonları tarafından uzaklaştırılır, bu durumda hidrofobik grupların birbirleri ile olan etkileşimleri artar ve proteinler çökerler ve bu olaya ise 'salting out' denir (Righetti ve ark., 2013). Çöktürme işleminde yaygın olarak amonyum sülfat tuzu kullanılmaktadır. Amonyum sülfat, yüksek çözünürlüğü, protein yapısını stabilize etmesi, nispeten düşük bir yoğunluğa sahip olması, ucuz ve kolay temin edilebilir olması gibi özellikleri nedeniyle tercih edilmektedir (Nelson ve Cox, 2005; Burgess, 2009). Amonyum sülfat derişiminin artışına bağlı olarak protein çözünürlüğünün değişimi ve 'salting in' ve 'salting out' Şekil 2'de gösterilmiştir.

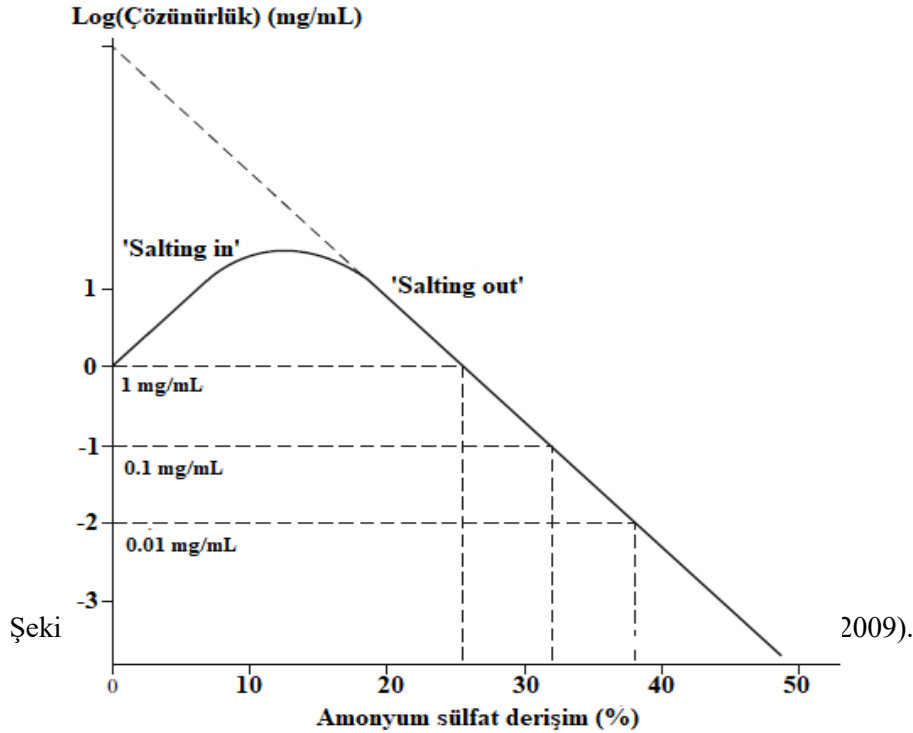
Genel olarak tuz ile çöktürme yöntemi, izoelektrik çöktürmede olduğu gibi ekstraksiyon ve çöktürme olmak üzere 2 temel işlemden oluşmaktadır. Ekstraksiyon aşamasında düşük konsantrasyonlarda tuz ilavesi ile proteinlerin çözünürlüğü artırılarak çözeltilere geçmesi sağlanmaktadır. Daha sonra ise yüksek tuz konsantrasyonu ilavesi ile proteinlerin çözünürlüğü azaltılarak çöktürme işlemi

## Protein Çöktürme Yöntemlerinin Karşılaştırılması

gerçekleştirilmektedir (Park ve ark., 2015). Tuz ile çöktürme yönteminde diğer önemli bir aşama ise diyaliz prosesi ile proteinlerin saflaştırılmasıdır. Diyaliz, tuz ve istenmeyen diğer bileşiklerin gözenekli yarı geçirgen zar yardımıyla difüzyon yoluyla ayrılmasını sağlayan bir protein saflaştırma tekniğidir (Scopes, 2013). Sıklıkla tuz ile çöktürme sonrasında tuzların uzaklaştırılması için kullanılmaktadır (Hadnadev ve ark., 2018; Stone ve ark., 2015; Adebisi ve ark., 2009). Bununla birlikte, izoelektrik çöktürme sonrasında istenilmeyen safsızlıkların uzaklaştırılması amacıyla da kullanımı mevcuttur (Iyenagbe ve ark., 2017).

Amonyum sülfat tuzu ile çöktürme yöntemi özellikle enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılmasında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Adetuyi ve ark., 2018; Li ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2017; Purwanto, 2016; Mariam ve ark., 2015; Zhao ve ark., 2015). İzoelektrik ve aseton çöktürmesi yöntemlerine kıyasla enzim aktivite kaybının düşük olması sebebiyle enzim izolasyonunda özellikle kromatografik yöntemler ile beraber kullanılmaktadır (Palmer ve Bonner, 2007). Örneğin; polifenoloksidaz enziminin karidesten elde edilmesi sırasında ilk olarak amonyum

sülfat çöktürmesi, sonrasında iyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri kullanılmıştır. Amonyum sülfat konsantrasyonu kademeli olarak %10'dan %90'a kadar artırılmış ve polifenoloksidaz aktivitesinin en yüksek olduğu amonyum sülfat konsantrasyonu %50 olarak bulunmuştur. Son olarak, amonyum sülfat tuzunu uzaklaştırmak için diyaliz yöntemi uygulanmıştır (Lv ve ark., 2017). Negi ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada ise fasulyeden serin proteaz inhibitörünün elde edilmesinde ilk olarak amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında ise jel filtrasyon kromatografisi kullanılmıştır. Elde edilen inhibitör proteinin, lahana kelebeğine karşı insektisidal etki gösterdiği belirtilmiştir. Bir diğer çalışmada ise selüloz, şeker kamışından %80'lik amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yöntemi yardımı ile ayrılmıştır (Adetuyi ve ark., 2018). Li ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada ise Güney Afrika'ya özgü tamarillo meyvesinden serin proteaz eldesi üzerine çalışılmış ve sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve iyon değişimi kromatografisi metotları uygulanmıştır. Son olarak, siyah cevizdeki olası alerjen protein araştırılmıştır. Proteinler, amonyum sülfat çöktürmesi ile ayrılmış ve sonrasında alerjen



olduğu düşünülen 11S globülin, hidrofobik etkileşim ve boyut dışlama kromatografisi yöntemleri ile saflaştırılmıştır (Zhang ve ark., 2017).

Tuz ile çöktürme yöntemi, izoelektrik çöktürme yönteminde olduğu gibi proteinlerin çözünürlüğü esasına dayanır. İki yöntemde de ilk olarak, çözünürlük arttırılarak proteinlerin ekstraksiyonu ve sonrasında çözünürlük azaltılarak proteinlerin çökmesi sağlanır (Duong-Ly ve Gabelli, 2014). İzoelektrik çökme yönteminde çözünürlük pH değeri ile ayarlanırken tuz ile çöktürme yönteminde iyonik şiddet ile ayarlanmaktadır. Çözünürlüğü etkileyen 2 farklı değişkenin kullanılması sebebiyle son yıllarda yapılan çalışmalarda, izoelektrik ve tuz çöktürmesinin, elde edilen proteinin fonksiyonel özellikleri ve protein içeriği açısından karşılaştırılması konusunda yapılan araştırmalar artış göstermiştir.

### Protein çöktürme yöntemlerinin karşılaştırılması

Proteinler, kendilerine özgü fiziksel ve kimyasal özellikleri kullanılarak kromatografik, elektroforez, santrifüj, ultrafiltrasyon ve çöktürme gibi çeşitli yöntemler ile hammaddeden izole edilmektedir (Kumar ve Sharma, 2015). Çöktürme yöntemi ise, ekonomik ve kolay olması sebebiyle yaygın olarak tercih edilen bir izolasyon tekniğidir (Evans ve ark., 2009). İzoelektrik ve amonyum sülfat ile çöktürme yöntemleri sağladıkları avantajlar sebebiyle sıklıkla kullanılmaktadırlar. İzoelektrik çöktürme, büyük ölçekte üretim kolaylığı ve yüksek oranda verim sağlamakta iken amonyum sülfat tuzu ile çöktürme yöntemi ise proteinlerin biyolojik aktivite kaybını engellemektedir (Zhang ve ark., 2017).

Konsantre veya izolatların fonksiyonel özelliklerini belirleyen faktörler amino asit bileşimi ve 3 boyutlu yapıdır (Boye ve ark., 2010). Ekstraksiyon ve çöktürme aşamalarında seçilen yönteme göre farklı protein tipleri elde edilmekte ve bu da fonksiyonel özelliklerin farklı olmasına neden olmaktadır (Stone ve ark., 2015). Moongnarm ve ark. (2014), 3 farklı yöntem; izoelektrik çöktürme, amonyum sülfat çöktürmesi ve izoelektrik/amonyum sülfat çöktürmesi ile siyah börülceden protein konsantreleri izole etmiş ve elde edilen

konsantreler verim, protein içeriği ve fonksiyonel özellikleri; çözünürlük, viskozite, su tutma ve yağ bağlama kapasitesi, köpürme yeteneği, emülsiyon stabilitesi ve jelleşme yeteneği bakımından karşılaştırılmıştır. Bunun yanı sıra, elde edilen protein konsantreleri buğday ununa ikame edilerek şeker kurabiyeleri yapılmış ve kurabiyelerin kimyasal kompozisyonu ve duyuşsal özellikleri (renk, koku, lezzet, tekstür ve genel beğeni) incelenmiştir. İzoelektrik çöktürmede %17.92 ile en yüksek verim sağlanırken izoelektrik/amonyum sülfat çöktürmesi ve amonyum sülfat çöktürmesinde protein verimi sırasıyla %15.05 ve %9.82 olarak bulunmuştur. Ayrıca, protein içerikleri izoelektrik çöktürme, izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme ve amonyum sülfat çöktürmesi için sırasıyla %85.89, %79.35 ve %68.28 olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, izoelektrik çöktürme yöntemi ile elde edilen izolatlar, incelenen tüm fonksiyonel özellikler (çözünürlük, viskozite, su ve yağ tutma kapasitesi, köpürme yeteneği, emülsiyon stabilitesi ve jel oluşturma yeteneği) bakımından diğerlerine göre üstün bulunmuştur. Buna ek olarak, duyuşsal analiz sonuçlarına göre %50 oranında protein konsantresi ikame edilen kurabiyelerin renk, koku, lezzet ve tekstür bakımından uygun olduğu gözlenmiştir. Bir diğer çalışmada, çay yaprakları işlenmesi sırasında açığa çıkan atıklar protein kaynağı olarak kullanılmıştır. Çalışmada, ekstraksiyon koşulları (sıcaklık, süre, pH değeri ve çözgen:kati oranı) ortogonal test ile optimize edilmiştir. Test sonuçlarına göre, 70 °C sıcaklıkta, pH 12 değerinde, 60 dakika ekstraksiyon süresinde ve 50:1 çözgen:kati oranında çay proteini ekstraksiyon oranı maksimum bulunmuştur. Buna ek olarak, izoelektrik, amonyum sülfat ve izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yöntemleri protein çöktürme oranına göre karşılaştırılmıştır. En yüksek protein çöktürme oranı %89.70 ile izoelektrik/amonyum sülfat çöktürme yöntemi ile elde edilmiştir (Cui ve ark., 2017). Başka bir çalışmada, izoelektrik ve amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen patates protein konsantrelerinin protein içerikleri karşılaştırılmıştır. Bunun yanı sıra, NaCl konsantrasyonunun (0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1.0 M)

ve pH değerinin (3.0, 5.0, 7.0 ve 8.0), patates proteinlerinin fonksiyonel özellikleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. İzoelektrik ve amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen konsantrelerin protein içeriği sırasıyla %85.80 ve 83.20 olarak bulunmuştur. Ayrıca, izoelektrik çöktürme ile elde edilen konsantrelerin diğerine göre polifenol içeriğinin 2.5 kat fazla olduğu ve dolayısıyla renginin de daha koyu olduğu belirtilmiştir. pH değeri izoelektrik noktaya yaklaştıkça, protein konsantreleri düşük çözünürlük, emülsifiye ve köpürme yeteneği göstermiştir. Bununla birlikte, NaCl konsantrasyonu arttıkça çözünürlük, emülsiyon ve köpürme özelliklerinin arttığı gözlenmiştir (Zhang ve ark., 2017). Adenekan ve ark. (2018) tarafından bezelye ile yapılan çalışmada, farklı izolasyon tekniklerinin (su, metanol, amonyum sülfat ve aseton çöktürme) protein içeriği üzerine etkisi araştırılmıştır. Su, metanol, amonyum sülfat ve aseton çöktürme yöntemleriyle elde edilen izolatların protein içeriği sırasıyla %91.35, %91.83, %91.73 ve %91.50 olarak bulunmuştur. Köpürme kapasitesi ve stabilitesinde amonyum sülfat çöktürmesi, su emme kapasitesinde metanol ve aseton çöktürmesi, yağ emme kapasitesinde metanol ve amonyum sülfat çöktürmesi ve emülsiyon kapasitesi ve stabilitesinde aseton ve metanol çöktürme yöntemlerinin daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür. Harryson ve ark. (2018) tarafından kırmızı (*Porphyra umbilicalis*), yeşil (*Ulva lactuca*) ve kahverengi (*Saccharina latissima*) deniz yosunları ile yapılan çalışmada, i) su ekstraksiyonu/amonyum sülfat çöktürmesi, ii) alkali ekstraksiyon/izoelektrik çöktürme ve iii) hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu metotları kullanılmıştır. Protein verimi açısından kırmızı (%22.6) ve kahverengi (%25.1) deniz yosunları için alkali ekstraksiyon/izoelektrik çöktürme yöntemi, yeşil deniz yosunu (%19.6) için ise amonyum sülfat çöktürmesi yönteminin uygun olduğu görülmüştür.

Farklı yöntemlerle çöktürülen proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin değiştiği bilinmektedir. Proteinlerin fonksiyonel özelliklerini protein yapısı belirlemektedir (Berg ve ark., 2015). Dolayısıyla, farklı çöktürme teknikleri ile elde edilen proteinlerin, protein yapısı farklı olduğundan fonksiyonel özellikleri

de farklılık göstermektedir. Bu nedenle, proteinlerin ekstraksiyonu ve çöktürülmesi sırasında uygun yöntem ve koşulların belirlenmesi, protein içeriği ve verimi açısından önem taşımaktadır.

### Sonuç

Proteinler, vücut dokularının bileşenidir ve sağlıklı beslenmenin ve diyetin önemli bir parçasıdır. Ancak, artan nüfus ile beraber hayvansal kaynaklı proteinlere erişim zorlaşmaktadır. Düşük maliyetli olan ve yüksek oranda protein içeren bitkiler, özellikle baklagiller, protein konsantrisi veya izolatu üretimi için uygundur. Proteinlerin ayrılması ve saflaştırılmasında izoelektrik, amonyum sülfat, aseton ve alkol çöktürmesi gibi çeşitli yöntemler bulunmakta ve izoelektrik ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Protein konsantrisi veya izolatlarının fonksiyonel özellikleri, protein verimi ve protein içeriği proteinin üç boyutlu yapısı, amino asit dizilimi ve hidrofobik oluşu gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre değişiklik göstermektedir. Dolayısıyla, protein yapısının farklı oluşu ile bu yöntemlerin verimi hammaddeye göre farklılaşmaktadır. İzoelektrik çöktürme yöntemi yüksek verimlilikte protein eldesine olanak sağlamakta kimi durumlarda izoelektrik/amonyum sülfat yöntemlerinin birlikte kullanılması verimi arttırmaktadır. Her hammadde için uygun ekstraksiyon ve çöktürme yöntemlerinin belirlenmesi önemli bir gereksinimdir ayrıca ekstraksiyon işlemlerinde etken olan pH değeri, sıcaklık, süre, çözelti konsantrasyonu ve katı/sıvı oranı gibi parametrelerin ürüne özgü olarak optimize edilmesi gerekmektedir. Elde edilecek bitkisel proteinlerin, geleceğin beslenme alışkanlıklarında yaygın kullanım alanı bulacağı düşünülmektedir.

### Kaynaklar

Adebiyi, A. P., Adebiyi, A. O., Hasegawa, Y., Ogawa, T., & Muramoto, K. (2009). Isolation and characterization of protein fractions from deoiled rice bran. *Eur. Food Res. Technol.*, 228(3), 391–401.

- Adenekan, M. K., Fadimu, G. J., Odunmbaku, L. A., & Oke, E. K. (2018). Effect of isolation techniques on the characteristics of pigeon pea (*Cajanus cajan*) protein isolates. *Food Sci Nutr.*, 6(1), 146–152.
- Adetuyi, F. O., Akintimehin, E. S., Karigidi, K. O., Okonji, R. E., & Adeniyi, D. A. (2018). Partial purification and characterisation of cellulase from sugarcane as affected by postharvest storage of sugarcane (*Saccharum officinarum* L) stem. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.*, 41(1), 379–391.
- Aryee, A. N. A., & Boye, J. I. (2017). Comparative Study of The Effects of Processing on The Nutritional, Physicochemical and Functional Properties of Lentil. *J Food Process Preserv.*, 41, 1-13.
- Aydemir, L. Y., & Yemencioğlu, A. (2013). Potential of Turkish Kabuli type chickpea and green and red lentil cultivars as source of soy and animal origin functional protein alternatives. *LWT-Food Sci Technol.*, 50, 686-694.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Gatto, G. J. (2015). *Biochemistry*. W.H. Freeman & Company, New York, USA, 95-100.
- Bonner, P. L. R. (2007). *Protein Purification*. Taylor and Francis Group, Milton Park Abingdon, UK.
- Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Res Int.*, 43(2), 414–431.
- Burgess, R. R. (2009). Chapter 20 Protein Precipitation Techniques. *Methods Enzymol.*, 463, 331-342.
- Chao, D., & Aluko, R. E. (2018). Modification of the structural, emulsifying, and foaming properties of an isolated pea protein by thermal pretreatment. *CYTA-J Food.*, 16(1), 357-366.
- Cui, Q., Ni, X., Zeng, L., Tu, Z., Li, J., Sun, K., ... Li, X. (2017). Optimization of Protein Extraction and Decoloration Conditions for Tea Residues. *Horticultural Plant Journal.*, 3(4), 172–176.
- de la Rosa-Millán, J., Orona-Padilla, J. L., Flores-Moreno, V. M., & Serna-Saldívar, S. O. (2018). Physicochemical, functional and ATR-FTIR molecular analysis of protein extracts derived from starchy pulses. *Int J Food Sci Technol.*, 53, 1414-1424.
- Du, M., Xie, J., Gong, B., Xu, X., Tang, W., Li, X., ... Xie, M. (2018). Extraction, physicochemical characteristics and functional properties of Mung bean protein. *Food Hydrocolloids.*, 76, 131-140.
- Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2014). Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods Enzymol.*, 541, 85-94.
- Evans, D. R., Romero, J. K., & Westoby, M. (2009). Concentration of proteins and removal of solutes. *Methods Enzymol.*, 463, 97-120.
- FDA (US Food and Drug Administration) (2004). Food allergen labeling and consumer protection act of 2004. *Pub Law.*, 108-282.
- Fernandez, A., Fernandez-Quintela, F., Macarulla, M. T., Barrio, A. S. Del, & Martínez, J. A. (1997). Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. *Plant Foods Hum Nutr.*, 51, 331-342.
- Hadnađev, M., Dapčević-Hadnađev, T., Lazaridou, A., Moschakis, T., Michaelidou, A. M., Popović, S., & Biliaderis, C. G. (2018). Hempseed meal protein isolates prepared by different isolation techniques. Part I. physicochemical properties. *Food Hydrocolloids.*, 79, 526–533.
- Harrysson, H., Hayes, M., Eimer, F., Carlsson, N. G., Toth, G. B., & Undeland, I. (2018). Production of protein extracts from Swedish red, green, and brown seaweeds, *Porphyra umbilicalis* Kützinger, *Ulva lactuca* Linnaeus, and *Saccharina latissima* (Linnaeus) J. V. Lamouroux using three different methods. *J Appl Phycol.*, 1–16.
- Ivanova, P., Kalaydzhev, H., Rustad, T., Silva, C. L. M., & Chalova, V. I. (2017).



- Comparative biochemical profile of protein-rich products obtained from industrial rapeseed meal. *Emir J Food Agricult*, 29(3), 170-178.
- Iyenagbe, D. O., Malomo, S. A., Idowu, A. O., Badejo, A. A., & Fagbemi, T. N. (2017). Effects of thermal processing on the nutritional and functional properties of defatted conophor nut (*Tetracarpidium conophorum*) flour and protein isolates. *Food Sci Nutr*, 5, 1170–1178.
- Karaca, A. C., Low, N., & Nickerson, M. (2011). Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Res Int*, 44(9), 2742–2750.
- Kaushik, P., Dowling, K., McKnight, S., Barrow, C. J., Wang, B., & Adhikari, B. (2016). Preparation, characterization and functional properties of flax seed protein isolate. *Food Chem*, 197, 212-220.
- Klupsaite, D., & Juodeikiene, G. (2015). Legume: composition, protein extraction and functional properties. A review. *Chem Technol.*, 1(1), 5–12.
- Kumar, P., & Sharma, S. M. (2015). An overview of purification methods for proteins. *Int. J. Appl. Res.*, 1(12), 450-459.
- Lam, A. C. Y., Warkentin, T. D., Tyler, R. T., & Nickerson, M. T. (2017). Physicochemical and functional properties of protein isolates obtained from several pea cultivars. *Cereal Chem*, 94(1), 89–97.
- Lara-Rivera, A. H., García-Alamilla, P., Lagunes-Gálvez, L. M., Macias, R. R., García López, P. M., Francisco, J., & Natera, Z. (2017). Functional Properties of *Lupinus angustifolius* Seed Protein Isolates. *J of Food Quality*, 1-9.
- Li, Z., Scott, K., Hemar, Y., Zhang, H., & Otter, D. (2018). Purification and characterisation of a protease (tamarillin) from tamarillo fruit. *Food Chem*, 256, 228–234.
- Lopez, D. N., Ingrassia, R., Busti, P., Bonino, J., Delgado, J. F., Wagner, J., ... Spelzini, D. (2018). Structural characterization of protein isolates obtained from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *LWT-Food Sci Technol*, 90, 396-402.
- Lv, Y., Cai, L., Yang, M., Liu, X., Hui, N., & Li, J. (2017). Purification, characterisation, and thermal denaturation of polyphenoloxidase from prawns (*Penaeus vannamei*). *Int J Food Prop*, 20, 3345–3359.
- Mariam, S. H. S., Ooi, C. W., Tan, W. S., Janna, O. A., Arbakariya, A., & Tey, B. T. (2015). Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G with ammonium sulphate precipitation and mixed-mode chromatography. *Sep. Purif. Technol.*, 144, 133–138.
- Moongngarm, A., Sasanam, S., Pinsiri, W., Inthaso, P., Janto, S., & Pengchai, J. (2014). Functional properties of protein concentrate from black cowpea and its application. *Am J Appl Sci*, 11(10), 1811–1818.
- Mune Mune, M. A., & Sogi, D. S. (2015). Functional Properties of Protein Concentrates of Cowpea and Bambara Bean Involving Different Drying Techniques. *J Food Process Preserv*, 39, 2304-2313.
- Muranyi, I. S., Otto, C., Pickardt, C., Osen, R., Koehler, P., & Schweiggert-Weisz, U. (2016). Influence of the Isolation Method on the Technofunctional Properties of Protein Isolates from *Lupinus angustifolius* L. *J. Food Sci*, 81, 2656-2663.
- Negi, P., Chand, S., Thakur, N., & Nath, A. K. (2018). Biological Activity of Serine Protease Inhibitor Isolated from the Seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Agric Res*, 7(3), 265–270.
- Nelson, D. & Cox, M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th Ed.). W.H. Freeman and Company, New York.
- Novák, P., & Havlí, V. (2016). 4-Protein Extraction and Precipitation. *In Proteomic Profiling and Analytical Chemistry* (Second Edition), 51-62.
- Özdemir, Y., Güven, E., & Özdemir, B. A. (2013). Et Ürünlerinde Kullanilabilecek Soya Proteini Alternatifleri. *Gıda*

- Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 8(81), 44–5144.
- Palmer, T., & Bonner, P. L. (2007). *Enzymes: biochemistry, biotechnology, clinical chemistry*. 2nd Edition, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK, 299 p.
- Park S. R., Lim C. Y., Kim, D. S. & Ko, K. (2015) Optimization of Ammonium Sulfate Concentration for Purification of Colorectal Cancer Vaccine Candidate Recombinant Protein GA733-FcK Isolated from Plants. *Front. Plant Sci*, 6,1040.
- Pazmino A, Vásquez G, & Carrillo W. (2018). Pigeon Pea Protein Concentrate (*Cajanus Cajan*) Seeds Grown in Ecuador Functional Properties, *Asian J Pharm Clin Res*, 11, 430-435.
- Purwanto, M. G. M. (2016). The Role and Efficiency of Ammonium Sulphate Precipitation in Purification Process of Papain Crude Extract. *Procedia Chem*, 18, 127–131.
- Righetti, P. G. & Boschetti, E. (2013). Detailed Methodologies and Protocols, *Low-abundance proteome discovery: state of the art and protocols*, Boschetti, E. (chief ed.), Newnes, 274 p.
- Salcedo-Chávez, B., Osuna-Castro, J. A., Guevara-Lara, F., Domínguez-Domínguez, J., & Paredes-López, O. (2002). Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6515-6520.
- Saldamlı, İ. & Temiz, A. (2017). Amino Asitler, Peptitler, Proteinler. *Gıda Kimyası*, Saldamlı, İ. (baş ed.), Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, Türkiye, 227-317.
- Scopes, R. K. (2013). *Protein purification: principles and practice*. Springer Science & Business Media, New York, USA.
- Sivasankar, B. (2005). *Bioseparations: principles and techniques*. PHI Learning Pvt. Ltd, New Delhi, India, 119 p.
- Stone, A. K., Karalash, A., Tyler, R. T., Warkentin, T. D., & Nickerson, M. T. (2015). Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food Res Int*, 76(P1), 31–38.
- Unlüsayın, M. (2009). Balık Proteinlerinin Saflaştırılmasında Kullanılan Son Yöntemler/ The recent methods on using for purification of fish proteins. *J FisheriesSciences.com*, 3(4), 298–309.
- Uzzan, A. (1988). Vegetable protein products from seeds: technology and uses in the food industry. Hudson, B. F. J. (ed.). *Developments of Food Industry*, 6.
- Wani, I. A., Sogi, D. S., & Gill, B. S. (2015). Physico-chemical and functional properties of native and hydrolysed protein isolates from Indian black gram (*Phaseolus mungo* L.) cultivars. *LWT-Food Sci Technol*, 60, 848-854.
- Wani, I. A., Sogi, D. S., Shivhare, U. S., & Gill, B. S. (2014). Physico-chemical and functional properties of native and hydrolyzed kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates. *Food Res Int*, 76, 11-18.
- Zhang, D. qin, Mu, T. hua, Sun, H. nan, Chen, J. wang, & Zhang, M. (2017). Comparative study of potato protein concentrates extracted using ammonium sulfate and isoelectric precipitation. *Int J Food Prop*, 20(9), 2113–2127.
- Zhang, Y. Z., Du, W. X., Fan, Y., Yi, J., Lyu, S. C., Nadeau, K. C., ... McHugh, T. (2017). Purification and characterization of a black walnut (*Juglans nigra*) allergen, Jug n 4. *J. Agric. Food Chem.*, 65(2), 454–462.
- Zhao, Q., Zhang, W., Wu, Y., & Ouyang, J. (2015). Extraction Techniques and Stability of Carotenoprotein from Carrot (*Daucus carota* L.) Root. *J Food Process Eng.*, 38(3), 290–298.