



Antifreeze Proteins: An Inovative Agent for the Prevention of Foods

İlhan Gün^{1,a}, Aslı Albayrak^{1,b}, Asuman Gürsel^{1,c}

¹Food Processing Department, Dairy Products Technology, Burdur Food, Agriculture and Livestock Vocational School, Burdur Mehmet Akif Ersoy University 15030, Burdur, Turkey

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Review Article</i></p> <p>Received : 28/05/2019 Accepted : 22/06/2020</p> <p>Keywords: Antifreeze protein Ice structuring proteins Food Dairy products Ice cream</p>	<p>Antifreeze proteins are those proteins that have ability to protect the organism against environmental conditions at temperatures below zero, and to resize the shape and size of ice crystals. Due to these properties, they prevent food from sensory, structural and mechanical damages during the storage in cold and they extend the product shelf life. In this review, the types and structure of antifreeze proteins, their mechanism of action and the possibilities of use in food are presented.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 8(7): 1433-1439, 2020

Antifriz Proteinler: Gıdaların Korunmasında İnovatif Bir Ajan

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Derleme Makalesi</i></p> <p>Geliş : 28/05/2019 Kabul : 22/06/2020</p> <p>Anahtar Kelimeler: Antifriz protein Buz yapılandırıcı proteinler Gıda Süt ürünleri Dondurma</p>	<p>Antifriz proteinler, sıfırın altındaki sıcaklık derecelerinde organizmayı çevre şartlarına karşı koruma ve buz kristallerinin şekli ve büyüklüğünü yeniden düzenleme gibi özel yeteneğe sahip proteinlerdir. Bu özelliklerinden dolayı soğukta depolama sırasında gıdaların duysal, yapısal ve mekaniksel hasarları önlediği görülmekte ve ürünün raf ömrünü uzatılmaktadır. Bu derlemede, antifriz proteinlerin tipleri, yapısal özellikleri ve etki mekanizmaları ile gıda alanında kullanım olanakları hakkında bilgi sunulmuştur.</p>

^a igun@mehmetakif.edu.tr

^b <https://orcid.org/0000-0003-0047-273X>

^c aalbayrak@mehmetakif.edu.tr

^c <https://orcid.org/0000-0002-1636-148X>

^c z.asuman.gursel@agri.ankara.edu.tr

^c <https://orcid.org/0000-0003-1808-9982>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Giriş

Doğada birçok organizma dondurucu sıcaklık derecelerine maruz kalmaktadır. Sıfır derecenin altındaki bu dondurucu sıcaklıklar sadece kutup bölgelerinde değil, gece ve gündüz arasındaki sıcaklık farkının yoğun yaşandığı iklim bölgelerinde de görülmektedir (Griffith ve Ewart, 1995). Bu nedenle bu bölgelerde yaşayan balık, bitki, bakteri ve böcek gibi canlılar, yaşamlarını sürdürebilmek için özel yapılara sahiptir. Bu özel yapılardan bir tanesi antifriz proteinlerdir. Antifriz proteinler, sıfır derecenin altındaki sıcaklıklarda hücrelerinin canlılığını sürdürmek zorunda olan balıklar, bitkiler, bakteriler, funguslar, böcekler ve eklembacaklılar tarafından sentezlenen polipeptit bileşikleridir (Üstün ve Turhan, 2015; Baardsnes ve ark.,1999).

Bu proteinler, ilk kez 1969 yılında, deniz suyunun donduğu bölgelerde yaşayan balıkların kanında keşfedilmiş ve kan serumunun donma noktasını deniz suyunun donma noktasının altına düşürebilme yeteneğine sahip oldukları saptanmıştır. Donma noktasını, kan serumunun osmotik basıncını artırmadan düşürmeleri nedeniyle bu proteinlere “antifriz protein (AFP)” adı verilmiştir (De Vries ve Wohlschlag, 1969; Yangılar ve Yıldız, 2016). Buz oluşumuna uygun bölgelerde yaşayan balıkların ardından, birçok bitki ve böcekte de aynı özelliğe sahip proteinlerin var olduğu belirlenmiştir. Buza bağlanabilmeleri ve buz kristalinin büyüklüğünü etkileyebilmeleri gerçeğinden hareketle, bu proteinlerin tanımlanmasında “buz yapılandırıcı proteinler (Ice Structuring Proteins, ISP)” ifadesinin kullanımının daha uygun olabileceği öne sürülmektedir (Regand ve Goff, 2006).

AFP’ler, sıfırın altındaki sıcaklık derecelerinde organizmayı çevre şartlarına karşı koruma ve buz kristallerine yeni bir şekil ve boyut kazandırma gibi özel yeteneğe sahip proteinlerdir (Zhang ve ark., 2007; Qiu ve ark., 2013; Kim ve ark., 2017). Bu işlevlerin yerine getirilebilmesi için, çekirdek buz kristallerindeki büyümenin engellenmesi gerekmektedir. AFP’ler çekirdek buz kristallerini bağlayarak, donma noktasını erime noktasının altına düşürürler. Böylece buz kristallerinin büyümesi, sıkışması ve buzun yeniden kristalleşmesini engeller (Bayer-Giraldi ve ark., 2011; De Vries ve Wohlschlag, 1969; Ewart ve ark., 1999).

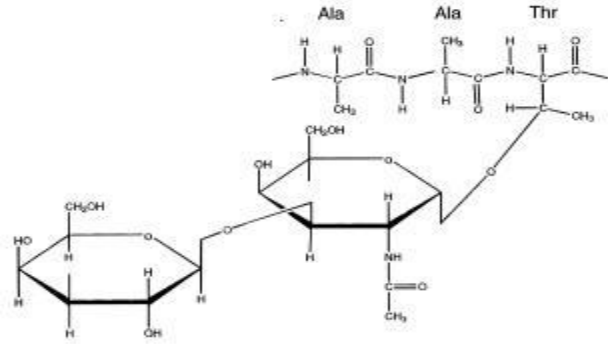
AFP’lerin in vitro koşullardaki başlıca özellikleri şunlardır (Yang ve ark., 1998);

- Buzun bazal olmayan yüzeylerine tutunur ve böylece AFP içeren çözeltilerde buz kristallerinin altıgen yapılar şeklinde gelişmesini sağlarlar. Bu özellik, buz gelişimini engelleyici bir etki yaratır.
- Çözeltinin donma derecesini, kolligatif olmayan bir biçimde erime sıcaklığı ile donma noktasını birbirine yaklaştırıp dengede tutmak suretiyle baskırlar.
- Buzun yeniden kristalleşmesini engeller.

Antifriz Proteinlerin Yapısı ve Sınıflandırılması

AFP’ler fonksiyonel özellikleri bakımından benzerlik göstermekte, ancak yapısal olarak aralarında farklılıklar bulunmaktadır. Bu yapısal farklılıklar, değişik orijinli olmalarından kaynaklanmaktadır (Garcia-Arribas ve ark., 2007). Antifriz molekülleri glikopeptit yapıda olup, her biri

üç amino asit içeren bir peptit zincirinin üçüncü amino asidine kovalent bağlarla bağlanmış bir disakkarit molekülünden oluşan birimlerin tekrarlanmasıyla meydana gelir (Bektaş ve Altıntaş, 2007). Şekil 1’de antifriz proteinin ortak monomer yapısı gösterilmiştir. Böcekler, yosunlar ve bakterilerde bulunan AFP’ler genellikle sarmal, globüler ve fiçı formunda bulunmaktadır (Aşçı ve ark., 2011; De Vries ve ark., 1970).



Şekil 1. Antifriz proteinlerde ortak monomer yapı (Bektaş ve Altıntaş, 2007)

Figure 1. Common monomer structure in antifreeze proteins (Bektaş ve Altıntaş, 2007)

Balık Antifriz Proteinleri

Balıklar üzerinde yapılan çalışmalarda, AFP’nin, Tip I, Tip II, Tip III, Tip IV ve antifriz glikoprotein (AFGP) olmak üzere 5 tipi bulunduğu tespit edilmiştir (Deng ve ark., 1997; Baardsnes ve ark., 1999; Crevel ve ark., 2002). Diğer taraftan, balıklardaki AFP’ler, glikoprotein olmayan grup ve glikoprotein olan grup (antifriz glikoprotein) olmak üzere iki farklı kategoride sınıflandırılmaktadır (Davies ve Hew, 1990; Hassas-Roudsari ve Goff, 2012). Birden dörde kadar olan AFP tipleri glikoprotein olmayan grup içerisinde yer almaktadır. Molekül ağırlığı AFP tipine göre değişiklik gösterebilmekte ve antifriz etkileri molekül ağırlığındaki artışla birlikte artmaktadır (Bektaş ve Altıntaş, 2007).

Glikoprotein Olmayan Grup (Tip I-IV)

Tip I

En basit AFP tipidir (Ramlov ve Johnsen, 2014) ve %60 alanin içeriği ile bu amino asit yönünden zengin bir durum sergilemektedir. Yapısında yer alan 37 amino asitten 23 adedinin alanin olduğu ve “Thr-Ala-Ala-X-Ala-X-X-Ala-Ala-X-X” (X, herhangi bir amino asidi ifade etmektedir) şeklinde 3 kez tekrarlanan amino asit dizilimine sahip olduğu tespit edilmiştir (De Vries ve Lin, 1977; Pickett ve ark., 1984). Sağ gözlü dere pisi (kış köpek dili) balığı ve kısa boynuzlu dere iskorpitlerindeki AFP’ler düz α -sarmal yapıdadır. Bu düz α -sarmal modelinin uzunluğu 58 Å olup, molekül ağırlığı 3,3 ile 4,5 kDa arasında değişmektedir (Davies ve Hew, 1990; Crevel ve ark., 2002; Hassas-Roudsari ve Goff, 2012). Pisi balığında bulunan AFP’de 11 amino asit “Thr-Ala-Ala-Thr (bazen aspartat)-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala” şeklinde tekrarlanmakta ve bu yapısal özelliği ile iskorpit balığında mevcut AFP’den farklılık göstermektedir. İskorpit

balığında ise, bu tip proteinler, fazla sayıda lizin ve arjinin yan zinciri nedeniyle daha amfipatik bir özellikte sergilemekte ve amino asit tekrarları bulunmaktadır (De Vries ve ark., 1970). Her iki alt grup da buz kristalinin farklı yüzeylerine bağlanmaktadır (Davies ve Sykes, 1997).

Tip II

Glikoprotein olmayan AFP tipleri içerisinde en uzun polipeptit yapısına sahiptir. Protein stabilitesi, sisteinler arasındaki disülfid bağları yardımıyla korunmaktadır (Crevel ve ark., 2002; Petzold ve Aguilera, 2009). Üç boyutlu yapıları, iki α -sarmal ve iki β -plakadan oluşmaktadır. Molekül ağırlığı 11 ile 24 kDa arasında değişmektedir (Hassas-Roudsari ve Goff, 2012). Deniz aslanı, çamuka ve ringa balığında rastlanmaktadır.

Tip III

Bu tipteki AFP'ler sülfopropil (SP) ve dörtlü amin gruplarına (QAEs) karşı gösterdikleri afiniteye göre iki gruba ayrılmaktadır. Dörtlü amin grupları, sülfopropil grubuna göre daha hidrofob ve daha yüksek aktiviteye sahiptir. Tip III AFP'ler amino asitlere karşı afinite göstermezler ve yapılarında sistein amino asitleri yer almaz. İkincil yapıları, sıkı, üçlü sarmal şeklindeki iki antiparalel β -plakadan ibarettir. Üçüncül yapıları ise globüler olmaktan ziyade nispeten düz yüzeyli üçgen prizma şeklindedir. Buz kristali prizmanın bir yüzeyine bağlanmaktadır (Antson ve ark., 2001; Ramlov ve Johnsen 2014). Molekül ağırlıkları 6,5 kDa kadardır. Okyanus somurtkan balığı ve Antarktik yılan balığında rastlanmaktadır.

Tip IV

Yakın zamanda uzun boynuzlu iskorpit balıklarının (*Myoxocephalus octodecimspinosus*) kan serumundan izole edilen ve diğer AFP'lerden büyük farklılıklar gösteren bir antifriz proteindir. Glutamat ve glutamin amino asidi bakımından zengindir (Crevel ve ark., 2002; Jin ve ark., 2005; Petzold ve Aguilera, 2009). Molekül ağırlığı 12 kDa gibi yüksek bir değer göstermektedir. Ayrıca, Atlas Okyanusu'nda yaşayan diğer iskorpit balıklarının AFP'lerindeki amino asitlerden daha yüksek düzeyde, 108 adet amino asit içermektedir. Protein yapısı, antiparalel olarak düzenlenmiş çok sayıda α -sarmal ve 4 adet amfipatik sarmaldan oluşmaktadır. Sarmalın hidrofob uçları içe, polar uçları ise çözücü suya yönelik biçimde konumlanmıştır (Ramlov ve Johnsen, 2014; Üstün ve Turhan, 2015).

Glikoprotein Olan Grup (Antifriz Glikoprotein)

Güney buz denizi (Antarktika kıta sahanlığı) sularında yaşayan balıkların kan serumunda bulunan glikoproteinlerdir (De Vries ve Wohlschlag, 1969). Morina ve gümüş balıkları gibi çeşitli Antarktika balıklarında bulunduğu tespit edilmiştir (Griffith ve Ewart, 1995). Fonksiyonel olarak glikoprotein olmayan antifriz proteinlere benzeyen, fakat yapısal olarak önemli farklılıklar gösteren proteinlerdir. Antarktika kıta sahanlığı sularındaki Morina balıklarının kanında mevcut AFGP'lerin yapısal özellikleri üzerinde yapılan çalışmalarda, bu proteinlerin çok sayıda tekrarlanan "Ala-Ala-Thr" alt birimleri ile bu alt birimlerdeki treonin amino asidine glikozid halinde bağlanmış bir disakkarit (β -D-galaktozil-(1f3)-N-asetil-D- galaktozamin) molekülünden oluştuğu ortaya konulmuştur (Harding ve ark., 2003;

Tachibana ve ark., 2004; Kristiansen ve Zachariassen, 2005). Ayrıca, tekrarlanan alt birimlerin 4'den 30'a kadar sıralanmış olduğu ve bu yapıya bazen prolin amino asidinin dâhil olduğu belirlenmiştir (Crevel ve ark., 2002). Bu proteinler 2,7 ile 32,0 kDa arasında değişen molekül ağırlığına sahip olup (Ramlov ve Johnsen, 2014), genel olarak 20-33 kDa ağırlığındaki AFGP'ler AFGP 1-4; molekül ağırlığı 20 kDa'nın altında olanlar ise AFGP 5-8 olarak tanımlanmıştır (Bouvet ve Ben 2003). Birden beşe kadar olan glikopeptitlerde tekrarlanan amino asit dizisi "Ala-Ala-Thr" şeklinde iken, altıdan sekize kadar olan glikopeptitlerde tekrarlanan kısımda alanin prolin ile yer değiştirmektedir (Crevel ve ark., 2002). Molekül ağırlığındaki artışla birlikte antifriz etkinin artış gösterdiği, ancak sekiz molekülün de işlevleri açısından benzer özellikte oldukları saptanmıştır (Sidell, 2000).

Bu proteinlerde, tekrarlanan hidrofilik karbonhidrat yapıları molekülün bir tarafına alanin, metil grupları ise molekülün diğer tarafına amfifilik biçimde yerleşmiş durumdadır. AFGP'lerin buz yüzeyine sıkı bir şekilde bağlanmasında bu yapısal özelliğin etkili olabileceği düşünülmektedir (Knight ve ark., 1991).

Omurgasız Antifriz Proteinleri

Böcek, akar, örümcek gibi karasal eklembacaklıların çoğunun AFP oluşturduğu bilinmektedir. Omurgasız bu canlılar kış aylarında oluşturdukları AFP yardımıyla vücut sıvılarını donmaya karşı korumaktadır. Böceklerde mevcut AFP'ler, β -sarmal yapıda olup 12-40 kDa arasında değişen molekül ağırlığına sahiptir. Bazı böceklerdeki AFP'ler sistein amino asidi yönünden, bazıları ise serin veya treonin amino asidi yönünden zengindir (Jin-Yao ve ark., 2005). Böceklerdeki AFP'ler, bazı özellikleri açısından balıklardaki AFP'lerden farklılık göstermektedir (Üstün ve Turhan, 2015). Bu proteinleri balıklardaki AFP'lerden farklı kılan benzersiz özellik, balık AFP'lerinden 10-100 kat daha aktif olmalarıdır. Bu özellik sayesinde omurgasız canlılar daha soğuk bölgelerde bile canlılıklarını koruyabilmektedir. Diğer taraftan, balıklardaki AFP'lerin aksine, bitki AFP'leri farklı buz kristallerinin birden fazla yüze, özellikle de hem prizma hem de bazal yüzlere bağlanabilirler (Ramlov ve Johnsen 2014). İmmunolojik çapraz-reaktiviteleri açısından Tip II balık antifriz proteinlerine benzerlik gösterirler (Griffith ve Ewarth, 1995).

Bitki Antifriz Proteinleri

Eğrelti otları ve yosunlar gibi ilkel bitkilerin yanı sıra, 27'den fazla yüksek bitki türünün buz yapılandırma aktivitesine sahip olduğu bilinmektedir. Ancak, bu aktivitenin var olması için bitkinin önce düşük sıcaklığa maruz kalması gereklidir (Üstün ve Turhan, 2015). Kış dönemi geçiren çok yıllık bitki türlerinden birçoğunun tohum, yumru, gövde, taç, dal, çiçek, tomurcuk, yaprak sapı, yaprak ayası gibi değişik kısımlarında ISP'lerin mevcut olduğu saptanmıştır (Hassas-Roudsari ve Goff, 2012). Yabani yaseminden izole edilen AFP'lerin, 67 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu ve %23,7 oranında glisin içerdiği belirlenmiştir (Duman, 1994; Griffith ve Ewarth, 1995). Havuçtaki AFP'ler ise, 34-36 kDa arasında değişen molekül ağırlığına sahip, 332 amino asit içeren, bir ya da iki izoformu olan glikoproteinlerdir (Jin-Yao ve ark., 2005). Yapılarında lizin bakımından zengin 24 amino asidin ardışık olarak 11 kez tekrarlandığı bölgeler yer

almaktadır. Bitki AFP'leri düşük düzeyde (0,2-0,6°C) termal histeresiz (TH) aktivitesine sahip olmakla birlikte, yeniden buz kristalleşmesini güçlü bir şekilde önlerler (Jin-Yao ve ark., 2005; Hassas-Roudsari ve Goff, 2012). Örneğin, kışlık çavdar ISP'leri içeren çözeltilerin, 25 µg/L gibi düşük protein konsantrasyonlarında bile yeniden kristalleşmeyi önleyen bir aktivite sergiledikleri gözlenmiştir (Hassas-Roudsari ve Goff, 2012).

Fungal Antifriz Proteinleri

Fungal AFP'ler ilk olarak, kar örtüsü altında uyuyan bitkilere karşı patojenik aktivite gösteren kar mantarlarında belirlenmiştir. *Antarctomyces psychrotrophicus*'den antifriz protein izolasyonu üzerine yapılan bir çalışmada, saflaştırılan antifriz proteinin yaklaşık 28 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu tespit edilmiştir. Araştırma sonuçları, bu proteinin bir piramidal buz kristalleri oluşturduğunu ve balık antifriz proteinlerinin TH etkisine benzer aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur (Xiao ve ark., 2010). İstiridye mantarı (*Pleurotus ostreatus*) ve kış mantarından (*Flammulina velutipes*, *Stereurn spp.* ve *Coriolus versicolor*) elde edilen ekstraktlarda da TH gözlenmiştir (Duman ve Olsen, 1993).

Bakteri Antifriz Proteinleri

Düşük sıcaklıkta gelişen bakterilerin TH düzeyi, 0,1-0,35°C arasında değişmektedir (Griffith ve Ewart, 1995). *Micrococcus cryophilus*, *Rhodococcus eritropolis* (Duman ve Olsen, 1993) ve yaygın toprak bakterisi olan *Pseudomonas putida*'nın antifriz aktiviteye sahip olduğu (Sun ve ark., 1994) belirlenmiştir. Bakteriyel AFP'nin, Tip II balık, böcek ve bitki AFP'lerinde olduğu gibi, buz bağlama aktivitesi açısından önem taşıyan intramoleküler disülfid köprüleri içerdiği saptanmıştır (Griffith ve Ewart, 1995).

Antifriz Proteinlerin Etki Mekanizması

AFP'lerle AFGP'ler arasındaki yapısal farklılıklar nedeniyle, söz konusu proteinlerin moleküler etki mekanizmasını açıklayabilecek tek bir hipotez öne sürülememektedir (Bouvet ve Ben, 2003). AFP'ler buza karşı değişik mekanizmalarla koruma sağlamaktadır. Bunlardan birisi, termal histeresiz yoluyla gerçekleştirilen koruma mekanizmasıdır. Bu mekanizmaya göre; sıvıların donma noktası, erime sıcaklığı sabit tutularak, buz kristallerinin geliştiği dereceye kadar düşürülmektedir. TH, donma noktası ile erime noktası arasında ölçülen sıcaklık farkını ifade etmekte ve AFP'lerin aktivitesinin belirlenmesinde indikatör görevi görmektedir (Garner ve Harding, 2010). TH yoluyla gerçekleştirilen mekanizmanın genellikle böcekler, balıklar, bitkiler, mantarlar ve bakterilerde etkili olduğu bilinmektedir (Clarke ve ark., 2002). Bu canlılarda bulunan AFP'lerin, donma noktası düşürmek amacıyla yararlanılan çözücülerden 200 ile 300 kat daha fazla aktiviteye sahip oldukları bildirilmektedir (Griffith ve Ewart, 1995). Böceklerdeki TH aktivitesi (>5°C), bitkiler (genellikle 0,2-0,5°C) ve balıklardakine (genellikle 0,7-1,5°C) göre daha yüksek düzeydedir (Jin-Yao ve ark., 2005). AFP'ler donma noktası depresyonuna dayalı etkilerini, çözeltide mevcut molekül sayısına bağlı olmaksızın uyguladıkları için (Crevel ve ark., 2002; Davies ve ark., 2002), balık kan

serumunun ozmotik basıncında fazla bir değişim meydana gelmemektedir (Crevel ve ark., 2002).

Diğer bir mekanizma, ISP'ler aracılığı ile buz kristalizasyonunun değişime uğratılması ve daha küçük ve farklı biçimlerde kristallerin oluşumunun sağlanmasıdır (Crevel ve ark., 2002, Üstün ve Turhan, 2015). Bir adsorbsiyon-inhibisyon süreci olan bu mekanizmada, proteinin büyümekte olan buz kristalinin yüzeyine bağlandığı düşünülmektedir (Feeney ve Yeh, 1998; Davies ve ark., 2002; Bouvet ve Ben, 2003; Hassas-Roudsari ve Goff, 2012). Crevel ve ark. (2002) ile Bouvet ve Ben (2003)'e göre bu etki, AFP'lerin su/buz ara yüzeyinde toplanması ve böylece kristal gelişiminin modifiye edilmesi suretiyle gerçekleşmektedir. AFP'lerin buza bağlanma mekanizması henüz tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte, bu bağlantıda proteinin yapısında yer alan hidroksil grupları (-OH) ve amino asit zincirindeki diğer polar grupların (=CO-) rolü olduğu düşünülmektedir (Eastman ve De Vries, 1986). Bazı araştırmacılar, buz halindeki su molekülleri arasındaki hidrojen bağlarının antifriz proteinlerin stabilitesi üzerine önemli düzeyde katkı sağladığını, diğer bazı araştırmacılar ise bu konuda hidrofobik amino asitlerden ileri gelen entropik ve entalpik katkıların önemli olabileceğini ileri sürmektedir (Myers ve Pace, 1996). Tüm AFP'ler, buz kristaline yüzeyden bağlanarak adsorbe edilmektedir. Adsorbsiyon ve buz kristalindeki büyümenin antifriz proteinin konsantrasyonuna ve buz morfolojisine bağlı olduğu ve düşük konsantrasyonlarda buz kristalinin altıgen şekil aldığı belirtilmektedir (De Vries, 1986; Griffith ve ark., 1992; Knight ve ark., 1984). Bir başka görüşe göre ise, AFP doğrudan buza bağlanmak yerine, daha ziyade buz/su ara yüzeyinde birikmektedir (Feeney ve Yeh, 1998; Wierzbicki ve ark., 2007). Bunu takiben proteinin buza bakan yüzündeki su/buz ara yüzey enerjisinin azalması sonucu, ara yüzey bölgesine protein adsorbsiyonu gerçekleşmektedir.

Antifriz Proteinlerin Gıdalarda Kullanımı

AFP'ler buz parçalarının yeniden kristalleşmesini ve daha büyük kristallerin oluşumunu engelleyici ajanlardır. Dondurulmuş gıdalarda, dondurulma işlemi sırasında gıdanın yapısında meydana gelebilecek hasarlar AFP'lerin kullanımı ile en aza indirilebilmektedir. AFP'ler gıdanın depolama süreci boyunca büyük kristallerin oluşumunu önlemeleri nedeniyle, biyomedikal ya da endüstriyel amaçlardan ziyade ısı dirence ihtiyaç duyulan mühendislik dallarında kullanılmaktadır. Bu alandaki çalışmalar özellikle et, balık, dondurulmuş hamur, dondurulmuş süt ürünleri ya da dondurma üzerinde gerçekleştirilmiştir (Üstün ve Turhan, 2015). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, balıklardan izole edilen 4 farklı AFP tipine ek olarak, kışlık çavdar, yabani yasemin ve itüzümü meyveleri ile dört farklı böcek türünden de AFP'ler elde edilmiştir (Duman ve Olsen, 1993). Antifriz proteinler, elde edildikleri kaynakların farklı olması nedeniyle, her gıdada kullanıma uygun olmayabilir. Bu konudaki diğer bir olumsuzluk, tüm organizmaların, kendi AFP'lerinin çoklu izoformlarını üretebilme yeteneğine sahip olmalarıdır. Örneğin, Atlantik Morina balığının hem protein büyüklüğüne hem de spesifik aktiviteye göre değişen birçok AFGP izoformu üretme yeteneğinde olduğu ortaya konulmuştur (Griffith ve Ewart, 1995). Havuçta da

benzer bir durum söz konusudur (Jin-Yao ve ark., 2005). Song ve ark. (2019) ise un kurdu olarak bilinen *Tenebrio molitor*'dan elde edilen AFP'nin sebzelerin dondurulduktan sonra çözünme işleminde meydana gelen hasarı en aza indirmek için kullanmıştır. Araştırmada kullanılan salatalık, havuç, kabak ve soğan örneklerinde kırılma kuvvetinin yüksek olduğu, AFP'nin buz kristali oluşumunu engellediği ve dondurulmuş sebzelerin kalitesini artırdığı tespit edilmiştir. Yüksek rakımlı tarlalarda domates yetiştiriciliğinde sorunları gidermek üzere Balamurugan ve ark. (2018)'nin yaptıkları çalışmada, *L. perenne*'den elde edilen AFP'nin domateste dondurucu stresi azalttığı ve ürün verimliliğini artırdığı vurgulanmaktadır.

Dondurma Teknolojisi

Dondurma teknolojisinde, buz kristalinin büyüklüğü ile ürünün pürüzsüz, kaymağımsı tekstürü ve duyuşsal nitelikleri arasında sıkı bir ilişki bulunmaktadır. Bu nedenle, dondurma üretim, depolama ve dağıtım koşullarının, küçük buz kristalleri oluşumunu sağlayacak ve buz kristal gelişim hızını en aza indirecek, diğer bir ifadeyle buzun yeniden kristalleşmesini önleyecek şekilde yürütülmesine önem verilmektedir (Hartel, 1998; Adapa ve ark., 2000). Ancak, depolama aşamasında dondurmanın sıcaklık dalgalanmalarına maruz kalması, küçük buz kristallerinin erimesine ve ürün yeniden donduğunda büyük kristaller şekline dönüşmelerine yol açmaktadır. Yeniden yapılanan büyük buz kristalleri ise, dondurmanın tekstürünü bozmakta ve ağızda buzlu yapı algılanması yol açmaktadır. Bu önemli sorunun çözümlenmesinde antifriz proteinlerin doğal buz gelişim inhibitörleri olarak kullanılabilceği ileri sürülmektedir (Üstün ve Turhan, 2015).

Antifriz proteinlerin dondurmada kullanımı konusunda yapılan birkaç çalışmadan birisinde, Warren ve ark. (1992), patentli olarak üretilen ticari antifriz proteinleri vanilyalı dondurma üretiminde kullanılmış ve elde ettikleri örnekleri -80°C'de dondurduktan sonra 1 saat süreyle -6°C ile -8°C arasında depolamıştır. Araştırma sonuçları, antifriz proteinlerin kullanıldığı dondurma örneklerinde, depolama süresi sonunda kristal gelişiminin düşük düzeyde kaldığını, kontrol örneklerinde ise buz kristallerindeki büyümenin devam ettiğini ortaya koymuştur.

Yapılan bir başka çalışmada Clarke ve ark. (2003), Tip III AFP içeren ve -10°C ile 20°C arasında depolanan dondurmaların mikroyapısını elektron mikroskobu yardımıyla 3 hafta süresince görüntülemiştir. Elde edilen sonuçlar AFP içermeyen kontrol örneklerinin sonuçları ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Depolamanın başlangıcında buz kristalleri açısından örnekler arasında çok az farklılıkların olduğu tespit edilmiştir. Ancak depolama süresinin sonlarına doğru AFP içeren örneklerde daha küçük kristaller olduğu, kontrol örneklerinde ise daha büyük kristal yapılarının bulunduğu görülmüştür.

Kışlık buğday çimi ekstraktından elde edilen buz yapılandırıcı proteinlerin dondurma kalitesi üzerine etkilerini araştıran Regand ve Goff (2006), bu proteinlerin %0,0025 ve %0,0037 oranlarında kullanımı ile dondurmada buzun yeniden kristalleşme oranının sırasıyla %40 ve %46 oranlarında azaltılabileceğini belirlemiştir. Buna bağlı olarak dondurmanın tekstüründe dikkate değer bir düzelme sağlandığı duyuşsal değerlendirme sonuçları ile

ortaya konulmuştur. Aynı çalışmada, stabilizer kullanımının ve miksin pastörizasyonunun ISP aktivitesi üzerine etkileri de incelenmiştir. Dondurma formülasyonunda stabilizer kullanımının ISP üzerinde sinerjistik bir etki yarattığı ve böylece ISP'nin aktivitesinde azalma meydana gelmediği ortaya konulmuştur. Pastörizasyon işleminin de ISP aktivitesi üzerinde olumlu etki yarattığı saptanmıştır.

Düşük yağ içeriğine sahip (%0,5 yağ) süten üretilen dondurmanın yapısı üzerine AFP'nin etkisini inceleyen Kalede ve ark. (2018), farklı kaynaklardan elde edilen (balık, kış çavdarı ve *E. coli*) AFP'leri kullanmışlardır. Balık kaynaklı AFP'den 3 mg/L kullanıldığında dondurmanın sert yapıda olduğu ve erime süresince şeklini koruyabildiği belirlenmiştir. Araştırmacılar -5°C'deki miks içerisine, 35 ve 65 mg/L oranında AFP ilave ettikten sonra dondurma üretimini gerçekleştirmişlerdir. Araştırma bulgularına göre dondurma miksinde AFP ilavesi, dondurmanın daha yumuşak yapıda olmasını sağlamıştır. Ayrıca çalışmada 35 mg/L AFP kullanımının dondurmada oluşan buz agregatlarının büyüklüğünü 140 µm çapına kadar düşürdüğü belirlenmiştir.

Soğutulmuş ya da Dondurulmuş Balık ve Et Teknolojisi

Antifriz proteinler et ya da balıkta da buz kristallerinin büyümesini önleyici bir etki yaratmaktadır. Sığır kas yapısından biri olan *sternomandibularis* bölgesinden alınan et örnekleri üzerine yapılan bir çalışmada, 0-1 mg/mL antifriz ve fosfat tamponu içeren solüsyona daldırılan örnekler +2 ve -20°C'de 3 gün bekletildikten sonra analiz edilmiştir (Payne ve ark., 1994). Araştırmada et üzerindeki boşluklara giren antifriz proteinler sayesinde dondurulan örneklerin kalitesinin korunduğu, ancak aynı etkinin +2°C depolanan örneklerde görülmediği tespit edilmiştir. Payne ve Young (1995) soğukta depolanan sığır ve kuzu etlerinin kalitesi üzerine AFP'nin etkilerini ortaya koymak amacıyla yaptıkları bir çalışmada, sığır etlerini önce AFP çözeltisinde ıslatıp daha sonra kurutarak -20°C'de 2-16 hafta süreyle depolamıştır. Kuzularda ise, ıslatma süresi 2 hafta gibi uzun bir süre gerektirdiği için, AFP'nin canlı hayvana enjeksiyonu uygun görülmüş, kesimden sonra kuzu etleri de aynı koşullarda depolanmıştır. Kesimden 24 saat önce AFP enjekte edilen örneklerde buz kristallerinin küçük boyutlu olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, et endüstrisinde donmaya bağlı bozulma ve hasar kayıplarının AFP'ler ile minimuma indirilebileceği öne sürülmüştür.

Desjardins ve ark. (2007), düşük su sıcaklığına maruz kalan yayın balığı (Atlantic wolffish, *Anarhichas lupus*)'nın gelişmesi üzerine AFP'lerin etkisini incelemiştir. Araştırma sonucunda, AFP'lerin sıfırın altındaki sıcaklıklarda balığın büyüme hızını artırabileceği görülmüştür.

Dondurulmuş Hamur Üretim Endüstrisi

Dondurulmuş hamur ürünleri, 1960'lı yıllardan itibaren pratik ürünler sektörüne giriş yapmıştır. Pratik ve kolay kullanılabilen ürünler olmakla birlikte, olumsuz yönleri raf ömürlerinin kısa olması ve düzgün bir hamur yapısına sahip bulunmamalarıdır.

Hamurun su tutma kapasitesinin artırılması ve yapısının düzeltilmesi konusunda Zhang ve ark. (2007) tarafından yürütülen bir çalışmada, dilimlenerek elde

edilen havuç parçaları, 50 mM Tris/HCl tampon ile homojenize edildikten sonra santrifüj edilerek süpernatant elde edilmiştir. Daha sonra deiyonize suyla diyalize edilen örnek, liyofilize edilerek dondurulmuş ve elde edilen havuç kaynaklı antifriz protein hamur üretiminde 6,2 g/kg hamur olacak şekilde kullanılmıştır. Diğer katkı maddeleriyle birlikte toplam dondurulmuş hamurda %18,3 oranında havuç antifriz proteini ihtiva eden örneklerin dondurma-çözündürme ve kristal oluşumu sırasında TH yarattığı gözlenmiştir. Ayrıca, dondurulmuş hamurda maya hücrelerinin daha yüksek düzeyde canlılıklarını korudukları ve hamurun su tutma kapasitesinde artış sağlandığı da belirlenmiştir.

Arpa antifriz proteininin dondurma ve dondurma-çözündürme döngüleri sırasında hamurun termal özellikleri ve su durumu üzerine etkisinin incelendiği bir başka çalışmada (Ding ve ark., 2015), hamur bileşimine ilave edilen %0,5 oranında AFP'nin hazırlanan taze hamurda görülen özgül ısı, donma sıcaklığı, erime sıcaklığı, donabilir su içeriği gibi hamurun termal özellikleri incelenmiştir. Dondurulmuş hamur örneklerinde de erime performansındaki değişme, donabilir su içeriği, yapıştırma özellikleri, nem içeriği, su hareketliliği ve donma ve donma-çözülme çevrimleri sırasında su dağılımı analiz edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, arpa kaynaklı AFP ilavesinin dondurma işleminden sonra hamurun belirgin özgül ısıyı arttırdığı, donma sıcaklığını ve erime sıcaklıklarındaki sıcaklık aralığını yükselttiği ve taze hamurun erime entalpisi ile donabilir su içeriğini azalttığı tespit edilmiştir.

Sonuç

Farklı yapıdaki antifriz proteinlerin değişik gıdalarda kullanımı ile ilgili çalışmaların sonuçları, antifriz protein kullanımının, dondurularak muhafaza edilen ürünlerin yapısal özelliklerinin korunması açısından yenilikçi bir uygulama olduğunu göstermektedir. Ancak, katıldıkları gıdanın diğer bileşenleri ile olan etkileşimlerinin henüz tam olarak bilinmemesi ve üretim maliyetlerinin yüksek olması antifriz proteinlerin katkı maddesi olarak kullanımını kısıtlayıcı faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bununla birlikte, ilerleyen dönemlerde, antifriz proteinlerin raf ömrü süresince ürün kalitesini artırmak, gıdanın yapısını korumak ve muhafazasını sağlamak amacıyla kullanılabileceği düşünülmektedir. Diğer taraftan, antifriz proteinlerin sentetik olarak üretilmesi ve daha düşük maliyetle elde edilerek satışa sunulmasının yaygın kullanım olanağı yaratabileceği tahmin edilmektedir. Ayrıca, düşük miktarda bile güçlü bir etkiye sahip olan böcek antifriz proteinlerinden aktivitesi yüksek olanların kullanılması, gıda bileşimine daha ucuz maliyette antifriz protein ilavesine imkân sağlayacaktır.

Kaynaklar

Adapa S, Schmidt KA, Jeon IJ, Herald TJ, Flores RA. 2000. Mechanisms of ice crystallization and recrystallization in ice cream: a review. *Food Reviews International*, 16: 259–271.
Anonymous. 2019a. Ice Crystals inside Antarctic Fishes May Never Melt, <http://www.sci-news.com/biology/science-ice-crystals-inside-antarctic-fishes-may-never-melt-02167.html>, Erişim Tarihi: 20.03.2019.

Anonymous. 2019b. Morina, <https://norvecdenizurunleri.com/daha-fazlasi/denz-urunler-akadems/morina/>, Erişim Tarihi: 20.03.2019.
Anonymous, 2019c. Gümüş Balığı, <http://www.cizgix.com/product-details/gumus-baligi>, Erişim Tarihi: 20.03.2019.
Antson AA, Smith DJ, Roper DI, Lewis S, Caves LS, Verma CS, Buckley SL, Lillford PJ, Hubbard RE. 2001. Understanding the mechanism of ice binding by type III antifreeze proteins. *Journal of Molecular Biology*, 305 (4): 875-889.
Aşçı A, Göçer EMÇ, Küçükçetin A. 2011. Antifriz proteinler ve gıda teknolojisinde kullanımı. *Akademik Gıda*, 9 (6): 46-51.
Baardsnes J, Kondejewski LH, Hodges RS, Kay C, Davies PL. 1999. New ice-binding face for type I antifreeze protein. *FEBS Letters*. 463: 87-91.
Balamurugan S, Ann JS, Varghese IP, Murugan SB, Harish MC, Kumar SR., Sathishkumar R. 2018. Heterologous expression of *Lolium perenne* antifreeze protein confers chilling tolerance in tomato. *Journal of Integrative Agriculture*, 17 (5): 1128–1136.
Bayer-Giraldi M, Weikusat I, Besir H, Dieckmann G. 2011. Characterization of an antifreeze protein from the polar diatom *Fragilariopsis cylindrus* and its relevance in sea ice. *Cryobiology*, 63: 210-219.
Bektaş G, Altıntaş A. 2007. Antifriz Proteinler. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 18: 27-32.
Bouvet V, Ben RB. 2003. Antifreeze proteins: structure, conformation and biological applications. *Cell Biochemistry Biophysics*, 39: 133–144.
Clarke CJ, Buckley SL, Lindner N. 2002. Ice structuring proteins-A new name for antifreeze proteins. *Cryo Letters*, 23 (2): 89-92.
Clarke CJ, Buckley S, Lindner N. 2003. Ice-structuring proteins in icecream. *Proceedings of the Second IDF International Symposium on Ice Cream*, Thessaloniki, p: 33–34.
Crevel RWR, Fedyk JK, Spurgeon MJ. 2002. Antifreeze proteins: occurrence and human exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 899–903.
Davies PL, Hew CL. 1990. Biochemistry of fish antifreeze proteins. *FASEB Journal*, 4: 2460–2468.
Davies PL, Sykes BD. 1997. Antifreeze proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 828-834
Davies PL, Baardsnes J, Kuiper MJ., Walker VK. 2002. Structure and function of antifreeze proteins. *Philosophical Transactions of The Royal Society*, 357: 927–935.
Deng G, Andrews DW, Laursen RA. 1997. Amino acid sequence of a new type antifreeze protein from the longhorn sculpin *Myoxocephalus octodecimspinosus*. *FEBS Letter*, 402: 17-20.
Desjardins M, Le François NR, Fletcher GL, Blier PU. 2007. High antifreeze protein levels in wolffish (*Anarhichas lupus*) make them an ideal candidate for culture in cold, potentially ice laden waters. *Aquaculture*, 272 (1): 667-674.
De Vries AL, Wohlschlag DE. 1969. Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science*, 163: 1073-1075.
De Vries AL, Komatsu SK, Feeney RE. 1970. Chemical and physical properties of freezing point-depressing glycoproteins from Antarctic fishes. *Journal of Biological Chemistry*, 245, (11): 2901-2908.
De Vries AL, Lin Y. 1977. Structure of a peptide antifreeze and mechanism of adsorption to ice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure*, 495: 388-392.
De Vries AL. 1986. Antifreeze glycopeptides and peptides: interactions with ice and water, *Methods in Enzymology*, 127: 293-303.
Ding X, Zhang H, Wang L, Qian H, Qi X, Xiao J. 2015. Effect of barley antifreeze protein on thermal properties and water state of dough during freezing and freeze-thaw cycles. *Food Hydrocolloids*, 47, 32-40.
Duman JG, Olsen TM. 1993. Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi, and phylogenetically diverse plants. *Cryobiology*, 30: 322-328.

- Duman JG. 1994. Purification and characterization of a thermal hysteresis protein from a plant, the bittersweet nightshade *Solanum dulcamara*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1206: 129-135.
- Eastman JT, De Vries AL. 1986. Antarctic fishes. *Scientific Americans*, 255: 96-103.
- Ewart KV, Lin Q, Hew CL. 1999. Structure, function and evolution of antifreeze proteins, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55: 271-283.
- Feeney RE., Yeh Y. 1998. Antifreeze proteins: Current status and possible food uses. *Trends in Food Science and Technology*, 9: 102-106.
- Garcia-Arribas O, Mateo R, Tomczak MM, Davies PL, Mateu MG. 2007. Thermo dynamic stability of a cold-adapted protein, type III antifreeze protein, and energetic contribution of salt bridges. *Protein Science*, 16: 227-238.
- Garner J, Harding MM. 2010. Design and synthesis of antifreeze glycoproteins and mimics. *ChemBioChem Combining Chemistry and Biology*, 11: 2489 - 2498.
- Griffith M, Ala P, Yang DSC., Hon WC, Moffat B. 1992. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. *Plant Physiology*, 100: 593-596.
- Griffith M, Ewart KV. 1995. Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods. *Biotechnology Advances*, 13: 375-402.
- Harding MM, Anderberg PI., Haymet ADJ. 2003. Antifreeze glycoproteins from polar fish. *European Journal of Biochemistry*. 270: 1381-1392.
- Hartel RW. 1998. Mechanisms and kinetics of recrystallization in ice cream. In *The Properties of Water in Foods*. D. S. Reid, ed. Blackie Academic and Professional, 287-328 New York, NY.
- Hassas-Roudsari M, Goff HD. 2012. Ice structuring application proteins from plants: mechanism of action and food. *Food Research International*, 46: 425-436.
- Jin-Yao L, Ji M, Fu-Chun Z. 2005. Recent advances in research of antifreeze proteins. *Chinies Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 21: 717-722.
- Kim HJ, Lee JH, Hur YB, Woo Lee C., Park SH, Koo BW. 2017. Marine antifreeze proteins: Structure, function, and application to cryopreservation as a potential cryoprotectant. *Marine Drugs*, 15: 1-27.
- Knight CA, De Vries AL, Oolman LD. 1984. Fish antifreeze protein and the freezing and recrystallization of ice. *Nature*, 308: 295-296.
- Knight CA, Cheng CC, De Vries AL. 1991. Adsorption of a-helical antifreeze peptides on specific ice crystal surface planes. *Biophysical Journal*, 59: 409-418.
- Kristiansen E, Zachariassen KE. 2005. The mechanism by which fish antifreeze proteins cause thermal hysteresis. *Cryobiology*, 51: 262-280.
- Myers KM, Pace CN. 1996. Hydrogen bonding stabilizes globular proteins. *Biophysical Journal*, 71: 2033-2039.
- Payne SR, Young OA. 1995. Effects of pre-slaughter administration of antifreeze proteins on frozen meat quality. *Meat Science*, 41: 147-155.
- Petzold G, Aguilera JM. 2009. Ice morphology: Fundamentals and technological applications in foods. *Food Biophysics*, 4: 378-396.
- Pickett M, Scot, GK, Davies PL, Wong N, Joshi S, Hew CL. 1984. Sequence of an antifreeze protein precursor. *European Journal of Biochemistry*. 143: 35-38.
- Qiu L, Mao X, Hou F, Ma J. 2013. A novel function—Thermal protective properties of an antifreeze protein from the summer desert beetle *Microdera punctipennis*. *Cryobiology*, 66: 60-68.
- Olijve LLC, Meister K, De Vries AL, Duman JG, Guo S, Bakker HJ, Voets IK. 2016. Blocking rapid ice crystal growth through nonbasal plane adsorption of antifreeze proteins. *Proceeding of The National Academy of Science of The United States of America*, 113 (14): 3740-3745.
- Payne SR, Sandford D, Harris A, Young OA. 1994. The effects of antifreeze proteins on chilled and frozen meat. *Meat Science*, 37 (3): 429-438.
- Ramlov H, Johnsen JL. 2014. Controlling the freezing process with antifreeze proteins. In *Emerging Technologies for Food Processing*. Elsevier. p: 539-561.
- Regand A, Goff HD. 2006. Ice recrystallization on inhibition in ice cream as affected by ice structuring proteins from winter wheat grass. *Journal of Dairy Science*, 89: 49-57.
- Üstün NŞ, Turhan S. 2015. Antifreeze proteins: Characteristics, function, mechanism of action, sources and application to foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39: 3189-3197.
- Sidell BD. 2000. Orono ME Gravitational and Space Biology. *Bulletin 13 (2)*, School of Marine Sciences, University of Maine.
- Sun X, Griffith M, Pasternak JJ, Glick BR. 1994. Does the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 survive cold temperature by synthesizing its own antifreeze protein 153-155 s. In: *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*, M.H. Ryder, P.M. Stephens and G.D. Bowen (eds.), CSIRO, Adelaide, Australia. p: 153-155.
- Song DH, Kim M, Jin ES, Sim DW, Won HS, Kim EK, Jang S, Choi YS, Chung KH, An JE. 2019. Cryoprotective effect of an antifreeze protein purified from *Tenebrio molitor* larvae on vegetables. *Food Colloids*, 94: 585-591.
- Tachibana Y, Fletche GL, Fujitani N, Tsuda S, Monde K, Nishimura SI. 2004. Antifreeze glycoproteins: Elucidation of the structural motifs that are essential for antifreeze activity. *Angewandte Chemie International Edition*, 116: 874.
- Xiao N, Suzuki K, Nishimiya Y, Kondo H, Miura A, Tsuda S, Hoshino T. 2010. Comparison of functional properties of two fungal antifreeze proteins from *Antarctomyces psychrotrophicus* and *Typhula ishikariensis*. *FEBS Journal* 277: 394-403.
- Warren CJ, Mueller CM, Mckown RL. 1992. Ice crystal growth suppression polypeptides and methods of preparation. *US Patent*, 5, p:118-792.
- Wierzbicki A, Dalal P, Cheatham TE, Knickelbein JE, Haymet ADJ, Maduraz JD. 2007. Antifreeze proteins at the ice/water interface: Three calculated discriminating properties for orientation of Type I proteins. *Biophysical Journal*, 93: 1442-1451.
- Yang DCS, Hon W-C, Bubanko S, Xue Y, Seetharaman J, Hew CL, Slicheri F. 1998. Identification of the ice-binding surface on a Type III antifreeze protein with a "Flatness Function" Algorithm. *Biophysical Journal*, 74: 2142-2151.
- Yangılar F, Yıldız O. 2016. Gıda endüstrisinde antifriz proteinlerin önemi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 32 (1): 81-87.
- Zhang C, Zhang H, Wang L. 2007. Effect of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins on the fermentation capacity of frozen dough. *Food Research International*, 40: 763-769