

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAMLET PROTEİNİ ÜRETİMİ ve KOASERVASYON YÖNTEMİYLE
STABİLİTESİNİN ARTTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Reyhan KOYUNCU

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

AĞUSTOS 2017

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAMLET PROTEİNİ ÜRETİMİ ve KOASERVASYON YÖNTEMİYLE
STABİLİTESİNİN ARTTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Reyhan KOYUNCU
(506141553)**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Beraat ÖZÇELİK

AĞUSTOS 2017

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506141553 numaralı Yüksek Lisans Burhan ÇETİNKAYA, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerinegetirdikten sonra hazırladığı “**BAMLET PROTEİNİ ÜRETİMİ VE KOASERVASYON YÖNTEMİYLE STABİLİTESİNİN ARTTIRILMASI**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Beraat ÖZÇELİK**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Beraat ÖZÇELİK**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doc. Dr. H. Funda
KARBANCIOĞLU GÜLER
İstanbul Teknik Üniversitesi

Yrd. Doc. Dr. Sibel ULUATA
İnönü Üniversitesi

Teslim Tarihi : 3 Temmuz 2017
Savunma Tarihi : 9 Ağustos 2017





Canım anneme ve babama,



ÖNSÖZ

Hayal ettiğim yerde lisansüstü eğitimimi tamamlarken, bu yolda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen; fikirlerine, zekâsına ve engin bilgisine daima hayran kaldığım; bilim adına geldiğim bu noktada emin adımlarla ilerlememi sağlayan ve en başından beri doğru yerde olduğumu hissettiren değerli hocam tez danışmanım Beraat ÖZÇELİK'e

Çalışmalarında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen; düşüncelerini, fikirlerini, bilgisini paylaşan ve yol gösteren; daima bana inanan ve güvenen değerli hocam Dr. Tamer El-Messery'ye

Çalışmalarım boyunca beni dinleyen, yardım eden ve desteğini asla eksik etmeyen değerli hocam Dr. Fatih BİLDİK'e

Her başım sıkıştığında yanına koştuğum ve sabrı için teşekkürü borç bildiğim değerli hocam Gıda Yük. Müh. Evren DEMİRCAN'a ve yardımlarını esirgemeyen, fikir ve bilgisini her zaman paylaşan Ar. Gör. Kadriye Nur KASAPOĞLU, Arş. Gör. Merve YAVUZ'a ve Arş. Gör. Beyza IŞIK'a

Onlardan çok şey öğrendim, en önemlisi çok güzel dostluklar edindim, tez çalışmalarım süresince daima yanımda olarak yorulduğum anlarda göstermiş oldukları destekleri, fikirleri ve en önemlisi dostlukları için sevgili arkadaşlarım Eda Nur AYAR, Merve KOYUNCU, Sinem GEDİK ve Gülnaz ARTAN'a

Tez çalışmalarımın yoğun olduğu zamanlarda ben onları ihmal etsem de beni hiçbir zaman yalnız bırakmadıkları için, daima yanımda oldukları ve destek verdikleri için dostluklarından hiçbir zaman vazgeçmeyeceğim can dostlarım Burcu GÜNDOĞDU, Kerime FERHATOĞLU ve Eylem YILMAZ'a

En başından başlayarak yaptığım işlerde, ilerlediğim yolda bana her zaman inanan ve güvenen; bir kez olsun beni yalnız bırakmayan manevi desteklerini sonsuz kez hissettiğim; onlar olmadığını asla düşünemediğim, ilerlediim yolda vermiş oldukları emeklerinden ve ve bitmeyen sevgilerinden dolayı canımdan çok sevdiğim anneciğim Havva KOYUNCU'ya, babacığim Mahmut KOYUNCU'ya, ikizim Nazan ŞAHİN'e, abiciğim Özhan KOYUNCU'ya, kardeşim Gökşen KOYUNCU'ya ve eniştem Şener ŞAHİN'e; doğdukları günden beri hayatımıza neşe, huzur ve anlam katan ayrıca annelerinin sütlerini benimle paylaşan canım yeğenlerim Tusem Lina KOYUNCU ve Barış Mete ŞAHİN'e tüm kalbimle çok teşekkür ederim...

AĞUSTOS 2017

Reyhan KOYUNCU
(Gıda Mühendisi)



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
SEMBOLLER	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ÖZET.....	xix
SUMMARY	xxi
1. GİRİŞ	1
1.1 Proteinler	2
1.1.1 Proteinlerin yapısal özellikleri.....	3
1.1.2. Proteinlerin sınıflandırılması	7
1.1.3 Protein molekülüne ait özellikler.....	9
1.1.3.1 Molekül yapısı ve şekli.....	9
1.1.3.2 Yarı ömrü	9
1.1.3.3 Stabilite.....	10
1.1.4 Süt proteinlerinin fonksiyonelliği	13
1.1.5 Süt proteini α -laktalbumin	14
1.1.6 BAMLET/HAMLET proteini.....	15
1.2 Enkapsülasyon Teknolojisi	20
1.2.1 Enkapsülasyon yöntemleri.....	22
1.2.2 Kaplama materyali olarak kullanılam pektinin özellikleri	26
2. MATERYAL METOT	31
2.1 Materyaller	31
2.2 Metotlar	31
2.2.1 Sütten α -laktalbumin eldesi.....	31
2.2.2 BAMLET eldesi.....	32
2.2.3 BAMLET proteini validasyonu	32
2.2.4 UPLC analizi ile α -laktalbumin ve BAMLET'in tanımlanması	32
2.2.5 BAMLET proteininin pektin ile koaservasyonu.....	32
2.2.6 Partikül boyutu ve zeta (ζ) potansiyeli	32
2.2.7 Bulanıklık analizleri.....	33
2.2.8 SEM uygulaması.....	33
2.2.9 Enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi	34
2.2.10 BAMLET /pektin koaservatının FTIR spektrumlarının elde edilmesi .	34
2.2.11 BAMLET/pektin koaservatının termal özelliklerinin diferansiyel taramalı kalorimetri ile belirlenmesi (DSC).....	35
2.2.12 Dielektrik özelliklerin belirlenmesi	35
2.3 İstatistiksel Analiz	35
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	37
3.1 Optimizasyon Aşamasında Yapılan Ölçümler	37

3.1.1 UPLC verileri ve kütle denkliği.....	37
3.1.2 BAMLET proteini geçerlilik testi (Validasyonu).....	41
3.1.3 Partikül boyutu.....	43
3.1.4 Zeta (ζ) potansiyeli	44
3.1.5 Bulanıklık görüntüleri.....	49
3.1.6 Koaservasyon için optimum pH'nın belirlenmesi.....	50
3.1.7 Koaservasyon için optimum BAMLET/pektin oranının belirlenmesi.....	51
3.1.8 SEM görüntüleri	53
3.1.9 Enkapsülasyon etkinliği (EE)	55
3.1.10 BAMLET/pektin koaservatının FTIR özellikleri	56
3.1.11BAMLET/pektin koaservatının termal özellikleri(DSC)	57
3.1.12 Dielektrik özellikler	59
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
KAYNAKLAR.....	63
EKLER.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	71

KISALTMALAR

α -LA	: Alfa-Laktalbumin, α - Laktalbumin
HAMLET	: <u>H</u> uman <u>A</u> lfa <u>L</u> aktalbumin <u>M</u> ade <u>L</u> Ethal to <u>T</u> umor Cells
BAMLET	: <u>B</u> ovine <u>A</u> lfa <u>L</u> aktalbumin <u>M</u> ade <u>L</u> Ethal to <u>T</u> umor Cells
OA	: Oleik asit
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography)
UPLC	: Ultra performans sıvı kromatografisi (Ultra Performance Liquid Chromatography)
FTIR	: Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spektroskopy)
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu (Scanning Elektron Microscope)
DSC	: Diferansiyel tarama kalorimetrisi (Differential Scanning calorimetry)
EE	: Enkapsülasyon etkinliği
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz (Phosphate Buffered Saline)
RSD	: Relatif standart sapma
O7	: Oran 7



SEMBOLLER

°C	: Santigrad derece
M	: Molarite
mM	: Milimolar
mV	: Milivolt
µm	: Mikrometre
nm	: Nanometre
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
rpm	: Dakikadaki devir sayısı (round per minute)
dk	: Dakika
w/v	: Ağırlık/hacim oranı (weight/volume)
v/v	: Hacim/hacim oranı (volume/volume)
kDa	: Molekül ağırlığı, kilo Dalton
p	: İstatistik olasılık
ε '	: Dielektrik sabiti (30 Mhz)
ε ''	: Dielektrik sabiti (3 Ghz)



ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1 : BAMLET üretim süreci.....	39
Çizelge 3.2 : α – Laktalbumin kütle denkliği	39
Çizelge 3.3 : BAMLET kütle denkliği.	40
Çizelge 3.4 : HPLC yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri	41
Çizelge 3.5 : HPLC yöntemiyle belirlenen gıda preparatlarının geri kazanım değerleri.....	42
Çizelge 3.6 : BAMLET proteininin partikül boyutu değerleri	43
Çizelge 3.7 : BAMLET-pektin koaservatın farklı protein:pektin oranlarındaki partikül boyutu partikül boyutu değerleri	44
Çizelge 3.8 : BAMLET proteini zeta (ζ) potansiyeli değerleri.....	45
Çizelge 3.9: Pektin zeta (ζ) potansiyeli değerleri.....	46
Çizelge 3.10: Farklı pH değerleri-sabit protein:pektin (1:1) oranındaki zeta (ζ) potansiyeli değerleri	47
Çizelge 3.11: Farklı protein:pektin oranları, sabit pH (pH3) için zeta (ζ) potansiyeli değerleri.....	47
Çizelge 3.12: Farklı pH değerleri için koaservat verimi.....	55
Çizelge 3.13: Farklı protein:pektin oranlarında koaservat verimi	55
Çizelge 3.14: BAMLET ve BAMLET-pektin koaservatlarının denatürasyon sıcaklık aralığı (ΔT_d), denatürasyonun pik sıcaklığı (T_d) ve denatürasyon entalpisi (ΔH_d)	58
Çizelge 3.15: α –laktalbumin, BAMLET ve BAMLET -pektin koaservatının dielektrik sabiti verileri	59



ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 : Peptit bağı.....	3
Şekil 1.2 : Proteinlerde primer yapı.....	4
Şekil 1.3 : α - heliks kıvrılmasının şematik gösterimi	5
Şekil 1.4 : Proteinlerde tersiyer yapı.	6
Şekil 1.5 : Proteinlerde kuarterner yapı.....	7
Şekil 1.6 : Proteinlerin yapısı.....	8
Şekil 1.7 : Disülfid bağı oluşumu.	13
Şekil 1.8 : A-lactalbumin (α -LA) ve oleik asit (OA, C18: 1, cis- Δ 9) arasındaki kompleks oluşumunun şematik görünüşü.	17
Şekil 1.9 : Doymuş ve doymamış yağ asitleri.	17
Şekil 1.10 : Yağ asidi yapısal görüntüsü.	18
Şekil 1.11 : Oleik asidin yapısal görüntüsü.	19
Şekil 1.12 : Geleneksel püskürterek kurutma ekipmanı ve prosesinin diyagramı.....	23
Şekil 1.13 : Püskürterek kurutucu(A) eş akım akışı ve (B) karşı akım akışı şeması..	24
Şekil 1.14 : Basit bir koaservasyonla aroma uçucularının kapsüllenmesinin şematik diyagramı.....	25
Şekil 1.15 : Yüksek esterleşme dereceli pektin, düşük esterleşme dereceli pektin ve amidize pektin.	27
Şekil 1.16 : Pektin yapısının şematik gösterimi.	27
Şekil 1.17 : Limon kabuğundan elde edilen pektinin SEM görüntüsü.....	28
Şekil 3.1 : α – Laktalbumin UPLC görüntüsü.	37
Şekil 3.2 : BAMLET'in UPLC görüntüsü.....	38
Şekil 3.3 : BAMLET oluşumunun şematik gösterimi.	38
Şekil 3.4 : BAMLET proteininin farklı pH aralıklarında ölçülen partikül boyutu değerlerinin grafiksel gösterimi.	43
Şekil 3.5 : BAMLET proteininin farklı pH aralıklarında ölçülen zeta potansiyeli değerlerinin grafiksel gösterimi.	45
Şekil 3.6 : BAMLET proteini ile pektin'in farklı pH aralıklarında ölçülen zeta potansiyeli değerlerinin grafiksel gösterimi.....	46
Şekil 3.7 : BAMLET-pektin koaservatının farklı protein:pektin oranlarında ve pH 3 değerinde ölçülen zeta potansiyeli değerlerinin grafiksel gösterimi.....	48
Şekil 3.8 : BAMLET-pektin koaservatının farklı pH aralıkları ve 1:1 protein :pektin oranında ölçülen zeta potansiyeli değerlerinin grafiksel gösterimi.....	48
Şekil 3.9 : Farklı pH değerleri ve sabit protein:pektin (1:1) oranlarında ki koaservatlar için bulanıklık görüntüsü.	49
Şekil 3.10 : Farklı protein:pektin oranları ve sabit pH (pH3) için koaservatların bulanıklık görüntüsü.....	49
Şekil 3.11 : BAMLET;Pektin koaservatı için pH değerine karşı yüzde verim ve bulanıklık değerleri.	51

Şekil 3.12 :BAMLET;Pektin koaservatı için kütle oranlarına karşı yüzde verim ve bulanıklık değerleri.....	52
Şekil 3.13 :BAMLET'in 4000 x kat büyütülmüş SEM görüntüsü.	53
Şekil 3.13 :BAMLET'in 16000 x kat büyütülmüş SEM görüntüsü.	53
Şekil 3.15 :BAMLET;pektin koaservatının 4000 x kat büyütülmüş SEM görüntüsü.	54
Şekil 3.15 :BAMLET;pektin koaservatının 16000 x kat büyütülmüş SEM görüntüsü.	54
Şekil 3.17 :Farklı pH ve farklı protein:pektin oranlarına sahip koaservat verimlerinin grafiksel gösterimi.	56
Şekil 3.18 :BAMLET, pektin ve BAMLET-pektin koaservatın FTIR spektrumları.	56
Şekil 3.19 :BAMLET, Pektin ve BAMLET- Pektin koaservatı tozlarının diferansiyel tarama kalometrik (DSC) termogramları.	58



BAMLET PROTEİNİ ÜRETİMİ VE KOASERVASYON YÖNTEMİYLE STABİLİTESİNİN ARTTIRILMASI

ÖZET

Enkapsülasyon; gıda bileşenlerinin korunması, stabilizasyonu ve yavaş salınımı için kullanılan nispeten yeni bir teknolojidir. Bununla birlikte enkapsülasyon gıda dışında ilaç ve kozmetik gibi geniş bir kapsamda kullanılmaktadır. Bahsedilen alanlarda birçok çalışma mevcuttur. Ancak önemli terapötik etkiye sahip protein ve peptit kaynaklı ilaç etkin maddelerinin enkapsülasyonu ile ilgili çalışma sayısı fazla değildir. Bu tip ilaçların klinik kullanımı için üretim ve depolama koşulları gibi in vitro şartların kararlılığı etkisi yanında; in vivo koşulların (örn: enzimatik hidroliz) terapötik etki üzerine olumsuz sonuçları bulunmaktadır. Bu stabilite sorunlarını enkapsülasyon ile elimine etmek mümkündür.

Bu tezde, terapötik etkiye sahip BAMLET proteini koaservatı oluşturularak stabilitesi arttırılmıştır (O7 w/w). Koaservasyonda pektin kullanılmış ve püskürtmeli kurutulmuştur. Proteinin stabilitesini etkileyen faktörler ve koaservasyon verimi incelenmiştir. Oral biyoyararlanımı arttırmak için yapılan çalışmada, mide asitliğine yakın bir pH seçilmek istenmiştir. Bu nedenle pH 3 koaservasyon için hedef pH değerini oluşturmuştur. Bağırsaklara gelindiğinde ilacın salınımı istenmektedir. Bu nedenle pH 7 ve sonrasında koaservasyonun yapısının bozulması ilacın salınması beklenmektedir.

BAMLET (Bovine Alpha lactalbumin Made LEthal to Tumor cells) proteini tümorisidal etkiye sahip etkin bir proteindir. Memeli sütlerinden elde edilen ve α -laktalbuminin-oleik asit ile birleşiminden oluşan bu proteinin, ilaç etkin maddesi haline getirilme sürecindeki olumsuz koşullardan etkilenmesi önlenmeye çalışılmış hatta bu sayede ilaç haline getirilmesi olası hale gelmiştir.

BAMLET proteinini üretmek için öncelikle inek sütünden α -laktalbumin elde edilmiştir. Literatüre uygun olarak 1 litre süttten 1.2 g α -laktalbumin elde edilmiştir. Proteinin oleik asit ile birleşimi sıcaklık uygulaması yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Alfa-laktalbumin ve BAMLET proteini, Ultra Performans Sıvı Kromatografisi (UPLC) ile tanımlanmıştır. Kromatogramda tek pik çıkmış ve literatürde tanımlandığı gibi 280 nm dalga boyunda sonuç elde edilmiştir. Elde edilen BAMLET için en uygun kaplama materyali pektin olarak belirlenmiştir.

BAMLET proteini validasyonu için HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) kullanılmıştır. Bunun için öncelikle doğrusal aralık ve kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Yöntemin doğruluğu ve kesinliği, standart sapma ve bağıl hata değerleri yaklaşık olarak % 4.3'den küçük olduğu verisi ile ispatlanmıştır. Ayrıca geri kazanım değeri BAMLET proteinini süt ve elma suyuna ilave edilerek hesaplanmıştır. Gıda preparatlarından elde edilen geri kazanım değerleri % 98.0 ile % 100.16 arasında olduğu belirlenmiş ve proteinin validasyonu sağlanmıştır.

BAMLET proteininin pektin ile farklı oranlarda (O1-O7; protein:pektin) koaservatı oluşturulmuştur. Koaservasyon veriminin belirlenmesi için analitik yöntemlere

başvurulmuş ve Flaş kromatografide absorbans ölçümleri yapılmıştır. En iyi verim, bulanıklık gözlemlerine paralel olarak O7 w/w Protein:pektin oranı olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyonda partikül büyüklüğü 335,6 nm ve ζ -potansiyeli -25,4 mV olarak ölçülmüştür ve koaservasyon veriminin moleküller arasında elektrostatik etkileşiminden büyük oranda etkilendiği belirlenmiştir. Daha sonra koaservat püskürtülerek kurutulmuş bu sayede kararlılığı artırılmıştır.

Fourier Transform Infrared (Kızılötesi) Spektroskopisi (FTIR) ile BAMLET, pektin ve koaservat (O7 protein:pektin w/w) üzerine yapılan analizde; BAMLET-pektin koaservatının 1653 cm^{-1} ve 1572 cm^{-1} aralığında oluştuğu gözlenmiştir. BAMLET ($-\text{COO}^-$) karboksil grupları ile pektin amin grupları ($-\text{NH}_3^+$) arasındaki elektrostatik etkileşimi bu aralıkta belirlenmiştir. FTIR koaservasyonun oluşum şeklini bağ yapıları ile ifade etmektedir.

Püskürtülerek kurutulmuş BAMLET-pektin koaservatının termal özelliklerinin belirlenmesi için diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) kullanılmıştır. Bu sayede püskürtülerek kurutulmuş koaservatın denatürasyon pik sıcaklığı ve denatürasyon entalpisinin ($T_d=163.57^\circ\text{C}$, $\Delta H_d=261.6\text{ j/g}$), hem BAMLET proteininin denatürasyon pik sıcaklığı ve denatürasyon entalpisinden ($T_d=136.33^\circ\text{C}$, $\Delta H_d=35.95\text{ j/g}$), hem de sıvı formadaki koaservatın denatürasyon pik sıcaklığı ve denatürasyon entalpisinden ($T_d=157.6^\circ\text{C}$, $\Delta H_d=104.3\text{ j/g}$) daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

BAMLET proteini dielektrik sabiti incelendiğinde (10.05 ± 0.05) sıvı koaservatın polaritesinden (78.063 ± 1.3) çok daha düşük olduğu görülmüştür. Solventin polaritesinin bir ölçütü olan dielektrik sabiti, BAMLET proteinin koaservatına göre daha az polariteye sahip olduğunu göstermiştir. Çözeltide daha büyük bir dielektrik sabiti olan solventin daha yüksek bir net yük yoğunluğuna sahip olduğu düşünülmektedir.

PRODUCTION OF BAMLET PROTEIN AND INCREASE STABILITY WITH COACERVATION

SUMMARY

Encapsulation is a relatively new technology, which can be used for protection of food items, stabilization of food and slow release. In addition, encapsulation able to use other disciplines such as medicines and cosmetics widely. There is a lot of work in the areas mentioned. However, the therapeutic effect of protein and peptide-induced significant drug encapsulation of active ingredients is not more about running count. The clinical use of this type of drugs can be affected by production and storage conditions namely invitro conditions determination. Invivo conditions (e.g.: enzymatic hydrolysis) has negative consequences on the therapeutic impact. These stability problems are possible to eliminated with encapsulation method. From the formulation perspective, proteins are encapsulated to provide efficient protection for active protein moiety against a physiological environment and targeting to the site of action allowing optimal therapeutic efficiency. Some proteins are influenced by gastric medium. In order to prevent this instability, we suggest to encapsulate model protein with pectin.

Protein pharmaceuticals are the fastest growing class of new therapeutic agents and are an important research topic in the (bio) pharmaceutical industry. For this purpose, the methods of encapsulation in the field are studied. The therapeutic effect is based on obtaining a low dose of the pharmacotherapeutic effect on the beneficial component. In addition to this, the use of carrier systems provides controlled release of the drug and preservation of the stability of the active substance.

The active ingredients namely protein and peptides which are the most widely used in the pharmaceutical field. Proteins that are very small proportions in the human body may be transported by diffusion or active transport to the site of action. It is desirable that the proteins in the protein structure should be transported to these effect areas in small doses in the appropriate dosage forms. Targeting these drugs brings many difficulties.

Protein and peptide structured proteins are cleaved by enzymes in the gastrointestinal tract. We do not want the α -lactalbumin-oleic acid composition (BAMLET) to break down in the digestive tract, which we want to make the drug active substance. If the half-life is considered to be short, controlled release and increased gastric stability are essential.

HAMLET (Human Alpha Lactalbumin Made LEthal to Tumor cells) protein, which we use because of its anticarcinogenic and therapeutic effect, is the molecular complex of human α -lactalbumin derived from human oil and oleic acid, a naturally occurring unsaturated fatty acid. As in some tumor cells, such as skin, breast and lung cancer, they induce apoptosis through autophagy in cells, but do not damage normally distributed cells. However, the mechanism of action is not fully understood. After proving the presence of the protein's tumoricidal effect, other mammalian

milks were investigated and then the same effect was found in the complexes of the α -lactalbumin derived from all mammalian milk with oleic acid. The protein name varies according to the mammal species obtained. (E.g. BAMLET: Bovine Alpha lactalbumin Made LEthal to Tumor cells).

In this thesis, coacervation with pectin (O7 w / w) is proposed and investigated to increase the gastric stability and to provide controlled release of the proteinaceous BAMLET to be administered orally. Cellulose derivatives are used as coating material because they have a beneficial effect on coacervation. However, there are few studies in the literature about encapsulation of proteins. Apart from that, BAMLET / HAMLET etc. There is no current study of the encapsulation of proteins. For this reason, the coacervates of BAMLET selected as model protein using the coacervation method have been prepared and characterized in our study. Pectin had been used for coacervation and also it had been done with spray drying method. Factors, which are affecting the stability of the protein and the coacervation efficiency, have been investigated.

BAMLET (Bovine Alpha lactalbumin Made LEthal to Tumor cells) is an effective protein with a tumoricidal effect. It has been tried to prevent the adverse conditions in the process of making this protein, which is obtained from mammalian milk and which is composed of α -lactalbumin-oleic acid, to become a drug active substance.

In order to produce BAMLET protein, firstly α -lactalbumin was obtained from the cow's milk. In accordance with the literature, 1.2 grams of α lactalbumin was obtained from 1-liter milk. The association of the protein with oleic acid has been carried out by means of temperature application. α -lactalbumin, hydrolyzed α -lactalbumin and BAMLET protein were identified by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC). A single peak was given in the chromatogram and a result of 280 nm wavelength was obtained as described in the literature. The most suitable coating material for the obtained BAMLET was identified as pectin.

HPLC (high performance liquid chromatography) was used for BAMLET protein validation. For this, firstly linear interval and calibration curve are created. The accuracy and accuracy of the method has been proved by the data that the standard deviation and relative error values are less than approximately 4.3%. In addition, recovery value of BAMLET protein can be calculated by adding milk and apple juice. The recovery values obtained from the food preparations were determined to be between 98.0% and 100.16% and protein validation was achieved.

The BAMLET protein was coacervated with pectin at different ratios (O1-O8, protein: pectin). Analytical methods were used to determine the coherence efficiency and absorbance measurements were performed on the flash chromatograph. The best efficiency was determined as O7 w / w Protein: pectin ratio parallel to turbidity observations. At this concentration, the particle size was measured as 335.6 nm and ζ -potential -25.4 mV and it was determined that the efficiency of coacervation was greatly affected by the electrostatic interaction between the molecules. It was then dried by spraying coacervate and its stability was increased.

Analysis by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) on BAMLET, pectin and coacervate (O7 protein: pectin w / w); BAMLET-pectin coacervate was observed at 1653 cm^{-1} and 1572 cm^{-1} . The FTIR spectrum of BAMLET showed absorption bands related to C=O stretching at 1629 cm^{-1} (free carboxyl groups) and N-H bending at 1536 cm^{-1} (amide II). The absorption band at 1387 cm^{-1} was attributable to the C-N stretching and N-H bending (amide III) vibrations. 1598 cm^{-1} a strong

band associated to the amide III ($-\text{NH}_3^+$ groups). The BAMLET–pectin coacervate displayed a band at 1653 cm^{-1} and 1572 cm^{-1} attributed to $-\text{COO}^-$ and $-\text{NH}_3^+$ Groups stretching vibration. The coacervation between the two biopolymers changed the FTIR in the carbonyl-amide region. The $-\text{NH}_3^+$ groups (band at 1598 cm^{-1}) and asymmetric and $-\text{COO}^-$ stretching vibration at 1629 and 1536 cm^{-1} , disappeared, respectively, indicating the electrostatic interaction between the carboxyl groups of SPI ($-\text{COO}^-$) and amine groups of chitosan ($-\text{NH}_3^+$). Besides, the spectrum of BAMLET–pectin coacervate showed a broad band at around $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$, indicating enhanced hydrogen bonding compared to that of BAMLET and pectin. This implied that hydrogen bonding was also involved in the interaction between BAMLET and pectin.

Differential scanning calorimetry (DSC) was used to determine the thermal properties of the spray-dried BAMLET-pectin coacervate. Thus spray-dried coacervate denaturation peak temperature and denaturation enthalpy ($T_d=163.57^\circ\text{C}$, $\Delta H_d=261.6\text{ j/g}$) and peak temperature denaturation of BAMLET protein and denaturing the enthalpy ($T_d=136.33^\circ\text{C}$, $\Delta H_d=35.95\text{ j/g}$) As well as higher than the denaturation peak temperature and denaturation enthalpy ($T_d = 157.6^\circ\text{C}$, $\Delta H_d = 104.3\text{ j / g}$) of coacervate in liquid form. This shows us that pectin is a good coating material and is more stable against temperature changes. In addition, the BAMLET protein has become more resistant to denaturation at this point. Because denaturation peak temperature and denaturation enthalpy are observed to be extremely low. In a coherent form, the resistance is increased by spray drying.

When the dielectric constant of BAMLET protein was examined (10.05 ± 0.05), it was found to be much lower than that of liquid coacervate (78.063 ± 1.3). The dielectric constant, a measure of the solvent's polarity, has shown that the BAMLET protein has less polarity than coacervate. The solvent, which is a larger dielectric constant in the solution, is thought to have a higher net charge density. The dielectric holder has given us information about the polarity of the coacervate formed. Thus, food and food varieties consumption compliance with this drug and also provided with the idea of the content that will be presented in the form of drugs. It has been observed that BAMLET has a less polar form. In UPLC analyzes, BAMLET proves the accuracy of our dielectric measurement, which may be later than the system, relative to alpha-lactalbumin. Because in the reversed-phase UPLC, the analyte with high polarity will first come out of the column. For this reason, the retention time is longer than that of our long BAMLET protein coacervate. However, the alpha-lactalbumin polarity was found to be low in accordance with the literature.



1. GİRİŞ

Protein farmasötikleri, yeni terapötik ajanların en hızlı büyüyen sınıfıdır ve (biyo) ilaç endüstrisinde önemli araştırma konularındandır (Leurs ve diğ., 2015). Bu amaçla ilgili alanda enkapsülasyon yöntemleri üzerine çalışılmaktadır. Tedavi edici özelliğinden yararlanılan bileşen üzerine düşük dozda farmakoterapötik etki elde etmek esas alınmaktadır. Bu etkiye ek olarak taşıyıcı sistemlerin kullanılması ilacın kontrollü salınımını ve etkin maddenin kararlılığının korunmasını sağlamaktadır (Conference, & Sciences, 2009).

Farmasötik alanda en çok kullanılan etkin maddeler protein ve peptitlerdir. İnsan vücudunda çok az oranlarda sentezlenen proteinler etki bölgesine difüzyon ya da aktif transportla taşınır. Protein yapısındaki ilaçların ise bu etki bölgelerine küçük miktarlarda uygun dozaj şekillerinde taşınıp etki göstermesi istenir. Bu ilaçların hedeflendirilmesi birçok güçlüğü beraberinde getirir (Groves, 2006).

Protein ve peptit yapılı proteinler gastrointestinal sistemde enzimler tarafından parçalanırlar (Groves, 2006). İlaç etkin maddesi haline getirmek istediğimiz α -laktalbumin-oleik asit bileşiminin (BAMLET) sindirim kanalında parçalanması istemediğimiz bir durumdur. Yarılanma ömürlerinin kısa oluşu da düşünülürse kontrollü salınım yapılması ve gastrik kararlılığının artırılması şarttır.

Protein ve peptitler gibi etkin maddeler nakil ve depolama sırasında stabilitelerini kaybederler. Bu gibi faktörler ilaçların kullanımını engellerler. Protein ve peptitlerin fiziksel ve kimyasal kararsızlıkları ise, terapötik etkilerinin kaybına yol açabilir (Groves, 2006). Bu aşamada gıda ve diğer sektörlerde kullanılan enkapsülasyon teknolojisi olumlu sonuçlar çıkarmaktadır.

Antikanserojen ve terapötik etkisi nedeniyle kullandığımız HAMLET (Human Alpha lactalbumin Made Lethal to Tumor cells) proteini, doğal olarak oluşan doymamış bir yağ asidi olan insan yağından ve oleik asidinden türetilmiş, insan α -laktalbuminin moleküler kompleksidir. Cilt, göğüs ve akciğer kanseri gibi bazı tümör hücrelerinde olduğu gibi, hücrelerde otofaji yoluyla apoptozu indükler, ancak normal dağılım

gösteren hücrelere zarar vermez (Jung ve diğ., 2017). Ancak etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Bulunan proteinin tümorisidal etkisi kanıtlandıktan sonra diğer memeli sütleri üzerine araştırmalar yapılmış ve ardından tüm memeli sütlerinden elde edilen α -laktalbuminlerin oleik asit ile oluşturdukları komplekslerde aynı etkiye rastlanmıştır. Protein ismi elde edilen memeli türüne göre değişmektedir. (Örn: BAMLET: Bovine Alpha lactalbumin Made LEthal to Tumor cells) (Wang ve diğ., 2011).

Bu tezde, oral yolla uygulanacak proteinik BAMLET'in gastrik stabilitesini arttırmak ve kontrollü salım sağlamak amacıyla pektin ile koaservasyonu önerilmekte ve incelenmektedir. Selüloz türevleri, koaservasyonda verime olumlu etki sağladıklarından dolayı kaplama materyali olarak kullanılmaktadır. Ancak proteinlerin enkapsülasyon ile kaplanması üzerine literatürde çok az sayıda çalışma vardır. Bunun dışında BAMLET/HAMLET vb. proteinlerinin enkapsülasyonla muamele edilmesiyle ilgili mevcut bir çalışma yoktur. Bu nedenle, pektin ile koaservasyon yöntemi kullanılarak model protein olarak seçilen BAMLET'in koaservatları çalışmamızda hazırlanmış ve karakterize edilmiştir.

1.1 Proteinler

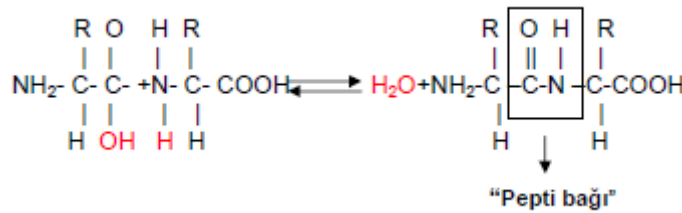
Proteinler yapı taşları olan amino asitlerin bir araya gelmesi ile oluşan büyük moleküllü bileşiklerdir. 22 amino asidin farklı kombinasyonları ile doğada milyarlarca değişik protein sentezlenmektedir. Proteinler temelde % 50-55 karbon, % 6-7 hidrojen, % 20-23 oksijen, % 12-19 azot ve %0.2-3.0 kükürt içeren ve yalnızca ribozomlarda sentezlenen bileşiklerdir. Bazı proteinlerde bunlardan başka P, Fe, Zn, Cu gibi elementler de bulunabilmektedir. Farklı proteinler, farklı sayı ve çeşitte aminoasit içerirler. Yapıyı oluşturan aminoasitler birbirlerine peptit bağlarıyla bağlandıklarından polipeptit yapısına sahiptir. Proteinler bir tek polipeptitten meydana geldikleri gibi birkaç polipeptidin bir araya gelmesiyle de oluşabilir. Her bir polipeptit zinciri ya da genel olarak protein, belli bir aminoasit sayısına, dizilenmesine, belirli bir molekül ağırlığına, kimyasal içeriğe ve üç boyutlu bir yapıya sahiptir. Bazı proteinler aminoasitlerin yanı sıra karbonhidrat, lipid, mineral madde ve renk maddeleri (pigmentler) gibi diğer yapıtaşlarını da içerir (Champe ve diğ., 2004; Devlin, 2005).

1.1.1 Proteinlerin yapısal özellikleri

Bir aminoasidin karboksil grubu (-COOH) başka bir aminoasidin amino grubuyla (-NH₂) bir mol su açığa çıkararak birleşir ve peptit zinciri oluşturur (Şekil 1.1). Peptitler peptit zincirinde yer alan aminoasit sayısına göre mono, di, tri gibi ön ekler verilerek isimlendirilirler. Genel bir kural olarak yapısında 10 kadar aminoasit içeren peptit zincirleri oligopeptit, daha uzun zincirli peptitler ise polipeptit olarak adlandırılır. Her proteinin karakteristik üç boyutlu doğal bir yapısı vardır. Üç boyutlu yapısı bozulmuş (denatüre olmuş) bir protein biyolojik etkinliğini de kaybeder. Proteinlerin karakteristik üç boyutlu yapılarını oluşumundan primer, sekonder, tersiyer ve kuarternler olarak adlandırılan yapılar sorumludur (Şekil 1.6). Primer yapı her proteinde yer almakta, buna karşılık bazı proteinler sekonder yapıda bazıları ise tersiyer veya kuarternler yapıda kendilerine özgü üç boyutlu yapılarına kavuşmaktadır (Groves, 2006).

Proteinlerin yapılarında ki bağlar ise kovalent bağlar ve kovalent olmayan bağlardır. Proteinlerin yapılarındaki kovalent bağlar, peptit bağları ve disülfid bağlarıdır; kovalent olmayan bağlar ise hidrojen bağları, iyon bağları ve hidrofob bağlar (apolar bağlar)'dır.

1) Peptit bağları: Peptit bağı bir aminoasidin karboksil grubu ile ikinci bir aminoasidin amino grubu arasından bir H₂O molekülünün açığa çıkması sonunda meydana gelir.



Şekil 1.1 : Peptit Bağı (Groves, M. J.).

2) Disülfid bağları: İki sistein kalıntısı arasında, sülfhidril (tiyol, -SH) gruplarının H kaybetmeleri sonucu oluşan S-S bağlarıdır. Disülfid bağlarının bir protein molekülünün şeklinin oluşmasında ve korunmasında önemli etkisi vardır.

3) Hidrojen bağları: Polipeptit zinciri oluşturan peptit özelliklerinden kaynaklanan durumundan dolayı, oksijenlerin negatif, azotların ise pozitif özellik taşımasının

sonucu olarak, bir polipeptit zincirindeki bir peptit düzleminde bulunan oksijen atomu ile bir başka peptit bağı veya düzlemindeki azot atomu arasında, oluşan bağlardır:

4) İyonik bağlar: Polipeptit zincirlerindeki asidik ve bazik amino asit kalıntılarının fonksiyonel gruplarının fizyolojik pH'da tamamen veya kısmen iyonlaşmış halde bulunmalarının sonucu olarak, elektronegatif ve elektropozitif gruplar arasında gelişen elektrostatik çekim kuvveti ile ($\text{COO}^- \cdots \cdots \text{H}_3\text{N}^+$) oluşan bağlardır.

5) Apolar bağlar (hidrofobik bağlar): Polipeptit zincirindeki amino asit kalıntılarının apolar kısımlarının birbirlerine yeter derecede yakın olmaları halinde geçici bir polarite göstermelerinin sonucu ortaya çıkan ve Van der Waals-London çekme kuvveti diye bilinen zayıf çekme kuvveti ile oluşan bağlardır. Hidrofobik etkileşimler, proteinlerin iç kısımlarının kararlı olarak devamlılığının sağlanmasında rol oynar (Pehlivan, 1997).

Proteinlerin meydana geldiği yapıları inceleyecek olursak bunlardan ilk primer (birincil) yapıdır. Bir protein molekülünü oluşturan polipeptit zinciri veya zincirlerindeki aminoasit sıralanışı proteinlerin primer yapısını oluşturur. Aminoasitler peptit bağlarıyla birleşerek polipeptitleri oluşturur. Primer yapı proteinlerin üç boyutlu yapısına bir geçiş teşkil eder ve fonksiyonel değildir (Şekil 1.2).

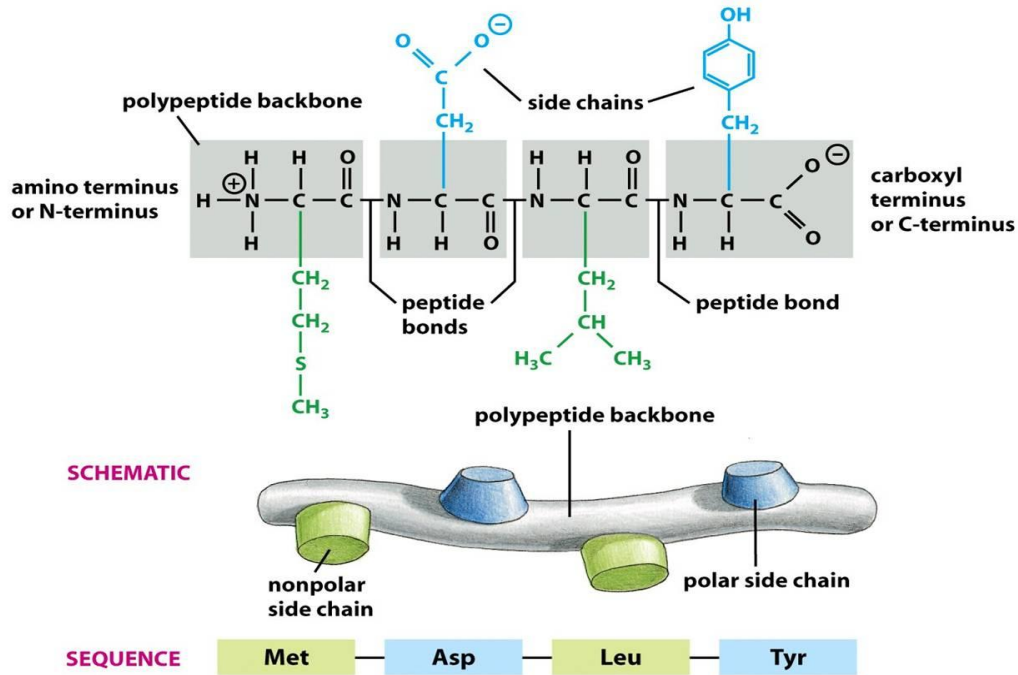
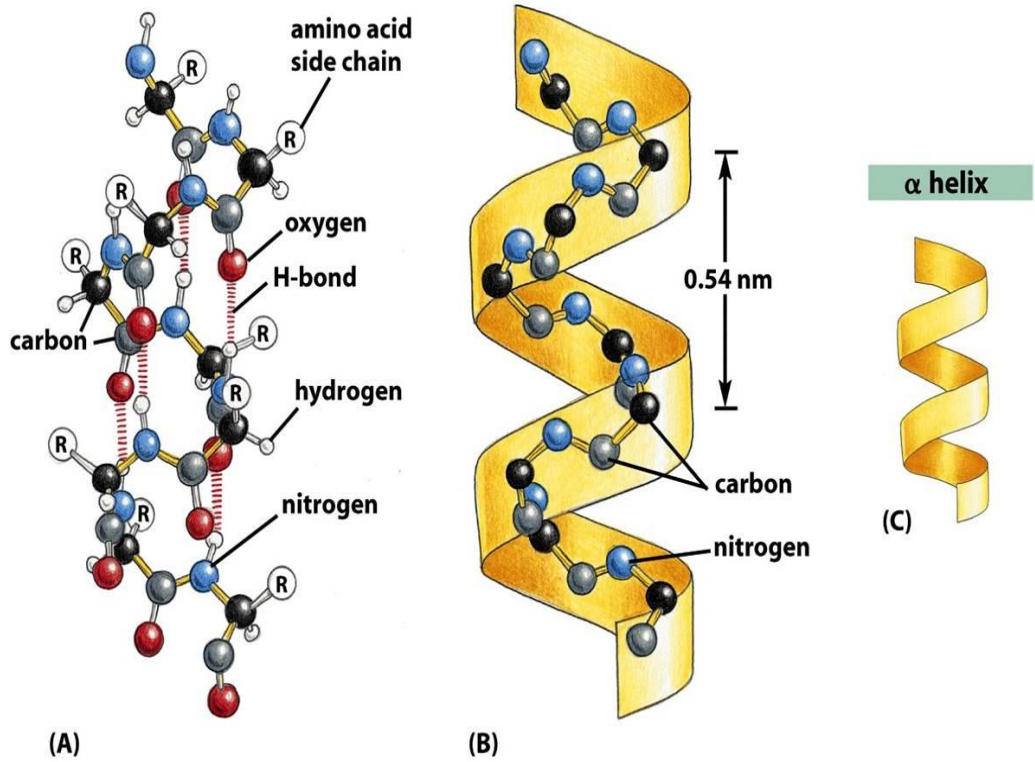


Figure 3-1 part 2 of 2 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Şekil 1.2 : Proteinlerde primer yapısı (Groves, 2006).

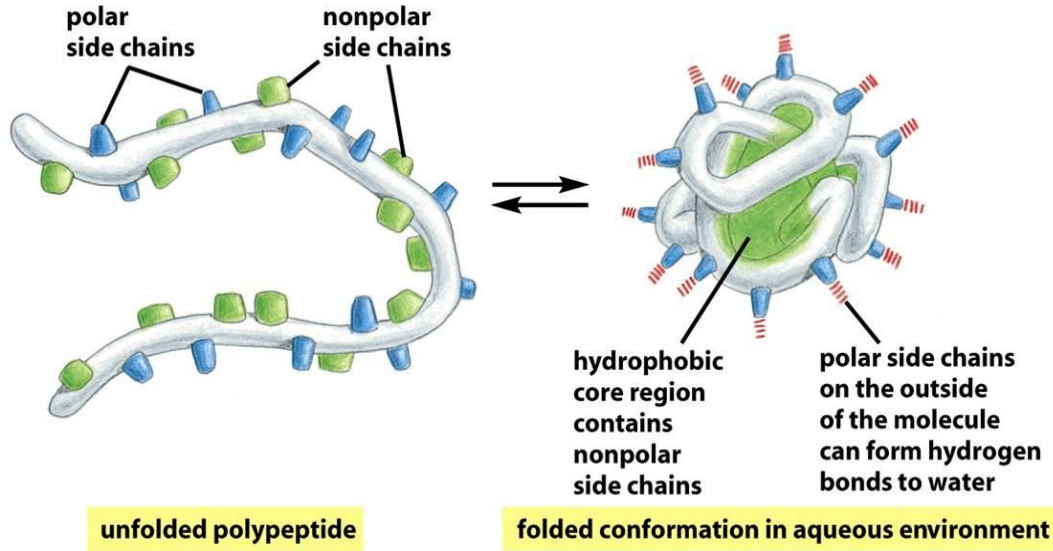
Bir üst konfigürasyona geçildiğinde sekonder (ikincil) yapıya ulaşılır. Peptit zinciri üzerinde belirli bölgeler yan zincirlerle ve/veya kendi üzerine katlanarak bağlar oluşturur. Polipeptit zincirindeki bu katlanmalar periyodik olarak tüm zincir boyunca yinelenir. İki elektronegatif atom arasındaki hidrojen bağı polipeptit zincirinde heliksel yapı oluşmasına neden olur. Sekonder proteinler heliksel yapıda ya da plakalı yapıda olabilir. Bu yapıları kararlılık kazandıran aynı polipeptit zinciri üzerinde kurulan H köprüleridir ve en stabil yapı göstereni α -heliks proteinlerdir. α -heliks proteinlerin çoğunda heliksin bir yüzü hidrofobik (su sevmeyen) iken diğer yüzü ve yan zincirler hidrofilik (su seven) kalıntılarla bağlanmıştır. Plakalı protein yapısı heliksel yapıdan farklı olarak pili benzeri yapı oluşturacak şekilde katlanmalar gösterir. Plakalı yapılarda hidrojen köprüleri farklı polipeptit zincirleri arasında kurulur (Şekil 1.3) ve α -heliks kıvrılmasının ilk aşamasında zincir bükülmeye başlar ve COOH yani karbonil grubu ile NH' yani amino grubu arasında hidrojen bağı oluşmaya başlar (Devlin, 2005). Bu bağ, fiziksel olarak kuvvetli bir bağ değildir ve dışarıdan verilen ısı veya fiziksel bir hareket ile koparılabilir. Kopmanın etkisiyle zincir yine eski düz halini almaya başlar (Champe ve diğ, 2004).



Şekil 1.3 : α - heliks kıvrılmasının şematik gösterimi (Devlin, 2005).

İki paralel polipeptit zinciri sekonder yapı oluşturduğunda zincirlerin birbirine yaklaştığı yerlerde kükürtlü aminoasitlerin aracılığıyla disülfid bağları oluşur. Kovalent yapıdaki bu bağlar son derece karardır. Bu nedenle yapıya karardılık kazandırır ve sekonder yapı denatürasyon koşullarında parçalanmaz.

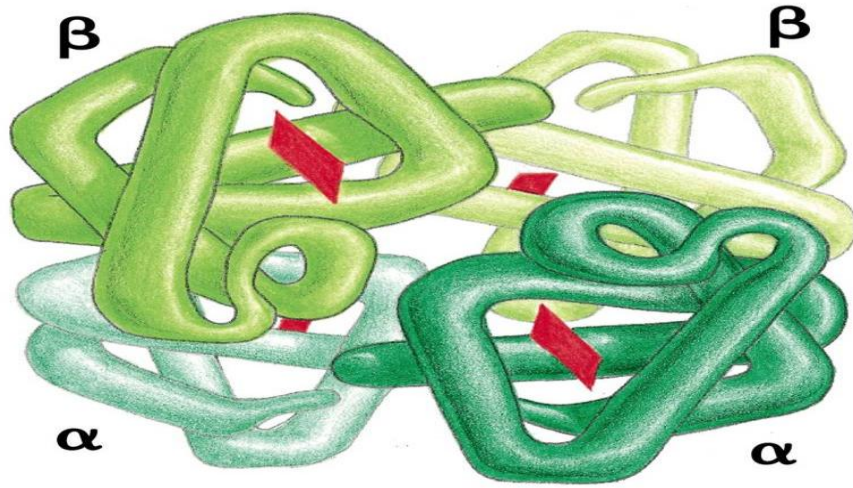
Protein molekülünün yuvarlak veya elipsoid bir şekil alabilmesi için ikinci yapıyı meydana getiren dizilişlerin üst üste katlanması veya yumak şeklinde sarılması gerekmektedir. Bu yapı tersiyer (üçüncül) yapı olarak adlandırılır. Yan zincirlerin reaksiyona girmesi ile mümkün olur. Helezon yapısı veya düz tabaka yapısı dışında kalan zincirlere ait gruplar veya atomların meydana getirdikleri çeşitli bağlar ve güçler protein molekülünün içerisinde pek az boşluk bırakan sıkı ve belirli bir şekil almasını sağlar (Şekil 1.4) ve tersiyer yapıyı oluşturur.



Şekil 1.4 : Proteinlerde tersiyer yapı (Devlin, 2005).

Tersiyer yapı genellikle globüler proteinlerde görülür ve bu proteinler tersiyer yapılarıyla üç boyutlu şekillerine kavuşurlar. Bu yapıda doğrusal yapının katlanması yolu ile katlı üçüncül yapıya ulaşarak yüzeyler arası mesafe kısalmaktadır.

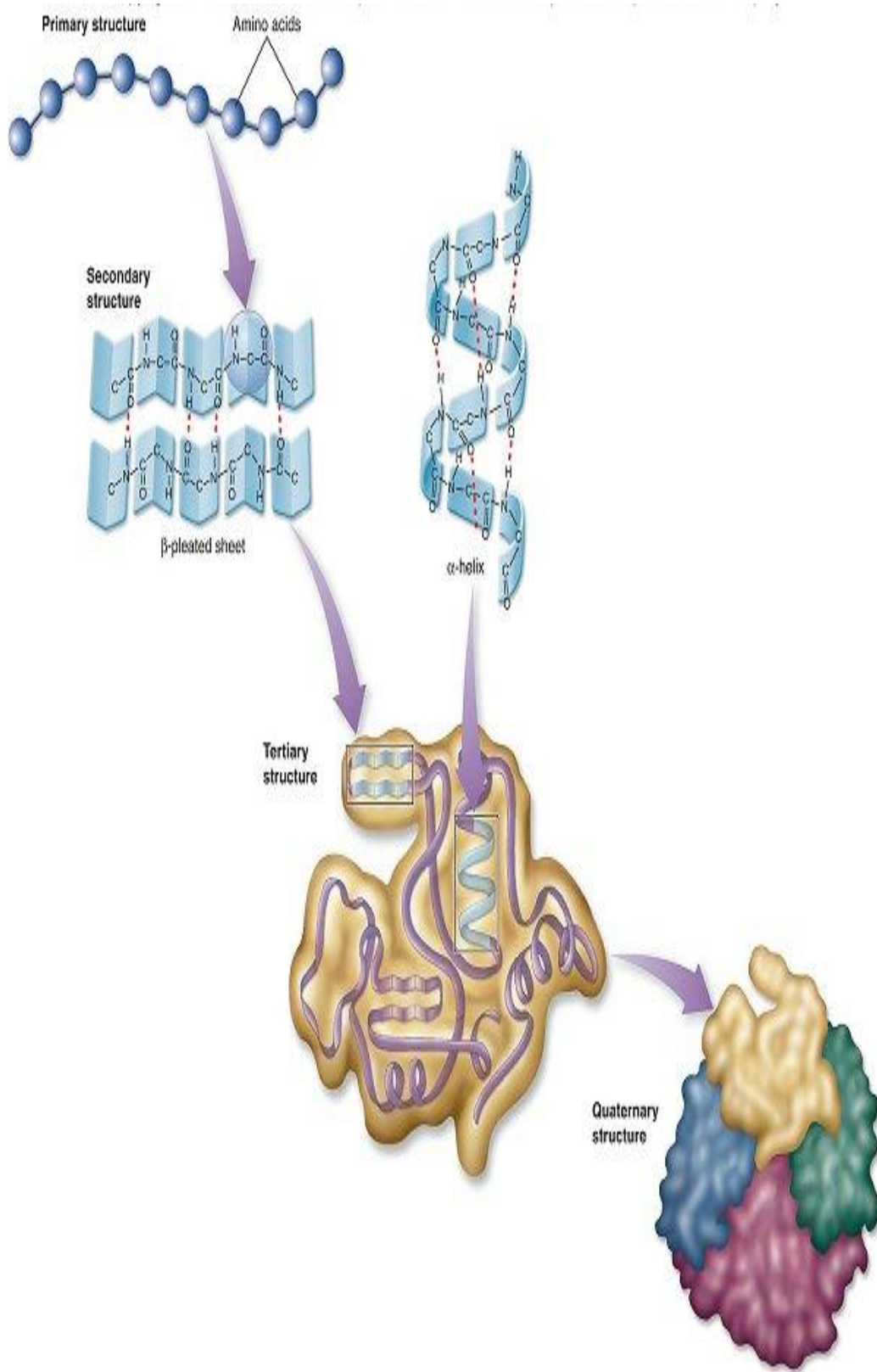
Birden fazla polipeptit zinciri (alt birimi) içeren proteinlerde polipeptit zincirleri tersiyer yapıyı oluşturan aynı bağ tipleriyle birbirleriyle salkımlar, topluluklar yaparak birleşir ve kuartern (dördüncül) yapıyı oluşturur. Hemoglobinin yapısında her biri miyoglobine benzer dört protein monomeri (alt birimi) birbirine kuartern yapıyı oluşturmak üzere çok sıkı bir şekilde bağlanmışlardır (Şekil.1.5).



Şekil 1.5 : Proteinlerde kuarterner yapı (Devlin, 2005).

1.1.2 Proteinlerin sınıflandırılması

Proteinler; fiziksel yapıları, boyutları ve tiplerine göre sınıflandırılabilir (Champe ve diğ., 2005; Devlin, 2005). **Fiziksel yapılarına** göre fibröz proteinler ve globüler proteinler olarak ikiye ayrılırlar. Bunlardan **fibröz proteinler** özellikle deri, tendon (kasları kemiğe bağlayan sert doku) ve kemik dokularda bulunur (Devlin, 2005). Fibröz protein suda çözünmemekle birlikte, fiziksel olarak oldukça dayanıklı bir yapıya sahiptir (Devlin, 2005). **Globüler proteinler** ise fibröz proteinin aksine, suda çözünebilirler ve fiziksel olarak dayanıklı değildirler (Champe ve diğ., 2005; Devlin, 2005). Globüler proteinler çoğunlukla, "enzim" yapısındadırlar. Enzimler ise, hücre içerisindeki sitoplazmada kimyasal reaksiyonları katalizlerler (Champe ve diğ., 2005).



Şekil 1.6 : Proteinlerin yapısı (Champe ve diğ., 2005).

Proteinlerin **tiplerine göre** ayrımı yapılırken; enzimler, reseptör proteinleri, glikoproteinler, lipoproteinler, plazma proteinleri (albuminler, globulinler) gibi farklı işlevsel yapıya sahip tiplerini mevcut olduğu görülür (Champe ve diğ., 2005; Devlin, 2005). Ayrıca; insülin, glukagon, kollajen, hemoglobin gibi spesifik görevleri olan proteinlerde vardır (Champe ve diğ., 2005; Devlin, 2005).

1.1.3 Protein molekülüne ait özellikler

Etkin proteinlerin vücuttaki kararlılığını etkileyen bazı özellikleri vardır. Bu özellikler onların neden enkapsüle edilmesi gerektiğini açıklar niteliktedir.

1.1.3.1 Molekül yapısı ve şekli

Proteinlerin molekül ağırlığı birkaç bin ile birkaç milyon Dalton arasında değişir. Çoğu globüler şekilde olmakla birlikte, fibröz yapıda olanları da vardır. Proteinlerin büyük molekül ağırlığında olması, barsak gibi biyolojik membranlardan geçişini de olumsuz yönde etkiler (Champe ve diğ., 2005; Devlin, 2005; Groves, 2006). Yine, aynı nedenle, bukkal, nazal, rektal ve vajinal yolla uygulama da zorluklarla karşılaşılır. Bu sorunu çözmek için, çoğu zaman penetrasyon artırıcıların kullanılması önerilir (Groves, 2006)..

1.1.3.2 Yarı ömrü

Çoğu protein molekülünün in vivo yarı ömrü, birkaç saniye ya da dakika gibi kısa bir süredir (Podust ve diğ 2016). Bu, kısmen, protein molekülünün karaciğer, böbrekler, vasküler endotel ve diğer dokulardaki degradasyonundan kaynaklanır. Protein moleküllerinin kısa yarı ömre sahip olması, bu etkin maddeleri kontrollü salım sistemleri ile formüle etme açısından uygun aday haline getirmektedir (Erdoğan, 2008). Sadece, ilaç uygulama bölgesinde protein molekülünü enzimatik degradasyondan korumak, plazma protein konsantrasyonunu maksimum düzeye çıkartmaya yetmeyebilir. Uzun süren ve sabit plazma düzeylerinde bir terapötik etki elde etmek için en iyi çözüm bu molekülleri içeren kontrollü salım sistemlerinin hazırlanmasıdır (Groves, 2006; Erdoğan, 2008). Kontrollü salım yapan dozaj şekilleri iki amaç taşır: yavaş ilaç salımı sağlamak ve ilaç etkin maddesini hem in vitro hem de in vivo koşullarda degradasyon ve denatürasyondan korumak (Erdoğan, 2008).

1.1.3.3 Stabilite

Protein molekülünün değişen koşullarda işlevini yerine getirebilmesi onun termodinamik kararlılığının bir ölçütü olarak kabul edilmektedir. Bu değişen koşulda artan sıcaklıkla birlikte geri dönüşümlü olarak açılan ve yüksek sıcaklıkta inaktif olan molekül, oda sıcaklığına soğutulduğunda tekrar katlanır ve aktivitesini tekrar kazanır. Bu da termostabil olduğunun göstergesidir. Protein molekülünün organik çözücüler ve sıcaklık gibi stres koşullarına dayanıklılığı, açılır ve tekrar kapanır olması termodinamik stabilitesi ile ilişkilidir (Erdoğan, 2008).

Protein stabilitesini etkileyen faktörler; hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları, konformasyonel entropi, tuz köprüleri, aromatik yapılar arasındaki etkileşimler, metal bağları ve disülfid bağları olarak sıralanmıştır.

Hidrofobik etkileşimler

Hidrofobik etki, globüler proteinlerin katlanmasında tetikleyici rol oynar. Hidrofobik kısımların molekülün iç kısmında kalmasını sağlar (Erdoğan, 2008).

Hidrojen bağları

Polipeptit zinciri oluşturan peptit bağlarındaki rezonans veya mezomeri durumundan dolayı, oksijenlerin bilinen keto gruplarından daha negatif olması, azotların ise pozitif özellik taşımasının sonucu olarak, bir polipeptit zincirdeki peptit düzleminde bulunan 3 oksijen atomu ile bir başka peptit bağı veya düzlemindeki azot atomu arasında, aradaki uzaklık yaklaşık $2,7 \text{ \AA}$ olduğunda, hidrojen köprüsü şeklinde ($\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}\cdots\text{N}$) oluşan bağlardır (Url-1).

Protein molekülü katlandığında, protein-su hidrojen bağları kırılır ve sadece bir kısmı intra-protein hidrojen bağları ile yer değiştirir. Bu, protein sistemindeki birçok hidrojen bağı nedeniyle, serbest enerjinin, izole edilmiş sistem içindeki değerinde büyük bir azalmaya neden olur. İndirgeme, suyun çeşitli hidrofobik etkilerinden kaynaklanır, entropik katkılar içerir, bunlar büyük oranda entalpi etkisini etkisizleştirir. Kuşkusuz proteinler için gözlemlenen katlanmayı ve açılmayı kolaylaştırmak için serbest enerjinin bu derece düşürülmesi gerekir (Sheu ve diğ., 2008).

Proteinlerde sadece amino gruplarının %1.3'ü ile karbonil gruplarının %1.8'i hidrojen bağı oluşturmazken, karbonil zincirinin %80'i ikinci bir hidrojen bağı oluşturmaya başaramaz. Dolayısıyla, entalpi tek başına ele alındığında, katlanmış protein yapısının destabilizasyonuna neden olmaktadır. Globüler proteinlerde, amid ve karbonil gruplarının H bağlarının büyük bir kısmı, α -heliks ve β -tabaka yapılarının oluşumu ile gerçekleşir. Bunlar da yapının %80- 90'nını oluşturur (Erdoğan, 2008).

Ortamın entropisi yoluyla hidrojen bağının çevresel kontrolünün büyük önem taşıdığı ve protein dinamiklerini kontrol etmek için önemli bir özellik olduğu sonucuna varılabilir. Bu nedenle, entropi hidrojen bağı aktivitesinin en önemli dinamik belirleyicisidir ve bu nedenle ortam tüm protein dinamiklerini modüle eder (Sheu ve diğ., 2008).

Konformasyonel entropi

Termodinamik kararlılık, canlı biyopolimerlerin mikro ortamlarına uyumunu kavrayarak ifade edilebilir. Makromoleküler radikal grupların yani proteine bağlanan ve onu karmaşık hale getiren eklentilerin; proteinlerin termodinamik istikrarını arttırdığı kabul görmüştür (Shahid ve diğ., 2017). Protein katlanması ve protein-protein ve protein-ligand komplekslerinin oluşumu, protein omurgasına ve yan zincirlere konformasyonel entropi ile kendini gösteren konformasyon değişikliklerini içerir. Konformasyonel entropide bir azalma, protein katlanması için büyük bir dengesizlik sağlayan termodinamik kuvvet olarak işlev görür. Konformasyonel entropi aynı zamanda protein-ligand bağlayıcı termodinamiğin önemli bileşenlerinden biridir (Chong & Ham, 2015). Protein macromolekülerinin kalabalığından etkilenilmesi nedeniyle hacim değişimine neden olan herhangi bir reaksiyonu tetiklemesi beklenir. Makromoleküllerin konfigürasyonel entropisi, birbirlerinin hacmi hariç tutularak azalır. Bu, bir çözeltinin serbest enerjisini artırır ve aynı zamanda çözeltide bulunan çözünen parçacıkların seyreltilmiş veya konsantre formlarının her birinin kimyasal potansiyelinde artışa neden olur (Shahid ve diğ., 2017).

Tuz köprüleri

Tuz köprüleri, doğal protein yapılarındaki karşıt yüklü kalıntıların uzamsal olarak kendilerine yakın çiftleri tarafından oluşturulur. Tuz köprüsü oluşturan kalıntılar genellikle, protein sıralamasında da yakındırlar ve aynı ikincil yapıya dahil olurlar. Tuz köprülerinin protein stabilitesine olumlu katkıda bulunması beklenirken, yeni deneysel bulgular, tuz köprülerinin stabilize edici ya da bozucu olabileceğini göstermektedir. Sistematik protein esnekliği, küçük ölçekli yan zincir ve arka kemik atom hareketleri, tuz köprüleri ve kararlılıkları proteinlerde dalgalanmalara neden olmaktadır (Kumar & Nussinov, 2002).

Aromatik yapılar arasındaki etkileşimler

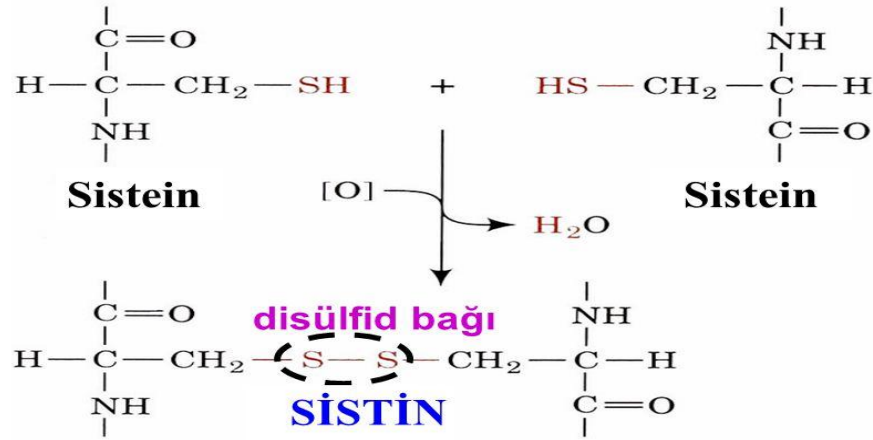
Proteinlerde bulunan aromatik yan zincirlerin yaklaşık %60'ı (fenil, tirozin, ve triptofan), aromatik çift yapı taşır (Erdoğan, 2008). Farklı proteinlerdeki enerji değerleri ölçülürken mutant çift-döngüler kullanılmış; α -heliks i ve $i + 4$ tortuları arasındaki elektrostatik etkileşimin protein kararlılığına ≤ 0.5 kcal mol⁻¹ civarında katkı sağladığı görülmüştür. Buna karşılık, aynı aralıkta ve -heliks i ve $i + 4$ tortuları arasındaki aromatik-aromatik etkileşimin protein kararlılığına etkisi 1 kcal mol⁻¹ olarak belirlenmiştir (Horovitz, t.y.). Aromatik yapılar arasında ki etkileşimin protein kararlılığına etkisi ve bu etkinin büyüklüğü açıkça görülmektedir.

Disülfid bağları

Proteindeki disülfür bağı, iki sistein kalıntısının, tiol gruplarının kükürt atomları (-SH) arasındaki kovalent bağıdır. Disülfid (aynı zamanda bir SS-bağ, disülfür köprüsü veya çapraz bağlama olarak da adlandırılır), iki tiolün oksidasyonu üzerine oluşur ve böylece iki sistein ve bunların ana peptit zincirlerini kovalent disülfid bağı ile birbirine bağlar. Tersine, bir disülfür bağı indirgeyici bir reaksiyon ile bozulabilir.

Disülfid bağlarının proteinlerin kararlılığına katkısı, bir veya daha fazla yerli disülfür bağının elimine edilmesi ve protein kararlılığında ki değişimin ölçülmesiyle belirlenmiştir. Ribonükleaz T1'deki iki doğal disülfür bağı metodik olarak parçalandıkça, diğer deneylerde bildirilen 2.3-5.2 kcal / mol aralığına uygun olarak, her çapraz bağlantının proteinin termodinamik kararlılığına 3.5 kcal / mol katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Dahası, her bir disülfid köprüsü ile ilişkili kararlılıktaki artışın, açılmış durumdaki konformasyonel entropinin kaybolmasından kaynaklandığı belirlenmiştir (Dombkowski, 2014).

Disülfid Bağ Oluşumu



Şekil 1.7 : Disülfid bağ oluşumu (Köse, 2006).

1.1.4 Süt proteinlerinin fonksiyonelliği

Süt içeriğinde protein, yağ, karbonhidrat, enzimler, vitaminler, mineraller ve antikorlar gibi diğer biyoaktif bileşenleri bulunduran tek besin maddesidir. Tüm bileşenler sütün içeriğinde dengeli ve yeterli bir şekilde bulunur. Ayrıca süt canlıların büyümesi ve gelişimi için tüm faktörleri içinde barındıran fonksiyonel bir besindir. (Özcan & Delikanlı, 2011). Süt proteinlerinin fonksiyonel özellikleri beslenme dışında yapı, görünüş, tekstür ve viskozite gibi karakteristik özellikleri ile de tanımlanmaktadır (Singh, 2002). Yüksek besin değerine sahip peynir altı suyu proteinlerinin gıdaların tekstürel özelliklerinin geliştirilmesinde; kıvam arttırma, jel oluşumunu güçlendirme, emülsiyon oluşturma, çözünürlük, köpük ve lif oluşturma, su tutma ve serum ayrılmasını engelleme gibi fonksiyonel özellikleri bulunmaktadır. Bunlardan jel oluşturma en önemli fonksiyonel özelliktir. Isıl işlem sonrası tuz eklenmesiyle jel yapı oluşur. Serum proteinlerinin diğer fonksiyonel özelliklerinden biri olan köpürme özellikleriyle hava içeren ürünlerin dayanıklılığını sağlar (Özcan & Delikanlı, 2011, Özen & Kılıç, 2007).

Proteinlerin taşıdığı bazı fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özellikler onların fonksiyonel özelliklerini ortaya çıkarır. Bunlar sırasıyla proteinlerin boyutları, şekilleri, aminoasit kompozisyonu ve dizilimi, yük dağılımı, hidrofobite/hidrofilite oranı, sekonder, tersiyer ve kuartern yapıları, moleküllerin esneklik/sertlik durumu ve diğer moleküllerle interaksiyon yeteneğinden oluşmaktadır. Gıdaların işlenmesi

sırasında farklı teknolojik işlemlerin uygulanması proteinlerin yapı ve fonksiyonel özelliklerini değiştirebilir. Örneğin; denatürasyon, proteinlerin esnekliğini ve hidrofobik etkileşimlerini artırır, pastörizasyon ise protein globüllerinin çözünmesine neden olmaktadır (Özcan & Delikanlı, 2011).

Süt ve süt ürünleri beslenme değeri açısından değerli komponentler ve biyolojik aktif maddeler içermektedir. Bunların başlıcalarını; biyoaktif peptitler, B6 (pidoksin) ve B12 (siyanokobalamin) vitaminleri, kalsiyum, konjuge linoleik asit (CLA) ve folik asit oluşturmaktadır. Enzimatik aktivite sonucu açığa çıktığında spesifik özellikleriyle önemli fizyolojik rollere sahip olan aminoasit zincirleri “fonksiyonel peptitler” olarak tanımlanmaktadır. Bu peptitler yapısal protein içinde inaktiftirler. Temel peynir altı suyu proteinleri olarak bilinen α -laktalbumin ve β -laktoglobulin’inde biyoaktif aminoasit zincirleri içermektedir (Kınık & Gürsoy, 2002).

Peynir altı suyunda bulunan serum proteinleri süt proteinlerinin yaklaşık olarak %20’sini oluşturmaktadır. En önemli serum proteinleri β -laktoglobulin, α -laktalbumin, serum albumini ve immunoglobulinlerdir. β -Laktoglobulin inek sütünde bulunur ve serum proteinlerinin yarısını oluşturur. α -Laktalbumin ise insan ve inek sütünde bulunmaktadır. Serum proteinleri kimozen enzime direnç gösterirler. Ayrıca kazeinden farklı olarak asit ile çökmezler. Bu nedenle bu proteinler süt’e asit ve rennet ile muamele edilmesi ile edilen serumda çözünür halde bulunmaktadır. Bu proteinler metal bağlı kümeler (α -laktalbumin-kalsiyum) veya disüfit bağları (α -laktalbumin, β -laktoglobulin) içermekte ve bunlar protein yapısının dayanıklılığını artırmaktadır. (Özen & Kılıç, 2007).

1.1.5 Süt proteini α -laktalbumin

Alfa Laktalbuminin özelliklerini aşağıdaki gibi sıralayabiliriz:

- 1) α -Laktalbumin (α -LA), laktoz sentaz kompleksinin bir bileşeni olan ve meme bezinde laktozun biyosentezinde rol oynayan, asidik kalsiyum bağlayıcı proteindir (14.2 kDa, 123 artık, 4 disüfid köprüsü içerir).
- 2) α -Laktalbumin laktoz sentezinin bir bileşeni olarak laktoz biyosentezinin düzenlenmesinde rol oynayan küçük asidik bir Ca^{2+} bağlayıcı proteindir (Jr ve diğ., 2006),

- 3) α -LA, sütteki toplam laktalbuminlerin yaklaşık %20-25'ini oluşturur. Lisin, lösin, sistin ve aspartik asit açısından zengindir. Diyaliz, pH 4.0' de yapıldığında α -laktalbumin kristalleri meydana gelir. Bu protein, sulandırılmış tuz çözeltilerinde, β -laktoglobulin' e oranla daha az çözünür.
- 4) Elzem ve dallanmış amino asit kaynağı olduğu için insan beslenmesinde önemlidir.
- 5) α -LA'ce zenginleştirilmiş sığır süt proteini fraksiyonları bebek mamalarına ve klinik protein takviyelerine eklenir.
- 6) Peynir yapımında α -LA'nın çoğunluğu peynir yapılırken suyuna geçer ve peynir altı suyu stabilize edici ajan olarak birçok gıda ürününe eklenir bu nedenle süt ürünlerinde ve diğer birçok gıda kategorisinde α -LA bulunur (Dombkowski, 2014).

1.1.6 BAMLET ve HAMLET proteini

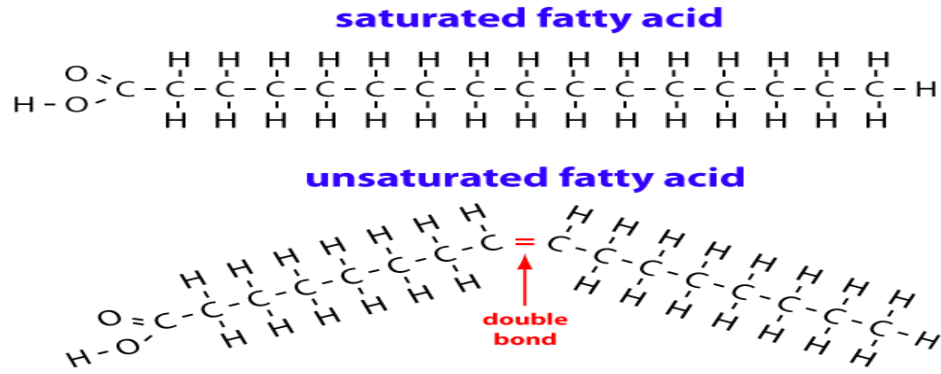
HAMLET (insan α -laktalbumini kanser hücreleri için öldürücü etkiye sahiptir.), insan α -laktalbumin'i ve oleik asit bileşiminden oluşan bir komplekstir (Svensson ve diğ., 2000). HAMLET, kelime olarak "İnsan α -laktalbumini tümör hücreleri için öldürücüdür." cümlesinin baş harflerinden oluşur (Human Alpha lactalbumin Made Lethal to Tumor cells). 90'lı yıllarda Svanborg ve grubu, bir süt proteini olan, 14-kDa ağırlığındaki α -laktalbuminin değiştirilmiş bir formu ile apoptozun indüklendiğini keşfetti. Bu proteinde yapılan değişiklik ise, oleik asidin bir kofaktör olarak α -laktalbumine bağlanmasıdır. Lipit kofaktörünün iki önemli özelliği bulunmaktadır, bunlardan ilki α -laktalbuminin değiştirilmiş kıvrımlı yapısını sabitleyici etkisi iken ikincisi tümör hücresi ölümünde belirli basamakların bir koaktivatörü olmasıdır. Geliştirilmiş konformasyonun, HAMLET'in sahip olduğu "tümörisidal olarak aktif" etkisinin oluşturulması için gerekli olduğu belirtilmiştir (Boekema, 2015). Bu kompleks tümör hücreleri üzerinde apoptoz benzeri (daha sonra apoptoz olarak adlandıracağız) hücre ölüm mekanizmasına yol açarken, sağlıklı hücreler bu etkiye karşı dayanıklıdır (Hakansson ve diğ., 1995; Svensson ve diğ. 2000; Svanborg ve diğ., 2003) ve anti-tümör aktivitesi, 40'tan fazla farklı lenfoma ve kanser hücre dizisini üzerinde etkilidir. Cilt siğilinin giderilmesi, fareler üzerinde yapılan çalışmada merkezi sinir sistemi tümörünün ilerlemesinin engellenmesi (Fast, 2005).

Bu, protein-oleik asit kompleksi seçici olarak geniş bir tümör hücre dizisi aralığını öldürür ve farmakolojik potansiyeli klinik çalışmalarda başarılı bir şekilde ispatlanmıştır. HAMLET proteini katlanma perspektifinden incelendiğinde yapısının oldukça ilginç olduğu gözlenmiştir. Hem sığır hem de insan sütünden elde edilen çeşitleri için ayrıntılı olarak karakterize edilmiştir. Konfigürasyonlarındaki etkinlikleri için gerekli olan oleik asit (kofaktörler'e benzetilmektedirler) tarafından kilitlenmiş gibi görünen α -La, orta kısmından katlanan erimiş küre benzeri bir yapıdır (Baumann ve diğ., 2012). HAMLET hızlı bir şekilde duyarlı hedefleri öldürdüğü için hücrede çok çeşitli etkiler görülür. Tümör hücresi yüzeyine bağlanır, içeri girer (Fast, 2005) ve histonlar, mitokondri, lizozomlar ve proteazomlar ile etkileşime girmesi için çekirdekte birikir (Boekema, 2015; Baumann ve diğ., 2012; Fast, 2005). Bu keşfe rağmen, başlangıçtaki HAMLET-hücre etkileşiminin ayrıntıları ile ilk ve sonraki aşamalarda fenotipin direnç göstermedeki hassasiyetinin nasıl farklılıklar gösterdiği dahil olmak üzere, HAMLET'in etki mekanizması ile ilgili sorular cevaplanmamıştır. Protein ve oleik asit bileşenlerinin hücre ölümüne neden olan bireysel rolü de belirsizdir. HAMLET'in, fizyolojik koşullar altında hücre kalıntıları ve tüm hücreleri birbirine bağlama ve aynı anda bozma gibi ilginç bir özelliği vardır. Buna karşın, α -La, zayıf olarak tümör hücrelerine bağlanır ve dış zar veya hücre yaşayabilirliği üzerinde çok az etki yaratır (Baumann ve diğ., 2012).

Sınırlı proteoliz ile elde edilen sığır α -LA parçaları oleik asidi bağlayabilir ve anti-tümör aktivitesi gösterebilir (Fang, B., 2014). Farklı kaynaklardan (insan, sığır, keçi, domuz, koyun, at ve devegiller) α -LA'nın HAMLET'e benzer biyolojik özellikleri gösterebilen OA-kompleksleri oluşturabileceği bulunmuştur (Fontana ve diğ., 2013). Bir diğer örnekte bağlayıcı protein olan β -laktoglobulin ile yağ asidi kompleksi meydana getirilmiş ve HAMLET'e benzer sitotoksik etki oluşturduğu da görülmüştür. Bu sonuçların tümü, HAMLET benzeri komplekslerin diğer proteinlerle de oluşabileceği ihtimalini kanıtlanmıştır (Fang, 2014).

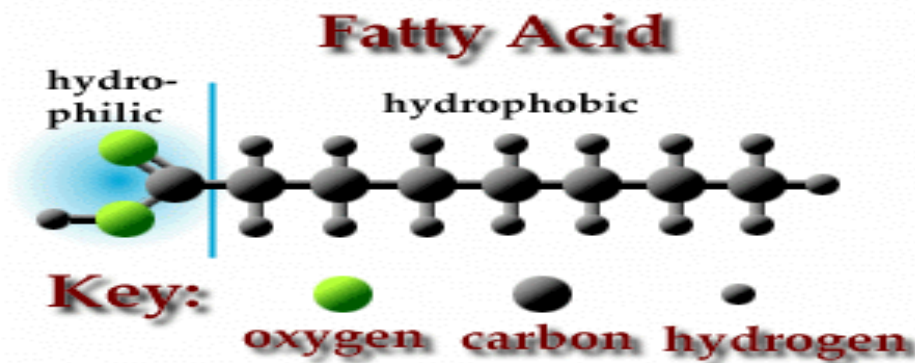
HAMLET/BAMLET gibi proteinlerin yapısında bulunan yağ asidi (C 18:6 cis) oleik asittir. Hidrojen, karbon ve oksijenden meydana gelen ve organik bir bileşik olan yağlar, içerdikleri yağ asitleri ile birbirinden farklıdır. Karbon (C) sayılarına göre kısa (C2-4), orta (C6-10), uzun (C12-20) ve çok uzun zincirli (C >22) olarak isimlendirilen yağ asitleri, yapılarında çift bağ içermiyorlar ise doymuş (sature), çift

bağ içeriyorlarsa doymamış (ansature) yağ asitleri (Şekil 1.9) olarak tanımlanır (Konukoğlu, 2008).



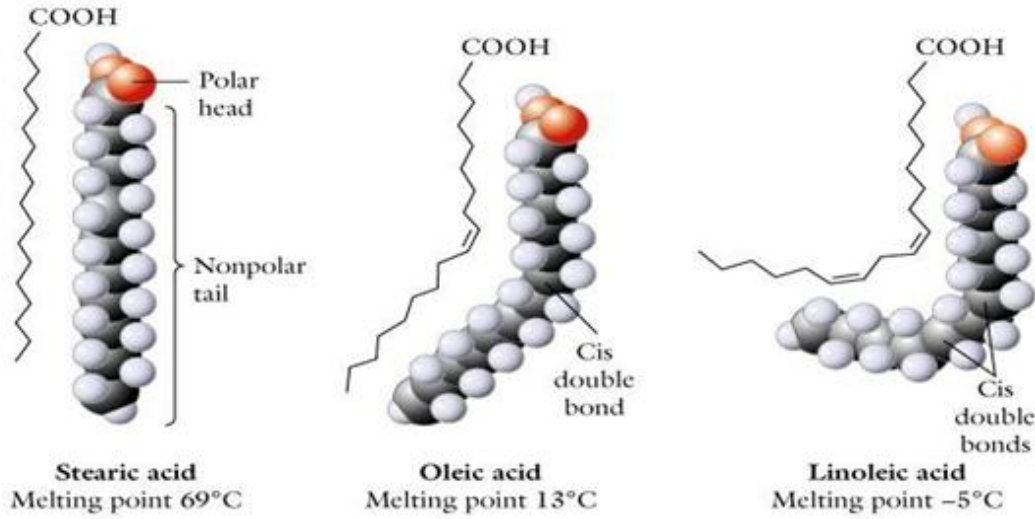
Şekil 1.8 : Doymuş ve doymamış yağ asitleri (Fidancı, 2009).

Doymamış yağ asitleri çift bağlarının sayısına göre tekli (monoansature) ve çoklu doymamış (poliansature) yağ asitleri olarak sınıflandırılır. Yağ asidi molekülünün biri karboksil ve diğeri metil karbon içeren iki sonlanma bölgesi bulunur. Metil karbonuna omega “ω” karbonu denir ve ilk çift bağın bulunduğu ω karbonuna göre de doymamış yağ asitleri ω-3, ω-6, ω-7 veya ω-9 gibi isimler alır. Yapıya çift bağların katılmasını sağlayan “desaturaz”lar, çift bağın eklendiği karbonlara göre Δ4, Δ5, Δ6 veya Δ9 –desaturaz olarak tanımlanır. Çoklu doymamış yağ asitlerindeki “a:b” şeklindeki ifade de “a” karbon sayısını, “b” çift bağ sayısını, “ω (n):x” ise metil karbonuna en yakın çift bağın pozisyonunu gösterir (C 18:2 ω-6 gibi). Çift bağların ucundaki karbonlara bağlı hidrojen atomlarının (Şekil 1.10) yerleşimine göre de yağ asitlerinin cis ve trans olmak üzere iki geometrik izomeri bulunur. Organizmada kullanılan doymamış yağ asitleri cis konumundadır (Simopoulos, 1989).



Şekil 1.9 : Yağ asidi yapısal görüntüsü (Fidancı, 2009).

Oleik asit; doğada birçok bitki yağında ve hayvansal yağlarda gliserol esteri olarak bulunan doymamış bir yağ asididir. $C_{17}H_{33}COOH$ kimyasal kapalı formülüyle gösterilen bu yağ asidi doymamış yağ asitlerinin en önemlisi olarak kabul edilir. Oleik asit molekülünün 9 ve 10. Karbon atomları arasında bir çift bağ bulunur. Açık sarı renkte ve hücre zarı yapısında yeterince bulunan omega 9 serisinden 18 karbon atomlu tekli doymamış yağ asididir. Oleik asit, diğer omega 3 ve omega 6 gruplarından farklı olarak esansiyel değildir. Çünkü insan vücudu tarafından sentezlenebilmektedir (Delgado ve diğ., 2017). Suda çözünmeyen oleik asit, alkol içersinde az miktarda eter ve organik çözücülerin çoğunda iyice çözünür. Doymamış yağ asidi olduğundan; katılma reaksiyonları verir.



Şekil 1.10 : Oleik asidin yapısal görüntüsü (Fidancı, 2009).

Sağlığa olan etkileri

- Tekli doymamış yağ asidi olarak yüksek tansiyon riskini azaltmaya yardımcı olur.
- LDL(kötü kolesterol)ü düşürerek kalp ve damar hastalıklarına karşı koruma yaptığı, yapılan araştırmalarla tespit edilmiştir.
- Şeker hastalarının insülin ihtiyacının azalmasına yardımcı olur.
- Kanser türlerine karşı koruyucu etki yapmaktadır (Gargaud, 2011).

HAMLET-BAMLET üretim yöntemleri

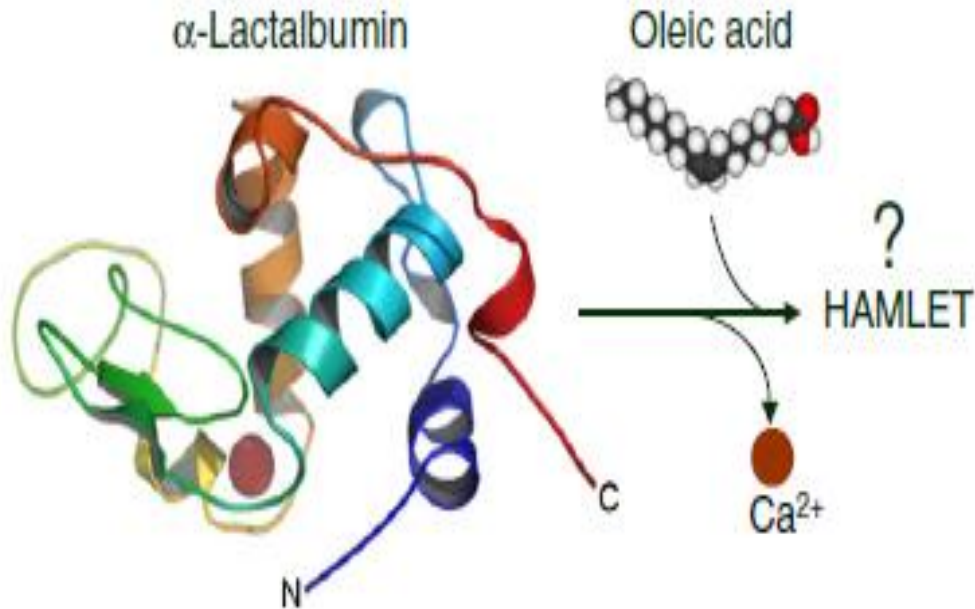
Kısmen katlanmış veya "erimiş küre" (MG) haline getirilmiş α -LA, asidik pH değerinde veya nötr pH değerinde proteine bağlı kalsiyumun giderilmesi ve orta

derecede ısıtması ile elde edilmesi çeşitli teknikler ve yaklaşımlar vasıtasıyla analiz edildiğini bildirmektedir. MG durumu, “native-like” bir ikincil yapı ve genel olarak “native-like” kıvrıma sahip olması ile karakterizedir, ancak doğal protein için tipik olan amino asit yan zincirlerinden yoksundur (Fontana ve diğ., 2013).

α -LA-oleik asit kompleksi oluşturmak için genelde iki yöntemden faydalanılır:

A) Protein ve OA'nın doğrudan karıştırılması

Protein ve OA birleşiminin direk karıştırma yoluyla yapılmasının başarılı bir örnek olmayacağından bahsedilse de; protein ve OA'nın oda sıcaklığında doğrudan karıştırma yanı sıra alkalik koşullarda ısıtma altında veya yüksek sürtünme koşulları altında karıştırma ile ilgili birçok örnek vardır. Yapılan bir çalışmaya göre “native” α -LA'nın 50-60 °C'lik ısı muamelesiyle açılması, OA'nın proteine bağlanmasını sağlamış, hatta bu yapı için EDTA gibi bir kalsiyum şelat maddesine ihtiyaç duyulmamıştır. Genel olarak, hazırlama yöntemine bakılmaksızın, ortaya çıkan OA-komplekslerinin sitotoksitesinin kolonla hazırlanan HAMLET veya BAMLET'e benzer olduğu gösterilmiştir (Fontana ve diğ., 2013).



Şekil 1.1 : A-lactalbumin (α -LA) ve oleik asit (OA, C18: 1, cis- Δ 9) arasındaki kompleks oluşumunun şematik görüntüsü. N-ucundan (mavi) C-ucuna (kırmızı) kadar gökkuşağı renkleriyle renklendirilmiş kısım, proteinin 123 kök zincirini gösterir. Protein- Ca^{2+} iyonu bağlantısı kırmızı bir top olarak gösterilmiştir. Asp82, Asp87, Asp88 yan zincirlerini ve Lys79 ve Asp84'ün karbonil oksijenlerini içeren doğal holo-proteinine Ca^{2+} bağlanır. Protein, dört disülfür köprüsü (Cys6-Cys120, Cys28-Cys111, Cys61-Cys77 ve Cys73-Cys91) ihtiva eder. Bir şelat maddesi kullanılarak holo-protein içerisindeki kalsiyumun giderilmesi ile yağ asidi bağlayabilen proteinin kısmen katlanmış veya "erimiş globül(kürecik)" halini alır (Fontana, ve diğ., 2013).

B) Kolon Prosedürü

HAMLET (BAMLET vb.), α -laktalbuminde bağlı halde bulunan Ca^{2+} 'yi çıkararak ve iyon değiştirme sütununda oleik asit'e maruz bırakarak üretilir. Svensson, M., ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kolon dolgu malzemesi oleik asit ile karıştırılır ve apo- α -LA ile muamele edilir (Svensson ve diğ., 2000). Bu durumda, Ca^{2+} salınımıyla indüklenen α -LA'nın yapısının OA'nın bağlanmasını desteklediği bildirilmiştir (Fang, 2014). HAMLET(BAMLET vb.), yağ ve protein kompleksi olarak ayrılır ve kısmen katlanmış durumda kinetik olarak sıkışmış bir protein karakteristiğine sahiptir. Çözeltide saf bileşenler karıştırılarak aktif kompleksin üretilmesi mümkün değildir (Fast, 2005). Kolon prosedürünün diğer varyantları, kısmen ısıyla denatüre edilmiş doğal holo α -LA'nın kullanımı, bunu takiben bir OA içeren kolon ile muamele edilmesi ve kromatografi uygulamasını içermektedir.

1.2 Enkapsülasyon Teknolojisi

Enkapsülasyon, bir materyali mikro ve nano parçacıklar biçiminde kaplamak için benzersiz bir yol sağlayan ve hızla genişleyen bir teknolojidir (Fang & Bhandari, 2012). Bu teknolojiye, bir madde (aktif madde) başka bir madde içerisine sokularak nanometre (nano kapsülleme), mikrometre (mikrokapsülleme) veya milimetre skalasında parçacıklar üretilir (Ray ve diğ., 2016). Ayrıca katı, sıvı ve gaz formundaki aktif maddeler kaplanır ve kapsüller içerisinde tutulması sağlanarak çok küçük bir madde ya da bir ingrediye korunur, belirli koşul ve hızlarda salınımı sağlanır (Wang ve diğ., 2011). Kapsülleme yoluyla oluşturulan parçacıkların boyutu, makro ($> 5000 \mu m$), mikro ($1.0-5000 \mu m$) ve nano ($<1.0 \mu m$) olarak sınıflandırılabilir (Fang, Z., & Bhandari, B. 2012).Kaplanan malzeme literatürde “aktif(active)”, “öz(core)”, “fill”, “internal” veya “payload” gibi isimler alırken, kaplamada kullanılan malzeme ise “kabuk(shell)”, “taşıyıcı (carrier material)”, “wall(duvar)”, “coating”, “external phase”, “matrix”, veya “enkapsülant” olarak adlandırılır (Devi, N., ve diğ., 2017). Son yıllarda, biyopolimer kapsülleme tabanlı teknolojilerdeki gelişmeler, farmasötik, gıda, kozmetik, tarım, elektronik ve moleküler tanı uygulamaları gibi birçok önemli alanda gelişme sağlamıştır (Devi ve diğ., 2017).

Gıda endüstrisinde enkapsülasyon uygulama nedenlerini aşağıdaki gibi özetleyebiliriz (Ray ve diğ., 2016):

- 1) Enkapsülasyon, kaplanan materyalin dış ortamına (örneğin, ısı, nem, hava ve ışık) karşı reaktivitesini azaltarak onu bozunmaya karşı koruyabilir,
- 2) Buharlaşma veya çekirdek malzemenin dış ortama aktarım hızı azalır, gecikir,
- 3) Orijinal malzemenin fiziksel özellikleri değiştirilebilir ve işlenmesi daha kolay hale getirilebilir,
- 4) Ürün zamanla yavaşça veya belirli bir noktada serbest bırakılacak şekilde (yani, doğru zamanda çekirdek malzemelerin bırakılmasını kontrol etmek için) özel olarak hazırlanabilir,
- 5) Çekirdek malzemenin lezzeti maskelenebilir,
- 6) Çekirdek malzemeye çok az miktarda gerek duyulduğunda seyreltilebilir, ancak yine de ana materyalde homojen bir dağılım elde edilir,
- 7) Aksi takdirde birbiriyle reaksiyona giren bir karışım içindeki bileşenleri ayırmak için kullanılabilir olmalıdır.
- 8) Çeşitli prosesler ve ürün depolanması sırasında meydana gelebilen kötü aroma ve koku oluşumu, ürünün yapısının bozulması, enzim aktivitesindeki kayıplar, bu nedenle oluşabilecek fonksiyonellik kaybı azaltılabilir ya da engellenebilir (Carneiro, ve diğ., 2013).

Kaplama materyalinin sahip olması gereken özellikler aşağıdaki gibidir (Desai & Park, 2005):

1. Yüksek konsantrasyonda iyi reolojik özellik göstermeli ve kolay iş kabiliyetinde sahip olmalı.
2. Aktif maddeyi dağıtma veya emülsiyon yapma ve üretilen emülsiyonu stabilize etme özelliğine sahip olmalı.
3. Proses sırasında aktif öz materyali ile kimyasal olarak etkileşimde bulunmamalı.
4. Aktif malzemeyi işleme veya saklama sırasında yapısında tutabilme ve sızdırmazlık kabiliyetine sahip olmalı.

5. Kurutma veya diğer desolventikasyon koşulları altında kapsülleme işlemi sırasında kullanılan solvent veya diğer malzemeleri tamamen boşaltma yeteneğine sahip olmalı.
6. Aktif malzemeye çevre koşullarına (örn. oksijen, sıcaklık, ışık ve nem) karşı maksimum koruma sağlamalı.
7. Çözücünün çözünürlüğü gıda endüstrisi için kabul edilebilir olmalıdır (örn. su ve etanol).

1.2.1 Enkapsülasyon yöntemleri

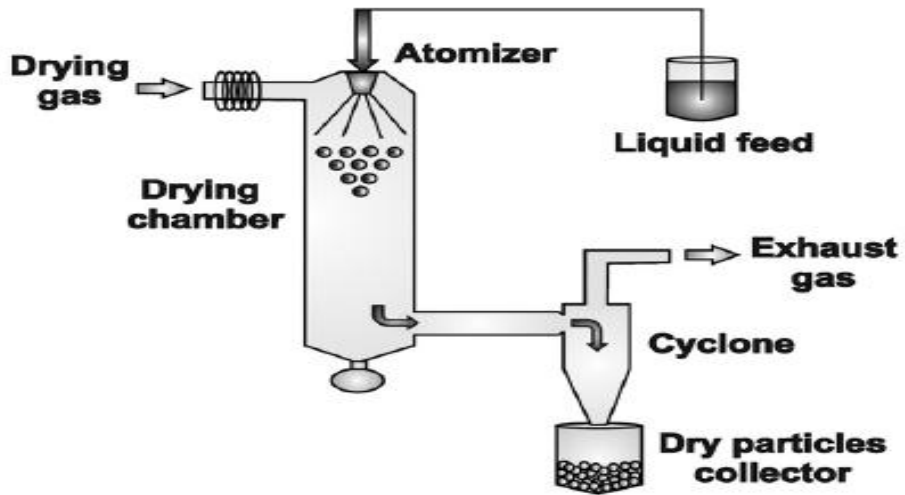
Kapsülleme yöntemlerini karakterize ederek sıralayacak olursak: öz materyalinin ince damlacıklar haline getirilip bir polimer içerisine karıştırılır ve seçilen tekniğe göre katılaştırılır ya da katı halde bulunan toz parçacıklar akışkan yatakta karıştırılıp kaplama çözeltisi püskürtülür. Bu amaçla uygulanan fiziksel yöntemler: püskürtmeli kurutma (spray drying), püskürtmeli soğutma (spray cooling/chilling), akışkan yataklı kaplama (fluidized bed coating), ekstrüzyon (extrusion), santrifüj süspansiyon ayırma (centrifugal suspension separation), dondurarak kurutma (lyophilization), kokristalizasyon ve emülsiyon oluşturma (cocrystallization and emulsion) iken fizikokimyasal yöntemler: koaservasyon (coacervation), lipozom ile kaplama (liposome entrapment) ve kimyasal yöntemler: Ara yüz polimerizasyonu ve kapsayıcı kompleksleme (inclusion complexation) olarak sıralanabilir (Gökmen, 2012).

Püskürtmeli kurutma

Püskürtmeli kurutma, gıda endüstrisinde en eski ve en yaygın kullanılan kapsülleme tekniğidir. Yöntem, bozunma/oksitlenmeye karşı koruyarak yağ lezzetini sağlamak ve sıvıları tozlara dönüştürmek için gıda endüstrisinde 1950'lerin sonlarından beri kullanılmaktadır (Se, 2004). Genelde hava olan sıcak bir kurutma gaz akımına, bir akışkanın atomize edilerek püskürtülmesi ve kuru bir toz haline dönüştürülmesi prensibine dayanan bir tekniktir (Sosnik & Seremeta, 2015). Teknik, esnek ve sürekli, ancak daha da önemlisi ekonomik bir işlemdir. Dondurarak kurutma ile karşılaştırıldığında, püskürterek kurutma yönteminin maliyeti 30-50 kat daha ucuzdur (Gharsallaoui & Chambin, 2007). Kullanılan kapsülleştiricilerin yaklaşık %80-90'ı püskürterek kurutmadan oluşuyorken, geri kalanı çoğunlukla püskürtme-soğutma, dondurarak kurutma, eriyik ekstrüzyon ve eriyik enjeksiyon ile

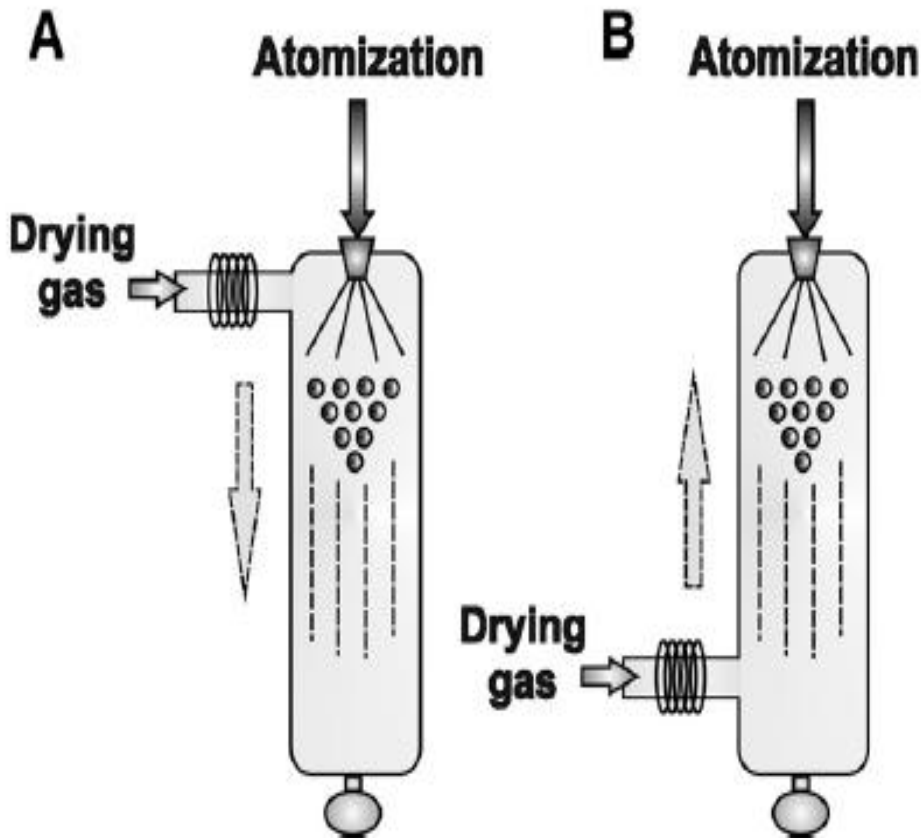
hazırlanmaktadır (Nedovic ve diğ., 2011). 40 µm'den küçük ve iyi kalitede parçacıklar üretilir. Bu özellik, nihai ürünlerin duyu ve dokusal özellikleri için arzulanmaktadır. Sprey kurutucuların gıda endüstrisinde kullanımı yaygın olmakla birlikte, bu tekniğin birçok dezavantajı vardır; ekipmanın karmaşıklığı, kurutma bölgesindeki düzgün olmayan koşullar ve partikül boyutunu kontrol etmekte karşılaşılan sorunlar bunlara örnek olarak verilebilir. Püskürtme kurutma teknolojisinin bir diğer sınırlaması, su içinde kabul edilebilir bir seviyede çözünmesi gereken kapsülleyici maddenin türüdür. Gıda endüstrisinde hemen hemen tüm püskürtme kurutma prosedürleri sulu formülasyonlardan gerçekleştirilir ve tipik duvar malzemeleri arasında akasya gum'u, maltodekstrinler, hidrofobik olarak değiştirilmiş nişasta ve bunların karışımları bulunur. Aljinat, karboksimetilselüloz, guar gum ve peynir altı suyu proteinleri, soya proteinleri ve sodyum kazeinat gibi proteinler gibi diğer polisakkaritler de kapsülleştirici maddeler olarak kullanılabilir (Estevinho & Rocha, 2017).

Mikrokapsülasyonda püskürtme-kurutma işleminin uygulanması üç temel aşamayı içerir: İşlenecek dispersiyonun veya emülsiyonun hazırlanması, dağılımın homojenleştirilmesi ve kütlenin kurutma odasına atomizasyonu (Gharsallaoui & Chambin, 2007). Bununla birlikte, Liu, W., ve diğ., işlemin piyasada bulunan atomizasyon sistemlerini sprey oluşturmak için kullanılan enerjinin türüne göre sınıflandırılmıştır. Bunlar: basınç püskürtücüleri, santrifüj atomizörü, kinetik enerji püskürtücüsü ve sonik enerji atomizasyonudur.



Şekil 1.12 : Geleneksel püskürtme kurutma ekipmanı ve prosesinin diyagramı (Sosnik & Seremeta, 2015).

Püskürterek kurutmada çalışma şekli, açık döngü veya kapalı döngü olabilir. Bunlardan birincisi, kurutma devresinde tekrar dolaştırılmayan kurutma gazı olarak havayı kullanırken, ikincisi, kurutma işlemi odasında yeniden işleme sokulan inert bir gaz (örn., Azot) tüm işlem boyunca kullanılır. Açık döngü konfigürasyonu, daha maliyet-etkin ve istikrarlı olduğu için çoğu durumda tercih edilir. Bununla birlikte, kapalı çevrim modu, patlayıcı gazların karıştırılmasını ve oksijene duyarlı maddelerin manipüle edilmesini önlemek için kullanılır. Sıvı atomizasyon yönüne göre şekillenen kuru gaz akış yönü için ise iki olasılık vardır: eş zamanlı akış (aynı yönde) ve ters akım akışı (ters yönde) (Şekil 1.3.). Birinci durumda, nihai ürün en soğuk havayla temas halindedir, bu nedenle ısıya duyarlı malzemelerin kurutulması için tercih edilir. İkinci durumda, kuru ürün en sıcak havayla temas halindedir ve bu nedenle sıcaklığa duyarlı malzemelerle kullanılamaz, ancak yüksek termal verimlilik açısından istenir. Buna ek olarak, eş akım ve karşı akım arasında karışık akışlı ara yapılandırmalar da vardır (Gharsallaoui & Chambin, 2007).



Şekil 1.13 : Püskürterek kurutucu (A) eş akım akışı ve (B) karşı akım akışı şeması. Tam satırlar sıvı atomizasyonunu, kesikli çizgiler ise kurutucu gazı temsil etmektedir (Sosnik & Seremeta, 2015).

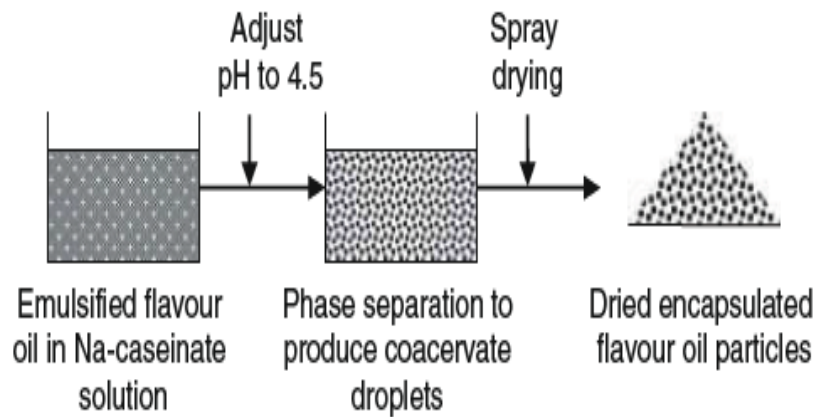
Koaservasyon

Koaservasyon, bir polimer çözeltisinden kaplama maddesinin bir sıvı fazının ayrılmasını ve ardından bu fazın asılı çekirdek (öz) parçacıklarının etrafında muntazam bir tabaka halinde kaplanmasını içerir. Daha sonra kaplama katılaşır. Genel olarak, parti-tipi koaservasyon işlemleri üç aşamadan oluşur ve sürekli çalkalama altında gerçekleştirilir (Fang & Bhandari, 2012):

1. Üç birbirine karışmayan kimyasal fazın formasyonu
2. Kaplamanın çökmesi
3. Kaplamanın katılaşması

İlk aşamada, bir sıvı üretim taşıyıcı fazı, bir çekirdek (öz) malzeme fazı ve bir kaplama materyali fazından oluşan üç fazlı bir sistem, doğrudan ekleme veya yerinde ayırma tekniği ile oluşturulur. Doğrudan ekleme yaklaşımında, çözülmeyen mumlarla kaplanmış maddeler, karışmayan çözeltiler ve çözülmeyen sıvı polimerler; diğer iki safhayla karışmadığı ve sıvılaştırılabildiği sürece, doğrudan sıvı üretim araçlarına ilave edilir. Yerinde ayırma tekniğinde, bir monomer, sıvı taşıyıcı içinde çözülür ve ardından ara yüzde polimerize olur (Desai & Park, 2005).

Koaservasyon basit ve kompleks olarak iki sınıfa ayrılır. Basit koaservasyon sadece bir polimer tipini içerirken kompleks koaservasyon bir çeşit polimer ve iki ya da daha fazla çeşit zıt iyonik yüklü polimer içerir. Bu teknik 1950 yılında National Cash Company tarafından karbonsuz kopya kâğıdı imalatı için geliştirilmiştir (Fang & Bhandari, 2012)



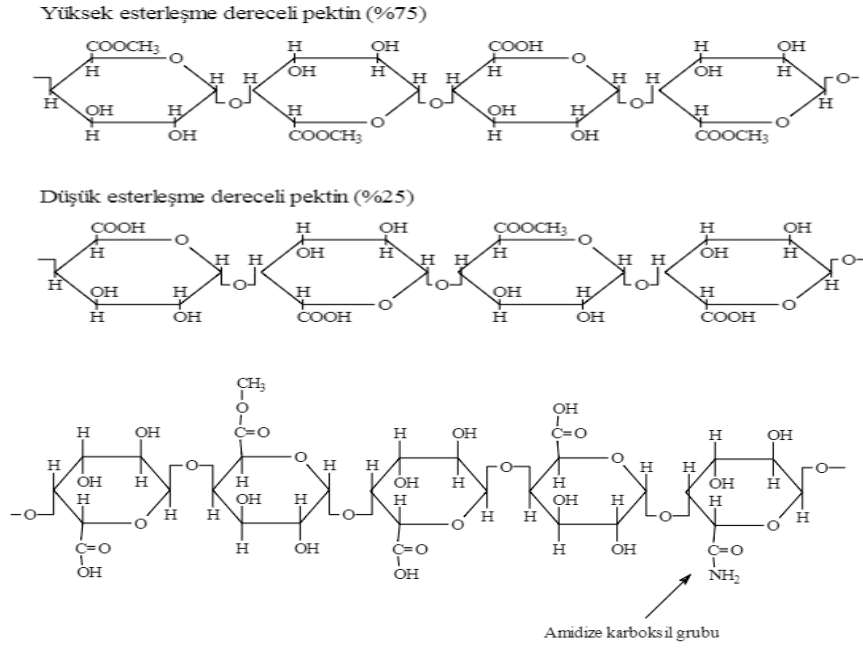
Şekil 1.14 : Basit bir koaservasyonla aroma uçucularının kapsüllenmesinin şematik diyagramı (Fang & Bhandari, 2012).

Şekil 1.14'te proteinin duvar materyali olarak kullanıldığı ve faz ayrımının pH ayarlaması ile elde edildiği basit koaservasyon örneği görülmektedir. Basit koaservasyon için diğer duvar malzemeleri arasında jelatin, gliadin, karajenan, soya proteini ve polivinil alkol bulunur. Bununla birlikte, gıda sanayindeki koaservasyon tekniklerinden çoğu, heparin / jelatin, jelatin / karboksimetilselüloz, β -laktoglobulin / gum akasya ve guar sakızı / dekstran gibi kompleks sistemlerdir ve en çok incelenen ve iyi anlaşılan koaservasyon sistemi muhtemelen jelatin / akasya gum'ı sistemidir.(Fang & Bhandari, 2012).

Kapsüllenmenin kullanımı için karmaşık koaservatlara kuvvetli bir ilgi vardır ve son otuz yılda bildirilen birçok araştırma ortaya çıkmıştır ve çeşitli aktif ajanlar kapsüllemek için yeni biyopolimer sistemlerin sentezi, karakterizasyonu ve optimizasyonu üzerinde durulmuştur. Koaservasyon genellikle aroma yağlarının enkapsülasyonunda kullanılsa da (Se, 2004), protein-polisakkarit kompleksleri ve koaservatlar, fizyolojik süreçlerde çokça yer alan biyopolimer çiftlerinden biridir ve mikro ve nano kapsülleme işlemleri gibi önemli endüstriyel uygulamalar bulmaktadır (Devi ve diğ., 2017).

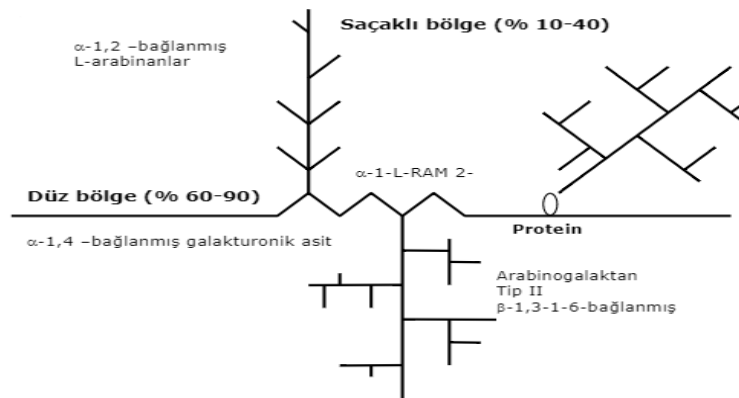
1.2.2 Kaplama materyali olarak kullanılan pektinin özellikleri

Pektinler, özellikleri ve kompleks yapısı nedeniyle hücre duvarı polisakkaritlerinin en yoğun olarak incelenen gruplarından biridir ve birçok farklı kimyasal bağ ile birbirine bağlanmış çok sayıda farklı monosakkaritten oluşur (Mierczy ve diğ., 2017). D-galakturonik asit (GalA) bakımından zengin olan ve önemli miktarlarda L-ramnoz (Rha), D-arabinoz (Ara) ve D-galaktoz (Gal) ve bunlarla birlikte 13 farklı monosakkarit içeren polimerlerden oluşur (Naqash ve diğ., 2017). Galakturonik asitlerin belirli bir bölümünde metil esterleşmesi meydana gelir. Galakturonik asitlerde meydana gelen esterleşme, esterleşme derecesi (DE) veya metoksillenme derecesi (DM) olarak bilinmektedir. Esterleşme derecesi (DE) 50 değerinin üzerinde olan (DM > 50%) pektin, yüksek metoksilli (HM), esterleşme derecesi (DE) 50 değerinin altında olan (DM < 50%) pektin, düşük metoksilli (LM) olarak değerlendirilir. LM pektinler amidlendirilmiş (LMA) veya amidlendirilmemiş (LMNA) olarak da kendi içinde ikiye ayrılırlar.



Şekil 1.15 : Yüksek esterleşme dereceli pektin, düşük esterleşme dereceli pektin ve amidize pektin (Meyve Sebze İşleme Teknolojisi, Hacettepe Üniversitesi Yayınları).

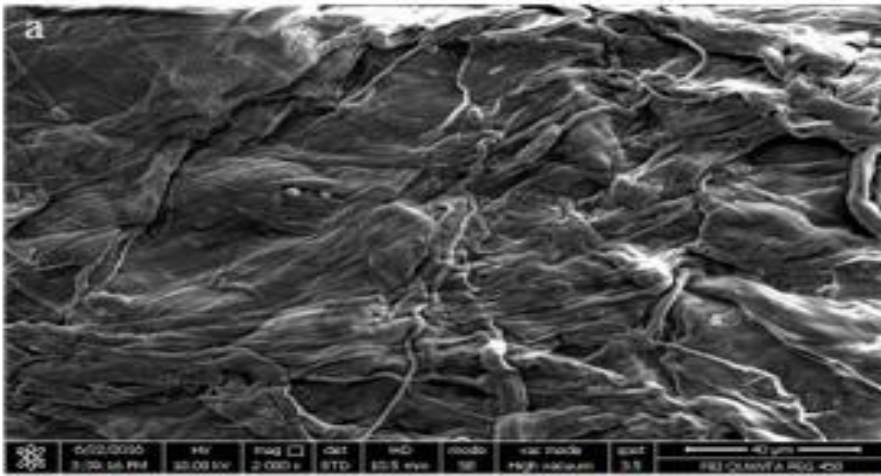
Yüksek metoksil pektinleri düşük pH (asidik) ve yüksek şeker içeriği bulunduğu durumlarda jelleşir. Bu koşullar dışında yalnızca ağıdalı bir çözelti oluşturabilir. Diğer taraftan düşük metoksil pektinleri kalsiyum ile birlikte jelleşir, düşük pH (asidik) ya da yüksek katılık koşulları gerekmez (Guo ve diğ., 2017). Pektin genel tanımlamasında, molekülün tüm uzunluğu boyunca 'pürüzsüz' ve 'saçaklı' bölgelerin birbirini izlediği belirtilmiştir. Pektin'in yaygın olarak kullanılan endüstriyel kaynakları arasında elma posası, turunçgil kabukları ve şeker pancarı posası yer alır (Naqash ve diğ., 2017).



Şekil 1.16 : Pektin yapısının şematik gösterimi (Acar, 2005).

Pek çok çalışma, pektin'in kolesterol düşürme etkisini, serum glikozunda meydana getirdiği düşüşü ve anti-kanser aktivitelerini incelemiş ve kanıtlamıştır. Pektin aynı zamanda, yapışkan bir jel oluşturma ve kolestrol ve safra asitlerini bağlama, boşaltımını arttırma ve yeniden emmeyi azaltma özelliklerinden kaynaklanan kolesterol düşürücü etkiyi türetilir. Kolestrol absorpsiyonu, safra tuzları, fosfolipidleri ve yağ asitleri tarafından oluşturulan misel oluşumunun bozulmasıyla daha da engellenir. Viskozite, molekül ağırlığı (MW) ve esterifikasyon derecesi (DE) pektinin kolestrolü düşürme yeteneğini belirler. Günde 12-24 g pektin tüketimi üzerine LDL-C' nin (lowdensity lipoprotein cholesterol) % 13'ünde azalma görülür. Yüksek hidrofobik süstitüsyon derecelerine sahip pektinlerin (çözünürlüğü yüksek ölçüde esterifiye edilmiş), düşük çözünürlüklerinden ötürü, plazma kolesterolünü daha etkili bir şekilde düşürdükleri bilinmektedir (Naqash ve diğ., 2017).

Bilindiği gibi, yüksek metoksillenmiş pektinler, asidik ve yüksek şeker koşullarında suya dirençli jeller oluşturabilir, ancak Ca^{+2} ile çapraz bağlanması güçtür. Ca^{+2} gibi iki değerli katyonların, Ca^{+2} ve galakturonat arasındaki elektrostatik çekim kuvveti nedeniyle pektin jelleşmesini önlediği iyi bilinmektedir. Bu nedenle, öncelikle pektin nanofiberleri için Ca^{+2} çapraz bağlanma yöntemi düşünülmüştür. Ancak yüksek metoksilenmiş pektinler için Ca^{+2} 'yi çapraz bağlamanın iki açıdan sınırları olması beklenmektedir (Cui ve diğ., 2017): (1) HP daha az karboksilat iyonu içermesi nedeniyle düşük çapraz bağlanma kabiliyetine sahiptir (Liu, 2017; Cui ve diğ., 2017). (2) Ca^{+2} iletimli iyonik birleşme ağı elektrostatik kuvvetle desteklendiğinden, fizyolojik ortamlarda Ca^{+2} ve monovalent iyonlar (ör. Na^{+} , K^{+}) arasındaki iyon değişimi nedeniyle çökelme olabilir (Cui ve diğ., 2017).



Şekil 1.17 : Limon kabuğundan elde edilen pektinin SEM görüntüsü (Güzel, 2017).

Yağ sindirim profili, sistemde bulunan pektin molekülü ile ilişkilendirilip incelendiğinde; yağ sindiriminin derecesinin, molekül ağırlığı ve metoksilasyon dercesi arttıkça azaldığı görülmüştür. Metoksilasyonların artması, molekülün genel hidrofobikliğinde bir artışa neden olmuş ve negatif grupların sayısını azaltmıştır. Artan kutupsuz gruplar, safra tuzlarının hidrofobik etkileşim ile bağlanmasına yol açar, dolayısıyla yağ damlacıklarının yüzeyleri ile etkileşime girme yeteneklerini azaltır (lipaz adsorpsiyonunu inhibe eder)-(Mierczy ve diğ., 2017;Cui ve diğ., 2017). Ayrıca Farklı özelliklere sahip suya dayanıklı pektin nanofiberleri, ilaç verme, doku rejenerasyonu ve biyomedikal uygulamalar için büyük potansiyel barındırmaktadır (Cui,ve,diğ.,2017).





2. MATERİYAL METOT

2.1 Materyaller

Deneyler süresince kullanılan süt (Pınar marka) numuneleri İstanbul'daki marketlerden temin edilmiştir. Numuneler alındıktan kısa bir süre sonra prosedürün ilk aşaması olan α -laktalbumin için işleme alınmış liyofilizasyon sonrası diğer işlemlere kadar -18°C'de saklanmıştır.

Kimyasallar ve diğer materyaller

Kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta kullanılmıştır. Turunçgil kabuğundan elde edilmiş ve yüksek amittlenmiş pektin (HMP>50% DE) Cargill (Saint Germain en Laye, FRANCE) firmasından, elma suyu (Dimes), Oleik asit (C:18:1:9), Molar Kimya (İstanbul, TÜRKİYE) firmasından ve Tris-HCL, EDTA, sodyum azide, sodyum asetat trihidrat, sodyum sitrat, asetik asit, sodyum hidroksit, hidroklorik asit, potasyum klorür, pepsin, pankreatin kimyasalları, α -laktalbumin standardı Sigma–Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

2.2 Metotlar

2.2.1 Sütten α -laktalbumin eldesi

Sütten α -laktalbumin eldesi işlemi için Pettersson, ve diğ. (2006) uyguladığı yöntem model alınmıştır. İşlem için öncelikle 1 litre süt'e 264g amonyum sülfat eklenmiş, 4 °C'de gece boyunca bekletilmiştir. Ardından 4200rpm/ 30 dak. / 12 ° C değerlerinde santrifüjlenmiştir. Elde edilen çözeltiye 50 mM Tris-HCL ve 35 mM EDTA eklenmiş pH sodyum hidroksit ile 7.5'a ayarlanmıştır. Flaş kromatografiye (bkz. Sayfa 36) gönderilen numunenin ilk yıkaması pH 7.5'daki 50mM Tris-HCl ve 1mM EDTA ile yapılmıştır. İkinci yıkama için pH 7.5 değerindeki 50mM Tris-HCl ve 1mM CaCl₂ kullanılmıştır. Örnek ardından liyofilize (Alpha 1-2, Christ) edilmiştir.

2.2.2 BAMLET eldesi

Kamijima ve diğ. (2008) uyguladığı yöntem baz alınarak, ilk önce 210 μ M fosfat tamponlu tuz (PBS) hazırlanmıştır. Tamponun pH sı sodyum hidroksit ile 7.5'a ayarlanmıştır. α -laktalbumin tampona eklenmiştir. Belirli bir oranda oleik asit ilave edilmiş, örnek 50-60 °C aralığında 15 dakika ısıtılmıştır. Santrifüjlenen (4000rpm, 25° C , 15 dak.) örnekten liyofilize edilerek (Alpha 1-2, Christ) sonraki aşama için -18°C'de saklanmıştır. Elde edilen BAMLET proteinine UPLC uygulaması yapılmıştır.

2.2.3 BAMLET proteini validasyonu

HPLC yöntemi ile validasyon uygulamasında; metanol-fosfat tamponu (70:30 h/h) mobil fazı, 1.0 ml dak⁻¹ kolon akış hızı, 10 μ l enjeksiyon hacmi ve (5 μ m, 25 cm x 4.6 mm) özelliklere sahip kolon kullanılmıştır. 280 nm dalga boyuna sahip UV dedektörle analiz gerçekleştirilmiştir (The United States Pharmacopeial Convention 2009; Cıltas, 2014).

2.2.4 UPLC analizi ile α -laktalbumin ve BAMLET'in tanımlanması

Analitik UPLC ayrımları için SPD-M10A fotodiyot dizilimi dedektörü (PDA) ile donatılmış Shimadzu LC-10A cihazı (Kyoto, Japonya) kullanıldı. Geri-fazlı kromatografi, güvenlik muhafazası C18 ODS (4 x 3.0 mm i.d) ile donatılmış 5 μ m parçacıklar (teknokroma, Barcelona, İspanya) ile paketlenmiş 250 x 4.6 mm Kromasil 100 C-18 kolonu ile gerçekleştirildi. Grafik, He-gazdan arındırılmış çözücü ile oluşturuldu. Farklı elüsyon koşullarında uygulanan çözücülerden çözücü A,% 0.1 formik asit ihtiva eden H2O ve çözücü B, MeCN'idi. Ayrılma, % 5 A ile başlayarak % 95 e ulaşmaya kadar doğrusal bir gradyan uygulandı ve ardından 5 dakika % 20'den % 95'e kadar A çözücüsü ile lineer gradyan uygulandı. Akış hızı 0,5 mL.min⁻¹ ve çalışma sıcaklığı 40°C olarak seçildi. Enjeksiyon hacmi 10 μ L idi. Kromatogram 280 nm'de (bamlet ve α -laktalbumin) kaydedildi.

2.2.5 BAMLET proteininin pektin ile koaservasyonu

Koaservasyon için ilk aşamada %0.02(w/w) oranında sodyum azide içeren (Neill ve diğ., 2014) %1(w/v)'lik BAMLET çözeltisi ve ardından %1(w/v)'lik pektin (HMP>50%) çözeltisi su ile hazırlanmıştır. Koaservasyon BAMLET ve pektin solüsyonlarının istenen pH ve oran aralıklarında vorteksenerek karıştırılmasıyla

gerçekleşti. Bunun için öncelikle istenen pH aralığına getirilen solüsyonlar belirli sıra ile falkon tüpüne yerleştirildi ve BAMLET proteini damla damla tüpe alındı. Ardından örneğe ultrasound uygulaması yapılmıştır (Ach, 2015; Çilek, 2012).

En uygun pH değerini bulmak için farklı pH aralıklarında (pH 2-8 aralığı) ve 1:1- protein: pektin oranı ile koaservasyon gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada; O1-O8 (karışım oranlarının kodlarını ifade eder) Protein: Pektin oranları ile pH3 değerinde tekrar koaservasyonlar yapıldı. Ardından bulanıklık, zeta (ζ) potansiyeli ve partikül boyutu ölçümü yapıldı. Koaservatları kurutmak için laboratuvar tipi püskürtmeli kurutucuda kullanıldı (BÜCHI Mini Sprey kurutucu B-290, BÜCHI Labortechnik AG, İngiltere). Süspansiyonlar, oda sıcaklığında 0.5 L / h'lik bir besleme hızında püskürtüle-kurutucuya pompalanır ve 140 ° C'lik bir giriş sıcaklığında ve 90 ° C'lik bir çıkış sıcaklığında kurutuldu. Kurutulan tozlar hava geçirmez kaplarda -18 ° C'de saklandı.

2.2.6 Partikül boyutu ve zeta (ζ) potansiyeli uygulaması

Her bir numune için (pH 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7) 0.250 μ l örnek 50 ml(5:100) oranında seyreltme yapılmıştır suya eklenerek zeta (ζ) potansiyeli ve partikül boyutu ölçümü yapılmıştır. Zeta potansiyel değerleri, zeta potansiyeli dinamik ışık saçma aracı ile 25 °C'de üçlü olarak ölçülmüştür (Malvern Zetasizer Nano ZS, Worcestershire, İngiltere) .

2.2.7 Bulanıklık analizleri

Biyopolimer çözeltilerinin bulanıklığı, floresan detektörü (Jasco, FP-4025) ile analiz edildi. Numuneler (4 ml) ekipmana yüklendi ve maksimum soğurma ortam sıcaklığında 218 nm'de ölçüldü. Ölçümler üçer defa yapıldı.

2.2.8 SEM uygulaması

Belirlenen numuneler için püskürtmeli kurutucu uygulaması yapıldı. Püskürtmeli kurutma işlemi yapılmış numuneler ve BAMLET Quanta FEG 250 SEM cihazında; 4000 $\times$ ve 16.000 $\times$ kat yaklaştırma ile, 5 kV artan voltajlı yüksek vakumda incelenmiştir.

2.2.9 Enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi

BAMLET proteininin koaservasyon verimini hesaplamak için Flaş kromatografi kullanılmıştır. Flaş kromatografi sistemine numune yükleme için "katı numune yükleme tekniği" uygulanmıştır. Kurutulan bileşik silika tozuna yüklendi ve ekstrakt, evrensel Rf car-tridge (Teledyne Isco, Lincoln, USA) cihazına aktarıldı. Kullanılan flaş kromatografi sistemi, C18 ters fazlı (Teledyne Isco, Lincoln, ABD), 13g RediSep® 4x sistemine sahip bir Combi Flash Rf cihazıdır ve daha sonra analitlerin ayrılması için yükleme yöntemi uygulanmış, bunun için C-18 kartuş kullanılmıştır. Hareketli faz A, suda içinde % 0,1 trifluoroasetik asit ve mobil faz B asetonitril içinde % 0,1 trifluoroasetik asitten oluşmaktadır. Çalışma süresi, 10 mL / dk'lık bir akış ile 20 dakika sürmüştür. Eğim % 0 B'den-% 100 B'ye gradient olarak devam ettikten sonra 4 dakika lineer akış sağlanmıştır. Fraksiyon toplanması, 280 nm'deki absorbans ölçmek suretiyle gerçekleştirildi. Tüm dalga boylarındaki ortalama emilim 280 ila 400 nm arasında değişti. Mümkün olan en yüksek saflık, maksimum absorpsiyon tepe noktasının merkezini temsil eden fraksiyon (fraksiyon başına 3 mL) absorbansları olarak kaydedildi.

Etkin madde yükleme ve kapsülleme etkinliğinin yüzdesi dolaylı yöntemle ölçülmüştür (Tran, 2015). BAMLET yüklemesi miktarı, süpernatant içindeki kapsül içine alınmamış BAMLET miktarının HPLC (Flaş kromatografi) analizi ile ölçülmesiyle belirlendi. BAMLET, yüksek kapsülleme verimliliğine sahip pektinlere başarıyla yüklenmiştir.

$$\% \text{ Koaservat Verimi} = \frac{(x-y)}{x} * 100 \quad (2.1)$$

x , BAMLET'in başlangıç absorbansı; y , koaservatı oluşturulmuş BAMLET çözeltisi içindeki serbest BAMLET absorbansı.

2.2.10 BAMLET, pektin ve koaservatın FTIR spektrumlarının edinilmesi

BAMLET ve pektin stok solüsyonlarının yanı sıra BAMLET-pektin koaservatı dondurularak kurutulduktan sonra, numuneler FTIR GX Sistemine (Perkin-Elmer, Shelton, CT, ABD) cihazında analiz edilmiştir. Tüm spektrumlar, 200 cm^{-1} ile 4000 cm^{-1} arasında değişmiştir (Huang ve diğ., 2012).

2.2.11 BAMLET/pektin koaservatının termal özelliklerinin diferansiyel taramalı kalorimeri ile belirlenmesi (DSC)

Koaservatların termal özellikleri, diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) kullanılarak incelendi. BAMLET, pektin ve BAMLET-pektin koaservat tozlarının denatürasyon sıcaklık aralığı (ΔT_d), pik denatürasyon sıcaklığı (T_d) ve denatürasyon entalpisi (ΔH_d), DSC (DSC-028 Mettler Toledo Inc., Columbus OH) kullanılarak tespit edildi. Öncelikle pektin ve BAMLET numunesi dondurularak kurutuldu. Koaservat ise püskürterek kurutulmuş hali ile kullanıldı. Her bir örnekten yaklaşık 5 mg, bir alüminyum pan içine tartıldı ve hermetik olarak kapatıldı. Boş bir pan ise referans olarak kullanıldı. Numuneler 5 °C / dakika'lık bir ısıtma hızında 40 °C'den 200 °C'ye ısıtıldı. ΔT_d , T_d ve ΔH_d ilgili yazılım kullanılarak hesaplandı. Ölçüm boyunca nitrojen tasfiyesi uygulandı (Huang ve diğ., 2012).

2.2.12 Dielektrik özelliklerin belirlenmesi

Besleme solüsyonlarının dielektrik sabiti Agilent ENA Series Network Analyzer, ABD tarafından 25°C' de üç tekrarlı olarak ölçüldü. Çözeltilerin dielektrik sabitleri 30 Mhz - 3 Ghz gibi geniş bir frekans aralığında araştırıldı.

2.3 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Minitab 17.3.1 (Minitab Inc., A.B.D) istatistik programıyla, üç tekrarlı olarak gerçekleştirilen deneylerin sonuçları kullanılarak tek yönlü varyans analiziyle (ANOVA) yapıldı. Tüm örneklerin ortalamaları arasındaki ve örneklerin de kendi içinde, sadece kefire katılarak oluşturulan gruplamaların ortalamaları arasındaki farklılıklar Tukey testiyle % 95'lik güven aralığında incelendi.

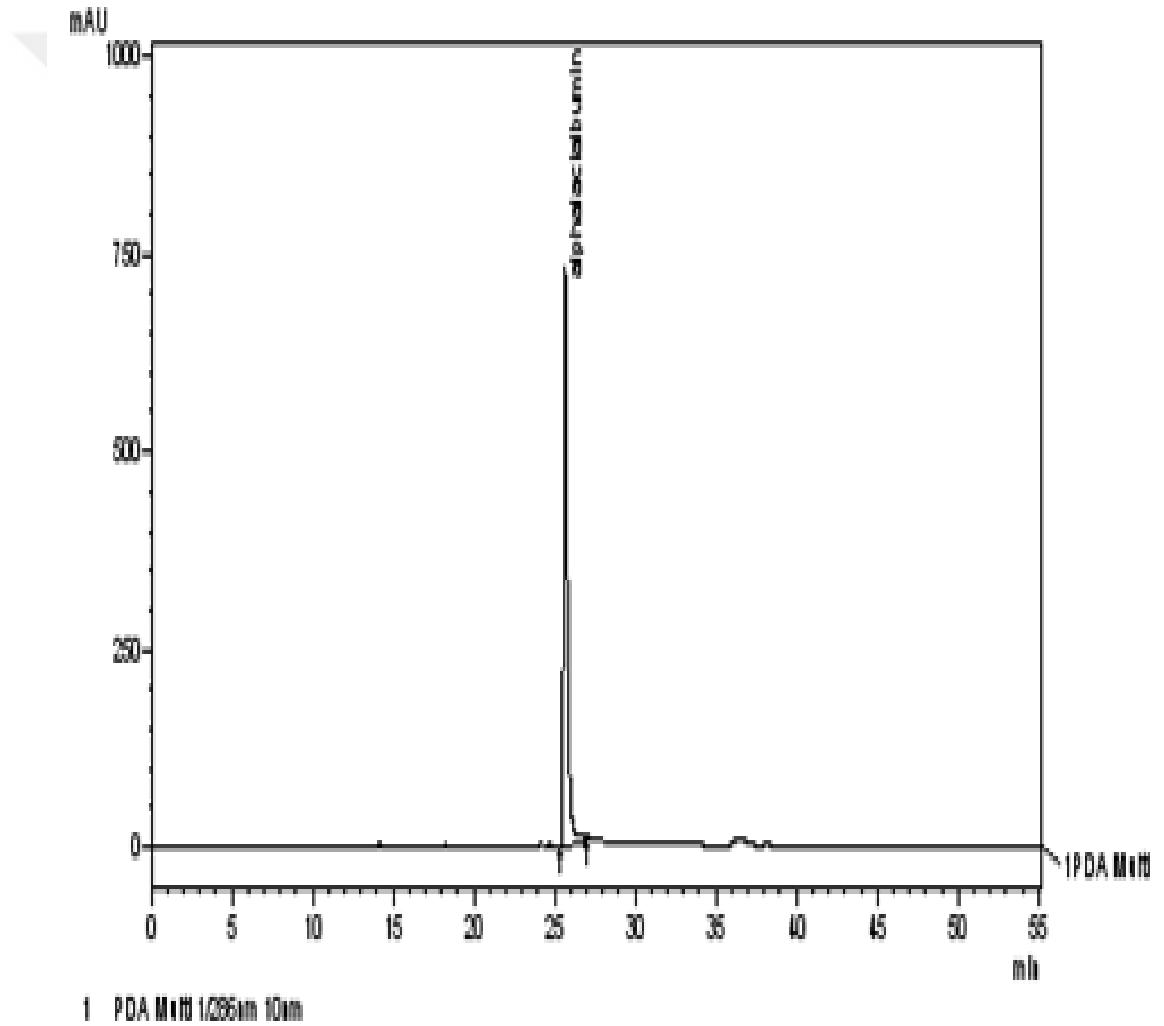


3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Optimizasyon Aşamasında Yapılan Ölçümler

3.1.1 UPLC verileri ve kütle denkliği

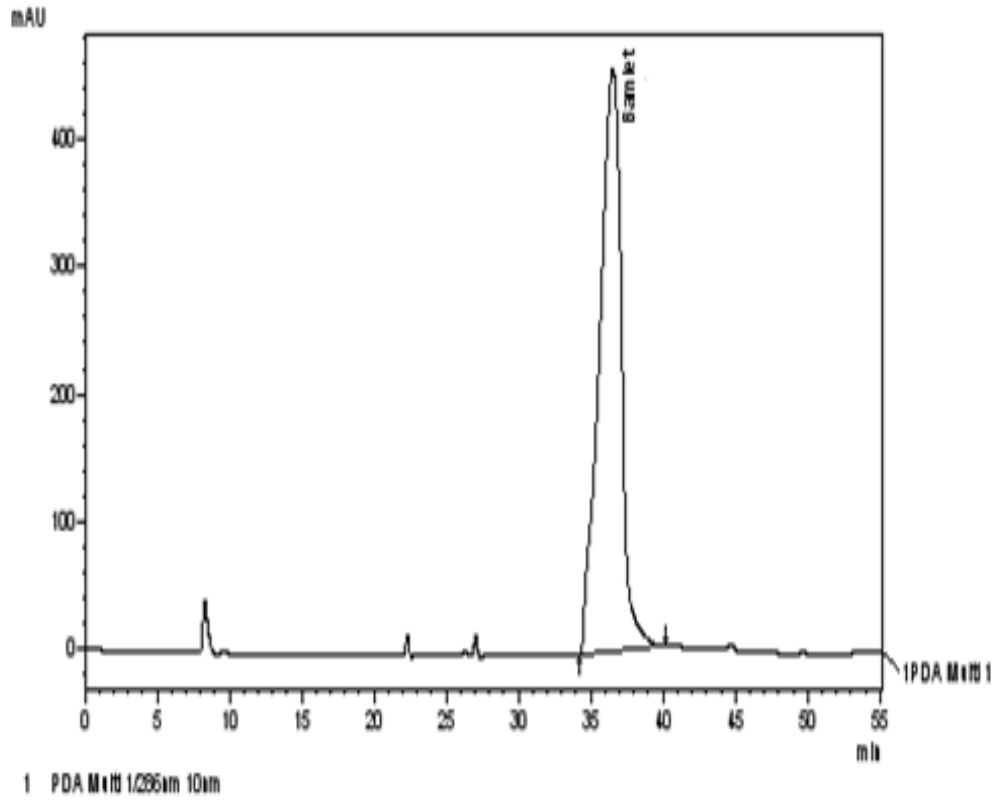
Alfa-laktalbumin



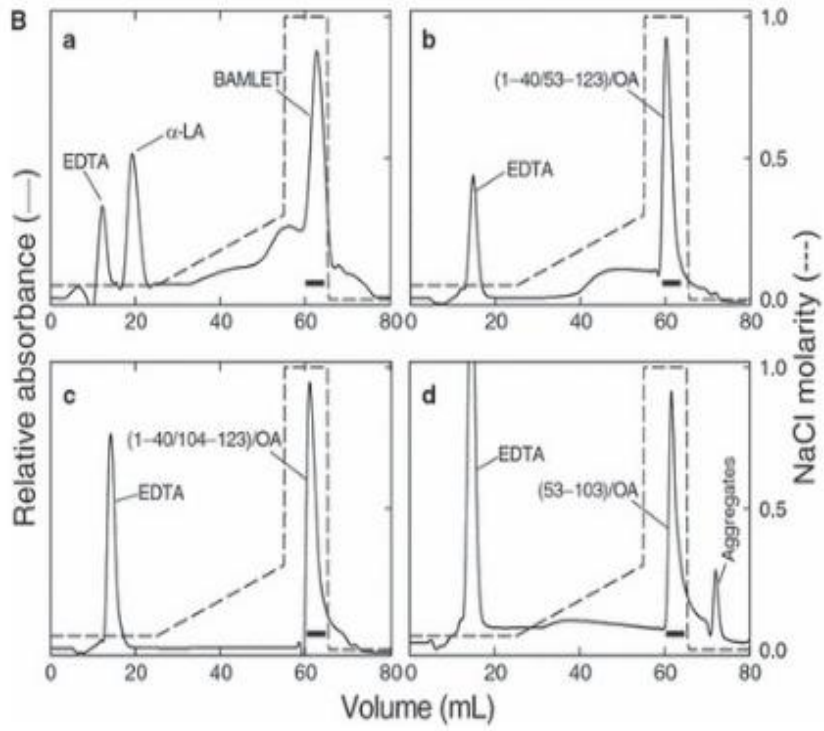
Şekil 3.1 : α – Laktalbumin UPLC kromatogram görüntüsü (280 nm).

α -LA'nın kromatogramı, 25.658. dakikada büyük bir pik çıkardı. Elde ettiğimiz proteinin standart α – Laktalbumin ile karşılaştırılmış ve aynı olduğu görülmüştür.

BAMLET



Şekil 3.2 : BAMLET'in UPLC görüntüsü (280 nm).



Şekil 3.3 : BAMLET oluşumunun şematik gösterimi (Tolin ve diğ., 2010).

Referans örnekte, BAMLET oluşumu sırasında yan tarafta oluşan kümeleşmeler (Şekil 3.4.) bizim numunemizde de gözlenmiştir. BAMLET ve oleik asit birleşimi ile yanlara doğru genişleyen görüntü görülmüştür. Oleik asit, pepsin ve pankreatin ile okside olan peptitler ile dimerleşme eğilimindedir. Bu yüksek molekül ağırlıklı polimerlerin oluştuğunun göstergesidir. Peptitlerin çapraz bağlarının oksidasyona uğramış ve yeni bir moleküler yapı oluşumuştur. Ayrıca oleik asit ile ilgili bir pik görülmemesi ortamda çapraz bağ yapmamış bir molekülün kalmadığını göstermektedir (Jiang ve diğ., 20017; Tolin ve diğ., 2010).

Çizelge 3.1 : BAMLET üretim süreci.

Materyal	Materyal Miktarı	Elde Edilen Ürün
Süt (İnek)	1000 g	1.297g α – Laktalbumin
α -Laktalbumin	1.297g	8.31839 g -ara işlem
Ara işlemde çıkan α -Laktalbumin	8.31839 g	3.891 g BAMLET (1:2 oranı; 1.297 gr α – Laktalbumin, 2.594g oleik asit)

Protein olmayan azotlu maddeler süttten elimine edildiğinde (%4.8) geriye kalan kısım proteinlerdir (%95). Bu kısmın %80'i kazein, %12'si albumin, %2'si globulin ve %2.4'ü proteoz-peptondur. 1 litre süttten ortalama 1.2 g α – Laktalbumin elde edilmiştir. Miktar literatür ile desteklenmiştir (Gür ve diğ., 2010).

Kütle denkliği

Çizelge 3.2 : α – Laktalbumin kütle denkliği.

Materyal	Alıkonma süresi	Ölçüm absorbansı(nm)	Yükseklik	Konsantrasyon (μ g/g)	Alan (%)
α – Laktalbumin	25,62	280nm	46201	12152	99,52
	25,39	280nm	45369	12428	99,36
	25,43	280nm	45963	12584	99,08
	25,26	280nm	45523	12640	99,81
Ortalama	25,43		45764	12451,0	99,44
%RSD	0,02 $\leq$ 20 (uygun)		0,84 $\leq$ 20 (uygun)	1,76 $\leq$ 20 (uygun)	0,31% $\leq$ 20 (uygun)

*Veriler asıl değerlerdir $\pm$ relatifstandart sapmaları ve ortalama değerleri tabloda gösterilmiştir (n=4). Veriler arasında istatistiksel olarak önemli derecede fark bulunamamıştır ($p < 0,05$). (1 mikrogram/gram (μ g/g) = 1 ppm ve 0.0001 % = 1 ppm).

α – Laktalbumin içeren dört tekrarlı enjeksiyon ve sonuçları Çizelge 3.2’de özetlenmiştir. Testin %RSD değeri; pik alanı, yükseklik ve alıkonma süresi için %’2den düşük çıkmıştır. Bu bize ölçümün çok iyi tekrarlanabilirliğinin çok iyi olduğunu göstermektedir ($\leq$ %20 olan değerler uygun olarak kabul edilir, Gıda Laboratuvarı & Rehberi n.d). Dolayısıyla, geliştirilen yöntem iyi bir hassasiyet göstermiştir.

Çizelge 3.3 : BAMLET kütle denkliği.

Materyal	Alıkonma süresi	Ölçüm absorbansı(nm)	Yükseklik	Konsantrasyon ($\mu\text{g/g}$)	Pik alanı (%)
BAMLET	36,54	280nm	98263	30236	99,41
	36,48	280nm	99210	31371	99,27
	36,22	280nm	98371	30643	99,3
	36,25	280nm	98054	31496	99,73
Ortalama	36,37		98474,5	30936,5	99,43
%RSD	0,03 $\leq$ 20 (uygun)		0,52% $\leq$ 20 (uygun)	1,18% $\leq$ 20 (uygun)	0,21% $\leq$ 20 (uygun)

*Veriler asıl değerlerdir $\pm$ relatif standart sapmaları ve ortalama değerleri tabloda gösterilmiştir (n=4). Veriler arasında istatistiksel olarak önemli derecede fark bulunamamıştır ($p < 0,05$). (1 mikrogram/gram ($\mu\text{g/g}$) = 1 ppm ve 0.0001” % = 1 ppm).

BAMLET içeren dört tekrarlı enjeksiyon ve sonuçları Çizelge 3.3’de özetlenmiştir. Testin %RSD değeri; pik alanı, yükseklik ve alıkonma süresi için %’2den düşük çıkmıştır. Bu bize ölçümün çok iyi tekrarlanabilirliğinin çok iyi olduğunu göstermektedir ($\leq$ %20 olan değerler uygun olarak kabul edilir, Gıda Laboratuvarı & Rehberi n.d). Dolayısıyla, geliştirilen yöntem iyi bir hassasiyet göstermiştir.

Doğrusallık ve aralık

25, 50, 100 ve 200 mg.mL^{-1} 'lik kalibrasyon standart çözeltileri hazırlandı ve gelişmiş yöntem kullanılarak analiz edildi. Elde edilen zirve alanları konsantrasyona göre çizilmiş ve doğrusallık en az kare regresyon yöntemi ile hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3’de özetlenmiştir.

3.1.2 BAMLET proteininin geçerlilik testi (Validasyonu)

BAMLET proteininin validasyonu, kalibrasyon eğrisine karşılık gelen BAMLET proteini derişimlerinin elde edilmesi, gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı ve yöntemin doğruluğu ve kesinliğinin belirlenmesi esasına dayanmaktadır.

Doğrusal aralık ve kalibrasyon eğrisi

0.01-0.25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ g/ml derişim aralığında BAMLET çözeltilerinin derişimlerine karşı okunan pik alan değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrisi elde edildi (Ek A).

Standart çözeltilerin hazırlanması

BAMLET'in metanol içinde 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ derişimde stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden belirli hacimde alınıp metanol ile seyreltilerek 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ derişimlerde BAMLET standart çalışma çözeltisi hazırlandı. Yüksek basınçlı sıvı Kromatografisinde (HPLC) standart çözeltinin kütle spektrumu ve kromatogramı alındı (EK A/Şekil A.1).

HPLC yönteminin **gözlenebilme sınırı** ve **tayin alt sınırı** değerleri sırasıyla 0.01 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve 0.02587 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulundu. Yöntemin **doğruluğu** ve **kesinliği** deney değişkenleriyle belirlendi. BAMLET'in kalibrasyon eğrisi içine düşen dört farklı derişimde hazırlanan çözeltilerinin pik değerlerinin üç kez okunmasıyla çalışma gerçekleştirildi. Okunan değerlerin ortalamaları ve standart sapmaları belirlendi. Yöntemin **kesinliği** yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ve **doğruluk** da bağıl hata ile Tablo 3.4'de verildi.

Çizelge 3.4 : HPLC yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri.

Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Bulunan $\pm$ std. sapma	% bağıl hata	% BSS
0,0225	0,023 $\pm$ 0,001	2,2	4,3
0,050	0,051 $\pm$ 0,001	2,0	1,0
0,100	0,099 $\pm$ 0,0005	-1,0	0,5
0,200	0,20 $\pm$ 0,002	-0,00	1,0

*Veriler ortalama değerlerdir ve $\pm$ standart sapmaları ile ifade edilmiştir (n=3). Veriler arasında istatistiksel olarak önemli derecede fark bulunamamıştır ($p < 0,05$).

Geri kazanım

Gıda preparatlarından geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemi ile yapıldı. Süt ve elma suyu preparatlarının sırasıyla 0.05 µg.ml⁻¹ deriş imlerde çözeltileri hazırlanarak pik alanı okundu. Sonra bu çözeltiiler üzerine BAMLET'in 3 farklı derişimdeki standart çözeltisi eklendi ve pik alanları belirlendi. Belirlenen pik alan değerleri aynı derişimdeki standart çözeltilerinin pik alan değerleriyle kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 3.5.'de verildi.

Çizelge 3.5 : HPLC yöntemiyle belirlenen gıda preparatlarının geri kazanım değerleri.

Preparat	Eklenen (µg ml ⁻¹)	Bulunan±std. sapma	Geri kazanım (%)	% BSS
Süt (0.05 µg ml ⁻¹)	0,05	0,049±0,001	98	2,04
	0,1	0,098±0,00023	99,77	0,23
	0,2	0,2003±0,0003	100,15	0,14
Elma suyu (0.05µg ml ⁻¹)	0,05	0,049±0,001	98	2,04
	0,1	0,099±0,00022	99,78	0,22
	0,2	0,2019±0,00032	100,16	0,15

*Veriler ortalama değerlerdir ve ± standart sapmaları ile ifade edilmiştir (n=3). Veriler arasında istatistiksel olarak önemli derecede fark bulunamamıştır ($p < 0,05$).

BAMLET proteini validasyonu için; HPLC cihazı verilerinden elde edilen, yüzde bağıl standart sapma ve bağıl hata değerleri yaklaşık olarak % 4.3'den küçük olduğundan dolayı geliştirilen HPLC yönteminin kesinliği ve doğruluğunun oldukça yüksek olduğu söylenebilir. Ayrıca geliştirilen yöntemin gıda preparatlarından geri kazanım değerleri de oldukça yüksektir. Gıda preparatlarından elde edilen geri kazanım değerleri % 98.0 ile % 100.16 arasında olduğu belirlendi. Elde edilen başka bir avantaj da teşhis limiti ve miktar tayin sınırı değerlerinin oldukça küçük olmasıdır. Bu nedenle ilaç endüstrisinde kalite kontrol çalışmalarında HPLC yöntemi başarıyla uygulanabilir. Bunun dışında BAMLET proteinin geçerlilik testi (Validasyonu), doğrusal aralık, kalibrasyon eğrisi, gözlenebilme sınırı, tayin alt sınırı, doğruluğu, kesinliği ve geri kazanım değerleri ile başarılı bir şekilde belirlenmiştir.

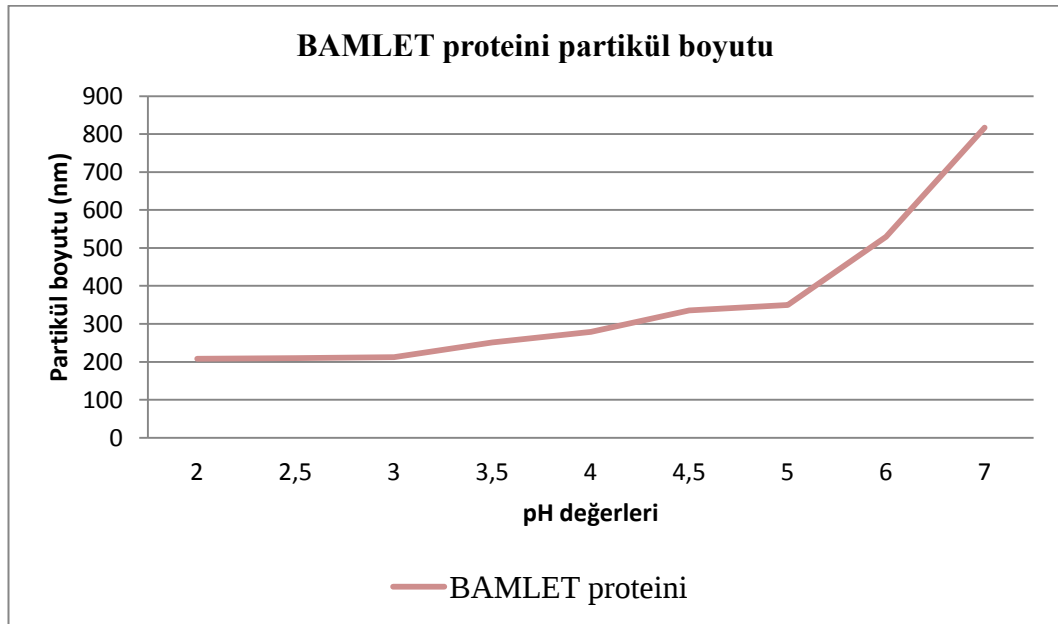
3.1.3. Partikül boyutu

Çizelge 3.6 : BAMLET proteininin partikül boyutu değerleri.

pH değerleri	Partikül boyutu (nm)	Std sapma
2	208,03	4,086
2,5	210,1	0,564
3	212,5	3,026
3,5	250,8	2,454
4	278,83	6,431
4,5	335,6	1,997
5	350	2,016
6	529	11,650
7	816,7	8,098

*Veriler ortalama değerlerdir ve $\pm$ standart sapmaları ile ifade edilmiştir (n=3). Veriler arasında istatistiksel olarak önemli derecede fark bulunamamıştır ($p < 0,05$).

Literatürde BAMLET proteininin partikül boyutları ile ilgili bilgiler mevcuttur. Elde ettiğimiz sonuçlar ile benzerlik göstermektedir (Delgado ve diğ., 2015).



Şekil 3.4 : BAMLET proteininin farklı pH aralıklarında ölçülen partikül boyutu değerlerinin grafiksel gösterimi.

Çizelge 3.7 : BAMLET-pektin koaservatın farklı protein: pektin oranlarında ve pH3 değerinde ölçülen partikül boyutu değerleri.

Farklı protein: pektin oranları	Partikül boyutu (nm)	Std sapma
O1	230,5	2,154
O2	208,03	1,951
O3	218,1	2,272
O4	212,5	3,026
O5	249,9	1,619
O6	238,77	2,150
O7	198,3	1,868
O8	235,5	1,877

*Veriler ortalama değerlerdir ve $\pm$ standart sapmaları ile ifade edilmiştir (n=3). Veriler arasında istatistiksel olarak önemli derecede fark bulunamamıştır ($p < 0,05$).

Ultrasound uygulamasının partikül büyüklüğü üzerine etkisi olmuştur. Uygulama süresi arttıkça partikül büyüklüğü küçülmektedir (Çilek., 2012).

3.1.4 Zeta (ζ) potansiyeli

BAMLET

Farklı pH değerleri için BAMLET proteininin zeta potansiyeli değerleri Çizelge 3.8 ve Şekil 3.7’de yer almaktadır.

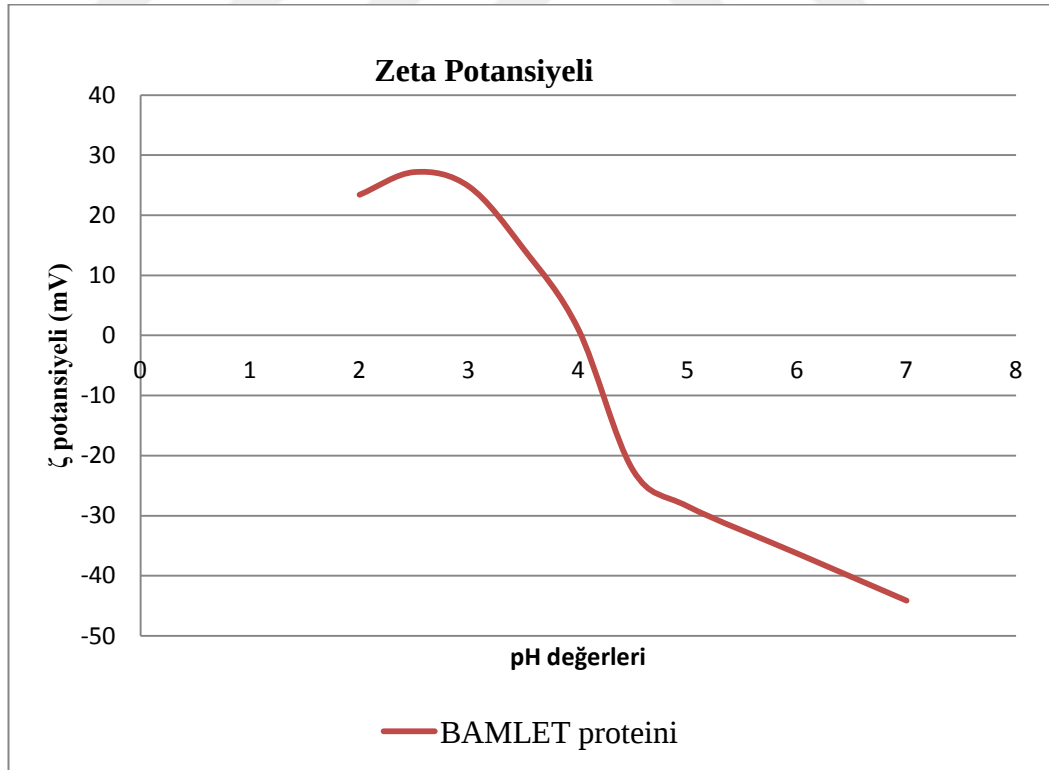
Zeta potansiyelinin asıl ölçüm amacı koloidal stabiliteyi tahmin etmek ve partiküller arası interaksiyonların incelenmesini sağlamaktır. Oluşturulan partikül süspansiyonlarında topaklanmayı tahmin etmek için gayet uygundur ve partiküllerin elektriksel itme güçlerinin bir ölçüsüdür denilebilir (Babaei, 2010).

Çizelge 3.8 : BAMLET proteini zeta (ζ) potansiyeli değerleri.

pH değerleri	Zeta değerleri(mV)	Std sapma
2	42,86	2,413
2.5	38,5	3,651
3	27,96	1,222
3.5	-3,77	0,230
4	-9,92	0,401
4.5	-35,46	0,929
5	-50,6	1,02
6	-68,06	2,2
7	-84,83	1,501

*Veriler ortalama değerlerdir ve $\pm$ standart sapmaları ile ifade edilmiştir (n=3). Veriler arasında istatistiksel olarak önemli derecede fark bulunamamıştır ($p < 0,05$).

BAMLET proteini için daha önce ölçülmüş bir zeta (ζ) potansiyeli değeri bulunmamaktadır.



Şekil 3.5 : BAMLET proteininin farklı pH aralıklarında ölçülen zeta potansiyeli değerlerinin grafiksel gösterimi.

Pektin

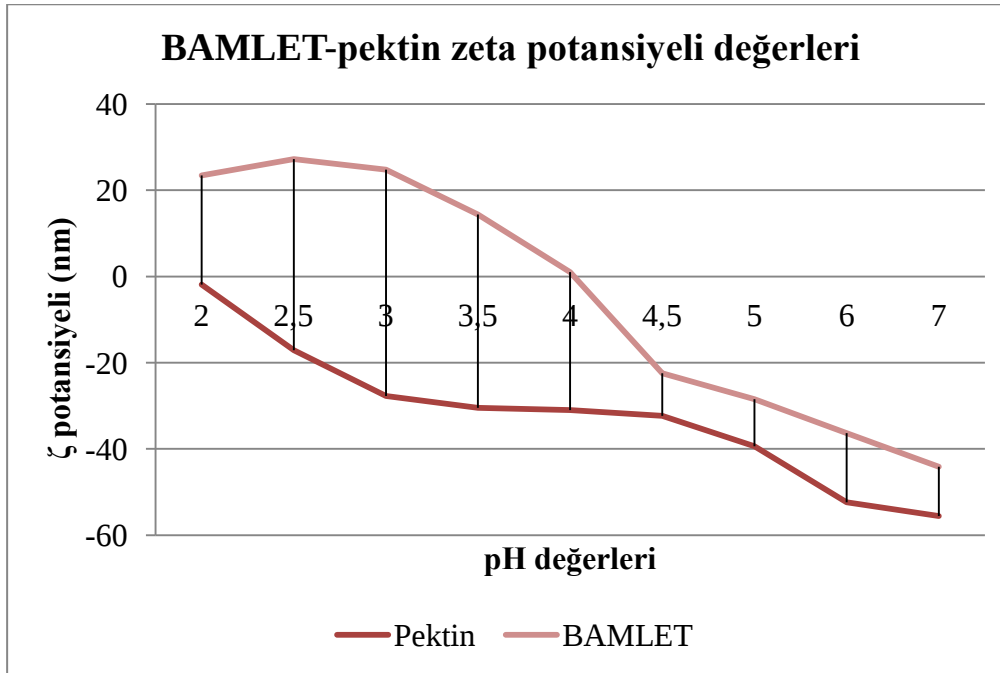
Çizelge 3.9 : Pektin zeta (ζ) potansiyeli değerleri.

pH değerleri	Zeta (ζ) potansiyeli değeri(mV)	Std sapma
2	-1,89	0,180
2.5	-17,1	0,458
3	-27,73	0,208
3.5	-30,46	0,529
4	-31	1,610
4.5	-32,33	1,721
5	-39,4	2,291
6	-52,36	1,001
7	-55,6	1,119

*Veriler ortalama değerlerdir ve $\pm$ standart sapmaları ile ifade edilmiştir (n=3). Veriler arasında istatistiksel olarak önemli derecede fark bulunamamıştır ($p < 0,05$).

Pektin zeta potansiyeli değerlerinin literatür'e uygun olduğu görülmüştür (Jones ve diğ., 2010).

BAMLET-pektin



Şekil 3.6 : BAMLET proteini ile pektin'in farklı pH aralıklarında ölçülen zeta potansiyeli değerlerinin grafiksel gösterimi.

Elde edilen zeta potansiyeli değerleri ile oluşturulan şekil 3.8’de görüldüğü gibi en uygun pH aralığı pH3’r. pH 4.5 değeri ve sonrası için her iki materyalde negatif değerde olduğu için koaservasyon gerçekleşemeyecektir. Ancak pH3 değerinde BAMLET proteininin pozitif değeri ile pektinin negatif değeri uyum göstermiş, koaservasyon için gerekli olan moleküller arası çekim gerçekleşmiştir. Bu aşamadan sonra en iyi protein: pektin oranını bulmak için deneye devam edilmiştir.

BAMLET: pektin koaservatı

Çizelge 3.10 : Farklı pH değerleri-sabit protein: pektin (1:1) oranındaki zeta () potansiyeli değerleri.

pH değerleri	Zeta () potansiyeli değeri	Std sapma
2	2,74	0,290
3	-17,63	1,724
4	-27,6	2,981
5	-34,33	4,162
6	-32,23	2,809
7	-43,86	1,908
8	-51,7	5,106

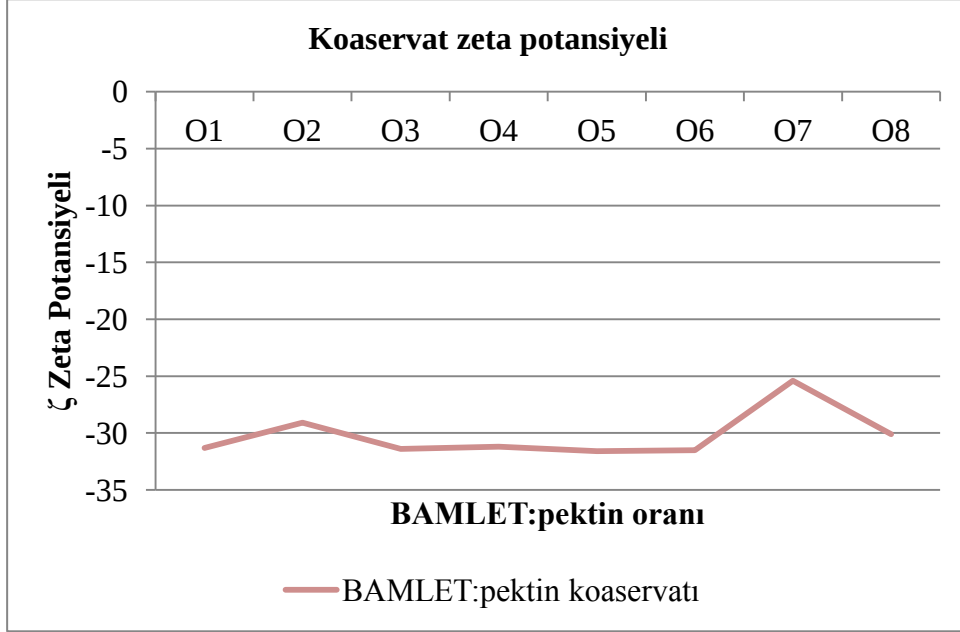
*Veriler ortalama değerlerdir ve $\pm$ standart sapmaları ile ifade edilmiştir (n=3). Veriler arasında istatistiksel olarak önemli derecede fark bulunamamıştır ($p < 0,05$).

Çizelge 3.11 : Farklı protein: pektin oranları, sabit pH (pH3) iini zeta () potansiyeli değerleri.

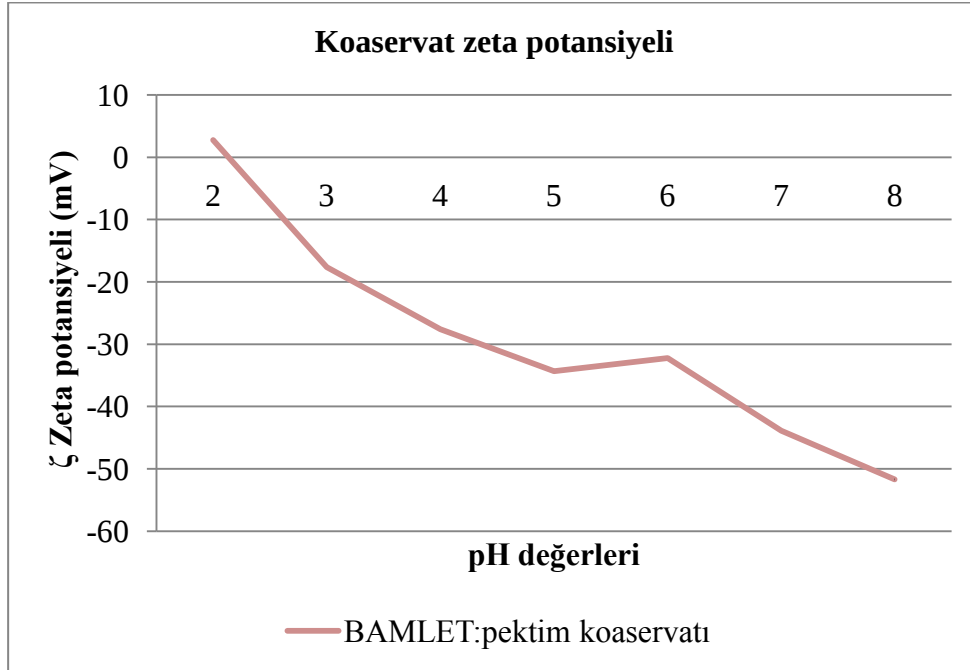
pH değerleri	Zeta () potansiyeli değeri(mV)	Std sapma
O1	-31,3	0,464
O2	-29,1	0,452
O3	-31,4	0,549
O4	-31,2	0,503
O5	-31,6	0,435
O6	-31,5	2,463
O7	-25,4	0,600
O8	-30,1	0,435

*Veriler ortalama değerlerdir ve $\pm$ standart sapmaları ile ifade edilmiştir (n=3). Veriler arasında istatistiksel olarak önemli derecede fark bulunamamıştır ($p < 0,05$).

Farklı pH değerleri için pH 2 değerinin pozitif olması (çizelge 3.10) BAMLET proteinini pozitif değerinin +42,86 iken pektinin bunu karşılayacak kadar fazla negatif yükte olmamasından kaynaklanmaktadır. pH4 ve sonrası için negatif değerin giderek artması ise moleküllerin yüklerinin ikisinin de negatif değerler kazanmalarından ve bu değerin artarak devam etmesinden kaynaklanır.

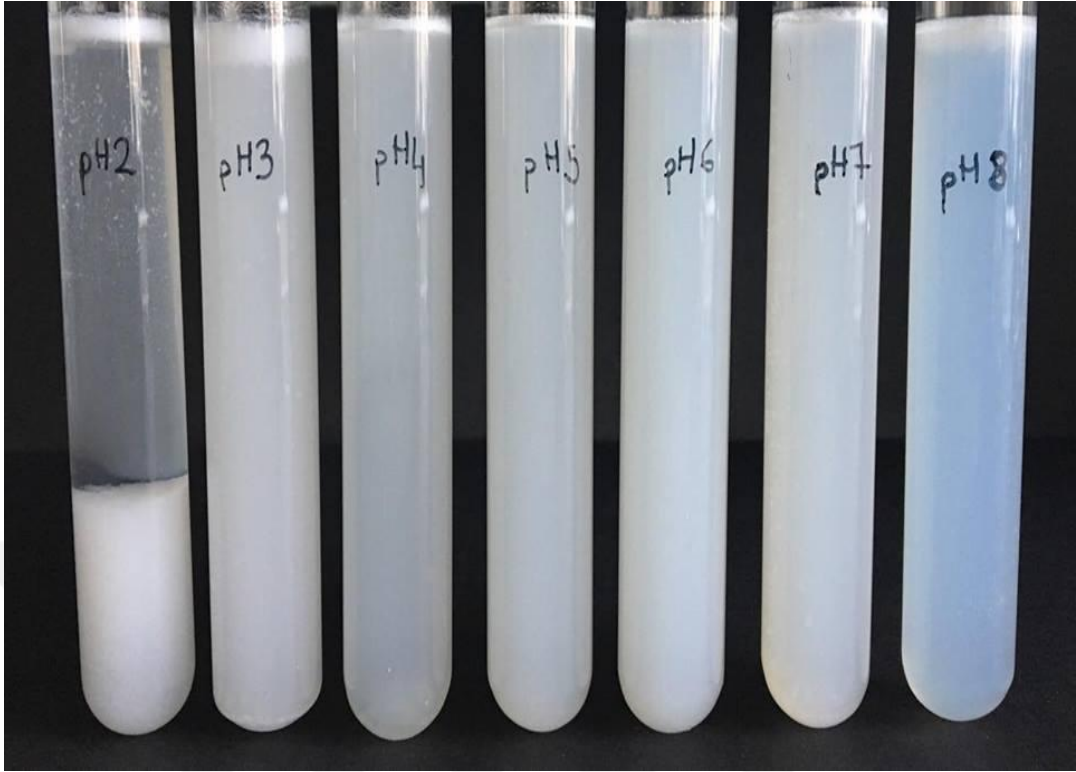


Şekil 3.7 : BAMLET-pektin koaservatının farklı protein: pektin oranlarında ve pH 3 değerinde ölçülen zeta potansiyeli değerlerinin grafiksel gösterimi.

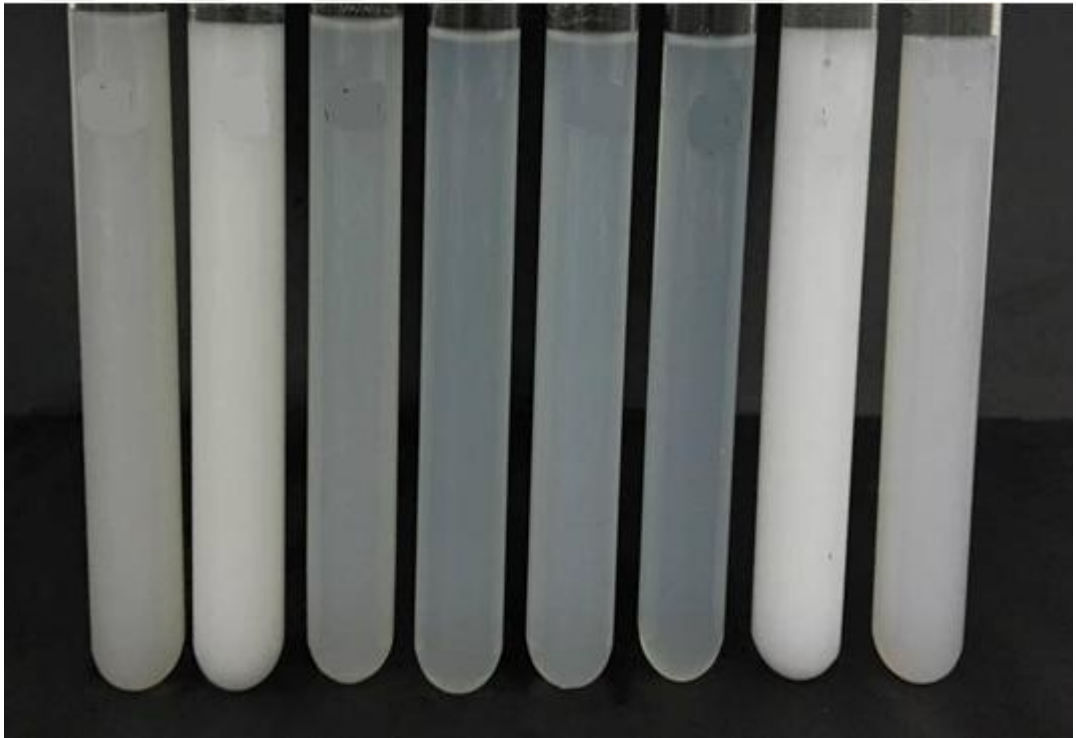


Şekil 3.8 : BAMLET-pektin koaservatının farklı pH aralıklarında ve 1:1 protein: pektin oranında ölçülen zeta potansiyeli değerlerinin grafiksel gösterimi.

3.1.5 Bulanıklık görüntüleri



Şekil.3.9 : Farklı pH değerleri ve sabit protein: pektin (1:1) oranlarında ki koaservatlar için bulanıklık görüntüsü.



Şekil 3.10 : Farklı protein: pektin oranları (O1-O7) ve sabit pH (pH3) için koaservatların bulanıklık görüntüsü.

Ortamın pH değeri, biyopolimerlerin yük yoğunluğunu ve koaservasyonun kuvvetini kuvvetle etkiler (Huang ve diğ., 2012). Farklı pH değerlerinde oluşturulan koaservat için pH 2 değerinde açıkça faz ayrımı görülmektedir. Bu pH değerinde pektin ve BAMLET proteini zıt yüklü olduğu halde, proteinin yük yoğunluğu çok daha fazladır. Diğer pH değerlerinde koaservat verimi elde edilmiş gibi görünse de pH3 değerinden sonra izoelektrik noktasına yaklaşan (pH4) protein için koaservat verimi düşmektedir ve bu noktadan sonra ortamda negatif yük (-) yoğunluğu mevcuttur.

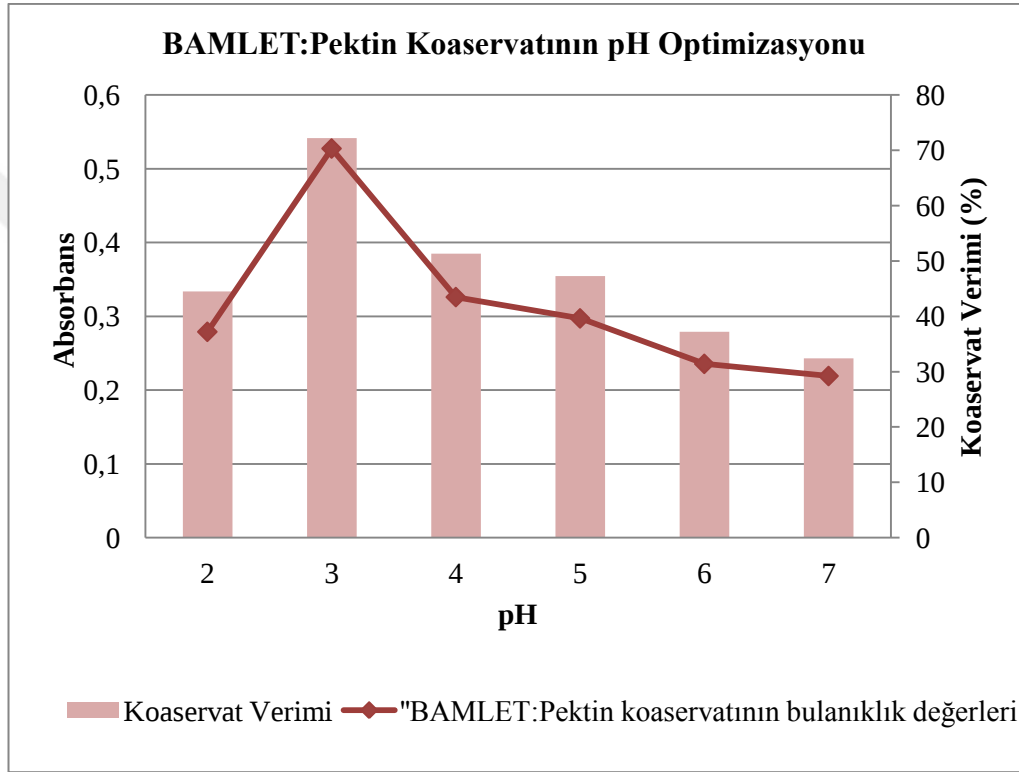
pH 3 değerinde O5 protein: pektin karışımı en düşük koaservasyon verimine sahiptir (%54,3). Koaservatın görselinde görüldüğü gibi protein-pektin arasında çözünabilir komplekslerin oluşması nedeniyle yalnızca biraz bulanıklık meydana gelmiştir. O7 protein pektin oranı ise en yüksek koaservat verimine sahiptir (%80,6). Yoğun bulanıklık görülen koaservatta, protein-pektin arasında kuvvetli moleküller arası etkileşim meydana gelmiştir ve çözünmez kompleksler oluşmuştur. Bu nedenle çözünmez kompleksler oluşturan parçacıklar birikmiş ve daha bulanık bir yapı meydana gelmiştir. Bu da koaservasyon verimine etki etmiştir (Wijaya ve diğ., 2017).

3.1.6 Koaservasyon için optimum pH'nın belirlenmesi

pH, fonksiyonel grupların iyonizasyon derecesini ve yüklü parçalar arasındaki elektrostatik etkileşimin gücünü kontrol ettiği için, koaservasyon sürecinde en önemli rolü oynamaktadır. Koaservatların fiziko-mekanik ve termal özellikleri katılan polimerler arasındaki etkileşimin derecesine göre yönetilir, çünkü etkileşimin gücü önemlidir (Gee ve diğ., 2016).

BAMLET ve Pektin solüsyonları 1M HCl veya 1M NaOH kullanılarak 2.0 ila 7.0 arasında değişen farklı pH değerlerine ayarlandı. Bu farklı pH değerleri için; BAMLET-Pektin karışık solüsyonlarının ve kompleks süspansiyonların flüoresans detektörü (Jasco, FP-4025) ile bulanıklık değerleri analiz edildi. Süspansiyonların emilmesi 218 nm'de ölçüldü. En yüksek ışık emiliminin gerçekleştiği pH değeri veya aralığı, kompleks koaservasyon için optimum pH olarak kabul edildi. Tekrar bu pH aralığında; zeta potansiyel değerleri, Zeta potansiyeli, dinamik bir ışık saçma aracı ile 25 °C'de üçlü olarak ölçüldü (Malvern Zetasizer Nano ZS, Worcestershire, İngiltere). Toplanan veriler ışığında optimum pH değeri belirlendi.

Farklı pH değerleri için en uygun pH aralığının arandığı analizde, çökme gözlenen pH2 değeri uygun değildir. Diğer değerler uygun bulunsa da BAMLET proteini dönüm noktasından (pH 3.5) sonra eksi (-) değer almaya başlamış ve bu da koaservatın yükünü gittikçe artan oranda eksi(-)'ye yönelmesine neden olmuştur. Yani en uygun değer BAMLET ve pektin moleküllerinin eşit ve zıt yüke sahip olduğu pH 3 değeridir. Ayrıca en iyi bulanıklık absorbansı ve bulanıklık üzerinden hesaplanan enkapsülasyon verimi (%72,2) bu değerde gözlenmiştir. Bu durum SEM görüntüleri ile de desteklenmiştir.



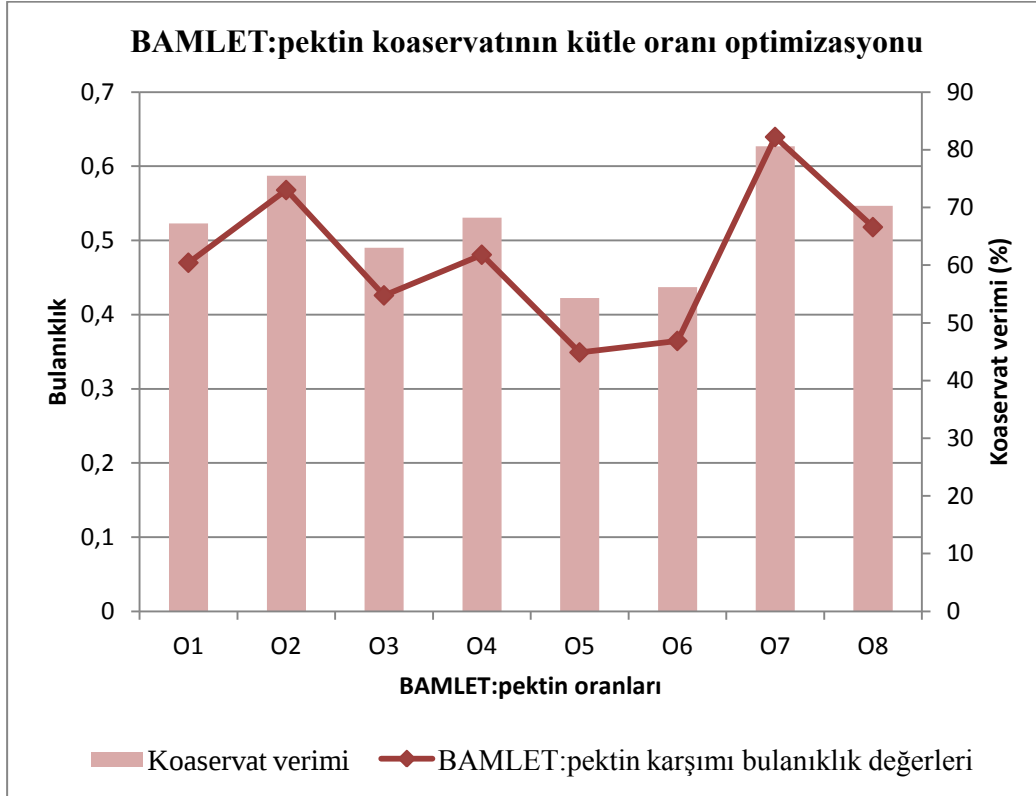
Şekil 3.11 : BAMLET; Pektin koaservatı için pH değerine karşı yüzde verim ve bulanıklık değerleri.

3.1.7 Koaservasyon için optimum BAMLET/Pektin kütle oranının belirlenmesi

Koaservasyon sürecinde, BAMLET-Pektin karıştırma oranı önemli bir faktördür. Karışımda bulunan en yüksek sayıda BAMLET ve pektin molekülü, en yüksek miktarda koaservat verimi üretmek için birbirleri ile etkileşime girebilir olmalıdır.

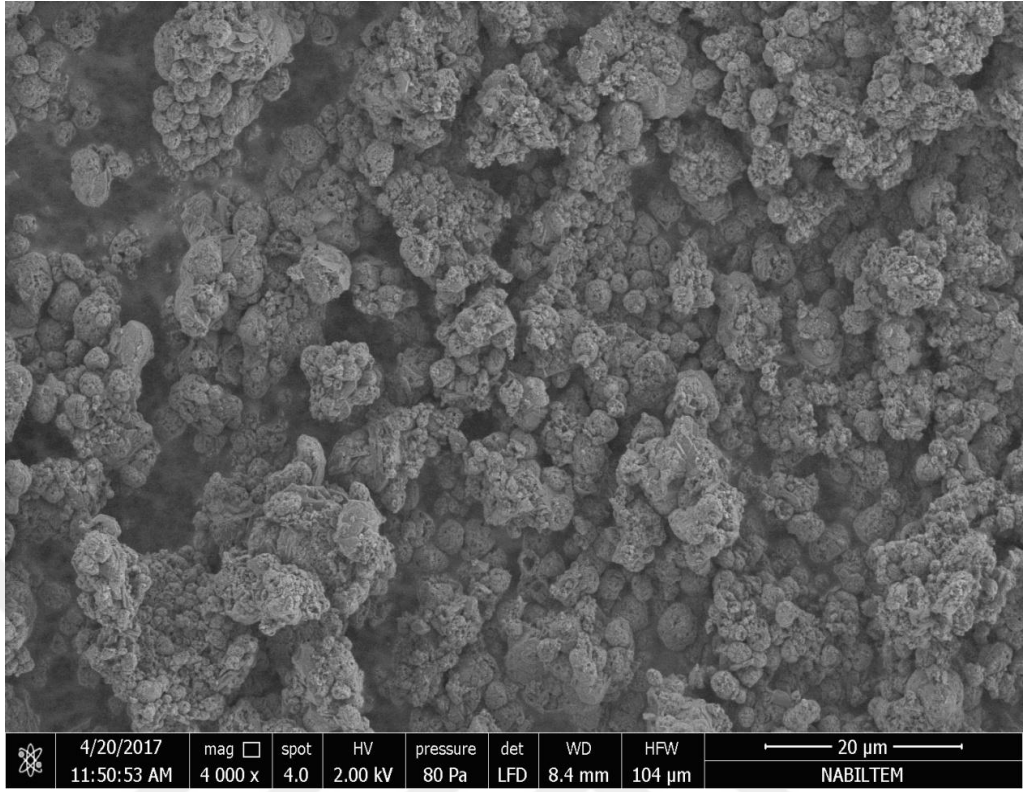
Bunun gerçekleşmesi için BAMLET-Pektin kütle oranı dikkatle seçilmelidir. Optimum BAMLET/Pektin kütle oranları, BAMLET veya Pektin moleküllerinin daha yüksek oranlarında tepkimeye girmemiş (kompleksleşmemiş) olarak kaldığı ve daha sonra denge fazına kaybolduğu ve kompleks koaservatın daha düşük verimle

sonuçlandığı oran anlamına gelir (Gee ve diğ., 2016). Optimum pH'da (optimum bulanıklık gözlemlendiği pH değeri) optimum BAMLET/Pektin oranı, bu iki polimer arasındaki en yüksek etkileşimi ve en yüksek koaservat verimi elde etmek için benimsenmiştir. Bu amaçla, O1-O8 (oran 1-oran 8) olmak üzere 8 farklı BAMLET/Pektin oranı kullanılmıştır. Farklı protein: pektin oranlarında elde edilen en yüksek koaservasyon etkinliği oranı %80,6 ile O7 (oran 7) protein: pektin oranıdır.

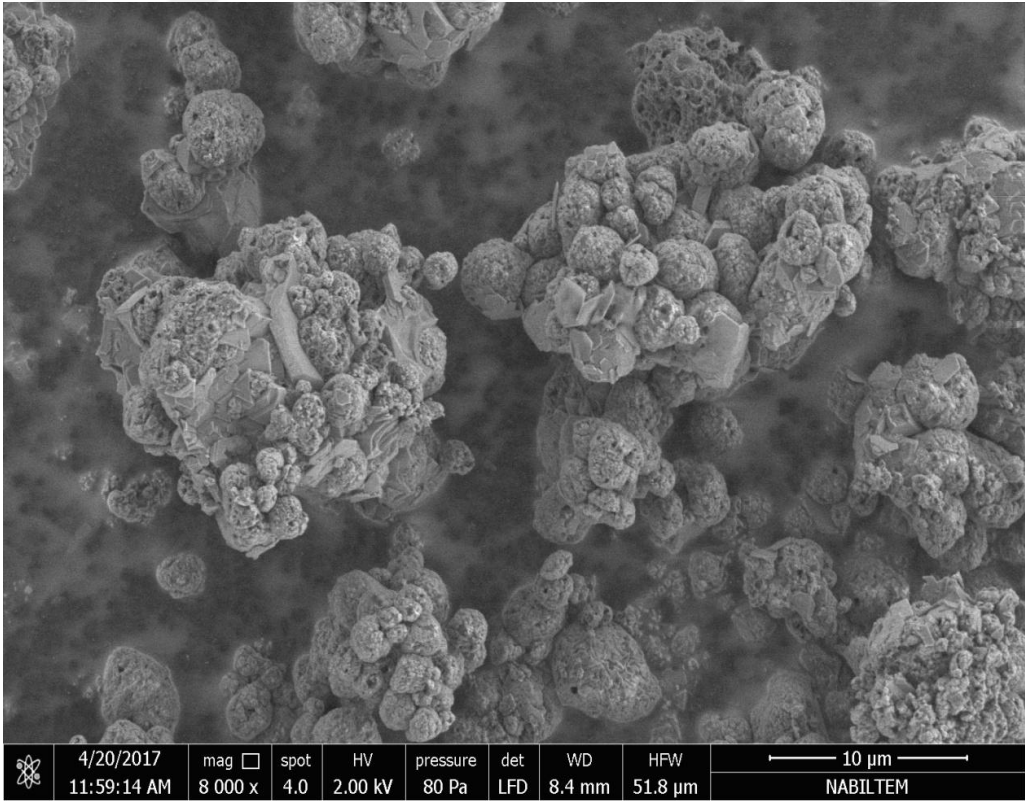


Şekil 3.12 : BAMLET; Pektin koaservatı için kütle oranlarına karşı yüzde verim ve bulanıklık değerleri.

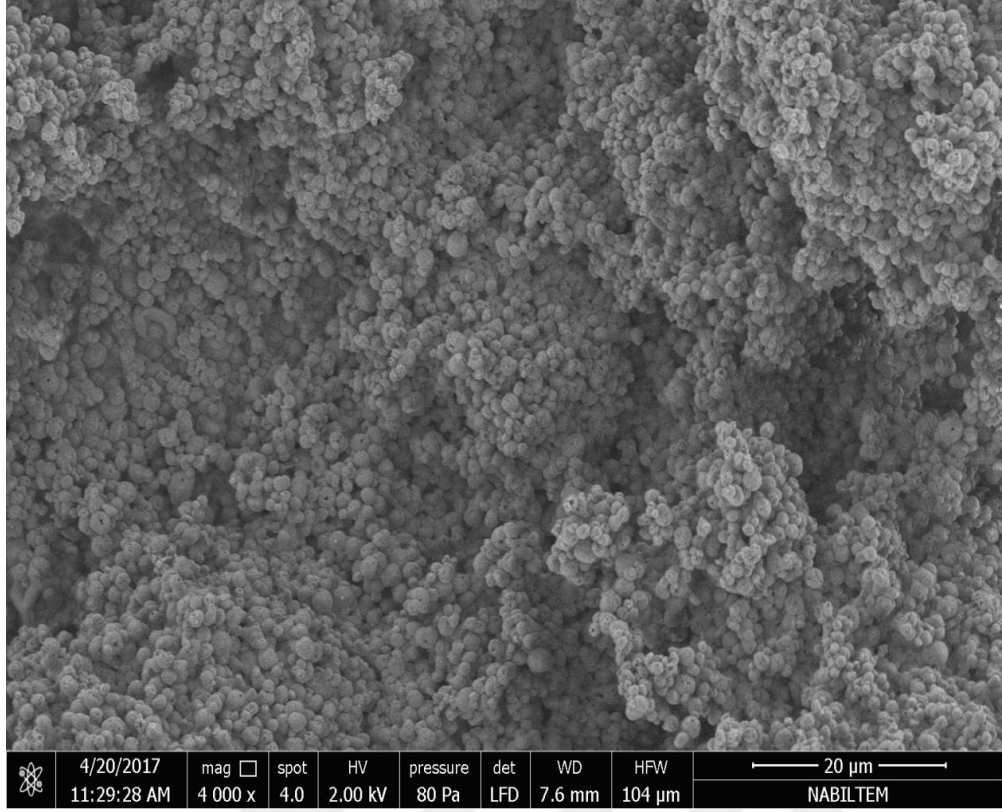
3.1.8 SEM görüntüleri



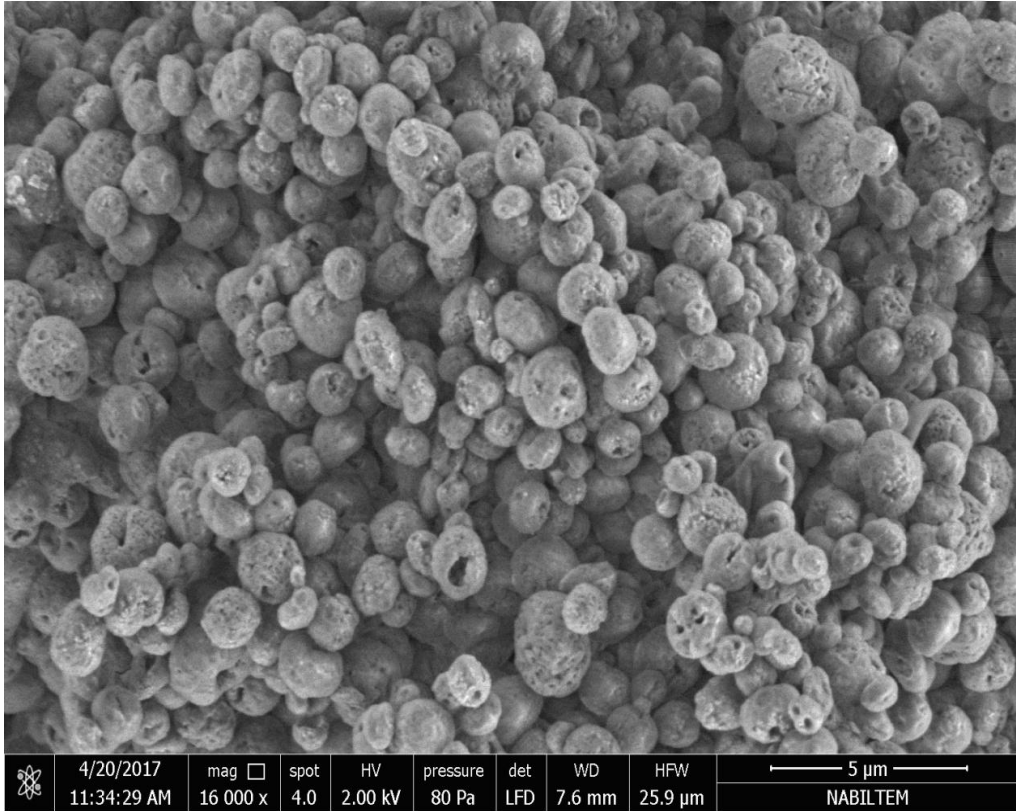
Şekil 3.13 : BAMLET'in 4000 x kat büyütülmüş SEM görüntüsü.



Şekil 3.14 : BAMLET'in 8000 x kat büyütülmüş SEM görüntüsü.



Şekil 3.15 : BAMLET: pektin koaservatının 4000 x kat büyütülmüş SEM görüntüsü(pH3 ve O7 oranı).



Şekil 3.16 : BAMLET: pektin koaservatının 16000 x kat büyütülmüş SEM görüntüsü (pH3 ve O7 oranı).

3.1.9 Enkapsülasyon etkinliği (EE)

Literatürle BAMLET proteininin kapsüllenmesi ile ilgili bir veri mevcut değildir. Çizelge 3.12-ve Çizelge 3.13 BAMLET proteininin kapsülleme verimliliğini göstermektedir. Çizelge 3.12 BAMLET: pektin koaservatının farklı pH değerlerinde kapsülleme verimini gösterirken, Çizelge 3.13 en iyi verim elde edilen pH değeri (pH3) için; farklı oranlarda kapsüllenen BAMLET: pektin koaservatının verim değerlerini göstermektedir. Kapsülleme verimi (%), BAMLET proteininin başlangıç absorbansı ile koaservat içindeki serbest BAMLET proteinin farkının, BAMLET proteininin başlangıç absorbansına bölümünün 100 ile çarpımıyla belirlenmiştir.

Çizelge 3.12 : Farklı pH değerleri için koaservat verimi.

pH	A	B	%Verim
2	0,392±0,003	0,218±0,008	44,5
3	0,396±0,002	0,108±0,005	72,7
4	0,416±0,004	0,203±0,018	51,3
5	0,406±0,001	0,214±0,015	47,3
6	0,460±0,070	0,289±0,100	37,2
7	0,437±0,040	0,296±0,004	32,4
8	0,433±0,036	0,301±0,008	30,6

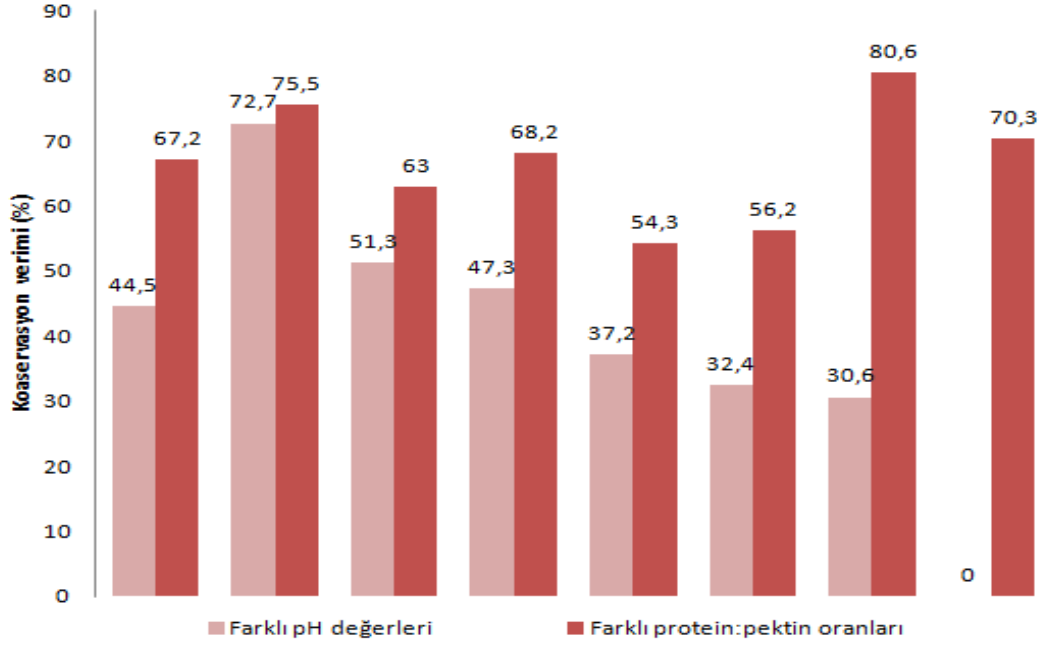
A: BAMLET'in başlangıç absorbansı; B: koaservatı oluşturulmuş BAMLET çözeltisi içindeki serbest BAMLET absorbansı. *Veriler ortalama değerlerdir ve $\pm$ standart sapmaları ile ifade edilmiştir (n=3). Veriler arasında istatistiksel olarak önemli derecede fark bulunamamıştır ($p < 0,05$).

Çizelge 3.13 : Farklı protein: pektin oranlarında koaservat verimi

BAMLET: Pektin oranı	A	B	%Verim
O1	0,396±0,002	0,129±0,017	67,2
O2	0,396±0,002	0,097±0,017	75,5
O3	0,396±0,002	0,146±0,012	63
O4	0,396±0,002	0,125±0,004	68,2
O5	0,396±0,002	0,180±0,009	54,3
O6	0,396±0,002	0,173±0,008	56,2
O7	0,396±0,002	0,076±0,007	80,6
O8	0,396±0,002	0,117±0,010	70,3

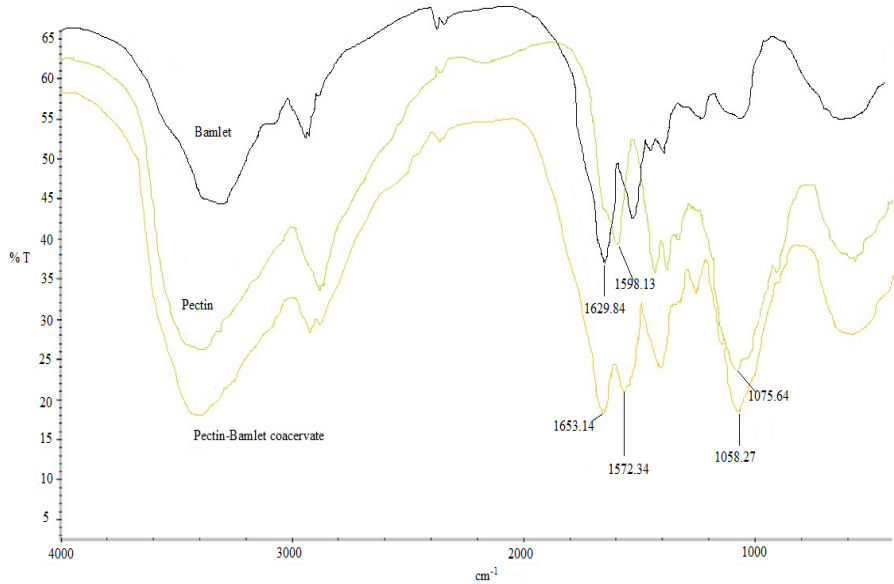
A: BAMLET'in başlangıç absorbansı; B: koaservatı oluşturulmuş BAMLET çözeltisi içindeki serbest BAMLET absorbansı. *Veriler ortalama değerlerdir ve $\pm$ standart sapmaları ile ifade edilmiştir (n=3). Veriler arasında istatistiksel olarak önemli derecede fark bulunamamıştır ($p < 0,05$).

En yüksek verim 80,6 ile O7 (Protein: pektin) arasında gözlenmiştir. Daha önce BAMLET üzerine benzer bir çalışma mevcut olmadığından dolayı kıyaslama yapılamamaktadır.



Şekil 3.17 : Farklı pH değeri ve farklı protein: pektin oranlarına sahip koaservat verimlerinin grafiksel gösterimi

3.1.10. BAMLET/pektin koaservatının FTIR özellikleri:



Şekil 3.18 : BAMLET, pektin ve BAMLET-pektin koaservatın FTIR spektrumları.

BAMLET'in FTIR spektrumu (Şekil 15) emilim bandına göre, 1629 cm^{-1} 'deki düşüş C=O (serbest karboksil grupları) gerilmesi nedeniyle düşüş ve 1536 cm^{-1} N-H bükülmesi (amid II) nedeniyle yükselişi ifade eder (Huang ve diğ., 2012). 1598 cm^{-1} 'deki pik amid III ($-\text{NH}_3^+$ grupları) bağıını ifade eder. BAMLET-pektin koaservatı 1653 cm^{-1} ve 1572 cm^{-1} 'aralığında oluşmuştur, $-\text{COO}^-$ ve $-\text{NH}_3^+$ grupları bu aralıkta titreşim ile gerilmiştir. İki biyopolimer arasındaki koaservasyon karbonil-amid bölgesindeki FTIR'yi değiştirmiştir. $-\text{NH}_3^+$ grupları (1598 cm^{-1} 'de) ve asimetrik karboksil gruplarının ($-\text{COO}^-$); 1629 ve 1536 cm^{-1} 'deki gerilme titreşimleri sırasıyla kaybolmuştur, BAMLET ($-\text{COO}^-$) karboksil grupları ile pektin amin grupları ($-\text{NH}_3^+$) arasındaki elektrostatik etkileşimi göstermiştir. Ayrıca, BAMLET-pektin koaservat spektrumu yaklaşık 3000 cm^{-1} - 3600 cm^{-1} aralığında geniş bir bant göstermiştir. Bu BAMLET ve pektininkine kıyasla güçlendirilmiş bir hidrojen bağı olduğunu gösterir. Ayrıca, hidrojen bağıının BAMLET ve pektin arasındaki etkileşimde de rol aldığı anlaşılır. Elde edilen görüntü literatür ile kıyaslanmış ve aynı yapılar gözlenmiştir (Andishmand ve diğ., 2017; Huang ve diğ., 2012).

Gözlenen diğer bağlar ise: 2867 cm^{-1} 'de. C-H bağıının gerilme titreşimine karşılık gelmiştir. 163 cm^{-1} 'de asetillenmiş birimlerin ($-\text{CONH}_2$ gruplarının) C = O titreşimine atfedilen karakteristik bir amid I bandıdır. 1405 cm^{-1} 'deki zirve, -OH ve -CH'nin titreşiminden kaynaklanmaktadır. 1058 cm^{-1} 'deki bant, C-O-C'nin simetrik gerilmesine karşılık gelir; 1075 cm^{-1} 'de bantlar C-O gerilme titreşimiyle ilişkilendirilmiştir.

3.1.11 BAMLET/pektin koaservatının termal özelliklerinin diferansiyel taramalı kalorimeri ile belirlenmesi (DSC)

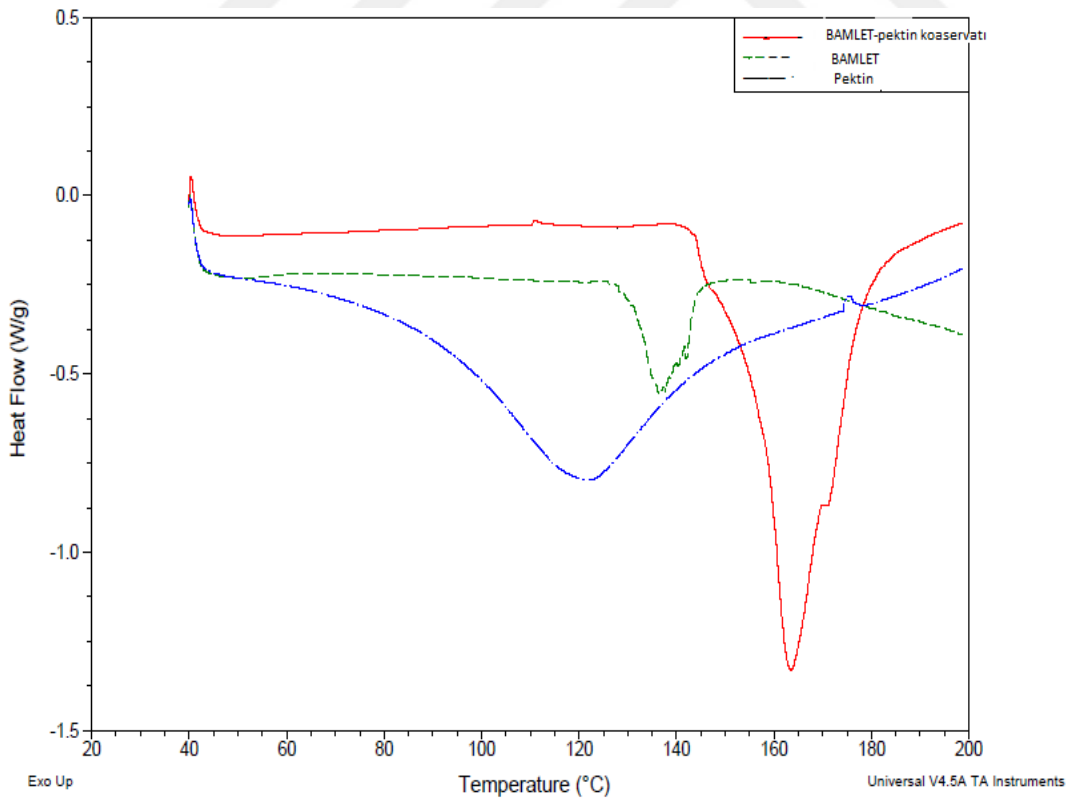
Şekil 3.20. BAMLET, pektin ve BAMLET-pektin koaservatların DSC (TA Instruments Q10) termogramlarını göstermektedir. Örneklerin, denatürasyon sıcaklık aralığı (ΔT_d), denatürasyon pik sıcaklığı (T_d) ve denatürasyon entalpisi (ΔH_d) termogramlardan belirlendi ve Çizelge 3.12.'de gösterildi. BAMLET'in denatürasyon pik sıcaklığı ve denatürasyon entalpisinin ($T_d=136.33^\circ\text{C}$, $\Delta H_d=35.95\text{ j/g}$); püskürtülerek kurutulmuş koaservatın, denatürasyon pik sıcaklığı ve denatürasyon entalpisinden ($T_d=163.57^\circ\text{C}$, $\Delta H_d=261.6\text{ j/g}$) çok daha düşük olduğu gözlemlendi. Püskürtülerek kurutulmuş ve koaservat haline getirilmiş BAMLET proteininin protein haline göre çok daha termal olduğu, daha yüksek tepe denatürasyon sıcaklığı

ve denatürasyon entalpisi gösterdiği böylelikle daha dirençli hale getirildiği ve termal olarak stabilitesinin bu yolla artırılabilceği gözlemlendi (Gee ve diğ., 2016). Ayrıca BAMLET'in püskürtülerek kurutulmuş koaservat içindeki termal kararlılığı, pektinin termal olarak duyarlı materyallerin kapsüllemesi için kullanılmaya elverişli olacağına işaret etmiştir. Bunun dışında püskürtülerek kurutulmamış BAMLET-pektin koaservatının ($T_d=157.6^\circ\text{C}$, $\Delta H_d=104.3$ j/g); püskürtülerek kurutulmuş formuna göre daha az termal özellik gösterdiği ve daha düşük sıcaklıkta hal değişimine uğrayarak denatüre olduğu görülmüştür.

Çizelge 3.14 : BAMLET ve BAMLET-pektin koaservatlarının denatürasyon sıcaklık aralığı (ΔT_d), denatürasyonun pik sıcaklığı (T_d) ve denatürasyon entalpisi (ΔH_d).

Analitler	ΔT_d ($^\circ\text{C}$)	T_d ($^\circ\text{C}$)	ΔH_d (J/g)
A	125.34-149.23	136.33	35.30
C	129.18-198.2	163.57	261.6
D	134.20-198.47	157.6	104.3

A: BAMLET, B: Pektin, C: BAMLET-Pektin koaservatı (Püskürtmeli kurutulmuş), D: BAMLET-Pektin koaservatı (Sıvı)



Şekil 3.19 : BAMLET, Pektin ve BAMLET- Pektin koaservatı tozlarının diferansiyel tarama kalometrik (DSC) termogramları.

3.1.12 Dielektrik özellikler

Çizelge 3.15 : α –laktalbumin, BAMLET ve BAMLET-pektin koaservatının dielektrik sabiti verileri.

Analitler	Dielektrik sabiti (ϵ')	Dielektrik sabiti
	30 Mhz'de	(ϵ'') 3 Ghz'de
A	16.59 ^c $\pm$ 0.33	15.66 ^c $\pm$ 0.22
B	10.05 ^b $\pm$ 0.05	9.81 ^b $\pm$ 0.03
C	78.063 ^a $\pm$ 1.3	76.42 ^a $\pm$ 1.05

A: α -laktalbumin, B: BAMLET, C: BAMLET-pektin koaservatı (pH 3, O7 oranı). *Veriler ortalama değerlerdir ve $\pm$ standart sapmaları ile ifade edilmiştir (n=3). Her kolonda üst indis olarak ifade edilen harflerdeki değişiklikler ortalamalardaki farkların istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir ($p < 0,05$). Sayıların yanında bulunan değişik harfler ise satırlar arasındaki farkların önemli olduğunu gösterir ($p < 0,05$).

Dielektrik sabiti, solventin polaritesi için bir ölçüttür. Çözeltide daha büyük bir dielektrik sabiti olan solventin daha yüksek bir net yük yoğunluğuna sahip olduğu düşünülmektedir (Keun ve diğ., 2004). BAMLET proteininin dielektrik sabiti (10.05 $\pm$ 0.05), diğer tüm gruplardan daha düşük bulundu (Çizelge 3.13). ‘‘Dielektrik sabiti yüksek olduğunda, çözeltideki net yük yoğunluğu yüksek olduğuna göre BAMLET proteininin polaritesi daha az gelişmiştir. BAMLET proteinin polaritesinin, α – laktalbuminin polaritesinden daha düşük olmasının sebebi hidrofobik grupların yoğunluğundan kaynaklanmaktadır. Yağ asitleri bağlanan molekülün bu yönde sonuç vermesi beklenen bir durumdur. Ayrıca UPLC sonuçları ile karşılaştırıldığında; ters faz kromatografisine göre polar lığı daha düşük olan BAMLET sistemden, α – laktalbumin’e göre, daha geç ayrılmıştır. Koaservatın polaritesi(78.063 $\pm$ 1.3) incelendiğinde diğerlerinde önemli derecede farklı olduğu görülmüştür. Yani pektin ile koaservat oluşturma çözeltinin polaritesini önemli derecede geliştirmiştir. Ayrıca her bir örnek için 30 Mhz'de ki değerler 3 Ghz değerindekilerden daha yüksek bulunmuştur. Düşük frekansta dielektrik sabitinin keskin azalması polarite ile açıklanır. Düşük frekanslarda dipoller uygulanan gerilimi takip eder ve dielektrik sabiti polar bileşiklerin ara yüzeyleri ve elektrod polarizasyonları nedeniyle yüksek olarak ölçülür. Yüksek frekanslarda kutupsal bileşikler, uygulanan voltajla hizalamak için yeterli zamana sahip değildir ve dielektrik sabiti düşük bulunur (Sinha ve diğ., 2015). α –laktalbumin için literatüre uygun değerler bulunmuştur (Pitera ve diğ., 2001).



4. SONUÇ

BAMLET, tümorisidal etkiye sahip bir proteindir. Sürdürülebilir bir bileşik olan BAMLET kapsüllenebilir ve değerli bileşiklerin bozunmaya karşı korunması, biyolojik olarak erişilebilirliği ve kontrollü salımını geliştirilebilir. Proteinin istenmeyen çevre koşullarına karşı savunması; basit, maliyet etkin ve yüksek kapsülleme verimi elde edilebilen koaservasyon yöntemi ile sağlanmıştır.

Çalışmanın amacı, pektin ile kaplı HAMLET proteininin koaservasyon yöntemi ile kapsüllenmesidir. Bu amaçla kaplama malzemesinin uygunluğu analiz edilmiş sonrasında koaservat özellikleri incelenmiştir. Ardından koaservat verimi kromatografik yöntemlerle araştırılmıştır. Sonuçlar pektinin BAMLET koaservasyonu için uygun bir polimer olduğunu göstermiştir. Koaservatın yükünün negatif olması pektinin kaplama materyali olarak dış yüzeyde kalabildiğini ve negatif yükünü koaservatın yüküne yansıttığını göstermektedir. Koaservat verimi için en uygun pH, pH 3 olarak belirlenirken; BAMLET: pektin-O7 w/v oranı en iyi oran (%80,6) olarak belirlenmiştir. Bu pH değerinden sonra koaservat verimi hızla düşmüştür (pH 8: %30,6). Koaservat veriminin pH değişimi bize oral biyoyararlanım için istenen pH (pH3)'da sağlandığını göstermektedir. Bu sayede midede sindirilmeden ilerleyen BAMLET proteini bağırsaklarda kaplama materyalinden ayrılmıştır.

Pektinin püskürtülerek kurutulması termal stabilitesini artırmıştır. Bu ilaç formuna getirilirken maruz kalacağı çevresel koşullara karşı dayanımını arttırmıştır. Ayrıca pektin BAMLET proteinini daha hidrofilik bir yapıya dönüştürmüştür.

Yukarıdaki veriler ışığında, BAMLET'in pektin ile kaplanarak tüketimi sırasında stabilitesinin arttırılabileceği ve vücut tarafından biyokullanılabilirliğinin arttırılabileceği savunulabilir.



KAYNAKLAR

- Acar, J., Gökmen V., Us F. (2005),** Meyve Sebze İşleme Teknolojisi Hacettepe Yayınları.
- Ach, D., Briançon , S., Dugas, V., Pelletier, J., Broze, G., & Chevalier, Y. (2015).** Influence of main whey protein components on the mechanism of complex coacervation with Acacia gum. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 481, 367–374. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.06.006>
- Andishmand, H., Tabibiazar, M., & Amin, M. (2017).** International Journal of Biological Macromolecules Pectin-zinc-chitosan-polyethylene glycol colloidal nano-suspension as a food grade carrier for colon targeted delivery of resveratrol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 16–22. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.087>
- Baumann, A., Gjerde, A. U., Ying, M., Svanborg, C., Holmsen, H., Glomm, W. R., ... Halskau, Ø. (2012).** HAMLET Forms Annular Oligomers When Deposited with Phospholipid Monolayers. *Journal of Molecular Biology*, 418(1-2), 90–102. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.02.006>
- Boekema, E. J. (2015).** A passive function of mitochondrial ATP synthase: Target for tumor killer HAMLET. *Journal of Molecular Biology*, 427(10), 1863–1865. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.03.003>
- Carneiro, H. C. F., Tonon, R. V., Grosso, C. R. F., & Hubinger, M. D. (2013).** Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, 115(4), 443–451. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.03.033>
- Champe, P. C., Harvey, R. A., Ferrier, D. R. (2004).** Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry. New York: Lippincott Williams & Wilkins.
- Chong, S., & Ham, S. (2015).** Structural versus energetic approaches for protein conformational entropy. *Chemical Physics Letters*, 627, 90–95. <http://doi.org/10.1016/j.cplett.2015.03.047>
- Ciltas., U., (2014),** diklorofenak etkin maddesinin farmosotik preperatlarda analitik yöntemlerle miktar tayini, Anabilim Dalı : Kimya Programı : Analitik Kimya. (2014).
- Conference, I., & Sciences, P. (2009).** 3 rd BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences. *October*.
- Cui, S., Yao, B., Gao, M., Sun, X., Gou, D., Hu, J., ... Liu, Y. (2017).** Effects of pectin structure and crosslinking method on the properties of crosslinked pectin

- nanofibers. *Carbohydrate Polymers*, 157, 766–774. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.052>
- Çilek, B. (2012). Betül Çilek Tez. *Saudi Med J*, 33(September), 3–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.0703993104>
- Delgado, G. E., Kramer, B. K., Lorkowski, S., Marz, W., von Schacky, C., & Kleber, M. E. (2017). Individual omega-9 monounsaturated fatty acids and mortality? The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Journal of Clinical Lipidology*, 11(1), 126–135.e5. <http://doi.org/10.1016/j.jacl.2016.10.015>
- Delgado, Y., Morales-Cruz, M., Figueroa, C. M., Hernández-Román, J., Hernández, G., & Griebenow, K. (2015). The cytotoxicity of BAMLET complexes is due to oleic acid and independent of the α -lactalbumin component. *FEBS Open Bio*, 5(1), 397–404. <http://doi.org/10.1016/j.fob.2015.04.010>
- Desai, K. G. H., & Park, H. J. (2005). *Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients*. <http://doi.org/10.1081/DRT-200063478>
- Devi, N., Sarmah, M., Khatun, B., & Maji, T. K. (2017). Encapsulation of active ingredients in polysaccharide – protein complex coacervates. *Advances in Colloid and Interface Science*, 239, 136–145. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2016.05.009>
- Devlin, T., (2005). *Textbook of Biochemistry With Clinical Correlations*. New York: Wiley Publishers.
- Dombkowski, A. A., Zakia, K., & Craig, D. B. (2014). Protein disulfide engineering. *FEBS Letters*, 588(2), 206–212. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.11.024>
- Erdo, C., Tez, S., & Yrd, M. A. N. (2008). Prote i n i k i l a ç e t k i n m a d d e l e r i n i n g a s t r o i n t e s t i n a l k a n a l d a s t a b i l i t e r i n i n a r t t i r i l m a s i i ç i n e n t e r i k e n k a p s ü l a s y o n m e t o d u n u n u y g u l a n m a s i .
- Estevinho, B. N., & Rocha, F. (2017). *A Key for the Future of the Flavors in Food Industry: Nanoencapsulation and Microencapsulation*. *Nanotechnology Applications in Food*. Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-811942-6.00001-7>
- Fang, B., Zhang, M., Tian, M., Jiang, L., Yuan, H., & Zheng, F. (2014). Biochimica et Biophysica Acta Bovine lactoferrin binds oleic acid to form an anti-tumor complex similar to HAMLET. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841(4), 535–543. <http://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.12.008>
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2012). 12 Encapsulation Techniques for Food Ingredient Systems.
- Fast, J., Mossberg, A., Nilsson, H., Svanborg, C., Akke, M., & Linse, S. (2005). Compact oleic acid in HAMLET, 579, 6095–6100. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.08.089>
- Fidanci.. E., (2009), ankara üniversitesi ders notları, [http:// 80.251.40.59/ veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/LG-Lipidler.html](http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/LG-Lipidler.html)
- Fontana, A., Spolaore, B., & Laureto, P. P. De. (2013). Biochimica et Biophysica Acta The biological activities of protein / oleic acid complexes reside in the

- fatty acid. *BBA - Proteins and Proteomics*, 1834(6), 1125–1143.
<http://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.02.041>
- Gargaud, M.** (2011). *Encyclopedia of Astrobiology*. Springer Berlin Heidelberg.
<http://doi.org/10.1007/978-3-642-11274-4>
- Gee, P., Gupta, R., Prasad, Y., & Adhikari, B.** (2016). Optimisation of the complex coacervation between canola protein isolate and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 191, 58–66. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.07.008>
- Gharsallaoui, A., & Chambin, O.** (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview, 40, 1107–1121.
<http://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>
- Gida, U., Laboratuvari, R., & Rehberİ, A. U.** (n.d.). Metot validasyonu ve ölçüm belirsizliği hesaplanması.
- Gökmen, S., Palamutoğlu, R., Sariçoban, C.,** (2012). Muş, 1, Üniversitesi, A., Yüksekokulu, M., ... Bölümü, G. M. Gıda Endüstrisinde Enkapsülasyon Uygulamaları. *Electronic Journal of Food Technologies Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi Electronic Journal of Food Technologies*, 7(71), 36–5036.
- Groves, M. J.** (2006). *PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY*, Taylor& Francis Group.
- Guo, X., Zhang, T., Meng, H., & Yu, S.** (2017). Food Hydrocolloids Ethanol precipitation of sugar beet pectins as affected by electrostatic interactions between counter ions and pectin chains. *Food Hydrocolloids*, 65, 187–197.
<http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.010>
- Gür, F., Güzel, M., Öncül, N., Yıldırım, Z., & Yıldırım, M.** (2010). Süt Serum Proteinleri ve Türevlerinin Biyolojik ve Fizyolojik Aktiviteleri. *Akademik Gıda*, 8(1), 23–31.
- Güzel, M.** (2017). Turunçgil Kabuklarından Elde Edilen Pektinlerin Karakterizasyonu ve Karşılaştırılması, 15(1), 17–28.
<http://doi.org/10.24323/akademik-gida.304274>
- Hakansson, A., Zhivotovskyt, B., Orrenius, S., Sabharwal, H., & Svanborg, C.** (1995). Apoptosis induced by a human milk protein, 92(August), 8064–8068.
- Hernández-ledesma, B., & Dávalos, A.** (2005). Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from ?? -Lactalbumin and ?? - Lactoglobulin . Identification of Active ..., (November 2015). <http://doi.org/10.1021/jf048626m>
- Horovitz, A.** (n.d.). Double-mutant cycles: a powerful tool for analyzing protein structure and function Amnon Horovitz, 121–126.
- Huang, G., Sun, Y., Xiao, J., & Yang, J.** (2012). Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan, 135, 534–539.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.140>
- Jiang, Z., Yuan, X., Yao, K., Li, X., & Zhang, X.** (2017). LWT - Food Science and Technology Laccase-aided modification: Effects on structure, gel properties and antioxidant activities of a -lactalbumin, 80, 355–363.
<http://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.043>
- Jones, O. G., Lesmes, U., Dubin, P., & Julian, D.** (2010). Effect of polysaccharide charge on formation and properties of biopolymer nanoparticles created by heat

- treatment of b -lactoglobulin – pectin complexes. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 374–383. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.11.003>
- Jr, F. Y., Zhang, M., Chen, J., & Liang, Y.** (2006). Structural changes of α lactalbumin induced by low pH and oleic acid, 1764, 1389–1396. <http://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.06.012>
- Jung, S., Lee, S., Lee, H., Yoon, J., & Lee, E. K.** (2016). Oleic acid-embedded nanoliposome as a selective tumoricidal agent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 585–589. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.06.058>
- Kamijima, T., Ohmura, A., Sato, T., Akimoto, K., Itabashi, M., Mizuguchi, M., ... Demura, M.** (2008). Heat-treatment method for producing fatty acid-bound alpha-lactalbumin that induces tumor cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376(1), 211–214. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.127>
- Keun, W., Ho, J., Seung, T., & Ho, W.** (2004). The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly (ethylene oxide) fibers, 45, 2959–2966. <http://doi.org/10.1016/j.polymer.2004.03.006>
- Kiryukhin, M. V.** (2018). ScienceDirect Active drug release systems : current status , applications and perspectives. *Current Opinion in Pharmacology*, 18, 69–75. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2014.09.010>
- Konukoğlu, D.** (2008). Omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin özellikleri ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkileri. *Türk Aile Hek. Derg.*, 13(3), 121–129. <http://doi.org/10.2399/tahd.08.121>
- Köse K.,** (2006), Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya AD, Kayseri-ders notları.
- Kumar, S., & Nussinov, R.** (2002). Close Range Electrostatic Interactions in Proteins Close-Range Electrostatic Interactions in Proteins, 604–617.
- Leurs, U., Mistarz, U. H., & Rand, K. D.** (2015). Getting to the core of protein pharmaceuticals - Comprehensive structure analysis by mass spectrometry. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93, 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.012>
- Liu, C., Guo, X., Liang, R., Liu, W., & Chen, J.** (2017). Food Hydrocolloids Alkylated pectin : Molecular characterization , conformational change and gel property. *Food Hydrocolloids*, 69, 341–349. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.008>
- Liu, W., Chen, X. D., & Selomulya, C.** (2015). Particuology On the spray drying of uniform functional microparticles. *Particuology*, 22, 1–12. <http://doi.org/10.1016/j.partic.2015.04.001>
- Mierczy, J., Cybulska, J., & Zdunek, A.** (2017). Rheological and chemical properties of pectin enriched fractions from different sources extracted with citric acid, 156, 443–451. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.042>
- Mcclements, D. J.** (2015). Encapsulation , protection , and release of hydrophilic active components : Potential and limitations of colloidal delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 219, 27–53. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2015.02.002>

- Naqash, F., Masoodi, F. A., Rather, S. A., Wani, S. M., & Gani, A.** (2017). Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin — A Review. *Carbohydrate Polymers*, 168, 227–239. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.058>
- Neill, G. J. O., Egan, T., Jacquier, J. C., Sullivan, M. O., & Riordan, E. D. O.** (2014). Whey microbeads as a matrix for the encapsulation and immobilisation of riboflavin and peptides. *FOOD CHEMISTRY*, 160, 46–52. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.002>
- Pehlivan F.** (1997): Biyofizik. Hacettepe Taş Kitapçılık 2.Baskı, Ankara
- Pettersson, J., Mossberg, A., & Svanborg, C.** (2006). a -Lactalbumin species variation, HAMLET formation, and tumor cell death, 345, 260–270. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.04.081>
- Pitera, J. W., Falta, M., & Gunsteren, W. F. Van.** (2001). Dielectric Properties of Proteins from Simulation: The Effects of Solvent , Ligands , pH , and Temperature. *Biophysical Journal*, 80(6), 2546–2555. [http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76226-1](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76226-1)
- Podust, V. N., Balan, S., Sim, B., Coyle, M. P., Ernst, U., Peters, R. T., & Schellenberger, V.** (2016). Extension of in vivo half-life of biologically active molecules by XTEN protein polymers. *Journal of Controlled Release*, 240, 52–66. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.038>
- Ray, S., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R.** (2016). Food Bioscience An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience*, 13, 76–83. <http://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.009>
- Se, G.** (2004). Micro- encapsulation : industrial appraisal of existing technologies and trends, 15, 330–347. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.10.005>
- Shahid, S., Hassan, I., Islam, A., & Ahmad, F.** (2017). Biochimica et Biophysica Acta Size-dependent studies of macromolecular crowding on the thermodynamic stability , structure and functional activity of proteins : in vitro and in silico approaches. *BBA - General Subjects*, 1861(2), 178–197. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.11.014>
- Sheu, S., Selzle, H. L., Schlag, E. W., & Yang, D.** (2008). The effect of entropy on protein hydrogen bonds, 462, 1–5. <http://doi.org/10.1016/j.cplett.2008.04.129>
- Sinha, S., Chatterjee, S. K., Ghosh, J., and Meikap, A. K.** (2015). Electrical transport properties of polyvinyl alcohol–selenium nanocomposite films at and above room temperature. *Journal of Materials Science* 50, 1632–1645
- Simopoulos, A. P.** (1989). Chapter 16 Fatty Acids, (Harris), 355–392.
- Sosnik, A., & Seremeta, K. P.** (2015). Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 223, 40–54. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2015.05.003>
- Steele, J. A. M., Hallé, J., Poncelet, D., & Neufeld, R. J.** (2014). Therapeutic cell encapsulation techniques and applications in diabetes ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 67–68, 74–83. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2013.09.015>

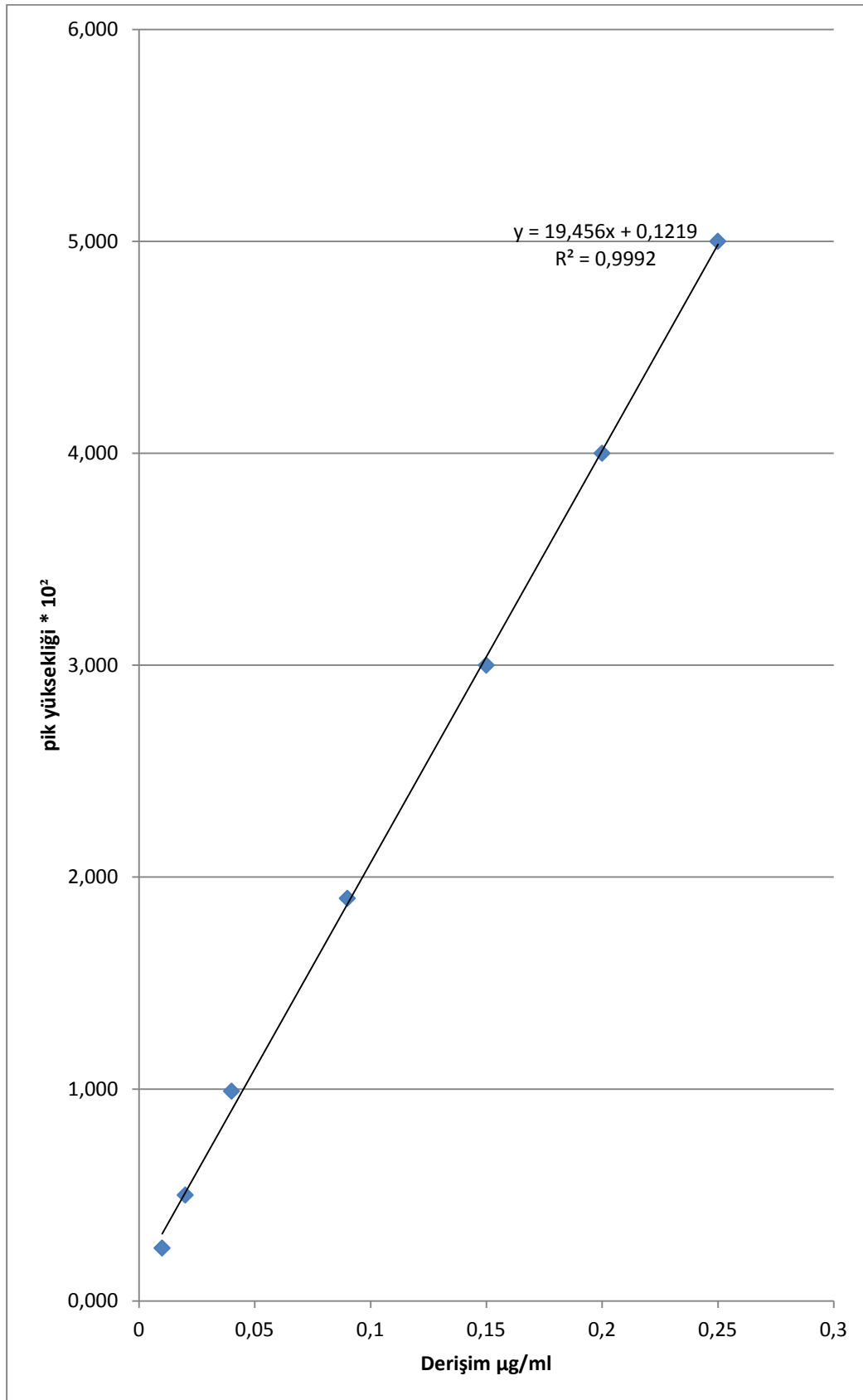
- Svanborg, C., Agerstam, H., Aronson, A., Bjerkvig, R., Diiringer, C., Fischer, W., ... Svensson, M.** (2003). HAMLET Kills Tumor Cells by an Apoptosis-Like Mechanism Cellular , Molecular , and Therapeutic Aspects.
- Svensson, M., Håkansson, A., Mossberg, A., Linse, S., & Svanborg, C.** (2000). Conversion of a -lactalbumin to a protein inducing apoptosis, 97(8).
- The United States Pharmacopeial Convention.** (2009). Pharmacists' Pharmacopeia. *United States Pharmacopeia and National Formulary, Author. Rockville: United States Pharmacopeial Convention Inc; 2002. USP 25, NF 19., 131.* <http://doi.org/ISSN: 1930-2908>
- Tolin, S., Franceschi, G. De, Spolaore, B., Frare, E., Canton, M., Laureto, P. P. De, & Fontana, A.** (2010). The oleic acid complexes of proteolytic fragments of a -lactalbumin display apoptotic activity, 277, 163–173. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07466.x>
- Tran, T. T., Vo, T. Van, & Tran, P. H.** (2015). Design of iron oxide nanoparticles decorated oleic acid and bovine serum albumin for drug delivery. *Chemical Engineering Research and Design*, 94, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2014.12.016>
- Wang, X., Li, X., Chen, L., Xie, F., Yu, L., & Li, B.** (2011). Preparation and characterisation of octenyl succinate starch as a delivery carrier for bioactive food components. *Food Chemistry*, 126(3), 1218–1225. Wen, H., Glomm, W. R., & Halskau, O. (2013). Cytotoxicity of bovine alpha-lactalbumin: oleic acid complexes correlates with the disruption of lipid membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1828(11), 2691–2699. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.07.026> <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.006>
- Wijaya, W., Van der Meeren, P., & Patel, A. R.** (2017). Cold-set gelation of whey protein isolate and low-methoxyl pectin at low pH. *Food Hydrocolloids*, 65, 35–45. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.037>
- Zhu, F.** (2017). Encapsulation and delivery of food ingredients using starch based systems. *Food Chemistry*, 229, 542–552. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.101>
- Url-1** <<http://www.mustafaaltinisik.org.uk> erişim tarihi 20.03.2017

EKLER

Ek A. HPLC yöntem kalibrasyon eğrisi



Ek A



Şekil A.1. HPLC yöntem kalibrasyon eğrisi

ÖZGEÇMİŞ



Ad-Soyad : Reyhan KOYUNCU
Doğum Tarihi ve Yeri : 01.02.1984, KOCAELİ
E-posta : koyuncureyhan1@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2013, Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Fakültesi, Gıda Mühendisliği
- **Yüksek Lisans** : 2017, İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği