

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**FARKLI TAHIL UNLARI VE BU UNLARDAN
ÜRETİLEN EKMEKLERDE PROTEAZ
İNHİBİTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI:
FERMANTASYON, PIŞIRME VE *İN VİTRO*
SİNDİRİMİN TRİPSİN VE KİMOTRİPSİN İNHİBİTÖR
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Mine KÖSTEKLİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sibel KARAKAYA

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 614.01.00

Sunuş Tarihi : 18.09.2009

Bornova - İZMİR

2010

ÖZET

FARKLI TAHIL UNLARI VE BU UNLARDAN ÜRETİLEN EKMEKLERDE PROTEAZ İNHİBİTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI; FERMANTASYON, PIŞİRME VE *İN VİTRO* SİNDİRİMİN TRİPSİN-KİMOTRİPSİN İNHİBİTÖR AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

KÖSTEKLİ, Mine

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Sibel KARAKAYA

Ocak, 2010, 75 sayfa

Geçmişte, diyet ile alınan proteinlerin sindirilirliğini azalttığı gerekçesiyle antinütrisyonel öğeler olarak değerlendirilen proteaz inhibitörlerinin günümüzde antikarsinojenik özelliklerinin çeşitli *in vitro* ve *in vivo* sistemlerde saptanmasıyla potansiyel biyolojik aktivitelerinden farmakoloji ve tıp alanında yararlanılabileceği düşüncesi oluşmuştur.

Bu çalışmada ülkemizde üretimi yapılan tahıllardan elde edilen buğday, çavdar, karışık tahıllı ve tam buğday unları, bu unlardan üretilen fermente ekmekek hamurları ve ekmekekler materyal olarak kullanılmıştır. Örneklerin tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitelerini belirlemek, bu aktiviteler üzerinde fermantasyon ve pişirmenin etkisini araştırmak amaçlanmıştır. Ayrıca buğday ve çavdar ekmeği çeşitlerine *in vitro* sindirim uygulanarak sindirimin tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitesi üzerine etkisi saptanmıştır.

Çalışma sonunda tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitesinin tahıl çeşidine bağlı olarak değiştiği görülmüştür. En yüksek tripsin inhibisyon aktivitesi 257 ± 36.39 TİU/ g kuru madde örnek ile karışık tahıllı unda, kimotripsin aktivitesi ise 72.64 ± 8.28 KİU/g kuru madde örnek ile çavdar ununda saptanmıştır. Çavdar unundan elde edilen ve moleküler ağırlığı 20 000 Da olan fraksiyonda 133.82 ± 17.72 TİU/ g kuru madde örnek tripsin inhibisyon aktivitesi ve 10.20 ± 1.22 KİU/g kuru madde örnek kimotripsin inhibisyon aktivitesi belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Proteaz inhibitörleri, tam buğday unu, çavdar unu, tahıl karışımı unu, ekmekek, tripsin-kimotripsin inhibisyon aktivitesi

ABSTRACT
PROTEASE INHIBITORS IN VARIOUS CEREAL FLOURS AND
BREADS: EFFECTS OF FERMENTATION, BAKING AND *IN VITRO*
DIGESTION ON TRYPSIN AND CHYMOTRYPSIN INHIBITORY
ACTIVITY

KÖSTEKLİ, Mine

MSc in Food Eng.

Supervisor: Prof. Dr. Sibel KARAKAYA

January 2010, 75 pages

In recent years an attitude on the potential health benefits of protease inhibitors which are accepted as antinutritional substances according to the previous scientific data, and possible uses of them in medicine and pharmacology by the light of *in vitro* and *in vivo* study results has been developed.

In this study various flours namely wheat, rye, mixed cereals and whole wheat flours and their fermented doughs and breads are used as materials. The aim of the study is to determine trypsin and chymotrypsin inhibitory activities of materials and to determine effects of fermentation and baking on these inhibitory activities. In addition effect of *in vitro* digestion on trypsin and chymotrypsin inhibitory activities in wheat and rye breads are determined.

It was found that trypsin and chymotrypsin inhibitory activities depend on the kind of cereals. The highest trypsin inhibitory activity was found in mixed cereal flour as 257 ± 36.39 TIU/g sample dry matter (dm), while the highest chymotrypsin inhibitory activity was determined rye flour as 72.64 ± 8.28 KIU/g sample (dm). Fraction with molecular weight greater than 20 000 Da obtained from rye flour protein fractions, possessed trypsin and chymotrypsin inhibitory activities 133.82 ± 17.72 TIU/g sample (dm) and 10.20 ± 1.22 KIU/g sample (dm), respectively.

Key words: Protease inhibitors, whole wheat flour, rye flour, mixed cereal flour, bread, tyripsin inhibitory activity, chymotyprsin inhibitory activity.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü konuda değerli görüş ve tecrübelerini benimle paylaşan, yardımını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sibel KARAKAYA' ya sabrı ve özverisi için,

İhtiyaç duyduğum her durumda desteğini hissettiğim, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak çalışmalarına katkıda bulunan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sedef Nehir El'e,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımları ve yol göstericiliği için Ar. Gör. Şebnem ŞİMŞEK ve yüksek lisans öğrencisi çalışma arkadaşlarıma,

Çalışmada kullanılan örneklerin teminini sağlayan Gıda Müh. Ali Nişancı' ya,

Hayatım boyunca bana maddi ve manevi destek olan sevgili aileme çalışmalarım sırasında en sıkıntılı anlarımda sağladıkları motivasyon, gösterdikleri sabır ve anlayış için sonsuz teşekkür ederim

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2. 1 Biyoaktif Peptitler	3
2.2 Proteazlar ve Proteaz İnhibitörleri.....	4
2.3 Proteaz İnhibitörlerinin Kaynakları.....	6
2. 4 Bitkisel Kaynaklı Proteaz İnhibitörleri.....	8
2.4.1 Soya (<i>Glycine Max</i>).....	8
2.4.2 Börülce (<i>Vigna unguiculata</i>).....	8
2.4.3 Lima Fasulyesi (<i>Phaseolus lunatus</i>).....	9
2.4.4 Fasulyeler (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	9
2.4.5 Bakla (<i>Vicia faba</i>).....	9
2.4.6 Winged fasulyesi (<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>).....	9
2.5 Proteaz İnhibitörlerinin Sağlık Üzerine Etkileri.....	10
2. 6 Bowman-Birk İnhibitörleri.....	12
2.7 Proteaz İnhibitörleri ve Antioksidan Etkileri	17
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER	18
3. 1 Materyal.....	18
3.1.1 Kimyasal Malzeme	20
3.2 Yöntem	21
3.2.1 Kullanılan Cihazlar.....	21
3.3 Analizler	22

3.3.1 Ham madde nem içeriklerinin belirlenmesi.....	24
3.3.1.1 Un örnekleri.....	24
3.3.1.2 Ekmek örnekleri	24
3.3.1.3 Hamur örnekleri.....	25
3.2.2 Ham madde protein içeriklerinin belirlenmesi	25
3.2.3 Hammaddeden protein ekstraktlarının elde edilmesi:	26
3.2.3.1 I. Aşama.....	26
3.2.3.2 II. Aşama	26
3.2.3.3 SPE eldesi aşamasında protein kaybının hesaplanması.....	27
3.2.4 Tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitesi gösteren çavdar unu SPE' deki proteinlerin molekül ağırlıklarına göre fraksiyonlara ayrılması.....	28
3.2.5 Ekmek örneklerine <i>in vitro</i> sindirim uygulanması	28
3.2.6 Hammaddeden elde edilen İPE ve SPE'nin ve <i>in vitro</i> sindirim uygulanan örneklerden elde edilen mide ve bağırsak diyalizatlarının protein miktarlarının belirlenmesi: 30	
3.2.6.1 Bradford yöntemi ile protein tayini:	30
3.2.6.2 Tripsin inhibisyon aktivitesi tayini :	30
3.2.6.3 Kimotripsin inhibisyon aktivitesi tayini;	32
3.3 İstatistiksel Analiz	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	34
4.1 Hammaddelerin Nem İçerikleri	34
4.2 Hammaddelerin Protein İçerikleri	36
4.3 Hammaddeden elde edilen protein ekstraktlarına ait protein içerikleri ile tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktiviteleri.....	38
4.3.1 İlk protein ekstraktı (İPE)	38
4.3.1.1 İPE protein içerikleri	38
4.3.1.2 İPE tripsin inhibisyon aktivitesi	42
4.3.1.3 İPE kimotripsin inhibisyon aktivitesi	46
4.3.2 Son protein ekstraktı (SPE)	49
4.3.2.1 SPE protein içerikleri	49
4.3.2.2 SPE tripsin inhibisyon aktivitesi	51
4.3.2.3 SPE kimotripsin inhibisyon aktivitesi	52

4.3.3 Çavdar unundan elde edilen SPE deki proteinlerin ultrafiltrasyon yöntemi ile fraksiyonlara ayrılması	55
4.3.4 <i>In vitro</i> sindirim işleminin buğday ve çavdar ekmeğinin tripsin inhibisyon aktivitesi üzerine etkisi.....	56
5. SONUÇ.....	61
6. ÖNERİLER	65
EK 1. Beklenen doygunluk %'sine ulaşmak için gerekli olan amonyum sülfat miktarları çizelgesi.....	73
EK 2. Bradford Kalibrasyon Grafiği	74
ÖZGEÇMİŞ.....	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.3 Deneme Planı	23
Şekil 4.3.1.1 (a) Tahıl unları, fermente hamur ve ekmeklerden elde edilen İPE' lerin protein içerikleri	40
Şekil 4.3.1.2 Tahıl unları, fermente hamur ve ekmeklerden elde edilen İPE' lerde saptanan tripsin inhibisyon aktiviteleri.....	45
Şekil 4.3.1.3 Tahıl unları, fermente hamur ve ekmeklerden elde edilen İPE' lerde saptanan kimotripsin inhibisyon aktiviteleri.....	48
Şekil 4.3.2.1 (a) Buğday ekmeği, çavdar unu ve çavdar ekmeği İPE ve SPE' lerinin protein miktarları	51
Şekil 4.3.2.3 Buğday ekmeği, çavdar unu ve çavdar ekmeği SPE' lerinin tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktiviteleri	53
Şekil 4.3.2. 4 Çavdar unu, çavdar ekmeği ve buğday ekmeği İPE ve SPE' lerinin tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktiviteleri.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan ekmeklerin yapımında kullanılan bileşenler	19
Çizelge 4.1 Buğday, çavdar, karışık tahıllı ve tam buğday unları ile bu unlardan elde edilen fermente ekmek hamurları ve ekmeklerin nem içerikleri	34
Çizelge 4.2 Çalışmada ekmekler için elde edilen nem değerlerinin TGK' de verilen nem değerleriyle karşılaştırılması.....	35
Çizelge 4.2 Çeşitli tahıllardan elde edilen un, fermente hamur ve ekmeklerin protein içerikleri.....	36
Çizelge 4.3.1.1(a) Tahıl unları, fermente hamur ve ekmeklerden elde edilen İPE' nin protein içerikleri (mg protein/mL İPE)	39
Çizelge 4.3.1.1 (b) Tahıl unları, fermente hamur ve ekmeklerden elde edilen İPE' nin protein içerikleri (mg protein/ g KM örnek).....	40
Çizelge 4.3.1.2 (a) Tahıl unları, fermente hamur ve ekmeklerden elde edilen İPE' lerin tripsin inhibisyon aktivitesi (TİU/mg protein)	43
Çizelge 4.3.1.2 (b) Tahıl unları, fermente hamur ve ekmeklerden elde edilen İPE' lerin tripsin inhibisyon aktivitesi (TİU/g KM örnek).....	44
Çizelge 4.3.1.3 (a) Tahıl unları, fermente hamur ve ekmeklerden elde edilen İPE' lere saptanan kimotripsin inhibisyon aktivitesi (KİU/mg protein).....	47
Çizelge 4.3.1.3 (b) Tahıl unları, fermente hamur ve ekmeklerden elde edilen İPE' lere saptanan kimotripsin inhibisyon aktivitesi (KİU/g KM örnek).....	47
Çizelge 4.3.2.1(a) Buğday ekmeği, çavdar unu ve çavdar ekmeği İPE' lerinden elde edilen SPE' lere ait protein değerleri.....	50
Çizelge 4.3.2.1 (b) Buğday ekmeği, çavdar unu ve çavdar ekmeği İPE' lerinden SPE eldesinde meydana gelen protein kaybı.....	50
Çizelge 4.3.2.3 Buğday ekmeği, çavdar unu ve çavdar ekmeği İPE' lerinden elde edilen SPE' lere ait kimotripsin inhibisyon aktivitesi	52
Çizelge 4.3.3 F3 fraksiyonunun tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitesi.	56
Çizelge 4.3.4.1 Buğday ve çavdar ekmekleri mide ve bağırsak diyalizatları protein içerikleri.....	57
Çizelge 4.3.4.2 Buğday ve çavdar ekmekleri mide ve bağırsak diyalizatları tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktiviteleri.....	57
Çizelge 4.3.4.3 Fermantasyon, pişirme ve ikisinin ortak etkisinin tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitesi üzerine etkisi.....	59

1. GİRİŞ

Günümüzde bireylerin beslenme biçimi yaşamın sürdürülebilmesi ve açlığın giderilmesi anlayışından sağlıklı ve iyi olma halini sağlama amacı yönünde değişim göstermektedir. Biyokimya, hücre biyolojisi ve fizyoloji ile ilgili son gelişmeler, beslenme biçiminin vücuttaki çeşitli fonksiyonları etkileyerek bazı hastalık risklerinin azaltılması için gerekli sağlıklı olma halini sağladığı hipotezini desteklemektedir (Karakaya ve El, 2006).

20. yüzyılın son çeyreğinde, çeşitli klinik ve epidemiyolojik çalışmaların sonuçlanmasıyla beslenme biçiminin, yaşam tarzı ve bireyin alışkanlıklarıyla beraber sağlığı önemli oranda etkilediği görülmüştür. Bu durum çeşitli hastalıklardan korunmada ve bireyin iyi olma halinin sağlanmasında beslenme biçiminin önemini ortaya koymaktadır. Bu önem doğrultusunda tüketiciler mevcut sağlıklarını korumaya yardımcı ve çeşitli hastalıklardan koruyucu etkisi bilenen gıdaların tüketimine yönelmiştir. Tüketicide oluşan bu bilinç gıda üreticilerini olduğu kadar beslenme bilimi konusunda çalışanları da yakından ilgilendirmektedir. Bu nedenle son yıllarda insan beslenmesi ile ilgili bilimsel çalışmalar biyoaktif ve fonksiyonel özelliklere sahip bazı gıda ve gıda bileşenlerinin ve bu bileşenlerin insan sağlığı üzerine olumlu etkilerinin araştırılmasına odaklanmıştır.

Sebebi bilinen ölümler sıralamasında kalp ve damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alan kanser önemli bir halk sağlığı problemidir. Bilindiği üzere kanserin görülme sıklığı ve kansere bağlı ölüm oranları tüm dünyada her geçen gün artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 2005 yılında tüm dünyada toplam 58 milyon ölüm vakasının 7.6 milyonu kanser nedeniyle gerçekleşmiştir. Yapılan istatistikler, 2015 yılında 9 milyon, 2030 yılında ise 11.4 milyon insanın ölüm nedeninin kanser olabileceğine işaret etmektedir (DSÖ, 2009). Ayrıca sağlık harcamaları oldukça yüksek olan kanser hastalığı ülke ekonomisini de olumsuz etkilemektedir. Bunun yanı sıra iş gücü ve performans kaybına da neden olmaktadır. Beslenme biçimi ile ilişkisi araştırılan hastalıkların başında kanser

hastalığı gelmektedir. Tüm bu nedenlerle kanser hastalığının tedavisi ve önlenmesi için her geçen gün beslenme ile ilgili bazı alternatifler sunulmaktadır.

Beslenme modellerinde bitkisel gıdalara ağırlık veren toplumlarda kanserin görülme sıklığı daha düşükken Batı ülkelerinde kolon, meme ve prostat kanserlerinin görülme sıklığı yüksektir (Chavez and Chavez, 1998). Bu durum kanser hastalığının sadece genetik faktörlerle ilgili olmadığını, çevresel faktörler ve beslenme biçimi ile de ilişkili olduğu hipotezini desteklemektedir (Ferrasson et al., 1997). Örneğin, Japonya’ da biyoaktif bileşiklerce zengin soya fasulyesi ve ürünlerinin tüketiminin oldukça yüksek olduğu bilinmektedir. Soya fasulyesi ve ürünlerinin tüketiminin yüksek olduğu ülkelerde kansere bağlı ölümlerin oldukça düşük olduğu belirtilmektedir (Kennedy, 1998).

Bazı bilimsel araştırmalarda kontrolsüz protein sentezi olarak tanımlanan kanser hastalığının anahtar faktörü olan proteolitik aktivitenin, proteaz inhibitörleri ile kontrol altına alınmasının aşırı proteolizi önleyeceği ve antikarsinojenik etki yaratacağı savunulmuştur (Ferrasson et al., 1997; Rao and Suresh, 2007). Bunun yanı sıra proteaz inhibitörlerinin reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellemesi sayesinde kanser oluşumunu/gelişimini baskılayabildiğine dikkat çeken çalışmalar da mevcuttur (Frenkel et al., 1987; Hou et al., 2001). Araştırmaların antikarsinojenik proteaz inhibitörlerinin çeşitli *in vivo* ve *in vitro* sistemlerde söz konusu etkiyi yaratabildiğini göstermesi bilim dünyasını proteaz inhibitörlerinin doğal gıda kaynaklarını araştırmaya yöneltmiştir.

İnsanoğlunun toplayıcılık devresinde ilk depolayabilip, tüketebildiği gıda maddesi, buğday tohumlarıdır. İnsanoğlu M.Ö. 72 bin’de taneyi kırarak, ateşin bulunmasıyla birlikte kavurarak, su ile hamur yapıp pişirerek (Chapati) ve M.Ö. 150 yıllarında Mısır’da ilk mayalı ekmeği pişirerek, bugünkü teknolojik konumuna getirmiştir (Elgün ve Ertugay, 1995).

Tahıla dayalı beslenmenin hakim olduğu toplumlarda olduğu gibi Türkiye’ de ekmek hem doyurucu hem de ucuz olması nedeniyle günlük

beslenmenin temel bir bileşenidir. Kişi başına yıllık ekmek tüketiminin; Avustralya'da 44 kg, Mısır'da 180 kg, İran'da 150 kg, İtalya'da 73 kg, Kuveyt' de 98 kg, Suriye'de 130 kg, ABD'de 34 kg olduğu belirtilmektedir. Ülkemizde ise bu miktarın ortalama 60 kg olduğu rapor edilmektedir. Yıllar içerisinde tüketici beslenme alışkanlıklarındaki değişiklik, daha farklı ekmek çeşitlerinin talebi, gelişen teknoloji ile söz konusu talebin karşılanabilir olması günümüzde marketlerde ekmek çeşitliliği oldukça artmıştır. Bu çeşitlilik, ekmeğin temel yapım maddesi olan tahılın veya buğdayın türüne, un işlenirken uygulanan saflaştırma derecesine, eklenen diğer gıda bileşenlerine ve katkı maddelerine, hazırlama/pişirme işlemlerine bağlı olarak değişmektedir (Karaağaoğlu ve ark, 2008).

Bu çalışmada buğday, çavdar, karışık tahıllı ve tam buğday unları, ekmek üretim aşamalarından olan son fermantasyondan alınan ekmek hamurları ve ekmeklerin tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitelerinin belirlenmesi, böylece söz konusu inhibisyon aktiviteleri üzerine fermantasyon ve pişirmenin etkisinin ortaya konması amaçlanmıştır. Ayrıca ekmek çeşitlerine *in vitro* sindirim uygulanarak sindirimin tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitesi üzerine etkisinin saptanması hedeflenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2. 1 Biyoaktif Peptitler

Biyolojik olarak aktif peptitler sahip oldukları besleyici değere ek olarak insanlar üzerinde hormon benzeri fizyolojik etkiye sahip gıda bileşenleri olarak tanımlanmaktadır. Fizyolojik fonksiyonları yönetme ve iyileştirme etkileri ile biyoaktif bileşiklerin kronik hastalıklardan korunmada ve bu hastalıkların önlenmesinde alternatif oluşturabileceği düşünülmektedir. Biyoaktif bileşikler çeşitli bitkisel kaynakların yanı sıra süt, yumurta, kırmızı et ve balık gibi hayvansal gıdalarda da bulunmaktadır. Buldukları protein yapısında inaktif olan biyoaktif peptitler mide ve bağırsak sindirimi sırasında enzimatik hidroliz yoluyla veya çeşitli gıda işleme yöntemleri (peynir üretimi, süt fermantasyonu vb.) sırasında ortaya çıkabilmektedir. Biyoaktif peptitler

sindirim sonrasında ince bağırsaktan emilerek kan dolaşımına karışabileceği gibi sindirim sisteminde lokal etki gösterebilmektedir. Biyoaktif peptitlerin aminoasit dizilimlerine bağlı olarak farklılaşan etkileri arasında mineral bağlama kapasitesi, bağışıklık sistemini düzenleyici etki, antimikrobiyal, antioksidan, antitrombotik ve hipokolesterolemik özellik ve antihipertansif etki sayılmaktadır. Birçok biyoaktif bileşik birden çok fonksiyona sahiptir ve bahsedilen etkilerden bir kaçını bir arada gösterebilmektedir (Erdmann et al 2008). Sağlık üzerine olumlu etkileri sayesinde fonksiyonel gıda bileşeni olarak kullanılabilme potansiyeline sahip biyoaktif peptitler ile ilgili araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır.

2.2 Proteazlar ve Proteaz İnhibitörleri

Proteazlar gıdaların sindirilmesi, doku farklılaşması, kan pıhtılaşması, enzim ve hormon öncül maddelerinin aktivasyonu gibi birçok fizyolojik ve fizyopatolojik olayı katalizlemektedir. Proteazlar katalitik mekanizmalarına ve inhibitörlerine göre 5 sınıfa ayrılmaktadırlar. Bu sınıflar; serin, sistin, metallo, aspartik ve treonin proteazlardır (Fear et al., 2007). Normal hücre metabolizmasında oldukça önemli olan proteazlar ve onların doğal inhibitörleri arasında bir denge bulunmaktadır. Fakat bu denge bazı fizyopatolojik durumlarda bozulabilmektedir. Söz konusu dengenin bozulmasına etki eden faktörler arasında;

- 1) Lizozomal enzimlerin neden olduğu proteolitik yıkımdan dolayı doğal inhibitörlerin aktivitesindeki azalma
- 2) İnhibitörlerin lizozomlardan salgılanan aşırı enzim ile doygun hale gelmesi
- 3) Granülositlerdeki nötrofillerden salgılanan miyeloperoksidazın katalizlediği H_2O_2 ' den türeyen reaktif oksijen türlerinin inhibitörleri inaktif hale dönüştürmesi
- 4) Hücre dışında inaktif olan lizozomal katepsinlerin stabiliteilerinin artması sayılabilir (Ferrasson et al., 1997; Losso, 2008).

Proteazlar ve endojen proteaz inhibitörleri arasındaki dengenin bozulması durumunda vücutta enflamasyon, romatizma, diş hastalıkları, hipertansiyon, gastrik ülser, kaslarla ilgili distrofi, patolojik anjiogenez veya tümör gelişimi ve metastaza neden olan kontrolsüz proteoliz olduğu bildirilmektedir (Ferrasson et al., 1997; Losso, 2008).

Proteazlar küçük ve büyük molekül ağırlıklarına sahip pek çok farklı bileşen tarafından inhibe edilebilmektedir. Doğal proteaz inhibitörleri yağ asitleri, fenolik bileşikler, amino asitler, peptitler gibi küçük moleküller olabildikleri gibi polipeptit veya protein yapıda da olabilmektedir. Bu inhibitörler, biyolojik sistemlerdeki proteolitik enzimlerin katalitik aktivitelerini spesifik veya genel olarak inhibe edebilme özelliğine sahiptir (Ferrasson et al., 1997).

Basit tanımıyla proteaz inhibitörleri proteolitik enzim aktivitesini inhibe eden ve proteazlarla spesifik olarak etkileşime giren enzim inhibitörleridir (Hudson 1982; Ryan, 1990). Proteolitik aktiviteyi düzenlemenin yanı sıra sıvı ve dokuların yabancı ya da istenmeyen proteolitik aktivite ile hidrolize olmalarını önlemede de rol oynarlar (Ryan 1990). Bitkisel kaynaklı proteaz inhibitörleri bitkilerin yaralanması veya enfeksiyonu durumunda bitki tarafından sentezlenmektedir. Çoğu proteaz inhibitörü endojen enzimlerden daha çok eksojen enzimlere karşı aktif olduğundan, bitkilerin patojen ve zararlılara karşı kendinin savunmasında rol oynamaktadır (Luckett et al., 1999).

Bitkisel gıdalar depo proteinlerinden farklı olarak bazı spesifik fonksiyonlarda görev alan çeşitli biyoaktif polipeptitler içermektedirler. Bu bileşikler arasında enzim inhibitörleri, lektinler ve ribozom inaktive eden proteinler bulunmaktadır. Enzim inhibitörleri sınıfı, amilaz ve proteaz inhibitörlerini içeren farklı protein çeşitlerinden oluşmaktadır (Losso, 2008).

Geçmişte yapılan bazı çalışmalar proteaz inhibitörlerini diyet ile alınan proteinlerin sindirilirliğini azalttığı gerekçesiyle antinütrisyonel öğeler olarak ele alırken (Mikola and Mikkonen, 1999) günümüzde ise bu moleküllerin antikarsinojenik özelliklerinin saptanmasıyla potansiyel

biyolojik aktivitelerinden farmakoloji ve tıp alanında yararlanılabileceği düşüncesi oluşmuştur (Kennedy, 1998).

2.3 Proteaz İnhibitörlerinin Kaynakları

Proteazları inhibe eden protein yapısındaki inhibitörler hemen hemen tüm organizmalarda bulunmakta ve kan serumu proteinlerinin önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar. Ayrıca pek çok dokuda bulunmalarının yanı sıra pankreas ve akciğer gibi organlarda da mevcuttur. Hayvanlarda, küflerde ve bakterilerde de bulunan proteaz inhibitörlerinin bilinen gıda kaynakları baklagiller, tahıllar, yağlı tohumlar, çerezler, meyveler, sebzeler, patates, yumurta, süt ürünleri ve hayvansal ürünlerdir. Proteaz inhibitörlerinin en yaygın kaynağı bitkilerdir ve genelde bitkilerin tohumlarında, yumru köklerinde, yapraklarında ve meyvelerinde bulunmaktadır. Molekül ağırlıkları çoğunlukla 8 – 20 kDa arasında olmak üzere genelde 4 – 85 kDa arasında değişen bitkisel kaynaklı proteaz inhibitörleri suda çözünür moleküllerdir. Bitkisel tohumlardaki birçok serin proteaz inhibitörü *Leguminosae*, *Cucurbitaceae*, *Solanoceae* ve *Gramineae* familyalarından izole edilmiştir (Kennedy, 1998; Filho, 1992; Rao and Suresh, 2007; Chaudhary et al., 2008).

Birçok bitkisel familyaya ait tohum ve yumru kökler serin proteaz inhibitörleri açısından değerlendirilmiş ve baklagiller familyasından soya fasulyesi (*Glycine max*), fasulye (*Phaseolus vulgaris*), börülce (*Vigna unguiculata*) ve diğerleri tripsin inhibitörleri için zengin kaynak olarak saptanmıştır. Ayrıca buğday, arpa, pirinç, sorgum, finger, millet, ragi ve coix gibi tahılların da proteaz inhibitörleri açısından zengin kaynak oldukları belirtilmiştir. Aynı durumun patates yumrusu ve rizomları (*Solanum tuberosum*) ve tatlı patates (*Ipomea batatas*) için de geçerli olduğu ve tahıl tohumlarının (*Gramineae*) çeşitli inhibitör ailelerinin serin proteaz inhibitörleri sınıfı açısından zengin kaynak oldukları vurgulanmıştır (Filho, 1992).

Proteaz inhibitörlerinin bulunduğu bitkisel kaynaklar arasında başta baklagil ve tahıllar olmak üzere; bazı meyve (elma, muz, ananas ve kuru üzüm) ve sebzeler (lahana, salatalık, patates, ıspanak ve domates)

bulunmaktadır. Arpa, buğday ve pirinç tohumlarında çözünen proteinlerin %5-10'unun proteaz inhibitörleri olduğu tahmin edilmektedir. Bitkilerdeki proteaz inhibitörlerinin miktarının bitkinin çeşidine, fizyolojik durumuna, böcek istilası veya zararının seviyesine bağlı olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle bitkisel tohum ve yumru köklerdeki proteaz inhibitörlerinin aktivitesi hasat yöntemi, zamanı ve koşulları ile depolama süre ve koşullarına göre değişiklik göstermektedir (Burns, 1987).

Ryan (1990) bitkisel kaynaklı proteaz inhibitörlerinin molekül ağırlıklarının küçük olduğunu ve genellikle 5 000 – 25 000 Da arasında değiştiğini bildirmiştir. Benzer şekilde Hudson (1982) de bitkisel proteaz inhibitörlerinin molekül ağırlıklarının 4 000 - 60 000 Da arasında değişmekle beraber genellikle 8 000 – 20 000 Da aralığında olduğunu bildirmiştir. Bitkisel proteaz inhibitörlerinin hayvan, bakteri ile fungal sıvı ve salgılarda bulunan proteazları inhibe ettikleri fakat bitkide bulunan proteazları nadir olarak inhibe ettikleri rapor edilmiştir. Bitkilerde proteaz inhibitörlerinin varlığı ilk olarak Read ve Haas'ın 1938 yılında soya unundan elde edilen ekstraktın, tripsinin jelatini sıvılaştırma yeteneğini inhibe ettiğini keşfetmesiyle ortaya çıkmıştır. Daha sonra proteaz inhibitörlerinin bitkiler aleminde oldukça geniş bir alana yayıldığı bulunmuş ve araştırmalar önemli gıda kaynaklarından olmaları nedeniyle *Leguminosae*, *Graminae* ve *Solanaceae* gibi türler üzerine yoğunlaşmıştır (Hudson 1982).

Proteaz inhibitörlerinin ilgili proteazlarla olan etkileşimlerinin pH' ya bağlılık gösterdiği belirtilmiş ve nötr pH da kuvvetli olan bu etkileşimin pH nötrden 3.0'e doğru düşükçe hızla azaldığı kaydedilmiştir. Ayrıca proteaz inhibitör molekülünün inhibe ettiği iki enzimin farklı olabileceği belirtilmiştir. Örneğin soya fasulyesinden elde edilen Bowman-Birk inhibitörü tripsin ve kimotripsini aynı anda inhibe edebilmektedir (Hudson, 1982).

Leguminosae ve *Graminae* familyasına ait tüm tohumlar tripsin, kimotripsin ve bazı mikrobiyal proteazları inhibe edebilen proteolitik enzimleri içermektedirler. Genellikle düşük molekül ağırlığına sahip olan bu inhibitörlerden tripsin inhibitörleri soya fasulyesindeki toplam proteinlerin %6' sını oluşturmaktadır. Söz konusu inhibitörler tohumlardaki endojen

proteazları inhibe edememektedir. Arpada ise çözümlü proteinlerin % 4 - 5 'ini oluşturan spesifik tripsin inhibitörü ve kimotripsin ile mikrobiyal proteazları inhibe edebilen bir inhibitör grubu mevcuttur (Kırsi and Mikoza, 1971).

Sebzeler ve baklagillerde bulunan bazı biyoaktif bileşiklerin farklı tip kanserlerin görülme sıklığının azaltılmasında olumlu etki yarattığını gösteren pek çok epidemiyolojik çalışma bulunmaktadır. Baklagillerin yüksek oranda proteaz inhibitörlerini içerdikleri bilinmektedir. İnsan beslenmesinde kolon, meme, prostat kanserlerinin görülme sıklığının azaltılmasında rolü olan ve yüksek miktarda proteaz inhibitörlerini içeren diğer gıdalar pirinç, mısır ve fasulyedir (Kennedy, 1998).

2. 4 Bitkisel Kaynaklı Proteaz İnhibitörleri

2.4.1 Soya (*Glycine Max*)

Proteaz inhibitör aktivitesine sahip olduğu saptanan ilk bitki olan soyadaki proteaz inhibitörleri Kunitz inhibitör ve Bowman-Birk inhibitör olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Söz konusu gruplar birbirinden küçük farklılıklar gösteren izoinhibitörlere sahiptir. İki inhibitör grubu arasındaki en büyük farklılıklar ise Kunitz grubunun daha düşük sayıda disülfid bağı içermesi, daha yüksek molekül ağırlığına sahip olması, tripsinle spesifik olarak etkileşime girmesi ile Bowman Birk grubunun yapısındaki 7 disülfid bağının protein molekülünü stabil hale getirmesiyle pH ve sıcaklık farklılıklarına dayanıklılık göstermesidir (Hudson, 1982).

2.4.2 Börülce (*Vigna unguiculata*)

Börülcede tripsin inhibitörünün varlığı keşfedildikten sonra karakterizasyonu üzerinde yapılan bir çalışmada aslında bu inhibitörün bir kimotripsin inhibitörü olduğu iddia edilmiştir ve söz konusu inhibitörün molekül ağırlığı 17 000 Da olarak belirlenmiştir (Hudson, 1982).

Börülcenin materyal olarak kullanıldığı bir başka çalışmada ise iki adet aktif uca sahip iki proteaz inhibitörünün saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Söz konusu inhibitörlerden birinin aynı

anda iki tripsin molekülünü inhibe edebildiği belirtilirken diğerinin hem tripsini hem de kimotripsini inhibe edebildiği saptanmıştır (Hudson, 1982).

2.4.3 Lima Fasulyesi (*Phaseolus lunatus*)

Lima fasulyesinden izole edilen proteaz inhibitörünün 10 000 Da molekül ağırlığında, sistin bakımından zengin, ısı, asit ve baza karşı dirençli olması, hem tripsini hem de kimotripsini inhibe edebilmesi ve amino asit dizilimi açısından Bowman-Birk inhibitör sınıfından olabileceği kaydedilmiştir (Hudson, 1982)

2.4.4 Fasulyeler (*Phaseolus vulgaris*)

P. vulgaris'in farklı türleri olan “kidney”, “franch”, “garden” ve “pinto” fasulyelerinden saflaştırılan proteaz inhibitörlerinin hem tripsin hem de kimotripsini inhibe edebildikleri ve pinto fasulyesinden saflaştırılan hariç hepsinin düşük molekül ağırlığına sahip oldukları bildirilmiştir (Hudson, 1982).

2.4.5 Bakla (*Vicia faba*)

Bakladan afinite kromotografisi ile saflaştırılan bir çok düşük molekül ağırlıklı izoinhibitörlerin diğer baklagillerden farklı olarak geniş aralıkta spesifikasyon göstererek sadece tripsin ve kimotripsini değil, aynı zamanda trombin, pronaz, papain ve bir çok mikrobiyal serin proteazlarını da inhibe edebilmektedir (Hudson, 1982).

2.4.6 Winged fasulyesi (*Psophocarpus tetragonolobus*)

Winged fasulyesinden affinite kromotografisi ile elde edilen tripsin inhibitör fraksiyonunda iki tanesi kimotripsin inhibisyon aktivitesi gösteren, molekül ağırlıkları 16 600 Da ila 20 900 arasında değişen toplam sekiz adet izoinhibitör saptanmıştır. Tripsin inhibitör fraksiyonun asidik koşullarda stabil olduğu fakat alkali koşullar altında kararsız olduğu bildirilmiştir (Hudson, 1982).

2.5 Proteaz İnhibitörlerinin Sağlık Üzerine Etkileri

Hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmaların içerdikleri çeşitli proteaz inhibitörleri, proteolitik enzimler ile tersinir stokiyometrik protein-protein kompleksleri oluşturmaktadır. Son yıllarda proteaz inhibitörleri, çok çeşitli nedenlerle bilimsel araştırmalara konu edilmiştir. Bu araştırma konuları temel olarak protein-protein etkileşimleri ve proteaz inhibitörlerinin istenmeyen proteolizi engellemesi ve buna bağlı olarak metabolizma kontrolü sağlaması gibi fizyolojik fonksiyonlar üzerine yoğunlaşmıştır (Rao and Suresh, 2007).

Proteaz inhibitörleri ile ilgili olarak hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar, *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ve epidemiyolojik veriler, proteaz inhibitörlerinin sıklıkla tüketildiği toplumlarda kansere bağlı ölüm oranlarının düşük olduğunu göstermektedir (Champ, 2002). Ayrıca proteaz inhibitörleri tümör gelişimini kontrol edebilen biyolojik aktiviteye sahip minör diyet bileşenleri olarak kabul edilmektedir (Garica- Gasca et al., 2002). Beslenme yolu ile gıdalardan alınan proteaz inhibitörlerinin kolon ve meme kanserlerinin gelişim riskini azalttığı bilinmektedir. Belirli oranda proteaz inhibitörlerini içeren tahılların ve bu tahıllardan üretilen ekmeklerin tüketilmesinin ağız ve gırtlak kanserlerinin görülme sıklığını azaltabileceği öngörülmüştür (Kennedy, 1998; Lippman and Matrisian 2000).

Proteolitik aktivitenin proteaz inhibitörleri ile kontrol edilmesinin HIV ve hipertansiyon hastalığının tedavisinde klinik olarak olumlu sonuçlar verdiği ve proteaz inhibitörlerinin kanser, obezite, kalp-damar hastalıkları, enflamasyon, sinir dokusu tahribatı, çeşitli enfeksiyon ve parazit hastalıklarında tıbbi amaçlı kullanılma potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir. Normalden fazla gerçekleşen proteolizin önlenmesi kemoterapi için bir strateji olarak kabul edilmektedir (Ferrasson et al., 1997).

Bitkilerin böcek ve zararlılara karşı savunma mekanizmasının üyesi olmaları ve antikarsinojenik etki göstermelerinin yanı sıra proteaz inhibitörlerinin kan pıhtılaşması ve trombosit agregasyonu gibi önemli biyolojik fonksiyonları bulunduğu bildirilmiştir (Chaudhary et al., 2008). Doğal proteaz inhibitörlerinin keşfedilmesi, yapılarının aydınlatılması ve

deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda kanser üzerine olumlu etkilerinin saptanması oldukça umut verici olarak kabul edilmekte ve birçok proteaz inhibitörü ile ilgili klinik çalışmaların insanlar üzerinde denenme seviyesine geldiği belirtilmektedir (Fear et al., 2007).

Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından hazırlanan kapsamlı raporda proteaz inhibitörlerinin hastalıkların tedavisindeki önemi vurgulanmakta ve kanser tedavisi için proteaz inhibitörlerinin kaynaklarının araştırılması, gıdalardaki proteaz inhibitörlerinin aktivitelerinin belirlenmesi, gıdalardan alınan proteaz inhibitörlerinin konsantrasyonu ve toplumda kanser görülme sıklığı arasındaki ilişkinin saptanması, hayvanlar üzerinde proteaz inhibitörlerinin etkinliğinin belirlenmesi, proteaz inhibitörlerinin etki mekanizmasının aydınlatılması önerilmektedir (Losso, 2008).

Günümüzde proteaz inhibitörleri, kanser önleyici kimyasal ajanlar sınıfının bir ögesi olarak nitelendirilmektedir. Pek çok farklı proteaz inhibitörünün karsinojenik prosesin ilerleyişini engelleyici etkisi belirlenmiş olsa da, antikarsinojenik proteaz inhibitörleri arasında en etkili olanların tripsin ve kimotripsin enzimlerini inhibe eden proteaz inhibitörleri olduğu vurgulanmıştır. İnsan beslenmesinde kimotripsin benzeri enzimleri inhibe etme kabiliyetine sahip proteaz inhibitörleri için pek çok kaynak bulunmaktadır. Proteaz inhibitörlerinin antikarsinojenik etkisinin, karsinojenler nedeniyle genlerde gerçekleşen mutasyonun geri döndürülmesi ve dolayısıyla hücre düzeyinde karsinojenik prosesin durdurulması şeklinde gerçekleştiği düşünülmektedir (Ferrasson et al., 1997). Çeşitli proteaz inhibitörlerinin farklı karsinojenik ajanlarla indüklenen transformasyonu *in vitro* koşullarda inhibe ettiği bilinmektedir. Proteaz inhibitörlerinin etkileri 3 ana kategoride toplanabilmektedir. Bunlar;

- 1) Sinyal transdüksiyon yol izlerini
- 2) DNA onarım sürecini ve
- 3) Çekirdek proteazlarını etkilemesidir (Clawson, 1996).

Reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerden kaynaklanan reaksiyonların yaşlanma, kanser, kalp-damar hastalıkları ve Alzheimer

hastalığı gibi dejeneratif veya patolojik hastalıklardan sorumlu olduğu bilinmektedir. Proteaz inhibitörlerinin henüz tam olarak açıklanamayan farklı mekanizmalarla kanserin baskılanmasını sağladığı bilimsel araştırmalarla saptanmıştır. Söz konusu mekanizmalardan birisi proteaz inhibitörlerinin reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellemesi ve böylece kanser oluşumunun önlenmesi olarak belirtilmiştir (Hou et al., 2001; Tsoi et al., 2005). Ayrıca antikarsinojenik proteaz inhibitörlerinin kanser oluşumunu geri dönüşümsüz olarak baskılayabildiği bildirilmektedir. Karsinojene maruz kalıdıktan sonra oluşturulan *in vivo* ve *in vitro* karsinogenez sistemlerinde etkilerini uzun süre sürdürebilmişlerdir. Bunun yanı sıra oldukça düşük konsantrasyonlarda bile antikarsinojenik ajan olarak etkili olmuşlardır. Kanser oluşumunu engelleyici kimyasal ajan olarak kullanılabilen ideal bir proteaz inhibitörünün kimyasal olarak stabil, suda çözünebilir, kimotripsini inhibe edebilir, sindirildikten sonra hücrelerde kullanılabilir özellikleri taşıması gerektiği vurgulanmıştır (Kennedy, 1998).

2. 6 Bowman-Birk İnhibitörleri

En güçlü tripsin ve kimotripsin inhibitörlerinden birisi, Bowman-Birk inhibitörleri (BBİ) olarak bilinen proteaz inhibitörleridir. 1944 yılında Bowman tarafından izolasyon prosedürü belirlenen ve Birk ve arkadaşları tarafından saflaştırılan inhibitörler bu nedenle Bowman-Birk inhibitörleri olarak anılmaktadır. Serin proteaz inhibitörleri sınıfından olan, suda çözünebilir protein yapısına sahip ve molekül ağırlığı 1513 ile 20000 Da arasında değişen BBİ ilk kez soya fasulyesinden izole edilmiştir. Fakat BBİ' nin, böcek ve zararlılara karşı savunma mekanizmasının bir parçası olarak hemen hemen tüm tek ve çift çenekli bitkilerde bulunduğu bilinmektedir (Kennedy, 1998; Losso, 2008).

BBİ' nin kanser oluşumunu engelleme kabiliyetleri *in vivo* ve *in vitro* sistemlerde saptanmıştır (Kennedy, 1998). BBİ' nin potansiyel fizyolojik etkilerinden tıp ve farmakoloji alanlarında yararlanılabilmesi için yeni BBİ formlarının ve BBİ' nin doğal olarak buldukları gıda kaynaklarının araştırılmasına büyük ölçüde ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (Scarafoni et al.,

2008). Baklagillerden izole edilen BBİ molekülünün iki ayrı ucu serin proteaz molekülleri ile eş zamanlı veya bağımsız olarak etkileşime girebilmektedir. Sindirim enzimlerinden olan tripsin ve kimotripsinin yanı sıra BBİ tarafından inhibe edilen serin proteazları arasında sindirim sisteminin bir diğer enzimi olan duedonaz ile insanlarda çeşitli hastalıkların başlamasında etkisi olan kimaz, triptaz, matriptaz, katepsin G ve lökosit elastaz gibi enzimler bulunmaktadır (Losso, 2008).

Çift çenekli bitkilerdeki BBİ' nin özellikleri olarak, 6-9 kDa arasında değişen, genellikle 8 kDa, küçük molekül ağırlığı, aktif konfigürasyonu stabilize eden 7 disülfid bağı, iki proteaz molekülünü aynı anda veya bağımsız olarak inhibe edebilen iki çift homolog bölge sayılabilir. Tek çenekli bitkilerde ise 8 kDa moleküler ağırlıkta tek ve 16 kDa moleküler ağırlıkta çift reaktif bölgeye sahip BBİ bulunmaktadır (Rao and Suresh, 2007; Scarafoni et al., 2007).

BBİ' nin kanser oluşumunu önleme etkilerinin kimotripsini inhibe etme kabiliyetlerinden kaynaklandığı öne sürülmüştür (Kennedy, 1998). Yani, karsinogenik transformasyonun baskılanmasında kimotripsin inhibisyon aktivitesinin, tripsin inhibisyon aktivitesine göre daha etkili olduğu vurgulanmıştır (Scarafoni et al., 2007).

Kennedy (1998), soya fasulyesinden izole edilmiş, saflaştırılmış ve konsantre edilmiş BBİ' nin antikarsinogenik özelliklerini araştırmıştır. Araştırma sonuçlarında, BBİ' lerin karsinogenezi baskılama özelliği fare, sıçan ve hamster olmak üzere 3 ayrı türde ve kolon, akciğer, karaciğer, özofagus ve oral epitelyum gibi çeşitli organlarda saptanmıştır.

Soya fasulyesinden izole edilen BBİ ve BBİ konsantreleri, insanlar üzerinde klinik denemeler aşamasına geçmiştir. Hem saflaştırılmış formda hem de konsantre formdaki BBİ' nin *in vitro* koşullarda kanser transformasyonunu ve *in vivo* koşullarda kanser oluşumunu toksizite olmaksızın önleme/baskılama yeteneğine sahip oldukları bildirilmiştir (Kennedy, 1998). Ayrıca insanlarda

spesifik kanser türleri üzerine etkiyi belirlemek için yapılan çalışmalarda BBİ' nin herhangi bir yan etkisi saptanmamıştır. Çeşitli hayvan modelleri üzerinde yapılan denemeler, ağız yoluyla alınan BBİ' nin kan dolaşımı ile vücuda dağıldığını göstermektedir. BBİ hem serum sıvısında hem de özafagus, mide, karaciğer, böbrek ve akciğerler gibi çeşitli organlarda formu değişmemiş olarak saptanmıştır (Scarafoni et al., 2007).

Hayvanlar üzerinde yapılan ve BBİ ve/veya konsantrelerinin antikarsinogenik etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda BBİ' nin;

1. Farelerde, dimetilhidrazin ile indüklenen kolon ve karaciğer kanserinde,
2. Hamsterlerde, 7,12-dimetilbenz (a) anthracene ile indüklenen ağız kanserinde,
3. Sıçanlarda metilbenzilitrozamin ile indüklenen özafagus kanserinde,
4. Farelerde, genellikle intestinal karsinogenez ile indüklenen spontan kolon kanserinde, kanser oluşumunu baskılayıcı etkisi saptanmıştır (Kennedy, 1998).

Ağız ve kolon kanseri üzerine yapılan bir çalışmada, soya fasulyesinden elde edilen BBİ ve BBİ konsantresi, deney hayvanlarına karsinogene maruz kaldıktan 3 ay sonra uygulanmış ve 6 aylık deney periyodu boyunca kanser oluşumunu baskılayıcı etki göstermiştir (Kennedy, 1998).

Sessa and Wolf (2001), soya fasulyesinin kabuk kısmından izole ettikleri BBİ' de oldukça yüksek tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitesi saptamışlardır. Soya fasulyesi kabuklarında, tripsin inhibitör bölgesine göre daha aktif kimotripsin inhibitör bölgesi bulunduğu kaydedildiği araştırmada araştırmacılar, saflaştırdıkları BBİ' nin konsantre formda % 61.9 kimotripsin inhibitör aktivitesi gösterdiğini kaydetmişlerdir. Elde ettikleri protein fraksiyonlarında kimotripsin inhibitör etkisi ise 61,9 ile 200 mg/g örnek arasında değişim göstermiştir. Elde edilen sonuçlar soya fasulyesi kabuğundan saflaştırılan BBİ' nin potansiyel antikarsinogen ajan olarak kullanılabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Scarafoni et al. (2008) beyaz acı bakladan (*Lupinus albus* L.) izole ettikleri 6 kDa molekül ağırlığındaki BBİ' nde yüksek tripsin inhibisyon aktivitesi tespit etmişlerdir (12,700 TIU/g örnek). Aynı araştırmada beyaz acı bakladan izole edilen BBİ' nin farklı sıcaklık ve pH' ya karşı dirençli olduğu kaydedilmiştir.

BBİ' nin meme ve prostat kanserleri üzerindeki antiproliferatif etkilerinin araştırıldığı bir araştırmada, Japonya' da yetişen iri siyah soya fasulyesinden izole edilen ve BBİ sınıfına ait olan tripsin inhibitörü, meme kanseri (MCF-7) ve karaciğer tümörü (Hep G2) hücrelerinin çoğalmasını, sırasıyla IC₅₀ 35 µM ve IC₅₀ 140 µM olmak üzere engellemiştir. Buna ek olarak söz konusu tripsin inhibitörünün geniş pH aralığında (pH 2 – 13) ve ısısal işlemlerden sonra (30 dk, 100°C) bile aktivitesini koruduğu bildirilmiştir (Vincent and Ng, 2008).

Çin'de yapılan bir araştırmada düşük molekül ağırlığına sahip çeşitli biyoaktif bileşenleri içeren *Momordica cochinchinensis* tohumlarının proteaz inhibitörleri açısından da zengin kaynak oldukları belirtilmiş ve bu tohumların 3000 Da ile 7500 Da arasında değişen molekül ağırlığında tripsin ve kimotripsin inhibitörleri içerdiği saptanmıştır. *Momordica cochinchinensis* tohumlarından izole edilen kimotripsin inhibitörünün sıçan karaciğer hücresi kültür sisteminde tert-butyl hidroperoksit (t-BHP) ile indüklenen oksidatif strese karşı antioksidan aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Aynı çalışmada karaciğer hücreleri söz konusu kimotripsin inhibitörü ile 24 saat muamele edildiğinde t-BHP' nin hücreye verdiği zararın büyük ölçüde engellendiği kaydedilmiştir (Tsoi et al., 2005).

Amerika'da yetişen bir tür fasulye çeşidi *Phaseolus acutifolius* ile yapılan bir çalışmada bu fasulyeden elde edilen protein fraksiyonunun tripsin ve kimotripsine karşı sırasıyla 1182 U/mg protein ve 540 U/mg protein, inhibisyon aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. Aynı çalışmada söz konusu fasulyeden elde edilen protein fraksiyonundaki proteaz inhibitörünün sağlıklı ve kanserli hücreler üzerinde antiproliferatif etkisi olduğu kaydedilmiştir (García- Gasca et al., 2002).

Japonya’ da yapılan bir araştırmada yabani soya fasulyesinden (*Glycine soja*) elde edilen protein fraksiyonlarından 9 ayrı proteaz inhibitörü izole edilmiş ve saflaştırılmıştır. Söz konusu bütün inhibitörler $3.2 - 6.2 \times 10^{-9}$ M arasında değişen konsantrasyonlarda tripsini inhibe edebilmiştir. Ayrıca bu inhibitörlerden bazıları kimotripsini de inhibe etmiştir. İzole edilen 7 çeşit inhibitörün, 8 kDa moleküler ağırlığa sahip olmalarına ek olarak ısı ve pH değişimlerine dayanıklılık göstermeleri ile yapılarındaki disülfid köprüleri bu inhibitörlerin BBİ sınıfından oldukları şeklinde yorumlanmıştır (Deshimoru et al., 2002).

Odoni et al. (1986) immobilize tripsin afinite kromatografisi, jel filtrasyon, iyon değiştirici ve ters faz kromatografisi kullanarak buğday tohumundan pek çok tripsin inhibitörü izole etmiştir. Bu inhibitörler moleköl ağırlıklarına (MA) göre 2 gruba ayrılmışlardır. Bu gruplar inhibitör 1 (MA 14 500 Da) ve inhibitör 2 (MA 7000 Da) olarak adlandırılmıştır. Her iki grup da sığır tripsinini inhibe edebilmiş ve *Leguminosae* familyasının çift başlı proteaz inhibitörü olan Bowman Birk inhibitörleri ile yüksek derecede homolog özellik göstermiştir.

Arpadaki proteaz inhibitörlerinin tohumdaki dağılımını üzerine yapılan bir araştırmada arpadan elde edilen ham ekstraktlarda (0,1 M sodyum asetat tamponunda, pH 4.9, 2 saat, 5 °C) en yüksek tripsin inhibisyon aktivitesi 9,1 U/g kuru ağırlık ile embriyoda saptanmıştır (Kırsi and Mikoza, 1971).

Buğdayın materyal olarak kullanıldığı bir başka çalışmada buğdaydan 12 sistin artığı ve 6 disülfid köprüsü içeren 71 amino asitten oluşan tripsin inhibitörü izole edilmiştir. Söz konusu tripsin inhibitörünün hem tahıl hem de baklagillerden izole edilen serin proteaz inhibitörleri ile yüksek derecede homolog özellik gösterdiği bildirilmiştir. Araştırmacılar buğdaydan izole ettikleri tripsin inhibitörünü tek başlı Bowman Birk tipi tripsin inhibitörü olarak sınıflandırmışlardır (Poerio et al., 1994).

Literatürde bazı soya ürünlerindeki proteaz inhibitörlerinin potansiyel antikarsinogenik etkilerini göstermesi için alınması gereken günlük miktar

verileri bulunmaktadır. Kennedy (1998), 145g tofunun 30 kimotripsin inhibisyon ünitesi (KIU) aktivite içerdiğini ve günlük olarak alınacak bu miktarın bazı kanser türlerine karşı beklenen önleyici etkiyi göstereceğini savunmuştur.

2.7 Proteaz İnhibitörleri ve Antioksidan Etkileri

Proteaz inhibitörlerinin reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellemesi ve böylece kanser oluşumunun/gelişiminin önlenmesi ile ilgili yapılan bir çalışmada BBİ' nin prostat kanseri hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Losso, 2008).

Çeşitli gıdalardan elde edilen tripsin-kimotripsin inhibitörlerinin insanlarda hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumu üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada patatesten elde edilen proteaz inhibitörlerinin lima fasulyesi ve tavuk yumurtası akından elde edilenlere göre daha etkili olduğu saptanmıştır (Frenkel et al., 1987).

Bir tür tatlı patatesten (*Ipomoea batatas*) elde edilen 33 kDa molekül ağırlığında tripsin inhibitörünün 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini inhibe edici özelliği saptanmıştır. Araştırmacılar bu nedenle tatlı patates tüketiminin sağlık üzerine yararlı etkisi olabileceğini belirtmişlerdir (Hou et al., 2001).

Proteaz inhibitörleri ile ilgili yapılan bilimsel araştırmaların sonuçlarına dayanarak Losso (2008), bir gıda veya gıda bileşeni olarak proteaz inhibitörleri gibi biyoaktif bileşiklerin tüketilmesinin insan sağlığı açısından önemini dört maddede özetlemiştir. Bu maddeler;

- 1) Bireyin yaşam süresi boyunca hastalıkların önlenmesi ve sağlığın korunabilmesi için gıdaların ilaçlara göre daha ucuz olması
- 2) Dejeneratif bir hastalık ortaya çıktığında tıbbi müdahalelerin maliyetinin yüksek olması
- 3) Çoğu insanın uzun süren periyotlarda ilaç kullanma disiplin ve sabrına sahip olmaması

4) Epidemiyolojik çalışmaların soya fasulyesi ve türevlerinde olduğu gibi, biyoaktif bileşenleri düzenli olarak tüketen insanlarda, yaşamın geç evrelerinde ortaya çıkan bazı dejeneratif hastalıklarla daha düşük oranlarda karşılaşılması olarak sıralanmıştır.

Literatürde proteaz inhibitörleri üzerine yapılan araştırmalar incelendiğinde tahıl unları üzerine kısıtlı sayıda araştırmaya ekmeçler üzerine ise hiçbir araştırmaya rastlanmaması ülkemizde tarımı yapılan tahıllardan elde edilen unlar ve bu unlardan elde edilen ekmeçler üzerine çalışılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle, çalışmada farklı un çeşitleri ile bu unlardan fermantasyon yoluyla üretilen hamur ve bu hamurların pişirilmesi ile üretilen ekmeçlerden elde edilecek protein ekstraktlarında proteaz inhibitörleri araştırılmıştır. Ayrıca ekmeç örneklerine *in vitro* sindirim uygulanarak sindirimin proteaz inhibitörleri üzerine etkisi belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1 Materyal

Çalışmada materyal olarak İzmir’deki yerel bir süpermarketin unlu mamuller bölümünden alınan buğday, çavdar, karışık tahıllı ve tam buğday unları, ekmeç üretim aşamalarından olan son fermantasyondan alınan ekmeç hamurları ve ekmeçler kullanılmıştır.

Mart 2008 tarihli ve 26807 sayılı resmi gazetede yayınlanan Türk Gıda Kodeksi Ekmeç ve Ekmeç Çeşitleri tebliğinde değişiklik yapılması hakkındaki tebliğe göre çalışmada kullanılacak ekmeçlerin tanımları aşağıda verilmiştir;

Ekmeç: Buğday ununa; su, tuz ve maya (*Saccharomyces cerevisiae*) ilave edilip tekniğine uygun olarak; yoğrulması, şekillendirilmesi, fermantasyona bırakılması ve pişirilmesi ile yapılan ürün

Tam Buğday Ekmeçi: Tam buğday unundan tekniğine uygun olarak üretilen ekmeç

Çavdarlı Ekmek: Buğday ununa en az % 30 en fazla % 50 oranında çavdar unu, istendiğinde çavdar kırmacı veya çavdar ezmesi ilave edilip tekniğine uygun olarak üretilen ekmek

Karışık Tahıllı Ekmek: Buğday ununa her birinden en az % 5 oranında olmak üzere; mısır, arpa, yulaf, çavdar, pirinç, triticales unları, kırmaları veya ezmelerinden en az üçü ilave edilip tekniğine uygun olarak üretilen ekmeği,

Söz konusu yerel markette ekmek üretimi günlük olarak yapılmaktadır. Üretimde kullanılan unlar ve ambalaj üzerinde belirtilen özellikleri ise Çizelge 3.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan ekmeklerin yapımında kullanılan bileşenler

Ekmek çeşitleri	Ekmek yapımında kullanılan bileşenler
Buğday ekmeği	Buğday unu (Tip 650), maya, tuz, katkı maddesi
Çavdar ekmeği	Çavdar unu, buğday unu, kavrulmuş malt, tuz, ekmek katkı maddesi (Enzim alfa amilaz antioksidan E 300, topaklanma önleyici E 170, buğday unu, soya unu), buğday gluteni
Tam buğday ekmeği	Tam buğday unu, tam buğday kırmacı, tuz, şeker, kavrulmuş buğday unu, laktik asit, E 270, stabilizör, kalsiyum karbonat E 170, emülgatör, mono ve digliseritlerin diasetil tartarik asit esterleri E 472E, antioksidan (askorbik asit), enzim (fungal α -amilaz)
Karışık tahıllı ekmek	Çavdar unu, çavdar kırmacı, buğday unu, ayçekirdeği (iç olarak), keten tohumu, tuz, soya kepeği, susam, kavrulmuş malt unu, buğday kepeği, asitliği düzenleyici (laktik asit), malt ekstraktı, emülgatör, antioksidan, enzim.

Yerel market unlu mamüller bölümü yetkilisinin verdiği bilgiye göre buğday unu dışında kalan un çeşitlerine yaklaşık % 50 oranında Tip 650 buğday unu eklenerek ekmek üretimi tekniğine uygun olarak gerçekleştirilmektedir.

Ekmek çeşitleri için fermantasyon aşaması parametreleri : % 80 bağıl nem, 30 - 31°C, yaklaşık 30 dakika (dk)

Ekmek çeşitleri için pişirme işlemi parametreleri:

- Buğday ekmeği: 290°C, 16 dk
- Tam buğday ekmeği: 230°C, 25 dk
- Çavdar ekmeği: 230°C, 20 dk
- Karışık tahıllı ekmek: 200°C, 30 dk

3.1.1 Kimyasal Malzeme

Tripsin (T0134), kimotripsin (C4129), p-toluensulfonil-L arginin metil ester (TAME, T4626), pankreatin, pepsin (P7000), TRIS (25,285-9), coomassive brilliant blue (B0770), PIPES (P7368), Bile ekstrakt (B-8631), sığır serum albümini (A2153) Sigma Aldrich'ten, N-benzoil-L-tirozin etil ester (BTEE, 13110), amonyum sülfat (09982) Fluka'dan, kalsiyum klorür, sodyum asetat, sodyum hidroksit, asetik asit, fosforik asit, hidroklorik asit, etanol ve metanol analitik saflıkta Merck KGaA Darmstadt Germany' den temin edilmiştir. *İn vitro* sindirim aşamasında ve diyalizde kullanılan moleküler ağırlık sınır değeri (MASD) 6000-8000 Da ve 3500 Da olan Spectra/Por Diyaliz Membranları Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, USA' dan, son protein ekstraktından ultrafiltrasyonla protein fraksiyonlarının eldesinde, tampon değiştirmede ve sindirim enzimlerinin ortamdaki uzaklaştırılmasında kullanılan Vivaspin 2 ve Vivaspin 6 model MASD 20000, MASD 10000, MASD 3000 ultrafiltrasyon aparatları Sartoriusstedim Biotech GmbH Goettingen Germany' den satın alınmıştır. Gerekli tüm aşamalarda distile su kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Kullanılan Cihazlar

Kjeldahl Cihazı: Örneklerin protein tayinleri için Gerhardt Kjeldatherm marka ön yakma ünitesi ve Gerhardt Vapodest 20 marka destilasyon ünitesinden oluşan düzenek kullanılmıştır.

pH-metre: Tampon çözeltilerin hazırlanması ve uygun analiz ortamının sağlanması için gerekli olan pH ayarlama işlemlerinde Sartorius PB-11 pH-metre kullanılmıştır.

Manyetik Karıştırıcı: Çözeltilerin hazırlanması, homojen karıştırma sağlanması, amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz işlemi sırasında Stuart heat-stir CC162 manyetik karıştırıcıdan yararlanılmıştır.

Hassas Terazi: Tüm tartım işlemlerinde Denver Instrument, SI-234 terazi kullanılmıştır.

Laboratuvar Değirmeni: Örneklerin öğütme işleminde Brook Crompton Series 2000 laboratuvar değirmeni kullanılmıştır.

Etüv: Eliwell OV-160-CLAD-F-EC-DI etüv nem analizleri ve kurutma işlemlerinde kullanılmıştır.

Derin dondurucu: Örneklerden elde edilen sulu ve ham protein ekstraktları, bu ekstraktlardan molekül ağırlıklarına göre ayrılan protein fraksiyonları, *in vitro* sindirim sonrasında elde edilen örneklerin analize kadar muhafazasında Uğur Derin Dondurucu kullanılmıştır.

Su banyosu: *In vitro* sindirim uygulamalarında Clifton 6F3A çalkalamalı su banyosu kullanılmıştır.

Santrifüj Cihazı: Thermo Scientific IEC CL31R Multispeed Centrifuge kullanılmıştır.

El blendırı: Örneklerin homojenize edilmesinde Arçelik El blendırı K-1253 kullanılmıştır.

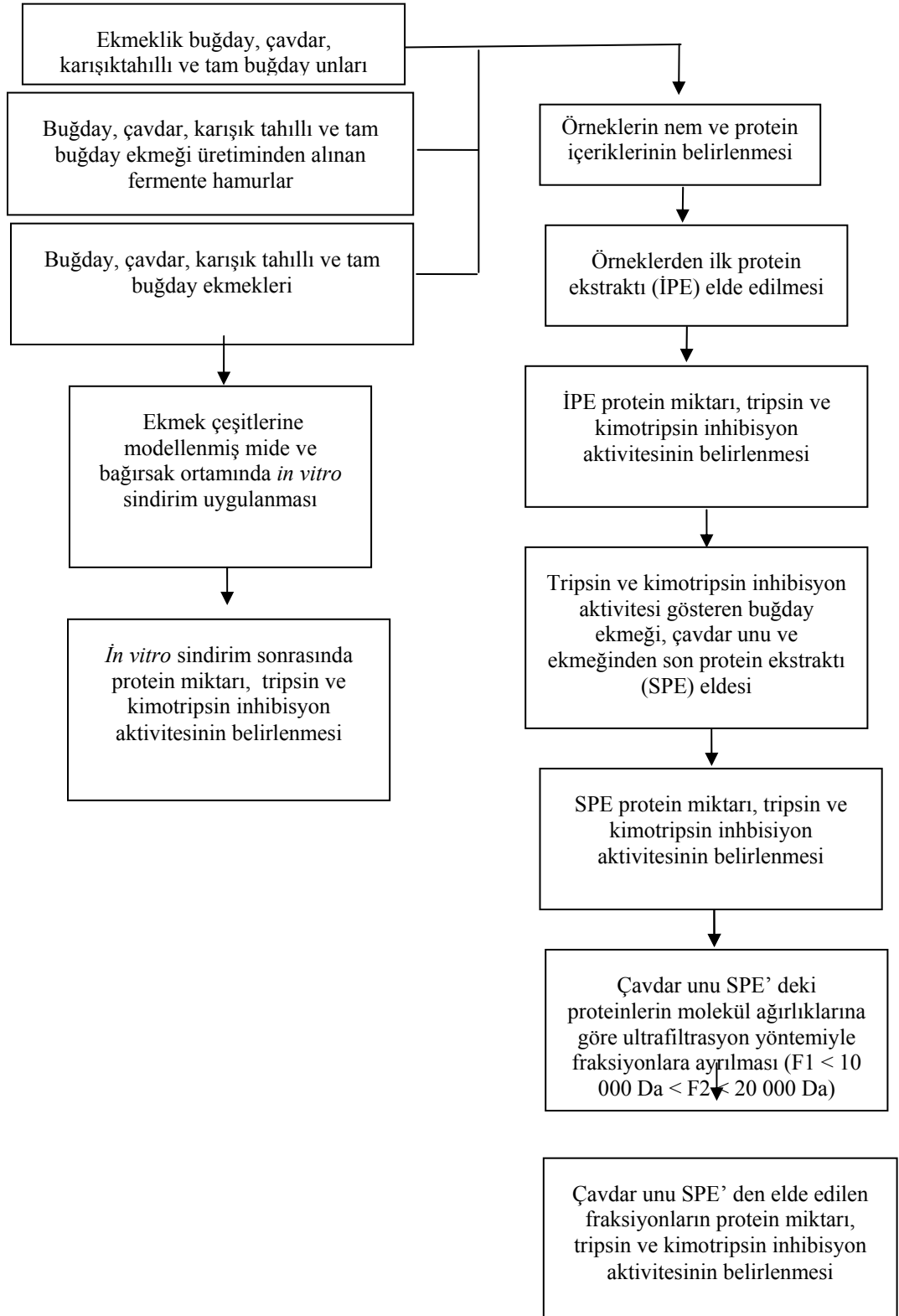
Tüp karıştırıcı: Nüve NM110 tüp karıştırıcı kullanılmıştır.

Spektrofotometre: Tüm spektrofotometrik analizlerde Varian Cary 50, UV-Visible Spectrophotometer, Victoria, Australia kullanılmıştır.

Buzdolabı: Protein ekstraktlarının eldesi ve diyaliz işlemleri için karıştırma işleminin +4°C' de gerçekleştirilmesi için Arçelik marka buzdolabı kullanılmıştır.

3.3 Analizler

Normal, avdar, tam buğday, karışık tahıllı unları, ekmekleri ve fermente hamurlarında denemeler 3 tekrar 2 paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Deneme planı Şekil 3.3' de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.3 Deneme Planı

3.3.1 Ham madde nem içeriklerinin belirlenmesi

Un ve ekmek çeşitlerinin nem içeriklerinin belirlenmesi için sırasıyla AOAC 925.10 ve AOAC 935.36 metotları kullanılmıştır (AOAC, 2005). Hamur örneklerinin nem içeriklerinin belirlenmesinde AOAC 935.36 metodu Elyas et al., (2002)'na göre modifiye edilerek kullanılmıştır.

3.3.1.1 Un örnekleri

Önceden $130 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ' ye ısıtılan etüvde sabit tartıma getirilen nem kaplarına iyice karıştırılan un örneklerinden yaklaşık 2 g tartılmış ve $130^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ' deki etüvde 3 – 4 saat bekletilmiştir. Nem kapları desikatörde oda sıcaklığına ulaştıktan sonra tartım alınmış ve 2 tartım arasındaki fark alınarak örneğin nem miktarı % olarak hesaplanmıştır. Karışık tahıllı un çeşidi için içerdiği ay çekirdeği içi, susam ve benzeri bileşenlerin homojen boyuta getirilmesi için kaba öğütme işlemi uygulanmıştır (AOAC 925.10).

3.3.1.2 Ekmek örnekleri

Bir bütün ekmek tartılıp ağırlığı kaydedilmiştir (X). Ekmek örneklerinin ağırlıkça yarısı alınarak temiz bir zemin üzerinde madde kaybı olmadan oda sıcaklığında kurutulmuştur (15 – 20 saat). Denge nemine kadar kurutulan örneklerin tartımı (Y) alındıktan sonra örnekler öğütülmüştür. Nem kapları sabit tartıma gelene kadar önceden $130 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ' ye ısıtılan etüvde bekletilmiş ve daraları alınmıştır. İyice karıştırılan öğütülmüş ekmek örneklerinden yaklaşık 2 g nem kabına tartılıp $130^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ' deki etüvde 3-4 saat bekletilmiştir. Nem kapları oda sıcaklığına ulaştıktan sonra tartım alınmış ve 2 tartım arasındaki fark üzerinden % nem hesaplanmıştır (Z). Toplam nem, $\%Nem = 100 - (Y \times Z / X)$ formülüyle hesaplanmıştır (AOAC 935.36).

3.3.1.3 Hamur örnekleri

Ekmek üretim aşamalarından olan fermantasyonu takiben alınan ekmek hamurlarının ağırlıkça yarısı tartılmış (X) ve 70 ± 3 °C etüvde nemi belirli ölçüde uzaklaşana kadar kurutulmuştur. Kurutulan örneklerin tartımı alındıktan sonra (Y) örnekler öğütülmüştür (Elyas et al., 2002). Nem kapları sabit tartıma gelene kadar önceden 130 ± 3 °C' ye ısıtılan etüvde bekletilmiş ve daraları alınmıştır. İyice karıştırılan öğütülmüş hamur örneklerinden yaklaşık 2 g nem kabına alınmış ve $130^{\circ}\text{C} \pm 3$ °C'deki etüvde 3-4 saat bekletilmiştir. Nem kapları oda sıcaklığına ulaştıktan sonra tartım alınmış ve 2 tartım arasındaki fark üzerinden % nem hesaplanmıştır (Z). Toplam nem, $\%Nem = 100 - (Y \times Z / X)$ formülüyle hesaplanmıştır.

3.2.2 Ham madde protein içeriklerinin belirlenmesi

Araştırmada hammadde olarak kullanılan un, fermente hamur ve ekmek çeşitlerinin protein miktarının belirlenmesi Kjeldahl Metoduyla (AOAC, 2005) yapılmıştır.

0.005 g hassasiyetle 1' er g örnek Kjeldahl tüplerine tartılmış, üzerlerine katalizör (1 kg susuz Na_2SO_4 , 30 g $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 15 g saf selenyum bileşiminde) eklenmiş ve 13 mL derişik H_2SO_4 ilave edilmiştir. Yakma ünitesinde sıcaklık kademeli olarak arttırılarak 430 °C'ye getirilmiştir.

Yanma tamamlandığında tüplerdeki örnekler üzerine 50 mL saf su eklenmiş ve tüpler destilasyon ünitesine yerleştirilmiştir. 50 mL % 40'lık NaOH alkali pompası ile tüp içerisine pompalandıktan sonra buhar açılıp 6 dakika süresince oluşan destilat (yeşil renkli) 25 ml borik asit içerisinde toplanmıştır.

Destilat, faktörü bilinen 0.1 N HCl çözeltisi ile yeşil renk açık pembeye dönene dek titre edilmiştir.

Örneklerin protein miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{Protein} = \frac{(S - S_{k\ddot{o}r}) \times F \times 0.0014 \times N}{\text{Örnekmiktarı(g)}} \times 100$$

F = HCl çözeltisinin faktörü

S = Titrasyonda harcanan HCl hacmi (mL)

$S_{k\ddot{o}r}$ = şahit denemede harcanan HCl hacmi (mL)

N = 6.25

3.2.3 Hammaddeden protein ekstraktlarının elde edilmesi:

3.2.3.1 I. Aşama

İlk aşamada protein ekstraktlarının elde edilmesi amacıyla ekmekler oda sıcaklığında (15 – 20 saat) kurutulup öğütülmüştür. Unlar, fermente hamurlar ve öğütülmüş ekmekler üzerine ağırlıklarının 5 katı kadar (1:5 w/v) 100 mM sodyum asetat tamponu (pH 4.5) ilave edilmiş ve 1 dk süreyle el blenderında homojenize edildikten sonra 4°C’ de manyetik karıştırıcıda 1 gece karıştırma işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen süspansiyon, 4° C’ de 10 000 g’ de 30 dk santrifüj edilmiş, berrak süpernatant ilk protein ekstraktı (İPE) olarak adlandırılmış ve analize kadar -20°C’ de saklanmıştır. (Scarafoni et al., 2008).

3.2.3.2 II. Aşama

İPE 80°C’ de, 3 dk su banyosunda ısıtıldıktan sonra hemen buz üzerinde soğulmuştur. Daha sonra 4° C’ de 10 000 g’ de 30 dk santrifüj işlemini takiben elde edilen süpernatanttaki proteinler %70 doygunlukta amonyum sülfat kullanılarak buz banyosunda 2.5 saat süreyle çöktürülmüştür. 4° C’ de 10 000 g’ de 30 dk santrifüj işlemini takiben elde edilen pelet distile

suda (5 ml) çözüldürülmüş ve amonyum sülfat tuzunun uzaklaştırılması amacıyla moleküler ağırlık sınır değeri (MASD) 3500 Da olan diyaliz membran kullanılarak 4°C’ de 1 gece distile suya karşı diyaliz edilmiştir. Daha sonra çözelti pH’ sı 0.2 N HCl ile pH 4.0’ e ayarlanmış ve 4°C’ de 10 000 g’ de 30 dk. santrifüjlenerek süpernatanttaki tampon çözelti, ultrafiltrasyon aparatı kullanılarak (MASD 3000 Da) 50 mM Tris/HCl tamponu (pH 8.0) ile değiştirilmiştir. Elde edilen çözelti (5 ml) son protein ekstraktı (SPE) olarak adlandırılmış ve sonraki aşamalar için – 20 °C’ de saklanmıştır (Scarafoni et al., 2008).

Örneklerden elde edilen ilk ve son protein ekstraktlarına Bradford yöntemi ile protein tayini, kimotripsin ve tripsin inhibisyon aktivitesi tayini uygulanmış ve sonuçlar mg protein başına tripsin inhibisyon ünitesi (TİU/mg protein) ve kimotripsin inhibisyon ünitesi (KİU/mg protein) olarak hesaplanmıştır.

3.2.3.3 SPE eldesi aşamasında protein kaybının hesaplanması

% Protein kaybı aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır;

$$\% \text{ Protein kaybı} = \frac{IPE_p - SPE_p}{IPE_p} \times 100$$

IPE_p = İlk protein ekstraktı protein miktarı (mg protein/g kuru madde örnek)

SPE_p = Son protein ekstraktı protein miktarı (mg protein/g kuru madde örnek)

3.2.4 Tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitesi gösteren çavdar unu SPE' deki proteinlerin molekül ağırlıklarına göre fraksiyonlara ayrılması

Hangi örneklerden elde edilen SPE'nin molekül ağırlığına göre fraksiyonlarına ayrılacağını belirlemek için parametre olarak protein konsantrasyonu ile tripsin ve kimotripsin aktiviteleri göz önüne alınmıştır. Elde edilen SPE' ler arasında en yüksek protein içeriğinin yanı sıra (1.02 ± 0.11 mg protein/g kuru madde örnek) göreceli olarak yüksek tripsin ile kimotripsin inhibisyon aktivitesine (sırasıyla 114.11 ± 13.21 TIU/g kuru madde örnek ve 25.19 ± 3.22 KIÜ/g kuru madde örnek) sahip çavdar unundan elde edilen SPE molekül ağırlığına göre fraksiyonlarına ayrılmıştır. Proteinler molekül ağırlığına göre 3 ayrı fraksiyona ayrılmıştır. Bu fraksiyonlar sırasıyla fraksiyon 1 (F1), fraksiyon 2 (F2) ve fraksiyon 3 (F3) olarak adlandırılmıştır. Molekül ağırlıklarına göre F1, 10 000 Da'dan küçük; F2, 10 000 ila 20 000 Da arası; F3 ise 20 000 Da' dan büyük protein fraksiyonlarını ifade etmektedir ($F1 < 10\ 000\ Da < F2 < 20\ 000\ Da < F3$). Bu amaçla 3 mL çavdar unu SPE önce MASD 10 000 Da olan ultrafiltrasyon aparatı kullanılarak 4° C' de 4000 g' de 1 saat santrifüjlenmiş ve filtrat (F1) ayrılmıştır. Membranın üst kısmında kalan retentat MASD 20 000 Da olan ultrafiltrasyon aparatı kullanılarak 4° C' de 4000 g' de 1 saat santrifüjlenmiş ve alt kısımdaki filtrat (F2) ve üst kısımdaki retentat (F3) ayrılmıştır. Elde edilen protein fraksiyonları sonraki aşamalar için - 20 °C' de saklanmıştır.

Protein fraksiyonlarına Bradford yöntemi ile protein tayini, kimotripsin ve tripsin inhibisyon aktivitesi tayini uygulanmış ve sonuçlar mg protein başına tripsin inhibisyon ünitesi (TIU/mg protein) ve kimotripsin inhibisyon ünitesi (KIÜ/mg protein) olarak hesaplanmıştır.

3.2.5 Ekmek örneklerine *in vitro* sindirim uygulanması

İnsan sindiriminin laboratuvar koşullarında modellenmesi için Gil-Izquierdo et al. (2002)' nin yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır. Oda sıcaklığında kurutulmuş ve öğütülmüş normal ve çavdar ekmeği çeşitlerinden 10 g alınarak üzerlerinde 30 ml distile su eklenmiştir. Örnekler el blenderı ile

1 dk süreyle homojenize edildikten sonra 10 g homojenizat analiz için ayrılmıştır. Homojenizat ağırlığının 2 katı kadar (1:2 w/v) distile su eklendikten sonra mide sindirimi için önce pH, 1M HCl ile pH 2'ye ayarlanmış ve sonra 1 mL %3'lük pepsin (3g pepsin/100 mL 0.1N HCl) ilave edilmiştir. 37°C'de, 2 saat, çalkalamalı su banyosunda (200 rpm) inkübasyonu takiben örnek 15'er mL' lik 2 kısma ayrılmıştır. Birinci kısma mide sindirimi işleminin sonlandırılması için 2,5 mL 1 M NaOH eklenmiş ve reaksiyon durdurulmuştur. Mide sindirimi uygulanmış örnek 25°C 10 000 g' de 15 dk santrifüjlenerek katı parçacıklar uzaklaştırılmış ve elde edilen süpernatantta kalmış olması muhtemel ve ileriki analizlerde sorun oluşturabilecek sindirim enzimlerinin uzaklaştırılması amacı ile ultrafiltrasyon aparatı (MASD 20000 Da) kullanılarak 25°C 10 000 g' de 30 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır. Mide diyalizati (MD) olarak adlandırılan filtrat, ultrafiltrasyon aparatından alınmış ve analize kadar -20°C' de saklanmıştır. Mide sindiriminin sonlandırılmasından hemen önce ayrılan diğer 15 mL' lik kısma ise bağırsak sindirimi uygulanmıştır. Böylece bağırsak sindiriminin, aynı şartlarda gerçekleştirilen mide sindirimi sonucu elde edilen örneklere uygulanması sağlanmıştır. Bağırsak diyalizatlarının elde edilmesi amacıyla mide sindiriminin son aşaması olan 37°C' de su banyosundaki inkübasyondan sonra alınan 15 mL örneğin bulunduğu tüp içerisine, 10 mL (0.15 N) PIPES tamponu içeren diyaliz membran (MASD 6000 – 8000 Da) yerleştirilmiştir. Daha sonra 37°C'de çalkalamalı su banyosunda (200 rpm) 30 dk süreyle inkübasyona devam edilmiştir. İnkübasyon sonunda ortama 2.5 mL pankreatin/safra karışımı (0.5 g pankreatin içeren 3 g safra ekstraktı/250 mL 1 N NaHCO₃) eklenerek örnek 37°C'de çalkalamalı su banyosunda (200 rpm) 2 saat daha inkübe edilmiştir. Reaksiyonun sonlandırılması için inkübasyon sonunda tüpler kaynayan su banyosuna alınarak 10 dakika bekletilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulan tüpler içerisindeki diyaliz membranlar dikkatlice çıkarılmış ve membranların dışı az miktarda saf su ile yıkanmıştır. Diyaliz membranlarından alınan bağırsak diyalizati (BD) analize kadar -20°C' de saklanmıştır.

Buğday ve çavdar ekmeği çeşitlerinden *in vitro* sindirim ile elde edilen mide ve bağırsak diyalizatlarına Bradford yöntemi ile protein tayini, kimotripsin ve tripsin inhibisyon aktivitesi tayini uygulanmış ve sonuçlar mg protein başına tripsin inhibisyon ünitesi (TİU/mg protein) ve kimotripsin inhibisyon ünitesi (KİU/mg protein) olarak hesaplanmıştır.

3.2.6 Hammaddeden elde edilen İPE ve SPE'nin ve *in vitro* sindirim uygulanan örneklerden elde edilen mide ve bağırsak diyalizatlarının protein miktarlarının belirlenmesi:

3.2.6.1 Bradford yöntemi ile protein tayini:

Protein tayini için Bradford (1976) yöntemi kullanılmıştır. Bradford reaktifinin hazırlanmasında 100 mg Coomassive Brilliant Blue G-250 (CBBG-250) 50 ml % 95'lik etanolde çözülmüş ve üzerine 100 ml %85'lik (w/v) fosforik asit ilave edilmiştir. Boya maddesinin (CBBG-250) tamamen çözünmesinden sonra çözelti 1 lt'ye distile su ile seyreltilmiştir. Elde edilen reaktif, boya kalıntıları tamamen uzaklaşana kadar Whatman No.1 süzgeç kağıdından bühner hunisi kullanılarak süzölmüş ve amber şişede 4°C' de en fazla 1 ay süreyle saklanmıştır. Bradford reaktifi için kalibrasyon grafiğinin hazırlanmasında standart protein olarak farklı konsantrasyonlarda sığır serum albümini (SSA) kullanılmıştır. Protein tayini için 100 µL örnek üzerine 2 mL Bradford reaktifi eklenerek 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda absorbans kaydedilmiştir. Şahit çözelti olarak 100 µL distile su ve 2 mL Bradford reaktifi kullanılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri ile İPE ve SPE ile mide ve bağırsak diyalizatlarındaki protein miktarı mL örnek için mg protein (mg protein/mL örnek) olarak hesaplanmıştır.

3.2.6.2 Tripsin inhibisyon aktivitesi tayini :

Tripsin inhibisyon aktivitesi tayini için Ee et al. (2008)' nın yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır.

Tripsin inhibisyon aktivitesi tayini için p-toluensulfonil-L arginin metil ester (TAME) substrat olarak kullanılmıştır. Tripsin inhibisyon tayini

tamponu (TİT) 10,3 mM CaCl₂ içerecek şekilde 41.4 mM Tris-HCl (pH 8.1) ile hazırlanmıştır. 2,6 mL TİT ve 0,3 mL TAME substratı (10 mM konsantrasyonunda, TİT ile hazırlanan) ışın yolu 10 mm olan, 3,5 ml lik kuartz küvete alınmış ve 0,1 ml tripsin (20µg/ml konsantrasyonunda, 1mM HCl' de) eklenerek karıştırılmıştır. Tripsin enzim aktivitesi tayini için spektrofotometrenin kinetik modunda 247 nm'de 6 dk boyunca absorbans değişimi kaydedilmiştir. Elde edilen reaksiyon grafiğinin doğrusal bölgesi dikkate alınarak dakikadaki absorbans değişimi belirlenmiştir. Tripsin inhibisyon aktivitesi tayini için örneklerden (İPE, SPE, protein fraksiyonları ve mide-bağırsak diyalizatları) 6 µL alınarak üzerine 2,6 mL TİT ve 0,1 mL tripsin ilave edilerek oda sıcaklığında 6 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Kör örnek enzim yerine 1mM HCl kullanılarak hazırlanmıştır. Tam olarak 6. dakikanın sonunda 0,3 mL TAME substrat çözeltisi eklenmiş ve spektrofotometrenin kinetik modunda 247 nm'de 6 dk boyunca absorbans değişimi kaydedilmiştir. Elde edilen reaksiyon grafiğinin doğrusal bölgesi dikkate alınarak dakikadaki absorbans değişimi belirlenmiştir. Tripsin inhibisyon aktivitesi tripsin inhibisyon ünitesi olarak mg protein için hesaplanmıştır.

Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır;

$$TIU / \text{mg protein} = \frac{(T\Delta A_{247} / dk - I\Delta A_{247} / dk) \times 6 \times 1000}{540 \times \text{protein}(mg)}$$

$T\Delta A_{247} / dk$ = Ortamda sadece substrat ve tripsin varken 247 nm dalga boyunda dakikadaki absorbans değişimi

$I\Delta A_{247} / dk$ = Ortamda substrat, tripsin ve örnek varken, 247 nm dalga boyunda dakikadaki absorbans değişimi

540 katsayısı; 247 nm' de, kullanılan tamponun kompozisyonu ve 10 mm ışın yolu olan kuvet için deneysel olarak saptanan molar ekstinksiyon katsayısıdır. Birim tripsin ünitesi (TÜ); bir dakikada 1 µmol substratın hidrolizini katalizleyen tripsin miktarı olarak ifade edilirken birim tripsin inhibisyon ünitesi (TİU) ise tripsin aktivitesinde 1 tripsin ünitesi (TU) azalma olarak tanımlanmaktadır.

3.2.6.3 Kimotripsin inhibisyon aktivitesi tayini;

Kimotripsin inhibisyon aktivitesi tayini için N-benzoil-L-tirozin etil ester (BTEE) substrat olarak kullanılmıştır. Kimotripsin inhibisyon tayini tamponu (KİT) 0.1 M CaCl₂ içerecek şekilde 0.1 M Tris-HCl (pH 7.8) ile hazırlanmıştır. 0.1 ml kimotripsin (20 µg/ml konsantrasyonunda 1mM HCl' de hazırlanan) ile 1.4 mL KİT ışın yolu 10 mm olan, 3.5 mL lik kuartz küvete alınmış ve 256 nm' de absorbans okumaya geçmeden hemen önce 1.5 mL BTEE çözeltisi (1 mM %50 (w/w) sulu metanolde hazırlanan) ilave edilmiştir. Kör örnek enzim yerine 1 mM HCl kullanılarak hazırlanmıştır. Kimotripsin enzim aktivitesi tayini için spektrofotometrenin kinetik modunda 256 nm'de 6 dk boyunca absorbans değişimi kaydedilmiştir. Elde edilen reaksiyon grafiğinin doğrusal bölgesi dikkate alınarak dakikadaki absorbans değişimi belirlenmiştir. İnhibisyon aktivitesi tayini için örneklerden (ilk protein ekstraktı, son protein ekstrakt, protein fraksiyonları ve mide-bağırsak diyalizatları) 15µl alınarak üzerine 1.4 mL KİT ve 0.1 mL kimotripsin eklenmiş ve oda sıcaklığında 6 dk inkübe edilmiştir. Tam olarak 6. dakikanın sonunda 1,5 mL BTEE substrat çözeltisi eklenerek spektrofotometrenin kinetik modunda 256 nm'de 6 dk boyunca absorbans değişimi kaydedilmiştir. Elde edilen reaksiyon grafiğinin doğrusal bölgesi dikkate alınarak dakikadaki absorbans değişimi belirlenmiştir. Kimotripsin inhibisyon aktivitesi kimotripsin inhibisyon ünitesi olarak mg protein için hesaplanmıştır.

Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır;

$$\text{KIU/ mg protein} = \frac{(K\Delta A_{256} / dk - I\Delta A_{256} / dk) \times 6 \times 1000}{964 \times \text{protein}(mg)}$$

$K\Delta A_{256} / dk =$ ortamda sadece substrat ve kimotripsin varken 256 nm dalga boyunda dakikadaki absorbans değişimi

$I\Delta A_{256} / dk =$ Ortamda substrat, kimotripsin ve örnek varken 256 nm dalga boyunda dakikadaki absorbans değişimi

964 katsayısı; 256 nm dalga boyunda, kullanılan tamponun kompozisyonu ve 10 mm ışın yolu olan küvet için deneysel olarak saptanan molar ekstinksiyon katsayısıdır. Birim kimotripsin nitesi (KU), dakikada 1 μmol substratın hidrolizini katalizleyen kimotripsin miktarı olarak tanımlanırken birim kimotripsin inhibisyon nitesi (KIU) ise kimotripsin aktivitesindeki 1 kimotripsin nite (KU) azalmadır.

3.3 İstatistiksel Analiz

Elde edilen tüm veriler arasındaki farklılık varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiş ve farklılık SPSS for Windows (Version 15.0) paket programı kullanılarak % 95 güven aralığında Tukey testi ile değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Hammaddelerin Nem İçerikleri

Buğday unu, çavdar unu, karışık tahıllı un ve tam buğday unu, bu unlardan elde edilen fermente ekmek hamurları ve ekmeklere ait % nem içerikleri Çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Buğday, çavdar, karışık tahıllı ve tam buğday unları ile bu unlardan elde edilen fermente ekmek hamurları ve ekmeklerin nem içerikleri

Tahıllar	Nem (%)*		
	Un	Fermente hamur	Ekmek
Buğday	13.23 ± 0.21 ^{a, A}	44.26 ± 0.82 ^{b, A}	33.74 ± 2.02 ^{c, A}
Çavdar	9.69 ± 0.39 ^{a, A B}	44.34 ± 1.56 ^{b, A}	37.08 ± 1.04 ^{c, A}
Karışık tahıllı	8.5 ± 0.22 ^{a, B}	40.16 ± 1.62 ^{b, B}	35.25 ± 1.85 ^{c, A}
Tam Buğday	12.16 ± 0.04 ^{a, A B}	45.23 ± 2.04 ^{b, A}	35.64 ± 1.11 ^{c, A}

* Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir

(a-b) farklı harfler aynı satırdaki değerler arasındaki farkın p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu ifade etmektedir.

(A-B) farklı harfler aynı sütundaki değerler arasındaki farkın p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu ifade etmektedir.

Çalışmada analiz edilen un çeşitleri için en yüksek nem içeriği % 13.23 ± 0.21 ile buğday unu örneğinde bulunurken bu değeri sırasıyla tam buğday (% 12.16 ± 0.04), çavdar (% 9.69 ± 0.39) ve karışık tahıllı (%8.5 ± 0.22) un çeşitleri takip etmiştir. Elde edilen verilere göre karışık tahıllı un ile buğday unu arasında nem içerikleri açısından önemli bir fark bulunmaktadır (p<0.05). Maleki et al., (1980) yaptıkları çalışmada dört farklı çeşit buğday unu için %13.2-13.4 arasında değişen nem içeriği bildirmişlerdir. Benzer şekilde Verwimp et al., (2004) ve Hung et al (2007) buğday unu nem içeriğini sırasıyla % 13.4 ve %14.12 olarak bildirmiştir. İki farklı çeşit tam buğday unu ile yapılan bir çalışmada ise (Prabhasankar and Rao, 2001) nem değerleri %

9.5 ve % 9.2 olarak bulunmuştur. Verwimp et al., (2004), çavdar unu için % 13.04 nem değeri bulmuşlardır.

Türk Gıda Kodeksi (TGK) buğday unu tebliğine (Tebliğ No: 99/01) göre ekmeklik buğday unlarında nem oranı sırasıyla maksimum % 14,5 protein oranı ise kuru maddede minimum % 10.5 olmalıdır. Buğday unu için elde ettiğimiz değerler TGK buğday unu tebliğindeki değerlerle uyumaktadır.

Çeşitler arasında fermente ekmek hamurları için nem değerleri göz önüne alındığında karışık tahıllı fermente hamuru ile diğer çeşitler arasında önemli bir fark bulunmaktadır ($p < 0.05$).

Buğday ekmeği için saptanan nem değeri ($\% 33.74 \pm 2.02$) ekmek çeşitleri arasında en düşük olmakla birlikte ekmek çeşitlerinin nem içerikleri arasında önemli bir fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$). Dağlıoğlu (1998) buğday ekmeğinin nem içeriğinin % 35 – 37 arasında değiştiğini bildirmiştir. Yapılan bir başka çalışmada buğday ekmeği, çavdar ekmeği ve tam buğday ekmeği için nem içerikleri sırasıyla % 29.7, % 33.4 ve % 31.4 olarak saptanmıştır (Karaağaoğlu ve ark., 2008).

TGK Ekmek ve ekmek çeşitleri tebliğinde değişiklik yapılması hakkındaki tebliğe (Tebliğ no 2008-5) göre buğday, çavdar ve tam buğday ekmekleri için maksimum nem değerleri ve ilgili ekmek çeşitleri için çalışmada elde ettiğimiz ortalama nem değerleri Çizelge 4.2' de karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.2 Çalışmada ekmekler için elde edilen nem değerlerinin TGK' de verilen nem değerleriyle karşılaştırılması

Çeşit	TGK Tebliğ No 2008-5'e göre maksimum nem (%)	Çalışmada elde edilen nem (%)
Buğday ekmeği	37	33.74 ± 2.02
Çavdar ekmeği	43	37.08 ± 1.04
Tam buğday ekmeği	42	35.64 ± 1.11

Çizelge 4.2' den görüldüğü üzere elde ettiğimiz değerlerin TGK ilgili tebliğine uygun olduğu saptanmıştır.

4.2 Hammaddelerin Protein İçerikleri

Buğday unu, çavdar unu, tam buğday unu, karışık tahıllı un; bu unlardan elde edilen fermente ekmek hamurları ve pişirme ile elde edilen ekmeklere ait protein içerikleri kuru madde (KM) üzerinden Çizelge 4.2' de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Çeşitli tahıllardan elde edilen un, fermente hamur ve ekmeklerin protein içerikleri

Tahıllar	Protein miktarı (g/100 g KM örnek)*		
	Un	Fermente hamur	Ekmek
Buğday	12.10 ± 1.35 ^{a, A} (11.70 ± 1.34)	11.85 ± 1.23 ^{a, AB} (6.60 ± 0.28)	15.02 ± 0.99 ^{b, AC} (9.95 ± 0.28)
Çavdar	12.75 ± 0.50 ^{a, A} (11.51 ± 0.45)	11.05 ± 1.79 ^{a, B} (6.14 ± 1.00)	13.05 ± 1.33 ^{a, A} (8.25 ± 0.78)
Karışık Tahıllı	14.68±2.01 ^{a, A} (13.43 ± 2.01)	17.06±1.05 ^{ab, C} (10.20 ± 0.51)	19.31±1.89 ^{b, B} (12.48 ± 0.95)
Tam Buğday	13.69±0.77 ^{ab, A} (12.03 ± 0.67)	13.25±1.33 ^{a, B} (7.30 ± 0.66)	16.11±0.92 ^{b, C} (10.36 ± 0.37)

* Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir

Parantez içerisindeki değerler yaş maddede ortalama ± SD değerleridir.

(a-c) farklı harfler aynı satırdaki değerler arasındaki farkın p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu ifade etmektedir.

(A-C) farklı harfler aynı sütundaki değerler arasındaki farkın p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu ifade etmektedir.

Hangi çeşit un kullanılırsa kullanılsın ekmek, eğer ilgili un buğday unundan farklıysa belirli oranda buğday unu ile su, tuz, maya ve diğer katkı maddelerinin katılmasıyla elde edilen hamurun fermantasyona bırakılması ve

daha sonra pişirilmesi ile elde edilen ürünü ifade etmektedir. Tahılların ve bu tahılların öğütülmesi ile elde edilen unların kimyasal bileşimi genetik yapıya, toprak ve iklim faktörlerine bağlı olarak değişmektedir (Karaağaoğlu ve ark., 2008).

Çalışmada en yüksek protein içeriği % 14.68 ± 2.01 ile karışık tahıllı undaki bulunurken bu değeri sırasıyla tam buğday (% 13.69 ± 0.77), çavdar (% 12.75 ± 0.50) ve buğday (% 12.10 ± 1.35) unları takip etmiştir. Ayrıca un çeşitleri arasında protein içerikleri açısından önemli bir fark saptanmamıştır ($p > 0.05$).

Ekmek çeşitleri arasından karışık tahıllı ekmek çeşidinin (% 19.31 ± 1.89) diğer çeşitlerden daha yüksek oranda protein içerdiği saptanmıştır ($p < 0.05$). Karışık tahıllı undan elde edilen fermente hamurun protein içeriği (% 17.06 ± 1.05) diğer unlardan elde edilen fermente hamurun protein içeriğinden daha yüksek olarak bulunmuştur ($p < 0.05$).

Buğday ve çavdar unu ile yapılan bir çalışmada protein değerleri sırasıyla % 10.12 ve % 6.59 olarak belirlenmiştir (Verwimp et al., 2004). Çavdar unu ve bu undan üretilen ekmeklerle ilgili yapılan bir başka çalışmada protein içeriği un ve ekmek için sırasıyla % 9.34 ve % 9.81 olarak bildirilmiştir (Michalska et al., 2008). Elde edilen veriler söz konusu çalışmalara ait protein içerikleri açısından karşılaştırıldığında buğday unu (% 12.10 ± 1.35), çavdar unu (% 12.75 ± 0.50) ve çavdar ekmeği (% 13.05 ± 1.33) için daha yüksektir. Buna ek olarak buğday unu protein miktarları ile ilgili olarak bu çalışmada elde edilenden daha yüksek, % 14.9 (Mariotti et al., 2006) ve % 13.5 (Ragae et al., 2006) protein içeriği değerleri literatürde bildirilmiştir. Tam buğday unu için Hung et al., (2007) çalışmada elde ettiğimiz protein içeriğine benzer protein değeri (% 13.5) saptamıştır.

Karaağaoğlu ve ark., (2008) buğday ekmeği, çavdar ekmeği ve tam buğday ekmeği için protein içeriklerini sırasıyla % 12.38, % 14.11 ve % 14.43 olarak bildirmişlerdir.

Buğday unları tanenin kabuk tabakasının endospermden ayrılıp öğütülmesiyle elde edilmektedir (Ertugay ve ark., 1993). Bu ayırma işlemi,

özellikle protein, yağ, vitamin ve minerallerin büyük oranda kaybına neden olmaktadır (Karaağaoğlu ve ark., 2008). Bu çalışmada buğday ununun en düşük protein içeriğine sahip olması buğday tanesinden kabuk tabakasının ayrılması işleminin neden olduğu protein kaybı ile açıklanabilir. Ayrıca tam buğday ununda en yüksek protein içeriğinin saptanması da bu un çeşidinde söz konusu ayırma işleminin gerçekleştirilmemesi olarak düşünülmüştür. Benzer ilişki söz konusu unlardan üretilen ekmeklerde de bulunmaktadır. Ayrıca çavdar, tam buğday ve karışık tahıllı ekmeklerin yapımında kullanılan unların, tam buğday kırması, kavrulmuş malt, çavdar kırması, ayçekirdeği (iç olarak), keten tohumu ve buğday kepeği içeriyor olması un ve ekmeklerin protein içeriklerini etkilemektedir.

4.3 Hammadeden elde edilen protein ekstraktlarına ait protein içerikleri ile tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktiviteleri

4.3.1 İlk protein ekstraktı (İPE)

4.3.1.1 İPE protein içerikleri

Temel olarak bir kaynaktan protein eldesi ve izolasyonu için izlenen adımlar, protein kazanımı (ekstraksiyon), ön saflaştırma (konsantrasyon) ve ayırma/tanımlama (kromatografik ve elektroforetik işlemler) olarak bilinmektedir. Bu adımlarda uygulanan hücre parçalama, berraklaştırma ve çöktürme (izoelektrik çöktürme, iyonik şiddeti azaltarak çöktürme, iyonik şiddeti artırarak çöktürme, organik çözümler ile çöktürme, organik polimerler ile çöktürme, denatürasyon ile çöktürme) işlemlerinden sonra diyaliz, saflık kontrolü ve karakterizasyon aşamaları uygulanır (Anon., 1999).

Buğday unu, çavdar unu, karışık tahıllı un ve tam buğday unu, bu unlardan elde edilen fermente hamurlar ve ekmeklerin İPE'lerine ait protein değerleri mL İPE ve g KM örnek için sırasıyla Çizelge 4.3.1.1 (a) ve Çizelge 4.3.1.1(b)'de verilmiştir.

Çizelge 4.3.1.1(a) Tahıl unları, fermente hamur ve ekmeklerden elde edilen İPE' nin protein içerikleri (mg protein/mL İPE)

İPE	Protein miktarı (mg protein/mL İPE)*		
	Un	Fermente hamur	Ekmek
Buğday	1.41 ± 0.41 ^{a,A}	1.09 ± 0.09 ^{b,AB}	0.19 ± 0.05 ^{c,A}
Çavdar	1.18 ± 0.16 ^{a,AC}	1.24 ± 0.13 ^{b,A}	0.17 ± 0.03 ^{c,A}
Karışık Tahıllı	1.48 ± 0.09 ^{a,B}	1.22 ± 0.08 ^{b,A}	0.18 ± 0.02 ^{c,A}
Tam Buğday	1.06 ± 0.08 ^{a,C}	0.89 ± 0.09 ^{a,B}	0.15 ± 0.01 ^{b,A}

* Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

(a-c) farklı harfler aynı satırdaki değerler arasındaki farkın sonucunda p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu ifade etmektedir.

(A-C) farklı harfler aynı sütundaki değerler arasındaki farkın sonucunda p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu ifade etmektedir.

İPE protein değerleri için un çeşitleri arasından karışık tahıllı un, en yüksek protein içeriğine (1.48 ± 0.09 mg/mL İPE) sahipken (p<0.05) bu değeri sırasıyla buğday (1.41 ± 0.41 mg/mL İPE), çavdar (1.18 ± 0.16 mg/mL İPE) ve tam buğday (1.06 ± 0.08 mg/mL İPE) unları takip etmiştir. Hamur örneklerinden elde edilen İPE' lerde ise sadece İPE çavdar fermente hamuru protein içeriği İPE çavdar unu protein içeriğinden daha yüksek olarak saptanmıştır (p<0.05). Fermente hamurlardan elde edilen İPE içerisinde ise en düşük protein içeriği tam buğdaydan elde edilen fermente hamurda saptanmış ancak bu değer ile buğday ve çavdar fermente hamurlarından elde edilen İPE arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (p>0.05). Ekmeklerden elde edilen İPE' nin protein değerleri arasında da anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. En yüksek değer 0.19 ± 0.05 mg/mL İPE ile buğday ekmeğine aittir.

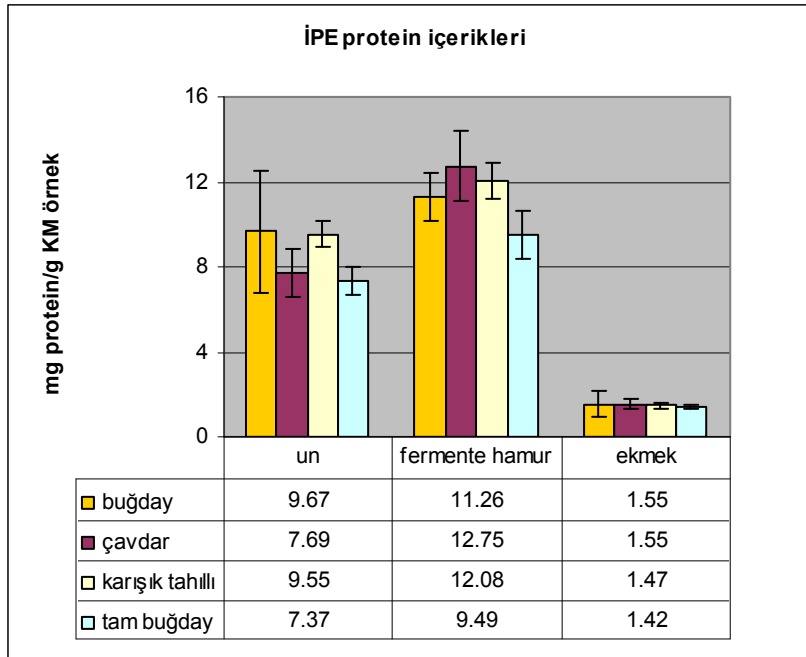
Çizelge 4.3.1.1 (b) Tahıl unları, fermente hamur ve ekmeklerden elde edilen İPE' nin protein içerikleri (mg protein/ g KM örnek)

İPE	Protein miktarı (mg/ g KM örnek)*		
	Un	Fermente Hamur	Ekmek
Buğday	9.67 ± 2.89 ^{a, A}	11.26 ± 0.83 ^{a, AB}	1.55 ± 0.34 ^{b, A}
Çavdar	7.69 ± 1.14 ^{a, AB}	12.75 ± 1.66 ^{b, A}	1.55 ± 0.26 ^{c, A}
Karışık Tahıllı	9.55 ± 0.59 ^{a, A}	12.08 ± 0.84 ^{b, A}	1.47 ± 0.17 ^{c, A}
Tam Buğday	7.37 ± 0.65 ^{a, B}	9.49 ± 1.14 ^{a, B}	1.42 ± 0.09 ^{b, A}

* Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

(a-c) farklı harfler aynı satırdaki değerler arasındaki farkın p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu ifade etmektedir.

(A-C) farklı harfler aynı sütundaki değerler arasındaki farkın p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu ifade etmektedir.



Şekil 4.3.1.1 (a) Tahıl unları, fermente hamur ve ekmeklerden elde edilen İPE' lerin protein içerikleri

İPE' lerdeki protein miktarları KM bazında örnek miktarı üzerinden karşılaştırıldığında Şekil 4.3.1.1 (a)' de belirtildiği gibi tüm çeşitler için fermente hamurlarda un ve ekmeklerden elde edilenlere göre daha yüksek protein değerleri saptanmıştır. Ancak sadece İPE çavdar unu ve İPE karışık tahıllı protein miktarları ile sırasıyla İPE fermente çavdar hamuru ve İPE fermente karışık tahıllı hamuru arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Fermente hamur örneklerinden daha fazla proteinin ekstrakte edilmiş olması;

- 1) Ekmek hamuru yapımında una eklenen suyun suda çözünen proteinleri çözünür hale getirmesi ve bu durumun ekstrakte edilen protein miktarına katkı sağlaması,
- 2) Yoğurma işlemi ve tuz ilavesinin serbest formda olmayan proteinlerin daha çözünür/ekstrakte edilebilir hale gelmesini sağlaması (Prakash 1986),
- 3) Fermantasyon işlemiyle daha küçük molekül ağırlığına sahip proteinlerin açığa çıkması böylece ekstraksiyonun daha kolay gerçekleşmesi gerekçeleriyle açıklanabilir (Antony et al., 1996).

Benzer şekilde ekmek üretimi sırasında uygulanan ısıl işlem, protein molekülünde molekül içi veya molekül dışı çapraz bağlanmalara ve dolayısıyla proteinlerin daha zor ekstrakte edilebilir yapıya dönüşmelerine yol açmış olabilir (Gerrard, 2002).

Ekmek çeşitleri için kuru madde örnek üzerinden İPE değerlerinde ekstrakte edilen proteinler açısından önemli bir fark bulunmamaktadır ($p>0.05$)

Scarafoni et al., (2008) beyaz acı bakla (*Lupinus albus L.*) ile yaptıkları çalışmada bu çalışmadakiyle aynı ekstraksiyon yöntemini kullanarak elde ettikleri İPE' de 183.1 mg protein/g örnek protein içeriği bildirmişlerdir. Beyaz acı bakla tohumlarının yüksek protein içeriği, kuru maddede % 44 (Egaña et al., 1992), göz önüne alındığında aynı ekstraksiyon işlemiyle elde edilen İPE' nin bu çalışmada elde edilenlerden daha yüksek protein içermesi beklenen bir sonuçtur.

4.3.1.2 İPE tripsin inhibisyon aktivitesi

Örneklerden elde edilen İPE lere ait tripsin inhibisyon aktivitesi mg protein ve kuru madde üzerinden g örnek için hesaplanıp sonuçlar Çizelge 4.3.1.2 (a) ve Çizelge 4.3.1.2 (b)' de gösterilmiştir.

Buğday için g KM örnekte tripsin inhibisyon aktivitesi açısından un, fermente hamur ve ekmek örnekleri arasında önemli bir fark bulunmamaktadır. Fakat çavdar ve karışık tahıllı çeşitleri için fermente hamurlardan elde edilen İPE' ler, aynı çeşitlerin unlarından elde edilenlere göre tripsin inhibisyon aktivitesi açısından hem g KM örnek hem de mg protein bazında daha düşüktür ($p < 0.05$). Bu durum farklı kaynaklardaki bazı proteaz inhibitörlerinin fermantasyona daha duyarlı olduğu ve fermantasyon işlemiyle aktivitesinin azalabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Tam buğday çeşidi için un, fermente hamur ve ekmeklerde tripsin inhibisyon aktivitesi saptanmamıştır. Buğday ununda söz konusu aktivite saptanırken tam buğday ununda saptanmaması buğday çeşitlerinin farklı olmasından kaynaklanabilir veya tam buğday ununda kepek kısmında bulunan bazı kompleks karbonhidratlar ile proteinler arasında gerçekleşen interaksiyonlar nedeniyle proteaz inhibitörlerinin serbest forma geçmemesi nedeniyle olabilir (Mauron, 1984).

Çizelge 4.3.1.2 (a) Tahıl unları, fermente hamur ve ekmeklerden elde edilen İPE' lerin tripsin inhibisyon aktivitesi (TİU/mg protein)

İPE	Tripsin İnhibisyon Aktivitesi* (TİU/mg protein)		
	Un	Hamur	Ekmek
Buğday	5.13 ± 3.11 ^{a, A}	2.80 ± 0.59 ^{a, A}	28.76 ± 14.21 ^{b, A}
Çavdar	15.85 ± 2.88 ^{a, AB}	4.75 ± 1.18 ^{b, A}	46.02 ± 11.89 ^{c, B}
Karışık Tahıllı	26.92 ± 3.19 ^{a, B}	7.87 ± 3.5 ^{b, A}	28.53 ± 13.45 ^{a, A}
Tam Buğday	-	-	-

* Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

- : saptanamamıştır.

(a-b) farklı harfler aynı satırdaki değerler arasındaki farkın p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu ifade etmektedir.

(A-B) farklı harfler aynı sütundaki değerler arasındaki farkın p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu ifade etmektedir.

Çizelge 4.3.1.2 (b) Tahıl unları, fermente hamur ve ekmeklerden elde edilen İPE' lerin tripsin inhibisyon aktivitesi (TİU/g KM örnek)

İPE	Tripsin inhibisyon aktivitesi*		
	TİU/g KM örnek		
	Un	Hamur	Ekmek
Buğday	41.90 ± 26 ^{a, A}	31.17 ± 7.29 ^{a, A}	45.25 ± 14.77 ^{a, A}
Çavdar	122.22 ± 30.02 ^{a, B}	60.69 ± 18.63 ^{b, AB}	65.98 ± 25.86 ^{b, A}
Karışık Tahıllı	257.05 ± 36.39 ^{a, C}	71.21 ± 21.76 ^{b, B}	29.59 ± 9.32 ^{c, B}
Tam Buğday	-	-	-

* Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

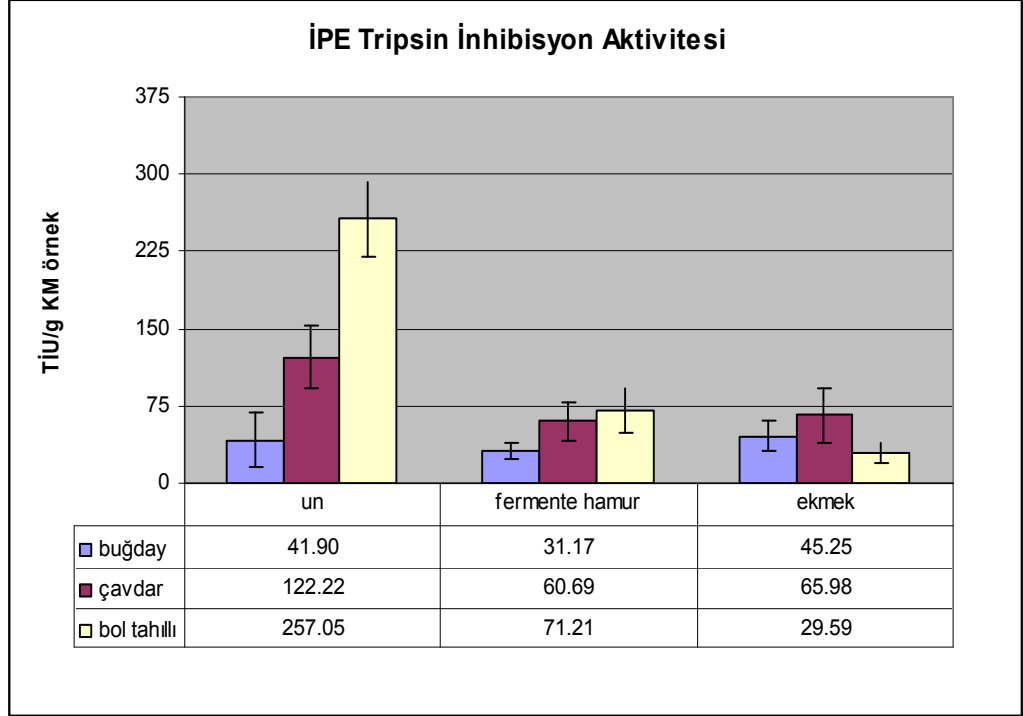
- : saptanamamıştır.

(a-c) farklı harfler aynı satırdaki değerler arasındaki farkın Tukey testi sonucunda p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu ifade etmektedir.

(A-C) farklı harfler aynı sütundaki değerler arasındaki farkın Tukey testi sonucunda p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu

Aynı türün farklı varyetelerinde proteaz inhibitörlerinin miktarı ve inhibisyon aktivitelerinin değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Guillamón et al., 2008). Fakat ticari örnekler kullanıldığı için bu konuda kesin bir yargıya varmak olanaksızdır. Karışık tahıllı un İPE' nin örnekler arasındaki en yüksek tripsin inhibisyon aktivitesini (257.05 ± 36.39 TİU/g örnek, 26.92 ± 3.19 TİU/mg protein) göstermesi ise bu una ticari olarak karıştırılmış olan çavdar unu, çavdar kırması, buğday unu, ayçekirdeği içi, keten tohumu, soya kepeği, susam, kavrulmuş malt unu ve buğday kepeğinin ortak etkisinden kaynaklanabileceği şeklinde yorumlanabilir. Buğday unu dışındaki diğer un çeşitlerine hamur yoğrulmadan önce yaklaşık % 50 oranında buğday unu ekleniyor olmasının ilgili çeşitlerden elde edilen hamur ve ekmeklerin tripsin inhibisyon aktivitesini toplamda azaltan etkisi olduğu düşünülebilir. Çünkü Çizelge 4.3.1.2 (a) ve 4.3.1.2 (b)' de belirtildiği üzere buğday unu için tripsin inhibisyon aktivitesi 41.90 ± 26 TİU/g örnek ve 5.13 ± 3.11 TİU/mg protein olmak üzere un örnekleri arasında en düşük olandır.

Örneklerden elde edilen İPE' lerde saptanan tripsin inhibisyon aktivitesi Şekil 4.3.1.2' de gösterilmiştir.



Şekil 4.3.1.2 Tahıl unları, fermente hamur ve ekmeklerden elde edilen İPE' lerde saptanan tripsin inhibisyon aktiviteleri

Ekmekler tripsin inhibisyon aktivitesi açısından incelendiğinde en yüksek değer 65.98 ± 25.86 TIU/g örnek ile çavdar ekmeğinde saptanırken bunu buğday ekmeği (45.25 ± 14.77 TIU/g örnek) ve karışık tahıllı ekmek (29.59 ± 9.32 TIU/g örnek) izlemiştir ($p < 0.05$). Karışık tahıllı çeşidi kendi içinde değerlendirildiğinde ise tripsin inhibisyon aktivitesi açısından ekmek, un ve fermente hamur örnekleri arasındaki farkın önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Çavdar ve buğday ekmekleri göz önüne alındığında pişirmenin tripsin inhibisyon aktivitesi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı açıktır. Çünkü bu iki çeşidin fermente hamurlarından ve ekmeklerinden elde edilen İPE' lerin tripsin inhibisyon aktiviteleri açısından aralarında önemli bir fark yoktur ($p > 0.05$). Karışık tahıllı ekmek İPE' sinin fermente hamura göre daha düşük tripsin inhibisyon aktivitesi göstermesi farklı katkıları içeren karışık tahıllı undaki proteaz inhibitörlerinin fermantasyondaki değişimlere olduğu kadar yüksek sıcaklığa da dayanıksız olduğu şeklinde yorumlanabilir.

İşlem görmemiş örnek olması açısından un örnekleri İPE' leri tripsin inhibisyon aktivitesi açısından Scarafoni et al., (2008) ile karşılaştırıldığında tripsin inhibisyon aktivitesinin beyaz acı baklaya göre oldukça düşük olduğu görülmektedir. Beyaz acı bakla tohumundan elde edilen İPE' nin 12 705 TİU/g örnek ve 69 TİU/mg protein tripsin inhibisyon aktivitesine sahip olduğu belirtilirken kimotripsin inhibisyon aktivitesi göstermediği rapor edilmiştir.

Çeşitli baklagillerin farklı varyetelerinin tripsin inhibisyon aktivitesi üzerine yapılan bir çalışmada tripsin inhibisyon aktivitesinin *Lupinus*' un farklı varyeteleri için önemsiz fakat *Glycine max* farklı varyeteleri arasında önemli değişiklikler gösterdiği belirtilmiştir. Araştırma kapsamında soya fasulyesi, fasulye, nohut, bezelye, mercimek ve baklanın farklı varyetelerindeki tripsin inhibisyon aktivitesi belirlenmiş ve varyeteler arasında tripsin inhibisyon aktivitesindeki değişimin soya fasulyesi için 43 – 84 TİU/mg protein, fasulye için 17 – 51 TİU/mg protein, nohut için 15 – 19 TİU/mg protein, mercimek için 3 – 8 TİU/mg protein ve bakla için 5 – 10 TİU/mg protein arasında olduğu kaydedilmiştir (Guillamón et al., 2008).

Valdebouze et al. (1980) bezelye ve bakla için sırasıyla 3 – 11 TİU/ mg örnek ve 5.6 – 11.8 TİU/ mg örnek arasında değişen sonuçlar bildirmiştir.

Trugo et al., (1990) *Phaseolus vulgaris*' in 10 farklı varyetesinde 71 – 160 TİU/ mg örnek arasında değişen tripsin inhibisyon aktivitesi saptamıştır.

Valdebouze et al. (1980) soya fasulyesinde yaptıkları çalışmada tripsin inhibisyon aktivitesini 57.2 TİU/mg soya fasulyesi ve 64.8 TİU/ mg yağsız soya fasulyesi olarak rapor etmişlerdir.

4.3.1.3 İPE kimotripsin inhibisyon aktivitesi

Örneklerden elde edilen İPE lere ait kimotripsin inhibisyon aktivitesi mg protein ve kuru madde üzerinden g örnek için hesaplanmış ve sırasıyla Çizelge 4.3.1.3 (a) ve Çizelge 4.3.1.3 (b)' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3.1.3 (a) Tahıl unları, fermente hamur ve ekmeklerden elde edilen İPE' lerde saptanan kimotripsin inhibisyon aktivitesi (KİU/mg protein)

İPE	Kimotripsin inhibisyon aktivitesi* (KİU/mg protein)		
	Un	Fermente Hamur	Ekmek
Buğday	4.19 ± 0.89 ^{a, A}	2.77 ± 1.04 ^{a, A}	21.56 ± 2.5 ^{b, A}
Çavdar	9.56 ± 2.24 ^{a, B}	2.02 ± 0.28 ^{b, A}	17.31 ± 5.15 ^{c, AC}
KarışıkTahıllı	2.49 ± 0.49 ^{a, A}	1.30 ± 0.66 ^{a, A}	4.93 ± 1.98 ^{a, B}
Tam Buğday	2.16±0.29 ^{a, A}	2.18 ± 0.22 ^{a, A}	15.32 ± 4.39 ^{b, C}

* Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

(a-b) farklı harfler aynı satırdaki değerler arasındaki farkın p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu ifade etmektedir.

(A-B) farklı harfler aynı sütundaki değerler arasındaki farkın p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu

Çizelge 4.3.1.3 (b) Tahıl unları, fermente hamur ve ekmeklerden elde edilen İPE' lerde saptanan kimotripsin inhibisyon aktivitesi (KİU/g KM örnek)

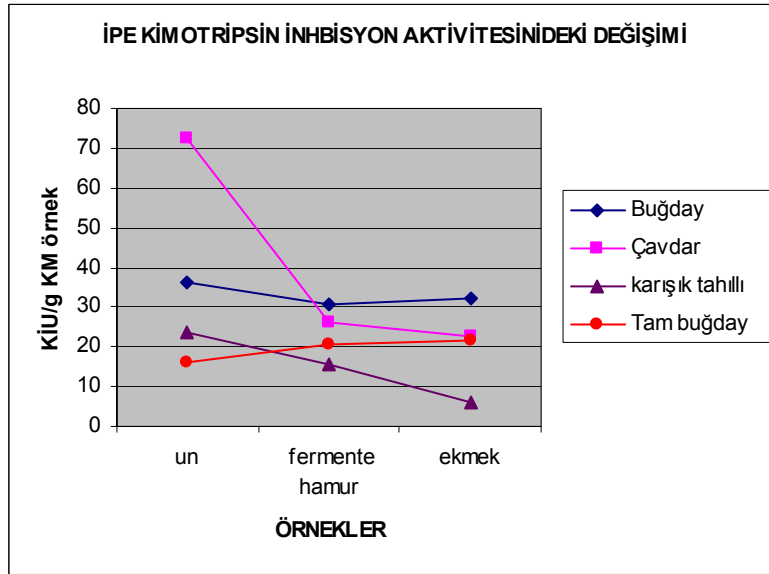
İPE	Kimotripsin inhibisyon aktivitesi* (KİU/g KM örnek)		
	Un	Fermente Hamur	Ekmek
Buğday	36.46 ± 4.39 ^{a, A}	30.48 ± 9.12 ^{a, A}	32.30 ± 5.51 ^{a, A}
Çavdar	72.64 ± 8.28 ^{a, B}	25.96 ± 6.30 ^{b, A}	22.82 ± 7.19 ^{b, A}
KarışıkTahıllı	23.88 ± 5.40 ^{a, C}	15.81 ± 8.11 ^{ab, B}	6.13 ± 3.27 ^{b, B}
Tam Buğday	15.88 ± 1.91 ^{a, C}	20.57 ± 1.76 ^{a, AB}	21.60 ± 6.12 ^{a, A}

* Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

(a-c) farklı harfler aynı satırdaki değerler arasındaki farkın p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu ifade etmektedir.

(A-C) farklı harfler aynı sütundaki değerler arasındaki farkın p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu

Buğday unu, fermente hamur ve ekmek örneklerinden elde edilen İPE ler arasında tripsin inhibisyon aktivitesinde olduğu gibi g örnekteki kimotripsin inhibisyon aktivitesi için de önemli bir fark bulunmamaktadır ($p>0.05$). Aynı durum tripsin inhibisyon aktivitesi göstermeyen fakat kimotripsin inhibisyon aktivitesi gösteren tam buğday unu, fermente hamur ve ekmeklerinden elde edilen İPE' ler için de geçerlidir. Çavdar unundan elde edilen İPE'nin kimotripsin inhibisyon aktivitesi, fermente hamur ve ekmekten elde edilen İPE'nin kimotripsin inhibisyon aktivitesinden yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Karışık tahıllı un ve bu undan elde edilen fermente hamur ile ekmeğe ait İPE' nin kimotripsin inhibisyon aktiviteleri karşılaştırıldığında ekmeğin kimotripsin inhibisyon aktivitesinin düşük olduğu, ancak fermente hamurun kimotripsin inhibisyon aktivitesi ile ekmeğin kimotripsin inhibisyon aktivitesi arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Tüm çeşit ve örnekler için İPE ler arasında en yüksek kimotripsin inhibisyon aktivitesi 72.64 ± 8.28 KIU/g örnek ile çavdar ununda saptanırken, bu değeri buğday unu (36.46 ± 4.39 KIU/g örnek) ve buğday ekmeği (32.30 ± 5.51 KIU/g örnek) İPE' leri takip etmiştir. Örneklerden elde edilen İPE' lerin kimotripsin inhibisyon aktivitesindeki değişim Şekil 4.3.1.3' de gösterilmiştir.



Şekil 4.3.1.3 Tahıl unları, fermente hamur ve ekmeklerden elde edilen İPE' lerde saptanan kimotripsin inhibisyon aktiviteleri

Kimotripsin inhibisyon aktiviteleeri mg protein bazında değerlendirildiğinde en yüksek inhibisyon aktivitesi ekmeklerde saptanmıştır. Karışık tahıllı hariç diğer ekmek eşitleri için elde edilen kimotripsin inhibisyon aktiviteleeri unlar için elde edilen kimotripsin inhibisyon aktiviteleerinden daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).

Tam buğday çeşidi dışında tüm çeşitlerin un, fermente hamur ve ekmek örneklerinden elde edilen İPE lerin hem tripsini hem de kimotripsini inhibe edebilen inhibitör ve/veya inhibitrleeri içerdiği sonucu elde edilmiştir.

4.3.2 Son protein ekstraktı (SPE)

Hammaddelerden elde edilen İPE' lere ait protein miktarı ile tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitesi sonuçlarına dayanarak her iki inhibisyon aktivitesini de göreceli olarak yüksek seviyede gösteren buğday ekmeği, avdar unu ve avdar ekmeği örneklerinden SPE elde edilmesine karar verilmiştir.

4.3.2.1 SPE protein içerikleri

Buğday ekmeği, avdar unu ve avdar ekmeği İPE' lerden elde edilen SPE' lere ait protein değerleeri izelge 4.3.2.1 (a)'da verilmiştir. Buğday ekmeği, avdar unu ve avdar ekmeğinden elde edilen SPE'lerin protein miktarlarının birbirinden farklı olduğu ve en yüksek protein içeriğine avdar ununun sahip olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Protein içerikleri kuru madde bazında hesaplandığında da benzer sonuç elde edilmiştir.

Çizelge 4.3.2.1(a) Buğday ekmeği, çavdar unu ve çavdar ekmeği İPE' lerinden elde edilen SPE' lere ait protein değerleri

SPE	Protein miktarı	
	mg protein/mL SPE	mg protein/g KM örnek
Buğday ekmeği	0.09 ± 0.00 ^a	0.56 ± 0.02 ^a
Çavdar unu	0.17 ± 0.02 ^b	1.02 ± 0.11 ^b
Çavdar ekmeği	0.05 ± 0.01 ^c	0.32 ± 0.08 ^c

* Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

(a-c) farklı harfler değerler arasındaki farkın Tukey testi sonucunda p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu ifade etmektedir.

İPE'den SPE elde etme aşamasında proteinde meydana gelen kayıp ise Çizelge 4.3.2.1(b)'de görülmektedir.

Çizelge 4.3.2.1 (b) Buğday ekmeği, çavdar unu ve çavdar ekmeği İPE' lerinden SPE eldesinde meydana gelen protein kaybı

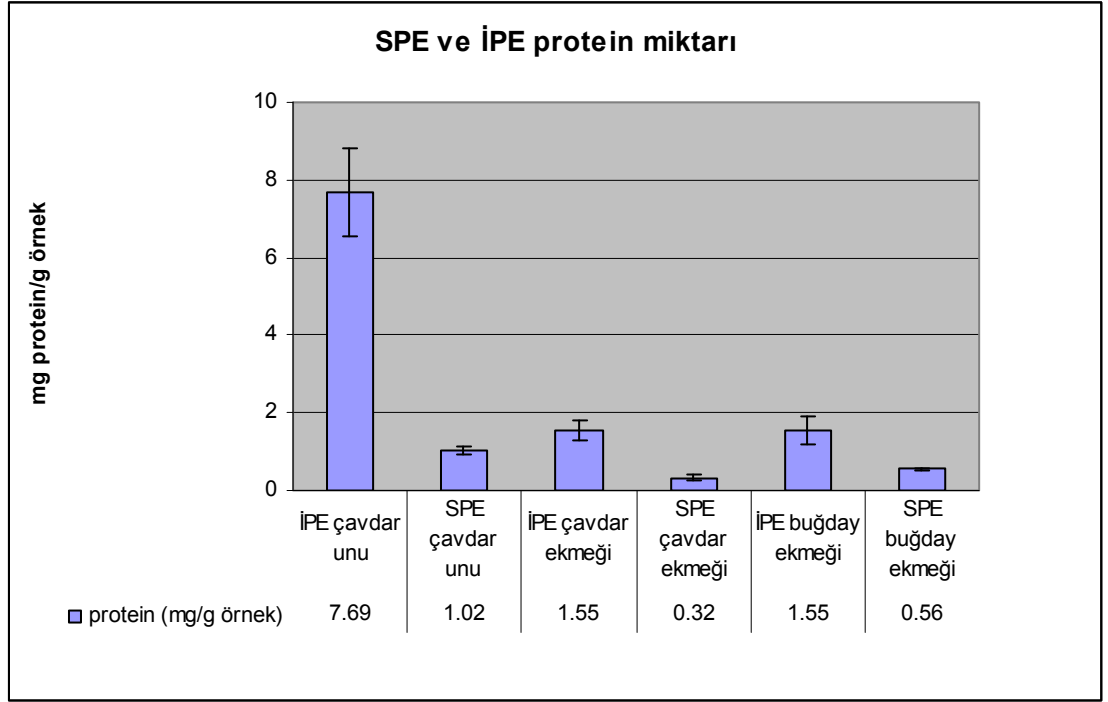
	Protein kaybı (%) *
Buğday ekmeği	49.0 ± 10.0 ^a
Çavdar unu	84.9 ± 3.2 ^b
Çavdar ekmeği	67.4 ± 10.9 ^c

* Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

(a-c) farklı harfler değerler arasındaki farkın p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu ifade etmektedir.

SPE eldesinde İPE lere denatürasyon (80°C su banyosunda bekletme), iyonik şiddeti artırarak ve iyonik şiddeti azaltarak çöktürme (çözeltiyi amonyum sülfatla %70 doygun hale getirme, çözelti pH' sını 4'e ayarlama ve çözeltiyi pH 8.0 tampon çözeltisine alma) işlemleri uygulanmıştır. Uygulanan bu işlemler, SPE' lere protein kaybına neden olmasına rağmen pH ve sıcaklığa dayanıklı proteinlerin elde edilmesi avantajını sağlamıştır. Şekil 4.3.2.1 (a)' dan da görüldüğü üzere SPE eldesinde protein miktarı İPE' ye

göre azalmıştır. SPE' lerde % protein kaybı en yüksek çavdar ununda (% 84.9 \pm 3.2) görülürken, en düşük protein kaybı % 49.0 \pm 10.0 ile buğday ekmeğinde saptanmıştır. Scarafoni et al., (2008) beyaz acı bakla tohumlarından elde ettikleri SPE' de, İPE' ye göre % 99'dan fazla protein kaybı bildirmişlerdir.



Şekil 4.3.2.1 (a) Buğday ekmeği, çavdar unu ve çavdar ekmeği İPE ve SPE' lerinin protein miktarları

4.3.2.2 SPE tripsin inhibisyon aktivitesi

Buğday ve çavdar ekmeği İPE' lerinden elde edilen SPE' lerde tripsin inhibisyon aktivitesi saptanmamıştır. Bu durum örneklere uygulanan protein çöktürme işlemleri nedeniyle gerçekleşmiş olabilir. Çavdar unu İPE' den elde edilen SPE' de ise oldukça yüksek tripsin inhibisyon aktivitesi (102.37 \pm 19.08 TİU/mg protein ve 114.11 \pm 13.21 TİU/g örnek) belirlenmiştir. SPE eldesi sırasında meydana gelen % 84.9' luk protein kaybına rağmen tripsin inhibisyon aktivitesi İPE' ye göre artmıştır. Bu artış SPE eldesinden ekstrakte edilen proteinlerin daha fazla tripsin inhibisyon aktivitesi göstermesi ile açıklanabilir.

Çavdar unu SPE' de belirlenen protein miktarı Scarafoni et al., (2008)'e göre beyaz acı bakladan aynı yöntemle elde edilen SPE' deki protein miktarından (0.91 mg protein/g örnek) daha yüksek (1.02 ± 0.11 mg protein/g örnek) bulunmuştur. Fakat beyaz acı bakla SPE' nin tripsin inhibisyon aktivitesi (186 TİU/mg protein) çavdar unu SPE' den (102.37 ± 19.08 TİU/mg protein) daha yüksektir.

4.3.2.3 SPE kimotripsin inhibisyon aktivitesi

Buğday ekmeği, çavdar unu ve çavdar ekmeği İPE' lerinden elde edilen SPE' lere ait kimotripsin inhibisyon aktivitesi g KM örnek ve mg protein için hesaplanıp sonuçlar Çizelge 4.3.2.3' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3.2.3 Buğday ekmeği, çavdar unu ve çavdar ekmeği İPE' lerinden elde edilen SPE' lere ait kimotripsin inhibisyon aktivitesi

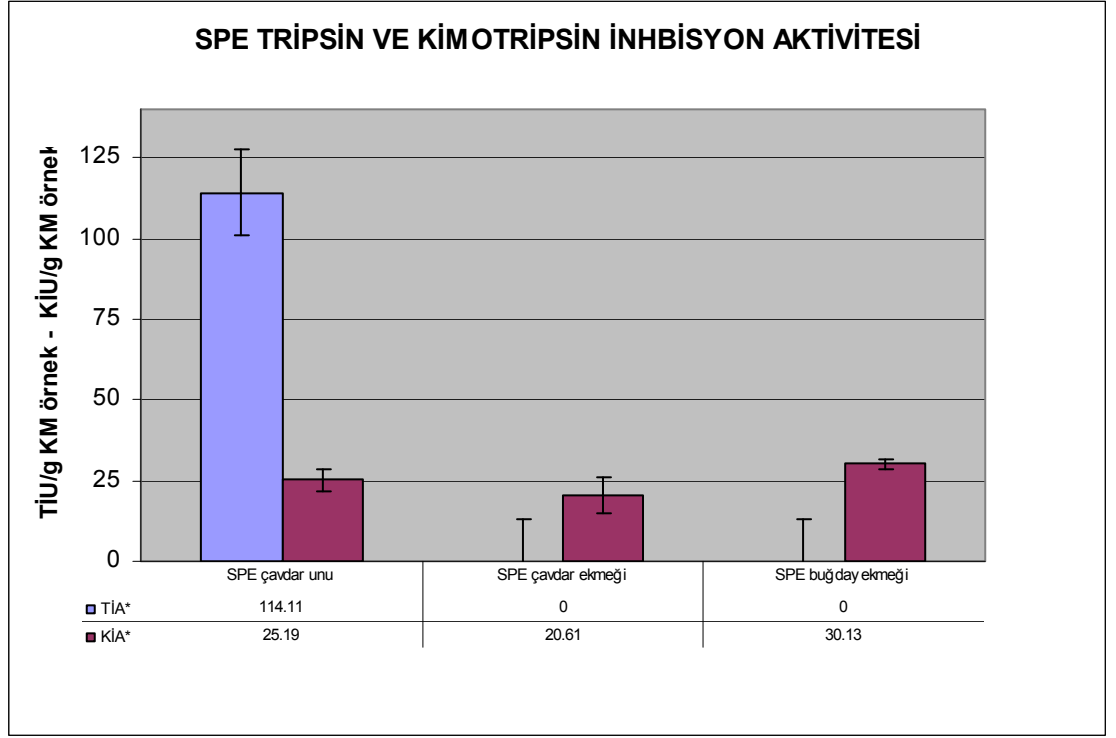
SPE	KİU/mg protein*	KİU/g KM örnek *
Buğday Ekmeği	39.51 ± 1.73^a	30.13 ± 1.55^a
Çavdar Unu	22.30 ± 1.25^a	25.19 ± 3.22^{ab}
Çavdar Ekmeği	47.69 ± 7.59^a	20.61 ± 5.60^a

* Değerler ortalama \pm SD olarak verilmiştir.

(a-b) farklı harfler aynı sütundaki değerler arasındaki farkın $p < 0.05$ düzeyinde önemli olduğunu göstermektedir

Tripsin inhibisyon aktivitesi göstermeyen buğday ve çavdar ekmeği SPE' leri sırasıyla 30.13 ± 1.55 KİU/g örnek ve 20.61 ± 5.60 KİU/g örnek olmak üzere kimotripsin inhibisyon aktivitesi göstermişlerdir (Şekil 4.3.2.3) . Buğday ve çavdar ekmeklerinin SPE' lerinde tripsin inhibisyon aktivitesinin saptanmamış olmasına karşı kimotripsin inhibisyon aktivitesinin belirlenmesi, proteaz inhibitörlerinden kimotripsini inhibe etme yeteneğine sahip olanların sıcaklık ve pH değişimlerine daha dayanıklı olduğu şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca SPE eldesinde uygulanan diyaliz (MASD 3500 Da) ve tampon değiştirme (MASD 3000) işlemleri sırasında tripsini inhibe edebilen ve düşük

molekül ağırlığına sahip olan inhibitörler uzaklaştırılmış olabilir. SPE buğday ekmeği, SPE çavdar unu ve SPE çavdar ekmeği'nde saptanan tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktiviteleri Şekil 4.3.2.3' de gösterilmiştir.



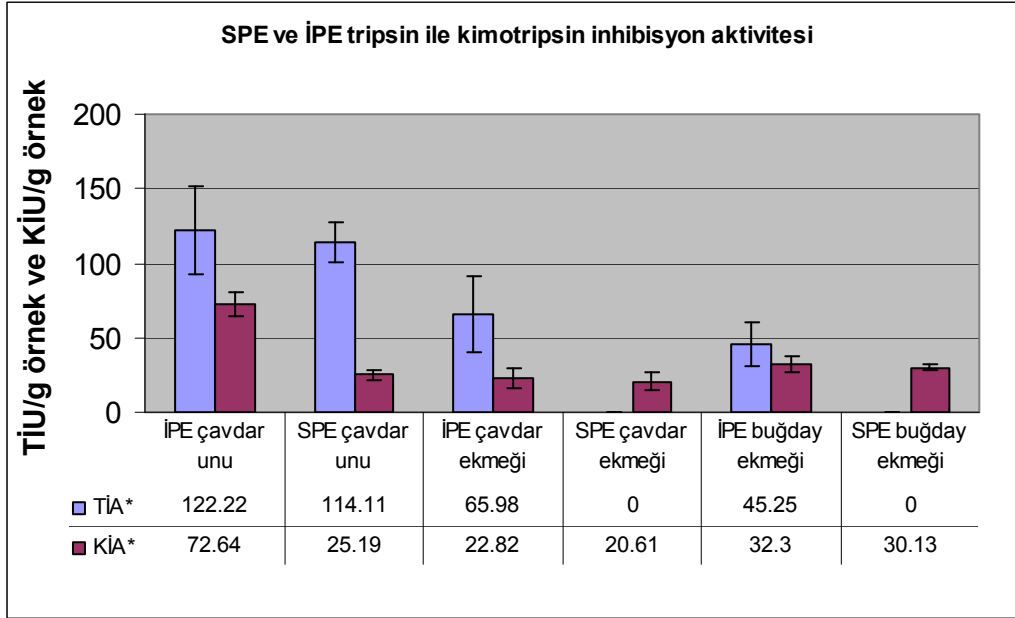
*TİA: Tripsin inhibisyon aktivitesi, KİA: Kimotripsin inhibisyon aktivitesi

Şekil 4.3.2.3 Buğday ekmeği, çavdar unu ve çavdar ekmeği SPE'lerinin tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktiviteleri

Ee et al., (2007) *Acacia victoriae* Bentham ile yaptıkları çalışmada suda bekletme ve 100°C' de kaynatma işlemlerinin tripsin ve kimotripsin inhibitörleri üzerine etkisini araştırmışlar ve suda bekletme işleminin tripsin inhibisyon aktivitesini arttırdığını, kimotripsin inhibisyon aktivitesini ise azalttığını saptamışlardır. Tripsin inhibitörlerinin kimotripsin inhibitörlerine göre daha dirençli olduğunun belirtildiği çalışmada kaynatma işleminin her iki inhibitörü tamamen inaktif hale getirdiği fakat kimotripsin inhibisyon aktivitesinin tamamen kaybolmadan 10 saniye önce yüksek bir artış gösterdiği kaydedilmiştir. Suda bekletme ve kaynatma işlemlerinin bir arada kullanılması ise iki inhibitörü de inaktif hale getirmiştir.

Nohut, mercimek ve fasulye ile yapılan bir çalışmada nohut ve fasulye örneklerinde bulunan tripsin ve kimotripsin inhibitörlerinin suda bekletme ile bir miktar arttığı fakat pişirme ve dehidrasyon işlemlerinin bir arada kullanılmasının tripsin inhibitörlerini azalttığı, kimotripsin inhibitörlerini ise tamamen yok ettiği saptanmıştır. Aynı çalışmada mercimek örneklerinde tripsin ve kimotripsin inhibitörleri saptanmamıştır (Cabrejas et al., 2009).

Buğday ekmeği, çavdar unu ve çavdar ekmeği İPE ve SPE' leri için tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktiviteleri Şekil 4.3.2.4'de bir arada gösterilmiştir.



*TİA: Trispsin inhibisyon aktivitesi KİA: Kimotripsin inhibisyon aktivitesi

Şekil 4.3.2. 4 Çavdar unu, çavdar ekmeği ve buğday ekmeği İPE ve SPE' lerinin tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktiviteleri

Şekilden de görüldüğü gibi hem çavdar ekmeği hem de buğday ekmeğinden elde edilen SPE'de tripsin inhibisyon aktivitesi saptanmamış, SPE çavdar unu ve SPE çavdar ekmeği kimotripsin inhibisyon aktiviteleri benzer bulunmuştur.

4.3.3 Çavdar unundan elde edilen SPE deki proteinlerin ultrafiltrasyon yöntemi ile fraksiyonlara ayrılması

SPE protein miktarı ile tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktiviteleri göz önüne alındığında Şekil 4.3.2.1 (a) ve Şekil 4.3.2.4'den de görüldüğü üzere SPE_{çavdar unu} protein miktarı ile tripsin ve kimotripsin aktivitesi SPE_{çavdar unu} ekmeği ve SPE_{buğday ekmeği} den daha yüksektir. Bu nedenle SPE_{çavdar unu} kullanılarak proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ultrafiltrasyon yöntemiyle 3 ayrı fraksiyona ayrılmasına karar verilmiştir. Söz konusu fraksiyonlar ve bu fraksiyonlara ait MASD bilgileri ise şöyledir;

- F1, MASD 10 000 Da' dan küçük
- F2, MASD 10 000 ila 20 000 Da arası
- F3 ise 20 000 Da' dan büyük protein fraksiyonlarını

ifade etmektedir.

Fraksiyonlar arasında $MA_{F1} < 10\ 000\ Da < MA_{F2} < 20\ 000\ Da < MA_{F3}$ ilişkisi bulunmaktadır. Fraksiyonlar için MASD literatürdeki verilerden yararlanılarak belirlenmiştir. Bitkilerde doğal olarak bulunan proteaz inhibitörlerinin molekül ağırlıklarının çoğunlukla 8 – 20 kDa arasında olmak üzere genelde 4 – 85 kDa arasında değiştiği belirtilmiştir (Chaudhary et al., 2008). Bu nedenle 10 000 Da ve 20 000 Da MASD' ye sahip ultrafiltrasyon aparatlarının kullanılması tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitesinin molekül ağırlıklarına göre nasıl bir değişim gösterdiğini saptamak için uygun görülmüştür. Fraksiyonlara ayırma işlemi sonrasında sadece $MA > 20000\ Da$ olan fraksiyonda (F3) protein saptanmış diğer fraksiyonlarda ise saptanmamıştır. F3 fraksiyonunun protein içeriği $0.24 \pm 0.02\ mg\ protein/mL$ F3 ve $0.27 \pm 0.02\ mg\ protein/gr$ örnek olarak belirlenmiştir.

F3 fraksiyonunun tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitesi Çizelge 4.3.3'de görülmektedir.

Çizelge 4.3.3 F3 fraksiyonunun tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitesi

SPE _{çavdar unu dan elde edilen fraksiyon}	Tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitesi			
	TİU/mg protein*	TİU/g KM örnek*	KİU/mg protein*	KİU/g KM örnek*
F3	87.39 ± 12.16	133.82 ± 17.72	6.43 ± 0.58	10.20 ± 1.22

* Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

F3 fraksiyonunun tripsin inhibisyon aktivitesi kimotripsin inhibisyonu aktivitesinden daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). F3 fraksiyonunun (MA > 20000 Da) TİU mg/ protein değerinin, İPE_{çavdar unu} (15.85 ± 3.11 mg/ protein), İPE_{çavdar fermente hamuru} ($4.75 \pm 1.1.8$ mg/protein), İPE_{çavdar ekmeği} (46.02 ± 11.89 mg/protein) TİU değerlerinden daha yüksek ve SPE_{çavdar unu} (102.37 ± 19.8 mg/protein) TİU değeriyle benzer olduğu belirlenmiştir. F3 fraksiyonunun KİU mg/protein değerinin İPE_{çavdar unu} (9.56 ± 2.24 mg/protein), İPE_{çavdar ekmeği} (17.31 ± 5.15 mg/protein), SPE_{çavdar unu} (22.30 ± 1.25 mg/protein) ve SPE_{çavdar ekmeği} (47.69 ± 7.59 mg /protein) KİU değerlerinden daha düşük, İPE_{çavdar fermente hamuru} (2.02 ± 0.28 mg/protein) KİU değerinden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu bilgilerden yola çıkarak çavdar ununda tripsin ve/veya kimotripsin inhibisyon aktivitesi gösteren proteaz inhibitör ve/veya inhibitör gruplarının molekül ağırlıklarının 20 000 Da' dan büyük olduğu söylenilebilir. Söz konusu inhibitör ve/veya inhibitör grubunun SPE eldesinden sonra aktivitesini sürdürüyor olması da sıcaklık ve pH değişimlerine karşı dayanıklı olduğunu göstermektedir.

4.3.4 *In vitro* sindirim işleminin buğday ve çavdar ekmeğinin tripsin inhibisyon aktivitesi üzerine etkisi

In vitro sindirim işlemi için buğday ekmeği ve çavdar ekmeği örneklerine önce mide sindirimi daha sonra mide sindirimi uygulanmış örnekler bağırsak sindirimi uygulanmıştır. Mide sindirimi sonunda elde edilen örneklerin tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitesi belirlenmeden önce sindirim enzimlerinin uzaklaştırılması amacıyla MASD 20 000 Da olan

ultrafiltrasyon aparatları kullanılmıştır. Bağırsak sindirimi sonunda elde edilen diyalizat hacmi 8.5 mL olarak belirlenmiştir. Elde edilen örneklerin protein içerikleri ile tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktiviteleri belirlenmiş ve sonuçlar sırasıyla Çizelge 4.3.4.1 ve Çizelge 4.3.4.2’ de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3.4.1 Buğday ve çavdar ekmekleri mide ve bağırsak diyalizatları protein içerikleri

Diyalizat	Protein (mg/mL diyalizat)*	Protein (mg/toplam diyalizat hacmi)*
Buğday ekmeği mide diyalizati	0.025 ± 0.005 ^a	0.37 ± 0.07 ^a
Buğday ekmeği bağırsak diyalizati	0.027 ± 0.006 ^a	0.21 ± 0.05 ^a
Çavdar ekmeği mide diyalizati	0.015 ± 0.001 ^b	0.22 ± 0.02 ^b
Çavdar ekmeği bağırsak diyalizati	0.006 ± 0.002 ^c	0.05 ± 0.01 ^c

* Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

(a-b) farklı harfler aynı sütundaki değerler arasındaki farkın p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu göstermektedir

Çizelge 4.3.4.2 Buğday ve çavdar ekmekleri mide ve bağırsak diyalizatları tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktiviteleri

Diyalizat	TİU/mL diyalizat*	KİU/mL diyalizat*
Buğday ekmeği mide diyalizati	5.91 ± 0.87 ^{a,B}	2.12 ± 0.70 ^{a,A}
Buğday ekmeği bağırsak diyalizati	9.17 ± 2.15 ^{b,B}	3.78 ± 0.45 ^{b,A}
Çavdar ekmeği mide diyalizati	-	4.16 ± 1.16 ^{b,A}
Çavdar ekmeği bağırsak diyalizati	3.73 ± 2.14 ^{c,A}	2.46 ± 0.14 ^{a,A}

* Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

(a-b) farklı harfler aynı sütundaki değerler arasındaki farkın p<0.05 düzeyinde önemli olduğunu göstermektedir

(A-B) farklı harfler aynı sütundaki değerler arasındaki farkın $p < 0.05$ düzeyinde önemli olduğunu

Elde edilen veriler göz önüne alındığında buğday ekmeği ve çavdar ekmeği için *in vitro* sindirim sonrasında tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitelerinin mL mide ve bağırsak hacmindeki değişimi farklıdır.

Buğday ekmeğinde *in vitro* sindirimi sonunda bağırsak diyalizatında hem tripsin hem de kimotripsin inhibisyon aktivitesi için mL diyalizatta artış gözlenirken çavdar ekmeğinde *in vitro* sindirim sonunda bağırsak diyalizatında saptanan kimotripsin inhibisyon aktivitesi (2.46 ± 0.14 KIU/mL bağırsak diyalizatı) mide diyalizatındakine (4.16 ± 1.16 KIU/mL mide diyalizatı) göre düşüktür ($p < 0.05$).

Proteaz inhibitörlerinin proteazlarla olan etkileşimlerinin pH ya bağlılık gösterdiği ve nötr pH da kuvvetli olan bu etkileşimin pH nötrden 3.0'e doğru düştükçe hızla azaldığı belirtilmiştir (Hudson, 1982). Bu durum buğday ekmeği tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitesinde bağırsak sindirim sonundaki artışı ve çavdar örneği mide diyalizatında tripsin inhibisyon aktivitesi olmamasına karşın bağırsak diyalizatında saptanmasını desteklemektedir. Asidik koşullarda gerçekleştirilen mide sindirimi sırasında göreceli olarak düşük aktivite gösteren veya göstermeyen inhibitörler bazik koşullarda gerçekleştirilen bağırsak sindiriminde aktivitelerini ortam koşulları sayesinde arttırmış olabilirler.

Pirinç kepeğinden elde edilen tripsin inhibitörüne pepsin ve pepsin ile pankreatin bir arada kullanılarak uygulanan *in vitro* sindirimde ortama protein kaynağı olarak sığır serum albümini eklenmesinin etkisi incelenmiş ve ortamda sığır serum albüminin bulunmasının pepsin ile uygulanan sindirim sonrasında tripsin inhibisyon aktivitesini önemli ölçüde koruduğu buna karşın ortamda albümin bulunmadığında tripsin inhibisyon aktivitesinin azaldığı kaydedilmiştir. Diyetle birlikte alınan bir proteinle beraber tripsin inhibisyon aktivitesinin gastrointestinal sindirimde korunabileceği vurgulanmıştır (Tashiro and Ikegami, 1996).

Tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitesi üzerine fermantasyon ve pişirmenin etkisi örneklerden elde edilen İPE' lere ait sonuçlar üzerinden

yorumlanmıştır. Çünkü SPE' lerde söz konusu aktiviteler üzerinde SPE eldesinde uygulanan işlemlerin de etkisi bulunmaktadır. Çalışmada kullanılan her bir çeşit için fermantasyonun etkisi İPE_{un} ve $\text{İPE}_{\text{fermente hamur}}$; pişirmenin etkisi $\text{İPE}_{\text{fermente hamur}}$ ve $\text{İPE}_{\text{ekmek}}$, fermantasyon ve pişirmenin birlikte etkisi İPE_{un} ve $\text{İPE}_{\text{ekmek}}$ tripsin ve/veya kimotripsin inhibisyon sonuçları istatistiksel farklılıklarına göre kıyaslanarak Çizelge 4.3.4.3' de özetlenmiştir.

Çizelge 4.3.4.3 Fermantasyon, pişirme ve ikisinin ortak etkisinin tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitesi üzerine etkisi

ETKİ İPE	Fermantasyon	Piştirme	Fermantasyon ve Piştirme
Tripsin inhibisyon aktivitesindeki değişim (TİU/g KM örnek)	Buğday çeşidi için fark önemsiz, çavdar, karışık tahıllı ve tam buğday çeşitleri için azalma (p<0.05)	Çavdar ve buğday çeşidi için fark önemsiz, karışık tahıllı çeşidi için azalma (p<0.05)	Çavdar ve karışık tahıllı çeşidi için azalma (p<0.05), Buğday için fark önemsiz
Kimotripsin inhibisyon aktivitesindeki değişim (KİU/g KM örnek)	Buğday, çavdar ve karışık tahıllı çeşitleri için azalma (p<0.05), tam buğday çeşidi için fark önemsiz	Tüm çeşitler için fark önemsiz (p>0.05)	Çavdar ve karışık tahıllı çeşidi için azalma (p<0.05); buğday ve tam buğday çeşidi için fark önemsiz

Çizelge 4.3.4.3' ten görüldüğü gibi buğday çeşidi hariç fermantasyon, tüm çeşitler için tripsin inhibisyon aktivitesini azaltan etkiye neden olurken piştirme sadece karışık tahıllı ekmek çeşitlerinde tripsin inhibisyon aktivitesini azaltan etkiye sahiptir. Fermantasyon ve pişirmenin ortak etkisi ise karışık tahıllı ve çavdar çeşitleri için tripsin inhibisyon aktivitesinin azalmasına neden olmuştur. Bu yorumdan yola çıkarak karışık tahıllı çeşidi için

fermantasyon ve pişirmenin; çavdar çeşidi için fermentasyonun tripsin inhibisyon aktivitesi üzerine etkili olduğu çıkarımı yapılabilir. Kimotripsin inhibisyon aktivitesindeki değişim ile ilgili olarak fermentasyonun buğday ve tam buğday çeşitleri hariç tüm çeşitler için azaltıcı etkisi varken pişirmenin hiçbir çeşit üzerinde tripsin inhibisyon aktivitesini önemli derecede değiştiren bir etkisi saptanmamıştır. Fermentasyon ve pişirmenin ortak etkisi ise karışıktahıllı ve çavdar için kimotripsin inhibisyon aktivitesinde azaltıcı etkiye neden olurken buğday ve tam buğday için oluşan fark önemsizdir. Dikkat çekici olarak fermentasyon, pişirme ve ikisinin ortak etkisinin tam buğday kimotripsin inhibisyon aktivitesin üzerine etkisinin önemsiz olduğu söylenebilir. Benzer şekilde söz konusu işlemlerin buğday çeşidinde tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitesi üzerine bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Son 20 yıldır sağlık üzerine olumlu etkileri araştırılan proteaz inhibitörleri (Champ 2002) doğal biyoaktif bileşikler olarak değerlendirilmekte (Hill, 2004) ve antikarsinojenik ajan olarak kullanılabilecekleri vurgulanmaktadır (Clemente et al., 2004). Proteaz inhibitörlerinin proteinlerin sindirilirliğini azaltıcı etkisi gibi olumsuz etkilerinin veya karsinojeni baskılama gibi sağlık üzerine olumlu etkilerinin sindirilen miktara bağlı olduğu bildirilmiştir (Guillamón et al., 2008).

Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından proteaz inhibitörlerinin kaynaklarının araştırılması, gıdalardaki proteaz inhibitörlerinin aktivitelerinin belirlenmesi, gıdalardan alınan proteaz inhibitörlerinin konsantrasyonu ve toplumda kanser görülme sıklığı arasındaki ilişkinin saptanması, hayvanlar üzerinde proteaz inhibitörlerinin etkinliğinin belirlenmesi, proteaz inhibitörlerinin etki mekanizmasının aydınlatılması önerilmektedir (Losso, 2008).

5. SONUÇ

Bitkisel gıdalar depo proteinlerinden farklı olarak bazı spesifik fonksiyonlarda görev alan çeşitli biyoaktif polipeptitler içermektedirler. Bu bileşikler arasında enzim inhibitörleri, lektinler ve ribozom inaktive eden proteinler bulunmaktadır. Enzim inhibitörleri sınıfı, amilaz ve proteaz inhibitörlerini içeren farklı protein çeşitlerinden oluşmaktadır (Losso, 2008).

Çalışmada 4 farklı tahıl unu çeşidi, bu unlardan üretilen fermente ekmek hamurları ve ekmeklerden iki ayrı aşama olmak üzere protein ekstraksiyonu gerçekleştirilip ekstraktların tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktiviteleri ve inhibisyon aktivitesinin fermentasyon, pişirme ve *in vitro* sindirimden nasıl etkilendiği belirlenmiştir.

Tüm çeşitler için örneklerden elde edilen İPE' ler arasında g KM örnek bazında en yüksek protein miktarı fermente hamurlarda saptanmış, bunu un ve ekmekler takip etmiştir. Buna karşın İPE tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitesi için aynı sıralamanın geçerli olmadığı belirlenmiştir. Buğday unu, hamur ve ekmekleri arasında TIU/g KM örnek için önemli bir fark bulunmazken, karışıktahıllı çeşitte TIU/g KM değerleri arasında un > fermente hamur > ekmek sıralaması saptanmıştır. Çavdar çeşidi İPE' lerinde ise İPE_{çavdar unu} en yüksek tripsin inhibisyon aktivitesine sahipken (122.22 ± 30.02 TIU/g KM) İPE_{çavdar fermente hamur}' un tripsin inhibisyon aktivitesi yaklaşık olarak % 50.3 oranında azalmıştır.

İPE_{çavdar fermente hamuru} ve İPE_{çavdar ekmek} arasında tripsin inhibisyon aktivitesi açısından bir fark saptanmamıştır. Aynı ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstraktlarda saptanan bu sonuçlar aynı familyaya ait olsalar da farklı tahıllardaki proteinlerin tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktiviteleri açısından farklılık olduğunu göstermiştir. Ayrıca tam buğday çeşidi dışında tüm çeşitlerin un, fermente hamur ve ekmek örneklerinden elde edilen İPE lerin hem tripsini hem de kimotripsini inhibe edebilen inhibitör ve/veya inhibitörleri içerdiği sonucu elde edilmiştir.

İPE' ler için kimotripsin inhibisyon aktiviteleri mg protein bazında değerlendirildiğinde en yüksek inhibisyon aktivitesi ekmeklerde saptanmıştır ($p < 0.05$).

Tüm çeşit ve örnekler için kuru madde örnek miktarında İPE ler arasında en yüksek kimotripsin inhibisyon aktivitesi 72.64 ± 8.28 KİU/g ile çavdar ununda saptanırken, bu değeri buğday unu (36.46 ± 4.39 KİU/g) ve buğday ekmeği (32.30 ± 5.51 KİU/g) İPE' leri takip etmiştir.

Buğday ve çavdar ekmeği İPE' lerinden elde edilen SPE' lerde tripsin inhibisyon aktivitesi saptanmamıştır. Bu durum örneklere uygulanan protein çöktürme işlemleri nedeniyle gerçekleşmiş olabilir. Çavdar unu İPE' den elde edilen SPE' de ise oldukça yüksek tripsin inhibisyon aktivitesi (102.37 ± 19.08 TİU/mg protein ve 114.11 ± 13.21 TİU/g örnek) belirlenmiştir. SPE eldesi sırasında meydana gelen % 84.9' luk protein kaybına rağmen tripsin inhibisyon aktivitesi İPE' ye göre artmıştır. Bu artış SPE eldesinden ekstrakte edilen proteinlerin daha fazla tripsin inhibisyon aktivitesi göstermesi ile açıklanabilir.

Tripsin inhibisyon aktivitesi göstermeyen buğday ve çavdar ekmeği SPE' leri sırasıyla 30.13 ± 1.55 KİU/g örnek ve 20.61 ± 5.60 KİU/g örnek olmak üzere kimotripsin inhibisyon aktivitesi göstermişlerdir

Buğday ve çavdar ekmeklerinin SPE' lerinde tripsin inhibisyon aktivitesinin saptanmamış olmasına karşın kimotripsin inhibisyon aktivitesinin belirlenmesi, proteaz inhibitörlerinden kimotripsini inhibe etme yeteneğine sahip olanların sıcaklık ve pH değişimlerine daha dayanıklı olduğu şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca SPE eldesinde uygulanan diyaliz (MASD 3500 Da) ve tampon değiştirme (MASD 3000) işlemleri sırasında tripsini inhibe edebilen ve düşük molekül ağırlığına sahip olan inhibitörler uzaklaştırılmış olabilir.

SPE_{çavdar unu}'ndan elde edilen ve molekül ağırlığı 20 000 Da' dan büyük olan F3 fraksiyonunun tripsin inhibisyon aktivitesi 133.82 ± 17.72 TİU/g KM örnek ve kimotripsin inhibisyon aktivitesi 10.20 ± 1.22 KİU/g KM örnek olarak saptanmıştır. Bu sonuçlara dayanarak çavdar ununda tripsin

ve/veya kimotripsin inhibisyon aktivitesi gösteren proteaz inhibitör ve/veya inhibitör gruplarının molekül ağırlıklarının 20 000 Da' dan büyük olduğu söylenebilir. Söz konusu inhibitör ve/veya inhibitör grubunun SPE eldesinden sonra aktivitesini sürdürüyor olması da sıcaklık ve pH değişimlerine karşı dayanıklı olduğunu göstermektedir.

Buğday ekmeğinde *in vitro* sindirimi sonunda mide diyalizatına göre bağırsak diyalizatında hem tripsin hem de kimotripsin inhibisyon aktivitesi için gözlenirken çavdar ekmeğinde *in vitro* sindirim sonunda bağırsak diyalizatında saptanan kimotripsin inhibisyon aktivitesi (2.46 ± 0.14 KİU/mL bağırsak diyalizatı) mide diyalizatındakine (4.16 ± 1.16 KİU/mL mide diyalizatı) göre daha düşük olarak saptanmıştır ($p < 0.05$).

Çalışmada kullanılan ekmeklerin bir dilimlerinin (25 g) sindirime uğramadan önceki tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitesini değerlendirmek amacıyla İPE için g kuru maddede belirlenen inhibisyon aktivitesi değerlerinden TİU ve KİU hesaplandığında buğday, çavdar ve karışık tahıllı ekmeklerinin bir dilimlerinin sırasıyla 750 ± 244 TİU, 1036 ± 406 TİU ve 479.0 ± 151 TİU tripsin inhibisyon aktivitesi gösterdikleri belirlenmiştir. Bir dilim buğday, çavdar, karışık tahıllı ve tam buğday ekmeğinin sindirime uğramadan önceki kimotripsin inhibisyon aktivitesi ise sırasıyla 535 ± 91 KİU, 359 ± 113 KİU, 101 ± 53 KİU ve 348 ± 99 KİU olarak hesaplanmıştır. Buğday ve çavdar ekmeklerinin bir diliminin *in vitro* sindirim sonrası tripsin ve kimotripsin inhibisyon aktivitesi bağırsak diyalizatları için belirlenen inhibisyon ünitesi/mL değerlerinden hesaplandığında, buğday ve çavdar ekmeğinde *in vitro* sindirim sonrası saptanan tripsin inhibisyon aktivitesi sırasıyla 780 ± 183 TİU ve 317 ± 182 TİU, kimotripsin inhibisyon aktivitesi ise sırasıyla 321 ± 38 KİU ve 209 ± 12 KİU olarak bulunmuştur. Bir dilim buğday ekmeği için *in vitro* sindirim öncesi ve sonrasında belirlenen tripsin inhibisyon aktivitesi değerleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmazken ($p > 0.05$), çavdar ekmeğindeki tripsin inhibisyon aktivitesinin *in vitro* sindirim sonrası azaldığı saptanmıştır ($p < 0.05$). Hem buğday hem de çavdar ekmeğindeki kimotripsin inhibisyon aktivitesinin ise *in vitro* sindirim sonrasında azaldığı belirlenmiştir ($p < 0.05$).

Bir dilim buğday ve çavdar ekmeğinin kimotripsin inhibisyon aktivitesinin Kennedy (1998) tarafından potansiyel antikarsinojenik etki için önerilen günlük 30 KIÜ alım değerinin çok daha üzerinde olduğu görülmektedir.

Elde edilen verilerden çavdar ve buğday ekmeklerinin günlük beslenme modeli içerisinde kararında tüketimlerinin sağlık üzerine olumlu etki sağlayabileceği öngörülebilir.

Çalışmadan elde edilen sonuçların proteaz inhibitörlerinin gıda kaynaklarının araştırılması, mevcut tripsin ve/veya kimotripsin inhibisyon aktivitesi üzerine, fermantasyon, pişirme ve *in vitro* sindirimin etkisinin belirlenmesi açısından literatüre katkı sağlayacak ve gelecek çalışmalara ışık tutacak nitelikte olduğu düşünülmektedir.

6. ÖNERİLER

Konuyla ilgili olarak gelecekte yapılacak çalışmalarda,

- İnhibitörlerin uygun kromatografik yöntemle saflaştırılması ve karakterizasyonu, moleköl ağırlıklarının belirlenmesi
- Aminoasit sekans analizinin yapılması önerilebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Anonymous, 1999. Protein Purification Handbook, Amersham Pharmacia Biotech AB, USA., Pp 94.

Antony, U., Sripriya, G. and Chandra, T.S., 1996, The effect of fermentation on the primary nutrients in foxtail millet (*Setaria italica*), Food Chemistry, 56, 381 – 384.

AOAC International, 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International 18th Edition, AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 935.36.

AOAC International, 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International 18th Edition, AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 925.10.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.

Burns, R. A., 1987. Protease inhibitors in processed plant foods. *Journal of Food Protection*, 50, 161-166.

Cabrejas, M.A.M., Aguilera, Y., Pedrosa, M.M., Cuadrado, C., Hernández, T., Díaz, S., and Esteban, R.M., 2009, The impact of dehydration process on antinutrients and protein digestibility of some legume flours, Food Chemistry, 114, 1063 – 1068.

Champ, M.M.J., 2002. Non-nutrient bioactive substances of pulses, British Journal of Nutrition, 88, 307 – 319.

Chaudhary, N.S., Shee C., Islam, A., Ahmad, F., Yernool, D., Kumar, P., Sharma, A.K., 2008. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from Putranjiva roxburghii seeds, Phytochemistry, 69, 2120–2126.

Chavez, M.D.M., and Chavez, A. 1998. Diet that prevents cancer: recommendations from the American Institute for Cancer Research, *Int. J. Cancer*.11, S85–S99.

(KAYNAKLAR DİZİNİ devam)

Clawson, G.A., 1996. Protease Inhibitors and Carcinogenesis: A Review. *Cancer Investigation*, 14, 597 – 608.

Clemente, A., MacKenzie, D. A., Jonson, I. T., and Domoney, C. (2004). Investigation of legume seed protease inhibitors as potential anticarcinogenic proteins, *Proceedings of the fourth international workshop on antinutritional factors in legume seeds and oilseeds*, 137–141.

Dağlıoğlu, O. 1998. Ekmegin Önemi ve Beslenmemizdeki Yeri. *Unlu Mamuller Teknolojisi*, 7, 38-44.

Deshimoru, M., Hanamoto, R., Kusano, C., Yoshimi, S., Terada, S., 2002. Purification and characterization of proteinase inhibitors from Wild Soja (Glycine Soja) Seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 1897–1903.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), *Cancer*, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en> (Erişim tarihi:25.08.2009).

Ee, K.Y., Zhao J., Rehman, A., Agboola, S., 2008. Characterisation of trypsin and α -chymotrypsin inhibitors in Australian wattle seed (*Acacia victoriae* Benth). *Food Chemistry*, 107, 337–343.

Egaña, J.I., Uauy, R., Cassorla, X., Barrera, G. and Yañez, E., 1992. Sweet lupin protein utilization in young men, *Journal of Nutrition*, 122, 2341–2347.

Ertugay, Z., Kurt, A., Elgün, A. ve Gökalp, Y.H. 1993. Gıda Bilimi ve Teknolojisi, Atatürk Üniversitesi Yayın No:671, Ziraat Fakültesi Yayın No:301, Ders Kitapları Serisi No:53, Erzurum, 78 s.

Elgün, A., ve Ertugay, Z., 1995, Tahıl İşleme Teknolojisi. Atatürk Üni. Ziraat Fakültesi Yayınları No:718, Erzurum, ss 376.

Elyas, S.H.A., Tinay, A.H.E., Yousif, N.E., Elsheikh, E.A.E., 2002. Effect of natural fermentation on nutritive value and in vitro protein digestibility of pearl millet, *Food Chemistry*, 78, 75–79.

(KAYNAKLAR DİZİNİ devam)

Erdmann K., Cheung B.W.Y., and Schröder H., 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 643–654.

Fear, G., Komarnytsky, G., and Raskin, I., 2007. Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs, *Pharmacology & Therapeutics*, 113, 354–368.

Ferrasson, E., Quillien, L., and Gueguen, J., 1997. Proteinase Inhibitors from Pea Seeds: Purification and Characterization. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 127-131.

Filho, J.X., 1992. The Biological Roles of Serine and Cysteine Proteinase Inhibitors in Plants, *R Bras. Fisiol. Veg.* 4, 1-6.

Frenkel, K., Chrzan, K., Ryan, C. A., Wiesner, R., and Troll W. 1987. Chymotrypsin-specific protease inhibitors decrease H₂O₂ formation by activated human polymorphonuclear leukocytes. *Carcinogenesis*, 1207–1212.

García-Gasca, T., Salazar-Olivo, L.A., Mendiola-Olaya, E., Blanco-Labra, A. 2002. The effects of a protease inhibitor fraction from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) on in vitro cell proliferation and cell adhesion of transformed cells. *Toxicology in vitro* 16, 229–233.

Gerrard, J.A. 2002. Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications, *Trends in Food Science & Technology*, 13: 391-399.

Gil-Izquierdo, A., Zafrilla, P., and Tomás-Barberán, F.A., 2002. An in vitro method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *Eur. Food Res. Technol.*, 214, 155-159.

Guillamón, E., Pedrosa, M.M, Burbano, C., Cuadrado, C., Sánchez, M.C and Muzquiz, M., 2008. The trypsin inhibitors present in seed of different grain legume species and cultivar, *Food Chemistry*, 107, 68–74.

Hill, G. D., 2004. Grain legumes and oilseeds-the way ahead, *Proceedings of the fourth international workshop on antinutritional factors in legume seeds and oilseeds*, EAAP publication, 110, 353–364.

(KAYNAKLAR DİZİNİ devam)

- Hou, W.C., Chen, Y.C., Chen, H. J., Lin, Y. H., Yang, L.L., and Lee, M.H.,** 2001. Antioxidant Activities of Trypsin Inhibitor, a 33 KDa Root Storage Protein of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam cv. Tainong 57). *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2978-2981.
- Hudson, B.J.F.,** 1982, *Developments in Food Proteins – 3*, Elsevier Applied Science Publishers, London and New York, 245-268.
- Hung, P.V., Maeda, T., and Morita, N.,** 2007, Dough and bread qualities of flours with whole waxy wheat flour substitution, *Food Research International*, 40, 273–279.
- Karaağaoğlu, N., Karabudak, E., Yavuz, S., Yüksek, O., Dinçer, D., Tosunbayraktar, G., Eren, F.H.,** 2008. Çeşitli Ekmeklerin Protein, Yağ, Nem, Kül, Karbonhidrat ve Enerji Değerleri. *Gıda*,33, 19-25.
- Karakaya, S. ve El, S.N.,** 2006. Total Phenols and Antioxidant Activities of Some Herbal Teas and *In Vitro* Bioavailability of Black Tea Polyphenols. *GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23 (1), 1-8.
- Kennedy, A.R.,** 1998. Chemopreventive Agents: Protease Inhibitors. *Pharmacol. Ther. Vol.*, 78, 3, 167–209.
- Kırsi, M. and Mikola, J.,** 1971. Occurrence of Proteolytic inhibitors in Various Tissues of Barley, *Planta (Berl.)* 96, 281—291.
- Lippman, S.M. and Matrisian, L.M.,** 2000. Protease Inhibitors in Oral Carcinogenesis and Chemoprevention, Vol. 6, 4599–4603.
- Losso, J.N.,** 2008. The Biochemical and Functional Food Properties of the Bowman-Birk Inhibitor. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 94–118.
- Luckett, S., Garcia, R.S., Barker, J.J., Konarev, A.V, Shewry, P.R., Clarke, A.R. and Brady, R.L.,** 1999. High-Resolution Structure of a Potent, Cyclic Proteinase Inhibitor from Sunflower Seeds. *J. Mol. Biol.*, 290, 525-533.

(KAYNAKLAR DİZİNİ devam)

Maleki, M., Hosoney, R.C. and Mattern, P.J., 1980, Effects of loaf volume, moisture content and protein quality on the softness and staling rate of bread, *Cereal Chem.*, 57, 138-140.

Mariotti, M., Alamprese, C., Pagani, M.A. and Lucisano, M., 2006, Effect of puffing on ultrastructure and physical characteristics of cereal grains and flours, *Journal of Cereal Science* , 43, 47–56.

Mauron, M., 1984. Effect of processing on nutritive value of food protein, In: *Handbook of Nutritive Value of Processed Food*, Rechcigl, M (Ed), Second Ed., Vol. 1, CRC Press. Inc., Florida.

Michalska, A., Benavent, M.A., Zielinska, H. and Castillo, M. D., 2008, Effect of bread making on formation of Maillard reaction products contributing to the overall antioxidant activity of rye bread, *Journal of Cereal Science*, 48, 123–132.

Mikola, M. and Mikkonen, A., 1999. Occurrence and Stabilities of Oat Trypsin and Chymotrypsin Inhibitors. *Journal of Cereal Science*, 30, 227–235.

Odoni, S., Koide T., Ono, T., 1986 . Wheat germ trypsin inhibitors. Isolation and structural characterization of single-headed and double-headed inhibitors of the Bowman-Birk type, *J Biochem.*,100, 975 – 983.

Poerio, E., Caporale, C., Carrano, L., Caruso. C., Vacca., F., and Buonocore V., 1994. The amino acid sequence and reactive site of a single-headed trypsin inhibitor from wheat endosperm. *J. Protein Chem.* 13:187–194.

Pomeranz, Y., 1987. *Modern Cereal Science and Technology*. VCH Publishers, 262, 277.

Prakash, V., 1986, Effect of Sodium Chloride on the Extractability of Proteins from Sesame Seed (*Sesamum indicum L.*) *J. Agric. Food Chem.*, 34, 257 – 259.

(KAYNAKLAR DİZİNİ devam)

Prabhasankar, P. and Rao, P.H., 2001. Effect of Different Milling Methods on Chemical Composition of Whole Wheat Flour. *European Food Research and Technology*, 213, 465 - 469.

Ragaei, S., Abdel, E.S.M., and Noaman, M., 2006, Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use, *Food Chemistry*, 98, 32-38.

Rao, K.N. and Suresh, C.G., 2007. Bowman–Birk protease inhibitor from the seeds of *Vigna unguiculata* forms a highly stable dimeric structure, *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1774, 1264–1273.

Ryan, C.A., 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *J. Ann.Rev. Phytopathol*, 28, 425-429.

Scarafoni, A., Magni, C., and Duranti, M., 2007. Molecular nutraceuticals as a mean to investigate the positive effects of legume seed proteins on human health. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 454–463.

Scarafoni, A., Consonni, A., Galbusera, V., Negri, A., Tedeschi, G., Rasmussen, P., Magni, C., Duranti, M., 2008. Identification and characterization of a Bowman–Birk inhibitor active towards trypsin but not chymotrypsin in *Lupinus albus* seeds. *Phytochemistry*, 69, 1820–1825.

Sessa, D.J. and Wolf, W.J., 2001. Bowman–Birk inhibitors in soybean seed coats. *Industrial Crops and Products*, 14, 73–83.

Tashiro, M. and Ikegami, S., 1996, Changes in activity, antigenicity, and molecular size of rice bran trypsin inhibitor by in vitro digestion, *J Nutr Sci Vitaminol.*, 42, 367-376.

Trugo, L.C., Ramos, L.A., Trugo, N.M.F., Souza, M.C.P., 1990. Oligosaccharide composition and trypsin inhibitor activity of *Phaseolus vulgaris* and the effect of germination on the alpha-galactoside composition and fermentation in the human colon. *Food Chemistry* 36, 53 – 61.

(KAYNAKLAR DİZİNİ devam)

Tsoi, A.Y.K., Ng, T.B. ve Fong, W.P., 2005. Antioxidative effect of a chymotrypsin inhibitor from *Momordica cochinchinensis* (Cucurbitaceae) seeds in a primary rat hepatocyte culture. *J. Peptide Sci.*, 11, 665–668.

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, Buğday unu tebliği, Tebliğ No: 99/01,

Yayımlandığı resmi gazete: 17.02.1999-23614

<http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/99-01.html> (Erişim tarihi: 12 Kasım 2009). **Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği**, Ekmek ve Ekmek Çeşitleri

Tebliğinde değişiklik yapılması hakkındaki tebliğ, Tebliğ No: 2008-5,

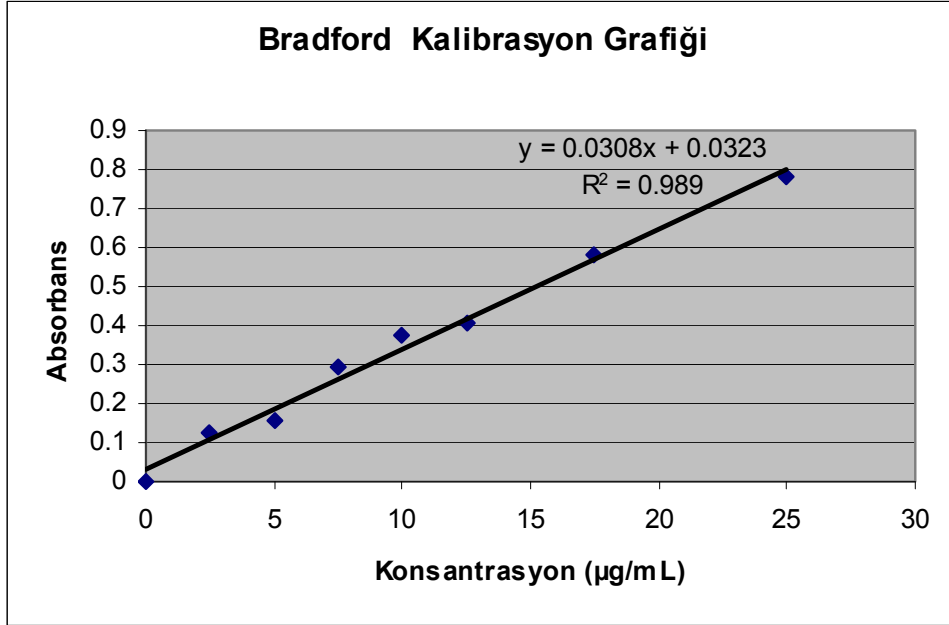
Yayımlandığı Resmi Gazete: 05.03.2008-26807.

<http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2002-13.html> (Erişim tarihi: 8 Aralık 2009).

Valdebouze, P., Bergeron, E., Gaborit, T., and Delort-Laval, J. (1980), Content and distribution of trypsin inhibitors and haemagglutinins in some legume seeds. *Canadian Journal of Plant Science*, 60, 695–701.

Verwimp, T., Vandeputte, G.E., Marrant, K., and Delcour, J.A. 2004, Isolation and characterisation of rye starch, *Journal of Cereal Science*, 39, 85–90.

Vincent, S.M.H. and Ng, T.B., 2008, A Bowman-Birk trypsin inhibitor with antiproliferative activity from Hokkaido large black soybeans. *J. Pept. Sci.*, 14, 278–282.

EK 2. Bradford Kalibrasyon Grafiği

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Mine KÖSTEKLİ
Doğum tarihi ve yeri : 21/09/1985, KÜTAHYA
Cinsiyeti : Kadın
Medeni hali : Bekar
Uyruk : T.C.
Adres : 1034 sok., Zübeyde Hnm. Apt., B 60 Blok D.34
Evka 4 Bornova İZMİR
Yabancı diller : İngilizce, Almanca
Mezun olduğu okullar :

- Soma Rıfat Dağdelen Anadolu Lisesi'nden 2003 yılında mezun oldu
- Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nden Gıda Mühendisi olarak 2007 yılında mezun oldu ve aynı yıl Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.