

**TOPLAM PROTEİN TAYİN YÖNTEMLERİ VE ENZİMLERLE
HİDROLİZLENMİŞ PROTEİN ÇÖZELTİLERİNDE TOPLAM
AMİNO ASİT TAYİN YÖNTEMLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

**THE COMPARISON OF THE METHODS FOR THE
ANALYSIS OF TOTAL PROTEIN AND THE ANALYSIS OF
TOTAL AMINO ACID VALUES IN ENZYMATICALLY
HYDROLYZED PROTEIN SOLUTIONS**

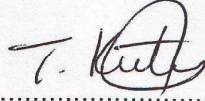
ÖZLEM GÜMRAH

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
KİMYA Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

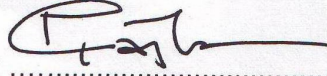
Bu çalışma jürimiz tarafından KİMYA ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan



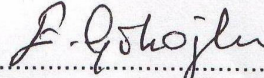
Prof. Dr. Tülin KUTSAL

Üye (Danışman)



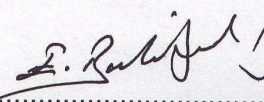
Prof. Dr. Perihan ÇAĞLAR

Üye



Prof. Dr. Elmas GÖKOĞLU

Üye



Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Üye



Doç. Dr. Serdal ABACI

ONAY

Bu tez . 26 / 06 /2008 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Prof. Dr. Erdem YAZGAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Saygıdeğer Annem Hatice GÜMRAH'a

TOPLAM PROTEİN TAYİN YÖNTEMLERİ VE ENZİMLERLE HİDROLİZLENMİŞ PROTEİN ÇÖZELTİLERİNDE TOPLAM AMİNO ASİT TAYİN YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Özlem Gümrah

ÖZ

Bu çalışmada, protein için iyi bir kaynak olan “süt tozu ” ve son zamanlarda yüksek protein içeriği ve insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileriyle ön plana çıkan “soya küspesi” ele alınarak protein özütlenmesi, tayin yöntemleri, protein hidrolizi ve hidroliz sonucunda açığa çıkan amino asitlerin tayini incelenmiştir. Çalışma dört ayrı kısım halinde yürütülmüştür.

Çalışmanın ilk bölümünde, yağı giderilmiş soya unundan protein eldesi için özütleme yönteminin süt tozu ve soya unu üzerinde denenmesi ve uygun pH, sıcaklık ve sürenin belirlenmesi ile ilgili deneyler yapılmıştır. Proteinlerin çözünürlüklerinin izoelektrik pH’da minimum olmasından faydalanarak, protein saflaştırılmıştır. Sonuç olarak, özütleme deneylerinde optimum koşullar 60 °C, pH:11 ve 1 saat olarak belirlenmiştir.

İkinci bölümde, literatürdeki başlıca toplam protein analiz yöntemlerinin incelenmesi sonucu seçilen beş yöntem süt proteini ve soya proteini tayini için denenmiştir. Gıda analizlerinde en çok kullanılan Kjeldahl yöntemine alternatif olarak Biüret 340-nm, Biüret-550 nm ve UV-280 nm, UV-220 nm gibi spektrofotometrik yöntemler seçilmiştir. Bu yöntemlerin seçilme nedeni, uygulanabilirliklerinin kolay olması ve farklı reaksiyonlar üzerinden gerçekleşmesidir. Sığır serum albumini (BSA) ve kazein standart proteinleri kullanılarak bütün yöntemler için ayrı “kalibrasyon grafikleri” ve daha sonra da “doğrusal çalışma grafikleri” elde edilmiştir. Bu sayede yöntemlerin, proteinlerin amino asit bileşimi ile olan ilgisi de incelenebilmiştir. Standart protein örnekleri ile yapılan çalışmalarda yöntemlerin çalışma aralıkları belirlenerek, duyarlılıkları karşılaştırılmıştır. Çalışma aralıkları, UV-280 nm, UV-220 nm, Biüret-340 nm, Biüret-550 nm için sırasıyla ; 0.03-2 mg/mL, 0.001-0.06 mg/mL, 1-10 mg/mL,

1-10 mg/mL olarak bulunmuştur. Seçilen yöntemler doğal örneklerle de uygulanmıştır. Bunun için soya protein izolatu, yağı giderilmiş soya unu, ekstrakte edilmiş soya unu ve yağsız süt tozu kullanılmıştır.

Spektrofotometrik yöntemler genel olarak, Kjeldahl yöntemine göre protein derişimi açısından yüksek sonuçlar vermiştir. Deney sonuçlarına göre UV-220 nm, Kjeldahl yöntemine en yakın sonuçları veren ve en hassas olan yöntemdir. Biüret-550 nm ise en düşük duyarlılığa sahiptir.

Çalışmanın üçüncü kısmında ise, elde edilen protein çözeltisinde enzim hidrolizi gerçekleştirilerek, hidroliz parametreleri belirlenmiştir. Hidrolizi gerçekleştirmek için Novozyme firmasından temin edilen 3 farklı endüstriyel proteaz enzimi (Flavourzyme 1000 L, Alcalase 2.5 L Type DX, Neutrase 1.5 mg) kullanılmıştır. Hidroliz sonrasında oluşan toplam amino asit değeri ve hidroliz derecesi (HD) belirlenmiştir.

Hidroliz tepkimesi 9 saat süreyle izlenmiştir. Enzim kombinasyonu şeklinde uygulanan yöntem en yüksek HD (%36.8) vermiştir. Daha sonra üçlü enzim karışımı ile %30.2 HD değerine ulaşılmıştır. En düşük hidroliz derecesi (%4.84) Neutrase enzimi ile elde edilirken, Flavourzyme (%15.7) ve Alcalase (%15.2) enzimleri ile gerçekleştirilen hidrolizlerde HD değerlerinin yaklaşık aynı olduğu gözlenmiştir.

Hidroliz deneylerinden sonra elde edilen amino asitler ninhidrin yöntemiyle belirlenmiştir. % 40 oranında amino asit içeren doğal örmekte yapılan tayin sonucunda amino asit miktarı %27.8 olarak bulunmuştur. Literatürde de belirtildiği gibi ninhidrin belirtecinin bulunması gerekenden daha düşük sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler : Protein tayini, protein özütlenmesi, enzimatik hidroliz, amino asit tayini.

Danışman : Prof. Dr. Perihan Çağlar, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Analitik Kimya Anabilim Dalı

THE COMPARISON OF THE METHODS FOR THE ANALYSIS OF TOTAL PROTEIN AND THE ANALYSIS OF TOTAL AMINO ACID VALUES IN ENZYMATICALLY HYDROLYZED PROTEIN SOLUTIONS

Özlem Gümrah

ABSTRACT

In this study, two good sources of protein, powdered milk and defatted soy flour were considered and the extraction of proteins, the methods of protein determination, the hydrolysis of proteins and the determination of amino acids obtained from protein hydrolysis were investigated. The study was carried out in four parts.

In the first part of this study, the extraction method for obtaining proteins from defatted soy flour was tried on both milk powder and defatted soy flour and the experiments for the determination of optimum values for pH, temperature and time were carried out. Proteins were purified by using the fact that the solubility of proteins is a minimum at isoelectrical pH values. Consequently, the optimum result was observed at 60 °C and pH 11 in the protein extraction experiments. The optimum time observed was one hour.

In the second part, five methods for total protein determination were chosen from the literature and were tried on samples of milk powder and defatted soy flour. The spectrophotometric methods such as Biuret-340 nm, Biuret-550 nm and UV-280 nm, UV-220 nm were chosen as the alternative for Kjeldahl method which is mostly used in food analysis. The rationale for choosing these methods includes the easiness of implementation and the applicability to different reactions. Two separate calibration curves were obtained using laboratory grade bovine serum albumin (BSA) and casein as the standard proteins. Therefore, the relationship between the proteins and their amino acid composition was examined in each case. When working with the samples of the standard proteins, the detection limits

and the sensitivities of the methods were compared. The detection limits of these methods were found for UV-280 nm, UV-220 nm, Biuret-340 nm, Biuret-550 nm; 0.03-2 mg/mL, 0.001-0.06 mg/mL, 1-10 mg/mL, 1-10 mg/mL, respectively. The chosen methods were also applied to the natural samples. For this aim, soy protein isolate, defatted soy flour, extracted soy flour and milk powder were used.

Generally, spectrophotometric methods give higher values for protein concentrations in comparison to the Kjeldahl method. UV-220 nm was the method which gives the nearest results to the Kjeldahl method and is the most sensitive one based on our experiments. Also, the Biuret- 550 nm has the lowest sensitivity.

In the third part of this study, enzymatic hydrolysis was performed to obtain soy protein hydrolyzates by using three different industrial protease enzymes (Flavourzyme 1000 L, Alcalase 2.5 L Type DX, Neutrase 1.5 mg) produced by Novozyme and the parameters of hydrolysis were determined. After hydrolysis, the total amino acid concentrations and the degree of hydrolysis (DH) were determined.

The hydrolysis was observed up to 9 hours. A combination of three enzymes showed the highest DH (%36.8). It was observed that the mixture of three enzymes results in considerably higher DH values (%30.2). The lowest DH was obtained in the presence of Neutrase (%4.84) and DH values were almost the same for Flavourzyme (%15.7) and Alcalase (%15.2).

After hydrolysis, the released amino acids in the protein hydrolyzates were determined using the ninhydrin method. When applied to the natural sample which has an amino acid content of 40 % the result was found as %27.8. However, as indicated in literature, the ninhydrin reagent gives lower results.

Keywords: Protein determination, protein isolation, enzymatic hydrolysis, amino acid determination.

Advisor: Prof. Dr. Perihan Çağlar, Hacettepe University, Chemistry Department, Analytical Chemistry Subdivision.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve tez çalışmam sırasında bilgi ve desteğiyle daima yanımda olup araştırma süresince yakın ilgi ve sonsuz yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Perihan Çağlar'a,

Çalışmalarım süresince tezimin her aşamasında karşılaştığım zorlukları aşabilmem için tecrübelerinden, fikir ve tartışmalarından yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Arif Çağlar'a,

Laboratuar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan, hocalarım Prof. Dr. Şeref Kunç ile hidroliz sistemini kurmama destek olan Prof Dr. Kadir Pekmez'e, ve çeşitli tartışmalarda fikirlerinden yararlandığım Yrd. Doç Dr. Mehmet Odabaşı ve Dr. Barış Temelli'ye,

Bu çalışmayı gerçekleştirirken güleryüzünü ve yardımını benden hiçbir zaman esirgemeyen sevgili arkadaşım, ablam Beray Temelli'ye, çalışmalarım süresince bana destek olup daima yanımda olan arkadaşım Öğr. Gör. Sertan Aytaç'a, laboratuvar arkadaşım Arş. Gör. Cafer Çakal'a ve "Kimyasal Sensörler" laboratuvarındaki diğer arkadaşlarıma, Kimya Bölümü Analitik Kimya Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Son olarak, hayatım boyunca desteklerini hep yanımda hissettiğim, anlayış ve sevgisini benden esirgemeyen annem-babam "Hatice ve Yaşar Gümrah"a; canımdan çok sevdiğim kardeşim Meltem Gümrah'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER (ve KISALTMALAR) DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ	18
2.1. Proteinler	18
2.1.1. Protein moleküllerinin üç boyutlu yapısı	19
2.1.2. Beslenmede protein	20
2.1.3. Süt Proteini.....	20
2.1.4. Soya Proteini.....	22
2.2. Protein Tayin Yöntemleri	25
2.2.1. Kjeldahl yöntemi.....	26
2.2.2. Spektrofotometrik yöntemler	27
2.2.2.1. Biüret yöntemi.....	27
2.2.2.2. UV-280 nm absorpsiyon yöntemi.....	28
2.2.2.5. UV-220 nm absorpsiyon yöntemi.....	29
2.2.2.6. Lowry yöntemi.....	30
2.2.2.7. Bradford (Coomassie blue) yöntemi	30
2.2.2.8. Spektrofotometrik yöntemin temelleri.....	30
2.2.2.9. Spektrofotometrenin çalışma prensibi.....	31
2.2.2.10 Absorpsiyon ilkeleri.....	32
2.2.2.11. Lambert-Beer kanunu	32
2.2.2.11.1. Lambert kanunu	32
2.2.2.11.2. Beer kanunu	33
2.2.2.12. Lambert-Beer kanunundan sapmalar	35

2.2.2.13. Proteinlerin nicel olarak tayini	35
2.3. Protein İzolasyonu	36
2.4 Hidroliz.....	39
2.4.1 Enzimatik protein hidrolizi.....	40
2.4.1.1 Proteazlar	41
2.4.2 Hidroliz koşulları	42
2.4.3. Hidroliz derecesi.....	43
2.4.4. Hidroliz sırasında ortaya çıkan değişiklikler.....	44
2.5. Amino Asit Tayin Yöntemleri.....	45
2.5.1. Formol titrasyonu.....	46
2.5.2. Ninhidrin reaksiyonu.....	46
2.5.3. Floreskamin reaksiyonu	46
2.5.4. O-fitaldialdehit reaksiyonu	47
3. DENEYSEL YÖNTEMLER.....	48
3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	48
3.2. Protein İzolatının Hazırlanması	48
3.3. Protein Tayin Yöntemleri.....	50
3.3.1. Biüret yöntemi	52
3.3.2. UV-280 nm ve UV-220 nm yöntemleri.....	52
3.4. Soya Proteininin Çeşitli Enzimlerle Hidrolizi.....	52
3.5. Ninhidrin Yöntemi ile Amino Asit Tayini	54
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	56
4.1. Protein İzolatının Hazırlanması	56
4.2. Protein Tayin Yöntemlerinin Karşılaştırılması	48
4.3. Enzimatik Hidroliz	68
4.4. Ninhidrin Yöntemi İle Amino Asit Tayini	60
5. SONUÇLAR	62
6. KAYNAKLAR.....	63
7. EKLER.....	69
ÖZGEÇMİŞ	73

Şekil 2.1.	Proteinlerde birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapı.	6
Şekil 2.2.	Kjeldahl damıtma düzeneği.....	14
Şekil 2.3.	Biüret bileşiği -Cu ²⁺ kompleksi	15
Şekil 2.4.	Protein- biüret ayırıcı reaksiyonu.....	15
Şekil 2.5.	Tirozin ve Triptofan amino asitlerinin moleküler yapıları.	16
Şekil 2.6.	Peptid bağları.....	16
Şekil 2.7.	Basit bir spektrofotometrenin elemanları.....	18
Şekil 2.8.	Homojen bir absorplayıcı ortamdan geçen ışığın şiddetindeki değişim	21
Şekil 2.9.	Absorbans-derişim değişimi	21
Şekil 2.10.	Doğrusal çalışma grafiği.....	23
Şekil 2.11.	Kuru protein izolatu eldesi için akım şeması	25
Şekil 2.12.	Proteoliz	27
Şekil 2.13.	Enzimatik hidroliz	27
Şekil 2.14.	Proteinlerin hidroliz reaksiyonları	28
Şekil 2.15.	Amid bağlarının, karboksilik veya amino grubundan kırılmasının gösterilişi	29
Şekil 2.16.	Ninhidrin reaksiyonu.....	33
Şekil 2.17.	O-fitaldialdehit reaksiyonu.....	34
Şekil 3.1.	Yağsız küspeden protein eldesi için SuperPro Designer 5.1 programıyla çizilen akım şeması.....	37
Şekil 3.2.	Yağı giderilmiş soya unundan (YGSU) elde edilen Soya proteini izolatı (SPI) nın hidrolizi için çeşitli enzim ve karışımların denenmesi.....	40
Şekil 3.3.	L-Lizin ile hazırlanan doğrusal çalışma grafiği.	42
Şekil 4.1.	Süt tozundan özütlenabilen protein veriminin pH ile değişimi	44
Şekil 4.2.	Yağı giderilmiş soya unundan özütlenabilen protein veriminin sıcaklıkla değişimi.....	45
Şekil 4.3.	Yağı giderilmiş soya unundan özütlenabilen protein veriminin sabit sıcaklıkta pH ile değişimi (60 °C).....	47
Şekil 4.4.	Özütlenabilen soya proteini veriminin zamanla değişimi	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

HD	Hidroliz derecesi
OPA	o-fitaldialdehit
TNBS	trinitrobenzensülfonik asit
ASA	American Soy Association
BCA	Bicinchoninic Acid
h	Hidroliz olan peptid bağlarının sayısı
h_{top}	Ana proteindeki peptid bağlarının toplam sayısı
BSA	Siğır serum albumini
YGSU	Yağı giderilmiş soya unu
SPI	Soya protein izolatu
RSA	Bağıl (relative) spesifik absorbands
S	Standart sapma
ESF	Özütlenmiş soya unu
MP	Süt tozu
SF	Soya unu
SEM	Ortalamanın standart hatası

Çizelge 2.1. Yaş gruplarına göre esansiyel amino asit gereksinimi ve sütün esansiyel amino asit içeriği	9
Çizelge 2.2. Yağlı tohumlardaki başlıca amino asitlerin bileşimi	10
Çizelge 2.3. Farklı protein kaynaklarının esansiyel amino asit içerikleri ve yaş gruplarına göre amino asit gereksinimi.....	10
Çizelge 2.4. Protein çöktürmede kullanılan çöktürücü tipleri.....	24
Çizelge 2.5. Proteinlerin yapısını oluşturan temel amino asitler ve diğerleri.....	32
Çizelge 3.1. Enzim bilgileri	40
Çizelge 4.1. Süt tozundan özütlenebilen protein veriminin, oda sıcaklığında (23 °C) pH ile değişimi	43
Çizelge 4.2. Artan sıcaklıkta, yağı giderilmiş soya unundan özütlenebilen protein verimi (pH:11).	45
Çizelge 4.3. Yağı giderilmiş soya unundan özütlenebilen protein verimi (60 °C ve pH 6.89, aynı koşullarda yapılan 4 deneyin sonucu.....	46
Çizelge 4.4. Yağı giderilmiş soya unundan özütlenebilen protein veriminin 60 °C da pH ile değişimi.....	47
Çizelge 4.5. Sabit sıcaklık (60 °C) ve pH'da (11), farklı sürelerde özütlenebilen soya proteini verimi.	48
Çizelge 4.6. UV-280 ve 220 nm Biüret-340 ve 550 nm yöntemleri için doğrusal çalışma grafiklerinin karşılaştırılması.....	51
Çizelge 4.7. Doğal örneklerin, UV-280 ve 220 nm, Biüret-340 ve 550 nm yöntemlerine göre ölçülmesi sonucunda elde edilen verilerin ortalama (X_{ort}) ve S (standart sapma) değerleri	53
Çizelge 4.8. UV-280 ve 220 nm, Biüret-340 ve 550 nm yöntemlerinin doğal örneklerle uygulanması sonucunda elde edilen protein miktarları (%w/w).....	54
Çizelge 4.9. Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, enzim karışımı ve enzim kombinasyonu için farklı sürelerde elde edilen hidroliz dereceleri...	56

1. GİRİŞ

Proteinler amino asitlerin polimerleridir. Türlerine, polipeptid zincirindeki amino asit sayısına ve dizilimine göre farklılık gösterirler. Bu yüzden farklı moleküler yapıları, besin değerleri ve fizikokimyasal özellikleri vardır. Birçok işlevi olan proteinler besinlerin önemli bileşenleridir. Vücudun kendi kendine sentezleyemediği fakat insan sağlığı için gerekli olan “esansiyel amino asitler” diye adlandırdığımız, lizin, triptofan, metiyonin, lösin, izolösin ve valin gibi amino asitleri içerdikleri gibi aynı zamanda büyük bir enerji kaynağıdır.

Özellikle protein için iyi bir kaynak olan süt proteininin biyolojik değeri 1.0 üzerinden 0.9 olup oldukça yüksektir (Tripaldi vd.1998), (Frau vd.,1997). Lösin, izolösin, valin, metiyonin, fenilalanin, treonin, triptofan, lizin gibi esansiyel amino asit içeriği yüksek olan süt proteini, kaliteli protein olarak kabul edilmekte ve besinlerdeki protein kalitesinin değerlendirilmesinde standart referans olarak kullanılmaktadır (Miller vd., 2000), (Baysal, 2004).

Tüm esansiyel amino asitleri içeren soya proteini de sağlıklı ve kaliteli bir beslenmede ön plana çıkmaktadır. Soya fasulyesinde fenolik asitler, fitosteroller, proteaz inhibitörleri, inositol hekzafosfatazlar, saponinler, melanoidler ve izoflavonlar gibi çeşitli anti-kanserojenik fitokimyasalların olduğu bildirilmiştir.

Dünyayı besleyen 5–6 önemli bitkisel üründen birisi olan soyanın, yağı çıkarıldıktan sonra kalan unu ya da küspesi çok besleyici olup, proteince çok zengindir. Yağı alınmış soya küspesi insan beslenmesi yanında çok değerli bir hayvan yemi kaynağı olarak da kullanılmaktadır. Bu küspelerden izole edilen proteinlerin, gıdalara katkı maddesi olarak kullanılması son yıllarda yaygınlaşmaktadır.

Besinlere çekici bir görünüm, yumuşaklık, sertlik, tat, renk ve uzun süre bozulmadan kalabilmesi gibi benzersiz fonksiyonel özellikler kazandırması açısından izole edilmiş proteinler, besinlerin hazırlanmasında sıkça kullanılmaktadır. Ayrıca istenmeyen ya da toksik bileşenleri uzaklaştırmak için de

proteinler izole edilir. Birçok yağlı tohum için, ağırlıkça % 90'nın üzerinde yağı giderilmiş un proteini bir saat içerisinde özütlenmektedir. Proteinleri çözültürme prosesi kullanılır (Bell vd., 1983).

Bu çalışmada proteinlerin izoelektrik pH'da çözünürlüklerinin minimum olmasından faydalanarak, protein izole edilmiştir. Bunun için yağı giderilmiş soya unundan ve süt tozundan farklı koşullarda protein özütlenerek en iyi verim elde edilmeye çalışılmıştır. Soya proteinini çöktürmek için uygun pH, sıcaklık ve süre belirlenmiştir.

Proteinlerin yapısal veya mekanik işlevleri vardır. Birçok besin proteini de biyokimyasal tepkimelerin hızlarını arttıran enzimlerdir . Bu bazen istenen bazen de zararlı olan bir durumdur. Proteinlerin bütün bu özelliklerinden dolayı, besinlerdeki toplam protein derişimi, proteinin türü, moleküler yapısı ve fonksiyonel özellikleri çok fazla araştırılan konulardır.

Doğal kaynaklardaki protein miktarlarını hesaplayabilmek için pek çok yol vardır. Bu kadar çok yöntem olmasına rağmen, genelde herhangi bir örnekteki protein miktarını en iyi saptayan ve tam istediğimiz sonucu veren bir yol yoktur. Ancak protein miktarını en iyi şekilde saptayabilmek için proteinin ve örnekteki diğer bileşiklerin yapısına, deneyin hassasiyetine göre yöntem seçilmelidir.

Gıda analizlerinde en çok kullanılan yöntem 1883'de geliştirilmiş olan Kjeldahl yöntemidir. Bu yöntem, polipeptid zincirlerinin, peptid bağlarındaki amin gruplarında bulunan azot miktarının tayinine dayanan bir yöntemdir ve hala bilinen en doğru ve yaygın azot tayini yöntemidir. Yöntemin kesinliği fazla ve tekrarlanabilirliği yüksektir ancak, bu yöntem protein tayinini örneğin içerdiği azot miktarına göre yapar ve bu yüzden proteinden gelmeyen azotu da tayin etmiş olur. Ayrıca hesaplamalarda azot miktarından protein miktarına geçerken kullanılan Kjeldahl faktörü de her protein türü için farklıdır. Çünkü farklı protein türleri farklı amino asit dizilimlerine sahiptir. Üstelik yöntem çok uzun zaman alır (Helrich,1990).

Spektrofotometrik yöntemlerle toplam protein tayini klinik analizler, biyokimya ve fizyoloji gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Bu çalışmada, toplam protein tayini için gıda analizlerinde en çok kullanılan Kjeldahl yöntemine alternatif olarak Biüret-340 nm, 550 nm ve UV-280 nm , 220 nm gibi spektrofotometrik yöntemler seçilmiştir. Bu yöntemlerin seçilme nedeni uygulanabilirliğinin kolay olması ve farklı reaksiyonlar üzerinden gerçekleşmeleridir. UV-220 nm (Stoscheck, 1990) yönteminde absorbans peptid bağlarının elektronik geçişlerinden kaynaklanırken, Biüret (Gornall vd., 1949) yöntemlerinde bakır/peptid bağı kompleksinin elektronik geçişi söz konusudur. Her iki yöntemde de peptidler ölçülmektedir. UV-280 nm (Stoscheck, 1990) yönteminde ise amino asitlerin elektronik geçişleri ölçülmektedir. Bu çalışmada yöntemler standart proteinler ve doğal protein kaynakları (süt, soya) üzerinde denenmiş ve karşılaştırılmıştır.

Proteinlerin gayet iyi bilinen besinsel, fonksiyonel ve biyolojik özellikleri, onların insan sağlığını destekleyici fonksiyonel gıdalarda katkı olarak kullanım potansiyelini arttırmaktadır. Son yıllarda gıda kaynaklı proteinlerden biyoaktif peptid üretimi gerçekleştirilmektedir. Protein molekülü içinde inaktif halde bulunan peptidler, gastrointestinal sindirimle, proteolitik kültür fermentasyonu ve proteolitik enzimlerle hidroliz yöntemleriyle serbest hale getirilmektedirler. Biyoaktif peptidler amino asit zincir uzunluğu ve dizilimine bağlı olarak, kan basıncını düzenleyici (ACE inhibisyonu) etki, kolesterol düşürücü etki, antioksidan aktivite, antitrombotik aktivite, bağıışıklığı artırıcı ve opioid aktivite göstermektedirler. Peptidlerin (örneğin soya, buğday, arpa, balık proteinlerinden elde edilen peptidlerin) besinsel özellikleri ve yukarıdaki biyoaktif özellikleri yanında cilt kanseri, kolon kanseri, karaciğer tümörü gibi bazı kanser formlarına karşı koruyucu ve tedavi edici özellikleri de bulunmaktadır (Aksay ve Özer, 2008).

Proteozlar, peptonlar ve peptidler, proteinlerin kısmi hidrolizi ile oluşur; tam hidroliz gerçekleştiğinde ise amino asitler açığa çıkar. Soya proteinlerinin hidrolizlenmesiyle açığa çıkan amino asitler gastrointestinal sisteminde emilim bozukluğu olan yaşlı hastaların diyetleri, hipoalerjenik bebek yiyecekleri, sporcu besinleri, ağırlık kontrol diyetleri ve kanser tedavileri için önemlidir. Çeşitli amino asitler kanser riskini azaltmada farklı etkilere sahiptir. Örneğin, sistein, sistin ve glutamin vücuttaki toksik maddeleri uzaklaştırır ve kanser tedavisindeki

radasyonun yol açtığı zararları giderir. Bu yüzden bu tür amino asitler genellikle kemoterapi ve radyasyon tedavilerinde kullanılır.

Protein hidrolizi sırasında moleküler değişiklikler meydana gelir. Böylece hidroliz ürünlerinin çözünürlük, viskozite, duyumsal özellikler, emülsiyon ve köpürme gibi fonksiyonel özelliklerinde değişiklikler olur (Panyam ve Kilara, 1996), (Nielsen, 1997), (Caessens vd., 1999).

Proteinlerin hidrolizi, kaynatma, asit etkisi ve enzim etkisiyle olabilir. Asit hidrolizi ve enzim hidrolizi yaygın olarak kullanılmaktadır, fakat bu yöntemlerin bazı avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır.

Bu çalışmada, protein tayininden sonra proteaz enzimleriyle protein hidrolizi denenmiştir. Soya proteininin hidrolizi için enzimatik hidroliz yöntemi seçilmiştir ve hidroliz Novozyme firmasından temin edilen 3 farklı endüstriyel proteaz enzimi (Flavourzyme 1000 L, Alcalase 2.5 L Type DX, Neutrase 1.5 mg) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hidroliz sonrasında oluşan toplam amino asit değeri ve hidroliz derecesi (HD) belirlenmiştir. HD, enzimatik hidrolizden sonra açığa çıkan enzimlerin miktarının, soya protein özütünün asit hidrolizi sonucunda bulunan toplam amino asit miktarına oranı hesaplanarak bulunmuştur. Amino asitleri tayin etmek için ninhidrin belirteci kullanılmıştır.

Hidrolizden sonra açığa çıkan α -amino grupları, amino grupta spesifik olarak reaksiyon veren belirteçler kullanarak spektrofotometrik olarak tayin edilebilir. Genelde kullanılan belirteçler, ninhidrin, o-fitaldialdehit (OPA) ve trinitrobenzensülfonik asittir (TNBS).

Çalışmanın son kısmında, ninhidrin belirteci ile amino asit tayinleri yapılarak literatürdeki yöntemlerle karşılaştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Proteinler

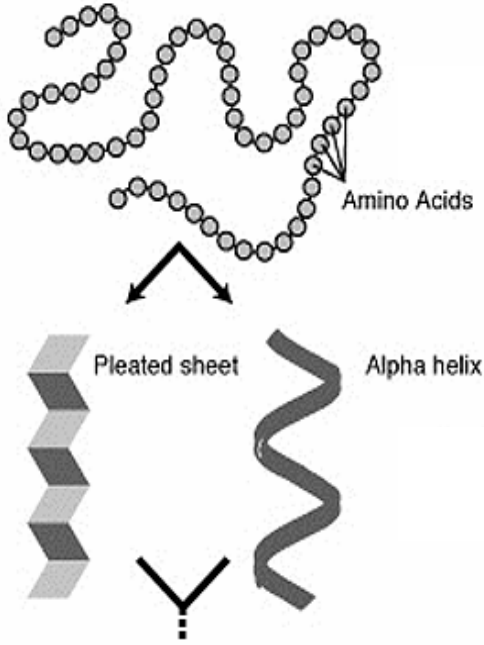
Proteinler, amino asitlerin zincir halinde birbirlerine bağlanmasından oluşan büyük organik bileşiklerdir. Bu zincirde bir amino asidin karboksil grubunun bir diğerinin amin grubuna bağlanmasıyla oluşan bağ peptid bağı olarak adlandırılır. Teorik olarak, 20 amino asidin sınırsız kombinasyonu mümkündür, fakat hayvanlarda ve bitkilerde bulunan fonksiyonel proteinler, oldukça spesifik amino asit zincirlerine sahip olmalıdır. Organizmanın protein ihtiyacı daha çok gerekli amino asitler üzerine kuruludur. Bir proteinin biyolojik değeri yani besleyici değeri bileşimindeki amino asit türüne bağlıdır.

Yapılarında, yağ ve karbonhidratlarda olduğu gibi karbon, hidrojen ve oksijen bulunur. Fakat karakteristik olarak azot ve bazen de kükürt vardır. Polisakkaritler, nükleik asitler ve yağlar gibi biyolojik makromoleküllere benzer şekilde, proteinler de canlı organizmaların temel bileşenlerindendir ve hücrelerin içindeki her süreçte yer alırlar. Belli işlevleri yerine getirmek için beraberce de çalışabilirler ve bazıları bir araya gelip kararlı kompleksler oluşturabilir. Birçok protein, biyokimyasal tepkimelerde katalizör işlevi olan enzimlerdir ve metabolizma için yaşamsal bir role sahiptir. Başka proteinlerin ise yapısal veya mekanik işlevleri vardır.

"Protein" sözcüğünün kaynağı, Yunanca'da "birincil öneme sahip" anlamını taşıyan πρῶτα (prota) sözcüğüdür. Bu isim, proteinleri 1838'de ilk tanımlayan Jöns Jakob Berzelius tarafından verilmiştir. 1926'da James B. Sumner'in üreaz enziminin bir protein olduğunu göstermesine kadar, proteinlerin canlılar için ne derece önemli olduğu tam anlaşılmamıştır (Sumner, 1926). Yapısı çözülen ilk proteinler arasında insülin ve miyoglobin bulunur ki, insülin için Sir Frederick Sanger 1958'de, miyoglobin için de Max Perutz ve Sir John Cowdery Kendrew 1962'de Nobel Kimya Ödülü kazanmıştır (Kendrew vd., 1958).

2.1.1. Protein moleküllerinin üç boyutlu yapısı

Proteinlerde birincil , ikincil , üçüncül ve dördüncül yapı diye dört yapı tanımlanır. (Şekil 2.1)

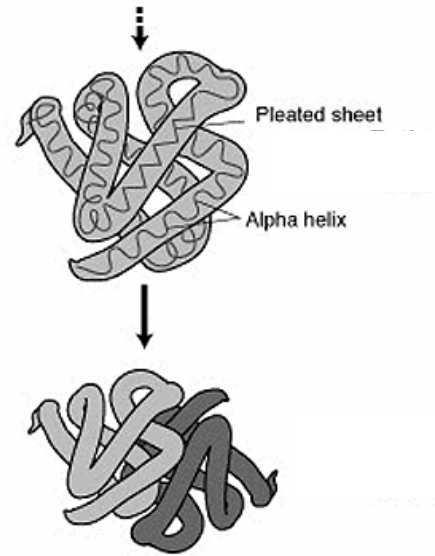


Şekil 2.1. Proteinlerde birincil, ikincil (üstte), üçüncül ve dördüncül yapı (sağ altta)

Üçüncül yapılar, genel olarak proteinin 3 boyutlu yapısı olarak özetlenebilir ve tuz köprüleri, hidrojen bağları, disülfür bağları gibi etkileşimler tarafından kararlı kılınır. Dördüncül yapı ise, birden fazla protein molekülünün birbiriyle etkileşmesiyle oluşan yapıya denir (Branden ve Tooze, 1999).

Bir proteindeki amino asitlerin dizilişi, o proteinin birincil yapısı olarak adlandırılır. İkincil yapı, hidrojen bağları ile kararlı kılınan, düzenli tekrarlanan yerel yapılardır. Bunların en yaygın örnekleri alfa sarmalı (alpha helix) ve beta yaprağıdır (beta sheet). İkincil yapılar yerel olduğu için bir proteinin içinde farklı ikincil yapılara sahip pek çok bölge olabilir. Proteinlerin üçüncül yapılarında ikincil yapıları proteinler bulunmaktadır. Bu tersiyer yapılar, alfa sarmalı, beta yaprağı veya her ikisinin karışımından oluşabilmektedir.

(Branden ve Tooze, 1999)



(<http://www.genome.gov/Pages/Hyperion/DIR/VIP/Glossary/Illustration/protein.shtml>)

Bazı proteinler tek polipeptid zincirinden meydana gelir; bunlar monomerik proteinlerdir. Birçok protein de yapısal olarak benzer, ya da tamamen ilgisiz bir veya daha fazla polipeptid zincirlerinden meydana gelir .

2.1.2. Beslenmede protein

Protein, beslenmemizin önemli bir parçasıdır. Çoğu mikroorganizma ve bitki, standart amino asitlerin tümünü sentezleyebilmesine karşın hayvanlar bazı amino asitleri diyetlerinden elde etmek zorundadırlar (Voet, 2004). Hayvanlarda amino asitler protein içeren besinlerin tüketilmesi yoluyla elde edilir. Proteinler sindirim yoluyla parçalanırlar. Bu süreç zarfında protein önce mide asitlerinin etkisiyle denatüre olur ve ardından proteaz olarak adlandırılan enzimler tarafından yıkıma uğrar. Esansiyel amino asitlerin vücuda alınması canlının sağlığı için çok önemlidir. Amino asitler önemli bir azot kaynağıdır. Vücuda alınan bazı amino asitler, özellikle esansiyel olmayanlar, protein sentezi için doğrudan kullanılmazlar. Onun yerine glukoneogenez yoluyla karbonhidratlara dönüşürler. Glukoneogenez açlık durumunda vücudun kendi proteinlerinden, özellikle kas proteinlerinden, glikoz elde edilmesinde de kullanılır (Brosnan, 2003). Proteinler peynir, süt, et vb. çeşitlerde bulunur.

2.1.3. Süt Proteini

Süt ve süt ürünleri; protein, kalsiyum, fosfor, A vitamini ve bazı B vitaminleri (özellikle riboflavin, B12) için iyi bir kaynaktır (Miller vd., 2000). Sütün kimyasal yapısı lipid, protein, karbonhidrat, vitamin ve mineral içeren bir kompleks olması nedeniyle tek başına ve uzun süre yeni doğan memeliler için yeterli bir besin kaynağıdır. Özellikle protein için iyi bir kaynak olan süt proteininin biyolojik değeri 1.0 üzerinden 0.9 olup oldukça yüksektir (Tripaldi vd.,1998), (Frau vd.,1997).

Yüksek kalite protein içeren inek sütünün ortalama % 3–3.5'i proteindir. İnek sütü proteini; kazein, peynir altı suyu proteinleri temel olmak üzere, enzimler ve az miktarda azot içeren protein olmayan bileşiklerden oluşan heterojen bir karışımdır (Fox ve McWeeney, 2003).

Toplam proteinin yaklaşık % 80'i kazein (% 8'i inorganik maddeler, % 92'si proteindir), % 20'si ise peynir altı suyu proteininden oluşmaktadır. Kazein sütün en önemli proteini olup , alfa, beta, gamma ve kappa olarak dört ayrı şekilde bulunur. Yapısında fosfor (%0.7- 0.9) bulunduran kazein bu dört şeklin heterojen bir karışımıdır. Asit kazein ve rennet kazein olmak üzere iki tip kazein bulunmaktadır. Laktik asit bakterileri, peynir altı suyu, laktik asit, hidroklorik asit, sülfürik asit, sitrik asit, asetik asit ve ortofosforik asit gibi insan sağlığına zarar vermeyen asitler kullanılarak elde edilen kazein, asit kazeini olarak adlandırılır. Rennet kazein ise teknolojisinde kimozen enzimi veya sütü pıhtılaştıran insan tüketimine uygun diğer enzimler kullanılarak üretilen kazein türüdür.

Peynir altı suyu olarak adlandırılan diğer kısmın ise süt serumu proteinlerince zengin olduğu bilinmektedir. Peynir altı suyu proteinleri diğer minör bileşenler ile birlikte, β -laktoglobulin, α -laktalbumin, immunoglobulinler, büyükbaş serum albümini, büyükbaş laktoferrini ve laktoperoksidazı kapsamaktadır (Yerlikaya ve Karagözlü, 2008). Son yıllarda giderek artan sayıda araştırma süt serumunun çok yönlü terapötik etkilerini aydınlatmış ve bu protein karışımının antikanserojen ve serbest radikal hasarını önleyen etkileri öne çıkmıştır (Öğünç ve Yalçın, 2008).

Lösin, izölösin, valin, metiyonin, fenilalanin, treonin, triptofan, lizin gibi esansiyel amino asit içeriği yüksek olan süt proteini, kaliteli protein olarak kabul edilmekte ve besinlerdeki protein kalitesinin değerlendirilmesinde standart referans olarak kullanılmaktadır (Miller vd., 2000), (Baysal, 2004).

Çizelge 2.1.'de sütün esansiyel amino asit içeriği ve çeşitli yaş gruplarının ihtiyacı olan esansiyel amino asit miktarları verilmiştir.

Çizelge 2.1. Yaş gruplarına göre esansiyel amino asit gereksinimi ve sütün esansiyel amino asit içeriği (Frau vd., 1997), (FAO/WHO/UNU,1985).

Amino asit	Amino asit gereksinimi (mg/g protein)				Sütün amino asit içeriği (mg/g protein)
	Bebek	Okul öncesi	Okul çağı	Yetişkin	
Histidin	26	19	19	16	27
İzolösin	46	28	28	13	47
Lösin	93	66	44	19	95
Lizin	66	58	44	16	78
Metiyonin ve Sistin	42	25	22	17	33
Fenilalanin ve Tirozin	72	63	22	19	102
Treonin	43	34	28	9	44
Triptofan	17	11	9	5	14
Valin	55	35	25	13	64
Toplam	434	320	222	111	504

2.1.4. Soya Proteini

Soya ürünlerinin belirli bir teknik standarda oturtulmasını sağlamak amacı ile ASA (American Soy Association) tarafından hazırlanmış ve Türkiye’de de kabul görmüş tanımlar çerçevesinde, kuru madde miktarı üzerinden asgari %50 protein içeren ürünler soya proteini olarak adlandırılmaktadır.

Soyanın, yağı çıkarıldıktan sonra kalan unu ya da küspesi çok besleyici olup, proteince çok zengindir. Bu özelliğinden dolayı gıda sanayisinde bolca kullanılır. Soya tohumlarında % 50–55 oranında protein, % 18–20 oranında da yağ bulunur. Dünyada en fazla üretilen ve tüketilen yağ soya yağı, yem sanayisinde en fazla kullanılan hammadde ise soya küspesidir (Nazlıcan, 1998).

Soya proteinini sağlıklı ve kaliteli bir beslenmede ön plana çıkaran faktör, tüm esansiyel amino asitleri içermesidir. Özellikle de lösin açısından zengindir. Çizelge 2.2.'de yağlı tohumlarda bulunan bazı amino asitlerin bileşimi, Çizelge 2.3.'te ise farklı protein kaynaklarının esansiyel amino asit içerikleri ve yaş gruplarına göre amino asit gereksinimi gösterilmektedir.

Çizelge 2.2. Yağlı tohumlardaki başlıca amino asitlerin bileşimi (g/16g N), (Viroben ve Bertrand, 1985)

Amino asit	Soya Fasulyesi	Ayçiçeği
Treonin	3.7- 4.2	3.5
Valin	4.9 – 5.4	5.1
İzolösin	4.8–5.5	4.2
Lösin	7.5–8.3	6.3
Fenilalanin	4.7–5.3	4.6
Metiyonin	1.5–1.6	4.2*
Sistein	1.5–1.8	
Lizin	5.8–6.5	3.3
Triptofan	1.2–1.4	1.3

* Metiyonin + sistein

Çizelge 2.3. Farklı protein kaynaklarının esansiyel amino asit içerikleri ve yaş gruplarına göre amino asit gereksinimi (Friedman, 1996).

Amino asit	Amino asit içeriği (mg/g protein)			FAO/WHO tarafından önerilen amino asit gereksinimi (mg/kg) / gün			
	Sığır eti	Soya proteini	Buğday unu	Bebek	Okul öncesi	Okul çağı	Yetişkin
Treonin	42.1	38.4	29.3	43	34	28	9
Cys + Met	32.7	68.1	38.7	42	25	22	17
Valin	45.4	49.1	42.7	55	35	25	13
İzolösin	41.8	47.1	33.4	46	28	28	13
Lösin	77.5	85.1	68.5	93	66	44	19
Tyr + Phe	70.2	96.6	77.8	72	63	22	19
Histidin	32.0	25.4	21.9	26	19	19	16
Lizin	79.4	63.4	26.6	66	58	44	16
Triptofan	9.9	11.4	11.2	17	11	9	5

Soya fitokimyasallar açısından da oldukça zengin bir yapı göstermektedir. İzoflavonlar, saponinler, taninler, fitatlar, proteaz inhibitörler, lektinler, guatrojenler ve alerjenler başlıca içerdiği fitokimyasallardır. Bunlardan özellikle sterol kaynaklı olan izoflavonlar çok önemlidir. Soya izoflavonları kimyasal olarak dört yapıda bulunmaktadır: aglikon (daidzein, genistein ve glycitein), glikozit (daidzin, genistin ve glycitin), asetilglukozit (asetildaizdin, asetilgenistin ve asetilglisit), ve malonilglukozit (malonildaizdin, malonilgenistin ve malonilglisit) (Öztürk ve Aytaç, 2008). İşlenmemiş soya fasulyesinde 1.2- 4.2 mg /g izoflavon bulunmaktadır.

İzoflavonlar; östrojenik ve antiöstrojenik aktivite, antioksidan, anti proliferatif, antikanserojen, antibakteriyal ve antimikrobiyal özellik gösterirler. Özellikle genistein, soya fasulyesi ürünlerinde bulunan belirgin bir izoflavondur ve kadınlarda meme kanseri riskini düşürebileceği düşünülmektedir.

İzoflavonların doğal yoldan temini için iyi bir kaynak olan soya proteinleri, et proteinleri ile fonksiyonel açıdan aynı özelliklere sahip olup, bitkisel protein kaynağı olarak besin değeri açısından, en az et kadar değerli olarak tanımlanırlar. Hatta ete oranla kolesterol ve yağ içermeyen yapıları sayesinde daha sağlıklı ve yararlanımı yüksek ürünler olarak kabul edilirler ve böylece yetersiz beslenme problemiyle boğuşan Türk insanı için de vazgeçilmez bir seçenek olmaktadır.

Yağı alınmış soya küspesi insan beslenmesi yanında çok değerli bir hayvan yemi kaynağı olarak da kullanılmaktadır. Bu küspelerden izole edilen proteinlerin, gıdalara katkı maddesi olarak kullanılması son yıllarda yaygınlaşmaktadır.



Bugün için gelişmiş ülkelerin piyasalarında, soyanın sütü, peyniri, filizi, sosu, dondurması, eti ve unundan, mürekkebi, mumu ve benzinine kadar pek çok soyalı sanayi ürünü bulunabilmektedir. Son yıllarda ülkemizde de ithal soyalı ürünlerin birçoğunu market raflarında bulmak mümkün olmuştur.

İstatistiklere göre; 2003 yılında 175 bin tonu soya yağı olmak üzere toplam 1.5 milyon tonluk soyalı ürünün ülkemize ithal edilmiş olması, soyanın tüketim

alışkanlıklarımız içerisinde giderek artan şekilde yer almaya başladığını göstermektedir. Ülkemizde soya proteini börek harcı, soya kuşbaşı adı altında piyasaya sürülmektedir (Nazlıcan, 1998). Proteinin hidrolizi ile elde edilen amino asitler ise, daha ziyade tarım sektöründe kullanılmaktadır ve ihtiyaç ithal yoluyla karşılanmaktadır. Küspeler sadece hayvan yemi olarak değerlendirilmektedir.

2.2. Protein Tayin Yöntemleri

Doğal kaynaklardaki protein miktarlarını tayin için pek çok yol vardır. Yöntemlerin bu derece çokluğuna karşın, genelde herhangi bir örnekteki protein miktarını en iyi saptayan ve tam istediğimiz sonucu veren bir yol yoktur. Ancak protein miktarını en iyi şekilde saptayabilmek için proteinin ve örnekteki diğer bileşiklerin yapısına, deneyin hassasiyetine göre yöntem seçilmelidir. Gıda analizlerinde en çok kullanılan yöntem 1883'de geliştirilmiş olan Kjeldahl yöntemidir. Bu yöntem hala bilinen en doğru ve yaygın azot tayini yöntemidir. Yöntemin kesinliği fazla ve tekrarlanabilirliği yüksektir. Fakat protein tayinini içerdiği azot miktarına göre yapar ve bu yüzden proteinden gelmeyen azotları da tayin etmiş olur. Ayrıca hesaplamada azot miktarından protein miktarına geçerken kullanılan Kjeldahl faktörü her protein türü için farklıdır. Çünkü farklı protein türleri farklı amino asit dizilimlerine sahiptir, üstelik yöntem çok uzun zaman alır (Helrich,1990).

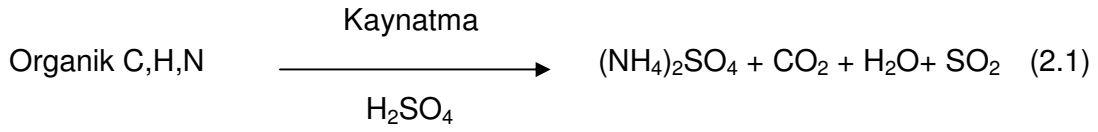
Spektrofotometrik yöntemlerle toplam protein tayini klinik analizler, biyokimya ve fizyoloji gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Kromatografik işlemler sırasında elüatlardaki proteinlerin bağlı miktarları doğrudan 280 nm'de absorpsiyon ölçümüne dayanan Warburg yöntemiyle belirlenir. Bu yöntemin hassasiyeti 0.05–2.0 mg/mL arasındadır. Çok duyarlı olmamakla birlikte, kolaylığı ve hızlı sonuç vermesi nedeniyle çok kullanılan bir tekniktir. Nicel tayinlerde en çok kullanılan yöntemler, hassasiyeti 1–10 mg/mL arasında olan Biüret yöntemi ve hassasiyeti 0.2–1.4 mg/mL arasında olan Coomassie-Blue (Bradford) yöntemidir. Bunun yanında Lowry ve Bicinchoninic Acid (BCA-Smith) yöntemleri, bulanıklık ölçümleri (turbidimetri), özgül aktivitenin ölçülmesi, kırılma indisinin ölçülmesi (refraktometri) ve saflaştırılıp kurutulmuş örneklerin doğrudan tartılması yöntemlerinden de yararlanılabilir.

2.2.1. Kjeldahl yöntemi

Polipeptid zincirlerinin, peptid bağlarındaki amin gruplarında bulunan azot miktarının tayinine dayanan bir yöntemdir. Kjeldahl yönteminin uygulanmasında 3 temel bölüm vardır:

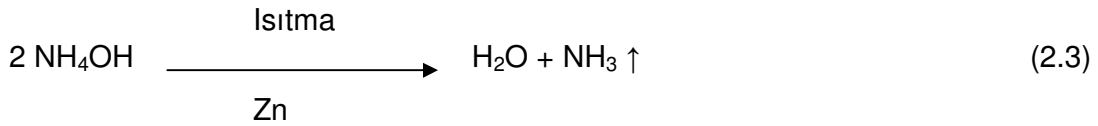
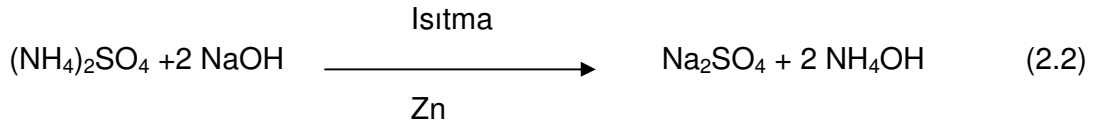
1. Örnek içerisindeki organik maddelerin oksidasyonu ve azotun amonyum sülfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ haline dönüştürülmesi.

Bu işlemde organik azot belirli bir miktar derişik H_2SO_4 ile muamele edilir.



Burada sürekli ısıtma ile CO_2 , H_2O , SO_2 buharlaşır. Bu işlemin kolayca uygulanabilmesi için katalizör olarak genellikle Cu, Hg, S, Se veya K tuzları kullanılır.

2. Amonyum sülfatın NaOH çözeltisi ile ayrıştırılması, önce NH_4OH ve daha sonra da NH_3 haline dönüştürülerek bir zayıf asitle tutulması.

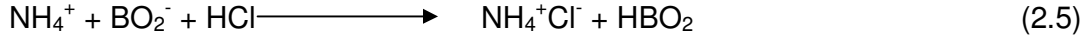


Burada amonyak gazı buharlaşır ve damıtma düzeneğinde yoğunlaşarak bir zayıf asit (% 4'lük borik asit) üzerinde tutulur (Şekil 2.2.)

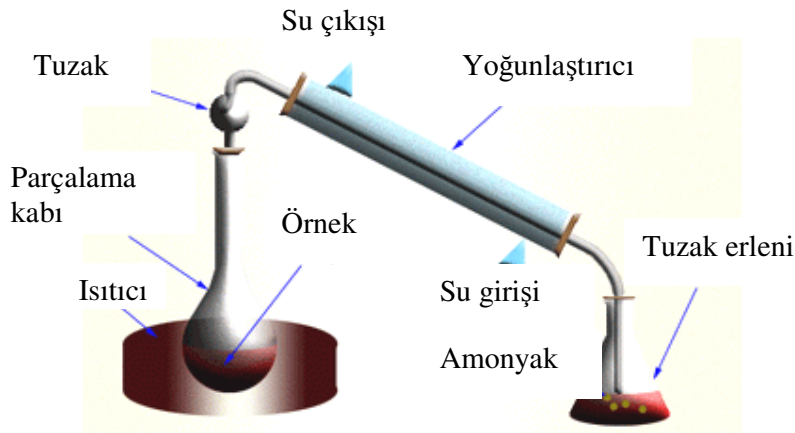


3. Amonyak çözeltisi nötrleştikten sonra arta kalan asit veya asit üzerinde tutulan bazın (NH₃) titre edilerek toplam N miktarının tayin edilme aşaması.

Burada borik asit tarafından tutulan amonyağın titrasyonu amacıyla 0.1 M HCl veya NaOH kullanılır.



Titrasyon sonunda toplam azot miktarı tayin edilir.

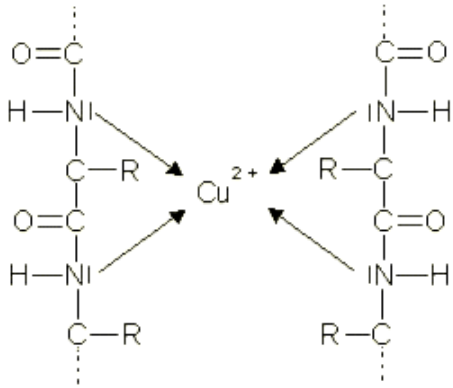


Şekil 2.2. Kjeldahl damıtma düzeneği (<http://avogadro.bitacoras.com/kjeldahl.gif>).

2.2.2 Spektrofotometrik yöntemler

2.2.2.1. Biüret yöntemi

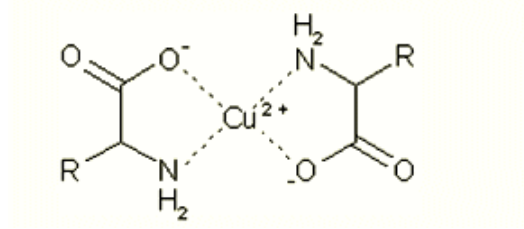
Duyarlılığı düşük (1-10 mg/mL) olmakla beraber pratikliği nedeniyle kolayca uygulanabilmektedir. Reaksiyonun esası Cu⁺² iyonlarının peptid azotlarına bağlanması sonucu bazik çözeltide 540 – 560 nm’de maksimum absorpsiyon gösteren renkli bir kompleks oluşumuna dayanır. Bakır atomlarının ana zincire bağlanması nedeniyle amino asit içeriğinin ölçümler üzerinde herhangi bir önemli etkisi yoktur. Tris tamponu ve amonyak girişi söz konusudur.



Biüret bileşiği yapı olarak peptid bağına benzer bir maddedir ve Cu^{2+} iyonları ile proteinlerin verdiği reaksiyona benzer bir renkli kompleks oluşturur (Şekil 2.3.). Bu nedenle kullanılan yöntem Biüret Yöntemi, Cu^{2+} içeren çözeltiye de Biüret Ayırıcı adı verilir (Şekil 2.4.).

Şekil 2.3. Biüret bileşiği - Cu^{2+} kompleksi.

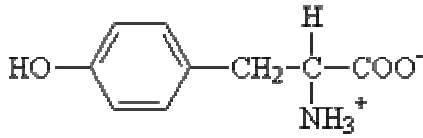
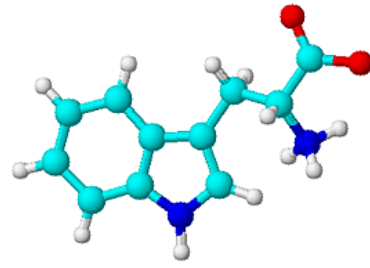
Protein ve peptidlerde iki peptid bağı oluşumuna katılan 4 azot atomu ile biüret ayırıcından gelen Cu^{2+} nin renkli kompleks oluşturması esastır (Gornall vd. ,1949).



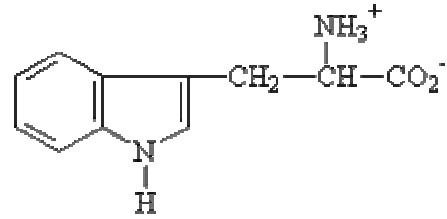
Şekil 2.4. Protein- biüret ayırıcı reaksiyonu.

2.2.2.2. UV-280 nm absorpsiyon yöntemi

Tirozindeki fenolik gruplar ve triptofandaki indolik gruplar (Şekil 2.5.) nedeniyle birçok protein 280 nm'de maksimum absorbans gösterir. Duyarlılık aralığı 0.05–2.0 mg/mL arasında olmasına rağmen oldukça hızlı bir tayin yöntemidir (Stoscheck, 1990).



Tyrosine
Tyr or Y

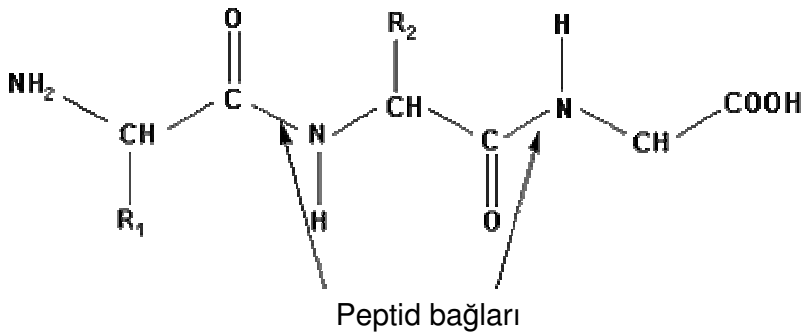


L-tryptophan
trp

Şekil 2.5. Tirozin ve Triptofan amino asitlerinin moleküler yapıları.

2.2.2.3. UV-220 nm absorpsiyon yöntemi

Bu yöntemde absorbans, peptid bağlarının (Şekil 2.6.) elektronik geçişlerinden dolayı gerçekleşir (Stoscheck, 1990). Duyarlılık aralığı literatürde 9.0–40 µg/mL olarak verilmiştir (N.K.K. Kamizake, 2003).



Şekil 2.6. Peptid bağları (Pauling vd., 1951).

2.2.2.4. Lowry yöntemi

Yöntem, bazik koşullar altında Biüret reaksiyonu ve aromatik amino asitlerin (Tirozin,Triptofan) Cu^{2+} katalizli oksidasyonundan sonra, ayrıca bulunan Fosfomolibdik, Fosfotungstik asit ile heteropolimolibden mavisine indirgenmeyi içeren Folin-Ciocalteu reaksiyonunun bir kombinasyonudur (Lowry vs., 1951). 0.5–1.5 mg /mL duyarlılığa sahiptir. Tris gibi primer aminler analizde hatalara neden olabilmektedir. Koyu mavi renk oluşumu karakteristiktir ve 750 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir. Yöntem çok duyarlıdır, ancak pH'ya bağımlıdır.

2.2.2.5. Bradford (Coomassie blue) yöntemi

Oldukça duyarlı olan bu yöntem (0.05–1.4 mg/mL), organik boyaların (BG–250), proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek, renk oluşturmasını esas alır. Mavi rengin oluşmasında proteinin amino asit bileşimi (özellikle arjinin gibi bazik aminoasitler ve aromatik amino asitler) önemlidir. Yöntemde protein 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir (Bradford, 1976).

Bradford yöntemi BG–250 ve proteinler arasındaki reaksiyonu temel alır. Küçük peptidler ve amino asitler BG–250 ile herhangi bir reaksiyon vermezler (Bradford, 1976), (Snyder ve Desborough, 1978), (Wei vd.,1977).

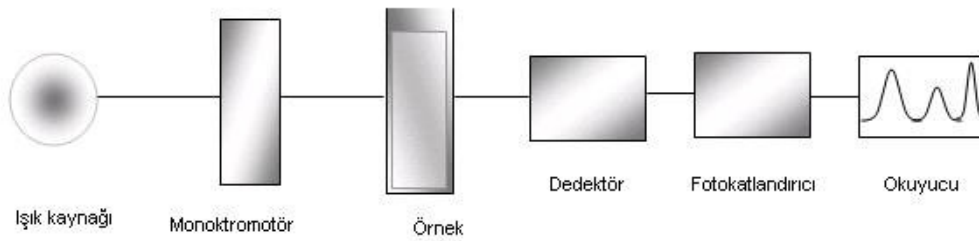
2.2.2.6. Spektrofotometrik yöntemin temelleri

Elektromanyetik dalganın (ışın, foton) iyon, atom veya moleküller ile etkileşmesini inceleyen bilim dalına spektroskopi adı verilir. Spektroskopik incelemelerin yapıldığı cihazlara da spektrofotometre denir. Bir madde, üzerine düşürülen dalgaboylarından (ultraviyole ışınlarından radyo dalgalarına kadar) ancak bazılarını absorplar. Maddenin bu özelliğinden yararlanılarak nitel ve nicel analizleri yapılabilir (Gündüz, 1990).

Dalgaboyu 200–1000 nm arasında değişen ışınların molekül orbitallerinde bulunan elektronlar tarafından absorpsiyonu üzerine kurulmuş olan spektroskopik yöntem UV-görünür bölge spektrofotometrisi adı verilir. UV-görünür bölge spektrofotometrisinde molekülün absorpladığı enerji, yapısında bulunan bir elektronu bir üst enerji seviyesine çıkarır. Bu nedenle ultraviyole ve görünür alan spektroskopisine orbitaller arasında elektron geçişlerini inceleyen spektroskopi dalı da denir.

2.2.2.7. Spektrofotometrenin çalışma prensibi

- Lamba tarafından yayılan ışın demeti monokromatör (prizma) yardımıyla tek bir dalga boyundaki ışına (monokromatik ışına) dönüştürölür.
- Bu ışın örneğin içinde bulunduğu odaya girer. Ölçümü yapılacak örnek, küvet içine konulur. Görünür alanda çalışılıyorsa cam (optik) küvet ; UV’ de çalışılıyorsa kuvars (silika) küvet kullanılır.
- Örnekten geçen ışığın şiddeti dedektör tarafından algılanır ve kaydedici ya da yazıcıya elektrik sinyali şeklinde gönderilir (şekil 2.7.).



şekil 2.7. Basit bir spektrofotometrenin elemanları.

2.2.2.8 Absorpsiyon ilkeleri

Işının belli dalga boyları madde tarafından absorplanır. Bu olaya absorpsiyon adı verilir. Absorblanan bu enerji, maddeyi (yani onu oluşturan atom veya molekülleri) uyarılmış hale geçirir. Absorpsiyonla uyarılmış olan böyle bir taneciğin ömrü 10^{-8} saniye kadardır.



Tanecik eski haline dönerken bu enerji geri verilir:



2.2.2.9. Lambert-Beer kanunu

2.2.2.9.1. Lambert kanunu

Homojen bir absorplayıcı ortamdan geçen ışının şiddeti tabaka kalınlığının artması ile üstel (veya logaritmik) olarak azalır:

$$I = I_0 \times e^{-kd} \quad (2.8)$$

I = geçen ışının şiddeti

I_0 = gelen ışının şiddeti

k = absorpsiyon katsayısı

d = tabakanın kalınlığı

2.2.2.9.2. Beer kanunu

Bir çözültiden geçen monokromatik bir ışın demetinin şiddeti, içerisinden geçtiği maddenin konsantrasyonuna bağlıdır.

$$I = I_0 \times e^{-kC} \quad (2.9)$$

I = geçen ışının şiddeti

I_0 = gelen ışının şiddeti

k = absorpsiyon katsayısı

C = derişim

Bu iki kanunun birleştirilmesiyle;

$$I = I_0 \times e^{-kCd} \quad (2.10)$$

I = geçen ışının şiddeti

I_0 = gelen ışının şiddeti

k = absorpsiyon katsayısı

C = derişim

d = ışık yolu (sıvının içinde bulunduğu küvetin genişliği)

$$I/I_0 = e^{-kCd} \quad (2.11)$$

$$\ln I/I_0 = -k \times C \times d \quad (2.12)$$

$$\ln I_0/I = k \times C \times d \quad (2.13)$$

$$\log I_0/I = \frac{k \times C \times d}{2.303} \quad (2.14)$$

$$k/2.303 = \epsilon \text{ (epsilon)} \quad (2.15)$$

$$\log I_0/I = \epsilon \times C \times d = A \text{ (Absorbans)} \quad (2.16)$$

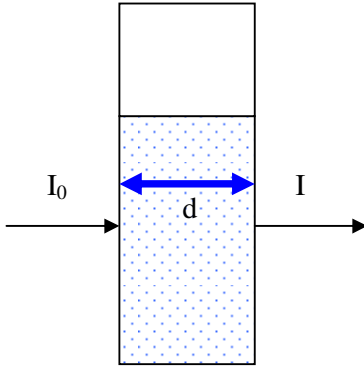
A = Absorbans

C = Derişim (mol /L veya mg/L)

ϵ = Molar soğurma katsayısı (L/mol.cm veya L/mg.cm)

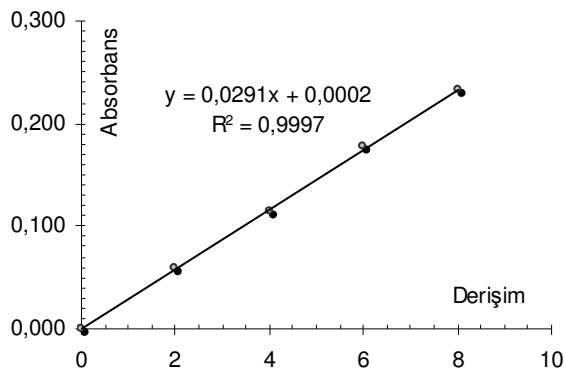
d = ışık yolu (sıvının içinde bulunduğu küvetin genişliği)

Eşitlikten (2.16) de anlaşılacağı gibi ϵ sabiti, çözelti derişimi ve ışığın geçtiği yolun uzunluğunun birimine bağlı olarak değişir (şekil 2.8.).



şekil 2.8. Homojen bir absorplayıcı ortamdaki geçen ışığın şiddetindeki değişim.

(2.16) eşitliğindeki A değerleri C ye karşı grafiğe geçirilirse eğimi “ $\epsilon \cdot d$ ” olan bir doğru elde edilir (şekil 2.9.).



şekil 2.9. Absorbans-derişim değişimi.

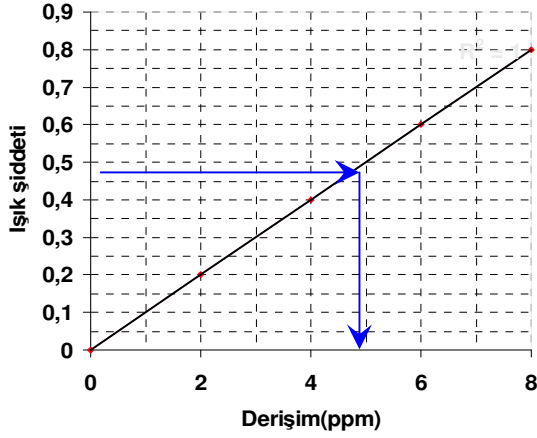
Ancak her zaman düzgün bir doğru elde edilemez. Bunun nedeni Lambert-Beer kanunundan sapmalardır.

2.2.2.10. Lambert-Beer kanunundan sapmalar

- Beer Kanunu genellikle 0.01 M dan büyük derişimlerde doğrusallıktan sapar. Yüksek derişimlerde absorpsiyon yapan moleküller arası uzaklık azalır ve moleküllerin yük dağılımı bozulur. Bu da absorpsiyonu etkiler, çözeltilerin seyreltilmesi bunu giderir.
- Soğurma yapan türün derişimi kimyasal reaksiyonlar sonucu değişiyorsa absorbans da değişir. Ortamdaki asitler ve çözücü önemli etkindir. Bu genellikle asit/baz indikatörlerinin sulu çözeltilerinde gözlenir.
- Ayrıca monokromatör dalga boyunu tam olarak ayıramadığında az da olsa sapma görülür. Prizma, mercek ve filtrelerin yüzeyinde oluşan kaçak ışınlar da sapmalara neden olur. Aletsel sapmalarda daima düşük absorbans okuması gözlenir.

2.2.2.11. Proteinlerin nicel olarak tayini

Proteinlerin nicel olarak tayin edilmesi için öncelikle standart örneklerin kullanılmasıyla bir kalibrasyon eğrisi hazırlanır. Analit derişimleri kesin olarak bilinen standart çözeltilerin absorbans sinyali ölçülür. Analit derişimine karşı Absorbans grafiğe geçirilir. Bilinmeyen örneğin absorbansı ölçülerek doğrusal çalışma grafiği yardımı ile derişimi bulunur (Şekil 2.10.).



Şekil 2.10. Doğrusal çalışma grafiği.

Farklı proteinler farklı absorpsiyon spektrumu gösterirler ve hiç bir protein standardı tüm proteinler için gerekli görevi yerine getiremez. En iyi uygulama şekli, çalışılacak olan her protein için bir standart eğri çizmektir. Bu durumlarda ticari olarak satılan saf proteinler standart olarak kullanılır. En yaygın kullanılan protein standardı sığır serum albüminidir (BSA).

2.3. Protein İzolasyonu

Birçok yağlı tohum için ağırlıkça % 90'nın üzerinde yağı giderilmiş un proteini bir saat içerisinde özütlenabilmektedir . Proteinleri çözültiden geri almak için genellikle çöktürme prosesleri kullanılır (Bell vd., 1983).

Protein çöktürmenin amacı; proteinin raf ömrünü arttırmak için enzimleri uzaklaştırmak veya pasif hale getirmek, besin değerlerini bozmadan , tat , renk ve yumuşaklık / sertlik derecesini geliştirmek ve istenmeyen ya da toksik olan bileşenleri uzaklaştırmaktır (Bell vd., 1983).

Sulu çözültelerde protein çözünürlüğü su molekülleri ve protein molekülleri arasındaki hidrojen bağlarıyla olur (izoelektrik pH'da değilse). Proteinler moleküler düzeye geçtiğinde ve arkasından bir araya toplanmaya başladıklarında daha büyük partiküller oluşur ve protein çözünürlüğü azalır (çökme). Moleküler düzeye geçme, polipeptidin aktif grupları arasında ; elektrostatik etkileşimler, hidrojen

bağları, hidrofobik etkileşimler, kovalent bağlar, disülfid bağları ve dipol-dipol etkileşimleri gibi bağların oluşmasıyla olur. Bu bağların oluşması proteindeki fonksiyonel gruplara bağlıdır.

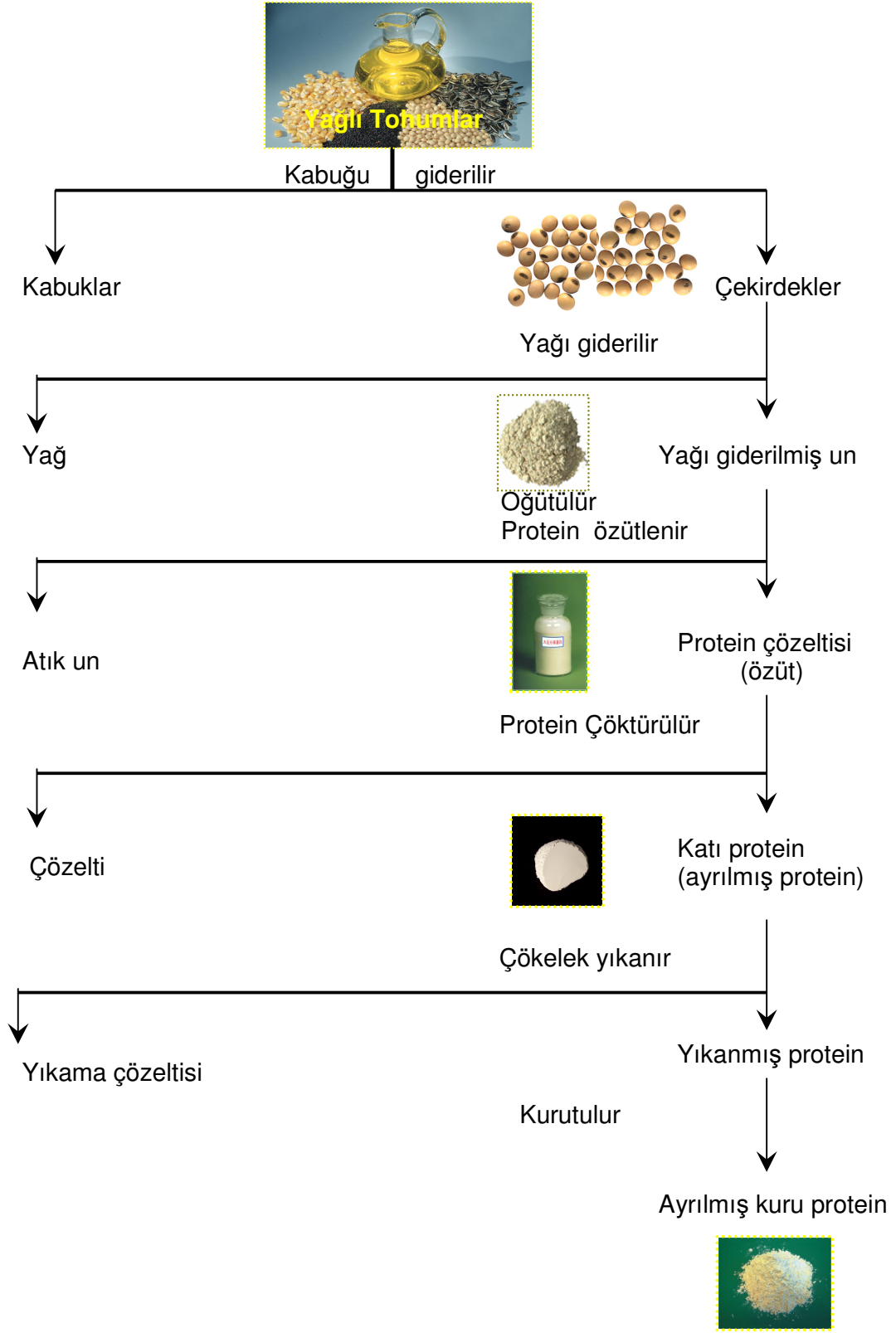
Proteinler amfoterik yapılardır, amino asidin yan zincirinin iyonlaşmasına bağlı olarak, negatif, pozitif veya yüksüz olabilirler. Proteinlerin çözünürlüğü izoelektrik noktada (nötr yük) minimum düzeydedir. Bu noktada minimum olmasının nedeni, komşu protein molekülüyle olan dipol-dipol etkileşimleri ve elektrostatik etkileşimlerin artması ve moleküllerin bir araya gelmeleridir. Ayrıca hidrojen bağları da etkilidir. Bu durum çözücü ve protein etkileşimini azalttığı için çözünürlük azalır. Çözünürlük aynı zamanda sıcaklık ve diğer organik ve inorganik iyonların çözeltide bulunmasıyla da ilgilidir (Çizelge 2.4.).

Yağı giderilmiş undaki protein, sulu alkali çözelti kullanılarak özütlenir. Katının (kg) çözeltiye (L) oranı 1:10'dan 1.20'ye kadar değişmektedir. Özütleme sırasında, serbest amino asitler ve peptidler gibi protein olmayan fakat azot içeren diğer bileşenler de özütlenebilir (Bell vd., 1983).

Çizelge 2.4. Protein çöktürmede kullanılan çöktürücü tipleri (Bell vd., 1983).

Çöktürme etkisi	Çöktürücü	Örnekler
Çözücü ortamını değiştirmek	Sıcaklık	> 45 °C
	Nötr tuzlar	NaCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , Na ₂ PO ₄ , vs.
	Organik çözücüler	Etanol, aseton ve eter
	Asitler (pH ayarlaması)	HCl, H ₂ SO ₄ , ve H ₂ PO ₄
	İyonik olmayan polimerler	Dekstranlar ve PEG
Protein molekülleriyle direk etkileşim	İyonik polimerler	CMC
	Polielektrolitler	HMP
	Metal iyonları	Ca ⁺² , Ba ⁺² , ve Zn ⁺² .

Yağlı tohumlardan protein özütlenerek kuru protein eldesi için bir seri işlem yapmak gerekir. Bunun için bir akım şeması verilmiştir (Şekil 2.11.).



Şekil 2.11. Kuru protein izolatu eldesi için akım şeması.

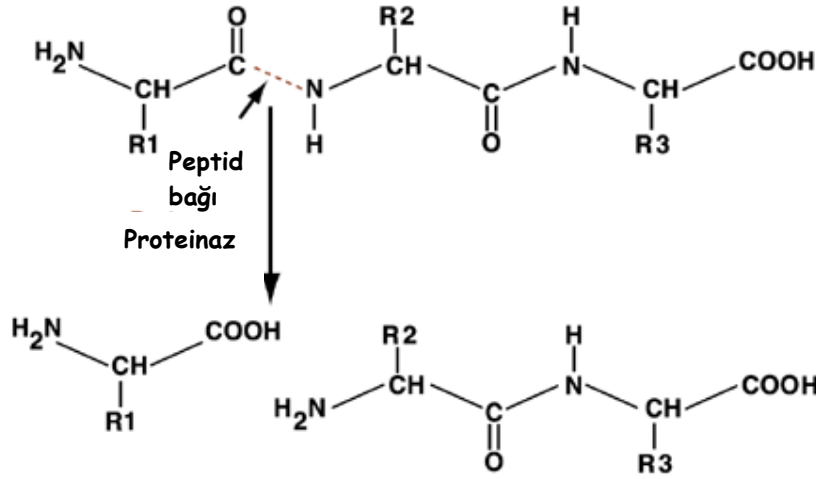
2.4 Hidroliz

Son yıllarda gıda kaynaklı proteinlerden biyoaktif peptid üretimi gerçekleştirilmektedir. Protein molekülü içinde inaktif halde bulunan peptidler, gastrointestinal sindirimle, proteolitik kültür fermentasyonu ve proteolitik enzimlerle hidroliz yöntemleriyle serbest hale getirilmektedirler. Özellikle soya, buğday, arpa, balık proteinlerinden elde edilen peptidlerin besinsel özellikleri ve biyoaktif özellikleri yanında cilt kanseri, kolon kanseri, karaciğer tümörü gibi bazı kanser türlerine karşı koruyucu ve tedavi edici özellikleri de bulunmaktadır (Aksay ve Özer, 2008).

Proteinlerin kısmi hidrolizi ile proteozlar, peptonlar ve peptidler oluşur; tam hidrolizi ile de amino asitler oluşur. Soya proteinlerinin tam hidrolizlenmesiyle açığa çıkan amino asitler gastrointestinal sisteminde emilim bozukluğu olan yaşlı hastaların diyetleri, hipoalerjenik bebek yiyecekleri, sporcu besinleri, ağırlık kontrol diyetleri ve kanser tedavileri için önemlidir. Çeşitli amino asitler kanser riskini azaltmada farklı etkilere sahiptir.

Protein hidrolizi sırasında moleküler değişiklikler meydana geldiğinden dolayı, hidroliz ürünlerinin çözünürlük, viskozite, duyumsal özellikler, emülsiyon ve köpürme gibi fonksiyonel özelliklerinde farklılıklar olur (Panyam ve Kilara, 1996), (Nielsen, 1997), (Caessens vd., 1999). Genellikle, hidrolizle birlikte proteinlerin izoelektrik noktada (pI) çözünürlükleri artmaktadır. Bunun nedeni, molekül ağırlığının azalması ve polar grupların artmasıdır (Chobert vd., 1988a), (Nielsen, 1997), (Slattery ve Fitzgerald, 1998).

Proteinler, polipeptid zincirindeki peptid bağlarının su girişi ile yıkılması sonucu hidroliz olurlar. Proteinlerin hidrolizi, kaynatma, asit etkisi ve enzim etkisiyle olabilir (Şekil 2.12. ve Şekil 2.14.).

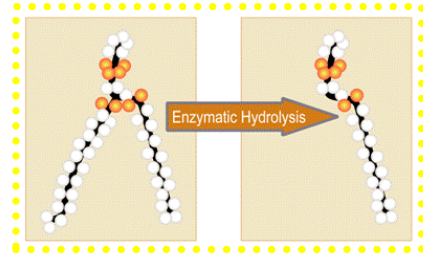


Şekil 2.12 . Proteinaz enzimi ile protein hidrolizi (Proteoliz tepkimesinde R1, R2, R3 amino asitlerin yan zincirlerini göstermektedir).

Asit hidrolizi ve enzim hidrolizi yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemlerin avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin, denatüre olmamış soya proteini proteaz enzimleriyle çok zor ayrıştırılır. Bu yüzden enzimatik hidrolizden önce ısıtmak ve ya alkolle denatüre etmek gerekir. Bu işlemi gerçekleştirmek çok zordur. Çünkü ısıtma veya alkolle denatürasyon ön işlemlerinin kontrol edilmesi kolay değildir. Asit hidrolizi ise bütün amino asitler için uygun değildir. Örneğin, Triptofan asit hidroliziyle tamamen yok olur, Valin ve İzolösin için ise moleküller arasındaki bağları koparmak çok zor olduğundan hidroliz işlemi uzun sürer.

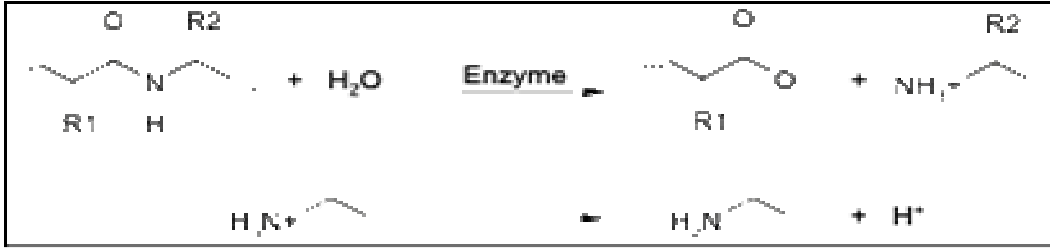
2.4.1 Enzimatik protein hidrolizi

Enzimatik protein hidrolizi, proteinlerin peptidler ve/veya aminoasitlere, proteolitik enzimler tarafından ayrıştırılmasıdır (Şekil 2.13.). Protein hidrolizi sırasında amin bağları kırılır ve su moleküllerinin eklenmesinden sonra, peptidler ve



Şekil 2.13. Enzimatik hidroliz

/veya serbest amino asitler ortaya çıkar. Oluşan yeni peptidler enzimler için yeni substratlar olabilirler (Adler-Nissen, 1993).



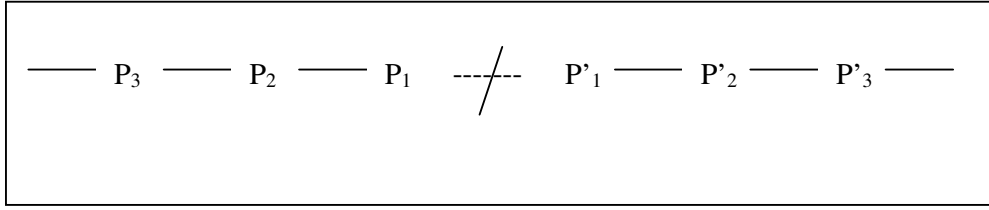
Şekil 2.14. Proteinlerin hidroliz reaksiyonları (Adler-Nissen, 1993).

2.4.1.1 Proteazlar

Birçok proteaz enzimleri protein hidrolizi için uygundur. Bu proteazlar hayvansal, bitkisel ve ya mikrobiyel kaynaklı olmalarına göre sınıflandırılabilirler . Katalitik aktivitelerine göre, endo ya da ekzo aktivite şeklinde sınıflandırılırlar ya da katalitik yerlerine göre sınıflandırılabilirler. Endoproteazlar protein zincirindeki amid bağlarını kırarlar, buna karşın ekzoproteazlar, proteinler veya peptidlerden ya C ucundan (karboksipeptidazlar) ya da N ucundan (aminopeptidazlar) uç amino asitleri uzaklaştırırlar . Proteazlar aktif gruplarına göre de farklılık gösterirler. Aktif grup ya amino asit (örn: serin, sistein ya da aspartik asit) ya da metalo grupları (genellikle çinko) olabilir (Adler-Nissen, 1993).

Bütün serin proteazlar endo-proteazlardır, fakat metalo proteazlar genellikle ekzo-proteazlardır (Whitaker, 1994). Proteazların pH spesifikliğı katalitik kısımlarındaki gruplara bağlıdır; sistein ve metalo proteazlar, nötr; serin, bazik ve aspartik asit, asidik pH'da aktif olan proteazlardır (Adler-Nissen, 1993).

Katalitik kısımda bulunan amino asitler , substrat bağlanması ve hangi amino asidin hidroliz potansiyeli olduğunu belirlemek ve böylece enzim spesifitesine karar vermek adına önemlidir (Adler-Nissen, 1993). Karboksil ucundan kırılan amid bağları P₁ ve amino ucundan kırılan amid bağları ise P'₁ olarak gösterilir (Şekil 2.15.), (Barrett vd., 1998).



Şekil 2.15. Amid bağlarının, karboksilik veya amino grubundan kırılmasının gösterilişi (Barrett vd., 1998).

Endoproteazlardan ve hayvansal kaynaklı tripsin, kemotripsin ve elastaz proteolitik enzimlerinin hepsi serin proteazları olmasına rağmen farklı enzim spesifitesine sahip oldukları örneklenmiştir. Bu enzimlerin, amid bağının karboksilik ucundaki amino asit tercihleri farklıdır. Tripsin, arginin ya da lizin tercih ederken, kemotripsin aromatik amino asitleri (fenilalanin, triptofan, tirozin) tercih eder. Elastaz, alanin gibi küçük yan zincirli amino asitleri tercih eder (Whitaker, 1994). Genelde enzimler farklı tipteki proteazların karışımdan hazırlanır. Örneğin pankreatin hem endo- hem de ekzo-proteazları içerir.

2.4.2 Hidroliz koşulları

Uygun bir ön-işlem basamağını içeren , protein / proteaz kombinasyonu seçildiği zaman hidroliz prosesinin reaksiyon koşulları belirlenebilir. Reaksiyonun sonucunu belirleyecek olan temel değişkenler ; sıcaklık, pH, enzimin substrata oranı ve reaksiyon süresidir. İlk üç faktör reaksiyon hızını belirler ve enzim karışımının spesifikliğini etkileyebilir. Reaksiyon süresi sadece hidrolizin miktarını belirler (Adler-Nissen, 1986). Hidroliz parametrelerini etkileyen değişkenler aynı zamanda hidroliz ürünlerinin bileşimini de etkilemektedir.

Eğer hidroliz prosesinin pH'ı kontrol edilmezse hidroliz başladıktan sonra, çözeltinin pH'ı , hidrolizin pH'ına göre proton alan veya veren yeni amino ve karboksil gruplarının oluşmasıyla , değişmeye başlayacaktır. Düşük pH'da bütün amino grupları protonlanır ve yalnızca karboksil grupları proton verir. Böylece pH artar. Nötr ve bazik pH'da , bütün karboksil grupları proton verip, sadece bazı

amino grupları protonlandığı için hidroliz sonucu pH azalır. Bu pH değişimini önlemek için tampon çözelti kullanmak gerekir. pH kontrol cihazı da kullanılabilir (Adler-Nissen, 1986).

2.4.3. Hidroliz derecesi

Hidroliz derecesi, hidroliz olan peptid bağlarının oranını gösterir ve (2.17) eşitliğine göre hesaplanır. Bu eşitlikte, h hidroliz olan peptid bağlarının sayısıdır ve h_{top} ana proteindeki peptid bağlarının toplam sayısıdır (Adler-Nissen, 1986).

$$HD = (h / h_{top}) \times 100 \% \quad (2.17)$$

Proteinin h_{top} değeri amino asit bileşiminden hesaplanır (Adler-Nissen, 1986). Hidroliz sırasında, her amid bağı kırıldığında yeni bir karboksil ve amino grubu açığa çıkar. Bu yüzden, hidroliz olmuş peptid bağlarının sayısı yeni oluşan C-ve/veya N-uçlu grupların sayısı ile tayin edilebilir.

Daha önce açıklandığı gibi, amino ve karboksil grupları, hidrolizden sonra ortamın pH'ına bağlı olarak az veya çok protonlanır veya proton verir. Eğer hidroliz pH kontrol cihazında yapılırsa, eklenen asit veya baz miktarı hidroliz derecesini hesaplamak için doğrudan kullanılabilir. Çünkü eklenen asit veya baz miktarı serbest amino ve karboksil gruplarıyla doğrudan ilgilidir (Adler-Nissen, 1986); (Diermayr ve Dehne, 1990). Bununla birlikte, bu yöntem yalnızca nötr/bazik ($pH > 7$) ya da asidik pH ($pH < 3$) için kullanılabilir. Çünkü pH 5 ve 6 arasında proton alma veya verme işlemi gerçekleşmez ve denge durumu söz konusudur. Ayrıca, asit ve baz gruplarının pK değerleri peptid zincirinin uzunluğu ve uç amino asitlerin yan zincirlerine bağlı olduğu için hidroliz boyunca sabit değildir (Adler-Nissen, 1986), (Diermayr ve Dehne, 1990), (Camacho vd., 2001). Bu problemlerden dolayı yeni bir yöntem ihtiyacı vardır.

Açığa çıkan α -amino grupları, amino grupla spesifik olarak reaksiyon veren belirteçler kullanarak spektrofotometrik olarak tayin edilebilir. Genelde kullanılan belirteçler, ninhidrin, o-ftaldehit (OPA) ve trinitrobenzensülfonik asittir (TNBS). Bu

üç belirteç kullanarak yapılan hidroliz derecesi tayinlerinde, OPA ve TNBS benzer sonuçlar verirken, ninhidrin oldukça düşük hidroliz derecesi değerleri vermiştir (Panasiuk vd., 1998). OPA yöntemi TNBS yöntemine göre daha hızlı ve kesin bir yöntem olarak belirtilmiştir (Turgeon vs.,1991). Bununla birlikte, OPA türevlerinin UV absorpsiyonunun belirteci ekledikten 20 dakika sonra daha kararlı olduğu da gösterilmiştir (Panasiuk vd., 1998).

2.4.4. Hidroliz sırasında ortaya çıkan değişiklikler

Protein hidrolizi sırasında moleküler değişikliklerin olması, hidroliz ürünlerinin çözünürlük, viskozite, duyumsal özellikler, emülsiyon ve köpürme özellikleri gibi tekno-fonksiyonel davranışlarında değişikliğe neden olur (Panyam ve Kilara, 1996), (Nielsen, 1997), (Caessens vd., 1999).

Genellikle, hidrolizle birlikte proteinlerin izoelektrik (pI) noktada çözünürlükleri artmaktadır. Bunun nedeni, molekül ağırlığının azalması ve polar grupların artmasıdır (Chobert vd., 1988a), (Nielsen, 1997), (Slattery ve Fitzgerald, 1998). Diğer pH değerlerindeki çözünürlüğü çalışılan proteine bağlıdır. Örneğin kazeinatların çözünürlüğü, pI değerinin (pH:4–5) altında ve üstündeki pH değerlerinde çok yüksektir. Sonuç olarak, hidroliz ürünlerinin bu pH'daki çözünürlükleri kazeinatlara benzer veya biraz daha düşüktür (Chobert vd., 1988a), (Chobert vd., 1988b), (Svenning vd., 1993), (Slattery ve Fitzgerald, 1998). Peyniraltı suyu proteinlerinin çözünürlükleri, pI'nın dışındaki değerlerde kazeinden daha azdır ve bütün pH aralığında hidrolizle birlikte çözünürlük artışı göstermektedir (Chobert vd., 1988a), (Perea vd., 1993), (Lieske ve Konrad, 1996).

2.5. Amino Asit Tayin Yöntemleri

Proteinlerin yapısını oluşturan 20 amino asit arasında 10 tanesi temel amino asitler olarak adlandırılır. Bu amino asitler insan vücudu tarafından ihtiyacı karşılayacak düzeyde sentezlenemedikleri için dışarıdan beslenme yoluyla alımları zorunludur.

Çizelge 2.5. Proteinlerin yapısını oluşturan temel amino asitler ve diğerleri.

Temel amino asitler	Diğerleri
İzolösin	Alanin
Lösin	Asparajin
Lizin	Aspartik asit
Metiyonin	Sistein
Fenilalanin	Glutamik asit
Treonin	Glutamin
Triptofan	Glisin
Valin	Prolin
Arjinin	Serin
Histidin	Tirozin

Amino asitler yan gruplarının (R) özelliklerine göre sınıflandırılırlar.

- Alifatik yan zincirli: Glisin, alanin, valin, lösin, izolösin.
- Hidroksilik grupları taşıyan yan zincirli: Serin, treonin, tirozin.
- Kükürt atomları taşıyan yan zincirli: Sistein, metiyonin.
- Asit grupları veya onların amidlerini taşıyan yan zincirli: Aspartik asit, asparajin, glutamik asit, glutamin.
- Bazik gruplar taşıyan yan zincirli: Arjinin, lizin, histidin.
- Aromatik halkalar taşıyanlar: Histidin, fenilalanin, tirozin, triptofan.
- İmino asitler: Prolin.

Amino asitler sahip oldukları reaktif grupların özellikleri nedeniyle çeşitli kimyasal reaksiyonlara katılabilirler. Bu özelliklerinden yararlanarak aminoasitlerin miktarlarını belirlemek mümkündür.

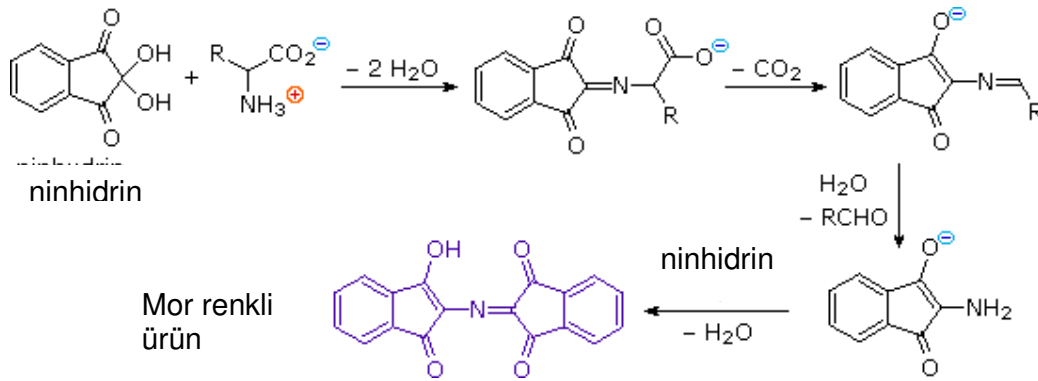
2.5.1. Formol titrasyonu

Amino asitler nötral veya hafif bazik çözeltilerde formaldehitte muamele edilirse formol serbest amino gruplarıyla birleşir. Böylece amino asidin mono ya da dimetiol türevleri ya da Schiff bazı oluşur. Bu da ortamda sadece karboksil gruplarının kalmasını sağlar. Amino asitlerdeki karboksil grupları bu reaksiyon sonrasında yapılan titrasyonla belirlenir.

2.5.2. Ninhidrin reaksiyonu

Bu reaksiyon çok düşük miktarlardaki amino asitleri belirlemede kullanılır. Amino asitler ninhidrin gibi güçlü yükseltgen ajanlarla ısıtıldıklarında mavi renkli bir ürün oluştururlar (Şekil 2.16.).

Ninhidrin belirteci amino asitlerin birincil aminleriyle reaksiyona girerek mavi bir renk verir. Yalnız prolin amino asidi ikincil amino grubuna bağlı olarak sarı renk verir.



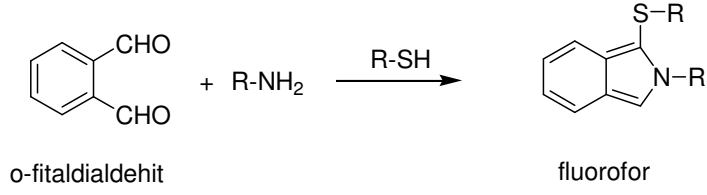
Şekil 2.16. Ninhidrin reaksiyonu (www.cem.msu.edu/.../Images3/ninhydrx.gif)

2.5.3. Floreskamin reaksiyonu

Bu reaksiyon nicel olarak aminoasitlerin, peptid ve proteinlerin belirlenmesinde kullanılır. Bu bileşikler floreskaminle reaksiyona girdiğinde güçlü floresans özellik gösteren bir bileşik oluşur.

2.5.4. O-fitaldialdehit reaksiyonu

Aminoasitler o-fitaldialdehit ile 2-merkapttoetanol varlığında reaksiyona girdiğinde floresans veren bir ürün meydana gelir(Şekil 2.17.).



Şekil 2.17. O-fitaldialdehit reaksiyonu .

3. DENEYSEL YÖNTEMLER

Bu çalışmada yapılan deneyleri dört ana grup altında toplamak mümkündür.

- Yağı giderilmiş soya unundan protein eldesi için özütleme yönteminin süt tozu ve soya unu üzerinde denenmesi ve uygun pH, sıcaklık ve sürenin belirlenmesi.
- Literatürdeki başlıca toplam protein analiz yöntemleri içerisinde incelenerek seçilen beş yöntemin süt proteini ve soya proteini tayini için denenmesi ve karşılaştırılması.
- Elde edilen protein çözeltisinde enzim hidrolizini gerçekleştirerek, hidroliz parametrelerinin belirlenmesi.
- Enzimlerle hidrolizlenmiş protein çözeltilerinde amino asit tayini için ninhidrin yönteminin denenmesi ve literatürdeki yöntemlerle karşılaştırılması.

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneyler sırasında analitik saflıkta kimyasallar kullanılmış olup kullanılan kimyasal maddeler için herhangi bir saflaştırma işlemine gerek duyulmamıştır. Bütün deneylerde damıtık su kullanılmıştır. Protein tayininde kullanılan Biüret belirtecini hazırlamak için $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Riedel-de Haën) ve NaK Tartarat (Panreac); ekstraksiyon için kloroform, metanol (Sigma-Aldrich); protein izolatlarının hazırlanması için, NaOH (Riedel-de Haën) ve HCl (Riedel-de Haën); hidroliz için Novozyme firmasının Flavourzyme 1000 L, Alcalase 2.5 L Type DX, Neutrase 1.5 mg enzimleri; amino asit tayini için Ninhidrin (Merck) ve amino asit tayinlerinde kullanılan doğrusal çalışma grafiğini elde etmek için, L-lysine monohydrochloride (BDH Chemicals) kullanılmıştır.

3.2. Protein İzolatının Hazırlanması

Bir protein molekülü, her protein için farklı ve karakteristik olan, proteindeki elektriksel yüke sahip R- gruplarının sayıları ve elektriksel yüklerinin çeşidi

tarafından belirlenen ve izoelektrik nokta diye tanımlanan bir pH değerinde iyonlaşmış fakat dış ortama karşı elektriksel yönden nötral bir yapıdadır.



Bu çalışmada proteinlerin izoelektrik pH'da çözünürlüklerinin minimum olmasından faydalanarak, protein saflaştırılmıştır. Bunun için yağı giderilmiş soya unundan farklı koşullarda protein özütlenerek en iyi verim elde edilmeye çalışılmıştır. Soya proteinini çöktürmek için uygun pH ve sıcaklık belirlenmiştir.

Öncelikle denemeler süt tozu ile gerçekleştirilmiştir. Yağsız süt tozu, 1 g için 10 mL damıtılmış su kullanılarak seyreltilmiştir. Hazırlanan bulamacın pH'ı 2M NaOH çözeltisi ile istenen değere ayarlanmıştır (6.50–12.0). Karışım oda sıcaklığında (23 °C) 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıyla karıştırılmış ve bu sırada pH sabit tutulmuştur.

Daha sonra, katı faz (atık) ve sıvı faz (protein çözeltisi, özüt) santrifüjle (5,000 rpm, 10 dakika) birbirinden ayrılmıştır. Sıvı faz manyetik karıştırıcıda, pH metre kullanılarak 2M HCl çözeltisi ile süt proteini'nin izoelektrik noktası olan pH 4.5'da çöktürülmüştür.

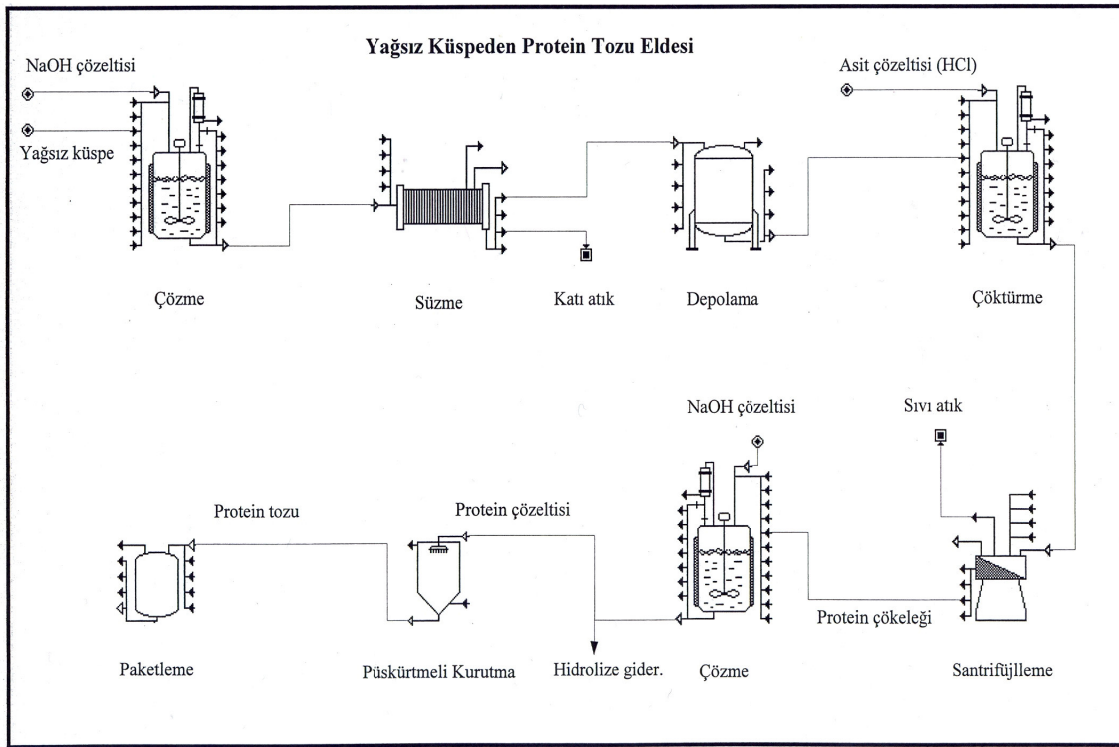
Süt tozu ile yapılan denemelerden sonra, yağı giderilmiş soya unu (1 g /10 mL damıtılmış su) bulamacının pH'ı 2M NaOH çözeltisi ile 11'e ayarlanmıştır. Karışım, 2 saat boyunca sabit pH da ve artan sıcaklıklarda (40–90°C) manyetik karıştırıcıyla karıştırılmıştır.

Son olarak 60 °C sıcaklıkta artan pH değerlerinde (6.89–13) soya unundan protein özütlenmiştir.

Çöktürülen proteinler liyofilizatör içerisinde 1 gece bekletilerek kurutulmuştur. Liyofilizatör cihazı, sıvı içeren örneklerin düşük sıcaklık (-80 °C) ve yüksek vakum altında dondurularak kurutulması için kullanılmaktadır.

Elde edilen protein izolatu Kjeldahl yöntemi ile tayin edilerek protein miktarı belirlenmiş ve protein verimleri hesaplanmıştır.

Farklı pH (6.5–13.0), sıcaklık (40 – 90 °C) ve sürelerde (30-120 dak.) yapılan deneyler sonucunda en uygun parametreler seçilmiştir. Belirlenen yöntemi endüstriyel bir proses haline getirmek için SuperPro Designer 5.1 programı kullanılarak bir akım şeması çizilmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Yağsız küspeden protein eldesi için SuperPro Designer 5.1 programıyla çizilen akım şeması.

3.3. Protein Tayin Yöntemleri

Soya ve süt proteinlerinde toplam protein tayini için gıda analizlerinde en çok kullanılan Kjeldahl yöntemi ve bu yöntemle alternatif olarak Biüret-340 nm, 550 nm ve UV-280 nm, 220 nm gibi spektrofotometrik yöntemler seçilmiştir. Bu yöntemlerin seçilme nedeni uygulanabilirliğinin kolay olması ve farklı reaksiyonlar

üzerinden gerçekleşmeleridir. UV-220 nm (Stoscheck, 1990) yönteminde absorpsiyon, peptid bağlarının elektronik geçişlerinden kaynaklanırken, Biüret (Gornall vd., 1949) yöntemlerinde bakır/peptid bağı kompleksinin elektronik geçişi söz konusudur. Her iki yöntemde de peptidler ölçülmektedir. UV-280 nm (Stoscheck, 1990) yönteminde ise amino asitlerin elektronik geçişleri ölçülmektedir.

Öncelikle spektrofotometrik yöntemler için standart proteinler kullanılarak kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Daha önce, farklı proteinlerin farklı absorpsiyon spektrumu göstermelerinden ve hiç bir protein standardının tüm proteinler için standart görevi yapamayacağından sözedilmiştir. En yaygın kullanılan protein standardı sığır serum albuminidir (BSA). Bu çalışmada BSA ve süt en önemli proteini olan kazein kullanılarak bütün yöntemler için ayrı ayrı kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Bu sayede yöntemlerin, proteinlerin amino asit bileşimi ile olan ilgisi de incelenebilmiştir. Standart proteinlerle yapılan çalışmalarda yöntemlerin doğrusal çalışma aralıkları belirlenerek, duyarlılıkları karşılaştırılmıştır. Bütün deneylerde Spectro UV-Vis Auto (LaboMed Inc.) spektrofotometre kullanılmıştır.

Belirlenen yöntemler doğal örneklerle uygulanmıştır. Bunun için soya protein izolatu, yağı giderilmiş soya unu, özütlenmiş soya unu ve yağsız süt tozu kullanılmıştır.

Doğal örneklerle yapılan deneylerde yağı giderilmiş soya unu kullanılmasına rağmen içinde kalan bir miktar yağın girişime neden olduğu düşünülerek soya unu tekrar özütlenmiştir. Bunun için 2 g soya unu 18 mL kloroform-metanol (1:1) karışımı içerisinde 5 dakika vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Daha sonra santrifüj (2,500 rpm, 10 dakika) yapılarak katı kısım ayrılmıştır. 12 mL kloroform-su (1:1) karışımında 5 dakika daha karıştırıldıktan sonra tekrar santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş ve katı faz ayrılarak kurutulmuştur.

Çalışmalarımızda bütün deneyler en az üç kez olmak üzere çok sayıda tekrarlanarak grafiklerde ortalama değer kullanılmıştır.

3.3.1. Biüret yöntemi

Biüret belirtecini hazırlamak için, 0.15 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 0.6 g NaK Tartarat 50 mL damıtık suda çözülür. Üzerine 30 mL %10 NaOH karıştırılarak eklenir. Son hacim 100 mL'ye tamamlanır.

1'er mL protein çözeltisi içeren örnekler (1.25 mg/mL), 2 mL biüret çözeltisi eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında (23 °C) bekletilmiştir. Örnekler 0.10 M NaOH içerisinde hazırlanmıştır. Kör çözelti ile spektrofotometre, 550 nm ve 340 nm için her ölçüm serisinden önce sıfırlanmıştır. Ölçümlerde 340 nm için kuvars, 550 nm için cam küvetler kullanılmıştır. Daha sonra standart eğriler hazırlanarak, doğal örneklerin protein derişimleri hesaplanmıştır.

3.3.2. UV-280 nm ve UV-220 nm yöntemleri

UV ölçümlerinde 280 nm için, 0.04 mg/mL ve 220 nm için, 0.03 mg/mL derişimlerinde 0.10 M NaOH içerisinde hazırlanan örnekler kullanılmıştır. Bütün ölçümler kuvars küvetlerde yapılmıştır.

3.4. Soya Proteininin Çeşitli Enzimlerle Hidrolizi

Proteinlerin hidrolizinde temel olarak asidik hidroliz ve enzimatik hidroliz yöntemleri kullanılmaktadır. Proteinlerin enzimatik yoldan hidrolizi geleneksel asit katalizli hidroliz yöntemine bir alternatif olmaktadır.

Bu çalışmada soya proteininin hidrolizi için enzimatik hidroliz yöntemi seçilmiştir ve hidroliz Novozyme firmasından temin edilen 3 farklı endüstriyel proteaz enzimi (Flavourzyme 1000 L, Alcalase 2.5 L Type DX, Neutrase 1.5 mg) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2.). Hidroliz sonrasında oluşan toplam amino asit değeri ve hidroliz derecesi (HD) belirlenmiştir. HD, enzimatik hidrolizden sonra açığa çıkan amino asit miktarının, soya protein özütünün asit hidrolizi sonucunda bulunan toplam amino asit miktarına oranı hesaplanarak bulunmuştur.

$$HD (\%) = (h / h_{top.}) \times 100 \quad (2.16)$$

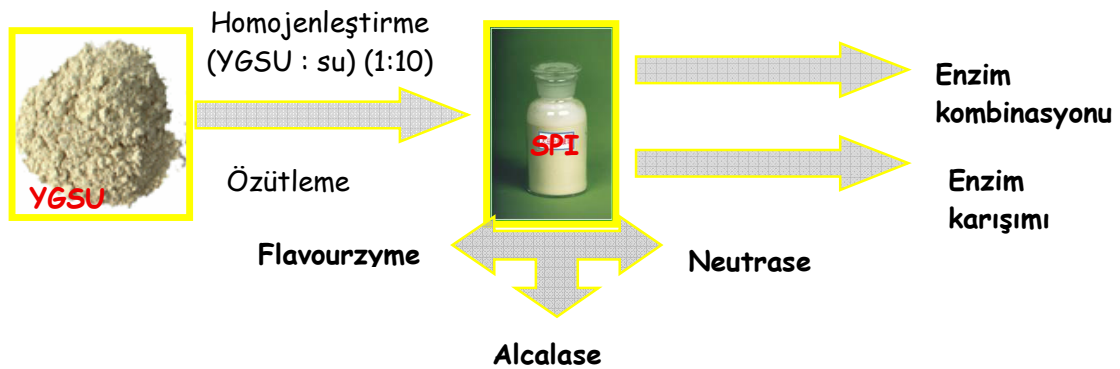
Açığa çıkan amino asitler ninhidrin belirteci ile tayin edilmiştir.

Çizelge 3.1.de kullanılan enzimlerle ilgili bazı bilgiler verilmiştir.

Çizelge 3.1. Enzim bilgileri.

Enzim	Tür	Aktivite	Renk	Fiziksel şekli
Neutrase 1.5 MG	nötr proteaz	1.5 AU-NH/g	açık kahverengi	granül şeklinde
Alcalase 2.5 L, Type DX	proteaz (subtilisin)	2.5 AU-A/g	amber	sıvı (d=1.05 g/mL)
Flavourzyme 1000 L	aminopeptidaz	1000 LAPU/g	kahverengi	sıvı

Soya protein özütü, daha önce anlatıldığı şekilde yağı giderilmiş soya ununun özütlenmesi ile hazırlanmıştır. Bu özüt ilk olarak asit hidrolizi ile parçalanarak açığa çıkan toplam amino asit miktarı ninhidrin yöntemi ile tayin edilmiştir. Asit hidrolizi geri soğutucu altında 4M H₂SO₄ ile 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir (Frost ve Heinsen, 1945). Doğrusal çalışma grafiğini hazırlamak için L-Lizin amino asidi 0.15–0.60 mg/mL derişim aralığında kullanılmıştır (Şekil 3.3.)



Şekil 3.2. Yağı giderilmiş soya unundan (YGSU) elde edilen soya proteini izolatu (SPI) nın hidrolizi için çeşitli enzim ve karışımların denenmesi.

Daha sonra aynı özütten 50 mL alınarak pH 7.3'e ve sıcaklık 50 °C'ye ayarlanmıştır. pH'ı sabit tutmak için fosfat tamponu kullanılmıştır. Sıcaklığı sabit tutmak için ise sıcaklık kontrollü bir sistem hazırlanmıştır. Bu sistemde Alcalase 2.5 L Type DX, Flavourzyme 1000 L, Neutrase 1.5 mg enzimleri ayrı ayrı denenmiştir. Sadece Neutrase enzimi için sıcaklık 45 °C'de sabitlenmiştir. Hidroliz tepkimesi 9 saat süreyle izlenmiştir.

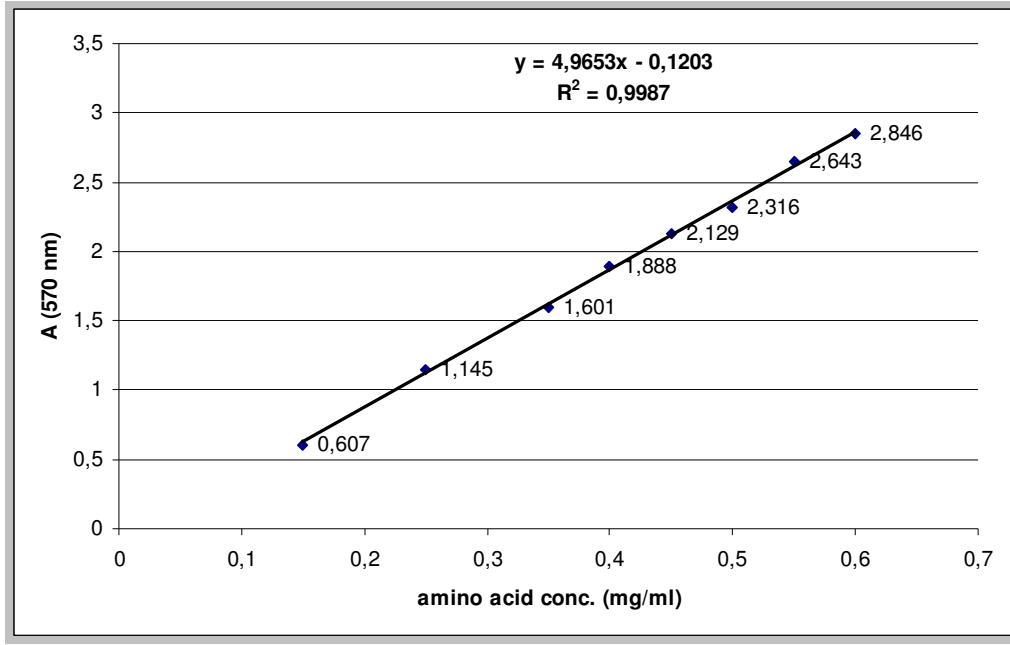
Enzimler tek tek uygulandıktan sonra enzim karışımı ve enzim kombinasyonu şeklinde iki ayrı yöntem denenmiştir. Enzim karışımı, 3 enzimin (Flavourzyme 1000 L, Alcalase 2.5 L Type DX, Neutrase 1.5 mg) pH 8.2 ve sıcaklık 53 °C'ye ayarlandıktan sonra aynı anda sisteme eklenmesiyle 9 saat süreyle hidroliz edilerek uygulanmıştır.

Enzim kombinasyonunda ise pH 8.2 ve sıcaklık 53 °C'deki protein çözeltisine 0.08 g Alcalase enzimi (proteinin %2'si) eklenmiştir. Yaklaşık 70 dakika sonra pH 6.38'e düşmüş ve sabit kalmıştır. Bu sırada çözeltiye 0.0252 g Neutrase (proteinin %0.63'ü) ve 0.01 g Flavourzyme (proteinin %0.1–0.25'i) eklenmiştir. Hidroliz 9 saate kadar izlenmiştir.

Bütün deneylerde hidrolizi takip etmek için, belli aralıklarla örnek alınmıştır. Açığa çıkan amino asitler yine ninhidrin yöntemiyle tayin edilerek, HD hesaplanmıştır.

3.5. Ninhidrin Yöntemi ile Amino Asit Tayini

Amino asit tayininde ninhidrin belirteci kullanılmıştır. Bunun için 0.35 g ninhidrin, % 50 propanol-su karışımında çözülmüştür. Kalibrasyon eğrisi için L-Lizin amino asidi kullanılmış ve doğrusal çalışma aralığı 0.15–0.60 mg/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. L-Lizin ile hazırlanan doğrusal çalışma grafiği.

Ninhidrinle amino asit tayin yönteminde kullanılan standart örnek, içeriğinde 17 çeşit amino asit bulunan bitkisel protein kaynaklı doğal amino asit karışımı olan “amino-ixir” dir. 1 mL örnek (0.2 mg /mL), 1 mL fosfat tamponu (pH 7.8), 2 mL su ve 1 mL ninhidrin belirteci vorteks ile karıştırılmıştır. Ağız sıkı bir şekilde kapatılan büyük deney tüplerine alındıktan sonra kaynayan su içerisinde 15 dakika bekletilerek, reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Deney tüpleri sıcak su içerisinde çıkartıldıktan sonra soğuk su banyosunda bekletilerek buharlaşan çözeltinin yoğunlaşması sağlanmıştır. 20 dakika sonra UV spektrofotometresinde 570 nm de absorbans ölçülmüştür. Ölçümler cam küvetlerde yapılmış ve sonuçlar çalışma grafiği yardımıyla bulunmuştur.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

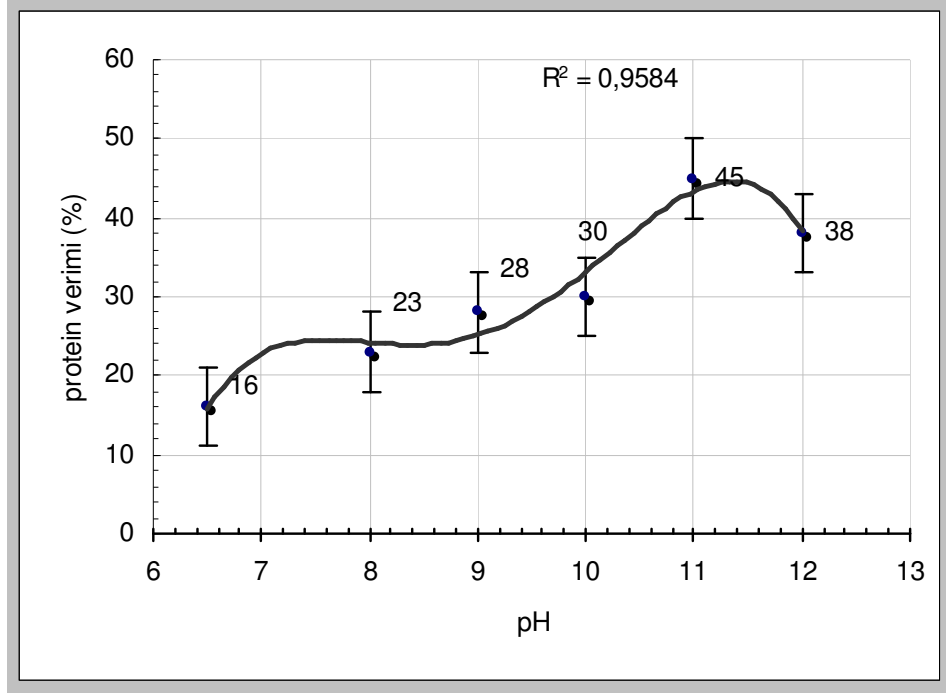
4.1. Protein İzolatının Hazırlanması

Proteinlerin izoelektrik pH'da çözünürlüklerinin minimum olmasından yararlanarak, deneylerimizde kullanılan proteinler saflaştırılmıştır.

Deneyler önce süt tozu ile gerçekleştirilmiştir. Oda sıcaklığında, çeşitli pH'larda süt tozundan protein özütlenmiş ve bu sıcaklıktaki en iyi sonuç % 45 verim ile pH:11 de elde edilmiştir (Çizelge 4.1. ve Şekil 4.1.).

Çizelge 4.1. Süt tozundan özütlenebilen protein veriminin, oda sıcaklığında (23 °C) pH ile değişimi

Sıcaklık (°C) Çözme/çöktürme	pH Çözme/çöktürme	Protein çözeltisinden özütlenebilen protein verimi (%)
23 /23	12.0/4.5	38
23 /23	11.0/4.5	45
23 /23	10.0/4.5	30
23 /23	9.00/4.5	28
23 /23	8.00/4.5	23
23 /23	6.50/4.5	16

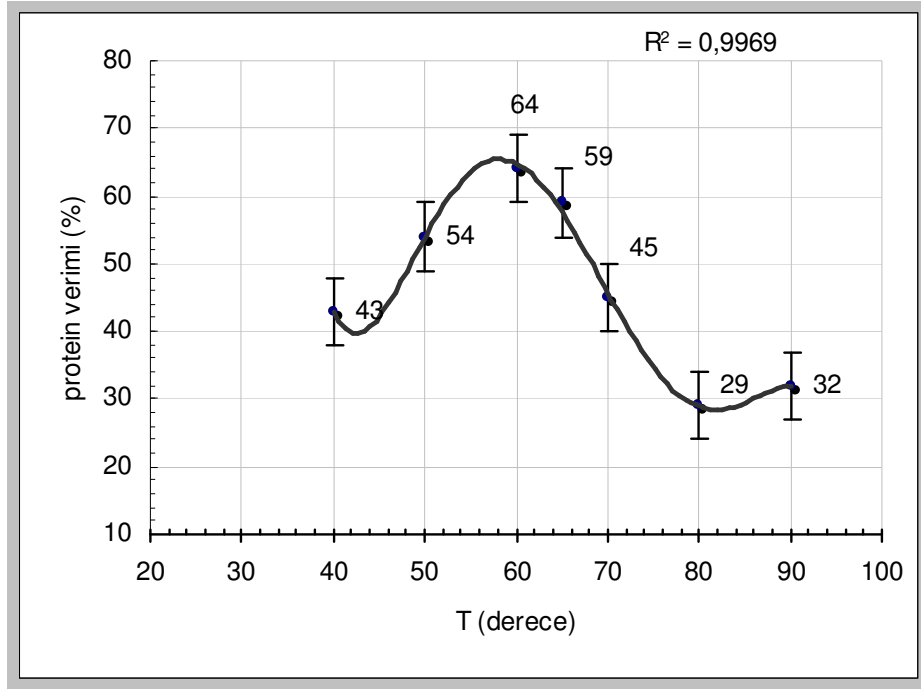


Şekil 4.1. Süt tozundan özütlenenebilen protein veriminin pH ile değişimi (23 °C).

Süt tozu ile yapılan bu deneyler sonucunda, oda sıcaklığında ve pH:11 de en iyi verimin alındığı gözleminden sonra pH:11 de sabit tutulup sıcaklık artırılarak yağı giderilmiş soya unundan protein özütleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Deneyler sonucunda 60 °C'de %64 protein verimi ile en iyi sonuç elde edilmiştir. 65 °C ve üstündeki sıcaklıklarda protein veriminde azalma gözlenmiştir. Çünkü bu sıcaklıktan sonra protein denatüre olmaya başlamıştır. Özellikle 80 °C'de protein veriminin oldukça azaldığı (%29) gözlenmiştir (Çizelge 4.2. ve Şekil 4.2.).

Çizelge 4.2. Artan sıcaklıkta, yağı giderilmiş soya unundan özütlenebilen protein verimi (pH:11).

Sıcaklık (°C)	pH	Protein çözeltilisinden özütlenebilen protein verimi (%)
Çözme/çöktürme	Çözme/çöktürme	
40/23	11/4.6	43
50/23	11/4.6	54
60/23	11/4.6	64
65/23	11/4.6	59
70/23	11/4.6	45
80/23	11/4.6	29
90/23	11/4.6	32



Şekil 4.2. Yağı giderilmiş soya unundan özütlenebilen protein veriminin sıcaklıkla değişimi (pH:11).

Daha sonra yağı giderilmiş soya unundan, pH değiştirilmeden, 60 °C'de protein özütlenmiştir. Yağı giderilmiş soya ununun damıtık su içerisinde bulamaç haline getirilmesinden sonraki pH:6.89 dur. Bu pH değeri değiştirilmeden en iyi verimin

elde edildiği 60 °C'de protein özütlenmiştir. Bu koşullarda yapılan 4 deneyin ortalaması sonucunda oldukça düşük (%20) bir protein verimi elde edilmiştir (Çizelge 4.3.).

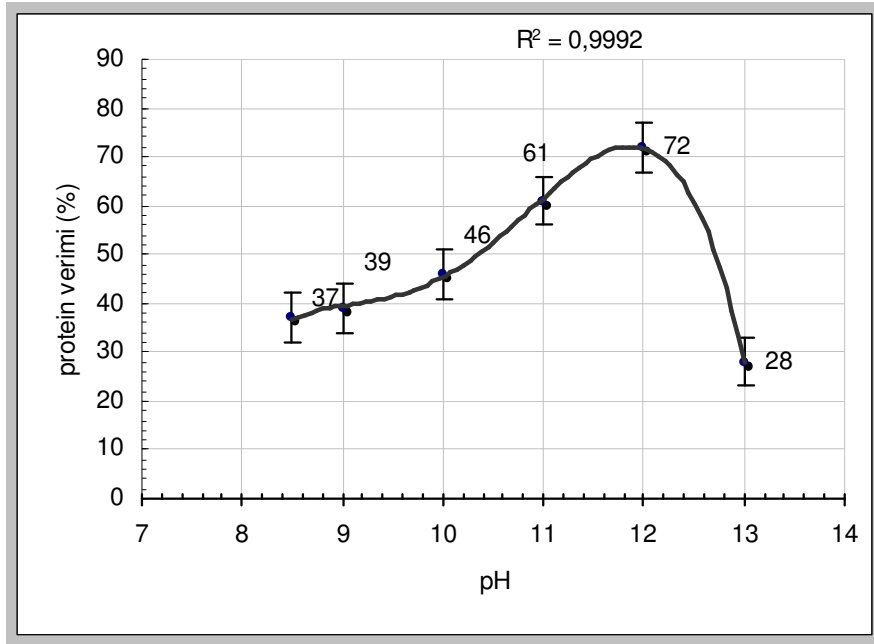
Çizelge 4.3. Yağı giderilmiş soya unundan özütlenebilen protein verimi (60 °C ve pH:6.89, aynı koşullarda yapılan 4 deneyin sonucu).

Sıcaklık (°C)	pH	Protein çözeltisinden özütlenebilen protein verimi (%)
Çözme/çöktürme	Çözme/çöktürme	
60 /23	6.89 /4.6	20
60 /23	6.89 /4.6	18
60 /23	6.89 /4.6	19
60 /23	6.89 /4.6	21

Buradan görüldüğü gibi yüksek pH'daki (11) özütlenebilen protein verimi düşük pH' dakinden (6.89) çok daha yüksektir. Böylece kuvvetli bazik ortamda proteinin çözeltiye daha iyi geçtiğı anlaşılmıştır. Bunun üzerine 60 °C'de, artan pH değerlerinde, yağı giderilmiş soya unundan yapılan deneylerde pH:12 de (%72) en iyi verim elde edilmiştir. Literatürde de belirtildiğı gibi, pH:12 yüksek bir değer olduğundan dolayı özütleme sırasında, serbest amino asitler ve peptidler gibi protein olmayan fakat azot içeren diğer bileşenler de özütlenmiş olabilir. pH:13 de ise proteinlerin hidroliz olmasından kaynaklanan bir azalma söz konusudur. Aynı deney setinde pH:11 de %61 protein verimi elde edilmiştir. Soya proteinleri için yapılan bütün bu özütleme deneyleri sonucunda 60 °C sıcaklık ve pH:11 en iyi koşullar olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4. ve Şekil 4.3.).

Çizelge 4.4. Yağı giderilmiş soya unundan özütlenebilen protein veriminin 60 °C da pH ile değişimi.

Sıcaklık (°C)	pH	Protein çözeltisinden özütlenebilen protein verimi(%)
Çözme/çöktürme	Çözme/çöktürme	
60 /23	8.5 /4.6	37
60 /23	9.0/4.6	39
60 /23	10/4.6	46
60 /23	11/4.6	61
60 /23	12/4.6	72
60 /23	13/4.6	28

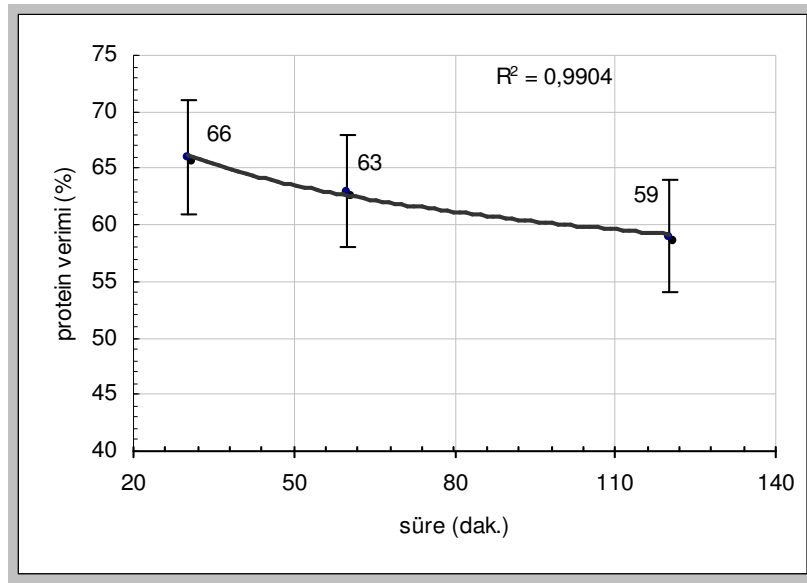


Şekil 4.3. Yağı giderilmiş soya unundan özütlenebilen protein veriminin sabit sıcaklıkta pH ile değişimi (60 °C).

Yukarıdaki deneylerde proteinler 1 saat süreyle özütlenmiştir. Özütleme süresini incelemek için yapılan deneylerde ise 30, 60 ve 120 dakika sonunda yaklaşık aynı sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.5.ve Şekil 4.4.).

Çizelge 4.5. Sabit sıcaklık (60 °C) ve pH'da (11), farklı sürelerde özütlenabilen soya proteini verimi.

Süre (dak.)	Sıcaklık (°C) Çözme/çöktürme	pH Çözme/çöktürme	Protein çözeltisinden özütlenabilen protein verimi (%)
30	60 /23	11 / 4.6	66
60	60 /23	11 / 4.6	63
120	60 /23	11 / 4.6	59



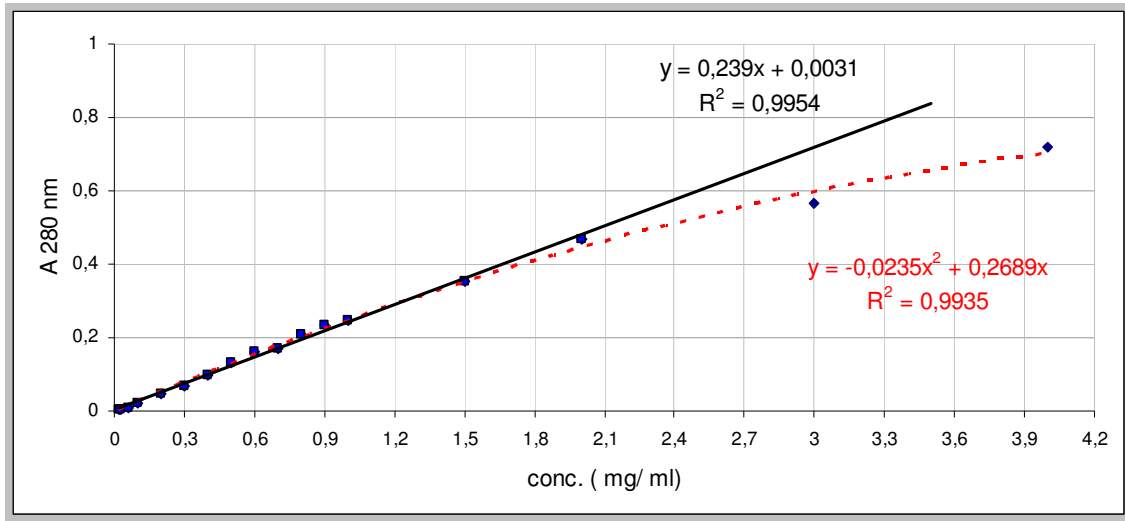
Şekil 4.4. Özütlenabilen soya proteini veriminin zamanla değişimi (Sıcaklık: 60 °C ve pH:11).

4.2. Protein Tayin Yöntemlerinin Karşılaştırılması

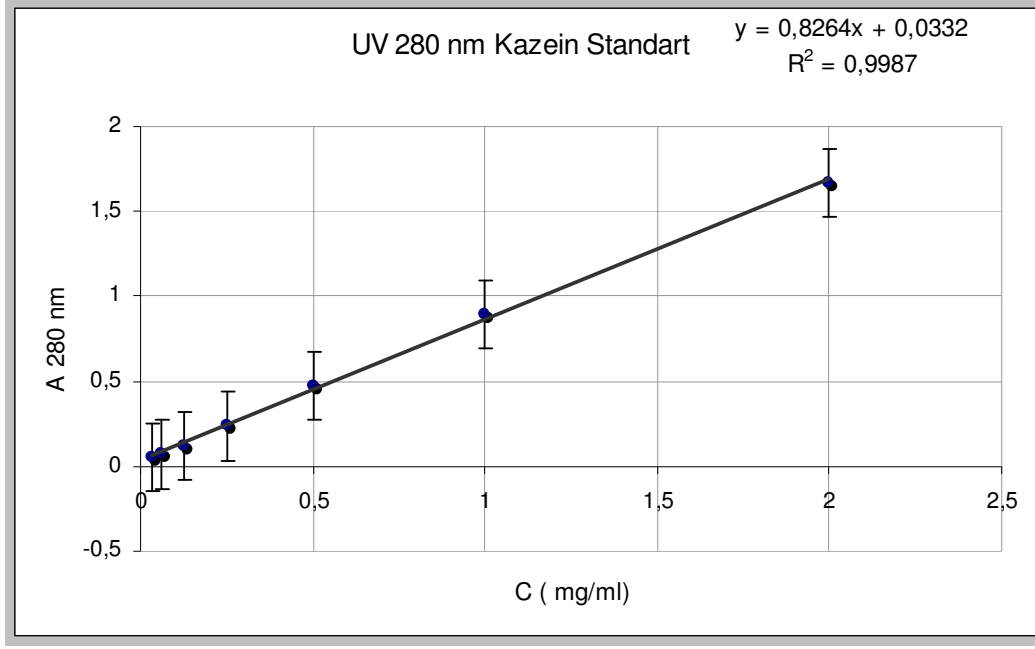
Bu çalışmada Kjeldahl yöntemine alternatif olarak Biüret-340 nm, 550 nm ve UV-280 nm, 220 nm gibi spektrofotometrik yöntemler seçilmiştir. Bu yöntemlerin seçilme nedeni uygulanabilirliğinin kolay olması ve farklı reaksiyonlar üzerinden gerçekleşmeleridir. UV-220 nm yönteminde absorbans peptid bağlarının elektronik geçişlerinden kaynaklanırken, Biüret yöntemlerinde ise bakır/peptid bağı

kompleksinin elektronik geçişi söz konusudur. Her iki yöntemde de peptidler ölçülmektedir. Buna karşılık, UV-280 nm yönteminde amino asitlerin elektronik geçişleri ölçülmektedir.

Spektrofotometrik yöntemler için öncelikle standart proteinler kullanılarak kalibrasyon grafikleri hazırlanmış ve bu kalibrasyon grafiklerinden de doğrusal çalışma grafikleri elde edilmiştir. Çünkü, farklı proteinler farklı absorpsiyon spektrumu gösterirler ve hiç bir protein standardı tüm proteinler için standart görevi yapamaz. En yaygın kullanılan protein standardı sığır serum albuminidir (BSA). Bu alışmada BSA ve sütün en önemli proteini olan kazein kullanılarak bütün yöntemler için ayrı kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Bu sayede yöntemlerin, proteinlerin amino asit bileşimi ile olan ilgisi de incelenebilmiştir. Standart proteinlerle yapılan çalışmalarda yöntemlerin çalışma aralıkları belirlenerek duyarlılıkları karşılaştırılmıştır. Kalibrasyon grafikleri ve doğrusal çalışma grafiklerine örnek olarak UV-280 nm kazein standardı aşağıda gösterilmiş (şekil 4.5. ve 4.6.), diğer grafikler ise Ek 7.1. de verilmiştir.



şekil 4.5. UV-280 nm yöntemiyle, kazein standardı için hazırlanan kalibrasyon grafiği.



Şekil 4.6. UV-280 nm yöntemiyle, Kazein standardı için hazırlanan doğrusal çalışma grafiği.

Yöntemleri karşılaştırmak için; RSA ve RSA[#] değerleri kullanılmıştır. Çizelge 4.6. da UV-280 ve 220 nm, Biüret-340 ve 550 nm yöntemleri için Kazein ve BSA standart proteinleri kullanılarak çalışma aralıkları (mg/mL), çalışma doğrularının denklemleri, doğruların regresyon katsayıları ve bu doğrulara göre hesaplanan bağıl (relative) spesifik absorbans (RSA) değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.6. UV-280 ve 220 nm Biüret-340 ve 550 nm yöntemleri için doğrusal çalışma grafiklerinin karşılaştırılması (n: deney sayısı).

Yöntem	Doğru denklemi $y(\text{absorbans}) = mx(\text{mg/mL}) + b$	n	Değişim aralığı (mg/mL)	RSA	RSA [#]
UV-280 nm	Kazein $y = 0.8264x + 0.0332$ $R^2 = 0.9987$	6	0.03 – 2	1.26	24.1
	BSA $y = 0.6555x + 0.0279$ $R^2 = 0.9996$	6	0.03 – 2		14.8
UV-220 nm	Kazein $y = 13.593x + 0.1153$ $R^2 = 0.9955$	6	0.001–0.06	1.05	384
	BSA $y = 12.803x + 0.0974$ $R^2 = 0.9882$	6	0.001–0.06		283
Biüret-340 nm	Kazein $y = 0.0892x - 0.0075$ $R^2 = 0.9921$	6	1–10	0.49	2.29
	BSA $y = 0.1689x - 0.0021$ $R^2 = 0.9953$	6	1-10		3.61
Biüret-550nm	Kazein $y = 0.0436x - 0.008$ $R^2 = 0.9967$	6	1-10	0.77	1.0
	BSA $y = 0.0496x - 0.0034$ $R^2 = 0.9952$	6	1-10		1.0

$RSA = [\text{kazeinin spesifik absorbansı}] / [\text{BSA' nın spesifik absorbansı}]$

$RSA^{\#} = [\text{X yönteminin spesifik absorbansı}] / [\text{biüret-550 nm yönteminin spesifik absorbansı}]$ (Kamizake vd., 2003)

Yöntemleri karşılaştırmak için; $RSA = [\text{kazeinin spesifik absorbansı}] / [\text{BSA' nın spesifik absorbansı}]$, $RSA^{\#} = [\text{X yönteminin spesifik absorbansı}] / [\text{biüret-550 nm yönteminin spesifik absorbansı}]$, değerleri kullanılmıştır.

Çizelge 4.6. da doğrusal çalışma grafiklerinin denklemleri verilmiştir. Grafiklere bakıldığında doğruların içinde regresyon katsayısı en küçük olanın 0.9882 ile UV-220 nm BSA olduğu görülmüştür (Ek 7.1: Şekil 7.3.). Elde edilen sonuçlara göre,

bu yöntemlerin içinde duyarlılığı en yüksek olan UV-220 nm yöntemidir (RSA[#] değerleri kazein için 384, BSA için 283). Biüret-550 nm ise en düşük duyarlılığa sahiptir (RSA[#] değerleri kazein için 1.0, BSA için 1.0). RSA değerlerine bakıldığında da en iyi sonucu yine UV-220 nm yönteminin verdiği görülmektedir (RSA 1.05). UV-220 nm yönteminde kazein ve BSA standart proteinlerinin her ikisi de kullanılabilir ve en düşük tayin sınırı bu yöntemle elde edilmiştir. Çünkü UV-220 nm yönteminde absorbans, peptid bağlarının elektronik geçişlerinden kaynaklanır ve amino asit bileşiminden bağımsızdır. Biüret-340 nm ise bu açıdan en kötü sonucu veren yöntemdir (RSA 0.49). Biüret yöntemlerinin her ikisinde de bakır/peptid bağı komplekslerinin elektronik geçişleri ölçülmesine rağmen, Biüret-340 nm (RSA 0.49) ve Biüret-550 nm (RSA 0.77) yöntemleri farklı RSA değerleri vermektedir. Bunun nedeni Biüret-340 nm'de yük transfer geçişlerinin, Biüret-550 nm'de ise d-d geçişlerinin ölçülmesidir (Huheey, Kecter ve Kecter, 1993). UV-280 nm yönteminde amino asitlerin elektronik geçişleri ölçüldüğü için RSA değeri 1.26 olarak bulunmuştur. Bu değer bu yöntemin kazein ve BSA standartları için oldukça farklı değerler verdiğini göstermektedir. Çünkü kazein ve BSA' nın amino asit içerikleri farklıdır. Dolayısıyla bu yöntem kullanılırken doğru standardın seçilmesi önemlidir.

Deneylerde kullanılan tüm yöntemler soya protein izolatu, yağı giderilmiş soya unu, özütlenmiş soya unu ve yağsız süt tozu gibi doğal örneklerle de uygulanmıştır.

Doğal örneklerle yapılan deneylerin sonuçları için ölçümlerin standart sapma değerleri hesaplanarak Çizelge 4.7. de verilmiştir.

Deneylerde yağı giderilmiş soya unu kullanılmasına rağmen içinde kalan bir miktar yağın girişime neden olduğu düşünülmektedir soya unu tekrar özütlenmiştir.

Standart sapma, dağılımdaki her bir değerlerin ortalamaya göre ne uzaklıkta olduğunu, diğer bir deyişle dağılımın ne yaygınlıkta olduğunu gösteren bir ölçüdür, yani tekrarlanabilirliğin ölçüsüdür. Standart sapma büyüdükçe dağılım yaygınlaşır.

S : standart sapma
 X_i : ölçüm değeri
 X_{ort} : N sayıda ölçümün ortalaması
N : ölçüm sayısı

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad (4.1)$$

Çizelge 4.7. Doğal örneklerin, UV-280 ve 220 nm, Biüret-340 ve 550 nm yöntemlerine göre ölçülmesi sonucunda elde edilen verilerin ortalama (X_{ort}) ve S (standart sapma) değerleri (ölçüm sayıları parantez içerisinde verilmiştir).

Örnek	Soya protein izolatı (SPI)		Süt tozu		Soya unu		Özütlenmiş soya unu (ESF)	
Yöntem	X_{ort}	S (10^4)	X_{ort}	S (10^4)	X_{ort}	S (10^4)	X_{ort}	S (10^4)
Biüret-550 nm	0.0361 (3)	7.07	0.0130 (5)	24.4	0.0241 (5)	8.66	0.0212 (3)	50.0
Biüret-340 nm	0.139 (3)	116	0.0540 (5)	8.66	0.121 (5)	55.0	0.104 (3)	114
UV-280 nm	0.0497 (3)	5.92	0.0493 (6)	26.0	0.0531 (6)	38.4	0.0512 (3)	36.0
UV-220 nm	0.377 (3)	77.4	0.221 (5)	43.6	0.314 (5)	21.1	0.302 (3)	40.6

Doğal örneklerle yapılan ölçümlerden doğrusal çalışma grafiklerinin kullanılması ile elde edilen protein miktarları (% w/w) çizelge 4.8'de verilmiştir.

Sonuçlar $\pm$ ortalamanın standart hatası (Standard error of mean, SEM) şeklinde verilmiştir. Ortalamanın standart hatası (SEM), standart sapma değerinin ölçüm sayısının kareköküne bölünmesi ile elde edilen değerdir (Sümbüloğlu, 2002). Ortalamanın standart hatası, ortalamanın dağılımındaki varyasyonu (değişimi) gösterir ve örnek sayısının artması ile küçülür.

Çizelge 4.8. UV-280 ve 220 nm, Biüret-340 ve 550 nm yöntemlerinin doğal örneklerle uygulanması sonucunda elde edilen protein miktarları (%w/w).

Yöntem	Standart	Soya protein izolatı (SPI) (w/w)	Süt tozu (MP) (w/w)	Soya unu (SF) (w/w)	Özütlenmiş soya unu (ESF) (w/w)
Biüret-550 nm	Kazein	-	38.4±0.72	-	-
	BSA	68.9±0.90	27.8±1.26	44.4±0.05	39.7±0.32
Biüret-340 nm	Kazein	-	55.2±0.12	-	-
	BSA	66.8±0.67	26.6±0.10	58.3±1.10	50.3±0.67
UV-280 nm	Kazein	-	48.7±1.28	-	-
	BSA	86.1±0.24	81.5±1.24	95.7±1.47	86.7±1.44
UV-220 nm	Kazein	-	26.0±0.12	-	-
	BSA	72.9±0.20	33.1±0.11	56.4±0.14	53.2±0.15
Kjeldahl	-	74.3±0.45	33.5±0.55	54.2±0.30	-
Gravim. yöntem	-	82.0±3.23	-	-	-

Bu çizelgede görüldüğü gibi spektrofotometrik yöntemler genel olarak, Kjeldahl yöntemine göre protein derişimi açısından yüksek sonuçlar vermiştir. UV-220 nm Kjeldahl yöntemine en yakın sonuçları veren ve en hassas olan yöntemdir. UV-280 nm yöntemi girişimlerden çok fazla etkilenmiştir. Biüret-340 nm ve 550 nm yöntemleri ile süt proteini tayini sırasında laktoz, bakırı indirgeme özelliği dolayısıyla ortamda pozitif girişim yapmış olabilir. Daha önce literatürde insan sütünde yapılan çalışmalarda %15'e varan girişimler gözlenmiştir (Verheul, Bosch ve Cornelissen, 1986). Yağı giderilmiş soya unu örneklerinin bir kez daha

özütlenmesinden sonra elde edilen protein değerlerinde bir düşme gözlenmiştir. Bu düşme lipitlerden kaynaklanabilecek olası girişimlerin azalması ile açıklanabilir.

Genelde yöntemlerin hepsinde gözlenen en büyük problem çözeltide meydana gelen bulanıklıktır. UV-220 nm yöntemi diğerlerine göre daha hassas olduğu için bulanıklık probleminden gelen etkiyi minimum düzeye indirmektedir. Protein tayini için gravimetrik yöntem de denenmiştir. İzoelektrik noktada çöktürme yöntemiyle izole edilen proteinin tamamen saf olmamasından dolayı gravimetrik yöntem diğerlerinden yüksek sonuç vermiştir.

4.3. Enzimatik Hidroliz

Çalışmalarımızda, protein tayininden sonra proteaz enzimleriyle protein hidrolizi yapılmıştır. Soya proteininin hidrolizi için enzimatik hidroliz yöntemi seçilmiştir ve hidroliz Novozyme firmasından temin edilen 3 farklı endüstriyel proteaz enzimi (Flavourzyme 1000 L, Alcalase 2.5 L Type DX, Neutrase 1.5 mg) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hidroliz sonrasında oluşan toplam amino asit değeri ve hidroliz derecesi (HD) belirlenmiştir. Daha önce de belirtildiği gibi, HD enzimatik hidrolizden sonra açığa çıkan amino asit miktarının, soya protein özütünün asit hidrolizi sonucunda bulunan toplam amino asit miktarına oranı hesaplanarak bulunmuştur. Amino asitleri tayin etmek için ninhidrin belirteci kullanılmıştır.

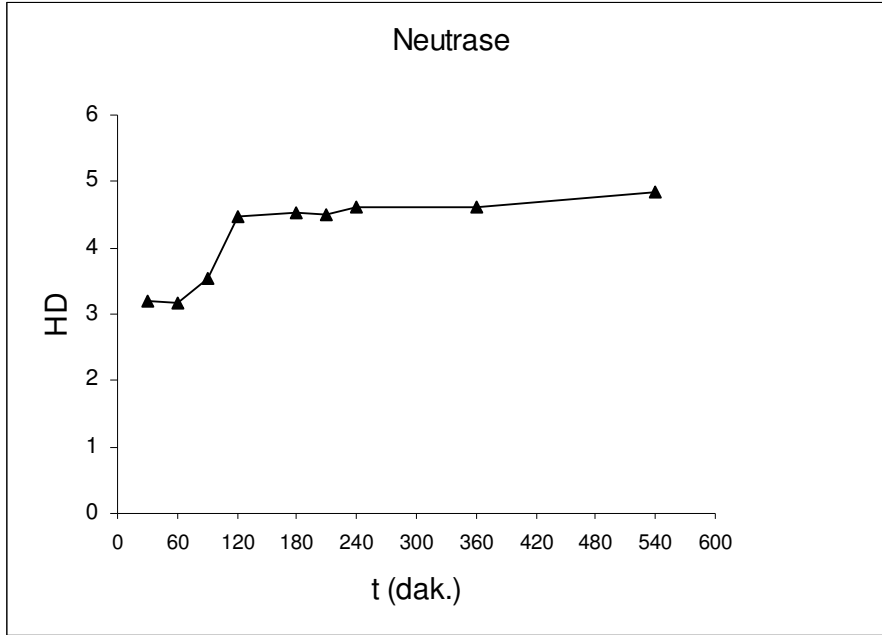
Hidroliz tepkimesi 9 saat süreyle izlenmiştir. Enzim kombinasyonu şeklinde uygulanan yöntem en yüksek HD' ni (%36.8) vermiştir. Daha sonra üçlü enzim karışımı ile %30.2 HD değerine ulaşılmıştır. En düşük hidroliz derecesi (%4.84) Neutrase enzimi ile elde edilirken, Flavourzyme (%15.7) ve Alcalase (%15.2) enzimleri ile gerçekleştirilen hidrolizlerde HD değerlerinin yaklaşık aynı olduğu gözlenmiştir .

Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, enzim karışımı ve enzim kombinasyonu için 9 saate kadar süren hidroliz boyunca elde edilen hidroliz dereceleri Çizelge 4.9. da

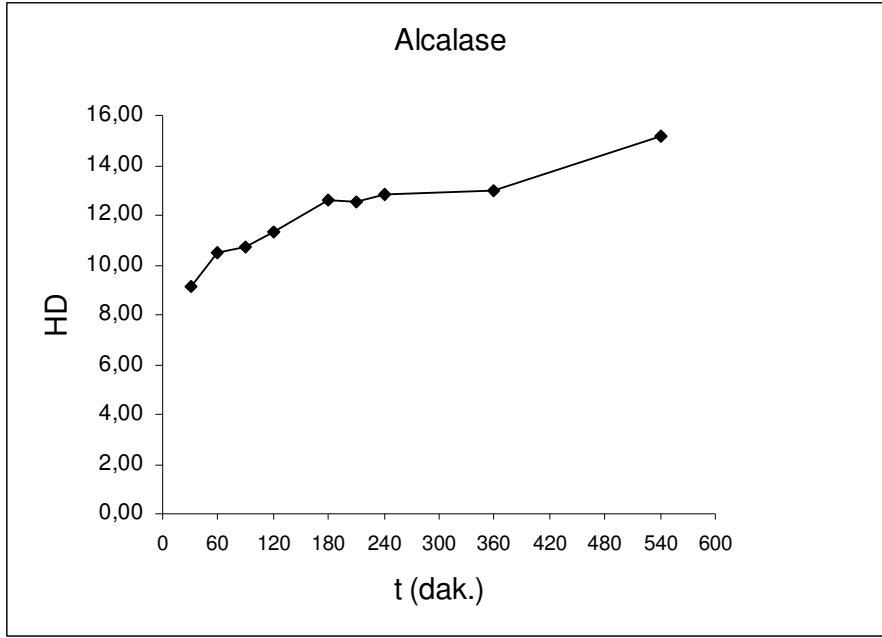
verilmiştir. Hidroliz süresi ile hidroliz derecesinin değişim grafikleri yöntemler için ayrı ayrı verilmiştir (Şekil 4.7.- 4.11.).

Çizelge 4.9. Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, enzim karışımı ve enzim kombinasyonu için farklı sürelerde elde edilen hidroliz dereceleri.

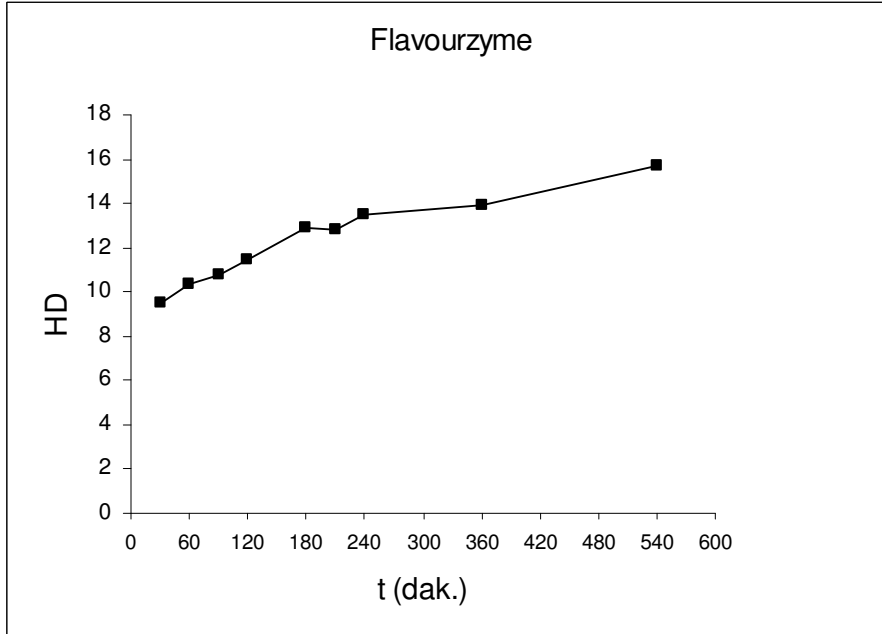
Enzim	Hidroliz derecesi (HD)								
	30 dak.	60 dak.	90 dak.	120 dak.	180 dak.	210 dak.	240 dak.	360 dak.	540 dak.
Alcalase	9.12	10.5	10.7	11.3	12.6	12.5	12.8	13.0	15.2
Flavourzyme	9.52	10.4	10.8	11.5	12.9	12.8	13.5	13.9	15.7
Neutrase	3.21	3.18	3.54	4.48	4.54	4.51	4.61	4.62	4.84
Enzim karışımı	4.58	12.9	14.5	15.9	18.2	20.0	20.9	21.5	30.2
Enzim kombinasyonu	9.46	13.0	13.7	14.2	14.5	18.6	22.0	24.1	36.8



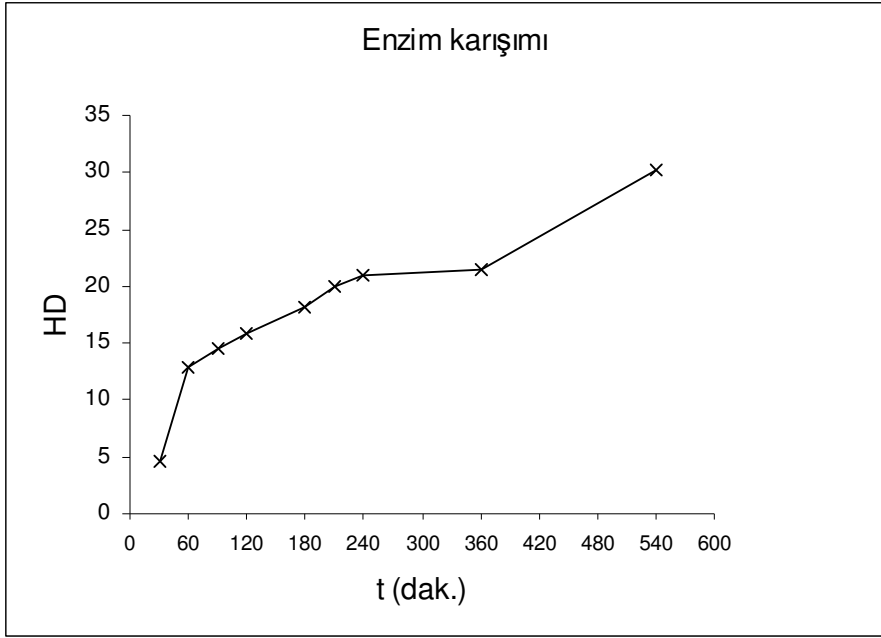
Şekil 4.7. Neutrase enzimi için hidroliz derecesinin zamanla değişimi.



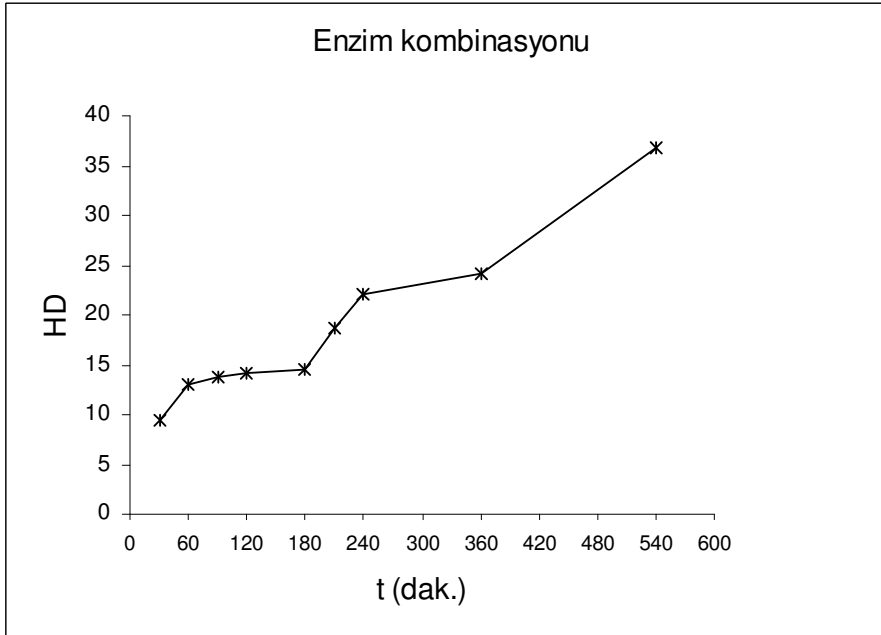
Şekil 4.8. Alcalase enzimi için hidroliz derecesinin zamanla değişimi.



Şekil 4.9. Flavourzyme enzimi için hidroliz derecesinin zamanla değişimi.

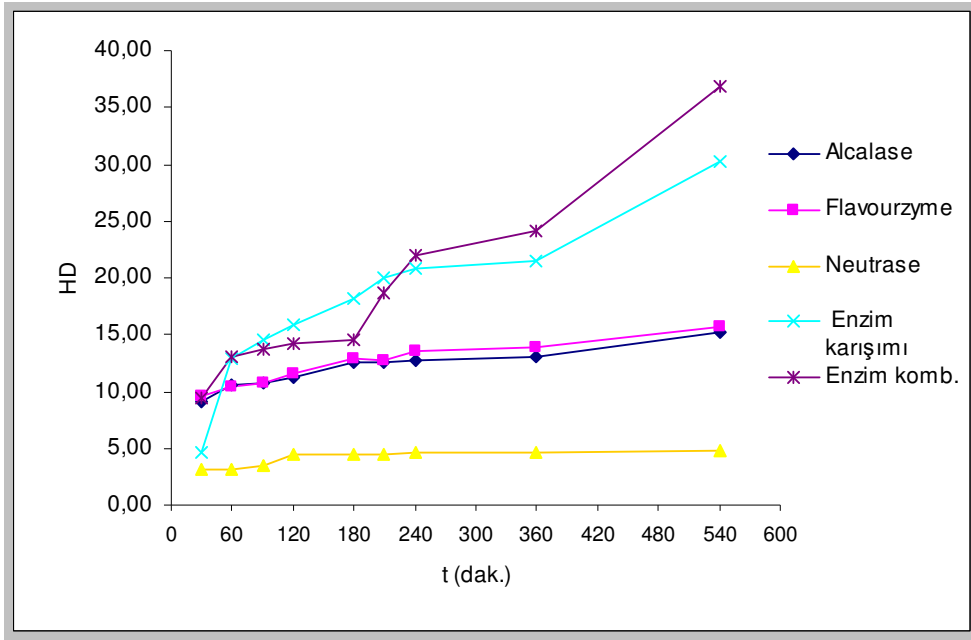


Şekil 4.10. Enzim karışımı için hidroliz derecesinin zamanla değişimi.



Şekil 4.11. Enzim kombinasyonu için hidroliz derecesinin zamanla değişimi.

Şekil 4.12. de ise enzimlerin hidroliz derecesinin zamanla değişimi grafikleri bir arada verilmektedir.

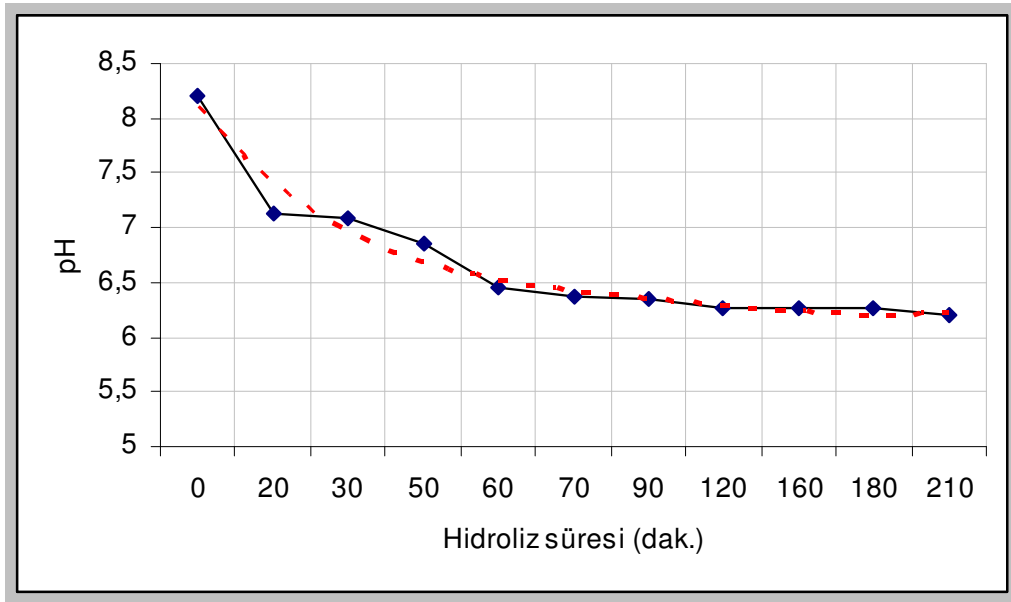


Şekil 4.12. Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, enzim karışımı ve enzim kombinasyonu için hidroliz derecesinin zamanla değişimi.

Bu çalışmada kullanılan Neutrase enzimi bakteriyel metalo proteazdır, Alcalase enzimi ise bakteriyel serin proteazdır. Neutrase enzimi kullanıldığında kırılan bağlar “Fenilalanin, Lösin, Valin” amino asitlerinin amino grupları tarafındadır. Alcalase enzimi ise geniş bir spesifikliğe sahiptir ve genellikle hidrofobik amino asitlerin karboksilik gruplarına yönelir.

Yukarıdaki açıklamaya göre, farklı enzimler, farklı enzim spesifikliğine sahip oldukları için 3 enzimin birlikte kullanıldığı enzim karışımı ve enzim kombinasyonu yöntemlerinde hidroliz derecesinin arttığı gözlenmiştir. Enzim kombinasyonu enzim karışımına göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Çünkü bu yöntemde pH:8.2 de ortama öncelikle Alcalase enzimi ilave edilmekte ve pH:7 den aşağı düştükten sonra Neutrase ve Flavourzyme enzimleri eklenmektedir. Alcalase enziminin önce ilave edilmesinin nedeni pH:6-10 aralığında yani yüksek pH’da iyi çalışan bir enzim olmasıdır. Neutrase ve Flavourzyme enzimleri ise, pH:5.5-7.5 aralığında en iyi çalıştıkları için daha sonra, yani pH:7 nin altına düştükten sonra ortama ilave edilirler.

Enzim kombinasyonu için pH'ın hidroliz süresince değişimi de gözlenmiştir ve pH ile hidroliz derecesi arasında bir ilişki olduğu görülmüştür (Şekil 4.13.). Nötr ve bazik pH'da, bütün karboksil grupları proton verip, sadece bazı amino grupları protonlandığı için hidroliz sonucu pH azalmaktadır. pH:5-6 arasında ise proton alma veya verme işlemi gerçekleşmez ve denge durumu söz konusudur. Ayrıca, asit ve baz gruplarının pK değerleri peptid zincirinin uzunluğu ve uç amino asitlerin yan zincirlerine bağlı olduğu için hidroliz boyunca sabit değildir. Bu yüzden pH değişimi ile hidroliz derecesini hesaplamak çok doğru bir yöntem olmamaktadır.



Şekil 4.13. Enzim kombinasyonu için pH'ın zamanla değişimi.

4.4. Ninhidrin Yöntemi İle Amino Asit Tayini

Amino asit tayini için, içeriğinde 17 çeşit amino asit bulunan bitkisel protein kaynaklı doğal amino asit karışımı (amino-ixir) kullanılmıştır. Bu karışım % 40 oranında amino asit içermektedir.

L-Lizin standart amino asidi kullanılarak hazırlanan doğrusal çalışma grafiğine göre yaptığımız değerlendirmede amino asit miktarı % 27.8 olarak bulunmuştur.

Literatürde de belirtildiği gibi ninhidrin belirteci kullanıldığında bulunması gerekenden daha düşük sonuçlar elde edilmektedir. Mutlak hata ve bağıl hata sırası ile (4.2) ve (4.3) eşitliklerine göre hesaplanarak, $E = -12.2$, ve $E_r = \% -31.0$ olarak bulunmuştur.

$$E = x_i - x_t \text{ (mutlak hata)} \quad (4.2)$$

$$E_r = [(x_i - x_t) / x_t] \times 100 \% \text{ (bağıl hata)} \quad (4.3)$$

x_i : ölçüm değeri

x_t : gerçek değer

Amino asit tayini için genelde kullanılan belirteçler, ninhidrin, o-ftaldehit (OPA) ve trinitrobenzensülfonik asittir (TNBS). Bu üç belirtecin kullanılması ile yapılan hidroliz derecesi tayinlerinde, OPA ve TNBS benzer sonuçlar verirken, ninhidrin oldukça düşük hidroliz derecesi değerleri vermiştir (Panasiuk vd.,1998). OPA yöntemi TNBS yöntemine göre daha hızlı ve kesin bir yöntem olarak belirtilmiştir (Turgeon vd.,1991). Ayrıca, OPA türevlerinin UV absorpsiyonunun, belirtecin eklenmesinden 20 dakika sonra daha kararlı olduğu da gösterilmiştir (Panasiuk vd., 1998).

Ninhidrin ve OPA (Church vd., 1983) yöntemleri, α -amino grupları için TNBS'den daha seçicidirler. Ninhidrin yönteminin avantajı α -amino gruplarıyla 570 nm'de spesifik bir reaksiyon vermesidir. Buna karşılık, ϵ -amino grupları ve amonyum iyonlarıyla olan reaksiyonu sonucunda 440 nm'de absorpsiyon yapan başka bir ürün oluşmaktadır (Yemm ve Cocking, 1955), (Schilling vd., 1963), (Samejima vd., 1971). Bu nedenle, ninhidrin kullanılmasının toplam amino asit tayininde negatif girişime yol açtığı gözlenmiştir.

5. SONUÇLAR

- Proteinler yaşayan sistemler içinde en fazla miktarlarda bulunan ve en fazla işleve sahip moleküllerdir. Hayatla ilgili işlevler bu molekül sınıfına bağımlıdır. Birçok işlevi olan proteinler besinlerin de önemli bileşenleridir.
- Bu çalışmada, protein için iyi bir kaynak olan süt proteini ve son zamanlarda yüksek protein miktarı ve insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileriyle ön plana çıkan soya proteini ele alınarak protein özütlenmesi, tayin yöntemleri, protein hidrolizi ve bunun sonucunda açığa çıkan amino asitlerin tayini incelenmiştir.
- Yağı giderilmiş soya unundan protein eldesi için özütleme yöntemi süt tozu ve soya unu üzerinde denenmiş ve optimum koşullar pH:11, 60 °C ve 1 saat olarak belirlenmiştir.
- Toplam protein analiz yöntemleri içerisinde incelenerek seçilen beş yöntem süt proteini ve soya proteini tayini için denenmiş ve karşılaştırılmıştır. Spektrofotometrik yöntemler genel olarak, Kjeldahl yöntemine göre protein derişimi açısından yüksek sonuçlar vermiştir. Deney sonuçlarına göre UV-220 nm yöntemi Kjeldahl yöntemine en yakın sonuçları veren ve en hassas olan yöntemdir.
- Elde edilen protein çözeltisinde enzim hidrolizi gerçekleştirilmiştir ve enzim kombinasyonu yöntemiyle en iyi verim elde edilmiştir.
- Enzimlerle hidrolizlenmiş protein çözeltisinde amino asit tayini için ninhidrin yöntemi denenmiştir. Ninhidrin ve OPA yöntemleri, α -amino grupları için TNBS'den daha seçicidirler. Ninhidrin kullanılmasının toplam amino asit tayininde negatif girişime yol açtığı gözlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

- Adler-Nissen, J., 1993, Proteases. In Enzymes in food processing; Nagodawithana, T., Reed, G., Eds.; Academic Press: San Diego, 159-203.
- Adler-Nissen, J., 1986, Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins; Elsevier Applied Science Publishers: London.
- Aksay, S., Özer, E.A., 2008, Gıda proteinlerinden üretilen biyoaktif peptidlerin sağlık açısından olumlu etkileri, Uluslararası Gıda, Beslenme ve Kanser Sempozyumu, Poster Bildirisi, 36.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D.; Woessner, J.F., 1998, Handbook of proteolytic enzymes; Academic Press: San Diego.
- Baysal, A., 2004, Beslenme, Ankara, Hatiboğlu Yayınları, 10.baskı, Bölüm II Besinler, Süt , 268-275.
- Bell,D.J.,Hoare, M., Dunnill, P.,1983, The formation of protein precipitates and their centrifugal recovery, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 26, 1-72.
- Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 72, 248-254.
- Branden, C., Tooze, J., 1999, Introduction to Protein Structure, Garland Publishing 2nd ed.: New York, NY.
- Brosnan, J., 2003, Interorgan amino acid transport and its regulation, J Nutr., 133, 6 Suppl 1, 2068-2072.

- Caessens, P.W.J.R., Daamen, W.F., Gruppen, H., Visser, S., Voragen, A.G.J., 1999, β -Lactoglobulin hydrolysis. II. Peptide identification, SH/SS exchange, and functional properties of hydrolysate fractions formed by the action of plasmin. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2980-2990.
- Camacho, F., Gonzalez Tello, P., Paez Duenas, M.P., Guadiz, E.M., Guadix, A., 2001, Correlation of base consumption with the degree of hydrolysis in enzymic protein hydrolysis. *J. Dairy Res.*, 68, 251-265.
- Chobert, J.M., Bertrand-Harb, C., Nicolas, M.G., 1988a, Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin, *J. Agric. Food Chem.*, 36, 883-892.
- Chobert, J.M., Sitohy, M.Z., Whitaker, J.R., 1988b, Solubility and emulsifying properties of caseins modified enzymatically by *Staphylococcus aureus* V8 protease, *J. Agric. Food Chem.*, 36, 220-224.
- Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H., Catignani, G.I., 1983, Spectrophotometric assay using O-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins, *Journal of Dairy Science*, 66, 1219-1227.
- Diermayr, P., Dehne, L., 1990, Kontrollierte enzymatische Proteinhydrolyse im Bereich niedriger pH-Werte 1.Mitteilung: Versuche mit Rinderserumalbumin. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 516-520.
- FAO/WHO/UNU, 1985, Energy and Protein Requirements, Report of Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. World Health Organization Technical Rep., Ser. 724, WHO, Geneva
- Fox, P.F., McWeeney, P.L.H., *Advanced Dairy Chemistry*, 2003, New York, Springer Verlag Publish, Volume 1. In Chapter 1: Milk Proteins: General and Historical Aspects. Third Edition. Part A.

Frau, M., Massanet, J., Rosello, C., Simal, S., Canellas, J., 1997, Evaluation of free amino acid content during ripening of Mahon cheese, Food Chemistry, 60 (4): 651-657.

Friedman, M., 1996, Nutritional value of food proteins from different food sources, J.Agric. Food Chem., 44, 6-29.

Frost, D.V., Heinsen, J., 1945, Determination of the degree of Hydrolysis of partial acid hydrolysates of casein and fibrin, The Journal of Biological Chem., 161, 517-521.

Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M., 1949, determination of serum proteins by means of the biuret reaction, J. Biological Chemistry, 177, 751-766.

Gündüz, T., 1990, Instrümental Analiz, ikinci baskı, Bilge Yayıncılık, Ankara.

Helrich, K., 1990, official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 15th edn., Arlington : Association of official Analytical Chemists. Inc., 807.

<http://www.cem.msu.edu/.../Images3/ninhydrx.gif>

<http://www.genome.gov/Pages/Hyperion/DIR/VIP/Glossary/Illustration/protein.html>

<http://avogadro.bitacoras.com/kjeldahl.gif>

Kamizake, N.K.K., Gonçalves, M.M., Zaia, C.T.B.V., Zaia, D.A.M., 2003, Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods, J. Food Composition and Analysis, 16, 507-516.

Kendrew, J., Bodo, G., Dintzis, H., Parrish, R., Wyckoff, H., Phillips, D., 1958, A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis, Nature 181 (4610), 662-666.

Lieske, B., Konrad, G., 1996, Physico-chemical and functional properties of whey protein as affected by limited papain proteolysis and selective ultrafiltration. *Int. Dairy J.* ,6, 13-31.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951, protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biological Chemistry*, 193, 265-275.

Miller, GD., Jarvis, KJ., McBean, LD., 2000, Handbook of Dairy Foods and Nutrition, In: Jensen RG, Kroger M, Editors, The Importance of Milk and Milk Products in the Diet, CRC Press, New York, 4-24.

Nazlıcan, A.N., Ağustos 1998, Çukurova'nın Üreyen Altını Soya İlgisizlik Kurbanı, *Cine-Tarım Dergisi*, sayı 10, Adana.

Nielsen, P.M., 1997, of protein hydrolysates, In *Food proteins and their applications*, Damadoran, S., Paraf, A., Eds. ; Marcel Dekker : New York, 443-472.

Öğünç, A.V., Yalçın, A.S., 2008, Whey proteinlerinin in vitro antioksidan etkileri, *Uluslararası Gıda, Beslenme ve Kanser Sempozyumu Poster Bildirisi*, 27.

Öztürk, G., Aytaç, S.,2008, Soyanın sağlık üzerine faydaları, *Uluslararası Gıda, Beslenme ve Kanser Sempozyumu Poster Bildirisi*, 65.

Panasiuk, R., Amarowicz, R., Kostyra, H., Sijtsma, L.,1998, Determination of alpha-amino nitrogen in pea protein hydrolysates: a comparison of three analytical methods. *Food Chem.* ,62, 363-367.

Panyam, D., Kilara, A., 1996, Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification, *Trends Food Sci. Technol.*, 7, 120-125.

- Perea, A., Ugalde, U., Rodriguez, I., Serra, J.L., 1993, Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: applications in industrial whey bioconversion processes, *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 418-423.
- Samejima, K., Dairman, W., Underfriend, S., 1971, Condensation of ninhydrin with aldehydes and primary amines to yield highly fluorescent ternary products, *Analytical Biochemistry*, 42, 222-247.
- Schilling, E.D., Burchill, P.I., Clayton, R.A., 1963, Anomalous reactions of ninhydrin, *Analytical Biochemistry*, 5, 1-6.
- Slattery, H., Fitzgerald, R.J., 1998, Functional properties and bitterness of sodium caseinate hydrolysates prepared with a *Bacillus* proteinase. *J. Food Sci.*, 63, 418-422.
- Snyder, J. C., Desborough, S.L., 1978, Rapid estimation of potato tuber total protein content with coomassie brilliant G-250, *Theoretical and Applied genetics*, 52, 135-139.
- Stoscheck, C.M., 1990, general methods for handling proteins and enzymes : Quantitation of protein. In M.P. Deutscher (Ed.), *Methods in enzymology : Guide to protein purification* New York: Academic Press, 40-42.
- Sumner, J.B., 1926, The Isolation and Crystallization of the Enzyme Urease Preliminary Paper, *J Biol Chem* 69, 435-41.
- Sümbüloğlu, K., Sümbüloğlu V., 2002, *Biyoistatistik*. 10. Baskı, Hatiboğlu Yayınları No: 10, Ankara.
- Svenning, C., Molland, T., Langsrud, T., Vegarud, G.E., 1993, A characterization study of peptides derived from casein proteolysis. In *Protein & fat globule modifications by heat treatment, homogenisation & other technological means for high quality dairy products: Proceedings of the IDF seminar*

held in Munich; IDF, Ed.; International Dairy Federation: Sonthofen, Germany, 96-105.

Turgeon, S.L., Bard, C., Gauthier, S.F., 1991, Comparaison de trois methodes pour. la mesure de degre d'hydrolyse de proteines laitieres modifiees enzymatiquement. Can. Inst. Sci. Technol. J., 24, 14-18.

Tripaldi, C., Martillotti, F., Terramoccia, S., 1998, Content of taurine and other free amino acids in milk of goats bred in Italy, Small Ruminant Research, 30, 127-136.

Verheul, F. E. A. M., Bosch, M. J. V. D., Cornelissen, P. J. H. C., 1986, Simplified and rapid methods for the determination of protein, fat and lactose in human-milk and the energy-intake by the breast-fed infant. Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, 24, 341–346.

Viroben, G., Bertrand, D., 1985, Proteins Vegetables, B. Techniques et Documentation Paris.

Voet, D., Voet, J.G., 2004, Biochemistry Vol 1 3rd ed. Wiley: Hoboken, NJ.

Wei, Y.J., li, K., Tong, S.Y., 1997, A linear regression method for the study of the coomassie brilliany blue protein assay, Talanta, 44, 923-930.

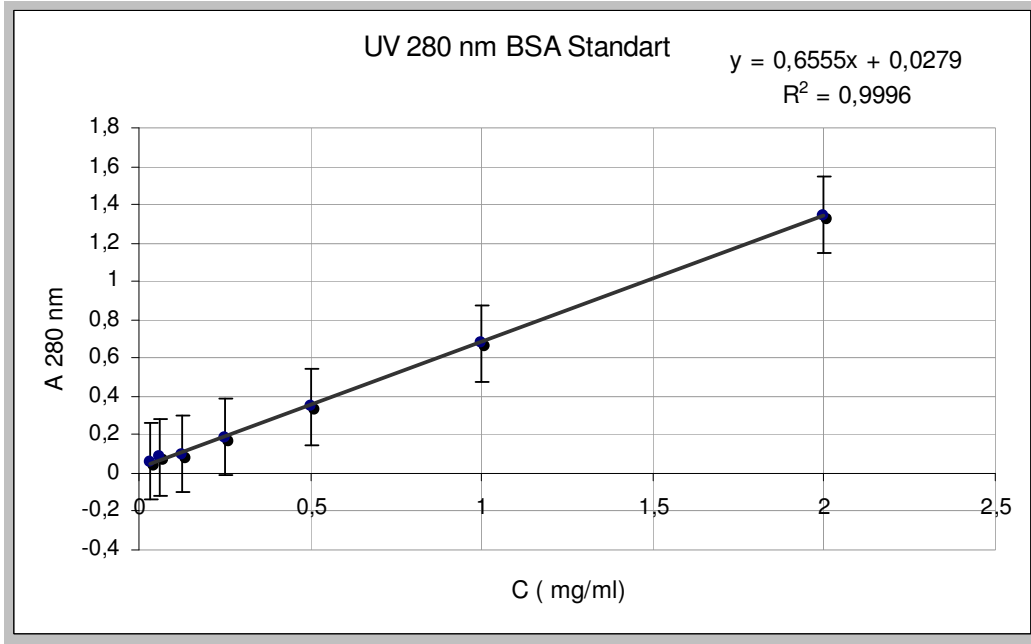
Whitaker, J.R., 1994, Principles of enzymology for the food sciences, 2 ed.; Marcel Dekker: New York, Vol. 61.

Yemm, E.W., Cocking, E.C., 1955, The determination of amino acids with ninhydrin, Analyst, 80, 209-213.

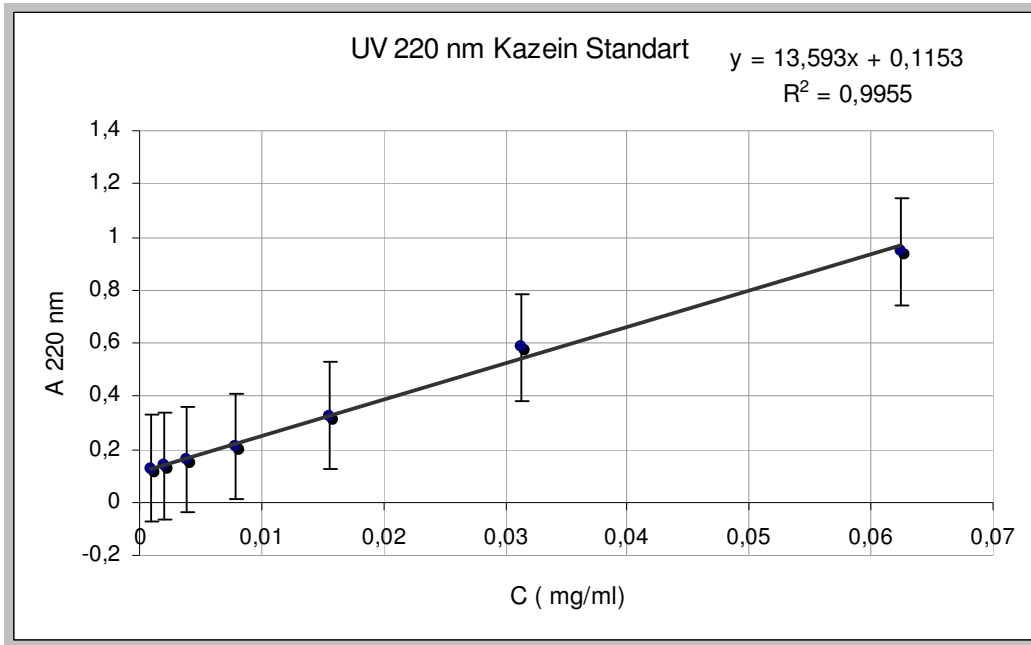
Yerlikaya, O., Karagözlü, C., 2008, Peynir altı suyu proteinleri ve antikanserojenik aktiviteleri, Uluslararası Gıda, Beslenme ve Kanser Sempozyumu Poster Bildirisi, 110.

7. EKLER

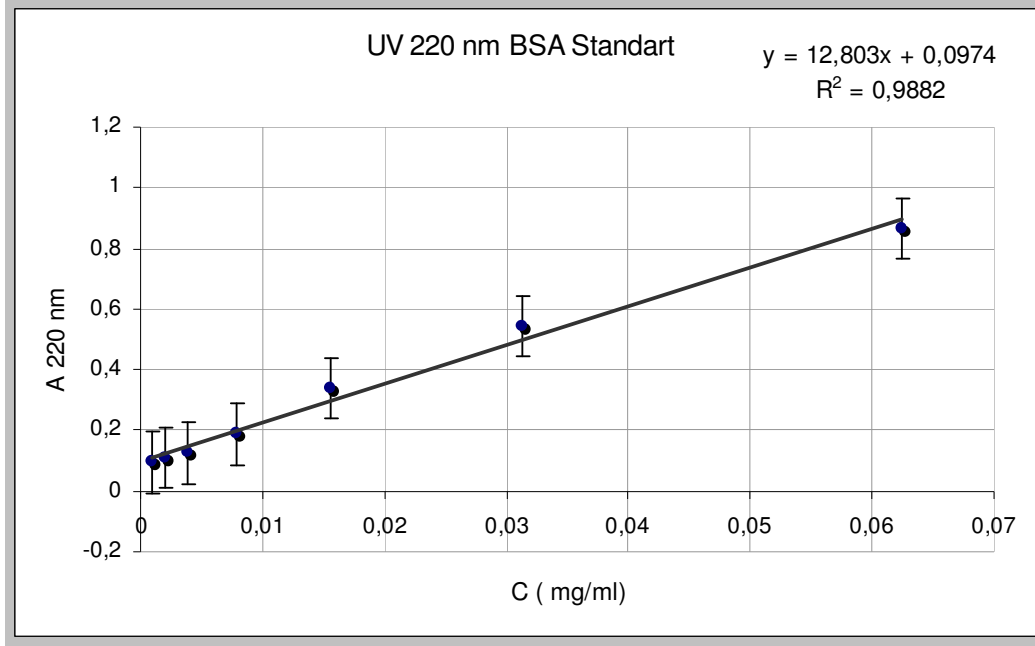
7.1. Spektrofotometrik Yöntemler İçin Kalibrasyon ve Doğrusal Çalışma Grafikleri.



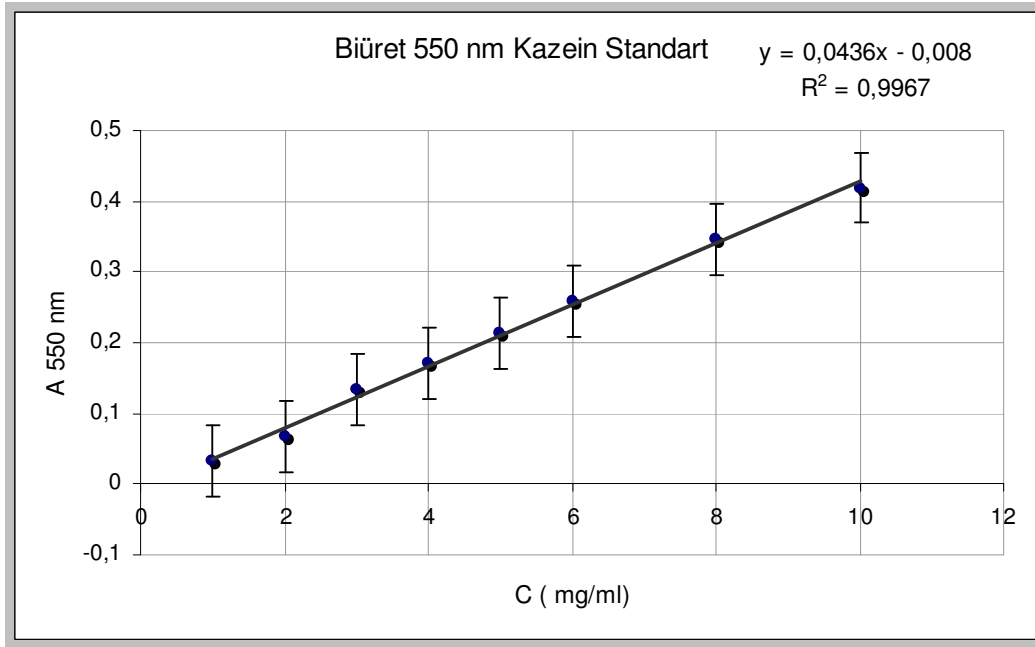
Şekil 7.1. UV-280 nm yöntemiyle, BSA standardı için hazırlanan doğrusal çalışma grafiği.



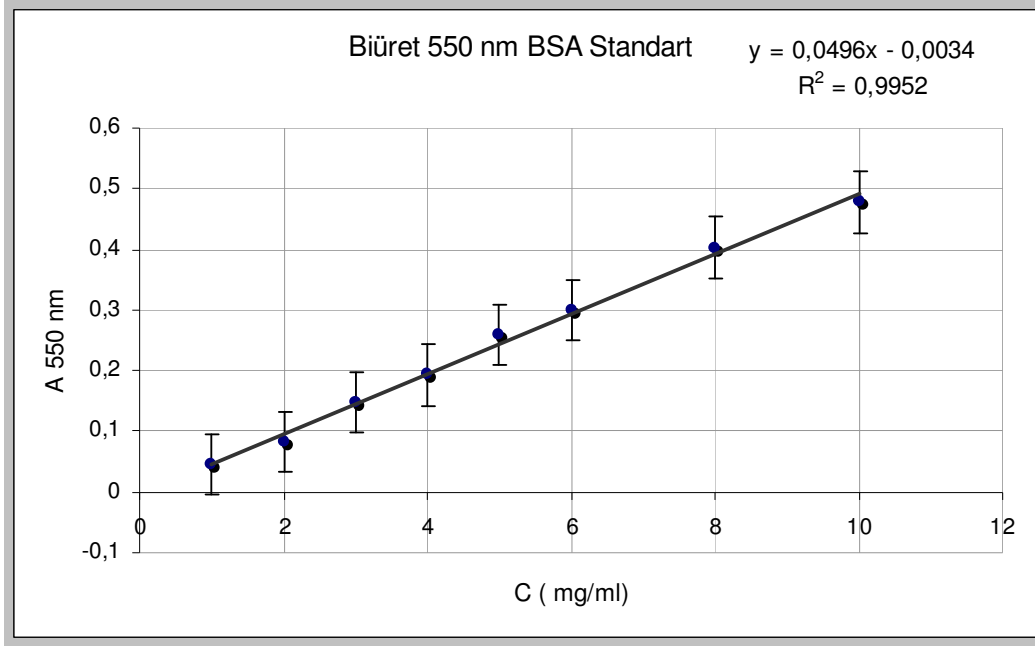
Şekil 7.2. UV-220 nm yöntemiyle, Kazein standardı için hazırlanan doğrusal çalışma grafiği.



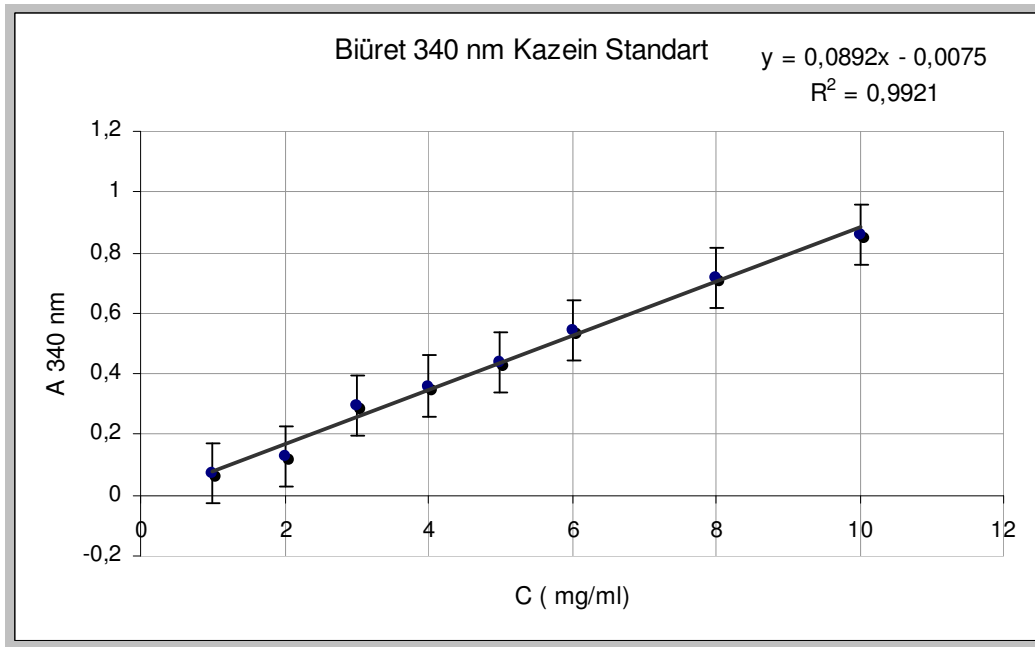
Şekil 7.3. UV-220 nm yöntemiyle, BSA standardı için hazırlanan doğrusal çalışma grafiği.



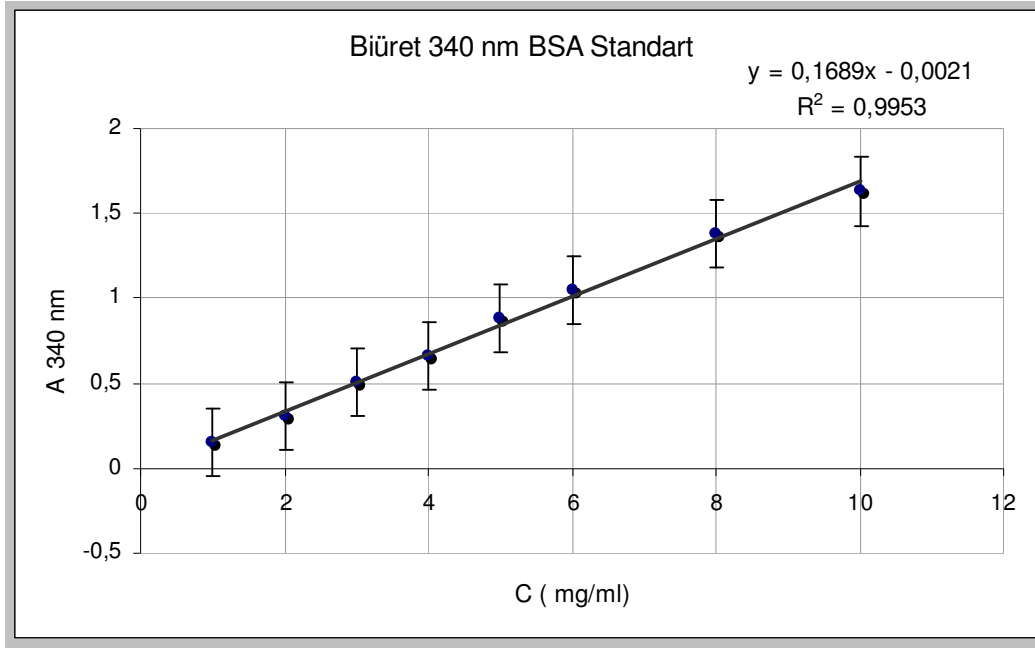
Şekil 7.4. Büret-550 nm yöntemiyle, kazein standardı için hazırlanan doğrusal çalışma grafiği.



Şekil 7.5. Biüret-550 nm yöntemiyle, BSA standardı için hazırlanan doğrusal çalışma grafiği.



Şekil 7.6. Biüret-340 nm yöntemiyle, Kazein standardı için hazırlanan doğrusal çalışma grafiği.



Şekil 7.7. Büret-340 nm yöntemiyle, BSA standardı için hazırlanan doğrusal çalışma grafiği.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özlem GÜMRAH

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 10.05.1981

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu :

Lise : 1995-1998 Ankara Lisesi

Lisans : 1999-2005 Hacettepe Üniversitesi Fen Fak. Kimya Bölümü

Y.Lisans : 2005-2008 Hacettepe Üniversitesi Fen Fak. Kimya Bölümü
Analitik Kimya A.B.D.