

**SÜNE (*Eurygaster* spp.) ZARARI GÖRMÜŞ BUĞDAYDAN
GLUTEN HİDROLİZATLARININ ELDESİ,
KARAKTERİZASYONU, FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

**PREPARATION, CHARACTERIZATION AND
DETERMINATION OF FUNCTIONAL PROPERTIES OF
GLUTEN HYDROLYZATES FROM BUG (*Eurygaster* spp.)
DAMAGED WHEAT**

BURCU OLANCA

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

GIDA Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2010

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI 'nda DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....
(Prof. Dr. Esra İBANOĞLU)

Üye (Danışman) :.....
(Doç. Dr. Dilek Sivri ÖZAY)

Üye :.....
(Prof. Dr. Hamit KÖKSEL)

Üye :.....
(Prof. Dr. Vural GÖKMEN)

Üye :.....
(Doç. Dr. Ümran UYGUN)

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Adil DENİZLİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Gücüme güç, umuduma umut kıatan, beni karşılıksız seven

canım anneme,

SÜNE (*Eurygaster* spp.) ZARARI GÖRMÜŞ BUĞDAYDAN GLUTEN HİDROLİZATLARININ ELDESİ, KARAKTERİZASYONU, FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

BURCU OLANCA

GIDA Mühendisliği

ÖZ

Bu çalışmada sağlam buğday unundan (cv Bezostaya) elde yıkama yöntemi ile hazırlanan gluten ve yüksek oranda süne zararına maruz kalmış buğdaydan (cv Ege) kısmen saflaştırılmış proteaz(lar), gluten hidrolizatlarının eldesinde kullanılmıştır. Enzim ekstraktının saflaştırılmasında anyon değişim ve jel filtrasyon gibi kromatografik yöntemler kullanılmış ve enzim ekstraktı yaklaşık 300 kat saflaştırılmıştır. Gluten hidrolizatlarının (%3 ve %5) hidroliz dereceleri (HD) pH-stat ile tespit edilmiştir. pH-stat' ın yeni bir yöntem olarak süne proteaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılabileceği gösterilmiştir. Gluten ve gluten hidrolizatlarının bazı fonksiyonel özellikleri (çözünürlük, emülsiyon kapasitesi ve emülsiyon stabilitesi, köpük kapasitesi ve stabilitesi) %0.2 (w/v) protein konsantrasyonunda ve pH 2-10 aralığında belirlenmiştir. Glutenin kısmen saflaştırılmış süne proteaz enzimiyle hidrolizinden sonra çözünürlüğü, pH 7, 8 ve 10' da %89.1, %89.6 ve %95.0 değerlerine kadar yükselmiştir. Gluten hidrolizatlarının emülsiyon stabilitesi nötral ve alkali pH' larda, emülsiyon kapasitesi ise pH 10 dışındaki tüm pH' larda artmıştır. Hidrolizatların köpük kapasitesi pH 6, 7 ve 8' de ve köpük stabilitesi pH 6 ve 7' de glutene göre daha yüksek çıkmıştır. Gluten hidrolizatlarının antioksidan aktiviteleri, glutene göre daha yüksek bulunmuştur. Glutenin enzimatik modifikasyonu sonucunda SDS-PAGE' de yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin (HMW) bant yoğunluklarında azalma ve özellikle <20 kDa' da protein bant yoğunluklarında ise artma gözlenmektedir. Gluten ve hidrolizatlarının iki boyutlu elektroforez (2-DE) haritaları pH 3-10 ve pH 5-8 aralılarında incelenmiş ve polipeptid bileşiminde bazı farklılıklar gösterilmiştir. HD %5 olan gluten hidrolizatında yeni açığa çıkan protein spotları MALDI-MS/MS ile tanımlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Süne, *Eurygaster* spp., gluten, proteaz, fonksiyonel özellikler, 2-D elektroforez, SE-HPLC, antioksidatif aktivite,

Danışman: Doç Dr. Dilek Sivri ÖZAY, Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

PREPARATION, CHARACTERIZATION AND DETERMINATION OF FUNCTIONAL PROPERTIES OF GLUTEN HYDROLYZATES FROM BUG (*Eurygaster* spp.) DAMAGED WHEAT

BURCU OLANCA

GIDA Mühendisliği

ABSTRACT

In this study gluten prepared by hand washing from sound wheat flour (cv. Bezostaya) and partially purified protease(s) from heavily bug damaged wheat (cv Ege) were used in production of gluten hydrolysates. Crude enzyme extract was purified about 300 times by anion exchange and gel filtration chromatographic methods. Degree of hydrolysis (DH) of the gluten hydrolysates (3% and 5%) determined by pH-stat. It has been shown that pH-stat can be used as a new method to determine the activity of wheat bug protease. Functional properties (solubility, emulsifying capacity and emulsion stability, foaming capacity and foam stability) of gluten and gluten hydrolysates were determined at 0.2% (w/v) protein concentration and pH values of 2-10. Gluten solubility after hydrolysis with partially purified wheat bug protease increased up to 89.1%, 89.6% and 95.0% at pH 7, 8 and 10, respectively. Emulsion stability of gluten hydrolysates at neutral and alkaline pH, and their emulsifying capacity at all pHs except pH 10 increased. Foaming capacity and foam stability values of gluten hydrolysates were significantly higher than those of gluten at pH 6, 7, 8 and at pH 6, 7 respectively. Enzymatic modification of gluten resulted in hydrolysates with higher antioxidant activity compared to gluten. Modification of gluten with wheat bug protease(s) caused decrease in intensities of high molecular weight (HMW) protein bands of SDS-PAGE, and increase in intensities of protein bands below 20 kDa. Two dimensional electrophoresis (2-DE) maps of gluten and its hydrolysates were analysed at pH 3-10 and pH 5-8 ranges and some differences in composition of polypeptides were determined. Protein spots appeared newly in gluten hydrolysate with degree of hydrolysis of 5% were identified by MALDI-MS/MS.

Keywords: wheat bug, *Eurygaster* spp., gluten, protease, functional properties, 2-D electrophoresis, SE-HPLC, antioxidant activity

Advisor: Doç Dr. Dilek Sivri ÖZAY, Hacettepe University, Department of Food Engineering

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım hocam Doç. Dr. Dilek SİVRİ ÖZAY' a teşekkürlerimi sunarım.

Yapıcı eleştiri ve katkılarından dolayı değerli Jüri Üyeleri' ne,

Süne proteaz enzimin saflaştırılması çalışmalarını Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi, Aşı ve Serum Üretim Laboratuvarında yapılmasına imkan sağlayan ve engin bilgilerini esirgemeyen Sayın Mustafa Hacıömeroğlu' na,

Dinamik lazer saçılımı deneylerinde laboratuvar imkanı sağlayan Sayın Prof. Dr. Süleyman Ali Tuncel' e,

Emülsiyon ve köpük çalışmalarında laboratuvar imkanı sağlayan Sayın Prof. Dr. Süeda Çelik' e,

Buğday örneklerinin öğütülmesinde gerekli ekipmanları sağlayan Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, Teknoloji Bölümü çalışanlarına,

Bu uzun süreçte her zaman manevi desteklerini hissettiğim dostlarım Ayşe Uzgören Baran, Arzu Başman, Devlet Demirel, Sibel Menteşe ve Ayşegül Arıkan'a,

Tez çalışmama maddi destek sağlayan H.Ü. Bilimsel Araştırmalar Birimine (proje no: 04.01.602.009 ve 09T12604002) ve yurt içi doktora bursu sağlayan TÜBİTAK'a,

Her zaman yanımda hissettiğim canım aileme,

ve burada adlarını tek tek sıralayamadığım, bu çalışmaya katkısı olan herkese,

En içten Teşekkürlerimi Sunarım

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
EKLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Buğday Gluteninin Gıdalarda Kullanımı.....	6
2.2. Proteinlerin Fonksiyonel Özellikleri	7
2.3. Proteinlerin Enzimatik Modifikasyonu	8
2.4. Enzimatik Protein Hidrolizatlarının Fonksiyonel Özellikleri	10
2.4.1. Protein hidrolizatlarının çözünürlük özellikleri	11
2.4.1.1. Çözünürlük üzerine hidroliz derecesinin etkisi	11
2.4.1.2. Çözünürlük üzerine pH' nın etkisi	12
2.4.1.3. Çözünürlük üzerine kullanılan substrat ve enzimin etkisi.....	12
2.4.2. Protein hidrolizatlarının emülsiyon özellikleri	13
2.4.2.1. Emülsiyon özellikleri üzerine hidroliz derecesinin etkisi	13
2.4.2.2. Emülsiyon özellikleri üzerine pH' nın etkisi	14
2.4.2.3. Emülsiyon özellikleri üzerine enzim etkisi	14
2.4.3. Protein hidrolizatlarının köpük özellikleri.....	15
2.4.3.1. Köpük özellikleri üzerine hidroliz derecesinin etkisi	15
2.4.3.2. Köpük özellikleri üzerine pH' nın etkisi.....	17

2.4.3.3. Köpük özellikleri üzerine enzim etkisi	17
2.5. Buğday Gluten Proteinlerinin Modifikasyonu	18
2.6. Gluten Proteinlerinin Biyoaktif ve Antioksidatif Özellikleri	25
2.7. Süne (<i>Eurygaster</i> spp.) Zararı	27
2.7.1. Süne proteazının bazı biyokimyasal özellikleri ve aktivite tayini	29
2.7.2. Süne proteazının gluten proteinleri üzerine etkisi	31
2.8. Proteinlerin Karakterizasyonu (Proteomiks).....	32
2.9. Proteinlerin Dinamik Işık Saçılımı (DLS) ile Boyut Dağılımının İncelenmesi	33
3. MATERYAL VE METOT	35
3.1. Materyal.....	35
3.2. Metot.....	35
3.2.1. Fiziksel analizler	35
3.2.1.1. Emgili tane sayımı	35
3.2.1.2. Hektolitre ağırlığı tayini	36
3.2.1.3. Bin tane ağırlığı tayini	36
3.2.1.4. Camsılık tayini	36
3.2.1.5. Nem tayini.....	36
3.2.1.6. Protein miktarı tayini	36
3.2.1.7. Sertlik tayini (soyma sayısı)	36
3.2.2. Öğütme	37
3.2.3. Gluten proteinlerinin hazırlanması	37
3.2.4. Zeleny sedimentasyon ve modifiye sedimentasyon değerlerinin tayini.....	37
3.2.5. Süne (<i>Eurygaster</i> spp.) proteolitik enziminin (SEE) izolasyonu	38
3.2.6. Süne (<i>Eurygaster</i> spp.) proteolitik enziminin saflaştırılması	38
3.2.6.1. Anyon değişim kromatografisi.....	38
3.2.6.2. Katyon değişim kromatografisi.....	39
3.2.6.3. Jel filtrasyon kromatografisi	39

3.2.7.1-propanolde (%50) çözünmeyen glutenin metodu ile süne enzim aktivitesi tayini	39
3.2.8. Gluten proteinlerinin pH-stat ile enzimatik modifikasyonu.....	40
3.2.9. Gluten hidrolizatının (HD %3.5) moleküler boyut dağılımının belirlenmesi çalışmaları	42
3.2.9.1. Ultrafiltrasyon tekniği	42
3.2.9.2. Jel filtrasyon kromatografisi	43
3.2.10. Gluten ve gluten hidrolizatlarının çözünürlük özelliği tayini.....	43
3.2.11. Gluten ve gluten hidrolizatlarının emülsiyon özellikleri tayini	44
3.2.11.1. Emülsiyon kapasitesi (EK, %) tayini.....	45
3.2.11.2. Emülsiyon stabilitesi (ES, %) tayini.....	45
3.2.12. Gluten ve gluten hidrolizatlarının köpük özellikleri tayini.....	46
3.2.13. Gluten ve gluten hidrolizatlarının antioksidan aktivite tayini.....	46
3.2.14. Gluten ve gluten hidrolizatlarının protein profilinin SE-HPLC ile analizi	47
3.2.14.1. Toplam protein (TP) miktarının SE-HPLC ile belirlenmesi	47
3.2.14.2. SDS' de çözünen (EP) ve çözünmeyen proteinlerin (UP) SE-HPLC ile belirlenmesi	48
3.2.15. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE).....	48
3.2.16. Gluten ve gluten hidrolizatlarının iki boyutlu jel elektroforezi	49
3.2.17. MALDI-MS/MS analizi.....	50
3.2.18. İstatistiksel analiz	51
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	53
4.1. Materyallere Ait Bazı Fiziksel, Kimyasal Ve Biyokimyasal Analizler	53
4.2. Süne Proteolitik Enzim Aktivitesinin Zeleny Sedimentasyon ve Modifiye Sedimentasyon Testleri İle Belirlenmesi	53
4.3. Süne Proteolitik Enzim Aktivitesinin 1-Propanolde (%50) Çözünmeyen Glutenin Metodu İle Belirlenmesi	54
4.4. Süne Proteolitik Enzim Aktivitesinin pH-stat Yöntemiyle Belirlenmesi.....	55
4.5. Süne Proteolitik Enziminin Saflaştırılması	58

4.6. Gluten Hidrolizatlarının Farklı Tekniklerle (Jel Filtrasyon, Anyon Değişim Kromatografisi ve Ultrafiltrasyon) Fraksiyonlara Ayrılması	62
4.7. Gluten Hidrolizatının Moleküler Boyut Dağılımının Dinamik Işık Saçılımı (DLS) ile İncelenmesi.....	69
4.8. Gluten Hidrolizatlarının Bazı Fonksiyonel Özellikleri.....	75
4.8.1. Gluten ve gluten hidrolizatlarının protein çözünürlüğü	75
4.8.2. Gluten ve gluten hidrolizatlarının emülsiyon özellikleri.....	78
4.8.3. Gluten ve gluten hidrolizatlarının köpük özellikleri	81
4.8.4. Gluten ve gluten hidrolizatlarının toplam antioksidan aktiviteleri.....	85
4.9. Gluten ve Gluten Hidrolizatlarında Moleküler Boyut Dağılımı	87
4.9.1. Gluten ve gluten hidrolizatlarındaki proteinlerin moleküler büyüklük dağılımının SE-HPLC ile belirlenmesi.....	87
4.9.1.1. Toplam proteinlerin (TP) SE-HPLC analizi	87
4.9.1.2. SDS' de çözünen (EP) ve çözünmeyen proteinlerin (UP) SE-HPLC sonuçları	90
4.9.2. Gluten ve gluten hidrolizatlarının elektroforetik (SDS-PAGE) özellikleri	94
4.9.3 Gluten ve gluten hidrolizatlarının iki boyutlu elektroforez (2-DE) ile incelenmesi.....	97
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	106
EKLER.....	122
ÖZGEÇMİŞ	126

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Peptid bağlarının proteaz ile hidrolizi	9
Şekil 3.1. Otomatik titratör cihazı (pH-stat)	42
Şekil 4.1. Tripsin enziminin vital (ticari) ve elde yıkanan gluten üzerine etkisinin pH-stat yöntemiyle tespiti.....	55
Şekil 4.2. Süne enzim ekstraktının ticari ve elde yıkanan gluten üzerine etkisinin pH-stat yöntemiyle tespiti.....	56
Şekil 4.3. Ticari glutenin sulu süspansiyonunun (%6) farklı oranlarda süne enzim ekstraktıyla hidrolizi.....	57
Şekil 4.4. Elde yıkanan glutenin sulu süspansiyonu (% 5) üzerine farklı miktardaki süne enzim ekstraktının etkisi	57
Şekil 4.5. Süne enzim ekstraktının, anyon değişim (DEAE-selüloz) kromatografisi ile kısmen saflaştırılması	59
Şekil 4.6. Anyon değişim kolonunda enzim aktivitesi gösteren fraksiyonların CM-sefaroze katyon değiştirici kolonda ayrımı	60
Şekil 4.7. Süne enziminin jel filtrasyon (Superdex 75) ile saflaştırılması.....	60
Şekil 4.8. Elde yıkanan glutenin sulu süspansiyonu (%5) üzerine E:S oranı 0.05 olan P4 ve P5 enzim fraksiyonlarının etkisi	62
Şekil 4.9. Elde yıkanan glutenin sulu süspansiyonunun (%5) SEE, P4 ve P5 enzimleri ile hidrolizi sırasında zamana karşı elde edilen %HD/protein miktarı oranı	62
Şekil 4.10. Elde yıkanarak elde edilen glutenin, pH-stat ile belirlenen hidroliz derecesinin zamanla değişimi.....	63
Şekil 4.11. Gluten hidrolizatının (HD %3.5) jel filtrasyonla fraksiyona ayrımı.....	63
Şekil 4.12. Gluten hidrolizatının (HD %3.5) anyon değişim kolonunda (DEAE-selüloz) ayrılması.....	64
Şekil 4.13. Gluten hidrolizatının (HD % 3.5) jel filtrasyon ve anyon değişim kromatografisi teknikleriyle ayrılan fraksiyonlarına ait SDS-PAGE elektroforegramı	65
Şekil 4.14. Sartorius ultrafiltrasyon düzeneğinde 100, 50, 20 ve 5 kDa' luk membran filtreler ile fraksiyonlarına ayrılan peptidlere ait SDS-PAGE elektroforegramı	67

Şekil 4.15. Amicon ultrafiltrasyon düzeneğinde 10 ve 30 kDa' luk membran filtreler ile fraksiyonlarına ayrılan peptidlere ait SDS-PAGE elektroforegramı	68
Şekil 4.16. Gluten hidrolizatı (HD % 3.5) ve seyreltilmiş örneklerine ait DLS partikül boyut dağılımları: a) Gluten hidrolizatı; b) Gluten hidrolizatı (seyreltme, 1/10); c) Gluten hidrolizatı (seyreltme, 1/100)	69
Şekil 4.17. Gluten hidrolizatı ve seyreltilmiş örneklerin %2 SDS bulunan ortamdaki DLS partikül boyut dağılımı: a) Gluten hidrolizatı; b) Gluten hidrolizatı (seyreltme, 1/10); c) Gluten hidrolizatı (seyreltme, 1/100).....	71
Şekil 4.18. Gluten hidrolizatı ve seyreltilmiş örneklerin 6M üre bulunan ortamdaki DLS partikül boyut dağılımı: a) Gluten hidrolizatı; b) Gluten hidrolizatı (seyreltme, 1/10); c) Gluten hidrolizatı (seyreltme, 1/100).....	72
Şekil 4.19. Gluten hidrolizatının (HD % 3.5) rejenere selüloz membrandan (0.2 µm) geçirildikten sonra DLS partikül boyut dağılımı	73
Şekil 4.20. Gluten hidrolizatının (HD % 3.5) sonikasyondan sonra DLS partikül boyut dağılımı.....	74
Şekil 4.21. Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait çözünürlük değerlerinin pH ile değişimi.....	76
Şekil 4.22. Protein çözünürlüğü için sığır serum albumini (BSA) ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi	77
Şekil 4.24. Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait emülsiyon stabilitesi (%) değerlerinin pH ile değişimi	81
Şekil 4.25. Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait köpük kapasitesi (cm ³) değerlerinin, pH ile değişimi	82
Şekil 4.26. Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait köpük stabilitesi (s) değerlerinin pH ile değişimi.....	85
Şekil 4.27. Antioksidan aktivite tayininde kullanılan kalibrasyon eğrisi	86
Şekil 4.28. Gluten ve gluten hidrolizatlarındaki (HD %3 ve %5) toplam proteinlere ait SE-HPLC profilleri.....	88
Şekil 4.29. Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait SDS' de çözünür proteinlerin SE-HPLC profilleri	91
Şekil 4.30. Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait SDS' de çözünmeyen proteinlerin SE-HPLC profilleri.....	93
Şekil 4.31. Gluten ve gluten hidrolizatlarının (HD %3 ve %5) SDS-PAGE yöntemiyle belirlenen protein bant desenleri.....	96
Şekil 4.32. Gluten proteinlerinin pH 3-10 aralığındaki protein haritası	98

Şekil 4.33. Gluten hidrolizatı (HD %3) proteinlerinin pH 3-10 aralığındaki protein haritası	99
Şekil 4.34. Gluten hidrolizatı (HD %5) proteinlerinin pH 3-10 aralığındaki protein haritası	100
Şekil 4.35. Gluten proteinlerinin pH 5-8 aralığındaki protein haritası	101
Şekil 4.36. Gluten hidrolizatı (HD %3) proteinlerinin pH 5-8 aralığındaki protein haritası	102
Şekil 4.37. Gluten hidrolizatı (HD %5) proteinlerinin pH 5-8 aralığındaki protein haritası	103

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 4.1. Gluten eldesinde kullanılan sağlam buğday (cv. Bezostaya) örneğine ait bazı fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları	53
Çizelge 4.2. Süne enzim ekstraktının (5 mg) elde yıkanarak hazırlanan gluten (50 mg) üzerine etkisi.....	55
Çizelge 4.3. Anyon değişim (DEAE-selüloz) kromatografisinde toplanan bazı fraksiyonlara ait relatif proteaz aktivitesi (RPA, %), spesifik aktivite ve saflaştırma faktörleri	58
Çizelge 4.4. Süne enziminin jel filtrasyon ile saflaştırılmasında elde edilen fraksiyonlara (P1, P2, P3, P4 ve P5) ait relatif proteaz aktivitesi (RPA, %), spesifik aktivite ve saflaştırma faktörleri.....	61
Çizelge 4.5. Gluten hidrolizatı (HD %3.5) ve seyreltilmiş örneklerine ait dinamik ışık saçılımı (DLS) partikül boyut dağılımı değerleri	70
Çizelge 4.6. Gluten hidrolizatı ve seyreltilmiş örneklerine %2 SDS ilave edildiğinde DLS partikül boyut dağılımı değerleri.....	71
Çizelge 4.7. Gluten hidrolizatı ve seyreltilmiş örneklerin 6 M üre bulunan ortamdaki DLS partikül boyut dağılımı değerleri	73
Çizelge 4.8. Gluten hidrolizatının rejenere selüloz membrandan (0.2 µm) geçirildikten sonra DLS partikül boyut dağılımı değerleri	74
Çizelge 4.9. Gluten hidrolizatının sonikasyondan sonra DLS partikül boyut dağılımı değerleri	74
Çizelge 4.10. Gluten ve gluten hidrolizatlarının (HD %3 ve %5) çözünürlüklerinin (%) pH ile değişimi	76
Çizelge 4.11. Gluten ve gluten hidrolizatlarının (HD %3 ve %5) farklı pH' lardaki emülsiyon kapasitesi (%) değerleri.....	78
Çizelge 4.12. Gluten ve gluten hidrolizatlarının (HD %3 ve %5) farklı pH' lardaki emülsiyon stabilitesi (%) değerleri.....	80
Çizelge 4.13. Gluten ve gluten hidrolizatlarının (HD %3 ve %5) farklı pH' lardaki köpük kapasitesi (cm ³) değerleri	82
Çizelge 4.14. Gluten ve gluten hidrolizatlarının (HD %3 ve %5) farklı pH' lardaki köpük stabilitesi (KS, s) değerleri	84
Çizelge 4.15. Gluten ve gluten hidrolizatlarının (HD %3 ve %5) antioksidan aktiviteleri.....	87

Çizelge 4.16. Gluten ve gluten hidrolizatlarındaki (HD %3 ve %5) toplam proteinlere ait SE-HPLC profillindeki TP1, TP2, TP3 ve TP4 pik alanları	89
Çizelge 4.17. Gluten ve gluten hidrolizatlarındaki (HD %3 ve %5) toplam proteinlere ait SE-HPLC profillindeki TP1, TP2, TP3 ve TP4 pik alanları (%).....	89
Çizelge 4.18. Gluten ve gluten hidrolizatlarının (HD %3 ve %5) polimerik/monomerik protein oranları.....	90
Çizelge 4.19. Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait SDS' de çözünür proteinlerin SE-HPLC profillindeki EP1, EP2, EP3 ve EP4 pik alanları.....	92
Çizelge 4.20. Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait SDS' de çözünür proteinlerin SE-HPLC profillindeki EP1, EP2, EP3 ve EP4 pik alanları (%)	92
Çizelge 4.21. Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait SDS' de çözünmeyen proteinlerin SE-HPLC profillindeki UP1, UP2, UP3 ve UP4 pik alanları.....	94
Çizelge 4.22. Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait SDS' de çözünmeyen proteinlerin SE-HPLC profillindeki UP1, UP2, UP3 ve UP4 pik alanları (%)	94
Çizelge 4.23. Gluten hidrolizatının (HD %5) pH 3-10 2-DE jelinden (Şekil 4.34) kesilen spotlardaki proteinlerin MALDI-MS/MS değerleri.....	105

EKLER DİZİNİ

Sayfa

- EK 1. HD %5 olan gluten hidrolizatının pH 3-10 aralığında elde edilen 2-D jelden kesilen (Şekil 4. 34) 1 no' lu spota ait MALDI-MS/MS kütle spektrumu.... 122
- EK 2. HD %5 olan gluten hidrolizatının pH 3-10 aralığında elde edilen 2-D jelden kesilen (Şekil 4. 34) 2 no' lu spota ait MALDI-MS/MS kütle spektrumu.... 123
- EK 3. HD %5 olan gluten hidrolizatının pH 3-10 aralığında elde edilen 2-D jelden kesilen (Şekil 4. 34) 3 no' lu spota ait MALDI-MS/MS kütle spektrumu.... 124
- EK 4. HD %5 olan gluten hidrolizatının pH 3-10 aralığında elde edilen 2-D jelden kesilen (Şekil 4. 34) 4 no' lu spota ait MALDI-MS/MS kütle spektrumu.... 125

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

HD	: Hidroliz derecesi
OPA	: o-fitaldialdehit
EK	: Emülsiyon kapasitesi
ES	: Emülsiyon stabilitesi
KK	: Köpük kapasitesi
KS	: Köpük stabilitesi
SEE	: Süne enzim ekstraktı
E:S	: Enzim:Substrat
HD	: Hidroliz derecesi
TGase	: Transglutaminaz
SE-HPLC	: Boyut dağılımı yüksek performanslı sıvı kromatografisi
SDS-PAGE	: Sodyum dosesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez
DLS	: Dinamik lazer ışık saçılımı
CM-sefaroze	: Karboksimetil sefaroze
DEAE-selüloz	: Dietilaminoetil selüloz

1. GİRİŞ

Buğday unu, su ile karıştırılıp yoğurulduğunda hamur oluşturarak fermentasyon sırasında oluşan gazı tutabilme yeteneğine sahiptir. Bu sayede ekmek başta olmak üzere birçok fırıncılık ürününde kullanımı mümkün olmaktadır. Buğdaya bu yegane özelliği kazandıran depo proteini ise “gluten” dir. Buğday nişastasının üretimi sırasında büyük miktarda gluten açığa çıkmaktadır. Dünyada yıllık gluten üretimi 500.000 ton civarında olup yaklaşık 1\$/kg fiyatlandırıldığı için oldukça ucuz ve sentetik polimerlere rakip bir kaynaktır.

Gıdalara besinsel değeri artırmak, tekstürel veya duyusal özellikleri geliştirmek, biyoaktif özellik kazandırmak amacıyla yeni ve maliyeti düşük olan gıda katkılarına ihtiyaç duyulmaktadır. Glutenin çözünmez yapısı fırıncılık ürünlerinde ekmek yapmak için istenen bir özellikken, bu özellik glutenin diğer gıdalarda kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenle günümüzde gluten modifiye edilerek gıdalarda kullanım alanları genişletilmeye çalışılmaktadır. Genellikle suda çözünür veya en azından suda dağılabilir gluten üretimi amaçlanmaktadır.

Gluten besinsel değer açısından hayvansal proteinlere göre düşük kalitededir. Çünkü esansiyel aminoasitler, lizin ve treonin açısından fakirdir. Fakat glutamin bakımından zengindir. Sindirim ve bağışıklık sisteminde hızlı çoğalan hücreler enerji kaynağı olarak glutamini tercih eder. Beslenme yetersizliği, ameliyat sonrası iyileşme dönemi, bağışıklık sistemindeki rahatsızlıklar, kritik bazı hastalıklar boyunca ve egzersiz sonrası glutamin vazgeçilmez bir aminoasittir. Ancak serbest glutamin ile N-terminalde bulunan ve amino grubu açıkta kalan peptide bağlı glutamin, sulu çözeltilerinde kararsızdır ve bunlar biyolojik olarak aktif değildir. Glutaminin en kararlı formu glutamin içeren dipeptidler (alanilglutamin) ve hidrolize buğday proteinleri gibi içerisinde glutamin bulunan peptidlerdir. Bu durum gluten hidrolizatlarının önemini artırmaktadır. Günümüzde bazı içeceklerle ve tıbbi formülasyonlara bu glutenden hazırlanmış preparatlar ilave edilmektedir. Ayrıca buğday gluteni yağa ve diğer polar olmayan maddelere karşı kuvvetli affinite gösterdiği için gluten hidrolizatları, yağ asitlerinin degradasyonunu önleyici etkiye yani antioksidatif aktiviteye sahiptir.

Protein yapılı katkılarda öncelikle çözünürlük olmak üzere, hidrasyon, su tutma, viskozite, jel oluşturma, köpük ve emülsiyon oluşturma kapasiteleri ile köpük ve

emülsiyon stabiliteeri gibi özellikler önemlidir. Ayrıca ısıı işlem uygulanan sıvı sistemde, katkı maddesinin koagule olmadan ve aşırı kalınlaşmadan ısıı işleme karşı yeterli stabilite göstermesi gerekir. Protein katkılarında en büyük başarı süt ve soya proteinlerinden elde edilmiş ve bunlar çeşitli modifikasyonlar ile birçok alanda kullanılabilir hale getirilmiştir. Buğday gluteni ise ucuz ve kolay temin edilebilen bir materyal olarak modifiye edilerek bu tür protein katkılarına rakip olabilir.

Proteinler en fazla kimyasal veya enzimatik yöntemlerle modifiye edilmektedir. Kimyasal hidroliz genellikle kolaydır, fakat bu uygulama istenmeyen tat ve kokuya, esansiyel aminoasitlerin yok olmasına, protein olmayan bileşenlerin reaksiyonuna, proteinlerin kullanımını sınırlayan lizinoalanin ve toksik bileşenlerin oluşumuna neden olmaktadır. Enzimatik hidroliz yöntemi ise özellikle yüksek protein konsantrasyonlu proseste ve yüksek derecede hidroliz istendiğinde bazı dezavantajlara sahiptir. Fakat kimyasal proseste olduğu gibi toksik bileşenler oluşmaz. Proteinlerin kısmi hidrolizinde sindirim sistemi ve bitkilerde bulunan proteolitik enzimler (papain, bromelain gibi) ile mikrobiyal kaynaklı proteolitik enzimler (alkalaz, nötraz, termitaz gibi) kullanılmaktadır. Ancak günümüzde yüksek protein konsantrasyonlarında çalışan ve verimliliği yüksek olan enzimlere gereksinim duyulmaktadır.

Ülkemizde buğdayda hasat öncesi verim ve teknolojik kalitenin düşmesine neden olan hububat zararlılarının başında gelen, süne (*Eurygaster spp.*) ve kımıl (*Aelia spp.*) buğdayların teknolojik özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü verilerine göre, 2009 yılında ülkemizde 12 milyon dekarlık alanda ilaçlı mücadele yapılmış ve süne mücadelesinde yaklaşık 7.5 milyon TL harcanmıştır (Anonymous, 2010). Ülkemizde ekonomik eşik uygulaması nedeniyle tarımsal mücadele yapılmayan alanlarda her yıl belli miktarlarda süne-kımıl zararına maruz kalmış buğday elde edilmektedir. Bazı yıllarda ise belli bölgelerde salgın şeklinde görülen süne-kımıl zararı nedeniyle o hasat dönemindeki buğdaylar hububat sanayinde kullanılamamaktadır. Zarar görmüş tane oranı yüksek olan buğdaylar ancak hayvan yemi olarak değerlendirilebilmektedir. Süne zararının buğdayın ekmeklik kalitesini bozmasının nedeni, bu zararlıının buğdayı emerek beslenmesi sırasında

taneye bıraktıkları sindirim salgılarıdır. Süne emgili taneler una öğütüldüğünde, süne enzimi una geçer ve su ile hamur haline getirildiğinde, enzim aktif hale geçerek gluten proteinlerinin hidrolizi sonucunda hamur yumuşak ve yapışkan bir hal alır, elastikiyeti azalır, makinede işlenmesi güçleşir, gaz tutma kapasitesi düşer ve ekmek kalitesi bozulur (Kretovich, 1944; Lorenz and Meredith, 1988a; Critchley, 1998; Karababa and Ozan, 1998).

Tez kapsamında süne zararı görmüş buğdaydaki proteaz enzimi glutenin modifikasyonunda kullanılmıştır. Böylece nişasta sanayinin bir yan ürünü olan glutenin, ekmekçilik sektörü dışında diğer gıda alanlarında da kullanımının yaygınlaştırılması ve glutene katma değer kazandırılması hedeflenmiştir. Gluten proteinlerine spesifik süne proteazının, gluten hidrolizatlarının hazırlanmasında diğer ticari enzim preparatlarına göre önemli avantajlara sahip olabileceği ve teknolojik kalitesi düşük süne zararı görmüş buğdayların gluten hidrolizatlarının değerlendirilmesinde kullanılabileceği düşünülmüştür. Ayrıca, elde edilen hidrolizatlarda moleküler büyüklük dağılımının ortaya konması, gluten proteinlerinin moleküler yapısının aydınlatılması ve süne proteaz enziminin gluten proteinleri üzerindeki etki mekanizmasının aydınlatılmasına önemli katkı sağlayabileceği öngörülmüştür.

Süne proteaz enzimi yüksek oranda zarar görmüş buğdaydan izole edilip kısmen saflaştırıldıktan sonra buğday depo proteini olan glutenin hidrolizinde kullanılmıştır. İki farklı hidroliz derecesinde (%3 ve %5) elde edilen gluten hidrolizatlarının, farklı pH' larda (pH 2, 4, 6, 7, 8 ve 10) çeşitli fonksiyonel özellikleri (çözünürlük, emülsiyon oluşturma kapasitesi ve stabilitesi ile köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi) ve antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Gluten ve gluten hidrolizatlarının moleküler boyut dağılımları dinamik ışık saçılımı (DLS) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (SE-HPLC) teknikleriyle incelenmiştir. Gluten ve gluten hidrolizatları sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ve iki boyutlu (2-D) jel elektroforez ile tespit edilmiştir. Örneklerle ait 2-D protein haritaları karşılaştırılarak değişiklik gözlenen proteinler MALDI-MS/MS ile tanımlanmaya çalışılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Buğdayı diğer hububat tanelerinden ayıran yegane özellik visko-elastik özellikteki depo proteini glutendir. Buğday öğütülüp su ile karıştırıldığında gaz tutabilme gibi kendine özgü reolojik özelliklere sahip hamuru oluşturur. Bu özelliğinden dolayı buğday birçok gıda ürününün (ekmek, erişte, makarna, bisküvi, kek, yufka gibi) üretiminde kullanılabilecek tek uygun materyaldir (Shewry and Halford, 2002). Gluten iki farklı polipeptitten oluşmaktadır. Gelişmekte olan buğdayda Gli-1 ve Gli-2 lokasyonlarındaki genler monomerik yapıdaki gliadin proteinlerini, Glu-1 ve Glu-3 lokasyonlarındaki genler ise disülfid çapraz bağlanma sonucunda molekül ağırlıkları on milyon Daltona kadar uzanan polimerik glutenin polipeptidlerini kodlamaktadır. Gliadin proteinleri hamura viskoz özellik kazandırırken, glutenin proteinleri elastik özellik vermektedir (Gianibelli, et al., 2001). Gliadin proteinleri %70' lik etil alkolde çözündükten sonra geriye kalan kısım glutenin proteinleridir. Gliadin ve gluteninlerin çoğu asidik ortam da kısmen çözünebilir. Gluten suda çözünmeyen, hidrofobik yapıya sahip olduğundan, kuru ağırlığının yaklaşık iki katı su absorplayabilir. Su ile hamur elde edildiğinde protein molekülleri kohesiv özellikte bir matriks oluşturur ve nişasta granülleri bu matriksin içinde tutulur. Bu matriks elastik olup uzamaya ve genişlemeye olanak sağlar. Hamurun yoğrulması sırasında bu elastikiyet gaz kabarcıklarının genişlemesine olanak sağlar ve böylece ekmek ve kekin tekstürü oluşur (Day et al., 2006).

Son yıllarda buğday nişastasının üretimi sırasında büyük miktarda açığa çıkan gluten, fonksiyonel özellikleri korunacak şekilde kontrollü olarak kurutulmaya başlanmıştır. Dünyada yıllık gluten üretimi 500.000 ton kadardır. Yaklaşık 1\$/kg fiyatlandırıldığı için oldukça ucuz ve sentetik polimerlere rakip bir üründür. Üretilen "vital gluten" genellikle fırıncılık ürünlerinde kullanılmasına karşın, süt ve soya proteinleri gibi rakip ürünlere göre daha uygun fiyata elde edilebildiği için gluten proteinlerinin (vital, de-vital veya modifiye) gıda katkı maddesi olarak da kullanımı artmıştır. Gluten hayvan yemlerinde ve gıda dışı alanlarda da uygulama alanı bulmaktadır (Lens et al., 1999).

Günümüzde gluten üretiminde kullanılan Batter ve Martin prosesleri esas olarak, 300 yıl önceki yöntemlerle aynı prensiptedir. Martin prosesinde buğday hamuru silindirik bir karıştırıcının içinde su ile yıkanarak, nişastanın elek deliklerden

uzaklaşması sağlanırken, Batter prosesinde buğday unu su ile karıştırılarak bekletilir ve sonra nişasta elenerek ayrılır. Bu proseslerin sonunda gluten hızla kurutulur. Gluten proteinleri yaş olduklarında ısıya duyarlılıkları daha fazladır. Düşük sıcaklıkta bile glutenin visko-elastik özelliği kaybolacağı için gluten üretiminde asıl kritik aşama kurutma aşamasıdır. Genellikle yaş gluten (%70 nem) kuru glutenle karıştırılıp nem içeriği yaklaşık %20' ye düşürüldükten sonra elde edilen materyal ufalanıp flaş kurutma uygulanır. Kuru glutenin sadece bir kısmı sistemden alınırken, yaş gluten sisteme yüklenir. Kurutma prosesine alternatif yöntem, yaş glutenin sulu amonyak veya asetik asitle dispersiyonu hazırlandıktan sonra sprey kurutma uygulanmasıdır. Fakat bu uygulamanın hem ekonomik hem de çevreye kirliliğine neden olmasından dolayı kullanımı sınırlıdır. "De-vital gluten" ise yüksek sıcaklıklarda kurutma ile üretilir, visko-elastik yapı göstermez. Vital glutenin çözünmezlik ve su tutma kapasitesi özelliklerini koruyan de-vital gluten, vital glutenin kohesiv özelliğinin dezavantaj olduğu yerlerde kullanılır. Laboratuvar düzeyinde hazırlanan liyofilizasyon ve rehidrasyon ile kurutma yapılan glutenin fonksiyonel özelliklerinde ise çok az bir değişim görülmektedir (Day et al., 2006).

Ticari gluten genellikle %75 protein, yaklaşık %8 nem ve değişen miktarda nişasta, lipid ve lif içermektedir. Nişasta ve lif, protein matriksinin içinde tutuklu olduğu için bu yapıdan ayrılmaları zordur. Yıkama işlemi artırılıp, nişasta ve lif içeriği düşürülmeye çalışıldığında ise çok fazla su harcanmakta ve atık suda toplam biyolojik oksijen ihtiyacı artmaktadır. Bu nedenle çok yüksek protein içerikli gluten üretimi özel istek durumunda üretilmekte ve değerinden fazla fiyata satılmaktadır. Ayrıca lipidler hidrofobik karakterli gluten proteinlerine kuvvetli bir şekilde bağlandıkları için yıkama sırasında bunların ayrılması da zordur (Day et al., 2006).

Bazı insanlarda gluten tolere edilemeyebilmektedir Çölyak hastalığı olarak tanımlanan bu hastalık, ince bağırsağın iltihaplanmasına ve sonuç olarak suyun ve diğer besinlerin absorpsiyonunun olumsuz etkilenmesine ve besin eksikliğine yol açmaktadır (Sollid, 2000). Tek tedavi gluten içeren ürünlerin tüketilmemesidir. Birçok araştırmacı bu hastalığın mekanizmasını anlamaya ve proteindeki allerjen yapıyı modifiye ederek allerjenik özelliği azaltmaya çalışmaktadır. Ancak bu konu ile ilgili genetik bilgi eksikliğinden dolayı alerjen özelliği düşürmek adına fazla başarı sağlanamamaktadır. Bu nedenle gluten veya modifiye glutenin özellikle

hububat kaynaklı olmayan gıdalarda kullanımında, gluteni tolere edemeyen kişiler dikkate alınmalıdır.

2.1. Buğday Gluteninin Gıdalarda Kullanımı

Vital gluten hamur kuvvetine, hamurun gaz tutma özelliklerine ve hacim artışına katkıda bulunduğu, son ürünün tekstüründe, sertliğinde ve çiğnenebilirliğinde düzelme sağladığı, hamburger ekmeklerinin iki parçasını bir arada tutan kısmında direnci artırdığı ve su absorpsiyonunda artış sağladığı için en fazla fırıncılık endüstrisinde kullanılmaktadır (Kalin, 1979). Ancak kendine özgü yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesinin ardından buğday gluteni, farklı uygulama alanları bulmuştur. Fırıncılık ürünlerinde istenilen protein içeriğinden daha düşük proteine sahip unlar, glutenle zenginleştirilerek, daha kaliteli ürün elde edilmektedir. Kendine özgü viskoelastik özelliğe sahip olan vital buğday gluteni, hamur kuvvetini, yoğurma toleransını ve elle işlenebilirliği artırmaktadır. Film-köpük oluşturabilme özelliği sayesinde gazın yapıda tutulması sağlanarak hacim artışına, homojenliğe ve tekstürün oluşmasına katkıda bulunmaktadır. Isı ile sertleşme özelliği, gerekli yapısal sertliğin sağlanmasına katkıda bulunmakta ve su absorplama özelliği fırıncılık ürününün verimini, yumuşaklığını ve raf ömrünü artırmaktadır. Una ilave edilecek gluten miktarı, uygulama alanına ve fırıncılık ürününde arzu edilen tekstür ve raf ömrüne bağlıdır. Örneğin una yaklaşık %1 gluten ilavesi son üründe krakerin kırılganlığını azaltırken, çok fazla gluten ilavesi krakeri yemek için çok sert hale getirmektedir. Gluten hamburger ve sandviç ekmeklerinde yaklaşık %2 oranında kullanılarak depolama sırasında alt ve üst dilimleri bir arada tutan kısmı kuvvetlendirmekte ve istenen kabuk özelliklerini sağlamaktadır. Ayrıca pizza hamurunu kuvvetlendirmede kullanılabilir ve aynı undan hem ince hem de kalın hamurlu üretim yapmayı mümkün kılabilir. Gluten ilavesi kabuk ve çiğnenebilirliği sağlamakta ve sistan hamura nem transferini azaltmaktadır. Gluten gıdanın protein içeriğini artırırken, yağ ve su bağlama özelliğini artırmaktadır. Böylece gluten et, balık ve kümes hayvanı ürünlerinde farklı uygulama alanları bulabilmektedir. Taze et glutenle işlendiğinde duysal olarak daha lezzetli biftek tarzı ürünler yapılabilir. Gluten ile düzgün dilimlenebilen et ürünü (meat loaf) oluşturabildiği gibi, hindi eti parçaları için de uygun bir bağlayıcı ajan olarak kullanılmaktadır. İşlenmiş et ürünlerinde gluten kümes hayvanı ruloları, konserve domuz eti ve diğer spesifik somun tipi

ürünlerde dilimlenme özelliklerini geliştirdiği ve pişirme kayıplarını minimize ettiği için iyi bir bağlayıcı ajandır. Fırıncılık ürünleri dışında glutenin en büyük kullanım alanı vejeteryan gıdalarında et yerini alması ve özellikle Japonya’ da deniz ürünü ve yengeç benzeri pahalı ürünlerin yapay formlarının üretiminde kullanılmasıdır. Sağlık ve gıda güvenliği konularına ilginin artmasından dolayı etsiz çeşitleri tercih eden tüketici sayısı giderek artmaktadır. Ekstrüzyon tekniği ile işlem gören buğday gluteni etin ağızda bıraktığı hissi, çiğnenebilirliği ve tadını taklit etmede kullanılabilir. Bu proses ile üretilen et ürünleri sandviç dolgusu olarak veya pizza ve salata üstüne uygundur. Glutenin viskoelastik özellikleri doğal peynirin karakteristik tekstürünü veren sentetik peynir hazırlanmasında kullanılabilir. Gluten tek başına veya soya proteini ile birlikte imitasyon peynir üretiminde çok pahalı olan sodyum kazeinatın yerinin yaklaşık %30’ unu almaktadır (Day et al., 2006).

Buğday gluteni ile zenginleştirilmiş kahvaltılık hububat ürünleri de özellikle sütle tüketildiklerinde çok hoş tat-kokuya sahiptir ve besinsel değeri yüksek olduğu için yaygın bir şekilde kabul görmektedir. Ekstrüde edilmiş bu tür gıdalarda buğday gluteni besinsel değer, kırılabilirlik ve istenen tekstürü sağlamaktadır. Gluten aynı zamanda meyve püreleri ile karıştırılarak meyve dolgusu olarak da kullanılır. Mısır tortillalarına eklenen gluten rulo oluşturabilme ve katlanabilirliğe karşı dayanıklılığı artırmaktadır (Day et al., 2006).

2.2. Proteinlerin Fonksiyonel Özellikleri

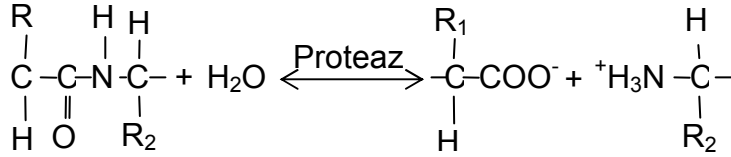
Gıdalara bazı istenen özellikleri kazandırmak için yeni ve düşük maliyetli gıda katkılarına ihtiyaç duyulmaktadır. Gıda katkıları (a) besinsel değeri artırmak; (b) tekstürel veya duyuşal özellikleri geliştirmek (c) biyoaktif özellik kazandırmak için çeşitli fonksiyonel özelliklere sahiptir. Proteinlerin fonksiyonel özellikleri, molekül ağırlığı, primer yapı, kovalent ve/veya kovalent olmayan bağlarla ilişkili konformasyonel yapı ve protein molekülü üzerindeki yük dağılımından etkilenmektedir. Bu özellikler, proteinin gıdada bulunan diğer bileşenler (protein, lipid, karbonhidrat, su, iyon ve aroma maddeleri) ile etkileşimine de bağlıdır. Ayrıca ortam pH’ ısı, sıcaklık, iyonik kuvvet, nem, oksidasyon-redüksiyon potansiyeli, kesme kuvveti ve diğer işlem koşulları da bu özellikleri etkilemektedir. Protein yapıları katkılarda öncelikle çözünürlük olmak üzere, hidrasyon, su tutma, viskozite, jel oluşturma, köpük ve emülsiyon oluşturma kapasiteleri ile köpük ve emülsiyon

stabilite gibi özellikler önemlidir. Ayrıca ısı işlem uygulanan sıvı sistemde, katkı maddesinin koagule olmadan ve viskozitesi aşırı derecede artmadan ısı işleme karşı yeterli stabilite göstermesi gerekir. Protein katkılarında en büyük başarı süt ve soya proteinlerinden elde edilmiş ve çeşitli modifikasyonlar sonucunda birçok alanda kullanılabilir hale getirilmişlerdir (Day et al., 2006).

2.3. Proteinlerin Enzimatik Modifikasyonu

Protein modifikasyonu, besinsel ve fonksiyonel özelliklerde istenen değişimleri sağlamak için proteinin yapısını değiştirmek olarak tarif edilebilir. Bu amaçla da en fazla kimyasal veya enzimatik modifikasyon uygulamaları kullanılmaktadır. Proteinlerin kısmi hidrolizi ile çözünürlük, köpük kapasitesi, emülsiyon stabilitesi ve aroma ajanlarının oluşumu gibi özellikler geliştirilebilmektedir. Ayrıca hidroliz işlemi istenmeyen koku ve renk oluşumunu önlemek ve toksik, besinsel değeri olmayan bileşenleri elimine etmek için de kullanılabilir. Protein hidrolizi asit veya alkali uygulaması gibi kimyasal metotların yanısıra farklı proteolitik enzimler kullanılarak da yapılabilir. Asit hidrolizi genellikle kolaydır, fakat bu uygulama hem istenmeyen tat ve kokuya hem de esansiyel aminoasitlerin kaybolmasına, protein olmayan bileşenlerin reaksiyonuna ve proteinlerin kullanımını sınırlayan lizinoalanin oluşumuna neden olmaktadır. Proteinlere asetilasyon ve fosforilasyon uygulaması bazı güvenlik sorunlarına yol açarken hidroklorik asit uygulamasıyla üretilen soya sosu, toksik bileşenler içerebilmektedir. Bu nedenle bazı çalışmalarda zayıf asit uygulaması yapılmaktadır. Enzimatik hidroliz yönteminde ise özellikle yüksek protein konsantrasyonlu proseste ve yüksek derecede hidroliz istendiğinde bazı zorluklarla karşılaşmaktadır. Ayrıca asit hidrolizine göre daha uzun zaman alması mikrobiyal kontaminasyon riskini artırmaktadır. Ekonomik fayda sağlamak için protein hidrolizatı çözünürlüğünün en az %60, mümkünse %90 üzeri olması tercih edilmektedir. Protein hidrolizatı hazırlamakta enzimatik hidroliz asit hidrolize göre verimliliği düşük bir prosestir. Çünkü sınırlı substrat konsantrasyonu ve düşük hidroliz derecesi söz konusudur. Fakat kimyasal proseste olduğu gibi toksik bileşenler oluşmaz. Bu nedenle yüksek protein konsantrasyonlarında çalışan ve verimliliği yüksek olan enzimatik hidroliz proseslerine gereksinim duyulmaktadır (Hong et al., 2001).

Proteinlerinin enzimatik hidrolizinde sindirim sistemi ve bitkilerde bulunan proteolitik enzimler (papain, bromelain gibi) ile mikrobiyal kaynaklı proteolitik enzimler (alkalaz, nötraz, termitaz gibi) kullanılmaktadır. Şekil 2.1’ de proteaz ile peptid bağının kırılmasını içeren basit bir reaksiyon gösterilmektedir (Adler-Nissen, 1986; Schwenke, 1997).



Şekil 2.1. Peptid bağlarının proteaz ile hidrolizi

Proteinlerin kısmi hidrolizi sonucunda açığa çıkan peptidler, orijinal proteine göre genellikle daha iyi fizikokimyasal özelliklere sahipken, aşırı derecede hidroliz bu özellikleri olumsuz yönde etkilemektedir (Molina and Wagner 2002; Pena-Ramos and Xiong 2003; Surowka et al., 2004; Lee and Kim 2005). Bu nedenle proteinlerin hidroliz derecesini (HD) kontrol etmek, istenen fonksiyonel özelliklere sahip hidrolizat elde etmek için önemlidir. Biyokimyasal reaksiyonlarda proteinlerin enzimatik hidrolizi süresince hidroliz derecesini izlemek için genellikle pH-stat yöntemi kullanılmaktadır (Adler-Nissen, 1986). Hidroliz derecesi aşağıdaki formüle göre reaksiyon sırasında hesaplanabilmektedir:

$$\text{HD (\%)} = \frac{100 \times h}{h_t}$$

h : 1 gram proteinde kırılan peptid bağı sayısı
h_t : 1 gram protein de bulunan toplam peptid bağı sayısı

Peptid bağı kırıldığında serbest hale geçen karboksil ve amino grupları reaksiyon çözeltisinin pH’ sına bağlı olarak iyonlaşır. Hidroliz sonrasında açığa çıkan serbest karboksil grupları ve serbest amino grupları çok veya az iyonlaşırlar. pH 6-9.5 aralığında çalışılırken amino grupları kısmen protonlanır. Yani bu pH aralığında proteinlerin hidrolizi sonucunda H⁺ iyonları daha çok serbest hale geçmektedir. pH 7.5-7.8 üzerindeki değerlerde amino gruplarının yarıdan azı protonlaşmışken, karboksil grupları tam olarak ayrılmıştır. Bu durum her bir mol peptid bağı kırılmasına ve 0.5-1 mol H⁺ un serbest kalmasına yol açmaktadır. pH 4-6.5 aralığında, amino grupları ve karboksil grupları yaklaşık olarak eşdeğer oranda

ayrışır. Bu nedenle bu pH aralığında pH-stat doğru sonuç vermez. pH-stat tekniğine göre yürütülen hidroliz prosesi, nötral veya bazik pH' da gerçekleştirildiğinde, peptid bağının kırılmasına bağlı olarak eşdeğer miktarda asit oluşur ve bunlar eşdeğer miktarda baz ile titre edilerek reaksiyon pH' sı sabit tutulur. pH' yı sabit tutmak üzere harcanan baz miktarı kırılan bağ sayısı ile orantılı olur. Aynı şekilde asidik koşullarda yapılan hidroliz sonucunda ortam pH' sı alkali olmaya eğilimlidir ve bu durumda ortam pH' sını sabit tutmak için asitle titrasyon gerçekleştirilir. pH-stat tekniği reaksiyon süresince sürekli olarak HD' nin izlenmesine imkan tanımaktadır.

HD' nin belirlenmesinde başka yöntemlerde mevcuttur. Bu yöntemlerden sadece pH-stat ve o-fitaldialdehit (OPA) yöntemleri hidroliz sonucunda serbest amino gruplarının oluşumuyla doğrudan ilişkilidir ve bu nedenle hidroliz derecesinin direk ölçülmesini sağlamaktadır. Ancak OPA metodunda prolin ve hidroksiprolin amino gruplarıyla reaksiyon vermemektedir ve sisteinle sadece kısmen reaksiyon vermektedir. Osmometre metodu da HD ile iyi korelasyon göstermektedir (Adler-Nissen, 1986).

Protein hidrolizatların hazırlanmasında substratın ön işlemlerden geçirilmesi önemlidir. Örneğin izoelektrik noktada çöktürme ile elde edilen soya protein izolatu yapısındaki konformasyonel değişikliklerden dolayı proteolize karşı hassasiyet gösterirken, ultrafiltrasyon tekniğiyle elde edilen izolat doğal yapısını koruduğu ve peptid bağlarının çoğu protein yapısının içinde gizlendiği için proteolize karşı daha dirençlidir. Doğal β -laktoglobulin pepsin ile hidroliz olmazken, 82 °C' de 8 dak ısıtım işlem sonrasında hidroliz olabilmektedir. Isıtım işlemle denaturasyon sonucunda birçok peptid bağı enzimle kolayca reaksiyon verebilecek şekilde açığa çıkar. Ayrıca birçok bitkisel protein, proteaz inhibitörü de içerebileceği için ısıtım işlemle inaktivasyon yapılmazsa bu durum hidrolizin etkinliğini azaltabilir (Nielsen, 1997).

2.4. Enzimatik Protein Hidrolizatlarının Fonksiyonel Özellikleri

Peptid bağlarının hidrolizi ile proteinin NH_3^+ ve COO^- içeriği ve böylece çözünürlüğü artmakta; molekül ağırlığı azalmakta ve globular yapısı yok olup gizli hidrofobik gruplar açığa çıkmaktadır. Bu değişiklikler proteinin birçok fonksiyonel özelliğini etkilemektedir (Nielsen, 1997).

2.4.1. Protein hidrolizatlarının çözünürlük özellikleri

Protein hidrolizatlarının çözünürlüğü, özellikle sıvı gıda katkılarında kullanıldıklarında önem kazanmaktadır. Çünkü bu katkılarda çözünmeyen tortuların bulunması istenmemektedir. Düşük çözünürlük son üründe istenmeyen görünüş ve kumsu bir tada yol açmaktadır. Genellikle düşük çözünürlüğe sahip olan proteinler, sınırlı fonksiyonel özelliğe ve daha sınırlı kullanım alanına sahiptir. Endüstriyel boyutlarda protein üretiminde verimi artırmak için proteinleri çözündürmede enzimler kullanılabilir. Bu durum özellikle aroma verici olarak kullanıldıklarında yararlıdır. Gıda proteinlerinin çözünürlüğü hem proteinin kaynağına hemde izolasyon sırasında uygulanan işlemlere göre değişmektedir. Protein hidrolizatlarının çözünürlük özellikleri hidroliz derecesi, ortam pH' sı ve kullanılan enzimin çeşidine bağlıdır (Nielsen, 1997).

2.4.1.1. Çözünürlük üzerine hidroliz derecesinin etkisi

Hidroliz derecesi arttıkça proteinlerin molekül ağırlığı azaldığı ve polar grupların sayısı arttığı için proteinlerin çözünürlüğü artmaktadır. pH 2-5 aralığında genellikle çözünmez özellik sergileyen mısır depo proteini zein, tripsin ile peptid bağlarının sadece %1.9' u kırıldığında bu pH aralığında iyi bir çözünürlük (%30-50) göstermiştir (Casella and Whitaker, 1990). Alkalaz ve nötrazla işlem görmüş yulaf unları, izoelektrik noktada (pH 5) 2-3 kat daha fazla protein çözünürlüğü göstermiştir. Sabit enzim-substrat oranında, çözünürlük HD' nin artmasıyla artmaktadır (Ponnampalam et al., 1987). Hidrolize edilmemiş soya protein izolatının pH 4.2' deki çözünürlüğü yaklaşık %5 iken, alkalaz ile hidroliz edildiğinde (HD %7.7) pH 2-8 aralığındaki çözünürlüğü %75' e kadar çıkmıştır. Bu protein nötraz ile hidroliz edildiğinde (HD %5.8) pH 2-8 aralığındaki çözünürlüğü yaklaşık %60-70' e kadar artmıştır. HD %1 olduğunda ise çözünürlükte çok az bir azalma görülmüştür. Bu durum enzimi inaktive etmek ve reaksiyonu durdurmak için uygulanan ısı işleme bağlanmıştır. Genellikle soya proteininin çözünürlüğü HD arttıkça artmasına karşın çok yüksek HD' nde bile %100 çözünürlük sağlanamamıştır (Adler-Nissen, 1986). Endoproteaz ile hidrolize edilen soya proteininin çözünürlüğü, pH ve HD ile artmış; fakat %16 HD ve pH 9.0' da bile %100 çözünürlüğe ulaşılamamıştır (Adler-Nissen, 1986; Nielsen, 1997).

2.4.1.2. Çözünürlük üzerine pH' nın etkisi

Soya protein izolatının pH-çözünürlük eğrisi U-şeklindeyken alkalaz veya nötraz ile kısmi proteolizi sonucunda çözünürlük pH ile değişmez duruma gelmiştir (Adler-Nissen, 1986). Protein hidrolizatlarının pH-çözünürlük profili HD' nden de etkilenmektedir. Kazeinin çözünmez olduğu izoelektrik noktasındaki çözünürlüğü *Staphylococcus aureus* V-8 proteazı ile hidrolize edilmesi sonucunda %2 HD' nde %24' e ve %6.7 HD' nde ise %53' e artmıştır. Fakat %2 ve %6.7 HD' ndeki pH-çözünürlük profili aynı değildir. Kazein ve %2 HD' ndeki kazein için izoelektrik nokta (pI) pH' sı 4.5 iken, %6.7 HD' ndeki kazein için izoelektrik nokta pH 5.5' e kaymıştır. Bu durum hidroliz ile oluşan peptidlerin pI' larındaki farklılıklar ve kullanılan enzimin spesifisitesiyle açıklanmıştır (Nielsen, 1997).

2.4.1.3. Çözünürlük üzerine kullanılan substrat ve enzimin etkisi

Protein çözünürlüğü üzerine protein yapısı da etkili olmaktadır. Soya proteinleriyle kıyaslandığında buğday gluten proteinlerinin çözünürlüğü hidrolizden daha fazla etkilenmektedir. HD %10' dan fazla olduğunda, buğday gluten hidrolizatının çözünürlüğü izoelektrik noktada %90' ı geçmektedir. Yağsız etin alkalaz ile hidrolizinde HD %10-15 olduğunda ise çözünürlük %85 olmaktadır. Yağsız et ile yapılan çalışmada, çözünürlüğün reaksiyon karışımındaki protein miktarına da bağlı olduğu saptanmıştır. Patates protein konsantratinin (ilk çözünürlüğü yaklaşık % 70) %3 HD' ne hidrolizi çözünürlüğünü önemli derecede değiştirmemiştir. Bu durum soya protein izolatı ve bakla proteini için yapılan denemelerden farklıdır. Bu farklılık büyük çözünmeyen proteinler ile küçük çözünür proteinler/peptid substratlarının enzim için rekabet etmesinden kaynaklanmaktadır. Genellikle enzimler çözünür küçük protein ve peptid substratları üzerine daha fazla aktiftir (Nielsen, 1997).

Protein çözünürlüğünü kullanılan enzimin çeşidi de etkilemektedir. Soya proteininin pH 7 ve 8' de alkalaz ile hidrolizi sonucunda elde edilen ürün, sumizim ile elde edilene göre daha yüksek çözünürlük göstermiştir (Adler-Nissen, 1986). Mullally et al., (1994) birçok ticari proteaz kullanarak hazırladıkları α -laktalbumin hidrolizatlarının çözünürlüklerini, gıda ürünlerinin tipik pH aralığında yer alan pH 6.6' da incelemişler ve bunların HD % 3.9-15.8 aralığındaki çözünürlüklerinin % 78-100 aralığında değiştiğini saptamışlardır. Bu çalışmada HD ile farklı enzimlerle

elde edilen çözünürlükler arasında korelasyon bulunamadığından, çözünürlükteki artış kullanılan enzim çeşidiyle ilişkilendirilmiştir. Monti and Jost (1978) peynir altı suyu proteinini, tripsin, papain ve nötral proteaz ile hidroliz etmiş ve tripsin ile elde edilen hidrolizatın pH 6.0' daki çözünürlüğünün % 90' dan fazla olduğu, ancak diğer iki enzimle elde edilen hidrolizatların maksimum çözünürlüklerinin daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.

2.4.2. Protein hidrolizatlarının emülsiyon özellikleri

Proteinler emülsiyon tipi işlenmiş gıdalarda surfektan olarak da kullanılmaktadır. Buna örnek olarak salata soslarında peynir altı suyu protein konsantratu, emülsiyon ile üretilmiş et ürünlerinde soya proteini ve kazeinin kullanımını verebiliriz. Proteinlerin kısmi hidrolizi genellikle polar, hidrofilik grup sayısını artırmakta, moleküler ağırlığını azaltmakta, globuler yapıyı değiştirmekte ve proteinin içine gizlenmiş hidrofobik grupların açığa çıkmasına neden olmaktadır. Bu değişiklikler emülsiyon özelliklerindeki deyiştirmektedir (Nielsen, 1997).

2.4.2.1. Emülsiyon özellikleri üzerine hidroliz derecesinin etkisi

Soya proteininin alkalaz ile yaklaşık %5 HD' ne kadar hidrolize edildiğinde elde edilen hidrolizatların emülsiyon kapasitesinin (EK) önemli düzeyde arttığı saptanmıştır. Nötraz enziminin ise etkisi daha düşük bulunmuştur. Bu da enzimlerin spesifitesinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Peynir altı suyu konsantratinin nötraz ile %10 HD' ne kadar hidrolizi sonucunda emülsiyon kapasitesinde artış saptanmış, ancak alkalaz ile %10 HD' nden daha fazla hidrolizin emülsiyon kapasitesinde düşüşe neden olduğu gösterilmiştir (Nielsen, 1997).

Mahmoud et al. (1992) kazeinin pankreatin enzimi ile hidrolizi sonucunda (HD %25-67) HD arttıkça emülsiyon aktivitesinin azaldığını saptamışlardır. Başka çalışmalarda *S. aureus*' dan elde edilen ve uç kısımlara spesifik olan V-8 proteazı ile kazeinin düşük HD' nde (%2 ve %6.7 HD) emülsiyon aktivitesinin geniş bir pH aralığında önemli düzeyde azaldığı saptanmıştır. Ancak HD %2 olan hidrolizatta emülsiyon stabilitesinin doğal kazeinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. V-8 proteazı glutamata spesifik ve glutamatlar kazeinin primer yapısında homojen bir şekilde bulunduğu için, bu HD' lerinde düşük emülsiyon aktivitesi

beklenmemektedir. Bu durumun C-terminalinde glutamat kalıntıları bulunduran peptidlerin kendilerine has özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Nielsen, 1997). Tripsin kullanılan benzer bir çalışmada kazeinin sınırlı hidrolizi ise emülsiyon aktivitesini artırmıştır, bu da kullanılan enzimin spesifiliğinin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Fakat bu hidrolizatların emülsiyon stabiliteleri kontrolden daha düşük bulunmuştur. Bunun nedeni oluşan peptidlerin emülsiyona yüksek stabilite kazandıracak kadar amfilik karakterli olmamasıdır (Nielsen, 1997).

Soya fasulyesinde ve bakladaki 11S globulinlerinin (glisinin) kısmi hidrolizi sonucunda yüksek moleküler ağırlıklı legumin-T' nin oluşumuyla emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi artarken, hidrolizin ilerleyen aşamalarında legumin-T' ninde hidrolizi sonucunda bu değerler azalmıştır. Bu değerlerin artışı, gizlenmiş hidrofobik grupların açığa çıkmasına bağlanmıştır. Proteinlerin yüzeyindeki hidrofilik peptidlerin kaybı, doğrudan yüzey hidrofobisitenin artmasıyla sonuçlanabilir. Bu da yüzey adsorpsiyonunu destekler. Aşırı hidrolizin zararlı etkisi ise globuler yapının kaybı ve parçalanmış peptidlerin optimum boyutuyla ilgilidir. Bu durum yağ damlalarının etrafında daha ince bir protein tabakası ve stabilitesi düşük emülsiyon oluşumuna neden olmaktadır (Schwenke, 1997).

2.4.2.2. Emülsiyon özellikleri üzerine pH' nın etkisi

Proteinlerin bulundukları ortam pH' sındaki taşıdıkları yük emülsiyon özelliklerini etkilemektedir. Protein hidrolizatlarının emülsiyon kapasiteleri genellikle izoelektrik pH' da düşüktür. Fakat izoelektrik pH' da tuz ilavesi emülsiyon özelliklerini geliştirmektedir (Turgeon et al., 1992).

2.4.2.3. Emülsiyon özellikleri üzerine enzim etkisi

Protein hidrolizinde kullanılan enzimin çeşidi, hidrolizatın emülsiyon özelliklerini etkilemektedir. Peynir altı suyu proteinlerinin tripsin, kimotripsin, papain, pepsin, termolizin ve spesifik olmayan *Bacillus* proteazları ile hidroliz edildiği bir çalışmada; tripsin ve kimotripsin ile oluşturulan oligopeptidlerin ara yüzey geriliminde hızlı bir azalma olmuştur. Triptik preparat haricinde diğer peptid preparatları çok zayıf emülsiyon aktivitesi göstermiştir. Triptik preparatla hazırlanan emülsiyonun stabilitesi de yüksek bulunmuştur. Triptik preparatların mükemmel emülsiyon özelliklerine sahip olması peptidlerin konformasyonlarına

bağlanmıştır. Bu peptidler C-terminallerinde lizin ve arjinin içermektedir (Nielsen, 1997).

Bir başka çalışmada ise immobilize tripsin, kimotripsin ve Rizozim-41 kullanılan ve %5 HD' ne kadar hidrolize edilen kazeinin emülsiyon özelliklerinin önemli düzeyde arttığı saptanmıştır. En yüksek emülsiyon aktivitesi Rizozim-41 ile sağlanmıştır (Nielsen, 1997).

Bir diğer çalışmada tripsin, kimotripsin ve pepsin ile hidrolize edilen peynir altı suyu protein izolatının, emülsiyon özellikleri incelenmiştir. Hidrolizatlarla yapılan emülsiyonlar hidrolize edilmemiş kontrolle göre daha küçük yağ damlaları ve daha homojen damla boyut dağılımı göstermiştir. Kimotripsin hidrolizatları ile yapılan emülsiyonlardaki yağ damlacıkları elektron mikroskobu ile incelendiğinde; tripsin ve pepsin hidrolizatlarıyla elde edilen emülsiyonlara göre uygun kalınlıkta ve daha homojen bir protein tabakası ile çevrelendikleri ortaya konmuştur. Bu sonuçlar peynir altı suyu protein izolatlarının, emülsiyon özelliklerini geliştirmek için kimotripsinin, tripsin ve pepsinden daha iyi bir enzim olduğunu göstermiştir. Ancak bu çalışmada emülsiyon stabiliteleri hakkında veri sunulmamıştır (Nielsen, 1997).

2.4.3. Protein hidrolizatlarının köpük özellikleri

Proteinin ideal bir köpük oluşturma ajanı olabilmesi için hava-su ara yüzeyinde hızla yayılabilme yeteneğinde olmalı ve konformasyonel değişim ile kohesiv, elastik film oluşturmalıdır. Köpük özellikleri protein moleküllerinin yüzeyinde açığa çıkan hidrofobik aminoasitlerin miktarına bağlıdır. Dispersiyondaki protein, su-hava arayüzeyinde yüzey geriliminin düşmesine sebep olur ve böylece köpük oluşur (Wang et al., 2008).

2.4.3.1. Köpük özellikleri üzerine hidroliz derecesinin etkisi

İki farklı soya protein izolatının köpük kapasitesi hidroliz ile önemli düzeyde artmış ve maksimum köpük kapasitesi HD %3.5' de elde edilmiştir. HD %3.5-6.0 aralığında ultrafiltrasyon uygulanmış (doğal formu korunan) soya proteininden elde edilen hidrolizatlarda köpük kapasitesi azalmazken, asit ile çöktürülmüş (kısmen denature olmuş) soya proteini ile yapılan hidrolizat da köpük kapasitesi azalmıştır. Bu veriler köpük oluşturma ajanı olarak soya proteinlerinin, yumurta akı yerine kullanılmak üzere modifiye edilebileceğini göstermiştir. Buğday gluten hidrolizatları

ile yapılan çalışmalarda maksimum köpük kapasitesinin oldukça düşük HD' lerinde elde edildiği gösterilmiştir. HD %2-3' de %600 oranında havanın yapıya katılabildiği (overrun) saptanmıştır (Nielsen, 1997). Köpük kapasitesinde önemli artış yer fıstığı proteinlerinin papain ile kısmi hidrolizi ve ayçiçeği proteinlerinin pepsin ile hidrolizinde de görülmüştür (Schwenke, 1997).

Proteinlerin enzimle kısmi hidrolizi ve üç boyutlu yapının açılması, peptidlerin yeniden düzenlenmesine ve su-hava ara yüzeyinde bir film oluşumuna yardımcı olmaktadır. Fakat oluşan film köpüğü stabil olacak kadar kalın ve viskoelastik değildir. Aşırı protein hidrolizi sonucunda oluşan kısa peptidler yağ-su veya hava-su ara yüzeyinde kararlı filmler oluşturmamaktadır. Proteolitik modifikasyon genellikle köpük oluşturma kuvvetini artırsa da, köpük stabilitesini azaltmaktadır. Köpük kapasitesindeki büyük artış ve köpük stabilitesindeki önemli azalma, bakla protein izolatının kısmen termitaz ile hidroliz edilmesi (HD %3.2-8.3) sonucunda da belirlenmiştir. Buğday gluteninin köpük kapasitesi termitaz uygulaması (HD %5.2-9.8) ile önemli düzeyde değişmezken, HD arttıkça köpük stabilitesi değerleri önemli düzeyde azalmıştır (Adler-Nissen, 1986; Schwenke, 1997). pH 11.2' de köpük oluşturmayan doğal mısır proteinleri tripsin ile kısmen hidrolize (HD %1.4-1.9) uğratıldığında köpük kapasitesi değerinde önemli artış olmuştur. Fakat oluşan köpük stabil değildir (Casella and Whitaker, 1990). Çeşitli enzimlerle buğday gluteninin kısmi hidrolizi ile çözünürlüğünün arttığı ve hidroliz derecesi %1-2 aralığındaki gluten hidrolizatlarının iyi emülsiyon ve köpük özellikleri göstermesine karşın köpük stabilitelerinin çok düşük olduğu saptanmıştır (Linares et al., 2000). Mimouni et al (1994) %1.25 HD' nde gluten proteinlerinin pepsin hidrolizatının %80 çözünürlük gösterdiğini fakat pH 7' de zayıf köpük stabilitesi sergilediğini saptamışlardır. Bu da gösteriyor ki yüksek çözünürlük diğer fonksiyonel özelliklerin geliştirilmesi için yeterli olmamaktadır. Mısır proteini (zein) köpük oluşturmazken, tripsin ile elde edilen hidrolize mısır (HD %1.42, 1.7 ve 1.87) ürünleri köpük oluşturabilmektedir. Köpük stabilitesi HD' ne bağlı olup sadece %1.87 HD' nde stabil köpük elde edilmiştir (Casella and Whitaker, 1990). Ancak bu sonuçlar diğer bazı çalışmalarla uyumlu değildir. Örneğin *B. subtilis* proteazı ile yapılan soya protein hidrolizatının köpük kapasitesi HD yaklaşık %10' da maksimum seviyededir. *Aspergillus oryzae*' den elde edilen enzim ile yapılan soya protein hidrolizatları da, %20' ye kadar artan HD' lerinde daha yüksek köpük kapasitesi

göstermiştir. Peynir altı suyu protein hidrolizatı için HD arttıkça köpük stabilitesi azalmakta ve köpük kapasitesi artmaktadır. Maksimum köpük kapasitesi oldukça yüksek HD' nde (%10) elde edilmiştir (Nielsen, 1997).

2.4.3.2. Köpük özellikleri üzerine pH' nın etkisi

Proteinlerin üzerindeki net yük arttıkça köpük oluşturma eğilimide artmaktadır. pH 2 ve 9' da yüksek köpük hacmi elde edilirken, peynir altı suyu proteinlerinin izoelektrik pH' sı yakınlarında düşük köpük hacimleri elde edilmiştir. Köpük stabilitesi asit pH da düşüken, pH>6' da pH arttıkça stabilite de artmıştır (Nielsen, 1997).

Isı ve pH işlemlerinin birlikte uygulanması peynir altı suyu protein hidrolizatlarının köpük oluşturma özelliklerini etkilemiştir. Hidrolizatların ısıtılması sırasında pH, köpük özellikleri üzerine HD' nden çok daha fazla etkili olmuştur. pH 8.0' de ısı işlem uygulanması, köpük özelliklerini önemli düzeyde geliştirmiştir (Nielsen, 1997). Olden (1984) soya protein hidrolizatın da köpük kapasitesi üzerine pH' nın etkisini incelemiş ve maksimum köpük kapasitesini pH 4.5' de sağlamıştır.

2.4.3.3. Köpük özellikleri üzerine enzim etkisi

Protein hidrolizatlarında bulunan düşük moleküler ağırlıklı peptidler ve serbest aminoasitler köpük oluşturma özelliğini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle sınırlı moleküler ağırlık dağılımı gösterecek şekilde hidrolize neden olan enzim ideal enzimdir (Nielsen, 1997). Soya protein hidrolizatlarında en iyi köpük oluşturma özellikleri, *Mucor miehe*' den elde edilen mikrobiyal kaynaklı aspartaz kullanılarak elde edilmiştir. Çünkü bu enzim çok spesifik olup, soya proteininde çok az peptid bağına hidrolize ederek sadece belli bir aralıkta moleküler ağırlığa sahip peptid üretmektedir. %0.5 HD' nde hazırlanan soya protein hidrolizatı mükemmel köpük özellikleriyle yumurta akı yerine kullanılabilir hale getirilmiştir (Boyce et al., 1986). Alkalaz ile hidrolize edilen soya protein izolatının köpük kapasitesi, hidrolize edilmeyen kontrol örneğine göre 12 kat fazlayken, nötraz ile hidrolize edileninki sadece 4 kat fazla çıkmıştır. Fakat her iki durumda da maksimum köpük oluşumu HD %3-4' de sağlanmıştır (Nielsen, 1997).

Maksimum köpük kapasitesi için her bir proteine ait optimum HD bulunmaktadır. Fakat bunu belirlerken köpük stabilitesi de dikkate alınmalıdır. Düşük moleküler

ağırlıklı peptidler ve aminoasitler köpük stabilitesini olumsuz etkilediği için moleküler ağırlık dağılımı önemlidir. Bu nedenle yüksek spesifite gösteren enzimlerle proteinlerin hidrolizi veya istenmeyen küçük peptidlerin uzaklaştırılması köpük özelliklerini maksimize edecektir (Nielsen, 1997).

2.5. Buğday Gluten Proteinlerinin Modifikasyonu

Glutenin çözünmez yapısı fırıncılık ürünlerinde ekmek yapmak için istenen bir özellikken, bu özellik glutenin diğer gıdalarda kullanımını sınırlamaktadır. Bu durum primer yapısına özellikle de yapısında ağırlıkça yaklaşık %40 oranında amid tipi yan zinciri olan glutamin içermesinden kaynaklanmaktadır. Glutamin hidrofobik etkileşimlerle protein yapısını stabilize etmekte ve hidrojen bağı ile gliadin ve glutenin moleküllerinin bir arada bulunmasını sağlamaktadır. Bazı sisteinlerde moleküller arası bağ oluşturmaktadır. Prolin ve lösin gibi polar olmayan aminoasitlerin yüksek miktarda bulunması da hidrofobik etkileşimleri artırır.

Günümüzde gluten modifiye edilerek gıdalarda kullanım alanları genişletilmeye çalışılmaktadır. Genellikle su da çözünür veya en azından su da dağılabilir gluten üretimi amaçlanmaktadır. Bunun için asit veya alkali uygulaması ile deamidasyon işlemi yapılabilir (Wu et al., 1976). Deamidasyon sırasında glutaminlerin bir kısmından amid gruplarının uzaklaştırılması sonucunda potansiyel yük değişir ve böylece çözünürlük artar. Ayrıca asit deamidasyonunda bazı peptidlerde hidrolize olduğu için çözünürlük artar. Alkali uygulaması genellikle hidrolize yol açmaz, ancak sistindeki disülfid bağlarını kırabilir ve lizinoalanin oluşturmak üzere çapraz bağ yapabilir. Deamide gluten kolayca disperse olabildiği için gıdalarda emülsiyon ve köpük stabilizasyonunda kullanılabilir. Sülfirik asit, fosforik asit veya klorosulfonik asitle işlem gören gluten fazla miktarda hatta bazı durumlarda ağırlığının 200 katı su bağlayabilmektedir (Day et al., 2006). Suksinik anhidrat ile glutenin işlem görmesi durumunda ise izoelektrik pH'ındaki çözünürlüğü artmıştır (Barber and Warthesen, 1982).

Isıl işlem, ekstrüzyon, yüksek basınç ve UV radyasyon gibi fiziksel işlemlerle de modifikasyon yapılabilir. Ekstrüzyon ile et benzeri lifli yapıda gluten; düşük basınçlarda (200 MPa) gevşek yapıda gluten veya yüksek basınçlarda (800 MPa) sert yapıda gluten üretilebilmektedir (Rhim et al., 1999; Day et al., 2006).

Proteolitik enzimler ekmek, fırıncılık ürünleri, kraker ve gofret üretiminde ticari olarak kullanılmaktadır. Bunlar hamurun elle işlenme özelliklerini geliştirir, hamur yoğurma süresini kısaltır ve hamur hacmini artırır. Bisküvi ve kraker unlarına bu proteazların eklenmesi gluteni hidrolize eder, hamur elastikiyetini kaybeder, şekil vermesi kolaylaşır, şeklini korur ve toplanmaz. Ayrıca proteinlerin çözünürlük gibi özellikleri peptid bağlarının enzimatik hidrolizi sonucunda da modifiye edilebilir. Bu amaç için uygun ticari enzimler papain, bromelain, subtilisin, tripsin ve pronazdır. Enzimatik yöntemle hazırlanan preparatlar köpük stabilitesi ve emülsiyon oluşturma gibi özellikler bakımından deamide glutenle yaklaşık aynıdır. Farklı olarak enzimle çözünürlük kazandırılmış glutenin, hamur özellikleri üzerine olumlu etkisi vardır. Örneğin hamura %1-2 oranında katıldığında yoğurma süresini azaltabilmektedir. Fakat enzimle çözünürlük kazandırma işlemi sırasında fazla enzim aktivitesi sonucunda acı tada sahip küçük peptidler de oluşabilir (Day et al., 2006). Kara et al. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada bisküvi kalitesi üzerine iki farklı proteaz enziminin ve yüksek düzeyde süne zararı görmüş buğday ununun (HPAF) etkileri incelenmiş ve HPAF' nin bisküvi yayılma oranı üzerine etkisinin ticari proteazlarla karşılaştırılabilecek düzeyde olduğu gösterilmiştir.

Birçok ticari proteaz (pankreatin tripsin 6.0S, porcine pepsin, pankreatin ve alkalaz 2.4L) kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada en yüksek hidrolitik aktiviteyi (HD %15.8) alkalaz göstermiştir. Alkalaz ile farklı hidroliz derecelerinde (HD %5.0, 10.0 ve 15.0) hazırlanan gluten hidrolizatları pH 2-12 aralığında mükemmel çözünürlük (>% 60) göstermiştir. Ancak sadece düşük hidroliz derecesindeki (HD %5) hidrolizatın emülsiyon ve köpük oluşturma özellikleri, orijinal glutene göre önemli düzeyde yüksek bulunmuştur. Hidroliz derecesinin artması bu özelliklerde önemli düzeyde azalmaya neden olmuştur. Hidrolizatların molekül ağırlıkları SDS-PAGE ve boyut dağılım kromatografisi (SE-HPLC) ile incelendiğinde HD arttıkça daha küçük polipeptidlerin oluştuğu ve bu peptidlerin hava/su ve su/yağ ara yüzeyini stabilize edemediği saptanmıştır (Kong et al., 2007a;b)

Wang et al. (2006) elde ettikleri gluten hidrolizatını (HD %2.8) ultrafiltrasyon ile molekül ağırlığına göre dört fraksiyona (>100 kDa, 50<kDa<100, 20<kDa<50 ve <20 kDa) ayırmış ve ayrılan bu fraksiyonların fonksiyonel özelliklerini incelemişlerdir. Ultrafiltrasyon uygulanmamış hidrolizatın pH 2-10 aralığındaki

çözünürlüğü, glutene göre önemli düzeyde artarken, izoelektrik noktası 6-7' den 5' e kaymıştır. Ultrafiltrasyon sonrası oluşan fraksiyonların çözünürlükleri ise gluten ve ultrafiltrasyon uygulanmamış hidrolizata göre önemli düzeyde yüksek çıkmıştır. 50<kDa<100, 20<kDa<50 ve <20 kDa' luk fraksiyonların izoelektrik noktası pH 8' e kaymıştır. pH 2-10 aralığında en yüksek emülsiyon aktivitesi gösteren 50<kDa<100 fraksiyonu olmuştur. En stabil köpük ise >100 kDa fraksiyonu ile elde edilmiştir. Köpük stabilitesi hidrolizat fraksiyonlarında moleküler ağırlığı azaldıkça düşmüştür. Proteoliz sonrasında glutenin (<20 kDa fraksiyonu hariç), yüzey hidrofobisitesi kontrole göre önemli düzeyde artmıştır. En yüksek yüzey hidrofobisitesi >100 kDa fraksiyonunda elde edilmiştir.

Buğday gluteninin papain ile hidrolizi sırasında çözünür azot, aminoasitlerdeki azot ve peptid azotu miktarları izlenmiş ve çözünür azot miktarının giderek arttığı; peptid azot miktarın ise ilk 6 saatte artarken bu peptidlerin zamanla aminoasitlere veya daha küçük peptidlere parçalanmasıyla azalmaya başladığı saptanmıştır. Enzimatik hidroliz ilerledikçe molekül ağırlığı 15 kDa üzeri olan serbest peptid yüzdesi azalmış, molekül ağırlığı 5 kDa altında olan serbest peptidlerin yüzdesi ise önemli düzeyde artmıştır. Monomerik protein (gliadin) ve çözünür hale geçen glutenin, enzimatik hidrolize karşı daha hassasken, çözünmeyen glutenin enzimatik hidrolize karşı direnç göstermiştir (Wang et al., 2007b).

Isıl işlem uygulanmış buğday gluteni fungal proteaz ile düşük, orta ve yüksek hidroliz derecesinde parçalanmış ve hidrolizatların çözünürlüğü ile köpük özellikleri farklı pH' larda belirlenmiştir. Bu çalışmada HD arttıkça çözünürlük artmış, fakat köpük özellikleri belli bir HD' nden sonra düşmeye başlamıştır. Düşük seviyede hidrolizle, geniş bir pH aralığında gluten proteinlerinin çözünürlüğü artarken, pH 9 ve 6.5' daki köpük özellikleri düzelmiştir (Drago and Gonzalez, 2001).

Gluten proteinlerinin fungal enzim ile hidrolize edildiği bir çalışmada hazırlanan hidrolizatlar karakterize edilmiştir. HD' ne ve ekstraksiyon pH' sına bağlı olarak hidrolizatların kompozisyonu en fazla düşük hidroliz derecesinde farklılık göstermiştir. Hidroliz derecesi arttığı halde pH 4' deki çözünürlük azalmıştır. Bu durum peptidlerin moleküler büyüklüklerinin yanı sıra net yüklerinin de önemli olduğunu göstermektedir. Çözünürlük daha küçük molekül ağırlığında ve daha hidrofil peptidler açığa çıktıkça artmaktadır (Drago, et al., 2008).

Gluten proteinleri çözünür hidrolizat verimini artıran sistein varlığında ve yokluğunda kimotriptik aktivite gösteren bir enzimle sınırlı düzeyde hidrolize edilmiş ve elde edilen hidrolizatlar inorganik membranlarla (MWCO 50 ve 100 kg/mol ZrO_2 membranlar) fraksiyonlarına ayrılmıştır. Membrandan geçen ve geçmeyen fraksiyonlar incelendiğinde, bu polipeptidlere ait molekül ağırlıklarının yaklaşık 17 kDa civarında olduğu, ayırımın molekül ağırlığından daha çok hidrofobik-hidrofilik gruplara göre olduğu saptanmıştır. Membrandan daha çok hidrofilik grupların geçtiği görülmüştür. Membranların üstünde kalan kısımlar hidrofobik peptidlerce zengin ve membrandan geçen kısımlar hidrofilik peptidlerce zengindir. Sisteinin eklenmesi ve ultrafiltrasyon membranlarının gözenek çapı,, hidrolizat fraksiyonlarının fonksiyonel özelliklerini etkilememiştir. Hidrolizatlar köpük oluşturmuş fakat köpükler stabiliteleri düşük çıkmıştır. Membrandan geçen fraksiyonlar sadece pH 6.5' da stabil olmayan köpük oluşturmuş ve emülsiyon oluşturmamıştır. Membran üstünde kalan fraksiyonda ise köpük ve emülsiyon stabiliteleri yüksek bulunmuştur (Berot et al., 2001; Larre et al., 2001; Popineau et al., 2002).

Linares et al. (2001,a;b) tarafından yapılan çalışmaların ilk kısmında gluten hidrolizatının (HD %1.4) fonksiyonel özellikleri üzerine iki farklı kurutma prosesinin etkileri incelenmiştir. Kurutma prosesi gluten hidrolizatlarının molekül ağırlık dağılımını, hidrofobisitesini ve çözünürlüğünü etkilememiştir. Fakat liyofilizasyon ile kurutulan hidrolizatın emülsiyon özellikleri püskürtme ile kurutulana göre daha yüksek bulunmuştur. Çalışmanın ikinci kısmında ise gluten hidrolizatının emülsiyon özelliği üzerine iki farklı emülsiyon oluşturma prosesinin (turbo-karıştırıcı, valf-homojenizatör) etkileri incelenmiştir.

Babiker et al. (1996) gluteni çeşitli proteazlar (kimotripsin, papain ve pepsin) ve zayıf asit kullanarak hidrolize etmiş ve elde edilen ürünleri transglutaminaz (TGase) ile işleme tabi tutarak geniş bir pH aralığında çözünür, şeffaf hale getirmişlerdir. TGase ile polimerizasyondan sonra hidrofobisite önemli derecede azalmıştır. Polimerize peptidlerin emülsiyon özellikleri proteaz ve asit ile elde edilen hidrolizatlara göre son derece iyi bulunmuştur. Köpük özellikleri de benzer şekilde polimerize ürünlerde iyi bulunmuştur. Proteaz ve asit ile elde edilen ürünler

acı tada sahipken, polimerizasyondan sonra bu tadın tamamen kaybolduğu saptanmıştır.

Agyare et al. (2008; 2009) tarafından yapılan çalışmada buğday gluteni kimotripsin ile farklı hidroliz derecelerinde (%6.4 ve %10.3) sınırlı düzeyde hidroliz edilmiş ve mikrobiyal transglutaminaz enziminin, hidrolizatların çözünürlük, emülsiyon ile köpük özellikleri üzerine etkisi farklı koşullarda (pH 4.0 ve 6.5; 0 ve 0.6 M NaCl; 20 ve 5 °C sıcaklıkta) incelenmiştir. Transglutaminaz uygulaması hidrolizatların çözünürlüğünü pH 4-7 aralığında 3-29 kat artırmıştır. NaCl ilavesi veya transglutaminazın inkübasyon koşullarını değiştirmek hidrolizatların çözünürlüğünü önemli düzeyde değiştirmemiştir. Transglutaminaz uygulaması sonucunda pH 4.0 ve NaCl bulunmadığında hava-su arayüzeyine peptidlerin adsorpsiyonunun artmasıyla kontrollere göre köpük kapasiteleri artmış; fakat pH 6.5' da kontrol ve transglutaminaz uygulanmış örnekler için köpük kapasitesi değerleri aynı çıkmıştır. Bunun tam tersine transglutaminaz uygulanmış hidrolizatların köpük stabilitesi değerleri kontrollerine göre pH 4.0' de azalmış, fakat pH 6.5' da önemli düzeyde artmıştır. 0.6 M NaCl ortamında örneklerin köpük stabilitesi ve kapasitesi değerleri ortam pH' sına bağlı olarak değişmiştir. Transglutaminaz uygulamasıyla emülsiyon aktivite indeksi pH 6.5' da 15 katı kadar artarken, emülsiyon stabilitesi değerleri emülsiyon sıcaklığı ve iyonik kuvvetten etkilenmiştir.

Linares et al. (2000) hafif asidik koşullarda enzimatik hidroliz yöntemi ile gluten proteinlerinin çözünürlüğünü arttırmıştır. %0-5 hidroliz derecesi aralığında gluten hidrolizatlarının ters-faz HPLC ile analizi sonucunda hem hidrofobik hemde hidrofilik peptidlerin serbest kaldığı görülmüştür. Hidrolizat dispersiyonlarının (3.75 mg/ml) emülsiyon ve köpük oluşturma özellikleri, bütün pH seviyelerinde ve tuz konsantrasyonların da hidroliz derecesi arttıkça düşmüştür. Diğer taraftan bu hidrolizat dispersiyonlarından ayrılan çözünür fraksiyonlar iyi fonksiyonel özellikler sergilemiştir. Çözünür fraksiyonlardaki hidrofilik ve hidrofobik peptidlerin oranı hidroliz derecesi, pH seviyesi ve tuz konsantrasyonuna bağlı çıkmıştır.

Bombara et al. (1997) tarafından yapılan çalışmada buğday unu, proteolitik hidrolize uğratıldığında çözünürlüğü 25 kDa' dan daha küçük proteinlerin oluşumuna bağlı olarak artmıştır. Kısmi hidroliz keklerin hacim, nem ve iç rengi gibi kalite parametrelerini olumlu etkilemiştir. Viskozite ve köpük stabilitesindeki

azalma, yüksek molekül ağırlıklı glutenin proteinlerinin aşırı hidrolizine bağlanmıştır. Farinograf su absorpsiyon değerinin kısmi hidrolizle artışıda, polar uçların ve protein ağırlığının esnekliğinin artışına bağlanmıştır.

Mason et al. (1986) pH 2' de pepsinle, glutenin proteinlerinin, gliadinden daha hızlı parçalandığını göstermiştir. Hidrolizin ilerleyen aşamalarında glutenin proteinleri 24kDa, gliadin proteinleri 14 kDa' luk peptidlerine kadar hidrolize olmuştur. Hidrolizin son aşamalarında ise <10 kDa peptidler ve serbest aminoasitler oluşmaya başlamıştır. Elde edilen polipeptidler prolin ve glutamat aminoasitlerince zengin bulunmuştur.

Motoi et al. (2004) deamidasyon işleminden sonra gluten proteinlerini, immobilize edilmiş pepsin ve rapidaz enzimleri ile hidrolize etmiş ve böylece hem hidrolizin başlangıç hızını artırmış, hem de köpük özelliklerinin gelişmesini sağlamıştır.

Hong et al. (2001) buğday gluten proteinlerini önce zayıf asitle 95 °C' de 1 saat işleme tabi tutarak çözünürlüğü artırmış ve böylece agregasyonla proteinin jelleşmesi engellendiği için enzimatik hidroliz prosesini hızlandırmıştır. Bu çalışmada alkalaz ve "flavourzyme" enzimleri ile 24 saat hidrolizasyondan sonra nitrojen çözünürlük indeksi %94.9' e çıkmış ve moleküler ağırlığı 300 Da' nın altında peptidler ve aminoasitler oluşmuştur.

Mimouni et al. (1999) gluten proteinini, asit deamidasyonundan sonra iki enzim ile hidrolize etmişler ve bunun fonksiyonel özelliklerini yumurta akı proteini, kazein, deamide gluten ve deamidasyondan sonra bir enzimle hidrolize olmuş glutenle kıyaslamışlardır. Deamidasyon ve ikili enzim (pepsin ve papain) ile ve sadece ikili enzim sistemi (pepsin+alkalaz) ile hazırlanmış hidrolizatların çözünürlükleri diğerlerinden daha yüksek (>%90) çıkmıştır. Glutenin pepsin veya papain ile işlem görmesi çözünürlüğü artırdığı için emülsiyon kapasitesini artırmış ancak emülsiyon stabilitesini düşürmüştür. Bu durum ortam pH' sına bağlı olarakda değişmiştir. Köpük ve emülsiyon özelliklerinin (özellikle stabilite değerlerinin) sırasıyla HD %1.3 ve 2' den sonra düştüğü saptanmıştır. İkili enzim sistemi ise köpük kapasitesini daha fazla artırmış ancak stabilite hala çok düşük kalmıştır. Köpük özellikleri gluten sadece çok az modifiye edildiğinde iyi çıkmıştır

Wang et al. (2008) gluteni papain ile hidrolize etmiş ve ardından ultrafiltrasyon ile fraksiyonlarına ayırmıştır. Hidroliz sonrasında çözünür kısımdaki peptidlerin molekül ağırlıklarının genelde 5-15 kDa arasında değiştiğini saptamıştır. Ultrafiltrasyon sırasında membrandan geçen katı miktarında ve protein içeriğinde çok az bir artış saptanmıştır. Bu da hidrolize olan polipeptidlerin bazılarının ve hidrolize olmamış proteinlerin ultrafiltrasyon membranından geçemediğini göstermektedir. Enzimatik hidroliz ile glutenin yüzey hidrofobisitesi artmıştır. Hidrofobik grupların artması hidrofobik gruplar ve yağ arasındaki etkileşimi artırdığı gibi köpük kapasitesini de artırmaktadır. Ultrafiltrasyon işlemiyle modifikasyon sonucunda hidrolizatların yüzey hidrofobisitesinde önemli bir değişiklik olmamıştır. Hidrolize gluten ve ultrafiltrasyon uygulanmış gluten hidrolizatında çözünürlük özellikleri pH 3-10 aralığında önemli düzeyde artmıştır. Orijinal glutenin pH-çözünürlük eğrisi çan şeklinde olup pH 7' de minimum çözünürlük (izoelektrik nokta) göstermiştir. Ultrafiltrasyon uygulanmamış hidrolizatın pl değeri 6' ya (pH 6' da %41.8 çözünürlük) kaymıştır. Ultrafiltrasyon uygulanmış gluten hidrolizatının çözünürlüğü her pH' da glutene ve gluten hidrolizatına göre daha yüksek bulunmuş ve pl değeri 5' e kaymıştır. Her iki modifiye gluten de alkali pH' da asidik pH'lara göre daha iyi çözünürlük göstermiştir. Çözünürlükteki bu artışlar daha küçük moleküler ağırlıklı peptidlerin oluşmasına ve hidrofilik/hidrofobik grupların oranını değiştiren iyonize olabilen amino ve karboksilik grupların açığa çıkmasına bağlanmıştır. Her iki modifiye gluteninde köpük kapasitesi pH 5, 7 ve 8' de önemli düzeyde artmıştır. Bu durum sınırlı düzeyde enzimatik hidroliz sonucunda daha fazla polipeptid zincirinin açığa çıkması ve böylece daha fazla havanın yapıya alınmasıyla birlikte yüzey aktivitesinin arttığını gösterir. Köpük kapasitesindeki artış hidroliz ile çözünürlükteki artışa bağlanmıştır.

Popineau and Thebaudin' in (1990) çalışmasında gluten, gliadin ve glutenin proteinleri nötraz enzimiyle kısmi olarak hidrolize edilmiş. Glutenin proteinleri enzime daha hassas bulunurken, molekül içi disülfid bağları ve aminoasit dizilimden dolayı gliadin proteinleri proteaz enzimlerine dirençli bulunmuştur. Gluten proteini pH 6-8 aralığında en düşük çözünürlük (%0.6) gösterirken, hidroliz ile çözünürlüğü (%75-85) artmıştır. Hidrolizatlar pH 7' de minimum çözünürlük göstermiştir. Hidrolizatların emülsiyon stabilitesi pH 4' de pH 7' ye göre daha yüksek bulunmuştur.

2.6. Gluten Proteinlerinin Biyoaktif ve Antioksidatif Özellikleri

Gluten besinsel değer açısından hayvansal proteinlere göre düşük kalitededir. Çünkü esansiyel aminoasitler, lizin ve treonin açısından fakirdir. Fakat kas/vücut yapısını kuvvetlendirmede önemli bir yeri olan glutamin bakımından zengindir (Krull et al., 1966; Day et al., 2006). Glutamin vücutta çok fazla bulunan bir aminoasittir. Sindirim ve bağışıklık sisteminde hızla çoğalan hücreler enerji kaynağı olarak glutamini tercih eder. Glutamin esansiyel bir aminoasit olmasa da beslenme yetersizliği, ameliyat sonrası iyileşme dönemi, bağışıklık sistemindeki rahatsızlıklar ve kritik bazı hastalıklar boyunca yerine göre vazgeçilmez bir aminoasit olabilmektedir. Glutamin gereksinimi egzersiz ve hastalık gibi stres yaratan durumlarda da artmaktadır. Bu nedenle sporculara glutamin yüklemesi önerilir. Glutamin alımı karaciğer, akciğer ve bağışıklık fonksiyonlarını düzenler ve kuvvetli egzersiz sonrası kas dokunun yıkımını azaltır. Serbest glutamin ile N-terminalde bulunan ve amino grubu açıkta kalan peptide bağlı glutamin, sulu çözeltilerinde kararsızdır, bunlar sulu çözeltilerinde piroglutamik asite dönüşürler ve bunlar biyolojik olarak aktif değildirler. Glutaminin en kararlı formu glutamin içeren dipeptidler (alanilglutamin) ve hidrolize buğday proteinleri gibi içerisinde glutamin bulunan peptidlerdir. Günümüzde bazı içeceklere ve tıbbi formülasyonlara bu tip preparatlar ilave edilmektedir (Sato et al., 1998, 2003; Sawaki et al., 2004; Horiguchi et al., 2005).

Gıda proteinlerinin enzimatik hidrolizi sonucunda çeşitli biyoaktif peptidler (antioksidan, opioid yani uyuşturucu etkisi olan, bağışıklığı düzenleyici, mineral taşıyıcı, antimikrobiyal ve kan basıncını düşüren peptidler) açığa çıkmaktadır. Pekçok proteinin hidrolizi sonrasında açığa çıkan ürünlerin, lipid veya yağ asitlerinin peroksidasyonuna karşı antioksidan aktivitesi saptanmıştır (Amarowicz and Shahidi, 1997; Chen et al., 1998; Hattori et al., 1998; Suetsuna, 2000; Rival et al., 2001, Sakanaka et al., 2004). Antioksidan aktivite mekanizması, protein moleküllerinin adsorpsiyonu sonucunda linoleik asitin yüzey alanının artması olarak açıklanmaktadır. tirozin, metiyonin, lizin ve triptofan aminoasitleri, bazı durumlarda prooksidatif etkiye sahip olmalarına karşın genellikle antioksidan olarak kabul edilmektedirler (Suetsuna and Chen, 2002). Kawashima et al. (1979) pekçok sentetik peptidin lipid oksidasyonu üzerine etkisini incelemiş ve dallanmış yan zincirli aminoasitler (valin, lösin, izolösin) içeren bazı peptidlerin antioksidan

özellikler gösterdiğini bulmuştur. N-terminalde alanin, tirozin, histidin ve metiyonin bulunan bu dipeptidlerin antioksidan aktivitelerinin sulu sistemdeki aminoasit karışımlarından daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Antioksidan özellik gösteren peptidlerin aktivitesi ve yapısı arasındaki ilişki, Chen et al. (1998) tarafından incelenmiş ve yüksek antioksidan aktivite gösteren peptidlerin hidrofobik aminoasitlere, N-terminalde valin veya lösin ve dizilimlerde prolin, histidin ve tirozine sahip olduğu bulunmuştur. Decker et al. (2001) iskelet kaslarında ve sinir dokusunda bulunan β -alanilhistidin dipeptidinin (karnosin) antioksidan etki mekanizmasının bakır gibi metal iyonlarıyla kelat oluşturmaya bağlı olduğunu göstermiştir. Antioksidan özellikteki His içeren peptidlerin yapı-aktivite ilişkisi tam olarak tanımlanamasa da, bu aktivite hidrojen verme yeteneği, lipid peroksil radikal tutuklama ve/veya imidazol grubun metal iyonu ile kelat oluşturma yeteneğiyle ilişkilendirilmiştir.

Glutendeki aminoasitlerin %50' den fazlası glutamik asit/glutamin ve prolin' den oluşmakta; aminoasitlerinin yaklaşık %30' u hidrofobik olup bu aminoasitler hidrofobik interaksiyonla glutenin agregat oluşturmaya ve polar olmayan maddelere bağlanmasına katkıda bulunmaktadır (Fennema, 1996). Buğday gluteni yağa ve diğer polar olmayan maddelere karşı kuvvetli affinite gösterdiği için gluten hidrolizatlarında yağ asitlerinin degradasyonunu önleyici etkilere sahip olabilmektedir. Suetsuna and Chen (2002) tarafından yapılan çalışmada farklı fraksiyonlara ayrılan gluten hidrolizatlarının bazısı antioksidan aktivite sergilerken bazısı göstermemiştir. Bu nedenle buğday gluten hidrolizatlarının antioksidan aktivitesinin peptidlerin bileşim veya yapısının sinerjik etkisinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu çalışmada en kuvvetli aktiviteye sahip fraksiyon, ters faz HPLC yöntemiyle saflaştırılmış ve bu peptidlerin Leu-Gln-Pro-Gly-Gln-Gly-Gln-Gln-Gly ve Ala-Gln-Ile-Pro-Gln-Gln dizilimine sahip olduğu gösterilmiştir. Burada linoleik asit oksidasyonunun, peroksil radikallerinin sönümüyle inhibe olabileceği düşünülmüştür.

Kong et al., (2008a) glutenin pepsin hidrolizi sonucu açığa çıkan ürünü ultrafiltrasyon ile farklı moleküler ağırlıklarında fraksiyonlamış ve bu fraksiyonlardan en yüksek antioksidan aktiviteyi en düşük molekül ağırlıklı (<5 kDa) ve en fazla hidrofobik aminoasit içeren fraksiyonun gösterdiğini

saptamışlardır. Wang et al. (2007a) glutenin papain hidrolizatının 5 kDa üzerinde ve altındaki peptid fraksiyonlarının hepsinin linoleik asit oksidasyon sisteminde kuvvetli antioksidatif aktivite sergilediğini belirlemiştir. pH 7' de 5 kDa' un altındaki fraksiyonun antioksidatif aktivitesi vitamin E ile yaklaşık aynı çıkmıştır.

Kong et al (2008b) tarafından yapılan çalışmada farklı enzimler ile hidrolize edilen gluten hidrolizatlarında opioid avtivite tespit edilmiş ve bu aktivitenin ultrafiltrasyonla ayrılan 3 kDa altındaki peptidlerde daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ancak bu peptidler çölyak hastalığının sebebi olarak da rol oynayabilmektedir.

Zihinsel bozukluklarla glutenin sindirimi arasındaki ilişkiyi ortaya koyan çalışmalar sırasında buğday gluteninin peptik hidrolizi sonucu açığa çıkan peptidlerin opioid aktivite gösterdikleri saptanmıştır. Opioid aktiviteye sahip bileşenler, ilaçlarda uyuşturucu olarak kullanılmakta olup bunların şizofreni ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca gluten hidrolizatları fırıncılık astımı, atopik deri hastalığı ve çölyak gibi allerjik hastalıklara yol açabilir (Mason et al., 1986; Motoi et al., 2004; Day et al., 2006).

2.7. Süne (*Eurygaster* spp.) Zararı

Ülkemizde tahıl üretimini sınırlayan faktörlerin başında çeşidin genetik özellikleri, yetiştirme koşulları, yabancı otlar ile hasat öncesi veya sonrası hastalıklar ve hububat zararlıları gelmektedir. Buğdayda hasat öncesi verim ve teknolojik kalitenin düşmesine neden olan hububat zararlılarının başında ülkemizde, süne (*Hemiptera: Pentadomidae*) ve kımıl (*Hemiptera: Scutelleridae*) gelmektedir (Kretovich, 1944; Paulian and Popov, 1980; Critchley, 1998). Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü verilerine göre, 2009 yılında ülkemizde 59 ilde, 53 milyon dekar alanda kontrol yapılmış ve 27 ilde, 12 milyon dekarlık alanda ilaçlı mücadele yapılmıştır ve bu zararlılarla mücadelede yaklaşık 7.5 milyon TL harcama yapılmıştır (Anonymous, 2010).

Süne (*Eurygaster* spp.) ülkemizde içinde bulunduğu 25°-55° kuzey enlemleri ile 20°-80° boylamları arasında kalan, Avrupa'nın kuzeyi hariç diğer Avrupa, Orta ve Yakın Doğu ile Kuzey Afrika ülkelerinde yaygındır. Almanya, Rusya, İspanya, Macaristan, Çek Cumhuriyeti, Yugoslavya, İtalya, Romanya, Bulgaristan,

Yunanistan, Türkiye, İran, Irak, Suriye, Ürdün ve Afganistan' da süne zararı görülmektedir (Paulian and Popov, 1980; Miller and Morse, 1996; Critchley, 1998). Yeni Zelanda' da ise *Nysius huttoni*, *Hudsona anceps* (Hemiptera: Lygidea) ve *Stenotus binotatus* (Hemiptera: Miridae) adlı zararlıların, buğdayda süneye benzer zarara neden oldukları belirlenmiştir (Swallow and Cressey, 1987; Lorenz and Meredith, 1988b).

Süne başta buğday (*Triticum aestivum*) ve arpa (*Hordeum vulgare*) olmak üzere öncelikle *Graminae* familyasındaki diğer türler üzerinde beslenir. Sünenin zarar derecesi ve şekli, zararlının yoğunluğuna, biyolojik dönemine, ürün çeşidi ve fenolojisine, iklim koşullarına (özellikle sıcaklık ve yağış) bağlı olarak değişmektedir. Sünenin kışlaklardan inişinden itibaren hububata verdiği zarar, buğdayın zarar gördüğü anda hangi olgunlaşma döneminde olduğuna bağlı olarak, kurtboğazı, akbaşak ve tane zararı olmak üzere üç kısımda toplanabilir (Paulian and Popov, 1980; Critchley, 1998). Kışlaklardan ovalara inen süne erginleri, kardeşlenme dönemindeki hububat saplarını emip özsuynunu alarak kurutmakta ve bu zarar sonucu bitki başak bağlayamamaktadır. Delinen sapın karakteristik şekilde sararması sonucu kurtboğazı (göbek kurusu) zarar şekli oluşur. Başakların henüz yaprak kılıfı içinde olduğu çiçeklenme döneminde, buğday sapının başağın hemen altından delinerek emilmesiyle başak tane bağlayamaz ve başağın tamamının veya bir kısmının kuruyarak karakteristik beyaz renk almasıyla ikinci zarar şekli olan akbaşak zararı meydana gelir. Hububatın tane bağladığı dönemde görülen tane zararından süt olum devresindeki buğday taneleri daha çabuk ve daha fazla, sarı olum devresindeki yani olgunlaşmış taneler ise daha az etkilenmektedir. Süt olum devresinde zarar görmüş taneler büyük ölçüde boşalıp buruşuk, cılız ve hafif olduklarından değirmendeki temizleme bölümünde kolayca ayrılabilir (Köksel et al., 2002). Bu zarar şeklinde buğdayın hektolitre ağırlığı, 1000 tane ağırlığı gibi fiziksel özellikleri olumsuz yönde etkilenmekte ve buğdayın öğütme kalitesi düşmektedir (Atlı vd., 1988; Lorenz and Meredith, 1988b). Ancak süne salgıladığı sindirim salgısı sayesinde sarı olum devresindeki sertleşmiş buğday tanelerini de yumuşatarak emilebilir hale getirebilmektedir. Genellikle tane üzerinde çöküntü ile birlikte açık renkli bir zonla çevrili bir veya daha fazla siyah nokta süne zararını işaret eder. Aşırı derecede zarar görmüş taneler tamamen buruşabilir. Sarı olum devresinde zarar görmüş tanenin şekli ve yoğunluğu fazla

etkilenmediğinden temizleme makinelerinde ayrılması mümkün olmamaktadır. Kurtboğazi ve akbaşak zararları buğdayda verim kaybına neden olurken, olgunlaşmanın ileri aşamalarında meydana gelen tane zararı buğdayın teknolojik kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir (Kretovich, 1944; Paulian and Popov, 1980; Critchley, 1998).

Süne zararının buğdayın ekmeklik kalitesini bozmasının nedeni, bu zararlının buğdayı emerek beslenmesi sırasında taneye bıraktıkları sindirim salgılarının olduğu belirlenmiştir. Süne emgili taneler una öğütüldüğünde, süne enzimi una geçer ve su ile hamur haline getirildiğinde, enzim aktif hale geçerek gluten proteinlerinin hidrolizi sonucunda hamur yumuşak ve yapışkan bir hal alır, elastikiyeti azalır, makinede işlenmesi güçleşir, gaz tutma kapasitesi düşer ve ekmek kalitesi bozulur (Kretovich, 1944; Lorenz and Meredith, 1988a; Critchley, 1998; Karababa and Ozan, 1998).

2.7.1. Süne proteazının bazı biyokimyasal özellikleri ve aktivite tayini

Kretovich (1944) tarafından yapılan çalışmada süne (*Eurygaster integriceps*) zararı görmüş buğdaylar da toplam azotlu madde miktarının azaldığı ve özellikle suda ve alkolde çözünen azotlu madde miktarında önemli derecede arttığı saptanmıştır. Süneli buğday tanelerinden su ile elde edilen enzim ekstraktında proteolitik aktivitenin, sağlam buğdaylardan elde edilen ekstrakta göre daha fazla olduğu extensibilite testi ile tespit edilmiştir. Süne enziminin, nötral veya kısmi bazik bir proteaz olduğu (pH 7.2), asidik pH' larda ise aktivitesinin düştüğü bildirilmiştir. Ayrıca 100°C' de 15 dakikalık bir ısı işlemi ile inaktif hale getirilebildiği ve düşük sıcaklıklarda enzim aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir.

Saflaştırılmamış enzim ekstraktı ile yürütülen bir diğer çalışmada süne proteazının, pH 8.5 ve 35°C' de optimum aktivite gösterdiği ve su da çözünen bir alkali proteaz olduğu saptanmıştır. İzoelektrik odaklama yöntemi ile pI değerinin 8.0 ve jel filtrasyon (Sephadex G-75) tekniği ile molekül ağırlığının (Mr) 15 kDa olduğu belirlenmiştir. Süne proteazı su ekstraktından amonyum sülfat ile çöktürme, jel filtrasyon ve iyon değişim (QAE Sephadex A-50) kromatografisi gibi tekniklerle 365 kat saflaştırılabilmektedir. Süne proteazı metalloproteazları inhibe eden EDTA ve asit proteazları inhibe eden pepstatin A' dan etkilenmezken, serin proteazlarda aktif bölgeyi inhibe eden tripsin inhibitörü ve SH- grubunu modifiye eden p-

kloromerküribenzoik asit (p-CMB) tarafından inhibe edilebilmiştir. Buda süne enziminin serin proteazların SH- grubu içeren bir alt grubunda yer aldığını göstermektedir (Sivri, 1998; Sivri and Köksel, 2000).

Süne enzim aktivitesi sonucunda gluten proteinlerinden en hızlı salınan aminoasit Phe (kontrole göre yaklaşık 10 kat artış) olarak bulunurken; Tyr, Pro ve Leu miktarları kontrol örneğine göre yaklaşık 4 kat; His ve Arg ise yaklaşık 3 kat arttığı belirlenmiştir. Bu aminoasitlerden özellikle Pro, Tyr ve Leu HMW-gluteninin alt birimlerinin merkezinde tekrarlanan dizilimler bölgesinde sık olarak yer alan aminoasitlerdir. Süne proteazının öncelikli olarak bu aminoasitleri hidrolize etmesi HMW gluteninin alt birimlerini hızla etkilemektedir (Sivri,1998; Sivri and Köksel, 2002).

Gluteninin kimyasal, fizikokimyasal ve reolojik özelliklerini belirlemek amacıyla kullanılan farinograf, alveograf, extensograf, infrared (NIR) spektrofotometre, Zeleny ve SDS-sedimentasyon testleri, unda süne zararını belirlemek için çeşitli şekillerde modifiye edilerek kullanılabilmektedir. Bu modifikasyonlar genellikle süne enziminin aktif duruma geçebilmesi için unun su ile muamele edilmesinden sonra uygun sıcaklıkta bekletilmesi şeklindedir (Kretovich, 1944; Greenaway et al., 1965; Every, 1991). Ayrıca süne enzimlerinin son üründe direk etkisinin görüldüğü test ekmek yapımı da bu amaçla kullanılmaktadır

Hemoglobin, azokazein, sitokrom-c, albumin, fibrin, jelatin, “hide powder”, benzoil-L-arjinin etil ester ve benzoil-L-tirozin etil esteri gibi çeşitli protein substratlarının *Nyctelia huttoni* proteaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılamayacağını gösterilmiştir (Every, 1991). Sivri and Köksel (2002), *Nyctelia* proteaz aktivitesini belirlemek üzere Every (1991) tarafından geliştirilen, suda ve SDS çözeltisinde çözünen jel proteinlerinin miktarının tespitine dayalı spektrofotometrik yöntemin modifiye edilerek süne proteaz aktivitesinin tayininde de kullanılabileceği göstermiştir. Ayrıca buğdayda polimerik glutenin (%50 1-propanolde çözünmeyen glutenin, 50 PI) miktarı ile gluten proteinlerinin kompozisyonu ve fonksiyonel özellikleri arasındaki korelasyona dayanan yöntemin de (Fu and Sapirstein, 1996) modifiye edilerek süne zararının tespitinde kullanılabileceği bildirilmiştir (Sivri and Köksel, 2002). Ayrıca glutenin ve farklı proteaz substratlarının (hemoglobin, azokazein, jelatin, “hide powder”, elastin, kolajen ve fibrin) süne proteazının

substratı olarak kullanıldığı bu çalışmada sadece glutenin ve jelatinin süne proteazı tarafından kullanıldığı, ancak süne proteaz aktivitesinin jelatin proteinleri üzerine etkisinin glutenin proteinlerine göre daha az olduğu gösterilmiştir.

2.7.2. Süne proteazının gluten proteinleri üzerine etkisi

Farklı gluten kalitesine sahip altı adet süne (*Eurygaster maura*) zararı görmüş saf buğday çeşitinden elde edilen kırma örnekleri, saf su ile ıslatılıp değişik sürelerde (15, 30, 60, 120 ve 240 dak) inkübasyona bırakıldıktan sonra, süne proteazının gliadin proteinleri üzerindeki etkisi asit-poliakrilamid jel elektroforez (A-PAGE), glutenin proteinleri üzerindeki etkisi ise sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemleri ile incelenmiştir. Süne proteazının gliadin ve glutenin proteinleri üzerinde inkübasyondan önce belirgin bir etkisinin olmadığı; ancak inkübasyonla birlikte hem gliadin hem de glutenin bant yoğunluklarında önemli azalmaların ortaya çıktığı ve inkübasyon süresinin artması ile bazı bantların tamamen yok olduğu tespit edilmiştir. SDS-PAGE sonuçları inkübasyon süresinin artması ile birlikte özellikle yüksek molekül ağırlıklı (High Molecular Weight, HMW) glutenin alt birimleri bölgesinde bant yoğunluklarının belirgin şekilde azaldığını, belli bir süreden sonra ise bu bölgede bulunan tüm bantların tamamen yok olduğunu göstermiştir. Kısa süreli inkübasyon sonunda HMW glutenin alt birimlerinin, proteaz etkisine karşı gliadin ve LMW glutenin alt birimlerine göre daha hassas olduğu tespit edilmiştir (Sivri and Köksel, 1996; Sivri 1998; Sivri et al., 1998; 1999).

Yeni Zellanda'da *Nysius huttoni* proteazının gluten proteinleri üzerine etkisinin elektroforez ile incelendiği bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ancak *Nysius* enziminin gliadin proteinleri üzerine etkisinin olmadığı veya çok az olduğu A-PAGE ile belirlenmiştir. Buna karşılık enzim aktivitesi sonucu gliadin bant deseninde mobilitesi, en düşük mobiliteli gliadinlerden daha düşük olan yeni bir bant tespit edilmiştir. Özellikle buğdayın ekmeklik kalitesi üzerinde önemli etkisi olduğu bilinen HMW glutenin altbirimleri bölgesinde enzim aktivitesi sonucunda pek çok bandın yok olduğu, LMW glutenin altbirimleri bölgesinde ise iyi bir ayırım sağlanmamış olmakla birlikte, bu bölgedeki bantların yoğunluklarında da azalma olduğu tespit edilmiştir (Cressey and McStay, 1987).

Süne proteazının polimerik glutenin (50PI) ve glutenin alt birimleri (HMW ve LMW) üzerine etkisi Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (Reverse Phase High Performans Liquid Chromotography, RP-HPLC) tekniği ile kantitatif olarak tespit edilmiştir. RP-HPLC sonuçları, inkübasyonun ilk 30. dakikasında tüm buğday çeşitlerinin toplam polimerik glutenin, HMW ve LMW glutenin alt birimleri miktarlarının önemli oranda azaldığını (>%80) göstermektedir. Ayrıca süne proteazının HMW:LMW oranlarında da önemli azalma ve süne proteazının HMW glutenin alt birimlerine spesifitesinin yüksek olduğunu göstermiştir (Sivri, 1998; Sivri et al., 1999; Sivri et al., 2002).

İki boyutlu (2D) elektroforez ve moleküler büyüklüğe göre ayırım yapan Yüksek Performanslı Likid Kromatografi (SE-HPLC) kullanılarak aynı buğday çeşitinin sağlam ve süne zararı görmüş taneleri ile yapılan bir çalışmada, genel olarak örneklerin protein haritasında önemli bir farklılık gözlenmemiş, ancak bir grup proteinin pI noktalarının bazik bölgeye doğru kaydığı gözlenmiştir (Sivri et al, 2004). SE-HPLC sonuçları ise süne zararı görmüş buğdaylarda polimerik glutenin miktarının önemli oranda azaldığını göstermiştir. Benzer sonuçlar süne zararı görmüş durum buğday (makarnalık) çeşitleri içinde saptanmıştır (Olanca et al., 2009)

Rosell et al (2002) farklı buğday çeşitlerinin protein fraksiyonları üzerine süne (*Eurygaster* spp.) ve kımıl (*Aelia* spp.) enzimlerinin etkisini yüksek-performanslı sıvı kromatografisi (SE-HPLC) ve serbest-bölge kapılar elektroforez (Free-zone capillary electrophoresis, FZCE) teknikleri kullanarak araştırmışlardır. Sonuçlar, süne proteinaz enzimi etkisi sonucunda %50 1-propanolde çözünen polimerik protein miktarında önemli oranda azalma olduğu; buna karşılık globulin, albumin ve gliadin miktarında ise artış olduğunu göstermiştir. FZCE' in süne zararının tespitinde kullanılabileceği belirtilmiştir.

2.8. Proteinlerin Karakterizasyonu (Proteomiks)

İki boyutlu (2-D) elektroforez proteinleri iki farklı fizikokimyasal parametreyi kullanarak ayırmaktadır. İzoelektrik odaklama (IEF) olarak bilinen birinci boyut proteinleri immobilize pH gradientinde (IPG) ayırmaktadır. Proteinler göç eder ve izoelektrik nokta (pI) olarak adlandırılan net yükün sıfır olduğu noktada dururlar. İkinci boyut sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE)

kullanarak proteinleri sadece molekül ağırlıklarına göre ayırır (Skylas et al., 2005). Son zamanlarda protein bileşiminin karakterizasyonunda proteomiks önemli bir yaklaşımdır. Proteomiks farklı genotiplerin, farklı dokulardan veya farklı koşullarda yetişen aynı genotiplerin protein bileşimini karşılaştırma imkanı sağlamaktadır. Proteomiks, mikroanalitik işlemlerle (N-terminal dizilim analizi, kütle spektroskopisi) ve ardından veri tabanı analiziyle birleşen yüksek ayırıcılığa sahip 2-boyutlu (2-D) elektroforezi kapsamaktadır. Proteomiks gluten proteinlerinin süne proteaz enzimiyle modifikasyonu sonucu meydana gelen degradasyon ürünlerini incelemek için uygun bir yöntemdir. Son zamanlarda bu yaklaşım buğday endosperm proteinlerindeki dane gelişimi, ısı şok ve süne proteaz enzimi ile hidrolizi sonucunda meydana gelen değişimleri incelemek amacıyla başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Skylas et al., 2002; Sivri et al., 2004).

2.9. Proteinlerin Dinamik Işık Saçılımı (DLS) ile Boyut Dağılımının İncelenmesi

Dinamik Işık Saçılımı (DLS) çözeltideki biyomoleküllerin boyutunu kısa sürede karakterize edebilen bir metottur. DLS homojen monodispers (aynı büyüklükteki küçük parçacıklar) bir örnek ile agregatı ayırmak için de kullanılmaktadır. Işık saçılım metotları seyreltik çözelti içerisindeki küçük parçacıklardan saçılan ışığın şiddetinin ve değişiminin ölçülmesi temeline dayanır. Kolloidal süspansiyonlar iki temel ışık saçılımı yöntemiyle karakterize edilir. Statik ışık saçılımı yönteminde ışık saçılımının şiddeti ölçülerek polimerlerin molekül ağırlığı, dönme yarıçapı ve ikinci viral katsayı belirlenir. Dinamik ışık saçılımı yönteminde ise çözeltideki moleküllerin Brownian hareketlerinden dolayı saçılan ışığın şiddetindeki değişimler ölçülerek hidrodinamik büyüklük, difüzyon katsayısı, dağılım indeksi ve parçacık büyüklük dağılımı elde edilir. DLS ile belirlenen partikülün hidrodinamik çapı olup, partikülün sıvı içerisinde ne kadar difüzlenebildiğiyle bağlantılıdır. Bu teknik örnek konsantrasyonu tam olarak bilinmeden çalışmaya olanak sağlar. Tek gereksinim korelasyon fonksiyonunun yeterli istatistiksel doğruluğu sağlaması için yeterince ışık saçılmasıdır. Bu nedenle teknik foton korelasyon spektroskopisi (PCS) ve quasi elastik ışık saçılımı (QELS) olarak da adlandırılmaktadır. Bu metodun en büyük avantajı, çok farklı yapıdaki proteinlere, kompleks bir ön işlem gerektirmeksizin uygulanabilir olmasıdır. Ancak toz, hava kabarcığı vs etkilere karşı son derece hassas olup, santrüfuj, filtrasyon ve seyreltme gerekliliği söz

konusu olabilmektedir. Bu yöntemde ölçülen PDI (polidispersite indeksi) değerinin 0.1 veya daha düşük olması örneğin monodispers duruma yakın olduğunu, daha yüksek olması ise ortamda farklı büyüklüklerde peptidlerin bulunduğunu göstermektedir (Lomakin et al., 2005; Nobbmann et al., 2007).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Araştırmada substrat olarak kullanılan glutenin elde edilmesinde, süne (*Eurygaster* spp.) zararı görmemiş (sağlam) Bezostaya çeşidi ekmeklik buğday örneği Polatlı Ticaret Borsası'ndan temin edilmiştir.

Süne (*Eurygaster* spp.) enziminin elde edilmesinde kullanılan yüksek oranda süne zararı görmüş durum buğdayı (cv. Ege) ise Urfa bölgesinde anlaşımlı çiftçilerden temin edilmiştir. Türkiye' de hasat öncesi zarara yol açan en önemli böcekler *Aelia* ve *Eurygaster* spp.' dir. Tarım Bakanlığı entomolojistleri tarafından yapılan çalışmada ise 2004-2005 hasat yıllarında Urfa bölgesinde sadece *Eurygaster* spp. bulunduğu saptanmıştır. Bu nedenle kullanılan buğdayın *Eurygaster* ile zararı gördüğünü söyleyebiliriz.

Bu buğday örneği Robber D4950 buğday temizleme cihazının (Almanya) eleme ve aspirasyon bölümünden geçirilerek süne zararı görmüş buğday tanelerince zengin olan fraksiyon alınmıştır. Buğdayın içinde bulunan toz, toprak, sap, saman, yabancı ot tohumları, böcek vb. yabancı maddeler eleklerden geçirilerek ve elle temizleme yöntemiyle ayrılmıştır. Özellikle süne emgili buğdaylar elle seçilerek örnek içerisindeki süne zarar oranının artması sağlanmıştır. Böylece yüksek oranda süne zararı görmüş buğday örneği elde edilmiştir.

Araştırmada kullanılan ticari gluten Vatan Gıda (İstanbul) firmasından temin edilmiştir.

Tripsin enzimi (domuz pankreasından elde edilen, 1120 BAEE unit/mg) Sigma (U.S.)' dan satın alınmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Fiziksel analizler

3.2.1.1. Emgili tane sayımı

Süne zararı görmüş buğday örneğinde (20 g) süne emgili taneler seçilerek ayrılmış, bunun toplam örnek içerisindeki ağırlıkça ve sayıca %'si hesaplanmıştır.

3.2.1.2. Hektolitre ağırlığı tayini

Hektolitre ağırlığı tayini hektolitre aletinde (Ohaus, Chicago, USA) AACC Metot No: 55-10' a (Anonymous, 2000) göre yapılmıştır. Sonuçlar kilogram/hektolitre (kg/hl) olarak belirlenmiştir.

3.2.1.3. Bin tane ağırlığı tayini

Bin tane ağırlığı 20 g örnekteki tane sayısı esas alınarak belirlenmiştir ve kuru madde üzerinden gram olarak ifade edilmiştir. Tane sayımı Numigram II (Tripette, Renoud, Fransa) cihazı ile yapılmıştır.

3.2.1.4. Camsılık tayini

Camsı, unsu ve dönmeli tane oranı (%) Grobecker kesme aleti ile ICC Standart No.129' a (Anonymous, 2002) göre yapılmıştır.

3.2.1.5. Nem tayini

Buğday örneklerinde nem tayini NIT (Infratec 1241 Grain Analyzer, Foss, İsviçre) cihazı ile yapılmış ve 10 ölçümün ortalama sonucu alınmıştır. Sağlam buğday unu (cv. Bezostaya), bu buğdayın elde yıkanması sonucu elde edilen gluten, ticari gluten, gluten hidrolizatları ve süne enzim ekstraktın da nem tayini AACC Metot No: 44-01 (AACC, 2000)' e göre belirlenmiştir.

3.2.1.6. Protein miktarı tayini

Sağlam buğday örneğinde protein miktarı NIT (Infratec 1241 Grain Analyzer, Foss, İsviçre) cihazı ile 10 ölçümün ortalama sonucu olarak alınmıştır. Sağlam buğday unu (cv. Bezostaya), bu buğdayın elde yıkanması sonucu elde edilen gluten, ticari gluten, gluten hidrolizatları ve süne enzim ekstraktında protein miktarı Kjeldahl yöntemiyle (N x 5.7) AACC Metod No: 46-11A' ya (Anonymous, 2000) göre belirlenmiştir.

3.2.1.7. Sertlik tayini (soyma sayısı)

Soyma sayısı için 20 g buğday örneği, 1 dakika süreyle “Strong Scott” buğday soyucu aletinin döner zımpara taşı ile soyuldu. Süre sonunda soyulmuş taneler tartılmış ve aşağıdaki formüle göre soyma sayısı hesaplanmıştır.

Soyma sayısı (%) = (20 - soyulmuş tane ağırlığı)x5

3.2.2. Öğütme

Sağlam buğday örneği % 15.5 neme tavlandıktan sonra Chopin (Fransa) marka laboratuvar değirmeninde una öğütülmüştür. Öğütme sonucu elde edilen ürünlerin miktarına göre un verimi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Un Verimi} = \frac{\text{Toplam Un Miktarı}}{\text{Toplam Kepek Miktarı} + \text{Toplam Un Miktarı}} \times 100$$

Süne zararı görmüş buğday örneği ise “Laboratory Mill 3100” (Danfodd, Huddinge, İsviçre) değirmeniyle kırmaya öğütülmüştür.

3.2.3. Gluten proteinlerinin hazırlanması

Süne zararı görmemiş, sağlam buğday unu (10 g), damıtık su (5.5 ml) ile yoğrularak hamur elde edilmiştir. Bu hamur çeşme suyu altında ve daha sonra saf su ile yıkanarak nişastası uzaklaştırılmıştır. Nişastanın tamamen uzaklaştığını anlamak için iyot çözeltisi indikatör olarak kullanılmıştır. Elde edilen yaş gluten küçük parçalara bölündükten sonra liyofilize edilip suyu uzaklaştırılmış ve öğütülmüştür. Elde edilen gluten analizlerde kullanılmak üzere -24 °C’ de saklanmıştır.

3.2.4. Zeleny sedimentasyon ve modifiye sedimentasyon değerlerinin tayini

Sağlam buğday ununda sedimentasyon değeri, AACC Metot No: 56-60A (Anonymous, 2000)' a göre belirlenmiştir.

Zeleny sedimentasyon testi modifiye edilerek unlarda süne zararının tespitinde kullanılabilir (Greenaway et al., 1965; Atlı vd., 1988). Proteaz aktivitesi sonucu gluten proteinlerinin parçalanması ve zayıf laktik asit çözeltisi ile hazırlanmış süspansiyondaki un partiküllerinin, belirli zaman içinde çöken miktarının azalması esasına dayanır. Deneyin yapılışında Zeleny sedimentasyon testinden farklı olarak sağlam buğday ununa (3.2 g) %1 oranında süne enzim ekstraktı ilave edildikten sonra 50 ml bromfenol mavisi çözeltisi ilave edilip, 5 dakika çalkalama aletinde çalkalandıktan sonra süne proteaz enziminin aktivite göstermesi için 37°C’ de 2 saat inkübasyona bırakılarak gerçekleştirilmiştir. Diğer işlemler sedimentasyon testinde olduğu gibi yapılmıştır.

3.2.5. Süne (*Eurygaster* spp.) proteolitik enziminin (SEE) izolasyonu

Süne (*Eurygaster* spp.) zararı görmüş buğdaydan elde edilen kırma örneği (200 g) saf su (1000 ml) ile 4 °C’ de, manyetik karıştırıcıda 6 saat (veya 24 saat) ekstrakte edilmiştir. Süre sonunda 15.000xg’ de 10 dakika, 4 °C’ de santrifüj edilmiş ve dökelti kısmı liyofilize edilip öğütülmüştür. Ekstrakt liyofilize edildikten sonra -24 °C’ de depolanmıştır. 6 saatlik ve 24 saatlik ekstraktların enzim aktiviteleri, modifiye sedimentasyon yöntemi (Madde 3.2.4) ve 1-propanolde (%50) çözünmeyen gluteninlerin spektrofotometrik olarak tayinine dayanan yöntemle (madde 3.2.7) belirlenmiştir. Enzim aktiviteleri yaklaşık aynı tespit edildiği için uzun süreli ekstraksiyonlarda ortaya çıkabilecek mikrobiyal gelişmenin önüne geçmek için süne enzim ekstraktının elde edilmesinde ekstraksiyon süresi olarak 6 saat tercih edilmiştir.

3.2.6. Süne (*Eurygaster* spp.) proteolitik enziminin saflaştırılması

Elde edilen süne enzim ekstraktı (SEE) farklı yöntemlerle saflaştırılmaya çalışılmıştır. Önce süne enzim ekstraktı iyon değişim kromatografisi teknikleriyle fraksiyonlarına ayrıldıktan sonra proteolitik aktivite gösteren fraksiyonlar jel filtrasyon kromatografisiyle daha fazla saflaştırılmıştır.

3.2.6.1. Anyon değişim kromatografisi

İyon değişim kromatografisi 1.6x6 cm’ lik (Pharmacia-Amersham), DEAE-selüloz (dietilaminoetil selüloz) zayıf anyon değiştirici kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kolon antibakteriyel ve antifungal etkili tiyomersal (sodyum etilciva tiyosalisilat) içeren 0.02 M sodyum-fosfat tamponu (pH 7.4) ile bir gece boyunca dengeye getirildikten sonra örnek kolona verilmiştir. Akış hızı 3 ml/dak’ dır. Liyofilize edilen süne enzim ekstraktı aynı tampon çözeltiyle karıştırılıp (0.1 g/ml), 20.000xg’ de 10 dak santrifüj edildikten sonra sıvı kısmın 5 ml’ si kolona yüklenmiştir. Kolonda tutulan maddeler 1 M NaCl çözeltisinden gradient oluşturularak yıkanmıştır. Fraksiyonlar 4.5 ml/tüp olacak şekilde toplandıktan sonra 280 nm’ de absorbans ölçümü yapılmıştır. Fraksiyonların enzim aktivitesi Madde 3.2.7’ de verilen 1-propanolde (%50) çözünmeyen glutenin metoduyla belirlenmiştir.

3.2.6.2. Katyon değişim kromatografisi

İyon değişim kromatografisi 1.6x6 cm' lik(Pharmacia-Amersham), CM-sefaroze (karboksimetil sefaroze) zayıf katyon değiştirici kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Madde 3.2.6.1' deki kolon ve şartlar uygulanmıştır. Kolonda akış hızı 2 ml/dk olarak ayarlanmıştır. DEAE-selüloz kolondan ayrılıp proteolitik aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirilerek bu kolona 5 ml olarak yüklenmiştir. Kolonda tutulan maddeler 1 M NaCl çözeltisinden gradient oluşturularak yıkanmıştır. Fraksiyonlar 4.5 ml/tüp olacak şekilde toplandıktan sonra 280 nm' de absorbans ölçümü yapılmıştır.

3.2.6.3. Jel filtrasyon kromatografisi

Anyon değişim (DEAE-selüloz) kromatografisi sonrasında aktivite gösteren fraksiyonlar toplanarak jel filtrasyon kromatografisi tekniğine göre ayırım sağlanmıştır. Jel filtrasyon da 2.6x 60 cm' lik kolon (Pharmacia-Amersham) ve Superdex 75 (Pharmacia-Amersham) dolgu materyali sabit faz olarak kullanılmıştır. Kolon antibakteriyal ve antifungal etkili tiyomersal (sodyum etilciva tiyosalisilat) içeren 0.02 M sodyum-fosfat tamponu (pH 7.4) ile bir gece boyunca dengeye getirildikten sonra örnek akış hızı 3 ml/dak. olacak şekilde uygulanmıştır. Fraksiyon toplayıcı ile 4.5 ml' lik örnekler tüplere alınmıştır. 280 nm' de absorbans ölçümü yapılmıştır. Fraksiyonların enzim aktivitesi Madde 3.2.7' de verilen 1-propanolde (%50) çözünmeyen glutenin metoduyla belirlenmiştir.

3.2.7.1-propanolde (%50) çözünmeyen glutenin metodu ile süne enzim aktivitesi tayini

Sağlam buğday unu veya gluten (50 mg) üzerine süne enzim ekstraktı (5 mg) ile su veya enzimin saflaştırılması aşamasında toplanan sıvı fraksiyonlar ilave edilmiştir. Örnekler 0, 30, 60 ve 120 dakika ısıtıcı blokta 37 °C' de inkübe edilmiştir. 15.000xg' de 3 dak santrifüjden sonra çöken kısım 1-propanol (%50) ile üç aşamada ekstrakte edilerek monomerik proteinler (gliadin) uzaklaştırılmıştır. Örnekler üzerine 500 µl 1-propanol (%50) ilave edilmiş ve 23°C' de 30 dak boyunca her 10 dakikada bir vortekslenerek ekstrakte edilmiştir. Örnekler daha sonra 2.200xg' de 3 dak boyunca santrifüj edilerek çözünen kısım ayrılmış ve çökelti üzerine tekrar 500 µl 1-propanol (%50) ilave edilerek ekstraksiyon işlemi tekrar edilmiştir. Son aşamada ise çökelti üzerine 500 µl 1-propanol (%50) ilave

edilmiş ve 1 dak süresince vortekslendikten sonra tekrar 2.200xg' de 3 dak santrifüj edilmiştir. Dökelti kısmı uzaklaştırıldıktan sonra, çökelti kısmına 1-propanol (%50) içeren 0.08 M Tris HCl (pH 7.5) çözeltisi ile hazırlanan %1' lik ditiotreitolden (DDT) 100 µl ilave edildikten sonra 60 °C' de 1 saat inkübe edilmiştir. İndirgeme işleminden sonra 900 µl 1-propanol (%50) ilave edilerek, 15.000xg' de 5 dak santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra dökeltiden 100 µl alınarak üzerine 900 µl 1-propanol (%50) ilave edilmiştir. Hazırlanan 1/10' luk çözeltiden aynı şekilde 1/100' lük çözelti hazırlanarak 214 nm'de absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Denemeler iki paralel olarak gerçekleştirilmiş, paralellerden ikişer dilüsyon hazırlanarak bir örneğe ait dört spektrofotometrik okuma gerçekleştirilmiştir. Örneklerin proteaz aktiviteleri relatif olarak aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Relatif Proteaz Aktivitesi (\%)} = \frac{(A_s - A_c)}{A_c} \times 100$$

A_s : Örneğe ait absorbans değeri, A

A_c : Kontrole (inkübasyonsuz örnek) ait absorbans değeri, A

Fraksiyonlardaki birim protein miktarına (mg) düşen relatif enzim aktivitesi (%) spesifik enzim aktivitesi olarak ifade edilmiştir. Fraksiyonların enzim ekstraktına göre saflıkları ise aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir:

$$\text{Saflık} = \frac{(\text{Spesifik Aktivite})_{\text{fraksiyon}}}{(\text{Spesifik Aktivite})_{\text{enzim ekstraktı}}}$$

3.2.8. Gluten proteinlerinin pH-stat ile enzimatik modifikasyonu

pH-stat yöntemi nötral veya alkali koşullarda yürütülen hidroliz işlemi sırasında, otomatik titratör yardımıyla ortama baz ilavesi sonucunda pH' nın sabit kalması prensibine dayanmaktadır.

Bu çalışmada enzimatik hidroliz işlemi pH-stat yöntemine (Adler-Nissen, 1986) göre Şekil 3.1' de görülen otomatik titratör cihazında (Mettler-Toledo DL50, Graphix, İsviçre) gerçekleştirilmiştir. Enzimatik hidroliz düzeneğinde otomatik titratör (10 ml kapasiteli pompa, karıştırıcı ve dijital göstergeli klavye), özel kapaklı ve ısı cıdarlı cam reaksiyon kabı, titratöre bağlı bir yazıcı, belli normalitedeki NaOH tankı bulunmaktadır.

pH-stat işleminin optimizasyon çalışmalarında ticari gluten substrat olarak, hem tripsin enzimi hem de süne enzim ekstraktı ise enzim kaynakları olarak kullanılmıştır. Glutenin farklı oranlardaki sulu dispersiyonlarının pH ve sıcaklığı, kullanılan enzimin optimum koşullarına uygun olarak ayarlanmış ve bu koşullarda sabit hızda (500 rpm) 30 dak karışması sağlanmıştır. Ortama mikrobiyal gelişimi engellemek için %0.02 oranında sodyum azid eklenmiştir. Tripsin, süne enzim ekstraktı veya kısmen saflaştırılmış süne enzimi ilavesinden sonra titrasyon işlemi başlatılmıştır. Eğer enzim ilavesi sonucunda pH' da ani bir değişim olmuşsa, ön titrasyon yapılarak çözelti pH' sı enzimin optimum çalışma pH' sına tekrar getirilmiştir. Reaksiyonda oluşan serbest H⁺ iyonlarını titre etmek ve düşen pH' yı tekrar belirlenen pH' ya çıkarmak için ortama gereken miktarda belli normalitede NaOH otomatik titratörden ilave edilmiştir ve eklenen baz miktarı (ml) yazıcıya iletilmiştir. Bu reaksiyon sırasında proteinlerin hidroliz derecesi (HD) aşağıdaki formüle göre izlenebilmektedir (Nielsen and Olsen, 2002):

$$HD (\%) = \frac{h}{h_t} \times 100$$

$$HD (\%) = \frac{B \times M_b \times F}{\alpha \times M_p \times h_t} \times 100$$

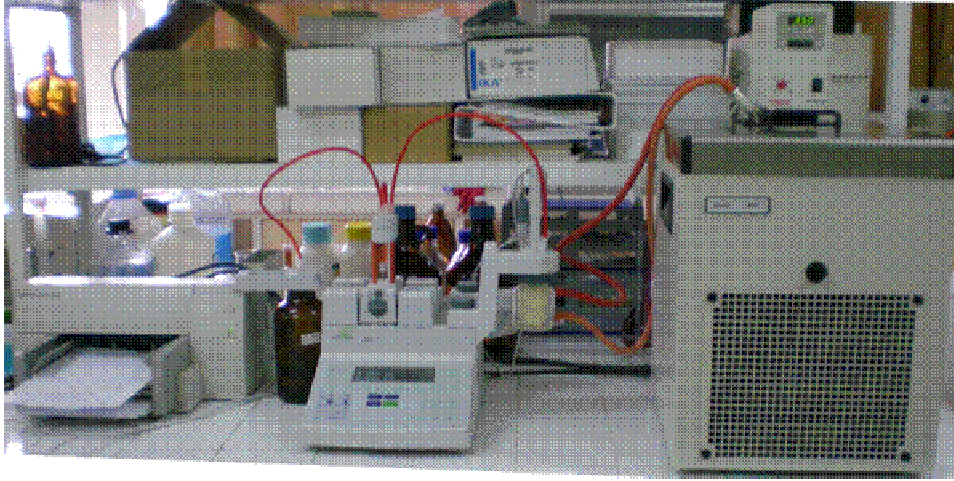
- h : Hidroliz eşdeğeri, meqv/g protein
- h_t : Peptid bağlarının toplam sayısı, meqv/g protein
- HD : Hidroliz derecesi, %
- B : Harcanan baz miktarı, ml
- M_b : Bazın molaritesi, M
- F : Faktör
- α : α-NH₂ gruplarının ortalama dissosiasyon katsayısı
- M_p : Protein miktarı, g

Gluten proteini için h_t 8.3 meqv/g proteindir. α değeri analiz sırasında kullanılan pH ve sıcaklığa göre değişen bir reaksiyon sabitidir. Tripsin enzimi için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla pH 8.0 ve 35 °C olduğu için 1/α değeri 1.300; süne enzimi için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla pH 8.5 ve 35 °C olduğu için 1/α değeri 1.095 olarak alınmıştır (Adler-Nissen, 1980).

pH-stat çalışmalarında reaksiyon N₂ gazı ortamında gerçekleştirilmiş. Böylece havadan gelip ortamın pH' sını asit yöne kaydırabilecek CO₂ gazının sisteme girişi engellenmiştir.

İstenen hidroliz derecesine ulaşıldıktan sonra enzim inaktivasyonunun sağlanması için örnek 95 °C' deki su banyosunda 10 dak bekletilmiştir. Örnek oda sıcaklığına soğutulduktan sonra 3.000xg' de 10 dak santrifüj edilmiştir. Sıvı kısmı alınıp liyofilizatörde kurutulduktan sonra -20 °C de saklanmıştır.

Tez kapsamında elde yıkama ile hazırlanan glutenin, süne enzimiyle hidrolizi sonucunda oluşan peptidlerin moleküler boyut dağılımı hakkında fikir edinmek için yapılan çalışmalarda (DLS ve jel filtrasyon) HD %3.5 olan gluten hidrolizatı kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmalarından sonra elde yıkama yöntemiyle hazırlanan glutenin sulu süspansiyonu (%5), saflaştırılmış süne proteaz enzimiyle, hidroliz derecesi %3 ve %5 olacak şekilde bu teknikle hidrolize edilmiştir. Hazırlanan bu hidrolizatlar ise fonksiyonel özelliklerin belirlenmesi, SE-HPLC, antioksidan aktivite tayini, elektroforetik çalışmalarda ve MALDI-MS/MS analizinde kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Otomatik titratör cihazı (pH-stat)

3.2.9. Gluten hidrolizatının (HD %3.5) moleküler boyut dağılımının belirlenmesi çalışmaları

3.2.9.1. Ultrafiltrasyon tekniği

Gluten hidrolizatı (HD % 3.5) değişik gözenek çapındaki membranlar kullanılarak ultrafiltrasyon düzeneklerinde molekül ağırlıklarına göre fraksiyonlara ayrılmaya çalışılmıştır. Uygulamalar iki farklı ultrafiltrasyon düzeneğinde gerçekleştirilmiştir. İlk sistem peristaltik pompa ile ters akış sağlayan, geri beslemeli, farklı gözenek çapına sahip (100 kDa, 50 kDa, 20 kDa ve 5 kDa) polietersülfon membran filtreler

bulunan ultrafiltrasyon birimidir (Sartorius, Almanya). Diğer sistem karıştırmalı hücre tipi Model 8200 (Amicon, Almanya) ultrafiltrasyon düzeneğidir. Bu sistemde rejenere selüloz membran filtreler (10 ve 30 kDa) kullanılmış ve 3.5 kg/cm² basınçta (azot gazı ile) fraksiyonlarına ayrılmaya çalışılmıştır. Elde edilen ultrafiltrasyon fraksiyonları Madde 3.2.15' de verilen SDS-PAGE elektroforez tekniği ile incelenmiştir.

3.2.9.2. Jel filtrasyon kromatografisi

Gluten hidrolizatı Madde 3.2.6.3' de verilen jel filtrasyon kromatografisi tekniği ve Superdex 200 (Pharmacia-Amersham) dolgu materyali ile fraksiyonlarına ayrılmıştır. Elde edilen fraksiyonlar Madde 3.2.15' de verilen SDS-PAGE elektroforez tekniği ile incelenmiştir.

3.2.9.3. Gluten hidrolizatlarının dinamik ışık saçılımı (DLS) tekniği ile incelenmesi

Gluten hidrolizatı (HD %3.5) ve bunun seyreltilmiş (1/10 ve 1/100) örnekleri ile bunların %2 SDS veya 8 M üre bulunan ortamlardaki, 0.2µ' luk membran filtreden geçirildikten sonraki ve sonikasyon işlemine tabi tutulduklarındaki hidrodinamik çap ($d_{H, nm}$) olarak z-ortalama moleküler boyut dağılımları Zetasizer Nano-S sistem (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) ile belirlenmiştir. Bu analiz aynı zamanda hidrolizatta agregasyon varlığı hakkında da bilgi vermektedir. DLS ölçümleri 633 nm' de işlem yapan He-Ne lazer (4 mW) kullanılarak 170° açıda gerçekleştirilmiştir.

3.2.10. Gluten ve gluten hidrolizatlarının çözünürlük özelliği tayini

Gluten ve gluten hidrolizatlarının çözünürlük özelliklerinin tespitinde Casella and Whitaker (1990)' ın metodu modifiye edilerek kullanılmıştır. Distile suda 2 mg/ml konsantrasyonunda çözünürlük tayini yapılmıştır. Tüm örneklerin protein çözünürlüğü, pH' nın bir fonksiyonu olarak pH 2-10 aralığında incelenmiştir. Belirlenen konsantrasyonda distile su ile hazırlanan örneklerin pH' sı istenen noktaya ayarlandıktan sonra oda sıcaklığında 1 saat karıştırılmaya bırakılmıştır. Bu süre boyunca 0.5 M HCl veya 0.5 M NaOH eklenerek pH istenilen noktada sabit tutulmuştur. Bir saat sonunda 3000xg' de 10 dak oda sıcaklığında santrifüj edildikten sonra sıvı kısım Whatman no.1 filtre kağıdından süzölmüştür.

Süzüntüdeki protein miktarı Lowry et al. (1951)' un metodu ile belirlenmiştir. Protein çözünürlüğünü saptamak için ilk olarak sığır serum albumin (BSA, Sigma, St. Louis, USA) kullanılarak standart eğri hazırlanmıştır. Analiz sırasında kullanılan çözeltiler:

Çözelti A :1000 ml damıtık sudaki 20 g Na₂CO₃, 4 g NaOH ve 1.6 g Na-tartarat çözeltisi

Çözelti B :100 ml damıtık sudaki 4 g Cu₂SO₄.5H₂O çözeltisi.

Çözelti C :1/100 (v/v) oranında çözelti B / çözelti A karışımıdır.

Folin-fenol çözeltisi :1:1(v/v) oranında distile su ile seyreltilmiş

Farklı pH' larda hazırlanarak elde edilmiş süzüntülerden, çalışılan protein çözeltisi konsantrasyonuna göre seyreltme yapılarak gereken miktarda çözelti alınmış ve toplam hacim 1000 µl' ye tamamlanmıştır. Daha sonra tüplere 3 ml çözelti C eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir.

Bu sürenin sonunda tüplere 0.3 ml folin-fenol çözeltisi eklenip vortekslenmiştir ve 45 dak oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. UV spektrometrede (Shimadzu UV-210PC) çözeltilerin 660 nm' deki absorbans değerleri okunarak protein miktarları saptanmıştır. Sonuçlar (%) protein çözünürlüğü olarak aşağıda verildiği şekilde hesaplanmıştır:

$$\text{Protein çözünürlüğü (\%)} = \frac{\text{Süzüntüdeki protein miktarı (g)}}{\text{Örneğin protein miktarı (g)}} \times 100$$

Burada örneğin protein miktarı (g) Madde 3.2.1.6' da verilen Kjeldahl metodu ile belirlenen toplam protein miktarıdır. Tüm örneklerde protein çözünürlüğü tayini için dört tekrar yapılmıştır.

3.2.11. Gluten ve gluten hidrolizatlarının emülsiyon özellikleri tayini

Gluten ve gluten hidrolizatlarının emülsiyon özelliklerinin belirlenmesinde Bilgi and Çelik (2004) metodu modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu metod, emülsiyon kapasitesi (EK) ve emülsiyon stabilitesi (ES) Yasumatsu et al. (1972)' ün yöntemi esas alınarak belirlenmiştir. Araştırmada suda yağ (o/w) emülsiyonları çalışılmıştır. Gluten ve gluten hidrolizatlarının % 0.2 (w/v) konsantrasyonunda ve pH 2, 4, 6, 7,

8 ve 10' daki çözeltileri, Madde 3.2.10' da anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Yağ çeşidi olarak mısır özü yağı kullanılmıştır. Elde edilmiş süzüntü-yağ karışımı, % 50 (v/v) oranında yağ içerecek şekilde cam tüplere (1.5 cm çap x 10 cm uzunluk) aktarılmıştır. Karışım oda sıcaklığında 23.500 rpm' de 90 s homojenize (Art-Micra D-8, Almanya) edilerek emülsiyonlar oluşturulmuştur.

3.2.11.1. Emülsiyon kapasitesi (EK, %) tayini

Emülsiyon kapasitesini belirlemek üzere cam tüplerdeki emülsiyonlar, oda sıcaklığında 2.100 g' de 25 dak santrifüjlenmiştir. Daha sonra tüplerdeki emülsifiye olmuş tabakanın yüksekliği ve toplam sıvı yüksekliği kaydedilmiş ve emülsiyon kapasitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$EK (\%) = \frac{H_1}{H_T} \times 100$$

EK : Emülsiyon kapasitesi
H₁ : Emülsifiye olan tabakanın yüksekliği
H_T : Toplam sıvı yüksekliği

Tüm örneklerde emülsiyon kapasitesi tayini için dört tekrar yapılmıştır.

3.2.11.2. Emülsiyon stabilitesi (ES, %) tayini

Emülsiyon stabilitesini belirlemek üzere deney tüplerine hazırlanan emülsiyon örnekleri (7 ml) 80 °C' deki su banyosunda (Kötterman Labortechnik, Almanya) 30 dakika bekletilmiş ve sonrasında oda sıcaklığına (23 °C) soğutulmuştur. Daha sonra emülsiyonlar 2.100 g' de 25 dak santrifüjlenmiştir. Tüplerdeki emülsifiye olmuş tabakanın yüksekliği ve toplam sıvı yüksekliği kaydedilmiş ve emülsiyon stabilitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$ES (\%) = \frac{H_2}{H_T} \times 100$$

ES : Emülsiyon stabilitesi
H₁ : Emülsifiye olan tabakanın yüksekliği
H_T : Toplam sıvı yüksekliği

Tüm örneklerde emülsiyon stabilitesi tayini için iki tekrar yapılmıştır.

3.2.12. Gluten ve gluten hidrolizatlarının köpük özellikleri tayini

Gluten ve gluten hidrolizatlarının köpük özelliklerinin belirlenmesinde İbanoğlu and İbanoğlu (1999)' nun metodu modifiye edilerek kullanılmıştır. Gluten ve gluten hidrolizatlarının %0.2 (w/v) konsantrasyonunda ve pH 2, 4, 6, 7, 8 ve 10' daki çözeltileri Madde 3.2.10' da anlatıldığı şekilde hazırlandıktan sonra köpük özellikleri belirlenmiştir.

Gluten ve gluten hidrolizatlarının köpük özelliklerinin incelenmesinde, 21 cm uzunluğunda ve iç çapı 5 cm olan sinter filtreli borosilikat silindirik cam kolon kullanılmıştır. Kolona 10 ml örnek tatbik edilmiştir. Kolondaki sinter filtrenin gözenek çapı 16-40 μm ' dir. Sinter filtre üzerine ilave edilen protein çözeltisini köpürtmek için alttan 10 sn süreyle, hava akış ölçerinde (Dwyer, Series MMA Mini-Master) 0.5 L/dak hızında hava verilmiştir. Bu sürenin sonunda verilen hava üç yollu vana sistemiyle kesilerek, köpüğün ulaştığı maksimum yükseklik, kolon üzerindeki cetveldan işaretlenmiştir. Köpüğün belli bir süre sonunda ulaştığı maksimum yükseklikten köpük hacmi (cm^3) hesaplanmış ve bu değer köpük kapasitesi (KK, cm^3) olarak verilmiştir. Köpük stabilitesi (KS, s) ise köpüğün ulaştığı maksimum yüksekliğin yarısına düşmesi için geçen zaman veya köpük yarı-ömrü (s) şeklinde ifade edilmiştir. Tüm örneklerde köpük özellikleri tayini için iki tekrar yapılmıştır.

3.2.13. Gluten ve gluten hidrolizatlarının antioksidan aktivite tayini

Gluten ve gluten hidrolizatlarının (HD % 3 ve % 5) antioksidan aktiviteleri Serpen et al. (2007)' in metodu modifiye edilerek yapılmıştır. Deneyde kullanılan çözeltiler ve kalibrasyon eğrisinin hazırlanması aşağıda belirtildiği gibidir:

ABTS stok çözeltisi: 7 mM 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) (ABTS), 2.45 mM potasyum persülfat (karanlıkta oda sıcaklığında bir gece bekletildikten sonra kullanılır).

ABTS çalışma çözeltisi: ABTS stok çözeltisi 734 nm' deki absorbansı 0.7-0.75 olana kadar 1:1 oranındaki etanol:su ile seyreltilir.

Troloks standart çözeltileri: 200-600 ppm ($\mu\text{g/ml}$) Troloks Standart Kalibrasyon çözeltileri 1:1 etanol su ile hazırlanır.

Kalibrasyon: 100 µl Trolox standart çözeltisine 15 ml ABTS çalışma çözeltisi ilave edilip çalkalayıcıda çalkalanır. 15 ml ABTS çalışma çözeltisinde 100 µl 1:1 etanol:su kör olarak kullanılır. 6. dakikada 734 nm’ deki absorbans okunur. % inhibisyona karşı trolox konsantrasyonu grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi hazırlanır.

$$\% \text{ inhibisyon} = 1 - (A_{\text{örnek}} / A_{\text{kör}}) \times 100$$

$A_{\text{örnek}}$:Örneğin 734 nm’ deki absorbansı, A

$A_{\text{kör}}$:Körün 734 nm’ deki absorbansı, A

Gluten ve gluten hidrolizatları örnekleri 10 katı kadar selüloz ile seyreltildikten sonra 10 mg örnekler falcon tüplerine tartılır. Örneklerin üzerlerine karanlıkta 15 ml ABTS çalışma çözeltilerinden ilave edildikten sonra 2 dak vortekslenir. Tüpler çalkalayıcıya 25 dak çalkalandıktan sonra, 2.500 g'de 2 dakika santrifüjlenir. Çözelti kısmından spektro küvetlerine alınıp tam 30. dakikada 734 nm’ deki absorbansları spektrofotometrede (Shimadzu, Japan) okunur. % inhibisyon değerleri hesaplandıktan sonra kalibrasyon eğrisi kullanılarak TEAA (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Aktivitesi, mmol troloks/kg örnek) değerleri belirlenir.

3.2.14. Gluten ve gluten hidrolizatlarının protein profilinin SE-HPLC ile analizi

Proteinler 300x7.8 mm boyutlarında ve 5 µm partikül boyutlu Biosep SEC S4000 kolonunda (Phenomenex, Torrance, CA., USA) HPLC cihazı (Agilent) ile analiz edilmiştir. Proteinlerin ayrımında mobil faz olarak %0.05 (v/v) trifloroasetik asit içeren asetonitril:su (50:50) çözeltisi kullanılmıştır (Gupta et al., 1993).”Diode Array” dedektör kullanılarak 214 nm’ deki spektrum elde edilmiştir. Kolonun kalibrasyonu için kullanılan miyozin (205 kDa), sığır serum albumini (66 kDa) ve yumurta albumininin (45 kDa) alıkonma süreleri sırasıyla 3.5; 4.8 ve 5.0 dakika olarak tespit edilmiştir.

3.2.14.1. Toplam protein (TP) miktarının SE-HPLC ile belirlenmesi

Gluten ve gluten hidrolizatlarının SDS’ de çözünen toplam protein miktarı Gupta et al (1993) tarafından önerilen HPLC yöntemine göre tespit edilmiştir. Örnekler (10 mg) mikrosantrifüj tüplerine tartılmış ve üzerlerine 1 ml % 0.5 (w/v) SDS-fosfat tamponu (pH 6.9) ilave edilmiştir. Sonikatörde (Misonix Model XL 2000) 15 sn sonikasyon uygulanmıştır. Örnekler 17.000xg’ de 10 dak santrifüjlendikten sonra

0.45 µm PVDF filtreden geçirilmiştir. Ekstrakte edilen örnekler (20 µL) kolona yüklenmiş ve 2 ml/dk. akış hızıyla 15 dak örneğin kolonda ilerlemesi sağlanmıştır.

Polimerik proteinlerin monomerik proteinlere oranı ise polimerik pik alanlarının (TP1+TP2), monomerik pik alanlarına (TP3+TP4) oranından hesaplanmıştır.

3.2.14.2. SDS' de çözünen (EP) ve çözünmeyen proteinlerin (UP) SE-HPLC ile belirlenmesi

Toplam polimerik proteinler %0.5 (w/v) SDS-fosfat tamponunda (pH 6.9) iki aşamalı ekstraksiyon ile birinci aşamada çözünür (sonikasyon uygulanmamış) ve ikinci aşamada çözünmez (sonikasyon uygulanmış) protein fraksiyonlarına ayrılmıştır. Birinci aşamada örnekler (10 mg) mikrosantrifüj tüplerine tartılmış ve üzerlerine %0.5 (w/v) SDS-fosfat tamponu (1 ml) ilave edildikten sonra 1.500 rpm' de 15 dk çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Örnekler 17.000xg' de 10 dak santrifüjlenmiş ve üstte kalan sıvı kısım çözünür proteinler olarak ayrılmıştır. 2. aşamada çökelti kısmına %0.5 (w/v) SDS-fosfat tamponu (1 ml) ilave edilerek, kalan proteinlerin çözünür hale geçmesi için 30 s sonikasyon uygulanmıştır. Bu örnekler de santrifüjlendikten sonra 0.45 µm PVDF filtreden geçirilerek SE-HPLC kolonuna 20 µL uygulanmıştır (Gupta et al. 1993).

3.2.15. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE)

SDS-PAGE işlemi dikey elektroforez aletinde (Hoefer, San Francisco) yapılmıştır. %30 toplam monomer konsantrasyonunda ve % 2.67 çapraz bağlı monomer konsantrasyonunda akrilamid/bisakrilamid stok çözeltisinden farklı konsantrasyonlarda Laemmli (1970) metoduna göre hazırlanan poliakrilamid jeller kullanılmıştır. Ekstrakt seyreltme stok çözeltisi, %20 (v/v) gliserol, 0.063 M Tris (pH 6.8), %2 (w/v) SDS ve %0.01 (w/v) pyronin Y ile hazırlanmıştır. Bu çözeltiye örnek hazırlama aşamasında %5 oranında merkaptetanol (ME) ilave edilmiştir. Elektroforez tampon çözeltisi, 0.192 M glisin, 0.025 M Tris, %1 (w/v) SDS içermektedir (pH 8.3). Stok boya çözeltisi, 1.5 g Coomassie Brilliant Blue G-250, 1lt 2N H₂SO₄ ilave edildikten sonra distile su ile 2 lt' ye tamamlanmıştır. Stok boya çözeltisi (300 ml), KOH (35 ml) ve %100' lük trikloro asetik asit (50 ml) ile boyama çözeltisi hazırlanmıştır.

%14' lük ayırıcı jel çözeltisi ve %3' lük ön ayırma jeli kullanılmıştır. Ayırıcı jel çözeltisine 0.5 g/l amonyum persülfat (APS) ve 0.5 ml/lt tetrametilendiamid (TEMED) ilave edilerek kalıba (160x180x1.5 mm) dökülmüştür. Polimerleşme tamamlandıktan sonra ön ayırma jeline 0.5 g/l APS ve 1 ml/lt TEMED ilave edilerek, ayırma jeli üzerine dökülmüştür.

SDS-PAGE örnekleri üzerine ekstrakt seyreltme çözeltisi (merkaptoetanol ilave edilmiş veya edilmemiş) eklenip 2.5 dak. ısıtıcı blokta 100 °C' de bekletilmiş ve jele uygulanmıştır. Elektroforez işlemi 30 mA/jel sabit akımda, 20°C' de sabit sıcaklıkta, 5-5.5 saat sürede gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jeller boyama çözeltisi ile boyanmıştır.

Protein marker (Sigma) olarak içerisinde aprotinin (6,5 kDa), α -laktalbumin (14,2 kDa), tripsin inhibitörü (20 kDa), tripsinojen (24 kDa), karbonik anhidraz (29 kDa), gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (36 kDa), ovalbumin (45 kDa), glutamik dehidrojenaz (55 kDa), albumin (66 kDa), fosforilaz B (97 kDa), β -galaktosidaz (116 kDa), myozin (205 kDa) bulunan geniş aralıklı protein standardı seçilmiştir.

3.2.16. Gluten ve gluten hidrolizatlarının iki boyutlu jel elektroforezi

Örnek hazırlama:

Gluten ve gluten hidrolizatları (HD %3 ve %5), 2 ml' lik vidalı kapaklı tüplere tartılmış ve üzerine 5M üre, 2M tioüre, %2 CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), %1 ASB-14 (Amidosulfobetaine-14,3-[N,N-dimetil(3-miristolaminopropil)amonyak) propansülfanat), %2 SB 3-10 (Sülfobetain 3-10), 65 mM DTT, 40 mM tris, %10 izopropanol ve proteaz inhibitör karışımı içeren protein ekstraksiyon tamponundan 500 μ l ilave edilip içerisine 0.5 g asitle yıkanmış cam boncuklar (Sigma) konulmuştur. Bio 101 (SAVANT) ile 6.5 konumunda 45 saniye homojenizasyondan sonra 10 dakika buzda bekletilir ve bu aşama iki kere tekrarlanır. Son konsantrasyon %2.88 olacak şekilde akrilamid eklenmiş ve Bio 101 (SAVANT) ile 6.5 konumunda 45 saniye tekrar homojenizasyondan sonra 10 dak buzda bekletme uygulaması tekrarlanmıştır. Örnekler 20.000xg' de 15 dak 20 °C' de santrifüj edildikten sonra süpertanant kısmı alınmıştır. Protein örneklerden 5 kDa' luk membran spin filtreler (Sartorius Stedim Biotech) ile tuz uzaklaştırılmış ve

kullanılana kadar -80°C' de depolanmışlardır. Herbir örneğin protein miktarı Bradford protein analiz kiti (Sigma) ve standart olarak BSA kullanılarak belirlenmiştir.

2-D PAGE

Protein örnekleri (100 µg) %1' lik taşıyıcı amfolit (pH 3-10) ile birlikte herbir 18 cm' lik pH 3-10' luk ve pH 5-8' lik "linear immobiline gradient strip" e yüklenmiştir. Odaklama işlemi Ettan IPGphor II (Amersham Bioscience) izoelektrik odaklama cihazında, 20°C' de gerçekleştirilmiştir. Bu işlem 2 saat 300 V' da; 8 saat içinde 8000 V' a aşamalı çıkış ve 10 saat boyunca 8000 V' da olmak üzere yaklaşık 18-20 saat toplam volt-saat olarak ise yaklaşık 120.000 olacak şekilde yapılmıştır. "Stripler" daha sonra proteinlerin ikinci boyut ayırımı için 20x20 cm boyutlarındaki %8-18' lik gradient akrilamid jellere yüklenmiştir. Bu işlem 5 µA/jel 12 saat ve 30 A/jel 4 saat olmak üzere boya çözeltisi jelden çıkana kadar 4 °C' de dikey elektroforez düzeneğinde yürütülmüştür. Proteinlerin ayırımından sonra jeller %10 metanol ve %7 asetik asit çözeltisinde 4 saat boyunca fiksasyon işlemine tabii tutulduktan sonra Syproruby boyama çözeltisi ile bir gece boyunca boyanmıştır. Metanol içermeyen, %7' lik asetik asit çözeltisi ile 4 saat boyunca ve %1 asetik asit çözeltisi ile 1 saat daha boya giderme işleminden sonra Typhoon 9400 variable mode imager (GE health care) ile 100µm çözünürlükte, 457 nm uyarmada ve 610 nm BP30 emisyon filtreleriyle görüntülenmiştir.

3.2.17. MALDI-MS/MS analizi

2-D jellerde yapılan inceleme sonucunda hidrolizatlarda glutene göre farklılık görülen protein spotlarının tanımlanması MALDI-MS/MS ile yapılmıştır.

Spot kesme ve triptik hidroliz:

Protein spotu (referans olarak), CCD kamera ve 1 mm çaplı kesme başlığı bulunan ExQuest Robotic floresant spot kesici (Bio-Rad, USA) kullanılarak 2-D jelden kesilmiş ve 96-MTB tabaka üzerine yerleştirilmiştir. Jel parçası %50 asetonitril (ACN)' de hazırlanmış 25 mM NH₄HCO₃ ile 3 kere 15 dak boyunca 37 °C' de hafif karıştırma ile yıkanmıştır. Daha sonra jel parçaları %100 ACN ile oda sıcaklığında 10 dak suyu uzaklaştırılmıştır. ACN uzaklaştırıldıktan sonra ise tamamen kurutulana kadar 37 °C' de inkübe edilmiştir. Yaklaşık 10-15 µL tripsin

çözeltisi (5ng/μL) her bir kuru jel parçasına eklenmiş ve jel parçalarının tripsin çözeltisiyle tekrar hidrasyona uğraması için 1 saat buzdolabında bekletilmiştir. Fazla tripsin uzaklaştırılmış ve 20μL 25 mM NH₄HCO₃, jel parçasını kaplayacak şekilde eklenmiş ve 37°C’ de hidroliz için bir gece boyunca inkübe edilmişlerdir.

Peptid ekstraksiyonu, zip-tip ve MALDI tabakasına yükleme:

Triptik hidroliz sonrasında, 10μl %0.1’ lik trifloroasetik asit (TFA) kuyucuğa eklenmiş ve jel parçasından peptidler sonikasyonla (96 kuyucuklu tabaka ultrasonik su banyosunda 10 dak yerleştirilmiş) ekstrakte edilmiştir. Ekstrakte edilen peptidlerden tuzun uzaklaştırılması ve konsantre edilmesi için zip-tip (Perfect Pure C18, Eppendorf) kullanılmış ve örnekler MALDI örnek tabakasına matriksle (%90 v/v ACN, 0.1% v/v TFA ile hazırlanan α-siyano-4-hidroksisinamik asit (1 mg/mL) birlikte 1 μL yüklenmiş ve hava da kuruması sağlanmıştır.

MALDI kütle spektrofotometresi ile veri toplama

“Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation” (MALDI) kütle spektrometresi, Applied Biosystems 4800 *Plus* MALDI TOF/TOF™ Analizörü ile yürütülmüştür. Nd:YAG lazer ile örnekler ışınlanmıştır. Spektra 700-3500 Da kütle aralığında refleksiyon modunda toplanmış ve bilinen peptid standartları (bradykinin, neurotensin, angiotensin ve ACTH) kullanılarak dış kalibrasyonu yapılmıştır. Cihaz daha sonra MS/MS (TOF/TOF) moduna alınmıştır. Burada MS taramasından en kuvvetli sekiz peptit izole edilmiş ve parçalanmıştır. Daha sonra kütlelerini ve yoğunluklarını ölçmek için tekrar hızlandırılmışlardır.

Protein tanımlanması için veri tabanı araştırması

Veriler (peptid pik listesi) veri tabanı araştırma programına (Mascot, Matrix Science Ltd, Londra, UK). uygun formatta çıkarılmıştır. Bütün örnekler SwissProt veri tabanındaki Viridiplantae (Plants) karşı seçilen parametreler ile incelenmiştir. Veri tabanı araştırmasındaki yüksek MOWSE en uygun sonucu göstermektedir.

3.2.18. İstatistiksel analiz

Elde edilen verilerin Microsoft Excel 2000 programında ortalaması alınmış, standart sapmaları hesaplanmış ve şekil üzerinde hata çubukları olarak gösterilmiştir. Ayrıca çözünürlük, emülsiyon kapasitesi ve stabilitesi, köpük kapasitesi ve

stabilitesi, antioksidan aktivite, SE-HPLC verilerine tek yönlü varyans analizi uygulanmış ve önemli fark gözlemlendiğinde ortalamalar arasındaki farkı ortaya koymak için LSD (least significant difference) testi yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Materyallere Ait Bazı Fiziksel, Kimyasal Ve Biyokimyasal Analizler

Süne proteaz enzim kaynağı olarak kullanılan süne zararı görmüş buğday (cv. Ege) örneğinde zarar seviyesi sayıca % 61.5 ve ağırlıkça %56.3 olarak belirlenmiştir.

Glutenin elde yıkama yöntemiyle elde edildiği süne zararı görmemiş (sağlam) buğday (cv. Bezostaya) örneğine ait fiziksel analiz sonuçları Çizelge 4.1’ de sunulmaktadır. Türkiye’ deki ekmeklik buğdayların hektolitre ağırlığı değeri ortalama 78 kg/hl’ dir (Köksel vd., 2000). Ekmeklik buğdaylarda unsu ve dönmeli tane oranının daha fazla olması istenmektedir. Soyma sayısına göre bu buğday örneği çok sert grubuna girmektedir. Bu sonuçlara göre Bezostaya çeşiti buğday, ekmeklik-sert buğday sınıfında değerlendirilmiş ve % 15.5 neme tavlansak % 69.5 randıman ile una öğütülmüştür.

Çizelge 4.1. Gluten eldesinde kullanılan sağlam buğday (cv. Bezostaya) örneğine ait bazı fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları

Nem (%)	Protein* (% , km)	Hektolitre ağırlığı (kg/hl)	Bin tane ağırlığı (g, km)	Camsı tane (%)	Unsu tane (%)	Dönmeli tane (%)	Soyma Sayısı (%)
8.3	13.9	77.5	34.2	37	0	63	15.4

*(N x 5.7)

pH-stat çalışmalarında vital gluten (ticari) ve sağlam buğday ununun elde yıkanması sonucu elde edilen gluten kullanılmıştır. Ticari glutene ait rutubet ve protein miktarları sırasıyla % 6.6 ve % 72.7 (% , km) iken elde yıkama ile hazırlanan gluten de rutubet % 3.4 ve protein % 76.8 (% , km) olarak belirlenmiştir.

4.2. Süne Proteolitik Enzim Aktivitesinin Zeleny Sedimentasyon ve Modifiye Sedimentasyon Testleri İle Belirlenmesi

Sağlam buğday ununa ait sedimentasyon (34.5 ml) ve modifiye sedimentasyon (46 ml) değerleri bu buğday örneğinin süne zararı görmediğini ortaya koymaktadır. Çünkü süne zararı gören unlarda proteolitik enzim aktivitesi sonucu gluten parçalanmakta ve bu unların modifiye sedimentasyon değeri, Zeleny sedimentasyon değerinden düşük çıkmaktadır. Modifiye sedimentasyon ve Zeleny

sedimentasyon değerleri arasındaki fark arttıkça, süne zararının da arttığı anlaşılmaktadır. Dolayısıyla gluten hidrolizatlarının üretiminde kullanılan glutenin, süne zararı görmemiş sağlam buğday unundan elde edildiği söylenebilir.

Yüksek oranda süne zararı görmüş durum (makarnalık) buğday örneği (cv. Ege) ise enzim ekstratı eldesinde kullanılmıştır. Bu amaçla Ege çeşitinden elde edilen kırmadan, süne enzim ekstraktı (SEE) su ile ekstrakte (6 saat) edilmiştir. Sağlam buğday ununa %1 oranında SEE ilave edildikten sonra Zeleny sedimentasyon ve modifiye sedimentasyon değerleri sırasıyla 31.5 ve 20 ml olarak belirlenmiştir. İki değer arasındaki fark (11.5 ml) kırmada, süne enzim aktivitesi bulunduğunu göstermektedir. Kırmadan elde edilen SEE miktarını arttırabilmek amacıyla daha uzun ekstraksiyon süreleri denenmiş ve uzun süreli (24 saat) ekstraksiyon sonucunda sedimentasyon değerinin 30.5' den 27.5 ml' ye düştüğü tespit edilmiştir. Bu nedenle kısa süreli enzim ekstraksiyonunun (6 saat) yüksek enzim aktivitesi elde etmek için daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

4.3. Süne Proteolitik Enzim Aktivitesinin 1-Propanolde (%50) Çözünmeyen Glutenin Metodu İle Belirlenmesi

Sağlam buğday ununa (50 mg) SEE ekstraktı (5 mg) ilave edildikten sonra su ile inkübe edilmeden (kontrol) ve 37 °C' de 120 dakika inkübe edilen örneklerle ait 1-propanolde (%50) çözünmeyen glutenin miktarları arasındaki fark, süne enzim aktivitesinin tespitinde kullanılabilecek bir yöntemdir (Sivri and Köksel, 2002). Bu yöntemle sağlam buğday ununda doğal olarak bulunan proteaz enzimlerine ait relatif proteaz enzim aktivitesi (%RPA) %16.3 saptanırken, süne enzim ekstraktı ilave edilmiş olan örnekteki %RPA, %63 olarak belirlenmiştir. Süne enzim ekstraktı hazırlanırken, uzun ekstraksiyon süresi (24 saat) kullanılarak elde edilen enzimin RPA' si %61.2 olarak tespit edilmiş ve uzun süreli inkübasyonun süne enzim aktivitesini artırıcı bir etkisi olmadığı bu yöntemle de gösterilmiştir.

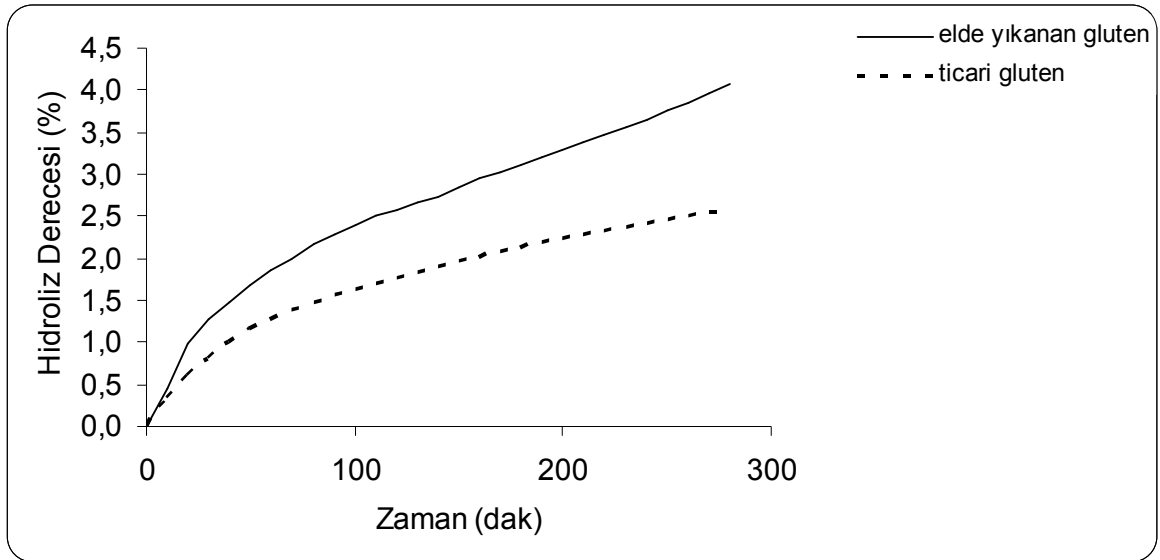
Aynı yöntem substrat olarak elde yıkanarak hazırlanan gluten kullanılarak tekrarlanmıştır. Glutene (50 mg) süne enzim ekstraktından (5 mg) ilave edildikten sonra su (400 µl) ile 37 °C' de 0, 30, 60 ve 120 dakika inkübe edilen örneklerle ait 1-propanolde (%50) çözünmeyen glutenin miktarları tespit edilmiş ve RPA (%) değerleri Çizelge 4.2' de sunulmuştur. RPA (%) değerlerinin inkübasyon süresi ile doğru orantı olarak arttığı görülmektedir.

Çizelge 4.2. Süne enzim ekstraktının (5 mg) elde yıkanarak hazırlanan gluten (50 mg) üzerine etkisi

Inkübasyon süresi (dak)	Relatif Proteaz Aktivitesi (%)
30	54,7
60	61,7
120	69,2

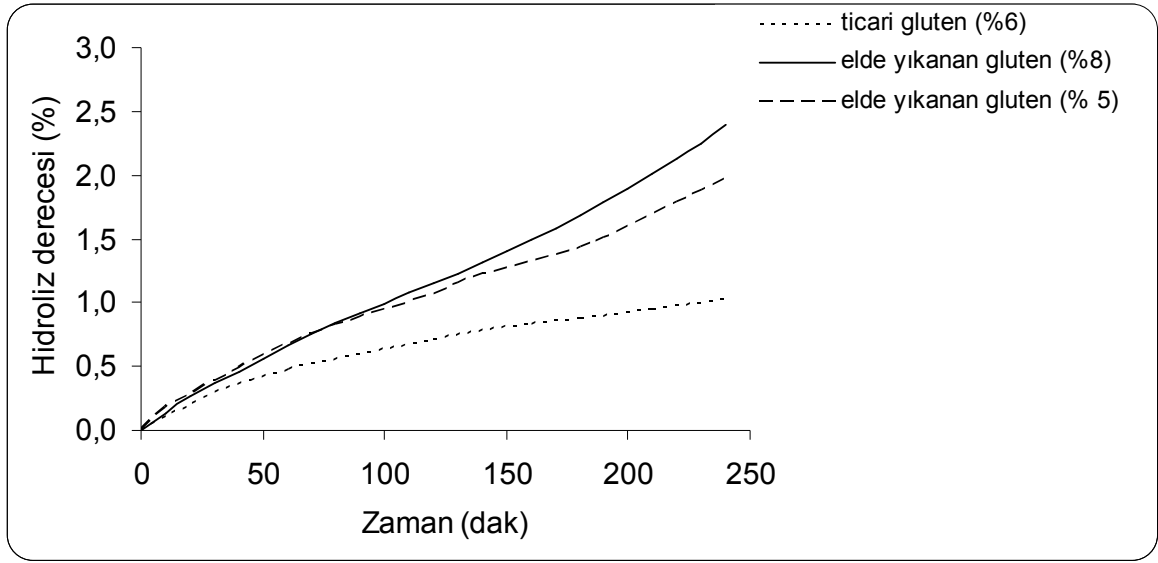
4.4. Süne Proteolitik Enzim Aktivitesinin pH-stat Yöntemiyle Belirlenmesi

Ön denemelerde tripsin enzimi kullanılarak bir serin proteazının vital (ticari) ve elde yıkanarak hazırlanan gluten üzerine etkileri karşılaştırılmıştır. Bu amaçla ticari gluten ve elde yıkanarak hazırlanan glutenin örnekleri, %5' lik sulu süspansiyonlarında, 0.01 enzim:substrat (E:S) oranında hidroliz edilmiştir. Zamana karşı hidroliz derecesi (HD, %) Şekil 4.1' de sunulmuştur. Enzimin elde yıkama yöntemiyle elde edilen glutene karşı daha aktif olduğu görülmektedir.



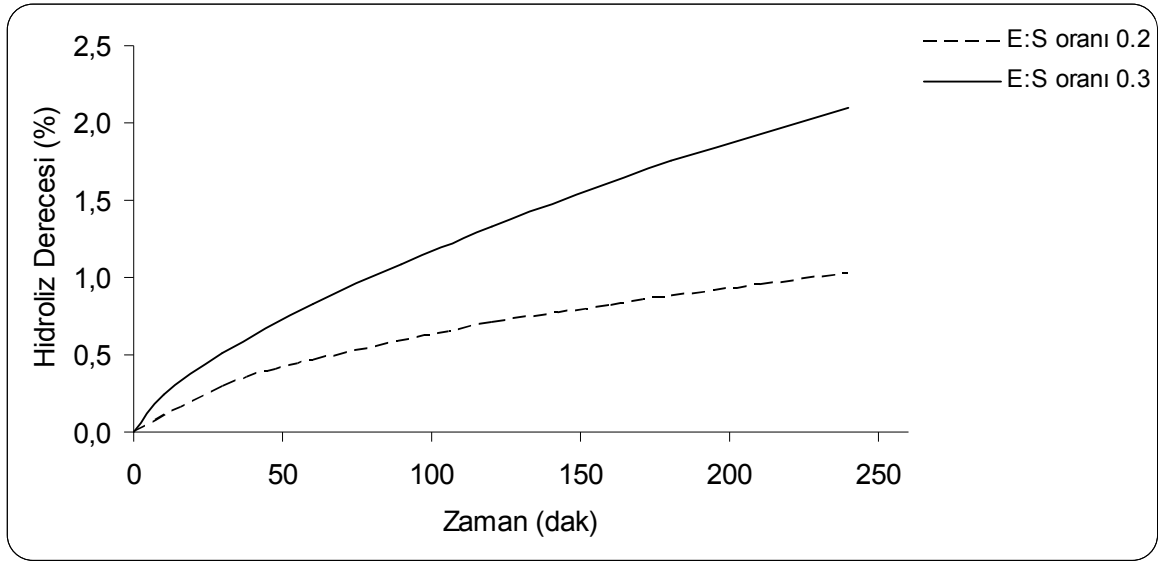
Şekil 4.1. Tripsin enziminin vital (ticari) ve elde yıkanan gluten üzerine etkisinin pH-stat yöntemiyle tespiti

Benzer sonuçlar süne enzim ekstraktı ile de elde edilmiştir (Şekil 4.2). Ticari gluten ve elde yıkanarak hazırlanan glutenin farklı oranlardaki sulu süspansiyonuna 0.2 E:S oranında süne enzim ekstraktından ilave edilmiştir. Süne proteolitik enziminin elde yıkanarak hazırlanan gluten üzerine etkisi ticari glutene göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca ortamda substrat oranı arttıkça hidroliz hızının arttığı gözlenmiştir.



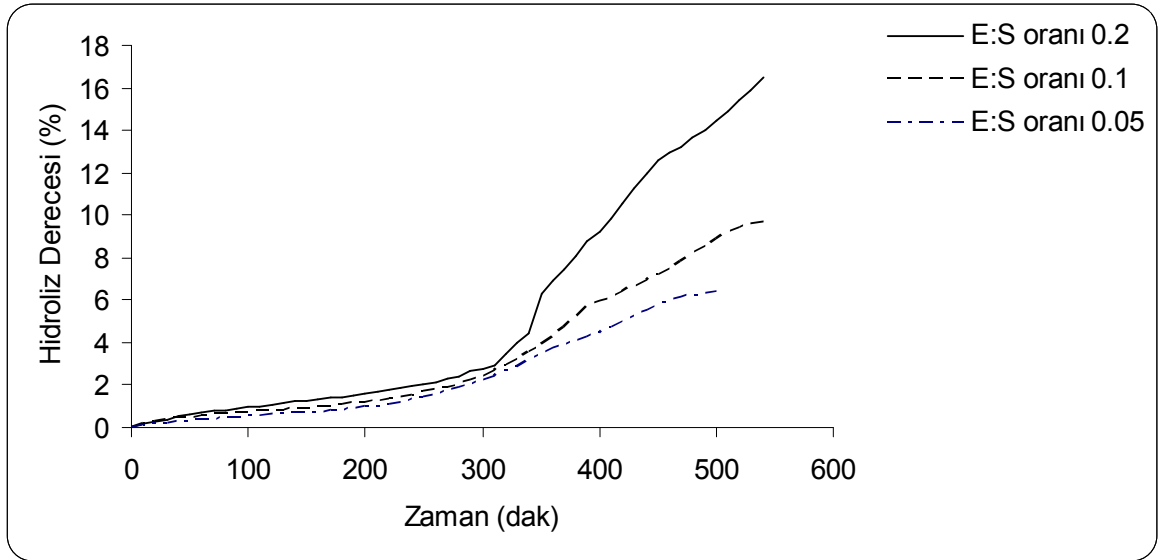
Şekil 4.2. Süne enzim ekstraktının ticari ve elde yıkanan gluten üzerine etkisinin pH-stat yöntemiyle tespiti

Bu yöntemde hidroliz derecesi üzerine enzim miktarının etkisi incelenmiştir. Bu amaçla ticari glutenin sulu süspansiyonuna (%6) E:S oranı 0.2 ve 0.3 olacak şekilde süne enzim ekstraktı ilave edilmiş ve optimum koşullarda pH-stat titrasyonu yapılmıştır. Örneklere ait hidroliz derecesinin zamanla değişimini gösteren grafik Şekil 4.3' de verilmektedir. Ortamdaki substrat oranı ve diğer parametreler sabitken enzim miktarı arttıkça hidroliz derecesi artmaktadır. Ayrıca pH-stat yöntemiyle reaksiyonun ilk dakikalarında bile enzim aktiviteleri arasında önemli bir fark olduğu görülmektedir.



Şekil 4.3. Ticari glutenin sulu süspansiyonunun (%6) farklı oranlarda süne enzim ekstraktıyla hidrolizi

Benzer sonuç elde yıkanan gluten ile de elde edilmiştir. Elde yıkanan glutenin sulu süspansiyonuna (%5) farklı E:S oranlarında (0.05; 0.1; 0.2) süne enzim ekstraktı ilave edilerek pH-stat titrasyonu yapılmıştır (Şekil 4.4). Benzer şekilde ortamdaki enzim miktarı arttırıldıkça hidroliz derecesindeki artış açık bir şekilde reaksiyonun ilk dakikalarından itibaren gözlenebilmektedir.



Şekil 4.4. Elde yıkanan glutenin sulu süspansiyonu (% 5) üzerine farklı miktardaki süne enzim ekstraktının etkisi

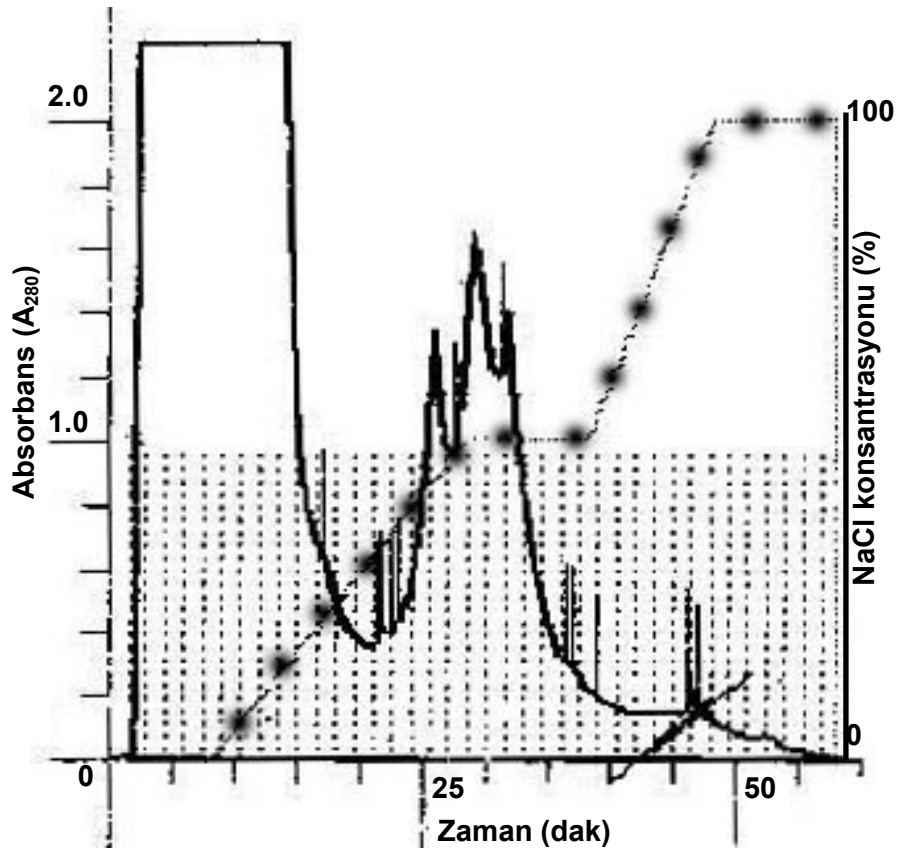
pH-stat ile elde edilen sonuçlar, bu yöntemin süne proteolitik enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılabileceğini göstermektedir. Yöntemin hızlı olması ve az miktarda substrat, enzim ve kimyasal kullanılması gibi avantajlar göz önüne alınarak tez kapsamında hidrolizatların hazırlanmasında pH-stat yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir. Ayrıca gluten hidrolizatlarının elde edilmesinde fazla miktarda SEE gerekmesi ve bu enzim ekstraktından gelebilecek düşük moleküler ağırlıklı buğday proteinlerinin gluten hidrolizatlarının fonksiyonel özelliklerini olumsuz etkileyebileceği göz önüne alınarak, süne enziminin saflaştırıldıktan sonra hidrolizatların eldesinde kullanımına karar verilmiştir.

4.5. Süne Proteolitik Enziminin Saflaştırılması

Süne enzimi süne zararı görmüş buğdaylardan elde edilen SEE' den iki aşamada saflaştırılmıştır. İlk olarak iyon değişim kromatografisi ve daha sonra jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri kullanılmıştır. Enzim ekstraktı tampon çözeltiyle (0.02 M sodyum-fosfat tamponu, pH 7.4) karıştırılıp (0.1 g/ml), DEAE-selüloz anyon değiştirici kolona yüklendikten sonra 8. dakikadan itibaren 1 M NaCl' ün lineer gradienti ile yıkama (elusyon) işlemine geçilmiştir. Zamana karşı absorpsiyon (A_{280nm}) değerlerini gösteren grafik Şekil 4.5' de sunulmuştur. Fraksiyon toplayıcısı yardımıyla kolondan 3 ml/dak akış hızında 1.5 dak aralıklarla fraksiyonlar toplanmış ve bunlarda 1-propanolde (% 50) çözünmeyen glutenin metoduna göre proteolitik aktivite tayini yapılmıştır (Çizelge 4.3).

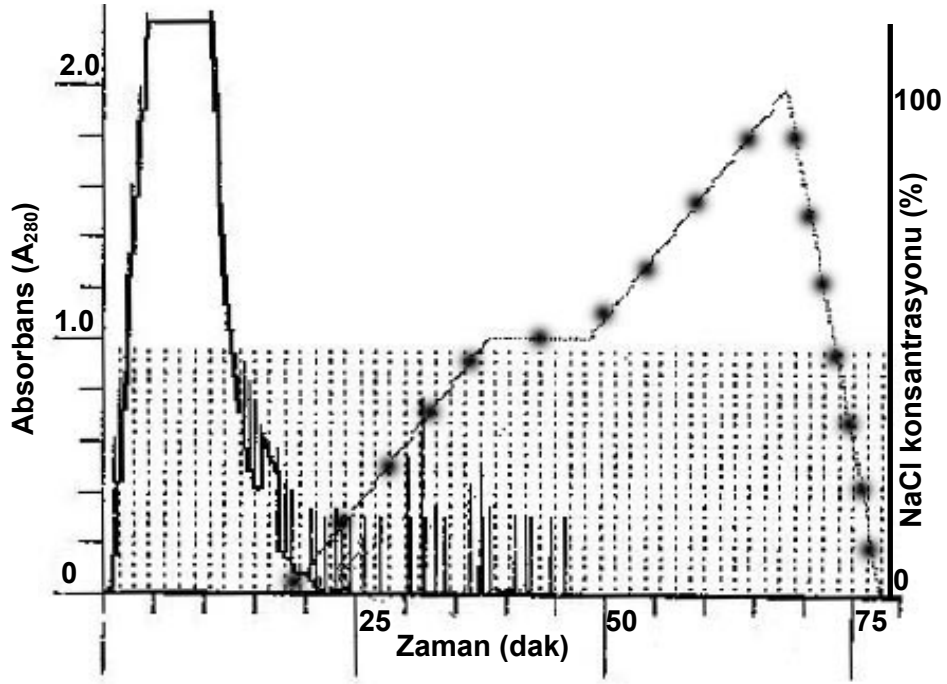
Çizelge 4.3. Anyon değişim (DEAE-selüloz) kromatografisinde toplanan bazı fraksiyonlara ait relatif proteaz aktivitesi (RPA, %), spesifik aktivite ve saflaştırma faktörleri

Örnekler	RPA (%)	A_{280}	Seyreltme Faktörü	Spesifik Aktivite	Saflaştırma Faktörü
Kolona yüklenen SEE	52.1 ± 2.4	0.45	300	0.4	-
Fraksiyon 5	76.9 ± 1.3	0.40	30	6.4	16.3
Fraksiyon 8	75.2 ± 0.9	0.38	30	6.6	17.0
Fraksiyon 11	54.7 ± 3.3	0.21	30	8.6	22.1
Fraksiyon 13	0	2.13	1	-	-
Fraksiyon 17	0	0.21	1	-	-
Fraksiyon 18	0	0.66	1	-	-
Fraksiyon 19	0	0.88	1	-	-
Fraksiyon 20	0	1.02	1	-	-
Fraksiyon 22	0	1.06	1	-	-
Fraksiyon 23	0	0.87	1	-	-
Fraksiyon 24	0	0.46	1	-	-
Fraksiyon 25	0	0.23	1	-	-



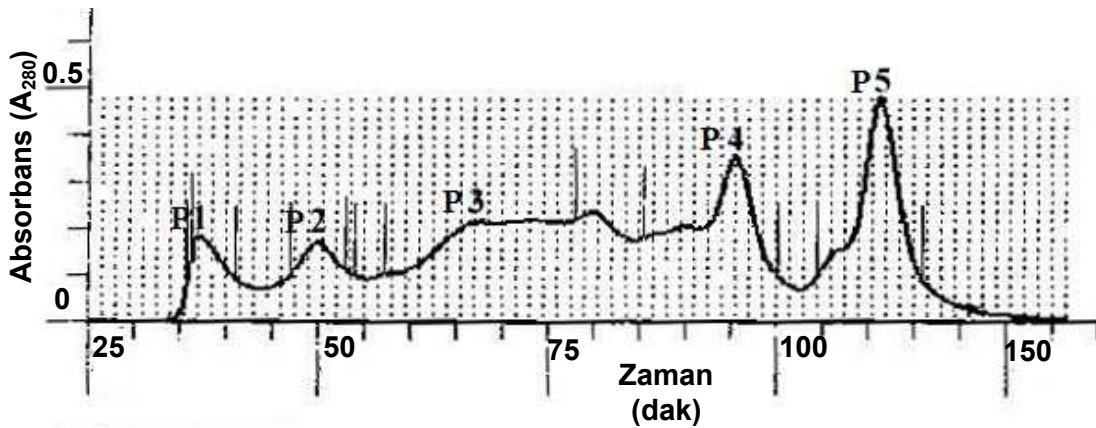
Şekil 4.5. Süne enzim ekstraktının, anyon değişim (DEAE-selüloz) kromatografisi ile kısmen saflaştırılması (---●---●---1 M NaCl gradienti)

1-propanolde (%50) çözünmeyen glutenin metoduna göre DEAE-selüloz kolonunda tutunmadan ayrılan fraksiyonlarda yüksek relatif proteolitik enzim aktivitesi saptanırken, kolondan NaCl gradienti ile yıkanarak ayrılan fraksiyonlarda proteolitik enzim aktivitesi saptanmamıştır. Bu nedenle enzimin saflaştırılmasında ilk aşama DEAE-selüloz kolona tutunmayan fraksiyonun toplanması olmuştur. Böylece enzim ekstraktı içerisinde aktivite göstermeyen bir kısım protein uzaklaştırılmıştır. DEAE-selüloz kolonda proteolitik aktivite gösteren fraksiyonlar biraraya toplanmış ve katyon değiştirici kolon olan CM-sefaroze kolona uygulanmıştır. Kolona tutunan materyallerin yıkanması için aynı şekilde NaCl gradienti kullanılmıştır. Ancak bu aşamada bütün proteinlerin kolona tutunmadığı ve proteinlerin fraksiyonlarına ayıramadığı saptanmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Anion değişim kolonunda enzim aktivitesi gösteren fraksiyonların CM-sefaroze katyon değiştirici kolonda ayrımı (---•---1 M NaCl gradienti)

Bu durumda DEAE-selüloz anion değiştirici kolonda enzim aktivitesine sahip fraksiyonlar toplanmış ve liyofilizatörde konsantre edildikten sonra daha fazla saflaştırabilmek için jel filtrasyon kolonuna uygulanmıştır. Kolonu ilk terk eden fraksiyonlar yüksek molekül ağırlığına sahip proteinlerdir. Jel filtrasyon ile elde edilen kromatogram Şekil 4.7' de gösterilmektedir. 3 ml/dak. akış hızıyla 4.5 ml' lik fraksiyonlar toplanmış ve 280 nm' de absorbans veren piklerin altında kalan fraksiyonlar birleştirilerek proteaz aktiviteleri tayin edilmiştir. Bu durumda jel filtrasyon sonucunda toplam beş fraksiyonda (P1, P2, P3, P4 ve P5) enzim aktivitesi tayini yapılmış ve veriler Çizelge 4.4' de sunulmuştur.



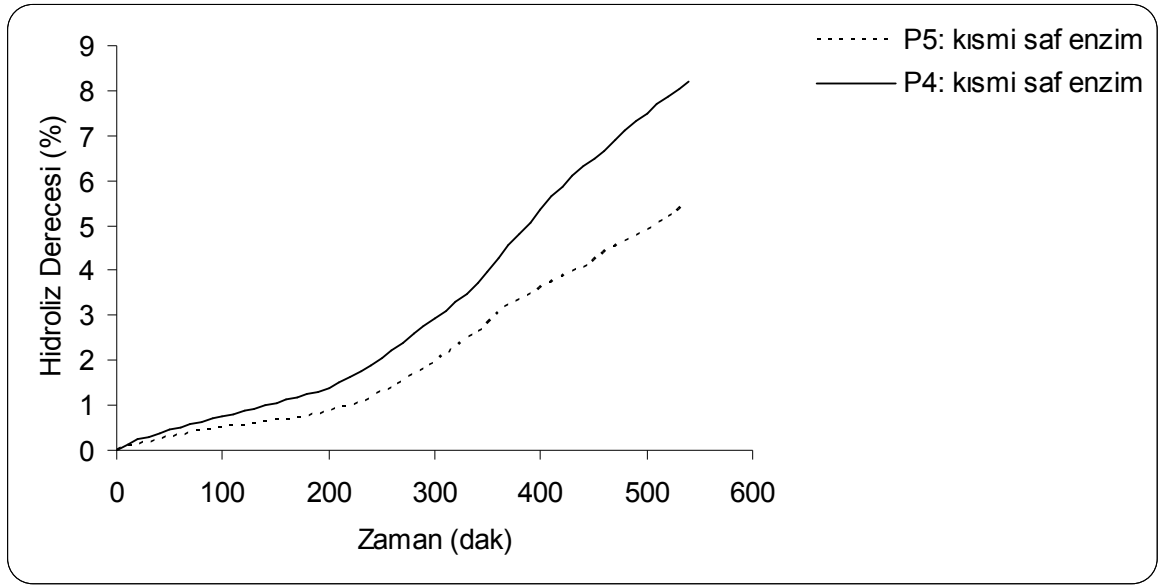
Şekil 4.7. Süne enziminin jel filtrasyon (Superdeks 75) ile saflaştırılması

Çizelge 4.4. Süne enziminin jel filtrasyon ile saflaştırılmasında elde edilen fraksiyonlara (P1, P2, P3, P4 ve P5) ait relatif proteaz aktivitesi (RPA, %), spesifik aktivite ve saflaştırma faktörleri

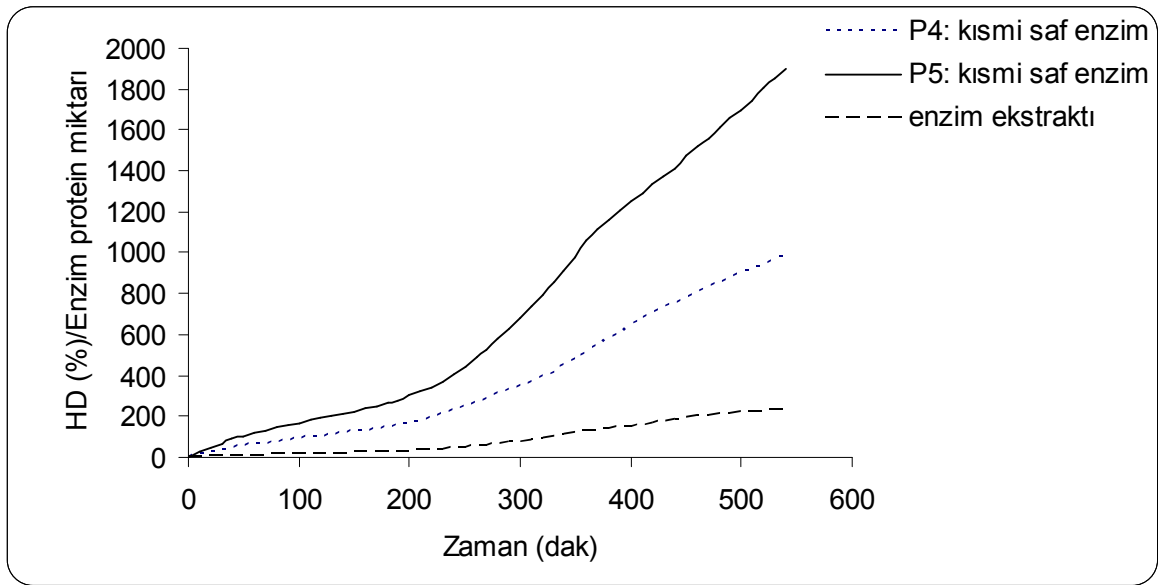
Örnekler	RPA (%)	A ₂₈₀	Spesifik Aktivite	Saflaştırma Faktörü
P1	-	0.27	-	-
P2	-	0.10	-	-
P3	-	0.17	-	-
P4	9.8 ± 1.6	0.67	14.8	37.9
P5	40.8 ± 5.2	0.35	117.5	301.9

Jel filtrasyon sonucunda toplanan beş fraksiyondan ikisinde (P4 ve P5) proteolitik enzim aktivitesi saptanmıştır. Moleküler ağırlığı daha küçük olan P5 fraksiyonunun spesifik enzim aktivitesi daha yüksek bulunmuştur. P4 ve P5 fraksiyonlarının süne enzim ekstraktına göre sırasıyla yaklaşık 38 ve 300 katı saflaştırılabildiği belirlenmiştir. Her iki fraksiyon ayrı ayrı toplanmış ve liyofilize edildikten sonra -20 °C’ de depolanmıştır.

pH-stat metodu, jel filtrasyon ile elde edilen bu iki fraksiyonun (P4 ve P5) proteaz aktivitelerinin belirlenmesinde de kullanılmıştır. Elde yıkanan glutenin sulu süspansiyonunun (%5) P4 veya P5 enzim fraksiyonlarıyla 0.05 E:S oranında pH-stat ile hidrolizine ait grafik Şekil 4.8.’ da sunulmuştur. P4 fraksiyonunun P5’ e göre daha fazla protein içerdiği ve dolayısıyla enzim konsantrasyonu daha yüksek bir fraksiyon olduğu, için hidroliz eğrisinin eğiminin daha yüksek yani hidrolizin daha hızlı gerçekleştiği görülmektedir. Ancak P4 ve P5 fraksiyonların protein miktarlarına (g) oranlandığında (Şekil 4.9) elde edilen değerlerin kullanılan diğer proteaz aktivitesi (1-propanolde (%50) çözünmeyen glutenin metodu) sonuçlarıyla uyum halinde olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.9 incelendiğinde en yüksek spesifik enzim aktivitesinin, P5 fraksiyonunda olduğu görülmektedir.



Şekil 4.8. Elde yıkanan glutenin sulu süspansiyonu (%5) üzerine E:S oranı 0.05 olan P4 ve P5 enzim fraksiyonlarının etkisi

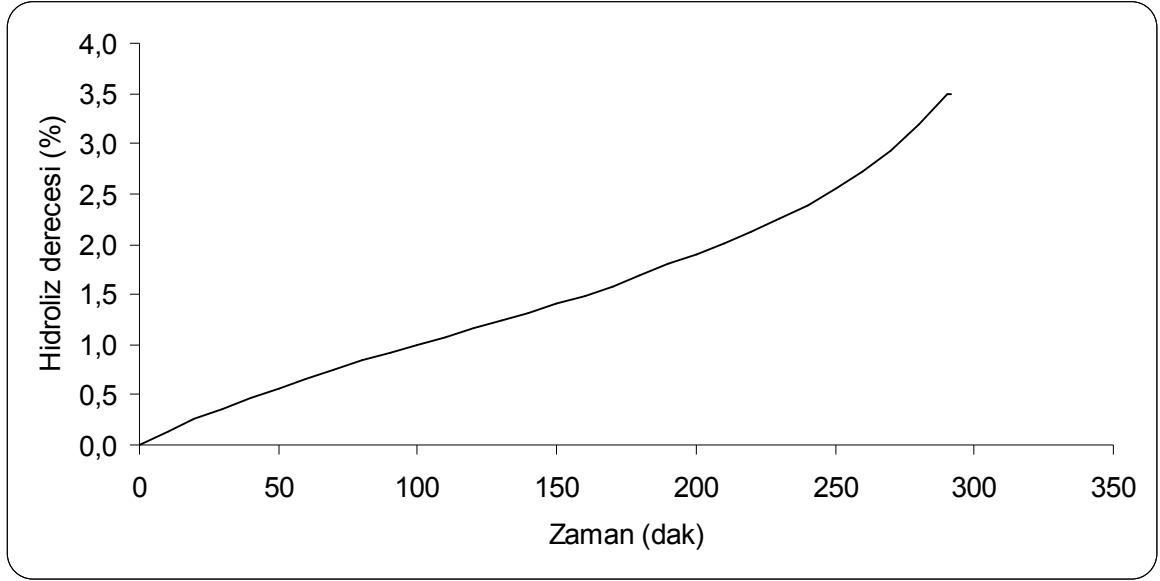


Şekil 4.9. Elde yıkanan glutenin sulu süspansiyonunun (%5) SEE, P4 ve P5 enzimleri ile hidrolizi sırasında zamana karşı elde edilen %HD/protein miktarı oranı

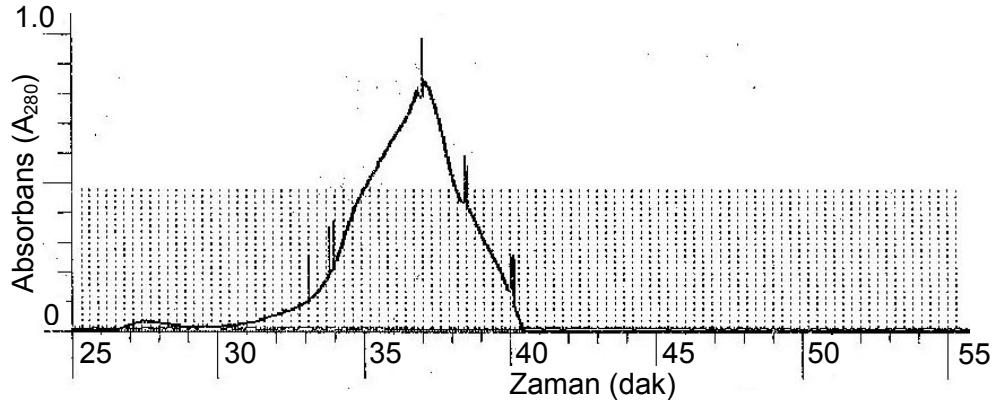
4.6. Gluten Hidrolizatlarının Farklı Tekniklerle (Jel Filtrasyon, Anyon Değişim Kromatografisi ve Ultrafiltrasyon) Fraksiyonlara Ayrılması

Elde yıkanarak hazırlanan glutenin sulu süspansiyonu 35 °C' de pH 8.5' da süne enzim ekstraktı ile 0.2 E:S oranında hidroliz edilmiştir (Şekil 4.10). Hidroliz derecesi %3.5 olduğunda enzim termal inaktivasyona uğratıldıktan sonra sıvı

kısmı alınmıştır. Elde edilen sulu fraksiyondaki proteinler jel filtrasyon, anyon değişim kromatografisi ve ultrafiltrasyonla incelenmiştir.



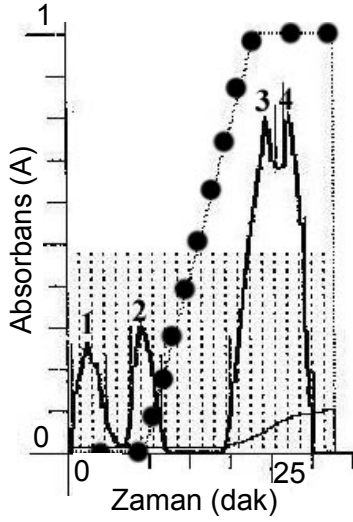
Şekil 4.10. Elde ykanarak elde edilen glutenin, pH-stat ile belirlenen hidroliz derecesinin zamanla değişimi



Şekil 4.11. Gluten hidrolizatının (HD %3.5) jel filtrasyonla fraksiyona ayırımı

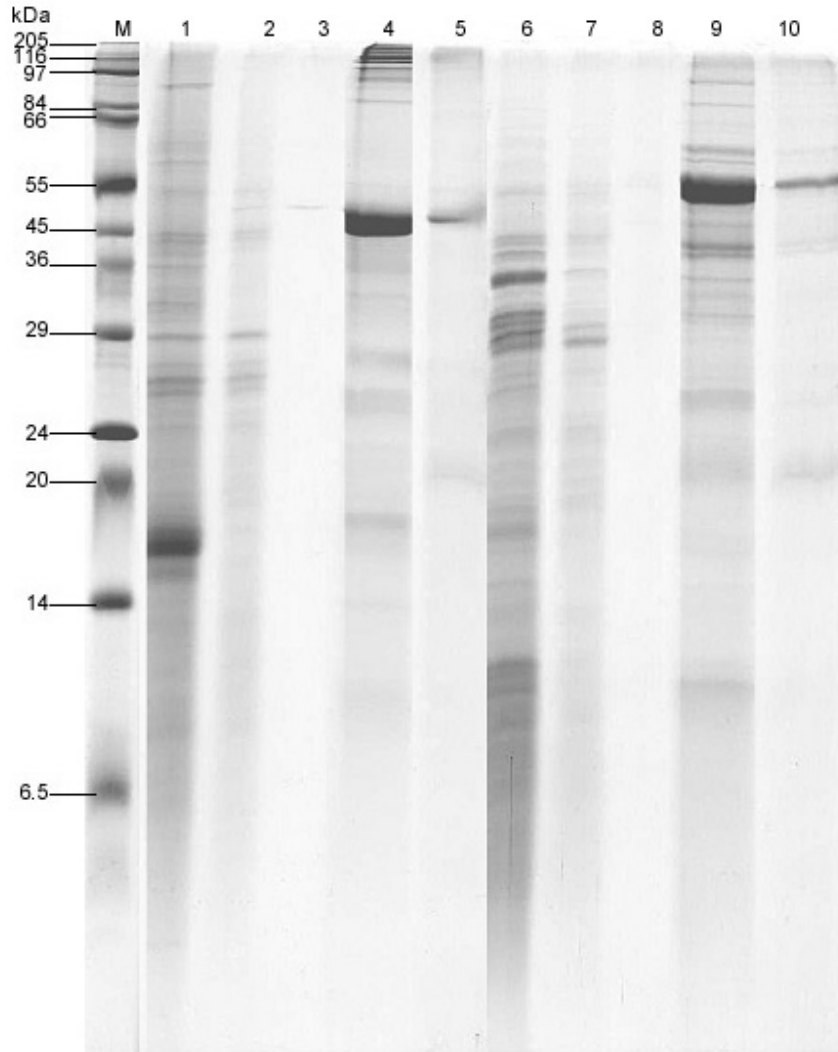
Gluten hidrolizatındaki proteinlerin moleküler boyut dağılımı hakkında fikir sahibi olmak için yapılan jel filtrasyon (Superdex 200, Pharmacia) sonucunda sadece bir fraksiyon elde edilmiştir (Şekil 4.11). Bu durum hidrolizatın sadece belli bir moleküler ağırlıktaki peptidlerden oluştuğunu göstermektedir. Bushuk et al., (1984) tarafından yapılan bir çalışmada indirgenmiş ve alkilasyon uygulanmış glutenin proteini jel filtrasyon kolonundan (sefadeks G-200) geçirilmiştir. Kolonun boş hacminde elde edilen ve en yüksek molekül ağırlığına sahip ilk fraksiyon

elektroforez ile incelenmiş ve bu fraksiyonun düşük moleküler ağırlıklı gluteninlerden oluşan bir agregat olduğu saptamıştır. Bu fraksiyonda yüksek oranda saptanan glikoproteinlerin, hidrofobik etkileşimlerle büyük glutenin agregatlarının oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir. Bu fraksiyonun birden fazla proteinden oluştuğu, iyon değişim (DEAE-selüloz) kromatografisi ile gösterilmiştir (Şekil 4.12). Anyon değiştirici kolona tutunmayan pozitif yüklü proteinler, iki pik halinde ve kolona bağlanan negatif yüklü proteinler ise NaCl ile yıkanarak son iki pik de birbirlerinden ayrılmıştır. Sonuç olarak jel filtrasyon yöntemiyle ayrılamayan peptidler, iyon değişim kromatografisi yöntemiyle dört farklı fraksiyona ayrılabilmiştir.



Şekil 4.12. Gluten hidrolizatının (HD %3.5) anyon değişim kolonunda (DEAE-selüloz) ayrılması (---•---•---1 M NaCl gradienti)

Gluten hidrolizatının (HD % 3.5) jel filtrasyon sonucunda elde edilen tek fraksiyon ve iyon değişim kromatografisi sonucunda elde edilen 4 fraksiyon SDS-PAGE ile 2-merkaptetanol ile indirgenmiş ve indirgenmemiş ortamlarda incelenmiştir (Şekil 4.13). Elektroforegram incelendiğinde anyon değişim kolonuna bağlanan yani negatif yükü fazla olan proteinlerin (Şekil 4.13; hat 4, 5 ve 9, 10) diğerlerine göre daha yoğun olduğu söylenebilir.

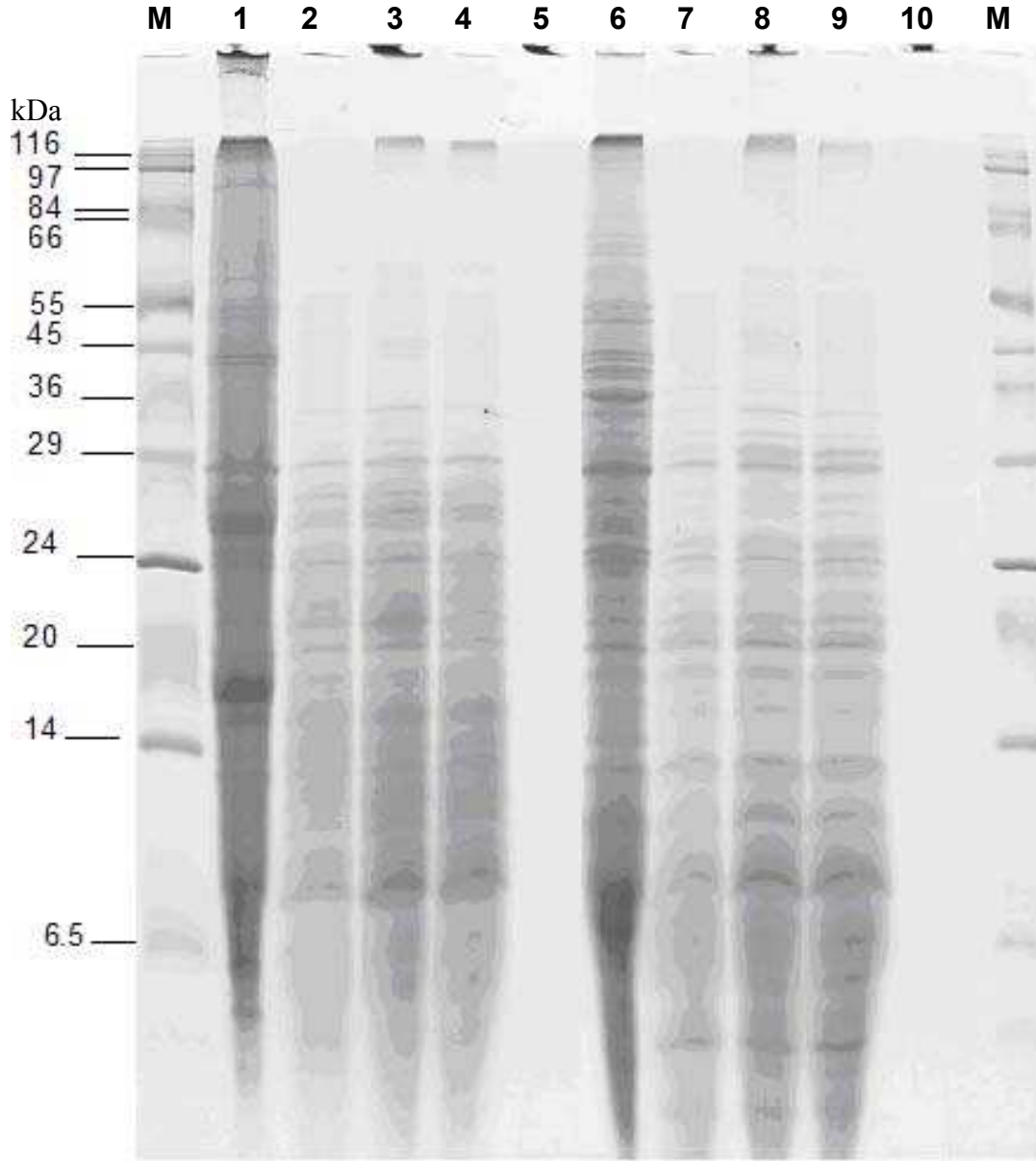


Şekil 4.13. Gluten hidrolizatının (HD % 3.5) jel filtrasyon ve anyon değişim kromatografisi teknikleriyle ayrılan fraksiyonlarına ait SDS-PAGE elektroforegramı

- | | |
|------------|--|
| M. | Protein standart |
| 1. | Jel filtrasyon fraksiyonu, indirgenmemiş |
| 2. | İyon değişim kromatografisi: 1. fraksiyon, indirgenmemiş |
| 3. | İyon değişim kromatografisi: 2. fraksiyon, indirgenmemiş |
| 4. | İyon değişim kromatografisi: 3. fraksiyon, indirgenmemiş |
| 5. | İyon değişim kromatografisi: 4. fraksiyon, indirgenmemiş |
| 6. | Jel filtrasyon fraksiyonu, indirgenmemiş |
| 7. | İyon değişim kromatografisi: 1. fraksiyon, indirgenmiş |
| 8. | İyon değişim kromatografisi: 2. fraksiyon, indirgenmiş |
| 9. | İyon değişim kromatografisi: 3. fraksiyon, indirgenmiş |
| 10. | İyon değişim kromatografisi: 4. fraksiyon, indirgenmiş |

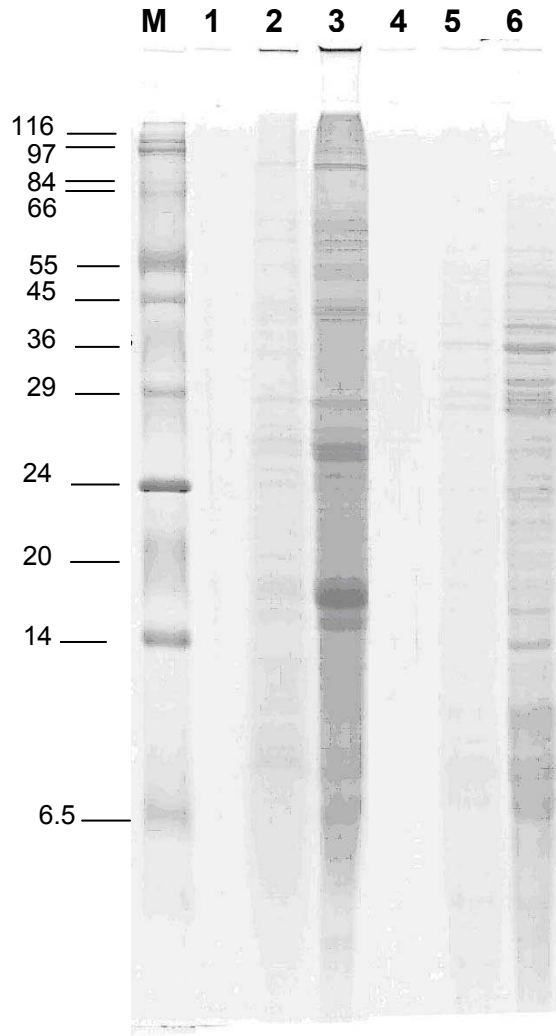
Gluten hidrolizatı (HD % 3.5) değişik gözenek çapındaki membranlar kullanılarak ultrafiltrasyon düzeneklerinde molekül ağırlıklarına göre fraksiyonlara ayrılmaya çalışılmıştır. Uygulamalar iki farklı ultrafiltrasyon düzeneğinde gerçekleştirilmiştir. İlk sistem peristaltik pompa ile ters akış sağlayan, geri beslemeli, farklı gözenek çapına sahip (100 kDa, 50 kDa, 20 kDa ve 5 kDa) polietersülfon membran filtreler bulunan ultrafiltrasyon birimidir (Sartorius, Almanya). Diğer sistem karıştırmalı hücre tipi Model 8200 (Amicon, Almanya) ultrafiltrasyon düzeneğidir. Bu sistemde rejenere selüloz membran filtreler (10 ve 30 kDa) kullanılmış ve 3.5 kg/cm² basınçta (azot gazı ile) fraksiyonlarına ayrılmaya çalışılmıştır.

Her iki düzenek ile elde edilen ultrafiltrasyon fraksiyonları SDS-PAGE ile incelenmiştir (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15). Özellikle 20<kDa<50, 5<kDa<20 (Şekil 4.14; hat 3 ve 4) ve 10<kDa<30 (Şekil 4.15; hat 2) moleküler ağırlık arasındaki peptid fraksiyonlarını içeren örneklerin indirgenmemiş formlarında jele girmeyen veya olması gereken moleküler aralığın üstünde protein bantlarına sahip olduğu saptanmıştır. Bu nedenle ultrafiltrasyon ile gluten hidrolizatının moleküler ağırlığına göre ayırımının başarılı bir şekilde gerçekleştirilemediği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle hidrolizattaki (HD %3.5) moleküler büyüklük dağılımını belirlemek amacıyla dinamik ışık saçılımı (DLS) tekniği kullanılmıştır.



Şekil 4.14. Sartorius ultrafiltrasyon düzeneğinde 100, 50, 20 ve 5 kDa' luk membran filtreler ile fraksiyonlarına ayrılan peptidlere ait SDS-PAGE elektroforegramı

- M.** Protein standart
- 1.** >100 kDa peptidler, indirgenmemiş
- 2.** 50<kDa<100 peptidler, indirgenmemiş
- 3.** 20<kDa<50 peptidler, indirgenmemiş
- 4.** 5<kDa<20 peptidler, indirgenmemiş
- 5.** kDa<5 peptidler, indirgenmemiş
- 6.** >100 kDa peptidler, indirgenmiş
- 7.** 50<kDa<100 peptidler, indirgenmiş
- 8.** 20<kDa<50 peptidler, indirgenmiş
- 9.** 5<kDa<20 peptidler, indirgenmiş
- 10.** kDa<5 peptidler, indirgenmiş

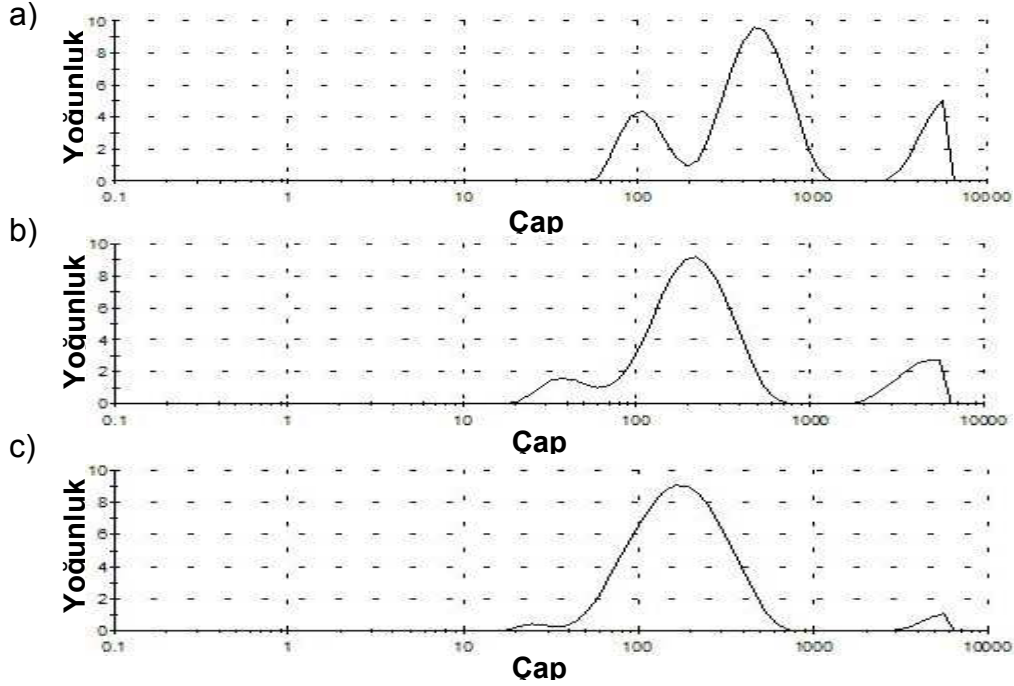


Şekil 4.15. Amicon ultrafiltrasyon düzeneğinde 10 ve 30 kDa' luk membran filtreler ile fraksiyonlarına ayrılan peptidlere ait SDS-PAGE elektroforegramı

- M.** Sigma protein standart
- 1.** <10 kDa peptidler, indirgenmemiş
- 2.** 10<kDa<30 peptidler, indirgenmemiş
- 3.** kDa>30 peptidler, indirgenmemiş
- 4.** kDa<10 peptidler, indirgenmiş
- 5.** 10<kDa<30 olan peptidler, indirgenmiş
- 6.** kDa>30 olan peptidler, indirgenmiş

4.7. Gluten Hidrolizatının Moleküler Boyut Dağılımının Dinamik Işık Saçılımı (DLS) ile İncelenmesi

Hidrolizatının (18.2 mg protein/ml) ve bunun 1/10 ile 1/100 oranında seyreltilmiş örneklerinin, DLS ile incelenmesi sonucunda elde edilen partikül boyut dağılımına ait veriler Şekil 4.16 ve Çizelge 4.5’ de verilmiştir.



Şekil 4.16. Gluten hidrolizatı (HD % 3.5) ve seyreltilmiş örneklerine ait DLS partikül boyut dağılımları: a) Gluten hidrolizatı; b) Gluten hidrolizatı (seyreltme, 1/10); c) Gluten hidrolizatı (seyreltme, 1/100)

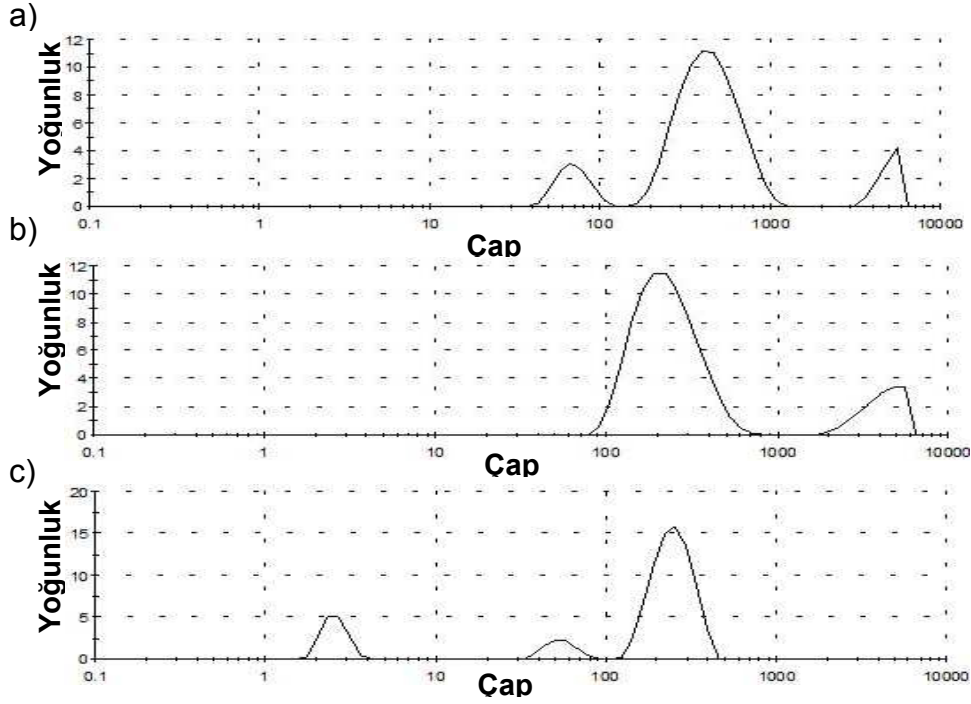
Gluten hidrolizatının PDI değeri 0.1’ den yüksek olduğu için ortamda molekül boyutu birbirinden farklı birçok partikül olduğu söylenebilir (Çizelge 4.5). Partiküllerin ortalama hidrodinamik yarıçapı 325.1 nm’ dir. Ortamdaki partiküllerin yaklaşık %14.1’ i agregat oluşturduğu saptanmıştır. Gluten hidrolizatında seyreltme işlemi yapıldığında agregat konsantrasyonunun azaldığı ve hidrodinamik çap eğrisinin daha düşük tarafa doğru kaydığı görülmektedir. Seyreltme işlemi sonucunda PDI değeri giderek azalmakta, ancak hala ortamda birden çok farklı molekül boyutundaki partikülün bulunduğu görülmektedir. Agregat konsantrasyonu ise %14.1’ den 1/100 seyreltme işlemi sonucunda % 2.9’ a kadar düşmüştür.

Çizelge 4.5. Gluten hidrolizatı (HD %3.5) ve seyreltilmiş örneklerine ait dinamik ışık saçılımı (DLS) partikül boyut dağılımı değerleri

Örnek	z-ortalama (nm)	polidispersite indeksi (PDI)	d _H (nm)	yoğunluk (%)	pik genişliği (nm)
Gluten hidrolizatı (HD %3.5)	325.1	0.8	509.0	64.5	187.6
			111.6	21.4	30.8
			4726.0	14.1	767.2
Gluten hidrolizatı (seyreltme, 1/10)	185.1	0.5	227.4	78.3	107.8
			4153.0	13.1	1021.0
			39.81.0	8.6	10.6
Gluten hidrolizatı (seyreltme, 1/100)	148.1	0.3	195.5	95.8	111.6
			4783.0	2.9	732.6
			26.0	1.3	4.31

Proteinlerin agregasyonu ortamın bileşimine, pH' sına ve iyonik kuvvetine bağlıdır. Hububat depo proteinlerinin agregat oluşturma eğilimi ortam pH' sı (5.55-9.10) arttıkça artmaktadır. Özellikle bu proteinlerin izoelektrik noktası olan pH 6.0-7.5' da en yoğun agregasyonlar oluşmaktadır (Trufanov et al., 2003). Gluten hidrolizatının hazırlanması sırasında ortam pH' sının (pH 8.5) agregat oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir.

Hidrolizatlardaki proteinlerin agregat oluşturmalarını engellemek için gluten hidrolizatı ve bunun seyreltilmiş örneklerine %2 sodyum dodesil sülfat (SDS) ilave edilmiş ve DLS ile partiküllerin boyut dağılımı incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.17 ve Çizelge 4.6' da verilmiştir. %2 SDS ilavesinin, yüksek hidrodinamik çapa sahip olan agregatın tamamen açılarak daha düşük nm' deki partiküllerine ayrıldığı görülmüştür. Deterjanların türü (anyonik, katyonik ve iyonik olmayan) ve konsantrasyonu, protein globüllerinin hidrofobisitesini etkileyerek proteinlerin agregasyon eğilimini değiştirmektedir. Trufanov et al. (2003) SDS' in varlığının en fazla asidik pH' da yani proteinlerin genel olarak pozitif yüklendiği pH değerlerinde etkili olduğunu; asidik pH' larda SDS ilavesinin agregasyonu artırdığını, zayıf alkali koşullarda ise agregasyonun etkilenmediğini bildirmişlerdir. Ayrıca SDS' in konsantrasyonu artırıldığında ise alkali pH' da agregasyonda azalma olduğunu, ancak hala ortamda agregat bulunduğunu da saptamışlardır.



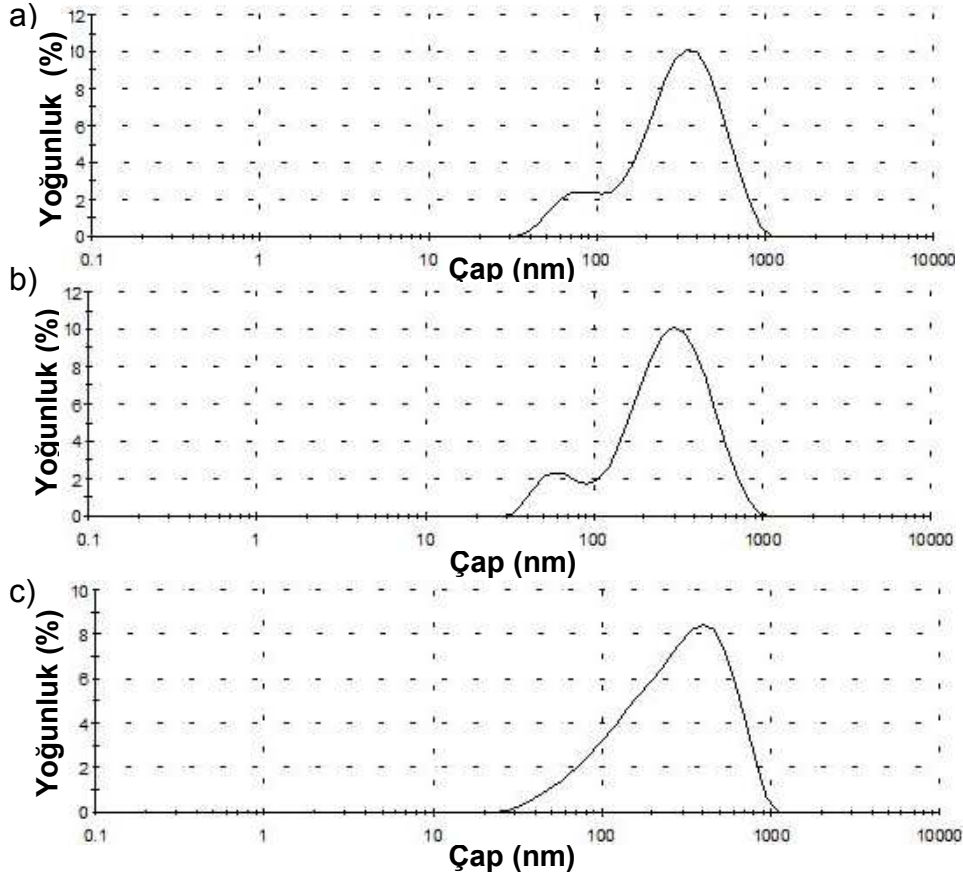
Şekil 4.17. Gluten hidrolizatı ve seyreltilmiş örneklerin %2 SDS bulunan ortamdaki DLS partikül boyut dağılımı: a) Gluten hidrolizatı; b) Gluten hidrolizatı (seyreltme, 1/10); c) Gluten hidrolizatı (seyreltme, 1/100)

Çizelge 4.6. Gluten hidrolizatı ve seyreltilmiş örneklerine %2 SDS ilave edildiğinde DLS partikül boyut dağılımı değerleri

Örnek	z-ortalama (nm)	polidispersiti indeksi (PDI)	d _H (nm)	yoğunluk (%)	pik genişliği (nm)
Gluten hidrolizatı (HD %3.5)	308.2	0.8	459.5	78.7	176.2
			70.0	11.9	14.4
			4946.0	9.5	642.4
Gluten hidrolizatı (seyreltme, 1/10)	226.8	0.4	236.3	84.2	97.8
			4201.0	15.8	1016.0
			-	-	-
Gluten hidrolizatı (seyreltme, 1/100)	287.4	0.4	250.7	75.9	62.5
			2551.0	13.5	0.4
			54.6	8.3	10.4

Gluten hidrolizatı ve seyreltilmiş örneklerinde agregat oluşumunu engellemek amacıyla ortama 6M üre ilave edilmiş ve partikül boyut dağılımı DLS ile incelenmiştir (Şekil 4.18 ve Çizelge 4.7). Ortama üre ilavesinin agregat oluşumunu

azalttığı elde edilen sonuçlarda gözlenmiştir. İyonik ve hidrofobik etkileşimlere ek olarak, proteinlerin agregat oluşturması, bu moleküllerin uzaydaki yapılarını stabilize eden hidrojen bağlarından da etkilenmektedir. Üre hidrojen bağlarını kırdığı için katlanmış yapıda olan protein molekülleri açılmakta ve protein moleküllerinin, moleküller arası etkileşime girmesi azalmaktadır (Trufanov et al., 2003).

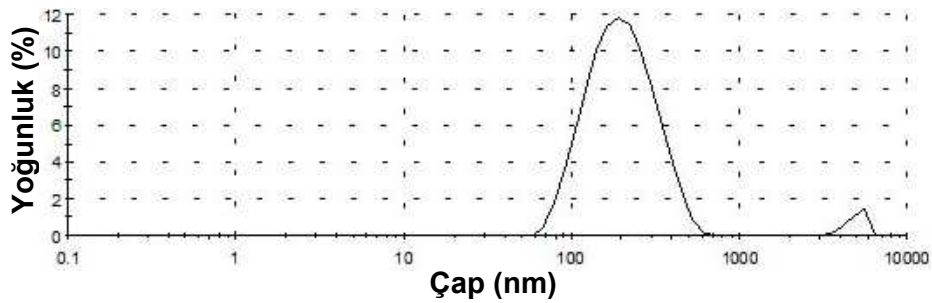


Şekil 4.18. Gluten hidrolizatı ve seyreltilmiş örneklerin 6M üre bulunan ortamdaki DLS partikül boyut dağılımı: a) Gluten hidrolizatı; b) Gluten hidrolizatı (seyreltme, 1/10); c) Gluten hidrolizatı (seyreltme, 1/100)

Çizelge 4.7. Gluten hidrolizatı ve seyreltilmiş örneklerin 6 M üre bulunan ortamdaki DLS partikül boyut dağılımı değerleri

Örnek	z-ortalama (nm)	polidispersiti indeksi (PDI)	d _H (nm)	yoğunluk (%)	pik genişliği (nm)
Gluten hidrolizatı (%3.5)	215.1	0.5	359.4	86.9	170.7
			76.0	13.1	19.3
			0	0	0
Gluten hidrolizatı (seyreltme, 1/10)	189.9	0.4	320.2	87.6	155.4
			63.6	12.4	16.3
			0	0	0
Gluten hidrolizatı (seyreltme, 1/100)	297.2	0.4	322.5	100.0	198.2
			0	0	0
			0	0	0

Gluten hidrolizatı 0.2 µm'lik (200 nm) rejenere selüloz membrandan geçirildikten sonra membrandan geçen fraksiyonun DLS' de boyut dağılımı incelenmiştir (Şekil 4.19 ve Çizelge 4.8). Proteinlerin membrandan geçtikten sonra tekrar agreste olduğu görülmektedir. Çünkü 200 nm' lik gözeneklerden geçen partiküllerin DLS' de daha yüksek hidrodinamik çap verdiği görülmüştür. Bu da ultrafiltrasyon işleminden sonra elde edilen fraksiyonlardaki peptidlerin agregat oluşturduğu hipotezini doğrulamaktadır.

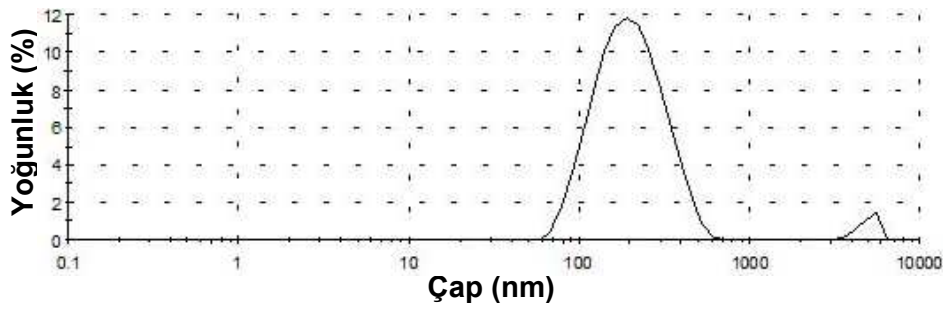


Şekil 4.19. Gluten hidrolizatının (HD % 3.5) rejenere selüloz membrandan (0.2 µm) geçirildikten sonra DLS partikül boyut dağılımı

Çizelge 4.8. Gluten hidrolizatının rejenere selüloz membrandan (0.2 µm) geçirildikten sonra DLS partikül boyut dağılımı değerleri

z-ortalama (nm)	polidispersiti indeksi (PDI)	d _H (nm)	yoğunluk (%)	pik genişliği (nm)
172.6	0.3	213.0	96.9	95.1
		4991.0	3.2	613.1
		0	0	0

Gluten hidrolizatının sonikasyon işleminden geçirilmesi de (Misonix, Farmingdale, NY) agregasyonun önüne geçememiştir (Şekil 4.20 ve Çizelge 4.9).



Şekil 4.20. Gluten hidrolizatının (HD % 3.5) sonikasyondan sonra DLS partikül boyut dağılımı

Çizelge 4.9. Gluten hidrolizatının sonikasyondan sonra DLS partikül boyut dağılımı değerleri

z-ortalama (nm)	polidispersiti indeksi (PDI)	d _H (nm)	yoğunluk (%)	pik genişliği (nm)
184	0.4	249.1	90.5	108.4
		35.7	5.5	8.1
		4720.0	4.0	768.9

SDS-PAGE ve DLS analizleri sonuçlarının hidrolizatlarda agregat oluşumunu göstermesi nedeniyle hidrolizatların molekül ağırlıklarına göre ultrafiltrasyon tekniği ile çeşitli fraksiyonlara ayırımının mümkün olamadığı sonucuna varılmıştır.

4.8. Gluten Hidrolizatlarının Bazı Fonksiyonel Özellikleri

% 3 ve %5 HD' ne sahip gluten hidrolizatları, glutenin sulu süspansiyonunun (%5) kısmen saflaştırılmış süne proteaz enzimiyle (E:S=0.05) pH-stat kullanılarak hazırlanmıştır. Hidrolizatlar (% 3 ve %5) liyofilize edildikten sonra bazı fonksiyonel özellikleri (çözünürlük, emülsiyon kapasitesi ve stabilitesi, köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi, antioksidan aktiviteleri) belirlenmiştir.

4.8.1. Gluten ve gluten hidrolizatlarının protein çözünürlüğü

Başta köpük, emülsiyon ve jel tipi olmak üzere pek çok gıda da, proteinin fonksiyonel katkı maddesi olarak kullanılabilmesinde çözünürlük en önemli özelliktir (Damodaran, 1996; Nielsen, 1997).

Elde yıkama ile hazırlanan glutenin ve bunun süne proteolitik enzimiyle modifikasyonu sonucu elde edilen %3 ve %5 HD' ndeki gluten hidrolizatlarının toplam protein miktarları sırasıyla %76.8 (km), %61.2 (km) ve %58.2 (km) olarak tespit edilmiştir. Gluten ve gluten hidrolizatlarının (HD %3 ve %5) suda çözünür protein miktarları (%) ise farklı pH' larda (pH 2, 4, 6, 7, 8 ve 10) incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.10 ve Şekil 4.21' de sunulmuştur. Sığır serum albumini (BSA) ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi ise Şekil 4.22' de verilmiştir.

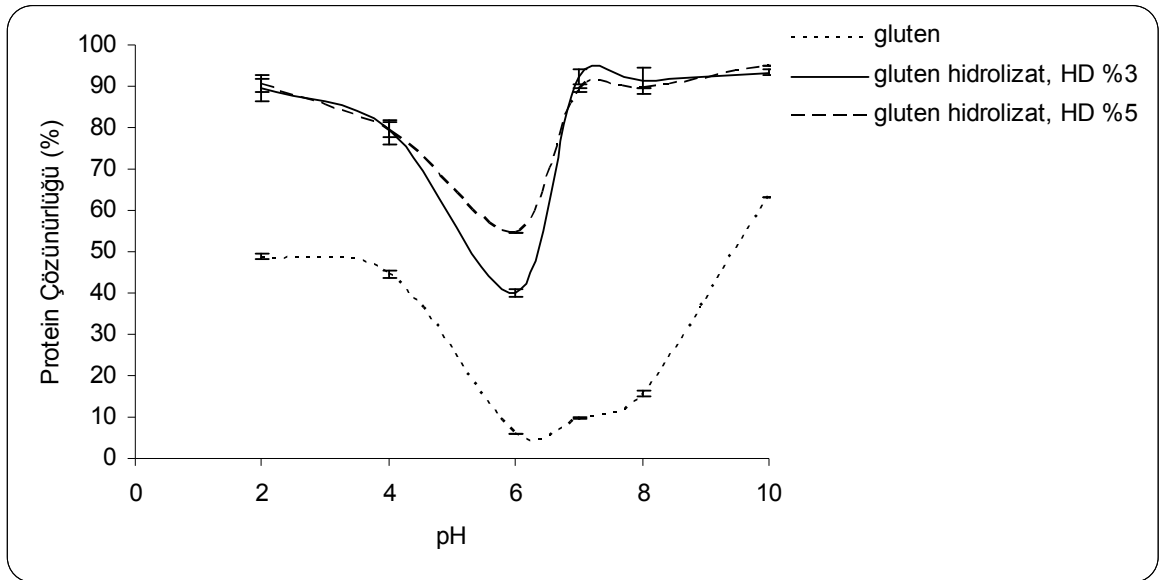
Glutenin pH 2 ile pH 10 aralığındaki protein çözünürlük eğrisi U şeklinde bir profil sergilemiştir (Şekil 4.21). Gluten en düşük protein çözünürlüğünü izoelektrik noktasına (Mejri et al., 2005) yakın olan pH 6' da, en yüksek çözünürlüğünü ise (%63.0) pH 10' da göstermiştir. Birçok araştırmacı pekçok bitki proteininin izoelektrik nokta bölgesinde en düşük çözünürlük gösterdiğini bildirmektedir (Ahmedna et al.,1999; Adebawale and Lawal, 2003; Bilgi and Çelik, 2004). İzoelektrik noktada pek çok proteinin çözünmemesi, protein molekülleri arasındaki yük itmelerinin nötralize edilmesinden kaynaklanmaktadır. Bu durumda hidrofobik etkileşimler artarak agregatlar meydana gelmektedir (Damodaran, 1996). Gluten süspansiyonlarının alkali pH' lardaki protein çözünürlüğü asidik pH' ya göre daha yüksek bulunmuştur. Alkali pH, proteinlerin ayrışmasına ve agregasyonun dağılmasına ve böylece protein çözünürlüğünün artmasına neden olmaktadır (Kinsella, 1976).

Çizelge 4.10. Gluten ve gluten hidrolizatlarının (HD %3 ve %5) çözünürlüklerinin (%) pH ile değişimi

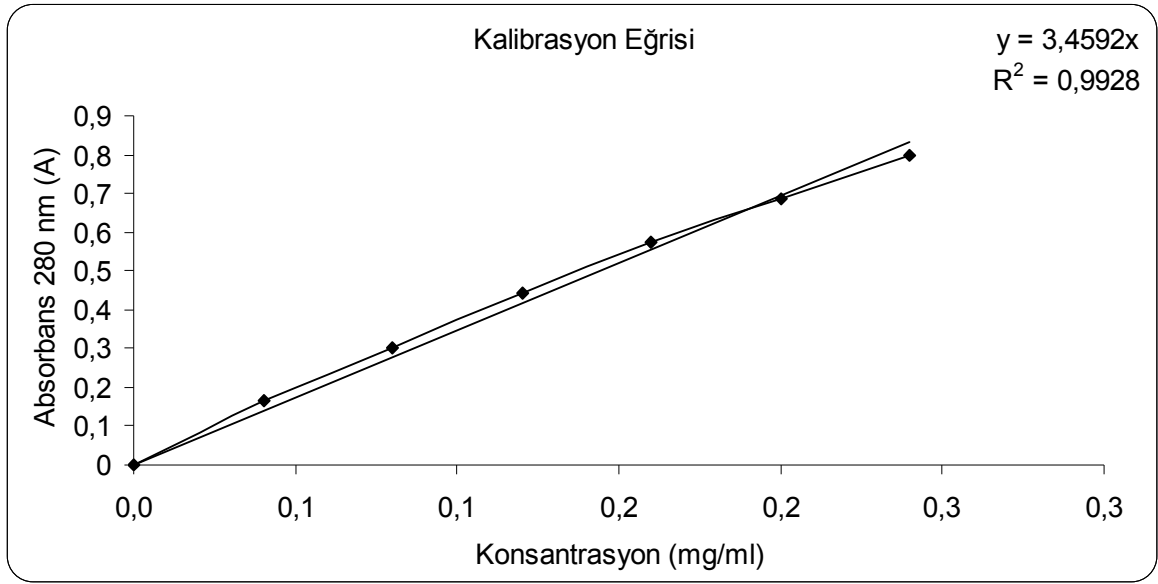
Örnek	pH					
	2	4	6	7	8	10
Gluten	48.8±0.7bB	44.4±0.9bC	6.0±0.0cF	9.7±0.3bE	15.6±0.6bD	63.0±0.0cA
Gluten						
Hidrolizat	89.6±3.0aA	79.6±2.0aB	40.2±0.9bC	92.2±1.9aA	91.3±3.2aA	93.4±0.7bA
(HD %3)						
Gluten						
Hidrolizat	90.3±1.6aB	79.0±2.9aC	54.5±0.0aD	89.1±0.6aB	89.6±0.2aB	95.0±0.1aA
(HD %5)						

*Herbir pH için örneklerin çözünürlük değerlerinde LSD testiyle belirlenen önemli düzeydeki farklılıklar ($p<0.05$) kolonlardaki küçük harflerle gösterilmiştir

**Herbir örnek için farklı pH' lardaki çözünürlük değerlerinde LSD testiyle belirlenen önemli düzeydeki ($p<0.05$) farklılıklar satır boyunca büyük harflerle gösterilmiştir.



Şekil 4.21. Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait çözünürlük değerlerinin pH ile değişimi.



Şekil 4.22. Protein çözünürlüğü için sığır serum albumini (BSA) ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi

Glutenin çözünürlüğü süne proteaz enzimiyle kısmi hidroliz sonucunda önemli derecede ($p < 0.05$) artmaktadır. Ancak hidroliz derecesinin artması protein çözünürlüğünü etkilememiştir (pH 6 ve 10 hariç). Protein hidrolizatlarının glutene göre çözünürlüğündeki artış molekül ağırlığındaki azalmaya ve polar gruptaki artışa bağlanmaktadır (Adler-Nissen, 1986; Nielsen, 1997). İzoelektrik noktadaki (pH 6.0) glutenin çözünürlüğü yaklaşık %6 iken, hidroliz derecesi %3 olan hidrolizatta %40.2 ve hidroliz derecesi %5 olan hidrolizatta %54.5'e çıkmıştır. Bu durum HD %3 ve %5 olduğunda oluşan peptidlerin net yüklerindeki farklılıklardan kaynaklanabilir. Nielsen (1997) sağlam ve hidroliz derecesi %2 olan kazeinin izoelektrik noktasının 4.5 iken, hidroliz derecesi %6.7 olduğunda izoelektrik noktanın 5.5'e kaydığını göstermiştir.

Hidrolizatların çözünürlükleri pH'ya bağlı olarak değişmektedir. pH 6 dışındaki tüm pH'larda hidroliz derecesi %3 olan gluten hidrolizatı için çözünürlük değerleri %79.6-93.4 arasında değişirken; hidroliz derecesi %5 olan gluten hidrolizatı için çözünürlük değerleri %79.0-95.0 arasında değişmektedir. Gluten hidrolizatları alkali pH'da asidik pH'lara göre daha iyi çözünürlük göstermiştir. Benzer durum Wang et al. (2008) tarafından da belirtilmiştir. Kong et al. (2007a) diğer ticari proteazlar (alkalaz 2.4L, pankreatin tripsin 6.0S, pepsin ve pankreatin) ile gluteni pH-stat yöntemine göre hidrolize etmişler ve bu enzimler içerisinde alkalazın en

yüksek hidroliz derecesini sağladığı saptanmıştır Kong et al. (2007b) tarafından yapılan bir diğer çalışmada alkalaz enzimiyle hidrolize edilen (HD % 15) glutenin en yüksek yaklaşık %80 çözünürlük gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada kullanılan süne proteaz enzimiyle hazırlanan gluten hidrolizatlarının (3 ve %5) çözünürlük değerlerinin ise alkalaz enzimi ile elde edilen değerlerden daha yüksek (%95.0) olduğu görülmektedir.

4.8.2. Gluten ve gluten hidrolizatlarının emülsiyon özellikleri

Emülsiyonlar yağ-su arayüzeyindeki yüksek yüzey geriliminden dolayı termodinamik olarak kararsızdır ve bunlarda zamanla faz ayrımı meydana gelmektedir. Emülsiyon özellikleri yağ-su ara yüzeyine adsorplanıp ara yüzey gerilimini azaltan amfilik yüzey aktif moleküller ilave edilerek düzeltilebilmektedir. Proteinler de bu amaçla kullanılabilecek maddelerdir. Proteinlerin emülsiyon özellikleri genellikle emülsiyon kapasitesi (EK) ve emülsiyon stabilitesi (ES) ile belirlenir. EK ve ES değerleri proteinin hidrofilik ve lipofilik özelliklerinin dengesine, konsantrasyonuna, çözünürlüğüne, pH, iyonik kuvvet ve viskoziteye bağlıdır (Damodaran, 1996; Bombara et al., 1997; Ivanov et al., 2001).

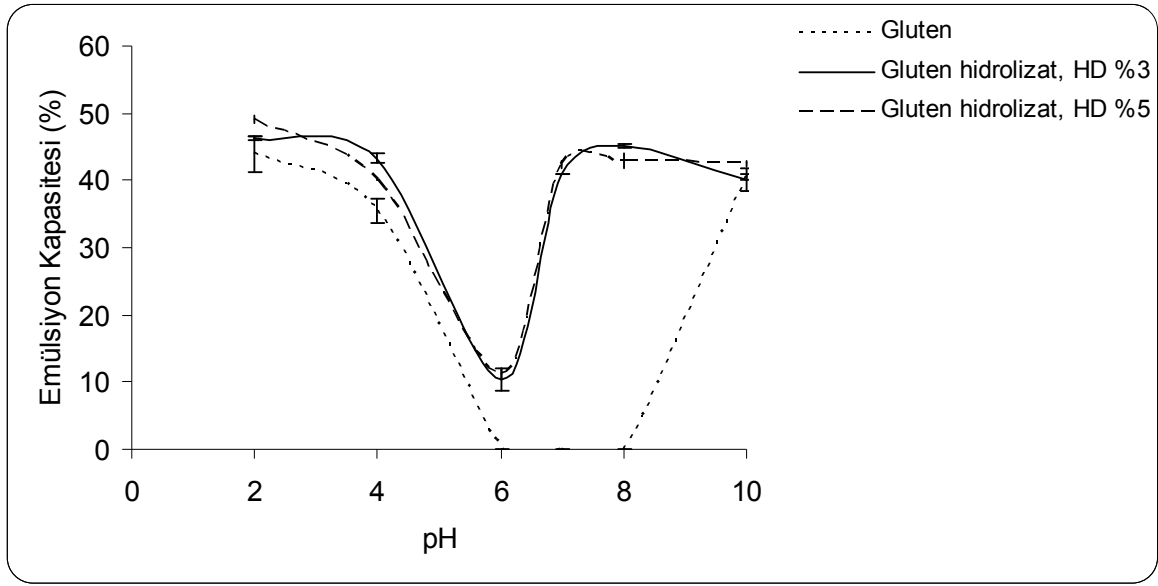
Gluten ve gluten hidrolizatlarının (HD %3 ve %5) distile suda hazırlanan %0.2 (w/v)' lik çözeltilerinin emülsiyon kapasitesi (EK, %) değerleri farklı pH' larda (pH 2, 4, 6, 7, 8 ve 10) tespit edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.11 ve Şekil 4.23' de sunulmuştur.

Çizelge 4.11. Gluten ve gluten hidrolizatlarının (HD %3 ve %5) farklı pH' lardaki emülsiyon kapasitesi (%) değerleri

Örnek	pH					
	2	4	6	7	8	10
Gluten	43.9±2.7bA	35.6±1.8bC	0.0±0.0bD	0.0±0.0cD	0.0±0.0cD	40.6±0.4aB
Gluten						
Hidrolizat	46.3±0.3abA	43.3±0.8aBC	10.3±1.8aE	40.9±0.1bCD	45.1±0.3aAB	40.2±1.7aD
(HD %3)						
Gluten						
Hidrolizat	49.0±0.6aA	40.2±0.0aC	11.2±0.9aD	42.4±0.5aB	42.9±1.2bB	42.5±0.3aB
(HD %5)						

* Herbir pH için örneklerin emülsiyon kapasitesi değerlerinde LSD testiyle belirlenen önemli düzeydeki farklılıklar (p<0.05) kolonlardaki küçük harflerle gösterilmiştir

**Herbir örnek için farklı pH' lardaki emülsiyon kapasitesi değerlerinde LSD testiyle belirlenen önemli düzeydeki (p<0.05) farklılıklar satır boyunca büyük harflerle gösterilmiştir.



Şekil 4.23. Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait emülsiyon kapasitesi (%) değerlerinin pH ile değişimi

Gluten pH 6, 7 ve 8' de emülsiyon oluşturmazken, pH 2' de en yüksek EK değerine (%43.9) ulaşmıştır. Bazı proteinler (yumurta akı ve jelatin) izoelektrik noktalarında optimum emülsiyon özellikleri sergilerken, diğerleri (soya fasulyesi gibi) izoelektrik noktalarından daha uzak pH değerlerinde en iyi performansı göstermişlerdir (Damodaran, 1996). Glutenin çözünürlük ve EK değerleri arasında önemli ($p < 0.001$) bir korelasyonun ($r = 0.96$) olduğu saptanmıştır. Ortam pH' ısı proteinlerin çözünürlüğünü etkileyerek dolaylı yoldan emülsiyon kapasitesini de etkilemektedir. Birçok çalışmada farklı proteinlerin pH-emülsiyon özellikleri profilinin, pH-çözünürlük profiline benzediği gösterilmiştir (Pearson et al., 1965; Crenwelge et al., 1974).

Genellikle proteinlerin kısmi hidrolizi sonucunda polar grupların sayısı ve hidrofilik özellikleri artmakta, moleküler ağırlıkları azalmakta, globuler yapıları değişmekte ve daha önceden gizli olan hidrofobik bölgeleri açığa çıkmaktadır. Bu değişimler proteinlerin emülsiyon özelliklerini etkilemektedir (Nielsen, 1997). Glutene ait pH 10 dışındaki diğer tüm pH' lardaki EK değerleri, süne proteaz enzimiyle kısmen hidrolize edildikten sonra önemli derecede ($p < 0.05$) artmıştır. Ancak glutenin hidroliz derecesi arttığında (HD %5) pH 4 ve 8' deki EK değerlerinde azalma olduğu görülmektedir. Bu durum Kong et al. (2007b)' ın alkalaz enzimi ile elde

ettikleri sonuçlar ile uyuşmaktadır. pH 7' de ise hidroliz derecesinin artmasıyla EK değerlerinde önemli derecede ($p<0.05$) artış saptanmıştır. Yağ-su arayüzeyinde peptidlerin konformasyonel olarak düzenlenmesi, farklı pH değerlerinde farklı olmaktadır (Damodaran. 1996). Her iki gluten hidrolizatı için EK değerleri ile çözünürlük değerleri arasında önemli düzeyde ($p<0.001$) korelasyon olduğu ($r=0.95$) saptanmıştır.

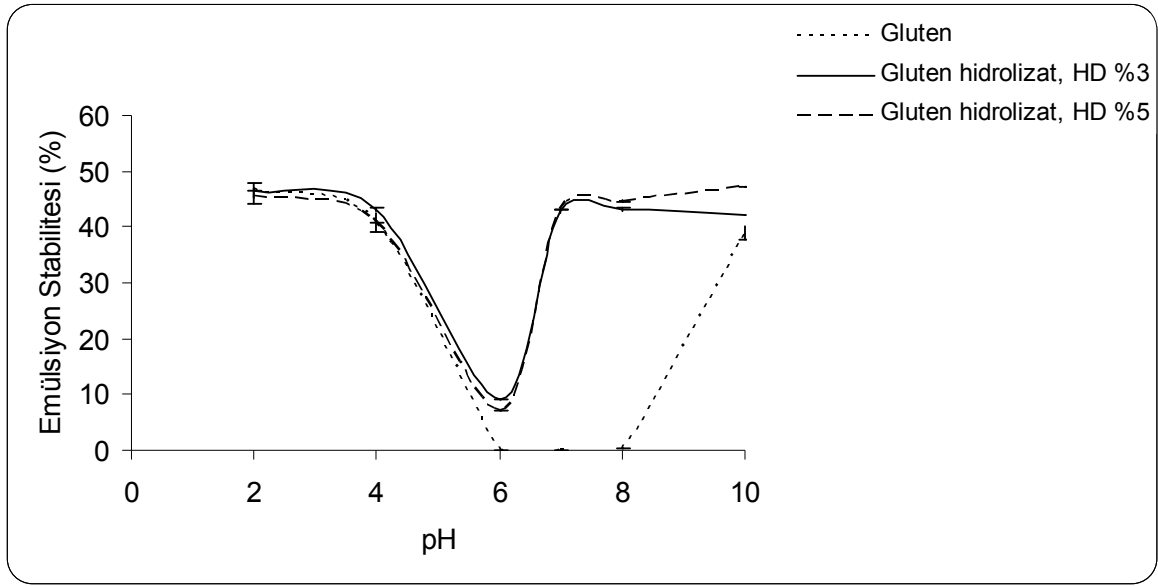
Gluten ve gluten hidrolizatların (HD %3 ve %5) distile suda hazırlanan % 0.2 (w/v)' lik çözeltilerinin emülsiyon stabilitesi (ES, %) değerleri de farklı pH' larda (pH 2, 4, 6, 7, 8 ve 10) tespit edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.12 ve Şekil 4.24' de sunulmuştur.

Çizelge 4.12. Gluten ve gluten hidrolizatlarının (HD %3 ve %5) farklı pH' lardaki emülsiyon stabilitesi (%) değerleri

Örnek	pH					
	2	4	6	7	8	10
Gluten	46.8±0.2aA	40.7±1.7aB	0.0±0.0cC	0.0±0.0bC	0.3±0.0cC	38.9±1.1cB
Gluten Hidrolizat (HD %3)	46.5±1.3aA	43.2±0.3aB	9.1±1.1aC	42.8±0.3aB	43.2±0.3bB	42.3±0.3bB
Gluten Hidrolizat (HD %5)	45.3±1.1aB	40.7±0.0aD	7.1±0.1bE	43.2±0.0aC	44.6±0.3aB	47.1±0.0aA

* Herbir pH için örneklerin emülsiyon stabilitesi değerlerinde LSD testiyle belirlenen önemli düzeydeki farklılıklar ($p<0.05$) kolonlardaki küçük harflerle gösterilmiştir

**Herbir örnek için farklı pH' lardaki emülsiyon stabilitesi değerlerinde LSD testiyle belirlenen önemli düzeydeki ($p<0.05$) farklılıklar satır boyunca büyük harflerle gösterilmiştir.



Şekil 4.24. Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait emülsiyon stabilitesi (%) değerlerinin pH ile değişimi

Emülsiyon stabilitesi, emülsiyon damlacıklarının su fazından ayrılmaksızın disperse halde kalma kapasitesi olarak bilinmektedir (Damodaran, 1996; Ivanov et al., 2001). Glutenin çözünürlük ve ES değerleri arasında önemli düzeyde ($p<0.001$) korelasyon ($r=0.94$) olduğu görülmektedir. Glutenin asidik pH' daki ES değerleri, EK değerlerine göre bir miktar artmıştır. Bu sonuç asidik pH' da proteinlerin, emülsiyon stabilitesi analizi sırasında uygulanan ısı ile işleme denatürasyonu sonucunda yüzey hidrofobisitesindeki artıştan kaynaklanabilir (Damodaran, 1996). Süne proteaz enzimiyle glutenin kısmen hidrolizi sonucunda ise pH 2 ve 4 dışındaki diğer tüm pH' larda ES değerlerinde önemli derecede ($p<0.05$) artış meydana gelmiştir. İleri derecede hidroliz (HD %5) pH 6' da ES değerinde önemli derecede ($p<0.05$) azalmaya, pH 8 ve 10' da ise artışa neden olmuştur. Gluten hidrolizatlarının çözünürlük ve ES değerleri arasında hidroliz derecesi %3 ($r=0.96$) ve hidroliz derecesi %5 ($r=0.97$) olan hidrolizatlar için yüksek korelasyonlar elde edilmiştir.

4.8.3. Gluten ve gluten hidrolizatlarının köpük özellikleri

Köpük özellikleri genellikle köpük kapasitesi ve stabilitesi değerleriyle karakterize edilmektedir. Proteinlerin hava-su arayüzeyinde hızlı bir şekilde adsorpsiyonu ve yeniden düzenlenmesi köpük kapasitesini belirlerken, arayüzeyde esnek, kohesiv film oluşumu köpük stabilitesiyle ifade edilmektedir (Damodaran 1996).

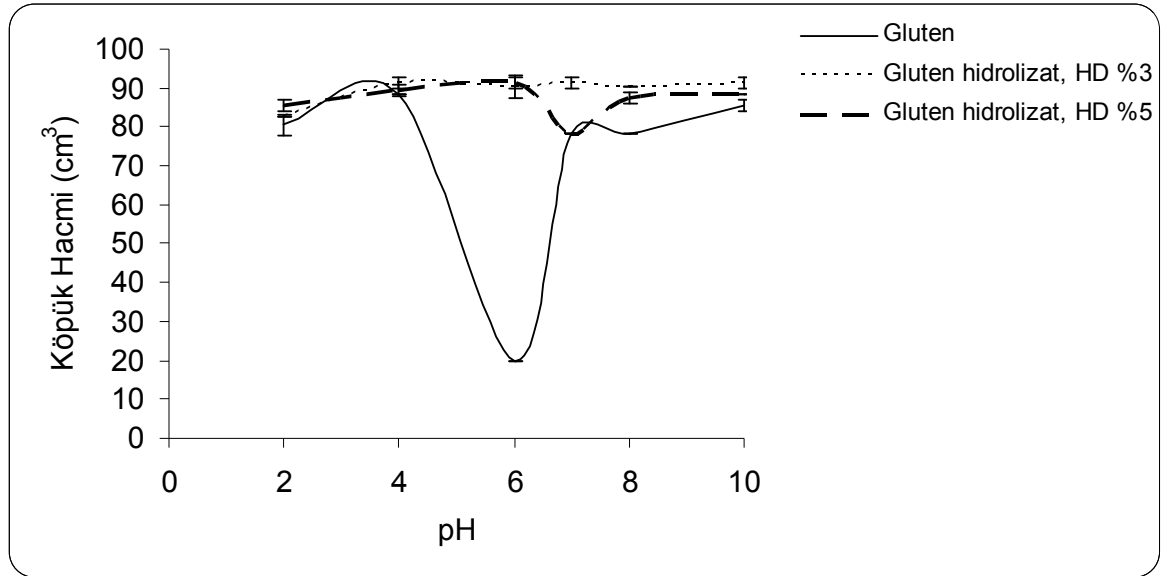
Gluten ve gluten hidrolizatların (HD %3 ve %5) distile suda hazırlanan % 0.2 (w/v)' lik çözeltilerinin köpük kapasitesi (KK, cm³) değerleri farklı pH' larda (pH 2. 4. 6. 7. 8 ve 10) tespit edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.13 ve Şekil 4.25' de sunulmuştur.

Çizelge 4.13. Gluten ve gluten hidrolizatlarının (HD %3 ve %5) farklı pH' lardaki köpük kapasitesi (cm³) değerleri

Örnek	pH					
	2	4	6	7	8	10
Gluten	80.5±2.8aB	88.3±0.0aA	19.6±0.0bC	78.5±0.0bB	78.5±0.0cB	85.4±1.4bA
Gluten Hidrolizatı						
(HD %3)	82.4±0.0aB	91.3±1.4aA	90.3±2.8aA	91.3±1.4aA	90.3±0.0aA	91.3±1.4aA
Gluten Hidrolizatı						
(HD %5)	85.4±1.4aC	89.3±1.4aAB	91.3±1.4aA	78.5±0.0bD	87.3±1.4bBC	88.3±0.0abB

* Herbir pH için örneklerin köpük kapasitesi değerlerinde LSD testiyle belirlenen önemli düzeydeki farklılıklar (p<0.05) kolonlardaki küçük harflerle gösterilmiştir

**Herbir örnek için farklı pH' lardaki köpük kapasitesi değerlerinde LSD testiyle belirlenen önemli düzeydeki (p<0.05) farklılıklar satır boyunca büyük harflerle gösterilmiştir.



Şekil 4.25. Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait köpük kapasitesi (cm³) değerlerinin, pH ile değişimi

Gluten pH 4 ve 10' da yüksek köpük hacmine sahipken izoelektrik nokta yakınlarında düşük köpük hacmine sahiptir (Çizelge 4.13). Bu durum izoelektrik nokta pH' sındaki düşük miktarda çözünür protein konsantrasyonundan kaynaklanmaktadır. Glutenin çözünürlük değerleriyle. KK değerleri arasında önemli (p<0.01) korelasyon (r=0.55) saptanmıştır.

Glutenin köpük kapasitesi pH 2 ve pH 4 dışındaki pH' larda kısmi hidroliz sonucunda önemli derecede ($p<0.05$) artmıştır. Gıda proteinlerinin enzimatik modifikasyonu köpük kapasitesinin artmasına neden olabilmektedir. Bu artış kısmi hidroliz sonrasında daha fazla havanın yapıda tutulmasına olanak sağlayan polipeptid zincirlerinin sayısındaki artışa bağlanabilir (Adler-Nissen, 1986). Fakat daha yüksek hidroliz derecesi (HD %5) köpük kapasitesinin pH 7, 8 ve 10' da önemli derecede ($p<0.05$) azalmasına yol açmaktadır. İleri derecede hidroliz sonucunda köpük kapasitesindeki genel azalma, oluşan küçük peptidlerin yüzey aktivitesi üzerine olumsuz etkisinden kaynaklanabilmektedir. Buğday gluten hidrolizatlarıyla yapılan çalışmalarda, köpük kapasitesinde en yüksek artışın, oldukça düşük hidroliz derecelerinde elde edildiği gösterilmiştir (Nielsen. 1997). Ayrıca HD %5 olan gluten hidrolizatının çözünürlük ve KK değerleri arasındaki korelasyon ($r=-0.57$) önemli ($p<0.01$) bulunmuştur

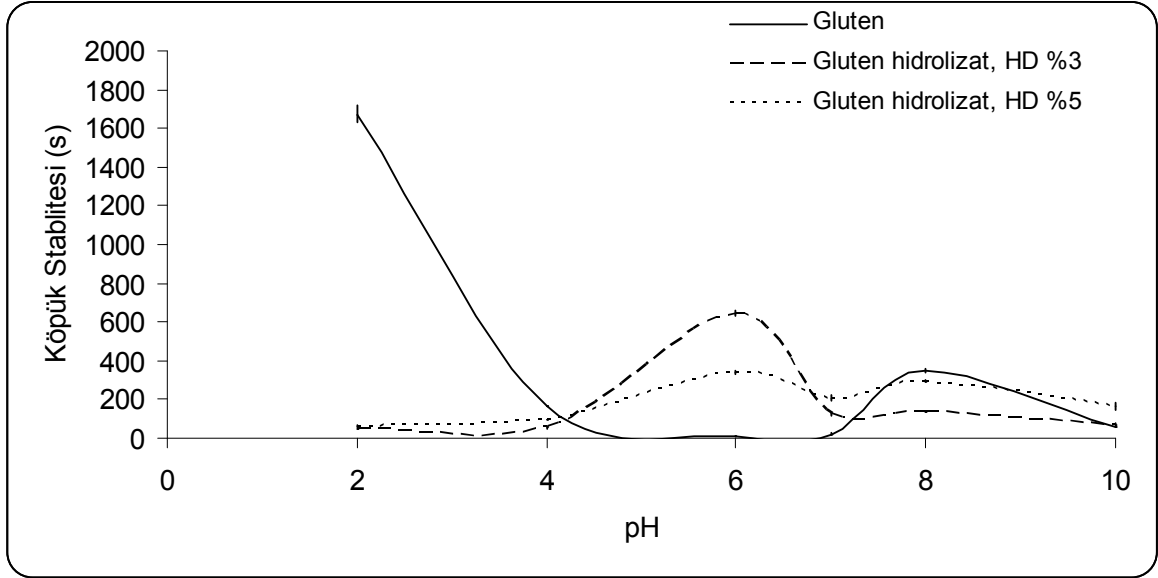
Gluten ve gluten hidrolizatların (HD %3 ve %5) distile suda hazırlanan %0.2 (w/v)' lik çözeltilerinin köpük stabilitesi (KS, s) değerleri farklı pH' larda (pH 2. 4. 6. 7. 8 ve 10) tespit edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.14 ve Şekil 4.26' de sunulmuştur.

Çizelge 4.14. Gluten ve gluten hidrolizatlarının (HD %3 ve %5) farklı pH' lardaki köpük stabilitesi (KS, s) değerleri

Örnek	pH				
	2	4	6	7	8
Gluten	1672.2±42.4aA	164.2±2.9aC	8.0±1.4cE	23.0±6.9cDE	348.1±9.8aB
Gluten Hidrolizat					
(HD %3)	47.5±0.1bC	54.9±3.2cC	643.8±11.7aA	126.8±6.9bB	136.1±4.4cB
Gluten Hidrolizat					
(HD %5)	62.2±1.5bF	96.0±0.5bE	343.3±10.5bA	205.4±15.5aC	293.2±6.0bB
					167.7±17.4aD

* Herbir pH için örneklerin köpük kapasitesi değerlerinde LSD testiyle belirlenen önemli düzeydeki farklılıklar (p<0.05) kolonlardaki küçük harflerle gösterilmiştir

**Herbir örnek için farklı pH' lardaki köpük kapasitesi değerlerinde LSD testiyle belirlenen önemli düzeydeki (p<0.05) farklılıklar satır boyunca büyük harflerle gösterilmiştir.



Şekil 4.26. Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait köpük stabilitesi (s) değerlerinin pH ile değişimi

Glutenin pH 2, 4 ve 8' deki KS değerleri aynı pH' lardaki gluten hidrolizatlarına göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Enzimatik hidroliz ile bu pH' lardaki KS değerleri önemli derecede ($p < 0.05$) azalırken pH 6 ve 7' deki KS değerleri önemli derecede artmıştır ($p < 0.05$). Ayrıca gluten hidrolizatlarında çözünürlük ve KS değerleri arasında HD %3 ($p < 0.001$) ve ve HD %5 için ($p < 0.01$) önemli korelasyon olduğu belirlenmiştir. Korelasyon katsayıları HD %3 için $r = -0.94$ ve HD %5 için $r = -0.54$ olarak hesaplanmıştır.

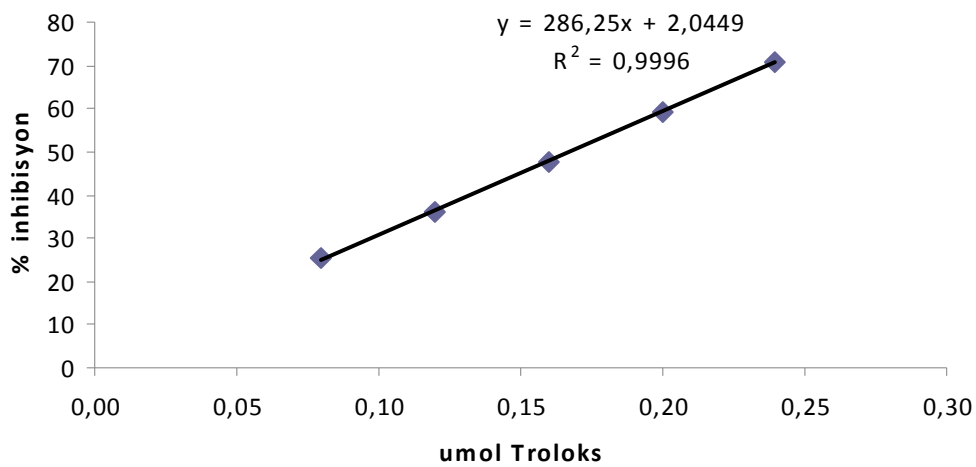
4.8.4. Gluten ve gluten hidrolizatlarının toplam antioksidan aktiviteleri

Bazı protein hidrolizatları lipidlerin ve/veya yağ asitlerinin peroksidasyonuna karşı antioksidan aktivite sergilemektedir (Amarowicz and Shahidi, 1997; Pena-ramos and Xiong, 2002; Diaz and Decker, 2004; Sakanaka et al., 2004). Antioksidan aktivite tayini için kullanılan pekçok yöntem çözünür bileşenlerle sınırlı olmakta ve ekstraksiyon aşaması yöntemin başarısını sınırlamaktadır. Gıdaların antioksidan aktivitelerinin tespitinde ekstraksiyon aşamasında bileşenlerin çözünürlüklerini artırmak için çözücü karışımları kullanılmakta ve/veya fiziksel uygulamalar yapılmaktadır (Emmons et al., 1999; Zhou and Yu, 2004). Ancak pekçok gıda maddesi kimyasal veya enzimatik uygulamalarla çözünmeyen bileşenler içermektedir (Kroon et al., 1997; Napolitano et al., 2006) ve antioksidan aktivite bu

çözünmeyen bileşenlere bağlı olabilmektedir. Bu çalışmadaki antioksidan tayin metodunda 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) (ABTS) kullanılarak çözünür ve çözünmez bileşenlerdeki toplam antioksidan aktivitesi ölçülebilmektedir (Serpen et al., 2007).

Gluten ve gluten hidrolizatlarının (HD %3 ve %5) toplam antioksidan aktiviteleri mmol Troloks eşdeğeri antioksidan aktivite (TEAA)/kg örnek) olarak belirlenmiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4.27' de ve sonuçlar Çizelge 4.15' de sunulmuştur. Bu yöntemle elde edilen glutenin antioksidan aktivitesi literatür ile karşılaştırıldığında oldukça yüksektir. Glutenin süne proteaz enzimiyle kısmi hidrolizi (HD %3) ile antioksidan aktivite önemli derecede ($p < 0.05$) artmış, yüksek hidroliz derecesinde (HD %5) ise önemli derecede ($p < 0.05$) azalmıştır.

Wang et al. (2007a) tarafından yapılan çalışmada papain ile hidrolize edilen gluten hidrolizatı, ultrafiltrasyon ile iki fraksiyona ayrılmış (>5 kDa ve <5 kDa) ve bu fraksiyonlardaki antioksidan aktivite değerleri saptanmıştır. 5 kDa' dan küçük peptidlerin pH 7' de vitamin E' ye yakın antioksidan aktivite sergilediği gösterilmiştir. Bir başka çalışmada benzer şekilde ultrafiltrasyonla ayrılan gluten hidrolizatlarının antioksidan değerlerine bakılmış ve 3 kDa' nın altındaki peptidlerin en yüksek antioksidan aktivite sergilediği gösterilmiştir (Kong et al., 2008a). Bu sonuçlar gluten hidrolizatlarının glutene göre daha yüksek antioksidan aktivite sergilediklerini desteklemektedir.



Şekil 4.27. Antioksidan aktivite tayininde kullanılan kalibrasyon eğrisi

Çizelge 4.15. Gluten ve gluten hidrolizatlarının (HD %3 ve %5) antioksidan aktiviteleri

Örnek	Troloks eşdeğeri antioksidan aktivite (mM TEAA/kg)
Gluten	172.1±1.0c
Gluten Hidrolizat (HD %3)	240.0±0.1a
Gluten Hidrolizat (HD %5)	228.6±0.9b

*Kolondaki önemli düzeydeki ($p<0.05$) farklılıklar LSD testiyle belirlenen harflerle gösterilmiştir.

4.9. Gluten ve Gluten Hidrolizatlarında Moleküler Boyut Dağılımı

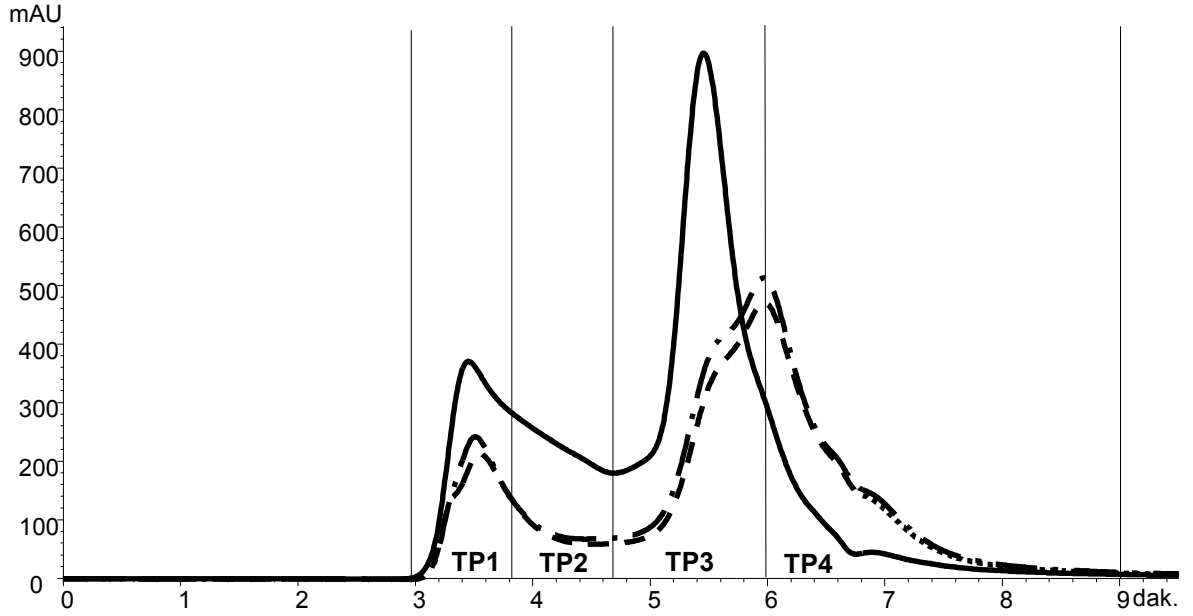
Gluten ve gluten hidrolizatlarındaki (HD %3 ve %5) proteinlerin boyut dağılımındaki değişiklikler SE-HPLC (moleküler büyüklüğe göre ayırım yapan Yüksek Performanslı Likid Kromatografi (SE-HPLC), SDS-PAGE ve iki boyutlu (2-D) elektroforez teknikleriyle gerçekleştirilmiştir. 2-D elektroforez de tespit edilen değişiklikler MALDI-MS/MS ile incelenmiştir.

4.9.1. Gluten ve gluten hidrolizatlarındaki proteinlerin moleküler büyüklük dağılımının SE-HPLC ile belirlenmesi

Glutenin hidrolizi sonucu ortaya çıkan polipeptidlerin molekül ağırlık dağılımındaki değişiklikler, gluten polimerinin stabilizasyonunu sağlayan moleküller arası disülfid bağları indirgenmeden, SE-HPLC yöntemi ile belirlenmeye çalışılmıştır. SE-HPLC profilleri dört alana bölünerek değerlendirilmiştir. İlk iki alan (P1 ve P2) sırasıyla daha büyük olan polimerik proteinleri (HMW-glutenin) ve daha küçük olan polimerik proteinleri (LMW-glutenin) kapsamaktadır. Üçüncü alan (P3) esas olarak gliadin proteinlerini ve son alan (P4) ise albumin/globulinleri gibi monomerik proteinleri göstermektedir (Gupta et al., 1993; Rosell et al., 2002; Rubio et al., 2006).

4.9.1.1. Toplam proteinlerin (TP) SE-HPLC analizi

Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait toplam protein SE-HPLC profilleri Şekil 4.28' de sunulmuştur. Bu profile ait TP1, TP2, TP3 ve TP4 değerleri ve bu değerlerdeki azalmalar (%) sırasıyla Çizelge 4.16 ve Çizelge 4.17' de verilmiştir.



Şekil 4.28. Gluten ve gluten hidrolizatlarındaki (HD %3 ve %5) toplam proteinlere ait SE-HPLC profilleri:
(_____ Gluten; _____.____.____ Gluten hidrolizatı. HD %3; - - - - -Gluten hidrolizatı. HD %5)

Gluten hidrolizatlarına ait SE-HPLC profillerinin düşük moleküller ağırlıklı tarafa doğru kaydığı görülmüştür (Şekil 4.28). Bu da enzimatik modifikasyon sonucunda oluşan peptidlerin gluten proteinlerine göre daha küçük boyut dağılımına sahip olduklarını göstermektedir. Linares et al. (2000) yaptıkları jel filtrasyon çalışmasında her ne kadar glutenin proteinleri agregat oluştursa da, hidroliz derecesi arttıkça molekül ağırlığının giderek azaldığı ve dolayısı ile bunların hidrolize hassas hale geldiklerini saptamışlardır.

Çizelge 4.16. Gluten ve gluten hidrolizatlarındaki (HD %3 ve %5) toplam proteinlere ait SE-HPLC profilindeki TP1, TP2, TP3 ve TP4 pik alanları

Örnek	TOPLAM PROTEİN						(TP1+TP2) + (TP3+TP4)
	TP1	TP2	TP3	TP4	TP1+TP2	TP3+TP4	
Gluten	10026.5a	10555.4a	32616.6a	7773.9b	20581.9a	40390.4a	60972.3a
Gluten							
Hidrolizatı							
(HD %3)	7052.8ab	4458.9b	22067.1b	20714.2a	11511.7b	42781.3a	54293.0a
Gluten							
Hidrolizatı							
(HD %5)	6357.5b	4064.8b	19522.8b	19503.9a	10422.3b	39026.6a	49448.9a

*Kolondaki önemli düzeydeki ($p<0.05$) farklılıklar LSD testiyle belirlenen harflerle gösterilmiştir.

TP1: yüksek molekül ağırlıklı polimerik proteinler

TP2: düşük molekül ağırlıklı polimerik proteinler

TP3: yüksek molekül ağırlıklı monomerik proteinler

TP4: düşük molekül ağırlıklı monomerik proteinler

Toplam SE-HPLC alanları (TP1+TP2+TP3+TP4) ile örneklerin protein miktarları arasında önemli ($p<0.001$) korelasyon ($r=1$) tespit edilmiştir. Gluten hidrolizatlarına ait TP1, TP2 ve TP3 alanları, gluteninkilere göre önemli düzeyde ($p<0.05$) azalırken, TP4 alanı önemli düzeyde ($p<0.05$) artmıştır (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.17. Gluten ve gluten hidrolizatlarındaki (HD %3 ve %5) toplam proteinlere ait SE-HPLC profilindeki TP1, TP2, TP3 ve TP4 pik alanları (%)

Örnek	TOPLAM PROTEİN (%)					
	TP1	TP2	TP3	TP4	(TP1+TP2)	(TP3+TP4)
Gluten	16.4a	17.3a	53.5a	12.8c	33.7a	66.3b
Gluten						
Hidrolizat	13.0b	8.2b	40.6b	38.2b	21.2b	78.8a
(HD %3)						
Gluten						
Hidrolizat	12.9b	8.2b	39.5c	39.4a	21.1b	78.9a
(HD %5)						

*Kolondaki önemli düzeydeki ($p<0.05$) farklılıklar LSD testiyle belirlenen harflerle gösterilmiştir.

TP1: yüksek molekül ağırlıklı polimerik proteinler

TP2: düşük molekül ağırlıklı polimerik proteinler

TP3: yüksek molekül ağırlıklı monomerik proteinler

TP4: düşük molekül ağırlıklı monomerik proteinler

Ayrıca hidroliz sonucunda polimerik protein miktarında, [% (TP1+TP2)] önemli düzeyde ($p<0.05$) azalma ve monomerik protein miktarında [% (TP3+TP4)] artış

sağlanmıştır (Çizelge 4.17). İleri hidroliz (HD %5) ile bu değerlerde önemli ($p<0.05$) bir değişim saptanmamıştır.

Gluten ve gluten hidrolizatlarındaki (HD %3 ve %5) polimerik proteinlerin monomerik proteinlere oranı Çizelge 4.18’ de verilmiştir. Polimerik/monomerik protein oranında önemli düzeyde azalmıştır. Elde edilen bu sonuçlar daha önceki çalışmalar ile uyum göstermektedir. Daha önce süne proteazı ile polimerik protein (1-propanol’ de (%50) çözünmeyen) miktarı arasında negatif bir korelasyon olduğu, süne zararı görmüş buğdaylarda polimerik glutenin miktarının önemli miktarda azaldığı (>%80), ayrıca toplam glutenin alt birimlerinin (HMW ve LMW) ve HMW/LMW oranlarının azaldığı gösterilmiştir (Sivri et al., 1999). Rosell et al. (2002) ise süne zararı görmüş buğdaylarda alkolde çözünmeyen polimerik protein miktarının azaldığını, alkolde çözünen polimerik proteinlerin, gliadinlerin, albuminlerin ve globulinlerin ise arttığını belirtmişlerdir.

Çizelge 4.18. Gluten ve gluten hidrolizatlarının (HD %3 ve %5) polimerik/monomerik protein oranları

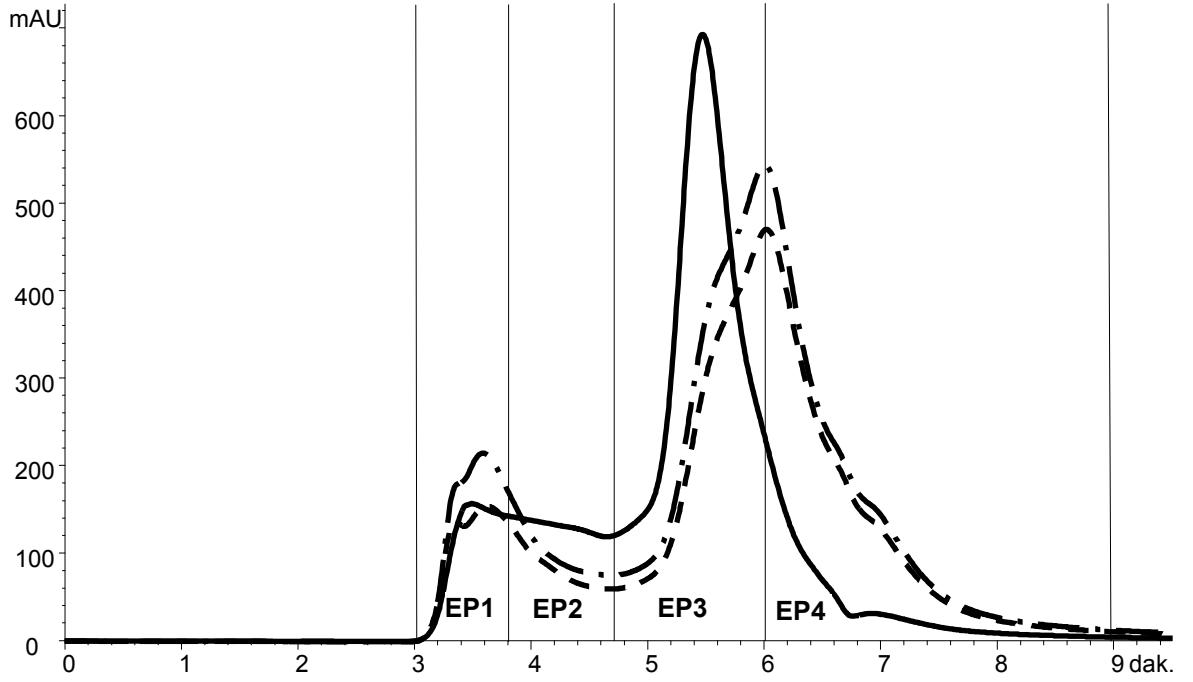
Örnek	Polimerik/Monomerik Proteinler
Gluten	0.51a
Gluten Hidrolizat (HD %3)	0.27b
Gluten Hidrolizat (HD %5)	0.27b

*Kolondaki önemli düzeydeki ($p<0.05$) farklılıklar LSD testiyle belirlenen harflerle gösterilmiştir.

4.9.1.2. SDS’ de çözünen (EP) ve çözünmeyen proteinlerin (UP) SE-HPLC sonuçları

% 0.5 (w/v) SDS bulunan ortamda karıştırma işlemi ile ayrılan proteinler (çözünür proteinler) ile geriye kalan kısımda ancak sonikasyondan sonra ayrılan proteinler (çözünmeyen proteinler) SE-HPLC ile incelenmiştir. Çözünür proteinlere (EP) ait SE-HPLC profilleri Şekil 4.29’ da ve piklere ait alan sonuçları Çizelge 4.19 ve Çizelge 4.20’ de sunulmuştur. Süne proteaz enzimi ile modifiye edilen gluten hidrolizatlarına ait profillerin, glutene göre oldukça farklı olduğu görülmektedir. Glutene ait çözünür proteinlerin büyük bir kısmı (%60.9) EP3 alanında bulunmaktadır. Bu nedenle glutene ait çözünür proteinlerin çoğunluğu gliadin gibi monomerik proteinlerden oluşurken, gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve HD %5) ait çözünür proteinlerin büyük çoğunluğu (sırasıyla %41.2 ve %42.9) EP4 bölgesinde

yer alan daha düşük boyutlardaki monomerik hidroliz ürünlerinden oluşmaktadır. Polimerik çözünür protein miktarı $[(EP1+EP2)]$ hidroliz ile önemli düzeyde ($p<0.05$) azalırken. monomerik protein miktarı $[(EP3+EP4)]$ hidroliz ile önemli düzeyde ($p<0.05$) artmaktadır. Ayrıca hidroliz derecesi arttıkça polimerik protein miktarındaki azalmanın ve monomerik protein miktarındaki artışın önemli düzeyde ($p<0.05$) olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.29. Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait SDS' de çözünür proteinlerin SE-HPLC profilleri:
(_____ Gluten; _____.____.____ Gluten hidrolizatı. HD %3; - - - - -Gluten hidrolizatı. HD %5)

Çizelge 4.19. Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait SDS' de çözünür proteinlerin SE-HPLC profilindeki EP1, EP2, EP3 ve EP4 pik alanları

Örnek	ÇÖZÜNÜR PROTEİN						(EP1+EP2) + (EP3+EP4)
	EP1	EP2	EP3	EP4	EP1+EP2	EP3+EP4	
Gluten	4578.3b	6358.4a	26781.1a	6266.6b	10936.7a	33047.7b	43984.4b
Gluten							
Hidrolizat (HD %3)	6278.8a	5042.4b	20863.4b	22534.7a	11321.2a	43398.0a	54719.2a
Gluten							
Hidrolizat (HD %5)	5223.5ab	4547.6b	18779.6b	21475.0a	9771.0a	40254.6a	50025.6ab

*Kolondaki önemli düzeydeki ($p<0.05$) farklılıklar LSD testiyle belirlenen harflerle gösterilmiştir.

EP1: yüksek molekül ağırlıklı çözünür polimerik proteinler

EP2: düşük molekül ağırlıklı çözünür polimerik proteinler

EP3: yüksek molekül ağırlıklı çözünür monomerik proteinler

EP4: düşük molekül ağırlıklı çözünür monomerik proteinler

Çizelge 4.20. Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait SDS' de çözünür proteinlerin SE-HPLC profilindeki EP1, EP2, EP3 ve EP4 pik alanları (%)

Örnek	ÇÖZÜNÜR PROTEİN (%)					
	EP1	EP2	EP3	EP4	(EP1+EP2)	(EP3+EP4)
Gluten	10.4b	14.5a	60.9a	14.3c	24.9a	75.1c
Gluten Hidrolizat (HD %3)	11.5a	9.2b	38.1b	41.2b	20.7b	79.3b
Gluten Hidrolizat (HD %5)	10.4b	9.1b	37.5c	42.9a	19.5c	80.5a

*Kolondaki önemli düzeydeki ($p<0.05$) farklılıklar LSD testiyle belirlenen harflerle gösterilmiştir.

EP1: yüksek molekül ağırlıklı çözünür polimerik proteinler

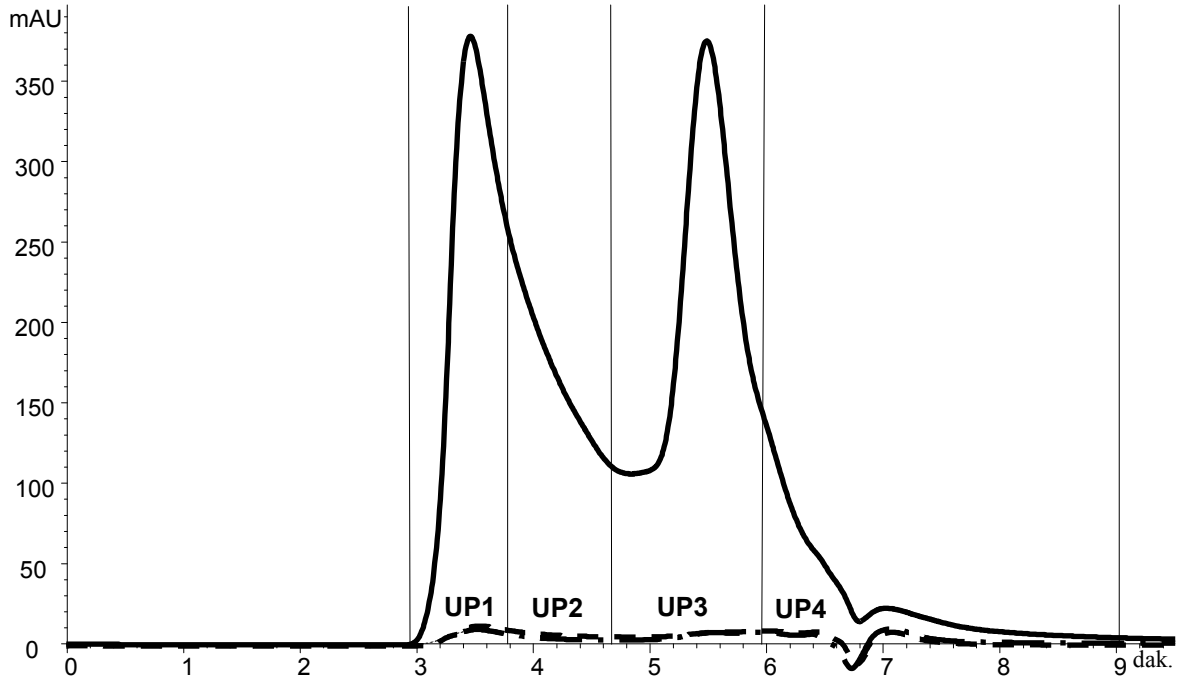
EP2: düşük molekül ağırlıklı çözünür polimerik proteinler

EP3: yüksek molekül ağırlıklı çözünür monomerik proteinler

EP4: düşük molekül ağırlıklı çözünür monomerik proteinler

Çözünmeyen proteinlere (UP) ait SE-HPLC profilleri ise Şekil 4.30' da ve piklere ait alan sonuçları Çizelge 4.21 ve Çizelge 4.22' de sunulmuştur. Gluten hidroliz edildiğinde çözünmeyen protein miktarında önemli bir azalma olduğu görülmektedir. Hidroliz ile birlikte UP1, UP2 ve UP3 pik alanlarında ve % oranlarında önemli düzeyde ($p<0.05$) azalma olmuştur. Bununla birlikte UP4 alanında önemli düzeyde ($p<0.05$) artış meydana gelmiştir. Bu da hidroliz ile birlikte daha büyük proteinlerin daha küçük peptidlere parçalandığını

göstermektedir. Benzer sonuçlar süne zararı görmüş. radyasyona ve sonikasyona maruz bırakılmış buğdaylar için rapor edilmiştir (Köksel et al.. 1998; Morel et al.. 2000; Sivri et al.. 2004). İleri derecede hidroliz sonucunda (HD %5) UP1 alanında bir artış olduğu görülmektedir. Bu durum hidroliz sonucu oluşan yeni peptidlerin agregat oluşturmamasından kaynaklanabilir. Bombara et al., (1997) hidroliz süresince düşük molekül ağırlıklı gluteninlerin azaldığını, gliadin ile diğer monomerik proteinlerin arttığını saptamışlardır. Ayrıca kolon boş hacminde gelen yüksek molekül ağırlıklı proteinlere ait ilk pikin, enzimatik hidroliz sonucu hiç kaybolmadığını ve bunun sebebinin oluşan daha düşük molekül ağırlıklı peptidlerin agregasyonundan kaynaklandığını belirtmişlerdir. Tosi et al. (2005) gluten hidrolizatlarını SE-HPLC ile fraksiyonlara ayırdıktan sonra elektroforez ile incelediklerinde bütün fraksiyonlarda boş hacimde gelen agregatların varlığını saptamışlardır. Yüksek seviyede süne zararına maruz kalmış durum buğdaylarında çözünmeyen polimerik protein miktarında (%UPP) artış gözlenmesi (Olanca et al., 2009) benzer şekilde hidroliz ürünlerinin agregat oluşturmaması ile açıklanabilir.



Şekil 4.30. Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait SDS' de çözünmeyen proteinlerin SE-HPLC profilleri:
(____) Gluten; (---) Gluten hidrolizatı. HD %3; (- - - -) -Gluten hidrolizatı. HD %5)

Çizelge 4.21. Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait SDS' de çözünmeyen proteinlerin SE-HPLC profilindeki UP1, UP2, UP3 ve UP4 pik alanları

Örnek	ÇÖZÜNMEYEN PROTEİN						(UP1+UP2) + (UP3+UP4)
	UP1	UP2	UP3	UP4	UP1+UP2	UP3+UP4	
Gluten	10957.9a	9335.8a	16704.3a	4420.0a	20293.7a	21124.3a	41418.0a
Gluten							
Hidrolizat (HD %3)	250.1b	169.3b	362.5b	457.6b	419.4b	820.1b	1239.5b
Gluten							
Hidrolizat (HD %5)	270.8b	169.7b	304.1b	402.1b	440.5b	706.2b	1146.6b

*Kolondaki önemli düzeydeki (p<0.05) farklılıklar LSD testiyle belirlenen harflerle gösterilmiştir.

UP1: yüksek molekül ağırlıklı çözünmeyen polimerik proteinler

UP2: düşük molekül ağırlıklı çözünmeyen polimerik proteinler

UP3: yüksek molekül ağırlıklı çözünmeyen monomerik proteinler

UP4: düşük molekül ağırlıklı çözünmeyen monomerik proteinler

Çizelge 4.22. Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait SDS' de çözünmeyen proteinlerin SE-HPLC profilindeki UP1, UP2, UP3 ve UP4 pik alanları (%)

Örnek	ÇÖZÜNMEYEN PROTEİN (%)					
	UP1	UP2	UP3	UP4	(UP1+UP2)	(UP3+UP4)
Gluten	26.5a	22.5a	40.3a	10.7b	49.0a	51.0c
Gluten Hidrolizat (HD %3)	20.2c	13.7b	29.2b	37.0a	33.9c	66.1a
Gluten Hidrolizat (HD %5)	23.6b	14.8b	26.5c	35.1a	38.4b	61.6b

*Kolondaki önemli düzeydeki (p<0.05) farklılıklar LSD testiyle belirlenen harflerle gösterilmiştir.

UP1: yüksek molekül ağırlıklı çözünmeyen polimerik proteinler

UP2: düşük molekül ağırlıklı çözünmeyen polimerik proteinler

UP3: yüksek molekül ağırlıklı çözünmeyen monomerik proteinler

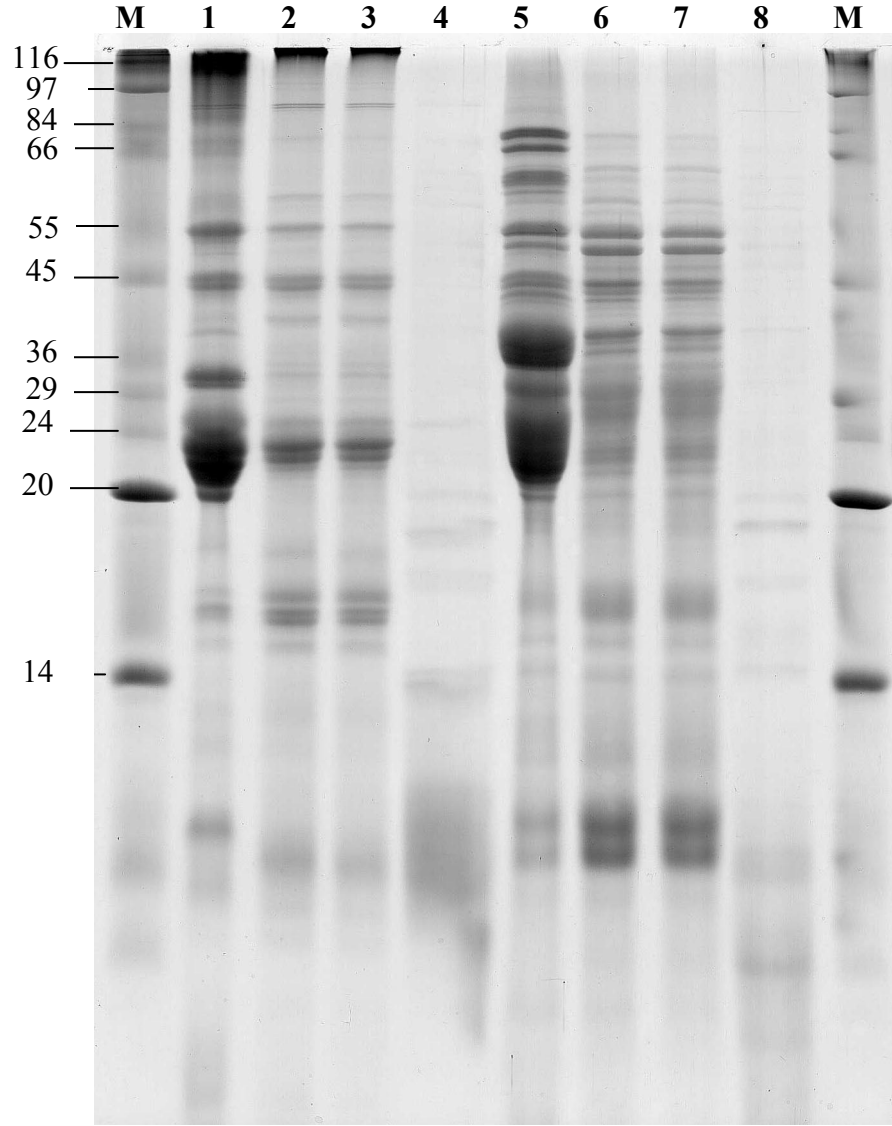
UP4: düşük molekül ağırlıklı çözünmeyen monomerik proteinler

4.9.2. Gluten ve gluten hidrolizatlarının elektroforetik (SDS-PAGE) özellikleri

Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve %5) ait SDS-PAGE elektroforegramı Şekil 4.31' de verilmiştir. İndirgenmemiş koşullardaki gluten (Şekil 4.31-hat 1) ve hidrolizat ürünlerinde (Şekil 4.31-hat 2 ve 3) jele girmeyen yüksek molekül ağırlıklı proteinler saptanırken; disülfid bağları 2-merkaptotanol ile indirgendiğinde bu proteinlerin jele girerek (Şekil 4.31-hat 5. 6 ve 7) alt birimlerine ayrıldığı

görülmüştür. Bu durum hidrolizatlardaki proteinlerin doğal formlarında disülfid bağları ile agregatlar oluşturduğunu göstermekte ve yapılan ultrafiltrasyon ve DLS çalışmaları ile gösterilen hidrolizatlardaki agregasyon oluşumunu desteklemektedir. Hem indirgenmiş hem de indirgenmemiş koşullarda, gluten proteinin süne proteaz enzimiyle kısmen hidrolize edilmesi sonucunda yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin bant yoğunluğunda bir azalma saptanmıştır. Gluten hidrolizatlarında indirgenmiş koşullarda yeni protein bantlarının (66-55 kDa) oluştuğu ve özellikle <20 kDa' da protein bant yoğunluklarının arttığı gözlenmiştir.

Anyon değişim (DEAE-selüloz) ve jel filtrasyon (Superdex G-75) kromatografisi teknikleriyle kısmen saflaştırılıp gluten hidrolizatlarının hazırlanmasında kullanılan süne enzimi de elektroforez ile incelenmiştir (Şekil 4.31-hat 4 ve 8). Kısmen saflaştırılmış süne enziminin <29 kDa' da birkaç peptid içerdiği görülmüştür. Sivri (1998) tarafından yapılan çalışmada süne proteaz enziminin molekül ağırlığı jel filtrasyon (Sephadex G-75) kromatografisi ile belirlenmeye çalışılmış ve enzimin molekül ağırlıkları 15 kDa civarında birden fazla sayıda proteaz içerdiği ifade edilmiştir. Every (1993) ise *Nysius* proteazının molekül ağırlığını jel filtrasyon ve SDS-PAGE teknikleriyle belirlemiş, ancak farklı sonuçlar elde etmiştir. Superdex-75' in sabit faz olarak kullanıldığı jel filtrasyon yöntemiyle proteolitik aktivite gösteren bir fraksiyonun, molekül ağırlığı 14.1 kDa olarak belirlenmiştir. SDS-PAGE yönteminde ise proteolitik aktivite gösteren bir büyük bantın 30 kDa. 6 adet küçük bantın ise 13.2, 15, 16, 17, 19 ve 28 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu belirlenmiştir. Jel filtrasyon ve SDS-PAGE ile elde edilen molekül ağırlıkları arasındaki farklılık, *Nysius* proteazının jel filtrasyonda sabit faz olarak kullanılan Superdex-75 tarafından kısmen tutulması ile ilişkilendirilmiştir.

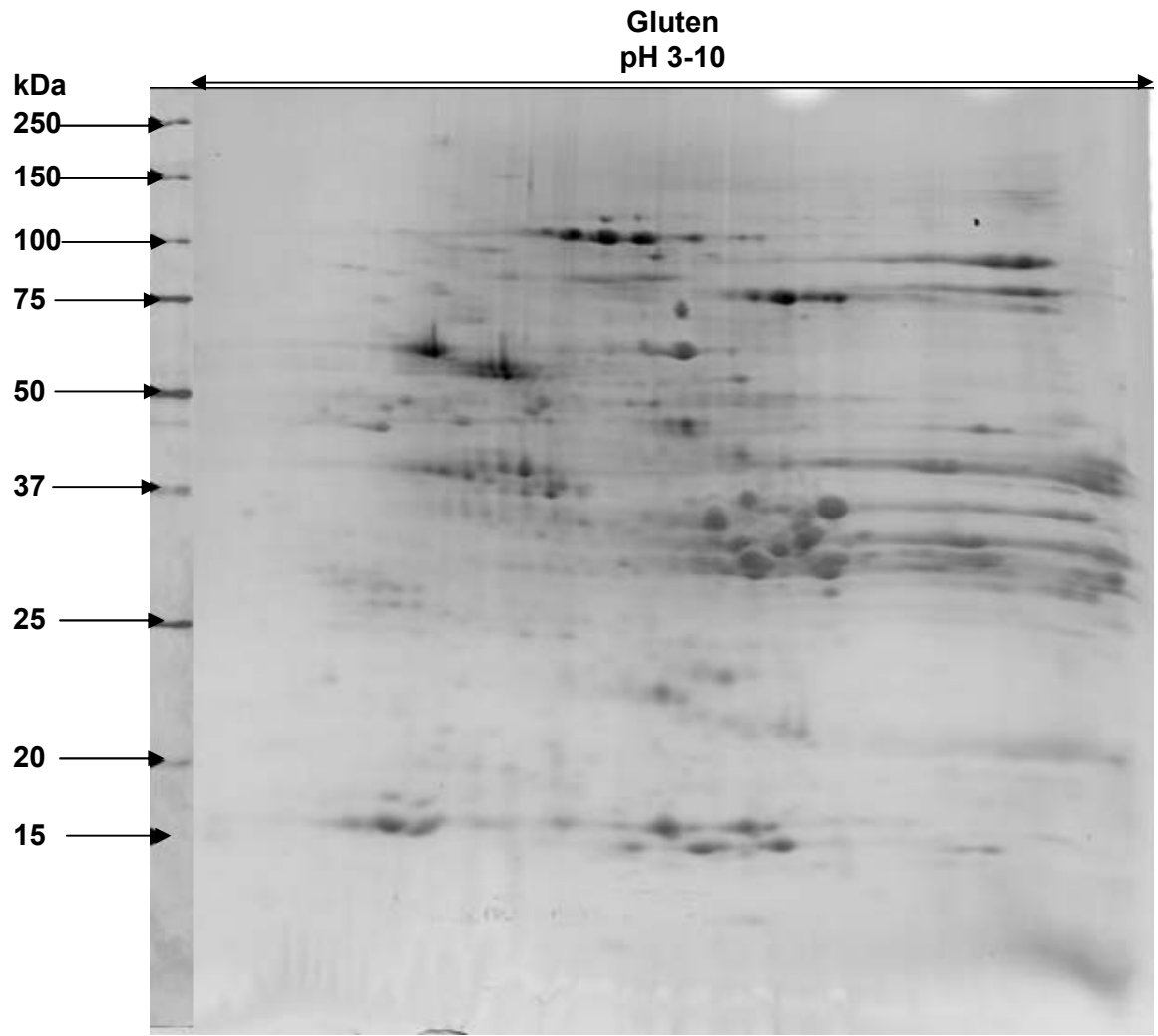


Şekil 4.31. Gluten ve gluten hidrolizatlarının (HD %3 ve %5) SDS-PAGE yöntemiyle belirlenen protein bant desenleri:

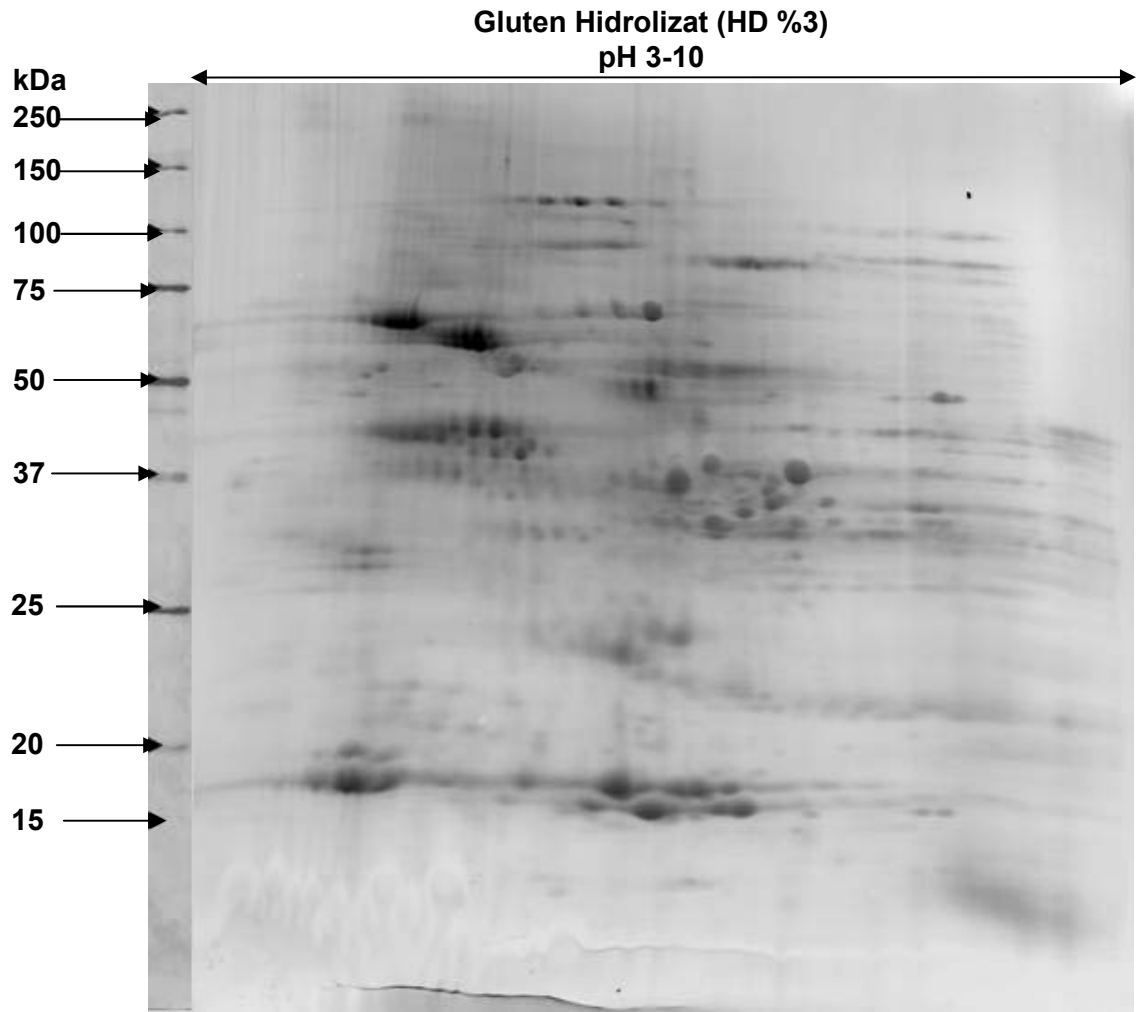
- M.** Protein standardı
- 1.** Gluten (indirgenmemiş)
- 2.** Gluten Hidrolizat (HD %3, indirgenmemiş)
- 3.** Gluten Hidrolizat (HD %5, indirgenmemiş)
- 4.** Kısım saflaştırılmış süne proteaz enzimi (indirgenmemiş)
- 5.** Gluten (indirgenmiş)
- 6.** Gluten Hidrolizat (HD %3, indirgenmiş)
- 7.** Gluten Hidrolizat (HD %5, indirgenmiş)
- 8.** Kısım saflaştırılmış süne proteaz enzimi (indirgenmiş)

4.9.3 Gluten ve gluten hidrolizatlarının iki boyutlu elektroforez (2-DE) ile incelenmesi

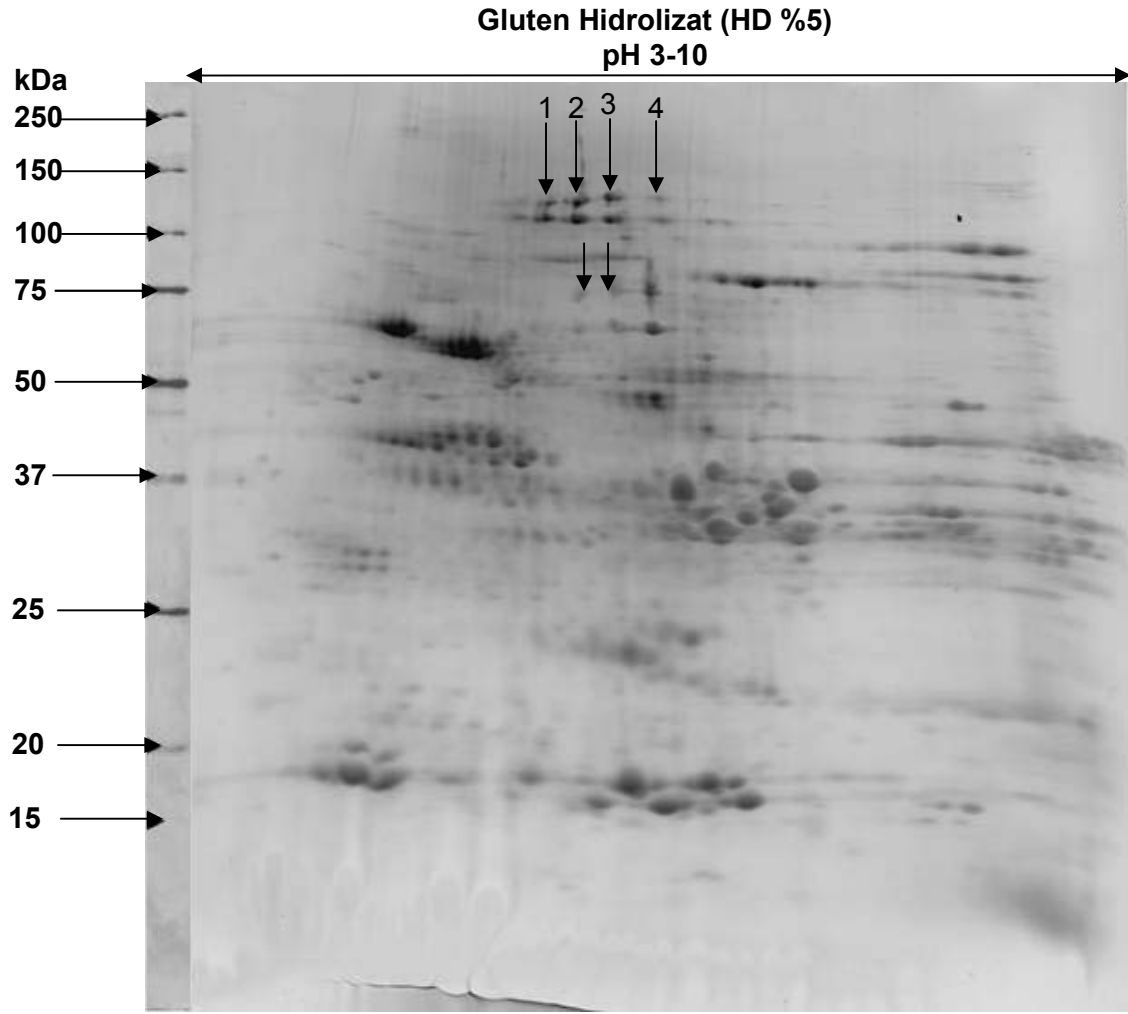
Glutenin kısmi hidrolizi sonucunda oluşan ürünlerin polipeptid profilindeki değişimler iki boyutlu elektroforez (2-DE) ile incelenmiştir. IEF (izoelektrik odaklama) analizleri hem asidik hemde bazik geniş bir pH aralığında (3-10) gerçekleştirilerek, gluten ve gluten hidrolizatlarının (HD %3 ve %5) protein haritaları elde edilmiştir (Şekil 4.32-34). 2-DE haritalarının karşılaştırılması sonucunda gluten ve gluten hidrolizatlarının polipeptid dağılımında farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Özellikle yüksek molekül ağırlık (HMW) bölgesindeki protein spotlarının yoğunlukları azalmış, hatta bazı protein spotları kaybolmuştur. Düşük molekül ağırlıklı protein (LMW) spotlarının yoğunluklarında ise artış saptanmıştır. Gluten ve yüksek hidroliz derecesine sahip gluten hidrolizatının (HD %5) 2-DE haritaları karşılaştırıldığında ise yüksek molekül ağırlıklı bölgede (Şekil 4.34' de yaklaşık 125 kDa ve 70 kDa civarında okla gösterilenler) yeni spotlar olduğu görülmektedir. Bu durum ilerleyen enzimatik hidroliz sırasında parçalanmamış gluteninde enzimle reaksiyona girebilecek konuma geldiğini göstermektedir. Jellerin diğer kısımları spot yoğunlukları ve mobiliteleri açısından benzerdir.



Şekil 4.32. Gluten proteinlerinin pH 3-10 aralığındaki protein haritası

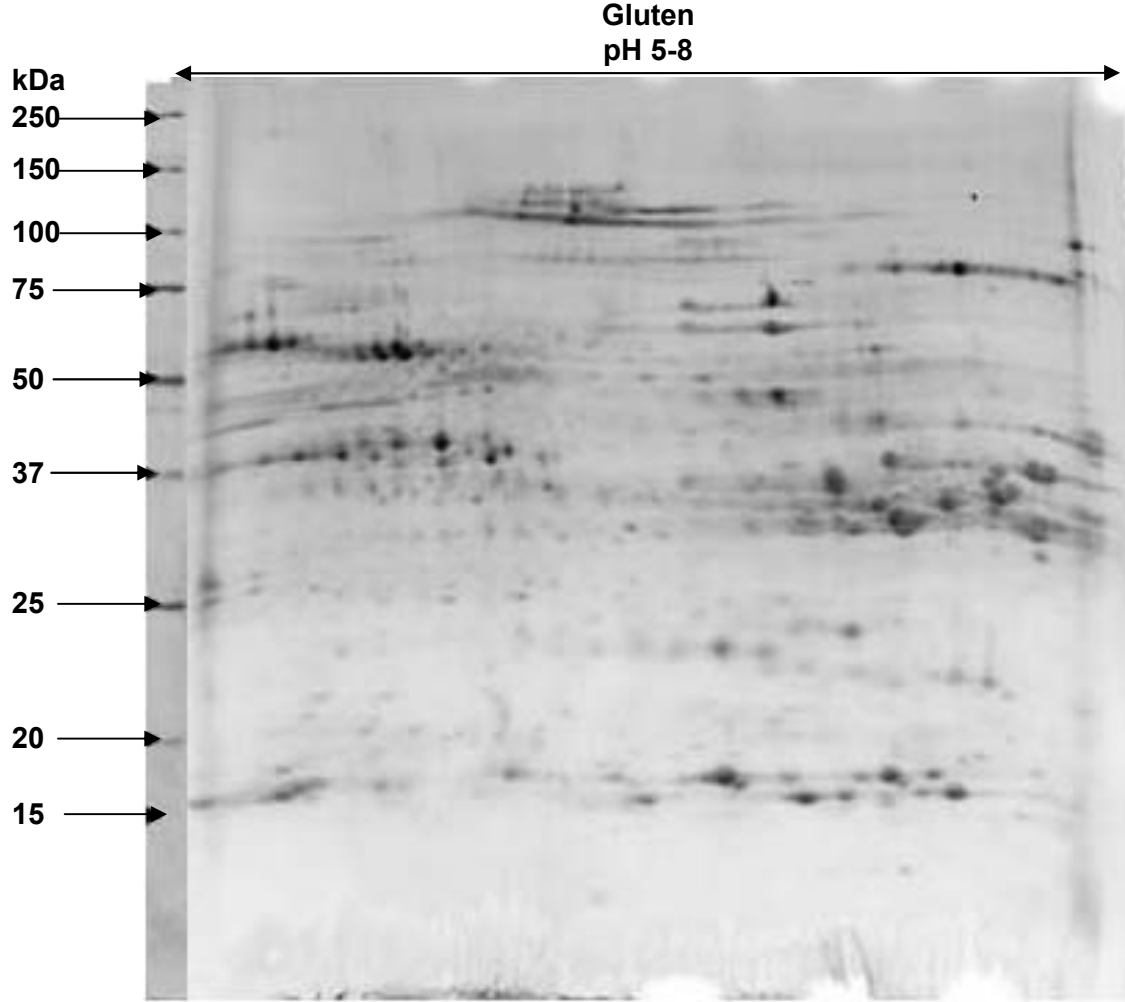


Şekil 4.33. Gluten hidrolizatı (HD %3) proteinlerinin pH 3-10 aralığındaki protein haritası

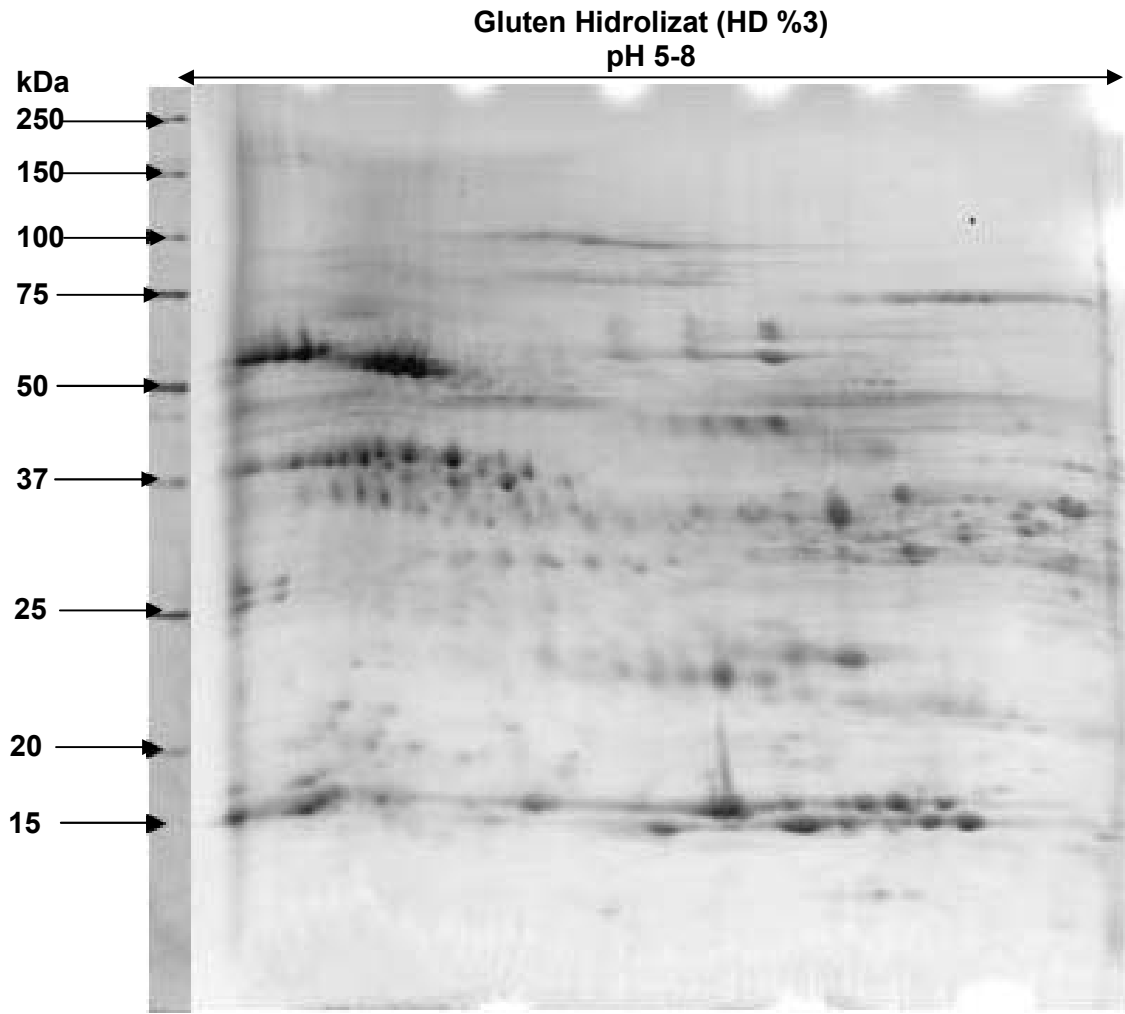


Şekil 4.34. Gluten hidrolizatı (HD %5) proteinlerinin pH 3-10 aralığındaki protein haritası

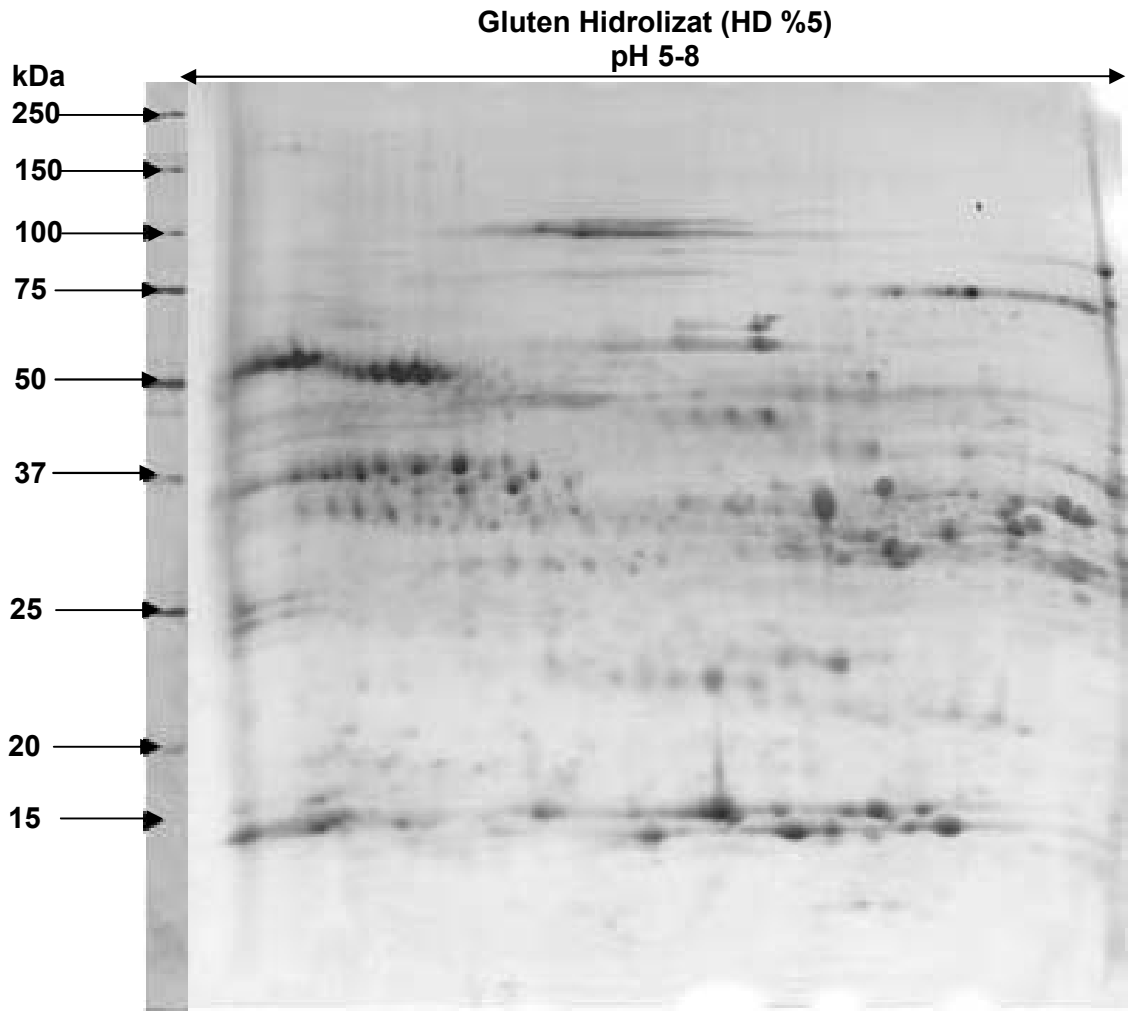
Elde edilen jellerde özellikle pH 5-6 ve 75-50 kDa aralığındaki spotların iyi ayrıldığı görüldüğünden örnekler daha dar bir pH aralığında (5-8) incelenmeye alınmıştır (Şekil 4.35-37). Böylece 2-D elektroforezde daha detaylı bir şekilde ayırım sağlanmıştır.



Şekil 4.35. Gluten proteinlerinin pH 5-8 aralığındaki protein haritası



Şekil 4.36. Gluten hidrolizatı (HD %3) proteinlerinin pH 5-8 aralığındaki protein haritası



Şekil 4.37. Gluten hidrolizatı (HD %5) proteinlerinin pH 5-8 aralığındaki protein haritası

pH 6-7 aralığında glutende yaklaşık 140 kDa' ki (Şekil 4.35) protein spotlarının pek çoğu enzimatik hidroliz sonucunda yok olmuştur (Şekil 4.36-37). Sonuç olarak süne proteaz enziminin en fazla bu bölgedeki proteinlere spesifik olduğu söylenebilir.

Sivri et al. (2004) sağlam ve süne zararı görmüş buğday endosperm proteinlerinin 2-DE protein haritalarını incelemiştir. Kontrol örneklerindeki bazı spotların süne zararı görmüş endosperm protein haritasında daha bazik pH bölgesine doğru kaydığı (izoelektrik noktasının değiştiği) rapor edilmiş ve bu durum proteinlerin hidrolizi sonucunda bazı pozitif yüklü aminoasitlerin ayrılarak, proteinin molekül ağırlığında önemli bir değişim olmadan negatif yük yoğunluğunun artmasına bağlanmıştır. Ayrıca izoelektrik noktadaki bu kayma proteinlerin deamidasyonu sonucunda da meydana gelmiş olabileceği ileri sürülmüştür. Enzimatik olarak modifiye proteinlerde deamidasyon sonucunda proteinlerin negatif yük yoğunluğunun artmasıyla çözünürlüğün arttığı bilinmektedir (Kato et al., 1987; Popineau and Thebaudin, 1990).

Özellikle HD %5 olan gluten hidrolizatında yeni açığa çıkan protein spotları (Şekil 4.34-1, 2, 3 ve 4 nolu spotlar) MALDI-MS/MS ile tanımlanmıştır. MALDI-MS/MS kütle spektrumları EK 1, 2, 3, 4 ve 5' de ve sonuçlar Çizelge 4.23' de verilmiştir. Buna göre yapılan veri tabanı (SwissProt) incelemesi sonucunda yeni oluşan 1, 2 ve 3 no' lu proteinlerin 89.3 kDa molekül ağırlığında ve pI 6.21 olan yüksek molekül ağırlıklı glutenin alt birimi (HMW DX5) olduğu saptanmıştır. 4. spottaki protein diğerlerinden farklı olduğu tespit edilmiştir. Bu proteinin molekül ağırlığı 10.9 kDa ve pI 8.18 olan yüksek molekül ağırlıklı glutenin alt birimini (HMW PC256) olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.23. Gluten hidrolizatının (HD %5) pH 3-10 2-DE jelinden (Şekil 4.34) kesilen spotlardaki proteinlerin MALDI-MS/MS değerleri

Spot no	Kütüphane ismi	Protein ismi	Tür	MOWSE skoru	Kütle (kDa)	pI
1	GLT5_WHEAT	Glutenin yüksek molekül ağırlıklı alt birimi DX5	Buğday	195	89.3	6.21
2	GLT5_WHEAT	Glutenin yüksek molekül ağırlıklı alt birimi DX5	Buğday	192	89.3	6.21
3	GLT5_WHEAT	Glutenin yüksek molekül ağırlıklı alt birimi DX5	Buğday	103	89.3	6.21
4	GLT1_WHEAT	Glutenin yüksek molekül ağırlıklı alt birimi PC256	Buğday	119	10.9	8.18

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1) Un sanayinde buğdayda süne-kıvıllı zararının belirlenmesinde danenin fiziksel muayenesi (dış görünüşü) ve modifiye sedimentasyon testi en yaygın olarak kullanılan basit yöntemlerdir. Klasik kalite değerlendirme metodlarının pek çoğu (gluten yıkama, gluten indeks, RVA, ekstensograf, alveograf gibi) ancak modifiye edilerek süne proteazının buğday kalitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılabilir. Proteaz aktivitesi tayin yöntemlerinde kullanılan birçok ticari substrata (hemoglobin, azokazein, hide powder, elastin, kolajen ve fibrin) karşı süne proteazının aktivite göstermediği; sadece glutene, bir miktarda jelatine karşı aktivite gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle süne proteaz aktivitesi tayinin de literatürde önerilen endo ve ekzo proteaz metodları ile sonuç alınamamaktadır. Bugüne kadar süne proteaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılabilecek iki yöntem önerilmiştir: birincisi suda ve %2' lik SDS çözeltisinde çözünen jel protein miktarının; ikincisi ise polimerik glutenin (1-propanolde (%50) çözünmeyen glutenin, 50 PI) miktarının tespit edildiği spektrofotometrik yöntemdir. Ayrıca elektroforez ve HPLC gibi kromatografik yöntemler de süne enzimi etkisiyle gluten proteinlerindeki ortaya çıkan değişim gösterilebilmektedir. Ancak bu yöntemler fazla miktarda kimyasal madde, uzman gerektiren, zaman alıcı yöntemlerdir. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar pH-stat tekniğinin süne proteaz aktivitesi tayininde kullanılabileceğini göstermiştir. Substrat oranı, pH ve sıcaklık sabit tutulduğunda enzim miktarı arttıkça hidroliz hızındaki artış açık bir şekilde reaksiyonun ilk dakikalarından itibaren gözlenebilmektedir. pH-stat tekniğinin az kimyasal malzeme ile hızlı ve doğru sonuç vermesi bu yöntemin süne-kıvıllı zararı görmüş buğdaylarda proteaz aktivitesinin belirlenmesinde başarı ile kullanılabileceğini göstermektedir.

2) Vital gluten ve elde hazırlanan gluten üzerine tripsin ve süne proteazının etkileri, pH-stat tekniğiyle incelendiğinde, enzimlerin elde yıkama yöntemiyle hazırlanan glutene karşı daha aktif olduğu saptanmıştır. Bu nedenle süne proteazı aktivitesinin tayininde substrat olarak kullanılan farklı vital glutenler ile farklı sonuçlar alınabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

3) Süne enzim ekstraktı, anyon değişim (DEAE selüloz) ve jel filtrasyon (Superdeks G-75) kromatografisi gibi yöntemler kullanılarak iki fraksiyon (P4 ve

P5) halinde sırasıyla yaklaşık 38 ve 300 katı kadar saflaştırılabilmektedir. Bu fraksiyonlar SDS-PAGE ile incelendiğinde, enzimin <29 kDa' da birkaç alt birim içerdiği görülmüştür.

4) Gluten hidrolizatındaki peptidler iki farklı ultrafiltrasyon sistemi ile molekül ağırlıklarına göre ayrılmaya çalışılmıştır. Her iki sistemden elde edilen ultrafiltrasyon fraksiyonları SDS-PAGE ile incelenmiştir. Elektroforez, DLS, SE-HPLC analizleri sonuçları ultrafiltrasyon yöntemi kullanılarak molekül ağırlığına göre ayrılan peptidlerin daha sonra tekrar birleşerek agregat oluşturdıklarını göstermiştir. Bu nedenle hidrofobisitesi yüksek olan bu peptid ürünlerinin molekül ağırlıklarına göre ayırımının ultrafiltrasyon ile mümkün olmadığı belirlenmiştir.

5) Glutenin pH 2-10 aralığındaki çözünürlük eğrisi U şeklinde bir profil sergilemiştir. Gluten için en yüksek çözünürlük değeri (%63.0) pH 10' da elde edilmiştir. Gluten çözünürlüğünün süne proteaz enzimiyle kısmi hidroliz sonucunda önemli derecede ($p<0.05$) arttığı, ancak hidroliz derecesi arttıkça protein çözünürlüğünde önemli bir farklılık olmadığı görülmüştür (pH 6 ve 10 hariç).

Süne proteaz enzimiyle hazırlanan gluten hidrolizatlarının (3 ve %5) çözünürlük değerlerinin literatürde en iyi sonuç veren alkalaz enzimi ile elde edilen değerlerden daha yüksek (%95.0) olduğu görülmektedir. Ekonomik fayda sağlamak için protein hidrolizatı çözünürlüğünün en az %60, mümkünse %90 üzeri olması tercih edilmektedir (Hong et al., 2001). Başta köpük, emülsiyon ve jel tipi gıda sistemleri olmak üzere pek çok gıdada protein çözünürlüğünün en önemli özellik olduğu düşünülürse, süne proteaz enziminin glutenin modifikasyonunda ticari proteazlara göre daha iyi sonuç verdiği söylenebilir.

6) Gluten pH 6, 7 ve 8' de emülsiyon oluşturmazken, pH 2' de en yüksek emülsiyon kapasitesi (EK) değerine (%43.9) ulaşmıştır. Glutene ait pH 10 dışındaki diğer tüm pH' lardaki EK değerleri, süne proteaz enzimiyle kısmen hidrolize edildikten sonra önemli derecede ($p<0.05$) artmıştır. Yüksek hidroliz derecesinde (HD %5) ise pH 4 ve 8' deki EK değerlerinde bir miktar azalma meydana gelmiştir. Buna göre emülsiyon tipi gıdalarda özellikle pH' sı 6, 7 ve 8 olan ortamlarda gluten proteinleri kullanılamazken, süne enzimiyle elde edilen gluten hidrolizatları (%3 ve %5) bu pH' larda kullanılabilir. Ancak aşırı hidroliz

sonucunda globuler yapı kaybı ve parçalanmış peptidlerin optimum boyutundaki düşüşü, EK değerlerinde azalma meydana getirebildiği için glutenin modifikasyonunda hidroliz derecesi dikkate alınmalıdır.

Süne proteaz enzimiyle glutenin kısmen hidrolizi sonucunda ise pH 2 ve 4 dışındaki diğer pH' larda ES değerlerinde önemli derecede ($p<0.05$) artış meydana gelmiştir. Gluten hidrolizatlarıyla oluşturulan emülsiyonlar, ES tayininde ısıtma işlemine tabi tutulduğunda bozulmamıştır.

7) Gluten pH 4 ve 10' da yüksek köpük hacmine sahipken izoelektrik nokta yakınlarında düşük köpük hacmine sahiptir. Glutenin köpük kapasitesi pH 2 ve pH 4 dışındaki pH' larda kısmi hidroliz sonucunda önemli derecede ($p<0.05$) artmıştır. Ancak yüksek hidroliz derecesi (HD %5) köpük kapasitesinin pH 7, 8 ve 10' da önemli derecede ($p<0.05$) azalmasına yol açmıştır. Enzimatik hidroliz ile pH 6 ve 7' deki KS değerleri glutene göre önemli derecede ($p<0.05$) artmış, ancak pH 2, 4 ve 8' deki KS değerleri önemli derecede ($p<0.05$) azalmıştır. Bu nedenle gluten hidrolizatları belli pH' larda oluşturdukları köpüklerin stabil olmaması dikkate alınarak gıda sistemlerinde tercih edilmelidir.

8) Gluten glutamin bakımından zengin bir protein kaynağı olup, glutamin içeren peptidlerin ise önemli biyolojik fonksiyonel özellikler sergiledikleri bilinmektedir. Ayrıca bazı peptid hidrolizatlarında gözlenen yüksek antioksidatif etki mekanizması, bu çalışmada elde edilen hidrolizatlarda da saptanmıştır. Gluten ve gluten hidrolizatlarının toplam antioksidan aktiviteleri (TEAA mmol/kg örnek) belirlenmiş glutenin antioksidan aktivitesi bu yöntemle oldukça yüksek olarak saptanmıştır. Glutenin süne proteaz enzimiyle kısmi hidrolizi, antioksidan aktivitenin önemli derecede ($p<0.05$) artmasına neden olmuştur. Ancak yüksek hidroliz derecesi (HD %5) sonucunda, antioksidan aktivite önemli derecede ($p<0.05$) azalmıştır. Glutenin süne proteaz enzimiyle hidrolizi ile biyoaktif bileşenlerin ekonomik ve kolay yoldan elde edilebileceği, böylece yeni fonksiyonel gıdaların üretimine olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

9) Gluten hidrolizatlarına ait SE-HPLC profillerinin düşük moleküller ağırlıklı tarafa doğru kaydığı görülmüştür. Bu da enzimatik modifikasyon sonucunda oluşan peptidlerin orijinal gluten proteinlerine göre daha küçük boyut dağılımına sahip

olduklarını göstermektedir. Ayrıca hidroliz sonucunda polimerik [% (TP1+TP2)] protein miktarında azalma, monomerik protein miktarında ise artış [% (TP3+TP4)] meydana gelmiştir ($p<0.05$). Hidroliz derecesi arttıkça proteinlerde önemli ($p<0.05$) bir değişim saptanmamıştır.

% 0.5 (w/v)' lik SDS çözeltisinde çözünür gluten proteinlerinin büyük çoğunluğunun (%60.9) gliadin gibi monomerik proteinlerden, gluten hidrolizatlarına (HD %3 ve HD %5) ait çözünür proteinlerin büyük çoğunluğunun ise (sırasıyla % 41.2 ve % 42.9) daha düşük boyutlardaki monomerik proteinlerden oluştuğu tespit edilmiştir. Hidroliz derecesi arttıkça çözünür polimerik protein miktarındaki azalma ve çözünür monomerik protein miktarındaki artış önemli düzeyde ($p<0.05$) görülmektedir.

Gluten hidroliz edildiğinde çözünmeyen protein miktarında (UP1, UP2 ve UP3) önemli düzeyde ($p<0.05$) azalma olmuştur. Bununla birlikte UP4 alanında önemli düzeyde ($p<0.05$) artış meydana gelmiştir. Bu da hidroliz ile birlikte daha büyük proteinlerin daha küçük peptidlere parçalandığını göstermektedir. Yüksek hidroliz derecesinde (%5) yüksek molekül ağırlıklı polimerik protein (UP1) miktarında bir artış görülmektedir. Bu durum hidroliz sonucu oluşan yeni peptidlerin agregat oluşturmamasından kaynaklanabilir.

10) SDS-PAGE sonuçları gluten ve hidrolizatlarda (HD %3 ve %5) indirgenmemiş koşullarda jele giremeyen yüksek molekül ağırlıklı (HMW) proteinler olduğunu, indirgenmediğinde ise bu proteinlerin alt birimlerine ayrıldığını göstermektedir. Bu durum hidrolizatlardaki proteinlerin disülfid bağları ile agregatlar oluşturduğunu göstermekte ve daha önce yapılan ultrafiltrasyon ve DLS sonuçlarını desteklemektedir. Hem indirgenmiş hem de indirgenmemiş koşullarda, gluten proteinin süne proteaz enzimiyle modifikasyonu sonucunda yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin bant yoğunluğunda bir azalma saptanmıştır. Gluten hidrolizatlarında yeni protein bantlarının oluştuğu ve özellikle <20 kDa' da protein bant yoğunluklarının arttığı gözlenmiştir.

11) Gluten ve gluten hidrolizatlarına (HD %3) ait 2-DE haritaları geniş bir pH spektrumunda (3-10) karşılaştırıldığında polipeptid dağılımında bazı farklılıklar gösterilmiştir. Özellikle yüksek molekül ağırlık bölgesindeki protein spotlarının

yoğunlukları azalmış, hatta bazı protein spotları kaybolmuştur. Düşük molekül ağırlıklı protein spotlarının bant yoğunluklarında ise artış saptanmıştır.

Gluten ve gluten hidrolizatı (HD %5) 2-DE haritalarının karşılaştırıldığında ise yüksek molekül ağırlıklı bölgede (yaklaşık 125 kDa ve 70 kDa civarında) yeni spotlar olduğu görülmektedir. Bu durum enzimatik hidrolizin ilerleyen aşamalarında paçalanmamış glutenin, enzime daha açık konuma geldiğini ve hidrolize uğramaya başladığını gösterebilir. 2-D analizi dar bir izoelektrik nokta aralığında (pH 5-8) tekrarlandığında, glutende yaklaşık 140 kDa civarında ve pH 6-7 aralığındaki protein spotlarının pek çoğu enzimatik hidroliz sonucunda yok olmuştur. Sonuç olarak süne proteaz enzimin en spesifik olduğu proteinlerin bu proteinler olduklarını söyleyebiliriz.

12) Özellikle HD %5 olan gluten hidrolizatında yeni açığa çıkan protein spotları MALDI-MS/MS ile tanımlanmıştır. Buna göre yeni oluşan 1, 2 ve 3 no' lu spotlardaki (Şeki 4.34) proteinlerin 89.3 kDa molekül ağırlığında ve pI 6.21 olan yüksek molekül ağırlıklı glutenin alt birimi (HMW DX5) oldukları saptanmıştır. 4. spottaki proteinin molekül ağırlığı 10.9 kDa ve pI 8.18 olan yüksek molekül ağırlıklı glutenin alt birimi (HMW PC256)' inden olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, süne zararı görmüş yüksek proteolitik aktiviteye sahip buğdaylar veya bu buğdaylardan elde edilen süne proteaz enzimi, gluten proteinlerinin modifikasyonunda başarı ile kullanılabilir. Böylece ucuz bir kaynak (gluten) ve ekonomik öneme sahip olmayan süne-kıvıllı zararına maruz kalmış buğdaylar, tekrar ekonomiye kazandıracak ve bu ürünlere önemli bir katma değer yaratılacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adebowale, K.O., Lawal, O.S., 2003, Foaming, gelation and electrophoretic characteristics of mucuna bean (*Mucuna pruriens*) protein concentrates, Food Chemistry. 83, 237–246.
- Adler-Nissen, J., 1986, Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins, Elsevier Applied Science Publishers, London.
- Agyarea, K.K., Addo, K., Xiong, Y.L., 2009, Emulsifying and foaming properties of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate as influenced by pH, temperature and salt, Food Hydrocolloids. 23, 72–81.
- Agyarea, K.K., Xiong, Y.L., Addo, K., 2008, Influence of salt and pH on the solubility and structural characteristics of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate, Food Chemistry. 107, 1131-1137.
- Ahmedna, M., Prinyawiwatukul, W., Rao, R.M., 1999, Solubilized wheat protein isolate: functional properties and potential food applications, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47, 1340-1345.
- Amarowicz, R. and Shahidi, F., 1997, Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates, Food Chemistry. 58, 355-359.
- Anonymous, 2000, AACCC International, Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. 10th Ed., St. Paul, MN.
- Anonymous, 2002, International Association for Cereal Chemistry, ICC Standart No:129.
- Anonymous, 2010, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Strateji Geliştirme Başkanlığı, Stratejik Yönetim Dairesi Verileri. <http://www.tarim.gov.tr/Files/BirimFaliyetleri/KORGEM.pdf>
- Atlı, A., Koçak, N., Köksel, H., Ozan, A.N., Aktan, B., Karababa, E., Dağ, A., Tuncer, T., Dikmen, B. ve Özkan, Ş., 1988, Süne (*Eurygaster* spp.) ve kımıl (*Aelia* spp.) zararı görmüş tanelerin ekmeklik buğday kalitesine etkileri, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Genel Yayın. No: 2, Ankara, pp. 23.
- Autran, J.C., 1994, Size-exclusion high performance liquid chromatography for rapid examination of size differences of cereal proteins. High Performance Liquid Chromatography of Cereal And Legume Proteins. Kruger, J.E. and Bietz, J.A. (eds), American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota, USA.
- Babiker, F.E., Fujisawa, N., Matsudomi, N and Kato, A., 1996, Improvement in the functional properties of gluten by protease digestion or acid hydrolysis followed by microbial transglutaminase treatment. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 44, 3746-3750.

- Barber, K.J., and Warthesen, J.J., 1982, Some functional properties of acylated wheat gluten, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 30, 930–934.
- Batey, I., 1985, Enzymatic solubilization of wheat gluten, *Journal of Applied Biochemistry*. 7, 423–429.
- Berot, S., Popineau, Y., Compoin, J.P., Blassel, C. And Chaufer, B., 2001, Ultrafiltration to fractionate wheat polypeptides, *Journal of Chromatography B*. 753, 29-35.
- Bilgi, B. and Çelik, S., 2004, Solubility and emulsifying properties of barley protein concentrate, *European Food Research Technology*. 218, 437–441.
- Bombara, N., Anon M.C. and Pilosof, A.M.R., 1997, Functional properties of protease modified wheat flours, *Lebensm.-Wiss. U.-Tecnol.* 30, 441-447.
- Boyce, C.O.L., Lanzilotta, R.P. and Wong, T.M., 1986, Enzyme modified soy protein for use as an egg white substitute, U.S. Patent 4.632.903.
- Bushuk, W., Bekes, F., McMaster, G.J. and Zawistowska, U., 1984, Carbohydrate and lipid complexes with gliadin and glutenin. *Gluten Proteins*, 1-3 May 1984, Graveland, A and Moonen, J.H.E. (eds), *Proceedings of the second international workshop on gluten proteins*, Wageningen, the Netherlands, pp: 101-109.
- Caselia, M.L.A and Whitaker, J.R., 1990, Enzymatically and chemically modified zein for improvement of functional properties, *Journal of Food Biochemistry*. 14, 453-475.
- Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K. and Nokihara, K., 1998, Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 49–53.
- Crenwelge, D.D., Dill, C.W., Tybor, P.T. and Landmann, W.A. 1974, A comparison of the emulsification capacities of some protein concentrates, *Journal of Food Science*, 39, 175-177.
- Cressey, P.J. and McStay, C.L., 1987, Wheat-bug damage in New-Zealand wheats: development of a simple SDS-sedimentation test for bug damage, *J. Sci. Food Agric*. 38, 357-366.
- Critchley, B.R., 1998, Literature review of sunn pest *Eurygaster integriceps* put. (hemiptera, *scutelleridae*), *Crop Protection*. 17 (4), 271-287.
- Damodaran, S., 1996, Functional properties. *Food Proteins: Properties And Characterization*. Nakai, S. and Modler, H.W. (eds), VCH, New York.
- Day, L., Augustin, M.A., Batey, I.L. and Wrigley, C.W., 2006, Wheat-gluten uses and industry needs, *Trends in Food Science and Technology*. 17, 82–90.

- Decker, E.A., Ivanov, V., Zhu, B.Z. and Frei, B., 2001, Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by carnosine histidine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 511–516.
- Diaz, M. and Decker, E., 2004, Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8208–8213.
- Drago, S.R. and Gonzalez, R.J., 2001, Foaming properties of enzymatically hydrolysed wheat gluten, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 1, 269-273.
- Drago, S.R., Gonzalez, R.J and Anon, M.C., 2008, Application of surface response methodology to optimize hydrolysis of wheat gluten and characterization of selected hydrolysate fractions, *Journal of The Science of Food And Agriculture*. 88, 1415–1422.
- Emmons, C., Peterson, D., Paul, G., 1999, Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. In vitro antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 4894–4898.
- Every, D., 1991, General proteinase assay by formation of SDS-protein gels of proteolyzed substrate proteins, *Analytical Biochemistry*. 197, 208-212.
- Every, D., 1993, Purification and characterization of a glutenin hydrolysing proteinase from wheat damaged by the New Zealand wheat-bug, *Nysius huttoni*, *J. Cereal Sci.* 18, 239-250.
- Every, D., J.A. Farrell, M.W. Stufkens and A.R. Wallace, 1998, Wheat cultivar susceptibility to grain damage by the New Zealand wheat bug, *Nysius huttoni*, and cultivar susceptibility to the effects of bug proteinase on baking quality, *J. Cereal Sci.* 27, 37-46.
- Fennema, O.R., 1996, *Food Chemistry*, Marcel Dekker, Inc., pp. 394– 395.
- Fu, B. X. and Sapirstein, H. D., 1996, Procedure of isolating monomeric proteins and polymeric glutenins of wheat flours, *Cereal Chem.* 73, 143-151.
- Gianibelli, M.C., Larroque, O.R., MacRitchie, F., and Wrigley, C.W., 2001, Biochemical, genetic and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits, *Cereal Chemistry*. 78, 635–646.
- Greenaway, W.T., Neustadt, M.H. and Zeleny, L., 1965, A test for stinkbug damage in wheat, *Cereal Chem.* 42, 577-579.
- Gupta, R.B., Khan, K and MacRitchie, F., 1993, Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in quantity and size distribution of polymeric proteins, *Journal of Cereal Science*. 18, 23–44.

- Hattori, M., Yamaji-Tsukamoto, K., Kumagai, H., Feng, Y. and Takahashi, K., 1998, Antioxidive activity of soluble elastin peptides, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 2167–2170.
- Hong, Y.S., Lee, K.Y. and Lee, C.H., 2001, Molecular weight distribution of protein hydrolysate by the enymic hydrolysis of weakly acid treated wheat gluten, *Food Sci. Technol. Res.* 7, 126-130.
- Horiguchi, N., Horiguchi, H. And Suzuki, Y., 2005, Effect of wheat gluten hydrolysate on the immune system in healty human subjects, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 2445-2449.
- Ibanoglu, E. and Ibanoglu, S., 1999, Foaming behaviour of EDTA-treated α -lactalbumin, *Food Chemistry*. 66, 477-481.
- Ivanov, I.B., Basheka, E.S., Gurkov, T.D., Hadjiiski, D.H., Arnaudov, L.N., Vassileva, N.D., Tcholakova, S.S. and Campbell, B.E., 2001, Stability of oil-in-water emulsions containing protein, *Food Colloids Fundamentals of Formulation*. Dickinson, E. and Miller, R. (eds), The Royal Society of Chemistry, UK., pp: 72-89.
- Kalin, F., 1979, Wheat gluten applications, food Products, *Journal of American Oil Chemical Society*. 56, 477-479.
- Kara, M., Sivri D. and Köksel, H., 2005, Effects of high protease-activity flours and commercial proteases on cookie quality, *Food Research International*. 38, 479–486.
- Karababa, E. and Ozan, A. N., 1998, Effect of wheat bug (*Eurygaster integriceps*) damage on quality of a wheat varety grown in Turkey, *J. Sci. Food Agriculture*. 77, 399-403.
- Kato, A., Tanaka, A., Lee, Y., Matsudomi, N. and Kobayashi, K., 1987, Effects of deamidation with chymotrypsin at pH 10 on the functional properties of proteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 35, 285–288.
- Kawashima, K., Itoh, H., Miyoshi, M. and Chibata, I., 1979, Antioxidant properties of branched-chain amino acid derivatives, *Chem. Pharm. Bull.* 27, 1912–1916.
- Kınacı, E., 1994, Buğday çeşidi ve kültürel tedbirlerin süne zararını azaltıcı etkileri, *Un Mamülleri Dünyası*. 3 (2), 4-10.
- Kinsella, J.E. 1976, Functional properties of proteins in foods: A survey, *CRC Critical, Reviews in Food Science and Nutrition*, 7, 219-280.
- Kong, X., Zhou, H. and Hua, Y., 2008a, Preparation and antioxidant activity of wheat gluten hydrolysates (WGHs) using ultrafiltration membranes, *Journal of The Science of Food And Agriculture*. 88, 920–926.

- Kong, X., Zhou, H., Hua, Y., and Qian, H., 2008b, Preparation of wheat gluten hydrolysates with high opioid activity, *Eur Food Res Technol.* 227, 511–517.
- Kong, X., Zhou, H. and Qian H., 2007a, Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates, *Food Chemistry.* 102, 759–763.
- Kong, X., Zhou, H. and Qian, H., 2007b, Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates, *Food Chemistry.* 101, 615–620.
- Köksel, H., Ozderen, T., Olanca, B. and Sivri Ozay, D., 2009, Effects of Suni Bug (*Eurygaster* spp.) Damage on Milling Properties and Semolina Quality of Durum Wheats (*Triticum durum* L.), *Cereal Chemistry.* 86, 181–186.
- Köksel, H., Atli, A., Dağ, A., and Sivri, D., 2002, Commercial milling of suni bug (*Eurygaster* spp.) damaged wheat, *Nahrung/Food.* 46, 25-27.
- Köksel, H., Sivri, D., Özboy, Ö., Başman, A. ve Karaca, H., 2000, Hububat Laboratuvarı El Kitabı. Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları, Yayın No:47.
- Köksel, H., Sapirstein, H.D., Celik, S., Bushuk, W., 1998, Effects of gamma-irradiation of wheat on gluten proteins, *J. Cereal Sci.* 30, 243-250.
- Kretovich, V.L., 1944. Biochemistry of the damage to grain by the wheat-bug, *Cereal Chem.* 21, 1-16.
- Kron, P.A., Faulds, C.B., Ryden, P., Robertson, J.A. and Williamson, G., 1997, Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon, *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 45, 661–667.
- Krull, L.H. and Wall, J.S., 1966, Synthetic Polypeptides Containing Side- Chain Amide Groups, *Biochemistry.* 5, 1521-1527.
- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* 227, 680–685.
- Larre, C., Huchet, B., Berot, S., and Popineau Y., 2001, Functional properties of peptides derived from wheat storage proteins by limited enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *Food Colloids-Fundamentals Of Formulation.* Dickinson, E. and Miller, R. (eds), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 263-271.
- Lee, K.A. and Kim, S.H., 2005, SSGE and DEE, new peptides isolated from a soy protein hydrolysate that inhibit platelet aggregation, *Food Chemistry.* 90, 389–93.
- Lens, J.P., Mulder, W.J. and Kolster, P., 1999, Modification of wheat gluten for nonfood applications, *Cereal Foods World.* 44, 5-8.

- Linares, E., Larre C. and Popineau Y., 2001a, Freeze- or spray-dried gluten hydrolysates. 1. Biochemical and emulsifying properties as a function of drying process, *Journal of Food Engineering*. 48, 127-135.
- Linares, E., Larre, C. And Popineau, Y., 2001b, Freeze- or spray-dried gluten hydrolysates. 2. Effect of emulsification process on droplet size and emulsion stability, *Journal of Food Engineering*. 48, 137-146.
- Linares, E., Larre, C., Lemeste, M and Popineau, Y., 2000, Emulsifying and foaming properties of gluten hydrolysates with an increasing degree of hydrolysis: role of soluble and insoluble fractions, *Cereal Chemistry*. 77, 414–420.
- Lomakin, A., Teplow, D.B. and Benedek, G.B., 2005, Quasielastic light scattering for protein assembly studies. *Methods In Molecular Biology, Amyloid Proteins: Methods And Protocols*. Sigurdsson, E.M. (ed), Humana press Inc, Totowa, NJ, vol. 299, pp: 153-174.
- Lorenz, K. and Meredith, P., 1988a, Insect damaged wheat-effects on starch characteristics, *Starch/Starke*. 40, 136-139.
- Lorenz, K. and Meredith, P., 1988b, Insect-damaged wheat: history of the problem, effects on baking quality, remedies, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol*. 21, 183-187.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265–275.
- Mason, P., Tome, D. and Popineau, Y., 1986, Peptic hydrolysis of gluten, glutenin and gliadin from wheat grain: kinetics and characterisation of peptides, *Journal of The Science of Food And Agriculture*. 37, 1223-1235.
- Matsoukas, N.P. and Morrison, W.R., 1990, Breadmaking quality of ten greek breadwheats-baking and storage tests on bread made by long fermentation and activated (chemical) dough development processes, and the effects of bug-damaged wheat, *J. Sci. and Food Agric*. 53, 363-367.
- Mejri, M., Roge, B., BenSouissi, A., Michels, F., and Mathlouthi, M. 2005, Effects of some additives on wheat gluten solubility: A structural approach, *Food Chemistry*. 92, 7–15.
- Mimouni, B., Azanza, J.L. and Raymond, J., 1999, Influence of double enzymic hydrolyses on gluten functionality, *Journal of The Science of Food And Agriculture*. 79, 1048-1053.
- Mimouni, B., Raymond, J., Merle-Desnoyers, A.M., Azanza, J.L., ve Ducastaing, A., 1994. Combined acid deamidation and enzymic hydrolysis for improvement of the functional properties of wheat gluten. *J. Cereal Sci*. 21:153-165.

- Molina, S.E.O and Wagner, J.R., 2002, Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structure characteristics, solubility and foaming properties, *Food Res. Int.* 35, 511–518.
- Monti, J.C. and Jost, R., 1978, Enzymatic solubilization of heat-denatured cheese whey protein, *Journal of Dairy Science.* 61, 1233-1237.
- Morel, P., Dehlon, J.C., Autran, J.P., Leygue Bar-L'Helgouac'h, C., 2000, Effects of temperature, sonication time, and power settings on size distribution and extractability of total wheat flour proteins as determined by size-exclusion high-performance liquid chromatography, *Cereal Chemistry.* 77, 685–691.
- Motoi, H., Fukudome, S. and Urabe, I., 2004, Continuous production of wheat gluten peptide with foaming properties using immobilized enzymes, *Eur. Food. Res. Technol.* 219, 522–528.
- Mullally, M.M., O'Callaghan, D.M., FitzGerald, R.J., Donnelly, W. and Dalton, J.P., 1994, Proteolytic and peptidolytic activities in commercial pancreatic protease preparations and their relationship to some whey protein hydrolysate characteristics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 42, 2973-2981.
- Napolitano, A., Lanzuise, S., Ruocco, M., Arlotti, G., Ranieri, R., Knutsen, S.H., Lorito, M. and Fogliano, V., 2006, Treatment of cereal products with a tailored preparation of trichoderma enzymes increases the amount of soluble dietary fiber, *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 54, 7863–7869.
- Nielsen, P.M., 1997, Functionality of protein hydrolysates. *Food Proteins And Their Applications.* Damodaran, S. and Paraf, A. (eds), CRC Press, New York, pp: 443-472.
- Nielsen, P.M., and Olsen, H.S., 2002, Enzymic modification of food protein. *Enzymes In Food Technology.* Whitehurst, R. and Law, B.A. (eds), Sheffield Academic Pres, UK.
- Nobbmann, U., Connah, M., Fish, B., Varley, P., Gee, C., Mulot, S., Chen, J., Zhou, L., Lu, Y., Sheng, F., Yi, J. and Harding, S.E., 2007, Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.* 24, 117-128.
- Olanca, B., Sivri Ozay, D. and Köksel, H., 2009, Effects of suni-bug (*Eurygaster* spp.) damage on size distribution of durum wheat (*Triticum durum* L.) proteins, *Eur. Food Res. Technol.* 229, 813–820.
- Olden, H.S., 1984, Method of producing an egg white substitute material, U.S. Patent 4,431,629.
- Ozderen, T., Olanca, B., Sanal, T., Ozay, D.S. and Köksel, H., 2008, Effects of suni-bug (*Eurygaster* spp.) damage on semolina properties and spaghetti

- quality characteristics of durum wheats (*Triticum durum* L.), Journal of Cereal Science. 48, 464–470.
- Paulian, F., and Popov C., 1980, Sunn pest or cereal bug, Wheat, Ciba-Geigy, Basel, pp. 69-74.
- Pearson, A.M., Spooner, M.E., Hegarty, G.R., and Bratzler, L.J. 1965, The emulsifying capacity and stability of soy sodium proteinate, potassium caseinate and nonfat dry milk, Food Technology, 19, 1841-1845.
- Pena-ramos, E.A. and Xiong, Y.L., 2002, Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system, Journal of Food Science. 67, 2952–2956.
- Pena-Ramos, E.A. and Xiong, Y.L.L., 2003, Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties, Meat Science. 64, 259–63.
- Ponnampalam, R., Goulet, G., Amiot, J. and Brisson, G.J., 1987, Some functional and nutritional properties of oat flours as affected by proteolysis, J Journal of Agricultural and Food Chemistry. 35, 279-285.
- Popineau, Y. Huchet, B., Larre, C and Berot, S., 2002, Foaming and emulsifying properties of fractions of gluten peptides obtained by limited enzymatic hydrolysis and ultrafiltration, Journal of Cereal Science. 35, 327–335.
- Popineau, Y. and Thebaudin, J.Y., 1990, Functional properties of enzymatically hydrolyzed glutens. Gluten protein. Bushuk, W. and Tkachuk, R. (eds), The American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN, p. 794.
- Rhim, J.W., Gennadios, A., Fu, D.J., Weller, C.L., and Hanna, M.A., 1999, Properties of ultraviolet irradiated protein films, Lebensmittel Wissenschaft und Technologie. 32, 129–133.
- Rival, S.G., Boeriu, C.G. and Wichers, H.J., 2001, Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49, 295–302.
- Rosell, C.M., Aja, S., Bean, S. and Lookhart, G., 2002, Effect of *Aelia* spp. and *Eurygaster* spp. Damage on wheat proteins, Cereal Chem. 79 (6), 801-805.
- Rubio, A.R.I., Singh, H., Chittrakorn, S. and MacRitchie, F., 2006, Stability of wheat proteins in solution, Journal of Cereal Science. 43, 169–174.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N. and Juneja, L.R., 2004, Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system, Food Chemistry. 86, 99–103.
- Sato, N.K., Sato, K., Esumi, Y., Okumura, T., Hideki, Y., Kuwajima, C.T., Kurata, A., Kotaru, M., Kawabata, M., Nakamura, Y. and Ohtsuki, K., 2003, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51, 8-13.

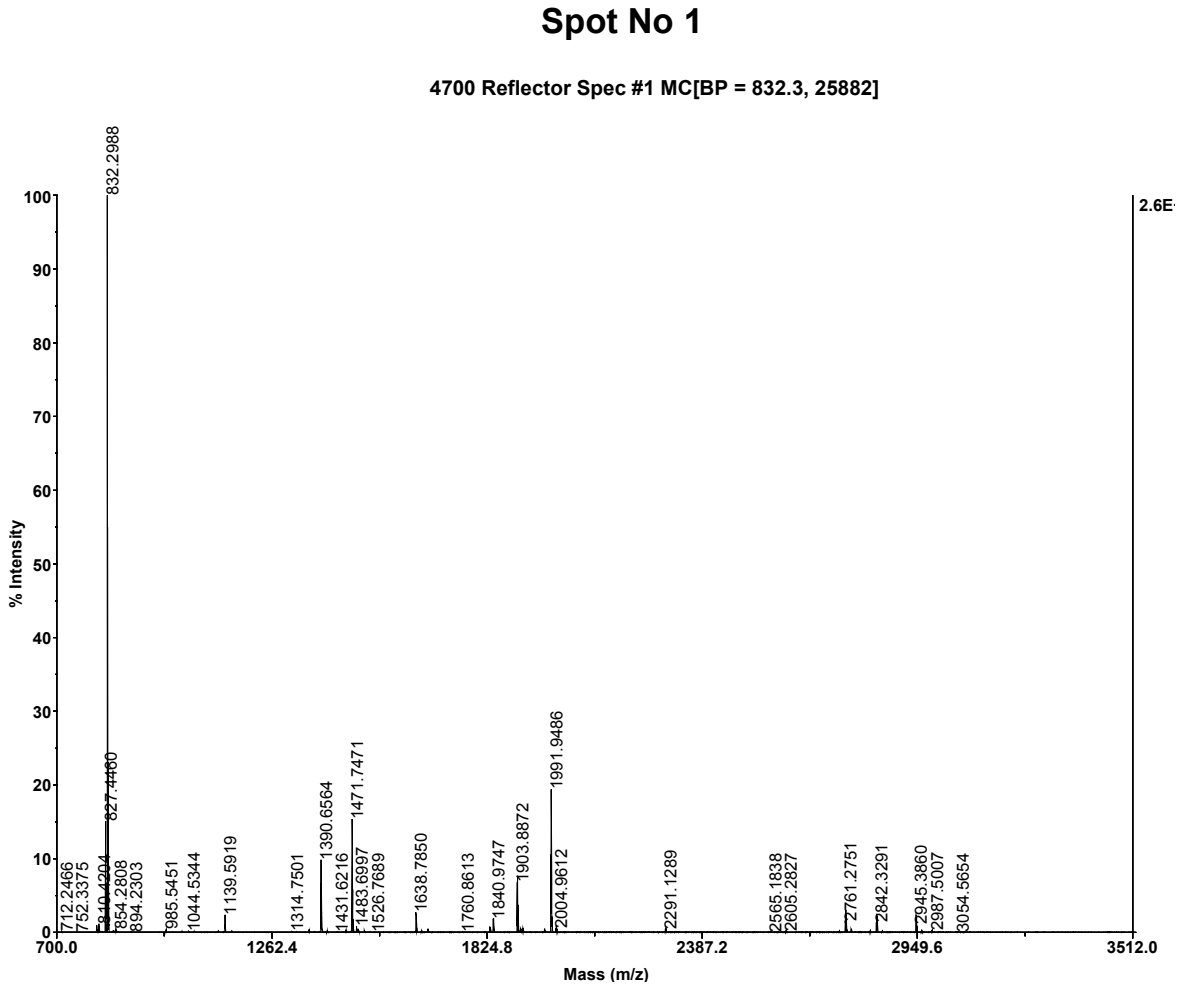
- Sato, K., Nisimura, R., Suzuki, Y., Motoi, H., Nakamura, Y., Ohtsuki, K., Kawabata, M., 1998, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46, 3403-3405.
- Sawaki, K., Takaoka, I., Sakuraba, K. and Suzuki, Y., 2004, Effects of distance running and subsequent intake of glutamine rich peptide on biomedical parameters of male Japanese athletes, Nutrition Research. 24, 59-71.
- Schwenke, K.D., 1997, Enzyme and chemical modification of proteins. Food Proteins and Their Applications. Srinivasan, D. (ed), CRC Press.
- Serpen, A., Capuano, E., Fogliano, V. and Gökmen, V., 2007, A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55, 7676–7681.
- Shewry, P.R., and Halford, N.G., 2002, Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization, Journal of Experimental Botany. 53, 947–958.
- Sivri, D., 1998, Süne (*Eurygaster* spp.) Proteolitik Enzimlerinin İzolasyonu, Karakterizasyonu, Saflaştırılması ve Gluten Proteinleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara, 101s.
- Sivri, D. and Köksel H., 1996, The effects of wheat bug proteolytic enzymes on gluten proteins, 6th International Gluten Workshop. Sydney, Australia, pp.461-464.
- Sivri, D. and Köksel, H., 2002, Wheat bug protease: a protease enzyme with specific activity on gluten proteins. Wheat Quality Elucidation. Ng, P.K.W. and Wrigley, C. (eds.), American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN. pp.113-126.
- Sivri, D. and Köksel, H., 2000, Characterisation and partial purification of gluten hydrolyzing protease from bug (*Eurygaster* spp.) damaged wheat. Gluten Proteins. Shewry, P.R. and Tatham, A.S. (eds.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. pp. 287- 290.
- Sivri, D., Yıldırım, Z., and Köksel, H., 2005, The Effect of Suni-Bug (*Eurygaster* spp.) Damaged Wheat on the Physical Properties of Extrusion Cooked Product, Food Sci. Technol. Res., 11, 32-36
- Sivri, D., Batey, I.L., Skylas, D.J., Daqiq, L. and Wrigley, C.W., 2004, Changes in the composition and size distribution of endosperm proteins from bug-damaged wheats, Australian Journal of Agricultural Research. 55, 1–7.
- Sivri, D., Sapirstein, H. Bushuk, W., and Köksel, H., 2002, Wheat intercultural differences in susceptibility of glutenin protein to the effects of bug (*Eurygaster integriceps*) protease, Cereal Chem. 79, 41-44.

- Sivri, D., Sapirstein, H. Köksel, H. and Bushuk, W., 1999, Effects of wheat bug (*Eurygaster maura*) protease on glutenin proteins, *Cereal Chem.* 76, 816-820.
- Sivri, D., Köksel, H. and Bushuk, W., 1998, Effects of wheat bug (*Eurygaster maura*) proteolytic enzymes on electrophoretic properties of gluten proteins, *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science.* 26, 117-125.
- Skylas, D.J., Dyk, D.V. and Wrigly, C.W., 2005, Proteomics of wheat grain, *Journal of Cereal Science.* 41, 165-179.
- Skylas, D.J., Cordwell, S.J., Hains, P.G., Larsen, M.R., Basseal, D.J., Walsh, B.J., Blumenthal, C., Rathmell, W.G., Copeland, L., Wrigley, C.W., 2002, Heat shock of wheat during grain filling: proteins associated with heat-tolerance, *Journal of Cereal Science.* 35, 175–188.
- Sollid, L.M., 2000, Molecular basis of celiac disease, *Annual Review of Immunology.* 18, 53–81.
- Suetsuna, K., 2000, Antioxidant peptides from the protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle, *Mar. Biotechnol.* 2, 5–10.
- Suetsuna, K. and Chen, J., 2002, Isolation and characterization of peptides with antioxidant activity derived from wheat gluten. *Food Sci. Technol. Res.* 8, 227–230.
- Surowka, K., Zmudzinski, D. and Surowka, J., 2004, Enzymatic modification of extruded soy protein concentrate as a method of obtaining new functional food components, *Trends Food Sci. Technol.* 15, 153–60.
- Swallow, W.H. and Cressey, P.J., 1987, Historical overview of wheat-bug damage in New-Zealand wheats, *New Zealand Journal of Agricultural Research.* 30, 341-344.
- Tosi, P., Masci, S., Giovangrossi, A., D'Ovidio, R., Bekes, F. and Larroque, O., 2005, Modification of the low molecular weight (LMW) glutenin composition of transgenic durum wheat, Effects on glutenin polymer size and gluten functionality, *Molecular Breeding* 16, 113–126.
- Trufanov, V.A., Permyakova, M.D. and Berezovskaya, E.V., 2003, Aggregating ability of seed storage proteins from cereals differing in gluten quality. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 39, 418–421.
- Turgeon, S.L., Gautier, S.F. and Paquin, P., 1992, Emulsifying property of whey peptide fractions as a function of pH and ionic strength, *Journal of Food Science.* 57, 601, 634.
- Uthayakumaran, S., Newberry, M., Phan-Thien, N., and Tanner, R., 2002, Small and large strain rheology of wheat gluten, *Rheol. Acta.* 41, 162- 172.

- Wang, J.S., Zhao, M.M., Hong, T. and Rosella, C.M., 2008, Preparation and characterization of modified wheat gluten by enzymatic hydrolysis-ultrafiltration, *Journal of Food Biochemistry*. 32, 316-334.
- Wang, J.S., Zhao, M.M., Zhao, Q.Z. and Jiang, Y.M., 2007a, Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems, *Food Chemistry*. 101, 1658–1663.
- Wang, J.S., Zhao, M.M., Zhao, Q.Z., Bao, Y and Jiang, Y.M., 2007b, Characterization of hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis of wheat gluten, *Journal of Food Science*. 72, 103-107.
- Wang, J.S., Zhao, M. And Jiang, Y., 2007c, Effects of wheat gluten hydrolysate and its ultrafiltration fractions on dough properties and bread quality. *Food Technol. Biotechnol*. 45, 410-414.
- Wang, J.S, Zhao, M., Yang, X. and Jiang, Y., 2006, Improvement on functional properties of wheat gluten by enzymatic hydrolysis and ultrafiltration, *Journal of Cereal Science*. 44, 93–100.
- Wu, C. H., Nakai, S., and Powrie, W.D., 1976, Preparation and properties of acid-solubilized gluten, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 24, 504–510.
- Yasumatsu, K., Sawada, K., Moritaka, S., Misaki, M., Toda, J., Wada, T. and Ishii, K., 1972, Whipping and emulsifying properties of soybean products, *Agricultural and Biological Chemistry*. 36, 719-727.
- Zhou, K and Yu, L., 2004, Antioxidant properties of bran extracts from Trego wheat grown at different locations, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 1112–1117.

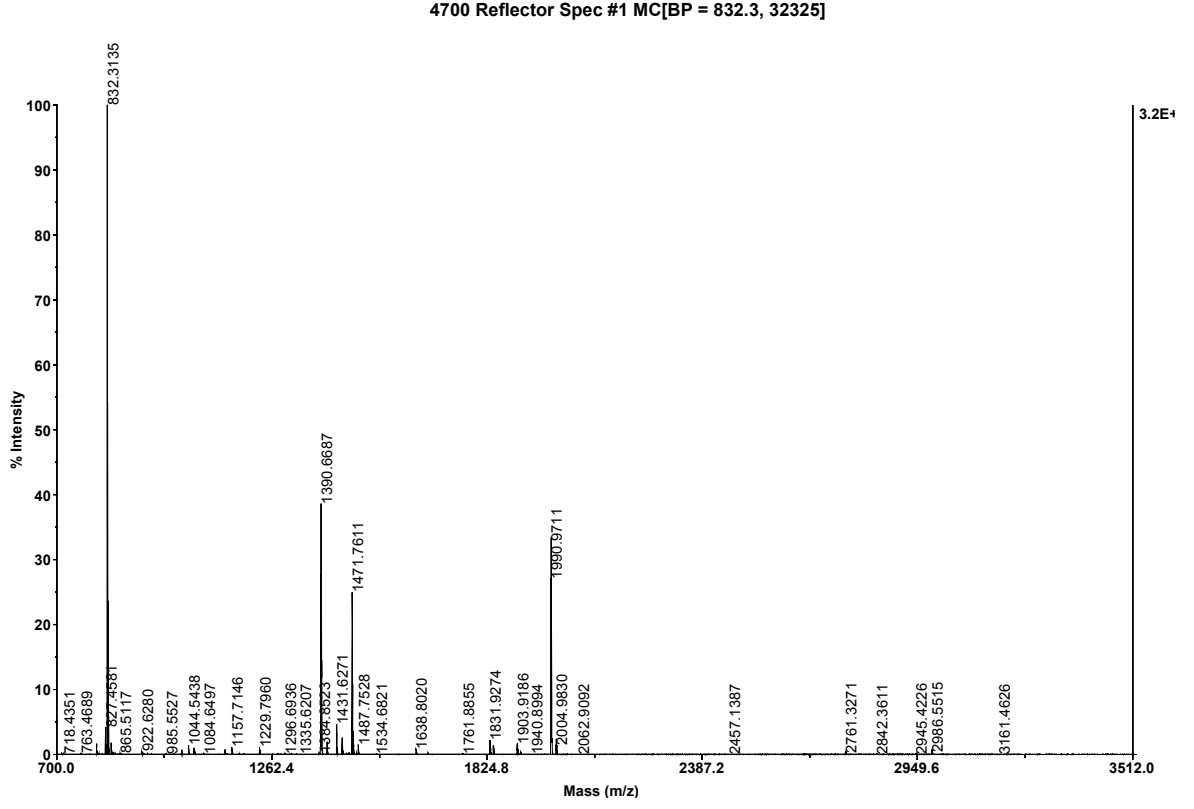
EKLER

EK 1. HD %5 olan gluten hidrolizatının pH 3-10 aralığında elde edilen 2-D jelden kesilen (Şekil 4. 34) 1 no' lu spota ait MALDI-MS/MS kütle spektrumu



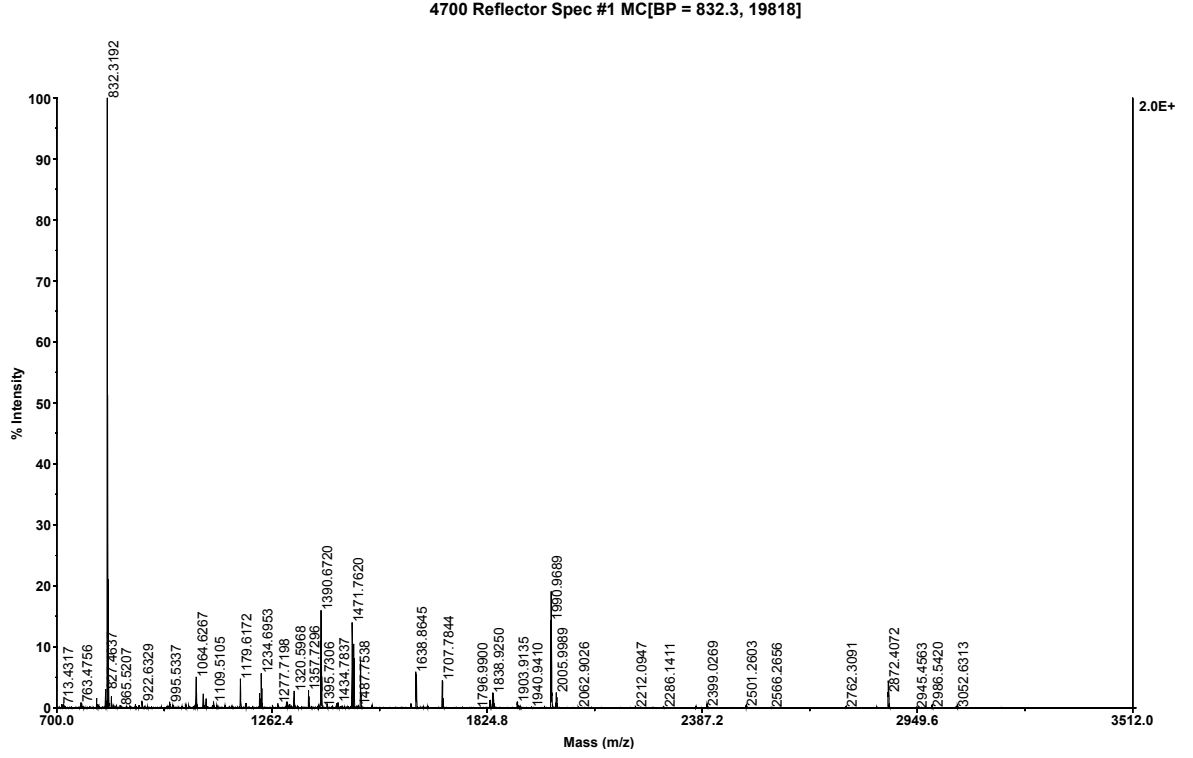
EK 2. HD %5 olan gluten hidrolizatının pH 3-10 aralığında elde edilen 2-D jelden kesilen (Şekil 4. 34) 2 no' lu spota ait MALDI-MS/MS kütle spektrumu

Spot No 2



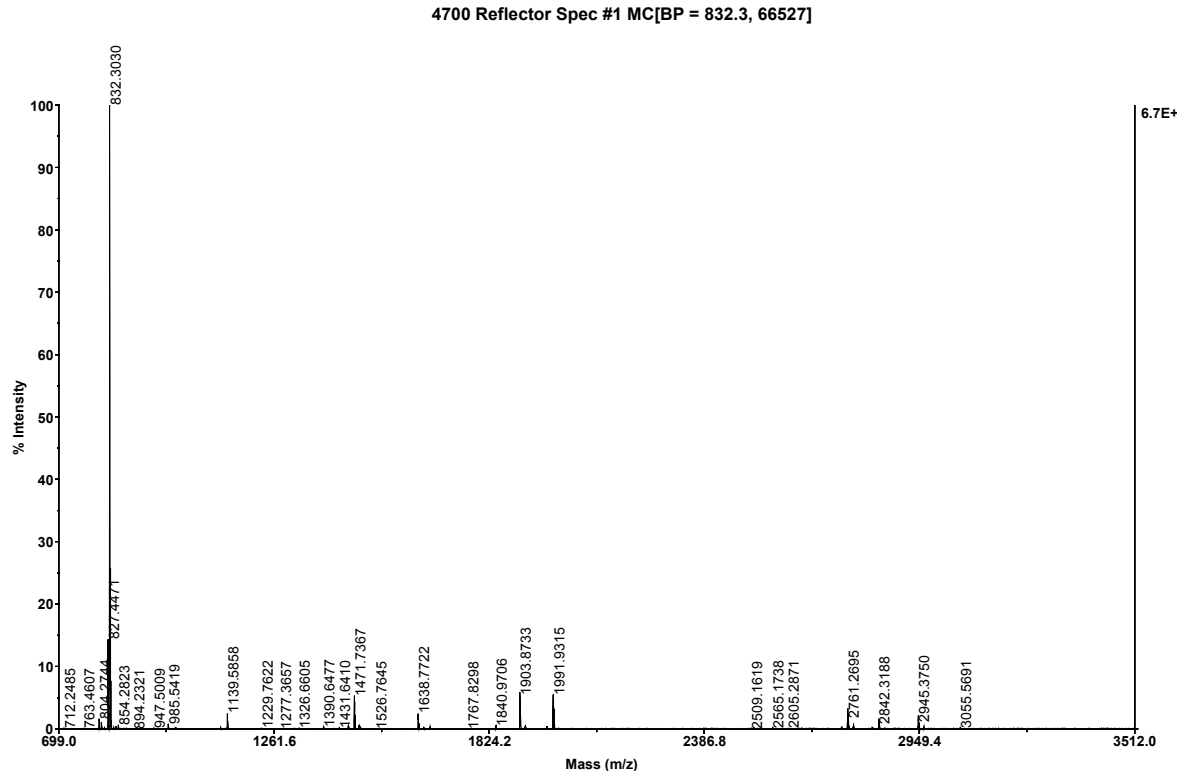
EK 3. HD %5 olan gluten hidrolizatının pH 3-10 aralığında elde edilen 2-D jelden kesilen (Şekil 4. 34) 3 no' lu spota ait MALDI-MS/MS kütle spektrumu

Spot No 3



EK 4. HD %5 olan gluten hidrolizatının pH 3-10 aralığında elde edilen 2-D jelden kesilen (Şekil 4. 34) 4 no' lu spota ait MALDI-MS/MS kütle spektrumu

Spot No 4



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : BURCU OLANCA

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 09/01/1979

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise :1992-1995 Ankara Etlik Lisesi

Lisans :1995-2000 H.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü

Yüksek Lisans :2000-2003 H.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü

Doktora :2003-2010 H.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce (iyi); İtalyanca (temel)

İş Tecrübesi:

2001-2009 :H.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü, Araştırma Görevlisi

2009- :Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı, Biyoteknoloji ve GDO Birimi, Gıda Mühendisi