

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MISIR GLUTENİNİN ENZİMATİK HİDROLİZİ:
PROSES PARAMETRELERİNİN OPTİMİZASYONU,
HİDROLİZ, ÇÖZÜNÜRLÜK VE ENZİM
İNAKTİVASYON KİNETİĞİ**

Kimya Yük. Müh. Dilek KILIÇ APAR

**FBE Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Kimya Mühendisliği Programında
Hazırlanan**

DOKTORA TEZİ

Tez Savunma Tarihi : 11 Nisan 2008

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Belma ÖZBEK (YTÜ)

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Mehmet Ali GÜRKAYNAK (İÜ)

: Prof. Dr. Kutlu ÜLGEN (BÜ)

: Prof. Dr. Dilek KAZAN (MÜ)

: Prof. Dr. İnci ATAÇ (YTÜ)

İSTANBUL, 2008

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	xvi
ÖNSÖZ	xx
ÖZET	xx
ABSTRACT	xxii
1. GİRİŞ	1
2. PROTEİN HİDROLİZİ	4
3. BİTKİSEL PROTEİN KAYNAKLARI	6
3.1 Mısır Gluteni	8
4. PROTEOLİTİK ENZİMLER	11
4.1 Proteolitik Enzimlerin Kaynaklarına göre Sınıflandırılması	11
4.1.1 Bitkisel proteazlar	11
4.1.2 Hayvansal proteazlar	12
4.1.3 Mikrobiyal proteazlar	12
4.2 Proteolitik Enzimlerin Etki Mekanizmasına göre Sınıflandırılması	13
4.2.1 Exo-peptidazlar	13
4.2.2 Endo-peptidazlar	14
4.3 Proteolitik Enzimlerin Kullanım Alanları	14
5. GLUTEN HİDROLİZİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	17
6. MATERYAL VE YÖNTEM	27
6.1 Kullanılan Cihazlar	27
6.2 Kimyasal Maddeler	29
6.3 Protein Hidroliz Deneyleri	31
6.4 pH-Stat Metodu ile Hidroliz Derecesinin Belirlenmesi	32
6.4.1 Materyaller	32
6.4.2 Hidroliz derecesinin hesaplanması	32
6.5 TNBS Yöntemi ile Serbest Amino Gruplarının Belirlenmesi	32
6.5.1 Materyaller	33
6.5.2 Yöntem	34
6.5.3 Hesaplamalar	34
6.6 OPA Yöntemi ile Serbest Amino Gruplarının Belirlenmesi	35

6.6.1	Materyaller.....	35
6.6.2	Yöntem	36
6.6.3	Hesaplamalar	36
6.7	Folin Lowry Yöntemi ile Çözünen Protein Miktarının Belirlenmesi.....	36
6.7.1	Materyaller.....	37
6.7.2	Yöntem	37
6.7.3	Hesaplamalar	38
6.8	Enzim Aktivite Tayini	40
6.8.1	Materyaller.....	40
6.8.2	Yöntem	41
6.8.3	Hesaplamalar	41
6.9	Aminoasit Kompozisyon Analizi	43
6.10	SEM Analizleri	43
6.11	Teorik çalışma	43
7.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	45
7.1	Hidroliz Reaksiyonu İçin Uygun Enzimin Seçimi	45
7.2	pH-Stat Kalibrasyonu	46
7.3	Kesikli Sistemde Proses Parametrelerinin Optimizasyonu	55
7.3.1	Gluten konsantrasyonunun hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi	55
7.3.2	Enzim konsantrasyonunun hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi	61
7.3.3	Sıcaklığın hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi	66
7.3.4	pH'ın hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi	71
7.3.5	Optimum proses şartlarında elde edilen mısır gluteni hidrolizatının amino asit kompozisyonunun incelenmesi.....	76
7.3.6	Çalışmada elde edilen verilerin literatürde varolan verilerle karşılaştırılması	77
7.4	Hidroliz Ürün Konsantrasyonunun Hidroliz Reaksiyonu Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi.....	80
7.5	Kademeli Enzim İlavesinin Hidroliz Reaksiyonu Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi.....	83
7.6	Glutene Uygulanan Ön İşlemlerin Hidroliz Reaksiyonu Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi.....	86
7.6.1	Isıl ön işlemin hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi.....	86
7.6.2	Mikrodalga ön işleminin hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi ...	90
7.6.3	Sonikasyon ön işleminin hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi ...	94
7.6.4	Nişastanın glutenden ayrılmasının hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi	98
7.6.5	Glutene uygulanan ön işlemlerin hidrolizat amino asit kompozisyonuna etkilerinin incelenmesi.....	103
7.7	Sonikasyon Parametrelerinin Hidroliz Reaksiyonu Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi.....	104
7.8	Mısır Gluteni için Hidroliz, Çözünürlük ve Enzim İnaktivasyon Kinetiğinin İncelenmesi	109
7.8.1	Elde Edilen Kinetik Verilerin Modellenmesi	109
7.8.1.1	Hidroliz ve çözünürlük verilerinin modellenmesi	109
7.8.1.2	Enzim inaktivasyon verilerinin modellenmesi	112
7.8.2	Michaelis-Menten kinetiği.....	115
7.8.2.1	Mısır gluteninin enzimatik hidrolizinin Michaelis-Menten kinetiğine uygunluğunun incelenmesi	120
7.8.2.2	Sıcaklık ve pH'ın Michaelis-Menten kinetik parametrelerine etkisinin incelenmesi	124

7.8.2.3	Alcalase enzimi için ürün inhibisyon türünün belirlenmesi	132
7.8.3	Kinetik verilerin literatürde varolan verilerle karşılaştırılması	144
8.	SONUÇLAR.....	145
KAYNAKLAR.....		153
EKLER		161
Ek 1	Hidroliz Derecesinin Hesaplanması.....	161
Ek 2	TNBS ve OPA Analizleri İle Serbest Hale Geçen Amino Asit Grup Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	163
Ek 3	Protein Çözünürlük Derecesinin Hesaplanması.....	166
Ek 4	% Enzim Aktivite Değerlerinin Hesaplanması	168
Ek 5	Nişasta Hidroliz Deneyi	170
ÖZGEÇMİŞ.....		172

SİMGE LİSTESİ

A	% Enzim aktivitesi
ACE	Anjiyotensin I dönüştürücü enzim
Abs	Absorbans değeri
a, b	Denklem sabitleri
B	Baz sarfiyatı, mL, meqv/g protein
E	Enzim
E_0	Başlangıç enzim miktarı, % (hacim)
e	Eğim
E_D	İnaktivasyon enerjisi, kJ/mol
ES	Enzim-Substrat kompleksi
EP	Enzim-Ürün kompleksi
HD	% Hidroliz derecesi
h_{top}	Toplam peptit bağ sayısı, meqv/g protein
ΔH	α -amino grupları için iyonlaşma entalpisi, kJ/mol
K_M	Michaelis-Menten sabiti, g/L
$K_M^{göz}$	Michaelis-Menten sabitinin gözlemsel değeri, g/L
K_i	İnhibisyon sabiti, % (hacim)
k_1, k_{-1}, k_2	Reaksiyon hız sabitleri
k, k_D	İnaktivasyon sabitleri, dak ⁻¹
P	Ürün
P_M	Protein miktarı, g
$PÇ$	% Protein çözünürlüğü
$PÇ_M$	Çözünen protein miktarı, g/L
R	Gaz sabiti, kJ/kmol.K
S	Substrat
S_0	Başlangıç substrat konsantrasyonu, g/L
SF	Seyrelme faktörü
T	Sıcaklık, °C, K
t	Zaman, dak.
W	Watt
X_{HD}	Hidroliz derecesi (Hidroliz dönüşümü)
$X_{PÇ}$	Çözünürlük derecesi (Protein çözünürlük oranı)
v	Reaksiyon hızı

V_{max}	Maksimum hız, mmol/L.dak, g/L.dak
$V_{max}^{göz}$	Maksimum hızın gözlemsel değeri, mmol/L.dak, g/L.dak
v_0	Başlangıç hızı, mmol/L.dak, g/L.dak
α	α -NH gruplarının ortalama ayrılma sabiti
γ	Denklemin sabiti
σ	Standart sapma

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Protein hidrolizi (Van der Ven C., 2002).....	4
Şekil 2.2	Proteaz enzimi tarafından katalizlenen hidroliz reaksiyonu (Adler-Nissen, 1986)..	4
Şekil 3.1	Mısırın ıslak öğütme işlemi için akış diyagramı [3]	9
Şekil 6.1	Protein hidrolizi deney düzeneği.....	31
Şekil 6.2	TNBS'in amino grupları ile reaksiyonu (Adler-Nissen, 1979).....	33
Şekil 6.3	OPA reaksiyonu (Nielsen vd., 2001)	35
Şekil 6.4	Folin Lowry yöntemi için oluşturulan standart eğri.....	39
Şekil 6.5	Aktivite tayini için oluşturulan standart eğri.....	43
Şekil 7.1	Farklı enzimler için zamana karşılık elde edilen baz sarfiyatı değerleri, T= 50°C, pH= 7, S= 20 g protein/L, E= 0.35 AU/g protein (▲ Flavourzyme, ⌘ PTN, ◆ Neutrase, ● Protamex, ■ Alcalase).....	45
Şekil 7.2	Farklı enzimler için zamana karşı elde edilen çözünen protein miktarları, T= 50°C, pH= 7, S= 20 g protein/L, E= 0.35 AU/g protein (▲ Flavourzyme, ⌘ PTN, ◆ Neutrase, ● Protamex, ■ Alcalase)	46
Şekil 7.3	50°C'de farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için TNBS yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri, E= % 0.15 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (◇ pH 6.5, Δ pH 7, ○ pH 7.5, ⌘ pH 8, — modeller).....	50
Şekil 7.4	50°C'de farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için OPA yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri, E= % 0.15 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (◇ pH 6.5, Δ pH 7, ○ pH 7.5, ⌘ pH 8, — modeller).....	51
Şekil 7.5	pH 7.5 değerinde farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için TNBS yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri, E= % 0.15 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (□ 40°C, Δ 50°C, ○ 60°C, — modeller)	52
Şekil 7.6	pH 7.5 değerinde farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için OPA yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri, E= % 0.15 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (□ 40°C, Δ 50°C, ○ 60°C, — modeller)	53
Şekil 7.7	Farklı substrat konsantrasyonları için zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, T= 50°C, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ 10 g protein/L, ■ 20 g protein/L, ▲ 30 g protein/L, ● 40 g protein/L, ⌘ 50	

	g protein/L, □ 60 g protein/L , — kinetik modeller)	56
Şekil 7.8	Farklı substrat konsantrasyonları için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, T= 50°C, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ 10 g protein/L, ■ 20 g protein/L, ▲ 30 g protein/L, ● 40 g protein/L, ж 50 g protein/L, □ 60 g protein/L, — kinetik modeller)	57
Şekil 7.9	Farklı substrat konsantrasyonları için hidroliz derecesi ile çözünürlük derecesinin değişimi T= 50°C, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ 10 g protein/L, ■ 20 g protein/L, ▲ 30 g protein/L, ● 40 g protein/L, ж 50 g protein/L, □ 60 g protein/L).....	58
Şekil 7.10	Farklı substrat konsantrasyonları için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, T= 50°C, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ 10 g protein/L, ■ 20 g protein/L, ▲ 30 g protein/L, ● 40 g protein/L, ж 50 g protein/L, □ 60 g protein/L , — kinetik model).....	59
Şekil 7.11	Enzim stabilitesi kontrol deneyleri için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, T= 50°C, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim) (▲ fosfat tamponda, ◆ 10 g protein/L substrat varlığında, ■ saf suda)	60
Şekil 7.12	% Hidroliz derecesi, % protein çözünürlüğü ve % enzim aktivite değerlerinin substrat konsantrasyonu ile değişimi, T= 50°C, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ hidroliz derecesi, ■ protein çözünürlüğü, Δ enzim aktivitesi) ..	61
Şekil 7.13	Farklı enzim miktarları için zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, T= 50°C, pH= 7, S= 30 g protein/L (◆ % 0.05 (hacim/hacim), ■ % 0.1 (hacim/hacim), ▲ % 0.15 (hacim/hacim), ● % 0.2 (hacim/hacim), ж % 0.25 (hacim/hacim), □ % 0.3 (hacim/hacim), Δ % 0.35 (hacim/hacim), — kinetik modeller).....	62
Şekil 7.14	Farklı enzim miktarları için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, T= 50°C, pH= 7, S= 30 g protein/L (◆ % 0.05 (hacim/hacim), ■ % 0.1 (hacim/hacim), ▲ % 0.15 (hacim/hacim), ● % 0.2 (hacim/hacim), ж % 0.25 (hacim/hacim), □ % 0.3 (hacim/hacim), Δ % 0.35 (hacim/hacim), — kinetik modeller).....	63
Şekil 7.15	Farklı enzim miktarları için hidroliz derecesi ile çözünürlük derecesinin değişimi, T= 50°C, pH= 7, S= 30 g protein/L (◆ % 0.05 (hacim/hacim), ■ % 0.1 (hacim/hacim), ▲ % 0.15 (hacim/hacim), ● % 0.2 (hacim/hacim), ж % 0.25 (hacim/hacim), □ % 0.3 (hacim/hacim), Δ % 0.35 (hacim/hacim)).....	64
Şekil 7.16	Farklı enzim miktarları için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, T= 50°C, pH= 7, S= 30 g protein/L (◆ % 0.05 (hacim/hacim),	

■ % 0.1 (hacim/hacim), ▲ % 0.15 (hacim/hacim), ● % 0.2 (hacim/hacim), Ж % 0.25 (hacim/hacim), □ % 0.3 (hacim/hacim), Δ % 0.35 (hacim/hacim), — kinetik modeller).....	65
Şekil 7.17 % Hidroliz derecesi, % protein çözünürlüğü ve % enzim aktivite değerlerinin enzim miktarı ile değişimi, T= 50°C, pH= 7, S= 30 g protein/L (◆ hidroliz derecesi, ■ protein çözünürlüğü, Δ enzim aktivitesi)	66
Şekil 7.18 Farklı sıcaklıklar için zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (◆ 40°C, ■ 45°C, ▲ 50°C, ● 55°C, Ж 60°C, □ 65°C, — kinetik modeller).....	67
Şekil 7.19 Farklı sıcaklıklar için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (◆ 40°C, ■ 45°C, ▲ 50°C, ● 55°C, Ж 60°C, □ 65°C, — kinetik modeller).....	68
Şekil 7.20 Farklı sıcaklıklar için hidroliz derecesi ile çözünürlük derecesinin değişimi, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (◆ 40°C, ■ 45°C, ▲ 50°C, ● 55°C, Ж 60°C, □ 65°C).....	69
Şekil 7.21 Farklı sıcaklıklar için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (◆ 40°C, ■ 45°C, ▲ 50°C, ● 55°C, Ж 60°C, □ 65°C, — kinetik modeller).....	70
Şekil 7.22 % Hidroliz derecesi, % protein çözünürlüğü ve % enzim aktivite değerlerinin sıcaklık ile değişimi, T= 50°C, pH= 7, S= 30 g protein/L (◆ hidroliz derecesi, ■ protein çözünürlüğü, Δ enzim aktivitesi)	71
Şekil 7.23 Farklı pH değerleri için zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, T=55°C, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (◆ pH 6.5, ■ pH 7, ▲ pH 7.5, ● pH 8, Ж pH 8.5, — kinetik modeller)	72
Şekil 7.24 Farklı pH değerleri için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, T=55°C, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (◆ pH 6.5, ■ pH 7, ▲ pH 7.5, ● pH 8, Ж pH 8.5, — kinetik modeller).....	73
Şekil 7.25 Farklı pH değerleri için hidroliz derecesi ile çözünürlük derecesinin değişimi, T=55°C, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (◆ pH 6.5, ■ pH 7, ▲ pH 7.5, ● pH 8, Ж pH 8.5)	74
Şekil 7.26 Farklı pH değerleri için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, T=55°C, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (◆ pH 6.5, ■ pH 7, ▲ pH 7.5, ● pH 8, Ж pH 8.5).....	75
Şekil 7.27 % Hidroliz derecesi, % protein çözünürlüğü ve % enzim aktivite değerlerinin pH ile değişimi, T= 55°C, pH= 7, S= 30 g protein/L (◆ hidroliz derecesi,	

■ protein çözünürlüğü, Δ enzim aktivitesi)	76
Şekil 7.28 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesi için zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, T=55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (\diamond % 0 (hacim/hacim), ■ % 25 (hacim/hacim), Δ % 50 (hacim/hacim), ● % 75 (hacim/hacim), ж % 100 (hacim/hacim))	80
Şekil 7.29 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesi için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (\diamond % 0 (hacim/hacim), ■ % 25 (hacim/hacim), Δ % 50 (hacim/hacim), ● % 75 (hacim/hacim), ж % 100 (hacim/hacim))	81
Şekil 7.30 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesi için hidroliz derecesi ile çözünürlük derecesinin değişimi, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (\diamond % 0 (hacim/hacim), ■ % 25 (hacim/hacim), Δ % 50 (hacim/hacim), ● % 75 (hacim/hacim), ж % 100 (hacim/hacim))	82
Şekil 7.31 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesi için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (\diamond % 0 (hacim/hacim), ■ % 25 (hacim/hacim), Δ % 50 (hacim/hacim), ● % 75 (hacim/hacim), ж % 100 (hacim/hacim))	83
Şekil 7.32 Kademeli enzim ilavesi için zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, T= 55°C, pH= 8, E _{toplam} = % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (● Tek kademedede: 0. dakikada 2.5 mL/L=7 AU/L enzim ilavesi, □ İki kademedede: 0. ve 20. dakikalarda 1.25 mL/L=3.5 AU/L enzim ilavesi, ▲ Dört kademedede: 0., 15., 30. ve 45. dakikalarda 0.625 mL/L=1.75 AU/L enzim ilavesi)	84
Şekil 7.33 Kademeli enzim ilavesi için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, T= 55°C, pH= 8, E _{toplam} = % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (● Tek kademedede: 0. dakikada 2.5 mL/L=7 AU/L enzim ilavesi, □ İki kademedede: 0. ve 20. dakikalarda 1.25 mL/L=3.5 AU/L enzim ilavesi, ▲ Dört kademedede: 0., 15., 30. ve 45. dakikalarda 0.625 mL/L=1.75 AU/L enzim ilavesi)	85
Şekil 7.34 Kademeli enzim ilavesi için zamana karşılık elde edilen enzim aktivite değerleri, T= 55°C, pH= 8, E _{toplam} = % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (● Tek kademedede: 0. dakikada 2.5 mL/L=7 AU/L enzim ilavesi, □ İki kademedede: 0. ve 20. dakikalarda 1.25 mL/L=3.5 AU/L enzim ilavesi, ▲ Dört kademedede: 0., 15., 30. ve 45. dakikalarda 0.625 mL/L=1.75 AU/L enzim ilavesi)	86

Şekil 7.35	Isıl ön işlemin glutenin yüzey yapısına etkisi	87
Şekil 7.36	Isıl ön işlem sonrası zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, T= 55°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 90°C'deki ısı ön işlem sonrası hidroliz, ▲ 100°C'deki ısı ön işlem sonrası hidroliz)	88
Şekil 7.37	Isıl ön işlem sonrası zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, T= 55°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 90°C'deki ısı ön işlem sonrası hidroliz, ▲ 100°C'deki ısı ön işlem sonrası hidroliz)	89
Şekil 7.38	Isıl ön işlem sonrası zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, T= 55°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 90°C'deki ısı ön işlem sonrası hidroliz, ▲ 100°C'deki ısı ön işlem sonrası hidroliz)	90
Şekil 7.39	Mikrodalga ön işleminin glutenin yüzey yapısına etkisi.....	91
Şekil 7.40	Mikrodalga ön işlemi sonrası zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, T= 55°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 540 W'lık mikrodalga ön işlemi sonrası hidroliz, ▲ 720 W'lık mikrodalga ön işlemi sonrası hidroliz)	92
Şekil 7.41	Mikrodalga ön işlemi sonrası zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, T= 55°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 540 W'lık mikrodalga ön işlemi sonrası hidroliz, ▲ 720 W'lık mikrodalga ön işlemi sonrası hidroliz.....	93
Şekil 7.42	Mikrodalga ön işlemi sonrası zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, T= 55°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 540 W'lık mikrodalga ön işlemi sonrası hidroliz, ▲ 720 W'lık mikrodalga ön işlemi sonrası hidroliz)	94
Şekil 7.43	Sonikasyon ön işleminin glutenin yüzey yapısına etkisi.....	95
Şekil 7.44	Sonikasyon ön işlemi sonrası zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, T= 55°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 80 W'lık sonikasyon ön işlemi sonrası hidroliz, ▲ 120 W'lık sonikasyon ön işlemi sonrası hidroliz).....	96
Şekil 7.45	Sonikasyon ön işlemi sonrası zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, T= 55°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 80 W'lık sonikasyon ön işlemi sonrası hidroliz, ▲ 120 W'lık sonikasyon ön işlemi sonrası hidroliz).....	97

Şekil 7.46	Sonikasyon ön işlemi sonrası zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, T= 55°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 80 W'lık sonikasyon ön işlemi sonrası hidroliz, ▲120 W'lık sonikasyon ön işlemi sonrası hidroliz).....	98
Şekil 7.47	Nişasta hidrolizi ön işleminin glutenin yüzey yapısına etkisi	100
Şekil 7.48	Nişasta hidrolizi ön işlemi sonrası zamana karşılık elde edilen protein hidroliz derecesi değerleri, T= 55°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ nişasta hidrolizi sonrası direkt kullanılan çözelti, ▲ nişasta hidrolizi sonrası yıkanarak kullanılan çözelti)	101
Şekil 7.49	Nişasta hidrolizi ön işlemi sonrası zamana karşılık elde edilen protein çözünürlük derecesi değerleri, T= 55°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ nişasta hidrolizi sonrası direkt kullanılan çözelti, ▲ nişasta hidrolizi sonrası yıkanarak kullanılan çözelti)	102
Şekil 7.50	Nişasta hidrolizi ön işlemi sonrası zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, T= 55°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ nişasta hidrolizi sonrası direkt kullanılan çözelti, ▲ nişasta hidrolizi sonrası yıkanarak kullanılan çözelti)	103
Şekil 7.51	Farklı akustik güç değerlerinde sonikasyon uygulaması ile gerçekleştirilen hidroliz deneyleri için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, T= 40°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol deneyi, □ 20 W, ▲100 W)	105
Şekil 7.52	Farklı akustik güç değerlerinde sonikasyon uygulaması ile gerçekleştirilen hidroliz deneyleri için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, T= 40°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol deneyi, □ 20 W, ▲100 W)	106
Şekil 7.53	Farklı % frekans değerlerinde sonikasyon uygulaması ile gerçekleştirilen hidroliz deneyleri için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, T= 40°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol deneyi, □ % 10, ▲% 80).....	107
Şekil 7.54	Farklı % frekans değerlerinde sonikasyon uygulaması ile gerçekleştirilen hidroliz deneyleri için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, T= 40°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol deneyi, □ % 10, ▲% 80)	108

Şekil 7.55	Enzim inaktivasyon sabitinin sıcaklıkla değişimi	115
Şekil 7.56	Michaelis-Menten denklemindeki kinetik parametrelerin grafik yöntemlerle eldesi	119
Şekil 7.57	Farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı değerleri, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, ✱ S= 50 g protein/L)	121
Şekil 7.58	Farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen çözünen protein konsantrasyonu değerleri, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, ✱ S= 50 g protein/L)	122
Şekil 7.59	Zamana karşı incelenen baz sarfiyatı verilerinden elde edilen hız değerleri için çizilen Lineweaver-Burke grafiği T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) ...	123
Şekil 7.60	Zamana karşı incelenen çözünen protein konsantrasyonu verilerinden elde edilen hız değerleri için çizilen Lineweaver-Burke grafiği T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim)	123
Şekil 7.61	40°C Sıcaklıkta farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı değerleri, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, ✱ S= 50 g protein/L)	125
Şekil 7.62	45°C Sıcaklıkta farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı değerleri, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, ✱ S= 50 g protein/L)	126
Şekil 7.63	50°C Sıcaklıkta farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı değerleri, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, ✱ S= 50 g protein/L)	127
Şekil 7.64	Farklı sıcaklık değerlerinde, mısır glutenin Alcalase enzimi ile hidrolizi için elde edilen Lineweaver-Burke grafikleri, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◇ 40°C, ▲ 45°C, ○ 50°C, ■ 55°C)	128
Şekil 7.65	pH 6.5 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı değerleri, T= 55°C, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, ✱ S= 50 g protein/L)	129

- Şekil 7.66 pH 7 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı değerleri, T= 55°C, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, ✖ S= 50 g protein/L) 130
- Şekil 7.67 pH 7.5 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı değerleri, T= 55°C, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, ✖ S= 50 g protein/L) 131
- Şekil 7.68 Farklı pH değerlerinde, mısır glutenin Alcalase enzimi ile hidrolizi için elde edilen Lineweaver-Burke grafikleri, T= 55°C, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◇ pH 6.5, ▲ pH 7, ○ pH 7.5, ■ pH 8) 132
- Şekil 7.69 Farklı inhibisyon türleri için Lineweaver-Burke grafikleri..... 134
- Şekil 7.70 Farklı substrat konsantrasyonlarında, reaksiyon çözeltisine % 15 (hacim/hacim) oranında hidrolizat ilavesi ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı değerleri, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, ✖ S= 50 g protein/L)..... 136
- Şekil 7.71 Farklı substrat konsantrasyonlarında, reaksiyon çözeltisine % 30 (hacim/hacim) oranında hidrolizat ilavesi ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı değerleri, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, ✖ S= 50 g protein/L) 137
- Şekil 7.72 Farklı substrat konsantrasyonlarında, reaksiyon çözeltisine % 45 (hacim/hacim) oranında hidrolizat ilavesi ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı değerleri, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, ✖ S= 50 g protein/L) 138
- Şekil 7.73 Farklı substrat konsantrasyonlarında, reaksiyon çözeltisine % 15 (hacim/hacim) oranında hidrolizat ilavesi ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen çözünen protein konsantrasyonu değerleri, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, ✖ S= 50 g protein/L) 139
- Şekil 7.74 Farklı substrat konsantrasyonlarında, reaksiyon çözeltisine % 30 (hacim/hacim) oranında hidrolizat ilavesi ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen çözünen protein konsantrasyonu değerleri, T= 55°C, pH= 8,

E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, ✖ S= 50 g protein/L).....	140
Şekil 7.75 Farklı substrat konsantrasyonlarında, reaksiyon çözeltisine % 45 (hacim/hacim) oranında hidrolizat ilavesi ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen çözünen protein konsantrasyonu değerleri, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, ✖ S= 50 g protein/L).....	141
Şekil 7.76 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesinde, zamana karşı incelenen baz sarfiyatı verilerinden elde edilen hız değerleri için çizilen Lineweaver-Burke grafikleri T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◇ kontrol, ▲ % 15 (hacim/hacim), ○ % 30 (hacim/hacim), ■ % 45 (hacim/hacim)).....	142
Şekil 7.77 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesinde, zamana karşı incelenen çözünen protein konsantrasyonu verilerinden elde edilen hız değerleri için çizilen Lineweaver-Burke grafikleri T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◇ kontrol, ▲ % 15 (hacim/hacim), ○ % 30 (hacim/hacim), ■ % 45 (hacim/hacim)).....	143
Şekil Ek5.1 Nişasta hidrolizi deneyi için zamana karşı elde edilen % hidroliz derecesi değerleri.....	171

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 3.1	Tahıl tohumlarının ortalama protein içerikleri (Lastity, 1984)	6
Çizelge 3.2	Baklagiller sınıfına giren bitki tohumlarının ortalama protein içerikleri (Sathe, 2002)	7
Çizelge 3.3	Mısır, mısır tohumu ve mısır gluteninin kimyasal içeriği (Shukla ve Cheryan, 2001)	10
Çizelge 6.1	Çalışmada kullanılan proteaz enzimlerinin özellikleri	29
Çizelge 6.2	Mısır glutenin amino asit kompozisyonu	30
Çizelge 6.3	Folin Lowry yöntemi için standart eğri verileri	39
Çizelge 6.4	Aktivite tayini için standart eğri verileri	42
Çizelge 7.1	Eşitlik 7.2'nin türetilişi (Adler-Nissen, 1986)	48
Çizelge 7.2	Eşitlik 7.3'ün türetilişi (Adler-Nissen, 1986)	49
Çizelge 7.3	50°C'de farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için TNBS yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri için elde edilen lineer modellere ait katsayılar ve istatistiksel değerler	50
Çizelge 7.4	50°C'de farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için OPA yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri için elde edilen lineer modellere ait katsayılar ve istatistiksel değerler	51
Çizelge 7.5	pH 7.5 değerinde farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için TNBS yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri için elde edilen lineer modellere ait katsayılar ve istatistiksel değerler	52
Çizelge 7.6	pH 7.5 değerinde farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için OPA yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri için elde edilen lineer modellere ait katsayılar ve istatistiksel değerler	53
Çizelge 7.7	50°C'de farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için Eşitlik 7.2 kullanılarak hesaplanan pK değerleri	54
Çizelge 7.8	pH 7.5 değerinde farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için Eşitlik 7.3 kullanılarak hesaplanan pK değerleri	54
Çizelge 7.9	Farklı substrat konsantrasyonlarında, 120 dakikalık işlem süresi sonunda elde edilen % hidroliz ve çözünürlük dereceleri, çözünen protein miktarları	

ve % enzim aktivite değerleri (T= 50°C, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim)) ...	60
Çizelge 7.10 Farklı enzim miktarlarında, 120 dakikalık işlem süresi sonunda elde edilen % hidroliz ve çözünürlük dereceleri, çözünen protein miktarları ve % enzim aktivite değerleri (T= 50°C, pH= 7, S= 30 g protein/L)	65
Çizelge 7.11 Farklı sıcaklık değerleri için, 120 dakikalık işlem süresi sonunda elde edilen % hidroliz ve çözünürlük dereceleri, çözünen protein miktarları ve % enzim aktivite değerleri (pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L).....	70
Çizelge 7.12 Farklı pH değerleri için, 120 dakikalık işlem süresi sonunda elde edilen % hidroliz ve çözünürlük dereceleri, çözünen protein miktarları ve % enzim aktivite değerleri (T= 55°C, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L).....	75
Çizelge 7.13 Optimum proses şartlarında elde edilen hidrolizat çözeltisinin amino asit kompozisyon analizi	77
Çizelge 7.14 Optimum proses şartlarında elde edilen verilerin, literatürde varolan verilerle karşılaştırılması	78
Çizelge 7.15 Ön işlem uygulaması ile gerçekleştirilen deneyler için elde edilen hidrolizat çözeltilerinin amino asit kompozisyonları	104
Çizelge 7.16 Sonikasyon altında gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu sonucunda elde edilen hidrolizat çözeltisinin amino asit kompozisyonu	109
Çizelge 7.17 Eşitlik 7.5 için elde edilen katsayılar, standart sapma (σ) ve R^2 istatistik değerleri	111
Çizelge 7.18 Eşitlik 7.7 ve 7.8 için elde edilen katsayılar, standart sapma (σ) ve R^2 istatistik değerler	114
Çizelge 7.19 Farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistik değerler, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim)	121
Çizelge 7.20 Farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen çözünen protein konsantrasyonu verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistik değerler, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim)	122
Çizelge 7.21 40°C Sıcaklıkta farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistik değerler, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim)	125
Çizelge 7.22 45°C Sıcaklıkta farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistik değerler, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim)	126

Çizelge 7.23	50°C Sıcaklıkta farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistik değerler, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim).....	127
Çizelge 7.24	Sıcaklık deneyleri için çizilen Lineweaver-Burke grafiklerden elde edilen kinetik parametreler ve grafiklere ait istatistiksel değerler.....	128
Çizelge 7.25	pH 6.5 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistik değerler, T= 55°C, E= % 0.25 (hacim/hacim).....	129
Çizelge 7.26	pH 7 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistik değerler, T= 55°C, E= % 0.25 (hacim/hacim).....	130
Çizelge 7.27	pH 7.5 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistik değerler, T= 55°C, E= % 0.25 (hacim/hacim).....	131
Çizelge 7.28	pH deneyleri için çizilen Lineweaver-Burke grafiklerden elde edilen kinetik parametreler ve grafiklere ait istatistiksel değerler.....	132
Çizelge 7.29	% 15 (hacim/hacim) hidrolizat ilavesi için, farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı verilerine uyan lineer modellere ait eğim ve istatistik değerler, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim).....	136
Çizelge 7.30	% 30 (hacim/hacim) hidrolizat ilavesi için, farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı verilerine uyan lineer modellere ait eğim ve istatistik değerler, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim).....	137
Çizelge 7.31	% 45 (hacim/hacim) hidrolizat ilavesi için, farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı verilerine uyan lineer modellere ait eğim ve istatistik değerler, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim).....	138
Çizelge 7.32	% 15 (hacim/hacim) hidrolizat ilavesi için, farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen çözünen protein konsantrasyonu verilerine uyan lineer modellere ait eğim ve istatistik değerler, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim).....	139
Çizelge 7.33	% 30 (hacim/hacim) hidrolizat ilavesi için, farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen çözünen protein konsantrasyonu verilerine uyan lineer modellere ait eğim ve istatistik	

değerler, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim).....	140
Çizelge 7.34 % 45 (hacim/hacim) hidrolizat ilavesi için, farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen çözünen protein konsantrasyonu verilerine uyan lineer modellere ait eğim ve istatistik değerler, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim).....	141
Çizelge 7.35 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesinde, zamana karşı incelenen baz sarfiyatı verilerinden elde edilen hız değerleri için çizilen Lineweaver-Burke grafiklerden hesaplanan kinetik parametreler ve grafiklere ait istatistiksel değerler	142
Çizelge 7.36 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesinde, zamana karşı incelenen çözünen protein konsantrasyonu verilerinden elde edilen hız değerleri için çizilen Lineweaver-Burke grafiklerden hesaplanan kinetik parametreler ve grafiklere ait istatistiksel değerler.....	143
Çizelge 7.37 Kinetik verilerin literatürde varolan verilerle karşılaştırılması	144
Çizelge Ek 1.1 Baz sarfiyatı verilerinden hesaplanan hidroliz derecesi değerleri	161
Çizelge Ek 2.1 Örnek deney için, ortalama baz sarfiyatı verileri, TNBS ve OPA analizleri sonucunda elde edilen ortalama absorbans değerleri, hesaplanan baz sarfiyatı, lösin amino ve serin amino eşdeğerleri.....	163
Çizelge Ek 3.1 Örnek deney için Folin Lowry yöntemi analizi sonucunda elde edilen veriler kullanılarak hesaplanan protein çözünürlük derecesi değerleri.....	166
Çizelge Ek 4.1 Örnek deney için enzim aktivite tayini sonucunda hesaplanan % aktivite değerleri	168

ÖNSÖZ

Tez çalışmam sırasında kıymetli fikir ve önerileri ile beni yönlendiren, yardımlarını esirgemeyen ve sonsuz destekleri ile beni onurlandıran, Tez Danışmanım Sayın Prof. Dr. Belma KIN ÖZBEK'e,

Eğitimime katkısı bulunan tüm saygıdeğer Öğretim Üyelerine,

Sevgiyi ve hayatı öğreten ilk öğretmenim, eğitimime en büyük destekcim, şu an hayatta olmayan ancak her an beni izlediğini bildiğim babam Niyazi KILIÇ'a,

Hayatımın hiçbir aşamasında sevgisini, ilgisini ve şevkatini esirgemeyen, kayıtsız şartsız destekcim, biricik annem Mediha KILIÇ'a,

Hayatımın en güzel dönemlerini paylaştığım sevgili kardeşlerim Melek, Ahmet ve Mehmet'e,

Sevgili eşim ve en iyi arkadaşım Işıltan APAR'a ve tüm sevdiklerime,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Dilek KILIÇ APAR

ÖZET

Son yıllarda, hayvansal kaynaklı proteinlere alternatif olan bitkisel kaynaklı proteinlerin modifiye edilerek gıda katkısı olarak kullanımı önem kazanmıştır. Yaklaşık olarak % 60 oranında protein içeren mısır gluteni, nişasta üretimi sırasında yan ürün olarak ortaya çıkmaktadır. Günümüzde, daha çok hayvan yemi olarak kullanılan mısır gluteninin, gıda katkısı olarak kullanılabilmesinde en büyük dezavantajı çözünürlüğünün çok düşük olmasıdır. Ancak bu dezavantaj proteinin modifiye edilmesi ile ortadan kaldırılabilir. Mısır proteininin gıda katkısı olarak kullanımını geliştirmek amacı ile bu çalışmada, mısır glutenin enzimatik hidrolizi, kapsamlı bir biçimde incelenmiştir.

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda; öncelikle beş farklı ticari enzim (Alcalase, Neutrase, Protamex, Flavourzyme ve PTN) kullanılmış ve bunların arasından mısır glutenin hidrolizi için en uygun enzimin Alcalase olduğu belirlenmiştir. Daha sonra, hidroliz derecesini belirlemek için kullanılan pH-stat yöntemi mısır glutenin Alcalase enzimi ile hidrolizi için kalibre edilmiş ve mısır gluteni hidrolizatları için pK değerleri; 40°C, 50°C ve 60°C sıcaklıklarda sırasıyla 6.82, 6.60 ve 6.37 olarak bulunmuştur. Kesikli sistemde, hidroliz parametrelerinin optimizasyonu için, farklı substrat konsantrasyonlarında (10-60 g protein/L), enzim konsantrasyonlarında (% 0.05-0.35 (hacim/hacim)), sıcaklık (40-65°C) ve pH (6.5-8.5) değerlerinde deneyler gerçekleştirilerek hidroliz derecesi, protein çözünürlüğü ve enzim stabilitesi zamana karşı incelenmiştir. Farklı proses şartlarında gerçekleştirilen bu deneyler sonucunda hidroliz için optimum proses şartları; substrat konsantrasyonu 30 g protein/L, enzim miktarı % 0.25 (hacim/hacim), sıcaklık 55°C ve pH 8 olarak belirlenmiştir. Optimum proses şartlarında, 120 dakika süreyle gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu sonucunda, % 28.4 hidroliz derecesi, % 85.3 protein çözünürlüğü elde edilmiş ve enzimin aktivitesini yaklaşık % 74 oranında kaybettiği saptanmıştır. Çalışmada; hidroliz ürünlerinin, kademeli enzim ilavesinin ve glutene uygulanan; ısı, mikrodalga, sonik ve nişasta hidrolizi ön işlemlerinin hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkileri ayrıca incelenmiştir. Ultrasonikasyon uygulaması ile gerçekleştirilen hidroliz deneyleri ile, sonikasyon parametrelerinin hidroliz reaksiyonu ve enzim stabilitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Optimizasyon deneyleri sonucunda elde edilen tüm veriler analiz edilerek; hidroliz, çözünürlük ve enzim inaktivasyonu için kinetik modeller elde edilmiş, mısır gluteninin hidrolizinin Michaelis-Menten Kinetiğine uygunluğu, başlangıç hız deneyleri gerçekleştirilerek ayrıca incelenmiştir. Hidroliz reaksiyonu için Michaelis-Menten kinetik parametreleri; $K_m = 53.77$ g/L, $V_{max} = 5.94$ mmol/L.dak olarak elde edilmiş, ayrıca bu parametrelerin sıcaklık ve pH ile değişimi incelenmiştir. Alcalase enzimi için ürün inhibisyon türünün unkompetitiv olduğu belirlenmiş ve inhibisyon sabiti $K_i = 44.68$ (hidrolizat hacmi/reaksiyon çözeltisi hacmi) olarak hesaplanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Mısır gluteni, Alcalase, enzimatik hidroliz, proses değişkenleri, optimizasyon, kinetik

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CORN GLUTEN: OPTIMIZATION OF PROCESS PARAMETERS, HYDROLYSIS, SOLUBILIZATION AND ENZYME INACTIVATION KINETICS

ABSTRACT

Over the last decade, modified plant proteins as an alternative to proteins from animal sources are increasingly being used as food additives. Corn gluten which contains approximately 60 % proteins is a by-product from the production of starch from maize. Currently, its main use is as an animal feed. The major drawback of using corn gluten in foods is that it is very insoluble in water. However, its solubility can be increased by modification. In the present work, a comprehensive study on the hydrolysis of corn gluten was performed to improve its utilization in food products.

In the present study, firstly, a general survey of enzymatic hydrolysis and solubilization of corn gluten was performed with five commercial enzyme preparations (Alcalase, Neutrase, Flavourzyme, Protamex and PTN) in order to choose appropriate enzyme; and as a result Alcalase was chosen as proper enzyme among them. Then, the calibration of pH-stat for corn gluten hydrolysis by Alcalase was performed and the pK values of the corn gluten hydrolysates were determined as 6.82, 6.60 and 6.37 for the temperatures of 40°C, 50°C and 60°C respectively. For optimization of the process parameters, hydrolysis reactions were performed at different substrate concentrations (10-60 g protein/L), enzyme concentrations (0.05-0.35 % (v/v)), temperatures (40-65°C) and pH values (6.5-8.5); and the degree of hydrolysis, solubility of corn gluten and residual enzyme activity were investigated depending on processing time. The optimum process conditions for hydrolysis and solubilization were obtained as 30 g/L substrate concentration, 0.25 % (v/v) enzyme concentration, 55°C and pH 8. Under these conditions, the values of degree of hydrolysis and solubilization were found as 28.4 % and 85.3 % respectively; and enzyme lost its activity by 74 % at the end of 120 min processing time. The effect of hydrolysis products and pretreatments applied to substrate; such as thermal treatment, microwave irradiation, sonic treatment and starch removal; on hydrolysis were also investigated. Hydrolysis experiments under ultrasonication were performed in order to investigate the effects of sonication parameters on hydrolysis and enzyme stability.

Modelling studies were performed to determine the kinetics of hydrolysis, solubilization and enzyme inactivation. The Michaelis-Menten kinetics was examined with initial rate assays, and the kinetic parameters, K_m and V_{max} were estimated as 53.77 g/L and 5.94 mmol/L.min. The effects of temperature and pH on Michaelis-Menten parameters were also examined. The type of inhibition for Alcalase determined as uncompetitive; and the inhibition constant, K_i , was estimated as 44.68 % (hydrolysate /substrate mixture; v/v).

Key Words: Corn gluten, Alcalase, enzymatic hydrolysis, process parameters, optimisation, kinetics

1. GİRİŞ

Proteinler; büyüme ve yaşamsal faaliyetlerin sürdürülebilmesi için gerekli olan enerji ve aminoasit kaynağı oldukları için besinsel olarak, yiyeceklere benzersiz özellikler kazandırdıkları için de fonksiyonel olarak temel gıda bileşenleridir.

Proteinlerin besinsel ve fonksiyonel özellikleri, protein hidrolizi ile modifiye edilebilir. Modifiye edilmiş proteinler gıdaların; çözünürlük, yağ ve su bağlanma kapasitesi, viskozite, emülsifiye olma ve köpürme gibi fonksiyonel özelliklerini geliştirmek için gıda katkı maddeleri olarak; veya kanser, akut ve kronik karaciğer rahatsızlığı, bağırsak iltihabı, kısa bağırsak sendromu, fenilketonüri, crohn hastalığı, ülseratif kolit, pankreas iltihabı, besin alerjisi gibi hastalıklarda medikal amaçlı kullanılmak üzere üretilen besinlerde, ayrıca protein takviyesi sağlamak amacı ile yaşlılar ve sporcular için özel olarak üretilen gıdalarda ve kilo-kontrol diyetlerinde kullanılabilirler (Giese, 1994; Schimidl vd., 1994; Frokjaer, 1994; Clemente, 2000; Kim vd., 2004a; Karamac vd., 2002).

Proteinler, peptid bağlarının parçalanması sonucunda, bozunarak farklı boyutlarda peptidlere ve serbest amino asitlere dönüşürler. Hidroliz olarak adlandırılan bu bozunma; enzimatik, asidik ve bazik olarak gerçekleştirilebilir. Asidik ve bazik hidrolizin kontrolü zordur ve elde edilen ürünün besinsel değeri düşüktür. Kimyasal hidroliz sonucu istenmeyen yan ürünler ve toksit maddeler oluşabilir. Asidik ve alkali hidrolizin tersine, enzimatik hidroliz daha ılımlı proses şartlarında (pH 6-8, 40-60°C) gerçekleşir ve yan reaksiyonları minimize eder. Enzimatik hidroliz sonucu elde edilen ürünlerde aminoasit kompozisyonu ham ürününki ile benzerdir. Ayrıca elde edilen hidrolizat nötralize edildiğinde daha az tuz içerir. Enzimatik hidrolizde son ürünün fonksiyonel özellikleri spesifik enzim seçimi ve reaksiyon koşullarının belirlenmesi ile kontrol edilebilir. Reaksiyon sonucunu etkileyen parametreler; sıcaklık, pH, enzim-substrat oranı ve reaksiyon süresidir (Adler-Nissen, 1976; Adler-Nissen, 1986; Clemente, 2000; Drago ve Gonzalez, 2001; Kim vd., 2004a).

Beslenme amaçlı olarak geliştirilen protein hidrolizatlarının eldesi için daha çok hayvansal kaynaklı proteinler kullanılmıştır. Hayvansal kaynaklar içinde en önemli protein kaynağı, besin değeri açısından ve ticari olarak eldesi kolay olduğu için süttür. Hidroliz için genellikle süt proteini olarak kazein ve peynir altı suyu kullanılır (Clemente, 2000). Protein eldesi için kullanılan diğer hayvansal kaynaklar et, kollajen, jelatin, balık ve yumurtadır (Adler-Nissen, 1986; Giese, 1994). Ancak son zamanlarda hayvansal kaynaklı proteinlere alternatif olarak bitkisel kaynaklı proteinlerin kullanımı giderek artış göstermektedir (Friedman, 1996;

Clemente, 2000). Bitkisel protein kaynakları arasında en çok soya proteinin hidrolizi üzerine çalışmalar (Adler-Nissen, 1978a; Adler-Nissen, 1978b; Constantinides ve Adu-Amankwa, 1980; Adler-Nissen, 1986; Don vd., 1991; Achouri vd., 1998; Wu vd., 1998; Lee vd., 2001; Jung vd., 2004; Surowka ve Zmudzinski, 2004; Chiang vd., 2006; Lamsal vd., 2006; Lamsal vd., 2007) gerçekleştirilmiştir. Soyanın yanı sıra; bezelye (Moreno ve Cuadrado, 1993; Karamac vd., 1998; Periago vd., 1998; Soral-Smietana vd., 1998; Sijtsma vd., 1998; Soral-Smietana vd., 1999; Karamac vd., 2002), nohut (Marquez ve Fernandez, 2002), bakla (Raymundo vd., 1998; Lqari vd., 2005) ve buğday (Bombara vd., 1997; Nouri vd., 1997; Drago ve Gonzalez, 2001; Popineau vd., 2002; Wang vd., 2006; Kong vd., 2007a; Kong vd., 2007b; Wang vd., 2007a; Wang vd., 2007b) üzerlerinde gerçekleştirilen çalışmalarla dikkat çeken bitkisel protein kaynakları arasında yer almaktadır.

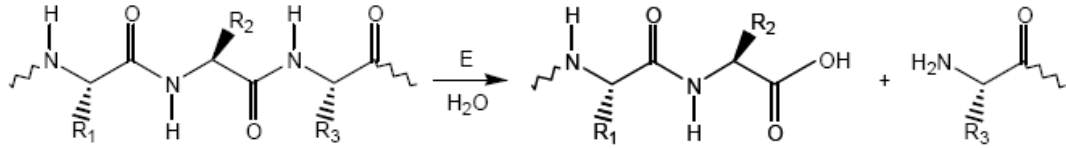
Yaklaşık olarak % 60 oranında protein içeren mısır gluteni, nişasta üretimi sırasında yan ürün olarak ortaya çıkmaktadır (Hardwick ve Glatz, 1989; Adler-Nissen, 1986). Daha çok hayvan yemi olarak kullanılan mısır glutenin, gıda katkısı olarak kullanılabilmesi için en büyük dezavantajı çözünürlüğünün çok düşük olmasıdır (Hardwick ve Glatz, 1989). Ancak bu dezavantaj proteinin modifiye edilmesi ile ortadan kaldırılabilir. Literatürde mısır proteinin hidrolizi üzerine çok sınırlı çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Adler-Nissen, 1977; Hardwick ve Glatz, 1989; Mannheim ve Cheryan, 1992; Briones-Martinez vd., 1997; Suh vd., 2000-2003; Kim vd., 2004a-b; Zheng vd., 2006). Mısır nişastası üretiminin yılda yaklaşık 100000 ton olduğu ülkemizde, yılda yaklaşık 23000 ton mısır proteini üretilmektedir [1]. Bu nedenle bu çalışmada, protein kaynağı olarak mısır gluteni seçilmiş ve mısır glutenin enzimatik hidrolizi, kapsamlı bir biçimde incelenmiştir.

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda; öncelikle beş farklı ticari enzim (Alcalase, Neutrase, Protamex, Flavourzyme ve PTN) kullanılmış ve bunların arasından mısır glutenin hidrolizi için en uygun enzimin Alcalase olduğu belirlenmiştir. Daha sonra, hidroliz derecesini belirlemek için kullanılan pH-stat yöntemi mısır glutenin Alcalase enzimi ile hidrolizi için kalibre edilerek hidroliz parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmada hidroliz ürünlerinin, kademeli enzim ilavesinin ve glutene uygulanan; ısı, mikrodalga, sonik ve nişasta hidrolizi ön işlemlerinin hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkileri ayrıca incelenmiştir. Hidroliz reaksiyonu ultrasonik ortamda da gerçekleştirilerek, sonikasyon parametrelerinin hidroliz reaksiyonu ve enzim stabilitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Kesikli sistemde gerçekleştirilen optimizasyon deneyleri sonucunda elde edilen tüm veriler analiz edilerek; hidroliz, çözünürlük ve enzim inaktivasyonu için kinetik modeller elde

edilmiştir. Mısır gluteninin hidrolizinin Michaelis-Menten kinetiğine uygunluğu, başlangıç hız deneyleri gerçekleştirilerek ayrıca incelemiş, reaksiyon için Michaelis-Menten kinetik parametreleri ile bu parametrelerin sıcaklık ve pH ile değişimi ve Alcalase enzimi için ürün inhibisyon türü belirlenmiştir.

2. PROTEİN HİDROLİZİ

Protein, peptit bağları ile birleşmiş amino grupları içeren uzun bir polimer zinciridir. Amino grupları arasındaki bağları sulu ortamda kırarak, proteini daha kısa parçalara ayırma işlemi hidrolitik bozunma veya hidroliz olarak isimlendirilir. Hidroliz reaksiyonu sırasında amid bağları kırılır ve su molekülünün eklenmesi ile peptitler ve/veya serbest amino asitler açığa çıkar (Şekil 2.1) (Adler-Nissen, 1993).

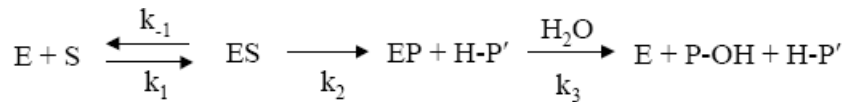


R₁, R₂ ve R₃: amino asit grupları, **E**: enzim

Şekil 2.1 Protein hidrolizi (Van der Ven C., 2002)

Proteinlerin enzimatik hidrolizi proteaz enzimleri tarafından katalizlenir. Genel olarak proteaz enzimleri tarafından katalizlenen protein hidrolizi üç ardışık reaksiyon sonucu gerçekleşir (Şekil 2.2) (Adler-Nissen, 1986);

- (1) Peptit zinciri (substrat) ve enzim arasında enzim-substrat kompleksinin oluşması
- (2) Peptit bağının kırılması ile oluşan iki yeni peptitten birinin açığa çıkması
- (3) İkinci peptit ve enzim kompleksine su molekülleri tarafından yapılan nükleofilik atak sonucunda ikinci peptit ve enzimin serbest kalması



E: enzim, S: substrat, ES: enzim substrat kompleksi, **P** ve **P'**: açığa çıkan peptitler,

k₋₁, k₁, k₂, k₃: reaksiyon hız sabitleri

Şekil 2.2 Proteaz enzimi tarafından katalizlenen hidroliz reaksiyonu (Adler-Nissen, 1986)

Hidroliz reaksiyonu sırasında kırılan peptit bağ sayısı, proteaz enziminin katalitik verimini ve reaksiyonun ilerleme derecesini gösterir. Hidroliz işlemi sırasında kırılan peptit bağ sayısı hidroliz eşdeğeri (h) olarak isimlendirilir; ve g protein başına eşdeğer mol miktarı olarak (eqv/g protein) ifade edilir.

Hidroliz eşdeğeri serbest amino gruplarında meydana gelen artışın belirlenmesi ile ölçölür. Serbest amino gruplarının konsantrasyonunu belirlemek amacıyla kullanılan biręok yöntem mevcuttur. Bunlar arasında günümüzde kabul görmüş ve enęok kullanılan yöntem trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) yöntemidir (Bkz. Bölüm 6.5) (Adler-Nissen, 1986).

Herhangi bir protein için toplam peptit bağ sayısı h_{top} (eqv/g protein) olarak gösterilirse hidroliz reaksiyonunun ilerlemesi diğer bir deyişle hidroliz derecesi;

$$HD = \frac{h}{h_{top}} \times 100\% \quad (2.1)$$

olarak ifade edilebilir. h_{top} değeri proteinin amino asit kompozisyonundan, temel amino asitlerin g protein başına mol sayıları toplanarak hesaplanabilir (Adler-Nissen, 1986).

3. BİTKİSEL PROTEİN KAYNAKLARI

Bitkisel gıdalar beslenmemizde önemli yer tutmaktadır. Besinler yolu ile alınan enerjinin yaklaşık % 80'i ve proteinlerin % 65'i bitkisel gıdalardan sağlanır (Sathe, 2002).

Bitkisel proteinler daha çok tohum (çekirdek) içeren bitkilerden sağlanır. Bu bazda bitkisel protein kaynakları tahıllar ve baklagiller olmak üzere iki ana sınıfa ayrılabilir. Tahıl çekirdekleri yaklaşık % 10-15, baklagil sınıfına giren bitki çekirdekleri ise yaklaşık % 20-40 oranında protein içerir. Baklagiller protein bakımından tahıllara göre daha zengindirler, ancak dünya çapında tahıl üretimi baklagillere göre daha fazla olduğundan, tahıllardan baklagillere göre üç kat daha fazla protein sağlanır (Larkins vd., 1993; Shewry ve Halford, 2002). Çizelge 3.1 ve 3.2'de tahıl ve baklagiller sınıfına giren çekirdek (tohum) bitkileri ve bu bitkilerin protein içerikleri verilmiştir. Tahıl ve baklagillerin dışında protein kaynağı olarak kullanılan diğer bitkiler; pamuk tohumu, susam, ay çekirdeği ve kolza tohumu olarak sıralanabilir (Adler Nissen, 1986).

Çizelge 3.1 Tahıl tohumlarının ortalama protein içerikleri (Lastity, 1984)

Tahıl	% Protein (kuru madde)
Buğday	12.2
Çavdar	11.6
Arpa	10.9
Yulaf	11.3
Mısır	10.2
Darı	10.3
Sorgum	11.0
Pirinç	8.1

Çizelge 3.2 Baklagiller sınıfına giren bitki tohumlarının ortalama protein içerikleri (Sathe, 2002)

Baklagiller	% Protein (kuru madde)
Fasulye (genel)	17.5-28.7
Barbunya	26.3-31.3
Börülce	18.3-35.0
Soya	31.2-52.9
Bakla	20.3-41.0
Acı bakla	34.0-43.0
Bezelye	23.5
Nohut	12.4-30.6
Mercimek	21.7-31.4
Yer fıstığı	25.4-33.8

Bitkisel proteinleri tanımlamak ve sınıflandırmak için çok çeşitli kriterler kullanılmıştır. Konuyla ilgili çalışan ilk araştırmacılar (Osborne, 1924; Mandal ve Mandal, 2000; Shewry vd., 2002 tarafından kaynak gösterilmiştir) sınıflandırmalarını proteinlerin bazı çözücüler içinde çözünürlüğüne dayalı olarak yapmışlardır. Hala geçerliliğini koruyan ve yaygın olarak kullanılan bu sınıflandırmaya göre bitkisel proteinler dört ana gruba ayrılır:

1. Suda çözünen, albüminler
2. Seyreltik tuzda çözünen, globülinler
3. Alkol-su karışımında çözünen, prolaminler
4. Seyreltik asit veya alkali ortamda çözünen, glutelinler

Baklagiller sınıfının ana proteinleri tuzda çözünen globülin proteinleridir. Tahıllar da az miktarda globülin içerir; ancak ana proteinleri alkol-su karışımında çözünen prolaminlerdir (Larkins vd., 1993). Tahıl proteinleri sülfür içeren amino asitler (metiyonin, sistein) bakımından zengin lizin bakımından fakirdirler. Baklagil proteinleri ise lizin bakımından zengin, sülfür içeren aminoasitler bakımından fakirdirler (Larkins vd., 1993; Shewry ve Halford, 2002).

3.1 Mısır Gluteni

Mısır gluteni, nişasta üretimi için, mısırın ıslak öğütme işlemi sırasında yan ürün olarak elde edilen değerli bir fonksiyonel proteindir. Şekil 3.1'de akış diyagramı sunulan mısırın ıslak öğütme işlemi başlıca dört aşama içerir.

İlk aşamada, mısır koçanından ayrıldıktan ve yabancı maddeler uzaklaştırıldıktan sonra, mısır taneleri su ve sülfür dioksit ile ıslatılarak (35- 47°C'de, 24-36 saat) şişirilir. Bu işlem sırasında mısırın temel besin içeriğinin büyük bir kısmı suya geçer. İşlem sonunda, süzülerek ayrılan çözelti kısmı mısır suyu olarak konsantre edilir.

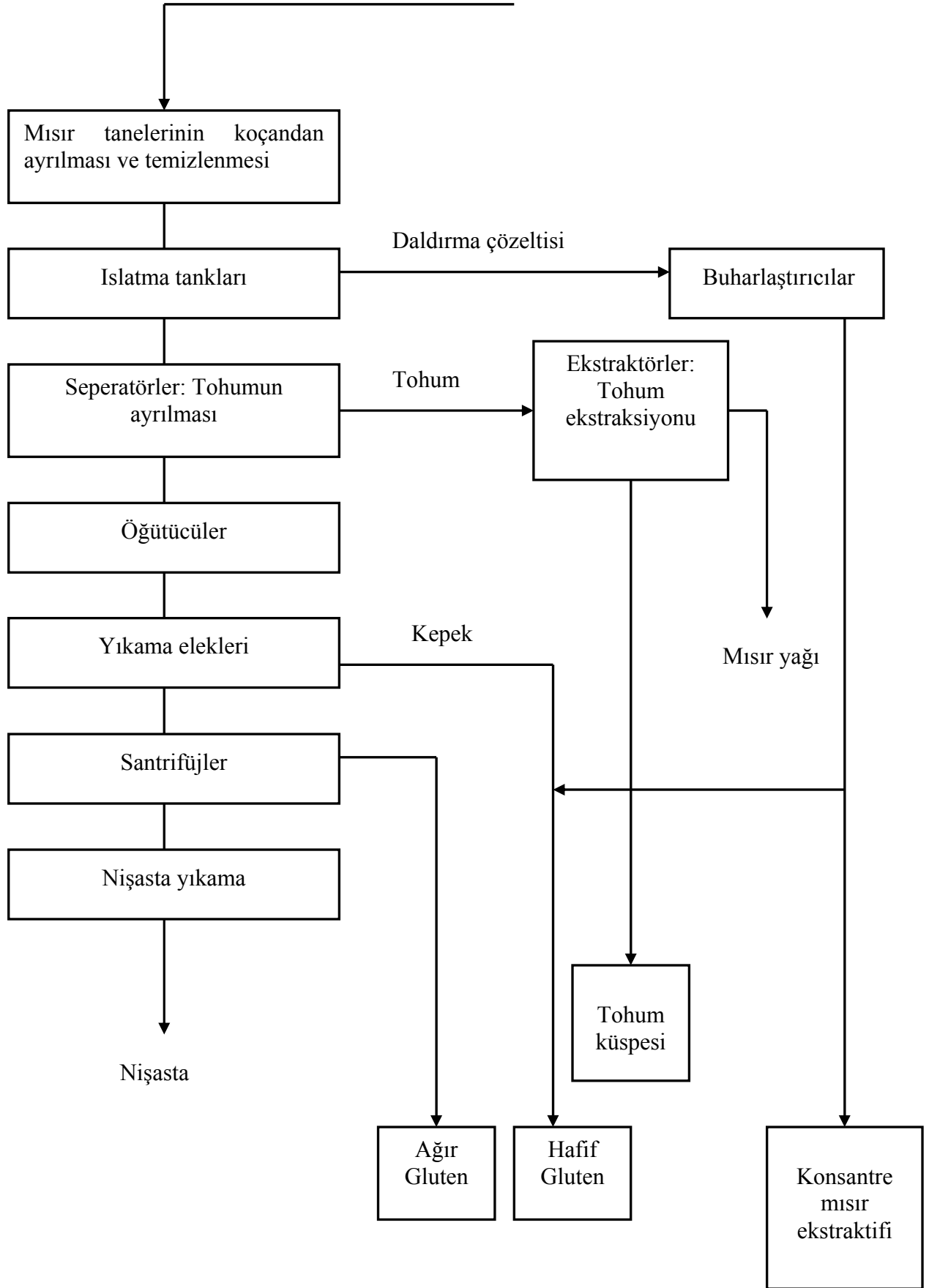
İkinci aşamada, siklon seperatörler kullanılarak, düşük yoğunluktaki tohum kısmı ayrılır. Yaklaşık olarak % 85 yağ içeren bu kısım eleklerle alınarak nişastayı uzaklaştırmak için yıkanır. Daha sonra, mekanik işlem ve çözücüler ile yağ tohumdan ayrılır, filtre edilerek son haline getirilir. Geriye kalan tohum artıkları hayvan yemi katkısı olarak kullanılır.

Üçüncü aşamada, çekirdeğinden ayrılan mısır hamuru öğütülerek kepek (lif), nişasta ve protein karışımından ayrılır. Ayrılan nişasta-protein karışımı nişasta seperatörlerine gönderilir. Lif kısmı (kepek) mısır suyu ile sulandırıldıktan sonra hayvan yemi olarak satılır.

Son aşamada, nişasta ve protein birbirinden santrifüjlenerek ayrılır. Geriye kalan nişasta fraksiyonu % 1-2 protein ihtiva eder. Bu nedenle bir seri yıkama işleminden daha geçirildikten sonra, % 99.5 saflıkta nişasta elde edilir (Shukla ve Cheryan, 2001; Thompson vd., 2006; [2; 3]). Mısır ve mısırdan elde edilen tohum ve glutenin içerdiği ana bileşenler Çizelge 3.3'de sunulmuştur.

Mısır glutenin karakteristik özelliklerine bakıldığında; sülfür içeren amino asitler (metiyonin, sistein) bakımından zengin, lizin bakımından fakir bir protein kaynağıdır. Diğer tahıllara göre kepek oranı düşüktür. Bitkisel protein kaynağı olarak en fazla araştırma konusu olmuş soya tohumlarının aksine proteinin parçalanmasını engelleyen inhibitörler içermemektedir. Sarı renktedir. Antioksidan vitamin grubuna ait beta-karoten bakımından zengindir [4].

Mısır



Şekil 3.1 Mısırın ıslak öğütme işlemi için akış diyagramı [3]

Çizelge 3.3 Mısır, mısır tohumu ve mısır gluteninin kimyasal içeriği (Shukla ve Cheryan, 2001)

Bileşen	Mısır (%)	% Kuru madde miktarı		
		Tohum	Hafif gluten	Ağır gluten
Nişasta	62.0	8.3	27	20
Protein	7.8	18.4	23	65
Yağ	3.8	33.2	2.4	4
Kül	1.2	10.5	1	1
Diğerleri*	10.2	29.6	46	10
Su	15.0	-	-	-

*Kepek, azot, pentozanlar, fitalik asit, çözümlü şeker, sarı renk pigmenti (xanthophylls)

Günümüzde mısır gluteninin başlıca kullanım alanı yem sanaiidir. Yem katkı maddesi olarak kümes ve büyükbaş hayvan beslemeciliğinde, ayrıca protein kaynağı olarak köpek mamalarında kullanılmaktadır [1; 5]. 1991 yılında mısır glutenin yabancı bitkilerin büyümesini engellediği Iowa State Üniversitesi tarafından kanıtlanmış ve doğal herbisit olarak 1991 yılında patent almıştır (Christians, 1991). 1994 yılında alınan yeni bir patente (Christians vd., 1994) ise, mısır gluteni hidrolizatlarının kendisinden daha aktif herbisit olduğu kanıtlanmıştır [5; 6]. Birçok bitkisel protein gıda katkısı olarak kullanılmaktadır. Mısır gluteninin, gıda katkısı olarak kullanılabilmesi için en büyük dezavantajı çözünürlüğünün çok düşük olmasıdır. Ancak bu dezavantaj proteinin modifiye edilmesi ile ortadan kaldırılabilir (Hardwick ve Glatz, 1989).

4. PROTEOLİTİK ENZİMLER

Proteolitik enzimler, proteinlerdeki peptit bağlarının parçalanmasını katalizleyerek proteinleri farklı moleküler boyuta peptit ve serbest aminoasitlere dönüştürürler (Rao vd., 1998; Clemente, 2000). Kaynaklarına göre; bitkisel, hayvansal, ve mikrobiyal olmak üzere üç sınıfa, etki mekanizmalarına göre endo-peptidazlar ve exo-peptidazlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar (Adler-Nissen, 1986).

4.1 Proteolitik Enzimlerin Kaynaklarına göre Sınıflandırılması

4.1.1 Bitkisel proteazlar

Bitkilerden proteaz elde edilmesi; tarım için alan sağlanabilmesi, iklimsel şartların uygunluğu gibi birçok faktöre bağlı olmakla beraber, çok fazla zaman gerektiren bir prosestir. En çok bilinen bitki kökenli proteazlar; papain, bromealin ve keretinazdır (Rao vd., 1998).

Papain

Kullanımı çok eskiye dayalı olan bitkisel bir proteazdır. Batı ve Orta Afrika ile Hindistan da tropikal iklime yakın iklim özellikleri gösteren bölgelerde yetişen *Carica papaya* meyvesinin öz suyundan ekstrakte edilir. Enzimin performansı, bitkinin kaynağına, yetiştiği yerin iklimsel koşullarına ve enzim eldesinde kullanılan ekstraksiyon ve saflaştırma yöntemlerine bağlı olarak farklılık gösterir. Enzim pH 5-9 aralığında aktiftir, ve substrat varlığında 80 veya 90°C'ye kadar stabildir. Endüstriyel olarak yüksek çözünürlükte ve tatlandırıcı (aroma verici) protein hidrolizatlarının elde edilmesinde kullanılır (Baeza vd., 1990; Rao vd., 1998).

Bromelain

Ananas suyu veya gövdesinden elde edilir. Enzim sistein proteaz olarak karakterize edilir. pH 5-9 aralığında aktiftir, inaktivasyon sıcaklığı 70°C'dir (Rao vd., 1998; Hemavathi vd., 2007).

Keretinaz

Bazı botanik bitki grupları, saç-tüy hidroliz eden bu proteazı üretir. Tüy ve yünün parçalanması, lizin gibi temel aminoasitlerin eldesi için önemlidir (Rao vd., 1998).

4.1.2 Hayvansal proteazlar

En çok bilinen hayvansal kaynaklı proteazlar; tripsin, chymotripsin, pepsin ve rennindir. Bu enzimler saf olarak büyük miktarlarda elde edilirler. Ancak üretimleri, kesim için hayvanların elde edilebilirliğine, politik ve zirai düzenlemelere bağlıdır (Rao vd., 1998).

Tripsin

Bağırsaktan elde edilen sindirim enzimidir. Serin proteazıdır. Karboksil gruplarını lizin ve arginin moleküllerine bağlayan peptitleri hidroliz eder (Rao vd., 1998).

Chymotripsin

Pankreatik eksraktlarda bulunur. Saf chymotripsin oldukça pahalı bir enzimdir ve yalnızca diagnostik (tanısal) ve analitik uygulamalarda kullanılır. Karboksil gruplarının fenilalanin, tirozin veya triptofan moleküllerinden herhangi birine bağlandığı peptitleri hidroliz eder. Çoğunlukla süt proteini hidrolizatlarının alerjik etkisini ortadan kaldırmak için kullanılır (Rao vd., 1998).

Pepsin

Hemen hemen tüm omurgalıların midelerinde bulunan asidik bir proteazdır. İki hidrofobik amino asit arasındaki peptit bağlarının hidrolizini katalizler. Öncelikli olarak aromatik amino asitlere (fenilalanin, tirozin ve triptofan) karşı özgüllük gösterir. Mide için optimum pH aralığı 2-4 iken pepsin pH 1-2 aralığında optimum aktivite gösterir. pH 6 değerinin üzerinde inaktive olur (Rao vd., 1998; Klomklao vd., 2007).

Rennin

Emziren memelilerin midelerinden elde edilen pepsin benzeri bir proteazdır. κ -kazeindeki tek peptit bağına parçalayarak çözünmeyen para- κ -kazein ve C-son uçlu gliopeptit oluşmasını sağlar. Çoğunlukla süt ürünleri endüstrisinde aroma verici stabil süt pıhtısı (lor, kesmik) elde etmek için kullanılır (Rao vd., 1998).

4.1.3 Mikrobiyal proteazlar

Bitkisel ve hayvansal kaynaklı proteazların, artan enzim taleplerini karşılamaya yetmemesi, mikrobiyal proteazlara olan ilginin artmasına neden olmuştur. Mikrobiyal enzimler, kullanılacakları alanlar için gerekli karakteristik özelliklerin hemen hemen tümüne sahip oldukları için bitkisel ve hayvansal kaynaklı proteazlara tercih edilirler.

Bakteriler

Ticari enzimlerin birçoğu, özellikle nötral ve alkali enzimler, *Bacillus* sınıfına ait organizmalarca üretilir. Bakteri kaynaklı nötral enzimler pH 5-8 aralığında aktiftirler ve hidrofobik amino asit çiftlerine olan ilgileri ile karakterize edilirler. Isı toleransları düşüktür. Bakteriyel alkali proteazlar ise, alkali pH değerlerinde (pH 10) gösterdikleri yüksek aktiviteleri ile karakterize edilirler. Optimum çalışma sıcaklıkları 60°C civarındadır (Rao vd., 1998).

Fungiler

Fungal proteazlar geniş bir pH aralığında (pH 4-11) aktiftirler ve geniş bir substrat seçiciliğine sahiptirler. Ancak bakteriyel enzimlere göre düşük reaksiyon hızlarına ve daha düşük ısı toleransına sahiptirler. Asidik fungal proteazlar için optimum pH aralığı 4-6.5'tur. Ancak pH 2.5-5 aralığında stabilitelelerini korurlar. Nötral fungal proteazlar, metalloproteazdır ve pH 7 değerinde aktiftirler (Rao vd., 1998).

4.2 Proteolitik Enzimlerin Etki Mekanizmasına göre Sınıflandırılması

4.2.1 Exo-peptidazlar

Uç noktalardaki peptit bağlarını hidrolizleyerek amino asitleri N-son ucundan veya C-son ucundan sistematik bir şekilde ayırırlar (Clemente, 2000).

Amino-peptidazlar

Polipeptit zincirinin serbest N-son ucuna etkirler ve tek bir amino asit molekülünün veya bir dipeptit veya tripeptidin serbest kalmasını sağlarlar. Birçok bakteri ve fungide bulunurlar. Genellikle hücre içi enzimdirler (Rao vd., 1998).

Karboksi-peptidazlar

Polipeptit zincirinin serbest C-son ucuna etkirler ve tek bir amino asit molekülünün veya bir dipeptitin serbest kalmasını sağlarlar. Enzimin aktif kısmında bulunan aminoasit özelliğine göre karboksi-peptidazlar kendi içlerinde, serin karboksi-peptidazlar, mettalo karboksi-peptidazlar ve sistein karboksi-peptidazlar olmak üzere üç sınıfa ayrılırlar (Rao vd., 1998).

4.2.2 Endo-peptidazlar

Endopeptidazlar protein molekülündeki peptit bağlarını gelişi güzel kırarak oldukça uzun peptitlerin açığa çıkmasını sağlarlar (Clemente, 2000). Endopeptidazlar aktif katalitik bölgelerine göre; serin proteazlar, sistein proteazlar, metallo proteazlar ve aspartik proteazlar olmak üzere dört alt gruba ayrılırlar (Adler-Nissen, 1986; Rao vd., 1998).

Serin proteazlar

Serine proteazlar aktif bölgelerinde bulunan serine grubuna göre karakterize edilirler. Genellikle nötral ve alkali pH değerlerinde aktif olan serin proteazları için optimum pH aralığı 7-11'dir. Serin proteazlar kendi içlerinde Serin alkali proteazlar ve Subtilisinler olmak üzere iki alt sınıfa ayrılırlar (Rao vd., 1998).

Sistein proteazlar

Katalitik merkezlerinde -SH (thiol) fonksiyonel grubu bulunan sistein proteazları serin proteazlarına benzer endopeptidazlardır. Serin proteazlarından farklı olarak nötral pH değerlerinde yüksek aktivite gösterirler (Adler-Nissen, 1986).

Metallo proteazlar

Temel bir metal atomu, genellikle Zn, içerirler ve nötral pH değerlerinde aktivite gösterirler. Stabiliteleri Ca^{2+} varlığında artar, ancak metal atomunu uzaklaştırıcı güçlü bir ajan (EDTA gibi) varlığında inaktive olurlar (Adler-Nissen, 1986).

Aspartik proteazlar

Aktif bölgelerinde bulunan aspartik asit molekülüne bağlı olarak asidik proteazlar olarak tanımlanırlar. Düşük pH değerlerinde (pH 3-4) aktivite gösterirler (Rao vd., 1998).

4.3 Proteolitik Enzimlerin Kullanım Alanları

Çok geniş kullanım alanına sahip olan proteazlar çoğunlukla deterjan ve gıda endüstrisinde kullanılırlar.

Deterjan endüstrisi

Proteazlar evde kullanılan deterjanlardan, lens ve diş protezlerini temizlemek için kullanılan özel temizlik maddelerine kadar tüm deterjan türlerinde kullanılan standart bir deterjan bileşenidirler. Yüksek sıcaklık ve pH değerlerinde aktif olma ve deterjanlara eklenen diğer

ayırıcı ve oksitleyici ajanlarla uygunluk gösterme, proteazların deterjanlarda kullanılabilmesi için gerekli olan temel şartlardır. Günümüzde piyasada yer alan deterjanlarda kullanılan proteazların tümü *Bacillus* kökenli mikroorganizmalarca üretilen serin proteazlarıdır (Rao vd., 1998).

Gıda endüstrisi

Süt endüstrisi: Proteazların süt endüstrisindeki ana kullanım alanını peynir üretimi oluşturmaktadır. Peynir üretiminde proteazlar Phe105-Met106 peptid bağına hidrolizleyerek para- κ -kazein ve makro peptidaz oluşturmak ve sütü pıhtılaştırmak için kullanılırlar (Rao vd., 1998).

Ekmek Üretimi: Buğday unu ekmek ve unlu mamullerin üretiminde kullanılan ana bileşendir. Buğday unu çözünür olmayan ve hamur özelliklerini belirleyen bir protein olan gluteni ihtiva eder. Ekmek üretiminde proteazlar buğday glutenini modifiye etmek, dolayısı ile hamurun karışma süresini kısaltmak ve ekmek hacmini artırmak için kullanılırlar (Bombara vd., 1997; Rao vd., 1998).

Soya ürünlerinin üretimi: Soya yüksek protein içeriğine sahip değerli bir besin maddesidir. Bu alanda proteazlar birçok gıdada katkı maddesi olarak kullanılan soya proteininin modifikasyonu ve fonksiyonel özelliklerini geliştirmek için kullanılmaktadırlar (Adler-Nissen, 1986; Rao vd., 1998).

Protein hidrolizatlarındaki acı tadın giderilmesi: Protein hidrolizatlarının acı tada sahip olması, hidrolizatların gıda ve sağlık ürünlerinde kullanımlarına en büyük engeli oluşturmaktadır. Acı tadın yoğunluğu hidrolizatta bulunan hidrofobik amino asitlerle doğru orantılıdır. Ayrıca peptidin tam ortasında bulunan pirolin molekülü de acı tada sebep olabilir. Hidrolizattaki acı tad hidrofobik amino asitler ve pirolin molekülünün peptidazlar ile parçalanması ile giderilebilir (Pedersen, 1994; Rao vd., 1998).

Aspartam sentezi: Aspartam yapay tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Proteazlar hidroliz enzimleridir ancak belirli ve kontrollü kinetik koşullar altında ters reaksiyonda katalizlerler. *Bacillus thermoprotolyticus* kaynaklı bir proteaz olan thermolysin aspartam sentezinde kullanılmaktadır (Rao vd., 1998).

Deri endüstrisi

Derinin işlenmesi, ıslatma, tüy giderimi, inceltme ve tabakalama gibi birçok adım içerir. Derinin işlenmesi için kullanılan klasik yöntemler sodyum sülfid gibi çevreye de zarar veren zararlı kimyasallar içerir. Bu kimyasallara alternatif olarak enzimlerin kullanılması hem işlenen derinin kalitesini artırır; hem de çevre kirliliğini azaltır. Proteazlar deri endüstrisinde; derinin kollajen olmayan bileşenlerinin seçici hidrolizi, albüminler ve globulinler gibi lifsiz (nonfibrillar) proteinlerin uzaklaştırılması, ıslatma işleminde hayvan derisinin şişirilmesi (mikrobiai proteazlar), deriden tüy ve yünün giderilmesi için (alkali proteazlar) kullanılmaktadır (Rao vd., 1998).

İlaç endüstrisi

Geniş çeşitlilik ve özellik gösteren proteaz enzimleri ilaç endüstrisinde tedavi etkinliği yüksek ajanların geliştirilmesinde kullanılmaktadır (Rao vd., 1998).

5. GLUTEN HİDROLİZİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Günümüzde, hayvansal kaynaklı proteinlere alternatif olan bitkisel kaynaklı proteinlerin gıda katkı maddeleri olarak kullanımını oldukça artış göstermiştir. Bitkisel protein kaynakları arasında en çok soya proteinin hidrolizi üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Gluten buğday, arpa ve mısırdan elde edilen değerli bir proteindir. Literatürde gluten hidrolizi üzerine gerçekleştirilen çalışmalar oldukça sınırlı olmakla beraber son yıllarda hız kazanmaya başlamıştır. Bu bölümde; glutenin enzimatik hidrolizi ile ilgili literatürde yer alan çalışmalar incelenmiş ve kısaca özetlenmiştir.

Kong vd. (2007a) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, buğday glutenin (% 5 ağırlık/hacim) hidrolizi Tripsin (pH 8.5, 47°C), Pepsin (pH 2, 37°C), Pancreatin (pH 8.5, 37°C) ve Alcalase (pH 8.5, 60°C) enzimleri kullanılarak gerçekleştirilmiş ve buğday gluteni hidrolizatı hazırlamak için en uygun enzim Alcalase (Alcalase için 360 dakika sonunda elde edilen hidroliz derecesi % 15.8) olarak seçilmiştir. Çalışmada daha sonra Alcalase enzimi ile hazırlanan farklı hidroliz derecesine sahip hidrolizatların (% 5, % 10 ve % 15) bazı fonksiyonel özellikleri incelenmiş, hazırlanan tüm hidrolizatlar için pH 2-12 aralığında çözünürlük değerlerinin % 60'dan fazla olduğu, ham glutenle karşılaştırıldığında, düşük hidroliz derecesine (% 5) sahip hidrolizatın emülsifiye olma ve köpürme özelliklerinin (kontrol deneyi için % 84, % 5, % 10 ve % 15 hidroliz derecelerine sahip hidrolizatlar için sırası ile % 158, % 115 ve % 90 hacim artışı bildirilmiştir) oldukça yüksek olduğu, köpük stabilitesinin hidroliz derecesi arttıkça azaldığı rapor edilmiştir.

Kong vd. (2007b) tarafından gerçekleştirilen çalışmada buğday glutenin hidrolizi Alcalase (pH 8.5, 60°C), Tripsin (pH 8.5, 47°C), Pepsin (pH 2, 37°C), Pancreatin (pH 8.5, 37°C), Neutrase (pH 7, 50°C) ve Protamex (pH 6.5, 50°C) enzimleri kullanılarak gerçekleştirilmiş ve hidroliz verimi en yüksek enzim, Alcalase olarak bildirilmiştir. Çalışmada daha sonra Alcalase enzimi ile farklı hidroliz derecesine sahip hidrolizatlar hazırlanmış ve hazırlanan tüm hidrolizatlar için pH 2-12 aralığında çözünürlük değerlerinin % 60'dan fazla olduğu bildirilmiştir. Çalışmada elde edilen hidrolizatların SDS-PAGE profilleri (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) incelenmiş, ve ham gluten ile karşılaştırıldığında tüm hidrolizatların moleküler ağırlıklarının 40 kDa değerinin altında olduğu rapor edilmiştir.

Wang vd. (2007a) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, buğday gluteni (% 8 (ağırlık/hacim)) papain enzimi (1500 U/g substrat) ile pH 6.5 değerinde, 50°C sıcaklıkta 8 saat süre ile hidroliz işlemine tabi tutulmuş ve hidroliz derecesinin ilk 4 saatte hızlı bir artış gösterdiği, 6

saat sonunda % 10.9 değerine ulaştığı ve bu değerinde sabitlendiği, ortalama peptit zinciri uzunluğunun 3 saatlik hidroliz sonunda 24 amino asit birimi olduğu, 8 saat sonunda bu değer 8 amino asit birimine düştüğü bildirilmiştir. Ayrıca hidroliz reaksiyonu sırasında hidrolizatın azot içeriği (çözünürlüğü) farklı formlarda (çözünür azot, peptit azot, amino azot) zamana bağlı olarak incelenmiş, çözünür azotun 6 saat süresince arttığı sonra sabitlendiği, amino azotun 8 saat süresince artış gösterdiği, peptit azotun 6 saat süresince arttığı daha sonra azaldığı bildirilmiştir. Çalışmada hidrolizatların moleküler ağırlık dağılımı dört farklı aralık için (>15 kD, 15-10 kD, 10-5 kD, <5 kD) zamana karşı incelenmiş ve hidroliz süresi arttıkça moleküler ağırlıkları 15 kD'un üzerinde olan peptitlerin azaldığı, 5 kD altında moleküler ağırlıklı peptitlerin belirgin şekilde arttığı rapor edilmiştir. Hidrolizat çözeltisinin protein içeriği buğday glutenin içerdiği gliadin, çözünür ve çözünmeyen glutenin peptitleri için ayrı ayrı incelenmiş, gliadin peptitlerinin ilk 4 saat içinde hızlı bir biçimde azaldığı (protein içeriğinin % 55 başlangıç değerinden, 4 saat sonunda % 15 değerine, 8 saat sonunda % 12.5 değerine düştüğü belirtilmiştir), çözünür glutenin proteinlerinin ilk 6 saatte düşüş gösterdiği sonra hemen hemen sabitlendiği (protein içeriğinin % 12 başlangıç değerinden 6 saat sonunda % 2.5 değerine düştüğü belirtilmiştir), çözünmeyen glutenin peptitlerinin zamanla sürekli azaldığı (protein içeriğinin % 28 başlangıç değerinden 8 saat sonunda yaklaşık % 18 değerine düştüğü belirtilmiştir) bildirilmiştir.

Wang vd. (2007b) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, buğday gluteni (% 8 (ağırlık/hacim)) 90°C'de 30 dakika süresince ısı ön işleme tabi tutulduktan sonra, papain enzimi (6000 U/g substrat) ile pH 6.5 değerinde, 50°C sıcaklıkta 6 saat süre ile hidroliz işlemi gerçekleştirilmiş ve elde edilen hidrolizat, peptitlerin moleküler ağırlıklarına göre membran ultrafiltrasyonu ile 5 kDa (memrandan geçen; protein içeriği % 26.4) ve 5-K (memranda alıkonan; protein içeriği % 53.8) olmak üzere iki fraksiyona ayrılarak, hem hidrolizat çözeltisinin hem de fraksiyonlarının antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Hidrolizat, 5 kDa fraksiyonu ve 5-K fraksiyonu arasında, en yüksek antioksidan aktivitesini 5 kDa fraksiyonunun gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca, membran filtrasyonu sonucu elde edilen fraksiyonların hidrolizatla karşılaştırıldığında yüzey hidrofobisitesinin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir.

Apar ve Özbek (2007) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, mısır gluteninin hidrolizi Neutrase enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve hidrolizat miktarının, mısır gluteninin hidroliz ve çözünürlüğüne etkisi incelenmiştir. Çalışmada hidroliz reaksiyonu için optimum proses parametreleri, 10 g/L substrat konsantrasyonu, 4 mL/L enzim miktarı, 45°C sıcaklık ve pH

6.5 olarak belirlenmiş ve bu şartlarda % 37.2 hidroliz derecesi ile % 52 protein çözünürlüğü elde edildiği rapor edilmiştir. Çalışmada hidroliz reaksiyonun mekanizması ve kinetiği ayrıca incelenmiş; hidroliz ile protein çözünürlük kinetiğinin ekponansiyel bir denklemlerle ifade edilebileceği bildirilmiştir.

Wang vd. (2006) tarafından gerçekleştirilen çalışmada buğday gluteninin hidrolizi, % 8 (ağırlık/hacim) gluten konsantrasyonunda, 48°C'de pH 6.8 değerinde Protamex enzimi (2000 U/g substrat) ile 10 dakika süreyle gerçekleştirilmiş ve % 2.8'lik hidroliz derecesi elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen hidrolizat, membran ultrafiltrasyonu ile dört fraksiyona (100-K, 50-K, 20-K ve <20-K) ayrılarak, fraksiyonların fonksiyonel özellikleri incelenmiştir. Çalışmada incelenen örnekler için elde edilen hidrofobisite değerleri en yüksekten düşüğe, 100-K fraksiyonu, 50-K fraksiyonu, fraksiyonlara ayrılmamış hidrolizat, 20-K fraksiyonu, hidrolizlenmemiş gluten ve <20-K fraksiyonu için sıralanmış, tüm fraksiyonlar için çözünürlüğün, fraksiyonlara ayrılmamış hidrolizat ve hidrolizlenmemiş glutenden daha yüksek olduğu ve sıcaklıkla azaldığı bildirilmiştir. Çalışmada, tüm fraksiyonlar ve fraksiyonlarına ayrılmamış hidrolizat çözeltisi için köpürme özelliğinin işlem görmemiş glutene göre oldukça yüksek olduğu, en yüksek köpürme özelliğinin 50-K fraksiyonu için elde edildiği (% 160 hacim artışı), köpük stabilitesi incelendiğinde 100-K fraksiyonun en yüksek, <20-K fraksiyonunun ise en düşük stabiliteyi gösterdiği rapor edilmiştir.

Zheng vd. (2006) gerçekleştirdikleri çalışmalarında mısır glutenini 160-180°C'de 1-1.5 MPa'da çift burgulu ekstrüderden geçirmişler ve daha sonra, % 10 (ağırlık/hacim) gluten içeren çözeltiyi pH 6.5 değerinde 70°C sıcaklıkta 180 dakika boyunca alfa-amilaz enzimi (30 U/L) ile muamele ederek glutenden nişastayı uzaklaştırmışlardır. Ön işlem sonrası gluten hidrolizi için Alcalase enzimini kullanmışlar ve belirledikleri optimum proses şartlarında (pH 8 değerinde, 60°C sıcaklıkta, 20 g H₂O/g protein, 48 mAU/g protein enzim ilavesi) hidroliz işlemini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda belirlenen optimum şartlarda gluten hidrolizinin, glutenin ekstrüderden geçirilmesi ve nişastanın uzaklaştırılması ile % 32.16 değerinden % 39.54 değerine yükseldiği, elde edilen protein çözünürlüğünün % 79.2 olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada, hidrolizat çözeltisindeki peptitlerin moleküler ağırlık dağılımı, 30, 60 ve 120 dakikalık hidroliz işlemlerinden sonra 5.100-1.190, 3.800-660 ve 3.710-660 Da olarak belirlenmiş, ayrıca hidrolizat çözeltisinin antioksidan aktivitesi incelenmiştir. Çalışma sonucunda, yüksek antioksidan aktiviteye sahip ve amino asit dizilimi, Phe-Pro-Leu-Glu-Met-Met-Pro-Phe olan yeni bir peptidin saflaştırıldığı rapor edilmiştir.

Kim vd. (2004a) tarafından, yüksek ACE inhibitör aktivitesine sahip, yüksek çözünürlükte hidrolizat elde etmek amacı ile gerçekleştirilen çalışmada, mısır glutenine uygulanan nişasta uzaklaştırma ve ısıl denatürasyon ön işlemlerinin protein çözünürlüğü üzerindeki etkisi incelenmiştir. Nişasta uzaklaştırma ön işlemi % 10 (ağırlık/hacim) gluten konsantrasyonunda, pH 6 değerinde, 60°C ve 80°C sıcaklık değerlerinde, nişastanın amilaz enzimi (Termamyl 120L) ile hidrolizlenmesiyle gerçekleştirilmiş ve başlangıçta % 3.25 olan nişasta içeriğinin 180 dakikalık işlem sonrası 60°C ve 80°C sıcaklıkları için sırası ile % 0.31 ve % 0.09 değerlerine düştüğü rapor edilmiştir. Nişasta uzaklaştırma ön işleminden sonra gluten çözeltilisine 30 dakika süre ile 80°C ve 100°C'de ısıl denatürasyon işlemi uygulanmıştır. Ön işlem uygulanan gluten çözeltilisi, 50°C'de, 6 saat boyunca Flavourzyme enzimi ile inkübe edilerek protein hidrolizi gerçekleştirilmiş ve ısıl ön işlem ile protein çözünürlüğünün arttığı rapor edilmiştir (6 saat sonunda sırası ile kontrol, 80°C ısıl ön işlem sonrası, 100°C ısıl ön işlem sonrası için hidrolizat protein içerikleri yaklaşık olarak 20, 30 ve 43 mg/mL olarak elde edilmiştir). Çalışmada, ısıl ön işlem süresinin hidroliz reaksiyonuna etkisi ayrıca incelenmiş ve ön işlem süresinin 15 dakikadan 60 dakikaya çıkarılması ile protein çözünürlüğünün yaklaşık olarak 37 mg/mL değerinden 47 mg/mL artığı (6 saatlik protein hidroliz işlemi sonunda) bulunmuştur. Hidrolizat çözeltilisinin ACE inhibitör aktivitesi, 6 farklı enzim (Protomax, Flavourzyme, Proleather, Protease A, Aroase-10, Pescalase) kullanılarak her enzimin kendi optimum sıcaklık ve pH değerinde gerçekleştirilen hidroliz deneyleri ile incelenmiş, bu deneyler sonucunda en yüksek ACE inhibitör aktivitesi ve protein çözünürlüğünün Flavourzyme enzimi ile elde edildiği rapor edilmiştir (8 saatlik işlem sonrası; IC₅₀= 0.18 mg katı, protein miktarı= 87.4 mg/mL). Çalışmada, Flavourzyme enzimi ile elde edilen hidrolizat çözeltilisinin nem sorpsiyon özelliği ayrıca incelenmiş ve elde edilen hidrolizatın etkili bir su-bağlama ajanı olduğu rapor edilmiştir.

Kim vd. (2004b) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, nişasta uzaklaştırma ve ısıl denatürasyon ön işlemlerinden sonra, Flavourzyme enzimi kullanılarak hazırlanan (Kim vd. 2004a) mısır gluteni hidrolizatının ACE inhibitör aktivitesi, emulsifiye edici ve köpürme özelliklerinin membran ultrafiltrasyonu kullanılarak geliştirilmesi amaçlanmıştır. İki tür ultrafiltrasyon membranı kullanılarak (10 ve 5 kDa ayırıcı) hidrolizat çözeltilisi; 10 kDa (% 58.3), 5-10 kDa (% 27.2) ve <5 kDa (% 14.5) olmak üzere üç fraksiyona ayrılmıştır. ACE inhibitör aktiviteleri incelendiğinde, hidrolizat, 10 kDa ve <5 kDa fraksiyonlar için IC 50 (% 50 ACE aktivitesini inhibe etmek için gerekli olan ACE inhibitör konsantrasyonu) değerleri sırası ile 0.018, 0.05, 12.32 ve 207.33 mg katı olarak rapor edilmiş, elde edilen ortalama hidrofobisite değerleri içinse, fraksiyonlar arasında önemli derecede bir fark

bulunmadığı bildirilmiştir. Çalışmada hidrolizat ve fraksiyonlarının emülsifiye edici ve köpürme özellikleri pH 3-8 aralığında incelenmiş, emülsifiye edici aktivite değerlerinin pH değeri ile arttığı, en yüksek emülsifiye edici aktiviteye ve stabiliteye <5 kDa fraksiyonunun sahip olduğu, <5 kDa ve >10 kDa fraksiyonlarının pH 6 değerinin altında köpürme kapasitelerinin zayıf olduğu, <5 kDa fraksiyonunun köpük stabilitesinin pH ile arttığı, 5-10 kDa fraksiyonun köpük stabilitesinin pH 4 değerine kadar azaldığı daha sonra arttığı rapor edilmiştir.

Suh vd. (2003) tarafından gerçekleştirilen çalışmada mısır glutenin hidrolizi 6 farklı ticari enzim (Protomax, Pescalase, Flavourzyme, Proleather, Protease A, Aroase-AP10) kullanılarak her enzimin kendi optimum sıcaklık ve pH değerinde, % 5 (ağırlık/hacim) substrat konsantrasyonunda gerçekleştirilmiş ve en yüksek ACE inhibitör aktivitesi ve protein çözünürlüğünün Flavourzyme enzimi ile elde edildiği rapor edilmiştir (8 saatlik işlem sonrası; IC₅₀= 0.18 mg katı, protein miktarı= 87.4 mg/mL). Çalışmada, hidrolizat çözeltisinin ACE inhibitör aktivitesi, Flavourzyme (karışık tür), Pescalase (endo-proteaz) ve Protease A (exo-proteaz) enzimleri için daha kapsamlı incelenmiş ve Flavourzyme enziminin tek başına kullanılmasına kıyasla Pescalase ve Protease A enzimlerinin 1:1 (ağırlık bazında) oranında birlikte kullanılması ile yüksek ACE inhibitör aktivitesine sahip hidrolizat elde etmek için gerekli olan reaksiyon süresinin 8 saatten 4 saate indiği rapor edilmiştir. Ayrıca, Flavourzyme ve Pescalase-Protease A enzim karışımı kullanılarak elde edilen hidrolizat çözeltilerinin yüzey hidrofobisiteyi incelenmiş, her iki durum için elde edilen ortalama hidrofobisite değerlerinin 1400 kcal/mol kritik değerinden düşük olduğu rapor edilmiştir.

Popineau vd. (2002) tarafından gerçekleştirilen çalışmada buğday gluteni Protease 2500S enzimi ile 0, 5 ve 10 mg sistein/g gluten varlığında hidrolizlenerek, % 2.6 hidroliz derecesine sahip üç farklı hidrolizat çözeltisi hazırlanmıştır. 0, 5 ve 10 mg sistein/g gluten varlığında elde edilen hidrolizatlar için çözünen peptit miktarları (çözünen peptit/toplam protein) sırası ile % 60 (hidrofilik fraksiyonu % 55, hidrofobik fraksiyonu % 45), % 74 (hidrofilik fraksiyonu % 51, hidrofobik fraksiyonu % 49) ve % 72 (hidrofilik fraksiyonu % 53, hidrofobik fraksiyonu % 49) olarak bildirilmiştir. Çalışmada, elde edilen hidrolizat çözeltileri iki farklı membrandan geçirilmiş (50 kg/mol ve 150 kg/mol); hidrolizatlar, membranlardan geçen fraksiyonlar ve membranlar tarafından tutulan fraksiyonlar için, köpürme ve emülsiyon oluşturma özellikleri pH 4 ve 6.5 değerlerinde iki farklı tuz konsantrasyonunda (% 0.2 ve % 2 NaCl) incelenmiştir. Membranlar tarafından tutulan fraksiyonların hidrofobik, membranlardan geçen fraksiyonların hidrofilik peptitler bakımından zenginleştiği; hidrolizatların köpürme

kapasitesine sahip olduğu ancak oluşan köpüklerin stabil olmadığı, membranlardan geçen fraksiyonların sadece pH 6.5 değerinde köpük oluşturduğu ve bu köpük stabilitesinin çok düşük bulunduğu ve hiç emülsifiye olma özelliği göstermedikleri, membranlar tarafından tutulan fraksiyonların stabiliteleri yüksek köpük oluşturdukları ve hidrolizat çözeltisi ile karşılaştırıldıklarında daha iyi emülsiyon stabilitesi gösterdikleri rapor edilmiştir. Membranlar tarafından tutulan fraksiyonların fonksiyonel özelliklerinin pH ve iyonik güçten etkilenmediği ayrıca kendi aralarında karşılaştırıldığında; farklı miktarlarda sistein ilavesinin hidrolizat çözünürlüğünü arttırmadığı ve farklı membran kullanımının hidrolizat fraksiyonlarının fonksiyonel özelliklerini değiştirmedikleri bildirilmiştir.

Drago ve Gonzalez (2001) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, ısıtılmış uygulanmış buğday gluteni (98°C'de 25 dakika) *Aspergillus oryzae* kaynaklı fungal proteaz enzimi ile, % 8 (ağırlık/ağırlık) protein konsantrasyonunda, % 5 enzim/substrat oranında, pH 4.25 değerinde, 55°C sıcaklıkta hidroliz işlemine tabi tutularak, düşük (0.5 saat sonunda, % 14), orta (2 saat sonunda, % 26) ve yüksek (6 saat sonunda, % 42) hidroliz derecesine sahip hidrolizatların çözünürlükleri ve köpürme özellikleri farklı pH değerlerinde (4, 6.5 ve 9) incelenmiştir. Çalışmada çözünürlüğün hidroliz derecesi ile arttığı, aynı hidroliz derecesine sahip örnekler için en yüksek köpürme kapasitesinin pH 9 değerinde elde edildiği ancak hidroliz derecesinin artması ile köpürme kapasitesinin azaldığı rapor edilmiştir. Su absorplama kapasitesi incelendiğinde; ısıtılmış uygulanan glutenin absorpsiyon özelliğinin ham glutene göre daha yüksek olduğu, hidroliz işlemi sonrası elde edilen örneklerin absorpsiyon özelliklerinin ise ham glutene göre daha düşük olduğu bildirilmiştir.

Suh vd. (2000) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, acı tadı giderilmiş ve yüksek ACE inhibitör aktivitesine sahip mısır gluteni hidrolizatlarının eldesi amaçlanmıştır. Çalışmada % 5 ağırlık/hacim konsantrasyonunda mısır gluteni pH 8.5 değerinde, % 0.5 (g enzim/g gluten) oranında Pescalase ve Termolase enzimi kullanılarak 6 saat süre ile hidroliz işlemine tabi tutulmuş, elde edilen hidrolizat çözeltileri membran filtrasyonundan (10 kDa) geçirildikten sonra 6 farklı aktif karbon (Koent CPG, Koent PWA, Koent RC, Juensei granül, Juensei toz) ve aktif kil (Juensei) ile 2 saat süre ile muamele edilmiştir (işlem için % 10 oranında aktif karbon kullanılmıştır). Aktif karbon muamelesi sonucunda acı tadın azaldığı, duyuusal değerlendirme sonucunda en düşük acı tat özelliğinin, Pescalase enzimi ile elde edilen hidrolizat çözeltisi için Koent PWA ve aktif kil ile muamele sonucunda, Termolase enzimi ile elde edilen hidrolizat çözeltisi içinse Koent RC ile muamele sonucunda elde edildiği, her iki enzim ile elde edilen hidrolizat çözeltisi için en düşük ACE inhibitör aktivite

değerlerinin (Pescalase ve Termolase hidrolizatları için sırası ile, yaklaşık % 50 ve % 52) Koent RC ile muamele sonucunda elde edildiği bildirilmiştir. Aktif karbonla muamele sonucunda toplam azot içeriğinin Pescalase ve Termolase hidrolizatları için 136-42 mg ve 134-108 mg değer aralıklarında elde edildiği, aktif karbonla muamele öncesinde bu değerlerin 148 mg ve 135 mg olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada hidrolizatların yüzey hidrofobisiteyi ayrıca incelenmiş, aktif karbonla muamele sonucunda yüzey hidrofobisite değerlerinin düştüğü, Pescalase enzimi ile elde edilen hidrolizat çözeltisi için en düşük hidrofobisite değerinin Koent PWA ile muamele sonucunda (elde edilen hidrofobisite değeri: 13.3, aktif karbonla muamele öncesi elde edilen değer: 38), Termolase enzimi ile elde edilen hidrolizat çözeltisi içinse Koent RC ile muamele sonucunda (elde edilen hidrofobisite değeri: 9.9, aktif karbonla muamele öncesi elde edilen değer 29.9) elde edildiği bildirilmiştir.

Bombara vd. (1997) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, hidroliz derecesine bağlı olarak buğday unu proteinlerinin fonksiyonel özellikleri incelenmiştir. Buğday unu proteininin hidrolizi *Aspergillus oryzae* kaynaklı nötral proteaz enzimi kullanılarak, 54°C sıcaklıkta, 26.6 mg/g çözelti protein konsantrasyonunda, 0.25/100-3/100 arasında değişen enzim/substrat oranlarında, pH 5.9 değerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, buğday proteinlerinin moleküler ağırlık dağılımı değerlerinin enzim ile muamele sonucu düştüğü, çözünen protein değerinin hidroliz derecesi ile lineer olarak değiştiği (hidroliz derecesinin % 0'dan % 36.7'ye artması ile % 7.1'den % 53'e arttığı), viskozitenin ve akma geriliminin % 14 hidroliz derecesi değerine kadar hızla azaldığı, emülsiyon kapasitesinin yaklaşık % 3.8 hidroliz derecesi değerine kadar düştüğü ve bu değerden sonra da yükseldiği, Bauman su ve yağ absorpsiyon kapasitesinin % 3.8 hidroliz derecesinde maksimum artışı gösterdiği rapor edilmiştir. Çalışmada ayrıca modifiye edilen un ile pişirme testleri yapılmış ve kek hacminin % 3.8 ve % 14.1 hidroliz derecesine kadar modifiye edilen unlar kullanıldığında % 10 arttığı, en yüksek kek hacmi artışının (% 17) ise modifiye edilmemiş un ile % 14.1 hidroliz derecesine kadar hidrolizlenmiş unun yarı yarıya karıştırılarak kullanılması ile sağlandığı bildirilmiştir.

Briones-Martinez vd. (1997) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, mısır gluteni hemisphaericin ve mexicain proteinazları ile muamele edilmiştir. Çalışmada hidroliz işlemine tabi tutulmamış gluten ile 1 saat ve 3 saat hemisphaericin ile muamele edilmiş gluten için çözünürlük değerleri sırası ile % 42, % 64 ve % 64, su absorpsiyon kapasitesi değerleri; 3.36 3.33 ve 4.23 g/g protein, yağ absorpsiyon kapasitesi değerleri; 2.45, 6.88 ve 7.52 g/g protein, emülsifiye aktivite indeksi değerleri; 4.69, 5.39 ve 4,99 m²/g protein olarak bildirilmiştir. Hidroliz işlemine tabi tutulmamış gluten ile 1 saat ve 3 saat mexicain ile muamele edilmiş

gluten için ise çözünürlük değerleri sırası ile % 42, % 75 ve % 82, su absorpsiyon kapasitesi değerleri; 3.36 3.00 ve 3.13 g/g protein, yağ absorpsiyon kapasitesi değerleri; 2.45, 5.48 ve 7.4 g/g protein, emülsifiye aktivite indeksi değerleri; 4.69, 8.03 ve 9.19 m²/g protein olarak rapor edilmiştir.

Nouri vd. (1997) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, buğday gluteninden ekstrakte edilen gliadin, pepsin enzimi ile hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Araştırmacılar, 0.286-4 mM arasında değişen substrat konsantrasyonlarında, pH 2 değerinde, 25°C sıcaklıkta, 2 mg/mL ve 4 mg/mL enzim konsantrasyonunda gerçekleştirdikleri kinetik deneyler sonucunda, Michaelis-Menten parametrelerini 2 mg/mL enzim konsantrasyonu için; $K_m = 7.5 \cdot 10^{-4}$ mol/L, $V_{max} = 8.47 \cdot 10^{-6}$ -NH₂eq/L.dak, 4 mg/mL enzim konsantrasyonu için; $K_m = 6.9 \cdot 10^{-4}$ mol/L, $V_{max} = 12.7 \cdot 10^{-6}$ -NH₂eq/L.dak olarak belirlemişlerdir. Çalışmada gliadin konsantrasyonunun (10-200 g/L) hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisi incelenmiş ve 420 dakikalık reaksiyon süresi sonunda elde edilen hidroliz derecesi değerlerinin hemen hemen sabit kaldığı (% 1.36-1.55) dolayısı ile hidroliz derecesinin gliadin konsantrasyonundan bağımsız olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada, karıştırıcı hızının hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisi 100-750 devir/dakika aralığında incelenmiş ve hidroliz derecesinin 250 devir/dak karıştırıcı hıza kadar arttığı, 500 devir/dak değerinden sonra ise (750 devir/dak) azaldığı bildirilmiştir. Sıcaklığın reaksiyon üzerindeki etkisi 25-50°C sıcaklık aralığında incelenmiş ve sıcaklığın 25°C değerinden 50°C arttırılması ile hidroliz derecesinin % 43 arttığı (25°C için 420 dakika sonunda elde edilen hidroliz derecesi % 1.26, 50°C için 420 dakika sonunda elde edilen hidroliz derecesi % 1.8) rapor edilmiştir.

Mannheim ve Cheryan (1992) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, mısır gluteninin; çözünürlük, berraklık, köpürme, nem sorpsiyonu gibi fonksiyonel özellikleri, enzimatik hidrolizle membran teknolojisinin kombine kullanımı ile modifiye edilmiştir. Çalışmada, mısır gluteninin Alcalase enzimi ile hidrolizi; % 8 (ağırlık/hacim) substrat konsantrasyonunda, 200 (ağırlık/ağırlık) substrat/enzim oranında, pH 8 değerinde, 50°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiş ve 4 saat sonunda % 27.7 hidroliz (= % 35.9 substrat dönüşümü) değerine ulaşıldığı bildirilmiştir. Enzim konsantrasyonunun hidroliz reaksiyonuna etkisi, 0-1.75 mg/mL aralığında değişen enzim miktarları için, % 1 (ağırlık/hacim) substrat konsantrasyonunda, pH 9 değerinde ve 50°C sıcaklıkta incelenmiş ve % substrat dönüşümünün 0.50 mg/mL enzim konsantrasyonuna kadar arttığı (% 45), bu değerden sonra değişmediği rapor edilmiştir. Substrat konsantrasyonunun hidroliz reaksiyonuna etkisi ise, % 0.125-2 (ağırlık/hacim) aralığında değişen substrat miktarları için 0.1 mg/mL enzim

konsantrasyonunda, pH 9 değerinde 50°C sıcaklıkta incelenmiş ve % substrat dönüşümünün substrat konsantrasyonu ile azaldığı, hidroliz için optimum substrat/enzim oranının 20 (ağırlık/ağırlık) olduğu bildirilmiştir. Çalışmada hidroliz verimini artırmak için glutene 5 farklı ön işlem uygulanarak (1- Sistein ile muamele, 2- disülfit reduktaz ile muamele, 3- sssinik anhidrit ile muamele, 4- ısıl ön işlem, 5- Na-Sülfit ile muamele) bu ön işlemlerin hidroliz verimine etkisi ayrıca incelenmiş, Sistein ve Na-Sülfit ile muamele sonucunda hidroliz veriminin belirgin şekilde etkilendiği (substrat dönüşümünün Sistein ile muamele sonucunda % 47-50, Na-Sülfit ile muamele sonucunda % 48.5-50.7 değerlerine yükseldiği) rapor edilmiştir. Araştırmacılar, 0.068-2 mg/mL arasında değişen substrat konsantrasyonlarında, 0.1 mg/mL enzim miktarı ile pH 9 ve 50°C sıcaklıkta gerçekleştirdikleri kinetik deneyler sonucunda; n işlemsiz, glutenin Na-sülfit ve Cysteine ile muamele edildiği ön işlemler sonrasında, mısır gluteni-Alcalase reaksiyonu için Michaelis-Menten parametrelerini belirlemişlerdir. Çalışmada n işlemsiz, glutenin Na-sülfit ve Cysteine ile muamele edildiği ön işlemler sonrasında gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için K_m değerlerinin sırası ile % 0.310, % 0.574, ve % 0.796 (ağırlık/hacim), V_{max} değerlerinin 6.8×10^{-3} , 16.8×10^{-3} ve 26.9×10^{-3} mg/mL.dak olarak elde edildiği bildirilmiştir. Çalışmada ayrıca elde edilen hidrolizat çözeltisinin membran filtrasyonundan geçirilmesinin, proteinin fonksiyonel özelliklerine etkisi incelenmiş, hidrolizat çözeltisinin membran filtrasyonu sonucunda iki peptit fraksiyonunun elde edildiği, filtrasyon sonucunda yüksek hidroliz derecesinde başlangıç köpük hacminin arttığı ancak köpük stabilitesinin azaldığı, protein çözünürlüğünün arttığı bildirilmiştir. Ayrıca enzim ile modifiye edilmiş proteinlerin çözünürlük ve berraklığının yüksek hidroliz derecesinde daha iyi olduğu, elde edilen tüm hidrolizat çözeltilerinin nem sorpsiyon kapasitelerinin hidrolizlenmemiş glutenden daha yüksek olduğu rapor edilmiştir.

Hardwick ve Glatz (1989) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, mısır glutenin hidrolizi bir alkali proteaz enzimi olan Alcalase 2.4 L ile gerçekleştirilerek, enzim konsantrasyonu ve gluten boyutunun hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. % 8 (ağırlık/hacim) substrat konsantrasyonunda, pH 9 değerinde 50°C sıcaklıkta, 0.375-0.75 AU/L aralığında değişen enzim konsantrasyonlarında gerçekleştirilen deneylerde, reaksiyon hızı; hem hidroliz derecesi hem de çözünen protein miktarı ile takip edilmiştir. Çalışmada enzim miktarı artıkça hidroliz ve çözünürlük değerlerinin arttığı (4 saat sonunda, 0.75 AU/L enzim konsantrasyonunda elde edilen maksimum hidroliz derecesi yaklaşık olarak % 9; 0.5 AU/L enzim konsantrasyonunda elde edilen maksimum çözünen protein miktarı yaklaşık olarak 29 g/L), ğtme işlemi sonucunda glutenin yüzey alanının dört kat arttığı; ancak bunun hidroliz

reaksiyonunun verimine önemli bir katkısının olmadığı rapor edilmiştir. Araştırmacılar reaksiyon kinetiğini, elde edilen deneysel sonuçları bazı kinetik modeller ile karşılaştırarak incelemişler ve kullandıkları modeller arasından lineer ve basitleştirilmiş ürün inhibisyon modelinin en iyi sonucu verdiğini rapor etmişlerdir.

Adler-Nissen (1977) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, mısır proteinin (% 8), Alcalase enzimi (% 2 enzim/substrat) ile 50°C, pH 8 değerinde hidrolizi gerçekleştirilmiş ve 240 dakika sonunda % 13 hidroliz derecesi elde edildiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada mısır gluteninin Neutralse enzimi ile hidrolizi için, hidrolizatın su absorpsiyon kapasitesi değişen enzim konsantrasyonlarında (% 0.15, % 0.3 ve % 0.6 enzim/substrat), pH 7 değerinde, 50°C sıcaklıkta, % 8 protein konsantrasyonunda, çözeltinin viskozitesi takip edilerek incelenmiş ve yüksek viskozite değeri (su absorpsiyon kapasitesi) elde edebilmek için optimum enzim/substrat oranının % 0.3 olarak saptandığı bildirilmiştir.

6. MATERYAL VE YÖNTEM

6.1 Kullanılan Cihazlar

Reaktör

Gerçekleştirilen deneyler için, çalışma hacmine göre üç farklı reaktör kullanılmıştır;

- 400 mL toplam hacme sahip, 8 cm çapında, 10.5 cm yüksekliğinde cam reaktör
- 150 mL toplam hacme sahip, 5 cm çapında, 8 cm yüksekliğinde cam reaktör
- 100 mL toplam hacme sahip, 4.5 cm çapında, 6.5 cm yüksekliğinde cam reaktör

Kontak termometreli ısıtıcı karıştırıcı

Reaksiyon çözeltisinin sıcaklığını ve karıştırma hızını kontrol etmek amacı ile, IKA marka bir kontak termometreli ısıtıcı karıştırıcı kullanılmıştır.

Karıştırıcı fonksiyonu

Motor: 12 VDC

Hız aralığı: 150-1200 devir/dak

Isıtıcı fonksiyonu

Isıtıcı gücü: 500 W

Ulaşabileceği maksimum tabla yüzey sıcaklığı: 450°C

Kontak termometre

Ölçüm aralığı: -10 - 400°C

Ölçüm doğruluğu: ± 0.3

Kontrol sapması: ± 1

pH kontrol ünitesi

Reaksiyon çözeltisinin pH değerini kontrol etmek amacı ile, alpha pH 800 markalı bir pH kontrol edici, Cole-Parmer markalı cam bir pH elektrodu ve Masterflex markalı bir peristatik

pompa kombine olarak kullanılmıştır.

pH kontrol edici

pH aralığı: 0 -14 pH, Doğruluk : ± 0.01 pH

mV aralığı: -1000 -1000 mV, Doğruluk: ± 1 mV

Perilstatik pompa

Pompa hızı: 1.6-100 devir/dak

Ayarlanabilir akış hız aralığı: 0.1-3400 mL/dak

Terazi

Hidroliz reaksiyonunun pH-stat metodu ile ototitrasyonu sırasında, ortama ilave edilen baz miktarını belirleyebilmek amacı ile bilgisayar bağlantısı bulunan, 0.001 g hassasiyete sahip, 0-410 g tartım kapasiteli SCALTEC SBA 41 markalı bir terazi kullanılmıştır.

Su Banyosu

Gerçekleştirilen deneyler sırasında gerekli analizler için; 6 L rezarvuvar hacmine sahip, 0-150°C aralığında ayarlanabilir PolyScience markalı bir su banyosu kullanılmıştır. Ayrıca, sonik ortamda gerçekleştirilen hidroliz deneylerinde, reaktör sıcaklığını kontrol etmek amacı ile; 6 L rezarvuvar hacmine sahip, -20-150°C aralığında ayarlanabilir, soğutma özelliği bulunan PolyScience markalı ikinci bir banyo kullanılmıştır.

Mikro santrifuj

Analiz öncesi örnekleri hazırlamak amacı ile Hettich markalı, 12x2.2 mL (1.2 Kg/dm³) kapasiteli, 0-13000 devir/dak aralığında ayarlanabilir dönüş hızına sahip bir santrifuj kullanılmıştır.

Spektrofotometre

Örneklerin absorbans değerlerini belirlemek için 200-1100 nm aralığında okuma yapabilen, Shimadzu marka UV-150-02 çift ışınli spektrofotometre kullanılmıştır.

Sonikatör

Substrata sonik ön işlem uygulamak ve hidroliz reaksiyonunu ultrasonik ortamda gerçekleştirmek amacı ile, akustik gücü 20-200 W aralığında, çalışma frekansı % 10-% 100 aralığında ayarlanabilen, Bandelin Sonopuls (HD 2200) marka, 12.7 mm çapında titanium uçlu (TT13) sonikatör kullanılmıştır.

Mikrodalga fırın

Substrata mikrodalga ön işlemi uygulamak amacı ile, 530x500x322 mm boyutunda, 30 L fırın hacmine sahip, 180-900 W aralığında ayarlanabilen mikrodalga gücüne, 40-250°C aralığında ayarlanabilir fırın özelliğine sahip, Arçelik firması tarafından üretilen MD 594 ürün kodlu fırın kullanılmıştır.

6.2 Kimyasal Maddeler

Kullanılan tüm kimyasallar yüksek saflıkta olup, Sigma-Aldrich, Fluka, J.T.Baker ve Fisher firmalarından temin edilmiştir.

Proteaz enzimleri

Mısır gluteninin hidroliz işleminde kullanılan proteaz enzimleri (Çizelge 6.1) ticari enzimler olup Novozymes (Novo Nordisk A/S Danimarka) firmasından sağlanmıştır.

Çizelge 6.1 Çalışmada kullanılan proteaz enzimlerinin özellikleri

Enzim	Kaynağı	Aktivitesi	Türü
Alcalase 2.4L	Bacillus licheniformis	2.4 AU/g	endopeptidaz
Neutrase 0.8L	Bacillus amyloliquefaciens	0.8 AU/g	endopeptidaz
Protamex	Bacillus licheniformis, Bacillus amyloliquefaciens	1.5 AU/g	kompleks
Flavourzyme 1000L	Aspergillus oryzae	1000 LAPU/g	kompleks
PTN P-110	Pankreas	11000 LVU/g	endopeptidaz

Gluten

Hidroliz reaksiyonlarında kullanılan mısır gluteni (protein içeriği % 62) Cargill firmasından temin edilmiştir. Glutenin amino asit kompozisyon analizi TÜBİTAK tarafından gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 6.2’de sunulmuştur.

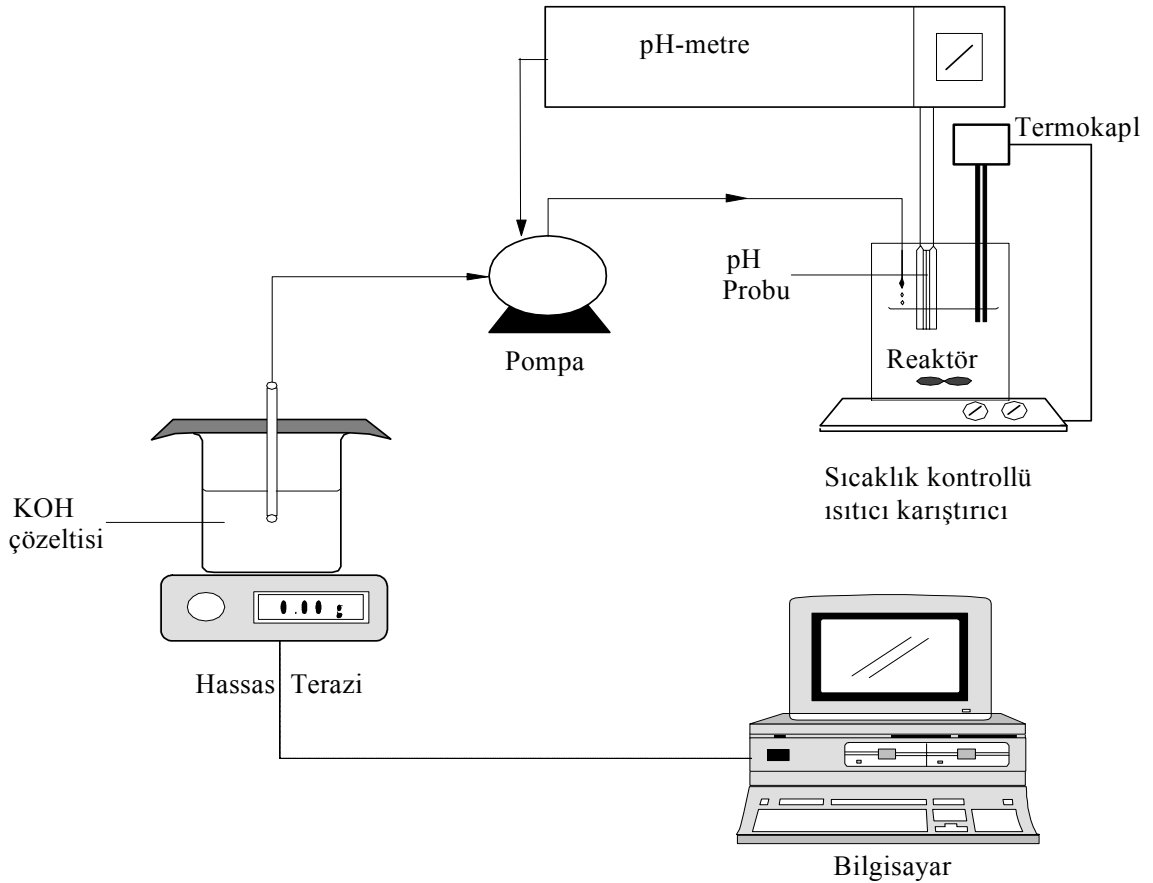
Çizelge 6.2 Mısır glutenin amino asit kompozisyonu

Aminoasit	mg/g protein	mmol/g protein
Alanin	86.91	0.9754
Glisin	25.65	0.3417
Valin	44.47	0.3796
Lösin	128.33	0.9783
İzolösin	36.17	0.2757
Treonin	27.48	0.2307
Serin	52.51	0.4997
Prolin	106.11	0.9216
Aspartik asit	145.27	1.0914
Metiyonin	22.62	0.1516
Glutamik asit	156.64	1.0646
Fenilalanin	59.10	0.3578
Lizin	15.75	0.1073
Histidin	32.31	0.2082
Triozin	48.45	0.2674
Hidroksiprolin	12.22	0.0932
Triptofan*	5.40	0.000026
Sistein*	20.00	0.1651
Arginin*	27.00	0.1550
Taurine*	54.00	0.4315

* Değerler Adler-Nissen (1986)’den alınmıştır.

6.3 Protein Hidroliz Deneyleri

Hidroliz reaksiyonları, sıcaklık, pH ve karıştırıcı hızı kontrol modülleri ile kombine edilmiş, bir cam reaktör içerisinde gerçekleştirilmiştir. Hidroliz reaksiyonları; pH, sıcaklık ve karıştırıcı hızı ayarları yapıldıktan ve sistem stabil hale geldikten sonra gluten çözeltisine enzimin ilave edilmesi ile başlatılmıştır. Hidroliz reaksiyonunun pH-stat metodu ile ototitrasyonu sırasında, ortama ilave edilen baz miktarı reaksiyon süresi boyunca 30 saniye aralıklarla bilgisayar ile kaydedilerek hidroliz derecesi belirlenmiştir. Aynı zamanda reaksiyon çözeltisinden belli zaman aralıklarında alınan örneklerin analizi ile çözünen protein miktarı ve enzim aktivitesi zamana bağlı olarak incelenmiştir. Gerçekleştirilen tüm deneyler iki kez tekrarlanmıştır ve tekrarlanan iki deney arasındaki maksimum fark \pm % 5 sınırlıdır. Protein hidroliz deneyleri için kullanılan deney düzeneği Şekil 6.1’de verilmiştir.



Şekil 6.1 Protein hidrolizi deney düzeneği

6.4 pH-Stat Metodu ile Hidroliz Derecesinin Belirlenmesi

pH-Stat yöntemi, reaksiyon sırasında açığa çıkan veya tüketilen hidrojen iyonları nedeni ile değişen pH değerini sabit tutmak için kullanılan bir yöntemdir. İlk olarak Danimarka'da Carlsberg laboratuvarında ortaya çıkarılan yöntem (Jacobsen vd., 1957), genellikle proteolitik reaksiyonların kontrolü için kullanılmaktadır. Bu yöntem ile hidroliz derecesi, hidroliz reaksiyonu sırasında serbest hale geçen protonların ototitrasyonu sırasında ortama ilave edilen baz miktarı ölçülerek belirlenmektedir (Adler-Nissen, 1986).

6.4.1 Materyaller

KOH çözeltisi

Hidroliz reaksiyonlarının oto titrasyonu için kullanılan 0.5 M KOH çözeltisi, 28 g KOH kristalini 1000 mL saf suda çözerek hazırlanmıştır.

6.4.2 Hidroliz derecesinin hesaplanması

Hidroliz derecelerinin hesaplanmasında aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır. Yöntem için örnek bir hesaplama Ekler bölümünde Ek 1'de verilmiştir.

$$HD = B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{P_M} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100\% \quad (6.1)$$

B : Baz miktarı

N_b : Baz normalitesi

α : α -NH gruplarının ortalama ayrılma sabiti

P_M : Protein miktarı (g)

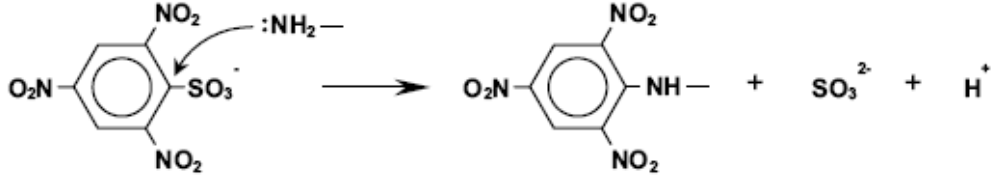
h_{tot} : Toplam peptid bağları (meqv/g protein)

HD : % Hidroliz derecesi

6.5 TNBS Yöntemi ile Serbest Amino Gruplarının Belirlenmesi

Trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) yöntemi, serbest amino gruplarının konsantrasyonunu belirlemek amacıyla endüstride en yaygın kullanılan yöntemdir. Enzimatik hidroliz

reaksiyonları konusunda geçerliliği ispatlanmış olan bu yöntem, ilk olarak Okuyama ve Satake (1960), Satake vd. (1960) tarafından kullanılmış, daha sonra Adler-Nissen (1979) tarafından yenilenmiştir.



Şekil 6.2 TNBS'in amino grupları ile reaksiyonu (Adler-Nissen, 1979)

TNBS metodu, TNBS ile pirimer amino gruplarının arasındaki reaksiyon (Şekil 6.2) sonucu ortaya çıkan kromofor'un (Chromophore) spektrofotometrik ölçümüne dayalı bir yöntemdir. Bu reaksiyon hafif alkali ortamda gerçekleşir ve pH değeri düşürülerek sonlandırılır. Reaksiyon sonucu kromoforun ışık absorblayıcı özelliği nedeni ile açık sarı bir renk oluşur. Absorbans veya optik yoğunluk olarak ölçülen bu rengin şiddeti, çözeltide bulunan serbest amino asit konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. TNBS ışığa duyarlı olduğu için reaksiyon ışık almayan ortamda gerçekleştirilmelidir.

6.5.1 Materyaller

TNBS çözeltisi

% 0.1'lik (ağırlık/hacim) trinitrobenzen sülfonik asit dihidrat (TNBS) çözeltisi, % 5'lik (ağırlık/hacim) olarak temin edilen TNBS çözeltisinin saf su ile seyreltilmesi ile kullanımdan hemen önce hazırlanmıştır. Çözeltiyi ışıktan korumak için çözeltinin hazırlandığı balon joje alüminyum folyo ile kaplanmıştır.

Sodyum fosfat tampon çözeltisi

0.2125 M alkali fosfat tampon çözeltisi hazırlamak için, % 3.32'lik (ağırlık/hacim) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi, pH değeri 8.2 değerine ulaşmaya kadar yavaşça % 3.78'lik (ağırlık/hacim) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisine ilave edilmiştir (hacimsel oran yaklaşık olarak 43:1000). % 3.32'lik (ağırlık/hacim) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve % 3.78'lik (ağırlık/hacim) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltileri, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kristallerini saf suda çözerek hazırlanmıştır.

Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi

% 1'lik (ağırlık/hacim) SDS çözeltisi, sodyum dodesil sülfat kristallerini saf suda çözerek hazırlanmıştır.

Hidroklorik asit çözeltisi

0.1 M HCl çözeltisi, 1 M'lık HCl çözeltisinin saf su ile seyreltilmesi ile hazırlanmıştır.

Lösin standartı

1.5 mM lösin standartı, lösin kristallerini % 1'lik (ağırlık/hacim) SDS çözeltisinde çözerek hazırlanmıştır.

6.5.2 Yöntem

Reaksiyon çözeltisinden belirli zaman aralıkları ile alınan hidrolizat örnekleri, enzim inaktive edildikten ve santrifüjlendikten sonra, amino grup konsantrasyonları 0.25-2.5 mM aralığında olacak şekilde % 1'lik SDS ile seyreltilmiştir. Daha sonra 0.25 mL'lik örnekler deney tüplerine alınarak üzerlerine 2 mL 0.2125 M sodyum fosfat tampon (pH 8.2) ve 2 mL % 0.1'lik trinitrobenzen sülfonik asit ilave edilerek karanlık ortamda 50°C sıcaklıkta 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Reaksiyon deney tüplerine 4 mL 0.1 N HCl ilave edilerek durdurulmuş ve örneklerin absorbans değerleri 340 nm'de kontrol çözeltisine karşı okunmuştur. Kontrol çözeltisi için 0.25 mL hidrolizat örneği yerine 0.25 mL % 1'lik SDS kullanılmıştır. Standart olarak 1.5 mM L-lösin kullanılmıştır. Analizler 3'er kez tekrar edilmiş ve elde edilen değerlerin ortalamaları alınmıştır. Tekrarlanan analizler arasındaki maksimum fark \pm % 5 sınırlıdır.

6.5.3 Hesaplamalar

Lösin amino eşdeğeri, lösin-NH₂ (meqv/g protein) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. Yöntem için örnek bir hesaplama Ekler bölümünde Ek 2'de verilmiştir.

$$l\ddot{o}sin-NH_2(meqv/g) = \frac{(Abs_{\ddot{o}rnek})}{(Abs_{standart})} \times C_{standart} \times SF \times \frac{1}{P_M} \quad (6.2)$$

Abs: Absorbans değerleri

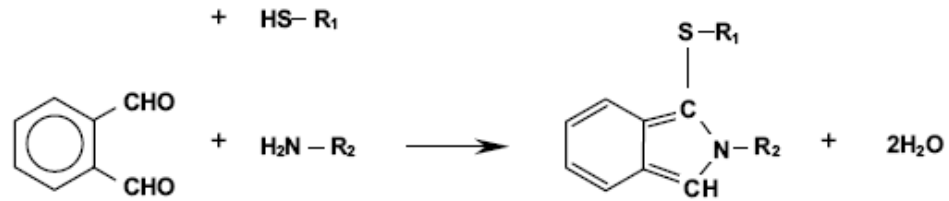
C_{standart} : standart olarak kullanılan lösin konsantrasyonu (meqv/L)

SF : Seyrelme faktörü

P_M : Çözeltideki toplam protein miktarı (g/L)

6.6 OPA Yöntemi ile Serbest Amino Gruplarının Belirlenmesi

Nielsien vd. (2001) tarafından, TNBS yöntem ve metodolojisi temel alınarak geliştirilen O-fitaldialdehit (OPA) yöntemi, serbest amino gruplarının konsantrasyonunu belirlemek amacıyla kullanılan yeni bir yöntemdir. Yöntemi TNBS yöntemininden farklı kılan nokta içerdiği kimyasal reaksiyondur. OPA ve serbest amino grupları arasındaki reaksiyon, TNBS yerine beta-merkaptolan varlığında gerçekleşir (Şekil 6.3). Bu reaksiyonda OPA'nın birincil amino grupları ve SH-bileşikleri (dithiothreitol, DTT) ile etkileşmesi sonucunda, 340 nm de ışık absorblayan renkli bir bileşik meydana gelir. Absorbans veya optik yoğunluk olarak ölçülen rengin şiddeti, çözeltide bulunan serbest amino asit konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.



Şekil 6.3 OPA reaksiyonu (Nielsen vd., 2001)

6.6.1 Materyaller

OPA ayracı

7.62 g disodyum tetraborat dekahidrat ve 200 mg sodyum dodesil sülfat (SDS) 150 mL deiyonize suda çözülmüştür. 160 mg O-fitaldialdehit, 4 mL etanolde çözüldükten sonra bu karışıma ilave edilmiştir. 176 mg dithiothreitol de (DTT) karışıma ilave edildikten sonra karışım 200 mL'ye tamamlanmıştır.

Serin standartı

0.9516 mM, serin standartı, serin kristallerini saf suda çözerek hazırlanmıştır.

6.6.2 Yöntem

Reaksiyon çözeltisinden belirli zaman aralıkları ile alınan hidrolizat örnekleri, enzim inaktive edildikten ve santrifüjlendikten sonra toplam protein içeriği % 0.1-1 (ağırlık/hacim) olacak şekilde saf su ile seyreltilmiştir. Daha sonra, 400 µL'lik örnekler deney tüplerine alınarak üzerlerine 3 mL OPA ayırıcı ilave edilmiş ve çözelti 5 saniye karıştırılmıştır. Tam olarak 2 dakika sonunda örneklerin absorban değerleri 340 nm'de kontrol çözeltisine karşı okunmuştur. Kontrol çözeltisi için 400 µl hidrolizat örneği yerine 400 µl su, standart için ise hidrolizat örneği yerine 400 µl 0.9516 mM'lık Serin çözeltisi kullanılmıştır. Analizler 3'er kez tekrar edilmiş ve elde edilen değerlerin ortalamaları alınmıştır. Tekrarlanan analizler arasındaki maksimum fark \pm % 5 sınırlıdır.

6.6.3 Hesaplamalar

Serin amino eşdeğeri, serin-NH₂ (meqv/g protein) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. Yöntem için örnek bir hesaplama Ekler bölümünde Ek 2'de verilmiştir.

$$\text{serin} - \text{NH}_2 (\text{meqv} / \text{g}) = \frac{(Abs_{\text{örnek}})}{(Abs_{\text{standart}})} \times C_{\text{standart}} \times SF}{P_M} \quad (6.3)$$

Abs: Absorbans değerleri

C_{standart} : standart olarak kullanılan serin konsantrasyonu (meqv/L)

SF: Seyrelme faktörü

P_M: Çözeltideki toplam protein miktarı (g/L)

6.7 Folin Lowry Yöntemi ile Çözünen Protein Miktarının Belirlenmesi

İlk olarak Lowry vd. tarafından 1951 yılında tanımlanan, Lowry yöntemi protein analizi için yaygın olarak kullanılan, en değerli yöntemlerden biridir. Renk ölçümüne dayalı olan bu metod iki farklı reaksiyon adımı içerir (Lowry vd., 1951);

1. Bakır iyonu ile amid bağı arasında oluşan kompleks sonucu alkali ortamda indirgenmiş bakır, Cu⁺, oluşur.
2. Folin-Ciocalteu maddesi triozin ve triptofan maddeleri ile indirgenir. İndirgenen Folin-

Ciocalteu maddesi mavi renk verir.

Protein miktarları, 500-750 nm dalga boyu aralığında indirgenen Folin-Ciocalteu maddesinin renk şiddeti değerleri okunarak belirlenir.

6.7.1 Materyaller

A ayıracı

20 g Na₂CO₃, 1 L'lik 0.1 N NaOH çözeltisinde çözülerek hazırlanmıştır.

B ayıracı

0.5 g CuSO₄.5H₂O, 100 mL'lik % 1'lik (ağırlık/hacim) sodyum tartarat çözeltisinde çözülerek hazırlanmıştır.

C ayıracı

Kullanımdan hemen önce, 100 mL A ayıracı ile 2 mL B ayıracı karıştırılarak hazırlanmıştır.

D ayıracı

Folin-Ciocalteu Lowry maddesinin 1:1 oranında saf su ile seyreltilmesi ile hazırlanmıştır. Hazırlanan D ayıracı kullanıma kadar koyu bir şişede buzdolabında saklanmıştır.

Potasyum fosfat tampon çözeltisi

pH değeri 7 olan 25 mM fosfat tampon çözeltisi hazırlamak için, 2.105 g KH₂PO₄ ile 2.174 g K₂HPO₄.3H₂O 900 mL saf suda çözülmüştür. Daha sonra 5 N KOH çözeltisi kullanılarak çözeltinin pH değeri 7'ye ayarlanmış ve hacmi 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

6.7.2 Yöntem

Reaksiyon çözeltisinden belirli zaman aralıkları ile alınan hidrolizat örnekleri, enzim inaktive edildikten ve santrifüjlendikten sonra toplam protein içeriği 0.4 g/L'yi geçmeyecek şekilde fosfat tamponu ile seyreltilmiştir. Daha sonra deney tüplerine alınan 1 mL'lik örneklerin üzerine 5 mL C ayıracı ilave edilerek örnekler 10 dakika 25°C sıcaklıkta bekletilmiştir. 10 dakika sonunda deney tüplerine 0.5 mL D ayıracı ilave edilmiş ve örnekler 30 dakika 25°C'de inkübe edildikten sonra absorbans değeri 750 nm'de referans çözeltisine karşı okunmuştur. Referans çözeltisi örnekle aynı şekilde, 1 mL örnek yerine 1 mL fosfat tampon kullanılarak hazırlanmıştır. Analizler 3'er kez tekrar edilmiş ve elde edilen değerlerin ortalamaları alınmıştır. Tekrarlanan analizler arasındaki maksimum fark \pm % 5 sınırlıdır.

6.7.3 Hesaplamalar

Yöntem için standart eğrinin hazırlanması

Çözünen protein miktarının tayini için, sığır serum albumini (BSA) fosfat tampon çözeltisinde çözülerek belirli konsantrasyonlarda hazırlanmış ve standart olarak kullanılmıştır. Hazırlanan BSA çözeltilerinin konsantrasyon değerleri ve bu değerlere karşılık 750 nm dalga boyunda okunan absorbans değerleri Çizelge 6.3’de, ortalama absorbans değerlerine karşı çizilen standart eğri Şekil 6.4’de verilmiştir.

Protein konsantrasyonu hesaplamak için kullanılan denklem lineer regresyon analizi sonucunda;

$$C \text{ (g/L)} = 0.4501 \times (\text{Absorbans değeri}) - 0.0217 \quad (6.4)$$

olarak belirlenmiştir. Elde edilen denklem için standart sapma (σ) ve regresyon katsayısı (R^2) değerleri sırasıyla 0.0105 ve 0.9966 olarak bulunmuştur.

Protein çözünürlüğü ($X_{PÇ}$);

$$X_{PÇ} = \frac{C_t - C_0}{C_{Toplam} - C_0} \quad (6.5)$$

C_t : herhangi bir zamandaki protein konsantrasyonu (g/L)

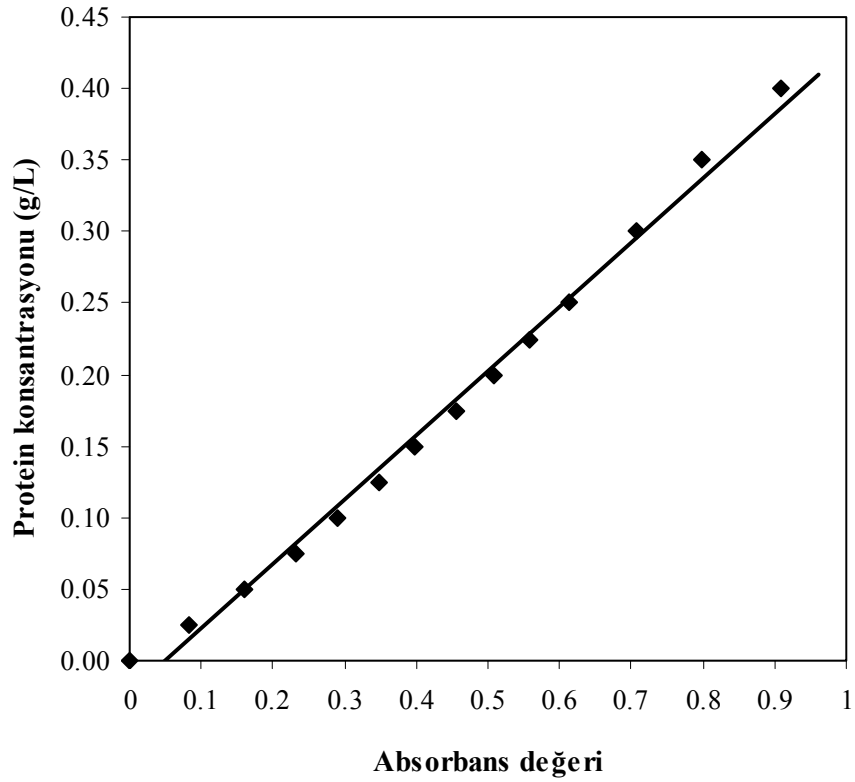
C_0 : hidroliz öncesi ortamda bulunan çözülmüş protein miktarı (g/L)

C_{Toplam} : toplam protein konsantrasyonu (g/L)

olarak tanımlanmıştır. Yöntem için örnek bir hesaplama Ekler bölümünde Ek 3’de verilmiştir.

Çizelge 6.3 Folin Lowry yöntemi için standart eğri verileri

BSA Kons. (mg/mL)	Deneme 1 Absorbans	Deneme 2 Absorbans	Deneme 3 Absorbans	Ortalama Absorbans
0	0	0	0	0
0.025	0.081	0.079	0.089	0.083
0.050	0.161	0.156	0.160	0.159
0.075	0.224	0.235	0.234	0.231
0.100	0.288	0.291	0.293	0.291
0.125	0.347	0.356	0.344	0.349
0.150	0.392	0.403	0.398	0.398
0.175	0.446	0.456	0.464	0.455
0.200	0.508	0.508	0.511	0.509
0.225	0.562	0.567	0.547	0.559
0.250	0.609	0.619	0.615	0.614
0.300	0.714	0.706	0.704	0.708
0.350	0.792	0.799	0.807	0.799
0.400	0.909	0.906	0.915	0.910



Şekil 6.4 Folin Lowry yöntemi için oluşturulan standart eğri

6.8 Enzim Aktivite Tayini

Literatürde proteolitik aktivite tayini için kullanılan birçok yöntem mevcuttur. Genel olarak bu yöntemlerde aktivite tayini için kullanılan substratlar kazein, hemoglobin ve azokazeindir (Tomarelli vd., 1949; Sarath vd., 1989; Aikat ve Bhattacharyya, 2000; Ferreira vd., 2003; Barros ve Malcata, 2004; Novozymes' Analytical method). Kazeinin veya hemoglobinin kullanıldığı aktivite tayin yöntemlerinde enzimin substratla inkübasyonundan sonra açığa çıkan protein miktarı Lowry (Lowry vd., 1951) veya Bradford (Bradford, 1976) yöntemleri ile tayin edilmekte olup enzim aktivitesi buna göre belirlenmektedir. Ancak, bu çalışmada reaksiyon çözeltisinden alınan örnekler saf enzim çözeltileri olmadığı, aynı zamanda çözünmüş mısır proteini de içerdiğinden, yapılan deneysel çalışmalar göstermiştir ki, bu iki substratın (kazein ve hemoglobin) kullanıldığı yöntemler, enzim çözeltisi için inkübasyon öncesi protein analizi yapıp fark alınsa bile sağlıklı sonuçlar vermemektedir.

Azokazein, kazeine turuncu sülfanilamid gruplarının bağlanması ile modifiye edilmiş bir proteindir. Azokazeinin substrat olarak kullanıldığı yöntemlerde, enzim aktivitesi inkübasyon sonunda azokazeinin parçalanması ile serbest hale geçen sülfanilamid grupları sonucunda açığa çıkan turuncu renk yoğunluğuna göre belirlenmektedir (Tomarelli vd., 1949).

Yapılan ön denemeler sonucunda, Alcalase enziminin değişen reaksiyon koşullarında stabilitesini belirleyebilmek ve enzimin inaktivasyon kinetiğini incelemek amacıyla, Azokazein yöntemi bu çalışma için en uygun yöntem olarak seçilmiştir. Çalışmada Tomarelli vd. (1949) tarafından tanımlanan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır.

6.8.1 Materyaller

Sodyum fosfat tampon çözeltisi

7.4 pH değerine sahip 0.1 M fosfat tampon çözeltisi hazırlamak için, % 1.56'lık (ağırlık/hacim) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi, pH değeri kontrol edilerek yavaşça % 1.78'lik (ağırlık/hacim) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisine ilave edilmiştir (hacimsel oran yaklaşık olarak 1:4). % 1.56'lık (ağırlık/hacim) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 1.78'lik (ağırlık/hacim) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltileri, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kristallerini saf suda çözerek hazırlanmıştır.

Azokazein çözeltisi

% 2'lik (ağırlık/hacim) azokazein çözeltisi, azokazeini, 7.4 pH değerine sahip 0.1 M fosfat tamponda çözerek hazırlanmıştır.

TCA (Trikloroasetik asit) çözeltisi

% 10'luk (ağırlık/hacim) TCA çözeltisi, TCA kristallerini saf suda çözerek hazırlanmıştır.

NaOH çözeltisi

1 M NaOH çözeltisi, % 4 ağırlık/hacim oranında NaOH'i saf suda çözerek hazırlanmıştır.

6.8.2 Yöntem

Belirlenen zaman aralıklarında reaktörden alınan örnekler santrifüjlendikten sonra, ele geçen supernatant çözeltisi 0.1 N fosfat tampon (pH 7.4) çözeltisi ile seyreltilmiştir. Daha sonra, 0.5 mL'lik örnekler deney tüplerine alınmış ve 1.5 mL azokazein çözeltisi ilavesi ile 40°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon, deney tüplerine 2 mL % 10'luk (ağırlık/hacim) TCA ilavesi ile sonlandırılmıştır. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilen örnekler 5 dakika santrifüjlendikten sonra, supernatant çözeltisinden alınan 2 mL'lik örnekler 2 mL 1 N NaOH ilave edilerek absorbans değerleri 440 nm'de referans çözeltisine karşı okunmuştur. Referans çözeltisi örnekle aynı şekilde hazırlanmıştır, ancak seyreltilmiş enzim örneklerine azokazein çözeltisinden önce TCA ilave edilmiştir. Örnek analizleri 3'er kez tekrar edilmiş ve elde edilen değerlerin ortalamaları alınmıştır. Tekrarlanan analizler arasındaki maksimum fark \pm % 5 sınırlıdır.

6.8.3 Hesaplamalar

Yöntem için standart eğrinin hazırlanması

Aktivite tayini için, Alcalase enzimi fosfat tamponu ile seyreltilerek belirli ünite değerlerinde hazırlanmış ve standart olarak kullanılmıştır. Hazırlanan enzim çözeltilerinin aktivite değerleri ve bu değerlere karşılık aktivite tayin yöntemi sonucunda 440 nm dalga boyunda okunan absorbans değerleri Çizelge 6.4'de verilmiş, ortalama absorbans değerlerine karşı çizilen aktivite değerleri Şekil 6.5'de sunulmuştur.

Lineer regresyon analizi sonucunda aktivite hesabı için kullanılan denklem;

$$a \text{ (AU/L)} = 2.3443 \times (\text{Absorbans değeri}) + 0.0407 \quad (6.6)$$

olarak belirlenmiştir. Elde edilen denklem için standart sapma (σ) ve regresyon katsayısı (R^2)

değerleri sırasıyla; 0.0342 ve 0.9982 olarak bulunmuştur.

% Aktivite değeri,

$$A = 100 \times \frac{a_t}{a_0} \quad (6.7)$$

a_0 : t=0 anındaki enzimin aktivitesi (AU/L)

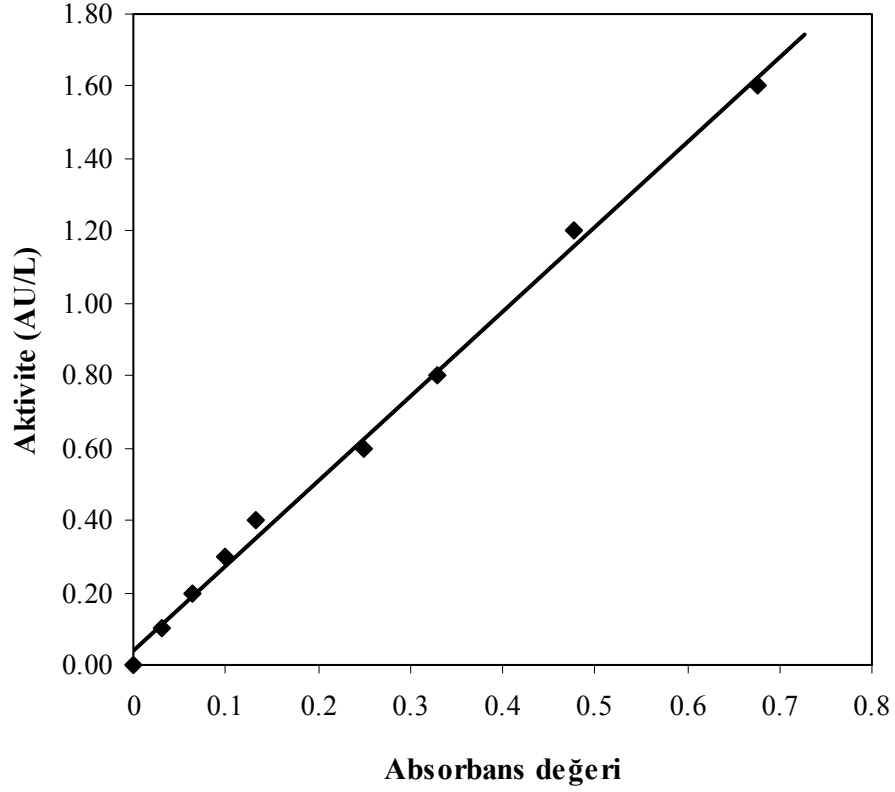
a_t : herhangi bir zamandaki enzim aktivitesi (AU/L)

A : herhangi bir zamandaki % enzim aktivitesi

olarak tanımlanmıştır. Yöntem için örnek bir hesaplama Ekler bölümünde Ek 4'de verilmiştir.

Çizelge 6.4 Aktivite tayini için standart eğri verileri

Enzim Aktivitesi (AU/L)	Deneme 1 Absorbans	Deneme 2 Absorbans	Deneme 3 Absorbans	Ortalama Absorbans
0	0	0	0	0
0.1	0.037	0.030	0.028	0.032
0.2	0.067	0.069	0.060	0.065
0.3	0.102	0.091	0.105	0.099
0.4	0.130	0.146	0.122	0.133
0.6	0.262	0.251	0.236	0.250
0.8	0.324	0.347	0.320	0.330
1.2	0.493	0.476	0.462	0.477
1.6	0.685	0.679	0.664	0.676



Şekil 6.5 Aktivite tayini için oluşturulan standart eğri

6.9 Aminoasit Kompozisyon Analizi

Mısır gluteninin ve deneyler sonucunda elde edilen hidrolizat çözeltilerinin aminoasit kompozisyon analizleri TÜBİTAK tarafından, Phenomenex EZ Faast GC-FID amino asit analiz kiti ve Varian GC, CP-3800GC cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

6.10 SEM Analizleri

Örneklerin SEM analizleri, TÜBİTAK tarafından Jeol-JSM 840 tarayıcı mikroskobu kullanarak gerçekleştirilmiştir.

6.11 Teorik çalışma

Nümerik hesaplamalar için MATLAB 5.0 programı kullanılmıştır. Marquardt-Levenberg metodu (Levenberg, 1944; Marquardt, 1963) kullanılarak deneysel veriler ile teorik veriler arasında minimum farkı veren parametreler hesaplanmıştır. Deneysel veriler ile teorik

verilerin farkına eşit olan SSR istatistik değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$SSR = \sum_{m=1}^{N_d} (C_m^{göz.} - C_m^{hes.})^2 \quad (6.7)$$

Burada, N_d toplam veri sayısıdır. Standard sapma, σ , aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

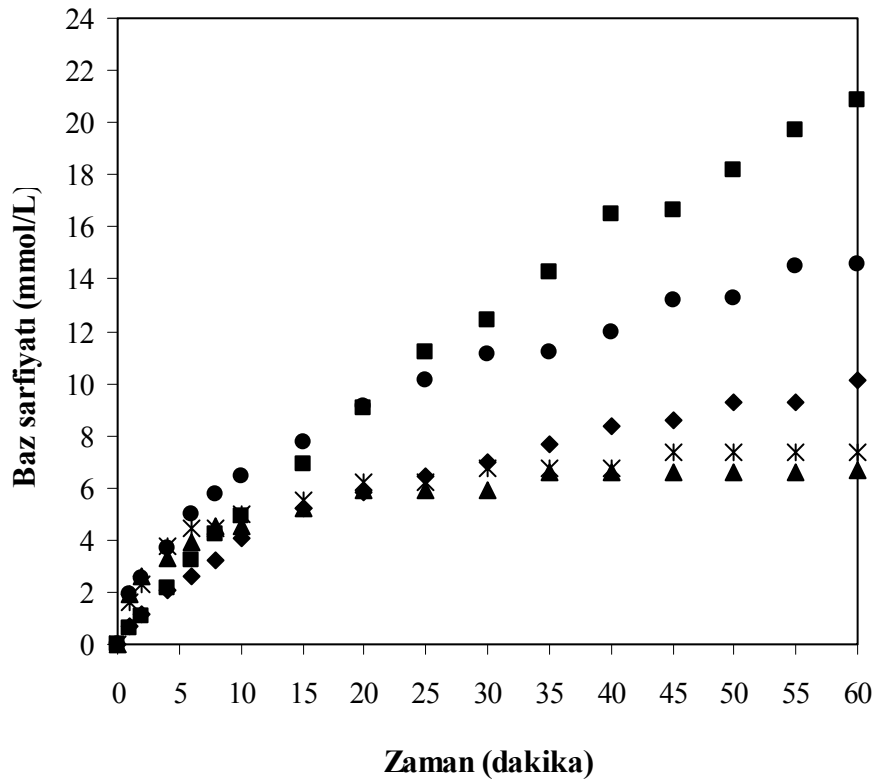
$$\sigma^2 \approx s^2 = (SSR)_{min} / (m-p) \quad (6.8)$$

Burada, p parametre sayısı ve s^2 varyanstır.

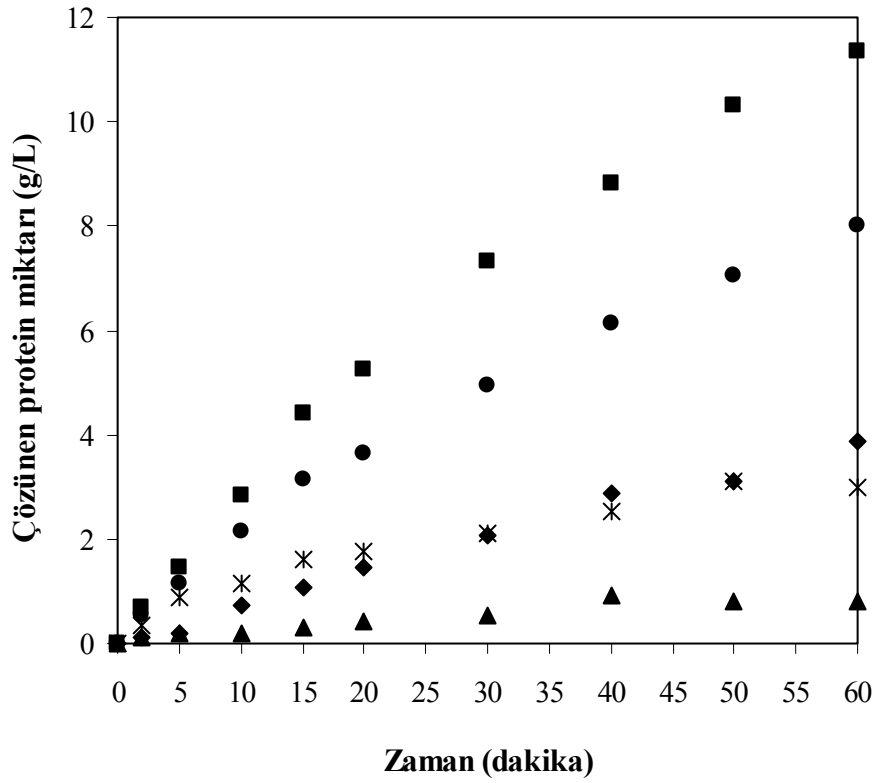
7. ARAŞTIRMA BULGULARI

7.1 Hidroliz Reaksiyonu İçin Uygun Enzimin Seçimi

Mısır glutenin hidroliz reaksiyonunun optimizasyonunda kullanılacak uygun enzimi belirleyebilmek amacıyla beş ticari proteaz enzimi ile ön denemeler gerçekleştirilerek, enzimlerin mısır gluteninin hidrolizi ve çözünürlüğü üzerindeki etkinlikleri incelenmiştir. Ön denemeler için seçilen proteaz enzimleri Alcalase, Neutrase, Flavourzyme, Protamex ve PTN'dir. Ön denemeler tüm enzimler için belirtilen sıcaklık ve pH çalışma aralıkları göz önünde bulundurularak, 50°C sıcaklıkta ve pH 7 değerinde gerçekleştirilmiştir. 20 g protein/L substrat içeren 200 mL çözelti eşit ünite de enzim ilavesi (0.35 AU/g protein) ile 60 dakika süresince reaksiyona tabi tutularak, baz sarfiyatları ve çözünen protein miktarları zamana bağlı olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 7.1 ve 7.2'de grafiksel olarak sunulmuştur.



Şekil 7.1 Farklı enzimler için zamana karşılık elde edilen baz sarfiyatı değerleri, T= 50°C, pH= 7, S= 20 g protein/L, E= 0.35 AU/g protein (▲ Flavourzyme, ⋈ PTN, ◆ Neutrase, ● Protamex, ■ Alcalase)



Şekil 7.2 Farklı enzimler için zamana karşı elde edilen çözünen protein miktarları, T= 50°C, pH= 7, S= 20 g protein/L, E= 0.35 AU/g protein (▲ Flavourzyme, ⋈ PTN, ◆ Neutralse, ● Protamex, ■ Alcalase)

Grafikler incelendiğinde Alcalase enziminin; mısır glutenin hidroliz ve çözünlüğünde, diğer enzimlerden daha etkin olduğu açıkça görülmektedir. Alcalase enzimi için 60 dakika sonunda elde edilen baz sarfiyatı ve çözünen protein miktarı değerleri sırası ile 20.83 mmol/L ve 11.35 g/L'dir. Elde edilen deneysel veriler sonucunda en yüksek etkinliğe sahip olan Alcalase enziminin, mısır gluteninin enzimatik hidrolizinin optimizasyonu için gerçekleştirilecek olan diğer tüm deneylerde kullanımına karar verilmiştir.

7.2 pH-Stat Kalibrasyonu

pH-Stat yönteminde hidroliz derecesi, hidroliz reaksiyonu sırasında serbest hale geçen protonların ototitrasyonu için ortama ilave edilen baz miktarından direkt olarak, daha önce Bölüm 6.4.2'de verilmiş olan Eşitlik 6.1 kullanılarak hesaplanır. Ancak hidroliz derecesinin doğru bir şekilde hesaplanabilmesi için pH-stat'ın kalibre edilmesi gerekir.

$$HD = B \times N_b \times \frac{I}{\alpha} \times \frac{I}{P_M} \times \frac{I}{h_{tot}} \times 100\% \quad (6.1)$$

Eşitlik 6.1'deki α terimi pH-stat yöntemi için kalibrasyon faktörüdür ve aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanır.

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad (7.1)$$

Eşitlik 7.1'den de görüldüğü gibi pH-stat kalibrasyonu, hidrolizatlar için pK değerinin belirlenmesidir. Amino asit grupları için pK değeri sabit değildir. Amino asit özelliği, peptid zincir uzunluğu ve sıcaklıkla değişmektedir (Adler-Nissen, 1986).

Bu çalışmada, pH-stat kalibrasyonu için Adler-Nissen (1986) tarafından tanımlanan yöntem kullanılmıştır. Yöntemde hidroliz reaksiyonu süresince pK değerinin sabit olduğu kabul edilir. Hidroliz reaksiyonu süresince, hem baz sarfiyatındaki artış, hem de serbest amino gruplarının konsantrasyonlarındaki artış, hidroliz derecesi ile doğru orantılıdır. Bu nedenle, baz sarfiyatı ile serbest hale geçen amino grupları arasında lineer bir ilişki söz konusudur. Dolayısı ile kalibrasyon, hidrolizat örneklerinde bulunan serbest amino grup konsantrasyonu ile baz sarfiyatı arasındaki lineer ilişkiyi belirlemek sureti ile gerçekleştirilir.

Bir referans sıcaklık seçilerek, bu sıcaklıkta farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen deneyler için baz sarfiyatı ve serbest amino grup konsantrasyonu arasındaki lineer ilişki belirlendikten sonra, elde edilen doğruların eğimlerden yararlanılarak pK değerleri, Eşitlik 7.2 kullanılarak hesaplanabilir. Eşitlik 7.2'nin türetilişi Çizelge 7.1'de verilmiştir (Adler-Nissen, 1986; Dzwolak ve Ziajka, 1999; Karamac vd., 2002; Camacho vd., 2001).

$$pK = pH_2 + \log(e_1 - e_2) - \log(10^{pH_2-pH_1} \times e_2 - e_1) \quad (7.2)$$

e : eğim

$pH_2 > pH_1$ olmalıdır.

Çizelge 7.1 Eşitlik 7.2'nin türetilişi (Adler-Nissen, 1986)

pH-Stat için: $dB = \alpha \times dh$

TNBS reaksiyonu için: $d(\text{lösin-NH}_2) = k \times dh$

Eğim, e

$$e = \frac{d(\text{lösin-NH}_2)}{dB} = k \times \alpha^{-1}$$

$$\alpha^{-1} = 1 + 10^{pK-pH}$$

İki farklı pH değeri için, $pH_2 > pH_1$:

$$e_1 - e_2 = k \times (10^{pK-pH_1} - 10^{pK-pH_2})$$

$$e_1 - e_2 = k \times 10^{pK-pH_2} \times (10^{pH_2-pH_1} - 1) \quad (a)$$

ve

$$e_2 \times 10^{pH_2-pH_1} - e_1 = k \times (10^{pH_2-pH_1} + 10^{pK-pH_1} - 1 - 10^{pK-pH_1})$$

$$e_2 \times 10^{pH_2-pH_1} - e_1 = k \times (10^{pH_2-pH_1} - 1) \quad (b)$$

denklemleri elde edilir.

a denklemi, b denkleme bölüldüğünde;

$$\frac{e_1 - e_2}{10^{pH_2-pH_1} \times e_2 - e_1} = 10^{pK-pH_2} \quad (c)$$

c denkleminin logaritması alındığında;

$$pK = pH_2 + \log(e_1 - e_2) - \log(10^{pH_2-pH_1} \times e_2 - e_1)$$

eşitliği elde edilir.

* OPA reaksiyonu için aynı denklem $d(\text{lösin-NH}_2) = k \times dh$ ifadesi yerine $d(\text{serin-NH}_2) = k \times dh$ ifadesi yerleştirilerek aynı şekilde türetilir.

Referans bir sıcaklıkta pK değeri biliniyorsa veya hesaplanmışsa, farklı bir sıcaklıktaki pK değeri, referans sıcaklıkla aynı pH değerinde ek bir deney gerçekleştirilmesi ile, aşağıdaki eşitlik (7.3) kullanılarak hesaplanabilir. Eşitlik 7.3'ün türetilişi Çizelge 7.2'de verilmiştir (Adler-Nissen, 1986).

$$pK = pH_2 + \log \left[\frac{e}{e_0} \times (1 + 10^{pK_0 - pH}) - 1 \right] \quad (7.3)$$

e ve e_0 aynı pH değerinde elde edilmelidir.

Çizelge 7.2 Eşitlik 7.3'ün türetilişi (Adler-Nissen, 1986)

Ana eşitlik: $e = k \times (1 + 10^{pK - pH})$

Standart sıcaklık T_0 'da $pK = pK_0$ ve T sıcaklığındaki pK değeri için ana eşitlik düzenlenirse:

$$e_0 = k \times (1 + 10^{pK_0 - pH}) \quad (a)$$

$$e = k \times (1 + 10^{pK - pH}) \quad (b)$$

a ve b denklemleri oranlandığında;

$$1 + 10^{pK - pH} = \frac{e}{e_0} \times (1 + 10^{pK_0 - pH})$$

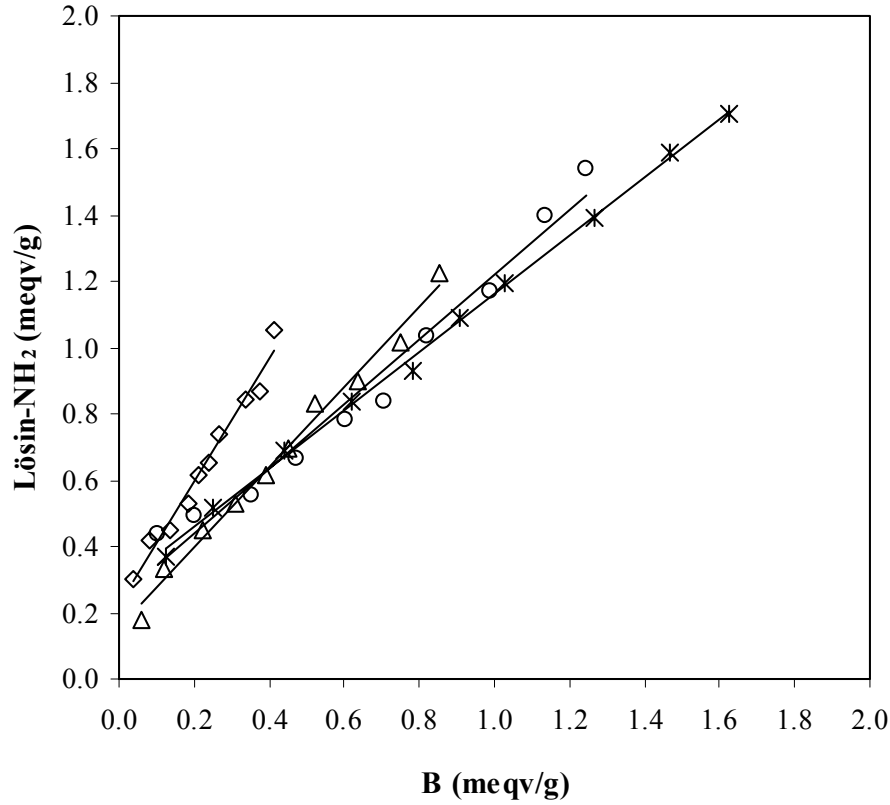
$$pK = pH + \log \left[\frac{e}{e_0} \times (1 + 10^{pK_0 - pH}) - 1 \right]$$

eşitliği elde edilir.

Bu çalışmada, referans sıcaklık 50°C olarak seçilmiş ve bu sıcaklıktaki pK değeri, pH 6.5, 7, 7.5 ve 8 değerlerinde hidroliz deneyleri gerçekleştirilerek hesaplanmıştır. Ayrıca pH 7.5 değerinde 40°C ve 60°C'de deneyler yapılmış ve referans sıcaklıkta elde edilen verilerden yararlanılarak bu sıcaklıklar için de pK değerleri hesaplanmıştır.

100 mL'lik çözelti hacminde gerçekleştirilen deneyler için sabit proses şartları; 30 g protein/L substrat konsantrasyonu, % 0.15 (hacim/hacim) enzim konsantrasyonu ve 1 saat reaksiyon süresidir. Reaksiyon sırasında baz sarfiyatı kaydedilmiş, belirli zaman aralıklarında reaksiyon çözeltisinden alınan örneklerde serbest hale geçen amino asit gruplarının analizi hem TNBS metodu, hem de OPA yöntemi ile yapılmıştır. Her iki yöntem içinde, baz sarfiyatı ile serbest

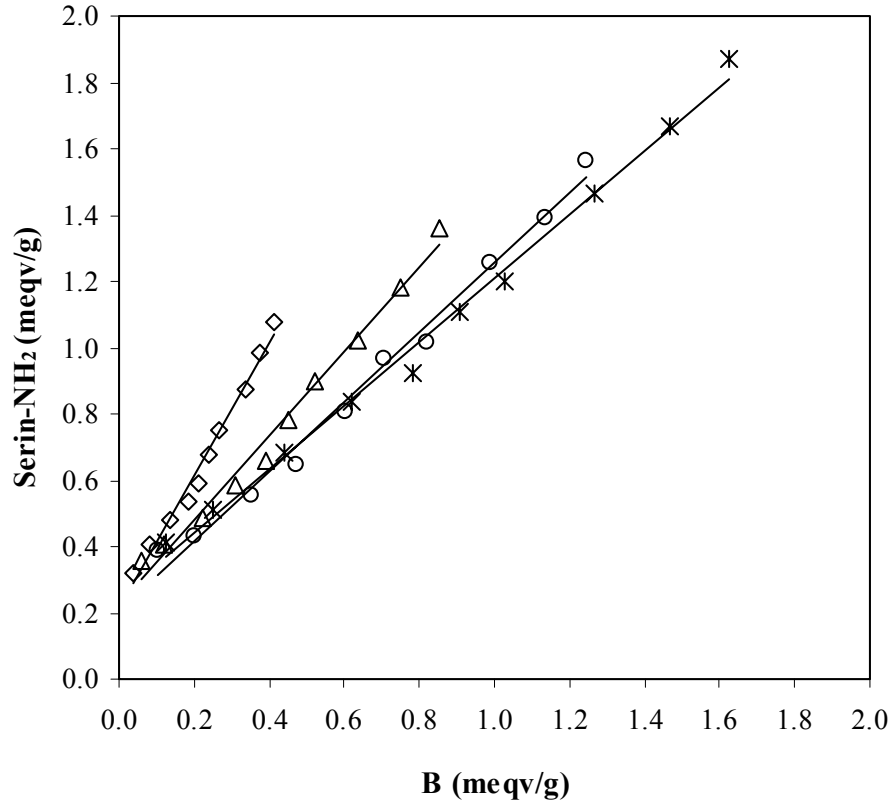
hale geçen amino asit grupları arasındaki doğrusal korelasyonun yüksek olduğu saptanmıştır. Elde edilen deneysel sonuçlar Şekil 7.3-7.6'da, deneysel verilere uyan lineer modellere ait katsayılar ve istatistiksel değerler Çizelge 7.3-7.6'da sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar kullanılarak hesaplanan pK değerleri ise Çizelge 7.7 ve 7.8'de özetlenmiştir.



Şekil 7.3 50°C'de farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için TNBS yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri, E= % 0.15 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (◇ pH 6.5, Δ pH 7, ○ pH 7.5, × pH 8, — modeller)

Çizelge 7.3 50°C'de farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için TNBS yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri için elde edilen lineer modellere ait katsayılar ve istatistiksel değerler

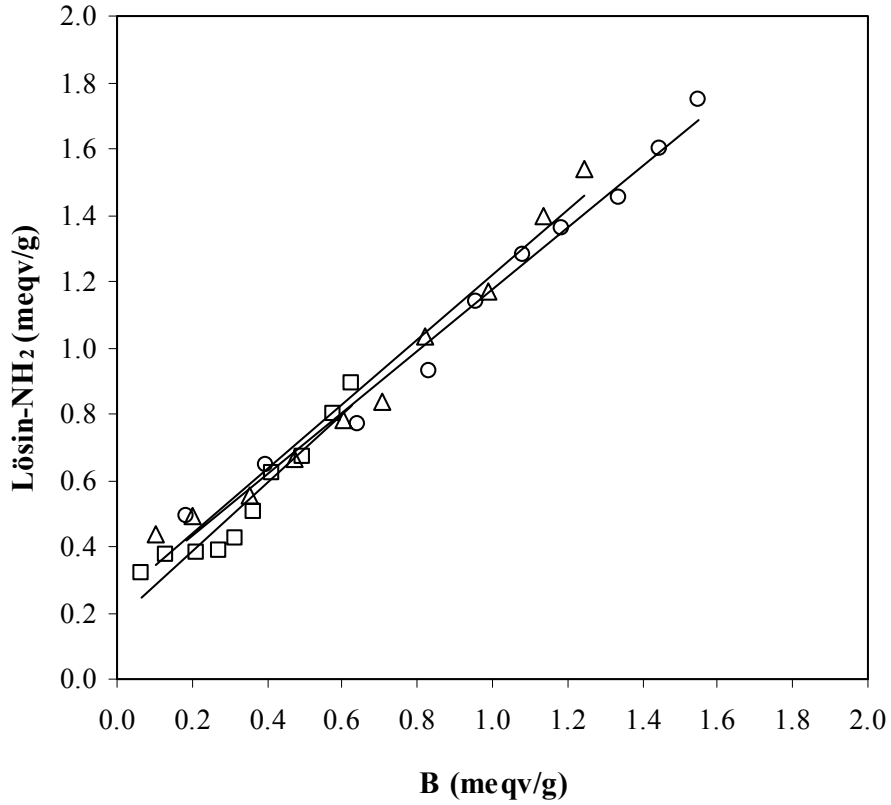
pH	Eğim (e)	Kesim noktası	Standart Sapma (σ)	R ²
6.5	1.8479	0.2257	0.0375	0.9883
7.0	1.2169	0.1514	0.0378	0.9938
7.5	0.9696	0.2471	0.0672	0.9862
8.0	0.8808	0.2805	0.0206	0.9990



Şekil 7.4 50°C’de farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için OPA yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri, E= % 0.15 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (◇ pH 6.5, Δ pH 7, ○ pH 7.5, ✖ pH 8, — modeller)

Çizelge 7.4 50°C’de farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için OPA yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri için elde edilen lineer modellere ait katsayılar ve istatistiksel değerler

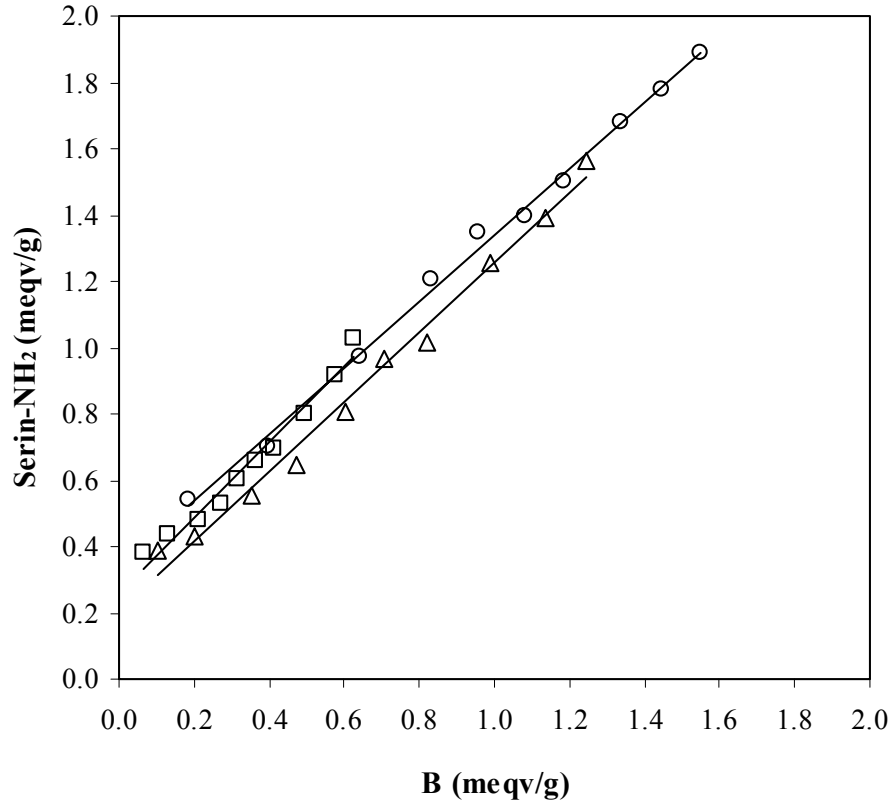
pH	Eğim (e)	Kesim noktası	Standart Sapma (σ)	R ²
6.5	2.0131	0.2111	0.0320	0.9927
7.0	1.2782	0.2232	0.0400	0.9937
7.5	1.0471	0.2068	0.0442	0.9948
8.0	0.9615	0.2482	0.0412	0.9968



Şekil 7.5 pH 7.5 değerinde farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için TNBS yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri, E= % 0.15 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (\square 40°C, Δ 50°C, \circ 60°C,— modeller)

Çizelge 7.5 pH 7.5 değerinde farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için TNBS yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri için elde edilen lineer modellere ait katsayılar ve istatistiksel değerler

Sıcaklık	Eğim (e)	Kesim noktası	Standart Sapma (σ)	R ²
40°C	1.0370	0.1780	0.0604	0.9583
50°C	0.9696	0.2471	0.0672	0.9862
60°C	0.9265	0.2516	0.0570	0.9918



Şekil 7.6 pH 7.5 değerinde farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için OPA yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri, E= % 0.15 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (\square 40°C, Δ 50°C, \circ 60°C, — modeller)

Çizelge 7.6 pH 7.5 değerinde farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için OPA yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri için elde edilen lineer modellere ait katsayılar ve istatistiksel değerler

Sıcaklık	Eğim (e)	Kesim noktası	Standart Sapma (σ)	R ²
40°C	1.1348	0.2592	0.0350	0.9877
50°C	1.0471	0.2068	0.0442	0.9948
60°C	0.9996	0.3413	0.0289	0.9982

Çizelge 7.7 50°C’de farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için Eşitlik 7.2 kullanılarak hesaplanan pK değerleri

TNBS reaksiyonu ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerlerinden elde edilen veriler kullanılarak hesaplanan değerler				
pH 1	pH 2	Eğim (e ₁)	Eğim (e ₂)	pK
6.5	7	1.8479	1.2169	6.50
7	7.5	1.2169	0.9696	6.62
7.5	8	0.9696	0.8808	6.68
6.5	7.5	1.8479	0.9696	6.55
7	8	1.2169	0.8808	6.65
6.5	8	1.8479	0.8808	6.57
ORT.				6.60
OPA reaksiyonu ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerlerinden elde edilen veriler kullanılarak hesaplanan değerler				
pH 1	pH 2	Eğim (e ₁)	Eğim (e ₂)	pK
6.5	7	2.0131	1.2782	6.56
7	7.5	1.2782	1.0471	6.56
7.5	8	1.0471	0.9615	6.63
6.5	7.5	2.0131	1.0471	6.56
7	8	1.2782	0.9615	6.57
6.5	8	2.0131	0.9615	6.57
ORT.				6.58

Çizelge 7.8 pH 7.5 değerinde farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için Eşitlik 7.3 kullanılarak hesaplanan pK değerleri

Sıcaklık	TNBS yöntemi ile elde edilen veriler için		OPA yöntemi ile elde edilen veriler için		ORT. pK
	Eğim (e)	pK	Eğim (e)	pK	
40°C	1.0370	6.81	1.1348	6.84	6.83
*50°C	0.9696	6.60	1.0471	6.58	6.59
60°C	0.9265	6.37	0.9996	6.34	6.36

*Referans sıcaklık değeri

Çizelge 7.7 ve 7.8 incelendiğinde her iki yöntemle yapılan kalibrasyon sonucunda hesaplanan pK değerlerinin birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir. Sonuç olarak, elde edilen tüm değerler göz önünde bulundurulduğunda, mısır gluteni hidrolizatları için pK değerleri; 40°C, 50°C ve 60°C sıcaklıklarda sırasıyla 6.83, 6.59 ve 6.36 olarak bulunmuştur.

Herhangi bir sıcaklıkta pK değeri biliniyorsa farklı bir sıcaklıktaki pK değeri, teorik olarak Gibbs-Helmholtz eşitliği (Eşitlik 7.4) kullanılarak da hesaplanabilir (Adler-Nissen, 1986).

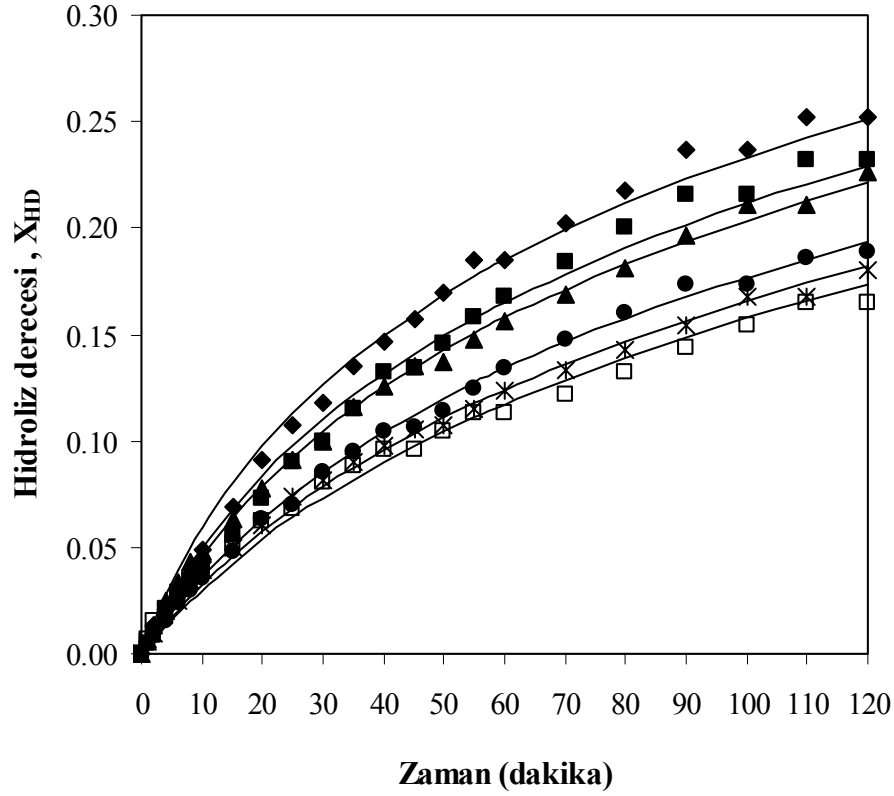
$$pK_1 - pK_2 = \frac{\Delta H^0}{2.303 \times R} \times \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right] \quad (7.4)$$

α -amino grupları için iyonlaşma entalpisi (ΔH^0) Steinhardt ve Beychok (1964) tarafından 45 KJ/mol olarak rapor edilmiştir. Bu değer Eşitlik 7.4'e yerleştirildiğinde, 40 ile 50°C için pK değerleri arasındaki farkın yaklaşık 0.23 birim, 50 ile 60°C içinse bu farkın yaklaşık 0.22 birim olması gerektiği hesaplanmaktadır. Elde edilen deneysel sonuçlar incelendiğinde (Çizelge 7.8); 40 ile 50°C'deki pK değerleri arasındaki farkın 0.24 birim, 50 ile 60°C'deki pK değerleri arasındaki farkın ise 0.23 birim olması sonuçların güvenilirliğini artırmaktadır.

7.3 Kesikli Sistemde Proses Parametrelerinin Optimizasyonu

7.3.1 Gluten konsantrasyonunun hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi

Substrat konsantrasyonunun hidroliz işlemine etkisini incelemek amacıyla hidroliz reaksiyonları 10-60 g protein/L arasında değişen farklı protein konsantrasyonlarında, % 0.25 (hacim/hacim) enzim ilavesi ile 50°C sıcaklık ve pH 7'de gerçekleştirilmiştir. 120 dakikalık reaksiyon süresi boyunca hidroliz dereceleri, protein çözünürlük dereceleri ve enzim stabiliteleri zamana bağlı olarak incelenmiş, elde edilen sonuçlar, Şekil 7.7-7.12'de grafiksel olarak sunulmuştur.



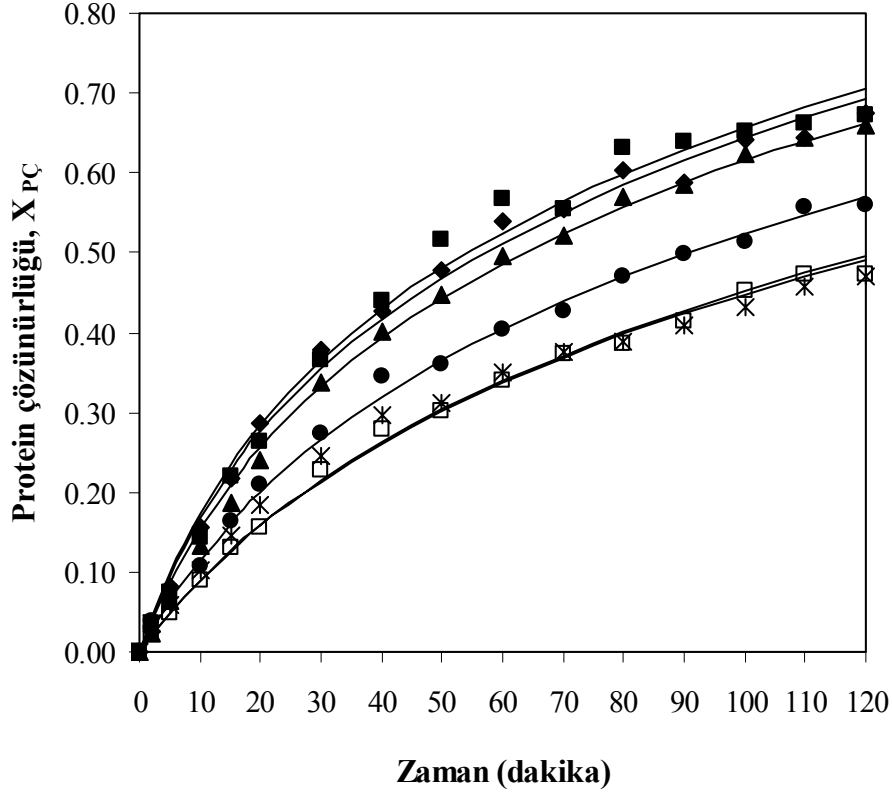
Şekil 7.7 Farklı substrat konsantrasyonları için zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, $T= 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}= 7$, $E= \% 0.25$ (hacim/hacim) (◆ 10 g protein/L, ■ 20 g protein/L, ▲ 30 g protein/L, ● 40 g protein/L, ⋈ 50 g protein/L, □ 60 g protein/L, — kinetik modeller)

Hidroliz derecesi ve protein çözünürlüğü değerlerinin substrat konsantrasyonuna bağlı değişimleri incelendiğinde (Şekil 7.7 ve 7.8), substrat konsantrasyonu artırıldığında, hidroliz reaksiyonun ve çözünürlük hızlarının, dolayısı ile hidroliz derecesi ve protein çözünürlük derecesi değerlerinde azalmış olduğu görülmektedir.

Hız profilleri incelendiğinde tüm substrat konsantrasyonları için hidroliz reaksiyonunun ve protein çözünürlüğünün başlangıçta hızlı ilerlediği daha sona yavaşlayarak azaldığı, tipik hidroliz ve çözünürlük eğrilerinin elde edilmiş olduğu görülmektedir (Şekil 7.7 ve 7.8). Hidroliz reaksiyonu ve protein çözünürlüğü hızlarındaki bu düşüş, a) enzime maruz kalan peptit bağlarının konsantrasyonunun azalması, b) hidroliz derecesinin ve çözünürlüğün başlangıç substrat konsantrasyonu arttıkça azalan limit bir değere ulaşması sonucunda oluşan yatışkın hal yaklaşımı, c) substrat ve/veya hidroliz ürünlerinden kaynaklanabilecek enzim inhibisyonu, d) enzim inaktivasyonu, sebeplerinden birine veya birkaçına bağlı olabilir.

Mısır gluteninin Alcalase enzimi ile hidrolizi için, substrat konsantrasyonunun hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisi Mannheim ve Cheryan (1992) tarafından da, % 0.125-2

(ağırlık/hacim) aralığında değişen substrat miktarları için 0.1 mg/mL enzim konsantrasyonunda, pH 9 değerinde 50°C sıcaklıkta incelenmiş ve % substrat dönüşümünün substrat konsantrasyonu ile azaldığı, hidroliz için optimum substrat/enzim oranının 20 (ağırlık/ağırlık) olduğu bildirilmiştir.

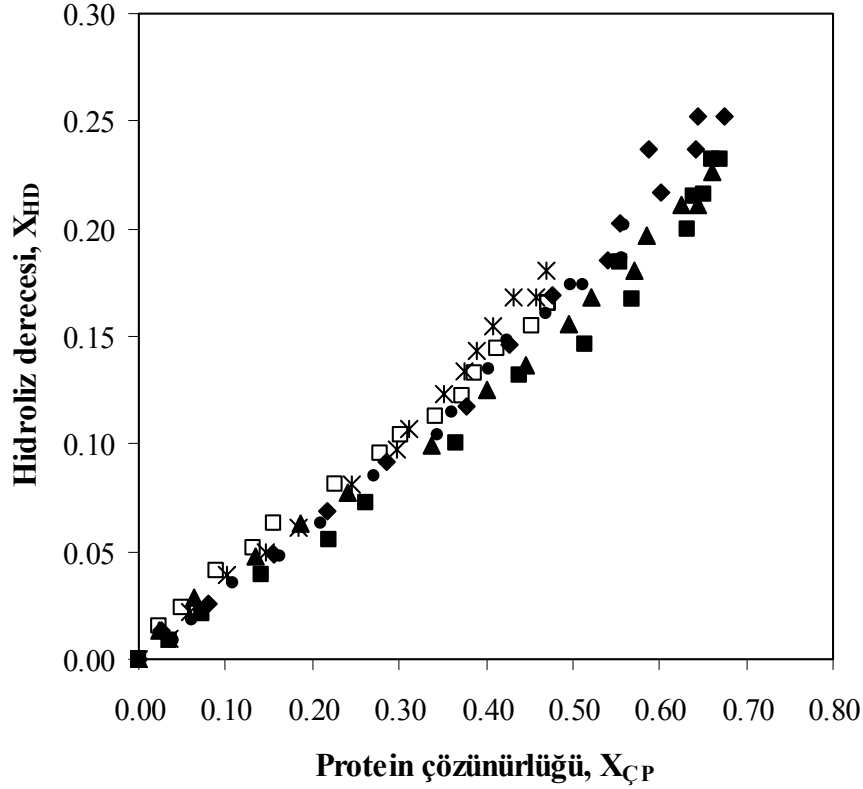


Şekil 7.8 Farklı substrat konsantrasyonları için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, $T= 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}= 7$, $E= \% 0.25$ (hacim/hacim) (◆ 10 g protein/L, ■ 20 g protein/L, ▲ 30 g protein/L, ● 40 g protein/L, ⋈ 50 g protein/L, □ 60 g protein/L, — kinetik modeller)

Hidroliz derecesi değerlerinin protein çözünürlük derecesi değerlerine bağlı değişimleri incelendiğinde (Şekil 7.9), çalışılan bütün substrat konsantrasyonu değerleri için, hidroliz derecesi değerleri ile çözünürlük değerleri arasında lineer bir ilişki olduğu ve tüm deneysel verilerin hemen hemen aynı bir doğru üzerinde buldukları görülmektedir.

Substrat konsantrasyonun enzim stabilitesine etkisi incelendiğinde (Şekil 7.10), çalışılan tüm substrat başlangıç konsantrasyonları için, enzim stabilitesinin ilk on dakikada hızlı bir düşüş gösterdiği, daha sonra ise işlem sonuna kadar yaklaşık olarak % 55 değerinde sabit kaldığı saptanmıştır. Bu nedenle ilk on dakikada güçlü bir substrat inaktivasyonunun meydana geldiği

düşünülebilir. Ancak çalışılan tüm substrat konsantrasyonları için inaktivasyon düzeyinin yaklaşık olarak aynı olduğu saptanmıştır. Bu durumda; 10 g protein/L başlangıç substrat konsantrasyonunun enzim bozunmasına sebep olabilecek aşırı değer olduğu ve bu konsantrasyon üzerindeki değerlerin daha fazla bir inaktivasyona neden olmadığı söylenebilir.

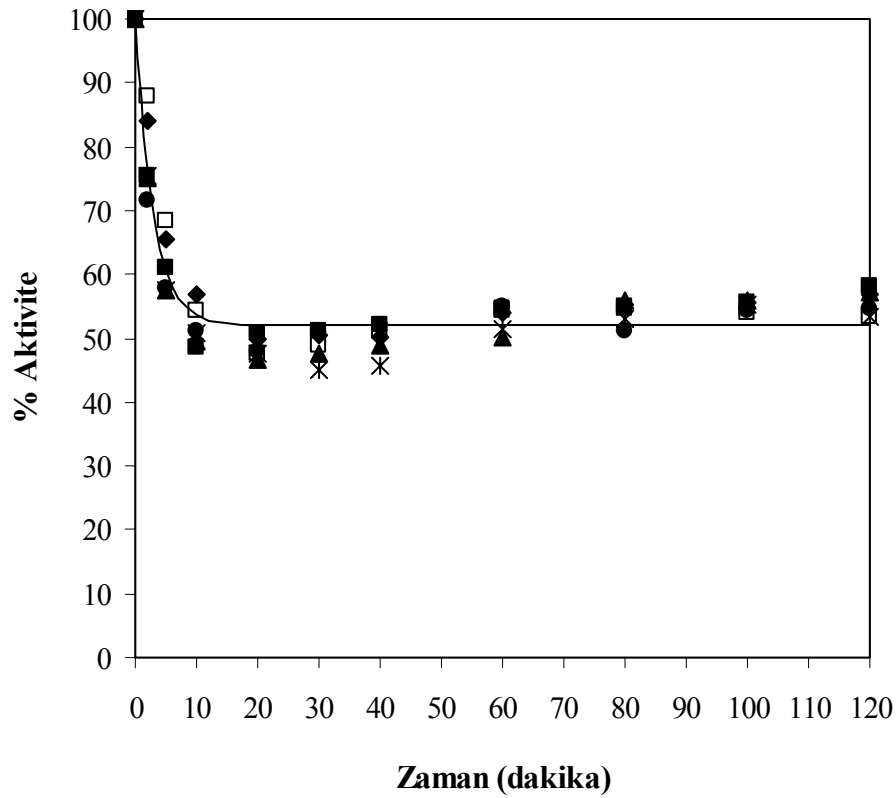


Şekil 7.9 Farklı substrat konsantrasyonları için hidroliz derecesi ile çözünürlük derecesinin değişimi T= 50°C, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ 10 g protein/L, ■ 20 g protein/L, ▲ 30 g protein/L, ● 40 g protein/L, ✖ 50 g protein/L, □ 60 g protein/L)

Elde edilen sonuçların gerçekten substrat inaktivasyonundan kaynaklanıp kaynaklanmadığına açıklık getirmek amacıyla, enzim stabilitesinin glutensiz ortamda; suda ve fosfat tampon çözeltileri içersinde incelendiği kontrol deneyleri gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Şekil 7.11’de grafiksel olarak sunulmuştur.

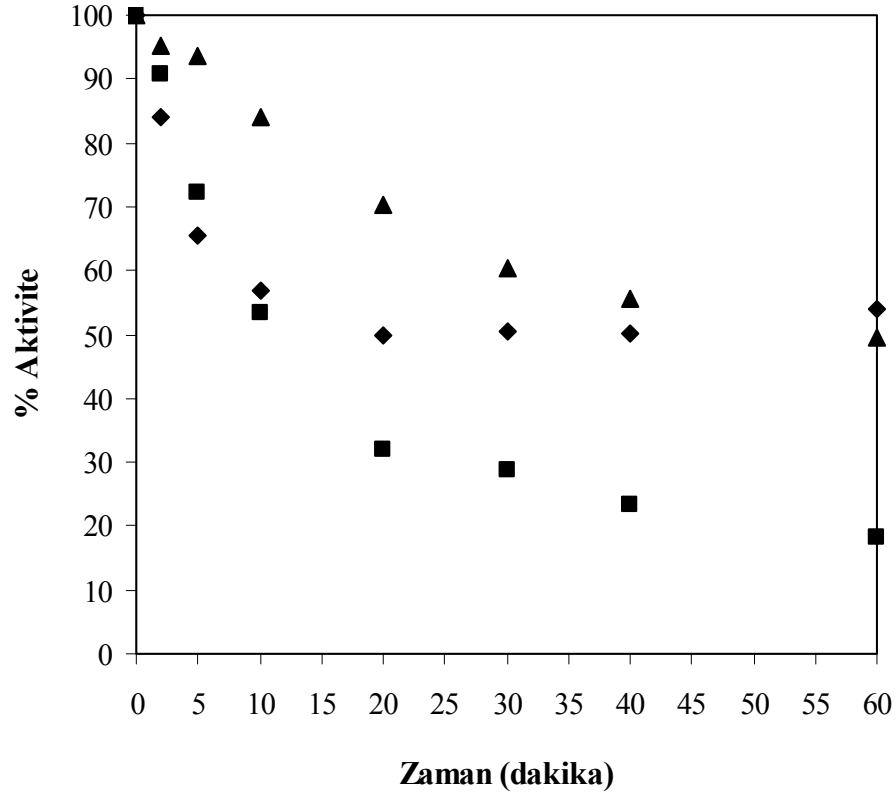
Şekil 7.11’den görüldüğü gibi suda ve fosfat tampon çözeltisinde enzim stabilitesi zamanla sürekli bir azalma eğilimi göstermiştir. 10 g protein/L substrat içeren deney, su ve fosfat tampon çözeltide glutensiz ortamda gerçekleştirilen deneylerle karşılaştırıldığında, ilk on dakikada enzim stabilitesinde meydana gelen düşüşün, substrat inaktivasyonuna dayanmadığı, ayrıca 20 dakikalık işlem süresinden sonra substrat ve/veya hidroliz ürünlerinin enzim

stabilitesi üzerinde koruyucu etkisi olduğu görülmektedir. Sonuç olarak, substrat inaktivasyonunun olmadığı saptanmıştır. Bu durumda başlangıç substrat konsantrasyonundaki artış ile hidroliz derecesi ve çözünürlük değerlerindeki azalma; a) enzimin substrat ile doygunluğa ulaşmasından dolayı reaksiyonun limitlenmesi, b) substrat konsantrasyonu arttıkça su aktivitesinin azalması, c) substrat miktarının artması ile viskozite artışına dayalı olarak kütle transferinin azalması ya da limitlenmesi, d) ürün ve/veya substratın sebep olduğu tersinir inhibisyon nedenlerinden birine veya birkaçına bağlı olabilir.



Şekil 7.10 Farklı substrat konsantrasyonları için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, T= 50°C, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ 10 g protein/L, ■ 20 g protein/L, ▲ 30 g protein/L, ● 40 g protein/L, ⋈ 50 g protein/L, □ 60 g protein/L, — kinetik model)

Çalışılan tüm substrat konsantrasyonları için, 120 dakikalık reaksiyon süresi sonunda elde edilen % hidroliz derecesi, % protein çözünürlüğü ve % enzim aktivite değerleri, Çizelge 7.9 ve Şekil 7.12'de özetlenmiştir. Çizelge 7.9 ve Şekil 7.12 incelendiğinde, % hidroliz ve % protein çözünürlük derecelerinin 30 g protein/L substrat konsantrasyonu değerinden sonra belirgin şekilde azaldığı görülmektedir. Bu nedenle 30 g protein/L substrat konsantrasyonu optimum substrat konsantrasyonu olarak seçilmiş ve diğer tüm deneylerde başlangıç substrat konsantrasyonu olarak bu değer kullanılmaya karar verilmiştir.

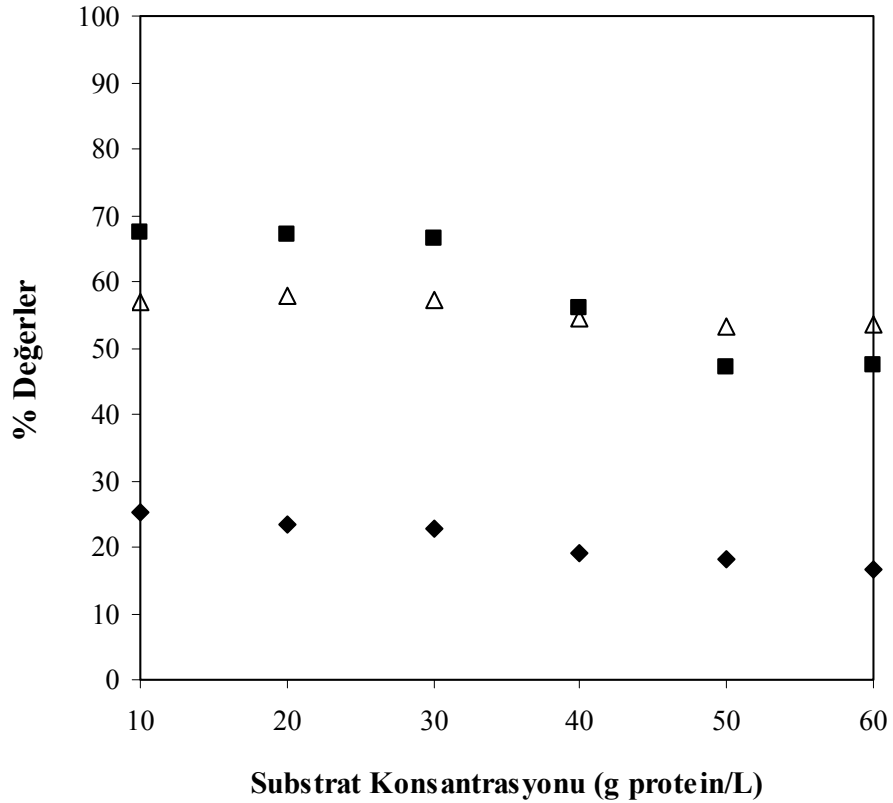


Şekil 7.11 Enzim stabilitesi kontrol deneyleri için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, T= 50°C, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim) (▲ fosfat tamponda, ◆ 10 g protein/L substrat varlığında, ■ saf suda)

Çizelge 7.9 Farklı substrat konsantrasyonlarında, 120 dakikalık işlem süresi sonunda elde edilen % hidroliz ve çözünürlük dereceleri, çözünen protein miktarları ve % enzim aktivite değerleri (T= 50°C, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim))

S ₀ (g protein/L)	HD (%)	PÇ (%)	PÇ _M (g/L)	A (%)
10	25.23	67.51	6.97	56.90
20	23.23	67.10	13.82	58.03
30	22.61	66.31	20.57	57.20
40	19.07	55.98	23.56	54.51
50	18.01	46.98	25.97	53.33
60	16.51	47.23	30.53	53.42

Hidroliz öncesi ortamda bulunan çözünmüş protein miktarı 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 g protein/L substrat konsantrasyonları için sırası ile 0.68, 1.24, 2.01, 2.67, 3.40 ve 4.16 g/L'dir.



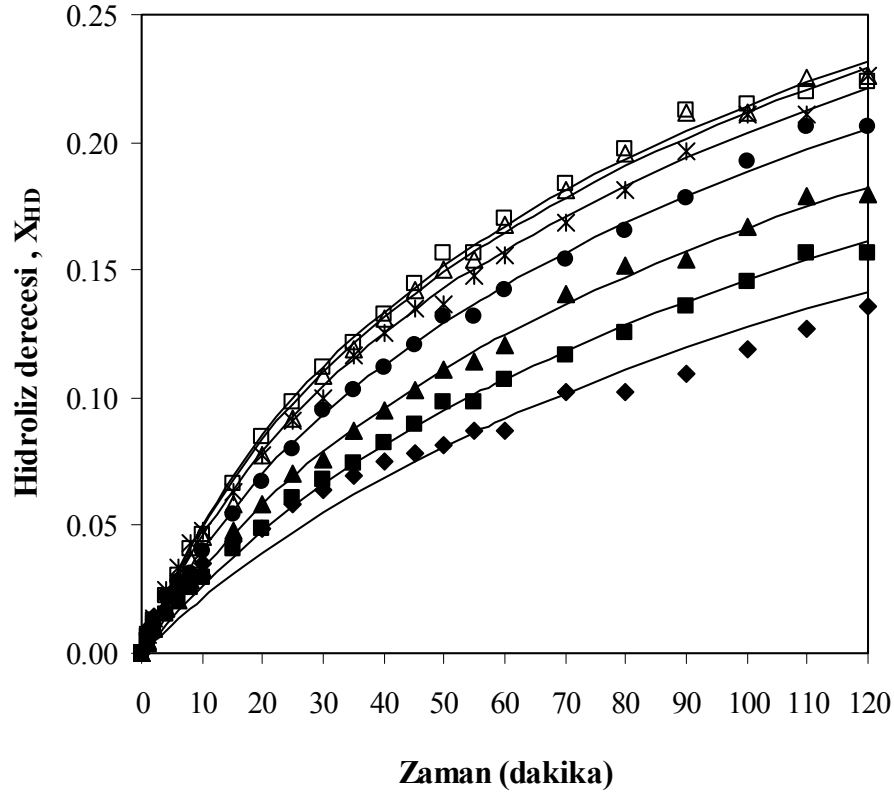
Şekil 7.12 % Hidroliz derecesi, % protein çözünürlüğü ve % enzim aktivite değerlerinin substrat konsantrasyonu ile değişimi, T= 50°C, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ hidroliz derecesi, ■ protein çözünürlüğü, △ enzim aktivitesi)

7.3.2 Enzim konsantrasyonunun hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi

Enzim konsantrasyonunun hidroliz işlemine etkisini incelemek amacıyla 30 g protein/L substrat içeren 200 mL'lik reaksiyon çözeltisine % 0.05-0.35 (hacim/hacim) arasında değişen miktarlarda Alcalase enzimi ilavesi yapılarak, hidroliz reaksiyonları 50°C sıcaklık ve pH 7 değerinde, 120 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Hidroliz dereceleri, protein çözünürlük dereceleri ve enzim stabiliteyi zamana bağlı olarak incelenmiş, elde edilen sonuçlar Şekil 7.13-7.17'de grafiksel olarak sunulmuştur.

Hidroliz derecesi değerlerinin enzim konsantrasyonuna bağlı değişimleri incelendiğinde (Şekil 7.13), enzim konsantrasyonu artırıldığında, hidroliz reaksiyonunun hızının dolayısı ile hidroliz derecesi değerlerinin de artmış olduğu görülmektedir. Ancak, % 0.25 (hacim/hacim) enzim miktarının üzerindeki enzim değerleri için, hidroliz derecesi değerlerinin artışının daha yavaş bir şekilde gerçekleştiği ve birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir. % 0.25 (hacim/hacim) enzim miktarının üzerindeki değerler için reaksiyonun daha yavaş ilerlemesi, substratın enzim ile doygunluğa ulaşmasından dolayı hidroliz reaksiyonunun diğer

faktörlerden çok substrat konsantrasyonu tarafından limitlenmiş olabileceğini göstermektedir.

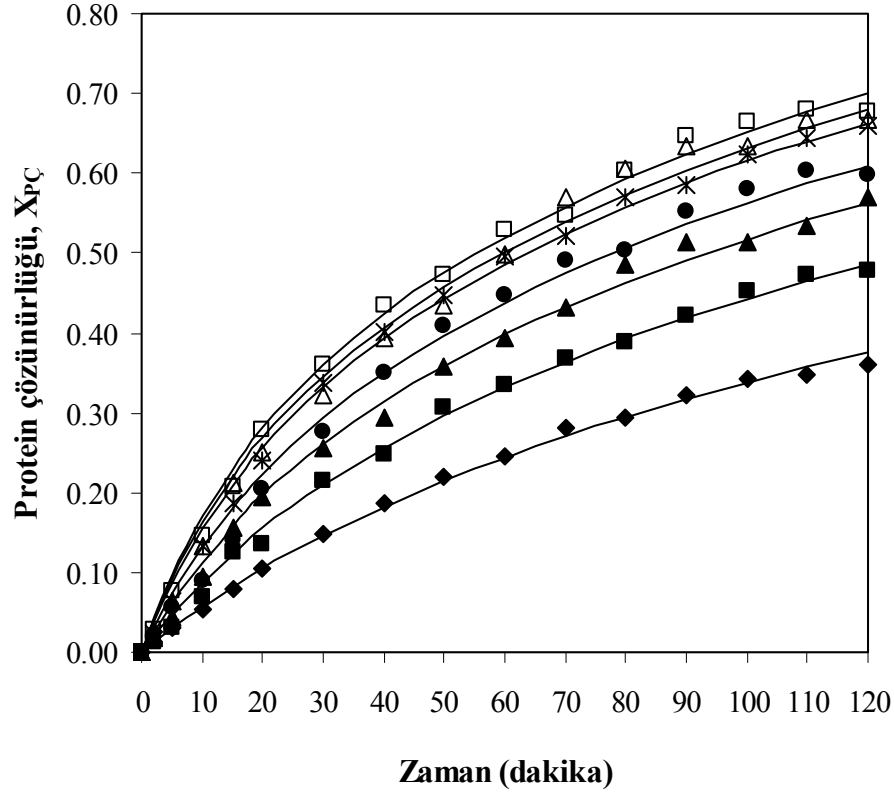


Şekil 7.13 Farklı enzim miktarları için zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, $T= 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}= 7$, $S= 30 \text{ g protein/L}$ (◆ % 0.05 (hacim/hacim), ■ % 0.1 (hacim/hacim), ▲ % 0.15 (hacim/hacim), ● % 0.2 (hacim/hacim), ✖ % 0.25 (hacim/hacim), □ % 0.3 (hacim/hacim), △ % 0.35 (hacim/hacim), — kinetik modeller)

Protein çözünürlük derecelerinin enzim konsantrasyonuna bağlı değişimleri incelendiğinde (Şekil 7.14), enzim miktarı arttırıldığında hidroliz derecesi değerleri ile benzer şekilde, çözünürlük değerlerinin de artmış olduğu; % 0.25 (hacim/hacim) enzim miktarının üzerindeki enzim değerleri için, çözünürlük değerlerindeki artışın daha yavaş bir şekilde gerçekleştiği görülmektedir. Bu durum yine, substratın enzim ile doyunurluğa ulaşmasından dolayı, hidroliz reaksiyonunun diğer faktörlerden çok substrat konsantrasyonu tarafından limitlenmiş olabileceğini göstermektedir.

Mısır gluteninin Alcalase enzimi ile hidrolizi için enzim konsantrasyonunun hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisi Mannheim ve Cheryan (1992) tarafından da, 0-1.75 mg/mL aralığında değişen enzim miktarları için, % 1 (ağırlık/hacim) substrat konsantrasyonunda, pH

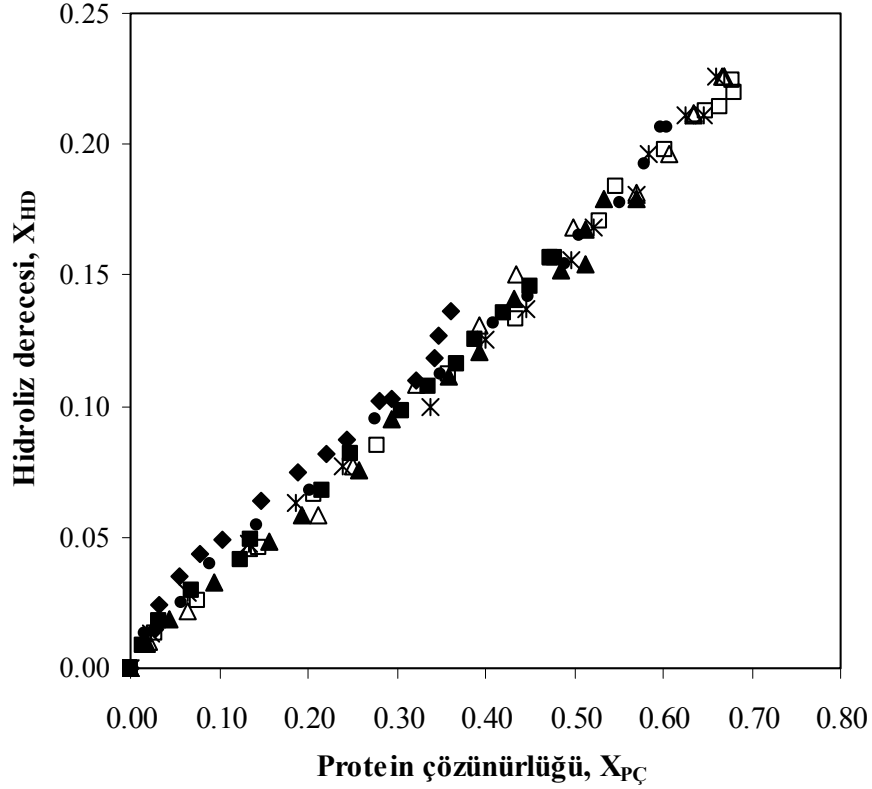
9 değerinde ve 50°C sıcaklıkta incelenmiş, bu çalışma ile benzer şekilde % substrat dönüşümünün belirli bir enzim konsantrasyonuna kadar (0.50 mg/mL) arttığı bu değerden sonra değişmediği rapor edilmiştir.



Şekil 7.14 Farklı enzim miktarları için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, T= 50°C, pH= 7, S= 30 g protein/L (◆ % 0.05 (hacim/hacim), ■ % 0.1 (hacim/hacim), ▲ % 0.15 (hacim/hacim), ● % 0.2 (hacim/hacim), ⋈ % 0.25 (hacim/hacim), □ % 0.3 (hacim/hacim), Δ % 0.35 (hacim/hacim), — kinetik modeller)

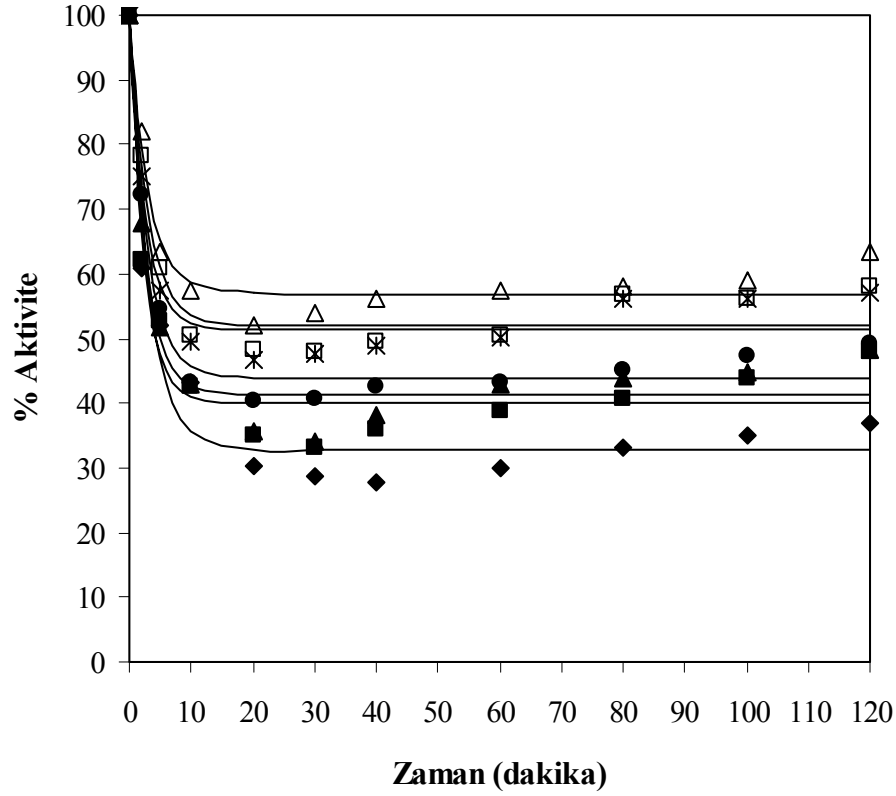
Hidroliz derecesi değerlerinin protein çözünürlük derecesi değerlerine bağlı değişimleri incelendiğinde (Şekil 7.15), çalışılan bütün enzim konsantrasyonu değerleri için, hidroliz derecesi değerleri ile çözünürlük derecesi değerleri arasında lineer bir ilişki olduğu ve tüm deneysel verilerin aynı bir doğru üzerinde toplandıkları görülmektedir.

Kullanılan enzim miktarının enzim stabilitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde (Şekil 7.16), çalışılan tüm enzim miktarları için, enzim stabilitesinin yine ilk on dakikada hızlı bir düşüş gösterdiği daha sonra ise işlem sonuna kadar sabit kaldığı, ancak enzim miktarı arttıķça enzim aktivitesinin sabitlendiği değerlerde de belirgin bir artış olduğu saptanmıştır.



Şekil 7.15 Farklı enzim miktarları için hidroliz derecesi ile çözünürlük derecesinin değişimi, $T=50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7$, $S=30\text{ g protein/L}$ (\blacklozenge % 0.05 (hacim/hacim), \blacksquare % 0.1 (hacim/hacim), \blacktriangle % 0.15 (hacim/hacim), \bullet % 0.2 (hacim/hacim), \ast % 0.25 (hacim/hacim), \square % 0.3 (hacim/hacim), \triangle % 0.35 (hacim/hacim))

Çalışılan tüm enzim miktarları için, 120 dakikalık reaksiyon süresi sonunda elde edilen % hidroliz derecesi, % protein çözünürlüğü ve % enzim aktivite değerleri, Çizelge 7.10 ve Şekil 7.17’de ayrıca özetlenmiştir. Çizelge 7.10 ve Şekil 7.17 incelendiğinde, hidroliz ve protein çözünürlük derecelerindeki artışın % 0.25 (hacim/hacim) enzim miktarından sonraki enzim miktarı değerleri için belirgin şekilde yavaşladığı ve hemen hemen sabitlendiği açıkça görülmektedir. Bu nedenle % 0.25 (hacim/hacim) enzim miktarı optimum enzim değeri olarak seçilmiş ve diğer tüm deneylerde bu değer kullanıma karar verilmiştir.

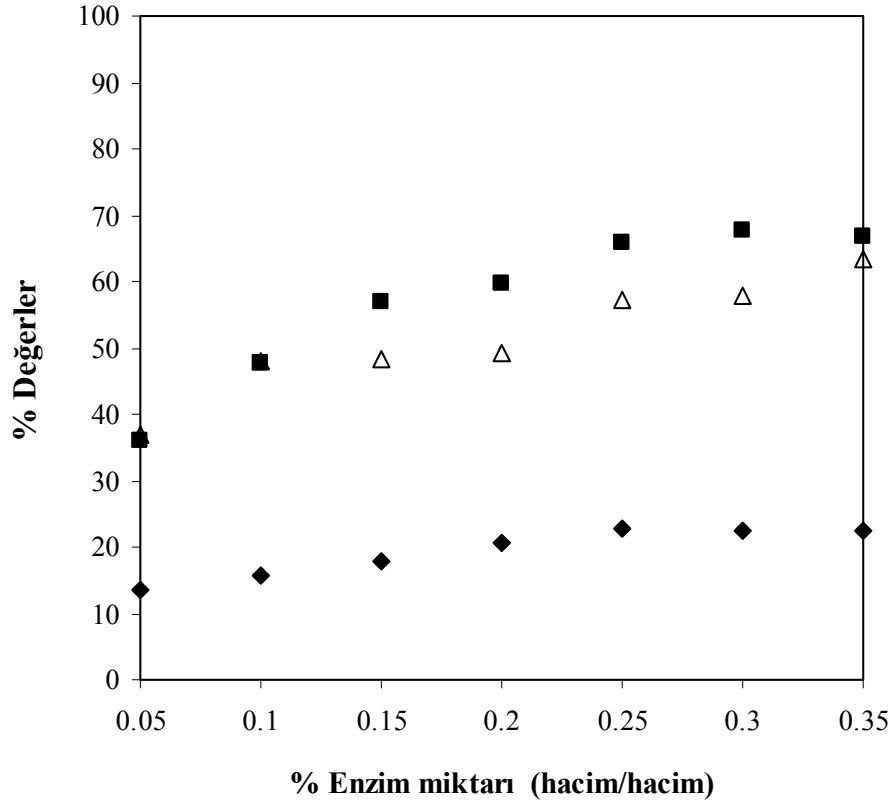


Şekil 7.16 Farklı enzim miktarları için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, T= 50°C, pH= 7, S= 30 g protein/L (◆ % 0.05 (hacim/hacim), ■ % 0.1 (hacim/hacim), ▲ % 0.15 (hacim/hacim), ● % 0.2 (hacim/hacim), ⌘ % 0.25 (hacim/hacim), □ % 0.3 (hacim/hacim), Δ % 0.35 (hacim/hacim), — kinetik modeller)

Çizelge 7.10 Farklı enzim miktarlarında, 120 dakikalık işlem süresi sonunda elde edilen % hidroliz ve çözünürlük dereceleri, çözünen protein miktarları ve % enzim aktivite değerleri (T= 50°C, pH= 7, S= 30 g protein/L)

E (%, hacim/hacim)	HD (%)	PÇ (%)	PÇ _M (g/L)	A (%)
0.05	13.61	36.01	12.16	36.88
0.10	15.67	47.76	15.47	47.89
0.15	17.93	56.99	17.99	48.22
0.20	20.62	59.74	18.72	49.27
0.25	22.61	66.31	20.48	57.20
0.30	22.40	67.80	20.95	58.01
0.35	22.58	66.83	20.75	63.52

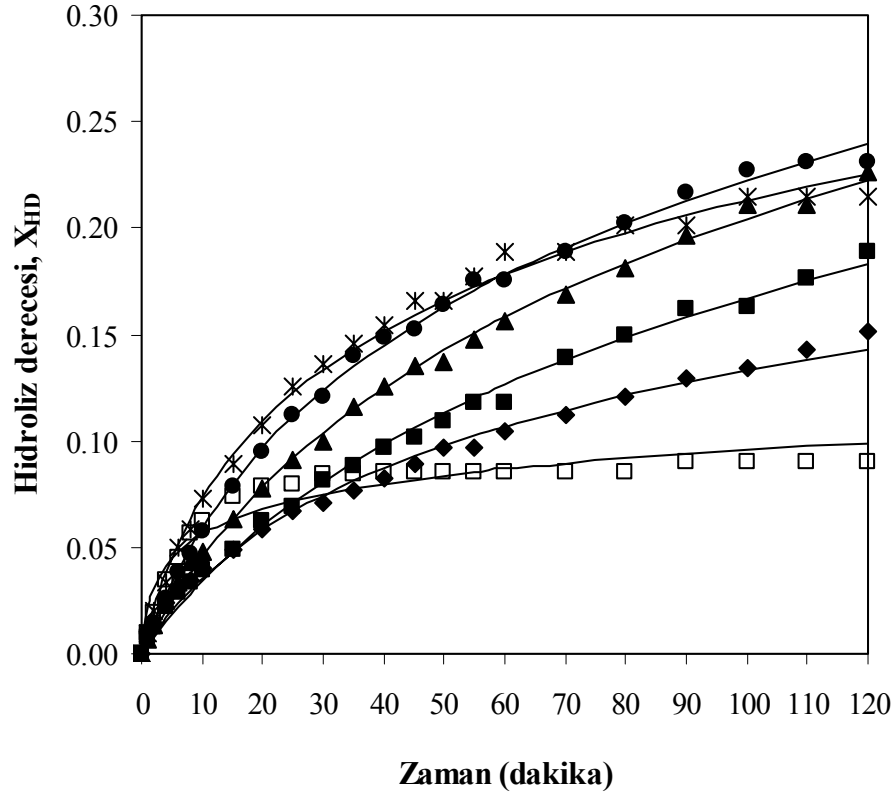
Hidroliz öncesi ortamda bulunan çözünmüş protein miktarı % 0.05, % 0.10, % 0.15, % 0.20, % 0.25, % 0.30 ve % 0.35 enzim miktarı deneyleri için sırası ile 2.12, 2.19, 2.09, 1.98, 2.01, 1.92 ve 2.10 g/L'dir.



Şekil 7.17 % Hidroliz derecesi, % protein çözünürlüğü ve % enzim aktivite değerlerinin enzim miktarı ile değişimi, T= 50°C, pH= 7, S= 30 g protein/L (◆ hidroliz derecesi, ■ protein çözünürlüğü, △ enzim aktivitesi)

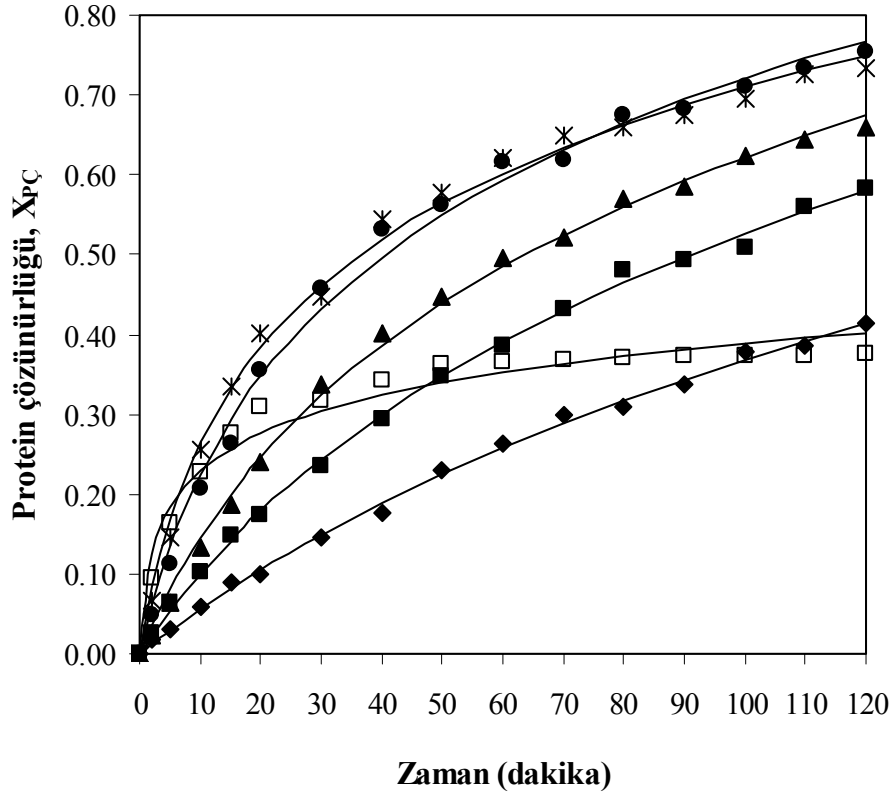
7.3.3 Sıcaklığın hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi

Sıcaklık artışının reaksiyon hızını artırdığı ancak enzimlerinde yapısal olarak bozunmalarına neden olduğu bilinmektedir. Sıcaklık artışının hidroliz derecesine ve çözünen protein miktarına etkisini incelemek için 30 g protein/L substrat içeren 200 mL'lik reaksiyon çözeltisi, pH 7 değerinde, % 0.25 (hacim/hacim) enzim ilavesi ile 40-65°C arasında değişen sıcaklık değerlerinde 120 dakika boyunca hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Hidroliz dereceleri, protein çözünürlük dereceleri ve enzim stabiliteleri zamana bağlı olarak incelenmiş, elde edilen sonuçlar Şekil 7.18-7.22'de grafiksel olarak sunulmuştur.



Şekil 7.18 Farklı sıcaklıklar için zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (◆ 40°C, ■ 45°C, ▲ 50°C, ● 55°C, ⋈ 60°C, □ 65°C, — kinetik modeller)

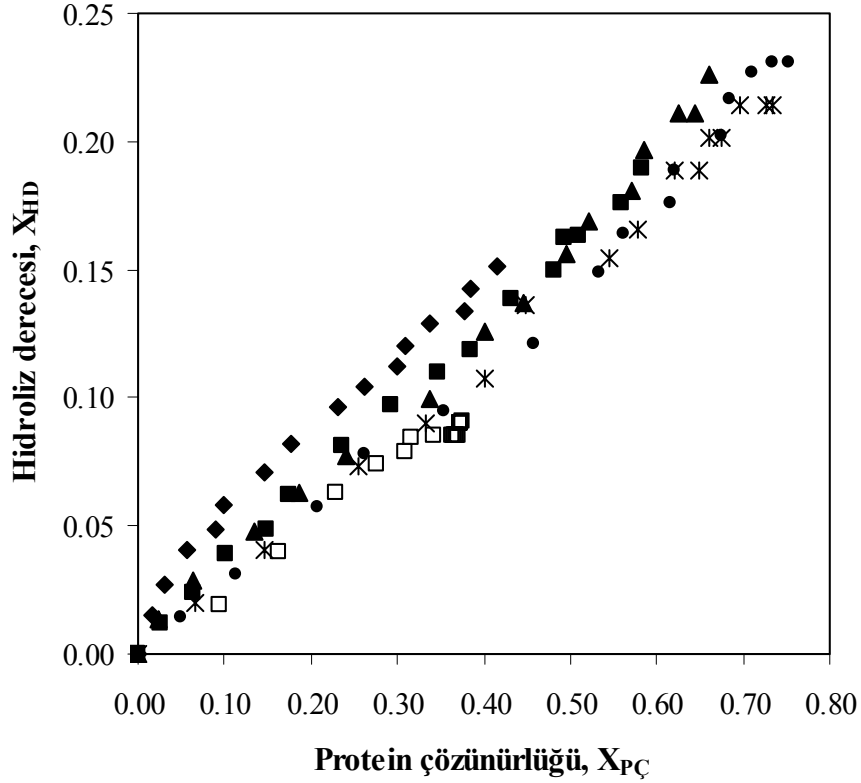
Hidroliz derecesi ve protein çözünürlük derecelerinin sıcaklığa bağlı değişimleri incelendiğinde (Şekil 7.18 ve Şekil 7.19); maksimum hidroliz ve çözünürlük değerlerinin 55°C'de elde edildiği, dolayısı ile bu sıcaklık değerinin mısır gluteninin hidroliz reaksiyonu için optimum değer olduğu saptanmıştır. 60°C'de hidroliz ve çözünürlük derecelerinin, işlem süresinin ilk 60 dakikasında 55°C'deki değerlerden biraz daha yüksek olduğu, ancak daha sonraki zaman diliminde bu değerlerin 55°C'deki değerlerin altında seyrettiği görülmektedir. Şekil 7.18 ve Şekil 7.19 incelendiğinde, yaklaşık 30. dakikadan sonra 65°C sıcaklık değeri için elde edilen hidroliz ve çözünürlük derecesi değerlerinin zamana bağlı olarak değişmedikleri ve sonuç olarak reaksiyonun durduğu görülmektedir. Bu durum, 65°C'de enzimin stabilitesini koruyamaması ve bozunması ile açıklanabilir.



Şekil 7.19 Farklı sıcaklıklar için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (◆ 40°C, ■ 45°C, ▲ 50°C, ● 55°C, ⋈ 60°C, □ 65°C, — kinetik modeller)

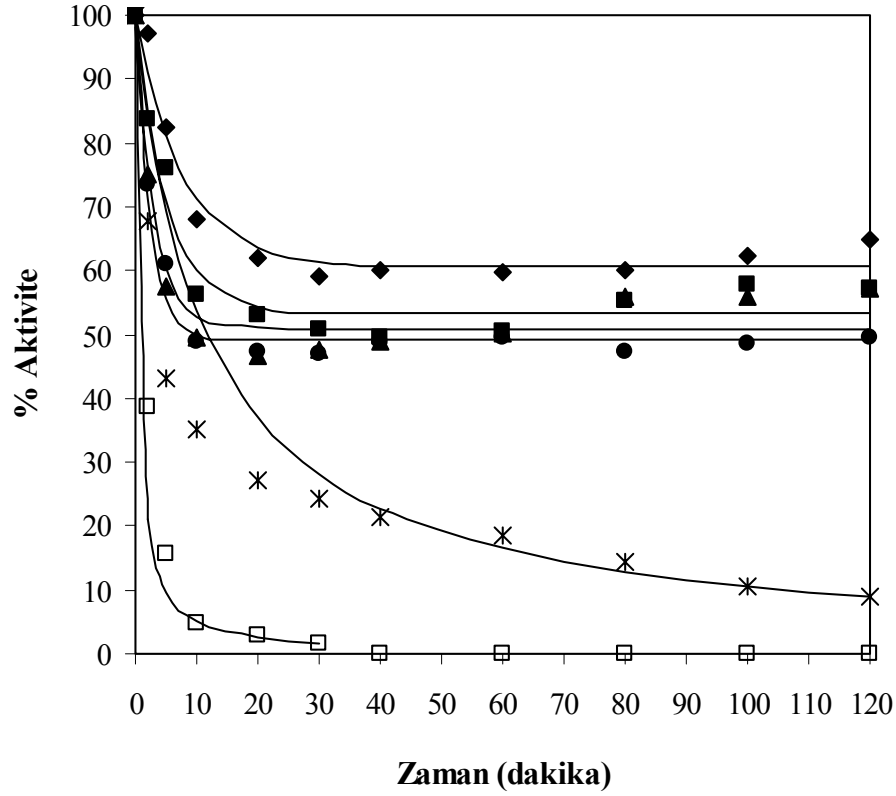
Sıcaklık deneylerine ait hidroliz derecesi değerlerinin protein çözünürlük derecesi değerlerine bağlı değişimleri incelendiğinde (Şekil 7.20), çalışılan bütün sıcaklık değerleri için, hidroliz derecesi değerleri ile çözünürlük derecesi değerleri arasında lineer bir ilişki olduğu görülmektedir.

Sıcaklığın enzim stabilitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde (Şekil 7.21), 40-55°C sıcaklık aralığında, sıcaklık artışına bağlı enzim inaktivasyonun oldukça az olduğu görülmektedir. Bu aralıkta enzim aktivitesi yine ilk on dakika içerisinde hızlı bir düşüş göstermiş daha sonra ise işlem sonuna kadar stabil kalmıştır. 55°C'den sonra enzim inaktivasyon hızı oldukça artmış, 65°C'de ise enzim 30 dakika içerisinde tamamen inaktive olmuştur.



Şekil 7.20 Farklı sıcaklıklar için hidroliz derecesi ile çözünürlük derecesinin değişimi, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (◆ 40°C, ■ 45°C, ▲ 50°C, ● 55°C, ✖ 60°C, □ 65°C)

Çalışılan tüm sıcaklık değerleri için, 120 dakikalık reaksiyon süresi sonunda elde edilen % hidroliz derecesi, % protein çözünürlüğü ve % enzim aktivite değerleri, Çizelge 7.11 ve Şekil 7.22’de ayrıca özetlenmiştir. Çizelge 7.11 ve Şekil 7.22 incelendiğinde, 55°C sıcaklık değerine kadar % hidroliz ve % çözünürlük derecelerinin artış gösterdiği bu sıcaklık değerinden sonra ise azalmaya başladığı açıkça görülmektedir. Bu nedenle mısır glutenin hidroliz ve çözünürlüğü için optimum sıcaklık değeri 55°C olarak belirlenmiş ve yapılacak diğer tüm deneylerde bu sıcaklık değerinin kullanımına karar verilmiştir.

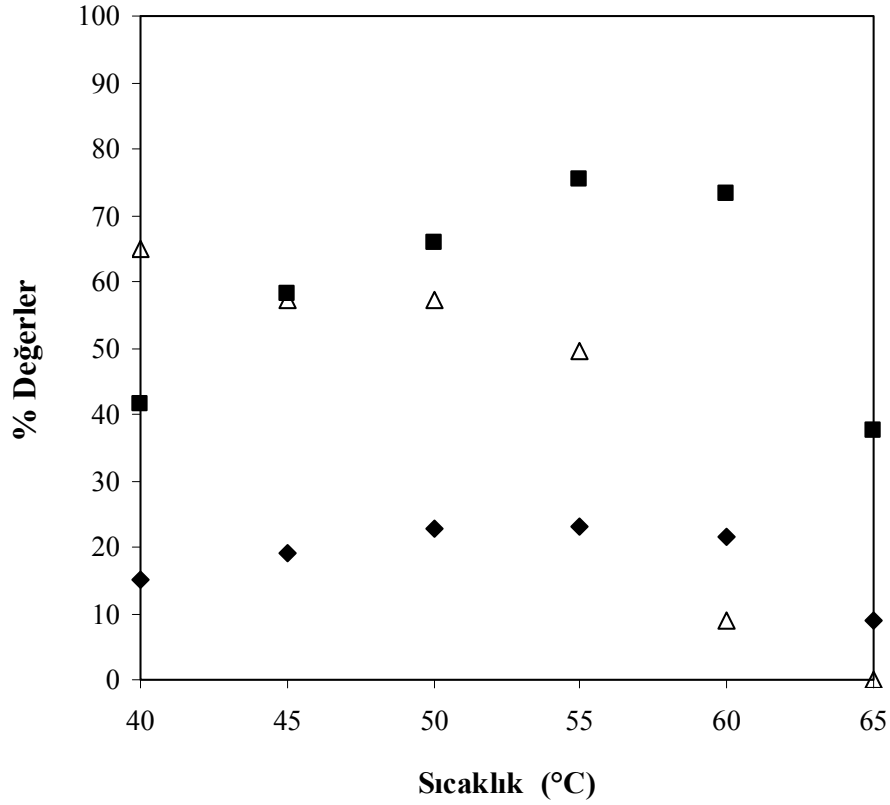


Şekil 7.21 Farklı sıcaklıklar için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (◆ 40°C, ■ 45°C, ▲ 50°C, ● 55°C, ✱ 60°C, □ 65°C, — kinetik modeller)

Çizelge 7.11 Farklı sıcaklık değerleri için, 120 dakikalık işlem süresi sonunda elde edilen % hidroliz ve çözünürlük dereceleri, çözünen protein miktarları ve % enzim aktivite değerleri (pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L)

T (°C)	HD (%)	PÇ (%)	PÇ _M (g/L)	A (%)
40	15.14	41.48	13.55	64.92
45	18.93	58.24	18.27	57.22
50	22.61	66.31	20.48	57.20
55	23.11	75.32	23.08	49.47
60	21.45	73.33	22.56	8.79
65	9.00	37.66	12.67	0.00

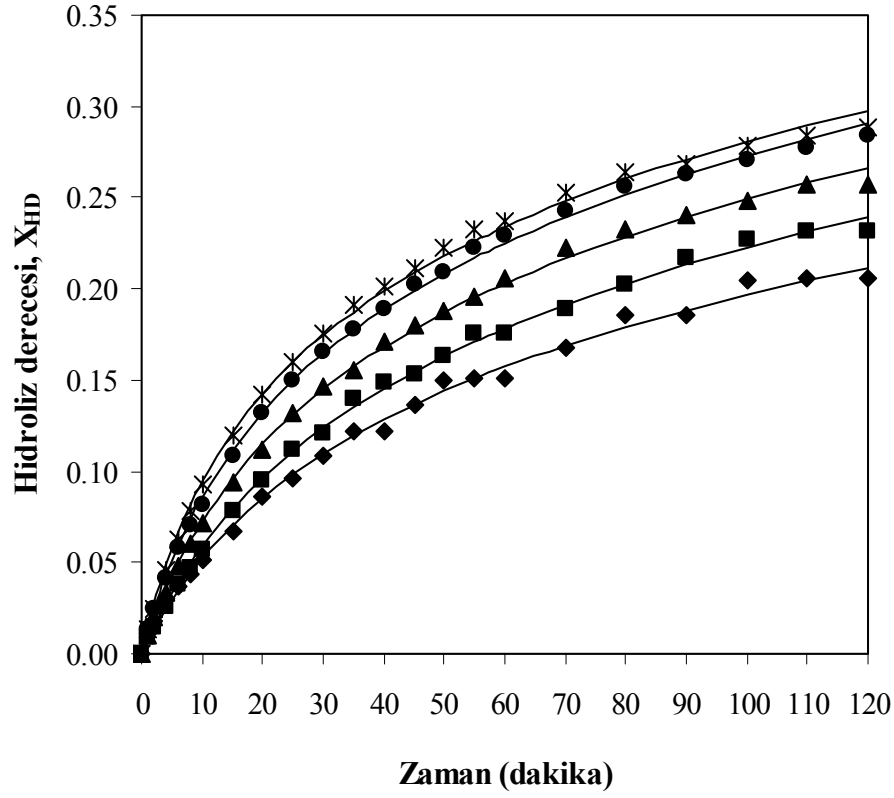
Hidroliz öncesi ortamda bulunan çözünmüş protein miktarı 40, 45, 50, 55, 60 ve 65°C sıcaklık değerlerinde gerçekleştirilen deneyler için sırası ile 1.90, 193, 2.01, 1.97, 2.11 ve 2.24 g/L'dir.



Şekil 7.22 % Hidroliz derecesi, % protein çözünürlüğü ve % enzim aktivite değerlerinin sıcaklık ile değişimi, T= 50°C, pH= 7, S= 30 g protein/L (◆ hidroliz derecesi, ■ protein çözünürlüğü, Δ enzim aktivitesi)

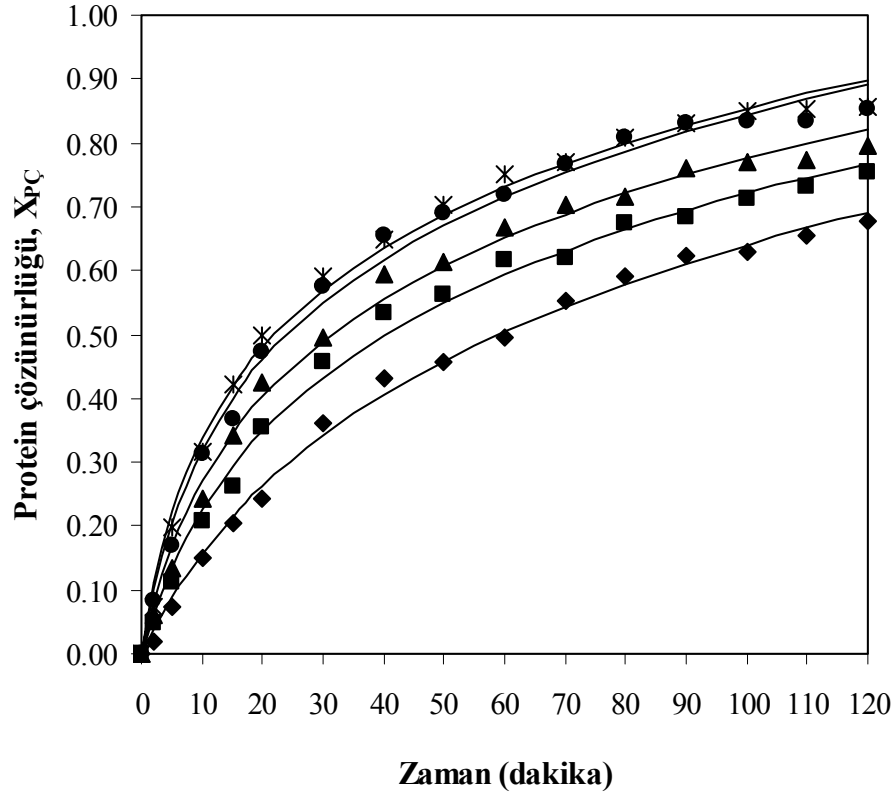
7.3.4 pH'nın hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi

pH değişiminin protein yapısını modifiye ettiği, enzimatik reaksiyonlarda enzim-substrat bağlanmasını dolayısıyla reaksiyonun katalizlenmesini, aynı zamanda enzim stabilitesini etkilediği bilinmektedir. pH değişiminin hidroliz reaksiyonuna etkisini incelemek için 30 g protein/L substrat içeren 200 mL'lik reaksiyon çözeltisi, pH 6.5-8.5 aralığında değişen pH değerlerinde, 55°C sıcaklıkta, % 0.25 (hacim/hacim) enzim ilavesi ile 120 dakika boyunca hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Hidroliz dereceleri, protein çözünürlük dereceleri ve enzim stabiliteleleri zamana bağlı olarak incelenmiş, elde edilen sonuçlar Şekil 7.23-7.27'de grafiksel olarak sunulmuştur.



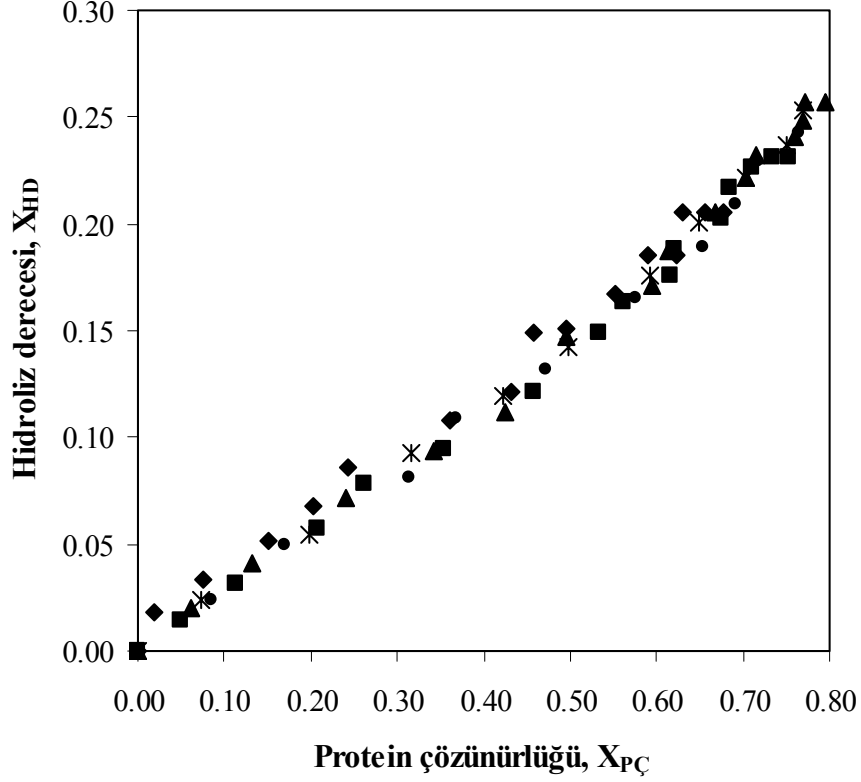
Şekil 7.23 Farklı pH değerleri için zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, $T=55^{\circ}\text{C}$, $E= \% 0.25$ (hacim/hacim), $S= 30$ g protein/L (◆ pH 6.5, ■ pH 7, ▲ pH 7.5, ● pH 8, ⋈ pH 8.5, — kinetik modeller)

Hidroliz derecesi ve protein çözünürlük derecelerinin pH'a bağlı değişimleri incelendiğinde (Şekil 7.23 ve Şekil 7.24); hidroliz reaksiyonunun hızının dolayısı ile hidroliz ve çözünürlük derecesi değerlerinin pH 8 değerine kadar artış gösterdiği, pH 8.5 değeri için elde edilen sonuçların ise hemen hemen pH 8 değeri için elde edilen sonuçlarla aynı olduğu görülmektedir.



Şekil 7.24 Farklı pH değerleri için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, $T=55^{\circ}\text{C}$, $E= \% 0.25$ (hacim/hacim), $S= 30$ g protein/L (◆ pH 6.5, ■ pH 7, ▲ pH 7.5, ● pH 8, ⋈ pH 8.5, — kinetik modeller)

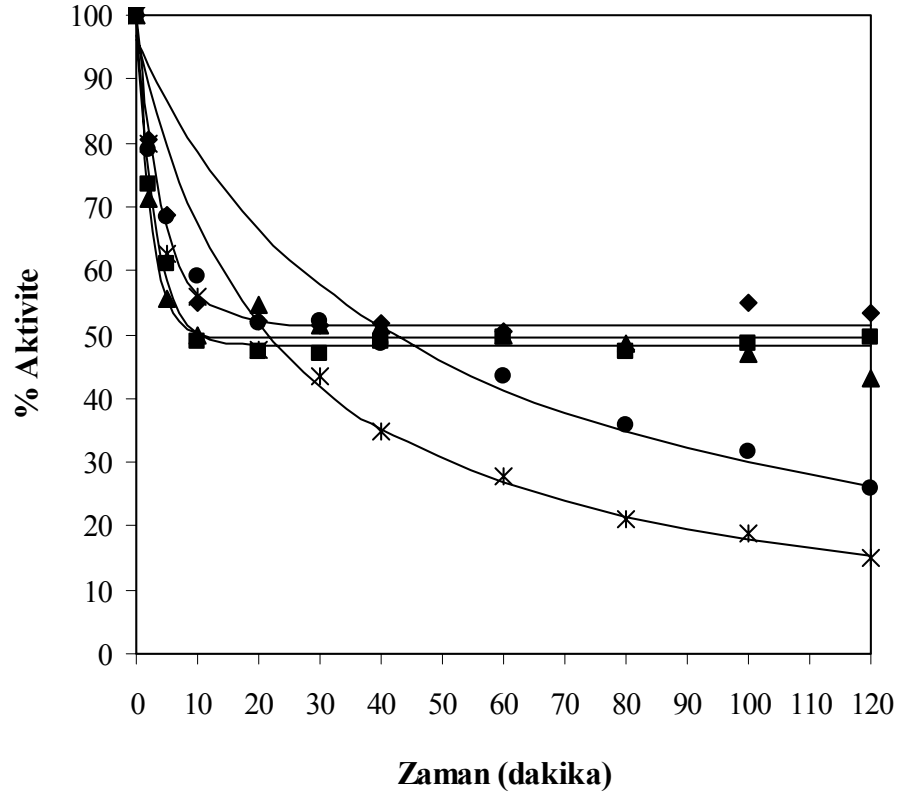
Farklı pH değerleri için; hidroliz derecesi değerlerinin protein çözünürlük derecesi değerlerine bağlı değişimleri incelendiğinde (Şekil 7.25), çalışılan bütün pH değerleri için, hidroliz derecesi değerleri ile çözünürlük derecesi değerleri arasında lineer bir ilişki olduğu görülmektedir.



Şekil 7.25 Farklı pH değerleri için hidroliz derecesi ile çözünürlük derecesinin değişimi, $T=55^{\circ}\text{C}$, $E= \% 0.25$ (hacim/hacim), $S= 30$ g protein/L (\blacklozenge pH 6.5, \blacksquare pH 7, \blacktriangle pH 7.5, \bullet pH 8, \times pH 8.5)

pH'in enzim stabilitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde (Şekil 7.26), pH 6.5-7.5 aralığında, pH artışına bağlı enzim inaktivasyonun oldukça az olduğu, enzim inaktivasyon hızının pH 7.5 değerinden sonra arttığı görülmektedir.

Çalışılan tüm pH değerleri için, 120 dakikalık reaksiyon süresi sonunda elde edilen % hidroliz derecesi, % protein çözünürlüğü ve % enzim aktivite değerleri, Çizelge 7.12 ve Şekil 7.27'de özetlenmiştir. Çizelge 7.12 ve Şekil 7.27 incelendiğinde, maksimum hidroliz ve çözünürlük derecesinin pH 8 değerinde elde edildiği görülmektedir. Bu nedenle pH 8, reaksiyon için uygun pH olarak seçilmiştir.

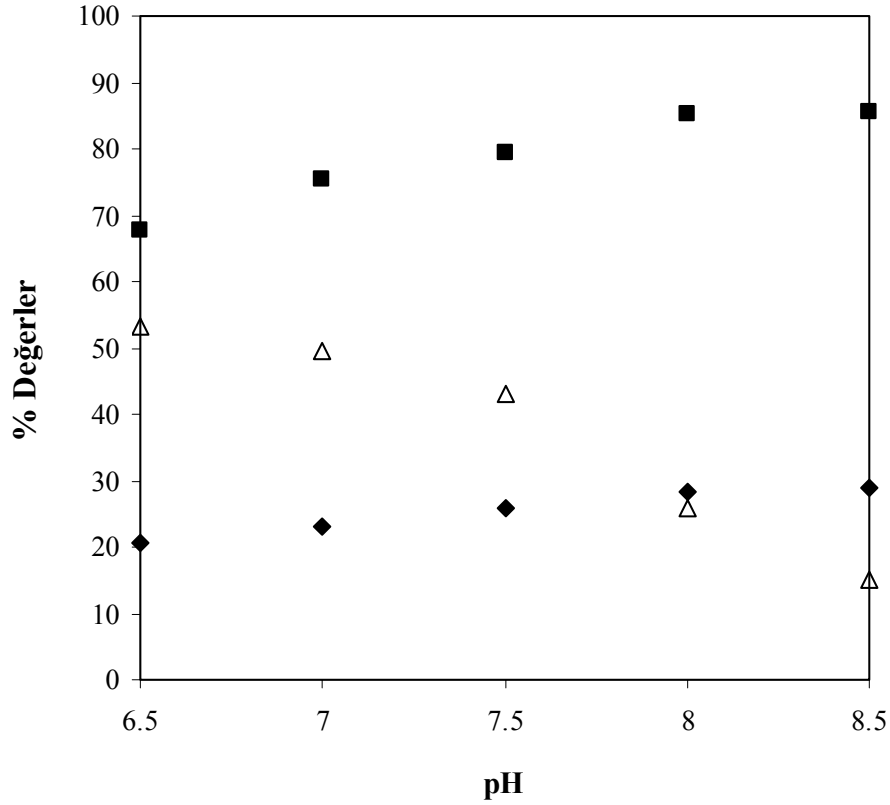


Şekil 7.26 Farklı pH değerleri için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, T=55°C, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (♦ pH 6.5, ■ pH 7, ▲ pH 7.5, ● pH 8, ж pH 8.5)

Çizelge 7.12 Farklı pH değerleri için, 120 dakikalık işlem süresi sonunda elde edilen % hidroliz ve çözünürlük dereceleri, çözünen protein miktarları ve % enzim aktivite değerleri (T= 55°C, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L)

pH	HD (%)	PÇ (%)	PÇ _M (g/L)	A (%)
6.5	20.55	67.73	20.93	53.36
7.0	23.11	75.32	23.08	49.47
7.5	25.69	79.49	24.26	43.05
8.0	28.38	85.25	25.86	25.85
8.5	28.85	85.67	25.98	15.08

Hidroliz öncesi ortamda bulunan çözünmüş protein miktarı pH 6.5, 7, 7.8, 8 ve 8.5 değerlerinde gerçekleştirilen deneyler için sırası ile 1.90, 1.97, 2.03, 1.97, ve 1.99 g/L'dir.



Şekil 7.27 % Hidroliz derecesi, % protein çözünürlüğü ve % enzim aktivite değerlerinin pH ile değişimi, T= 55°C, pH= 7, S= 30 g protein/L (◆ hidroliz derecesi, ■ protein çözünürlüğü, Δ enzim aktivitesi)

7.3.5 Optimum proses şartlarında elde edilen mısır gluteni hidrolizatının amino asit kompozisyonunun incelenmesi

Bölüm 7.3.1-7.3.4'de kesikli sistemde gerçekleştirilen deneyler sonucunda, mısır gluteninin Alcalase enzimi ile hidrolizi için optimum proses şartları; 30 g protein/L substrat konsantrasyonu, % 0.25 (hacim/hacim) enzim miktarı, 55°C sıcaklık ve pH 8 olarak belirlenmiş ve optimum proses şartlarında, 120 dakika süreyle gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu sonucunda, % 28.4 hidroliz derecesi, % 85.3 protein çözünürlüğü elde edilmiştir. Optimum proses şartlarında elde edilen hidrolizat çözeltisinin amino asit kompozisyonu analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 7.13'de sunulmuştur. Çizelge 7.13 incelendiğinde hidrolizat çözeltisinin amino asit kompozisyonunun, ham glutenin amino asit kompozisyonu ile hemen hemen aynı olduğu, yani hidroliz işlemi sonucunda proteinin besinsel değerini koruduğu açık bir biçimde görülmektedir.

Çizelge 7.13 Optimum proses şartlarında elde edilen hidrolizat çözeltisinin amino asit kompozisyon analizi

Aminoasit	Ham Gluten (mg/g protein)	Hidrolizat (mg/g protein)
Alanin	86.91	92.03
Glisin	25.65	27.24
Valin	44.47	44.73
Lösin	128.33	165.31
İzolösin	36.17	33.27
Treonin	27.48	29.74
Serin	52.51	52.02
Prolin	106.11	104.72
Aspartik asit	145.27	94.93
Metiyonin	22.62	14.59
Glutamik asit	156.64	208.90
Fenilalanin	59.10	54.88
Lizin	15.75	13.80
Histidin	32.31	16.46
Triozin	48.45	43.94
Hidroksiprolin	12.22	4.24

7.3.6 Çalışmada elde edilen verilerin literatürde varolan verilerle karşılaştırılması

Literatürde gluten hidrolizi üzerine gerçekleştirilen çalışmalar oldukça sınırlı olmakla beraber, son yıllarda hız kazanmaya başlamıştır. Ancak, bu çalışmaların gerçekleştirilme amaçları ve gerçekleştirildikleri proses şartları oldukça farklılık göstermektedir. Bu çalışmalarda daha çok mısır gluteni hidrolizatlarının belirli bazı fonksiyonel özellikleri iyileştirilmeye çalışılmış, enzim stabilitesi hiç incelenmemiş, reaksiyon kinetiği ise Hardwick ve Glatz (1989) ve Mannheim ve Cheryan (1992) tarafından oldukça sınırlı bir şekilde incelenmiştir. Bu çalışmada ise özellikle maksimum hidroliz ve protein çözünürlüğü için proses parametreleri ile ilgili optimizasyon çalışmalarına yer verilmiş, enzim stabilitesi incelenmiş ve reaksiyon kinetiği üzerine detaylı bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Çizelge 7.14’de, glutenin enzimatik hidrolizi ile ilgili literatürde yeralan çalışmalar sonucunda elde edilen hidroliz ve çözünürlük verileri ile deneylerin gerçekleştirildikleri proses şartları verilmiştir.

Çizelge 7.14 Optimum proses şartlarında elde edilen verilerin, literatürde varolan verilerle karşılaştırılması

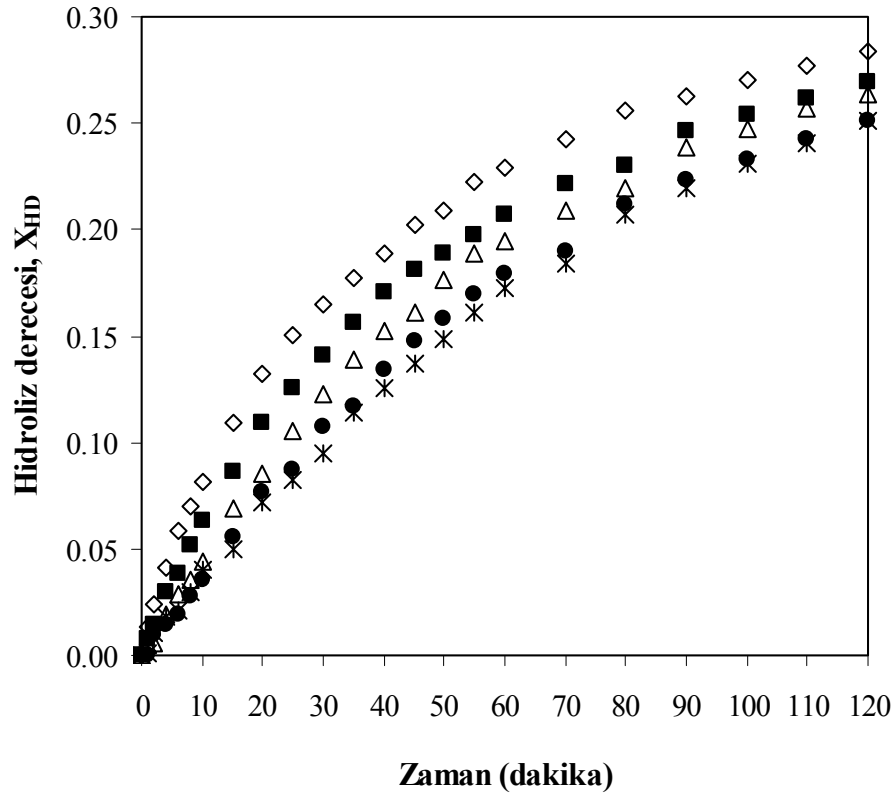
Kaynak	Substrat	Enzim	Proses şartları	Hidroliz Derecesi ve Protein Çözünürlüğü
Kong vd. (2007a,b)	Buğday Gluteni	Tripsin	pH 8.5, 47°C	% 4.5 HD; % 75 çöz.
		Alcalase	pH 8.5, 60°C	%15.8 HD; % 80 çöz.
		Pancreatin	pH 8.5, 37°C	%11 HD; % 75 çöz.
		Neutrased	pH 7.0, 50°C	% 7 HD; % 75 çöz.
		Protamex	pH 6.5, 50°C	% 6.8 HD; % 75 çöz.
			E/S = 1:100 (ağırlık) S = % 5 (ağırlık/hacim)	(HD değerleri 360 dak. sonunda elde edilen değerlerdir, çözünürlük değerleri ise pH 2-12 aralığında elde edilen max. değerlerdir.)
Wang vd. (2007a)	Buğday Gluteni	Papain	pH 6.5, 50°C E = 1500 U/g S = % 8 (ağırlık/hacim)	6 saat sonunda, % 10.9 HD; 8 saat sonunda, % 55 çöz.
Apar ve Özbek (2007)	Mısır Gluteni	Neutrased	pH 6.5, 45°C E = 4 mL/L S = 10 g/L	2 saat sonunda, % 37.2 HD, % 52 çöz.
Wang vd. (2006)	Buğday Gluteni	Protamex	pH 6.8, 48°C E = 2000 U/g S = % 8 (ağırlık/hacim)	10 dak. sonunda, % 2.8 HD
Zheng vd. (2006)	Mısır Gluteni	Alcalase	Ekstrüderden geçirme ve nişasta hidroliz ön işlemi sonrası pH 8, 60°C, 20 g H ₂ O/g protein, E = 48 mAU/g protein	120 dakika sonunda, % 39.54 HD, % 79.2 çöz.
Kim vd. (2004a)	Mısır Gluteni		Nişasta hidrolizi ve ısı ön işlem sonrası,	8 saat sonunda,
		Potamax	pH 5.5-7.5, 35-60°C	% 56.2 çözünürlük
		Flavourzyme	pH 5-7, 50°C	% 87.4 çözünürlük
		Proleather	pH 10, 60°C	% 49.7 çözünürlük
		Protease A	pH 7, 50°C	% 72.1 çözünürlük
		AroaseAP-10	pH 7-8, 50-55°C	% 48.8 çözünürlük
Pescalase	pH 8, 60°C	% 72.4 çözünürlük		
			S = % 10 (ağırlık/hacim)	

Çizelge 7.14'e devam

Drago ve Gonzalez (2001)	Buğday Gluteni	<i>Aspergillus oryzae</i> kaynaklı fungal proteaz	Isıl ön işlem sonrası, pH 4.25, 55°C S = % 8 (ağırlık) E/S = 5/100	6 saat sonunda, % 42 HD, % 77.58 çöz. Max. çöz. % 79.94 (pH 9)
Bombara vd. (1997)	Buğday Gluteni	<i>Aspergillus oryzae</i> kaynaklı nötral proteaz enzimi	pH 5.9, 54°C E/S = 0.25/100- 3/100 S = 26.6 mg protein/g çözelti (220g un/550 mL su)	1 saat sonunda, % 36.7 HD, % 53 çöz.
Briones-Martinez vd. (1997)	Mısır Gluteni	Hemisphaericin Mexicain	Belirtilmemiş	3 saat sonunda, % 64 çözünürlük % 82 çözünürlük
Nouri vd. (1997)	Gliadin (Buğday)	Pepsin	pH 2, 25°C E/S = 1/100 S = 10-200 g/L	420 dak. sonunda, % 1.36- % 1.55 HD
Mannheim ve Cheryan (1992)	Mısır Gluteni	Alcalase	pH 8, 50°C E/S = 1/200 (ağırlık) S = % 8 (ağırlık/hacim)	4 saat sonunda, % 27.7 HD
Hardwick ve Glatz (1989)	Mısır Gluteni	Alcalase	pH 9, 50°C S = % 8 (ağırlık/hacim) E=0.375-0.75 AU/L	4 saat sonunda, % 9 HD (E=0.75 AU/L) % 36.2 çöz (E= 0.5 AU/L)
Adler-Nissen (1977)	Mısır Gluteni	Alcalase	pH 8, 50°C S = % 8 (ağırlık/hacim) E/S = 2/100	240 dak. sonunda, % 13 HD
Bu çalışmada	Mısır Gluteni	Alcalase Neutrased Flavourzyme Protamex PTN	pH 7, 50°C S = % 2 (ağırlık/hacim) E = 0.35 AU/g protein	60 dak sonunda, % 56 çözünürlük % 19 çözünürlük % 4 çözünürlük % 40 çözünürlük % 15 çözünürlük
		Alcalase	pH 8, 55°C S = % 3 (ağırlık/hacim) E = 0.23 AU/g protein (% 0.25 hacim/hacim)	120 dak sonunda, % 28.4 HD % 85.3 çözünürlük

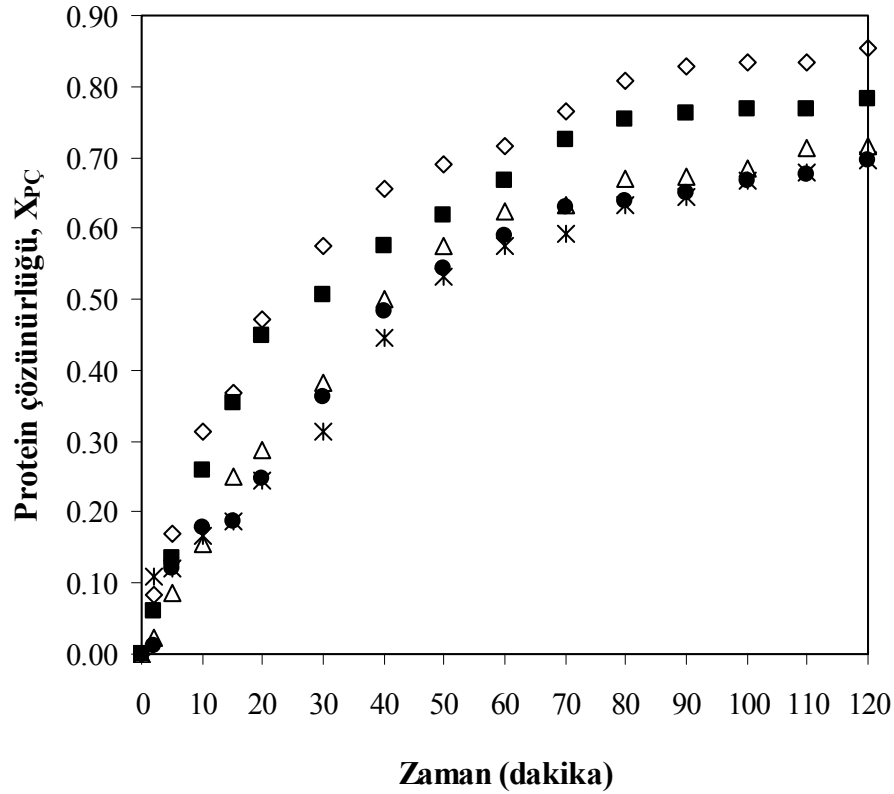
7.4 Hidroliz Ürün Konsantrasyonunun Hidroliz Reaksiyonu Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

Hidroliz işlemi sonunda meydana gelen ürünlerin (hidrolizatların), reaksiyona etkisini incelemek amacıyla, öncelikle deneylerde kullanılacak hidrolizatın eldesi için, hidroliz reaksiyonu belirlenen optimum proses şartlarında gerçekleştirilmiştir. 120 dakikalık reaksiyon süresi sonunda Alcalase enzimi ısı ile inaktive edildikten sonra, ortamda kalan hidrolizlenmeyen proteini çözültiden ayırmak için, hidrolizat çözültisi süzölmüş ve deneylerde kullanılacağı miktarlarda kaplara konularak buzlukta saklanmıştır. Daha sonra, hidrolizat çözültisinin toplam hacime % 25, % 50, % 75, % 100 (hacim/hacim) oranlarında ilave edilmesiyle hazırlanan 30 g protein/L substrat içeren reaksiyon çözültileri, 55°C sıcaklıkta, pH 8'de, % 0.25 (hacim/hacim) enzim ilavesi ile 120 dakika boyunca hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar Şekil 7.28-7.31'de grafiksel olarak sunulmuştur.



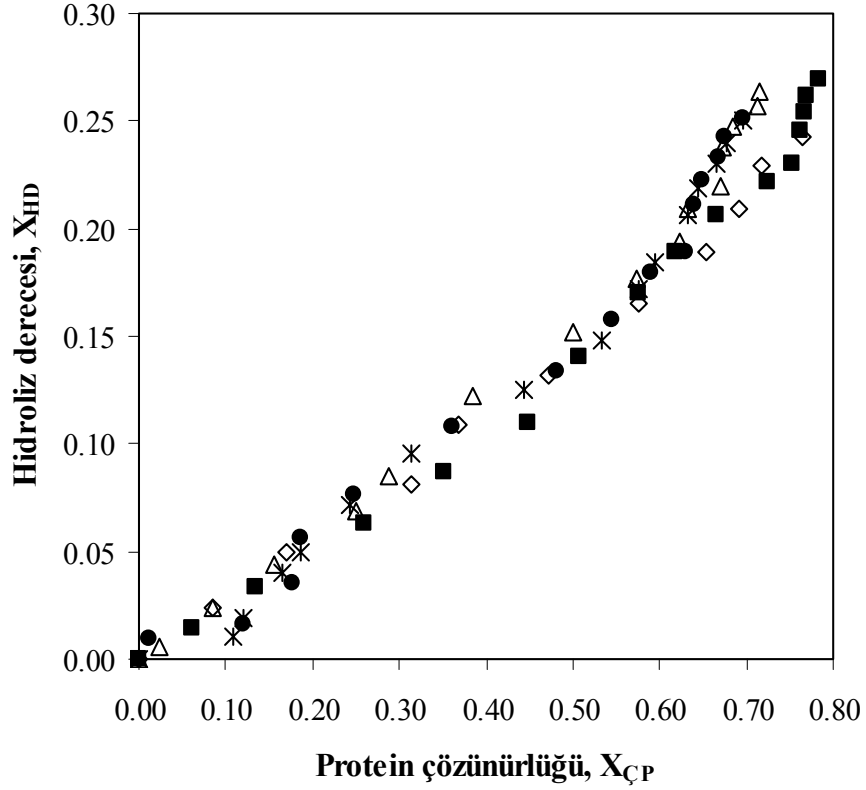
Şekil 7.28 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesi için zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, T=55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (◇ % 0 (hacim/hacim), ■ % 25 (hacim/hacim), △ % 50 (hacim/hacim), ● % 75 (hacim/hacim), Ж % 100 (hacim/hacim))

Hidroliz derecesi ve protein çözünürlük derecelerinin hidrolizat miktarına bağlı değişimleri incelendiğinde; hidrolizat miktarı artırıldığında; hidroliz reaksiyonunun hızının dolayısı ile hidroliz ve çözünürlük derecesi değerlerinin de azalmış olduğu görülmektedir (Şekil 7.28 ve 7.29). Bu azalma, hidroliz ürünlerinin enzimi inhibe etmesi veya ortamın viskozitesini artırarak kütle transferini engellemesi ile açıklanabilir.



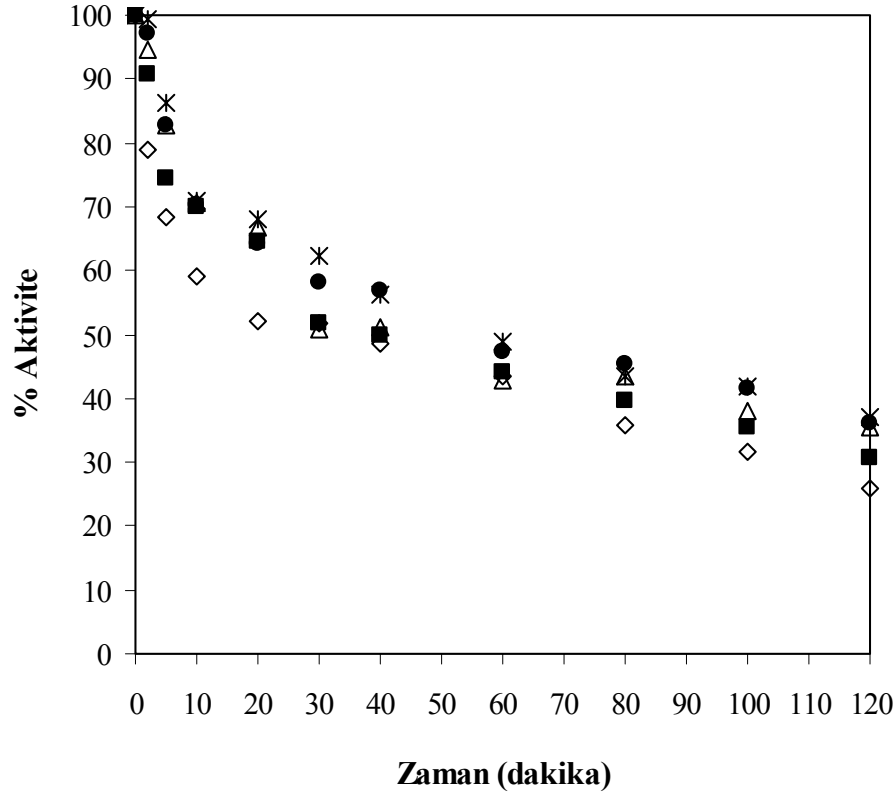
Şekil 7.29 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesi için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, T=55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (◇ % 0 (hacim/hacim), ■ % 25 (hacim/hacim), △ % 50 (hacim/hacim), ● % 75 (hacim/hacim), ⋈ % 100 (hacim/hacim))

Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesi için; hidroliz derecesi değerlerinin protein çözünürlük derecesi değerlerine bağlı değişimleri incelendiğinde (Şekil 7.30), hidroliz derecesi değerleri ile çözünürlük derecesi değerleri arasında lineer bir ilişki olduğu görülmektedir.



Şekil 7.30 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesi için hidroliz derecesi ile çözünürlük derecesinin değişimi, $T= 55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}= 8$, $E= \% 0.25$ (hacim/hacim), $S= 30$ g protein/L (\diamond % 0 (hacim/hacim), \blacksquare % 25 (hacim/hacim), Δ % 50 (hacim/hacim), \bullet % 75 (hacim/hacim), \times % 100 (hacim/hacim))

Hidrolizat miktarının enzim stabilitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde (Şekil 7.31), hidrolizat miktarındaki artış ile enzim stabilitesinde artış meydana geldiği gözlemlenmiştir. Enzim stabilitesinde meydana gelen bu artış, hidrolizat ilavesi sonucu hidroliz ve protein çözünürlüğünün azalması göz önünde bulundurulduğunda, çözelti viskozitesinin artması sonucunda enzim-substrat etkileşiminin azalması nedeni ile enzimin reaksiyonda daha az kullanılması veya hidrolizat ilavesi ile çözelti özelliklerinin değişmesi (viskozite, ısı iletkenlik vs.) sonucunda enzim stabilitesinin reaksiyon çözeltisinde meydana gelen sıcaklık ve pH değişimlerinden daha az etkilenmesi ile açıklanabilir.

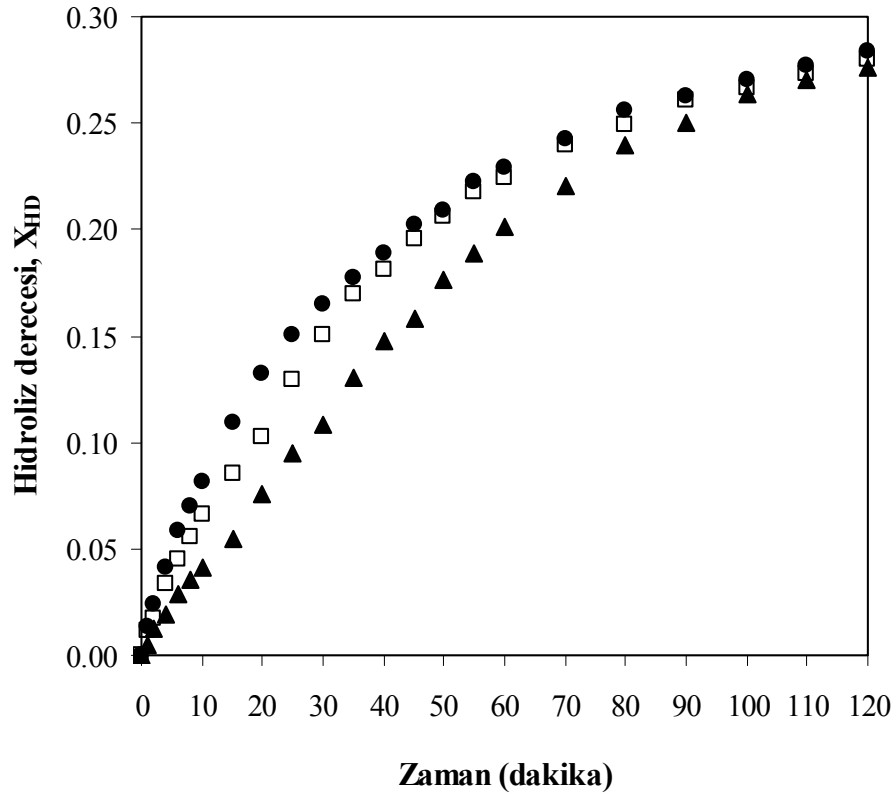


Şekil 7.31 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesi için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim), S= 30 g protein/L (◇ % 0 (hacim/hacim), ■ % 25 (hacim/hacim), △ % 50 (hacim/hacim), ● % 75 (hacim/hacim), ⋈ % 100 (hacim/hacim))

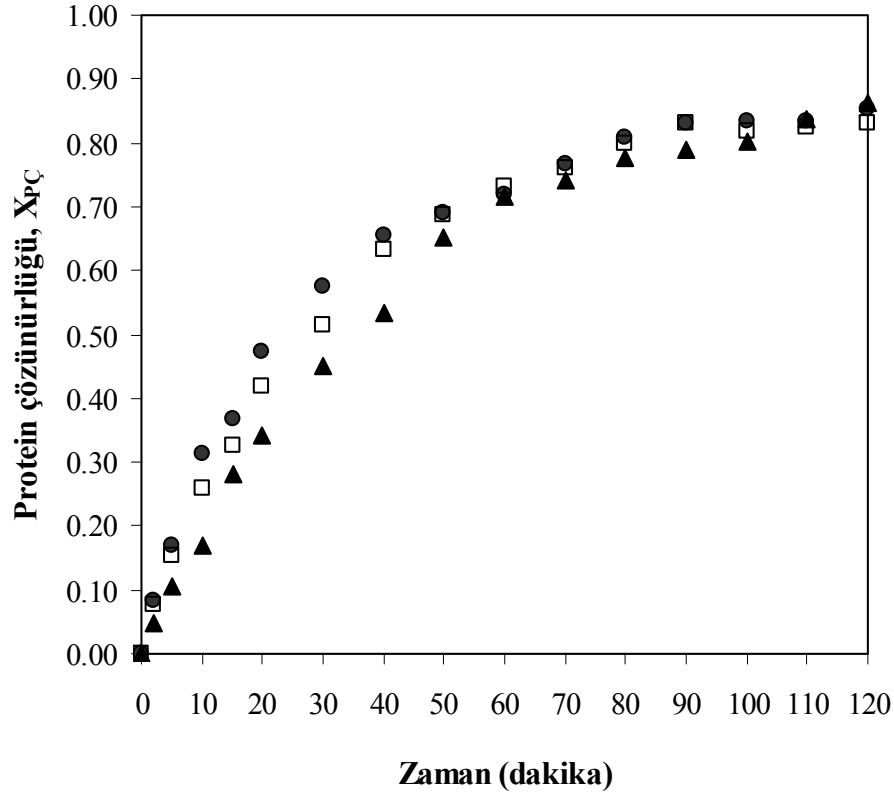
7.5 Kademeli Enzim İlavesinin Hidroliz Reaksiyonu Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

Bölüm 7.3’de gerçekleştirilen deneyler sonucunda, mısır gluteninin hidrolizi ve çözünürlüğü için belirlenen optimum proses koşullarında (30 g protein/L substrat konsantrasyonu, % 0.25 (hacim/hacim) enzim miktarı, 55°C sıcaklık ve pH 8) enzimin stabilitesini % 74 oranında kaybettiği saptanmıştır. Bu nedenle enzim inaktivasyonunu azaltabilmek, dolayısı ile hidroliz ve çözünürlük verimini artırabilmek amacıyla, belirlenen optimum koşullarda toplam enzim miktarı sabit tutularak (2.5 mL/L = 7 AU/L), enzim kademeli şekillerde (tek kademede: 0. dakikada, iki kademede: 0. ve 20. dakikalarda, dört kademede: 0., 15., 30. ve 45. dakikalarda) reaksiyon ortamına ilave edilmiş ve hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 7.32-7.34’de grafiksel olarak sunulmuştur.

Şekil 7.32 ve Şekil 7.33 incelendiğinde, tek kademede enzim ilavesi ile karşılaştırıldığında kademeli enzim ilavesi ile başlangıçtaki enzim miktarı düşük olduğu için reaksiyonun başlangıçta daha yavaş ilerlediği, ancak ara kademelerde ilave edilen enzim ile 120 dakikalık işlem süresi sonunda hidroliz ve çözünürlük değerlerinin, tek kademede enzim ilavesi ile elde edilen değerlerle eşitlendiği saptanmıştır. Bu durum, kademeli enzim ilavesinin hidroliz ve çözünürlük verimine herhangi bir katkısı olmadığını göstermektedir.

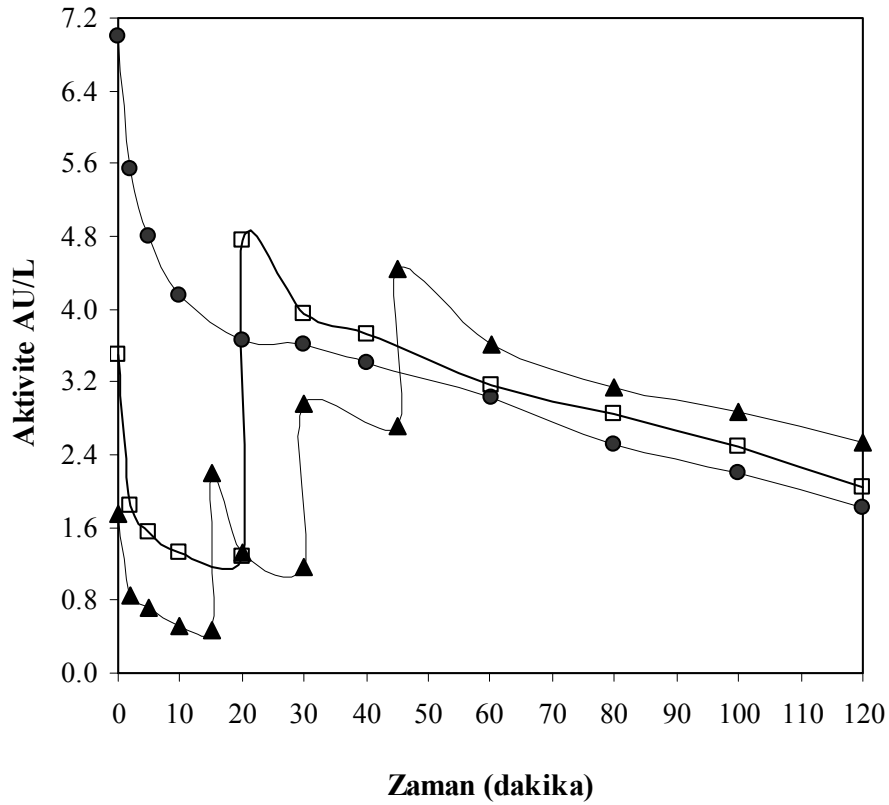


Şekil 7.32 Kademeli enzim ilavesi için zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, $T= 55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}= 8$, $E_{\text{toplam}}= \% 0.25$ (hacim/hacim), $S= 30$ g protein/L (● Tek kademede: 0. dakikada 2.5 mL/L=7 AU/L enzim ilavesi, □ İki kademede: 0. ve 20. dakikalarda 1.25 mL/L=3.5 AU/L enzim ilavesi, ▲ Dört kademede: 0., 15., 30. ve 45. dakikalarda 0.625 mL/L=1.75 AU/L enzim ilavesi)



Şekil 7.33 Kademeli enzim ilavesi için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, $T= 55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}= 8$, $E_{\text{toplam}}= \% 0.25$ (hacim/hacim), $S= 30$ g protein/L (● Tek kademe: 0. dakikada 2.5 mL/L=7 AU/L enzim ilavesi, □ İki kademe: 0. ve 20. dakikalarda 1.25 mL/L=3.5 AU/L enzim ilavesi, ▲ Dört kademe: 0., 15., 30. ve 45. dakikalarda 0.625 mL/L=1.75 AU/L enzim ilavesi)

Kademeli enzim ilavesinin enzim stabilitesine etkisi incelendiğinde ise (Şekil 7.34), kademeli enzim ilavesi ile enzim stabilitesinin artırılacağı gözlemlenmiştir. Ortama ilave edilen toplam enzim miktarı göz önünde bulundurulduğunda, 2.5 mL/L'lik enzim miktarı için enzimin başlangıç ünitesi 7 AU/L'dir. 120 dakika sonunda geriye kalan enzim aktivitelerinin tek kademe enzim ilavesi için 1.81 AU/L (geriye kalan aktivite % 26), iki kademe enzim ilavesi için 2.03 AU/L (geriye kalan aktivite % 29), dört kademe enzim ilavesi içinse 2.52 AU/L (geriye kalan aktivite % 36) olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak enzim stabilitesi, enzim ilavesinin iki kademe gerçekleştirilmesi ile % 12, dört kademe gerçekleştirilmesi ile % 39 oranında artmıştır.



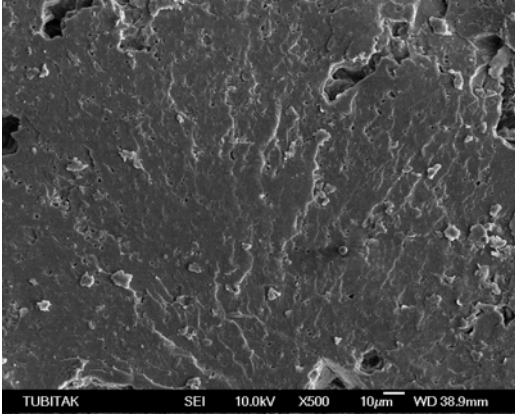
Şekil 7.34 Kademeli enzim ilavesi için zamana karşılık elde edilen enzim aktivite değerleri, $T= 55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}= 8$, $E_{\text{toplam}}= \% 0.25$ (hacim/hacim), $S= 30$ g protein/L (● Tek kademe: 0. dakikada 2.5 mL/L=7 AU/L enzim ilavesi, □ İki kademe: 0. ve 20. dakikalarda 1.25 mL/L=3.5 AU/L enzim ilavesi, ▲ Dört kademe: 0., 15., 30. ve 45. dakikalarda 0.625 mL/L=1.75 AU/L enzim ilavesi)

7.6 Glutene Uygulanan Ön İşlemlerin Hidroliz Reaksiyonu Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

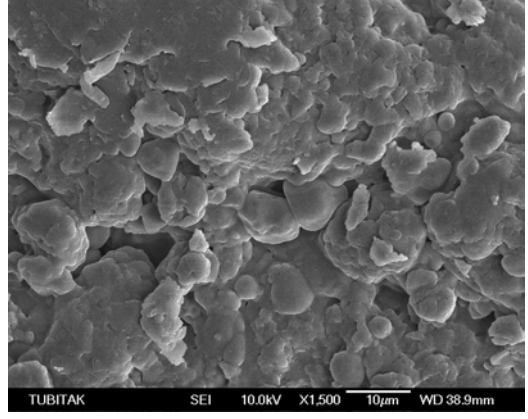
7.6.1 Isıl ön işlemin hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi

Proteinlerin denatürasyonu, ikincil ve üçüncül yapıların parçalanması ve yıkımını içerir. Denatürasyon reaksiyonları peptit bağlarını parçalayacak kadar güçlü olmadığı için birincil yapı (amino asit dizilimi) denatürasyon işlemi sonrası aynı kalır. Denatürasyon, proteindeki normal alfa-helix ve beta tabakalarını bozar ve protein halkasını açarak proteini düzensiz bir şekle sokar [7].

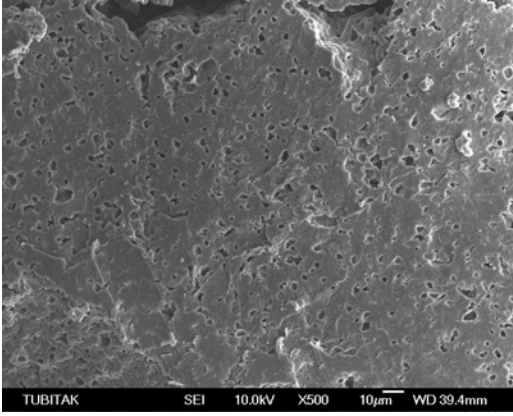
Üçüncül yapıda yan zincirler arasında bozunabilecek dört tür bağ etkileşimi vardır: hidrojen bağları, tuz köprüleri, disülfid bağları ve polar olmayan hidrofobik etkileşimler. Bu nedenle, birçok madde ve durum denatürasyona neden olabilir [7].



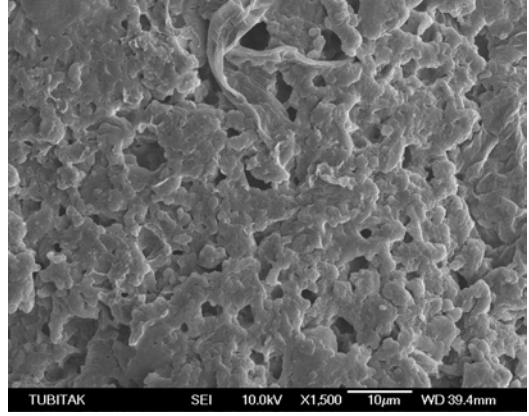
arayüzey görüntüsü, büyütme x 500



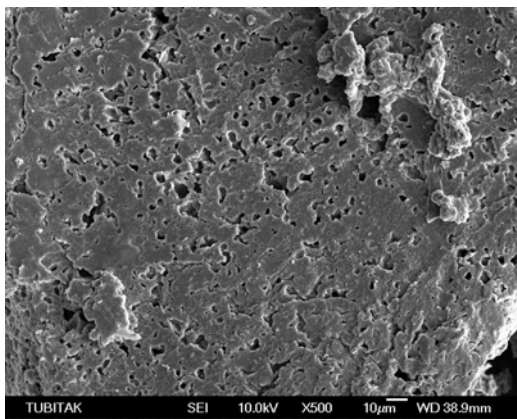
partikül yüzeyi görüntüsü, büyütme x 1500

(a) Ön işlem öncesi elde edilen SEM görüntüleri

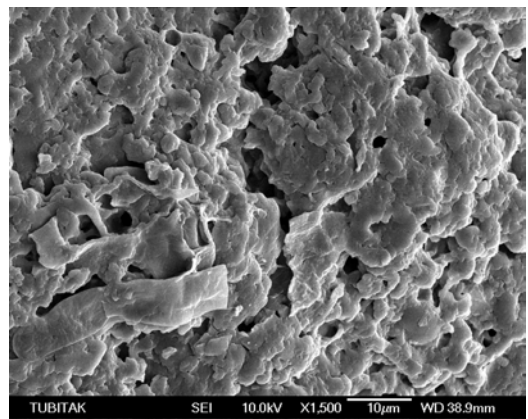
arayüzey görüntüsü, büyütme x 500



partikül yüzeyi görüntüsü, büyütme x 1500

(b) 90°C ısıtılma sonrası elde edilen SEM görüntüleri

arayüzey görüntüsü, büyütme x 500



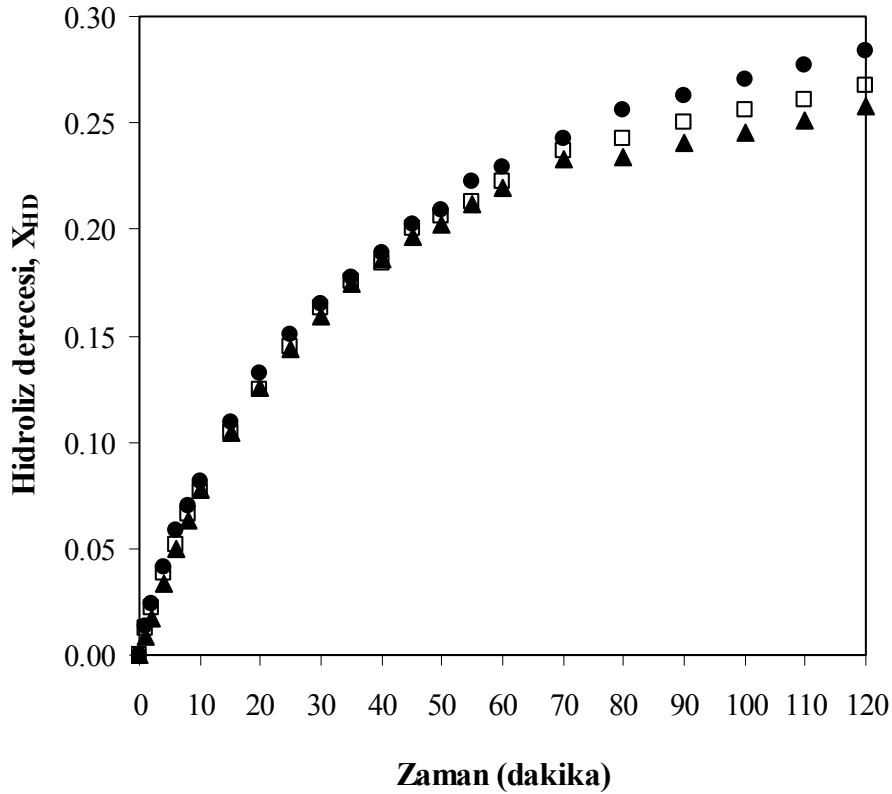
partikül yüzeyi görüntüsü, büyütme x 1500

(c) 100°C ısıtılma sonrası elde edilen SEM görüntüleri

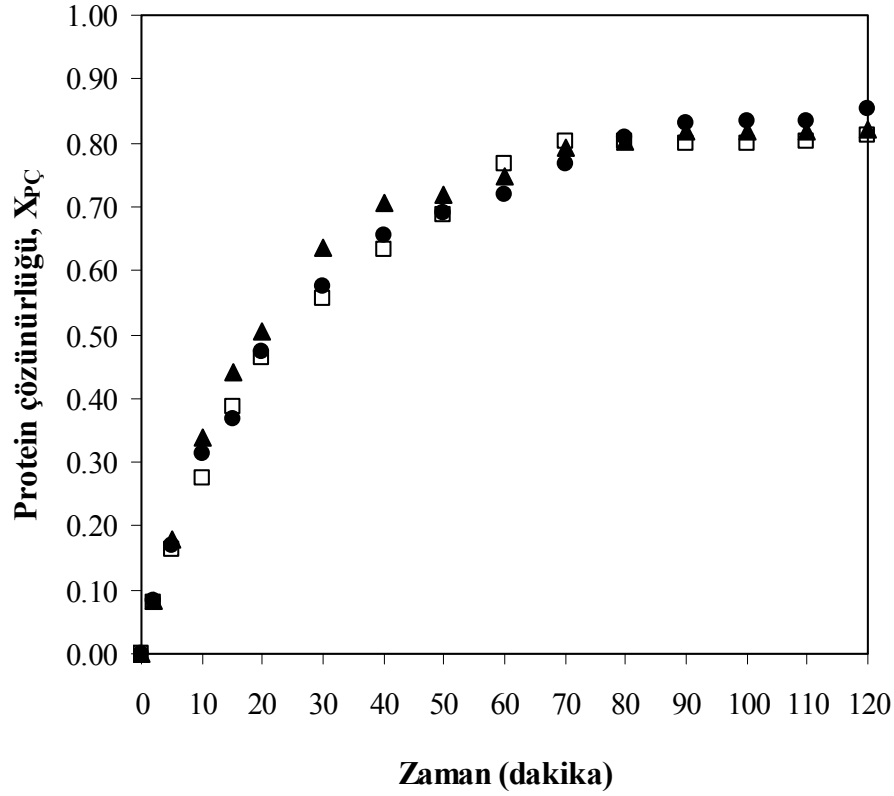
Şekil 7.35 Isıl ön işlemin glutenin yüzey yapısına etkisi

Isı kinetik enerjisi arttırdığından, moleküller çok hızlı titreşir, bu moleküller arasındaki bağları zayıflatır ve parçalanmasını sağlar. Bu nedenle, ısı hidrojen bağlarını parçalamak ve polar olmayan hidrofobik etkileşimleri bozmak için kullanılabilir. Isıl denatürasyon sonucu protein bozunur ve enzimatik olarak daha kolay parçalanabilir bir hale gelir. Bu amaçla çalışmanın bu bölümünde, ısıl denatürasyon için 90 ve 100°C olmak üzere iki farklı sıcaklık seçilmiş, 30 g/L protein içeren 200 ml'lik gluten çözeltisi, enzimatik reaksiyon öncesi seçilen sıcaklık değerlerine ısıtılarak bu sıcaklık değerlerinde 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Ön işlem sonrası gluten morfolojisinde meydana gelen değişimi inceleyebilmek amacı ile SEM görüntüleri alınmış ve Şekil 7.35'de sunulmuştur. Şekil 7.35 incelendiğinde, ısıl ön işlem uygulandığında substrattaki gözenekliliğin arttığı görülmektedir.

Glutene uygulanan ısıl ön işlem sonrası hidroliz reaksiyonu 200 mL hacimde, daha önceden belirlenen optimum proses şartlarında; 55°C sıcaklık ve pH 8 değerinde, % 0.25 (hacim/hacim) enzim ilavesi ile; gerçekleştirilmiştir. 120 dakikalık reaksiyon süresi boyunca protein hidrolizi, protein çözünürlüğü ve enzim aktivitesi zamana bağlı olarak incelenmiş, elde edilen sonuçlar Şekil 7.36-7.38'de grafiksel olarak sunulmuştur.



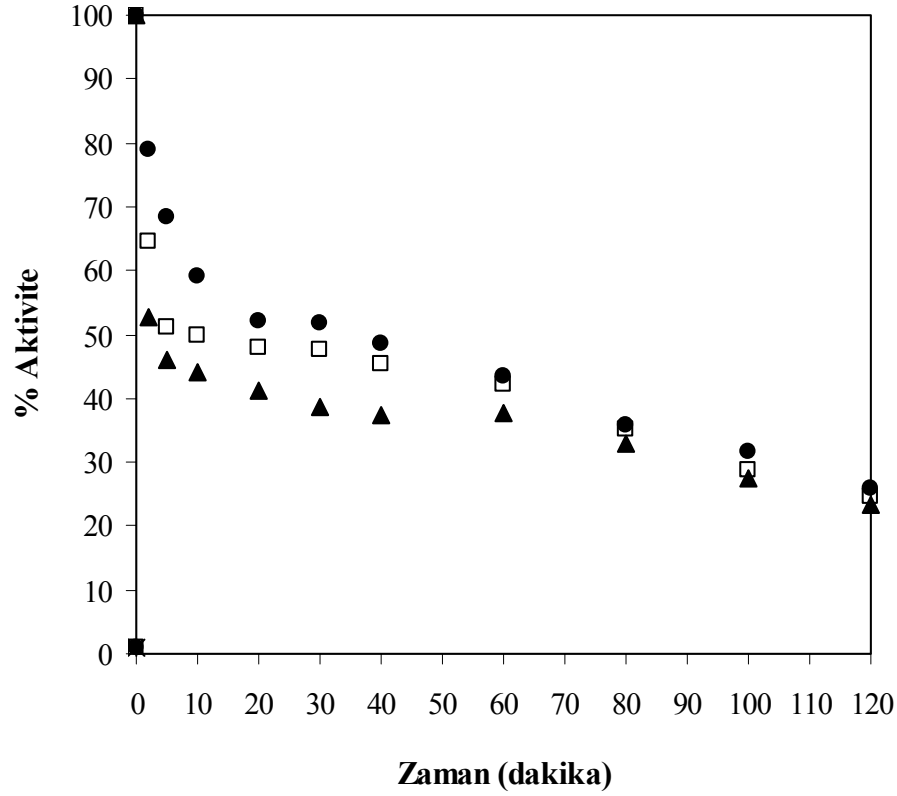
Şekil 7.36 Isıl ön işlem sonrası zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, T= 55°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 90°C'deki ısıl ön işlem sonrası hidroliz, ▲100°C'deki ısıl ön işlem sonrası hidroliz)



Şekil 7.37 Isıl ön işlem sonrası zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, $T= 55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}= 8$, $S= 30 \text{ g protein/L}$, $E= \% 0.25$ (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 90°C 'deki ısıl ön işlem sonrası hidroliz, ▲ 100°C 'deki ısıl ön işlem sonrası hidroliz)

Şekil 7.36 ve 7.37 incelendiğinde ısıl ön işlemin hidroliz verimine bir katkısı olmadığı açıkça görülmektedir. Isıl ön işlem ile 120 dakika sonunda hidroliz derecesi değerlerinde görülen çok az düşüş, hidroliz öncesi ortamda bulunan çözünmüş protein miktarının ön işlemle artış göstermesi ile açıklanabilir. Hidroliz öncesi ortamda bulunan çözünmüş protein miktarının ön işlem uygulanmadan 1.97 g/L olduğu, 90 ve 100°C 'lik ısıl ön işlem uygulamasından sonra ise bu değer 2.67 ve 2.97 g/L 'ye yükseldiği belirlenmiştir.

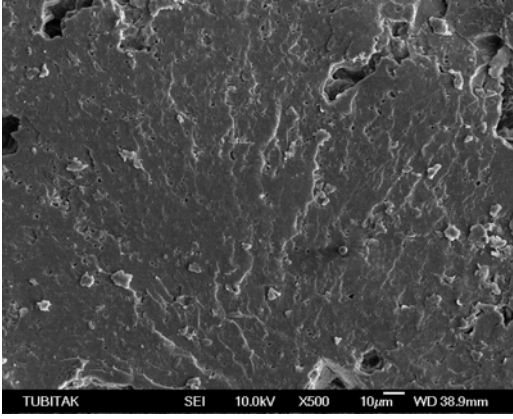
Şekil 7.38 incelendiğinde ön işlem sonrası ilk 60 dakikalık sürede, kontrol deneyi ile karşılaştırıldığında aktivite değerlerinde az da olsa bir düşüş meydana geldiği görülmektedir. Bu durum, ısıl inaktivasyonla proteinin ikincil veya üçüncül yapısında meydana gelen olası bozunma sonucunda bazı bileşenlerin ortaya çıkması veya direk olarak değişime uğramış olan substratın enzim stabilitesini etkilemesi ile açıklanabilir.



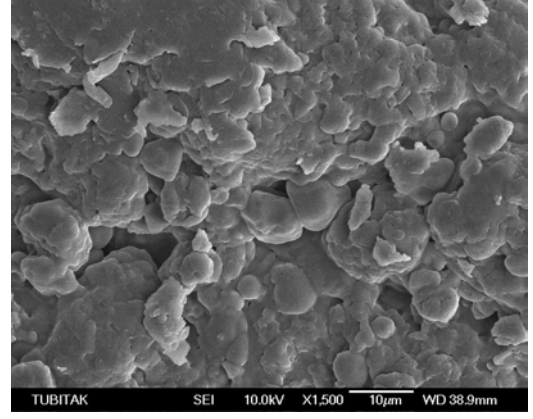
Şekil 7.38 Isıl ön işlem sonrası zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, T= 55°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 90°C'deki ısıl ön işlem sonrası hidroliz, ▲ 100°C'deki ısıl ön işlem sonrası hidroliz)

7.6.2 Mikrodalga ön işleminin hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi

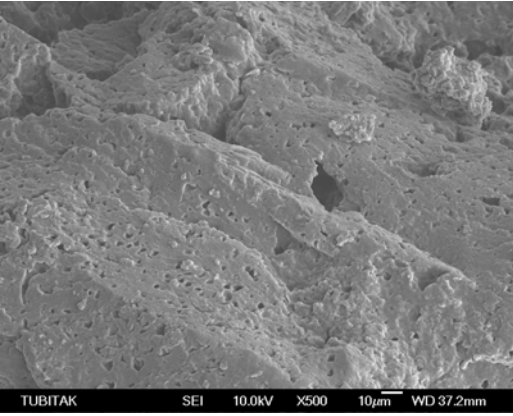
Substrata uygulanan ön işlemlerde amaç enzimin substrattaki hedef bağlara ulaşabilirliğini kolaylaştırmaktır. Ön işlemler fiziksel (mekanik ve ısı) veya kimyasal işlemler (asidik ve alkali) olarak gruplandırılabilir. Mikrodalga'nın enzimatik reaksiyonlarda ön işlem olarak kullanımı yakın zamanda araştırma konusu olmuştur. Mondal vd. (2004), gerçekleştirdikleri çalışmada, üç farklı enzimatik reaksiyon seçerek bu reaksiyonlarda substrat olarak kullanılan poligalakturonik asit, ksilan ve karboksiselüloza mikrodalga ön işlemi uygulamışlar ve ön işlem sonrasında bu substratlar üzerinde pektinaz, ksilanaz ve selülaz enzimlerinin katalitik aktivitelerinin ön işlem uygulanmayan substratlara göre sırası ile 1.5, 2.3 ve 1.6 kat arttığını bildirmişlerdir. Zhu vd. (2006) tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise, pirinç sapının selülaz enzimi ile hidrolizinde mikrodalga ön işleminin etkisi incelenmiş ve mikrodalga ön işlemi ile alkali ön işlemi kombine kullanıldığında hidroliz reaksiyonunun başlangıç hızının arttığı bildirilmiştir.



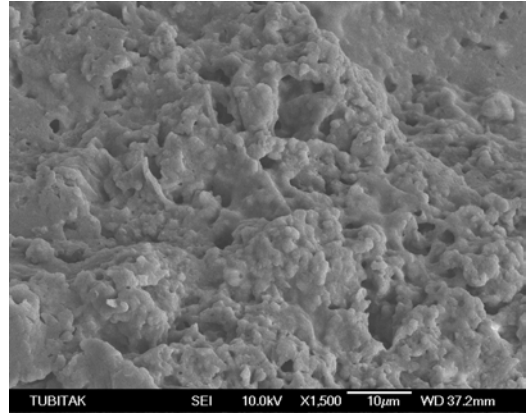
arayüzey görüntüsü, büyütme x 500



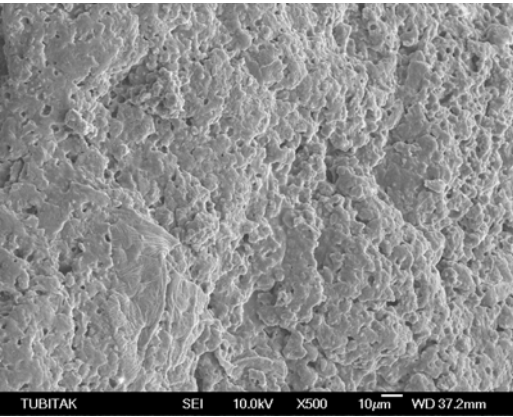
partikül yüzeyi görüntüsü, büyütme x 1500

(a) Ön işlem öncesi elde edilen SEM görüntüleri

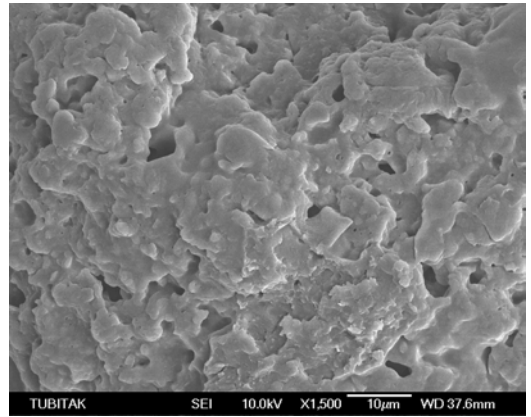
arayüzey görüntüsü, büyütme x 500



partikül yüzeyi görüntüsü, büyütme x 1500

(b) 540 W mikrodalga ön işlemi sonrası elde edilen SEM görüntüleri

arayüzey görüntüsü, büyütme x 500

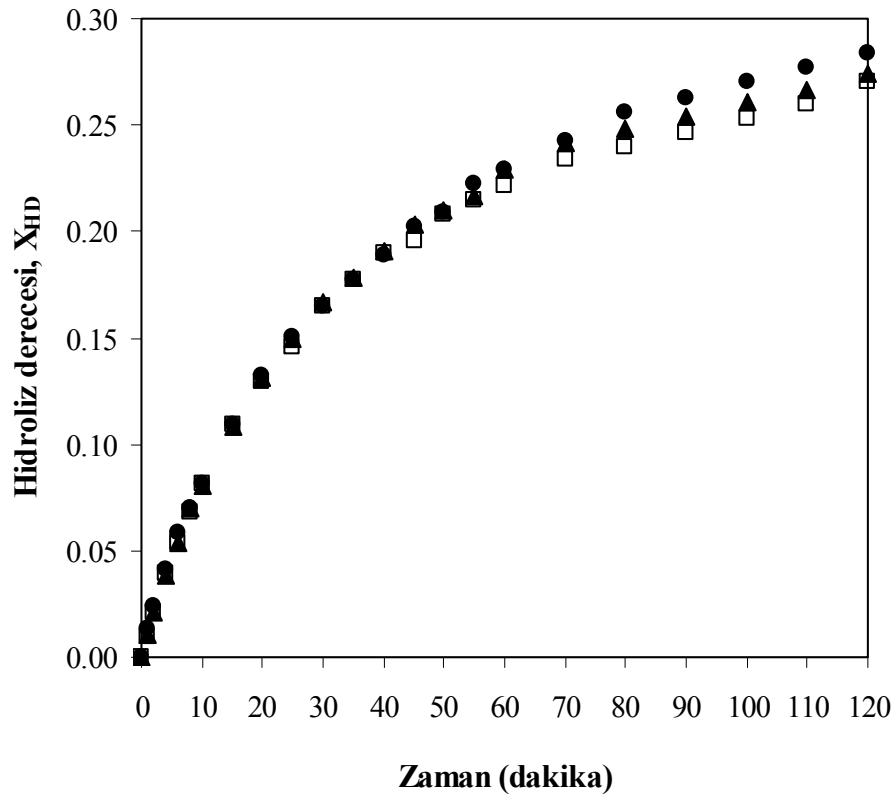


partikül yüzeyi görüntüsü, büyütme x 1500

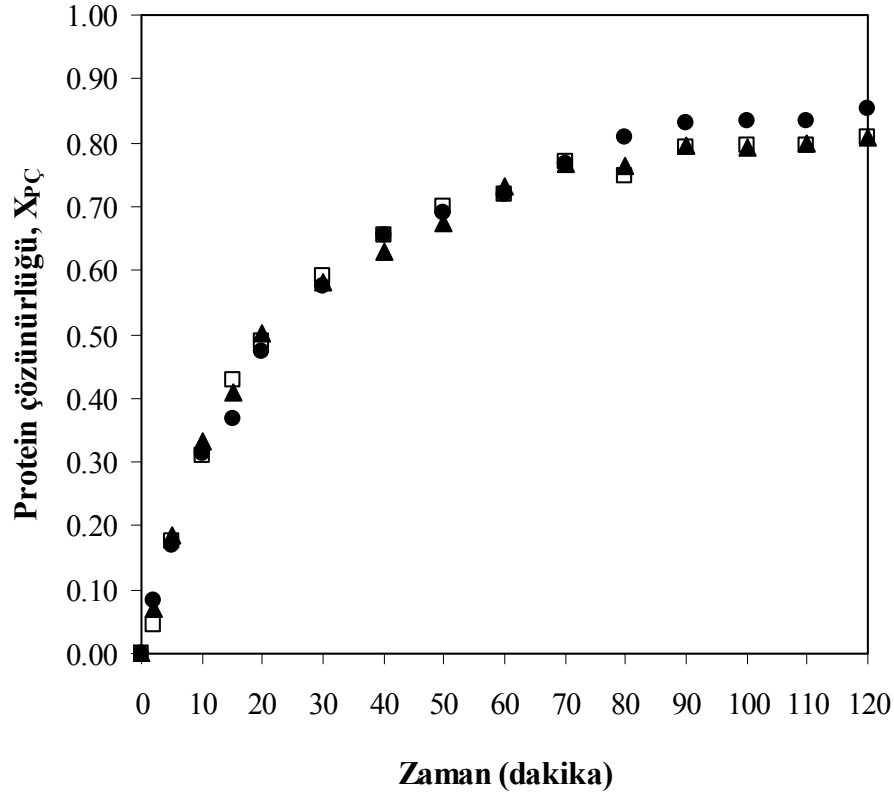
(c) 720 W mikrodalga ön işlemi sonrası elde edilen SEM görüntüleri

Şekil 7.39 Mikrodalga ön işleminin glutenin yüzey yapısına etkisi

Çalışmanın bu bölümünde mısır glutenine mikrodalga ön işleminin uygulanmasının hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ön işlemler için Arçelik firması tarafından üretilen MD 594 ürün koduna sahip mikrodalga fırın kullanılmıştır. 540 W ve 720 W olmak üzere iki farklı mikrodalga gücü seçilerek, 30 g/L protein içeren 200 mL'lik gluten çözeltisi, enzimatik reaksiyon öncesi seçilen güç değerlerinde 10 dakika süresince mikrodalga işlemine tabi tutulmuştur. Ön işlem tamamlandıktan sonra çözelti hacmi kontrol edilerek, çözelti tekrar 200 mL'ye tamamlanmış ve daha önceden belirlenen optimum şartlarda hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Ön işlem sonrası gluten morfolojisinde meydana gelen değişimi inceleyebilmek amacı ile alınan SEM görüntüleri Şekil 7.39'da hidroliz reaksiyonu sonucu elde edilen sonuçlar Şekil 7.40-7.42'de sunulmuştur. Şekil 7.39 incelendiğinde, mikrodalga ön işlem uygulandığında substrattaki gözenekliliğin arttığı görülmektedir.



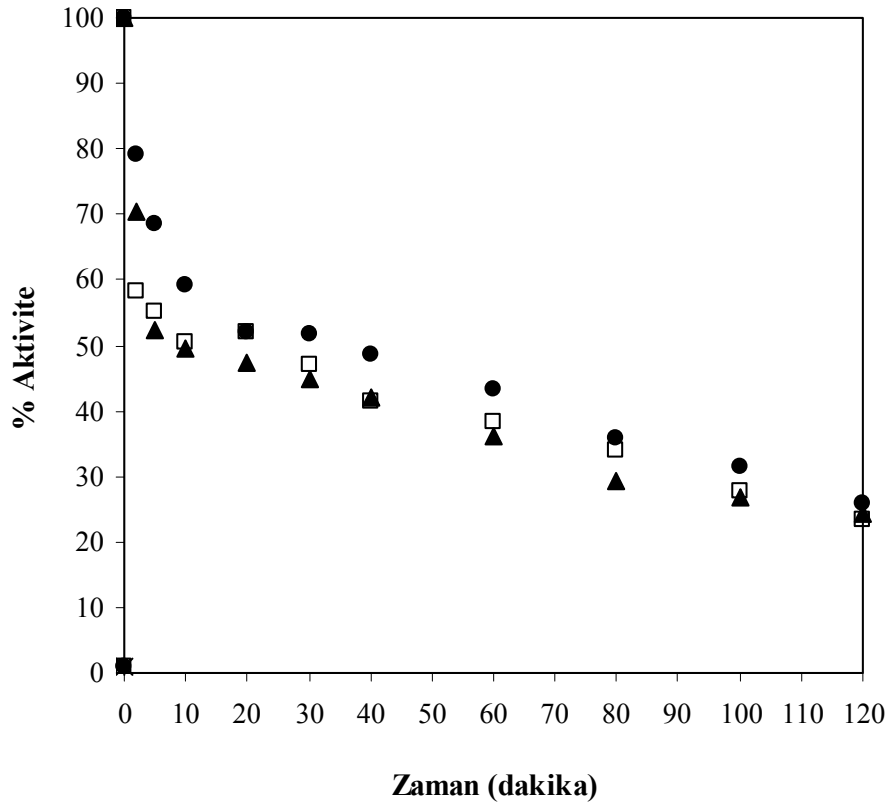
Şekil 7.40 Mikrodalga ön işleminin zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, T= 55°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 540 W'lık mikrodalga ön işleminin sonrası hidroliz, ▲ 720 W'lık mikrodalga ön işleminin sonrası hidroliz)



Şekil 7.41 Mikrodalga ön işleminin zamanla karşılaştık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, T= 55°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 540 W'lık mikrodalga ön işleminin ardından hidroliz, ▲ 720 W'lık mikrodalga ön işleminin ardından hidroliz

Şekil 7.40-7.41 incelendiğinde mikrodalga ön işleminin için elde edilen sonuçların ısı ön işlem için elde edilen sonuçlarla hemen hemen aynı olduğu yani ön işlemin hidroliz ve çözünürlük verimine daha fazla bir katkısı olmadığı görülmektedir. Hidroliz öncesi ortamda bulunan çözünmüş protein miktarı mikrodalga ön işleminin uygulanması ile artış göstermiştir. Hidroliz öncesi ortamda bulunan çözünmüş protein miktarı ön işlem uygulanmadan 1.97 g/L iken, bu değer 540 ve 720 W'lık mikrodalga ön işleminin uygulamasından sonra 2.56 g/L'ye yükseldiği bulunmuştur.

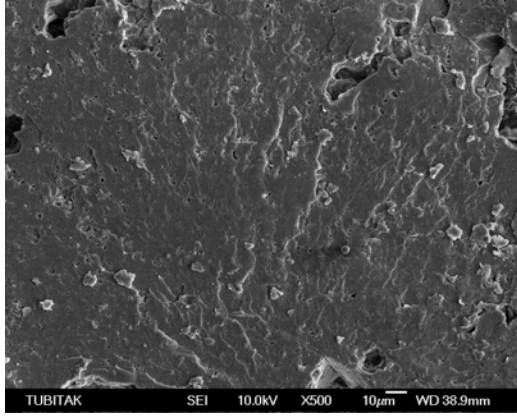
Şekil 7.42 incelendiğinde ön işlem sonrası, kontrol deneyi ile karşılaştırıldığında aktivite değerlerinde az da olsa bir düşüş meydana geldiği görülmektedir.



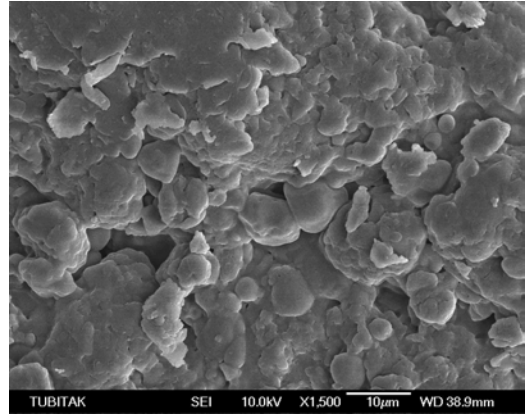
Şekil 7.42 Mikrodalga ön işleme sonrası zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, T= 55°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 540 W'lık mikrodalga ön işleme sonrası hidroliz, ▲ 720 W'lık mikrodalga ön işleme sonrası hidroliz)

7.6.3 Sonikasyon ön işleminin hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi

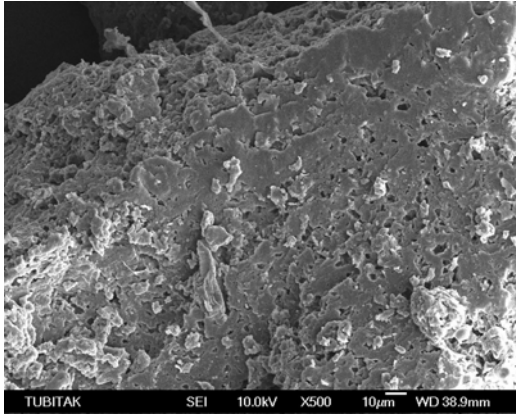
Sonikasyon işleminin proteindeki zayıf bağları parçalayarak protein denatürasyonuna neden olabileceği, ayrıca substratın partikül boyutunu düşürerek enzim için yüzey alanını artırabileceği düşünülerek, çalışmanın bu bölümünde sonikasyon ön işleminin hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sonikasyon işlemi için Bandelin Sonopuls (HD 2200) marka, TT13, 12.7 mm çapında titanium uçlu sonikatör kullanılmıştır. Ön işlemler % 12 (ağırlık/hacim) substrat konsantrasyonunda 50 mL hacimde, 40°C sabit sıcaklıkta (çözelti sıcaklığını sabit tutmak için soğutucu banyo kullanılmıştır), % 50 frekans aralığında 30 dakika süreyle (1 dakika çalışma süresi, bir dakika bekleme süresi) 80 W ve 120 W'lık akustik güçlerde gerçekleştirilmiştir. Ön işlem sonrası substrat çözeltisi 200 mL'ye seyreltilmiş ve daha önceden belirlenen optimum şartlarda hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir.



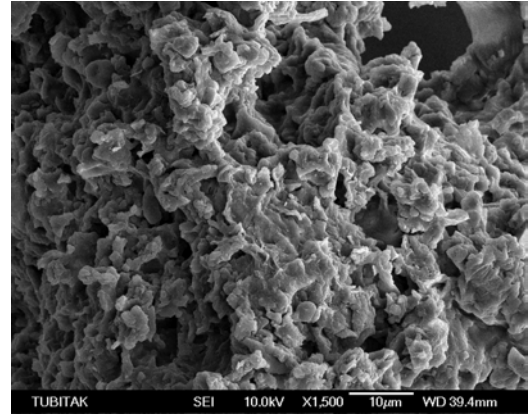
arayüzey görüntüsü, büyütme x 500



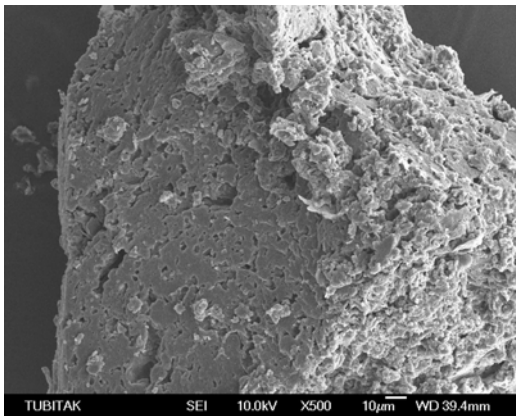
partikül yüzeyi görüntüsü, büyütme x 1500

(a) Ön işlem öncesi elde edilen SEM görüntüleri

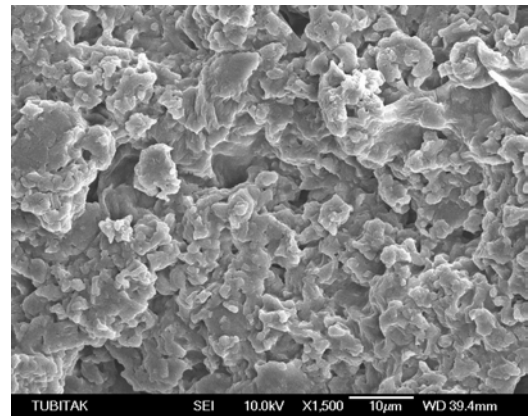
arayüzey görüntüsü, büyütme x 500



partikül yüzeyi görüntüsü, büyütme x 1500

(b) 80 W sonikasyon ön işlemi sonrası elde edilen SEM görüntüleri

arayüzey görüntüsü, büyütme x 500

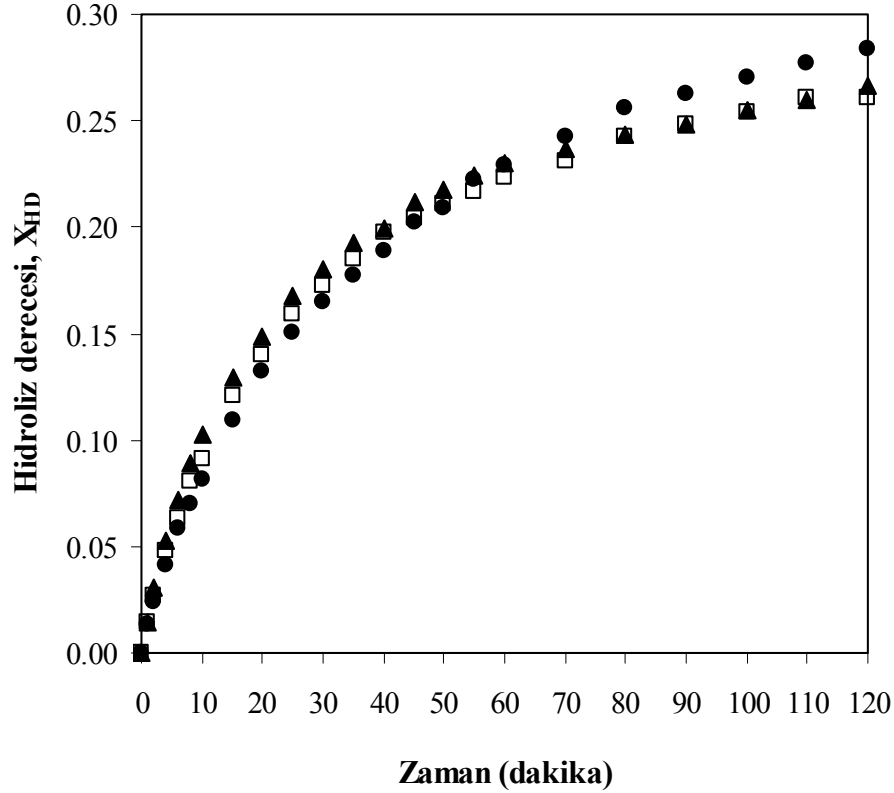


partikül yüzeyi görüntüsü, büyütme x 1500

(c) 120 W sonikasyon ön işlemi sonrası elde edilen SEM görüntüleri

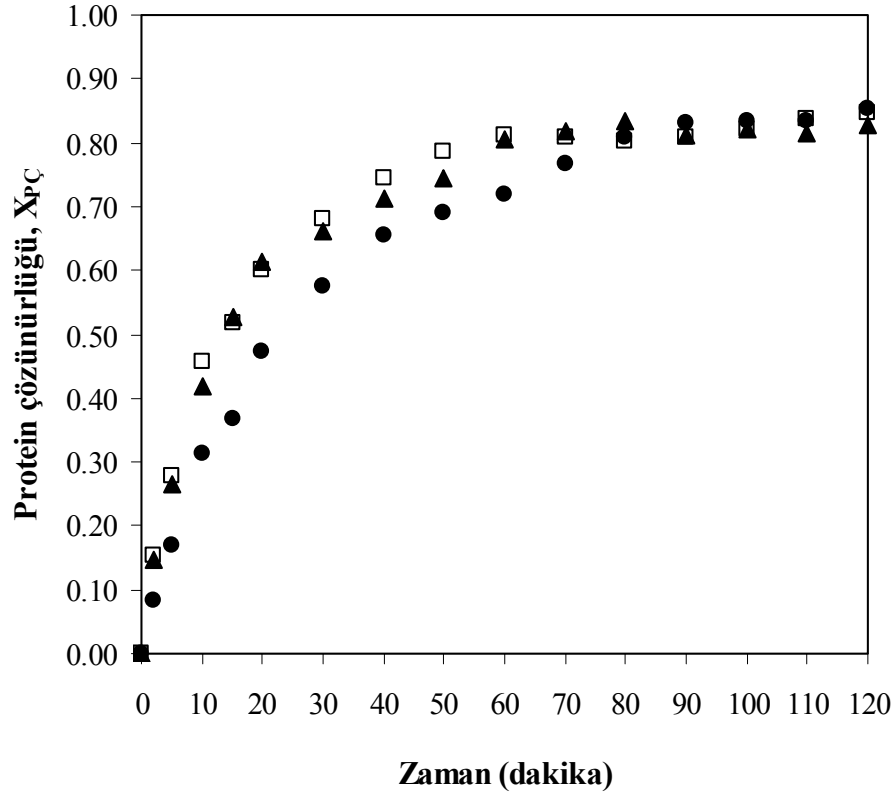
Şekil 7.43 Sonikasyon ön işleminin glutenin yüzey yapısına etkisi

Ön işlem sonrası gluten morfolojisinde meydana gelen değişimi inceleyebilmek amacı ile alınan sem görüntüleri Şekil 7.43’de hidroliz reaksiyonu sonucu elde edilen sonuçlar Şekil 7.44-7.46’da sunulmuştur. Şekil 7.43 incelendiğinde, sonikasyon ön işlemi uygulandığında substrattaki gözenekliliğin arttığı görülmektedir.



Şekil 7.44 Sonikasyon ön işlemi sonrası zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, T= 55°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 80 W’lık sonikasyon ön işlemi sonrası hidroliz, ▲ 120 W’lık sonikasyon ön işlemi sonrası hidroliz)

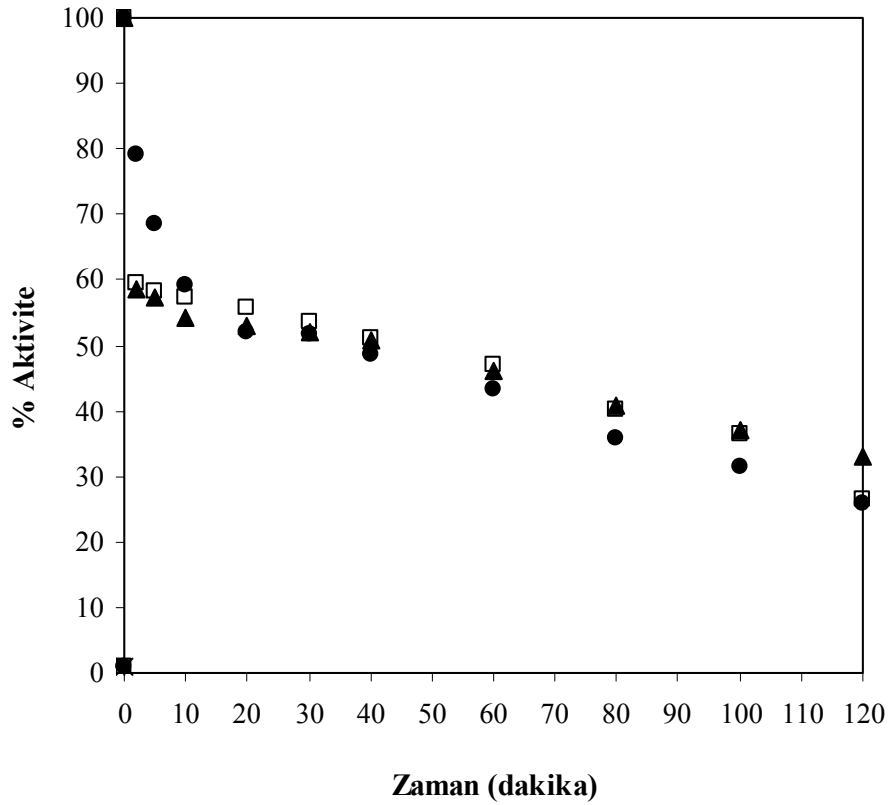
Şekil 7.44 incelendiğinde sonikasyon ön işleminin hidroliz verimine bir katkısı olmadığı açıkça görülmektedir. Sonikasyon ön işlemi ile 120 dakika sonunda hidroliz derecesi değerlerinde görülen çok az düşüş, yine hidroliz öncesi ortamda bulunan çözülmüş protein miktarının ön işlemle artış göstermesi ile açıklanabilir. Hidroliz öncesi ortamda bulunan çözülmüş protein miktarı ön işlem uygulanmadan 1.97 g/L iken, bu değer 80 ve 120 W’lık sonikasyon ön işlemi uygulamasından sonra 3.01 ve 3.93 g/L’ye yükseldiği bulunmuştur.



Şekil 7.45 Sonikasyon ön işlemi sonrası zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, T= 55°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 80 W'lık sonikasyon ön işlemi sonrası hidroliz, ▲ 120 W'lık sonikasyon ön işlemi sonrası hidroliz)

Şekil 7.45 incelendiğinde, ön işlem uygulandığında protein çözünürlüğünün daha hızlı gerçekleştiği, kontrol deneyi için protein çözünürlüğü 90. dakikada tamamlanırken, ön işlem uygulaması ile aynı çözünürlük değerine 60. dakikada ulaşıldığı görülmektedir. Ancak ön işlem süresi ve maliyeti de göz önünde bulundurulduğunda sonikasyon işlemin fazla bir avantaj sağlamadığı açıktır.

Şekil 7.46 incelendiğinde enzim aktivitesi üzerinde sonikasyon ön işleminin, kontrol deneyleri ile karşılaştırıldığında bir etkisi olmadığı açıkça görülmektedir.



Şekil 7.46 Sonikasyon ön işlemleri sonrası zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, T= 55°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 80 W'lık sonikasyon ön işlemleri sonrası hidroliz, ▲ 120 W'lık sonikasyon ön işlemleri sonrası hidroliz)

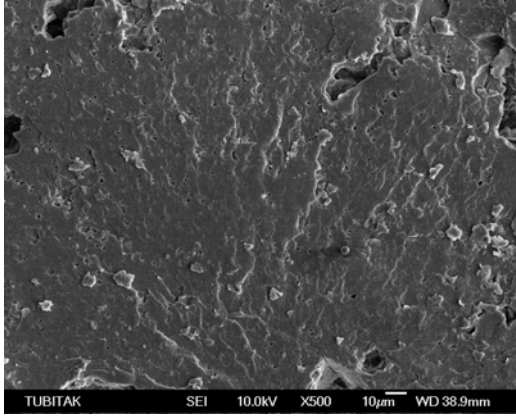
7.6.4 Nişastanın glutenden ayrılmasının hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi

Mısır gluteni % 12-20 oranında nişasta içermektedir ve nişasta proteine kuvvetli bir biçimde bağlıdır. Kim vd. (2004) gerçekleştirdikleri çalışmada mısır glutenini alfa-amilaz enzimi ile muamele ederek nişastayı hidrolizlemişler, daha sonra substrata ısıl denatürasyon (80 ve 100°C'de 30 dakika) uygulamışlardır. Ön işlem uygulanan gluteni Flavourzyme enzimi ile hidrolizleyerek, nişasta hidrolizi+ısıl ön işlem uygulandıktan sonra elde edilen protein hidroliz veriminin, sadece nişasta hidrolizi ön işlemi uygulandıktan sonra elde edilen protein hidroliz veriminden daha yüksek olduğunu rapor etmişler, ancak ham gluten ile yani ön işlem uygulanmamış gluten hidrolizi ile bir karşılaştırma yapmamışlardır. Zheng vd. (2006) gerçekleştirdikleri çalışmalarında mısır glutenini 160-180°C'de 1-1.5 MPa'da çift burgulu ekstrüderdan geçirmişler ve daha sonra alfa-amilaz enzimi ile muamele ederek nişastayı hidrolizlemişlerdir. Ön işlem sonrası gluten hidrolizi için Alcalase enzimini kullanmışlar ve

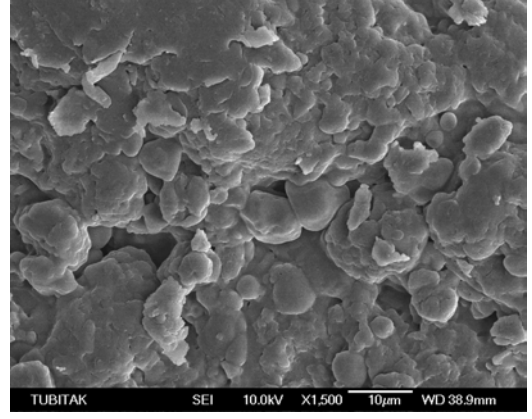
nişastanın glutenden uzaklaştırılması ile hidroliz veriminin arttığını rapor etmişlerdir. Her iki çalışmada da nişasta hidrolizi başka bir ön işlem ile kombine olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada glutenden nişasta alfa-amilaz enzimi ile hidroliz edilerek uzaklaştırılmış ve ön işleme tabi tutulan gluten ile ham glutenin Alcalase enzimi ile hidrolizi sonucunda elde edilen veriler karşılaştırılmıştır.

Nişasta hidrolizi, 30 g/L protein içeren gluten çözeltisi (\approx 48.2 g gluten/L) için 200 mL hacimde 65°C sıcaklıkta pH 6.5 değerinde, % 0.6 (hacim/hacim) *Bacillus Licheniformis* kaynaklı alfa-amilaz enzimi ilavesi ile 30 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. Benzer şartlarda (pH 6.5, T= 70°C) Zheng vd. (2006), % 10 gluten (100 g gluten/L) içeren çözeltilerden 30 dakikada nişastanın yaklaşık % 60'ını uzaklaştırdıklarını rapor etmişlerdir. Ayrıca, saf mısır nişastanın fazlası (20 g nişasta/L) ile, aynı koşullarda; 65°C sıcaklıkta pH 6.5 değerinde, % 0.6 (hacim/hacim) alfa-amilaz enzimi ilavesi ile; 30 dakika süreyle kontrol amaçlı olarak gerçekleştirilen hidroliz deneyinde (Ek 5) nişastanın % 86'sının hidrolizlendiği saptanmıştır. Zheng vd. (2006)'nin çalışmalarında kullandıkları gluten miktarı bu çalışmada kullanılan miktarın yaklaşık iki katı kadardır. Glutende nişasta miktarı % 12 ile % 20 arasında değişim göstermektedir (Shukla ve Cheryan, 2001; Kim vd., 2003). Maksimum miktar göz önünde bulundurulduğunda, 48.2 g/L gluten içeren çözelti içerisindeki nişasta konsantrasyonu 9.64 g/L'dir (Saf nişasta ile gerçekleştirilen hidroliz deneyinde bu miktarın 2 katı kullanılmıştır). Bütün bunlar dikkate alındığında, bu çalışma için nişasta hidrolizi ön işlemi uygulandığında nişastanın % 60'ından fazlasının uzaklaştırıldığı kabul edilebilir.

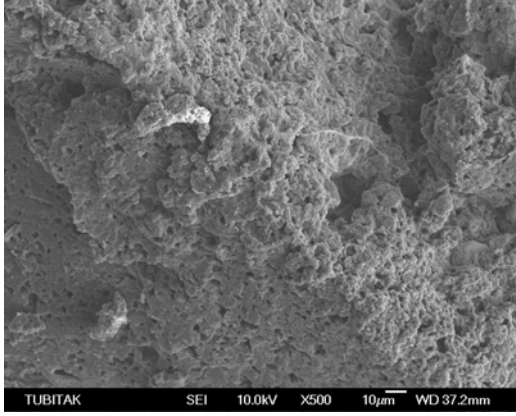
Nişasta hidroliz reaksiyonu sonrası alfa-amilaz enzimi ısı ile inaktive edilmiş ve çözelti iki farklı şekilde; 1. direkt olarak, 2. nişasta hidroliz ürünlerinin bir kaç kez saf su ile yıkanarak uzaklaştırılmasından sonra, daha önce belirlenen optimum şartlarda protein hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Ön işlem sonrası gluten morfolojisinde meydana gelen değişimi inceleyebilmek amacı ile alınan SEM görüntüleri Şekil 7.47'de, protein hidrolizi reaksiyonu sonucu elde edilen sonuçlar Şekil 7.48-7.50'de sunulmuştur. Şekil 7.47 incelendiğinde, nişasta hidroliz ön işlemi uygulandığında substrattaki gözenekliliğin arttığı açık bir şekilde görülmektedir.



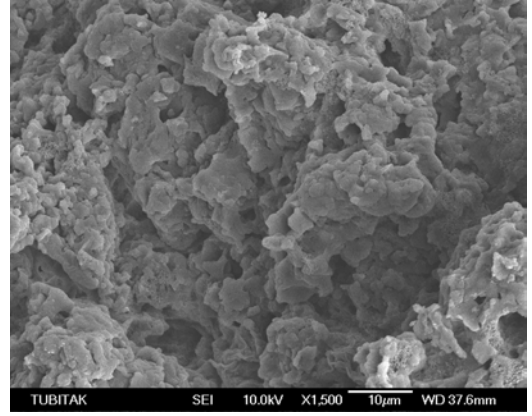
arayüzey görüntüsü, büyütme x 500



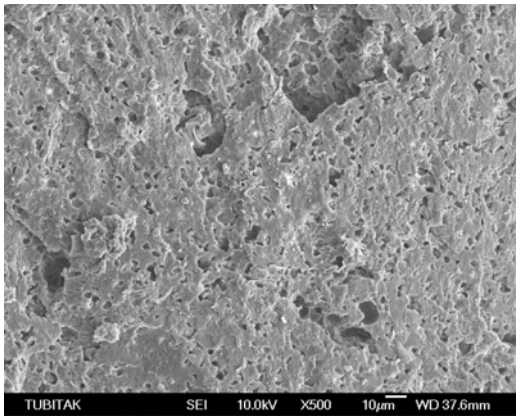
partikül yüzeyi görüntüsü, büyütme x 1500

(a) Ön işlem öncesi elde edilen SEM görüntüleri

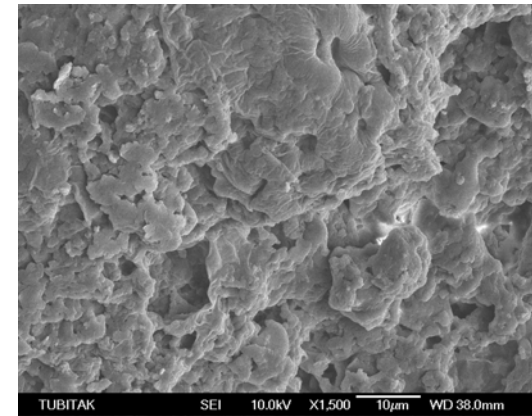
arayüzey görüntüsü, büyütme x 500



partikül yüzeyi görüntüsü, büyütme x 1500

(b) Nişasta hidrolizi ön işlemi sonrası (yıkama yapılmadan) elde edilen SEM görüntüleri

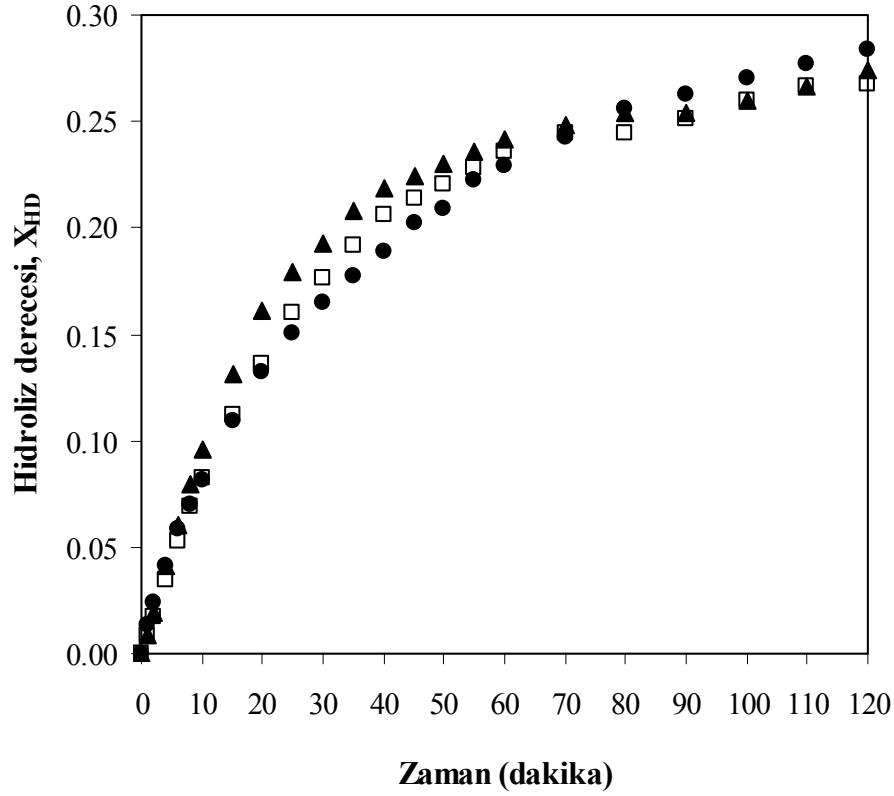
arayüzey görüntüsü, büyütme x 500



partikül yüzeyi görüntüsü, büyütme x 1500

(c) Nişasta hidrolizi ön işlemi sonrası (yıkama yapıldıktan sonra) elde edilen SEM görüntüleri

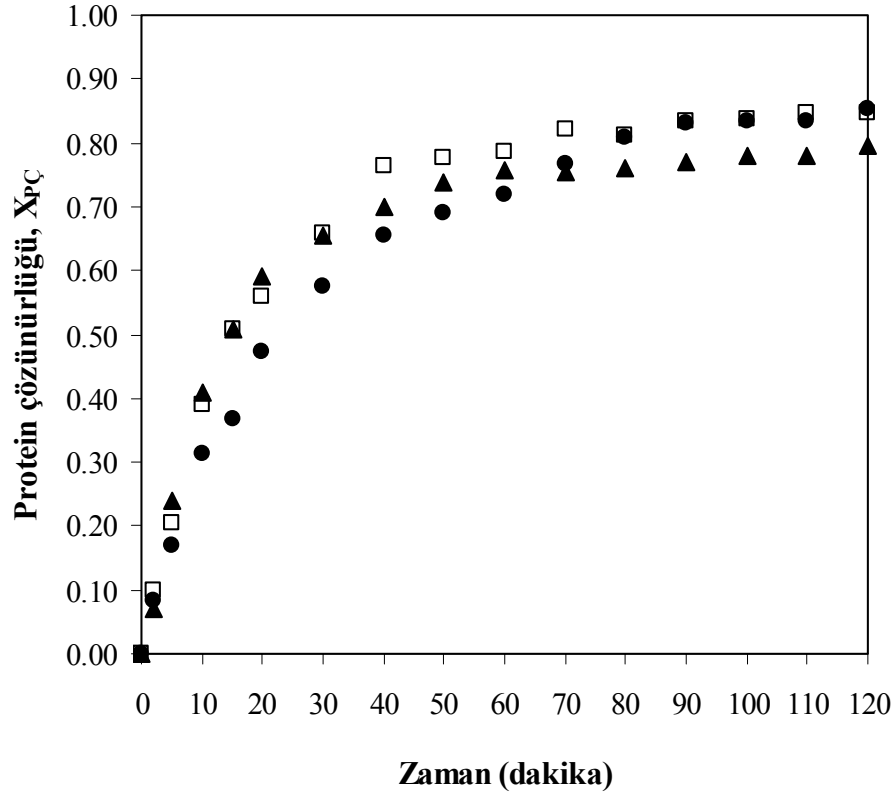
Şekil 7.47 Nişasta hidrolizi ön işleminin glutenin yüzey yapısına etkisi



Şekil 7.48 Nişasta hidrolizi ön işlemi sonrası zamana karşılık elde edilen protein hidroliz derecesi değerleri, $T= 55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}= 8$, $S= 30 \text{ g protein/L}$, $E= \% 0.25$ (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ nişasta hidrolizi sonrası direkt kullanılan çözeltili, ▲ nişasta hidrolizi sonrası yıkanarak kullanılan çözeltili)

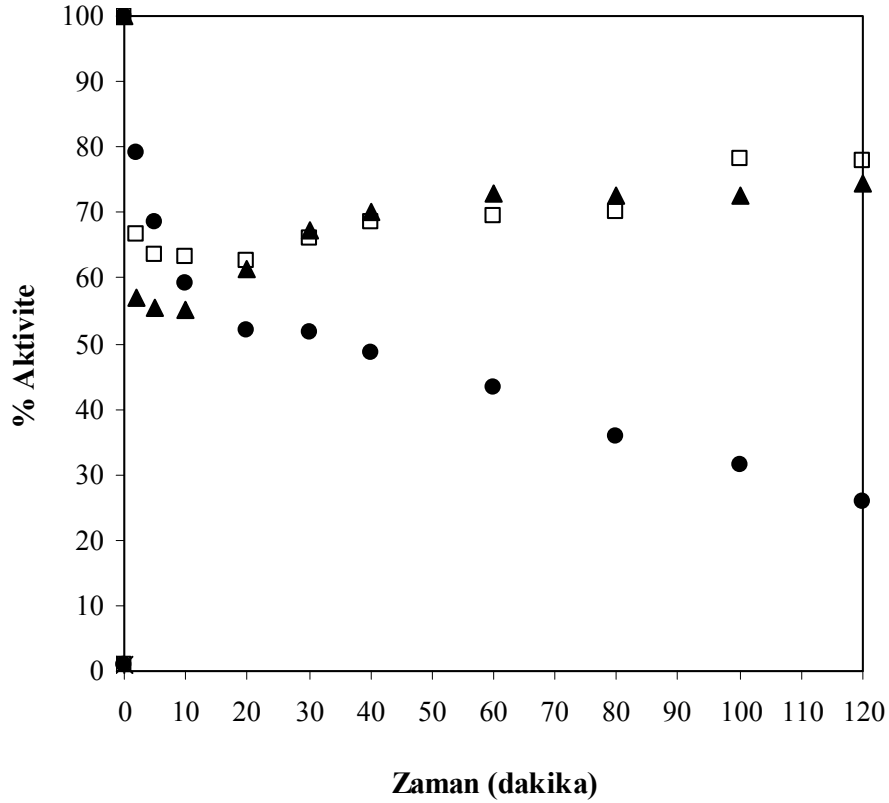
Protein hidrolizi öncesi ortamda bulunan çözünmüş protein miktarı nişasta hidrolizi ön işlemi uygulanmadan 1.97 g/L iken, bu değerin ön işlem uygulamasından sonra 4.56 g/L 'ye yükseldiği bulunmuştur.

Şekil 7.48 ve 7.49 incelendiğinde nişasta hidrolizi ön işlemi ile protein hidrolizi ve çözünlüğü için başlangıç hızlarının artığı, 120 dakikalık işlem sonrası hidroliz veriminin değişmediği, ancak ön işlem ile protein çözünlüğünün daha kısa zamanda tamamlanabileceği görölmektedir.



Şekil 7.49 Nişasta hidrolizi ön işlemi sonrası zamana karşılık elde edilen protein çözünürlük derecesi değerleri, T= 55°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ nişasta hidrolizi sonrası direkt kullanılan çözelti, ▲ nişasta hidrolizi sonrası yıkanarak kullanılan çözelti)

Şekil 7.50 incelendiğinde nişasta hidrolizi ön işlemi uygulanması ile enzim aktivitesinin 20. dakikadan sonra azalmadığı bu değerden sonra sabit kaldığı, yani stabilitesinde belirgin bir artış meydana geldiği görülmektedir. Bu durum, nişastanın enzim inaktivasyonuna neden olduğu ve alfa-amilaz ile hidroliz sonucu dekstrin ve türevlerine dönüştürülerek glutenden ayrılması ile substratın, enzim stabilitesini artırıcı bir etki kazanmış olabileceği, ayrıca gluten ile nişasta arasındaki bağların kırılması sonucu nişasta ile birlikte enzimi inaktive eden bazı bileşenlerinde glutenden ayrılmış olabileceği varsayımları ile açıklanabilir.



Şekil 7.50 Nişasta hidrolizi ön işlemleri sonrası zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, T= 55°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ nişasta hidrolizi sonrası direkt kullanılan çözelti, ▲ nişasta hidrolizi sonrası yıkanarak kullanılan çözelti)

7.6.5 Glutene uygulanan ön işlemlerin hidrolizat amino asit kompozisyonuna etkilerinin incelenmesi

Bölüm 7.6.1-7.6.4'de glutene uygulanan; ısı, mikrodalga, sonik ve nişasta hidrolizi ön işlemlerinin hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Ön işlemlerin hidrolizat besin değerine bir etkisi olup olmadığını belirlemek amacıyla ile ön işlemler sonrası elde edilen hidrolizat çözeltilerinin amino asit kompozisyonları incelenmiş ve Çizelge 7.15'de sunulmuştur. Çizelge 7.15 incelendiğinde ön işlemler sonucunda elde edilen hidrolizat çözeltilerinin amino asit kompozisyonlarının kontrol deneyi (ön işlemsiz gerçekleştirilen hidroliz deneyi) sonucu elde edilen hidrolizat çözeltisinin ve ham glutenin amino asit kompozisyonu ile hemen hemen aynı olduğu, yani glutene uygulanan ön işlemler sonucunda proteinin besinsel değerini koruduğu görülmektedir.

Çizelge 7.15 Ön işlem uygulaması ile gerçekleştirilen deneyler için elde edilen hidrolizat çözeltilerinin amino asit kompozisyonları

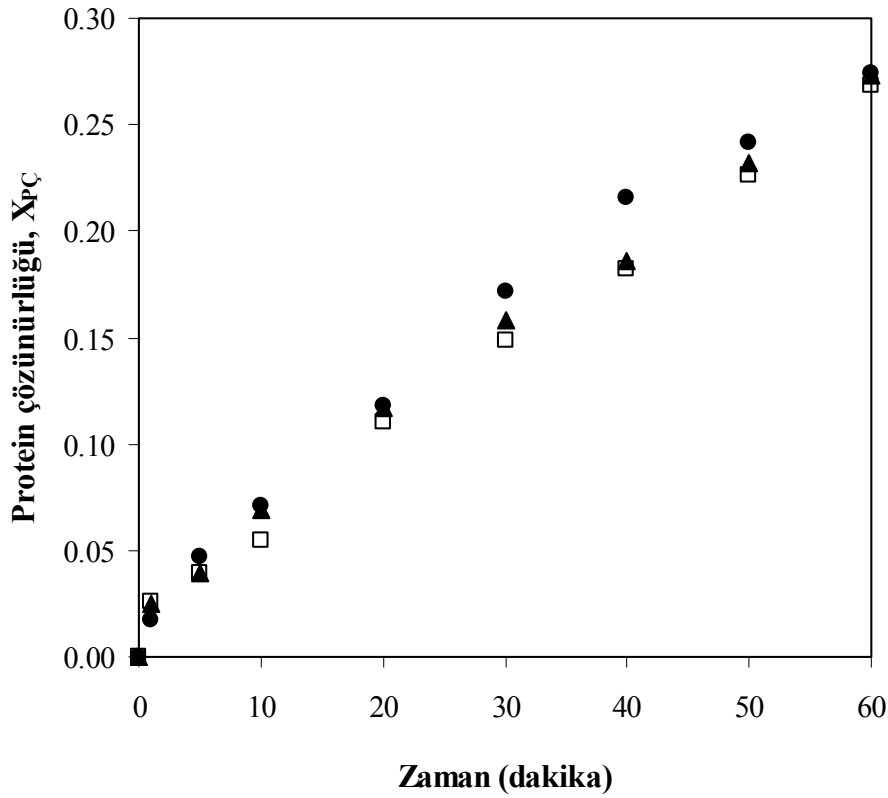
*Hidrolizat Çözeltileri (mg/g protein)						
Amino Asit	Ham Gluten mg/g protein	Kontrol Deneyi	Isıl Ön İşlem	Mikro Dalga Ön İşlemi	Sonikasyon Ön İşlemi	Niş. Hid. Ön İşlemi
Alanin	86.91	98.42	65.98	92.28	93.93	69.92
Glisin	25.65	37.77	38.82	27.92	27.91	23.46
Valin	44.47	50.14	63.10	47.68	44.93	45.55
Lösin	128.33	131.65	141.35	163.29	130.69	129.87
İzolösin	36.17	35.17	58.34	37.54	34.48	40.03
Treonin	27.48	38.67	45.76	27.25	31.91	30.81
Serin	52.51	58.71	78.14	45.15	47.51	50.84
Prolin	106.11	70.78	84.96	104.24	104.79	76.44
Aspartik asit	145.27	83.67	100.81	81.23	81.87	171.88
Metiyonin	22.62	17.66	24.05	17.27	14.18	17.21
Glutamik asit	156.64	200.94	130.38	220.55	238.38	190.81
Fenilalanin	59.10	55.58	71.85	52.12	54.15	52.10
Lizin	15.75	26.23	15.84	13.15	15.79	14.74
Histidin	32.31	36.58	18.60	26.34	27.62	26.89
Triozin	48.45	53.35	55.85	39.68	49.18	47.00
Hidroksiprolin	12.22	4.69	6.18	4.32	2.69	12.45

*Çizelgede ön işlem sonrası elde edilen hidrolizatlar için verilen değerler; 100°C de gerçekleştirilen ısıl ön işlemi, 720 W mikrodalga gücünde gerçekleştirilen mikrodalga ön işlemi, 120 W akustik güçte gerçekleştirilen sonikasyon ön işlemi, nişasta hidroliz ön işlemi sonrası nişasta hidroliz ürünlerinin yıkanarak uzaklaştırılması, sonrasında gerçekleştirilen protein hidrolizi deneyleri içindir.

7.7 Sonikasyon Parametrelerinin Hidroliz Reaksiyonu Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Ultrasonikasyonun kimyasal reaksiyonların hızını artırmak için kullanıldığı bilinmektedir. Ultrasonikasyonun enzimatik reaksiyonlar üzerindeki etkisi ise çok fazla araştırılmamıştır. Konuyla ilgili literatürde yeralan sınırlı çalışmalar içerisinde, bazı araştırmacılar ultrasonikasyon uygulaması sonucunda oluşan kavitasyon enerjisinin enzimatik

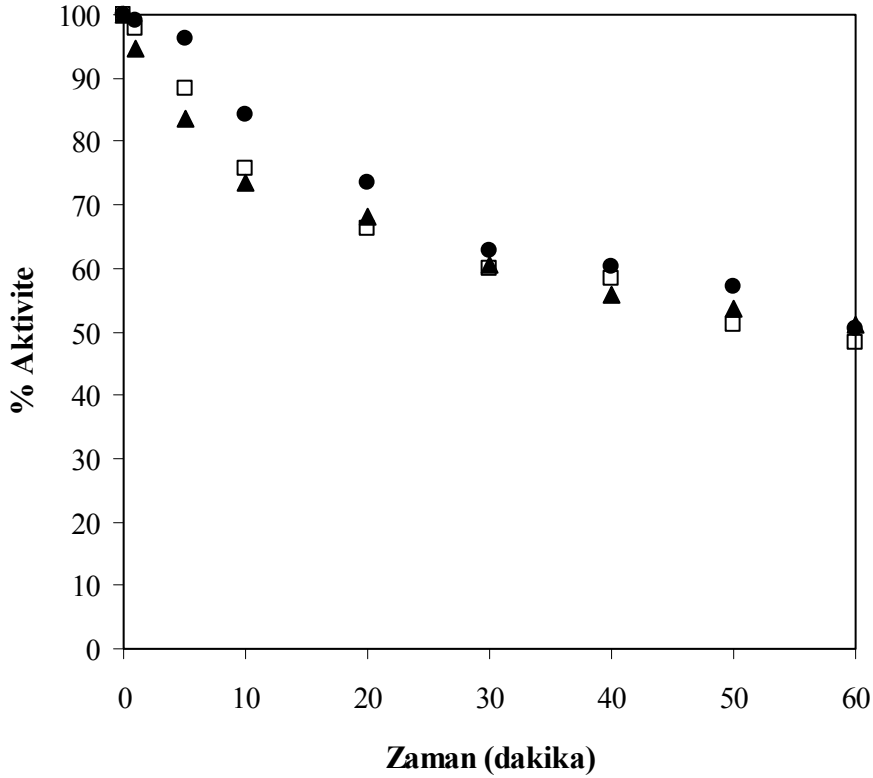
reaksiyonların hızını arttırdığını rapor etmişlerdir (Vulfson vd., 1991; Sakakibara vd., 1996; Ramachandran vd., 2006; Şener vd., 2006). Bu nedenle, çalışmanın bu bölümünde hidroliz reaksiyonu sonikasyon altında gerçekleştirilerek, sonikasyon parametrelerinin; akustik güç ve frekans aralığı; hidroliz ve enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir.



Şekil 7.51 Farklı akustik güç değerlerinde sonikasyon uygulaması ile gerçekleştirilen hidroliz deneyleri için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, T= 40°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol deneyi, □ 20 W, ▲ 100 W)

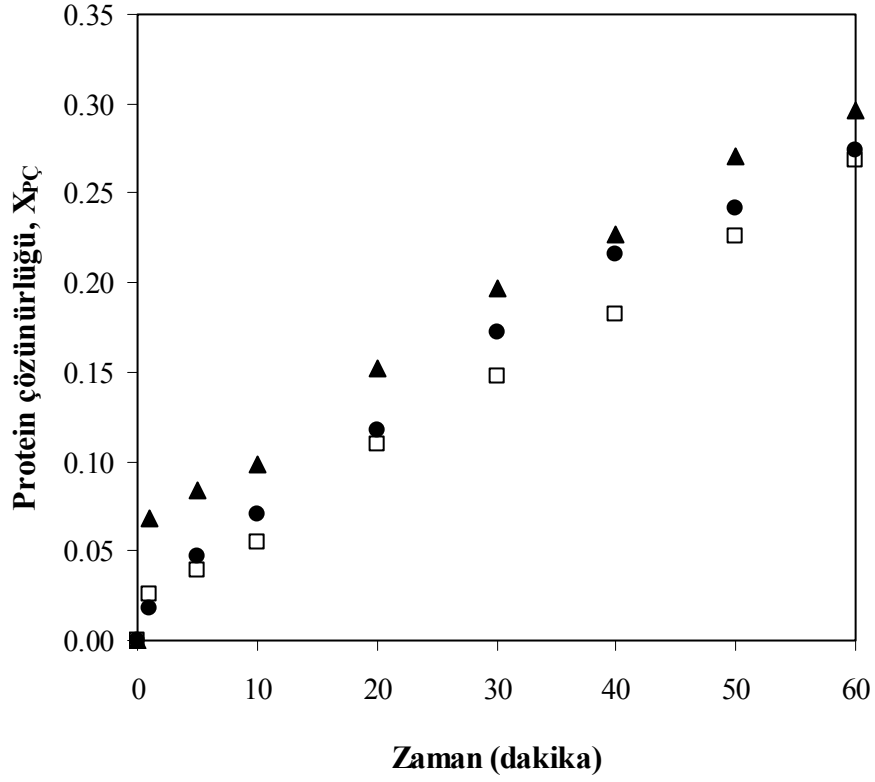
Akustik gücün reaksiyon üzerindeki etkisini incelemek amacı ile hidroliz reaksiyonu, pH 8 değerinde 100 mM fosfat tampon çözelti içerisinde 30 g protein/L substrat konsantrasyonunda, 40°C sabit sıcaklıkta, % 0.25 (hacim/hacim) enzim ilavesi ile, 12.7 mm çapında titanium uçlu sonikatör kullanılarak; % 10 frekans aralığında 20 W ve 100 W'lık akustik güçlerde gerçekleştirilmiştir. % Frekans aralığının hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisini incelemek amacı ile hidroliz reaksiyonu aynı şartlar altında 20 W'lık akustik güç değerinde % 10 ve % 80 frekans değerlerinde gerçekleştirilmiştir. Deneyler için çalışma hacmi olarak 100 mL seçilmiş ve 60 dakikalık işlem süresince (1 dakika çalışma süresi, bir

dakika bekleme süresi) çözünen protein konsantrasyonu ve enzim aktivitesi zamana karşı incelenmiştir. Karşılaştırma yapabilmek amacı ile aynı reaksiyon koşullarında sonikasyon işlemi uygulanmadan da bir kontrol deneyi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar akustik güç deneyleri için Şekil 7.51 ve Şekil 7.52’de, % frekans aralığı için Şekil 7.53 ve Şekil 7.54’de grafiksel olarak sunulmuştur.



Şekil 7.52 Farklı akustik güç değerlerinde sonikasyon uygulaması ile gerçekleştirilen hidroliz deneyleri için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, T= 40°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol deneyi, □ 20 W, ▲ 100 W)

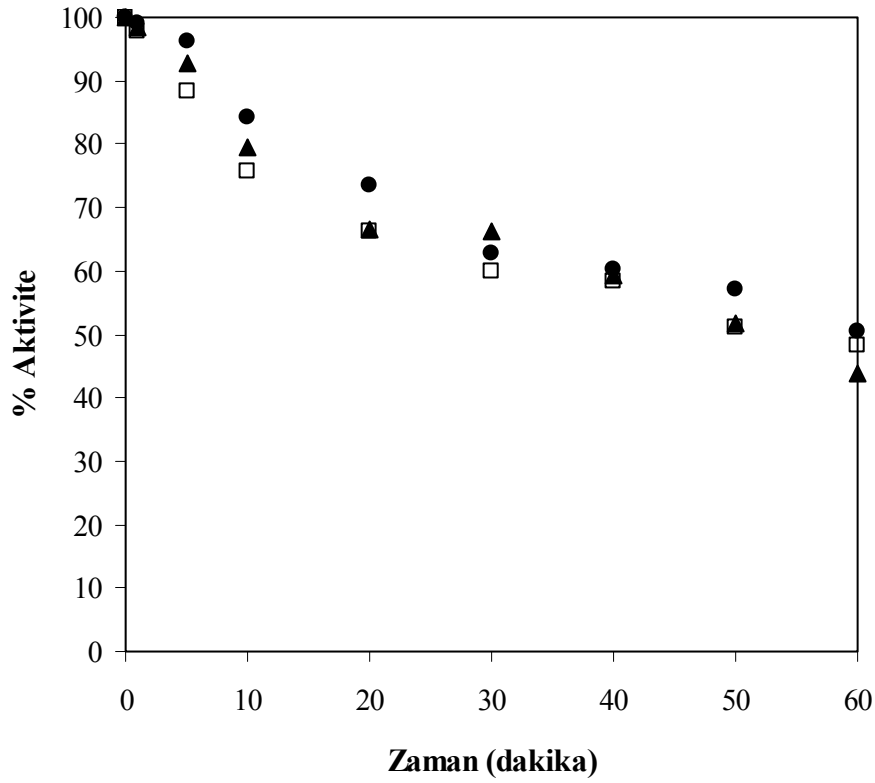
Şekil 7.51 ve Şekil 7.52 incelendiğinde akustik gücün mısır gluteninin hidrolizi için reaksiyon hızını arttırıcı bir etkisinin olmadığı ve Alcalase enziminin stabilitesini etkilemediği (azaltmadığı veya arttırmadığı) görülmektedir.



Şekil 7.53 Farklı % frekans değerlerinde sonikasyon uygulaması ile gerçekleştirilen hidroliz deneyleri için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, T= 40°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol deneyi, □ % 10, ▲ % 80)

Şekil 7.53 incelendiğinde % 80 frekans değeri için reaksiyon hızında çok azda olsa bir artış meydana geldiği ancak bu artışın verimi fazla etkilemediği açıkça görülmektedir.

% Frekans değerinin enzim aktivitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde (Şekil 7.54), Alcalase enziminin stabilitesinin % frekans değeri ile değişmediği ve hemen hemen kontrol deneyi ile aynı aktivite değerlerinin elde edildiği görülmektedir.



Şekil 7.54 Farklı % frekans değerlerinde sonikasyon uygulaması ile gerçekleştirilen hidroliz deneyleri için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, T= 40°C, pH= 8, S= 30 g protein/L, E= % 0.25 (hacim/hacim) (● kontrol deneyi, □ % 10, ▲% 80)

Sonikasyon işleminin hidrolizat besin değerine bir etkisi olup olmadığını belirlemek amacı ile, kontrol deneyi ve 20 W akustik güçte, % 80 frekans değerinde sonikasyon altında gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu sonucunda elde edilen hidrolizat çözeltilerinin amino asit kompozisyonları incelenmiş ve Çizelge 7.16'da sunulmuştur. Çizelge 7.16 incelendiğinde sonikasyon altında gerçekleştirilen deney sonucunda elde edilen hidrolizat çözeltisinin amino asit kompozisyonunun, kontrol deneyi sonucu elde edilen hidrolizat çözeltisinin ve ham glutenin amino asit kompozisyonu ile hemen hemen aynı olduğu, dolayısı ile sonikasyon işlemi sonucunda proteinin besinsel değerini koruduğu görülmektedir.

Çizelge 7.16 Sonikasyon altında gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu sonucunda elde edilen hidrolizat çözeltisinin amino asit kompozisyonu

Amino Asit	Ham Gluten (mg/g protein)	Hidrolizat Çözeltileri (mg/g protein)	
		Kontrol Deneyi	Sonikasyon altında hidroliz
Alanin	86.91	98.42	83.21
Glisin	25.65	37.77	31.39
Valin	44.47	50.14	44.56
Lösin	128.33	131.65	147.16
İzolösin	36.17	35.17	32.55
Treonin	27.48	38.67	30.24
Serin	52.51	58.71	47.06
Prolin	106.11	70.78	90.10
Aspartik asit	145.27	83.67	122.10
Metiyonin	22.62	17.66	22.19
Glutamik asit	156.64	200.94	182.46
Fenilalanin	59.10	55.58	51.39
Lizin	15.75	26.23	22.86
Histidin	32.31	36.58	33.41
Triozin	48.45	53.35	52.79
Hidroksiprolin	12.22	4.69	6.52

7.8 Mısır Gluteni için Hidroliz, Çözünürlük ve Enzim İnaktivasyon Kinetiğinin İncelenmesi

7.8.1 Elde Edilen Kinetik Verilerin Modellenmesi

7.8.1.1 Hidroliz ve çözünürlük verilerinin modellenmesi

Enzimatik reaksiyonlar genel olarak Michaelis-Menten kinetiğine dayalı modeller ile karakterize edilirler (Costantinides ve Adu-Amankwa, 1980; O'Meara ve Munro, 1985; Barros ve Malcata, 2004; Sousa vd., 2004; Tardioli vd., 2005). Ancak, literatürde enzimatik reaksiyon kinetiğini empirik modellerle (Margot vd., 1997; Karamac vd., 2002) ve basit eksponansiyel denklemlerle (Moreno ve Cuadrado, 1993; Gonzalez-Tello vd., 1994; Marquez

ve Vazquez, 1999) ifade eden çalışmalarda mevcuttur. Çalışmanın bu bölümünde, Bölüm 7.3'de mısır gluteninin hidroliz ve çözünürlüğü için zamana karşı elde edilen tüm deneysel veriler analiz edilmiş; ve hidroliz ile çözünürlük kinetiğinin aşağıda verilen eksponansiyel denklem (Eşitlik 7.5) ile ifade edilebileceği bulunmuştur.

$$\frac{dX}{dt} = a \cdot \exp(-b \cdot X)$$

$$X = \frac{1}{b} \times \ln(1 + a \times b \times t) \quad (7.5)$$

Eşitlik 7.5'de X terimi hidroliz dönüşümünü veya çözünürlük oranını ifade etmektedir. a ve b değerleri farklı deneyler için farklı değerlere sahip denklem sabitleridir. Eşitlik 7.5 için elde edilen katsayılar ve istatistiksel değerler Çizelge 7.17'de sunulmuştur.

Bu çalışmada, başlangıç substrat ve başlangıç enzim konsantrasyonları için elde edilen deneysel veriler kullanılarak yapılan modelleme çalışmaları sonucunda elde edilen b katsayılarının değerlerinin birbirine oldukça yakın olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, b katsayısının, başlangıç substrat ve başlangıç enzim konsantrasyonu ile değişmediği, diğer bir deyişle bu parametrelerden bağımsız olduğu kabul edilmiştir. Elde edilen bu sonuç (b katsayısının, başlangıç substrat ve başlangıç enzim konsantrasyonu ile değişmemesi) daha önce literatürde verilmiş olan çalışmalarla da desteklenmektedir (Moreno ve Cuadrado, 1993; Gonzalez-Tello vd., 1994; Marquez ve Vazquez, 1999).

Sonuç olarak, birbirine yakın olarak elde edilen b değerlerinin ortalaması alınmış ve bu değer yaklaşık olarak hidroliz için 8.86 ve çözünürlük için 3.33 olarak hesaplanmıştır. Çizelge 7.17'deki standart sapma (σ) ve R^2 istatistik değerleri de, 8.86 ve 3.33 sabit değerleri kullanılarak yapılan modelleme çalışmalarına aittir. Diğer bir yandan, başlangıç substrat ve başlangıç enzim konsantrasyonu deneylerine ait veriler için hesaplanan a değerleri; başlangıç substrat konsantrasyonunun artması ile azalış (ters orantılı), başlangıç enzim konsantrasyonunun artması ile artış göstermektedir (doğru orantılı). Ancak, sıcaklık ve pH deneysel verileri için elde edilen değerler incelendiğinde, a değerlerinin arttığı, b değerlerinin ise her bir sıcaklık ve pH değeri için farklılık gösterdiği görülmektedir (Çizelge 7.17).

Çizelge 7.17 Eşitlik 7.5 için elde edilen katsayılar, standart sapma (σ) ve R^2 istatistik değerleri

S_0 (g/L)	Hidroliz				Çözünürlük			
	a	b	σ	R^2	a	b	σ	R^2
10	0.0078	8.86	0.0070	0.9967	0.0225	3.33	0.0170	0.9974
20	0.0062	8.86	0.0076	0.9954	0.0237	3.33	0.0242	0.9951
30	0.0057	8.86	0.0032	0.9990	0.0202	3.33	0.0130	0.9984
40	0.0043	8.86	0.0032	0.9987	0.0142	3.33	0.0100	0.9986
50	0.0039	8.86	0.0039	0.9976	0.0105	3.33	0.0189	0.9929
60	0.0034	8.86	0.0068	0.9911	0.0103	3.33	0.0088	0.9986
% E_0 (hacim/hacim)								
0.05	0.0023	8.86	0.0091	0.9728	0.0062	3.33	0.0074	0.9983
0.10	0.0030	8.86	0.0027	0.9986	0.0101	3.33	0.0096	0.9984
0.15	0.0038	8.86	0.0026	0.9991	0.0138	3.33	0.0121	0.9981
0.20	0.0048	8.86	0.0031	0.9989	0.0165	3.33	0.0198	0.9952
0.25	0.0057	8.86	0.0032	0.9990	0.0202	3.33	0.0130	0.9984
0.30	0.0064	8.86	0.0034	0.9989	0.0232	3.33	0.0159	0.9979
0.35	0.0062	8.86	0.0046	0.9982	0.0215	3.33	0.0214	0.9961
T (°C)								
40	0.0049	16.49	0.0045	0.9952	0.0060	2.49	0.0071	0.9988
45	0.0040	9.36	0.0043	0.9974	0.0113	2.62	0.0084	0.9992
50	0.0057	8.86	0.0032	0.9990	0.0202	3.33	0.0130	0.9984
55	0.0080	9.80	0.0032	0.9992	0.0349	3.63	0.0196	0.9973
60	0.0127	13.67	0.0048	0.9979	0.0507	4.45	0.0161	0.9980
65	0.0430	57.66	0.0072	0.9676	0.1748	14.18	0.0196	0.9863
pH								
6.5	0.0071	11.10	0.0041	0.9982	0.0203	3.11	0.0146	0.9983
7.0	0.0080	9.80	0.0032	0.9992	0.0349	3.63	0.0196	0.9973
7.5	0.0107	9.79	0.0030	0.9994	0.0474	3.79	0.0224	0.9968
8.0	0.0134	9.65	0.0033	0.9994	0.0619	3.79	0.0245	0.9967
8.5	0.0159	10.12	0.0039	0.9992	0.0712	3.95	0.0223	0.9972

Bölüm 7.3’de elde edilen deneysel verilerden, hidroliz derecesi değerleri ile çözünürlük derecesi değerleri arasında lineer bir ilişki olduğu görülmektedir. Bu nedenle hidroliz derecesi ve çözünürlük arasındaki ilişki ayrıca incelenmiş ve gerçekleştirilen tüm deneyler için aşağıda verilen genel bağıntının (Eşitlik 7.6) kullanılabileceği bulunmuştur;

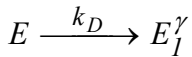
$$X_{HD} = 0.3239.X_{PÇ} - 0.00011 \quad (7.6)$$

Eşitlik 7.6 için R^2 istatistik ve standart sapma değerleri sırasıyla 0.9955 ve 0.0064 olarak hesaplanmıştır. Literatürde hidroliz derecesi ve çözünürlük arasındaki lineer ilişki bezelye proteinin Trypsin ile hidrolizi için Soral-Smietana vd. (1998) tarafından, buğday ununun proteaz ile modifikasyonu için Bombara vd. (1997) tarafından da bildirilmiştir.

7.8.1.2 Enzim inaktivasyon verilerinin modellenmesi

Enzim inaktivasyon kinetiği genellikle birinci mertebe inaktivasyon modeli (Chen vd., 1995; Colombie vd., 2001; Marin-Zamora vd., 2006; Fadıloğlu vd., 2006) ile ifade edilir. Ancak enzimatik reaksiyonların karmaşıklığı nedeni ile, literatürde enzim inaktivasyon kinetiğini birinci mertebe olmayan model denklemlerle ifade eden bir çok çalışma da yer almaktadır (Sadana ve Henley, 1987; Schokker ve Boekel, 1999; Özbek ve Ülgen, 2000; Ladero vd., 2006).

Çalışmanın bu bölümünde, enzim inaktivasyon kinetiğini belirleyebilmek amacı ile Bölüm 7.3’de zamana karşılık elde edilen aktivite verileri analizi edilmiş ve; substrat ve enzim başlangıç konsantrasyonu deneylerinin tümü ile, 45-55°C sıcaklık ve 6.5-7.5 pH aralığında gerçekleştirilen deneyler için elde edilen enzim inaktivasyon verilerinin Sadana ve Henley (1987) tarafından tanımlanan birinci mertebe olmayan tek adım unimoleküler enzim inaktivasyon modeline (Eşitlik 7.7) uyduğu belirlenmiştir. Sadana ve Henley (1987) tarafından tanımlanan bu inaktivasyon modelinde, enzim aktivitesi sıfır değerine ulaşmaz, son aşamada ulaşılan belirli bir aktivite değerinde sabit kalır.



$$A = (100 - \gamma)\exp(-k_D.t) + \gamma \quad (7.7)$$

Diğer yandan, 55°C sıcaklık ve pH 7.5 değerinin üzerinde gerçekleştirilen deneyler için yapılan modelleme çalışmaları sonucunda elde edilen verilerin ikinci mertebe inaktivasyon kinetiğine (Eşitlik 7.8) uyduğu belirlenmiştir. 55°C sıcaklık ve pH 7.5 değerlerin üzerine çıkıldığında, inaktivasyon mekanizmasının değiştiği (enzim inaktivasyon kinetiğinde bir kayma meydana geldiği) elde edilen deneysel sonuçlardan da (Şekil 7.21 ve 7.26) açıkça görülmektedir. İnaktivasyon kinetiğindeki bu kayma, belirli bir sıcaklık ve pH değerinin üzerine çıkıldığında protein yapısında meydana gelen deformasyonlar sonucunda enzimin stabilitesini koruyamaması, dolayısı ile inaktivasyon hızında meydana gelen artış ile açıklanabilir.

$$1/A = 1/A_0 + k.t \quad (7.8)$$

Eşitlik 7.7 ve 7.8’de; A terimi % enzim aktivitesini, γ terimi son aşamada ulaşılan % enzim aktivite değerini, k_D ve k : inaktivasyon (bozunma) sabitlerini (dak^{-1}), t : hidroliz işleminin süresini ifade etmektedir. Eşitlik 7.8 ve 7.9 için elde edilen katsayılar ve istatistiksel değerler Çizelge 7.18’de sunulmuştur.

Alcalase enzimi için inaktivasyon enerjisi 40-55°C sıcaklık aralığı için, Eşitlik 7.7’den elde edilen inaktivasyon sabitleri (k_D , dak^{-1}) kullanılarak Arrhenius bağıntısından hesaplanabilir (Eşitlik 7.9).

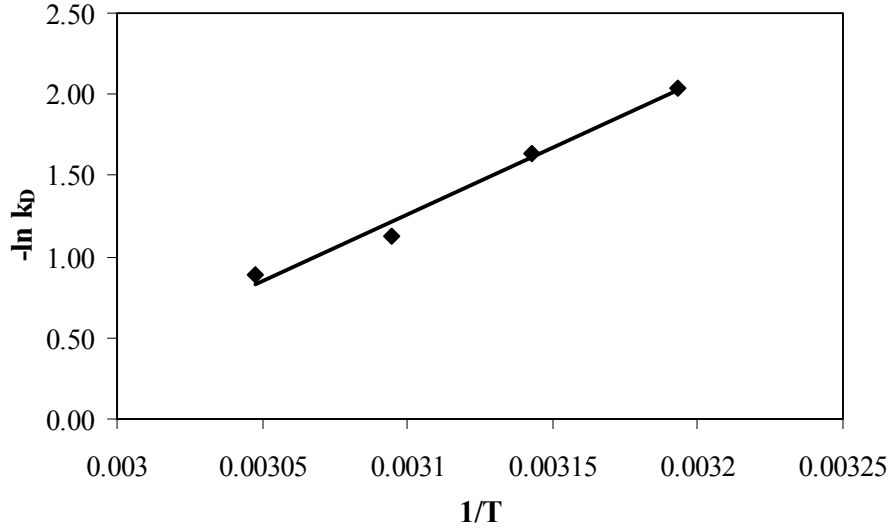
$$\ln k_D = \ln k_{D0} - E_D/RT \quad (7.9)$$

İnaktivasyon enerjisini (E_D) belirleyebilmek amacı ile $\ln k_D$ terimine karşı çizilen $1/T$ grafiği Şekil 7.55’de sunulmuştur. Şekilden, elde edilen verilerin Eşitlik 7.9’a uygunluğu açıkça görülmektedir. Yapılan modelleme sonucunda ($\sigma = 0.0798$, $R^2 = 0.9920$) E_D terimi, 67.86 kJ/mol olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu inaktivasyon enerjisi değeri, literatürde daha önce Alcalase enzimi için bildirilen değerlerden farklılık göstermektedir. Farklı substratlar kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda, Alcalase enzimi için inaktivasyon enerjisi; Marquez ve Vazquez (1999) tarafından 25.35 kJ/mol, Adler-Nissen (1986) tarafından 270.0 kJ/mol olarak rapor edilmiştir.

Çizelge 7.18 Eşitlik 7.7 ve 7.8 için elde edilen katsayılar, standart sapma (σ) ve R^2 istatistik değerler

S_0 (g/L)	Model denklem	σ	R^2
10-60 g/L	$A = (100-51.96)\exp(-0.3395.t) + 51.96$	3.0034	0.9834
% E_0 (hacim/hacim)			
0.05	$A = (100-32.71)\exp(-0.3111.t) + 32.71$	5.0198	0.9751
0.10	$A = (100-39.92)\exp(-0.4146.t) + 39.92$	4.9194	0.9696
0.15	$A = (100-41.18)\exp(-0.3714.t) + 41.18$	4.2837	0.9768
0.20	$A = (100-43.85)\exp(-0.3441.t) + 43.85$	2.8824	0.9886
0.25	$A = (100-50.90)\exp(-0.3261.t) + 50.90$	3.8517	0.9700
0.30	$A = (100-52.05)\exp(-0.3322.t) + 52.05$	3.7504	0.9747
0.35	$A = (100-56.91)\exp(-0.3244.t) + 56.91$	3.2520	0.9768
T (°C)			
40	$A = (100-60.58)\exp(-0.1304.t) + 60.58$	2.9719	0.9830
45	$A = (100-53.32)\exp(-0.1953.t) + 55.32$	3.3460	0.9791
50	$A = (100-50.90)\exp(-0.3261.t) + 50.90$	3.8517	0.9700
55	$A = (100-49.04)\exp(-0.4125.t) + 49.04$	2.1478	0.9915
60	$1/A = 1/97.94 + 0.00084.t$	0.0064	0.9802
65*	$1/A = 1/103.01 + 0.01903.t$	0.0385	0.9867
pH			
6.5	$A = (100-51.52)\exp(-0.2329.t) + 51.52$	2.0905	0.9925
7.0	$A = (100-49.04)\exp(-0.4125.t) + 49.04$	2.1478	0.9915
7.5	$A = (100-49.36)\exp(-0.4213.t) + 49.36$	3.0489	0.9837
8.0	$1/A = 1/96.01 + 0.00023.t$	0.0024	0.9593
8.5	$1/A = 1/96.90 + 0.00045.t$	0.0020	0.9940

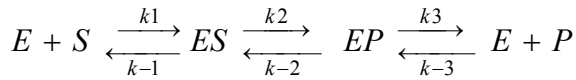
* 0-30 dakika için



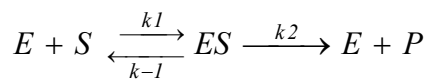
Şekil 7.55 Enzim inaktivasyon sabitinin sıcaklıkla değişimi

7.8.2 Michaelis-Menten kinetiği

Enzim katalizinin ana kuramı Michaelis-Menten ve Haldane'in çalışmaları üzerine kurulmuştur (Montgomery vd., 1996). En basit enzim katalizli sistem, isomerizasyon ve parçalanma reaksiyonlarında olduğu gibi tek bir substratın ürüne dönüştüğü reaksiyonlardır (Bisswanger, 2002). Reaksiyon mekanizması;



şeklinde yazılır. Burada, ES ve EP enzim-substrat ve enzim-ürün kompleksidir. Basitleştirme amacı ile sadece bir kompleksin oluştuğu (ES kompleksi), geri reaksiyonların önemsiz olduğu şartlar aranır. Ürünün yeterli derecede birikmediği yani ileri yönde başlangıç hızlarının ölçüldüğü durumlarda bu şartlar sağlanmış olur ve reaksiyon mekanizması;



şeklini alır (Telefoncu, 1997). Bu mekanizma göz önünde bulundurularak, substrat (S), enzim (E), enzim substrat (ES) ve ürün (P) konsantrasyonlarının zamanla değişimi aşağıdaki eşitliklerle ifade edilir;

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] \quad (7.10)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[S][E] + (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (7.11)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (7.12)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = v \quad (7.13)$$

Sistem yatışkın haldeyken, ES derişimi sabittir, yani $\frac{d[ES]}{dt} = 0$ 'dır. Bu durumda; Eşitlik 7.12 aşağıdaki şekilde basitleşir;

$$k_1[S][E] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (7.14)$$

Kütlenin korunumu kanuna göre ortamdaki tüm enzim serbest veya kompleksleşmiş halde bulunacağına göre;

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad (7.15)$$

yazılabilir.

Eşitlik 7.15'den $[E]$ terimi çekilir ve Eşitlik 7.14'de yerine yerleştirilirse;

$$[ES] = \frac{k_1[S][E]_0}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} = \frac{[E]_0[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \quad (7.16)$$

ifadesi elde edilir. Bu ifade Eşitlik 7.13'te yerine konulursa;

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_0[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \quad (7.17)$$

ifadesi elde edilir.

Üç hız sabitini içeren terim tek bir sabitte toplanırsa;

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (7.18)$$

Reaksiyon hızı, enzim substratla doymduğunda maksimuma ulaşır. Bu durumda;

$[E]_0 = [ES]$ dir. Öyleyse;

$$v_{\max} = k_2[ES] = k_2[E]_0 \quad (7.19)$$

7.18 ve 7.19 ifadeleri Eşitlik 7.17'de yerine yerleştirildiğinde Michaelis-Menten denklemi (Eşitlik 7.20) elde edilir (Bisswanger, 2002; Bailey ve Ollis, 1987).

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (7.20)$$

Michaelis-Menten denklemi iki sabit ile karakterize edilir. Birincisi Michaelis-Menten sabiti K_m , ayrılma sabitidir ve enzim substrat arasındaki çekimi ifade eder. K_m değeri ne kadar düşükse enzim substrat arasındaki çekim o kadar kuvvetlidir. İkincisi maksimum hızın bir ölçütü olan ve denklemden direkt elde edilemeyen katalitik sabit, k_{cat} 'dir ($v_{\max} = k_{cat} / [E]_0$). $k_{cat} / K_m = k_{cat} k_1 / (k_{-1} + k_2)$ oranı katalitik verim olarak tanımlanır (Bisswanger, 2002).

K_m ve V_{max} değerlerinin grafik yöntemle eldesi

Michaelis-Menten denklemi (Eşitlik 7.20), bir parametre diğerine karşı çizildiğinde, bir doğru elde edilebilecek şekilde birkaç formda düzenlenebilir. Elde edilen doğrunun eğim ve kesim noktası kullanılarak K_m ve V_{max} değerleri kolayca belirlenebilir. Bu amaçla en çok kullanılan üç denkleme aşağıda yer verilmiştir (Kuchel ve Ralston, 1988).

Lineweaver-Burkee denklemi

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{v_{\max}} \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (7.21)$$

Eşitlik 7.21 için, $1/[S]_0$ 'a karşı $1/v_0$ çizildiğinde eğim K_m / v_{\max} değerini, doğrunun y eksenin kestiği nokta $1/v_{\max}$ değerini, doğrunun x eksenin kestiği nokta $-1/K_m$ değerini verir (Şekil 7.56 (a)).

Eadie-Hofstee denklemi

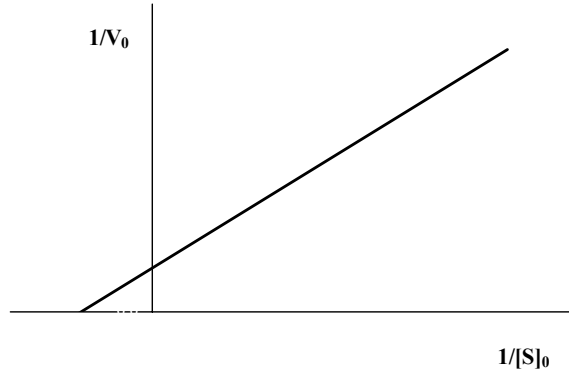
$$v_0 = -K_m \frac{v_0}{[S]_0} + v_{\max} \quad (7.22)$$

Eşitlik 7.22 için, $v_0/[S]_0$ 'a karşı v_0 değerleri çizildiğinde eğim $-K_m$ değerini, doğrunun y eksenin kestiği nokta v_{\max} değerini verir (Şekil 7.56 (b)).

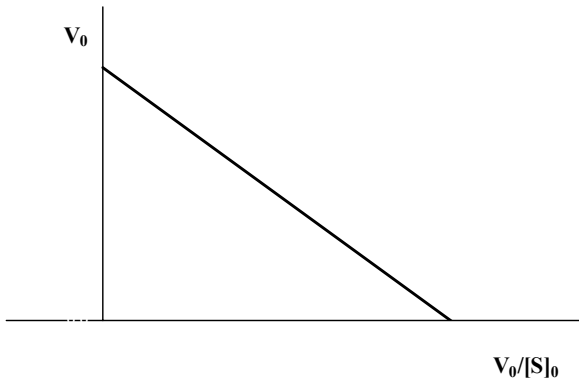
Hanes-Woolf denklemi

$$\frac{[S]_0}{v_0} = \frac{[S]_0}{v_{\max}} + \frac{K_m}{v_{\max}} \quad (7.23)$$

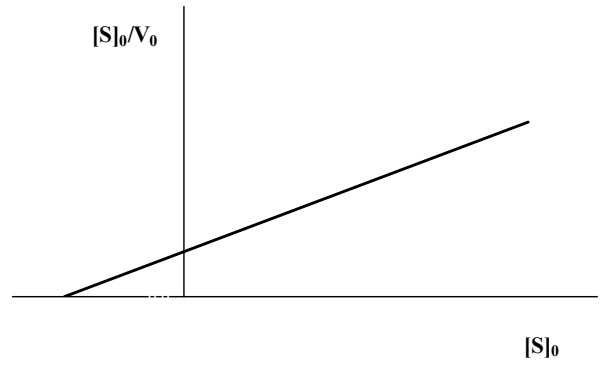
Eşitlik 7.23 için, $[S]_0$ 'a karşı $[S]_0 / v_0$ çizildiğinde eğim $1/v_{\max}$ değerini, doğrunun x eksenini kestiği nokta $-K_m$ değerini, y eksenini kestiği nokta K_m/v_{\max} değerini verir (Şekil 7.56 (c)).



(a) Lineweaver-Burke grafiği



(b) Eadie-Hofstee grafiği



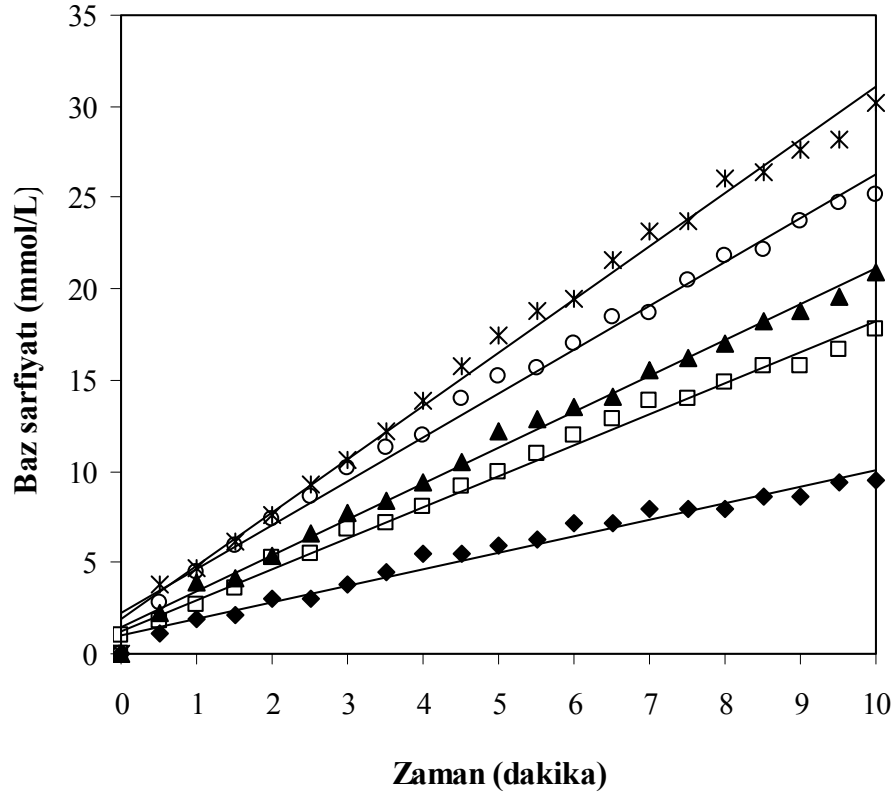
(c) Hanes-Woolf grafiği

Şekil 7.56 Michaelis-Menten denklemindeki kinetik parametrelerin grafik yöntemlerle eldesi

7.8.2.1 Mısır gluteninin enzimatik hidrolizinin Michaelis-Menten kinetiğine uygunluğunun incelenmesi

Mısır gluteninin Alcalase enzimi ile hidroliz kinetiğinin Michaelis-Menten kinetiğine uygunluğunu incelemek amacıyla, hidroliz reaksiyonları 10, 20, 30, 40 ve 50 g protein/L substrat konsantrasyonlarında, daha önce belirlenen optimum reaksiyon şartlarında, 55°C ve pH 8'de, % 0.25 (hacim/hacim) enzim ilavesi ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonların başlangıç hızlarını belirleyebilmek amacıyla her deney için sarf edilen baz konsantrasyonu (mmol/L) ve çözünen protein miktarı (g/L) zamana karşı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 7.57 ve Şekil 7.58'de grafiksel olarak sunulmuştur. Başlangıç hızları, deneysel verilere uyan lineer modellerin eğimlerinden hesaplanmış, elde edilen hız değerleri ve modellere ait istatistiksel değerler Çizelge 7.19 ve Çizelge 7.20'de verilmiştir.

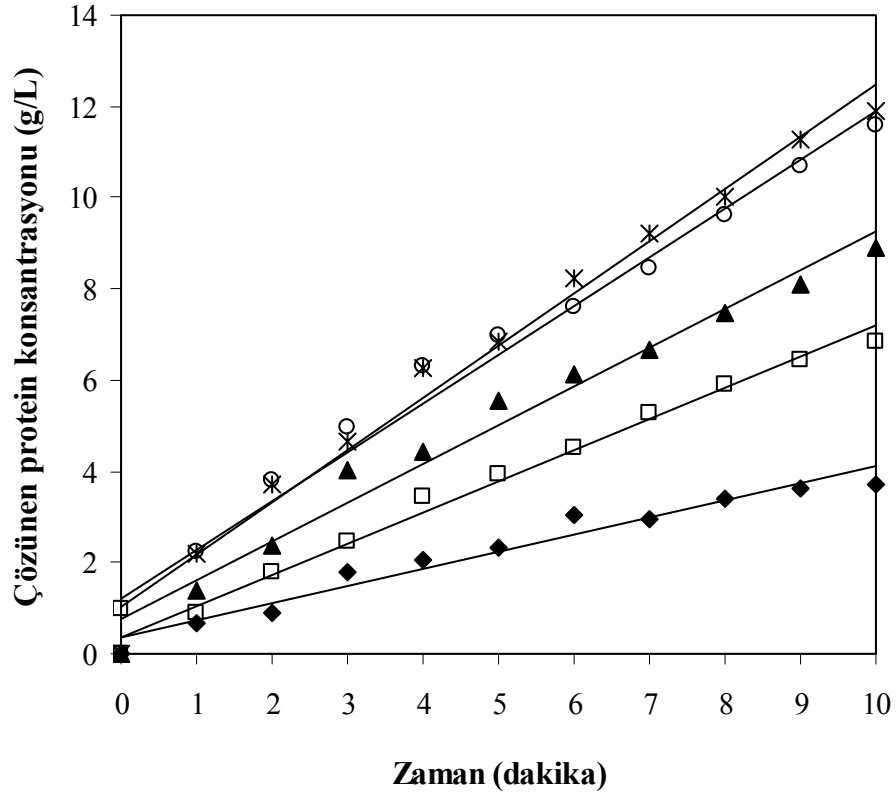
Baz sarfiyatı verileri kullanılarak elde edilen başlangıç hız değerleri için çizilen Lineweaver-Burke grafiği ($R^2=0.9946$, $\sigma= 0.0352$) Şekil 7.59'da, çözünen protein konsantrasyonu verileri kullanılarak elde edilen başlangıç hız değerleri için çizilen Lineweaver-Burke grafiği ($R^2=0.9985$, $\sigma= 0.0468$) Şekil 7.60'da sunulmuştur. Şekil 7.59'dan kinetik parametreler $K_m= 53.77$ g/L, $V_{max}= 5.94$ mmol/L.dak, Şekil 7.60'dan $K_m= 49.45$ g/L, $V_{max}= 2.32$ g/L.dak olarak hesaplanmıştır. Baz sarfiyatı verileri ve çözünen protein konsantrasyonu verileri kullanılarak elde edilen K_m değerlerinin birbirine çok yakın olduğu görülmektedir. Elde edilen bu sonuç ve daha önceki bölümlerde hidroliz derecesi ile protein çözünürlüğü arasında elde edilen lineer bağıntı, kinetik verilerin hesabında baz sarfiyatı veya çözünen protein konsantrasyon verilerinden herhangi birinin kullanılabileceğini göstermektedir.



Şekil 7.57 Farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı değerleri, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, * S= 50 g protein/L)

Çizelge 7.19 Farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistik değerler, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim)

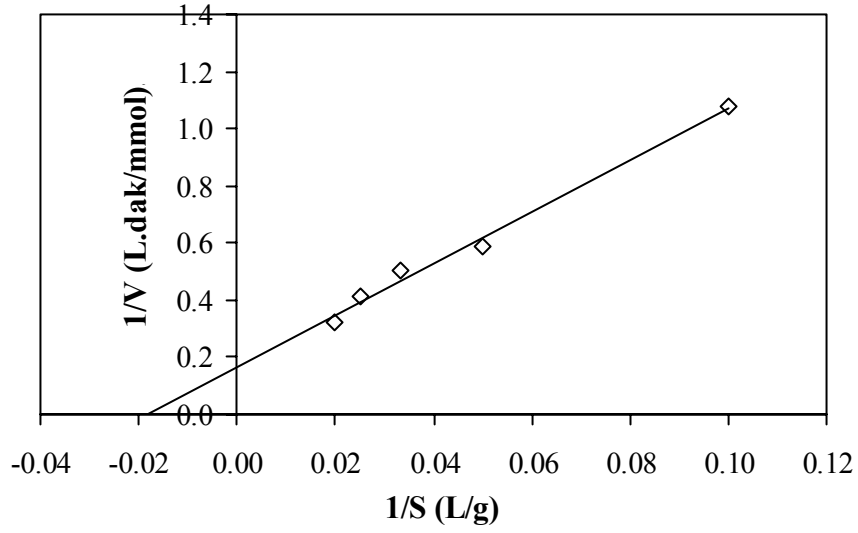
S_0 (g protein/L)	Eğim (v_0) (mmol/L.dak)	Standart Sapma (σ)	R^2
10	0.9259	0.4733	0.9869
20	1.7077	0.5206	0.9954
30	1.9728	0.4956	0.9969
40	2.4126	0.7550	0.9951
50	3.0959	0.7570	0.9967



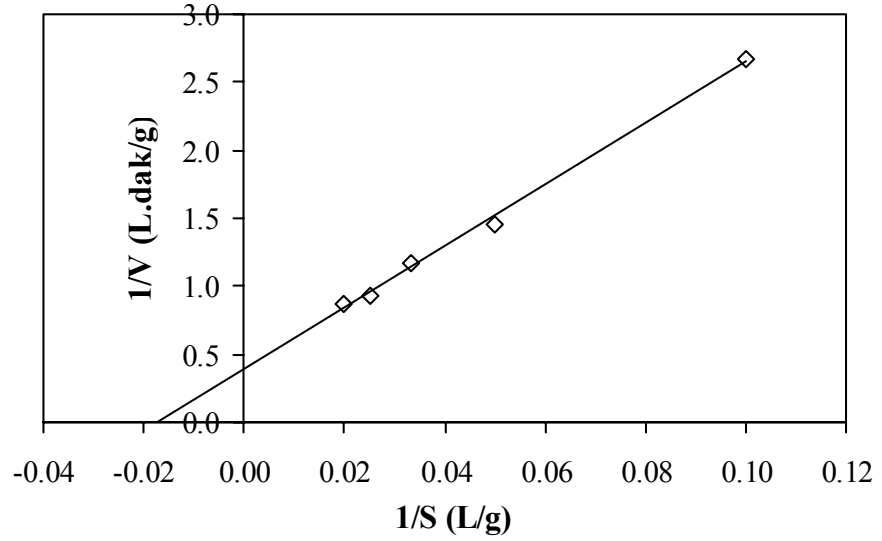
Şekil 7.58 Farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen çözünen protein konsantrasyonu değerleri, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, ✖ S= 50 g protein/L)

Çizelge 7.20 Farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen çözünen protein konsantrasyonu verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistik değerler, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim)

S ₀ (g protein/L)	Eğim (v ₀) (g/L.dak)	Standart Sapma (σ)	R ²
10	0.3891	0.2739	0.9788
20	0.6856	0.2305	0.9954
30	0.8510	0.4454	0.9890
40	1.0683	0.5786	0.9882
50	1.1434	0.4933	0.9925



Şekil 7.59 Zamana karşı incelenen baz sarfiyatı verilerinden elde edilen hız değerleri için çizilen Lineweaver-Burke grafiği T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim)



Şekil 7.60 Zamana karşı incelenen çözünen protein konsantrasyonu verilerinden elde edilen hız değerleri için çizilen Lineweaver-Burke grafiği T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim)

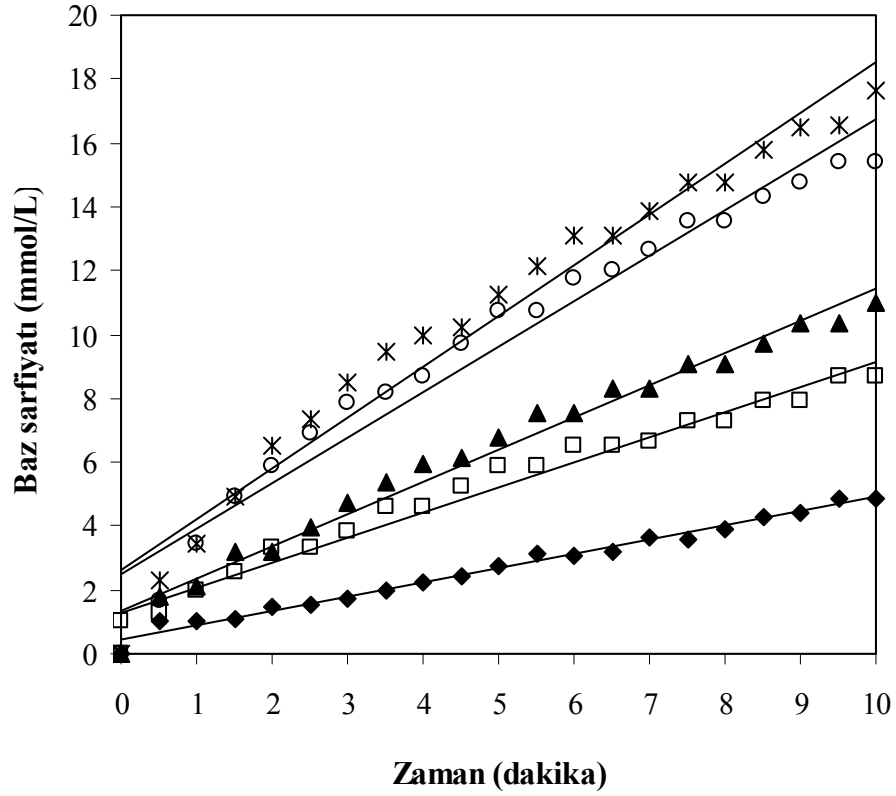
7.8.2.2 Sıcaklık ve pH'ın Michaelis-Menten kinetik parametrelerine etkisinin incelenmesi

Michaelis-Menten kinetik parametrelerinin sıcaklık ile değişimini incelemek amacıyla başlangıç hız deneyleri, 10, 20, 30, 40 ve 50 g protein/L substrat konsantrasyonlarında, pH 8 değerinde, % 0.25 (hacim/hacim) enzim ilavesi ile 40, 45, 50 ve 55°C sıcaklık değerlerinde gerçekleştirilerek baz sarfiyatı zamana bağlı olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 7.61-7.63'de (T=55°C için bkz Şekil 7.57) grafiksel olarak sunulmuştur. Her set sıcaklık deneyi için, deneysel verilere uyan lineer modellerin eğimlerinden hesaplanan başlangıç hızları ve modellere ait istatistik değerler Çizelge 7.21-7.23'de verilmiştir (T=55°C için bkz Çizelge 7.19). Modellerden elde edilen başlangıç hız verileri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burke grafikleri Şekil 7.64'de sunulmuş, grafiklerinden elde edilen kinetik parametreler ve istatistiksel değerler Çizelge 7.24'de sunulmuştur.

Çizelge 7.24 incelendiğinde, V_{max} değerlerinin sıcaklıkla arttığı, K_m değerlerinin ise sıcaklıkla azaldığı (enzim-substrat bağlanma eğiliminin arttığı), dolayısı ile katalitik verimin (enzim konsantrasyonu sabit tutulduğu için V_{max}/K_m olarak hesaplanmıştır) sıcaklıkla arttığı görülmektedir.

Kinetik parametrelerin pH ile değişimini incelemek amacıyla başlangıç hız deneyleri, 10, 20, 30, 40 ve 50 g protein/L substrat konsantrasyonlarında, 55°C sıcaklıkta, % 0.25 (hacim/hacim) enzim ilavesi ile pH 6.5, 7, 7.5, ve 8 değerlerinde gerçekleştirilerek baz sarfiyatı zamana bağlı olarak incelenmiş, elde edilen sonuçlar Şekil 7.65-7.67'de (pH=8 için bkz Şekil 7.57) grafiksel olarak sunulmuştur. Her set için, deneysel verilere uyan lineer modellerin eğimlerinden hesaplanan başlangıç hızları ve modellere ait istatistik değerler Çizelge 7.25-7.27'da verilmiştir (pH=8 için bkz Çizelge 7.19). Modellerden elde edilen başlangıç hız verileri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burke grafikleri Şekil 7.68'de sunulmuş, grafiklerinden elde edilen kinetik parametreler ve istatistiksel değerler ise Çizelge 7.28'de sunulmuştur.

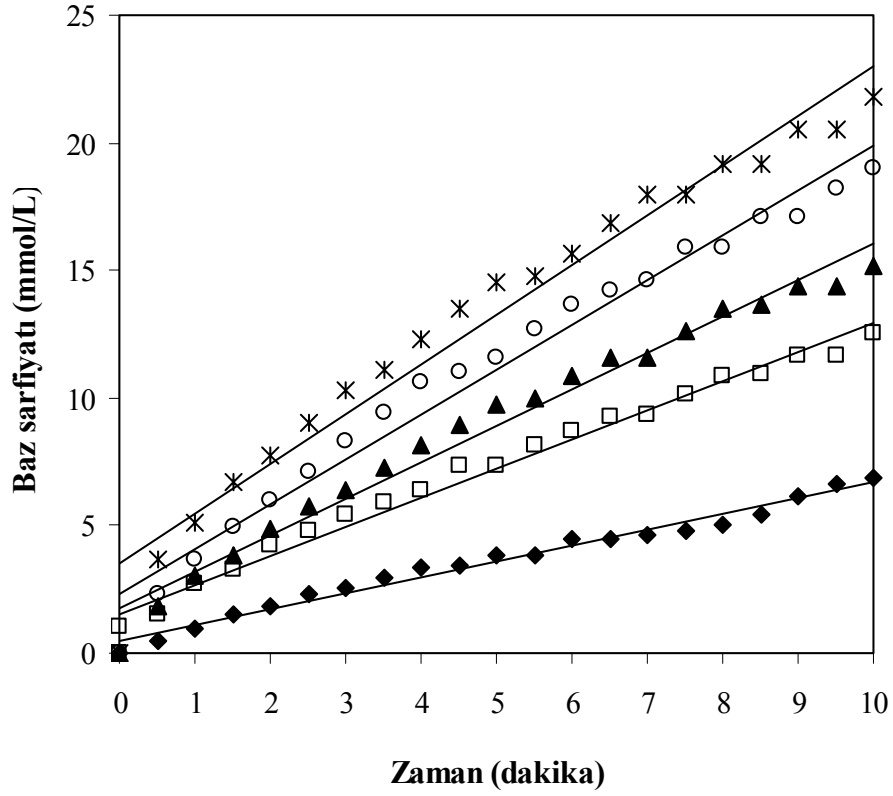
Çizelge 7.28 incelendiğinde, hem V_{max} hem de K_m değerlerinin pH ile arttığı, V_{max} değerlerindeki artış oranı K_m değerlerindeki artış oranından daha yüksek olduğu için katalitik verim değerlerinin de (V_{max}/K_m) pH ile artış gösterdiği görülmektedir.



Şekil 7.61 40°C Sıcaklıkta farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı değerleri, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, × S= 50 g protein/L)

Çizelge 7.21 40°C Sıcaklıkta farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistik değerler, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim)

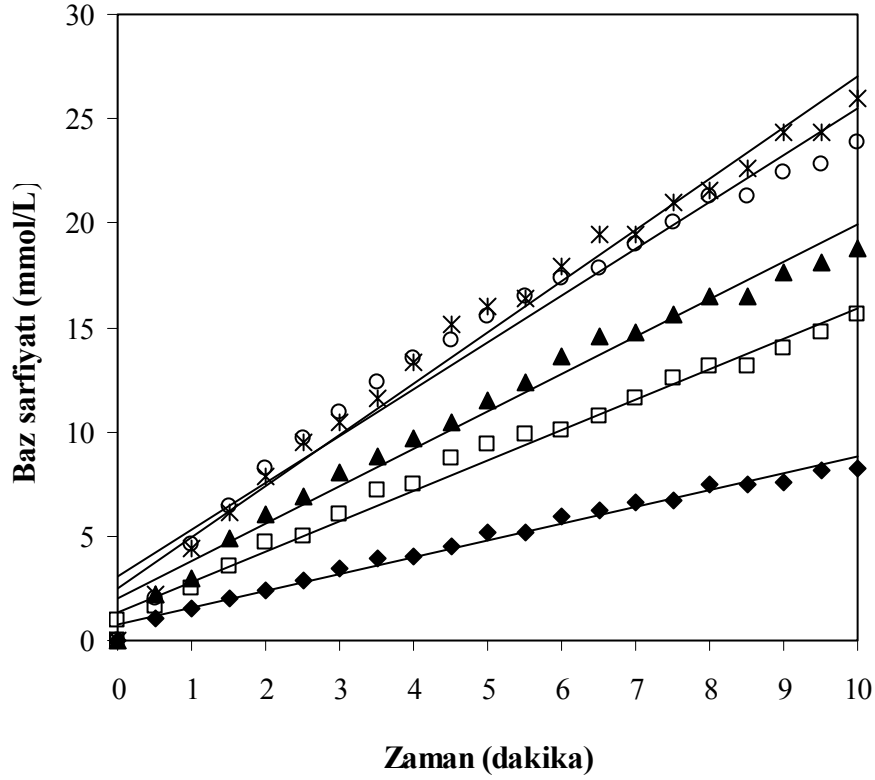
S ₀ (g protein/L)	Eğim (v ₀) (mmol/L.dak)	Standart Sapma (σ)	R ²
10	0.4454	0.1669	0.9931
20	0.7866	0.4518	0.9841
30	1.0058	0.4769	0.9891
40	1.4296	0.9554	0.9786
50	1.5908	0.9894	0.9814



Şekil 7.62 45°C Sıcaklıkta farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı değerleri, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, × S= 50 g protein/L)

Çizelge 7.22 45°C Sıcaklıkta farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistik değerler, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim)

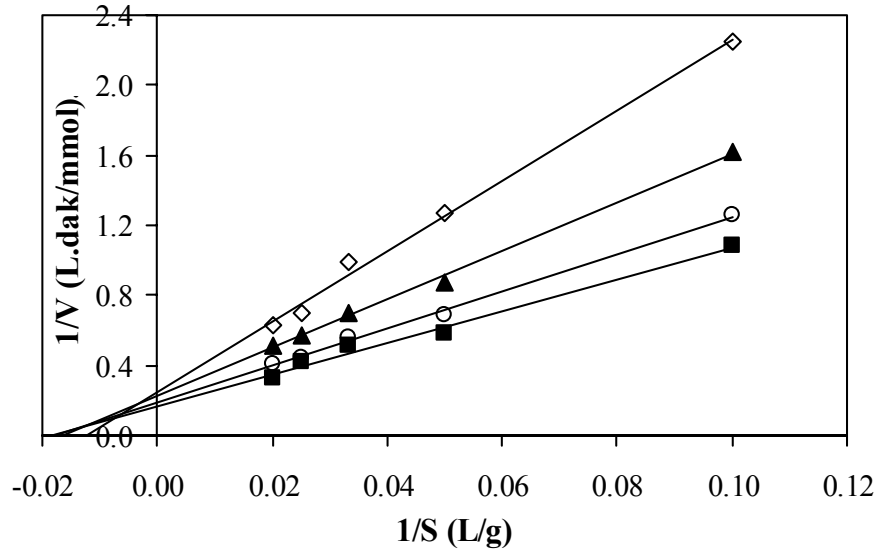
S_0 (g protein/L)	Eğim (v_0) (mmol/L.dak)	Standart Sapma (σ)	R^2
10	0.6184	0.2757	0.9903
20	1.1418	0.5203	0.9899
30	1.4290	0.6663	0.9894
40	1.7561	0.8822	0.9877
50	1.9450	1.1656	0.9827



Şekil 7.63 50°C Sıcaklıkta farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı değerleri, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, × S= 50 g protein/L)

Çizelge 7.23 50°C Sıcaklıkta farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı verilerine uyandır lineer modeller için eğim ve istatistik değerler, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim)

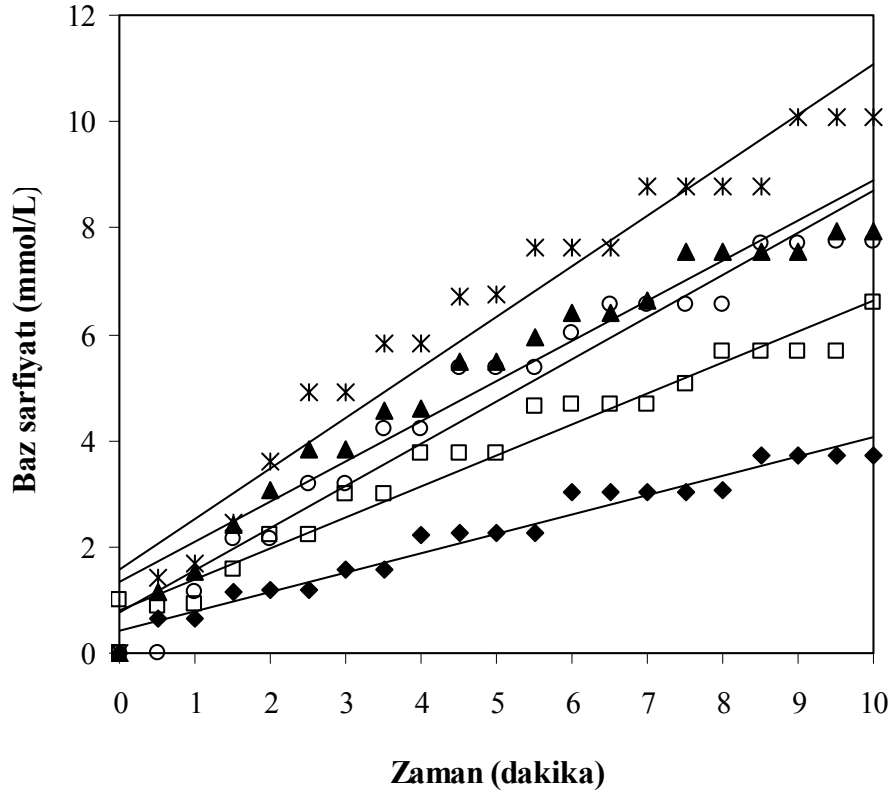
S_0 (g protein/L)	Eğim (v_0) (mmol/L.dak)	Standart Sapma (σ)	R^2
10	0.7976	0.3206	0.9921
20	1.4580	0.5292	0.9936
30	1.7900	0.7835	0.9907
40	2.2339	1.3274	0.9830
50	2.4537	1.0598	0.9909



Şekil 7.64 Farklı sıcaklık değerlerinde, mısır glutenin Alcalase enzimi ile hidrolizi için elde edilen Lineweaver-Burke grafikleri, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◇ 40°C, ▲ 45°C, ○ 50°C, ■ 55°C)

Çizelge 7.24 Sıcaklık deneyleri için çizilen Lineweaver-Burke grafiklerden elde edilen kinetik parametreler ve grafiklere ait istatistiksel değerler

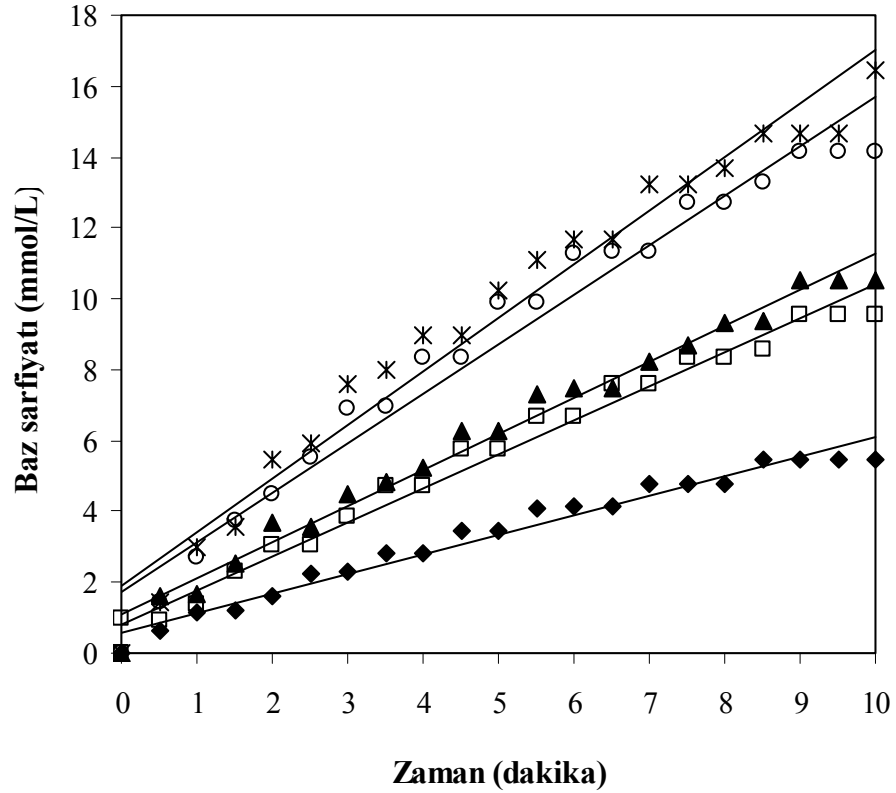
Kinetik sabitler ve istatistiksel değerler	Sıcaklık (°C)			
	40	45	50	55
K_m (g/L)	80.63	61.27	56.24	53.77
V_{max} (mmol/L.dak)	4.01	4.44	5.32	5.94
V_{max}/K_m	0.0497	0.0725	0.0946	0.1105
Standart Sapma (σ)	0.0558	0.0262	0.0218	0.0352
R^2	0.9973	0.9987	0.9985	0.9946



Şekil 7.65 pH 6.5 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı değerleri, $T= 55^{\circ}\text{C}$, $E= \% 0.25$ (hacim/hacim) (◆ $S= 10$ g protein/L, □ $S= 20$ g protein/L, ▲ $S= 30$ g protein/L, ○ $S= 40$ g protein/L, * $S= 50$ g protein/L)

Çizelge 7.25 pH 6.5 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistik değerler, $T= 55^{\circ}\text{C}$, $E= \% 0.25$ (hacim/hacim)

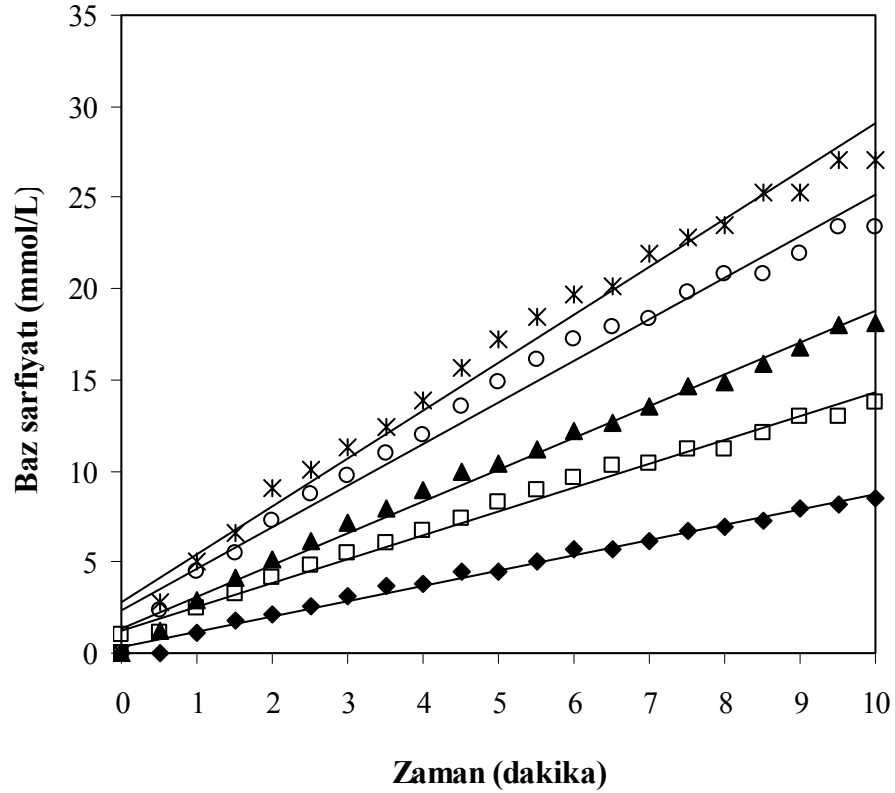
S_0 (g protein/L)	Eğim (v_0) (mmol/L.dak)	Standart Sapma (σ)	R^2
10	0.3623	0.2249	0.9815
20	0.5853	0.3913	0.9786
30	0.7563	0.5792	0.9723
40	0.7943	0.5978	0.9732
50	0.9510	0.7367	0.9716



Şekil 7.66 pH 7 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı değerleri, $T= 55^{\circ}\text{C}$, $E= \% 0.25$ (hacim/hacim) (\blacklozenge $S= 10$ g protein/L, \square $S= 20$ g protein/L, \blacktriangle $S= 30$ g protein/L, \circ $S= 40$ g protein/L, \ast $S= 50$ g protein/L)

Çizelge 7.26 pH 7 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistik değerler, $T= 55^{\circ}\text{C}$, $E= \% 0.25$ (hacim/hacim)

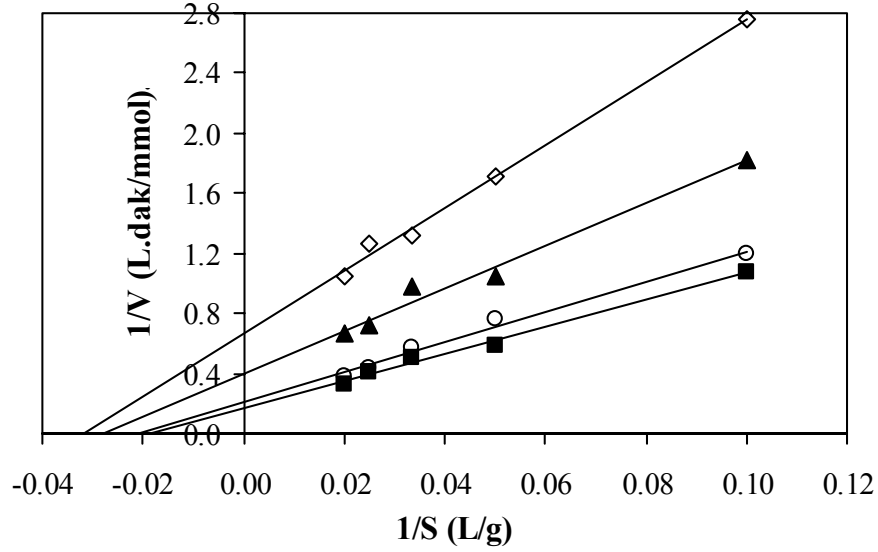
S_0 (g protein/L)	Eğim (v_0) (mmol/L.dak)	Standart Sapma (σ)	R^2
10	0.5472	0.3063	0.9849
20	0.9563	0.4412	0.9897
30	1.0167	0.4383	0.9909
40	1.3956	0.8427	0.9825
50	1.5130	0.8987	0.9830



Şekil 7.67 pH 7.5 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı değerleri, T= 55°C, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, × S= 50 g protein/L)

Çizelge 7.27 pH 7.5 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistik değerler, T= 55°C, E= % 0.25 (hacim/hacim)

S_0 (g protein/L)	Eğim (v_0) (mmol/L.dak)	Standart Sapma (σ)	R^2
10	0.8393	0.2711	0.9949
20	1.3058	0.5087	0.9926
30	1.7471	0.5488	0.9952
40	2.2742	1.0055	0.9905
50	2.6247	1.1349	0.9909



Şekil 7.68 Farklı pH değerlerinde, mısır glutenin Alcalase enzimi ile hidrolizi için elde edilen Lineweaver-Burke grafikleri, T= 55°C, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◇ pH 6.5, ▲ pH 7, ○ pH 7.5, ■ pH 8)

Çizelge 7.28 pH deneyleri için çizilen Lineweaver-Burke grafiklerden elde edilen kinetik parametreler ve grafiklere ait istatistiksel değerler

Kinetik sabitler ve istatistiksel değerler	pH			
	6.5	7.0	7.5	8.0
K_m (g/L)	31.38	35.88	47.00	53.77
V_{max} (mmol/L.dak)	1.50	2.52	4.69	5.94
V_{max}/K_m	0.0478	0.0702	0.0997	0.1105
Standart Sapma (σ)	0.0506	0.0782	0.0427	0.0352
R^2	0.9979	0.9894	0.9936	0.9946

7.8.2.3 Alcalase enzimi için ürün inhibisyon türünün belirlenmesi

Genellikle enzim katalizli reaksiyonların hızı reaktan olmayan bileşenlerce etkilenir, reaksiyon hızında bir bileşenden dolayı azalma meydana geliyorsa bu bileşen inhibitör olarak adlandırılır. İnhibisyon çalışmaları genellikle enzim seçiciliği, aktif merkezin fiziksel ve kimyasal yapısı ve reaksiyonun kinetik mekanizması hakkında bilgi verir.

Üç ana tür inhibisyon vardır;

Kompetitiv (yarışmalı) inhibisyon

İnhibitörün substrata bağlanmasını engelleyecek bir tarzda serbest enzime bağlanması sonucu reaksiyonu engellendiği tür inhibisyondur. Kompetitiv inhibitör varlığında V_{\max} değeri değişmez, ancak K_m değeri artış gösterir. Kompetitive inhibisyonu için hız denklemi;

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} = \frac{v_{\max} [S]}{K_{m_{göz}} + [S]} \quad (7.24)$$

şeklindedir. Eşitlik 7.24'de $[I]$ inhibitör konsantrasyonu, K_i inhibisyon sabitidir. Kinetik parametrelerin eldesi için hız denklemi lineer hale getirilir ve Lineweaver-Burke grafiği çizilirse Şekil 7.69 (a) elde edilir.

Nonkompetitiv (yarışmasız) inhibisyon

Bu tür inhibisyonda inhibitör ve substrat gelişigüzel bir tarzda, birbirinden bağımsız olarak ve tersinir bir şekilde enzimde farklı merkezlere bağlanır. Nonkompetitiv inhibitör varlığında V_{\max} değeri azalırken K_m değeri değişmez. Nonkompetitiv inhibisyon için hız denklemi;

$$v = \frac{\frac{v_{\max}}{(1 + [I]/K_i)} [S]}{K_m + [S]} = \frac{v_{\max_{göz}} [S]}{K_m + [S]} \quad (7.25)$$

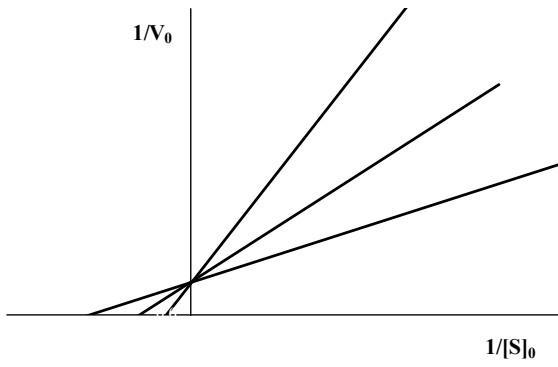
şeklindedir. Eşitlik 7.25 lineer hale getirilir ve Lineweaver-Burke grafiği çizilirse Şekil 7.69 (b) elde edilir.

Unkompetitiv (yarı yarışmalı) inhibisyon

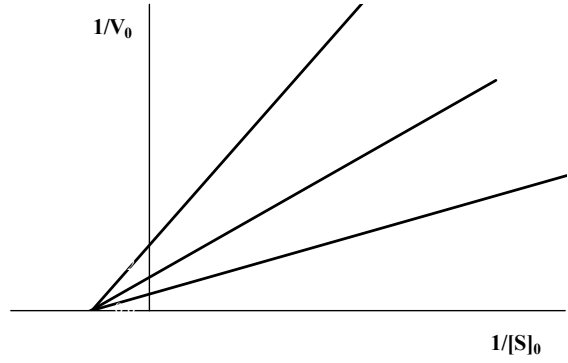
Bu tür inhibisyonda inhibitör serbest enzime bağlanmaz, enzim substrat kompleksine bağlanarak kompleksin ürün oluşturmasını engeller. Unkompetitiv inhibisyonda hem V_{\max} hem de K_m değeri azalır. Unkompetitiv inhibisyon için hız denklemi;

$$v = \frac{\frac{v_{\max}}{(1+[I]/K_i)}[S]}{\frac{K_m}{(1+[I]/K_i)} + [S]} = \frac{v_{\max g\ddot{o}z}[S]}{K_{m g\ddot{o}z} + [S]} \quad (7.26)$$

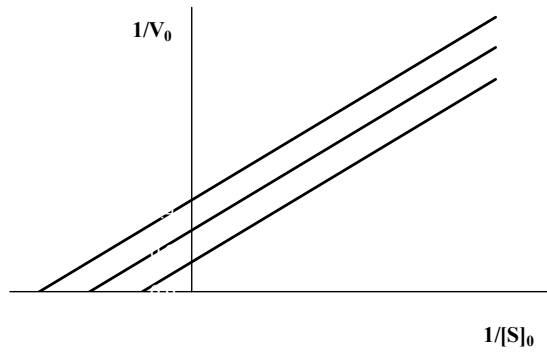
şeklindedir. Kinetik parametrelerin eldesi için hız denklemi lineer hale getirilir ve Lineweaver-Burke grafiği çizilirse Şekil 7.69 (c) elde edilir (Segel, 1993; Telefoncu, 1997; Kuchel ve Ralston, 1988).



(a) Kompetitive (yarışmalı) inhibisyon



(b) Nonkompetitive (yarışmasız) inhibisyon



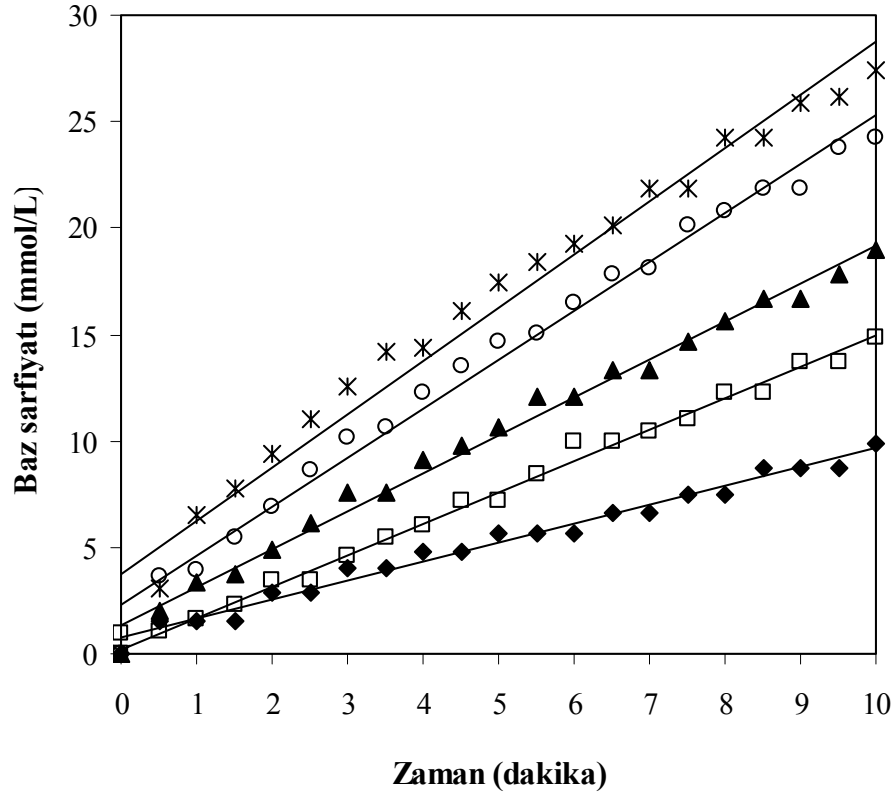
(c) Unkompetitive (yarı yarışmalı) inhibisyon

Şekil 7.69 Farklı inhibisyon türleri için Lineweaver-Burke grafikleri

Mısır glutenin hidroliz reaksiyonunda Alcalase enzimi için ürün inhibisyon türünün belirlenebilmesi amacıyla, öncelikle deneylerde kullanılacak hidrolizatın eldesi için, elde edilen optimum proses şartlarında (30 g protein/L substrat konsantrasyonunda, 55°C sıcaklıkta, pH 8'de, % 0.25 (hacim/hacim) enzim ilavesi ile) hidroliz reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. 120 dakikalık reaksiyon süresi sonunda Alcalase enzimi ısı ile inaktive edildikten sonra, ortamda kalan hidrolizlenmeyen proteini çözültiden ayırmak için, hidrolizat çözültisi süzölmüş ve deneylerde kullanılacağı miktarlarda kaplara konularak buzlukta saklanmıştır. Daha sonra başlangıç hız deneyleri, reaksiyon ortamına % 15, 30 ve 45 (hacim/hacim) oranında hidrolizat ilaveleri ile; 10, 20, 30, 40 ve 50 g protein/L substrat konsantrasyonlarında, 55°C sıcaklık ve pH 8'de, % 0.25 (hacim/hacim) enzim ilavesi ile gerçekleştirilmiştir. Her deney için zamana karşı incelenen baz konsantrasyonu sarfiyatı (mmol/L) ve çözünen protein miktarı (g/L) değerleri Şekil 7.70-7.75'de grafiksel olarak sunulmuştur (kontrol deneyleri için bkz. Şekil 7.57 ve 7.58). Her set için, deneysel verilere uyan lineer modellerin eğimlerinden hesaplanan, başlangıç hızları ve modellere ait istatistiksel değerler Çizelge 7.29- 7.34'de verilmiştir.

Modellerden elde edilen başlangıç hız verileri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burke grafikleri (Şekil 7.76 ve Şekil 7.77) inhibisyon türünün unkompetitiv olduğunu göstermiştir. Lineweaver-Burke grafiklerinden elde edilen kinetik parametreler ve grafiklere ait istatistiksel değerler Çizelge 7.35 ve Çizelge 7.36'de verilmiştir.

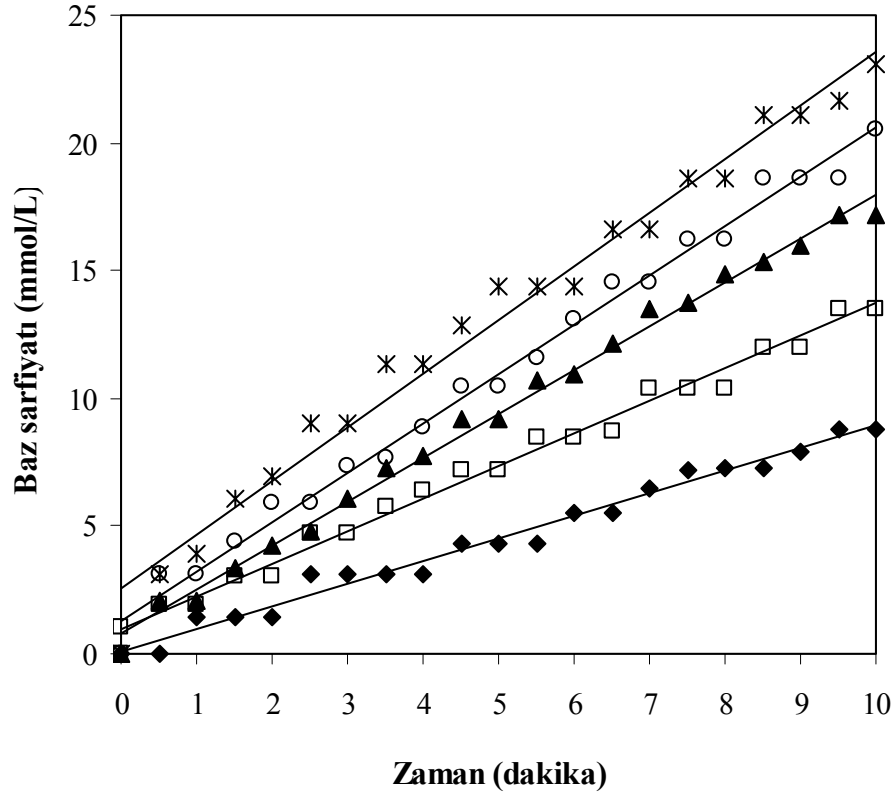
Çizelge 7.35 ve 7.36 incelendiğinde, baz sarfiyatı verileri ve çözünen protein konsantrasyonu verileri kullanılarak elde edilen inhibisyon sabiti (K_i) değerlerinin birbirine çok yakın olduğu görülmektedir. Daha öncede belirtildiği gibi, elde edilen bu sonuç ve daha önceki bölümlerde hidroliz derecesi ile protein çözünürlüğü arasında elde edilen lineer bağıntı kinetik verilerin hesabında baz sarfiyatı veya çözünen protein konsantrasyonu verilerinden herhangi birinin kullanılabileceğini göstermektedir.



Şekil 7.70 Farklı substrat konsantrasyonlarında, reaksiyon çözeltisine % 15 (hacim/hacim) oranında hidrolizat ilavesi ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı değerleri, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, ✱ S= 50 g protein/L)

Çizelge 7.29 % 15 (hacim/hacim) hidrolizat ilavesi için, farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı verilerine uyan lineer modellere ait eğim ve istatistik değerler, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim)

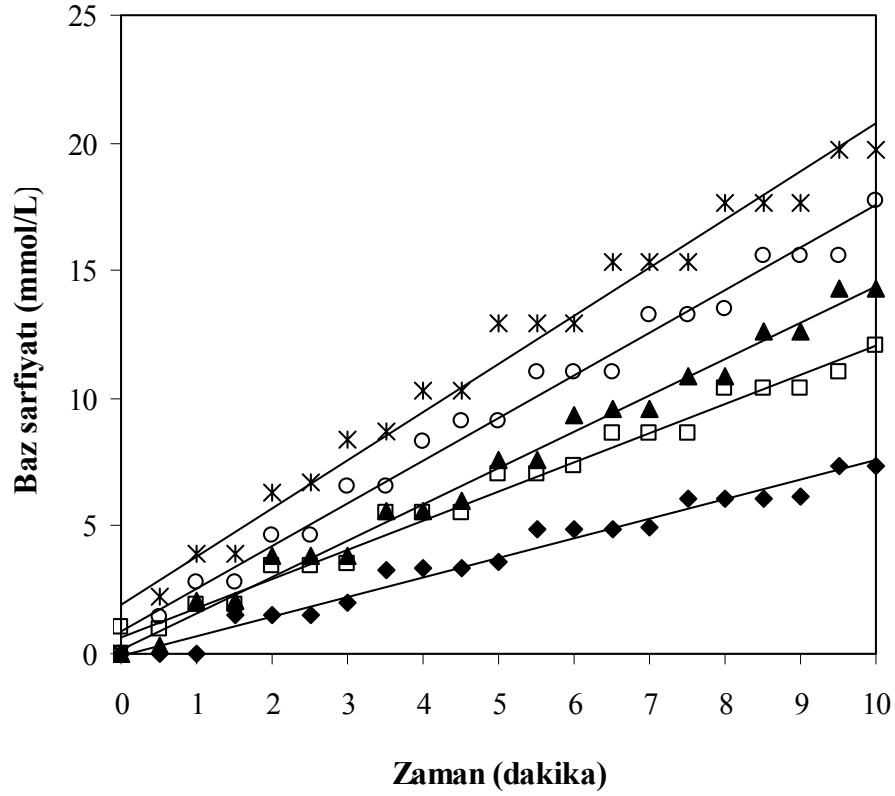
S_0 (g protein/L)	Eğim (v_0) (mmol/L.dak)	Standart Sapma (σ)	R^2
10	0.8810	0.3850	0.9908
20	1.4728	0.3402	0.9973
30	1.8148	0.5358	0.9955
40	2.2470	0.8308	0.9936
50	2.5012	1.3133	0.9867



Şekil 7.71 Farklı substrat konsantrasyonlarında, reaksiyon çözeltisine % 30 (hacim/hacim) oranında hidrolizat ilavesi ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı değerleri, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, * S= 50 g protein/L)

Çizelge 7.30 % 30 (hacim/hacim) hidrolizat ilavesi için, farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı verilerine uyan lineer modellere ait eğim ve istatistik değerler, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim)

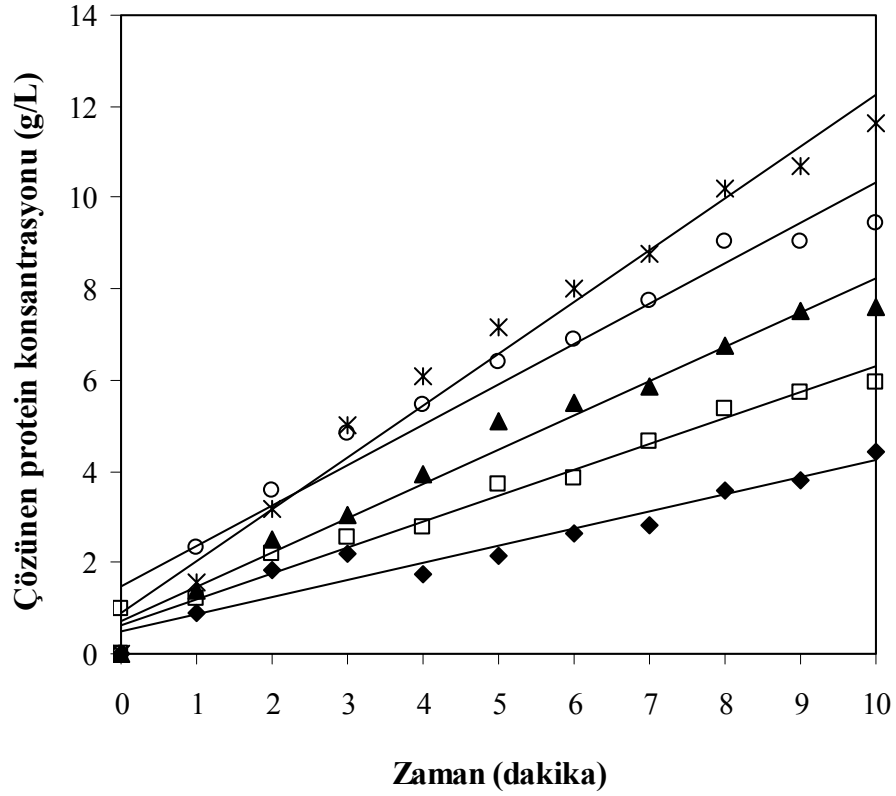
S_0 (g protein/L)	Eğim (v_0) (mmol/L.dak)	Standart Sapma (σ)	R^2
10	0.8264	0.3789	0.9911
20	1.2767	0.4594	0.9937
30	1.7210	0.4231	0.9970
40	1.9268	0.5949	0.9953
50	2.1078	0.9517	0.9901



Şekil 7.72 Farklı substrat konsantrasyonlarında, reaksiyon çözeltisine % 45 (hacim/hacim) oranında hidrolizat ilavesi ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı değerleri, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, ✖ S= 50 g protein/L)

Çizelge 7.31 % 45 (hacim/hacim) hidrolizat ilavesi için, farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen baz sarfiyatı verilerine uyan lineer modellere ait eğim ve istatistik değerler, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim)

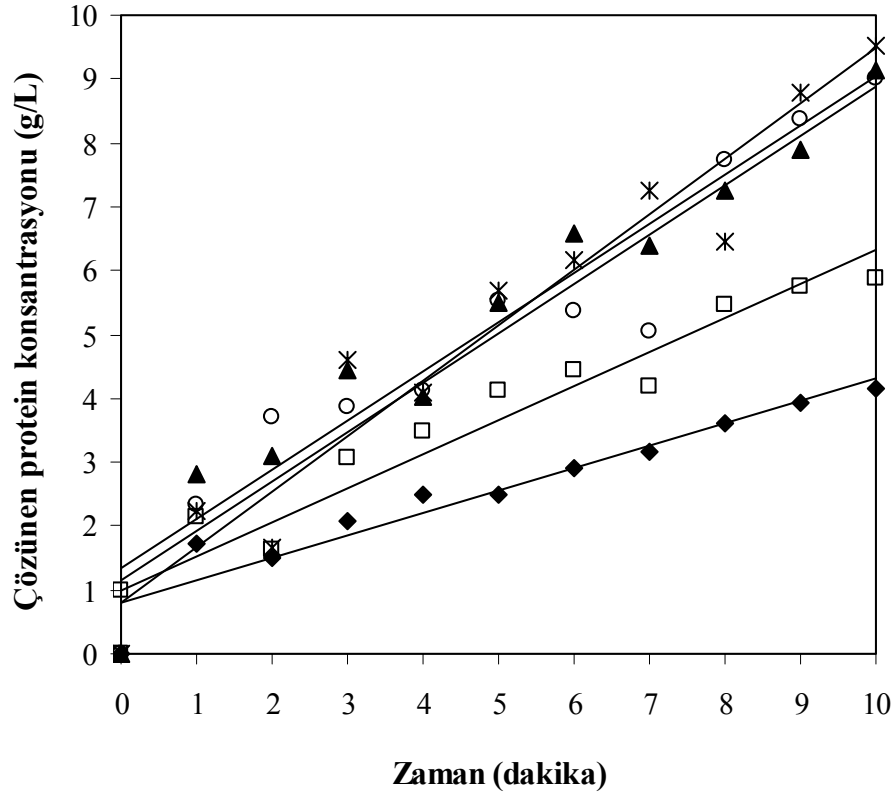
S_0 (g protein/L)	Eğim (v_0) (mmol/L.dak)	Standart Sapma (σ)	R^2
10	0.7675	0.4105	0.9859
20	1.1450	0.4733	0.9917
30	1.4231	0.4754	0.9945
40	1.6640	0.6176	0.9933
50	1.8900	0.8748	0.9896



Şekil 7.73 Farklı substrat konsantrasyonlarında, reaksiyon çözeltisine % 15 (hacim/hacim) oranında hidrolizat ilavesi ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen çözünen protein konsantrasyonu değerleri, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, ✖ S= 50 g protein/L)

Çizelge 7.32 % 15 (hacim/hacim) hidrolizat ilavesi için, farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen çözünen protein konsantrasyonu verilerine uyan lineer modellere ait eğim ve istatistik değerler, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim)

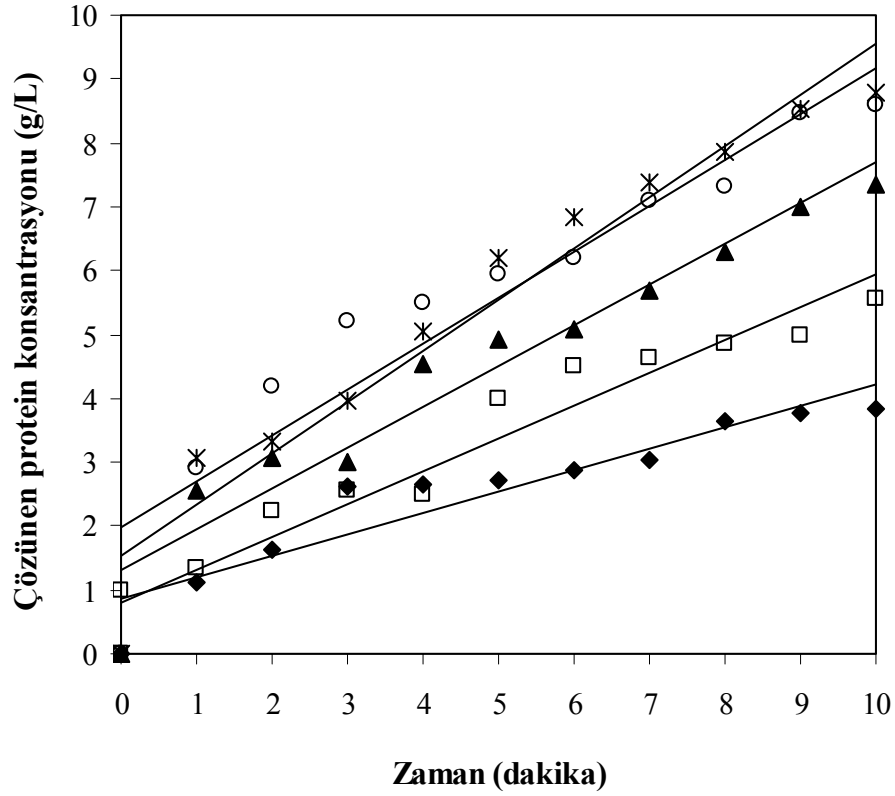
S_0 (g protein/L)	Eğim (v_0) (g/L.dak)	Standart Sapma (σ)	R^2
10	0.3758	0.3555	0.9653
20	0.5684	0.3175	0.9875
30	0.7512	0.4132	0.9875
40	0.8855	0.7034	0.9751
50	1.1387	0.5790	0.9896



Şekil 7.74 Farklı substrat konsantrasyonlarında, reaksiyon çözeltisine % 30 (hacim/hacim) oranında hidrolizat ilavesi ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen çözünen protein konsantrasyonu değerleri, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, ✖ S= 50 g protein/L)

Çizelge 7.33 % 30 (hacim/hacim) hidrolizat ilavesi için, farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen çözünen protein konsantrasyonu verilerine uyan lineer modellere ait eğim ve istatistik değerler, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim)

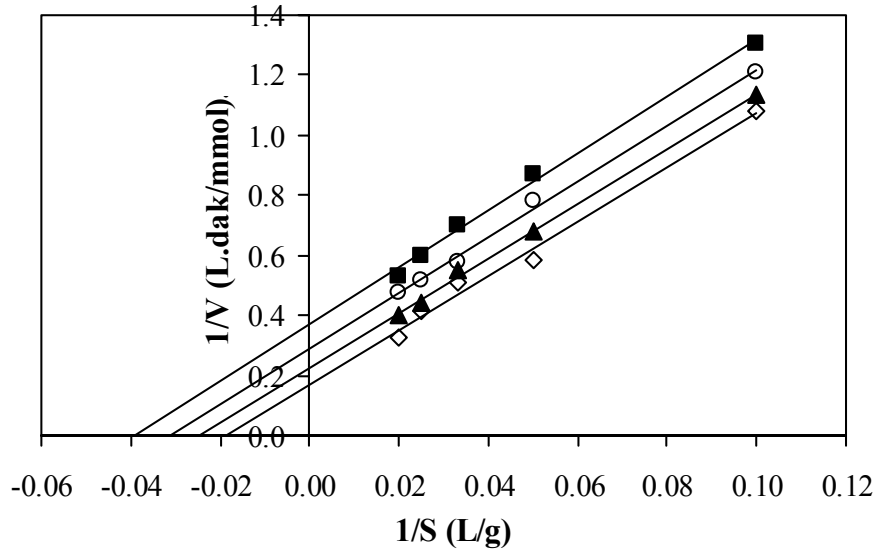
S ₀ (g protein/L)	Eğim (v ₀) (g/L.dak)	Standart Sapma (σ)	R ²
10	0.3496	0.3593	0.9594
20	0.5325	0.5464	0.9595
30	0.7720	0.6618	0.9712
40	0.7728	0.7873	0.9600
50	0.8698	0.7703	0.9694



Şekil 7.75 Farklı substrat konsantrasyonlarında, reaksiyon çözeltisine % 45 (hacim/hacim) oranında hidrolizat ilavesi ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen çözünen protein konsantrasyonu değerleri, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, □ S= 20 g protein/L, ▲ S= 30 g protein/L, ○ S= 40 g protein/L, ✱ S= 50 g protein/L)

Çizelge 7.34 % 45 (hacim/hacim) hidrolizat ilavesi için, farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen çözünen protein konsantrasyonu verilerine uyan lineer modellere ait eğim ve istatistik değerler, T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim)

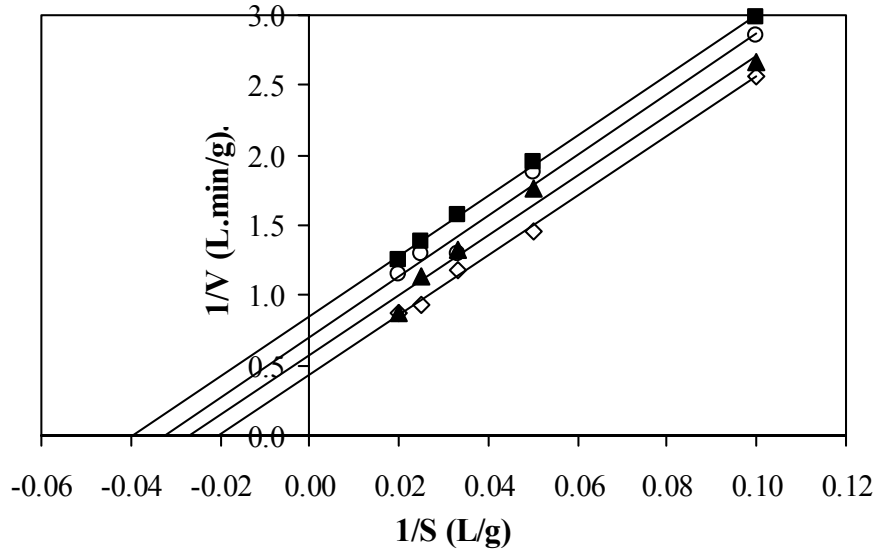
S_0 (g protein/L)	Eğim (v_0) (g/L.dak)	Standart Sapma (σ)	R^2
10	0.3350	0.4416	0.9357
20	0.5128	0.4877	0.9649
30	0.6378	0.5909	0.9667
40	0.7200	0.8669	0.9455
50	0.8001	0.6978	0.9703



Şekil 7.76 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesinde, zamana karşı incelenen baz sarfiyatı verilerinden elde edilen hız değerleri için çizilen Lineweaver-Burke grafikleri T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◇ kontrol, ▲ % 15 (hacim/hacim), ○ % 30 (hacim/hacim), ■ % 45 (hacim/hacim))

Çizelge 7.35 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesinde, zamana karşı incelenen baz sarfiyatı verilerinden elde edilen hız değerleri için çizilen Lineweaver-Burke grafiklerden hesaplanan kinetik parametreler ve grafiklere ait istatistiksel değerler

Kinetik sabitler ve istatistiksel değerler	% Hidrolizat ilavesi (hacim/hacim)			
	Kontrol	% 15	% 30	% 45
K_m (g/L)	53.77	-	-	-
$K_m^{göz}$ (g/L)	-	40.34	32.06	26.02
V_{max} (mmol/L.dak)	5.94	-	-	-
$V_{max}^{göz}$ (mmol/L.dak)	-	4.43	3.45	2.74
K_i (%)	-	45.06	44.32	42.19
K_i (%) (ort.)		43.85		
σ	0.0352	0.0143	0.0204	0.0223
R^2	0.9946	0.9991	0.9983	0.9980



Şekil 7.77 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesinde, zamana karşı incelenen çözünen protein konsantrasyonu verilerinden elde edilen hız değerleri için çizilen Lineweaver-Burke grafikleri T= 55°C, pH= 8, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◇ kontrol, ▲ % 15 (hacim/hacim), ○ % 30 (hacim/hacim), ■ % 45 (hacim/hacim))

Çizelge 7.36 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesinde, zamana karşı incelenen çözünen protein konsantrasyonu verilerinden elde edilen hız değerleri için çizilen Lineweaver-Burke grafiklerden hesaplanan kinetik parametreler ve grafiklere ait istatistiksel değerler

Kinetik sabitler ve istatistiksel değerler	% Hidrolizat ilavesi (hacim/hacim)			
	Kontrol	% 15	% 30	% 45
K_m (g/L)	49.56	-	-	-
$K_m^{göz}$ (g/L)	-	37.06	30.80	24.99
V_{max} (g/L.dak)	2.32	-	-	-
$V_{max}^{göz}$ (g/L.dak)	-	1.74	1.42	1.17
K_i (%)	-	44.49	46.26	45.79
K_i (%) (ort.)		45.51		
σ	0.0468	0.1061	0.0965	0.0237
R^2	0.9985	0.9913	0.9930	0.9996

7.8.3 Kinetik verilerin literatürde varolan verilerle karşılaştırılması

Literatürde, mısır gluteninin hidroliz kinetiği sınırlı bir şekilde incelenmiştir. Bu çalışmada glutenin enzimatik hidroliz kinetiği kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve elde edilen kinetik verilerle, literatürde varolan veriler Çizelge 7.37’de sunulmuştur.

Çizelge 7.37 Kinetik verilerin literatürde varolan verilerle karşılaştırılması

Kaynak	Kinetik model	Proses şartları	Kinetik sabitler
Mannheim ve Cheryan (1992)	Michaelis-Menten	pH 9, 50°C S = 0.068-2 g/L E = 0.1 g/L	$K_m = 3.1$ g/L $V_{max} = 6.8 \times 10^{-3}$ g/L.dak
Hardwick ve Glatz (1989)	Basitleştirilmiş ürün inhibisyonlu model; $r_I = k_I e_0 ([I] - [IE]) / [1 + ([P] / K_{mP})]$ $r_S = k_S e_0 [S] / [1 + ([P] / K_{mP})]$ r_I : çözünmeyen substrat r_S : çözünen substrat	pH 9, 50°C S = belirtilmemiş E = 0.375-0.75 AU/L	$k_I = 5.27 \times 10^{-2}$ g/L $k_S = 1.65 \times 10^{-1}$ g/L $K_{mP} = 3.79$ g/L
Bu çalışmada	Michaelis-Menten (unkompetitiv inhibisyon) $v = \frac{\frac{v_{max}}{(1 + [I] / K_i)} [S]}{\frac{K_m}{(1 + [I] / K_i)} + [S]} \quad (7.26)$ $\frac{dX}{dt} = a \cdot \exp(-b \cdot X) \quad (7.5)$ X: Hidroliz veya çözünürlük derecesi $A = (100 - \gamma) \exp(-k_D \cdot t) + \gamma \quad (7.7)$ $1/A = 1/A_0 + k \cdot t \quad (7.8)$ A: % enzim aktivitesi	pH 8, 55°C S = 10-50 g/L E = % 0.25 (hacim) pH 6.5-8.5, 40-65°C S = 10-60 g/L E = % 0.05-0.25 (hacim) pH 6.5-7.5, 40-55°C pH 8-8.5, 60-65°C	Baz sarfiyatı verilerinden; $K_m = 53.77$ g/L $V_{max} = 5.94$ mmol/L.dak $K_i = \% 43.85$ (hacim) Çözünen protein kons. verilerinden; $K_m = 49.45$ g/L $V_{max} = 2.32$ g/L.dak $K_i = \% 45.51$ (hacim) Denklemin katsayıları Çizelge 7.17’de verilmiştir. İnaktivasyon sabitleri Çizelge 7.18’de verilmiştir.

8. SONUÇLAR

Günümüzde, hayvansal kaynaklı proteinlere alternatif olan bitkisel kaynaklı proteinlerin modifiye edilerek, gıdaların fonksiyonel özelliklerini iyileştirici katkı maddeleri olarak veya klinik amaçla geliştirilen özel besin ve enerji içeceklerinde protein takviyesi olarak kullanımı önem kazanmıştır. Bu nedenle bitkisel kaynaklı proteinlerin enzimatik hidroliz ile modifikasyonu ve elde edilen hidrolizat özelliklerinin iyileştirilmesi araştırmacıların ilgisini çeken bir konu olmuştur.

Bitkisel protein kaynakları arasında en çok soya proteinin hidrolizi üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Soyanın yanı sıra; bezelye, nohut, bakla üzerlerinde gerçekleştirilen çalışmalarla dikkat çeken bitkisel protein kaynakları arasında yer almaktadır. Ülkemizde, yılda yaklaşık 23000 ton mısır proteini üretilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada, protein kaynağı olarak mısır gluteni seçilmiş ve mısır glutenin enzimatik hidrolizi, kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve elde edilen sonuçlar aşağıda kısaca özetlenmiştir:

- 1) Mısır glutenin hidroliz reaksiyonunun optimizasyonunda kullanılacak uygun enzimi belirleyebilmek amacıyla beş ticari proteaz enzimi ile (Alcalase, Neutrase, Flavourzyme, Protamex ve PTN) ön denemeler gerçekleştirilerek, enzimlerin mısır gluteninin hidrolizi ve çözünürlüğü üzerindeki etkinlikleri incelenmiş ve Alcalase enziminin diğer enzimlerden daha etkin olduğu belirlenmiştir.
- 2) Hidroliz derecesini belirlemek için kullanılan pH-stat yöntemini, mısır glutenin Alcalase enzimi ile hidrolizi için kalibre etmek, diğer bir deyişle farklı sıcaklıklar için mısır gluteni hidrolizatlarının pK değerlerini belirlemek amacı ile gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları sırasında, serbest hale geçen amino asit gruplarının analizi hem TNBS metodu, hem de OPA yöntemi ile yapılmıştır. Her iki yöntem içinde, hidroliz reaksiyonları sırasında serbest hale geçen protonların ototitrasyonu için ortama ilave edilen baz sarfiyatı değerleri ile serbest hale geçen amino asit konsantrasyonu değerleri arasındaki doğrusal korelasyonların yüksek olduğu saptanmış, ve her iki yöntemle yapılan kalibrasyon sonucunda hesaplanan pK değerleri birbirine oldukça yakın bulunmuştur. TNBS metodu ile yapılan kalibrasyon sonucunda mısır gluteni hidrolizatları için pK değerleri; 40°C, 50°C ve 60°C sıcaklıklarda sırasıyla 6.81, 6.60 ve 6.37 olarak, OPA yöntemi ile yapılan kalibrasyon sonucunda aynı sıcaklıklar için pK değerleri sırasıyla; 6.83, 6.59 ve 6.36 olarak bulunmuştur.

- 3) Substrat konsantrasyonunun hidroliz işlemine etkisi incelendiğinde, substrat konsantrasyonu artırıldığında, hidroliz reaksiyonunun ve protein çözünürlük hızlarının, dolayısı ile hidroliz derecesi ve protein çözünürlük derecesi değerlerinin azaldığı saptanmıştır. 120 dakikalık reaksiyon sonrası elde edilen değerler incelendiğinde, % hidroliz ve % protein çözünürlüğü derecelerinin 30 g protein/L substrat konsantrasyonu değerinden sonra belirgin şekilde azaldığı görülmüş, bu nedenle 30 g protein/L substrat konsantrasyonu optimum substrat konsantrasyonu olarak seçilmiş ve diğer tüm deneylerde başlangıç substrat konsantrasyonu olarak bu değerin kullanımına karar verilmiştir. Mısır gluteninin Alcalase enzimi ile hidrolizi için, substrat konsantrasyonunun hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisi Mannheim ve Cheryan (1992) tarafından da incelenmiş ve bu çalışma ile benzer şekilde % substrat dönüşümünün substrat konsantrasyonu ile azaldığı, hidroliz için optimum substrat/enzim oranının 20 (ağırlık/ağırlık) olduğu bildirilmiştir.

Substrat başlangıç konsantrasyonunun enzim stabilitesine etkisi incelendiğinde, çalışılan tüm substrat başlangıç konsantrasyonları için, enzim stabilitesinin ilk on dakikada hızlı bir düşüş gösterdiği, daha sonra ise işlem sonuna kadar yaklaşık olarak % 55 değerinde sabit kaldığı saptanmıştır.

- 4) Enzim konsantrasyonunun hidroliz işlemine etkisi incelendiğinde, enzim konsantrasyonu artırıldığında, hidroliz reaksiyonunun hızının dolayısı ile hidroliz derecesi ve protein çözünürlük derecesi değerlerinin arttığı, ancak % 0.25 (hacim/hacim) enzim miktarının üzerindeki enzim değerleri için, hidroliz ve protein çözünürlük derecesi değerlerindeki artışın belirgin şekilde yavaşladığı görülmüştür. % 0.25 (hacim/hacim) enzim miktarının üzerindeki değerler için reaksiyonun daha yavaş ilerlemesi, substratın enzim ile doyunurluğa ulaşmasından dolayı hidroliz reaksiyonunun diğer faktörlerden çok substrat konsantrasyonu tarafından limitlenmiş olabileceğini göstermektedir. Mısır gluteninin Alcalase enzimi ile hidrolizi için, enzim konsantrasyonunun hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisi Mannheim ve Cheryan (1992) tarafından da incelenmiş, ve bu çalışma ile benzer şekilde % substrat dönüşümünün belirli bir enzim konsantrasyonuna kadar (0.50 mg/mL) arttığı bu değerden sonra değişmediği rapor edilmiştir.

Kullanılan enzim miktarının enzim stabilitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde, çalışılan tüm enzim miktarları için, enzim stabilitesinin ilk on dakikada hızlı bir düşüş gösterdiği daha sonra ise işlem sonuna kadar sabit kaldığı, ancak enzim miktarı artıkça

enzim aktivitesinin sabitlendiği değerlerde de belirgin bir artış olduğu saptanmıştır. Farklı enzim miktarları ile gerçekleştirilen deneyler sonucunda, % 0.25 (hacim/hacim) enzim miktarı hidroliz reaksiyonu için optimum enzim değeri olarak belirlenmiştir.

- 5) Hidroliz derecesi ve protein çözünürlük derecelerinin sıcaklığa bağlı değişimleri incelendiğinde, maksimum hidroliz ve çözünürlük değerlerinin 55°C’de elde edildiği, dolayısı ile bu sıcaklık değerinin mısır gluteninin hidroliz reaksiyonu için optimum değer olduğu saptanmıştır.

Sıcaklığın enzim stabilitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde, 40-55°C sıcaklık aralığında, sıcaklık artışına bağlı enzim inaktivasyonunun oldukça az olduğu, bu aralıkta enzim aktivitesinin yine ilk on dakika içerisinde hızlı bir düşüş gösterdiği daha sonra ise işlem sonuna kadar stabil kaldığı, 55°C’den sonra enzim inaktivasyon hızının oldukça arttığı ve 65°C’de enzimin 30 dakika içerisinde tamamen inaktive olduğu belirlenmiştir.

- 6) Hidroliz derecesi ve protein çözünürlük derecelerinin pH’a bağlı değişimleri incelendiğinde, hidroliz reaksiyonunun hızının dolayısı ile hidroliz ve çözünürlük derecesi değerlerinin pH 8 değerine kadar artış gösterdiği, pH 8.5 değeri için elde edilen sonuçların ise hemen hemen pH 8 değeri için elde edilen sonuçlarla aynı olduğu bulunmuştur.

pH’ın enzim stabilitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde, pH 6.5-7.5 aralığında, pH artışına bağlı enzim inaktivasyonunun oldukça az olduğu, enzim inaktivasyon hızının pH 7.5 değerinden sonra arttığı belirlenmiştir. Maksimum hidroliz ve çözünürlük derecesi pH 8 değerinde elde edildiğinden, reaksiyon için uygun pH değeri 8 olarak seçilmiştir.

- 7) Hidroliz işlemi sonunda meydana gelen ürünlerin (hidrolizatların), hidroliz reaksiyonuna etkisi incelendiğinde, ortamda bulunan hidrolizat miktarı arttığında; hidroliz reaksiyonunun hızının dolayısı ile hidroliz ve çözünürlük derecesi değerlerinin azaldığı saptanmıştır. Bu azalma, hidroliz ürünlerinin enzimi inhibe etmesi veya ortamın viskozitesini artırarak kütle transferini engellemesi ile açıklanabilir.

Hidrolizat miktarının enzim stabilitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde, hidrolizat miktarındaki artış ile enzim stabilitesinde artış meydana geldiği gözlemlenmiştir.

- 8) Kademeli enzim ilavesinin hidroliz reaksiyonuna etkisi incelendiğinde, toplam enzim miktarı sabit tutulduğundan, kademe sayısı arttıkça, başlangıçtaki enzim miktarı düşük olduğu için reaksiyonun başlangıç hızında bir azalma meydana geldiği, ancak ara kademelerde ilave edilen enzim ile 120 dakikalık işlem süresi sonunda hidroliz ve çözünürlük değerlerinin eşitlendiği, dolayısı ile, kademeli enzim ilavesinin hidroliz ve çözünürlük verimine herhangi bir katkısı olmadığı saptanmıştır.

Kademeli enzim ilavesinin enzim stabilitesine etkisi incelendiğinde ise, kademeli enzim ilavesi ile enzim stabilitesinin arttırılabileceği saptanmıştır. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda; enzim stabilitesinin, enzim ilavesinin iki kademede gerçekleştirilmesi ile % 12, dört kademede gerçekleştirilmesi ile % 39 oranında arttığı bulunmuştur.

- 9) Glutene uygulanan ısı ön işlemin hidroliz reaksiyonuna etkisi incelendiğinde, hidroliz öncesi ortamda bulunan çözünmüş protein miktarının ön işlem uygulanması sonucu yükseldiği ancak ısı ön işlemin hidroliz ve çözünürlük verimine bir katkısı olmadığı bulunmuştur.

Ön işlemin enzim stabilitesine etkisi incelendiğinde, ön işlem sonrası ilk 60 dakikalık sürede, enzim aktivite değerlerinde az da olsa bir düşüş meydana geldiği saptanmıştır.

- 10) Glutene uygulanan mikrodalga ön işleminin hidroliz reaksiyonuna etkisi incelendiğinde, hidroliz öncesi ortamda bulunan çözünmüş protein miktarının ön işlem uygulanması sonucu yükseldiği ancak ön işlemin hidroliz ve çözünürlük verimini artırıcı bir etkisi olmadığı görülmüştür.

Ön işlemin enzim stabilitesine etkisi incelendiğinde, ön işlem sonrası ilk 60 dakikalık sürede, ısı ön işleme benzer şekilde enzim aktivite değerlerinde az da olsa bir düşüş meydana geldiği saptanmıştır.

- 11) Glutene uygulanan sonikasyon ön işleminin hidroliz reaksiyonuna etkisi incelendiğinde, hidroliz öncesi ortamda bulunan çözünmüş protein miktarının ön işlem uygulanması sonucu yükseldiği, sonikasyon ön işleminin hidroliz verimine ve hızına bir katkısı olmadığı ancak ön işlem uygulandığında protein çözünürlüğünün daha hızlı gerçekleştiği belirlenmiştir.

Ön işlemin enzim stabilitesine etkisi incelendiğinde, sonikasyonun enzim stabilitesini etkilemediği görülmüştür.

12) Glutene uygulanan nişasta hidrolizi ön işleminin protein hidrolizine etkisi incelendiğinde, nişasta hidrolizi ön işlemi ile protein hidroliz ve çözünürlüğünün başlangıç hızlarının arttığı, 120 dakikalık işlem sonrası hidroliz veriminin değişmediği, ancak ön işlem ile protein çözünürlüğünün daha kısa zamanda tamamlanabileceği saptanmıştır.

Ön işlemin enzim stabilitesine etkisi incelendiğinde, nişasta hidrolizi ön işlemi uygulanması ile enzim stabilitesinde belirgin bir artış meydana geldiği görülmüştür. Bu durum, enzim inaktivasyonuna neden olan nişastanın veya başka bileşenlerin amilaz enzimi ile muamele sırasında glutenden ayrılmış olabileceği varsayımları ile açıklanabilir.

13) Sonikasyon parametrelerinin; akustik güç ve frekans aralığı; hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkileri incelendiğinde, akustik gücün mısır gluteninin hidrolizi için reaksiyon hızını artırıcı bir etkisinin olmadığı, frekans değerinin artırılması ile reaksiyon hızında çok azda olsa bir artış meydana geldiği ancak bu artışın verimi fazla etkilemediği belirlenmiştir.

Sonikasyon parametrelerinin enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelendiğinde, Alcalase enziminin stabilitesinin sonikasyon uygulaması sonucunda değişmediği (artmadığı ya da azalmadığı) belirlenmiştir.

14) Gerçekleştirilen matematiksel modelleme çalışmaları ile, Bölüm 7.3’de mısır gluteninin hidroliz ve çözünürlüğü için zamana karşı elde edilen tüm deneysel veriler analiz edilmiş; ve hidroliz ile çözünürlük kinetiğinin aşağıda verilen eksponansiyel denklem (Eşitlik 7.5) ile ifade edilebileceği bulunmuştur.

$$\frac{dX}{dt} = a \cdot \exp(-b \cdot X)$$

$$X = \frac{1}{b} \times \ln(1 + a \times b \times t) \quad (7.5)$$

Eşitlikte; X terimi hidroliz dönüşümünü veya çözünürlük oranını ifade etmektedir. a ve b değerleri farklı deneyler için farklı değerlere sahip denklem sabitleridir. b katsayısının, başlangıç substrat ve başlangıç enzim konsantrasyonu ile değişmediği,

diğer bir deyişle bu parametrelerden bağımsız olduğu saptanmış ve bu değer hidroliz için 8.86, çözünürlük için 3.33 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu sonuç daha önce literatürde verilmiş olan çalışmalarla da desteklenmektedir (Moreno ve Cuadrado, 1993; Gonzalez-Tello vd., 1994; Marquez ve Vazquez, 1999). Diğer bir yandan, başlangıç substrat ve başlangıç enzim konsantrasyonu deneylerine ait veriler için hesaplanan a değerlerinin; başlangıç substrat konsantrasyonunun artması ile azaldığı (ters orantılı), başlangıç enzim konsantrasyonunun artması ile artış gösterdiği (doğru orantılı) saptanmıştır. Sıcaklık ve pH deneyleri sonucunda elde edilen veriler için hesaplanan a ve b katsayılarının ise herbir sıcaklık ve pH değerleri için farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

- 15)** Bölüm 7.3’de elde edilen veriler için; hidroliz derecesi ve çözünürlük arasındaki ilişki ayrıca incelenmiş ve gerçekleştirilen tüm deneyler için aşağıda verilen genel bağıntının (Eşitlik 7.6) kullanılabileceği bulunmuştur;

$$X_{HD} = 0.3239.X_{PC} - 0.00011 \quad (7.6)$$

Literatürde hidroliz derecesi ve çözünürlük arasındaki lineer ilişki; bezelye proteinin Trypsin ile hidrolizi için Soral-Smietana vd. (1998) tarafından, buğday ununun proteaz ile modifikasyonu için Bombara vd. (1997) tarafından da bildirilmiştir.

- 16)** Enzim inaktivasyon kinetiğini belirleyebilmek amacı ile Bölüm 7.3’de zamana karşılık elde edilen enzim aktivite verileri analiz edilmiş; substrat ve enzim başlangıç konsantrasyonu deneylerinin tümü ile, 45-55°C sıcaklık ve 6.5-7.5 pH aralığında gerçekleştirilen deneyler için elde edilen enzim inaktivasyon verilerinin Sadana ve Henley (1987) tarafından verilen birinci mertebe olmayan tek adım unimoleküler enzim inaktivasyon modeline (Eşitlik 7.7) uyduğu belirlenmiştir.

$$A = (100 - \gamma)\exp(-k_D.t) + \gamma \quad (7.7)$$

Diğer yandan, 55°C sıcaklık ve pH 7.5 değerinin üzerinde gerçekleştirilen deneyler için yapılan modelleme çalışmaları sonucunda elde edilen verilerin ikinci mertebe

inaktivasyon kinetiğine (Eşitlik 7.8) uyduğu belirlenmiştir. İnaktivasyon kinetiğindeki bu kayma, belirli bir sıcaklık ve pH değerinin üzerine çıkıldığında protein yapısında meydana gelen deformasyonlar sonucunda enzimin stabilitesini koruyamaması, dolayısı ile inaktivasyon hızında meydana gelen artış ile açıklanabilir.

$$1/A = 1/A_0 + k.t \quad (7.8)$$

- 17)** Alcalase enzimi için inaktivasyon enerjisi 40-55°C sıcaklık aralığı için, 67.86 kJ/mol olarak hesaplanmıştır. Farklı substratlar kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda, Alcalase enzimi için inaktivasyon enerjisi; Marquez ve Vazquez (1999) tarafından 25.35 kJ/mol, Adler-Nissen (1986) tarafından 270.0 kJ/mol olarak rapor edilmiştir.
- 18)** Mısır gluteninin Alcalase enzimi ile hidroliz kinetiğinin Michaelis-Menten kinetiğine uygunluğunu incelemek amacıyla, gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için başlangıç hızları hem sarf edilen baz konsantrasyonu (mmol/L) hem de çözünen protein miktarı verileri kullanılarak hesaplanmıştır. Baz sarfiyatı verileri kullanıldığında kinetik parametreler; $K_m = 53.77$ g/L, $V_{max} = 5.94$ mmol/L.dak olarak, çözünen protein konsantrasyonu verileri kullanıldığında; $K_m = 49.45$ g/L, $V_{max} = 2.32$ g/L.dak olarak hesaplanmıştır. Baz sarfiyatı verileri ve çözünen protein konsantrasyonu verileri kullanılarak elde edilen K_m değerlerinin birbirine çok yakın olması ve daha önceki bölümlerde hidroliz derecesi ile protein çözünürlüğü arasında elde edilen lineer bağıntı, kinetik verilerin hesabında baz sarfiyatı veya çözünen protein konsantrasyon verilerinden herhangi birinin kullanılabileceğini göstermektedir.
- 19)** Michaelis-Menten kinetik parametrelerinin sıcaklık ile değişimi incelendiğinde, V_{max} değerlerinin sıcaklıkla arttığı, K_m değerlerinin ise sıcaklıkla azaldığı (enzim-substrat bağlanma eğiliminin arttığı), dolayısı ile katalitik verimin sıcaklıkla arttığı saptanmıştır.
- 20)** Kinetik parametrelerin pH ile değişimi incelendiğinde, hem V_{max} hem de K_m değerlerinin pH ile arttığı, V_{max} değerlerindeki artış oranı K_m değerlerindeki artış oranından daha yüksek olduğu için katalitik verim değerlerinin de (V_{max}/K_m) pH ile artış gösterdiği belirlenmiştir.

21) Mısır gluteninin hidroliz reaksiyonunda Alcalase enzimi için ürün inhibisyon türünün belirlenebilmesi amacıyla gerçekleştirilen deneyler sonucunda, inhibisyon türünün unkompetitiv olduğu belirlenmiş ve inhibisyon sabiti baz sarfiyatı verileri kullanıldığında $K_i = \% 43.85$ (hidrolizat hacmi/reaksiyon çözeltisi hacmi) olarak, çözünen protein konsantrasyonu verileri kullanıldığında $K_i = \% 45.51$ (hidrolizat hacmi/reaksiyon çözeltisi hacmi) olarak hesaplanmıştır. Elde edilen inhibisyon sabiti (K_i) değerlerinin birbirine çok yakın olması, yine kinetik verilerin hesabında baz sarfiyatı veya çözünen protein konsantrasyon verilerinden herhangi birinin kullanılabilceğini göstermektedir.

Sonuç olarak; hidroliz işleminin verimi, kullanılan enzim ve substrat miktarına, proses şartlarına bağlı olarak değişmektedir. Gerçekleştirilen deneysel çalışmalar sonucunda, mısır gluteninin Alcalase enzimi ile hidrolizi sonucu, % hidroliz derecesi ve çözünen protein miktarını maksimize edebilmek için uygun proses şartları belirlenmiştir. Belirlenen optimum reaksiyon şartlarında; 30 g protein/L substrat konsantrasyonu, % 0.25 (hacim/hacim) enzim miktarı, 55°C sıcaklık, pH 8, 120 dakika süreyle gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu sonucunda; % 28.4 hidroliz derecesi ve % 85.3 protein çözünürlüğü elde edilmiş ve enzimin aktivitesini % 74 oranında kaybettiği saptanmıştır. Proses parametrelerinin optimizasyonun yanısıra, elde edilen deneysel verilerin modellenmesi sonucunda; hidroliz, protein çözünürlüğü ve enzim inaktivasyon kinetiklerinin incelenmesi ile, ayrıca reaksiyonun Michaelis-Menten kinetiğine dayalı olarak karakterize edilmesi ile, gluten hidroliz kinetiği için teorik ve bilimsel açıdan literatüre katkıda bulunulmuştur.

KAYNAKLAR

- Aikat, K., Bhattacharyya, B.C. (2000), "Protease Extraction in Solid State Fermentation of Wheat Bran by a Local Strain of *Rhizopus Oryzae* and Growth Studies by the Soft Gel Technique", *Process Biochemistry*, 35: 907-914.
- Achouri, A., Zhang, W., Shiyang, X. (1998), "Enzymatic Hydrolysis of Soy Protein Isolate and Effect of Succinylation on the Functional Properties of Resulting Protein Hydrolysates", *Food Research International*, 31(9): 617-623.
- Adler-Nissen, J. (1976), "Enzymatic Hydrolysis of Proteins for Increased Solubility", *J. Agric. Food Chem.*, 24: 1090-1093.
- Adler-Nissen, J. (1977), "Enzymic Hydrolysis of Food Proteins", *Process Biochemistry* (July/August): 18-23.
- Adler Nissen, J. (1978a), Hydrolysis of Soy Protein, US Patent 4,100,024.
- Adler Nissen, J. (1978b), "Enzymatic Hydrolysis of Soy Protein for Nutritional Fortification of Low pH Food", *Ann. Nutr. Alim.*, 32: 205-216.
- Adler-Niessen, J. (1979), "Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid", *Agricultural Food Chemistry*, 27: 1256-1262.
- Adler-Nissen, J. (1986), *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*, Elsevier Applied Science Publishers, London and New York.
- Adler-Nissen, J. (1993), Proteases. In *Enzymes in food processing*, Nagodawithana, T., Reed, G., Eds., Academic Press, San Diego, 159-203.
- Apar, D.K., Özbek, B. (2007), "Hydrolysis and Solubilization of Corn Gluten by Neutrase", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82: 1107–1114.
- Astolfi-Filfo, S., Galembeck, E.V., Faria, J.B., Frascino, A.C.S. (1986), "Stable yeast transformants that secrete functional α -amylase encoded by cloned mouse pancreatic cDNA", *Biotechnology*, 4: 311–315.
- Baeza, G., Correa, D., Salas, C. (1990), "Proteolytic Enzymes in *Carica Candamarcensis*", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 51(1): 1-9.
- Bailey, J.E., Ollis, D.F. (1987), *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill, New York.
- Barros, R.M., Malcata, F.X. (2004), "A Kinetic Model for Hydrolysis of Whey Proteins by Cardosin A Extracted From *Cynara Cardunculus*", *Food Chem.*, 88: 351-359.
- Birol, G. (1997), *Fermentation Characteristics of Four Genetically Engineered Saccharomyces Cerevisiae Strains*, Doktora Tezi, Boğaziçi Üniversitesi, İstanbul.
- Briones-Martinez, R., Juarez-Juarez, M., Oliver-Salvador, M.C., Cortes-Vazquez, M.L. (1997), "Influence of Enzymatic Hydrolysis on Functionality of Plant Proteins DSC studies",

Journal of Thermal Analysis, 49: 831-837.

Bisswanger, H. (2002), Enzyme Kinetics, Wiley-VCH, Weinheim.

Bombara, N., Anon, M.C., Pilosof, A.M.R. (1997), "Functional Properties of Protease Modified Wheat Flours", *Lebensm.-Wiss. u-Technol*, 30: 441-447.

Bradford, M.M. (1976), "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities Utilizing the Principle of Protein Dye Binding", *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.

Camacho, F., Gonzalez-Tello, P., Paez-Duenas, M.P.N., Guadix, E.M., Guadix, A. (2001), "Correlation of Base Consumption with the Degree of Hydrolysis in Enzymic Protein Hydrolysis", *Journal of Dairy Research*, 68: 251-265.

Chen, D.-H., Chen, H.-H., Huang, T.-C. (1995), "Deactivation Kinetics of Yeast Alcohol Dehydrogenase in Aerosol OT/Isooctane Reverse Micelles", *Journal of Chem. Eng. Japan*, 28: 551-555.

Chiang, W.-D., Tsou, M.-J., Tsai, Z.-Y., Tsai, T.-C. (2006), "Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitor Derived from Soy Protein Hydrolysate and Produced by Using Membrane Reactor", *Food Chemistry*, 98(4): 725-732.

Christians, N.E. (1991), "Preemergence Weed Control Using Corn Gluten Meal", U.S. Patent 5,030,268.

Christians, N.E., Garbutt, J.T., Liu, D. (1994), "Preemergence Weed Control Using Plant Protein Hydrolysate", U.S. Patent 5,290,749.

Clemente, A. (2000), "Enzymatic Protein Hydrolysates in Human Nutrition", *Food Science and Technology*, 11: 254-262.

Colombie, S., Gaunand, A., Lindet, B. (2001), "Lysozyme Inactivation and Aggregation in Stirred-Reactor", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11: 559-565.

Constantinides, A., Adu-Amankwa, B. (1980), "Enzymatic Modification of Vegetable Protein: Mechanism, Kinetics, and Production of Soluble and Partially Soluble Protein in a Batch Reactor", *Biotechnology and Bioengineering*, 22(8): 1543-1565.

Don, L.S.B., Pilosof, A.M.R., Bartholomai, G.B. (1991), "Enzymatic Modification of Soy Protein Concentrates by Fungal and Bacterial Proteases", *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68(2): 102-105.

Drago, S.R., Gonzalez, R.J. (2001), "Foaming Properties of Enzymatically Hydrolysed Wheat Gluten", *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1: 269-273.

Dzwolak, W., Ziajka, S. (1999), "Enzymatic Hydrolysis of Milk Proteins under Alkaline and Acidic Conditions", *Journal of Food Science*, 64 (3): 393-395.

Fadıloğlu, S., Erkmen, O., Şekeroğlu, G. (2006), "Thermal Inactivation Kinetics of Alkaline Phosphatase in Buffer and Milk", *Journal of Food Processing and Preservation*, 30: 258-268.

- Ferreira, L., Ramos, M. A., Dordick, J. S., Gil, M.H. (2003), "Influence of Different Silica Derivatives in the Immobilization and Stabilization of a *Bacillus Licheniformis* Protease (Subtilisin Carlsberg)", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21(4-6): 189-199.
- Friedman, M. (1996), "Nutritional Value of Proteins from Different Food Sources", *Agric. Food Chem.*, 44: 6-29.
- Frokjaer, S. (1994), "Use of Hydrolysates for Protein Supplementation", *Food Technology*, 48(10): 86-88.
- Giese, J. (1994), "Proteins as Ingredients: Types, Functions, Applications", *Food Technology*, 48(10): 50-60.
- Gonzalez-Tello, P., Camacho, F., Jurado, E., Paez, M.P., Guadix, E.M. (1994), "Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins: I. Kinetic Models", *Biotechnol. and Bioeng.*, 44: 523-528.
- Hardwick, J.E., Glatz, C.E. (1989), "Enzymatic Hydrolysis of Corn Gluten Meal", *J. Agric. Food Chem.*, 37: 1188-1192.
- Hemavathi, A.B., Hebbar, H.U., Raghavarao, K.S.M.S. (2007), "Reverse micellar extraction of bromelain from *Ananas comosus* L. Merrill", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82: 985-992.
- Jacobsen, C.F., Leonis, J., Linderstrom-Lang, K., Ottesen, M. (1957), "The pH-Stat and Its Use in Biochemistry", *Methods of Biochemical Analysis*, 4: 171-210.
- Jung, S., Roussel-Philippe, C., Briggs, J.L., Murphy, P.A., Johnson, L.A. (2004), "Limited Hydrolysis of Soy Proteins with Endo- and Exoproteases", *Journal of the American Oil Chemists Society*, 81(10): 953-960.
- Karamac, M., Amarowicz, R., Kostyra, H., Sijtsma, L. (1998), "Hydrolysis of Pea Protein Isolate 'Pisane' By Trypsin", *Nahrung*, 42: 219.
- Karamac, M., Amarowicz, C., Kostyra, H. (2002), "Effect of Temperature and Enzyme/Substrate Ratio on the Hydrolysis of Pea Protein Isolates by Trypsin", *Czech. J. Food Sci.*, 20 (1):1-6.
- Kim, J.M., Whang, J.H., Kim, K.M., Koh, J.H., Suh, H.J. (2004a), "Preparation of Corn Gluten Hydrolysate with Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Activity and Its Solubility and Moisture Sorption", *Process Biochem.* 39: 989-994.
- Kim, J. M., Whang, J.H., Suh, H.J. (2004b), "Enhancement of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Activity and Improvement of the Emulsifying and Foaming Properties of Corn Gluten Hydrolysate Using Ultrafiltration Membranes", *Eur. Food Res. Technol.*, 218: 133-138.
- Klomklao, S., Kishimura, H., Yabe, M., Benjakul, S. (2007), "Purification and Characterization of Two Pepsins from the Stomach of Pectoral Rattail (*Coryphaenoides Pectoralis*)", *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 147: 682-689.
- Kong, X., Zhou, H., Qian, H. (2007a), "Enzymatic Preparation and Functional Properties of

Wheat Gluten Hydrolysates”, *Food Chemistry*, 101: 615-620.

Kong, X., Zhou, H., Qian, H. (2007b), “Enzymatic Hydrolysis of Wheat Gluten by Proteases and Properties of the Resulting Hydrolysates”, *Food Chemistry*, 102: 759-763.

Kuchel, P.W., Ralston, G.B. (1988), *Theory and Problems of Biochemistry*, McGraw-Hill, New York.

Ladero, M., Ruiz, G., Pessela, B.C.C., Vian, A., Santos, A., Garcia-Ochoa, F. (2006), “Thermal and pH Inactivation of an Immobilized Thermostable Beta-Galactosidase from *Thermus Sp.* Strain T2: Comparison to the Free Enzyme”, *Biochemical Engineering Journal*, 31: 14–24.

Larkins, B. A., Lending, C.R., Wallace, J.C. (1993), “Modification of Maize-Seed-Protein Quality”, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 58: 264S-269S.

Lamsal, B.P., Reitmeier, C., Murphy, P.A., Johnson, L. A. (2006), “Enzymatic Hydrolysis of Extruded-Expelled Soy Flour and Resulting Functional Properties”, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 83(8): 731-737.

Lamsal, B.P., Jung, S., Johnson, L.A. (2007), “Rheological Properties of Soy Protein Hydrolysates Obtained from Limited Enzymatic Hydrolysis”, *LWT*, 40: 1215-1223.

Lastity, R. (1984), *The Chemistry of cereal proteins*, CRC Press, Boca Raton, Florida.

Lee, J.-Y., Lee, H.D., Lee, C.-H. (2001), “Characterization of Hydrolysates Produced by Mild Acid Treatment and Enzymatic Hydrolysis of Defatted Soybean Flour”, *Food Research International*, 34: 217-222.

Levenberg, K. (1944), “A Method for the Solution of Certain Non-Linear Problems in Least Squares”, *Quart. Appl. Math.*, 2: 164-168.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951), “Protein Measurement with Folin Phenol Reagent”, *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.

Lqari, H., Pedroche, J., Giron-Calle, J., Vioque, J., Millan, F. (2005), “Production of *Lupinus Angustifolius* Protein Hydrolysates with Improved Functional Properties”, *GRASAS Y ACEITES*, 56 (2): 135-140.

Mandal, S. ve Mandal R.K. (2000), “Seed Storage Proteins and Approaches for Improvement of Their Nutritional Quality by Genetic Engineering”, *Current Science*, 79: 576-589.

Mannheim, A., Cheryan, M. (1992), “Enzyme-Modified Proteins From Corn Gluten Meal - Preparation And Functional-Properties”, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 69(12): 1163-1169.

Marin-Zamora, M.E., Rojas-Melgarejo, F., Garcia-Canovas, F., Garcia-Ruiz, P.A. (2006), “Direct Immobilization of Tyrosinase Enzyme from Natural Mushrooms (*Agaricus Bisporus*) on D-Sorbitol Cinnamic Ester”, *Journal of Biotechnology*, 126: 295-303.

Marquez, M.C., Fernandez, V. (2002), “pH Stat Method to Evaluate the Heat Inactivation of

Subtilisin Inhibitor in Legumes”, *Chem. Biochem. Eng.*, 16(1): 31-35.

Margot, A., Flaschel, E., Renken, A. (1997), “Empirical Kinetic Models for Tryptic Whey Protein Hydrolysis”, *Process Biochem.*, 32: 217-223.

Marquardt, D. (1963), “An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters” *SIAM J. Appl. Math.*, 11: 431-441.

Marquez, M.C., Vazquez, M.A. (1999), “Modelling of Enzymatic Protein Hydrolysis”, *Process Biochem.*, 35: 111-117.

Mondal, K., Roy, I., Gupta, M.N. (2004), “Enhancement of Catalytic Efficiencies of Xylance, Pectinase and Cellulase by Microwave Pretreatment of Their Substrates”, *Biocatalysis and Biotransformation*, 22: 9-16.

Montgomery, R., Conway, T., Spector, A., Chappell, D. (1996), *Biochemistry*, Mosby-Year Book Inc., St. Louis.

Moreno, M.M.C. ve Cuadrado, F.V. (1993), “Enzymatic Hydrolysis of Vegetable Proteins: Mechanism and Kinetics”, *Process Biochem.* 28: 481-490.

Nielsen, P.M., Peterson, D., Dambmann, C. (2001), “Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis”, *Journal of Food Science*, 66: 642-646.

Nouri, L., Legrand, J., Popineau, Y., Belleville, P. (1997), “Enzymatic Hydrolysis of Wheat Proteins Part I. Enzymatic Kinetics and Study of Limited Hydrolysis in a Batch Stirred Reactor”, *Chemical Engineering Journal*, 65: 187-194.

Novozymes’ Analytical method, EB-SM-0348.02/01.

Okuyama, T., Satake, K. (1960), “On the Preparation and Properties of 2,4,6-Trinitrophenyl-Amino Acids and Peptides”, *J. Biochem.*, 47:454-466.

O’Meara, G.M., Munro, P.A. (1985), “Kinetics of the Hydrolysis of Lean Meat Protein by Alcalase: Derivation of Two Alternative Rate Equations and Their Fit to Experimental Data”, *Biotechnol. And Bioeng.*, 27: 861-869 .

Osborne, T. B. (1924), *The Vegetable Proteins*, 2nd edn, Longmans Green and Co., London.

Özbek, B., Ülgen, K. (2000), “The Stability of Enzymes After Sonication”, *Process Biochem.*, 35(9): 1037-43.

Pedersen B. (1994), “Removing Bitterness From Protein Hydrolysates”, *Food Technology*, 48(10): 96-98.

Periago, J.M., Vidal, L.M., Ros, G., Rincon, F., Martinez, C., Lopez, G., Rodrigo, J., Martinez, I. (1998), “Influence of Enzymatic Treatment on the Nutritional and Functional Properties of Pea Flour”, *Food Chem.*, 1(63): 71-78.

Popineau, Y., Huchet, B., Larre, C., 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.

Ramachandran, K., Al-Zuhair, S., Fong, C.S. vd. (2006), “Kinetic Study on Hydrolysis of Oils by Lipase with Ultrasonic Emulsification”, *Biochemical Eng. Journal*, 32(1): 19-24.

Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S, Deshpande, V.V. (1998), “Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 597-635.

Raymundo, A., Empis, J., Sousa, I. (1998), “White Lupin Protein Isolate as a Foaming Agent”, *Food Research and Technol.*, 207(2): 91-96.

Sadana, A., Henley, J. (1987), “Single-Step Unimolecular Non-1st-Order Enzyme Deactivation Kinetics”, *Biotechnology and Bioengineering*, 30(6): 717-723.

Sakakibara, M., Wang, D., Takahashi, R., Takahashi, K., Mori, S. (1996), “Influence of Ultrasound Irradiation on Hydrolysis of Sucrose Catalyzed by Invertase”, *Enzyme Microb. Technol.*, 18(1): 444-448.

Sarath, G., De La Motte, R., Wagner, F.W. (1989), *Proteolytic Enzymes, A Practical Approach, Protease Assay Methods*. In: Beynon R.J., Bond J.S., editors. Oxford, UK: IRL Press.

Satake, K., Okuyama, T., Ohashi, M., Shinoda, T. (1960), “The Spectrophotometric Determination of Amine, Amino Acid and Peptide with 2, 4, 6-Trinitrobenzene 1-Sulfonic Acid”, *J. Biochem.*, 47: 654-660.

Sathe, S.K. (2002), “Dry Bean Protein Functionality”, *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(2): 175-223.

Schmidl, M.K., Taylor, S.L., Nordlee, J.A. (1994), “Use of Hydrolysate Based Products in Special Medical Diets”, *Food Technology*, 48(10): 77-85.

Schokker, E.P., van Boekel, M.A.J.S. (1999), “Kinetics of Thermal Inactivation of the Extracellular Proteinase from *Pseudomonas fluorescens* 22F: Influence of pH, Calcium, and Protein”, *J. Agric. Food Chem.*, 47: 1681-1686.

Segel, I.H.(1993), *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems*, Wiley, New York.

Shewry, P.R., Beaudoin, F., Jenkins, J., Griffiths-Jones, S., Mills, E.N.C. (2002), “Plant Protein Families and Their Relationships to Food Allergy”, *Biochemical Society Transactions*, 30: 906-910.

Shewry, P.R., Halford, N.G. (2002), “Cereal Seed Storage Proteins: Structures, Properties and Role in Grain Utilization”, *Journal of Experimental Botany, Inorganic Nitrogen Assimilation Special Issue*, 30: 947-958.

Shukla, R., Cheryan, M. (2001), “Zein: The Industrial Protein From Corn”, *Industrial Crops and Products*, 13: 171-192.

Sijtsma, L., Tezera, D., Hustinx, J., Vereijken, J.M. (1998), "Improvement of Pea Protein Quality by Enzymatic Modification", *Nahrung*, 42: 215-216.

Soral-Smietana, M., Swigon, R., Amarowicz, R., Sijtsma, L. (1998), "Solubility of Trypsin Pea Protein Hydrolysates", *Nahrung*, 42: 217-218.

Soral-Smietana, M., Amarowicz, R., Swigon, A., Sijtsma, L. (1999), "Comparison of Solubility of Pea Protein Hydrolysate by Three Analytical Methods", *International Journal of Food Science and Nutrition*, 50: 407-411.

Sousa, R., Lopes, G.P., Tardioli, P.W., Giordano, R.L.C., Almeida, P.I.F., Giordano, R.C. (2004), "Kinetic Model for Whey Protein Hydrolysis by Alcalase Multipoint-Immobilized on Agrose Gel Particles", *Brazilian J. of Chem. Eng.*, 2: 147-153.

Steinhardt, J., Beychok, S. (1964), Interactions of Proteins with Hydrogen Ions and Other Small Ions and Molecules. In the Proteins. Vol. II. H. Neurath (Ed.), Academic Press, New York.

Suh, H.J., Whang, J.H., Kim, Y.S., Bae, S.H., Noh, D.O. (2003), "Preparation of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitor From Corn Gluten", *Process Biochem.*, 38: 1239-1244.

Suh, H.J., Bae, S.H., Noh, D.O. (2000), "Debitting of Corn Gluten Hydrolysate with Active Carbon", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 614-618.

Surowka, K., Zmudzinski, D. (2004), "Functional Properties Modification of Extruded Soy Protein Concentrate Using Neutrase", *Czech Journal of Food Sciences*, 22(5):163-174.

Şener, N., Apar, D.K., Özbek, B. (2006), "A Modelling Study on Milk Lactose Hydrolysis and Beta-Galactosidase Stability under Sonication", *Process Biochemistry*, 41(7): 1493-1500.

Tardioli, P.W., Sousa, R., Giordano, R.C., Giordano, R.L.C. (2005), "Kinetic Model of Hydrolysis of Polypeptides Catalyzed by Alcalase Immobilized on 10 % Glyoxyl-agarose", *Enzyme and Microbial Technol.*, 36: 555-564.

Telefoncu, A. (Editör) (1997), *Enzimoloji: Uslan, H.A., Enzim Kinetiği*, Ege Üniversitesi yayınları, İzmir.

Thompson, C.I., Rausch, K.D., Belyea, R.L., Tumbleson, M.E. (2006), "Microfiltration of Gluten Processing Streams from Corn Wet Milling", *Bioresource Technology*, 97: 348-354.

Tomarelli, R., Charney, M., Harding, M. (1949), "The Use of Azoalbumin as a Substrate in the Colorimetric Determination of Peptic and Tryptic Activity", *Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 34: 428-433.

Wang, J.-S., Zhao M.-M., Zhao Q.-Z., Bao Y., Jiang Y.-M. (2007), "Characterization of Hydrolysates Derived from Enzymatic Hydrolysis of Wheat Gluten", *Journal of Food Science*, 72(2): 103-107.

Wang, J.-S., Zhao, M.-M., Zhao, Q.-Z., Jiang, Y.-M. (2007b), "Antioxidant Properties of Papain Hydrolysates of Wheat Gluten in Different Oxidation Systems", *Food Chemistry*, 101: 1658-1663.

Wang, J., Zhao, M., Yang, X., Jiang, Y. (2006), "Improvement on Functional Properties of Wheat Gluten by Enzymatic Hydrolysis and Ultrafiltration", *Journal of Cereal Science*, 44: 93-100.

Wu, W.U., Hettiarachchy, N.S., Qi, M. (1998), "Hydrophobicity, Solubility and Emulsifying Properties of Soy Protein Peptides Prepared by Papain Modification and Ultrafiltration", *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75(7): 845-850.

Van der Ven, C. (2002), "Biochemical and Functional Characterisation of Casein and Whey Protein Hydrolysates", Ph.D. thesis, Wageningen University, The Netherlands.

Vulfson, E.N., Sarney, B.D., Law, B.A. (1991), "Enhancement of Subtilisin Catalysed Interesterification in Organic Solvents by Ultrasonic Irradiation", *Enzyme Microb. Technol.*, 13: 123-126.

Zheng, X.-Q., Li, L.-T., Liu, X.-L., Wang, X.-J., Lin, J., Li, D. (2006), "Production of Hydrolysate with Antioxidative Activity by Enzymatic Hydrolysis of Extruded Corn Gluten", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73: 763-770.

Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Zang, X., Li, H., Gao, M. (2006), "The Effect of Microwave Irradiation on Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw", *Bioresource Technology*, 97: 1964-1968.

İNTERNET KAYNAKLARI

[1] www.gidasanayii.com

[2] www.oznet.ksu.edu "Publications from Kansas State University: Corn Gluten Feed, Composition and Feeding Value for Beef and Dairy Cattle, Kansas State University, February 2001

[3] www.ag.ndsu.edu/pubs "Corn Gluten Feed Composition, Storage, Handling, Feeding and Value. NDSU Extension Service, North Dakota State University of Agriculture and Applied Science

[4] [www.royalcanin.us/articles/advantages of corngluten.htm](http://www.royalcanin.us/articles/advantages_of_corngluten.htm)

[5] www.healthycommunitiesproject.org/cgm.shtm

[6] www.hort.iastate.edu/gluten

[7] www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/568denaturation.html

EKLER**Ek 1 Hidroliz Derecesinin Hesaplanması**

Bölüm 7.3.1’de 20 g protein/L substrat konsantrasyonu için, 200 mL çözelti hacminde, 50°C sıcaklık ve pH 7 değerinde gerçekleştirilen iki deney için, pH-stat yöntemi ile ototitrasyon sonucunda kaydedilen ortalama baz sarfiyatı değerleri Çizelge Ek 1.1’de verilmiştir. Ototitrasyon için 0.5 N KOH çözeltisi kullanılmış ve çözeltinin yoğunluğu 1 g/mL olarak alınmıştır. Hidroliz derecesinin hesaplanması aşağıda ayrıntılı şekilde açıklanmış ve hesaplanan değerler aynı çizelgede gösterilmiştir.

Çizelge Ek 1.1 Baz sarfiyatı verilerinden hesaplanan hidroliz derecesi değerleri

Zaman (dak.)	Baz Sarfiyatı (g)	Baz Sarfiyatı (mL)	Hidroliz Derecesi (X_{HD})
0	0.000	0.000	0.000
1	0.448	0.448	0.005
2	0.770	0.770	0.009
4	1.512	1.512	0.017
6	2.306	2.306	0.026
8	2.997	2.997	0.034
10	3.490	3.490	0.039
15	4.924	4.924	0.056
20	6.424	6.424	0.073
25	7.953	7.953	0.090
30	8.829	8.829	0.100
35	10.137	10.137	0.115
40	11.694	11.694	0.132
45	11.823	11.823	0.134
50	12.887	12.887	0.146
55	13.998	13.998	0.158
60	14.800	14.800	0.167
70	16.265	16.265	0.184
80	17.669	17.669	0.200
90	19.034	19.034	0.215
100	19.046	19.046	0.215
110	20.530	20.530	0.232
120	20.541	20.541	0.232

Hidroliz derecelerinin hesaplanmasında, Bölüm 6.4.2’de verilen aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır;

$$HD = B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{P_M} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100$$

B : Baz miktarı (mL); Çizelge Ek 1.1’de 3. sütun değerleridir.

N_b : Baz normalitesi; 0.5 N (= 0.5 mmol/mL)

α : α-NH gruplarının ortalama ayrılma sabiti

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}}}$$

Deneyin gerçekleştirildiği sıcaklık için pK değeri 6.59 (Bölüm 7.2 pH-stat kalibrasyonu sonucu elde edilmiştir) ile deneyin gerçekleştirildiği pH değeri 7, yukardaki eşitlikte yerine konulduğunda;

$\alpha = 1.27$ olarak elde edilir.

P_M : Protein miktarı; deneyde kullanılan protein miktarı 20 g/L dir. Deney 200 mL hacimde gerçekleştirildiği için bu değer 4 g olarak alınır.

h_{top.} : Toplam peptid bağları, mısır gluteni için 8.7 mmol/g protein olarak alınmıştır. (Bu değer, Bölüm 6’da; Çizelge 6.2’de glutenin içerdiği amino asitlerin mmol değerleri toplanarak elde edilmiştir).

Tüm bu veriler kullanılarak, örnek olarak 4. dakika için hidroliz derecesi hesaplanırsa;

$$HD = 1.51 \times 0.5 \times \frac{1}{1.27} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{8.7} \times 100$$

$HD = \% 1.7$ veya $X_{HD} = 0.017$ olarak elde edilir.

Ek 2 TNBS ve OPA Analizleri İle Serbest Hale Geçen Amino Asit Grup Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Bölüm 7.2’de pH-stat yönteminin kalibrasyonu için gerçekleştirilen deneyler sonucunda, baz sarfiyatı verilerine karşı hidroliz reaksiyonu sonucunda serbest hale geçen amino asit grup konsantrasyonlarının, lösin amino eşdeğeri ve serin amino eşdeğeri olarak hesaplanmasını örneklendirmek amacı ile, 30 g protein/L substrat konsantrasyonunda, 50°C’de, pH 7 değerinde, 100 ml’lik çözelti hacminde, % 0.15 (hacim/hacim) enzim ilavesi ile gerçekleştirilen iki deney sonucunda kaydedilen ortalama baz sarfiyatı ve TNBS ile OPA analizleri sonucunda elde edilen ortalama absorbans değerleri Çizelge Ek 2.1’de verilmiştir. TNBS analizleri örneklerin % 1’lik SDS ile 25 kat seyreltilmesi ile Bölüm 6.5.2 de anlatıldığı şekilde, OPA analizleri örneklerin saf su ile 45 kat seyreltilmesi ile Bölüm 6.6.2’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde hesaplamalar ayrıntılı bir biçimde açıklanmış ve elde edilen sonuçlar aynı çizelgede sunulmuştur.

Çizelge Ek 2.1 Örnek deney için, ortalama baz sarfiyatı verileri, TNBS ve OPA analizleri sonucunda elde edilen ortalama absorbans değerleri, hesaplanan baz sarfiyatı, lösin amino ve serin amino eşdeğerleri

Zaman (dak)	B.Sarfiyatı (g)	Absorbans (TNBS)	Absorbans (OPA)	B.Sarfiyatı (meqv/g)	Lösin-NH ₂ (meqv/g)	Serin-NH ₂ (meqv/g)
2	0.367	0.063	0.215	0.061	0.176	0.357
5	0.712	0.118	0.244	0.119	0.331	0.405
10	1.335	0.160	0.294	0.222	0.448	0.488
15	1.850	0.189	0.353	0.308	0.530	0.586
20	2.356	0.219	0.398	0.393	0.614	0.661
25	2.712	0.248	0.469	0.452	0.694	0.779
30	3.117	0.296	0.542	0.519	0.829	0.899
40	3.799	0.320	0.616	0.633	0.896	1.022
50	4.506	0.362	0.712	0.751	1.014	1.182
60	5.105	0.437	0.821	0.851	1.224	1.362

Baz sarfiyatı eşdeğerlerinin hesaplanması;

pH-stat yöntemi ile ototitrasyon sırasında 0.5 N KOH çözeltisi kullanılmıştır. Baz çözeltisinin yoğunluğu 1 g/mL alınarak 5. dakika için g protein başına baz sarfiyatı mol eşdeğerleri hesaplanırsa;

$$(0.712 \text{ g} \times 1 \text{ g/mL} \times 0.5 \text{ mmol/mL}) / 3 \text{ g protein} = 0.119 \text{ mmol/g protein} (= 0.119 \text{ meqv/g})$$

değeri elde edilir.

Lösin amino eşdeğeri, lösin-NH₂ (meqv/g protein) Bölüm 6.5.3'de verilen aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{lösin-NH}_2(\text{meqv/g}) = \frac{(Abs_{\text{örnek}})}{(Abs_{\text{standart}})} \times C_{\text{standart}} \times SF \times \frac{1}{P_M}$$

$Abs_{\text{örnek}}$: Çizelge Ek 2.1'de, 3. sütun değerleri

Abs_{standart} : Örnek deneyler için standartın ortalama absorban değeri, 0.446

C_{standart} : Standart olarak kullanılan lösin konsantrasyonu, 1.5 meqv/L

SF : Seyrelme faktörü, örnek deney için= 25

P_M : Çözeltideki toplam protein miktarı, 30 g/L

Tüm bu veriler kullanılarak, örnek olarak 5. dakika için lösin amino eşdeğeri hesaplanırsa,

$$\text{lösin-NH}_2(\text{meqv/g}) = \frac{(0.118)}{(0.446)} \times 1.5 \times 25 \times \frac{1}{30}$$

$$l\ddot{o} \text{ sin} - NH_2 (meqv / g) = 0.331 meqv / g$$

değeri elde edilir.

Serin amino eşdeğeri, serin-NH₂ (meqv/g protein), Bۆlüm 6.6.3'de verilen aşağıdaki formöl kullanılarak hesaplanmıştır.

$$serin - NH_2 (meqv / g) = \frac{(Abs_{\ddot{ö}rnek})}{(Abs_{standart})} \times C_{standart} \times SF \times \frac{1}{P_M}$$

Abs_{örnek} : Çizelge Ek 2.1'de, 4. sütun değerleri

Abs_{standart} : Örneklemler için standartın ortalama absorban değeri, 0.860

C_{standart} : Standart olarak kullanılan serin konsantrasyonu, 0.9516 meqv/L

SF : Seyrelme faktörü, örnekleme için= 45

P_M : Çözeltideki toplam protein miktarı, 30 g/L

Tüm bu veriler kullanılarak, örnekleme için 5. dakika için serin amino eşdeğeri hesaplanırsa,

$$serin - NH_2 (meqv / g) = \frac{(0.244)}{(0.860)} \times 0.9516 \times 45 \times \frac{1}{30}$$

$$serin - NH_2 (meqv / g) = 0.405 meqv / g$$

değeri elde edilir.

Ek 3 Protein Çözünürlük Derecesinin Hesaplanması

Bölüm 7.3.1'de 20 g protein/L substrat konsantrasyonu için, 200 mL çözelti hacminde, 50°C sıcaklık ve pH 7 değerinde gerçekleştirilen iki deney için, reaksiyon çözeltisinden belirli zaman aralıklarında alınan örnekler, enzim inaktive edildikten ve santrifüjlendikten sonra fosfat tampon çözeltisi ile 36 kat seyreltilmiş ve protein analizleri Bölüm 6.7.2'de anlatılan Folin Lowry yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda elde edilen ortalama absorbans değerleri Çizelge Ek 3.1'de verilmiştir. Protein çözünürlük derecesinin hesaplanması aşağıda ayrıntılı şekilde açıklanmış ve hesaplanan değerler aynı çizelgede gösterilmiştir.

Çizelge Ek 3.1 Örnek deney için Folin Lowry yöntemi analizi sonucunda elde edilen veriler kullanılarak hesaplanan protein çözünürlük derecesi değerleri

Zaman (dak)	Absorbans Değeri	Çözünen Protein Miktarı (g/L)	P. Çözünürlüğü (X _{PC})
0	0.125	1.244	0.000
2	0.165	1.890	0.035
5	0.210	2.622	0.074
10	0.290	3.911	0.142
15	0.379	5.366	0.220
20	0.428	6.161	0.262
30	0.549	8.118	0.367
40	0.634	9.495	0.440
50	0.721	10.907	0.515
60	0.782	11.891	0.568
70	0.766	11.634	0.554
80	0.857	13.105	0.632
90	0.864	13.218	0.639
100	0.878	13.453	0.651
110	0.890	13.640	0.661
120	0.902	13.828	0.671

Protein çözünürlük derecelerinin hesaplanmasında ilk olarak, Bölüm 6.7.3’de tanımlanan aşağıdaki denklem kullanılarak absorbans değerleri çözünen protein miktarlarına dönüştürülmüştür.

$$C(g/L) = [0.4501 \times (\text{Absorbans değeri}) - 0.0217] \times SF$$

SF : seyrelme faktörü

Protein miktarı yukarıdaki denklemden hesaplandıktan sonra, çözünürlük derecesi, yine Bölüm 6.7.3’de tanımlanan aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$X_{PÇ} = \frac{C_t - C_0}{C_{\text{Toplam}} - C_0}$$

Örnek olarak yukarıdaki eşitlikler kullanılarak, 5. dakika için çözünürlük derecesi hesaplanırsa;

$$C_0 (g/L) = [0.4501 \times (0.125) - 0.0217] \times 36$$

$$C_0 (g/L) = 1.244 \text{ g/L}$$

$$C_5 (g/L) = [0.4501 \times (0.210) - 0.0217] \times 36$$

$$C_5 (g/L) = 2.622 \text{ g/L}$$

$$X_{PÇ} = \frac{2.622 - 1.244}{20 - 1.244}$$

$$X_{PÇ} = 0.074$$

olarak elde edilir.

Ek 4 % Enzim Aktivite Değerlerinin Hesaplanması

Bölüm 7.3.1’de 20 g protein/L substrat konsantrasyonu için, 200 mL çözelti hacminde, 50°C sıcaklık ve pH 7 değerinde gerçekleştirilen iki deney için, zamana karşı alınan örnekler fosfat tampon çözeltisi ile 5 kat seyreltildikten sonra, enzimin aktivite tayini Bölüm 6.8.2’de anlatılan enzim aktivite tayini yöntemine göre gerçekleştirilmiş ve analizler sonucunda elde edilen ortalama absorbans değerleri ve bu değerler kullanılarak, örnek olarak hesaplanan % aktivite değerleri Çizelge Ek 4.1’de sunulmuştur.

Çizelge Ek 4.1 Örnek deney için enzim aktivite tayini sonucunda hesaplanan % aktivite değerleri

Zaman (dak.)	Absorbans Değeri	% Aktivite
0	0.564	100
2	0.420	75.25
5	0.337	61.12
10	0.264	48.41
20	0.277	50.66
30	0.279	51.02
40	0.285	51.99
60	0.300	54.53
80	0.303	55.05
100	0.306	55.69
120	0.320	58.03

% Aktivite değerlerinin hesaplanmasında ilk olarak, Bölüm 6.8.3’de tanımlanan aşağıdaki denklem kullanılarak absorbans değerleri enzim aktivite değerlerine dönüştürülmüştür.

$$a (AU/L) = [2.3443 x (Absorbans değeri) + 0.0407] x SF$$

SF : seyrelme faktörü

Enzim aktivite değerleri yukarıdaki denklemden hesaplandıktan sonra, % aktivite değerleri yine Bölüm 6.8.3’de tanımlanan aşığıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$A = 100 \times \frac{a_t}{a_0}$$

Örnek olarak 5. dakika için % aktivite değeri açık bir şekilde hesaplanırsa;

$$a_0 = [2.3443 \times (0.564) + 0.0407] \times 5$$

$$a_0 = 6.814 \text{ AU/L}$$

$$a_5 = [2.3443 \times (0.338) + 0.0407] \times 5$$

$$a_5 = 4.165 \text{ AU/L}$$

$$A = 100 \times \frac{4.165}{6.814}$$

$$A = \% 61.12$$

değeri elde edilir.

Ek 5 Nişasta Hidroliz Deneyi

Nişasta hidrolizi ön işlemi için kontrol amaçlı olarak gerçekleştirilen deneyde, 20 g/L mısır nişastası (Calbiochem firmasından temin edilmiştir) içeren 200 mL hacimdeki çözelti, 65°C sıcaklıkta pH 6.5 değerinde, % 0.6 (hacim/hacim) *Bacillus Licheniformis* kaynaklı alfa-amilaz enzimi (Sigma firmasından temin edilmiştir) ilavesi ile 30 dakika süreyle hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Reaksiyon süresince, belirli zamanlarda çözülden örnekler alınarak ortamda kalan nişasta miktarı aşağıda açıklanan yöntemle göre belirlenerek hidroliz derecesi hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil Ek 5.1’de grafiksel olarak sunulmuştur.

Nişasta konsantrasyonu tayini

Ortamda kalan nişasta miktarının tayini için, reaktörden alınan 0.5 mL’lik reaksiyon çözeltisi örneklerine NaOH ilavesi ile reaksiyon durdurulmuş ve enzimin inaktive edilmesi için örnekler 100°C sıcaklıkta 5 dakika kaynatılmıştır. Daha sonra bu örnekler üzerine 5 mL iyot çözeltisi (% 15 I₂ ve % 0.5 KI) ilave edilmiş ve son hacim saf su ilavesi ile 15 mL’ye tamamlanmıştır. Çözeltideki nişasta konsantrasyonu tayini için kullanılan bu son karışımın absorban değeri, 550 nm dalga boyundaki spektrofotometrede referans çözeltisi olarak 10 mL saf su ve 5 mL iyot çözeltisi kullanılarak okunmuştur (Astolfi-Filho vd., 1986; Birol, 1997).

Hidroliz derecesinin hesaplanması

Nişasta için hidroliz derecesi aşağıdaki bağıntı kullanılarak hesaplanmıştır;

$$[N]_t = \frac{abs_{n0}}{abs_{nt}} x [N]_0$$

$$H_N = \frac{[N]_0 - [N]_t}{[N]_0} x 100$$

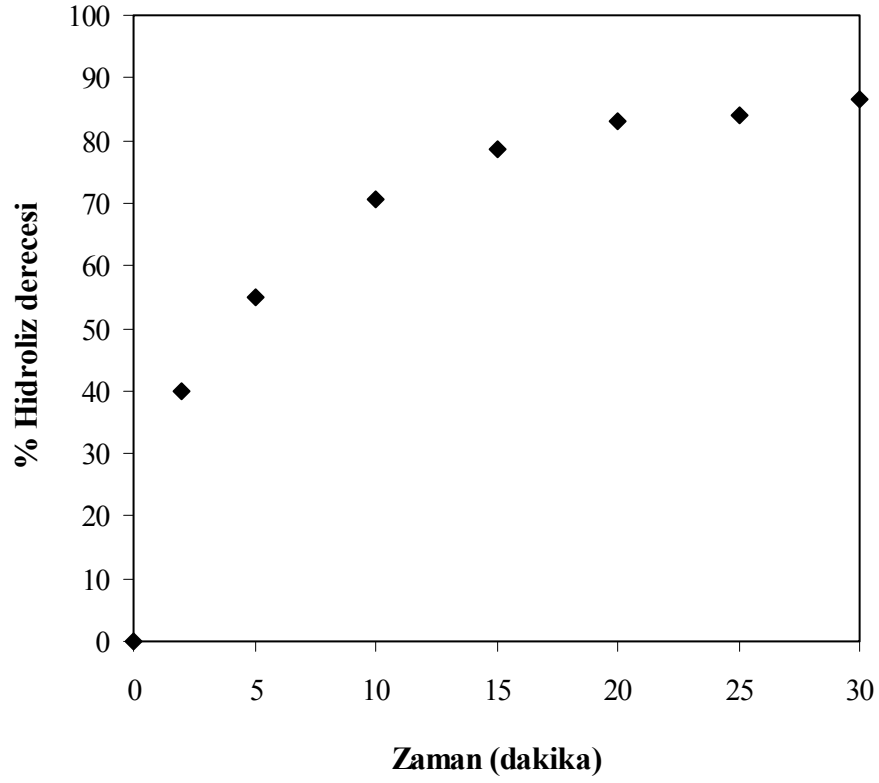
abs_{n0} : t= 0 anındaki örnek için elde edilen absorban değeri

abs_{nt} : herhangi bir zamanda alınan örnek için elde edilen absorban değeri

$[N]_0$: t= 0 anındaki nişasta konsantrasyonu, g/L

$[N]_t$: herhangi bir zamanda ortamda kalan nişasta konsantrasyonu, g/L

H_N : herhangi bir zamandaki % hidroliz derecesi



Şekil Ek 5.1 Nişasta hidrolizi deneyi için zamana karşı elde edilen % hidroliz derecesi değerleri

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi 16.12.1976

Doğum yeri Almanya

Lise 1991-1994 Pendik Lisesi

Lisans Hazırlık 1994-1995 Ege Üniversitesi, Yabancı Diller Bölümü
(İngilizce)

Lisans 1995-1999 Ege Üniversitesi Mühendislik Fak.
Kimya Mühendisliği Bölümü

Yüksek Lisans 2000-2002 Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Müh. Anabilim Dalı

Doktora 2002-2008 Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Müh. Anabilim Dalı

Çalıştığı kurum(lar)

2000-Devam ediyor YTÜ Kimya-Metalurji Fak. Araştırma Görevlisi