

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SUSAM KÜSPESİNDEKİ PROTEİNİN ENZİMATİK HİDROLİZİNİN,
ÇÖZÜNÜRLÜĞÜNÜN, ENZİM İNAKTİVASYON KİNETİĞİNİN VE
FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

ELÇİN DEMİRHAN YILMAZ

**DOKTORA TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. BELMA KIN ÖZBEK**

İSTANBUL, 2012

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SUSAM KÜSPESİNDEKİ PROTEİNİN ENZİMATİK HİDROLİZİNİN,
ÇÖZÜNÜRLÜĞÜNÜN, ENZİM İNAKTİVASYON KİNETİĞİNİN VE
FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Elçin DEMİRHAN YILMAZ tarafından hazırlanan tez çalışması 22.02.2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Belma KIN ÖZBEK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Belma KIN ÖZBEK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Kutlu ÜLGEN
Boğaziçi Üniversitesi

Prof. Dr. İnci ARISAN
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Ülker BEKER
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Dilek KAZAN
Marmara Üniversitesi

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 29-07-01-01 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam sırasında kıymetli fikir ve önerileri ile beni yönlendiren, yardım eden ve her aşamada beni destekleyen, çalışmalarımın yönlendirilmesi ve sonuçlandırılmasında büyük emeği geçen, yanında çalışmaktan onur duyduğum Tez Danışmanım Sayın Prof. Dr. Belma KIN ÖZBEK'e,

Lisans ve Lisansüstü eğitimimi yaptığım Kimya Mühendisliği Bölümümüzün tüm saygıdeğer Öğretim Üyelerine,

Doktora eğitimim sırasında beni maddi açıdan destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu TÜBİTAK'a,

Yürek dolusu sevgisi ve sıcak gülüşü ile hayatımızı aydınlatan şu an aramızda olmayan biricik anneanneme,

Hayatımın her aşamasında sevgisini, şefkatini, ilgisini ve desteğini esirgemedi, her anında yanımda olan aileme, eşime ve tüm sevdiklerime,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Şubat, 2012

Elçin DEMİRHAN YILMAZ

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|-------|
| SİMGE LİSTESİ..... | ix |
| KISALTIMA LİSTESİ..... | x |
| ŞEKİL LİSTESİ..... | xi |
| ÇİZELGE LİSTESİ | xviii |
| ÖZET | xxi |
| ABSTRACT..... | xxiii |
| BÖLÜM 1 | 1 |
| GİRİŞ | 1 |
| 1.1 Literatür Özeti..... | 1 |
| 1.2 Tezin Amacı..... | 3 |
| 1.3 Orijinal Katkı | 4 |
| BÖLÜM 2 | 5 |
| PROTEİN HİDROLİZİ | 5 |
| BÖLÜM 3 | 7 |
| BİTKİSEL PROTEİN KAYNAKLARI | 7 |
| 3.1 Susam ve Susam Küspesi | 9 |
| BÖLÜM 4 | 12 |
| PROTEİNLERİN FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİ..... | 12 |
| 4.1 Su ve Yağ Tutma Kapasitesi | 13 |
| 4.2 Köpük Oluşturma | 14 |
| 4.3 Emülsiyon özellikleri | 15 |
| BÖLÜM 5 | 16 |
| PROTEOLİTİK ENZİMLER | 16 |
| 5.1 Proteolitik Enzimlerin Kaynaklarına göre Sınıflandırılması..... | 16 |

| | | |
|--|---|----|
| 5.1.1 | Bitkisel proteazlar | 16 |
| 5.1.2 | Hayvansal proteazlar | 17 |
| 5.1.3 | Mikrobiyal proteazlar | 18 |
| 5.2 | Proteolitik Enzimlerin Etki Mekanizmasına göre Sınıflandırılması | 18 |
| 5.2.1 | Exo-peptidazlar | 18 |
| 5.2.2 | Endo-peptidazlar | 19 |
| 5.3 | Proteolitik Enzimlerin Kullanım Alanları | 20 |
| BÖLÜM 6 | | 22 |
| LİTERATÜRDE SUSAM PROTEİNİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR | | 22 |
| BÖLÜM 7 | | 28 |
| MATERİYAL VE YÖNTEM | | 28 |
| 7.1 | Kullanılan Cihazlar | 28 |
| 7.2 | Kimyasal Maddeler | 31 |
| 7.3 | Protein Hidroliz Deneyleri | 32 |
| 7.4 | pH-Stat Metodu ile Hidroliz Derecesinin Belirlenmesi | 33 |
| 7.4.1 | Materyaller | 34 |
| 7.4.2 | Hidroliz derecesinin hesaplanması | 34 |
| 7.5 | TNBS Yöntemi ile Serbest Amino Asit Gruplarının Belirlenmesi | 34 |
| 7.5.1 | Materyaller | 35 |
| 7.5.2 | Yöntem | 36 |
| 7.5.3 | Hesaplamalar | 36 |
| 7.6 | OPA Yöntemi ile Serbest Amino Asit Gruplarının Belirlenmesi | 37 |
| 7.6.1 | Materyaller | 37 |
| 7.6.2 | Yöntem | 37 |
| 7.6.3 | Hesaplamalar | 38 |
| 7.7 | Folin Lowry Yöntemi ile Çözünen Protein Miktarının Belirlenmesi | 38 |
| 7.7.1 | Materyaller | 39 |
| 7.7.2 | Yöntem | 39 |
| 7.7.3 | Hesaplamalar | 40 |
| 7.8 | Enzim Aktivite Tayini | 42 |
| 7.8.1 | Materyaller | 43 |
| 7.8.2 | Yöntem | 43 |
| 7.8.3 | Hesaplamalar | 44 |
| 7.9 | Susam Küspesi Protein Hidrolizatının Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi .. | 46 |
| 7.9.1 | Su Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi | 46 |
| 7.9.2 | Yağ Tutma Kapasitesi Belirlenmesi | 46 |
| 7.9.3 | Köpük Kapasitesi ve Stabilitésinin Belirlenmesi | 46 |
| 7.9.4 | Emülsiyon Aktivite İndeksi (EAI) ve Emülsiyon Stabilité İndeksinin (ESI) Belirlenmesi | 47 |
| 7.10 | Amino Asit Kompozisyon Analizi | 48 |
| 7.11 | Teorik çalışma | 48 |
| BÖLÜM 8 | | 49 |
| ARAŞTIRMA BULGULARI | | 49 |
| 8.1 | Hidroliz Reaksiyonu İçin Uygun Enzimin Seçimi | 49 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 8.2 | pH-Stat Kalibrasyonu | 50 |
| 8.3 | Kesikli Sistemde Proses Parametrelerinin Optimizasyonu | 60 |
| 8.3.1 | Susam küspesi konsantrasyonunun hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi | 60 |
| 8.3.2 | Enzim konsantrasyonunun hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi | 67 |
| 8.3.3 | pH'ın hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi | 73 |
| 8.3.4 | Sıcaklığın hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi | 78 |
| 8.3.5 | Optimum proses şartlarında susam küspesi proteini ve susam proteini hidrolizinin karşılaştırılması | 84 |
| 8.3.6 | Optimum proses şartlarında elde edilen susam küspesi proteini hidrolizatının amino asit kompozisyonunun incelenmesi | 87 |
| 8.3.7 | Literatürde varolan verilerle bu çalışmada elde edilen verilerin karşılaştırılması | 88 |
| 8.4 | Hidroliz Ürün Konsantrasyonunun Hidroliz Reaksiyonu Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi | 90 |
| 8.5 | Kademeli Enzim İlavesinin Hidroliz Reaksiyonu Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi | 94 |
| 8.6 | Susam Küspesine Uygulanan Ön İşlemlerin Hidroliz Reaksiyonu Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi | 97 |
| 8.6.1 | Isıl ön işlemin hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi | 97 |
| 8.6.2 | Mikrodalga ön işleminin hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi | 101 |
| 8.6.3 | Sonikasyon ön işleminin hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi | 105 |
| 8.6.4 | Susam küspesine uygulanan ön işlemlerin hidrolizat amino asit kompozisyonuna etkilerinin incelenmesi | 108 |
| 8.7 | Sonikasyon Parametrelerinin Hidroliz Reaksiyonu Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi | 110 |
| 8.8 | Susam Küspesi Proteini için Hidroliz, Çözünürlük ve Enzim İnaktivasyon Kinetiğinin İncelenmesi | 116 |
| 8.8.1 | Elde Edilen Kinetik Verilerin Modellenmesi | 116 |
| 8.8.1.1 | Hidroliz ve çözünürlük verilerinin modellenmesi | 116 |
| 8.8.1.2 | Enzim inaktivasyon verilerinin modellenmesi | 117 |
| 8.8.2 | Michaelis-Menten kinetiği | 122 |
| 8.8.2.1 | Susam küspesi proteininin enzimatik hidrolizinin Michaelis-Menten kinetiğine uygunluğunun incelenmesi | 126 |
| 8.8.2.2 | Sıcaklık ve pH'ın Michaelis-Menten kinetik parametrelerine etkisinin incelenmesi | 129 |
| 8.8.2.3 | Alcalase enzimi için ürün inhibisyon türünün belirlenmesi | 138 |
| 8.9 | Susam Küspesi Protein Hidrolizatlarının Fonksiyonel Özelliklerinin İncelenmesi | 146 |
| 8.9.1.1 | Su Tutma Kapasitesi | 146 |
| 8.9.1.2 | Yağ Tutma Kapasitesi | 148 |
| 8.9.1.3 | Köpük Kapasitesi ve Stabilitesi | 148 |
| 8.9.1.4 | Emülsiyon Aktivite İndeksi ve Emülsiyon Stabilite İndeksi | 150 |
| 8.9.2 | Fonksiyonel özelliklerin literatürde varolan verilerle karşılaştırılması | 151 |
| BÖLÜM 9 | | 153 |

| | |
|----------------------------|-----|
| SONUÇLAR ve ÖNERİLER | 153 |
| KAYNAKLAR | 163 |
| ÖZGEÇMİŞ | 174 |

SİMGE LİSTESİ

| | |
|---|--|
| A | % Enzim aktivitesi |
| a, b | Denklemler sabitleri |
| B | Baz sarfiyatı, mL, meqv/g protein |
| E | Enzim |
| E ₀ | Başlangıç enzim miktarı, % (hacim/hacim) |
| e | Eğim |
| E _D | İnaktivasyon enerjisi, kJ/mol |
| HD | % Hidroliz derecesi |
| h _{top} | Toplam peptit bağ sayısı, meqv/g protein |
| ΔH | α-amino asit 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/hacim) |
| k ₁ , k ₋₁ , k ₂ | Reaksiyon hız sabitleri, dak ⁻¹ |
| k, k _D | İnaktivasyon sabitleri, dak ⁻¹ |
| P | Ürün |
| P _M | Protein miktarı, g |
| PÇ | % Protein çözünürlüğü |
| R | Gaz sabiti, kJ/kmol.K |
| S | Substrat konsantrasyonu, g/L |
| S ₀ | Başlangıç substrat konsantrasyonu, g/L |
| T | Sıcaklık, °C |
| t | Zaman, dak |
| X _{HD} | Hidroliz derecesi |
| X _{PÇ} | Protein Çözünürlük derecesi (%) |
| θ | Reaksiyon hızı |
| V _{max} | Maksimum hız, meqv/L.dak |
| V _{max} ^{göz} | Maksimum hızın gözlemsel değeri, meqv/L.dak |
| V ₀ | Başlangıç hızı, meqv/L.dak |
| α | α-NH gruplarının ortalama ayrılma sabiti |
| γ | Denklemler sabiti |
| σ | Standart sapma |

KISALTMA LİSTESİ

| | |
|-----|-----------------------------|
| Abs | Absorbans değeri |
| ES | Enzim-Substrat kompleksi |
| EP | Enzim-Ürün kompleksi |
| SF | Seyrelme faktörü |
| W | Watt |
| EAI | Emülsiyon Aktivite İndeksi |
| ESI | Emülsiyon Stabilite İndeksi |

ŞEKİL LİSTESİ

| | Sayfa |
|---|-------|
| Şekil 2.1 Protein hidrolizi [48] | 5 |
| Şekil 2.2 Proteaz enzimi tarafından katalizlenen hidroliz reaksiyonu [8] | 6 |
| Şekil 3.1 Susam küspesi üretimi | 11 |
| Şekil 7.1 Protein hidrolizi deney düzeneği | 33 |
| Şekil 7.2 TNBS'nin amino asit grupları ile reaksiyonu [91]..... | 35 |
| Şekil 7.3 OPA reaksiyonu [92] | 37 |
| Şekil 7.4 Folin Lowry yöntemi için standart eğri | 42 |
| Şekil 7.5 Aktivite tayini için standart eğri | 45 |
| Şekil 8.1 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, Ж PTN, ■ Neutrase, ● Protamex, ◆ Alcalase)..... | 50 |
| Şekil 8.2 50°C'de farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için TNBS yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri, (◇ pH 6.5, □ pH 7, Δ pH 7.5, Ж pH 8,— modeller)..... | 55 |
| Şekil 8.3 50°C'de farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için OPA yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri, (◇ pH 6.5, □ pH 7, Δ pH 7.5, Ж pH 8,— modeller) | 56 |
| Şekil 8.4 pH 7.5 değerinde farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için TNBS yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri, (◇ 40°C, Δ 50°C, □ 60°C,— modeller) | 57 |
| Şekil 8.5 pH 7.5 değerinde farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için OPA yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri, (◇ 40°C, Δ 50°C, □ 60°C,— modeller) | 58 |
| Şekil 8.6 Farklı substrat konsantrasyonları için zamana karşı elde edilen % hidroliz derecesi değerleri (T= 50°C, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim)) (◆ 10 g protein/L, ■ 15 g protein/L, ▲ 20 g protein/L, × 25 g protein/L, Ж 30 g protein/L,— modeller) | 61 |
| Şekil 8.7 Farklı substrat konsantrasyonları için zamana karşı elde edilen çözünürlük derecesi değerleri (T= 50°C, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim)) | |

| | | |
|------------|---|----|
| | (♦ 10 g protein/L, ■ 15 g protein/L, ▲ 20 g protein/L, × 25 g protein/L, Ж 30 g protein/L,— modeller) | 62 |
| Şekil 8.8 | Farklı substrat konsantrasyonları için hidroliz derecesi ile çözünürlük derecesinin değişimi (T= 50°C, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim)) (♦ 10 g protein/L, ■ 15 g protein/L, ▲ 20 g protein/L, × 25 g protein/L, Ж 30 g protein/L,— modeller) | 63 |
| Şekil 8.9 | 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, ■ 15 g protein/L, ▲ 20 g protein/L, × 25 g protein/L, Ж 30 g protein/L,— modeller) | 64 |
| Şekil 8.10 | 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)..... | 65 |
| Şekil 8.11 | % 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) | 67 |
| Şekil 8.12 | Farklı enzim konsantrasyonları için zamana karşı elde edilen % hidroliz derecesi değerleri (T= 50°C, pH= 7, S= 15 g protein/L) (♦ % 0.20 (hacim/hacim), ■ % 0.25 (hacim/hacim), ▲ % 0.30 (hacim/hacim), × % 0.35 (hacim/hacim), Ж % 0.40 (hacim/hacim),— modeller)..... | 68 |
| Şekil 8.13 | Farklı enzim konsantrasyonları için zamana karşı elde edilen çözünürlük derecesi değerleri (T= 50°C, pH= 7, S= 15 g protein/L) (♦ % 0.20 (hacim/hacim), ■ % 0.25 (hacim/hacim), ▲ % 0.30 (hacim/hacim), × % 0.35 (hacim/hacim), Ж % 0.40 (hacim/hacim),— modeller)..... | 69 |
| Şekil 8.14 | Farklı enzim konsantrasyonları için hidroliz derecesi ile çözünürlük derecesinin değişimi, (T= 50°C, pH= 7, S= 15 g protein/L) (♦ % 0.20 (hacim/hacim), ■ % 0.25 (hacim/hacim), ▲ % 0.30 (hacim/hacim), × % 0.35 (hacim/hacim), Ж % 0.40 (hacim/hacim),— modeller)..... | 70 |
| Şekil 8.15 | Farklı enzim konsantrasyonları için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, (T= 50°C, pH= 7, S= 15 g protein/L) (♦ % 0.20 (hacim/hacim), ■ % 0.25 (hacim/hacim), ▲ % 0.30 (hacim/hacim), × % 0.35 (hacim/hacim), Ж % 0.40 (hacim/hacim),— modeller) | 71 |
| Şekil 8.16 | Hidroliz derecesi, % protein çözünürlüğü ve % enzim aktivite değerlerinin enzim miktarı ile değişimi, T= 50°C, pH= 7, S= 15 g protein/L (♦ hidroliz derecesi, ■ protein çözünürlüğü, Δ enzim aktivitesi) | 73 |
| Şekil 8.17 | Farklı pH değerleri için zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, (T= 50°C, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (♦ pH 6.5, ■ pH 7, ▲ pH 7.5, × pH 8, Ж pH 8.5, ● pH 9, — modeller) | 74 |
| Şekil 8.18 | Farklı pH değerleri için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, (T= 50°C, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (♦ pH 6.5, ■ pH 7, ▲ pH 7.5, × pH 8, Ж pH 8.5, ● pH 9, — modeller)..... | 75 |

| | | |
|------------|--|----|
| Şekil 8.19 | Farklı pH değerleri için hidroliz derecesi ile çözünürlük derecesinin değişimi, (T= 50°C, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (♦ pH 6.5, ■ pH 7, ▲ pH 7.5, × pH 8, Ж pH 8.5, ● pH 9)..... | 76 |
| Şekil 8.20 | Farklı pH değerleri için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, (T= 50°C, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (♦ pH 6.5, ■ pH 7, ▲ pH 7.5, × pH 8, Ж pH 8.5, ● pH 9, — modeller)..... | 77 |
| Şekil 8.21 | % Hidroliz derecesi, % protein çözünürlüğü ve % enzim aktivite değerlerinin pH ile değişimi, T= 50°C, E= % 0.30 (hacim/hacim), S= 15 g protein/L (♦ hidroliz derecesi, ■ protein çözünürlüğü, Δ enzim aktivitesi)..... | 78 |
| Şekil 8.22 | Farklı sıcaklıklar için zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, (S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim), pH= 8.5) (♦ 45°C, ■ 50°C, ▲ 55°C, × 60°C, Ж 65°C, — modeller)..... | 79 |
| Şekil 8.23 | Farklı sıcaklıklar için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, (S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim), pH= 8.5) (♦ 45°C, ■ 50°C, ▲ 55°C, × 60°C, Ж 65°C, — modeller) | 80 |
| Şekil 8.24 | Farklı sıcaklıklar için hidroliz derecesi ile çözünürlük derecesinin değişimi, (S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim), pH= 8.5) (♦ 45°C, ■ 50°C, ▲ 55°C, × 60°C, Ж 65°C)..... | 81 |
| Şekil 8.25 | Farklı sıcaklıklar için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, (S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim), pH= 8.5) (♦ 45°C, ■ 50°C, ▲ 55°C, × 60°C, Ж 65°C, — modeller) | 82 |
| Şekil 8.26 | % Hidroliz derecesi, % protein çözünürlüğü ve % enzim aktivite değerlerinin sıcaklık ile değişimi, (S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim), pH= 8.5) (♦ hidroliz derecesi, ■ protein çözünürlüğü, Δ enzim aktivitesi) | 83 |
| Şekil 8.27 | Susam ve susam küspesi substratları için zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, (S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim), pH= 8.5, T= 50°C) (■ susam küspesi,▲ susam)..... | 84 |
| Şekil 8.28 | Susam ve susam küspesi substratları için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, (S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim), pH= 8.5, T= 50°C) (■ susam küspesi,▲ susam)..... | 85 |
| Şekil 8.29 | Susam ve susam küspesi substratları için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, (S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim), pH= 8.5, T= 50°C) (■ susam küspesi,▲ susam) | 86 |
| Şekil 8.30 | Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesi için zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim), S= 15 g protein/L) (♦ % 0 (hacim/hacim), ■ % 25 (hacim/hacim), ▲ % 50 (hacim/hacim), × % 75 (hacim/hacim), Ж % 100 (hacim/hacim))..... | 91 |
| Şekil 8.31 | Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesi için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim), S= 15 g protein/L) (♦ % 0 (hacim/hacim), ■ % 25 (hacim/hacim), ▲ % 50 (hacim/hacim), × % 75 (hacim/hacim), Ж % 100 (hacim/hacim))..... | 92 |

- Şekil 8.32 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesi için hidroliz derecesi ile çözünürlük derecesinin değişimi, (T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim), S= 15 g protein/L) (◆ % 0 (hacim/hacim), ■ % 25 (hacim/hacim), ▲ % 50 (hacim/hacim), × % 75 (hacim/hacim), Ж % 100 (hacim/hacim))..... 93
- Şekil 8.33 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesi için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim), S= 15 g protein/L) (◆ % 0 (hacim/hacim), ■ % 25 (hacim/hacim), ▲ % 50 (hacim/hacim), × % 75 (hacim/hacim), Ж % 100 (hacim/hacim)) 94
- Şekil 8.34 Kademeli enzim ilavesi için zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, E_{toplam}= % 0.30 (hacim/hacim), S= 15 g protein/L) (◆ Tek kademede: 0. dakikada 3 mL/L= 8.4 AU/L enzim ilavesi, □ İki kademede: 0. ve 20. dakikalarda 1.5 mL/L= 4.2 AU/L enzim ilavesi, ▲ Dört kademede: 0., 15., 30. ve 45. dakikalarda 0.75 mL/L= 2.1 AU/L enzim ilavesi)..... 95
- Şekil 8.35 Kademeli enzim ilavesi için zamana karşılık elde edilen protein çözünürlük değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, E_{toplam}= % 0.30 (hacim/hacim), S= 15 g protein/L) (◆ Tek kademede: 0. dakikada 3 mL/L= 8.4 AU/L enzim ilavesi, □ İki kademede: 0. ve 20. dakikalarda 1.5 mL/L= 4.2 AU/L enzim ilavesi, ▲ Dört kademede: 0., 15., 30. ve 45. dakikalarda 0.75 mL/L= 2.1 AU/L enzim ilavesi)..... 96
- Şekil 8.36 Kademeli enzim ilavesi için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, E_{toplam}= % 0.30 (hacim/hacim), S= 15 g protein/L) (● Tek kademede: 0. dakikada 3 mL/L= 8.4 AU/L enzim ilavesi, □ İki kademede: 0. ve 20. dakikalarda 1.5 mL/L= 4.2 AU/L enzim ilavesi, ▲ Dört kademede: 0., 15., 30. ve 45. dakikalarda 0.75 mL/L= 2.1 AU/L enzim ilavesi)..... 97
- Şekil 8.37 Isıl ön işlem sonrası zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (◆ kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 90°C'lik ısıl ön işlem sonrası hidroliz, ▲ 100°C'lik ısıl ön işlem sonrası hidroliz) 99
- Şekil 8.38 Isıl ön işlem sonrası zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (◆ kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 90°C'lik ısıl ön işlem sonrası hidroliz, ▲ 100°C'lik ısıl ön işlem sonrası hidroliz)..... 100
- Şekil 8.39 Isıl ön işlem sonrası zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (◆ kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 90°C'lik ısıl ön işlem sonrası hidroliz, ▲ 100°C'lik ısıl ön işlem sonrası hidroliz) 101
- Şekil 8.40 Mikrodalga ön işlemi sonrası zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (◆ kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 540 W'lık mikrodalga ön işlemi sonrası hidroliz, ▲ 720 W'lık mikrodalga ön işlemi sonrası hidroliz) 103
- Şekil 8.41 Mikrodalga ön işlemi sonrası zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L,

| | | |
|------------|---|-----|
| | E= % 0.30 (hacim/hacim)) (◆ kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 540 W'lık mikrodalga ön işleme sonrası hidroliz, ▲720 W'lık mikrodalga ön işleme sonrası hidroliz)..... | 104 |
| Şekil 8.42 | Mikrodalga ön işleme sonrası zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (◆ kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 540 W'lık mikrodalga ön işleme sonrası hidroliz, ▲720 W'lık mikrodalga ön işleme sonrası hidroliz) | 105 |
| Şekil 8.43 | Sonikasyon ön işleme sonrası zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (◆ kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 80 W'lık sonikasyon ön işleme sonrası hidroliz, ▲120 W'lık sonikasyon ön işleme sonrası hidroliz) | 106 |
| Şekil 8.44 | Sonikasyon ön işleme için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5 S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (◆ kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 80 W'lık sonikasyon ön işleme sonrası hidroliz, ▲120 W'lık sonikasyon ön işleme sonrası hidroliz) | 107 |
| Şekil 8.45 | Sonikasyon ön işlem için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (●kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 80 W'lık sonikasyon ön işleme sonrası hidroliz, ▲120 W'lık sonikasyon ön işleme sonrası hidroliz) | 108 |
| Şekil 8.46 | Farklı akustik güç değerlerinde sonikasyon uygulaması ile gerçekleştirilen hidroliz deneyleri için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, (T= 40°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (◆ kontrol deneyi, □ 20 W, ▲100 W) | 110 |
| Şekil 8.47 | Farklı akustik güç değerlerinde sonikasyon uygulaması ile gerçekleştirilen hidroliz deneyleri için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, (T= 40°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (◆ kontrol deneyi, □ 20 W, ▲100 W)..... | 112 |
| Şekil 8.48 | Farklı % frekans değerlerinde sonikasyon uygulaması ile gerçekleştirilen hidroliz deneyleri için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, (T= 40°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (◆ kontrol deneyi, □ % 10, ▲% 80)..... | 113 |
| Şekil 8.49 | Farklı % frekans değerlerinde sonikasyon uygulaması ile gerçekleştirilen hidroliz deneyleri için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, (T= 40°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (◆ kontrol deneyi, □ % 10, ▲% 80) | 114 |
| Şekil 8.50 | Enzim inaktivasyon sabitinin sıcaklıkla değişimi | 121 |
| Şekil 8.51 | Michaelis-Menten denklemindeki kinetik parametrelerin grafik yöntemlerle eldesi | 126 |
| Şekil 8.52 | Farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen hidroliz değerleri, T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, ■ S= 15 g protein /L, ▲ S= 20 g protein /L, ● S= 25 g protein /L, ✕ S= 30 g protein /L)..... | 128 |

- Şekil 8.53 Zamana karşı incelenen hidroliz değeri verilerinden elde edilen hız değerleri için çizilen Lineweaver-Burke grafiği T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim) 129
- Şekil 8.54 40°C Sıcaklıkta farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen hidroliz değerleri, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, ■ S= 15 g protein/L, ▲ S= 20 g protein/L, ● S= 25 g protein /L, Ж S= 30 g/L) 130
- Şekil 8.55 45°C Sıcaklıkta farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen hidroliz değerleri, pH=8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g ptotein/L, ■ S= 15 g protein/L, ▲ S= 20 g protein/L, ● S= 25 g protein/L, Ж S= 30 g protein/L) 131
- Şekil 8.56 Farklı sıcaklık değerlerinde, susam küspesi proteininin Alcalase enzimi ile hidrolizi için elde edilen Lineweaver-Burke grafikleri, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim) (◆ 40°C, ■ 45°C, ▲ 50°C) 132
- Şekil 8.57 pH 7 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen hidroliz değerleri, T= 50°C, E= % 0.30 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, ■ S= 15 g protein/L, ▲ S= 20 g protein/L, ● S= 25 g protein/L, Ж S= 30 g protein/L) 134
- Şekil 8.58 pH 7.5 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen hidroliz değerleri, T= 50°C, E= % 0.30 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, ■ S= 15 g protein/L, ▲ S= 20 g protein/L, ● S= 25 g protein/L, Ж S= 30 g protein/L) 135
- Şekil 8.59 pH 8 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen hidroliz değerleri, T= 50°C, E= % 0.30 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, ■ S= 15 g protein/L, ▲ S= 20 g protein/L, ● S= 25 g protein/L, Ж S= 30 g protein/L) 136
- Şekil 8.60 Farklı pH değerlerinde, susam küspesi proteininin Alcalase enzimi ile hidrolizi için elde edilen Lineweaver-Burke grafikleri, T= 50°C, E= % 0.30 (hacim/hacim) (◆ pH 7, ■ pH 7.5, ▲ pH 8, ● pH 8.5)..... 137
- Şekil 8.61 Farklı inhibisyon türleri için Lineweaver-Burke grafikleri 140
- Şekil 8.62 Farklı substrat konsantrasyonlarında, reaksiyon çözeltisine % 15 (hacim/hacim) oranında hidrolizat ilavesi ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen hidroliz değerleri, T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, ■ S= 15 g protein/L, ▲ S= 20 g protein/L, ● S= 25 g protein/L, Ж S= 30 g protein/L) 141
- Şekil 8.63 Farklı substrat konsantrasyonlarında, reaksiyon çözeltisine % 30 (hacim/hacim) oranında hidrolizat ilavesi ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen hidroliz değerleri, T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, ■ S= 15 g protein/L, ▲ S= 20 g protein/L, ● S= 25 g protein/L, Ж S= 30 g protein/L) 142
- Şekil 8.64 Farklı substrat konsantrasyonlarında, reaksiyon çözeltisine % 45 (hacim/hacim) oranında hidrolizat ilavesi ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen hidroliz değerleri, T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim)(◆ S= 10 g protein/L, ■ S= 15 g

| | |
|---|-----|
| protein/L, ▲ S= 20 g protein/L, ● S= 25 g protein/L, Ж S= 30 g protein/L) | 143 |
| Şekil 8.65 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesinde, susam küspesi proteininin Alcalase enzimi ile hidrolizi için elde edilen Lineweaver-Burke grafikleri, T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim) (◆ kontrol, ■ % 15 (hacim/hacim), ▲ % 30 (hacim/hacim),● % 45 (hacim/hacim)) | 144 |

ÇİZELGE LİSTESİ

| | Sayfa |
|---|-------|
| Çizelge 3.1 Tahıl tohumlarının ortalama protein içerikleri [52] | 8 |
| Çizelge 3.2 Baklagiller sınıfına giren bitki tohumlarının ortalama protein içerikleri [49] | 8 |
| Çizelge 4.1 Gıda proteinlerinin gıda sistemlerindeki fonksiyonel özellikleri [64] | 13 |
| Çizelge 7.1 Çalışmada kullanılan proteaz enzimlerinin özellikleri..... | 31 |
| Çizelge 7.2 Susam küspesi proteini amino asit kompozisyonu | 32 |
| Çizelge 7.3 Folin Lowry yöntemi için standart eğri verileri | 41 |
| Çizelge 7.4 Aktivite tayini için standart eğri verileri | 44 |
| Çizelge 8.1 Eşitlik 8.2'nin türetilişi [8]..... | 53 |
| Çizelge 8.2 Eşitlik 8.3'ün türetilişi [8] | 54 |
| Çizelge 8.3 50 ⁰ 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 | 55 |
| Çizelge 8.4 50 ⁰ 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 | 56 |
| Çizelge 8.5 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 | 57 |
| Çizelge 8.6 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 | 58 |
| Çizelge 8.7 50 ⁰ C'de farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için Eşitlik 8.2 kullanılarak hesaplanan pK değerleri..... | 59 |
| Çizelge 8.8 pH 7.5 değerinde farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için Eşitlik 8.3 kullanılarak hesaplanan pK değerleri..... | 59 |
| Çizelge 8.9 Farklı substrat konsantrasyonlarında, 120 dakikalık işlem süresi sonunda elde edilen % hidroliz ve çözünürlük dereceleri | |

| | | |
|--------------|---|-----|
| | ve % enzim aktivite değerleri (T= 50°C, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim))..... | 66 |
| Çizelge 8.10 | Farklı enzim miktarlarında, 120 dakikalık işlem süresi sonunda elde edilen % hidroliz ve çözünürlük dereceleri ve % enzim aktivite değerleri (T= 50°C, pH= 7, S= 15 g protein/L)..... | 72 |
| Çizelge 8.11 | Farklı pH değerleri için, 120 dakikalık işlem süresi sonunda elde edilen % hidroliz ve çözünürlük dereceleri ve % enzim aktivite değerleri (T= 50°C, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim))..... | 77 |
| Çizelge 8.12 | Farklı sıcaklık değerleri için, 120 dakikalık işlem süresi sonunda elde edilen % hidroliz ve çözünürlük dereceleri ve % enzim aktivite değerleri (S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim), pH= 8.5)..... | 83 |
| Çizelge 8.13 | Susam ve susam küspesi substratları için, 120 dakikalık işlem süresi sonunda elde edilen % hidroliz ve çözünürlük dereceleri ve % enzim aktivite değerleri (S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim), pH= 8.5, T= 50°C) | 87 |
| Çizelge 8.14 | Optimum proses şartlarında elde edilen hidrolizat çözeltisinin amino asit kompozisyon analizi | 88 |
| Çizelge 8.15 | Optimum proses şartlarında elde edilen verilerin, literatürde varolan verilerle karşılaştırılması | 89 |
| Çizelge 8.16 | Ön işlem uygulaması ile gerçekleştirilen deneyler için elde edilen hidrolizat çözeltilerinin amino asit kompozisyonları..... | 109 |
| Çizelge 8.17 | Sonikasyon altında gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu sonucunda elde edilen hidrolizat çözeltisinin amino asit kompozisyonu | 115 |
| Çizelge 8.18 | Eşitlik 8.5 için elde edilen katsayılar, standart sapma (σ) ve R^2 istatistiksel değerleri | 119 |
| Çizelge 8.19 | Eşitlik 8.7 ve 8.8 için elde edilen katsayılar, standart sapma (σ) ve R^2 istatistiksel değerler..... | 120 |
| Çizelge 8.20 | Farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen hidroliz değeri verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistiksel değerler, T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim) | 127 |
| Çizelge 8.21 | 40°C Sıcaklıkta farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen hidroliz değeri verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistiksel değerler, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim) | 131 |
| Çizelge 8.22 | 45°C Sıcaklıkta farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen hidroliz değeri verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistiksel değerler, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim) | 132 |
| Çizelge 8.23 | Sıcaklık deneyleri için çizilen Lineweaver-Burke grafiklerden elde edilen kinetik parametreler ve grafiklere ait istatistiksel değerler | 133 |
| Çizelge 8.24 | pH 7 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen hidroliz değeri verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistiksel değerler, T= 50°C, E= % 0.30 (hacim/hacim) | 134 |
| Çizelge 8.25 | pH 7.5 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen hidroliz değeri verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistiksel değerler, T= 50°C, E= % 0.30 (hacim/hacim) | 135 |

| | | |
|--------------|--|-----|
| Çizelge 8.26 | pH 8 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen hidroliz değeri verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistiksel değerler, T= 50°C, E= % 0.30 (hacim/hacim) | 136 |
| Çizelge 8.27 | pH deneyleri için çizilen Lineweaver-Burke grafiklerden elde edilen kinetik parametreler ve grafiklere ait istatistiksel değerler..... | 138 |
| Çizelge 8.28 | % 15 (hacim/hacim) hidrolizat ilavesi için, farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen hidroliz değeri verilerine uyan lineer modellere ait eğim ve istatistiksel değerler, T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim)..... | 142 |
| Çizelge 8.29 | % 30 (hacim/hacim) hidrolizat ilavesi için, farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen hidroliz değeri verilerine uyan lineer modellere ait eğim ve istatistiksel değerler, T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim)..... | 143 |
| Çizelge 8.30 | % 45 (hacim/hacim) hidrolizat ilavesi için, farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen hidroliz değeri verilerine uyan lineer modellere ait eğim ve istatistiksel değerler, T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim)..... | 144 |
| Çizelge 8.31 | Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesinde, zamana karşı incelenen hidroliz değeri verilerinden elde edilen hız değerleri için çizilen Lineweaver-Burke grafiklerden hesaplanan kinetik parametreler ve grafiklere ait istatistiksel değerler..... | 145 |
| Çizelge 8.32 | Susam küspesi proteininin enzimatik hidroliz kinetiğine ait veriler | 146 |
| Çizelge 8.33 | Susam küspesi proteini ve hidrolizatlarının su ve yağ tutma kapasitesi değerleri | 147 |
| Çizelge 8.34 | Susam küspesi proteini ve hidrolizatlarının köpük kapasitesi değerleri | 149 |
| Çizelge 8.35 | Susam küspesi proteini ve hidrolizatlarının köpük stabilitesi değerleri | 150 |
| Çizelge 8.36 | Susam küspesi proteini ve hidrolizatlarının emülsiyon aktivite indeksi ve emülsiyon stabilite indeksi değerleri | 151 |
| Çizelge 8.37 | Fonksiyonel özelliklerin varolan verilerle karşılaştırılması..... | 152 |

**SUSAM KÜSPESİNDEKİ PROTEİNİN ENZİMATİK HİDROLİZİNİN,
ÇÖZÜNÜRLÜĞÜNÜN, ENZİM İNAKTİVASYON KİNETİĞİNİN VE
FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Elçin DEMİRHAN YILMAZ

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Belma KIN ÖZBEK

Proteinin yapı taşları olan amino asitlerine parçalanması doğal bir prosestir. Enzimlerle hidroliz işlemi sonucunda diğer hidroliz proseslerine göre daha güvenli ve istenen hidrolizat ürünleri elde edilir. Proteinin peptidlere parçalanması ile çözünür ve sindirimi kolay ürünler elde edilir ve tat, viskozite, karıştırılabilirlik, emulsifiye edici ve köpük yapıcı gibi diğer fonksiyonel özellikler de etkilenir. Bitkisel kaynaklı proteinlerin ucuz olmasına ve bol bulunmasına rağmen gıdalarda istenen fonksiyonel performanslarının düşük olmasından dolayı, gıda ürünlerinde kullanımı sınırlıdır. Ancak, enzimatik modifikasyonlarla proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin geliştirilebileceği belirtilmiştir ve bu şekilde elde edilen ürünler gıda katkı maddeleri olarak değerlendirilmektedir.

Yağ endüstrisinde atık olarak elde edilen susam küspesi yaklaşık olarak % 40 oranında protein içerir. Günümüzde, daha çok hayvan yemi olarak kullanılan susam küspesinin, gıda katkısı olarak kullanılabilmesinde en büyük dezavantajı çözünürlüğünün çok düşük olmasıdır. Ancak bu dezavantaj proteinin modifiye edilmesi ile ortadan kaldırılabilir. Susam küspesi proteininin gıda katkısı olarak kullanımını geliştirmek amacı ile bu çalışmada, susam küspesinin enzimatik hidrolizi, kapsamlı bir biçimde incelenmiştir.

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda; ilk olarak beş farklı ticari enzim (Alcalase, Neutrase, Protamex, Flavourzyme ve PTN) kullanılmış ve bunların

arasından susam küspesi hidrolizi için en uygun enzimin Alcalase olduğu belirlenmiştir. Daha sonra, hidroliz derecesini belirlemek için kullanılan pH-stat yöntemi susam küspesi proteininin Alcalase enzimi ile hidrolizi için kalibre edilmiş ve susam küspesi hidrolizatları için pK değerleri; 40°C, 50°C ve 60°C sıcaklıklarda sırasıyla 6.88, 6.65 ve 6.42 olarak bulunmuştur. Kesikli sistemde, hidroliz parametrelerinin optimizasyonu için, farklı substrat konsantrasyonlarında (10-30 g protein/L), enzim konsantrasyonlarında (% 0.20-0.40 (hacim/hacim)), pH (6.5-9) ve sıcaklık (45-65°C) 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; 15 g protein/L substrat konsantrasyonu, % 0.30 (hacim/hacim) enzim miktarı, 50°C sıcaklık ve pH 8.5 olarak belirlenmiştir. Optimum proses şartlarında, 120 dakika süreyle gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu sonucunda, % 26.3 hidroliz derecesi, % 82.1 protein çözünürlüğü elde edilmiş ve enzimin aktivitesini yaklaşık % 56 oranında kaybettiği saptanmıştır.

Çalışmada hidroliz ürünlerinin, kademeli enzim ilavesinin ve susam küspesine uygulanan; ısı, mikrodalga ve sonikasyon ön işlemlerinin hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkileri ayrıca incelenmiştir. Optimizasyon deneyleri sonucunda elde edilen tüm veriler analiz edilerek; hidroliz, çözünürlük ve enzim inaktivasyonu için kinetik modeller elde edilmiştir. Susam küspesi proteininin hidrolizinin Michelis Menten Kinetiğine uygunluğu, başlangıç hız deneyleri gerçekleştirilerek ayrıca incelenmiştir. Hidroliz reaksiyonu için Michelis Menten Kinetik parametreleri; $K_m = 41.17$ g/L, $V_{max} = 9.24$ meqv/L.dak olarak elde edilmiş, bu parametrelerin sıcaklık ve pH ile değişimi ayrıca incelenmiştir. Alcalase enzimi için ürün inhibisyon türünün unkompetitiv olduğu belirlenmiş ve inhibisyon sabiti $K_i = 38.24$ (hidrolizat hacmi/reaksiyon çözültüsü hacmi) olarak hesaplanmıştır.

Susam küspesi proteininin hidrolizatlarının fonksiyonel özellikleri (su tutma kapasitesi, yağ tutma kapasitesi, köpürme ve emülsiyon özellikleri) incelenmiştir. Enzimatik hidroliz, susam küspesi protein hidrolizatlarının fonksiyonel özelliklerini geliştirmiştir. Susam küspesi protein hidrolizatlarının bu fonksiyonel karakteristikleri, endüstriyel gıda uygulamalarında doğal katkı olarak hidrolizatların kullanımını sağlamaktadır. Sonuç olarak, gıda sanayi atığı olan susam küspesi değerli bir gıda katkısı haline dönüşebilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Susam küspesi, Alcalase, enzimatik hidroliz, proses değişkenleri, optimizasyon, kinetik, fonksiyonel özellikler

**INVESTIGATION OF ENZYMATIC HYDROLYSIS, SOLUBILIZATION,
ENZYME INACTIVATION KINETIC AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF
SESAME CAKE PROTEIN**

Elçin DEMİRHAN YILMAZ

Department of Chemical Engineering

PhD. Thesis

Advisor: Prof. Dr. Belma KIN ÖZBEK

The breakdown of a protein to constituent amino acids is a natural process. Protein hydrolysis can be achieved by a number of chemical processes, in acidic and basic conditions and most importantly by enzymes for example proteases. The more soluble and easily digestible products can be obtained by the break down the proteins to peptides; and some functional properties such as flavour, viscosity, emulsifying and foaming are also affected. Although, the plant proteins are cheap and superabundant, the use of these proteins in food industry is limited because of their low functional performances. However, the functional properties of plant proteins can improve by enzymatic modifications; and then these products can be considered as foodstuff in the food industry.

The sub-product of the oil extraction process is sesame cake, which has 40 % protein content. The main use of sesame cake is animal feed. The low water solubility of sesame cake limits its use for human food products, but it can be increased by modification. In the present work, a comprehensive study on the hydrolysis of sesame cake protein was performed to improve its utilization in food products.

In the present study, first of all a general survey of enzymatic hydrolysis and solubilization of sesame cake protein was performed with five commercial enzyme preparations (Alcalase, Neutrase, Flavourzyme, Protamex and PTN) in order to choose appropriate enzyme; and Alcalase gave the highest performance among the other enzymes used. Then, the calibration of pH-stat was performed; and the pK values of the sesame cake protein hydrolysates were determined as 6.88, 6.65 and 6.42 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 (10-30 g protein/L), enzyme concentrations (0.20-0.40 % v/v), pH values (6.5-9) and temperatures (45-65°C); and the degree of hydrolysis, solubility of sesame cake protein and residual enzyme activity were investigated depending on the processing time. The optimum process conditions for hydrolysis and solubilization were obtained as 15 g/L substrate concentration, 0.30 % v/v enzyme concentration, 50 °C and pH 8.5. Under these conditions, the values of degree of hydrolysis and solubilization were found as 26.3 % and 82.1 % respectively; and enzyme lost its activity by approximately 56 % at the end of 120 min processing time.

The effect of hydrolysis products and pretreatments applied to substrate; such as thermal treatment, microwave irradiation, and sonic treatment; on hydrolysis were also investigated. Modeling studies were performed to determine the kinetics of hydrolysis, solubilization and enzyme inactivation. The Michelis Menten kinetics was examined with initial rate assays, and the kinetic parameters, K_m and V_{max} were estimated as 41.17 g/L and 9.24 meqv/L.min. The effects of temperature and pH on Michelis Menten parameters were also examined. The type of inhibition for Alcalase determined as uncompetitive; and the inhibition constant K_i was estimated as 38.24 % (hydrolysate/substrate mixture).

The functional properties (water holding capacity, oil holding capacity, foaming and emulsion properties) were investigated. It was found that the functional properties of sesame cake protein hydrolysates could be modified by enzymatic hydrolysis. The results suggested that the functional characteristics of sesame cake protein hydrolysates make them good substrates to be used in food industry as a natural additive for many industrial food applications; and also for cosmetic and personal care products. So, the by-product sesame cake can be processed into a value-added product.

Key Words: Sesame cake, Alcalase, enzymatic hydrolysis, process parameters, optimisation, kinetics, functional properties

1.1 Literatür Özeti

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, emulsifiye edici ve köpük yapıcı 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 [1-6].

Proteinin, yapı taşları olan amino asitlerine parçalanması doğal bir süreçtir. Protein hidrolizi, asidik ortamda, bazik ortamda veya enzimler yardımı ile gerçekleştirilebilir. Proteinlerin asidik hidrolizi sonucu elde edilen hidrolizatlar gıda katkı maddeleri, koku verici maddeler olarak kullanıldığı gibi endüstriyel fermentasyonda uygulamaları da mevcuttur. Ancak, kimyasallarla yapılan hidroliz işleminde zararlı yan ürünler ve istenmeyen hidroliz ürünleri elde edilir. 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 [4,5,7-9].

Proteinin peptidlere parçalanması ile çözünür ve sindirimi kolay ürünler elde edilir. Bundan başka proteinin parçalanması, tat, koku, viskozite, karıştırılabilirlik, emulsifiye edici ve köpük yapıcı gibi diğer fonksiyonel özelliklerde de etkilidir. Böylece uygun hidroliz şartlarının belirlenmesi ile bu özelliklerde spesifik gelişmeler sağlanabilir.

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 [4]. Protein eldesi için kullanılan diğer hayvansal kaynaklar et, kollajen, jelatin, balık ve yumurtadır [1,8]. Ancak son zamanlarda hayvansal kaynaklı proteinlere alternatif olarak bitkisel kaynaklı proteinlerin kullanımı giderek artış göstermektedir [4,10]. Bitkisel protein kaynakları arasında en çok soya proteinin hidrolizi [8, 11-22] üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Soyanın yanı sıra; bezelye [6, 23-28], nohut [29], bakla [30,31] ve buğday [9, 32-39] üzerlerinde gerçekleştirilen çalışmalarla dikkat çeken bitkisel protein kaynakları arasında yer almaktadır.

Bitkisel kaynaklı proteinlerin ucuz olmasına ve bol bulunmasına rağmen gıdalarda istenen fonksiyonel performanslarının düşük olmasından dolayı, gıda ürünlerinde kullanımı sınırlıdır. Ancak, enzimatik modifikasyonlarla proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin geliştirilebileceği belirtilmiştir ve bu şekilde elde edilen ürünler gıda katkı maddeleri olarak değerlendirilmektedir.

Bu nedenle, farklı bitkisel proteinlerin hidrolizi, çözünen protein miktarı ve kullanılacak enzimlerin kinetiği üzerinde yapılacak olan araştırmalarla optimum proses şartlarının belirlenmesi, hidroliz sonucu elde edilen sıvı hidrolizatların gıda endüstrisinde, içeceklerde, hazır çorbalarda, salata soslarında ve benzer gıdalarda, hayvansal kaynaklı proteinlerden elde edilen katkı maddelerine alternatif olarak kullanılabilmesine olanak sağlayacaktır.

Susam küspesi susam yağı üretimi sonunda elde edilir. Susam küspesinde ortalama % 40 ham protein ve % 24 madeni maddeler (P, K, Ca) bulunmaktadır [40, 41]. Susam küspesi yüksek protein ve mineral içeriğinden dolayı değerli bir besin maddesi olmasına karşın, günümüzde sadece hayvan yemi olarak kullanılmaktadır, ancak bazı ülkelerde ekmeğe de karıştırılmaktadır. Gıda endüstrisinde kullanımının olmamasının nedeni çözünürlüğünün az olmasıdır. Birçok bitkisel protein gıda katkısı olarak kullanılmaktadır. Susam küspesinin, gıda katkısı olarak kullanılabilmesi için en büyük dezavantajı çözünürlüğünün çok düşük olmasıdır. Ancak bu dezavantaj proteinin modifiye edilmesi ile ortadan kaldırılabilir [42-46].

1.2 Tezin Amacı

Modifiye proteinler gıda katkı maddeleri olarak geniş kullanım alanı bulmaktadır. Bu tezin amacı, yağ endüstrisinden atık olarak elde edilen susam küspesi proteininin çeşitli ticari enzimlerle muamele edilerek hidrolizini gerçekleştirmek; hidrolizat ürünlerinin eldesini ve proteinin çözünürlüğünü etkileyen proses parametrelerini incelemek, hidroliz prosesinde maksimum verim alınabilmesi için proses parametrelerini optimize etmek, optimizasyon ile ilgili matematiksel modelleri geliştirmek ve elde edilen hidrolizatların fonksiyonel özelliklerini incelenmektedir.

Tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda; ilk olarak beş farklı ticari enzim (Alcalase, Neutrase, Protamex, Flavourzyme ve PTN) kullanılmış ve bunların arasından susam küspesi hidrolizi için en uygun enzimin Alcalase olduğu belirlenmiştir. Daha sonra, hidroliz derecesini belirlemek için kullanılan pH-stat yöntemi susam küspesi proteininin Alcalase enzimi ile hidrolizi için kalibre edilerek hidroliz parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Optimizasyon deneyleri sonucunda elde edilen tüm veriler analiz edilerek; hidroliz, çözünürlük ve enzim inaktivasyonu için kinetik modeller elde edilmiştir. Susam küspesi proteininin hidrolizinin Michelis Menten Kinetiğine uygunluğu, başlangıç hız deneyleri gerçekleştirilerek ayrıca incelemiştir, reaksiyon için Michelis Menten Kinetik parametreleri ile bu parametrelerin sıcaklık ve pH ile değişimi ve Alcalase enzimi için ürün inhibisyon türü belirlenmiştir. Deneysel çalışmanın daha sonraki bölümünde, susam küspesine uygulanabilecek bazı ön işlemlerin hidroliz reaksiyonu üzerindeki

etkileri ve hidroliz reaksiyonu ultrasonik ortamda gerçekleştirilmesi ile sonikasyon parametrelerinin hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmanın son bölümünde ise, hidroliz reaksiyonu sonucu elde edilen susam küspesi protein hidrolizatlarının fonksiyonel özellikleri incelenmiştir.

1.3 Orijinal Katkı

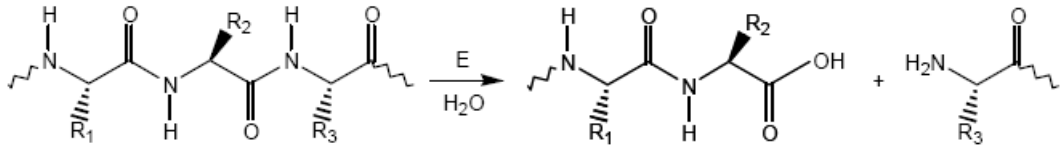
Ülkemizde susam ekimi, hububattan sonra ikinci ürün olarak yaygındır. Susam yağı üretimi sonunda elde edilen susam küspesi yüksek protein ve mineral içeriğinden dolayı değerli bir besin maddesi olmasına karşın, sadece hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde kullanımının olmamasının nedeni çözünürlüğünün az olmasıdır. Bu çalışmada, susam küspesi proteinin ticari proteaz enzimleri ile hidrolizlenmesi sırasında, proses parametrelerinin (pH, sıcaklık, enzim miktarı, substrat miktarı, hidrolizat miktarı) susam küspesi proteininin hidroliz derecesi, çözünürlüğü ve fonksiyonel özellikleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. İlgili proses parametrelerinin optimize edilmesi yüksek verim ve stabil ürünler elde edilmesi açısından oldukça büyük önem taşımaktadır.

Ayrıca bu çalışma, konu ile ilgili yapılacak olan diğer çalışmalara da temel oluşturmaktadır. Enzimatik hidroliz sonucunda susam küspesi protein hidrolizatlarının fonksiyonel özellikleri iyileştirilmiştir. Susam küspesi protein hidrolizatlarının bu fonksiyonel karakteristikleri, endüstriyel gıda uygulamalarında doğal katkı olarak hidrolizatların kullanımını sağlamaktadır. Sonuç olarak, gıda sanayi atığı olan susam küspesi değerli bir gıda katkısı haline dönüşebilmektedir. Ayrıca, optimum şartların belirlenmesi ve model denklemlerinin geliştirilmesi ile bilime ve ekonomiye de katkı sağlanmıştır.

BÖLÜM 2

PROTEİN HİDROLİZİ

Protein, peptit bağları ile birleşmiş amino asit grupları içeren uzun bir polimer zinciridir. Amino asit 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) [47].



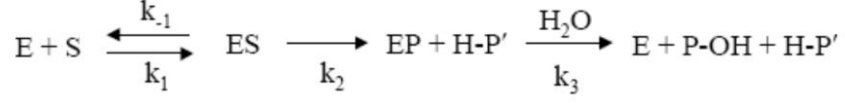
R₁, R₂ ve R₃: amino asit grupları, E: enzim

Şekil 2.1 Protein hidrolizi [48]

Proteinlerin enzimatik hidrolizi proteaz enzimleri tarafından katalizlenir. Genel olarak proteaz enzimleri tarafından katalizlenen protein hidrolizi üç ardışık reaksiyon sonucu gerçekleşir (Şekil 2.2) [8];

- (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 [8]

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 asit gruplarında meydana gelen artışın belirlenmesi ile ölçülür. Serbest amino asit gruplarının konsantrasyonunu belirlemek amacıyla kullanılan birçok yöntem mevcuttur. Bunlar arasında günümüzde kabul görmüş ve en çok kullanılan yöntem trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) yöntemidir[8].

Herhangi bir protein için toplam peptit bağ sayısı h_{top} (eqv/g) 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 [8].

BİTKİSEL PROTEİN KAYNAKLARI

Bitkisel gıdalar beslenmemizde önemli yer tutmaktadır. Besinler yolu ile alınan enerjinin yaklaşık % 80'ni ve proteinlerin % 65'i bitkisel gıdalardan sağlanır [49]. 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 [50,51]. 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 [8].

Çizelge 3.1 Tahıl tohumlarının ortalama protein içerikleri [52]

| Tahıl | % Protein (kuru madde, g/100 g) |
|--------------|--|
| 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 [49]

| Baklagiller | % Protein (kuru madde, g/100 g) |
|--------------------|--|
| 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. Osborne [53] ve konuyla ilgili çalışan ilk araştırmacılar 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 [54-55]:

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. Tahıllarda az miktarda globülin içerir; ancak ana proteinleri alkol-su karışımında çözünen prolaminlerdir [50]. Tahıl proteinleri sülfür içeren amino asitler (metiyonin, sistein) bakımından zengin lizin bakımından fakirdirler. Baklagil proteinleri ise lizin bakımından zengin, sülfür içeren amino asitler bakımından fakirdirler [50,51].

3.1 Susam ve Susam Küspesi

Susam (*Sesamum Indicum L.*) dünyada yaklaşık 4000 yıldır tarımı yapılan en eski yağ bitkilerinden birisidir (Morris, 2002). Günümüzde özellikle Hindistan, Çin, Afganistan, Pakistan, Bangladeş, Endonezya ve Srilanka gibi Asya ülkelerinde üretilmektedir. Dünyada üretilen yağlı tohumlar içerisinde 8. sırada yer alırken, Türkiye’de ekimi yapılan yağlı tohumlar içerisinde ayçiçeğinden sonra ikinci önemli yağ bitkisidir. Susam geniş oranda bitkisel yağ için değerlendirilmekte, diğer kısmı pastacılıkta ve tohumluk olarak tüketilmektedir [56,57].

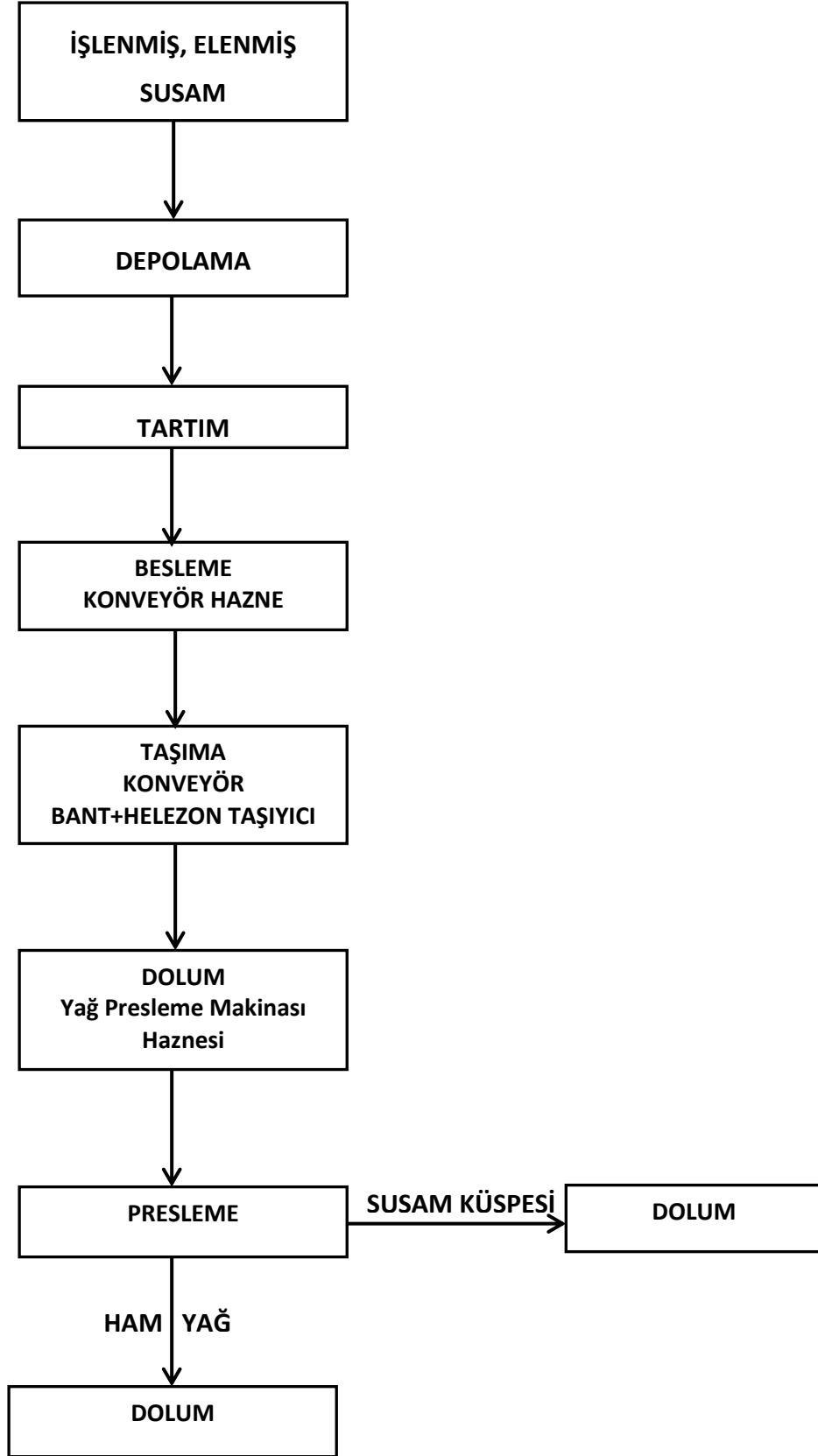
Yağ oranı ve enerji değeri çok yüksek bir besin olan susam, protein (metionin ve triptofan içeriği yüksek), kalsiyum, magnezyum, potasyum, mineraller ve B Vitamini kaynağıdır. Susam tohumu özellikle lizin, metionin ve sistein amino asitlerince zengindir. Susam tohumu % 40 – 60 oranında yağ içermektedir. Susam yağında en çok bulunan yağ asitleri sırasıyla; oleik asit, linoleik asit, palmitik asit, stearik asit ve düşük

oranda linolenik asit ile arasidik asitlerdir. Proteini ise esansiyel amino asitlerce zengindir [56].

Önemli bir yağlı tohum olmasının yanında içerdiği antioksidan bileşiklerden dolayı ilaç ve kozmetik sanayinde de geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Yağının yüksek kalitesi ve tohumların pasta ve şekerlemelerde geniş bir şekilde kullanılması, uluslararası ticarete susam tohumuna olan talebin artmasına neden olmuştur. Susam yağı bileşiminde bulunan sesamin ve sesamolin antioksidanları sayesinde geç bozulması ve oldukça kaliteli olmasına rağmen yemeklik yağ olarak kullanımı ekonomik olmadığı için ülkemizde bitkisel yağ olarak kullanımı sınırlı kalmıştır. Üretilen susam tohumlarının büyük bir çoğunluğu, sevilen bir tatlı olan tahin helvasının ana maddesi olan tahin üretiminde, ayrıca baharat olarak ve pastacılık ürünlerinde de kullanılmaktadır [44, 42, 58].

Susam küspesi susam yağı üretimi sonunda elde edilir. Susam küspesinde ortalama % 40 ham protein ve % 24 madeni maddeler (P, K, Ca) bulunmaktadır [40]. Susam küspesinin üretimi şematik olarak Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

Susam küspesi yüksek protein ve mineral içeriğinden dolayı değerli bir besin maddesi olmasına karşın, günümüzde sadece hayvan yemi olarak kullanılmaktadır, ancak bazı ülkelerde ekmeğe de karıştırılmaktadır. Gıda endüstrisinde kullanımının olmamasının nedeni çözünürlüğünün az olmasıdır. Birçok bitkisel protein gıda katkısı olarak kullanılmaktadır. Susam küspesinin, gıda katkısı olarak kullanılabilmesi için en büyük dezavantajı çözünürlüğünün çok düşük olmasıdır. Ancak bu dezavantaj proteinin modifiye edilmesi ile ortadan kaldırılabilir [42-46].



Şekil 3.1 Susam küspesi üretimi

PROTEİNLERİN FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİ

Bir gıdanın tüketici açısından önem taşıyan işlevsel özelliği, gıdanın besleyici değerinin dışında kalan diğer niteliklerinin tümüdür. Bunlar sırasıyla tekstür, tat-koku, renk ve görünüşdür. Proteinlerin besin kalitesi, amino asit kompozisyonu ve gıda proteinlerini hidrolize edebilen enzimler ile sindirilebilme kolaylığı ile tanımlanır. Proteinlerin, gıda işleme ve gıda ürünleri geliştirilmesinde, gıdanın yapısını etkileyen birçok fonksiyonel özellikleri vardır. Gıda maddesinin doğal olarak içerdiği veya gıda hazırlanırken içine ilave edilen proteinlerin çözünürlüğü, su tutma kapasitesi, yağ bağlama özellikleri, köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi, emülsiyon oluşturma kapasitesi ve stabilitesi, viskozite ve jel oluşturma gibi özellikleri ise ürün kalitesine önemli etkileri olan fonksiyonel özelliklerdir. Fonksiyonel özellikler gıdaları hazırlama, işleme, depolama ve sunum aşamalarında gıdanın davranışını ve performansını belirlemektedir. Gıda bazlı yeni protein kaynaklarının araştırılması ve geliştirilmesi sırasında fonksiyonel özellikler, temel kriter olarak değerlendirilmektedir. Yeni protein kaynaklarının esansiyel amino asit kompozisyonu ve fonksiyonel özellikleri yanında kabul edilebilir duyuşal özelliklere sahip olması da aranan bir özelliktir.

Proteinlerin fonksiyonel özellikleri, protein yapısı ile ilgili özelliklerden (amino asit dizilimi ve bileşimi), proteinin elde edişisi sırasında uygulanan koşullardan (ekstraksiyon ve çöktürme koşulları, yağ uzaklaştırma metodu, enzim uygulaması, kurutma ve toz ürün elde etme metotları), birbirleri ile diğer bileşenler ile ve su ile olan etkileşimleri ve proteinin fonksiyonel özelliklerinin saptanması sırasında uygulanan koşullardan (pH,

sıcaklık, karıştırma metodu ve süresi) etkilenmektedir [59-63]. Çizelge 4.1’de bazı gıda sistemlerinde kullanılan proteinler fonksiyonel özellikleri ile birlikte verilmiştir [64].

Çizelge 4.1 Gıda proteinlerinin gıda sistemlerindeki fonksiyonel özellikleri [64]

| Fonksiyonel Özellikler | Gıda Sistemi |
|-------------------------------|---|
| Çözünürlük | İçecekler |
| Viskozite | Çorbalar, Et Suları, Salata Sosları, Tatlılar |
| Su Bağlama | Sosisler, Kekler, Ekmekler |
| Jel Oluşturma | Etler, Jeller, Kekler, Soslar |
| Emülsiyon Oluşturma | Sosisler, Çorbalar, Kekler, Soslar |
| Köpük Oluşturma | Çırpılmış Pasta Süslemeleri, Dondurma, Kekler, Tatlılar |
| Yağ ve Aroma Bağlama | Et Ürünleri, Unlu Ürünler, Donutlar |
| Elastiklik | Et, Unlu Ürünler |

4.1 Su ve Yağ Tutma Kapasitesi

Gıda proteinleri amino asit kompozisyonu, molekül büyüklüğü, yapısı ve izoelektrik noktalarına göre değişkenlik gösterirler. Proteinler, özütleme ve saflaştırma için farklı kimyasal ve fiziksel uygulamalara maruz kalırlar. Bu çevresel koşullar proteinlerin işlevselliğini etkiler. Protein kompozisyonu ve dizilişi, su ve yağ bağlama kapasitesini önemli ölçüde etkiler. Genel olarak protein yapısı içinde tutulan su iki kategoride incelenir. Birincisi protein molekülüne bağlanan çözücü özelliğini kaybeden bağlı sudur. İkincisi ise protein ortamı tarafından tutulmuş olan alıkonmuş sudur. Bağlı su, proteinin fizikokimyasal özelliklerinden etkilenirken alıkonmuş su ise daha çok ortamın yapısından etkilenir [65,66]. Su molekülleri proteinlerdeki birçok gruba bağlanır.

Böylece gıda endüstrisinde bilinen özellikteki bir proteinin üretime girmesi sağlanarak son ürün ile ilgili standart özellikler hedeflenen şekilde üründe oluşabilmektedir.

Protein kaynaklı bileşenlerin absorblayıp yapıda tuttuğu su çeşitli gıdaların tekstürel niteliklerine ve bazı özelliklerine katkıda bulunmaktadır. Bunlar çoğunlukla et ürünlerinde ve hamurda gözlenen özelliklerdir. Su absorpsiyonu yolu ile protein su alarak şişer ve böylece karakteristik olan yapı, tekstür, viskozite ve adhezyon gibi gıdanın bazı önemli reolojik özellikleri ortaya çıkar [66,67].

Protein ve lipitler arasındaki etkileşim birçok gıdanın duyu kalitesini etkilemektedir. Bu etkileşimler çeşitli bağlar aracılığıyla olur ve pH, iyonik güç, sıcaklık ve sistemdeki diğer değişkenlerden etkilenirler. Protein temelli gıdalarda, yağ bağlama kapasitesi için protein ortamının yapısı önemlidir. Küçük partikül boyutlu, düşük yoğunluklu protein tozları yüksek yoğunluklu protein tozlarından daha fazla yağ adsorbe ederler. [65,68].

4.2 Köpük Oluşturma

Köpük, bir sıvı içinde havanın baloncuklar içinde hapsolmesi ile meydana gelmektedir. Köpükler sürekli sıvı veya sulu fazlı koloidal sistemlerdir. Gaz veya hava fazı içerisinde dağılırlar. Sürekli sıvı fazın içinde gazın dağılmasıyla köpük oluşur. Bir molekülün iyi bir köpürme ajanı olabilmesi için temel gereksinimler şu şekildedir: (i) köpürme süresince hava/su arayüzeyinde hızlı bir şekilde adsorblanmalı, (ii) hızlı konformasyonel değişikliğe uğrama ve arayüzeyde yeniden düzenlenme yeteneğine sahip olmalı [69].

Gıda köpükleri normalde çırpma, sallama veya püskürtmeyle üretilir ve kullanılan metot köpüğün karakteristik özelliklerini etkiler. Köpük kapasitesi (oluşan köpüğün hacminin ölçüsü % olarak ifade edilir) ve köpük stabilitesi (köpüğün sönmeye için gereken zamanın ölçüsü) köpüklerin iki genel karakteristik özellikleridir [65,67]. Hava ile stabil köpük oluşturma kapasitesi pandispanya kek, şekerleme, kurabiye, sufle, krema, helva, dondurma gibi gıdalarda önemli bir özelliktir [70,71].

Köpük özellikleri proteinin tipi, hazırlama metodu, kompozisyonu, çözünürlüğü ve konsantrasyonundan, ortam pH'sından, tuzların bulunmasından ve hidrofobik etkileşimlerden etkilenmektedir [68].

4.3 Emülsiyon özellikleri

Birçok gıda sistemi için istenen temel fonksiyonel özelliklerden birisi de emülsiyon oluşturmaktır. Emülsiyon, karışmaz iki sıvının birbiri içinde dağılması veya süspansiyon oluşturmaları şeklinde tanımlanabilir. Proteinlerin emülsiyon özellikleri, gıdalardaki fonksiyonellikleri açısından önemli fonksiyonel özelliklerinden biridir. Yüzey hidrofobisitesi ve protein konsantrasyonu proteinlerin emülsiyon özelliklerini belirleyen temel karakteristiklerdendir. Proteinlerin esnekliği ve çevresel değişimler karşısında yapısal adaptasyona uğraması yüzey aktivitesi olarak ifade edilmektedir. Emülsiyon özellikleri, proteinin kaynağı, konsantrasyonu, çözünbilme yeteneği, pH, sıcaklık, tuz konsantrasyonu, ekipman ve metot gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir [65,68,71,72].

Proteinlerin gıda emülsiyonlarındaki emülsiyon özelliklerini tespit etmek için emülsiyon aktivite indeksi ve emülsiyon stabilite indeksi terimleri kullanılmaktadır. Emülsiyon aktivite indeksi (EAI); proteinin flokulasyon ve birleşmeyi önleyerek emülsiyonun oluşumu süresince su/yağ arayüzeyine hızlı bir şekilde adsorblanabilme yeteneğidir. Emülsiyon stabilite indeksi (ESI) ise proteinin, yağ moleküllerinin flokulasyon ve birleşmesini önleyerek belirli bir süre stabil bir emülsiyon sağlayabilme yeteneğinin ölçüsüdür [73,74].

PROTEOLİTİK ENZİMLER

Proteolitik enzimler, proteinlerdeki peptit bağlarının parçalanmasını katalizleyerek proteinleri farklı moleküler boyuta peptit ve serbest amino asitlere dönüştürürler [4,73]. Kaynaklarına göre; bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal olmak üzere üç sınıfa, etki mekanizmalarına göre endo-peptidazlar ve exo-peptidazlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar [8].

5.1 Proteolitik Enzimlerin Kaynaklarına göre Sınıflandırılması

5.1.1 Bitkisel proteazlar

Bitkilerden proteaz elde edilmesi; tarım için alan sağlanabilmesi, iklimsel şartların uygunluğu gibi birçok faktöre bağlı olmakla beraber, çok fazla zaman gerektiren bir süreçtir. En çok bilinen bitki kökenli proteazlar; papain, bromelain ve keratinazdır [75].

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 ve ya 90°C'ye kadar stabildir. Endüstriyel olarak yüksek

çözünürlükte ve tatlandırıcı (aroma verici) protein hidrolizatlarının elde edilmesinde kullanılır [75,76].

Bromelain

Ananas suyu veya gövdesinden elde edilir. Enzim sistein proteaz olarak karakterize edilir. pH 5-9 aralığında aktiftir, inaktivasyon sıcaklığı 70°C'dir [75,77].

Keratinaz

Bazı botanik bitki grupları saç-tüy hidroliz eden bu proteazı üretir. Tüy ve yünün parçalanması, lizin gibi temel amino asitlerin eldesi için önemlidir [75].

5.1.2 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 [75].

Tripsin

Bağırsaktan elde edilen sindirim enzimidir. Serine proteazıdır. Karboksil gruplarını lizin ve arginin moleküllerine bağlayan peptitleri hidroliz eder [75].

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 [75].

Pepsin

Hemen hemen tüm omurgalıların midelerinde bulunan asidik bir proteazdır. İki hidrofobik amino asit arasındaki peptit bağlarının hidrolizini katalizler. Öncelikli olarak aromatik amino asitlere (phenylalanine, tyrosine ve tryptophan) karşı özgüllük gösterir. Mide için optimum pH aralığı 2-4 iken pepsin pH 1-2 aralığında optimum aktivite gösterir. pH 6 değerinin üzerinde inakive olur [75,78].

Rennin

Emziren memelilerin midelerinden elde edilen pepsin benzeri bir proteazdır. κ -kazeindeki tek peptit bağınyı parçalayarak çözünmeyen para- κ -kazein ve C-son uçlu glyopeptit oluşmasını sağlar. Çoğunlukla süt ürünleri endüstrisinde aroma verici stabil süt pıhtısı (lor, kesmik) elde etmek için kullanılır [75].

5.1.3 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 [75].

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 stabilitelerini korurlar. Nötral fungal proteazlar, metalloproteazdır ve pH 7 değerinde aktiftirler [75].

5.2 Proteolitik Enzimlerin Etki Mekanizmasına göre Sınıflandırılması

5.2.1 Exo-peptidazlar

Uç noktadaki peptit bağlarını hidrolizleyerek amino asitleri N-son ucundan veya C-son ucundan sistematik bir şekilde ayırırlar [4].

Aminopeptidazlar

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 [75].

Karboksipeptidazlar

Polipeptit zincirinin serbest C-son ucuna etkirler ve tek bir amino asit molekülünün veya bir dipeptitin serbest kalmasını sağlarlar. Enzimin aktif kısmında bulunan amino asit özelliğine göre karboksipeptidazlar kendi içlerinde, serin karboksipeptidazlar, metallo karboksipeptidazlar ve sistein karboksipeptidazlar olmak üzere üç sınıfa ayrılırlar [75].

5.2.2 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, metalloproteazlar ve aspartik proteazlar olmak üzere dört alt gruba ayrılırlar [8,75].

Serin proteazlar

Serine proteazlar aktif bölgelerinde bulunan serine grubuna göre karakterize edilirler. Genellikle nötral ve alkali pH değerlerinde aktif olan serine proteazları için optimum pH aralığı 7-11'dir. Serine proteazlar kendi içlerinde Serine alkali proteazlar ve Subtilisinler olmak üzere iki alt sınıfa ayrılırlar [75].

Sistein proteazlar

Katalitik merkezlerinde –SH (thiol) fonksiyonel grubu bulunan cysteine proteazları serine proteazlarına benzer endopeptidazlardır. Serine proteazlarından farklı olarak nötral pH değerlerinde yüksek aktivite gösterirler [8].

Metallo proteazlar

Temel bir metal atomu, genellikle Zn, içerirler ve nötral pH değerlerinde aktivite gösterirler. Stabiliteleri Ca²⁺ varlığında artar, ancak metal atomunu uzaklaştırıcı güçlü bir ajan (EDTA gibi) varlığında inaktive olurlar [8].

Aspartik proteazlar

Aktif bölgelerinde bulunan aspartik asit molekülüne bağlı olarak asidik proteazlar olarak tanımlanırlar. Düşük pH değerlerinde (pH 3-4) aktivite gösterirler [75].

5.3 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 bileşendirler. 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 serine proteazlarıdır [75].

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 makropeptidaz oluşturmak ve sütü pıhtılaştırmak için kullanılırlar [75].

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 [32,75].

Soya ürünlerinin üretimi: Soya yüksek protein içeriğine sahip değerli bir besin maddesidir. Bu alanda proteazlar birçok gıdada katkı maddesi olarak kullanılan soya proteinin modifikasyonu ve fonksiyonel özelliklerini geliştirmek için kullanılmaktadırlar [8,75].

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 peptitin tam ortasında bulunan piroline molekülü de acı tada sebep olabilir. Hidrolizattaki acı tad hidrofobik amino asitler ve pirolin molekülünün peptidazlar ile parçalanması ile giderilebilir [75,79].

Aspartam sentezi: Aspartam yapay tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Proteazlar hidroliz enzimleridir ancak belirli ve kontrollü kinetik koşullar altında ters reaksiyonda katalizlerler. *Bacillus thermoproteolyticus* kaynaklı bir proteaz olan thermolysin aspartam sentezinde kullanılmaktadır [75].

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 (mikrobiyal proteazlar), deriden tüy ve yünün giderilmesi için (alkali proteazlar) kullanılmaktadır [75].

İlaç endüstrisi

Geniş çeşitlilik ve özellik gösteren proteaz enzimleri ilaç endüstrisinde tedavi etkinliği yüksek ajanların geliştirilmesinde kullanılmaktadır [75].

LİTERATÜRDE SUSAM PROTEİNİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Günümüzde, hayvansal kaynaklı proteinlere alternatif olan bitkisel kaynaklı proteinlerin gıda katkı maddeleri olarak kullanımı oldukça artış göstermiştir. Bitkisel protein kaynakları arasında en çok soya proteinin hidrolizi üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Susam küspesi hayvan yemi olarak kullanılan değerli bir protein kaynağıdır. Literatürde susam ve susam küspesi hidrolizi üzerine gerçekleştirilen sınırlı çalışmalar, susam proteininin hidrolizatlarının fonksiyonel özelliklerini iyileştirmeye yönelik olup, bu çalışmada susam proteininin enzimatik hidroliz reaksiyon kinetiği incelenmemiştir. Bu bölümde; susam ve susam küspesinin, enzimatik hidrolizi ve fonksiyonel özellikleri ile ilgili literatürde yer alan sınırlı çalışmalar özetlenmiştir.

Cano-Medina vd. [80] tarafından 2011 yılında gerçekleştirilen çalışmada, susam protein konsantresinin emülsiyon ve köpürme karakteristiklerine yağ konsantrasyonu ve pH'ın etkisi incelenmiştir. Susam protein konsantresini basitleştirilmiş proses ile elde edilmiş ve ticari soya konsantresi ile özellikleri karşılaştırılmıştır. Susam protein konsantresinin maksimum emülsiyon kapasitesi asidik ve bazik pH değerlerinde % 38 bulunurken, ticari soya konsantresi için bu değer % 44 olarak bulunmuştur. Emülsiyon kapasitesi yağ konsantresinin artması ile artmakta, kapasite % 7.8 değerinden % 60 değerine yükselmiştir. Susam protein konsantresinin emülsiyon stabilitesi asidik pH değerlerinde bazik pH değerlerine göre daha yüksek bulunmuştur. Maksimum emülsiyon stabilitesi, 55 g/L örnek konsantrasyonundan yüksek ve 550 g/L yağ konsantrasyonundan düşük değerlerde elde edilmektedir. Susam protein konsantresinin köpürme kapasitesi için elde edilen değerler soya konsantresinden daha

yüksek bulunmuştur. Bu bulgular, susam protein konsantresinin gıda endüstrisinde hammadde olarak potansiyel kullanıma sahip olduğunu göstermektedir.

Onsaard vd. [81] tarafından 2010 yılında gerçekleştirilen çalışmada, üç farklı susam protein konsantresi, iki farklı yöntem ile yağsız susam unundan hazırlanmıştır. Kullanılan yöntemler i) tuz çözeltisi ve izoelektrik çöktürme (SPC-salt); ii) pH 9 ve pH 11 değerinde baz çözeltisi ve izoelektrik çöktürme (SPC-pH 9 ve SPC-pH 11). Susam protein konsantrelerinin protein verimi ve kimyasal kompozisyonu belirlenmiş ve bazı fonksiyonel özellikleri soy protein izolatı ile karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. Kjeldahl prosedürü temel alınarak protein verimleri SPC-salt, SPC-pH 9 and SPC-pH 11 için sırası ile % 19.5, % 21.9 ve % 35.3 olarak bulunmuştur. SPC-pH 9 (% 82.9) ve SPC-pH 11 (% 83.3) için protein içerikleri SPC-salt (% 75.5) örneğinkinden yüksek bulunmuştur. Minimum protein çözünürlüğü tüm örnekler için pH 5 değerinde bulunmuştur. Tüm SPC örnekleri pH 3, 8 ve 9 değerlerinde soy protein izolatına göre çözünürdür. Emülsiyon aktivite indeksi (EAI) tüm susam protein konsantresi örnekleri için soy protein izolatından daha yüksek; emülsiyon stabilite indeksi değerleri ise daha düşük bulunmuştur. Su tutma ve yağ tutma kapasiteleri ise soy protein izolatından daha düşüktür.

Kanu vd. [82] tarafından 2009 yılında gerçekleştirilen çalışmada, susam protein hidrolizatları değişik proteazlar kullanılarak yağı alınmış susam unundan elde edilmiştir. Farklı şartlar altında, proteazların hidroliz prosesine etkisi farklı olmuştur. 60°C ve pH 8 değerinde en yüksek protein dönüşüm oranı Alcalase 2.4 L enzimi ile elde edilmiş olup, Flavourzyme enzimi Alcalase enziminden sonraki yüksek dönüşümü gerçekleştirmiştir. Hidroliz proses parametreleri (sıcaklık, pH, Enzim/Substrat oranı, zaman) hidroliz derecesinin optimizasyonu için Response Surface Metodoloji yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Yağsız susam protein izolatının çözünürlüğü artan pH ile artarken, hidroliz derecesi % 1.19 değerinden % 18.8 değerine değişmektedir. Susam protein hidrolizatının oldukça yüksek köpürme özellikleri ile yağı alınmış susam tozuna göre daha iyi emülsifiye olma ve su/yağ tutma kapasitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, köpük stabilitesinin zaman ile azaldığı görülmüştür. Alcalase enzimi kullanılarak elde edilen hidrolizatın, Flavourzyme enzimi ile elde edilen hidrolizattan daha iyi fonksiyonel özellik gösterdiği belirtilmiştir.

Sreedevi vd. [83] tarafından 2009 yılında gerçekleştirilen çalışmada, susam protein hidrolizatlarının köpürme özellikleri incelenmiştir. Susam protein izolatları tripsin enzimi kullanılarak hidrolizlenmiştir. Hidroliz derecesi (% 6, 8 ve 10) pH-stat yöntemi ile belirlenmiştir. Köpürme kapasitesi ve köpük stabilitesi elektriksel iletkenlik metodu ile tespit edilmiştir. Köpürme özelliklerine pH ve hidroliz derecesinin etkisi incelenmiştir. Tripsin enzimi ile elde edilen protein hidrolizatların daha iyi köpürme kapasitesine sahip olduğu görülmüş ve bu yüzden hidrolizatların özellikle dondurma üretiminde potansiyel gıda katkısı olarak kullanılabileceği görülmüştür.

Sreedevi ve Sivasankar [40] tarafından 2009 yılında gerçekleştirilen çalışmada, susam protein hidrolizatlarının emülsiyon özellikleri incelenmiştir. Susam protein izolatları tripsin ve karışık proteazlar kullanılarak hidrolizlenmiştir. Hidroliz derecesi (% 6, 8 ve 10) pH-stat yöntemi ile belirlenmiştir. Emülsiyon aktivitesi, emülsiyon stabilitesi ve emülsiyon stabilitesine zaman ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Emülsiyon özelliklerine pH ve hidroliz derecesinin etkisi çalışılmıştır. Tripsin enzimi diğer bakteriyel proteazlara göre daha yüksek hidroliz verimi sağlamıştır. Tripsin enzimi ile elde edilen protein hidrolizatlarının izolatlara göre daha iyi emülsiyon özelliklerine sahip olduğu bulunmuştur.

Kanu vd. [84] tarafından 2007 yılında gerçekleştirilen çalışmada, susam protein izolatının fonksiyonel özellikleri incelenmiştir. Susam protein izolatları farklı pH, sıcaklık, zaman ve toz/su oranı değerlerinde hazırlanmıştır. Çalışmanın amacı, susam protein izolat üretiminin izolata negatif etkisi olup olmadığını görmek için susam protein izolatı ile ticari soya protein izolatının karşılaştırılmasıdır. Elde edilen sonuçlara göre, susam protein izolatlarının fonksiyonel performansları ticari soya proteinleri ile neredeyse aynı bulunmuştur. Herikisi de aynı pH aralığında benzer çözünürlük eğrileri göstermiştir. Ancak, ticari soya proteini pH 4.5-5 aralığında çok düşük protein çözünürlüğü (% 5-10) belirlenmiştir. Aynı pH aralığında susam proteininin çözünürlüğü daha yüksek (% 15-19) bulunmuştur. Yağ absorplama ve su tutma kapasitesi incelendiğinde, susam proteininin düşük yağ absorplama ve yüksek su tutma kapasitesine sahip olduğu, ancak sıkıştırılmış dansitesinin de düşük olduğu görülmüştür. Düşük ve yüksek sıcaklıklar için viskozite performansı benzer bulunmuş ve susam protein izolatları pl noktasının altında ve üstünde yüksek köpük kapasitesi

göstermiştir. Susam protein izolatının iyi fonksiyonel özelliklerinden dolayı değişik gıda formulasyonlarında protein katkısı olarak kullanılabilceği tespit edilmiştir.

Khalid vd. [85] tarafından 2003 yılında gerçekleştirilen çalışmada, susam tohumlarının çözünürlüğü ve fonksiyonel özelliklerinin pH ve tuz konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi incelenmiştir. Tohumların protein içeriği % 47.70'dir. Minimum protein çözünürlüğü pH 5, maksimum protein çözünürlüğü ise pH 3 iken bulunmuştur. Emülsifiye olma kapasitesi, aktivitesi ve emülsiyon stabilitesi, aynı şekilde köpürme kapasitesi ve stabilitesi pH seviyesinden ve tuz konsantrasyonundan etkilenmektedir. Düşük değerler asidik pH ve yüksek tuz konsantrasyonlarında görülür.

Bandyopadhyay ve Ghosh [44] tarafından 2002 yılında gerçekleştirilen çalışmada, % 40-50 protein içeriğine sahip ve sülfür içeren amino asitlerin varlığından dolayı insan beslenmesi için önemli bir protein kaynağı olan yağsız susam küspesinden susam protein izolatı üretilmiştir. Protein izolatı, papain enzimi ile protein hidrolizatı üretimi için başlangıç maddesi olarak kullanılmıştır. Protein hidrolizatlarının, değişik pH değerlerinde çözünürlükleri, emülsiyon aktivite indeksi ve emülsiyon stabilite indeksi olarak emülsiyon özellikleri, köpük kapasitesi ve köpük stabilitesi olarak köpüklenme özellikleri ve moleküler ağırlık dağılımı incelenmiştir. 10 dakikalık hidroliz prosesi sonucunda maksimum peptid bağ ayrımı olduğu hidroliz derecesinden gözlemlenmiştir. Protein hidrolizatları orijinal protein izolatından daha iyi fonksiyonel özellikler göstermektedir. Protein çözünürlüğünde, emülsiyon aktivite indeksi ve emülsiyon stabilite indeksinde önemli bir artış gözlemlenmiştir. Çözünürlükteki en büyük artış pH 5 ile pH 7 değerleri arasında görülmüştür. Hidrolizatların molekül ağırlığı hidroliz prosesi boyunca azalmıştır. Protein hidrolizatlarının gelişmiş bu fonksiyonel özellikleri, hidrolizatların özellikle gıda, eczacılık ve bağlantılı endüstrilerde yararlı olarak kullanımını sağlamaktadır.

Taha vd. [86] tarafından 2002 yılında gerçekleştirilen çalışmada, soya, susam tohumu ve pirinç kepeği proteinleri papain ve bromelain enzimleri kullanılarak hidrolize edilmiştir. Deneyler her enzimin her bir substrat için ayrı ayrı optimum şartlarını açıklamak için yapılmıştır. Sonuç olarak papain enzimi için yüksek aktiviteye soya, susam ve pirinç kepeği için sırası ile E/S oranı 0.06, 0.29, 0.19 ve pH 7.2, 7.0, 7.0

değerlerinde ulaşılmıştır. Üç substrat için de papain enzimi için optimum sıcaklık 50°C'dir. Bromelain enzimi kullanılması durumunda ise optimum şartlar; E/S oranı 0.067, 0.058, 0.21 (sırası ile), pH 6.0 ve 45°C'dir.

Taha ve Ibrahim [67] tarafından 2002 yılında gerçekleştirilen çalışmada, daha önceki çalışmada (Taha vd., 2002) belirlenen optimum koşullarda elde edilen farklı hidroliz derecesine sahip hidrolizat çözeltilerinin fonksiyonel özellikleri incelenmiştir. İncelenen fonksiyonel özellikler; ıslanabilirlik, akışkanlık, nitrojen çözünebilirliği, su absorplama kapasitesi, yağ tutma kapasitesi, jelleşme, emülsifiye olma kapasitesi, köpük stabilitesidir. Sonuçlar hidroliz derecesindeki artışla protein çözünürlüğünün direk olarak ilişkili olduğunu göstermektedir.

Inyang ve Iduh [45] tarafından 1996 yılında gerçekleştirilen çalışmada, susam protein konsantrasyonunun protein çözünürlüğüne, emülsifikasyona ve köpürme özelliğine pH ve NaCl konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. Konsantrasyonun protein içeriği % 70.7'dir. Protein çözünürlüğü, emülsifikasyon ve köpürme kapasiteleri pH ve iyonik güç ile değişmektedir. Protein çözünürlüğü en düşük pH 4 değerinde % 2.1 olarak bulunmuş olup, pH 2 değerinde % 6.6'dan pH 10 değerinde % 13.1 değişmiştir. Çözünürlük iyonik gücün artışı ile artmaktadır. Emülsiyon kapasitesi pH 2 değerinde 6.2 ml yağ/g örnek değerinden pH 10 değerinde 19.4 ml yağ/g örnek değerine değişmektedir. Tuz konsantrasyonunun 0 M'dan 1.0 M konsantrasyonuna artışı ile emülsiyon kapasitesi 11.5 ml yağ/g örnek değerinden 20.9 ml yağ/g örnek değerine artmıştır. Emülsiyon stabilitesi NaCl konsantrasyonu ile artarken, en stabil köpük oluşumu 0.5 M NaCl konsantrasyonunda gerçekleşmiştir.

Perez ve Saad [87] tarafından 1984 yılında gerçekleştirilen çalışmada, düşük çözünürlüğü nedeniyle gıda endüstrisinde kullanımı sınırlı olan susam proteininin bu özelliğinin geliştirilebilmesi için ticari proteaz enzimleri ile enzimatik hidrolizi gerçekleştirilmiştir. Hidroliz reaksiyonu için iki farklı bakteriyel proteaz olan Neutrase 0.5L ve Alcalase 0.6L kullanılmıştır. Neutrase 0.5L kullanılarak gerçekleştirilen deneylerde hidroliz için optimum şartlar; % 6 substrat konsantrasyonu, % 3 enzim/substrat oranı, 50°C sıcaklık ve pH 7 olarak bulunmuş; ve bu şartlardaki hidroliz derecesi % 8 olarak hesaplanmıştır. Diğer taraftan, Alcalase 0.6L kullanılarak

gerçekleştirilen deneylerde ise optimum şartlar; % 8 substrat konsantrasyonu, % 2.3 enzim/substrat oranı, 58°C sıcaklık ve pH 8 olarak bulunmuş; ve bu şartlardaki hidroliz derecesi % 10 olarak hesaplanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

7.1 Kullanılan Cihazlar

Reaktör

Gerçekleştirilen enzimatik hidroliz deneyleri için, 400 ml toplam hacime sahip (reaksiyon çalışma hacmi, 200 ml), 8 cm çapında, 10.5 cm yüksekliğinde cam reaktör kullanılmıştır.

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 peristaltik pompa kombine olarak kullanılmıştır.

pH kontrol edici

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

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

Peristaltik 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 absorpsiyon değerlerini okumak için Döteryum ve Wolfram lambalı, 200-1100 nm aralığında okuma yapabilen, Shimadzu marka UV-150-02 çift ışınlı 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 titanyum 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.

Homojenizatör

Susam küspesi protein hidrolizatlarının fonksiyonel özelliklerinin incelenmesi amacı ile fonksiyonel özellik deneyleri için, IKA Ultra Turrax T 18 homojenizatör sistemi kullanılmıştır.

7.2 Kimyasal Maddeler

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

Proteaz enzimleri

Susam küspesi proteininin hidroliz işleminde kullanılan proteaz enzimleri (Çizelge 7.1) ticari enzimler olup Novozymes (Novo Nordisk A/S Danimarka) firmasından sağlanmıştır.

Çizelge 7.1 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 | Endotripsin |

Susam Küspesi

Hidroliz reaksiyonlarında kullanılan susam küspesi (protein içeriği % 37.8) Necdet Bükey A.Ş. firmasından temin edilmiştir. Susam küspesinin amino asit kompozisyon analizi TÜBİTAK tarafından gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 7.2'de sunulmuştur.

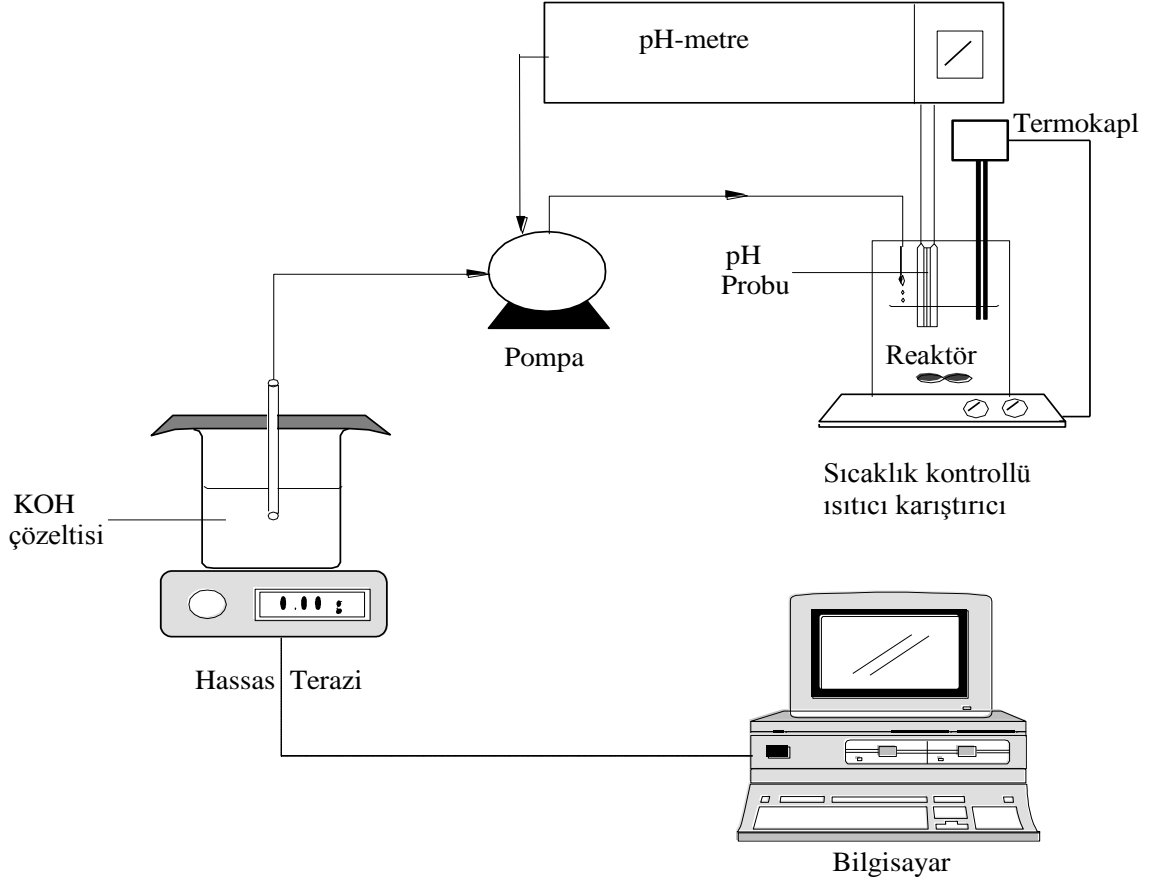
Çizelge 7.2 Susam küspesi proteini amino asit kompozisyonu

| Amino asit | mg/g protein | mmol/g protein |
|----------------|--------------|----------------|
| Alanin | 67.29 | 0.7552 |
| Glisin | 49.96 | 0.6655 |
| Valin | 59.32 | 0.5070 |
| Lösin | 104.14 | 0.7939 |
| İzolösin | 49.051 | 0.3739 |
| Treonin | 58.17 | 0.4884 |
| Serin | 55.17 | 0.5249 |
| Prolin | 68.06 | 0.5912 |
| Aspartik asit | 45.97 | 0.3454 |
| Metiyonin | 28.23 | 0.1892 |
| Glutamik asit | 26.85 | 0.2047 |
| Fenilalanin | 161.73 | 1.0992 |
| Lizin | 82.73 | 0.5009 |
| Histidin | 11.05 | 0.0756 |
| Triozin | 39.64 | 0.2555 |
| Hidroksiprolin | 47.78 | 0.2637 |
| Arginin | 21.13 | 0.1213 |
| Triptofan | 23.730 | 0.1162 |

7.3 Protein Hidroliz Deneyleri

Hidroliz reaksiyonları, sıcaklık, pH ve karıştırıcı hızı kontrol modülleri ile kombine edilmiş, bir cam reaktör içerisinde gerçekleştirilmiştir. Hidroliz reaksiyonları için hazırlanan susam küspesi çözeltilisinin reaktör sisteminde; pH, sıcaklık ve karıştırıcı hızı ayarları yapıldıktan ve sistem stabil hale geldikten sonra, enzim ilavesi ile reaksiyon 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 sınırındadır. Protein hidroliz deneyleri için kullanılan deney düzeneği Şekil 7.1’de verilmiştir.



Şekil 7.1 Protein hidrolizi deney düzeneği

7.4 pH-Stat Metodu ile Hidroliz Derecesinin Belirlenmesi

pH-stat, 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 [88], 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 [8].

7.4.1 Materyaller

KOH çözeltisi

Hidroliz reaksiyonlarının oto titrasyonu için kullanılan 0.2 M KOH çözeltisi, 11.2 g KOH kristalini 1000 ml saf suda çözerek hazırlanmıştır.

7.4.2 Hidroliz derecesinin hesaplanması

Hidroliz derecelerinin hesaplanmasında aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır.

$$DH = B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{P_M} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100\% \quad (7.1)$$

B : Baz miktarı (ml)

N_b : Baz normalitesi

α : α -NH gruplarının ortalama ayrılma sabiti

P_M : Protein miktarı (g)

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

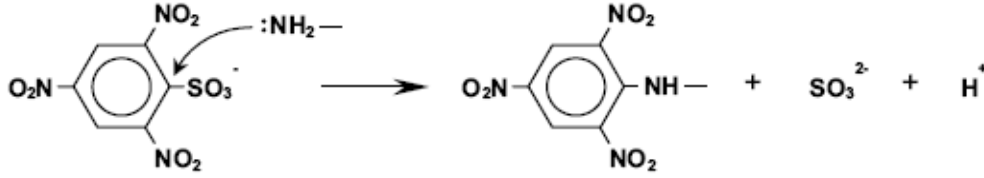
HD : % Hidroliz derecesi

7.5 TNBS Yöntemi ile Serbest Amino Asit Gruplarının Belirlenmesi

Trinitrobenzensülfonik asit (TNBS) yöntemi, serbest amino asit gruplarının konsantrasyonunu belirlemek amacıyla endüstride en yaygın kullanılan yöntemdir. Enzimatik hidroliz reaksiyonları hususunda geçerliliği ispatlanmış olan bu yöntem ilk olarak Okuyama ve Satake [89], Satake vd. [90] tarafından kullanılmış, daha sonra Adler-Nissen [91] tarafından yenilenmiştir.

TNBS metodu, TNBS ile pirimer amino asit gruplarının arasındaki reaksiyon (Şekil 7.2) 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.



Şekil 7.2 TNBS'nin amino asit grupları ile reaksiyonu [91]

7.5.1 Materyaller

TNBS çözeltisi

% 0.1'lik (ağırlık/hacim) trinitrobenzensülfonik 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 jöle alüminyum folyo ile kaplanmıştır.

Sodyum fosfat tampon çözeltisi

0.2125 M alkali fosfat tampon çözeltisi hazırlamak için, % 3.32'lik (ağırlık/hacim) NaH₂PO₄.2H₂O çözeltisi, pH değeri 8.2 değerine ulaşmaya kadar yavaşça % 3.78'lik (ağırlık/hacim) Na₂HPO₄.2H₂O çözeltisine ilave edilmiştir (hacimsel oran yaklaşık olarak 43:1000). % 3.32'lik (ağırlık/hacim) NaH₂PO₄.2H₂O ve % 3.78'lik (ağırlık/hacim) Na₂HPO₄.2H₂O çözeltileri, NaH₂PO₄.2H₂O ve Na₂HPO₄.2H₂O 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'lik HCl çözeltisinin saf su ile seyreltilmesi ile hazırlanmıştır.

Leucin standart

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

7.5.2 Yöntem

Reaksiyon çözeltisinden belirli zaman aralıkları ile alınan hidrolizat örnekleri, enzim inaktive edildikten ve santrifüjlendikten sonra, amino asit 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 okunmuştur. Kontrol çözeltisi için 0.25 ml hidrolizat örneği yerine 0.25 ml % 1'lik SDS kullanılmıştır. Standart olarak 1.5 mM L-leucine kullanılmıştır. Örnek analizleri 3'er kez tekrar edilmiş ve elde edilen değerlerin ortalamaları alınmıştır. Tekrarlanan analizler arasındaki maksimum fark \pm % 5 sınıırındadır.

7.5.3 Hesaplamalar

Leucine amino asit eşdeğeri, leu-NH₂ (meqv/g protein) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$leu-NH_2 (meqv/g) = \frac{(Abs_{\text{örnek}} - Abs_{\text{kontrol}})}{(Abs_{\text{standart}} - Abs_{\text{kontrol}})} \times C_{\text{standart}} \times SF \times P_M \quad (7.2)$$

Abs : Absorbans değerleri

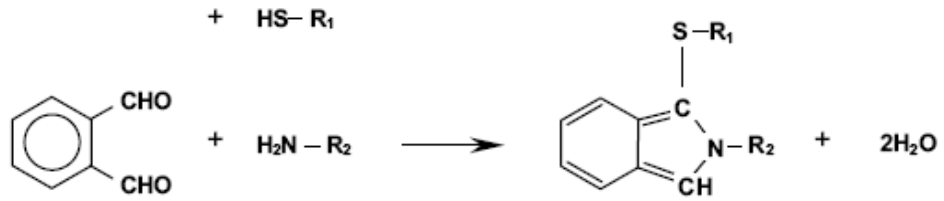
C_{standart} : Standart olarak kullanılan leucine konsantrasyonu (meqv/L)

SF : Seyrelme faktörü

P_M : Çözeltideki toplam protein miktarı (g/L)

7.6 OPA Yöntemi ile Serbest Amino Asit Gruplarının Belirlenmesi

Nielsien vd. [92] tarafından, TNBS yöntem ve metodolojisi temel alınarak geliştirilen O-fitaldialdehit (OPA) yöntemi, serbest amino asit gruplarının konsantrasyonunu belirlemek amacıyla kullanılan yeni bir yöntemdir. Yöntemi TNBS yöntemininden farklı kılan nokta içerdiği kimyasal reaksiyondur. OPA ve serbest amino asit grupları arasındaki reaksiyon, TNBS yerine beta-merkaptetanol varlığında gerçekleşir (Şekil 7.3). Bu reaksiyonda OPA'nın birincil amino asit 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 7.3 OPA reaksiyonu [92]

7.6.1 Materyaller

OPA ayıracı

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

Serine standart

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

7.6.2 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 okunmuştur. Kontrol çözeltisi için 400 µl hidrolizat örneği yerine 400 µl su, standart için ise hidrolizat örneği yerine 400 µl 0.9516 mM’lık Serine çözeltisi kullanılmıştır. Örnek analizleri 3’er kez tekrar edilmiş ve elde edilen değerlerin ortalamaları alınmıştır. Tekrarlanan analizler arasındaki maksimum fark \pm % 5 sınırlıdır.

7.6.3 Hesaplamalar

Serine amino asit eşdeğeri, serine-NH₂ (meqv/g protein) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$serine-NH_2 (meqv/g) = \frac{(Abs_{\text{örnek}} - Abs_{\text{kontrol}}) \times C_{\text{standart}} \times SF}{(Abs_{\text{standart}} - Abs_{\text{kontrol}}) P_M} \quad (7.3)$$

Abs : Absorbans değerleri

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

SF : Seyrelme faktörü

P_M : Çözeltideki toplam protein miktarı (g/L)

7.7 Folin Lowry Yöntemi ile Çözünen Protein Miktarının Belirlenmesi

İlk olarak Lowry vd. [93] 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 [93];

1. Bakır iyonu ile amid bağı arasında oluşan kompleks sonucu alkali ortamda indirgenmiş bakır, Cu⁺, oluşur.
2. Folin-Ciocalteu maddesi tirozin 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.

7.7.1 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.

7.7.2 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. Örnek analizleri 3'er kez tekrar edilmiş ve elde edilen değerlerin ortalamaları alınmıştır. Tekrarlanan analizler arasındaki maksimum fark \pm % 5 sınırlıdır.

7.7.3 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 absorbands değerleri Çizelge 7.3'te, ortalama absorbands değerlerine karşı çizilen standart eğri Şekil 7.4'te verilmiştir. Protein konsantrasyonu hesaplamak için kullanılan denklem Linear regresyon analizi sonucunda;

$$C \text{ (g/L)} = 0.4654 \times (\text{Absorbans değeri}) - 0.0279$$

olarak belirlenmiştir. Elde edilen denklem için standart sapma (σ) ve regresyon katsayısı (R^2) değerleri sırasıyla 0.0189 ve 0.9887 olarak bulunmuştur.

Protein çözünürlüğü ($X_{PÇ}$);

$$X_{PÇ} = \frac{C_t - C_0}{C_{\text{Toplam}} - C_0} \quad (7.4)$$

C_t : Herhangi bir zamandaki protein konsantrasyonu, (g/L)

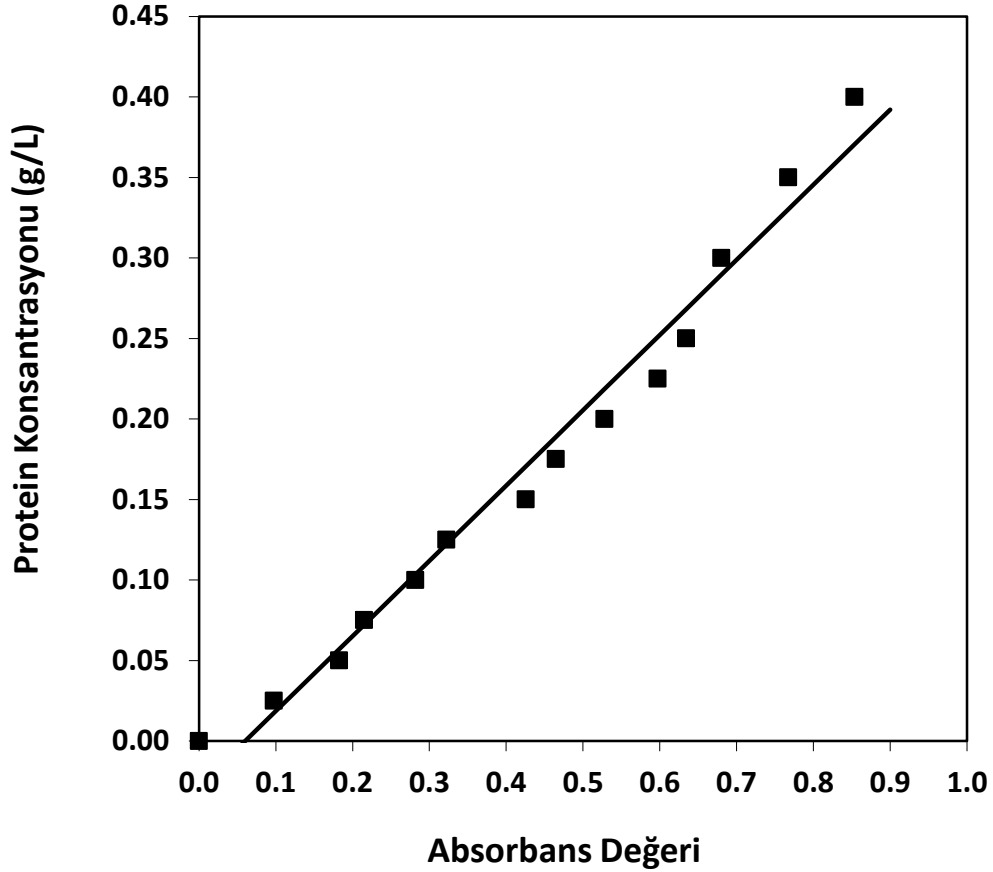
C_0 : Hidroliz öncesi ortamda bulunan çözünmüş protein miktarı, (g/L)

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

olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 7.3 Folin Lowry yöntemi için standart eğri verileri

| BSA Kons. (mg/ml) | Deneme 1 Absorbans | Deneme 2 Absorbans | Deneme 3 Absorbans | Ort. Absorbans |
|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.025 | 0.106 | 0.0905 | 0.096 | 0.098 |
| 0.050 | 0.202 | 0.1585 | 0.187 | 0.183 |
| 0.075 | 0.219 | 0.199 | 0.227 | 0.215 |
| 0.100 | 0.275 | 0.2785 | 0.292 | 0.282 |
| 0.125 | 0.322 | 0.3325 | 0.312 | 0.322 |
| 0.150 | 0.43 | 0.418 | 0.428 | 0.425 |
| 0.175 | 0.444 | 0.4635 | 0.486 | 0.465 |
| 0.200 | 0.528 | 0.519 | 0.537 | 0.528 |
| 0.225 | 0.612 | 0.5785 | 0.601 | 0.597 |
| 0.250 | 0.614 | 0.637 | 0.652 | 0.634 |
| 0.300 | 0.65 | 0.695 | 0.695 | 0.680 |
| 0.350 | 0.723 | 0.7835 | 0.795 | 0.767 |
| 0.400 | 0.836 | 0.8435 | 0.881 | 0.854 |



Şekil 7.4 Folin Lowry yöntemi için standart eğri

7.8 Enzim Aktivite Tayini

Literatürde proteolitik aktivite tayini için kullanılan birçok yöntem mevcuttur. Genel olarak bu yöntemlerde aktivite tayini için kullanılan substratlar kazein, hemoglobün ve azokazeindir [94-99]. Kazeinin veya hemoglobünün kullanıldığı aktivite tayin yöntemlerinde enzimin substratla inkübasyonundan sonra açığa çıkan protein miktarı Lowry [93] veya Bradford [100] yöntemleri ile tayin edilmekte olup enzim aktivitesi buna göre belirlenmektedir. Ancak, bu çalışmada reaksiyon çözeltisinden alınan örnekler saf enzim çözeltileri olmadığı, aynı zamanda çözünmüş susam proteini de içerdiğinden, yapılan deneysel çalışmalar göstermiştir ki, bu iki substratın (kazein ve hemoglobün) 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 [94].

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. [94] tarafından tanımlanan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır.

7.8.1 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.

7.8.2 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 örneklere 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 sınıırındadır.

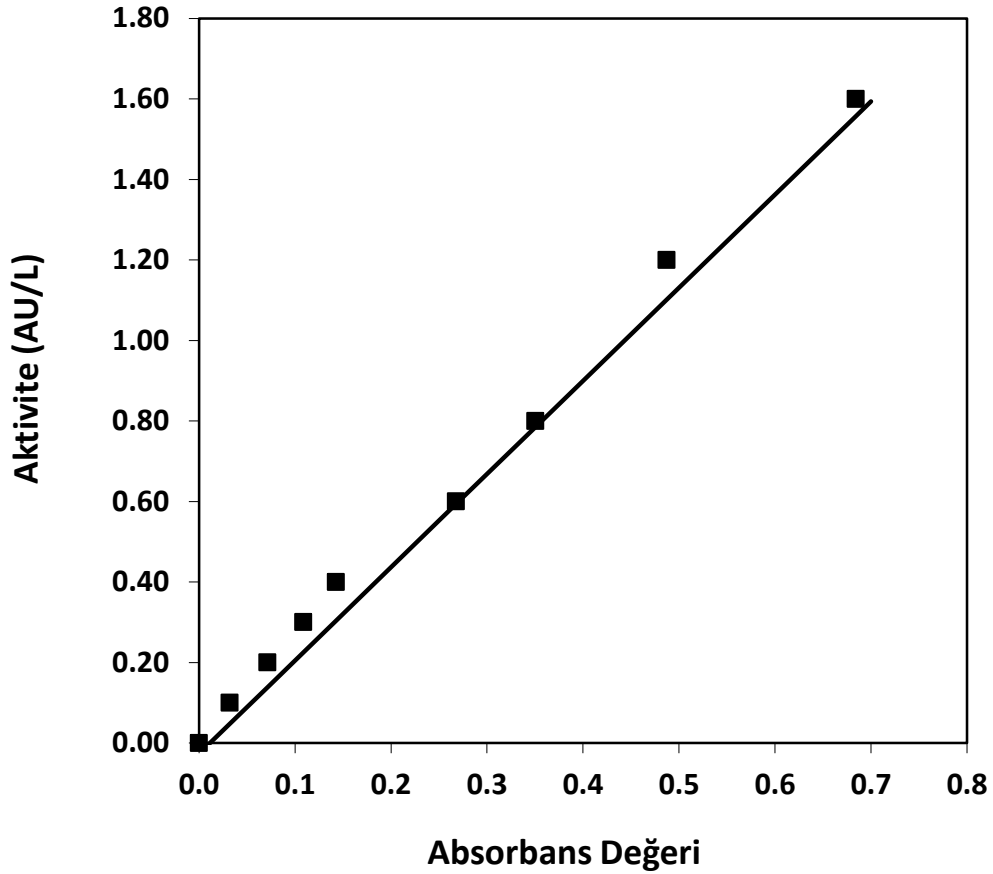
7.8.3 Hesaplamalar

Yöntem için standart eğrinin hazırlanması

Aktivite tayini için, alkalaz 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 7.4'te verilmiş, ortalama absorbans değerlerine karşı çizilen aktivite değerleri Şekil 7.5'te sunulmuştur.

Çizelge 7.4 Aktivite tayini için standart eğri verileri

| Enzim Aktivitesi (AU/L) | Deneme 1 Absorbans | Deneme 2 Absorbans | Deneme 3 Absorbans | Ort. Absorbans |
|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.1 | 0.035 | 0.033 | 0.028 | 0.032 |
| 0.2 | 0.071 | 0.069 | 0.074 | 0.071 |
| 0.3 | 0.112 | 0.109 | 0.105 | 0.109 |
| 0.4 | 0.147 | 0.139 | 0.142 | 0.143 |
| 0.6 | 0.271 | 0.264 | 0.268 | 0.268 |
| 0.8 | 0.337 | 0.354 | 0.360 | 0.350 |
| 1.2 | 0.502 | 0.483 | 0.476 | 0.487 |
| 1.6 | 0.694 | 0.682 | 0.677 | 0.684 |



Şekil 7.5 Aktivite tayini için standart eğri

Linear regrasyon analizi sonucunda aktivite hesabı için kullanılan denklem;

$$a \text{ (AU/L)} = 2.3142 \times (\text{Absorbans değeri}) + 0.0265$$

olarak belirlenmiştir. Elde edilen denklem için standart sapma (σ) ve regresyon katsayısı (R^2) değerleri sırasıyla; 0.0355 ve 0.9981 olarak bulunmuştur.

% Aktivite değeri,

$$A = 100 \times \frac{a_t}{a_0} \quad (7.5)$$

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

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

A_t : herhangi bir zamandaki % enzim aktivitesi

olarak tanımlanmıştır.

7.9 Susam Küspesi Protein Hidrolizatının Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi

7.9.1 Su Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi

Protein hidrolizatlarının su tutma kapasitesi Vioque vd. [71] tarafından bildirilen yöntemle ölçülmüştür. Su tutma kapasitesi için 0.5 g protein örnekleri üzerine 5 ml saf su ilave edilmiştir. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında bekletilmiş, 3000 x g'de 30 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Protein örneklerine ilave edilen saf suyun başlangıçta hacmi ile süpernatant hacminin farkı belirlenmiş ve sonuçlar mL absorplanan su /g protein olarak hesaplanmıştır.

7.9.2 Yağ Tutma Kapasitesi Belirlenmesi

Protein hidrolizatlarının yağ tutma kapasitesi Vioque vd. [71] tarafından bildirilen yöntemle ölçülmüştür. Yağ tutma kapasitesi için 0.5 g protein örnekleri 5 ml mısır yağı ile 30 dakika karıştırılmış; daha sonra 3000 x g'de 30 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Protein hidrolizatlarından ayrılan yağın hacmi ölçülmüş ve sonuçlar mL absorplanan yağ /g protein olarak hesaplanmıştır.

7.9.3 Köpük Kapasitesi ve Stabilitesinin Belirlenmesi

Protein örneklerinin köpürme özellikleri Chabanon vd. [101] tarafından belirtilen yöntemle köpük kapasitesi ve stabilitesi olarak belirlenmiştir. 50 ml % 1.5 (ağırlık/hacim) protein çözeltisi 8000 devir/dak hızında 5 dakika süre ile homojenizatörde (Ultra Turrax, IKA T18 basic) karıştırılarak köpük oluşumu sağlanmıştır. Örneklerin köpük kapasiteleri aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\text{Köpük Kapasitesi(\%)} = \frac{V_1 - V_2}{V_2} \times 100 \quad (7.6)$$

V_1 : Homojenizasyon sonrası toplam hacim (ml)

V_2 : Homojenizasyon öncesi toplam hacim (ml)

Örneklerin köpük stabilitesi ise oda sıcaklığında 10, 30, 45 ve 60 dakika sonundaki köpük hacmi (ml) olarak belirlenmiştir.

7.9.4 Emülsiyon Aktivite İndeksi (EAI) ve Emülsiyon Stabilite İndeksinin (ESI) Belirlenmesi

Protein örneklerinin emülsiyon aktivite indeksi (EAI) ve emülsiyon stabilite indeksi (ESI) Pearce and Kinsella [102] tarafından belirtilen metoda göre ölçülmüştür. % 0.1 (ağırlık/hacim)'lik 6 ml protein çözeltisi ve 2 ml Mısır yağı emülsiyon oluşturmak amacıyla homojenizatör (Ultra Turrax, IKA T18 basic) ile en yüksek devirde 1 dakika süreyle homojenize edilmiştir. Emülsiyonun alt kısmından alınan 50 µl örnek 10 ml % 0.1'lik (w/v) sodyum dodesil sülfat çözeltisi (SDS) ile seyreltilmiştir. Karışımın 500 nm'deki absorbansı okunmuş (0. dakikadaki) ve bu absorbans değeri kullanılarak aşağıdaki formül yardımıyla EAI değeri hesap edilmiştir.

$$EAI(m^2 / g) = \frac{2 \times T \times (A_0 \times DF)}{c \times \phi \times 10000} \quad (7.7)$$

T=2.303

A₀: 0. dakikadaki absorbans değeri

DF: Seyreltme faktörü (100)

c: Çözeltideki protein konsantrasyonu (g/ml)

φ: Yağın hacimsel fraksiyonu

Örneklerin ESI değerleri, emülsiyonun 10 dakika bekletilmesinden sonra alt kısmından alınan 50 µl örneğin 10 ml % 0.1'lik (ağırlık/hacim) SDS ile seyreltilmesi ve absorbansının 500 nm'de okunması (10. dakikadaki) sonucunda elde edilen verilerden aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır.

$$ESI(dak) = \frac{A_0 \times \Delta t}{A_0 - A_{10}} \quad (7.8)$$

T₀ : 0. dakikadaki absorbans

T₁₀: Homojenizasyon işleminden 10 dakika sonra okunan absorbans

t: Emülsiyonun bekleme süresi (10 dakika)

7.10 Amino Asit Kompozisyon Analizi

Susam küspesinin ve deneyler sonucunda elde edilen hidrolizat çözeltilerinin amino asit kompozisyon analizleri TÜBİTAK tarafından, Shimadzu UFLC LC-20 AT cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

7.11 Teorik çalışma

Nümerik hesaplamalar için MATLAB 5.0 programı kullanılmıştır. Marquardt-Levenberg metodu [103,104] 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.

$$SSR = \sum_{m=1}^{N_d} (C_m^{göz.} - C_m^{hes.})^2 \quad (7.9)$$

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

$$\sigma^2 \approx s^2 = (SSR)_{\min} / (m-p) \quad (7.10)$$

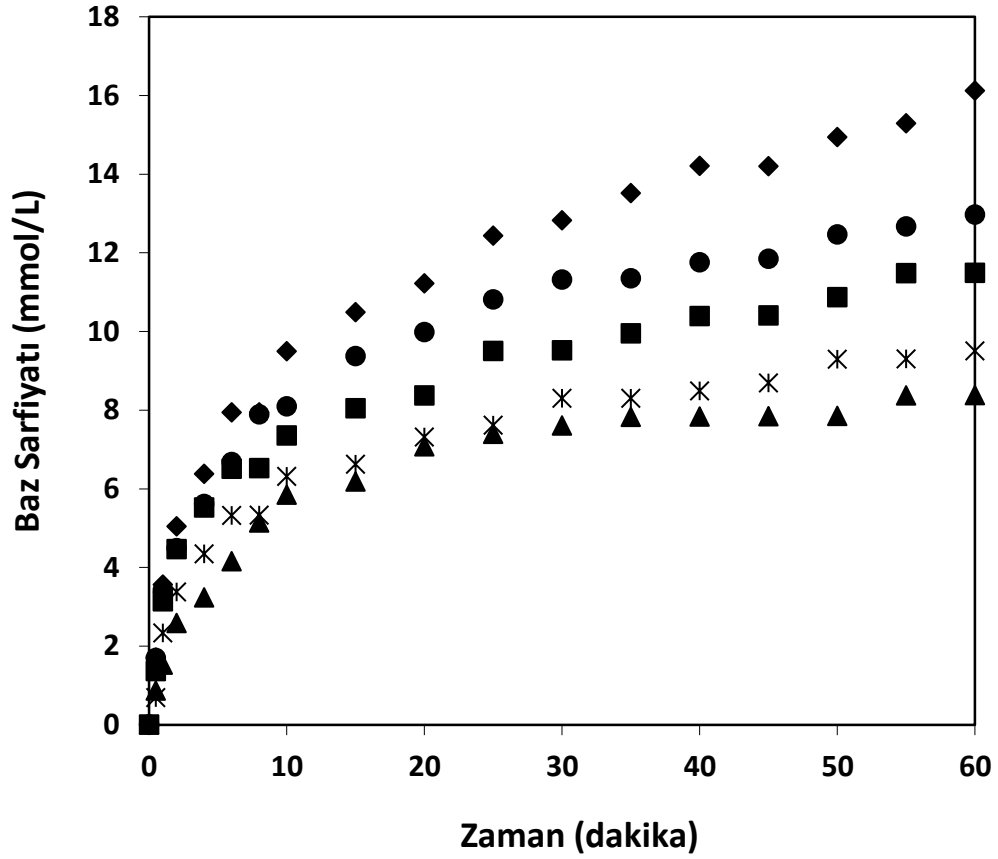
Burada, p parametre sayısı ve s^2 varyanstır.

ARAŞTIRMA BULGULARI

8.1 Hidroliz Reaksiyonu İçin Uygun Enzimin Seçimi

Susam küspesi proteinin hidroliz reaksiyonunun optimizasyonunda kullanılacak uygun enzimi belirleyebilmek amacıyla beş ticari proteaz enzimi ile ön denemeler gerçekleştirilerek, enzimlerin susam küspesi proteini hidrolizi 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, seçilen 50°C sıcaklıkta ve pH 7 değerinde gerçekleştirilmiştir. 20 g protein/L substrat içeren 200 ml çözelti eşit ünitelerde enzim ilavesi (0.35 AU/g protein) ile 60 dakika süresince reaksiyona tabi tutularak, baz sarfiyatları zamana bağlı olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 8.1'de grafiksel olarak sunulmuştur.

Şekil 8.1 incelendiğinde Alcalase ve Protamex enziminin; susam küspesi proteininin hidrolizinde, diğer enzimlerden daha etkin olduğu açıkça görülmektedir. Alcalase ve Protamex enzimleri için 60 dakika sonunda elde edilen baz sarfiyatları sırası ile, 16.12 ve 12.96 mmol/L'dir. Elde edilen deneysel veriler sonucu en yüksek etkinliğe sahip olan Alcalase enziminin, susam küspesi proteinin enzimatik hidrolizinin optimizasyonu için gerçekleştirilecek olan diğer tüm deneylerde kullanımına karar verilmiştir.



Şekil 8.1 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, ■ Neutrased, ● Protamex, ◆ Alcalase)

8.2 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 Materyal ve Yöntem Bölüm 7.4.2’de verilmiş olan eşitlik (7.1) kullanılarak hesaplanır. Ancak hidroliz derecesinin doğru bir şekilde hesaplanabilmesi için pH-stat’ın kalibre edilmesi gerekir.

$$DH = B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{P_M} \times \frac{1}{h_{top}} \times 100\% \quad (7.1)$$

B : Baz miktarı (ml)

N_b : Baz normalitesi

α : α -NH gruplarının ortalama ayrılma sabiti

P_M : Protein miktarı (g)

h_{top} : Substrattaki toplam peptid bağları sayısı (meqv/g protein)

HD : % Hidroliz derecesi

Eşitlik 7.1'deki α terimi pH-stat yöntemi için kalibrasyon faktörüdür ve aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanır.

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad (8.1)$$

Eşitlik 8.1'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 [8].

Bu çalışmada, pH-stat kalibrasyonu için Adler-Nissen [8] 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 asit gruplarının konsantrasyonlarındaki artış, hidroliz derecesi ile doğru orantılıdır. Bu nedenle, baz sarfiyatı ile serbest hale geçen amino asit grupları arasında lineer bir ilişki söz konusudur. Dolayısı ile kalibrasyon, hidrolizat örneklerinde bulunan serbest amino asit 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 asit grup konsantrasyonu arasındaki lineer ilişki belirlendikten sonra, elde edilen doğruların eğimlerden yararlanılarak pK değerleri, eşitlik (8.2) kullanılarak hesaplanabilir. Eşitlik 8.2'nin türetilişi Çizelge 8.1'de verilmiştir [6,8, 105,106].

$$pK = pH_2 + \log(b_1 - b_2) - \log(10^{pH_2 - pH_1} \times b_2 - b_1) \quad (8.2)$$

b: eğim

$pH_2 > pH_1$ olmalıdır.

Referans bir sıcaklıkta pK değeri biliniyorsa veya hesaplanmışsa, farklı bir sıcaklıktaki pK değeri, referans sıcaklıkla aynı pH değerinde gerçekleştirilen tek bir deney ile aşağıdaki eşitlik (8.3) kullanılarak hesaplanabilir. Eşitlik 8.3'ün türetilişi Çizelge 8.2'de verilmiştir [8].

$$pK = pH_2 + \log \left[\frac{b}{b_0} \times (1 + 10^{pK_0 - pH}) - 1 \right] \quad (8.3)$$

b ve b_0 aynı pH değerinde elde edilmelidir.

Çizelge 8.1 Eşitlik 8.2'nin türetilişi [8]

pH-Stat için: $dB = \alpha \times dh$

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

Eğim, b

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

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

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

$$b_1 - b_2 = k \times (10^{pK-pH_1} - 10^{pK-pH_2})$$

$$b_1 - b_2 = k \times 10^{pK-pH_2} \times (10^{pH_2-pH_1} - 1) \quad (a)$$

ve

$$b_2 \times 10^{pH_2-pH_1} - b_1 = k \times (10^{pH_2-pH_1} + 10^{pK-pH_1} - 1 - 10^{pK-pH_1})$$

$$b_2 \times 10^{pH_2-pH_1} - b_1 = k \times (10^{pH_2-pH_1} - 1) \quad (b)$$

denklemleri elde edilir.

a denklemini, b denklemine bölündüğünde;

$$\frac{b_1 - b_2}{10^{pH_2-pH_1} \times b_2 - b_1} = 10^{pK-pH_2} \quad (c)$$

c denkleminin logaritması alındığında;

$$pK = pH_2 + \log(b_1 - b_2) - \log(10^{pH_2-pH_1} \times b_2 - b_1)$$

eşitliği elde edilir.

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

Çizelge 8.2 Eşitlik 8.3'ün türetilişi [8]

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

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

$$b_0 = k \times (1 + 10^{pK_0-pH}) \quad (\text{a})$$

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

a ve b denklemleri oranlandığında;

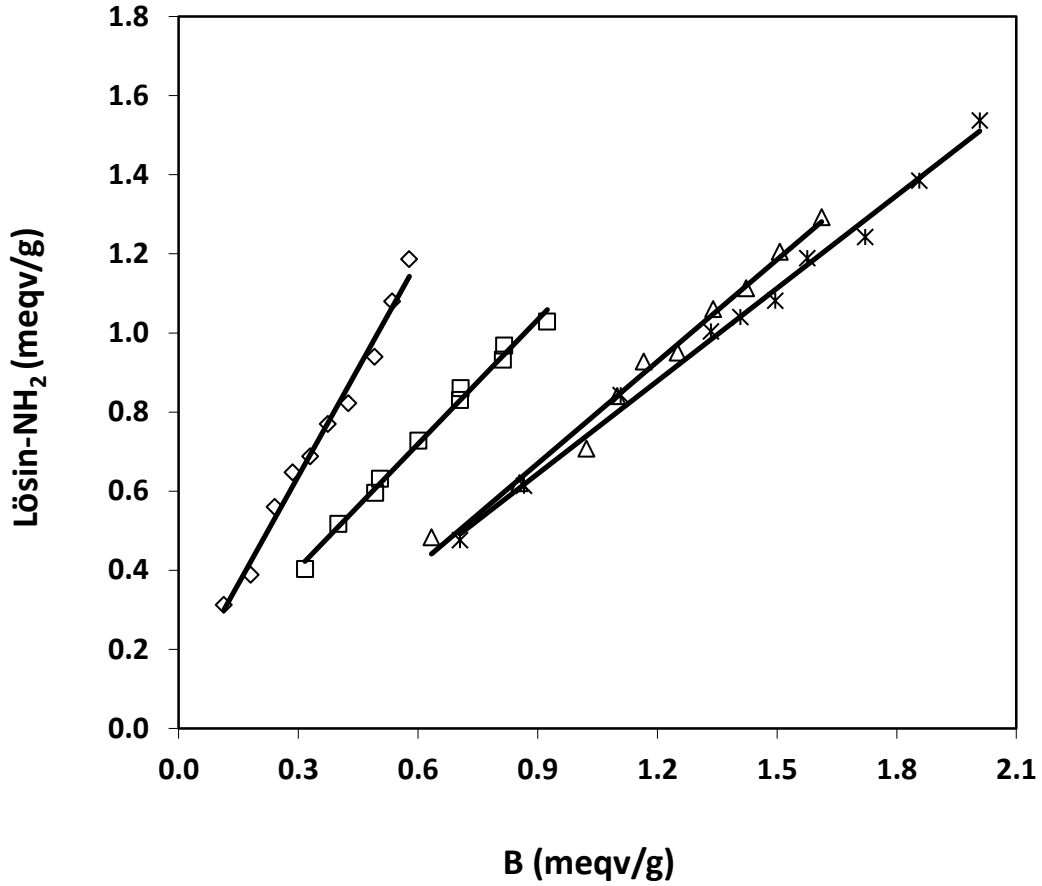
$$1 + 10^{pK-pH} = \frac{b}{b_0} \times (1 + 10^{pK_0-pH})$$

$$pK = pH + \log \left[\frac{b}{b_0} \times (1 + 10^{pK_0-pH}) - 1 \right]$$

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.

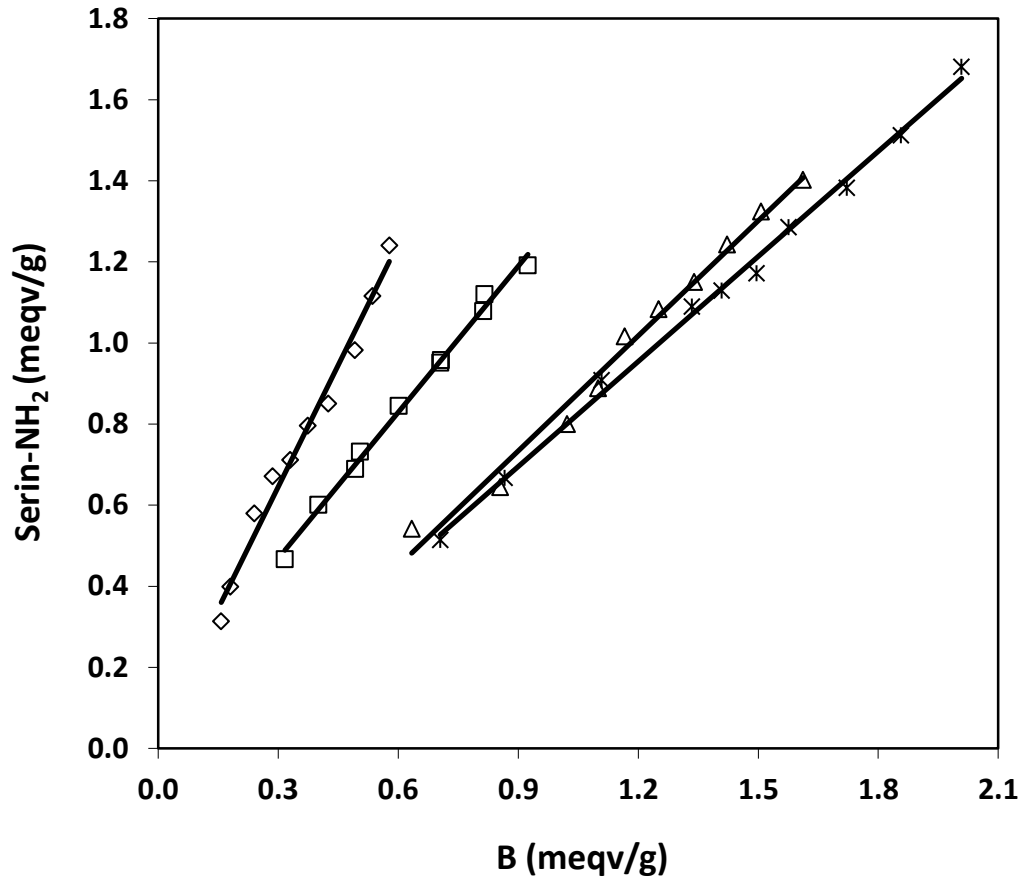
100 ml'lik çözelti hacminde gerçekleştirilen deneyler için sabit proses şartları; 10 g protein/L substrat konsantrasyonu, % 0.25 (hacim/hacim) enzim konsantrasyonu ve 1 saat reaksiyon süresidir. Reaksiyon sırasında baz sarfiyatı kaydedilmiş, belirli zaman aralıklarında reaksiyon çözeltisinden alınan 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 8.2-8.5'te, deneysel verilere uyan lineer modellere ait katsayılar ve istatistiksel değerler Çizelge 8.3-8.6'da sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar kullanılarak hesaplanan pK değerleri ise Çizelge 8.7 ve 8.8'de özetlenmiştir.



Şekil 8.2 50°C’de farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için TNBS yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri, (◊ pH 6.5, □ pH 7, Δ pH 7.5, * pH 8,— modeller)

Çizelge 8.3 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

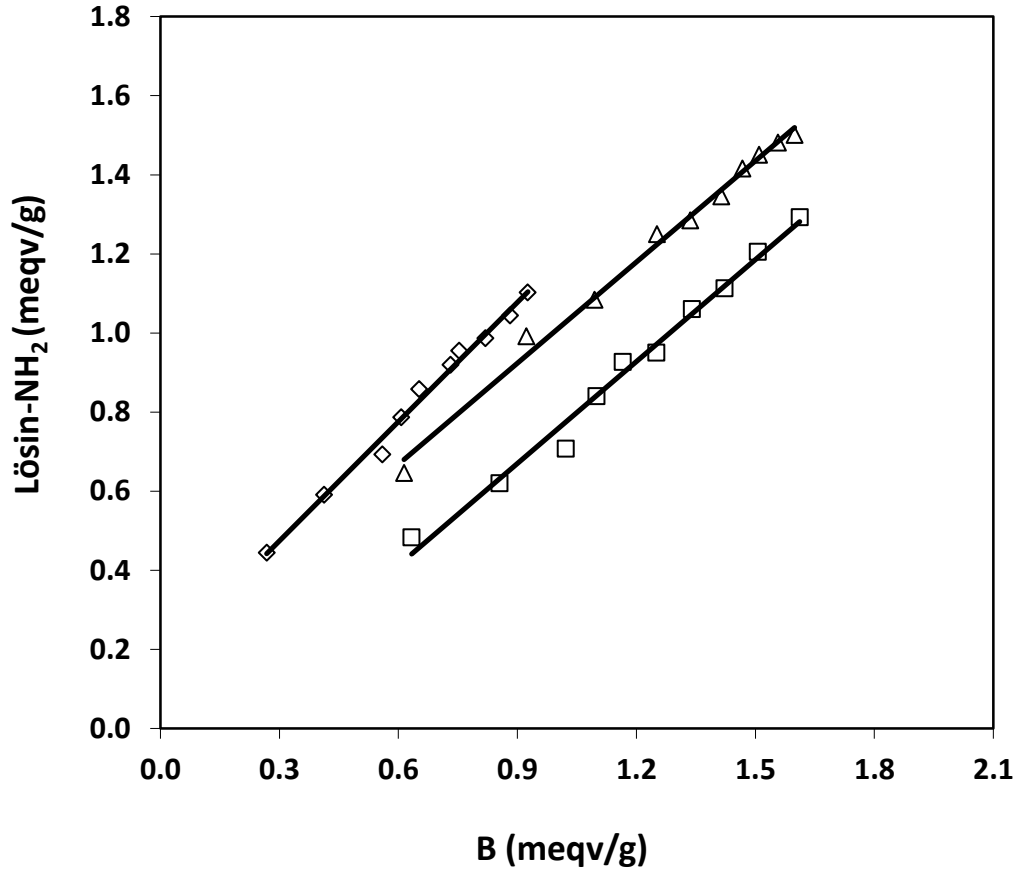
| pH | Eğim (e) | Kesim noktası | St.Sapma (σ) | R ² |
|-----|----------|---------------|-----------------------|----------------|
| 6.5 | 1.8140 | 0.0948 | 0.0345 | 0.9933 |
| 7.0 | 1.0477 | 0.0913 | 0.0197 | 0.9960 |
| 7.5 | 0.8581 | 0.1021 | 0.0321 | 0.9932 |
| 8.0 | 0.7818 | 0.0601 | 0.0267 | 0.9971 |



Şekil 8.3 50°C'de farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için OPA yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri, (◇ pH 6.5, □ pH 7, Δ pH 7.5, * pH 8,— modeller)

Çizelge 8.4 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

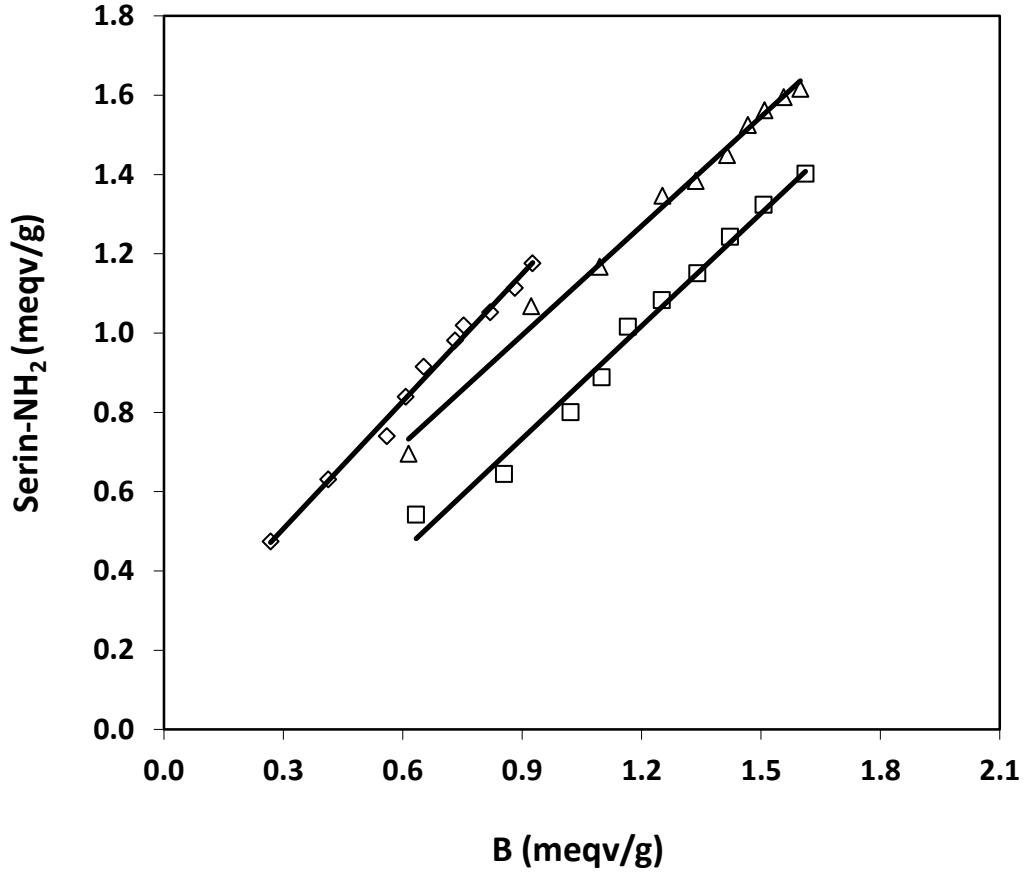
| pH | Eğim (e) | Kesim noktası | St.Sapma (σ) | R ² |
|-----|----------|---------------|-----------------------|----------------|
| 6.5 | 1.9974 | 0.0471 | 0.0413 | 0.9913 |
| 7.0 | 1.2006 | 0.1092 | 0.0195 | 0.9970 |
| 7.5 | 0.9462 | 0.1176 | 0.0372 | 0.9925 |
| 8.0 | 0.8639 | 0.0826 | 0.0239 | 0.9981 |



Şekil 8.4 pH 7.5 değerinde farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için TNBS yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri, (\diamond 40°C, Δ 50°C, \square 60°C,— modeller)

Çizelge 8.5 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 | St.Sapma (σ) | R ² |
|----------|----------|---------------|-----------------------|----------------|
| 40°C | 0.9313 | 0.2223 | 0.0267 | 0.9919 |
| 50°C | 0.8581 | 0.1021 | 0.0321 | 0.9932 |
| 60°C | 0.8149 | 0.2038 | 0.0269 | 0.9951 |



Şekil 8.5 pH 7.5 değerinde farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için OPA yöntemi ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerleri, (\diamond 40°C, Δ 50°C, \square 60°C,— modeller)

Çizelge 8.6 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 | St.Sapma (σ) | R ² |
|----------|----------|---------------|-----------------------|----------------|
| 40°C | 1.0327 | 0.2108 | 0.0233 | 0.9946 |
| 50°C | 0.9462 | 0.1176 | 0.0372 | 0.9925 |
| 60°C | 0.8975 | 0.1945 | 0.0264 | 0.9959 |

Çizelge 8.7 50°C'de farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için Eşitlik 8.2 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 (e₁) | Eğim (e₂) | pK |
| 6.5 | 7 | 1.8140 | 1.0477 | 6.70 |
| 7 | 7.5 | 1.0477 | 0.8581 | 6.56 |
| 7.5 | 8 | 0.8581 | 0.7818 | 6.67 |
| 6.5 | 7.5 | 1.8140 | 0.8581 | 6.65 |
| 7 | 8 | 1.0477 | 0.7818 | 6.59 |
| 6.5 | 8 | 1.8140 | 0.7818 | 6.65 |
| ORT. 6.64 | | | | |

| OPA reaksiyonu ile belirlenen serbest amino asit grup konsantrasyonlarına karşı baz sarfiyatı değerlerinden elde edilen veriler kullanılarak hesaplanan değerler | | | | |
|---|-------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------|
| pH 1 | pH 2 | Eğim (e₁) | Eğim (e₂) | pK |
| 6.5 | 7 | 1.9974 | 1.2006 | 6.65 |
| 7 | 7.5 | 1.2006 | 0.9462 | 6.65 |
| 7.5 | 8 | 0.9462 | 0.8639 | 6.66 |
| 6.5 | 7.5 | 1.9974 | 0.9462 | 6.64 |
| 7 | 8 | 1.2006 | 0.8639 | 6.66 |
| 6.5 | 8 | 1.9974 | 0.8639 | 6.65 |
| ORT. 6.65 | | | | |

Çizelge 8.8 pH 7.5 değerinde farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için Eşitlik 8.3 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 | 0.9313 | 6.87 | 1.0327 | 6.89 | 6.88 |
| 50°C (ref.) | 0.8581 | 6.64 | 0.9462 | 6.65 | 6.65 |
| 60°C | 0.8149 | 6.41 | 0.8975 | 6.42 | 6.42 |

Çizelge 8.7 ve 8.8 incelendiğinde her iki yöntemle yapılan kalibrasyon sonucunda hesaplanan pK değerlerinin birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir. Sonuç olarak, elde edilen tüm değerler göz önünde bulundurulduğunda, susam küspesi proteini hidrolizatları için pK değerleri; 40°C, 50°C ve 60°C sıcaklıklarda sırasıyla 6.88, 6.65 ve 6.42 olarak bulunmuştur.

Herhangi bir sıcaklıkta pK değeri biliniyorsa farklı bir sıcaklıktaki pK değeri, teorik olarak Gibbs-Helmholtz eşitliği (Eşitlik 8.4) kullanılarak da hesaplanabilir [8].

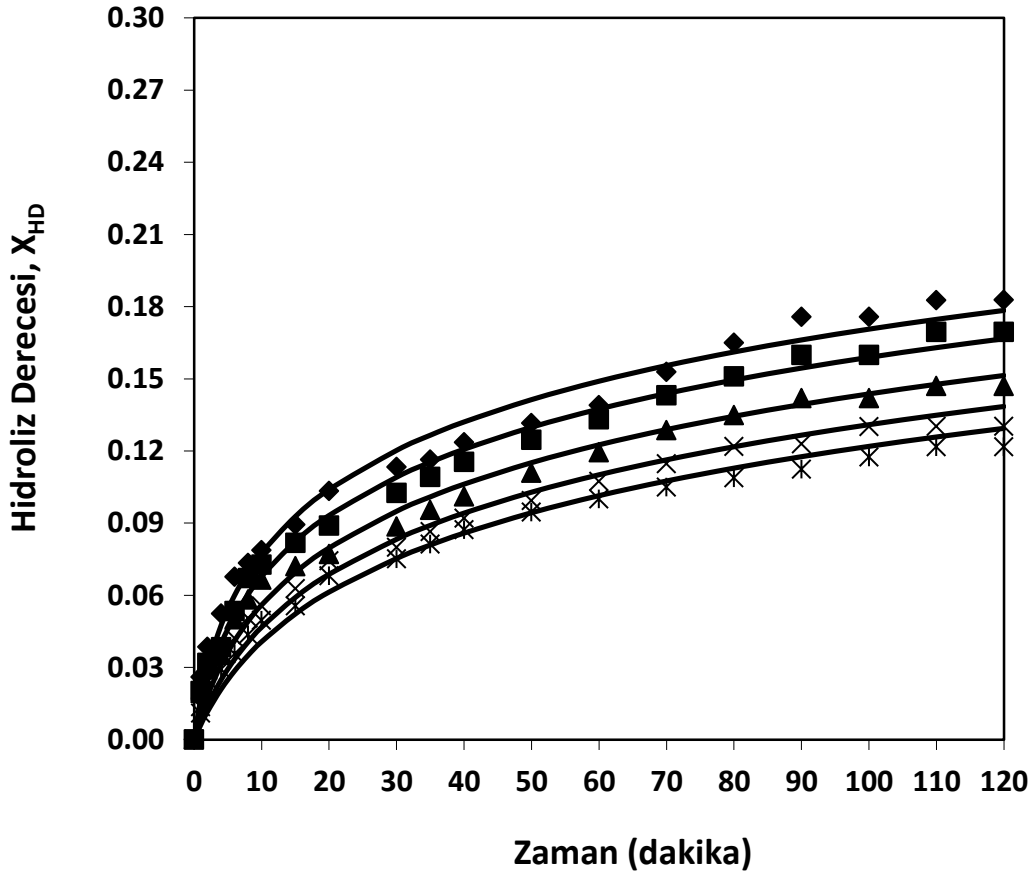
$$pK_1 - pK_2 = \frac{\Delta H^0}{2.303 \times R} \times \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right] \quad (8.4)$$

α -amino asit grupları için iyonlaşma entalpisi (ΔH^0) Steinhardt ve Beychok [8] tarafından 45 kJ/mol olarak rapor edilmiştir. Bu değer Eşitlik 8.4'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 8.8); 40 ile 50°C'deki pK değerleri arasındaki farkın 0.23 birim, 50 ile 60°C'deki pK değerleri arasındaki farkın ise 0.20 birim olması sonuçların güvenilirliğini artırmaktadır.

8.3 Kesikli Sistemde Proses Parametrelerinin Optimizasyonu

8.3.1 Susam küspesi konsantrasyonunun hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi

Substrat konsantrasyonunun hidroliz işlemine etkisini incelemek amacıyla hidroliz reaksiyonları 10-30 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 8.6-8.11'de grafiksel olarak sunulmuştur.

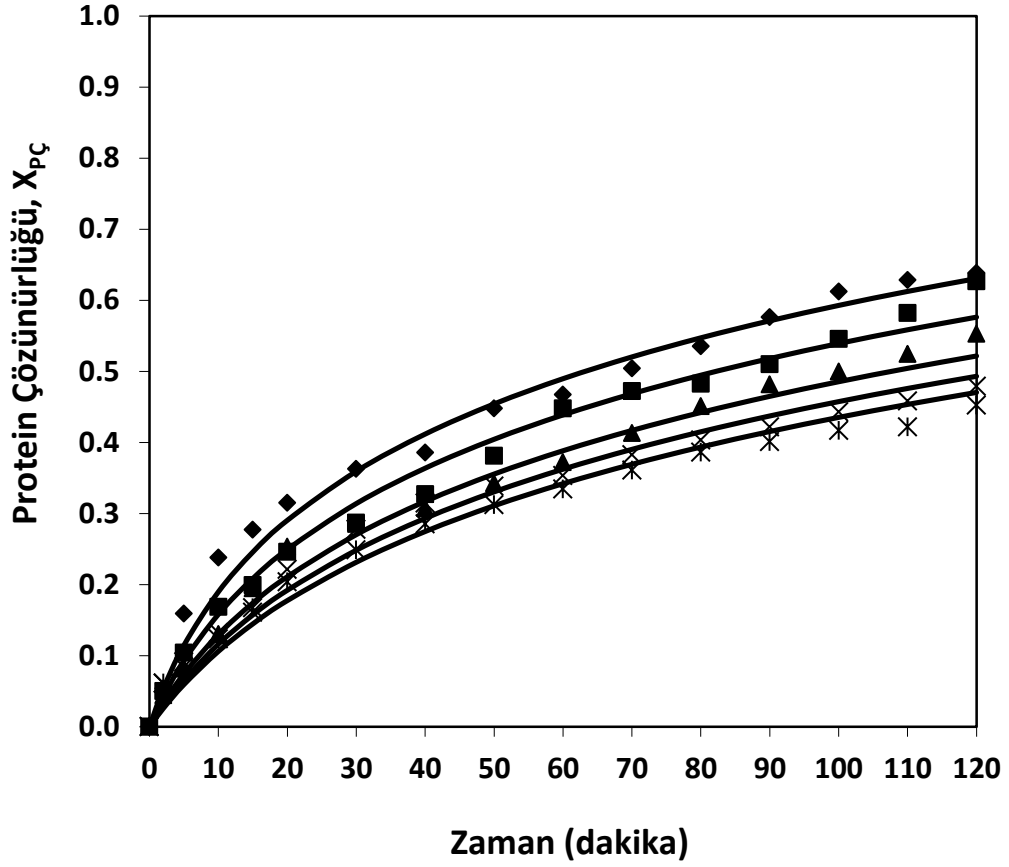


Şekil 8.6 Farklı substrat konsantrasyonları için zamana karşı elde edilen % hidroliz derecesi değerleri (T= 50°C, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim)) (◆ 10 g protein/L, ■ 15 g protein/L, ▲ 20 g protein/L, × 25 g protein/L, ⋈ 30 g protein/L,— modeller)

Hidroliz derecesi ve protein çözünürlüğü değerlerinin substrat konsantrasyonuna bağlı değişimleri incelendiğinde (Şekil 8.6 ve 8.7), substrat konsantrasyonu artırıldığında, hidroliz reaksiyonun ve çözünürlük hızlarının, dolayısı ile hidroliz derecesi ve protein çözünürlük derecesi değerlerinde azalmış olduğu görülmektedir.

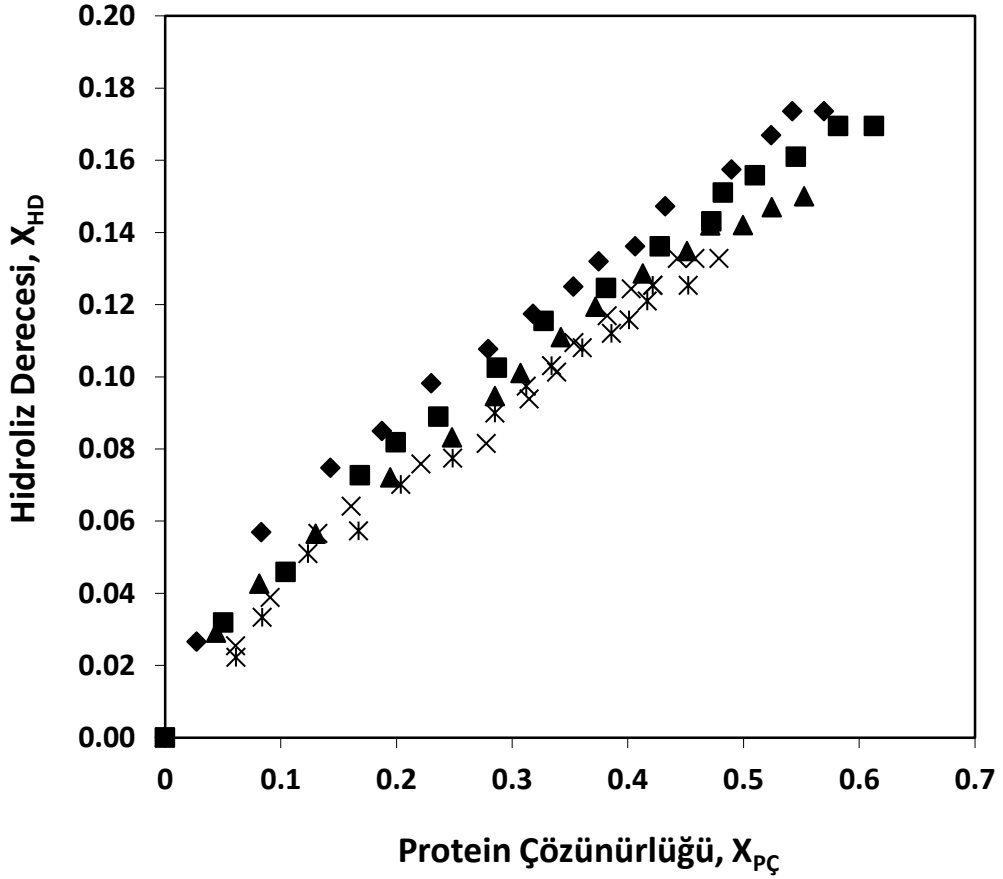
Hız profilleri incelendiğinde tüm substrat konsantrasyonları için hidroliz reaksiyonunun ve protein çözünürlüğünün başlangıçta hızlı ilerlediği daha sona yavaşlayarak azaldığı, tipik hidroliz ve çözünürlük eğrilerinin elde edilmiş olduğu görülmektedir (Şekil 8.6 ve 8.7). Hidroliz reaksiyonu ve protein 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 [108,109].



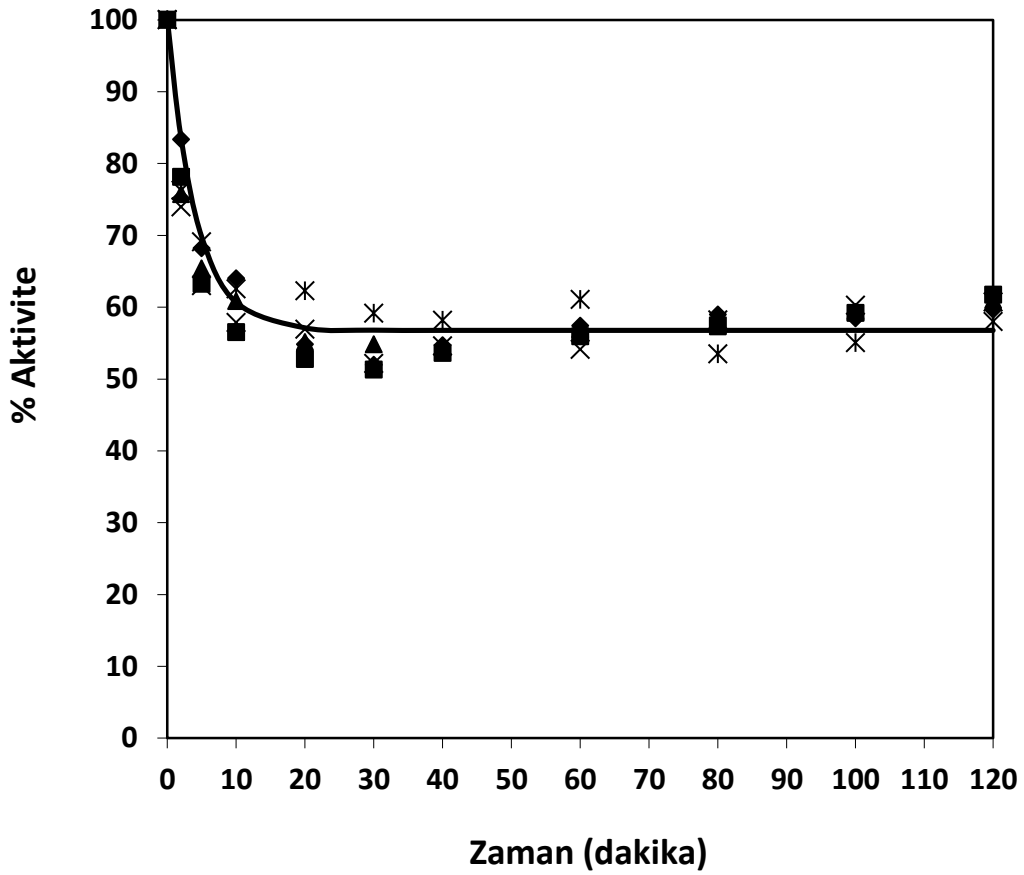
Şekil 8.7 Farklı substrat konsantrasyonları için zamana karşı elde edilen çözünürlük derecesi değerleri (T= 50°C, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim)) (◆ 10 g protein/L, ■ 15 g protein/L, ▲ 20 g protein/L, × 25 g protein/L, ⋈ 30 g protein/L,— modeller)

Hidroliz derecesi değerlerinin protein çözünürlük derecesi değerlerine bağlı değişimleri incelendiğinde (Şekil 8.8), 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. Literatürde hidroliz derecesi ve çözünürlük arasındaki lineer ilişki Sorali-Smietana vd. [26], Bombara vd. [32] ve Apar ve Özbek [109] tarafından da bildirilmiştir.



Şekil 8.8 Farklı substrat konsantrasyonları için hidroliz derecesi ile çözünürlük derecesinin değişimi (T= 50°C, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim)) (◆ 10 g protein/L, ■ 15 g protein/L, ▲ 20 g protein/L, × 25 g protein/L, ✖ 30 g protein/L,— modeller)

Substrat konsantrasyonunun enzim stabilitesine etkisi incelendiğinde (Şekil 8.9), 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.

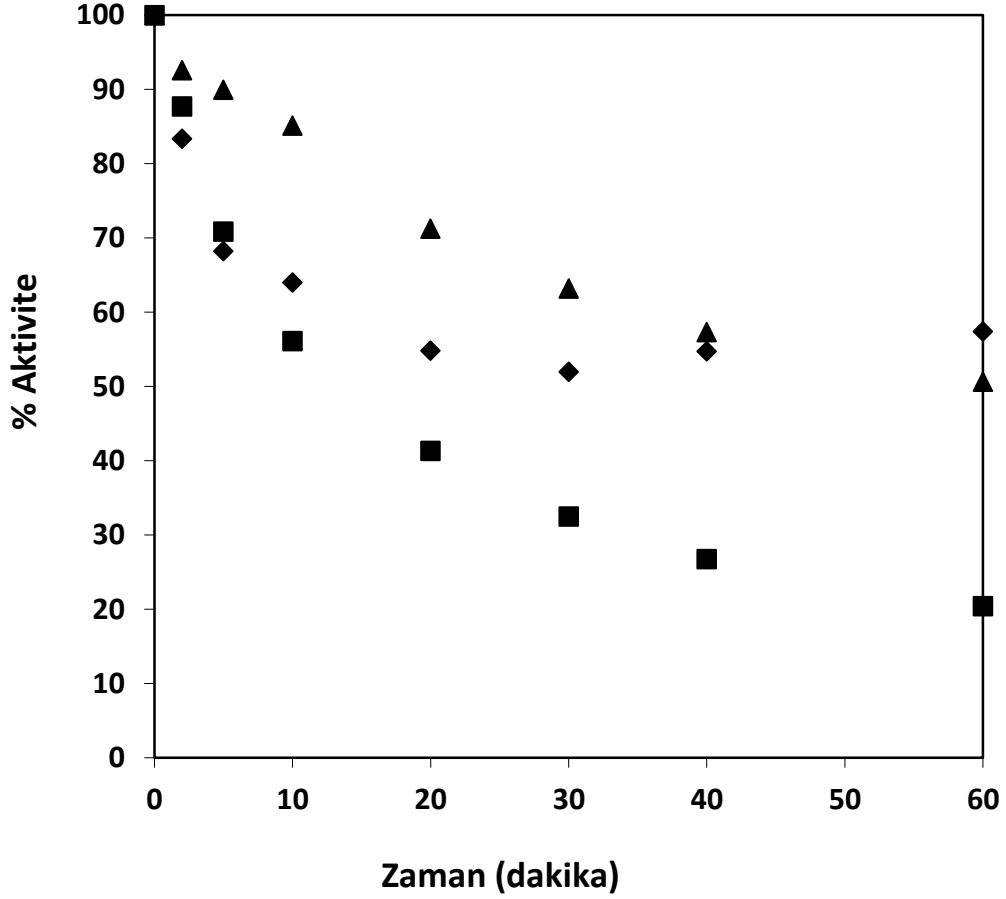


Şekil 8.9 Farklı substrat konsantrasyonları için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, (T= 50°C, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim)) (◆ 10 g protein/L, ■ 15 g protein/L, ▲ 20 g protein/L, × 25 g protein/L, ⋈ 30 g protein/L,— modeller)

Elde edilen sonuçların gerçekten substrat inaktivasyonundan kaynaklanıp kaynaklanmadığına açıklık getirmek amacıyla, enzim stabilitesinin susam küspesiz ortamda; suda ve fosfat tampon çözeltileri içerisinde incelendiği kontrol deneyleri gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Şekil 8.10'da grafiksel olarak sunulmuştur.

Şekil 8.10'dan görüldüğü gibi suda ve fosfat tampon çözeltilerinde enzim stabilitesi zamanla sürekli bir azalma eğilimi göstermiştir. 10 g protein/L substrat içeren deney, su ve fosfat tampon çözeltide susam küspesiz ortamda gerçekleştirilen deneylerle karşılaştırıldığında, ilk on dakikada enzim stabilitesinde meydana gelen düşüşün, substrat inaktivasyonuna dayanmadığı, ayrıca 10 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 dererecesi ve çözünürlük değerlerindeki azalma; a) enzimin substrat ile doyunurluğa ulaşmasından dolayı reaksiyonun limitlenmesi, b) substrat konsantrasyonu artıkça 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 8.10 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)

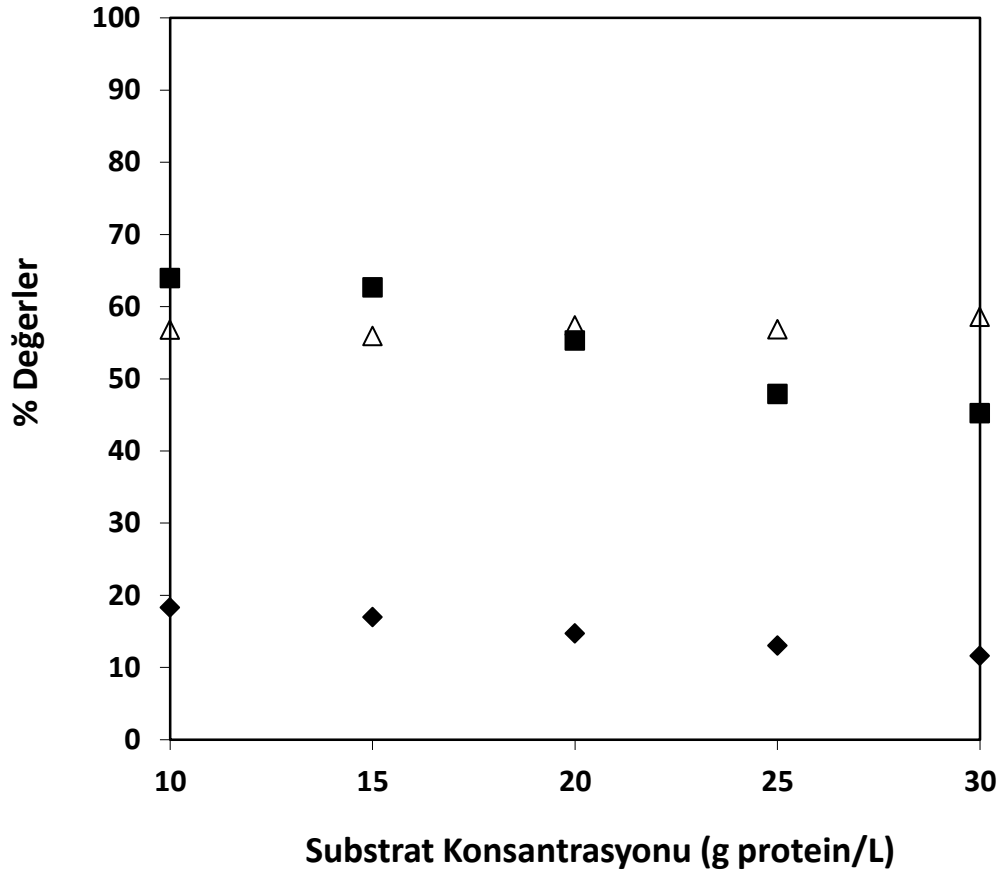
Çalışılan tüm substrat konsantrasyonları için, 120 dakikalık reaksiyon süresi sonunda elde edilen % hidroliz derecesi, % protein çözünürlüğü ve % enzim aktivite değerleri, Çizelge 8.9 ve Şekil 8.11'de özetlenmiştir. Çizelge 8.9 ve Şekil 8.11 incelendiğinde, % hidroliz ve % protein çözünürlük derecelerinin 15 g protein/L substrat konsantrasyonu değerinden sonra belirgin şekilde azaldığı görülmektedir. Bu nedenle 15 g protein/L substrat konsantrasyonu optimum substrat konsantrasyonu olarak seçilmiş ve diğer tüm deneylerde başlangıç substrat konsantrasyonu olarak bu değer kullanıma karar verilmiştir.

Susam küspesi proteininin Alcalase enzimi ile hidrolizi için, substrat konsantrasyonunun hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisi Perez ve Saad [87] tarafından da, % 2-10 (ağırlık/hacim) aralığında değişen substrat miktarlarında incelenmiş; hidroliz için optimum substrat konsantrasyonunun % 8 (ağırlık/hacim) olduğu bildirilmiştir.

Çizelge 8.9 Farklı substrat konsantrasyonlarında, 120 dakikalık işlem süresi sonunda elde edilen % hidroliz ve çözünürlük dereceleri ve % enzim aktivite değerleri (T= 50°C, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim))

| S₀ (g protein/L) | HD (%) | PÇ (%) | A (%) |
|--|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| 10 | 18.27 | 63.95 | 56.78 |
| 15 | 16.95 | 62.66 | 55.90 |
| 20 | 14.69 | 55.26 | 57.37 |
| 25 | 13.02 | 47.88 | 56.85 |
| 30 | 11.60 | 45.23 | 58.58 |

Hidroliz öncesi ortamda bulunan çözülmüş protein miktarı 10, 15, 20, 25 ve 30 g protein/L substrat konsantrasyonları için sırası ile 0.96, 1.23, 2.61, 2.82 ve 3.28 g/L'dir.



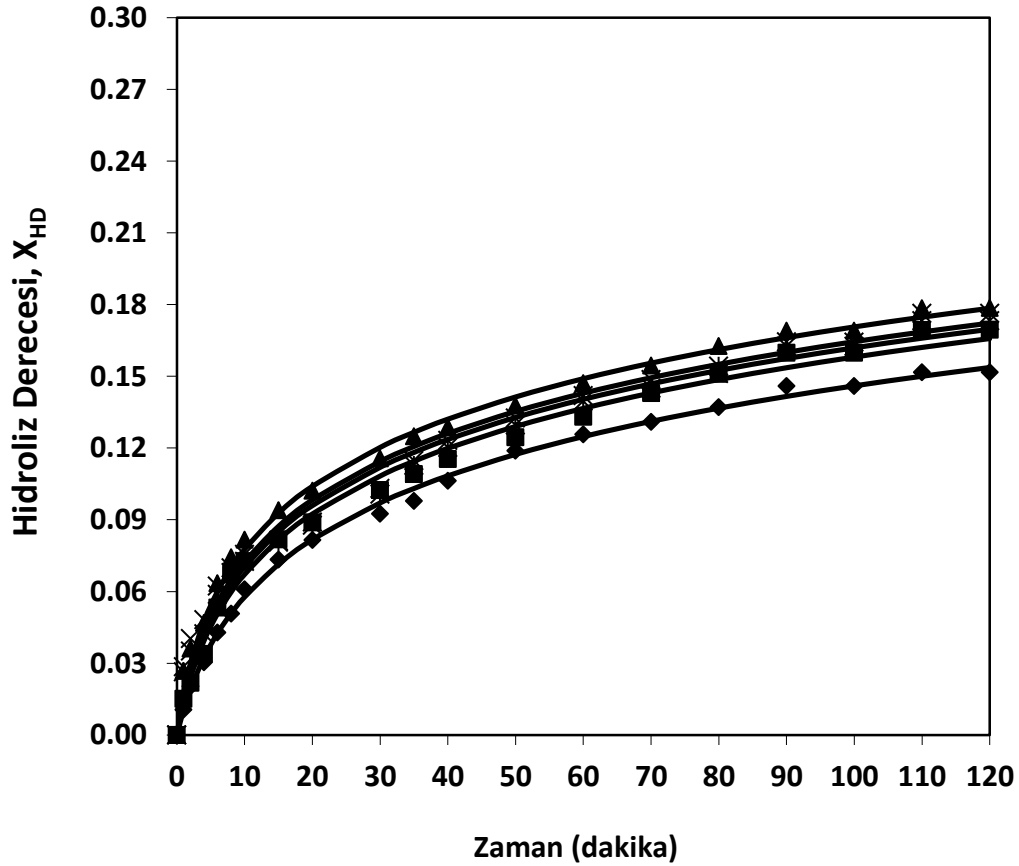
Şekil 8.11 % Hidroliz derecesi, % protein çözünürlüğü ve % enzim aktivite değerlerinin substrat konsantrasyonu ile değişimi, T= 50°C, pH= 7, E= % 0.25 (hacim/hacim) (◆ hidroliz derecesi, ■ protein çözünürlüğü, △ enzim aktivitesi)

8.3.2 Enzim konsantrasyonunun hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi

Enzim konsantrasyonunun hidroliz işlemine etkisini incelemek amacıyla 15 g protein/L substrat içeren 200 mL'lik reaksiyon çözeltisine % 0.20-0.40 (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 8.12-8.16'da grafiksel olarak sunulmuştur.

Hidroliz derecesi değerlerinin enzim konsantrasyonuna bağlı değişimleri incelendiğinde (Şekil 8.12), enzim konsantrasyonu artırıldığında, hidroliz reaksiyonunun hızının dolayısı ile hidroliz derecesi değerlerinin de artmış olduğu görülmektedir. Ancak, % 0.30

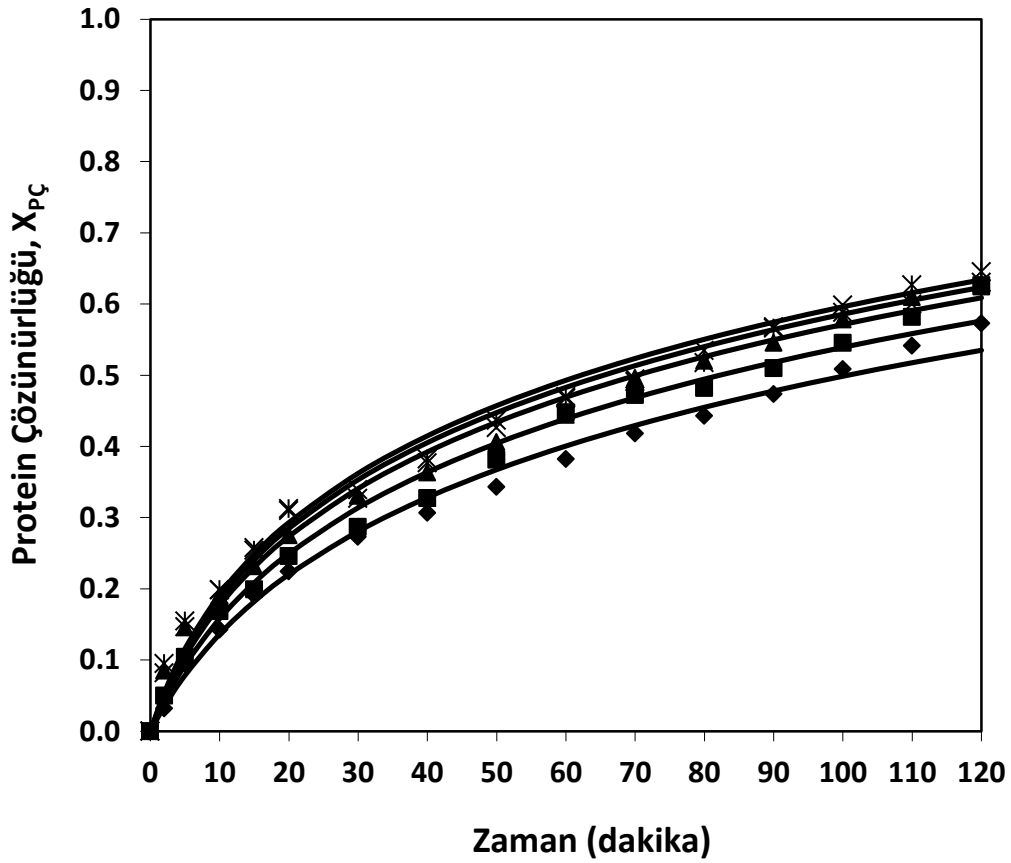
(hacim/hacim) enzim miktarının üzerindeki enzim değerleri için, hidroliz derecesi değerlerinin artışının daha yavaş bir şekilde gerçekleştiği ve birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir. % 0.30 (hacim/hacim) enzim miktarının üzerindeki değerler için reaksiyonun daha yavaş ilerlemesi, substratın enzim ile doyunurluğa ulaşmasından dolayı hidroliz reaksiyonunun diğer faktörlerden çok substrat konsantrasyonu tarafından limitlenmiş olabileceğini göstermektedir.



Şekil 8.12 Farklı enzim konsantrasyonları için zamana karşı elde edilen % hidroliz derecesi değerleri (T= 50°C, pH= 7, S= 15 g protein/L) (◆ % 0.20 (hacim/hacim), ■ % 0.25 (hacim/hacim), ▲ % 0.30 (hacim/hacim), × % 0.35 (hacim/hacim), ⋈ % 0.40 (hacim/hacim),— modeller)

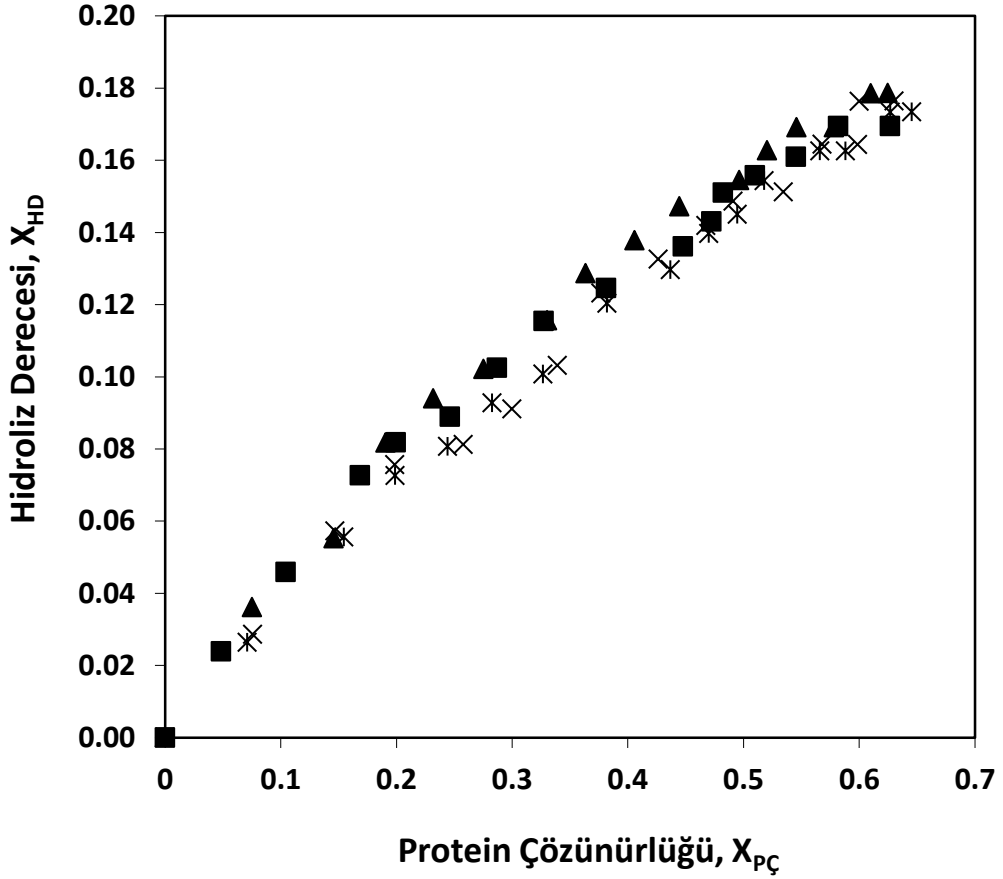
Protein çözünürlük derecelerinin enzim konsantrasyonuna bağlı değişimleri incelendiğinde (Şekil 8.13), enzim miktarı arttırıldığında hidroliz derecesi değerleri ile benzer şekilde, çözünürlük değerlerinin de artmış olduğu; % 0.30 (hacim/hacim) enzim miktarının üzerindeki enzim değerleri için, çözünürlük değerlerindeki artışın daha yavaş

bir şekilde gerçekleştiği görülmektedir. Bu durum yine, substratın enzim ile doygunluğa ulaşmasından dolayı, hidroliz reaksiyonunun diğer faktörlerden çok substrat konsantrasyonu tarafından limitlenmiş olabileceğini göstermektedir.



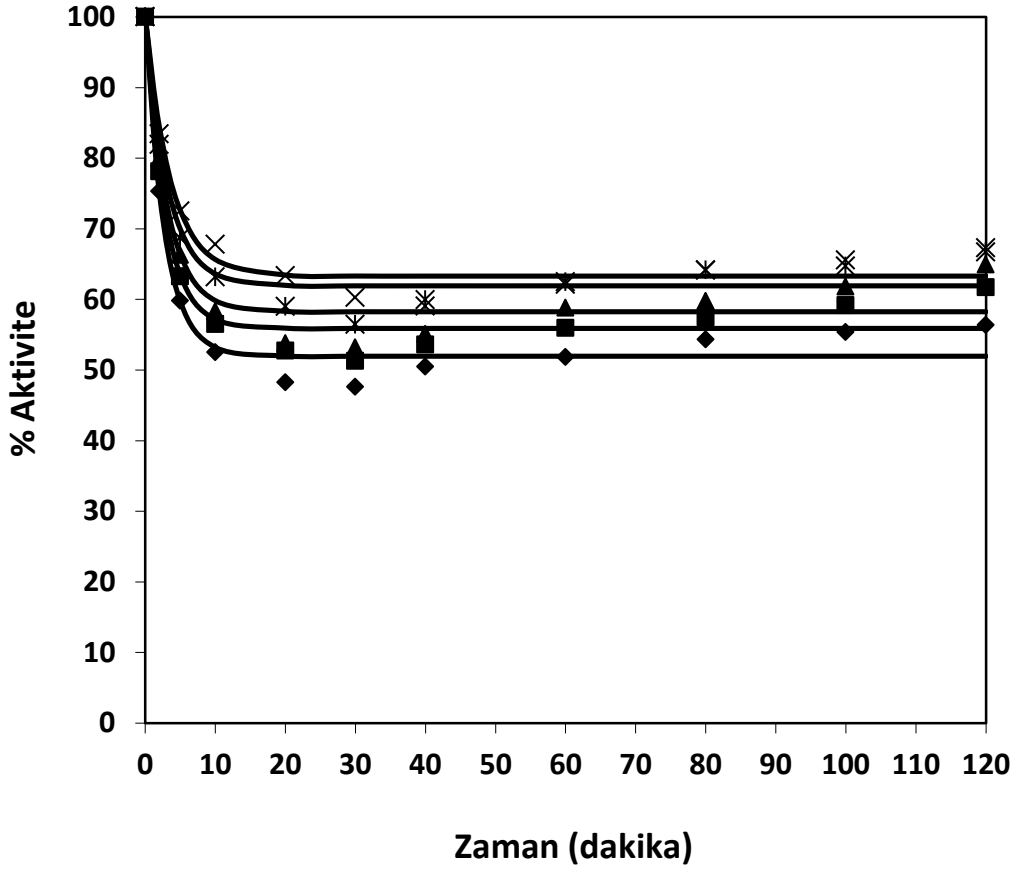
Şekil 8.13 Farklı enzim konsantrasyonları için zamana karşı elde edilen çözünürlük derecesi değerleri ($T= 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}= 7$, $S= 15 \text{ g protein/L}$) (◆ % 0.20 (hacim/hacim), ■ % 0.25 (hacim/hacim), ▲ % 0.30 (hacim/hacim), × % 0.35 (hacim/hacim), Ж % 0.40 (hacim/hacim), — modeller)

Hidroliz derecesi değerlerinin protein çözünürlük derecesi değerlerine bağlı değişimleri incelendiğinde (Şekil 8.14), 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.



Şekil 8.14 Farklı enzim konsantrasyonları için hidroliz derecesi ile çözünürlük derecesinin değişimi, ($T= 50^{\circ}C$, $pH= 7$, $S= 15$ g protein/L) (◆ % 0.20 (hacim/hacim), ■ % 0.25 (hacim/hacim), ▲ % 0.30 (hacim/hacim), × % 0.35 (hacim/hacim), ✖ % 0.40 (hacim/hacim), — modeller)

Kullanılan enzim miktarının enzim stabilitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde (Şekil 8.15), 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 arttıkça enzim aktivitesinin sabitlendiği değerlerde de belirgin bir artış olduğu saptanmıştır.



Şekil 8.15 Farklı enzim konsantrasyonları için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, (T= 50°C, pH= 7, S= 15 g protein/L) (◆ % 0.20 (hacim/hacim), ■ % 0.25 (hacim/hacim), ▲ % 0.30 (hacim/hacim), × % 0.35 (hacim/hacim), ✱ % 0.40 (hacim/hacim),— modeller)

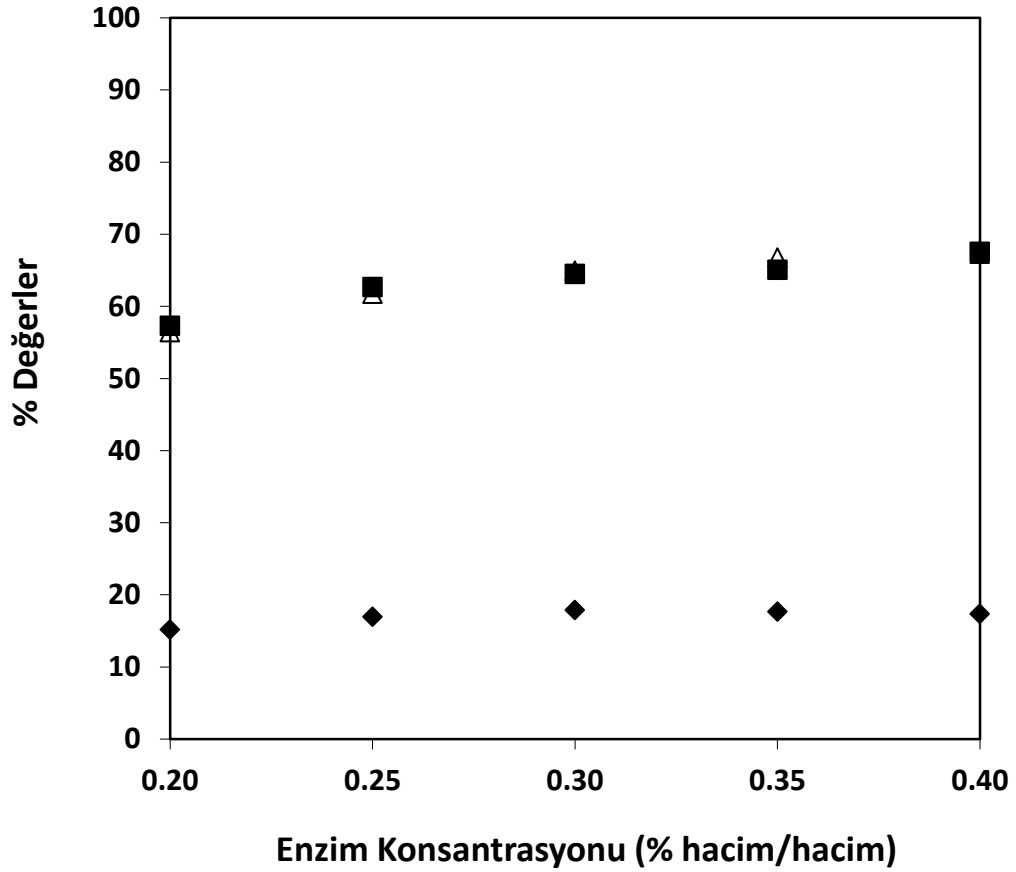
Çalışılan tüm enzim miktarları için, 120 dakikalık reaksiyon süresi sonunda elde edilen % hidroliz derecesi, % protein çözünürlüğü ve % enzim aktivite değerleri, Çizelge 8.10 ve Şekil 8.16'da ayrıca özetlenmiştir. Çizelge 8.10 ve Şekil 8.16 incelendiğinde, hidroliz ve protein çözünürlük derecelerindeki artışın % 0.30 (hacim/hacim) enzim miktarından sonraki enzim miktarı değerleri için belirgin şekilde yavaşladığı ve hemen hemen sabitlendiği açıkça görülmektedir. Bu nedenle % 0.30 (hacim/hacim) enzim miktarı optimum enzim değeri olarak seçilmiş ve diğer tüm deneylerde bu değer kullanıma karar verilmiştir.

Susam proteinin Alcalase enzimi ile hidrolizi için enzim konsantrasyonunun hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisi Perez ve Saad [87] tarafından da, % 0.9-2.3 enzim/substrat oranlarında incelenmiş; hidroliz için optimum enzim/substrat oranının % 2.3 (= % 1.25 hacim/hacim enzim konsantrasyonuna karşılık gelmektedir) olduğu bildirilmiştir.

Çizelge 8.10 Farklı enzim miktarlarında, 120 dakikalık işlem süresi sonunda elde edilen % hidroliz ve çözünürlük dereceleri ve % enzim aktivite değerleri (T= 50°C, pH= 7, S= 15 g protein/L)

| E (%, hacim/hacim) | HD (%) | PÇ (%) | A (%) |
|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| 0.20 | 15.18 | 57.29 | 56.38 |
| 0.25 | 16.95 | 62.66 | 61.72 |
| 0.30 | 17.86 | 64.47 | 64.92 |
| 0.35 | 17.64 | 65.03 | 66.72 |
| 0.40 | 17.33 | 67.54 | 67.29 |

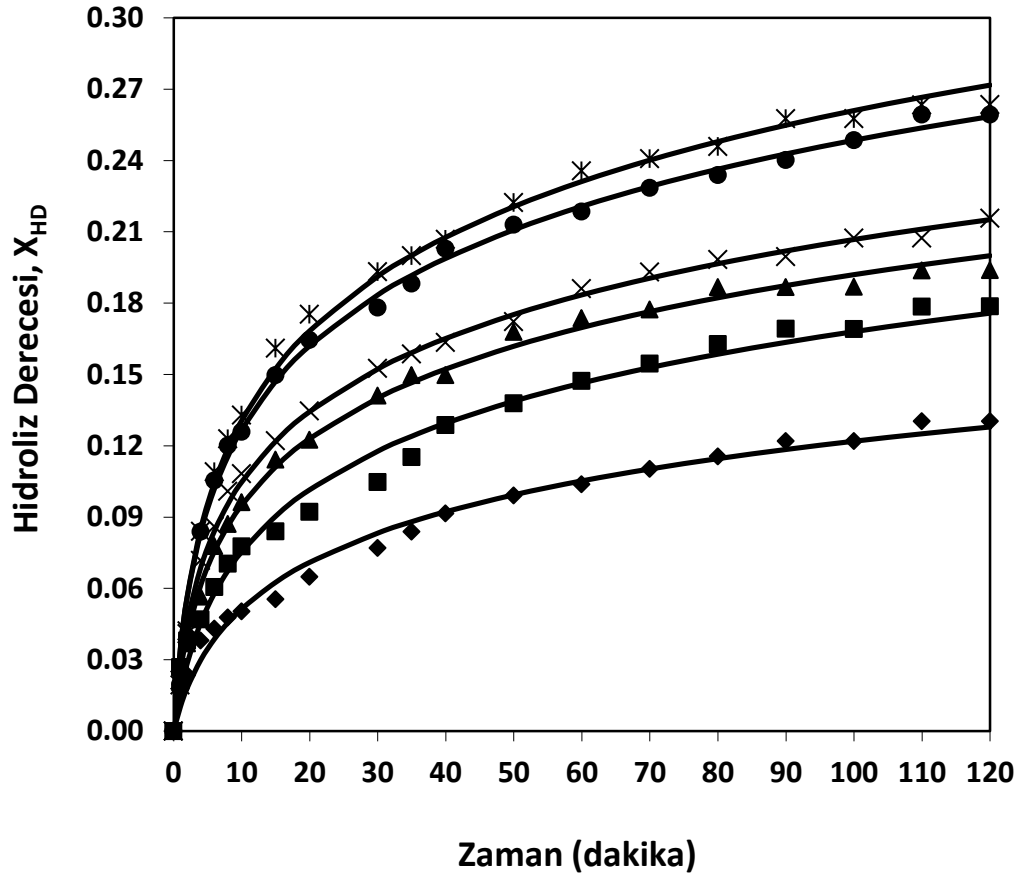
Hidroliz öncesi ortamda bulunan çözünmüş protein miktarı % 0.20, % 0.25, % 0.30, % 0.35 ve % 0.40 enzim miktarı deneyleri için sırası ile 2.09, 2.13, 2.07, 1.98 ve 2.16 g/L'dir.



Şekil 8.16 Hidroliz derecesi, % protein çözünürlüğü ve % enzim aktivite değerlerinin enzim miktarı ile değişimi, T= 50°C, pH= 7, S= 15 g protein/L (◆ hidroliz derecesi, ■ protein çözünürlüğü, Δ enzim aktivitesi)

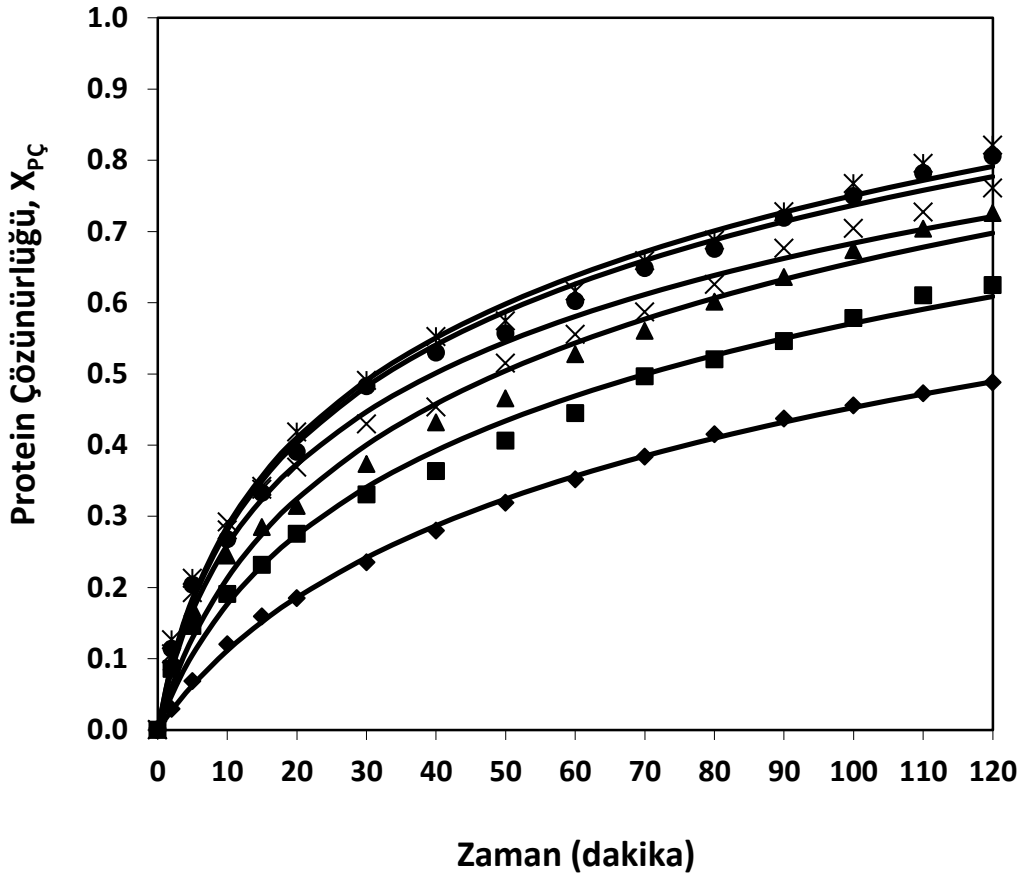
8.3.3 pH'nın hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi

pH değişiminin protein yapısını modifiye ettiği, enzimatik reaksiyonlarda enzim-substrat bağlanmasını dolayısıyla reaksiyonun katalizlenmesini, aynı zamanda enzim stabilitesini etkilediği bilinmektedir [98]. pH değişiminin hidroliz reaksiyonuna etkisini incelemek için 15 g protein/L substrat içeren 200 mL'lik reaksiyon çözeltisi, pH 6.5-9 aralığında değişen pH değerlerinde, 50°C sıcaklıkta, % 0.30 (hacim/hacim) enzim ilavesi ile 120 dakika boyunca hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Hidroliz dereceleri, protein çözünürlük dereceleri ve enzim stabiliteleri zamana bağlı olarak incelenmiş, elde edilen sonuçlar Şekil 8.17-8.21'de grafiksel olarak sunulmuştur.



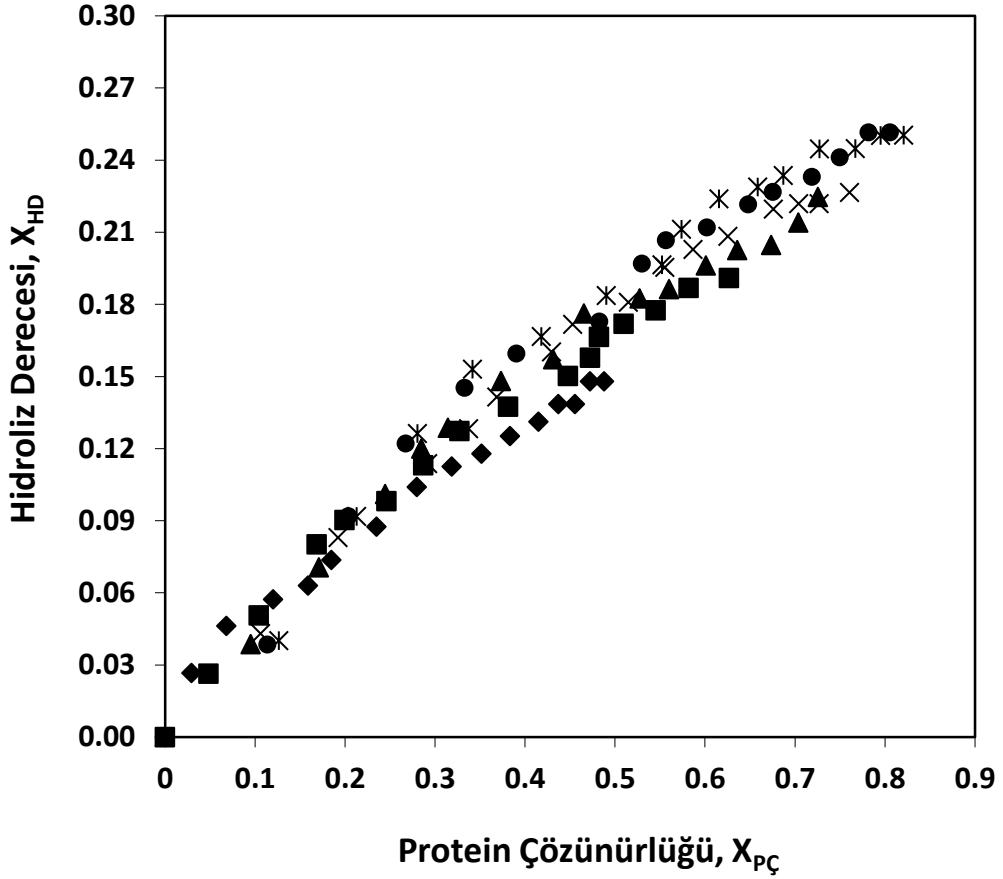
Şekil 8.17 Farklı pH değerleri için zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, (T= 50°C, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (◆ pH 6.5, ■ pH 7, ▲ pH 7.5, × pH 8, Ж pH 8.5, ● pH 9, — modeller)

Hidroliz derecesi ve protein çözünürlük derecelerinin pH'a bağlı değişimleri incelendiğinde (Şekil 8.17 ve Şekil 8.18); hidroliz reaksiyonunun hızının dolayısı ile hidroliz ve çözünürlük derecesi değerlerinin pH 8.5 değerine kadar artış gösterdiği, pH 9 değeri için elde edilen sonuçların ise hemen hemen pH 8.5 değeri için elde edilen sonuçlarla aynı olduğu görülmektedir.



Şekil 8.18 Farklı pH değerleri için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, (T= 50°C, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (◆ pH 6.5, ■ pH 7, ▲ pH 7.5, × pH 8, Ж pH 8.5, ● pH 9, — modeller)

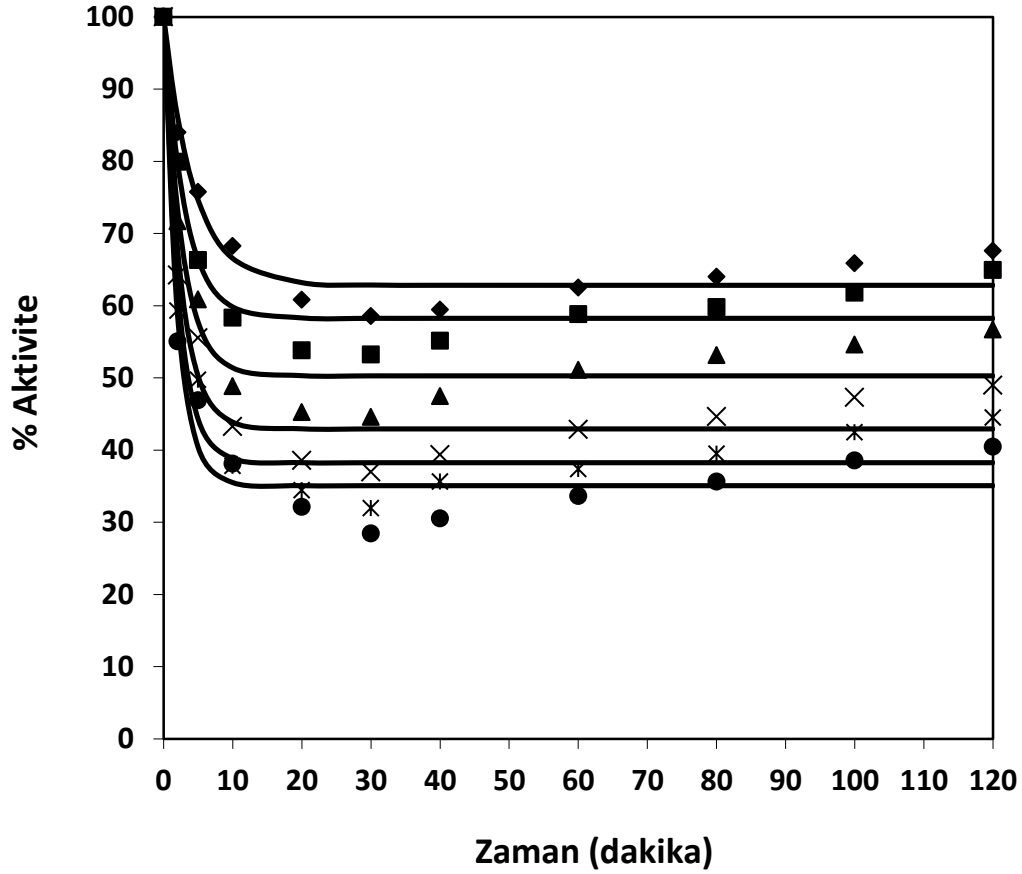
Farklı pH değerleri için; hidroliz derecesi değerlerinin protein çözünürlük derecesi değerlerine bağlı değişimleri incelendiğinde (Şekil 8.19), çalışılan bütün pH değerleri için, hidroliz derecesi değerleri ile çözünürlük derecesi değerleri arasında lineer bir ilişki olduğu görülmektedir.



Şekil 8.19 Farklı pH değerleri için hidroliz derecesi ile çözünürlük derecesinin değişimi, (T= 50°C, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (♦ pH 6.5, ■ pH 7, ▲ pH 7.5, × pH 8, Ж pH 8.5, ● pH 9)

pH'in enzim stabilitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde (Şekil 8.20), pH 6.5-7.5 aralığında, pH artışına bağlı enzim inaktivasyonunun 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 8.11 ve Şekil 8.21'de özetlenmiştir. Çizelge 8.11 ve Şekil 8.21 incelendiğinde, maksimum hidroliz ve çözünürlük derecesinin pH 8.5 değerinde elde edildiği görülmektedir. Bu nedenle pH 8.5, reaksiyon için uygun pH olarak seçilmiştir.

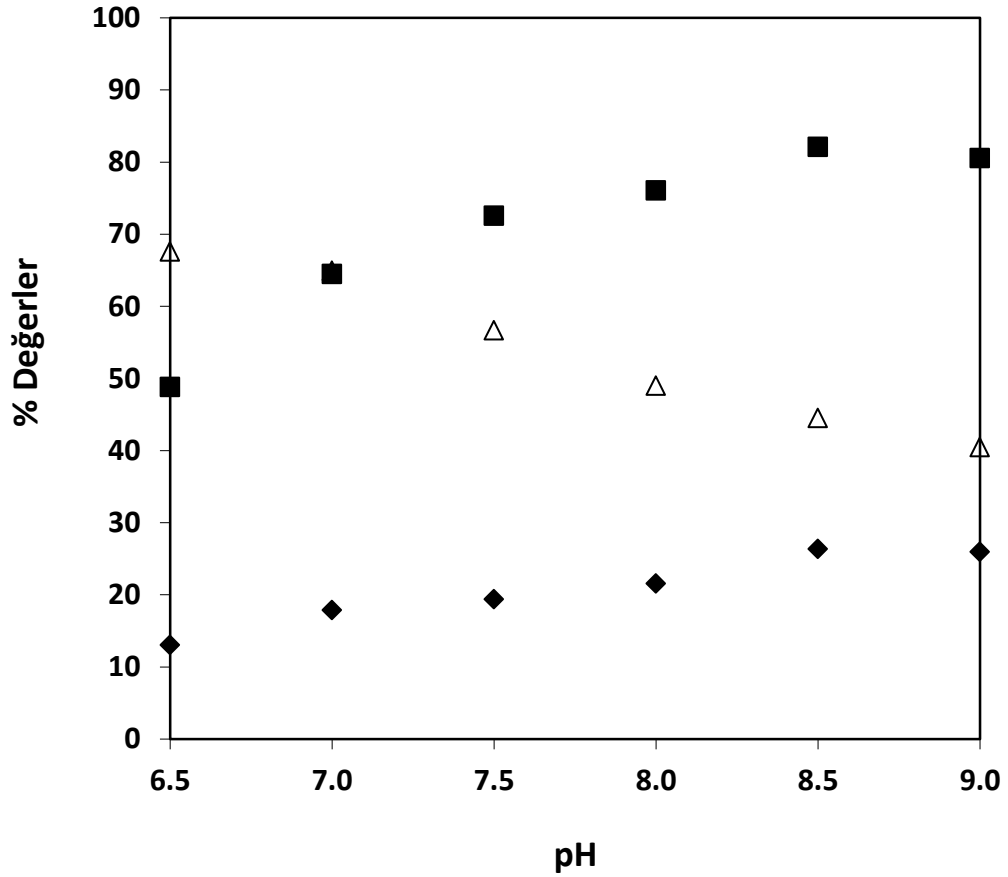


Şekil 8.20 Farklı pH değerleri için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, (T= 50°C, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (◆ pH 6.5, ■ pH 7, ▲ pH 7.5, × pH 8, ⋈ pH 8.5, ● pH 9, — modeller)

Çizelge 8.11 Farklı pH değerleri için, 120 dakikalık işlem süresi sonunda elde edilen % hidroliz ve çözünürlük dereceleri ve % enzim aktivite değerleri (T= 50°C, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim))

| pH | HD (%) | PÇ (%) | A (%) |
|-----|--------|--------|-------|
| 6.5 | 13.03 | 48.8 | 67.58 |
| 7.0 | 17.86 | 64.47 | 64.92 |
| 7.5 | 19.39 | 72.56 | 56.68 |
| 8.0 | 21.57 | 76.08 | 48.97 |
| 8.5 | 26.34 | 82.09 | 44.50 |
| 9.0 | 25.93 | 80.56 | 40.45 |

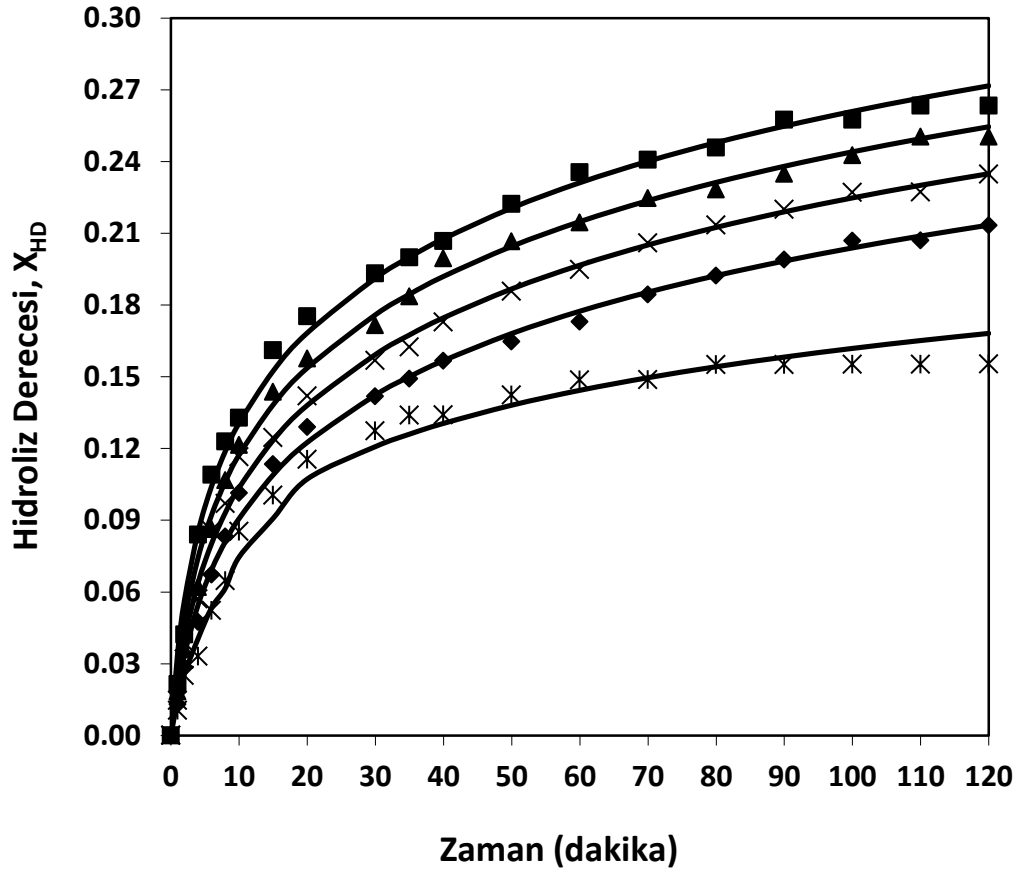
Hidroliz öncesi ortamda bulunan çözülmüş protein miktarı pH 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5 ve 9 değerlerinde gerçekleştirilen deneyler için sırası ile 2.03, 2.07, 2.05, 1.96, 2.07 ve 2 g/L'dir.



Şekil 8.21 % Hidroliz derecesi, % protein çözünürlüğü ve % enzim aktivite değerlerinin pH ile değişimi, T= 50°C, E= % 0.30 (hacim/hacim), S= 15 g protein/L (◆ hidroliz derecesi, ■ protein çözünürlüğü, △ enzim aktivitesi)

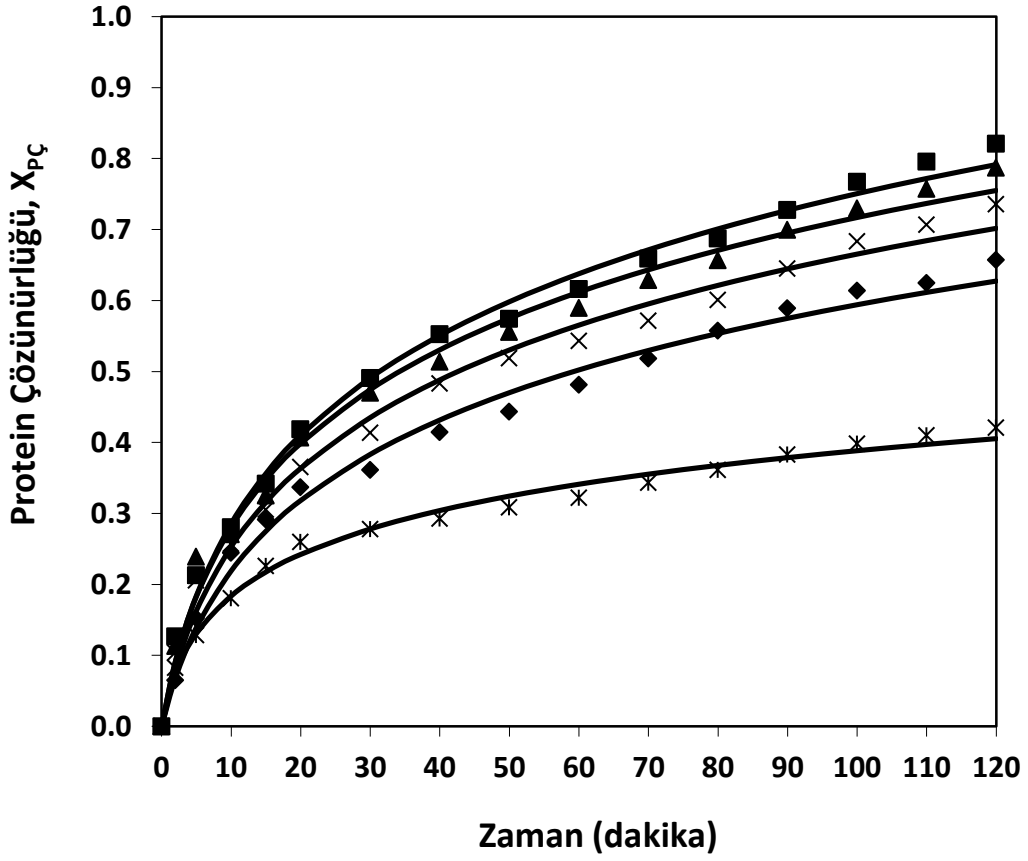
8.3.4 Sıcaklığın hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi

Sıcaklık artışının reaksiyon hızını artırdığı ancak enzimlerinde yapısal olarak bozunmalarına neden olduğu bilinmektedir. Sıcaklık artışının hidroliz derecesine ve çözünen protein miktarına etkisini incelemek için 15 g protein/L substrat içeren 200 mL'lik reaksiyon çözeltisi, pH 8.5 değerinde, % 0.30 (hacim/hacim) enzim ilavesi ile 45-65°C arasında değişen sıcaklık değerlerinde 120 dakika boyunca hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Hidroliz dereceleri, protein çözünürlük dereceleri ve enzim stabiliteyi zamana bağlı olarak incelenmiş, elde edilen sonuçlar Şekil 8.22-8.26'da grafiksel olarak sunulmuştur.



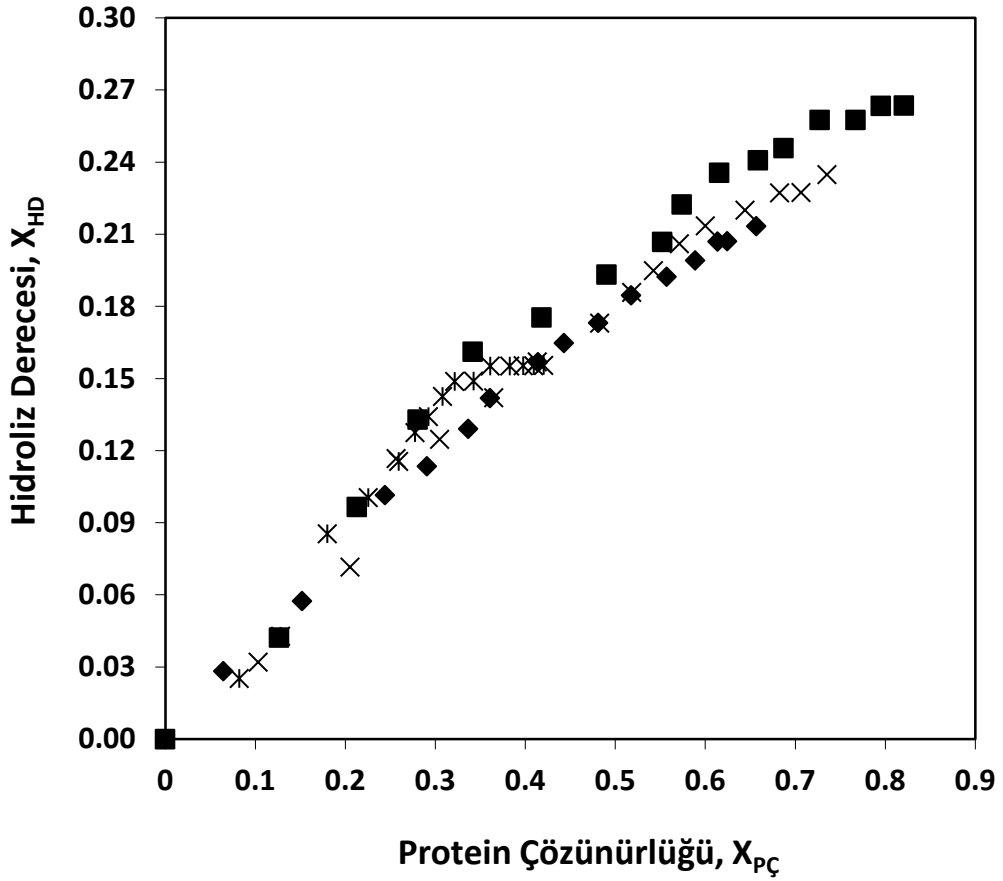
Şekil 8.22 Farklı sıcaklıklar için zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, (S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim), pH= 8.5) (◆ 45°C, ■ 50°C, ▲ 55°C, × 60°C, ⋈ 65°C, — modeller)

Hidroliz derecesi ve protein çözünürlük derecelerinin sıcaklığa bağlı değişimleri incelendiğinde (Şekil 8.22 ve Şekil 8.23); maksimum hidroliz ve çözünürlük değerlerinin 50°C’de elde edildiği, dolayısı ile bu sıcaklık değerinin susam küspesi proteininin hidroliz reaksiyonu için optimum değer olduğu saptanmıştır. 55°C’de hidroliz ve çözünürlük derecelerinin, işlem süresinin ilk 60 dakikasında 50°C’deki değerlerden biraz daha yüksek olduğu, ancak daha sonraki zaman diliminde bu değerlerin 50°C’deki değerlerin altında seyrettiği görülmektedir. Şekil 8.22 ve Şekil 8.23 incelendiğinde, yaklaşık 40. dakikadan sonra 65°C sıcaklık değeri için elde edilen hidroliz ve çözünürlük derecesi değerlerinin zamana bağlı olarak değişmedikleri ve sonuç olarak enzimin sıcaklıkla tamamen inaktive olmasından dolayı reaksiyonun durduğu görülmektedir. Bu durum, 65°C’de enzimin stabilitesini koruyamaması ve bozunması ile açıklanabilir.



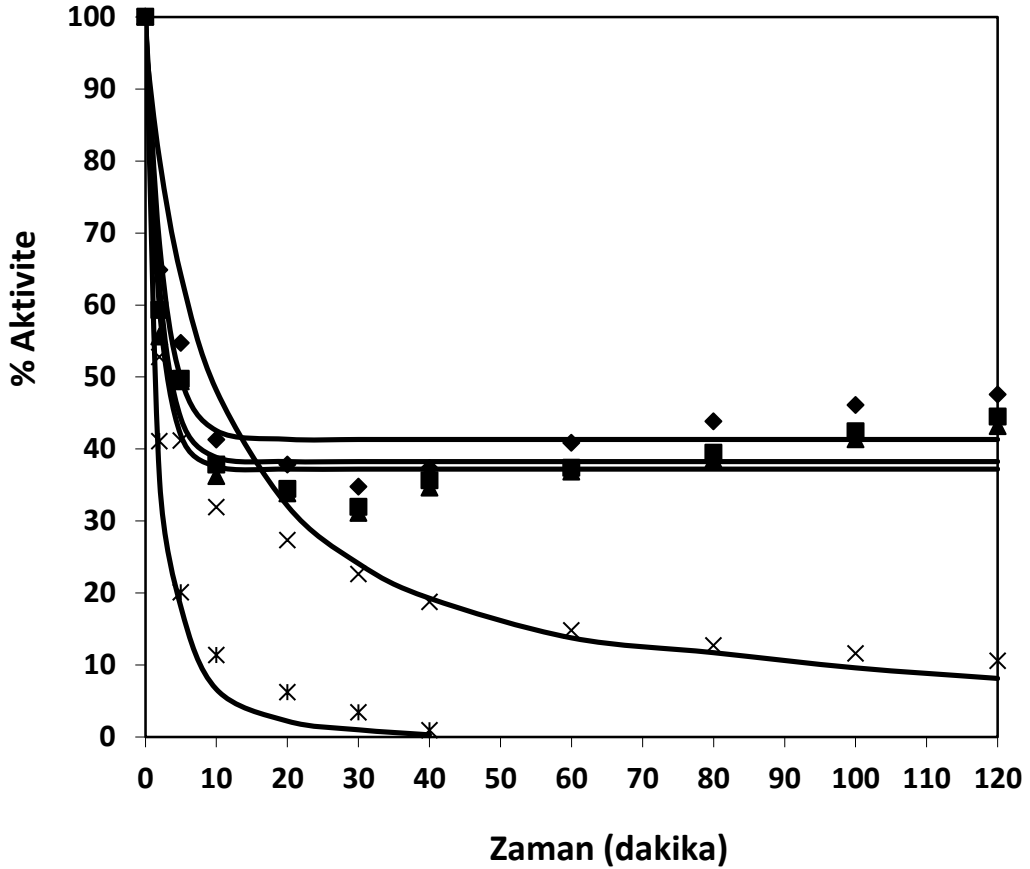
Şekil 8.23 Farklı sıcaklıklar için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, (S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim), pH= 8.5) (◆ 45°C, ■ 50°C, ▲ 55°C, × 60°C, ⋈ 65°C, — modeller)

Sıcaklık deneylerine ait hidroliz derecesi değerlerinin protein çözünürlük derecesi değerlerine bağlı değişimleri incelendiğinde (Şekil 8.24), çalışılan bütün sıcaklık değerleri için, hidroliz derecesi değerleri ile çözünürlük derecesi değerleri arasında lineer bir ilişki olduğu görülmektedir.



Şekil 8.24 Farklı sıcaklıklar için hidroliz derecesi ile çözünürlük derecesinin değişimi, (S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim), pH= 8.5) (◆ 45°C, ■ 50°C, ▲ 55°C, × 60°C, ✖ 65°C)

Sıcaklığın enzim stabilitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde (Şekil 8.25), 45-55°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 40 dakika içerisinde tamamen inaktive olmuştur.



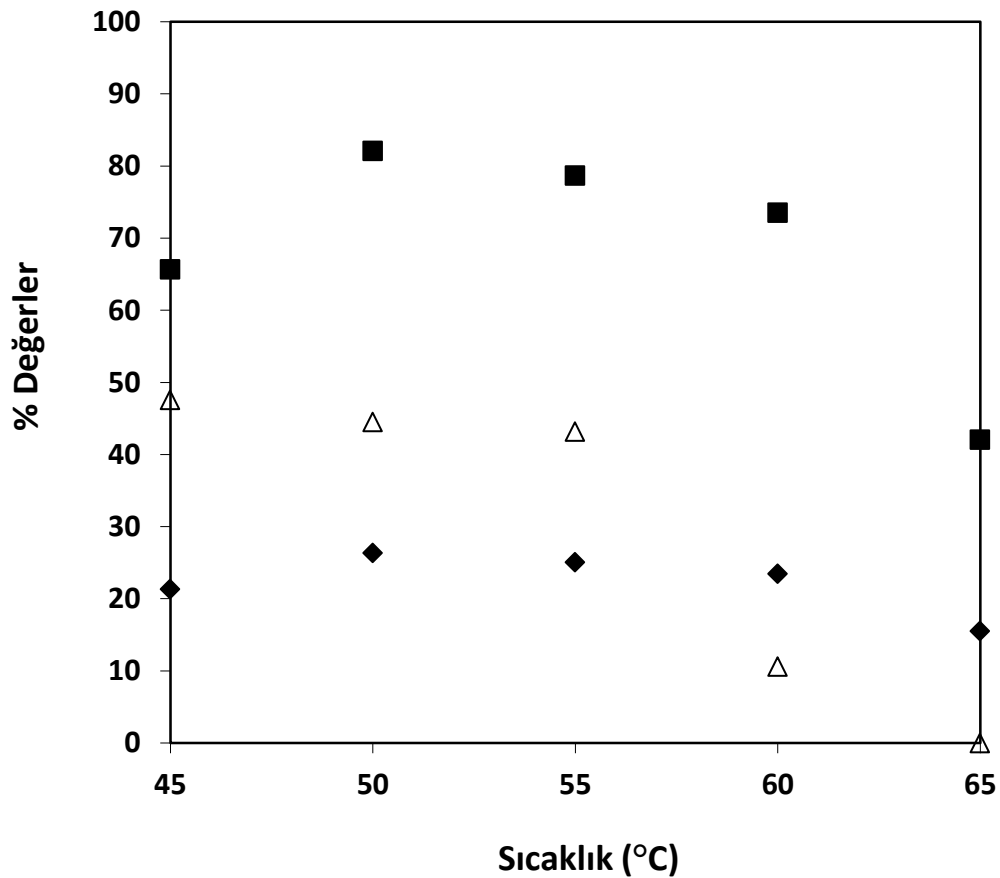
Şekil 8.25 Farklı sıcaklıklar için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, (S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim), pH= 8.5) (◆ 45°C, ■ 50°C, ▲ 55°C, × 60°C, ⋈ 65°C, — modeller)

Çalışılan tüm sıcaklık değerleri için, 120 dakikalık reaksiyon süresi sonunda elde edilen % hidroliz derecesi, % protein çözünürlüğü ve % enzim aktivite değerleri, Çizelge 8.12 ve Şekil 8.26'da ayrıca özetlenmiştir. Çizelge 8.12 ve Şekil 8.26 incelendiğinde, 50°C sıcaklık değerine kadar % hidroliz ve % çözünürlük derecelerinin artış gösterdiği bu sıcaklık değerinden sonra ise azalmaya başladığı açıkça görülmektedir. Bu nedenle susam küspesi proteininin hidroliz ve çözünürlüğü için optimum sıcaklık değeri 50°C olarak belirlenmiştir.

Çizelge 8.12 Farklı sıcaklık değerleri için, 120 dakikalık işlem süresi sonunda elde edilen % hidroliz ve çözünürlük dereceleri ve % enzim aktivite değerleri (S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim), pH= 8.5)

| T (°C) | HD (%) | PÇ (%) | A (%) |
|-----------|-----------|-----------|----------|
| 45 | 21.33 | 65.68 | 47.55 |
| 50 | 26.34 | 82.09 | 44.5 |
| 55 | 25.04 | 78.69 | 43.15 |
| 60 | 23.47 | 73.55 | 10.58 |
| 65 | 15.53 | 42.07 | 0 |

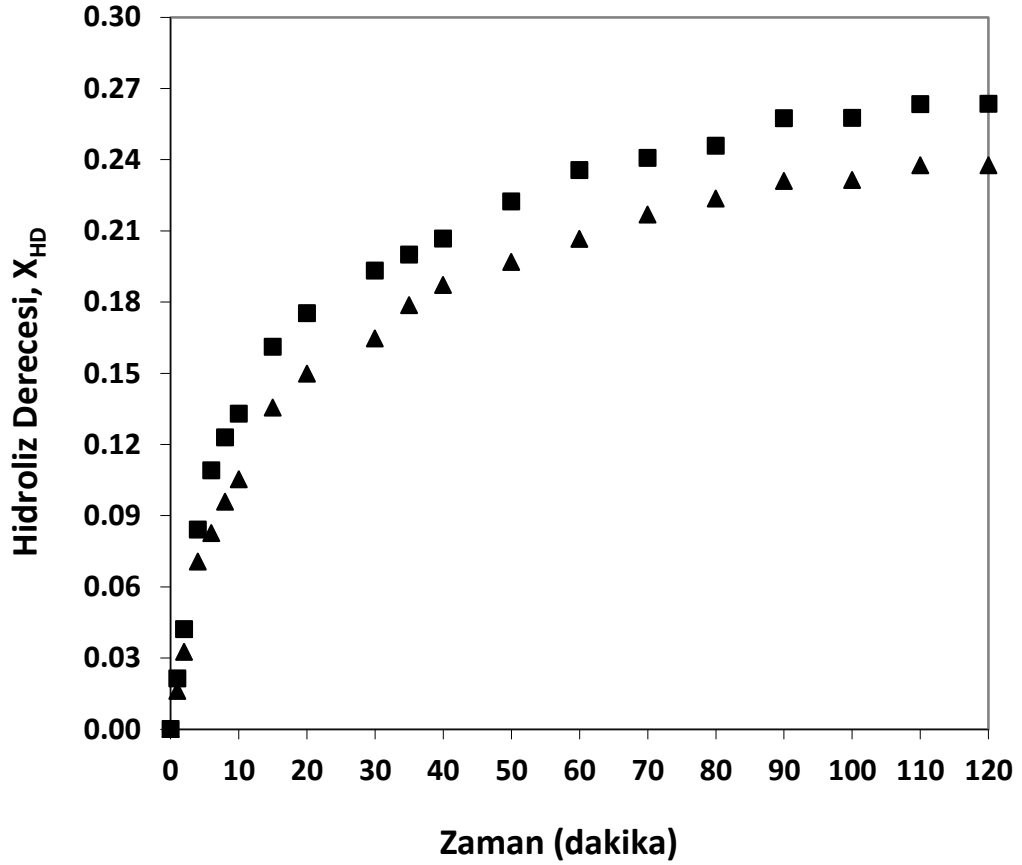
Hidroliz öncesi ortamda bulunan çözünmüş protein miktarı 40, 45, 50, 55, 60 ve 65°C sıcaklık değerlerinde gerçekleştirilen deneyler için sırası ile 2.03, 2.07, 2.01, 2.12 ve 2.09 g/L'dir.



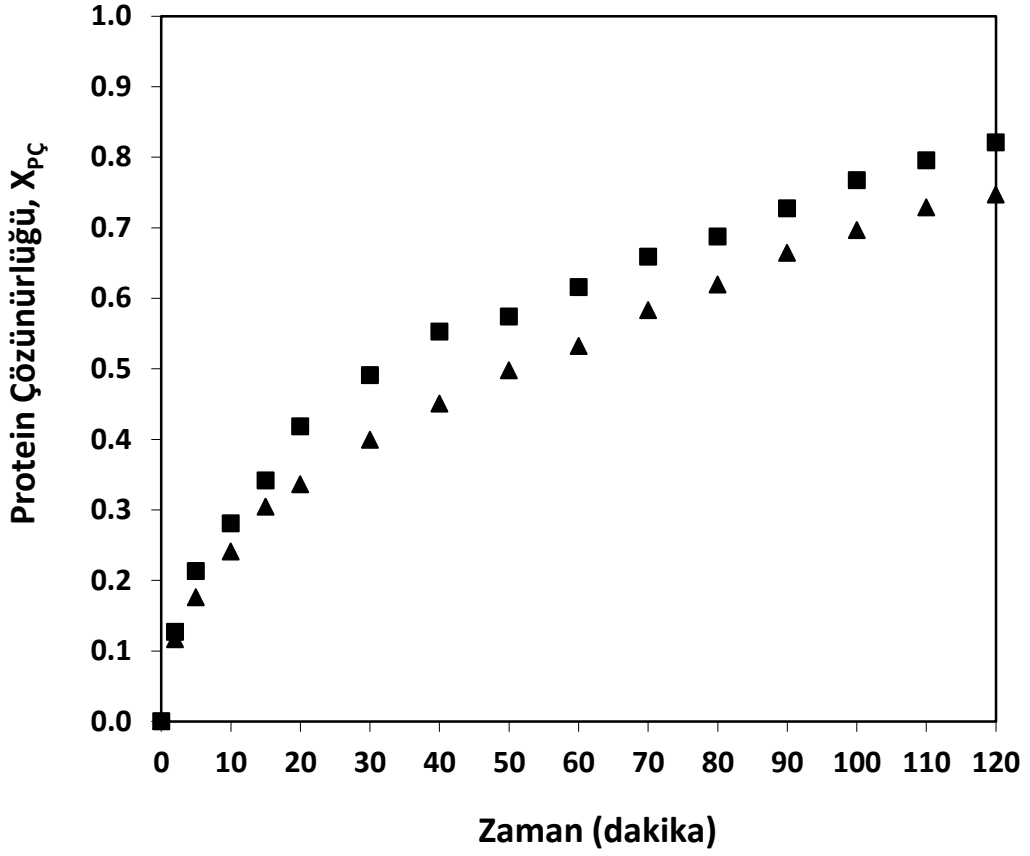
Şekil 8.26 % Hidroliz derecesi, % protein çözünürlüğü ve % enzim aktivite değerlerinin sıcaklık ile değişimi, (S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim), pH= 8.5) (♦ hidroliz derecesi, ■ protein çözünürlüğü, Δ enzim aktivitesi)

8.3.5 Optimum proses şartlarında susam küspesi proteini ve susam proteini hidrolizinin karşılaştırılması

Substrat olarak susam küspesi yerine susam kullanımının hidroliz derecesine ve çözünen protein miktarına etkisini incelemek için, optimum proses şartları olan 15 g protein/L substrat içeren 200 mL'lik reaksiyon çözeltisi, 50°C ve pH 8.5 değerinde, % 0.30 (hacim/hacim) enzim ilavesi ile 120 dakika boyunca hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Hidroliz dereceleri, protein çözünürlük dereceleri ve enzim stabiliteleri zamana bağlı olarak incelenmiş, elde edilen sonuçlar Şekil 8.27-8.29'da grafiksel olarak sunulmuştur.

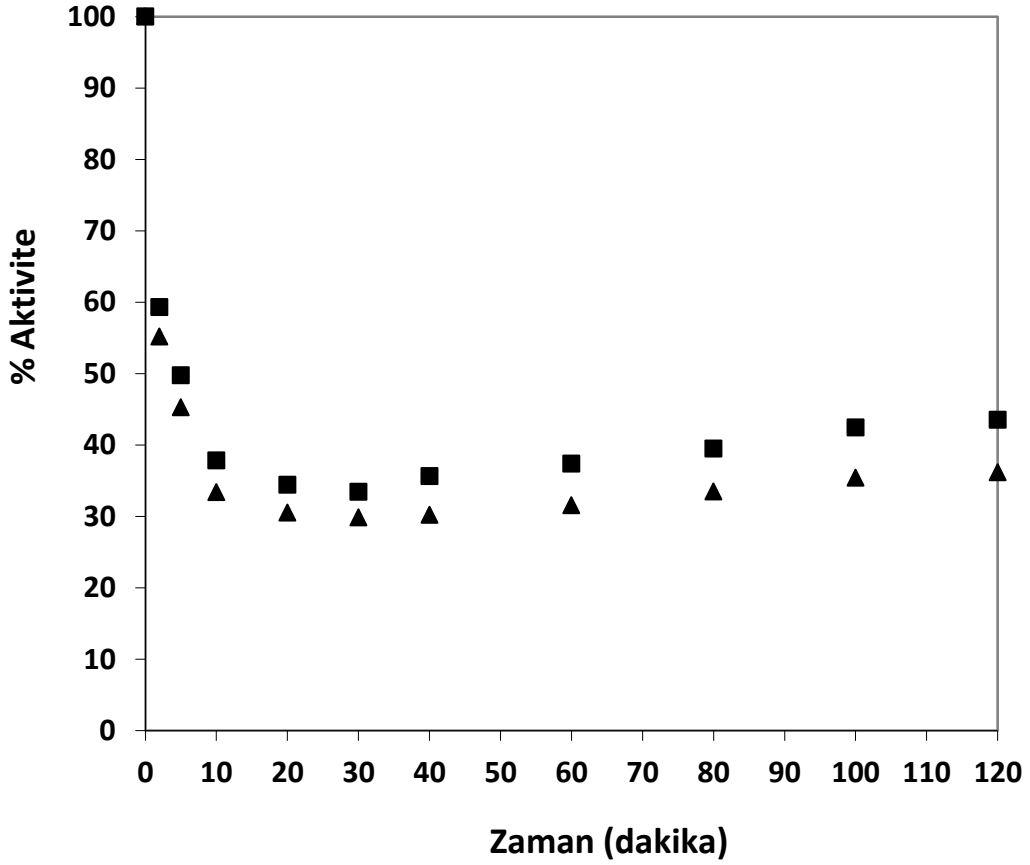


Şekil 8.27 Susam ve susam küspesi substratları için zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, (S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim), pH= 8.5, T= 50°C)
(■ susam küspesi, ▲ susam)



Şekil 8.28 Susam ve susam küspesi substratları için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, (S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim), pH= 8.5, T= 50°C) (■ susam küspesi, ▲ susam)

Şekil 8.27 ve 8.28 incelendiğinde, substrat olarak susam kullanıldığında hidroliz derecesi ve çözünürlük derecesi değerlerinin azaldığı görülmektedir. Susam küspesi için elde edilen hidroliz derecesi ve çözünürlük değerleri % 26.3 ve % 82.1 iken, bu değerler substrat olarak susam kullanıldığında % 23.8 ve % 75 olarak bulunmuştur.



Şekil 8.29 Susam ve susam küspesi substratları için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, (S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim), pH= 8.5, T= 50°C)
(■ susam küspesi, ▲ susam)

Farklı subtrat kullanımının enzim stabilitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde (Şekil 8.29), substrat olarak susam kullanıldığı zaman % enzim aktivite değerlerinde azalma olduğu görülmektedir. Enzim aktivitesi değerleri susam küspesi kullanıldığında % 44.5, susam kullanıldığında ise % 36.2 olarak bulunmuş olup, susam küspesi kullanıldığı enzim aktivite değeri susam kullanıldığında enzim aktivite değerine kıyasla yaklaşık % 19 daha fazladır.

Çizelge 8.13 Susam ve susam küspesi substratları için, 120 dakikalık işlem süresi sonunda elde edilen % hidroliz ve çözünürlük dereceleri ve % enzim aktivite değerleri (S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim), pH= 8.5, T= 50°C)

| Substrat | HD (%) | PÇ (%) | A (%) |
|-----------------|---------------|---------------|--------------|
| Susam | 23.76 | 75.01 | 36.15 |
| Susam Küspesi | 26.34 | 82.09 | 44.50 |

Sonuç olarak, susam küspesi substrat olarak kullanıldığı zaman hidroliz derecesi ve çözünürlük derecesi değerlerinin arttığı görülmektedir. % Enzim aktivite değerleri incelendiğinde, susam küspesi ile daha yüksek aktivite değeri elde edilmektedir. Bu durum, susam küspesinin yağ içermemesinin enzim aktivitesi üzerinde olumlu etkisi olduğunu göstermektedir.

8.3.6 Optimum proses şartlarında elde edilen susam küspesi proteini hidrolizatının amino asit kompozisyonunun incelenmesi

Bölüm 8.3.1-8.3.4'de kesikli sistemde gerçekleştirilen deneyler sonucunda, susam küspesi proteininin Alcalase enzimi ile hidrolizi için optimum proses şartları; 15 g protein/L substrat konsantrasyonu, % 0.30 (hacim/hacim) enzim miktarı, 50°C sıcaklık ve pH 8.5 olarak belirlenmiş ve optimum proses şartlarında, 120 dakika süreyle gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu sonucunda, % 26.3 hidroliz derecesi, % 82.1 protein çözünürlüğü elde edilmiştir. Optimum proses şartlarında elde edilen hidrolizat çözeltisinin amino asit kompozisyonu analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 8.14'te sunulmuştur. Çizelge 8.14 incelendiğinde hidrolizat çözeltisinin amino asit kompozisyonunun, ham susam küspesinin amino asit kompozisyonu ile hemen hemen aynı olduğu, yani hidroliz işlemi sonucunda proteinin besinsel değerini koruduğu açık bir biçimde görülmektedir.

Çizelge 8.14 Optimum proses şartlarında elde edilen hidrolizat çözeltisinin amino asit kompozisyon analizi

| Amino asit | Ham Susam Küspesi (mg/g protein) | Hidrolizat (mg/g protein) |
|----------------|-------------------------------------|------------------------------|
| Alanin | 67.29 | 72.11 |
| Glisin | 49.96 | 52.64 |
| Valin | 59.32 | 55.69 |
| Lösin | 104.14 | 101.43 |
| İzolösin | 49.05 | 43.27 |
| Treonin | 58.17 | 59.47 |
| Serin | 55.17 | 52.52 |
| Prolin | 68.06 | 70.53 |
| Aspartik asit | 45.97 | 42.91 |
| Metiyonin | 28.23 | 33.03 |
| Glutamik asit | 26.85 | 24.91 |
| Fenilalanin | 161.73 | 161.11 |
| Lizin | 82.73 | 83.45 |
| Histidin | 11.05 | 12.08 |
| Triozin | 39.64 | 40.97 |
| Hidroksiprolin | 47.78 | 44.62 |
| Arginin | 21.13 | 22.84 |
| Triptofan | 23.73 | 26.79 |

8.3.7 Literatürde varolan verilerle bu çalışmada elde edilen verilerin karşılaştırılması

Literatürde susam ve susam küspesi 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 susam protein hidrolizatlarının belirli bazı fonksiyonel özellikleri iyileştirilmeye çalışılmış, enzim stabilitesi ve reaksiyon kinetiği hiç incelenmemiştir. Bu çalışmada ise özellikle maksimum hidroliz ve protein çözünürlüğü için proses parametreleri ile ilgili optimizasyon çalışmalarına yer verilmiş, enzim

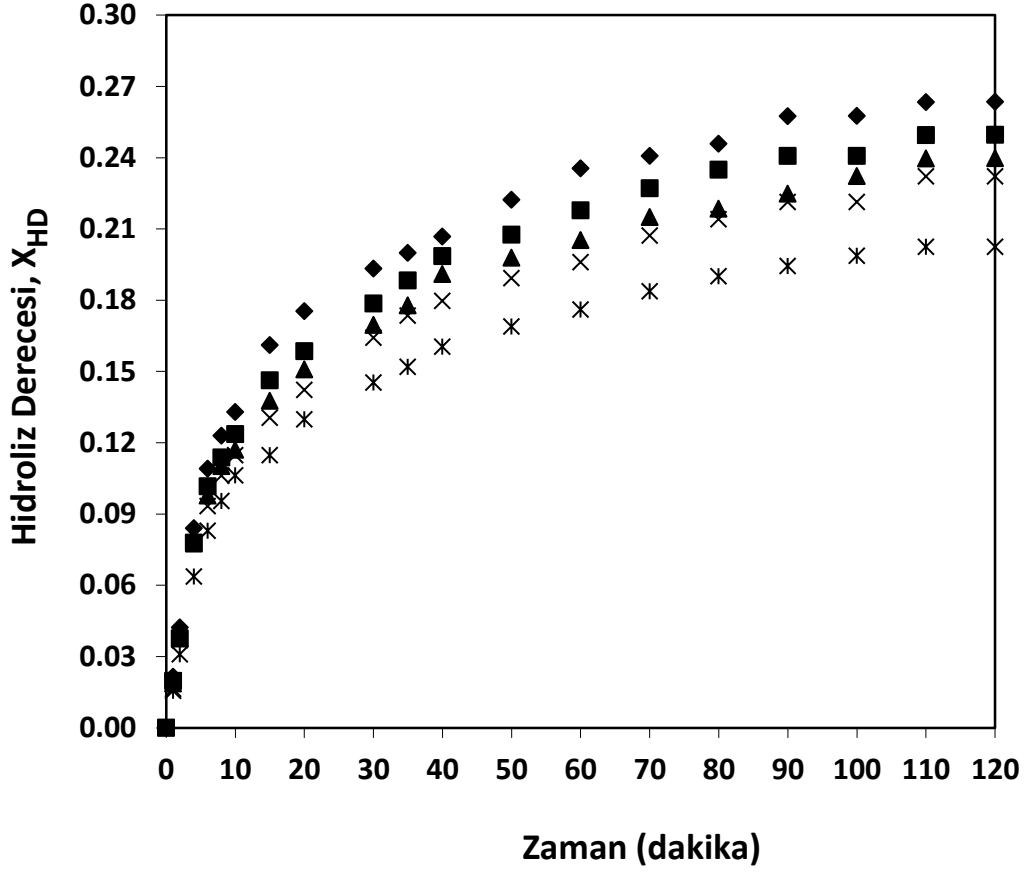
stabilitesi incelenmiş ve reaksiyon kinetiği üzerine detaylı bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Çizelge 8.15'te, susam küspesi proteininin enzimatik hidrolizi ve enzimatik hidroliz ile ilgili literatürde yer alan çalışmalar sonucunda elde edilen hidroliz ve çözünürlük verileri ile deneylerin gerçekleştirildikleri proses şartları verilmiştir.

Çizelge 8.15 Optimum proses şartlarında elde edilen verilerin, literatürde varolan verilerle karşılaştırılması

| Kaynak | Substrat | Enzim | Proses şartları | Hidroliz Derecesi ve Protein Çözünürlüğü |
|------------------------------------|------------------------|-----------|--|---|
| Kanu vd. [82] | Susam küspesi | Alcalase | pH 8.32, 59°C E/S = 1.80 (%) | 83 dakika sonunda, % 15.8 HD; |
| Bandyopadhyay ve Ghosh [44] | Susam protein izolatı | Papain | pH 8, 37°C E= % 0.1 (ağırlık/hacim) S = % 5 (ağırlık/hacim) | 60 dakika sonunda, % 24.1 HD; |
| Taha vd. [86] | Susam | Papain | pH 7.0, 50°C E/S = 0.29 S = % 5 (ağırlık/hacim) | 120 dakika sonunda, % 27.2 HD |
| | | Bromelain | pH 6.0,45°C E/S = 0.058 S = % 5 (ağırlık/hacim) | 120 dakika sonunda, % 29.1 HD |
| Perez ve Saad [87] | Susam | Neutrase | pH 7, 50°C E/S = % 3 S = % 6 | 70 dakika sonunda, % 8 HD |
| | | Alcalase | pH 8, 58°C E/S = % 2.3 S = % 8 | 50 dakika sonunda, % 10 HD |
| Bu çalışmada | Susam küspesi ve Susam | Alcalase | pH 8.5, 50°C S = % 1.5 (ağırlık/hacim) E = % 0.3 (hacim/hacim) | Susam Küspesi; 120 dakika sonunda, % 26.3 HD % 82.1 çözünürlük |
| | | | | Susam; 120 dakika sonunda, % 23.8 HD % 75 çözünürlük |

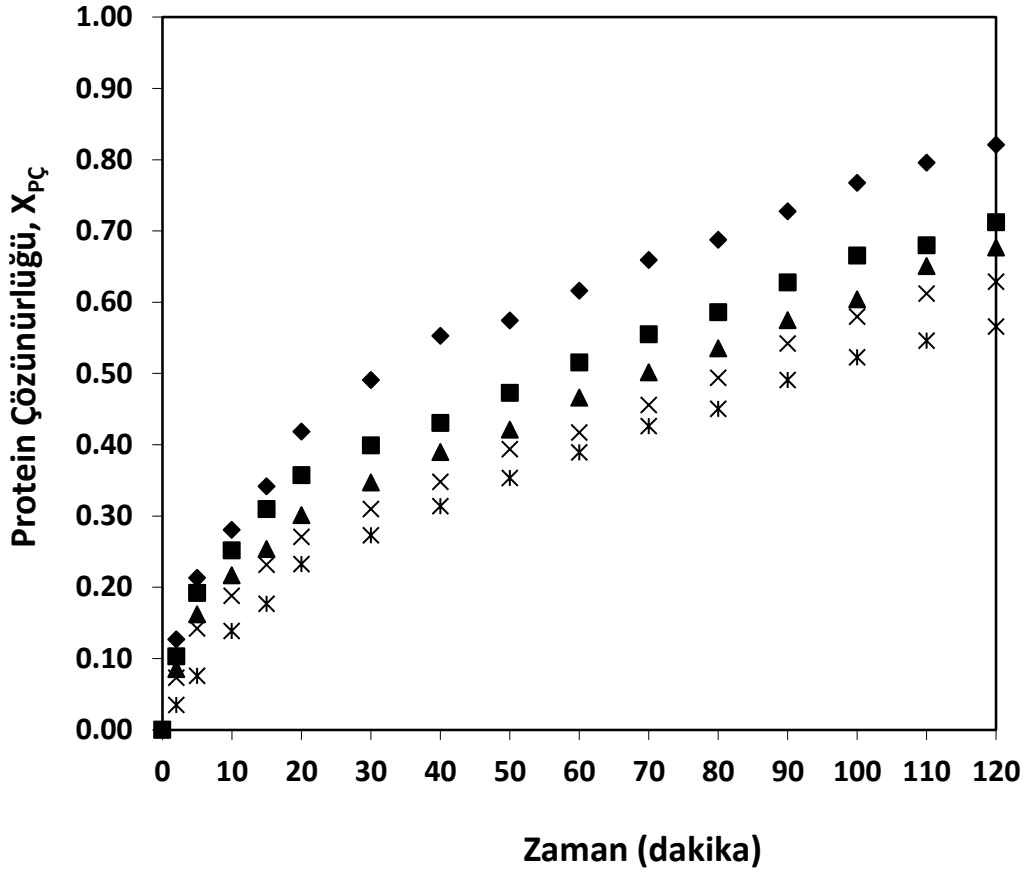
8.4 Hidroliz Ürün Konsantrasyonunun Hidroliz Reaksiyonu Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

Hidroliz işlemi sonunda meydana gelen 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 15 g protein/L substrat içeren reaksiyon çözültileri, 50°C sıcaklıkta, pH 8.5'de, % 0.30 (hacim/hacim) enzim ilavesi ile 120 dakika boyunca hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar Şekil 8.30-8.33'de grafiksel olarak sunulmuştur.



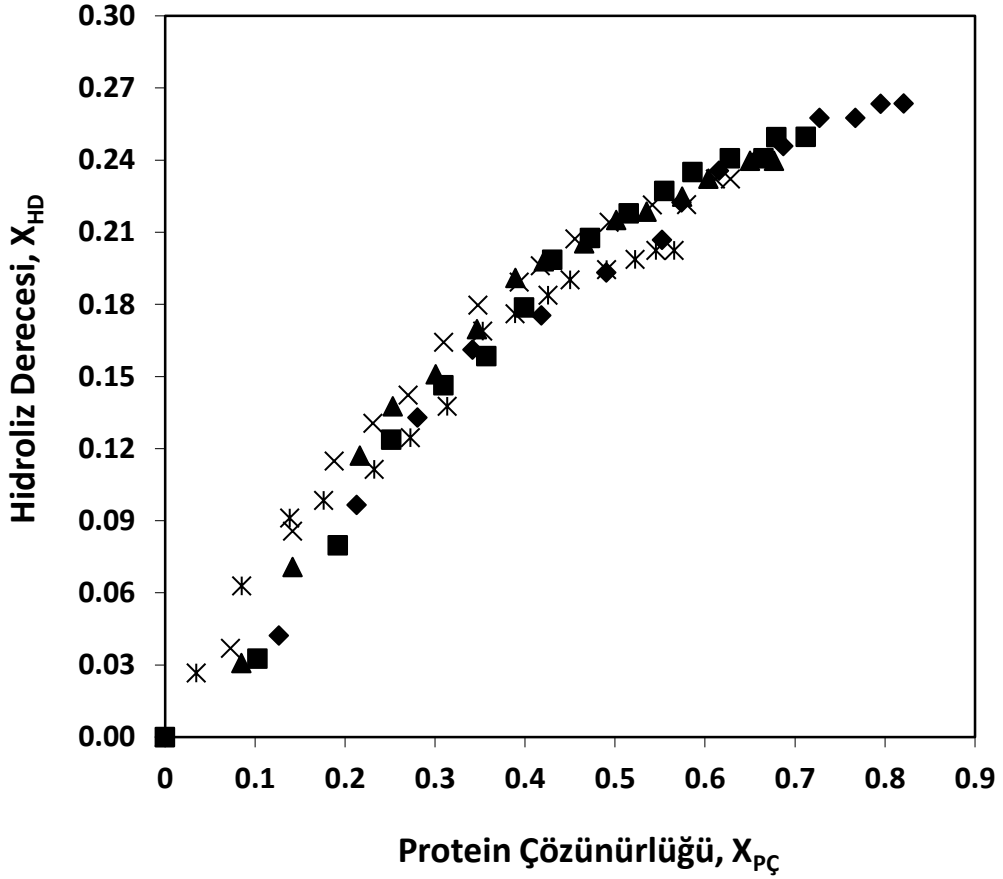
Şekil 8.30 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesi için zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim), S= 15 g protein/L) (◆ % 0 (hacim/hacim), ■ % 25 (hacim/hacim), ▲ % 50 (hacim/hacim), × % 75 (hacim/hacim), * % 100 (hacim/hacim))

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 8.30 ve 8.31). Bu azalma, hidroliz ürünlerinin enzimi inhibe etmesi veya ortamın viskozitesini artırarak kütle transferini engellemesi ile açıklanabilir.



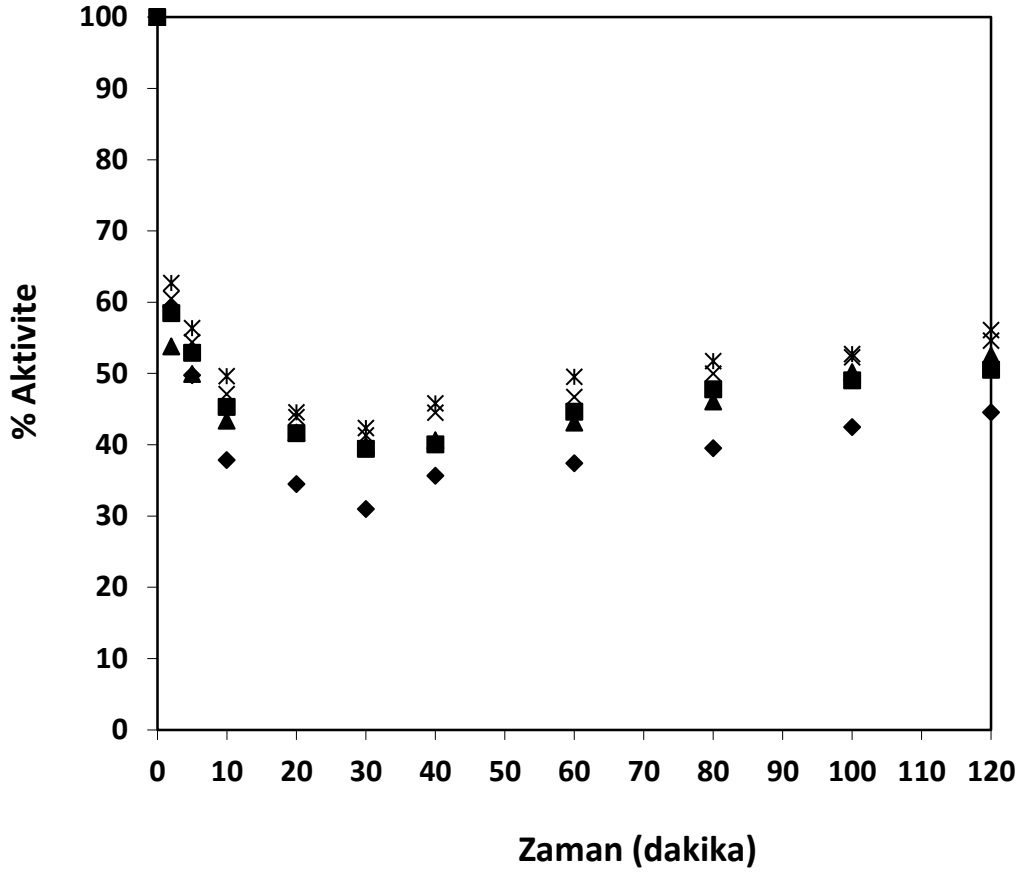
Şekil 8.31 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesi için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim), S= 15 g protein/L) (◆ % 0 (hacim/hacim), ■ % 25 (hacim/hacim), ▲ % 50 (hacim/hacim), × % 75 (hacim/hacim), * % 100 (hacim/hacim))

Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesi için; hidroliz derecesi değerlerinin protein çözünürlük derecesi değerlerine bağlı değişimleri incelendiğinde (Şekil 8.32), hidroliz derecesi değerleri ile çözünürlük derecesi değerleri arasında lineer bir ilişki olduğu görülmektedir.



Şekil 8.32 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesi için hidroliz derecesi ile çözünürlük derecesinin değişimi, (T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim), S= 15 g protein/L) (◆ % 0 (hacim/hacim), ■ % 25 (hacim/hacim), ▲ % 50 (hacim/hacim), × % 75 (hacim/hacim), ✖ % 100 (hacim/hacim))

Hidrolizat miktarının enzim stabilitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde (Şekil 8.33), 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 ile; 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.



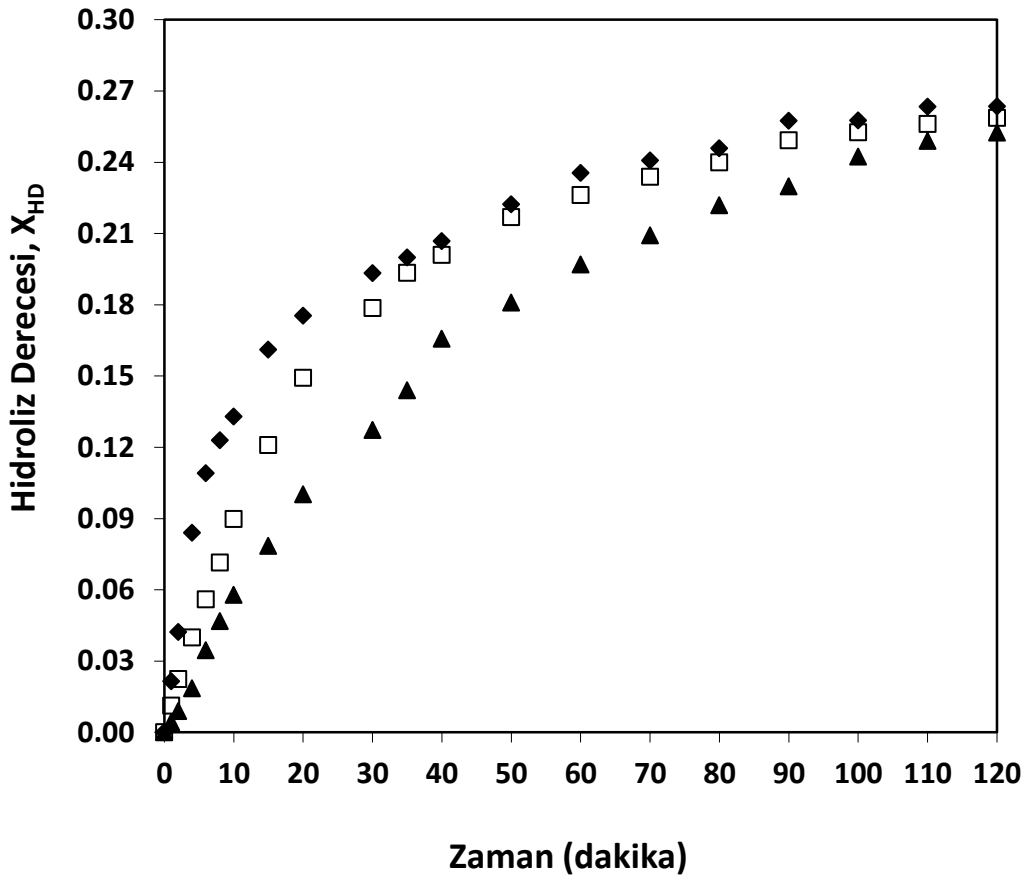
Şekil 8.33 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesi için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim), S= 15 g protein/L) (♦ % 0 (hacim/hacim), ■ % 25 (hacim/hacim), ▲ % 50 (hacim/hacim), × % 75 (hacim/hacim), ⌘ % 100 (hacim/hacim))

8.5 Kademeli Enzim İlavesinin Hidroliz Reaksiyonu Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

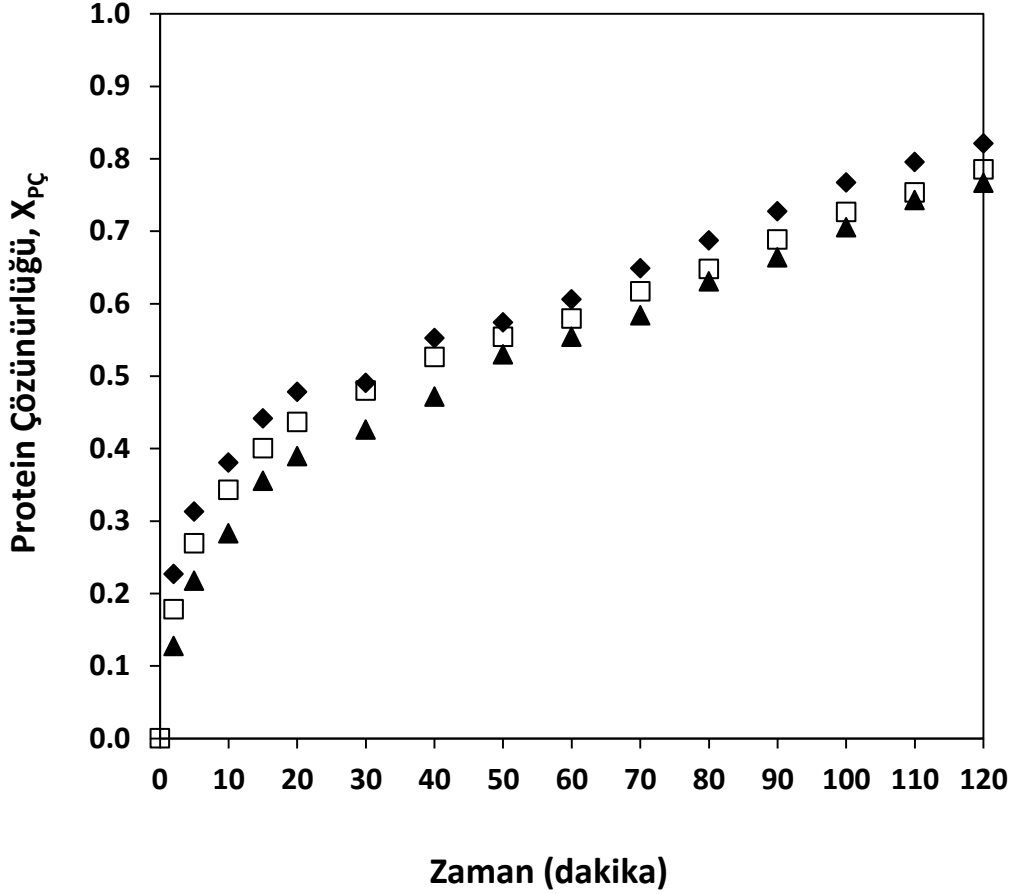
Bölüm 8.3'de gerçekleştirilen deneyler sonucunda, susam küspesi proteininin hidrolizi ve çözünürlüğü için belirlenen optimum proses koşullarında (15 g protein/L substrat konsantrasyonu, % 0.30 (hacim/hacim) enzim miktarı, 50°C sıcaklık ve pH 8.5) enzimin stabilitesini % 56 oranında kaybettiği saptanmıştır. Bu nedenle, enzim inaktivasyonunu azaltabilmek, dolayısı ile hidroliz ve çözünürlük verimini artırabilmek amacıyla, belirlenen optimum koşullarda toplam enzim miktarı sabit tutularak (3 mL/L = 8.4 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 8.34-8.36'de grafiksel olarak sunulmuştur.

Şekil 8.34 ve Şekil 8.35 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.

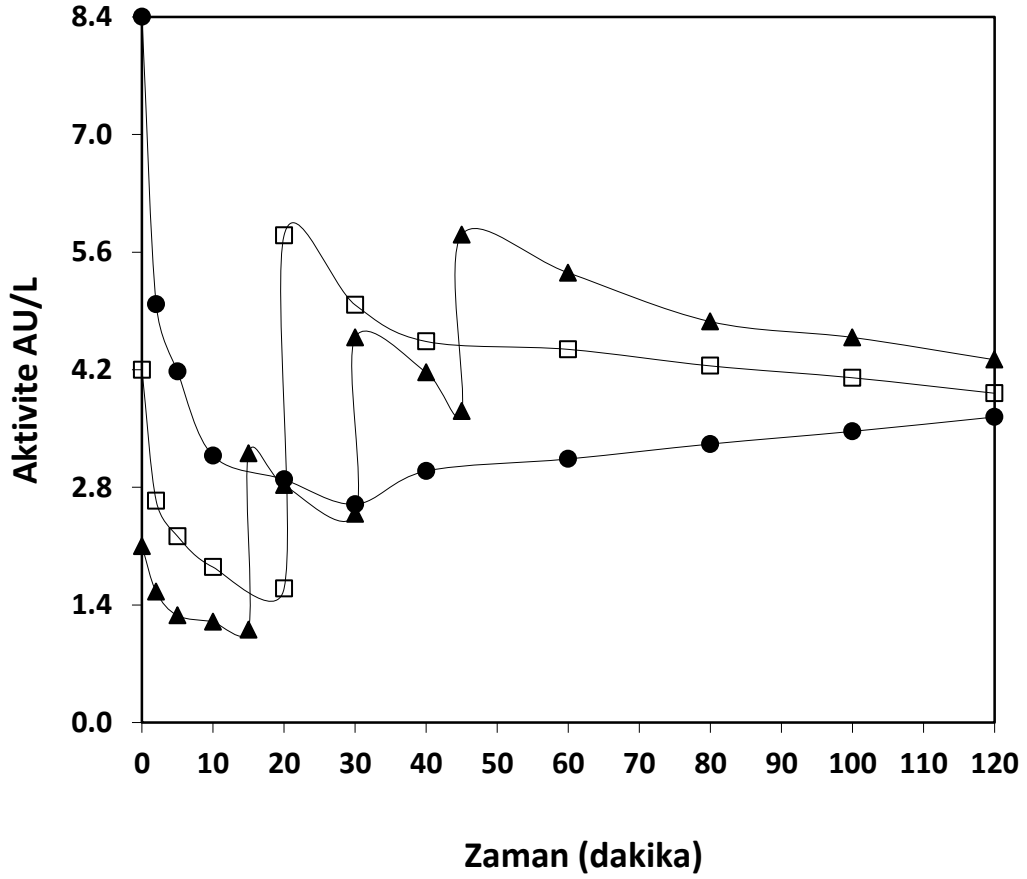


Şekil 8.34 Kademeli enzim ilavesi için zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, ($T= 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}= 8.5$, $E_{\text{toplam}}= \% 0.30$ (hacim/hacim), $S= 15$ g protein/L) (◆ Tek kademede: 0. dakikada 3 mL/L= 8.4 AU/L enzim ilavesi, □ İki kademede: 0. ve 20. dakikalarda 1.5 mL/L= 4.2 AU/L enzim ilavesi, ▲ Dört kademede: 0., 15., 30. ve 45. dakikalarda 0.75 mL/L= 2.1 AU/L enzim ilavesi)



Şekil 8.35 Kademeli enzim ilavesi için zamana karşılık elde edilen protein çözünürlük değerleri, ($T= 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}= 8.5$, $E_{\text{toplam}}= \% 0.30$ (hacim/hacim), $S= 15$ g protein/L) (◆ Tek kademe: 0. dakikada 3 mL/L= 8.4 AU/L enzim ilavesi, □ İki kademe: 0. ve 20. dakikalarda 1.5 mL/L= 4.2 AU/L enzim ilavesi, ▲ Dört kademe: 0., 15., 30. ve 45. dakikalarda 0.75 mL/L= 2.1 AU/L enzim ilavesi)

Kademeli enzim ilavesinin enzim stabilitesine etkisi incelendiğinde ise (Şekil 8.36), kademeli enzim ilavesi ile enzim stabilitesinin artırılabilceği gözlemlenmiştir. Ortama ilave edilen toplam enzim miktarı göz önünde bulundurulduğunda, 3 mL/L'lik enzim miktarı için enzimin başlangıç ünitesi 8.4 AU/L'dir. 120 dakika sonunda geriye kalan enzim aktivitelerinin tek kademe enzim ilavesi için 3.64 AU/L (geriye kalan aktivite % 43), iki kademe enzim ilavesi için 3.92 AU/L (geriye kalan aktivite % 47), dört kademe enzim ilavesi içinse 4.32 AU/L (geriye kalan aktivite % 51) olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak enzim stabilitesi, enzim ilavesinin iki kademe gerçekleştirilmesi ile % 8, dört kademe gerçekleştirilmesi ile % 19 oranında artmıştır.



Şekil 8.36 Kademeli enzim ilavesi için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, ($T= 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}= 8.5$, $E_{\text{toplam}}= \% 0.30$ (hacim/hacim), $S= 15$ g protein/L) (● Tek kademe: 0. dakikada 3 mL/L= 8.4 AU/L enzim ilavesi, □ İki kademe: 0. ve 20. dakikalarda 1.5 mL/L= 4.2 AU/L enzim ilavesi, ▲ Dört kademe: 0., 15., 30. ve 45. dakikalarda 0.75 mL/L= 2.1 AU/L enzim ilavesi)

8.6 Susam Küspesine Uygulanan Ön İşlemlerin Hidroliz Reaksiyonu Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

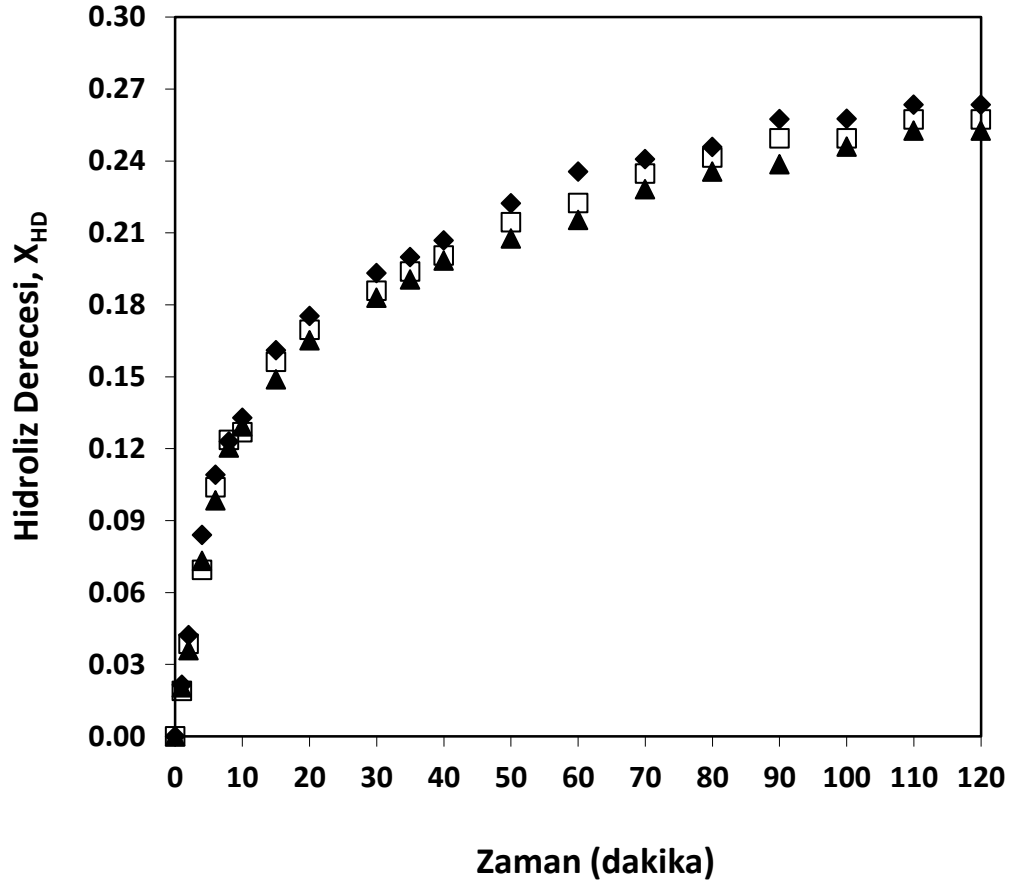
8.6.1 Isıl ön işlemin hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi

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 [110].

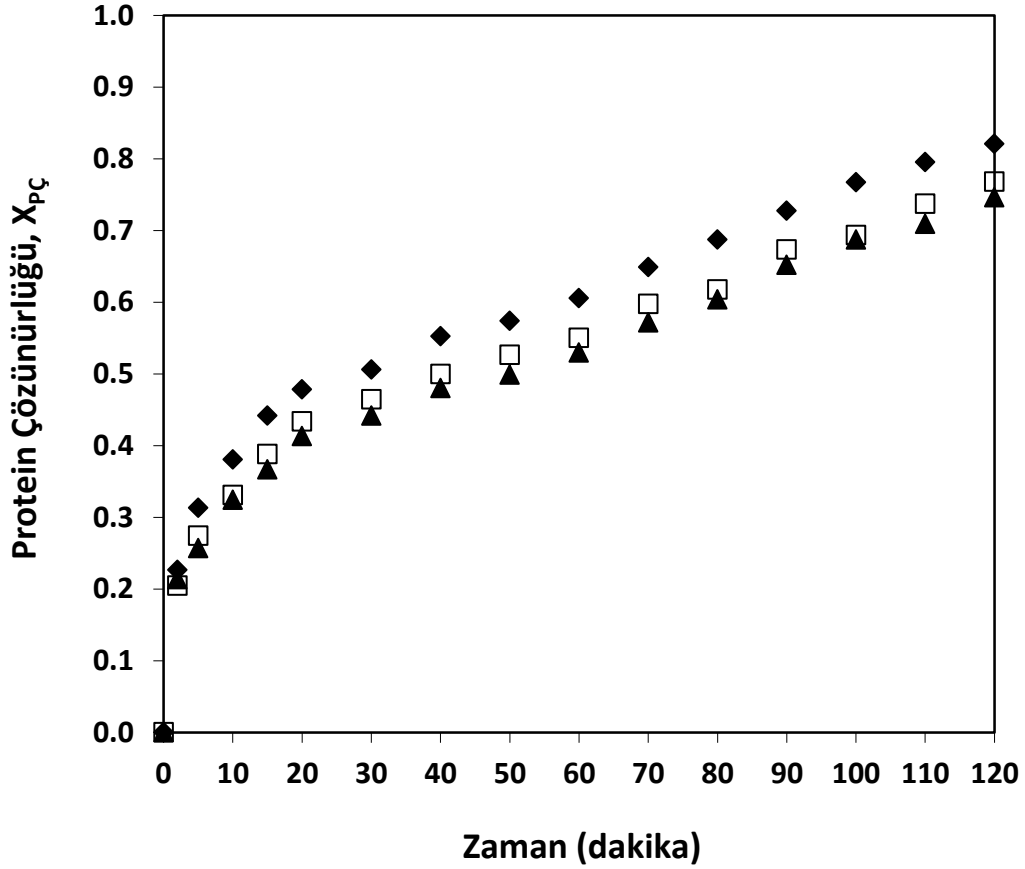
Üçüncül yapıda yan zincirler arasında bozunabilecek dört tür bağ etkileşimi vardır: hidrojen bağları, tuz köprüleri, disülfid bağları ve polar olmayan hidrofobik etkileşimler. Bu nedenle, birçok madde ve durum denatürasyona neden olabilir [110].

Isı kinetik enerjiyi 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, 15 g/L protein içeren 200 ml'lik susam küspesi çözeltisi, enzimatik reaksiyon öncesi seçilen sıcaklık değerlerine ısıtılarak bu sıcaklık değerlerinde 30 dakika boyunca bekletilmiştir.

Susam küspesine uygulanan ısıl ön işlem sonrası hidroliz reaksiyonu 200 mL hacimde, daha önceden belirlenen optimum proses şartlarında; 50°C sıcaklık ve pH 8.5 değerinde, % 0.30 (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 8.36-8.38'de grafiksel olarak sunulmuştur.



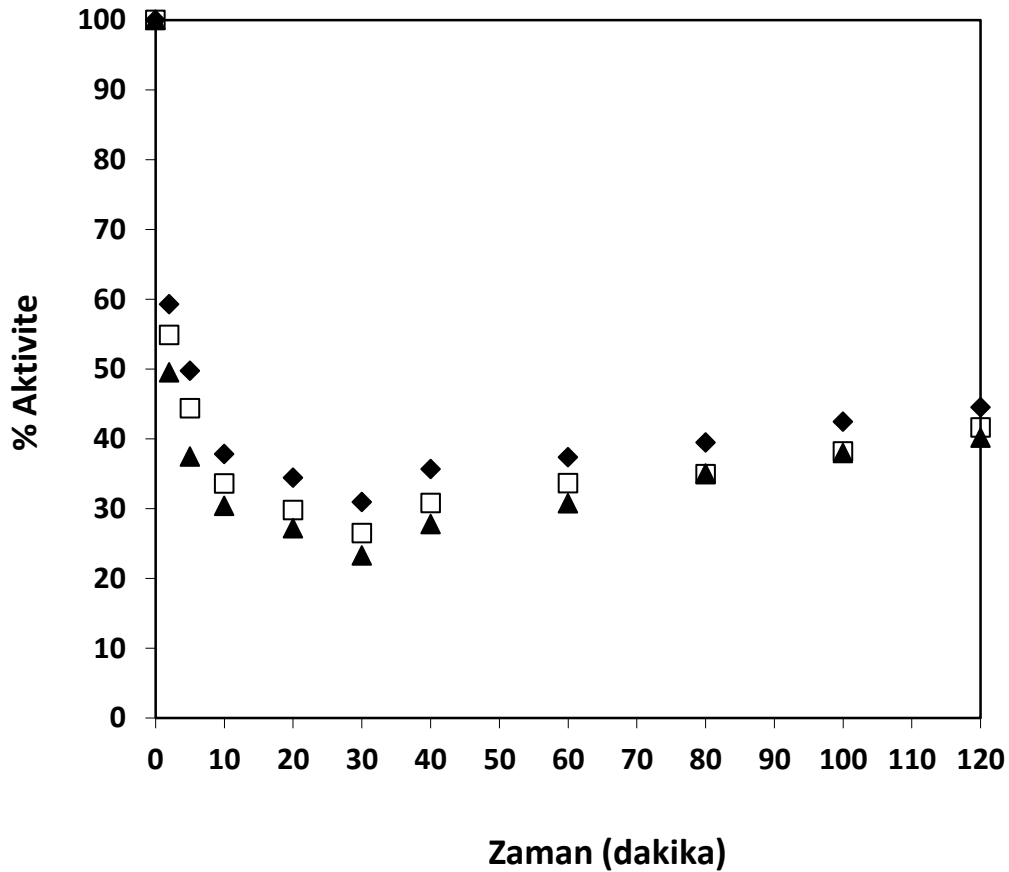
Şekil 8.37 Isıl ön işlem sonrası zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (♦ kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 90°C'lik ısıl ön işlem sonrası hidroliz, ▲ 100°C'lik ısıl ön işlem sonrası hidroliz)



Şekil 8.38 Isıl ön işlem sonrası zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (◆ kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 90°C'lik ısıl ön işlem sonrası hidroliz, ▲ 100°C'lik ısıl ön işlem sonrası hidroliz)

Şekil 8.37 ve 8.38 incelendiğinde ısıl ön işlemin hidroliz verimine bir katkısı olmadığı açıkça görülmektedir. Isıl ön işlem ile 120 dakika sonunda protein çözünürlük derecesi değerlerinde görülen çok az düşüş, hidroliz öncesi ortamda bulunan çözünmüş protein miktarının ön işleme artış göstermesi ile açıklanabilir. Hidroliz öncesi ortamda bulunan çözünmüş protein miktarının ön işlem uygulanmadan 2.07 g/L olduğu, 90 ve 100°C'lik ısıl ön işlem uygulamasından sonra ise bu değerlerin 2.71 ve 2.88 g/L'ye yükseldiği belirlenmiştir.

Şekil 8.39 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.



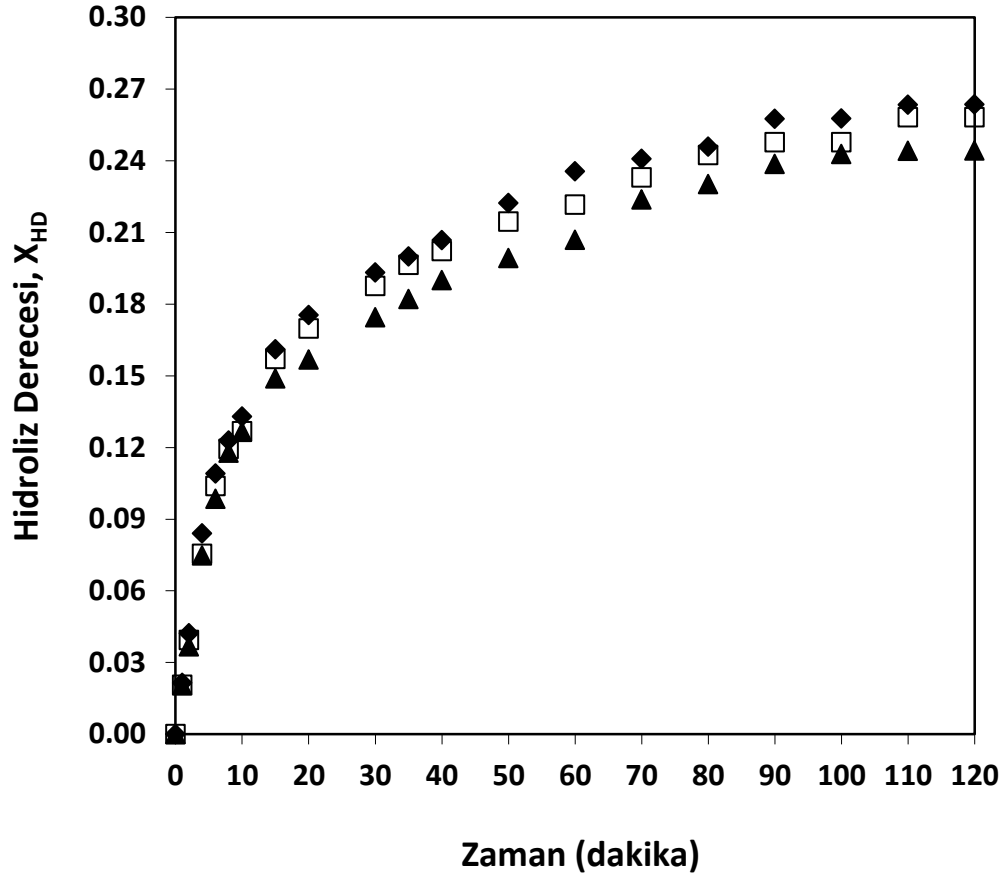
Şekil 8.39 Isıl ön işlem sonrası zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (♦ kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 90°C'lik ısıl ön işlem sonrası hidroliz, ▲ 100°C'lik ısıl ön işlem sonrası hidroliz)

8.6.2 Mikrodalga ön işleminin hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi

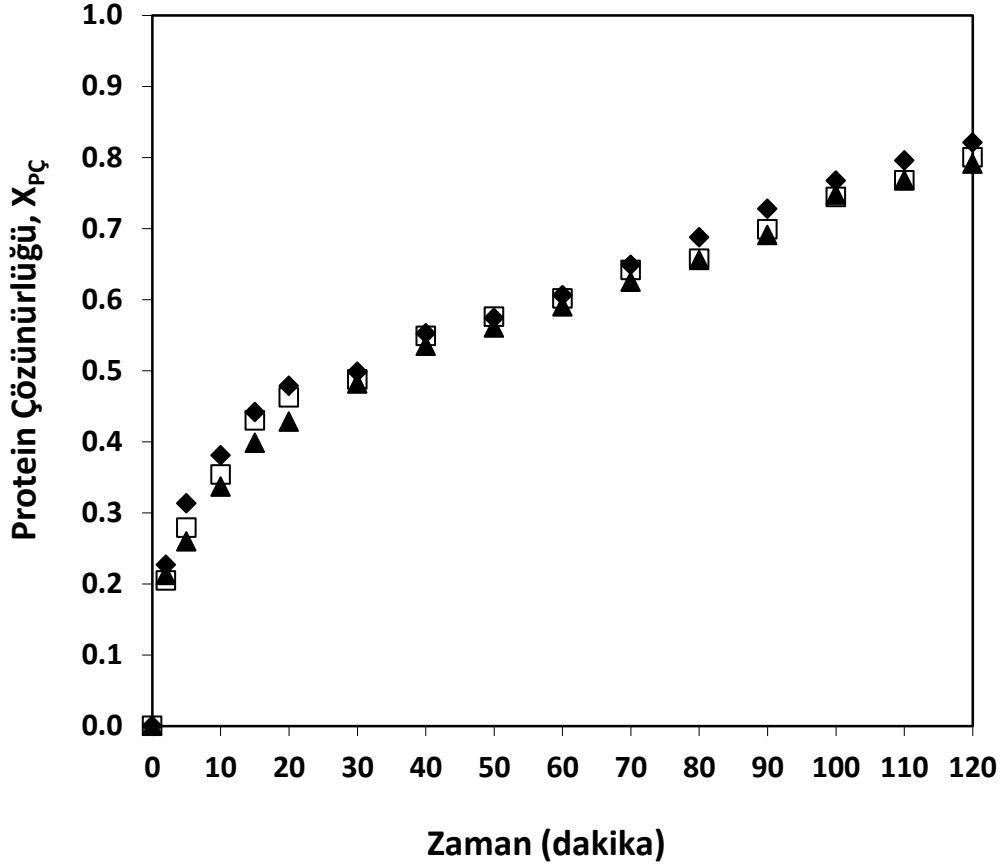
Substrata uygulanan ön işlemlerde amaç enzimin substrattaki hedef bağlara ulaşabilirliğini kolaylaştırmaktır. Ön işlemler fiziksel (mekanik ve ısı) veya kimyasal işlemler (asidik ve alkali) olarak gruplandırılabilir. Mikrodalga'nın enzimatik reaksiyonlarda ön işlem olarak kullanımı yakın zamanda araştırma konusu olmuştur.

Mondal vd. [111], gerçekleştirdikleri çalışmada, üç farklı enzimatik reaksiyon seçerek bu reaksiyonlarda substrat olarak kullanılan poligalakturonik asit, ksilan ve karboksiselüloza mikrodalga ön işlemleri uygulamışlar ve ön işlem sonrasında bu substratlar üzerinde pektinaz, ksilanaz ve selüloz enzimlerinin katalitik aktivitelerinin ön işlem uygulanmayan substratlara göre sırası ile 1.5, 2.3 ve 1.6 kat arttığını bildirmişlerdir. Zhu vd. [112] tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise, pirinç sapının selüloz enzimi ile hidrolizinde mikrodalga ön işleminin etkisi incelenmiş ve mikrodalga ön işlemi ile alkali ön işlemi kombine kullanıldığında hidroliz reaksiyonunun başlangıç hızının arttığı bildirilmiştir.

Çalışmanın bu bölümünde susam küspesine 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, 15 g/L protein içeren 200 mL'lik susam küspesi protein 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.



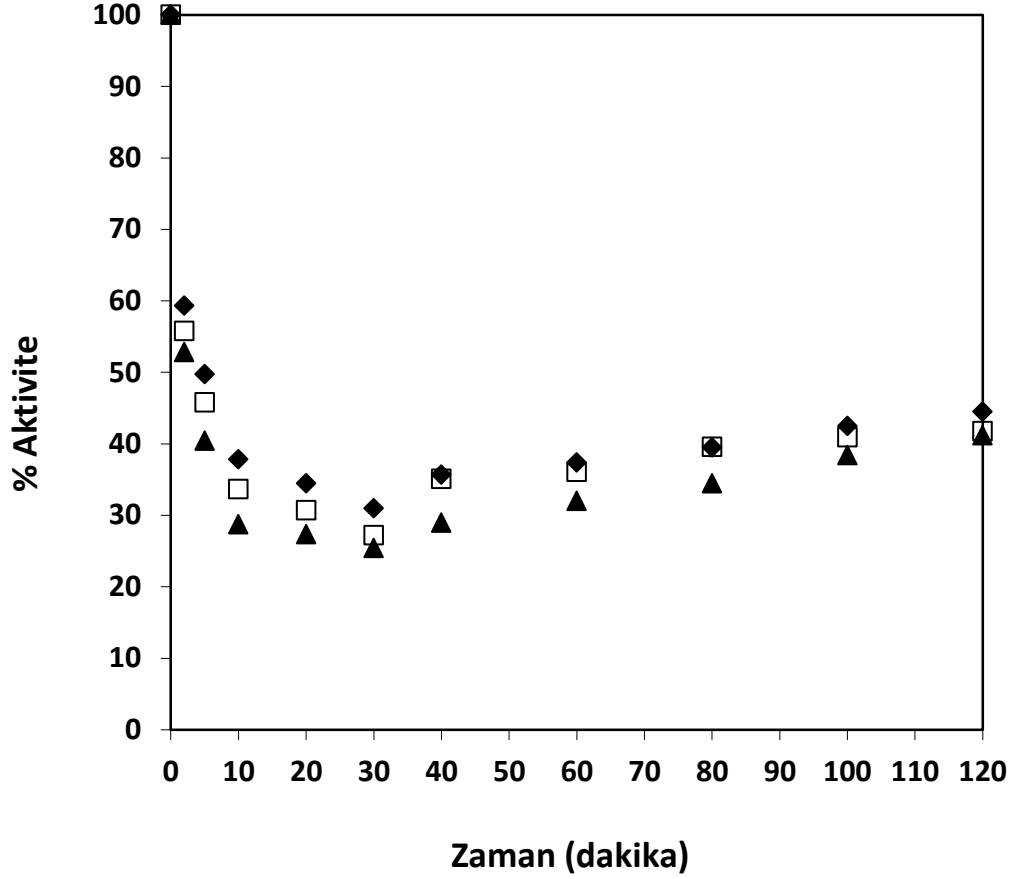
Şekil 8.40 Mikrodalga ön işleme sonrası zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (♦ kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 540 W'lık mikrodalga ön işleme sonrası hidroliz, ▲ 720 W'lık mikrodalga ön işleme sonrası hidroliz)



Şekil 8.41 Mikrodalga ön işleme sonrası zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (♦ kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 540 W'lık mikrodalga ön işleme sonrası hidroliz, ▲ 720 W'lık mikrodalga ön işleme sonrası hidroliz)

Şekil 8.40-8.41 incelendiğinde mikrodalga ön işleme 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 çözülmüş protein miktarı mikrodalga ön işleme uygulanması ile artış göstermiştir. Hidroliz öncesi ortamda bulunan çözülmüş protein miktarı ön işlem uygulanmadan 1.97 g/L iken, bu değer 540 ve 720 W'lık mikrodalga ön işleme uygulamasından sonra 2.36 ve 2.67 g/L'ye yükseldiği bulunmuştur.

Şekil 8.42 incelendiğinde ön işlem sonrası, kontrol deneyi ile karşılaştırıldığında aktivite değerlerinde az da olsa bir düşüş meydana geldiği görülmektedir.

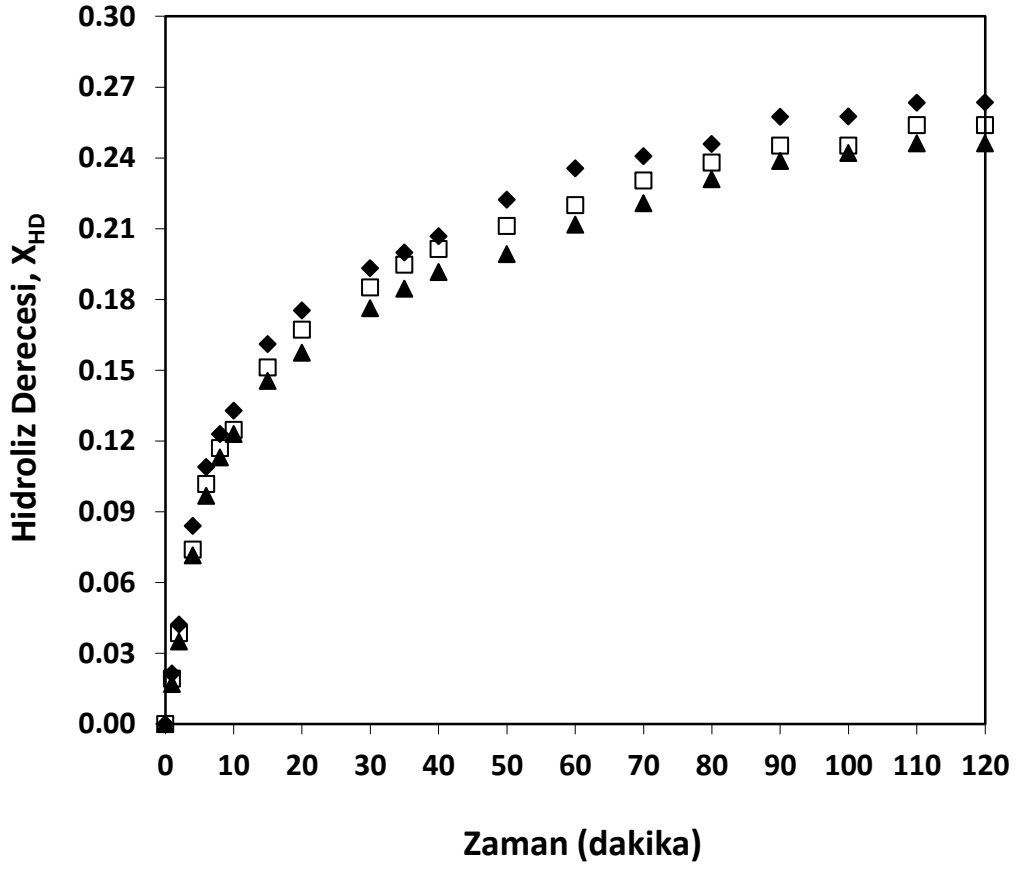


Şekil 8.42 Mikrodalga ön işleme sonrası zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (◆ kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 540 W'lık mikrodalga ön işleme sonrası hidroliz, ▲ 720 W'lık mikrodalga ön işleme sonrası hidroliz)

8.6.3 Sonikasyon ön işleminin hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi

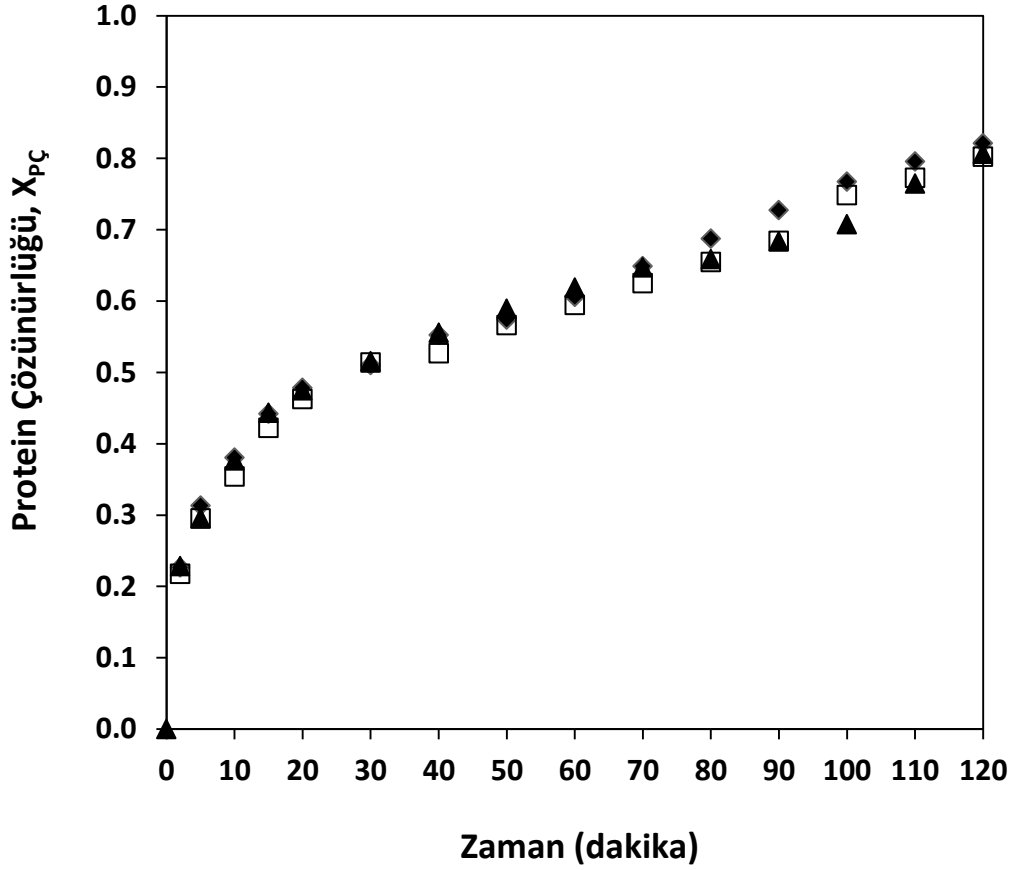
Sonikasyon işleminin proteindeki zayıf bağları parçalayarak protein denatürasyonuna neden olabileceği, ayrıca substratın partikül boyutunu düşürerek enzim için yüzey alanını artırabileceği düşünülerek, çalışmanın bu bölümünde sonikasyon ön işleminin hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. 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.



Şekil 8.43 Sonikasyon ön işlemi sonrası zamana karşılık elde edilen hidroliz derecesi değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (♦ kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 80 W'lık sonikasyon ön işlemi sonrası hidroliz, ▲ 120 W'lık sonikasyon ön işlemi sonrası hidroliz)

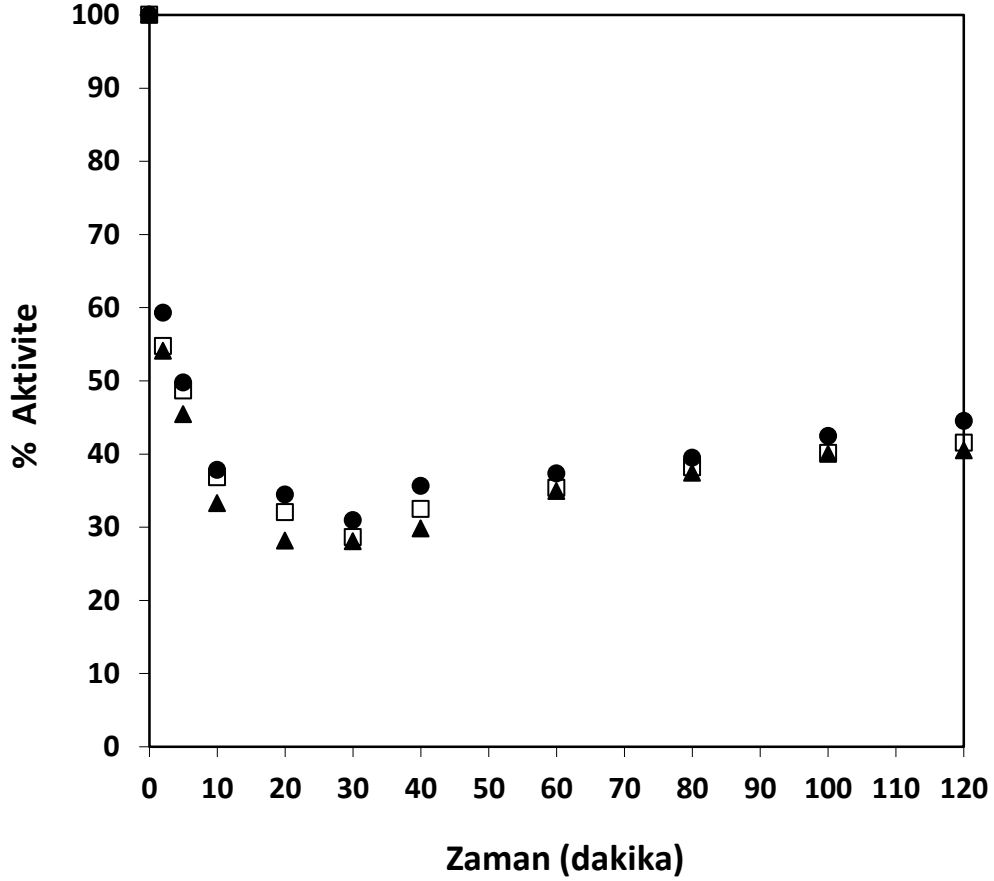
Şekil 8.43 incelendiğinde sonikasyon ön işleminin hidroliz verimine bir katkısı olmadığı açıkça görülmektedir. Sonikasyon ön işlemi ile 120 dakika sonunda hidroliz derecesi değerlerinde görülen çok az düşüş, yine hidroliz öncesi ortamda bulunan çözülmüş protein miktarının ön işlemle artış göstermesi ile açıklanabilir. Hidroliz öncesi ortamda bulunan çözülmüş protein miktarı ön işlem uygulanmadan 2.07 g/L iken, bu değer 80 ve 120 W'lık sonikasyon ön işlemi uygulamasından sonra 2.96 ve 3.21 g/L'ye yükseldiği bulunmuştur.



Şekil 8.44 Sonikasyon ön işlemi için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5 S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (♦ kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 80 W'lık sonikasyon ön işlemi sonrası hidroliz, ▲ 120 W'lık sonikasyon ön işlemi sonrası hidroliz)

Şekil 8.44 incelendiğinde, ön işlem uygulanmasının protein çözünürlüğüne herhangi bir etkisi olmadığı görülmektedir. Bu nedenle, ön işlem süresi ve maliyeti de göz önünde bulundurulduğunda sonikasyon işlemin fazla bir avantaj sağlamadığı açıktır.

Şekil 8.43 incelendiğinde enzim aktivitesi üzerinde sonikasyon ön işleminin, kontrol deneyleri ile karşılaştırıldığında bir etkisi olmadığı açıkça görülmektedir.



Şekil 8.45 Sonikasyon ön işlem için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, (T= 50°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (● kontrol (ön işlemsiz hidroliz), □ 80 W'lık sonikasyon ön işlemi sonrası hidroliz, ▲ 120 W'lık sonikasyon ön işlemi sonrası hidroliz)

8.6.4 Susam küspesine uygulanan ön işlemlerin hidrolizat amino asit kompozisyonuna etkilerinin incelenmesi

Bölüm 8.6.1-8.6.3'te susam küspesine uygulanan; ısı, mikrodalga ve sonikasyon ön işlemlerinin hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Ön işlemlerin hidrolizat besin değerine bir etkisi olup olmadığını belirlemek amacı ile ön işlemler sonrası elde edilen hidrolizat çözeltilerinin amino asit kompozisyonları incelenmiş ve Çizelge 8.16'da sunulmuştur. Çizelge 8.16 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 susam küspesi amino asit kompozisyonu ile hemen hemen aynı olduğu, yani

susam küspesine uygulanan ön işlemler sonucunda proteinin besinsel değerini koruduğu görülmektedir.

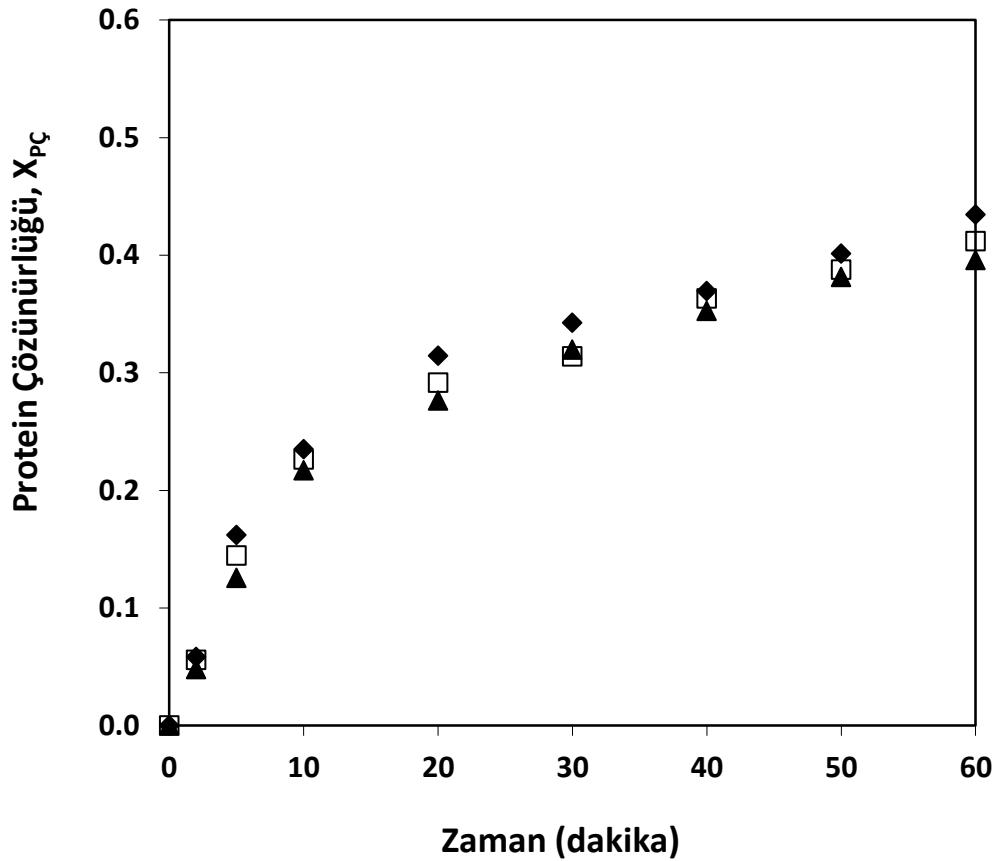
Çizelge 8.16 Ön işlem uygulaması ile gerçekleştirilen deneyler için elde edilen hidrolizat çözeltilerinin amino asit kompozisyonları

| Amino Asit | Ham Susam Küspesi (mg/g protein) | *Hidrolizat Çözeltileri (mg/g protein) | | | |
|----------------|----------------------------------|--|---------------|-----------------------|----------------------|
| | | Kontrol Deneyi | Isıl Ön İşlem | Mikro Dalga Ön İşlemi | Sonikasyon Ön İşlemi |
| Alanin | 67.29 | 72.11 | 59.89 | 75.47 | 73.12 |
| Glisin | 49.96 | 52.64 | 41.82 | 53.82 | 51.03 |
| Valin | 59.32 | 55.69 | 53.66 | 56.38 | 54.42 |
| Lösin | 104.14 | 101.43 | 99.76 | 103.09 | 105.71 |
| İzolösin | 49.05 | 43.27 | 55.23 | 47.74 | 48.48 |
| Treonin | 58.17 | 59.47 | 62.76 | 57.95 | 61.91 |
| Serin | 55.17 | 52.52 | 58.01 | 52.08 | 54.83 |
| Prolin | 68.06 | 70.53 | 56.72 | 65.64 | 66.99 |
| Aspartik asit | 45.97 | 42.91 | 40.06 | 43.56 | 42.89 |
| Metiyonin | 28.23 | 33.03 | 31.97 | 29.37 | 28.08 |
| Glutamik asit | 26.85 | 24.91 | 22.54 | 32.39 | 31.03 |
| Fenilalanin | 161.73 | 161.11 | 168.38 | 158.21 | 154.34 |
| Lizin | 82.73 | 83.45 | 83.86 | 80.97 | 81.05 |
| Histidin | 11.05 | 12.08 | 10.12 | 9.43 | 10.03 |
| Triozin | 39.64 | 40.97 | 55.85 | 43.41 | 43.01 |
| Hidroksiprolin | 47.78 | 44.62 | 50.68 | 43.52 | 44.19 |
| Arginin | 21.13 | 22.84 | 18.97 | 20.53 | 20.63 |
| Triptofan | 23.73 | 26.79 | 29.73 | 26.83 | 28.31 |

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

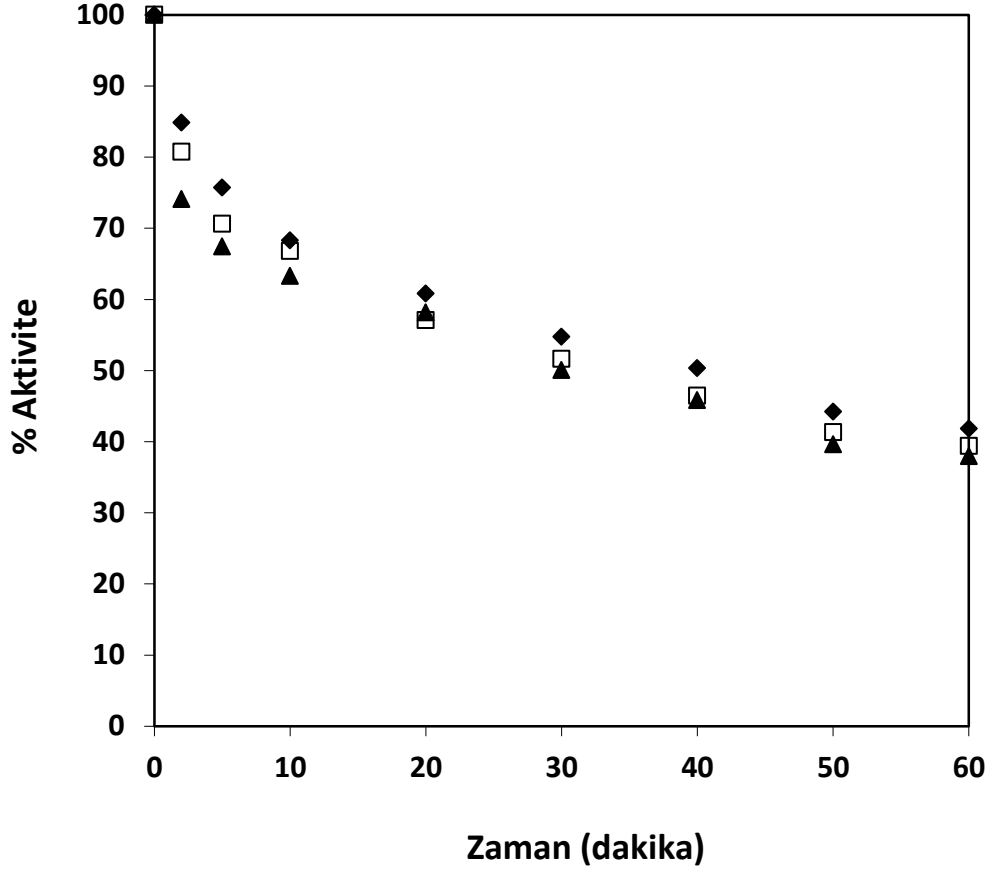
8.7 Sonikasyon Parametrelerinin Hidroliz Reaksiyonu Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Ultrasonikasyonun kimyasal reaksiyonların hızını artırmak için kullanıldığı bilinmektedir. Ultrasonikasyonun enzimatik reaksiyonlar üzerindeki etkisi ise çok fazla araştırılmamıştır. Konuyla ilgili literatürde yer alan sınırlı çalışmalar içerisinde, bazı araştırmacılar ultrasonikasyon uygulaması sonucunda oluşan kavitasyon enerjisinin enzimatik reaksiyonların hızını arttırdığını rapor etmişlerdir [113-116]. Bu nedenle, çalışmanın bu bölümünde hidroliz reaksiyonu sonikasyon altında gerçekleştirilerek, sonikasyon parametrelerinin; akustik güç ve frekans aralığı; hidroliz ve enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir.



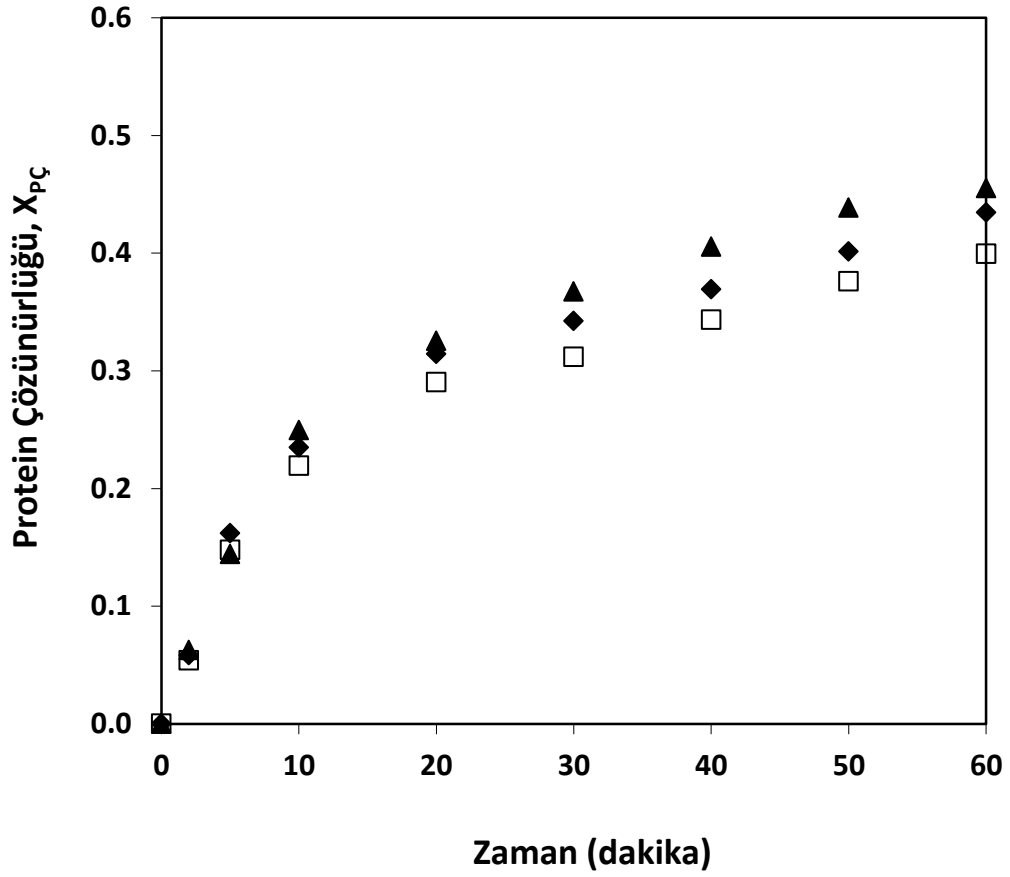
Şekil 8.46 Farklı akustik güç değerlerinde sonikasyon uygulaması ile gerçekleştirilen hidroliz deneyleri için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, (T= 40°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (◆ kontrol deneyi, □ 20 W, ▲ 100 W)

Akustik gücün reaksiyon üzerindeki etkisini incelemek amacı ile hidroliz reaksiyonu, pH 8.5 değerinde 100 mM fosfat tampon çözelti içerisinde 15 g protein/L substrat konsantrasyonunda, 40°C sabit sıcaklıkta, % 0.30 (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 8.46 ve Şekil 8.47'te, % frekans aralığı için Şekil 8.48 ve Şekil 8.49'da grafiksel olarak sunulmuştur.



Şekil 8.47 Farklı akustik güç değerlerinde sonikasyon uygulaması ile gerçekleştirilen hidroliz deneyleri için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, (T= 40°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (◆ kontrol deneyi, □ 20 W, ▲ 100 W)

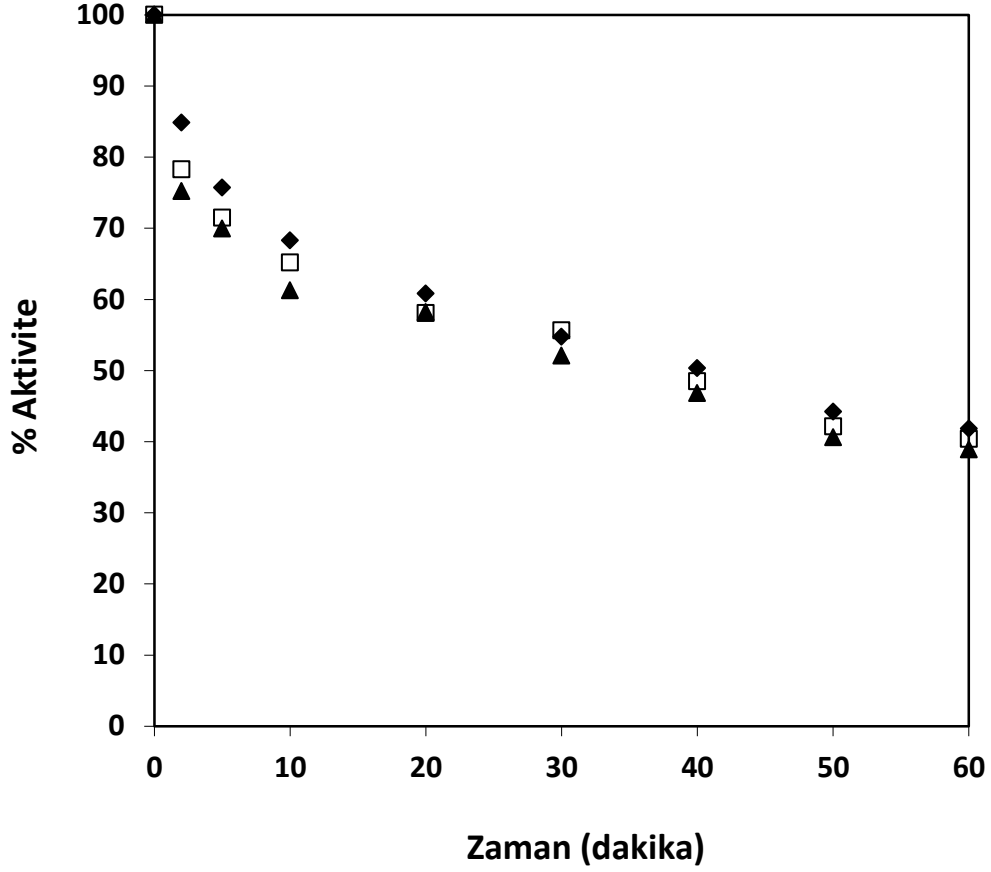
Şekil 8.46 ve Şekil 8.47 incelendiğinde akustik gücün susam küspesi protein hidrolizi için reaksiyon hızını arttırıcı bir etkisinin olmadığı ve Alcalase enziminin stabilitesini etkilemediği (azaltmadığı veya arttırmadığı) görülmektedir.



Şekil 8.48 Farklı % frekans değerlerinde sonikasyon uygulaması ile gerçekleştirilen hidroliz deneyleri için zamana karşılık elde edilen çözünürlük derecesi değerleri, (T= 40°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (hacim/hacim)) (◆ kontrol deneyi, □ % 10, ▲ % 80)

Şekil 8.48 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 8.49), Alcalase enziminin stabilitesinin % frekans değeri ile değişmediği ve hemen hemen kontrol deneyi ile aynı aktivite değerlerinin elde edildiği görülmektedir.



Şekil 8.49 Farklı % frekans değerlerinde sonikasyon uygulaması ile gerçekleştirilen hidroliz deneyleri için zamana karşılık elde edilen % enzim aktivite değerleri, (T= 40°C, pH= 8.5, S= 15 g protein/L, E= % 0.30 (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 8.17’de sunulmuştur. Çizelge 8.17 incelendiğinde sonikasyon altında gerçekleştirilen deney sonucunda elde edilen hidrolizat çözeltisinin amino asit kompozisyonunun, kontrol deneyi sonucu elde edilen hidrolizat çözeltisinin ve susam küspesi proteininin amino asit kompozisyonu ile hemen hemen aynı olduğu, dolayısı ile sonikasyon işlemi sonucunda proteinin besinsel değerini koruduğu görülmektedir.

Çizelge 8.17 Sonikasyon altında gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu sonucunda elde edilen hidrolizat çözeltisinin amino asit kompozisyonu

| Amino Asit | Ham Susam Küspesi (mg/g protein) | Hidrolizat Çözeltileri (mg/g protein) | |
|----------------|--|---------------------------------------|--------------------------------|
| | | Kontrol Deneyi | Sonikasyon altında hidroliz |
| Alanin | 67.29 | 69.96 | 68.14 |
| Glisin | 49.96 | 50.34 | 51.09 |
| Valin | 59.32 | 57.69 | 61.46 |
| Lösin | 104.14 | 102.23 | 103.16 |
| İzolösin | 49.05 | 46.27 | 52.96 |
| Treonin | 58.17 | 57.92 | 53.27 |
| Serin | 55.17 | 54.46 | 52.26 |
| Prolin | 68.06 | 69.83 | 66.35 |
| Aspartik asit | 45.97 | 43.91 | 45.51 |
| Metiyonin | 28.23 | 32.47 | 32.19 |
| Glutamik asit | 26.85 | 25.62 | 27.94 |
| Fenilalanin | 161.73 | 160.31 | 156.03 |
| Lizin | 82.73 | 82.57 | 82.73 |
| Histidin | 11.05 | 10.93 | 9.41 |
| Triozin | 39.64 | 41.61 | 42.87 |
| Hidroksiprolin | 47.78 | 46.28 | 46.22 |
| Arginin | 21.13 | 21.94 | 22.57 |
| Triptofan | 23.73 | 25.67 | 25.83 |

8.8 Susam Küspesi Proteini için Hidroliz, Çözünürlük ve Enzim İnaktivasyon Kinetiğinin İncelenmesi

8.8.1 Elde Edilen Kinetik Verilerin Modellenmesi

8.8.1.1 Hidroliz ve çözünürlük verilerinin modellenmesi

Enzimatik reaksiyonlar genel olarak Michaelis-Menten kinetiğine dayalı modeller ile karakterize edilirler [98,108,117,118,119]. Ancak, literatürde enzimatik reaksiyon kinetiğini empirik modellerle [6,120] ve basit eksponansiyel denklemlerle [121-123] ifade eden çalışmalarda mevcuttur. Çalışmanın bu bölümünde, Bölüm 8.3'te susam küspesi proteininin hidroliz ve çözünürlüğü için zamana karşı elde edilen tüm deneysel veriler analiz edilmiş ve hidroliz ile çözünürlük kinetiğinin aşağıda verilen eksponansiyel denklem (Eşitlik 8.5) ile ifade edilebileceği bulunmuştur.

$$\frac{dX}{dt} = a \cdot \exp(-b \cdot X) \quad (8.5)$$

Eşitlik 8.5'te X terimi hidroliz dönüşümünü veya çözünürlük oranını ifade etmektedir. a ve b değerleri farklı deneyler için farklı değerlere sahip denklem sabitleridir. Eşitlik 8.5 için elde edilen katsayılar ve istatistiksel değerler Çizelge 8.18'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 [109,121-123].

Sonuç olarak, birbirine yakın olarak elde edilen b değerlerinin ortalaması alınmış ve bu değer yaklaşık olarak hidroliz için 22.99 ve çözünürlük için 4.52 olarak hesaplanmıştır. Çizelge 8.17'deki standart sapma (σ) ve R^2 istatistik değerleri de, 22.99 ve 4.52 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 8.18).

Bölüm 8.3'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 8.6) kullanılabileceği bulunmuştur;

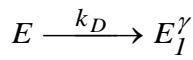
$$X_{HD} = 0.3048.X_{PÇ} + 0.0107 \quad (8.6)$$

Eşitlik 8.6 için R^2 istatistik ve standart sapma değerleri sırasıyla 0.9871 ve 0.0191 olarak hesaplanmıştır. Literatürde hidroliz derecesi ve çözünürlük arasındaki lineer ilişki bezelye proteinin Trypsin ile hidrolizi için Soral-Smietana vd. [26] tarafından, buğday ununun proteaz ile modifikasyonu için Bombara vd. [32] tarafından ve mısır gluteninin Alcalase ile hidrolizi için Apar ve Özbek [109] tarafından da bildirilmiştir.

8.8.1.2 Enzim inaktivasyon verilerinin modellenmesi

Enzim inaktivasyon kinetiği genellikle birinci mertebeye inaktivasyon modeli [124-127] ile ifade edilir. Ancak enzimatik reaksiyonların karmaşıklığı nedeni ile, literatürde enzim inaktivasyon kinetiğini birinci mertebeye olmayan model denklemlerle ifade eden bir çok çalışma da yer almaktadır [128-131].

Çalışmanın bu bölümünde, enzim inaktivasyon kinetiğini belirleyebilmek amacı ile Bölüm 8.3'te zamana karşılık elde edilen aktivite verileri analizi edilmiş ve; substrat ve enzim başlangıç konsantrasyonu deneylerinin tümü ile, 45-55°C sıcaklık ve 6.5-9.0 pH aralığında gerçekleştirilen deneyler için elde edilen enzim inaktivasyon verilerinin Sadana ve Henley [128] tarafından tanımlanan birinci mertebe olmayan tek adım unimoleküler enzim inaktivasyon modeline (Eşitlik 8.7) uyduğu belirlenmiştir. Sadana ve Henley [128] tarafından tanımlanan bu inaktivasyon modelinde, enzim aktivitesi sıfır değerine ulaşmaz, son aşamada ulaşılan belirli bir aktivite değerinde sabit kalır.



$$A = (100 - a_1) \exp(-k_D \cdot t) + a_1 \quad (8.7)$$

Diğer yandan, 55°C sıcaklık değerinin üzerinde gerçekleştirilen deneyler için yapılan modelleme çalışmaları sonucunda elde edilen verilerin ikinci mertebe inaktivasyon kinetiğine (Eşitlik 8.8) uyduğu belirlenmiştir. 55°C sıcaklık değerlerin üzerine çıkıldığında, inaktivasyon mekanizmasının değiştiği (enzim inaktivasyon kinetiğinde bir kayma meydana geldiği) elde edilen deneysel sonuçlardan da (Şekil 8.25) açıkça görülmektedir. İnaktivasyon kinetiğindeki bu kayma, belirli bir sıcaklık değerinin üzerine çıkıldığında protein yapısında meydana gelen deformasyonlar sonucunda enzimin stabilitesini koruyamaması, dolayısı ile inaktivasyon hızında meydana gelen artış ile açıklanabilir.

$$1/A = 1/A_0 + k \cdot t \quad (8.8)$$

Eşitlik 8.7 ve 8.8'de; A terimi % enzim aktivitesini, a_1 terimi son aşamada ulaşılan % enzim aktivite değerini, k_D ve k : inaktivasyon (bozunma) sabitlerini (dak^{-1}), t : hidroliz işleminin süresini ifade etmektedir. Eşitlik 8.7 ve 8.8 için elde edilen katsayılar ve istatistiksel değerler Çizelge 8.19'da sunulmuştur.

Çizelge 8.18 Eşitlik 8.5 için elde edilen katsayılar, standart sapma (σ) ve R^2 istatistiksel değerleri

| S_0 (g/L) | Hidroliz | | | | Çözünürlük | | | |
|---|----------|-------|----------|--------|------------|-------|----------|--------|
| | a | b | σ | R^2 | a | b | σ | R^2 |
| 10 | 0.0216 | 22.99 | 0.0069 | 0.9922 | 0.0290 | 4.52 | 0.0178 | 0.9953 |
| 15 | 0.0164 | 22.99 | 0.0047 | 0.9959 | 0.0231 | 4.52 | 0.0207 | 0.9944 |
| 20 | 0.0114 | 22.99 | 0.0059 | 0.9918 | 0.0186 | 4.52 | 0.0161 | 0.9959 |
| 25 | 0.0084 | 22.99 | 0.0060 | 0.9896 | 0.0153 | 4.52 | 0.0191 | 0.9923 |
| 30 | 0.0067 | 22.99 | 0.0056 | 0.9896 | 0.0136 | 4.52 | 0.0196 | 0.9907 |
| % E_0 (hacim/hacim) | | | | | | | | |
| 0.20 | 0.0121 | 22.99 | 0.0091 | 0.9959 | 0.0189 | 4.52 | 0.0168 | 0.9958 |
| 0.25 | 0.0164 | 22.99 | 0.0031 | 0.9959 | 0.0231 | 4.52 | 0.0207 | 0.9944 |
| 0.30 | 0.0176 | 22.99 | 0.0032 | 0.9939 | 0.0271 | 4.52 | 0.0220 | 0.9937 |
| 0.35 | 0.0187 | 22.99 | 0.0034 | 0.9918 | 0.0290 | 4.52 | 0.0207 | 0.9946 |
| 0.40 | 0.0196 | 22.99 | 0.0046 | 0.9941 | 0.0296 | 4.52 | 0.0262 | 0.9914 |
| pH | | | | | | | | |
| 6.5 | 0.0121 | 29.57 | 0.0044 | 0.9942 | 0.0144 | 4.40 | 0.0052 | 0.9995 |
| 7.0 | 0.0176 | 22.99 | 0.0032 | 0.9939 | 0.0271 | 4.52 | 0.0220 | 0.9937 |
| 7.5 | 0.0334 | 22.59 | 0.0036 | 0.9984 | 0.0342 | 4.14 | 0.0259 | 0.9937 |
| 8.0 | 0.0399 | 21.61 | 0.0035 | 0.9987 | 0.0509 | 4.70 | 0.0268 | 0.9936 |
| 8.5 | 0.0477 | 16.86 | 0.0062 | 0.9974 | 0.0562 | 4.29 | 0.0213 | 0.9966 |
| 9.0 | 0.0492 | 18.11 | 0.0058 | 0.9975 | 0.0552 | 4.38 | 0.0223 | 0.9961 |
| T (°C) | | | | | | | | |
| 45 | 0.0239 | 18.76 | 0.0045 | 0.9952 | 0.0411 | 5.24 | 0.0228 | 0.9941 |
| 50 | 0.0477 | 16.86 | 0.0062 | 0.9974 | 0.0562 | 4.29 | 0.0213 | 0.9966 |
| 55 | 0.0378 | 17.15 | 0.0055 | 0.9978 | 0.0576 | 4.63 | 0.0231 | 0.9956 |
| 60 | 0.0298 | 17.72 | 0.0076 | 0.9952 | 0.0497 | 4.84 | 0.0215 | 0.9956 |
| 65 | 0.0363 | 28.77 | 0.0095 | 0.9844 | 0.0566 | 10.58 | 0.0117 | 0.9958 |

Çizelge 8.19 Eşitlik 8.7 ve 8.8 için elde edilen katsayılar, standart sapma (σ) ve R^2 istatistiksel değerler

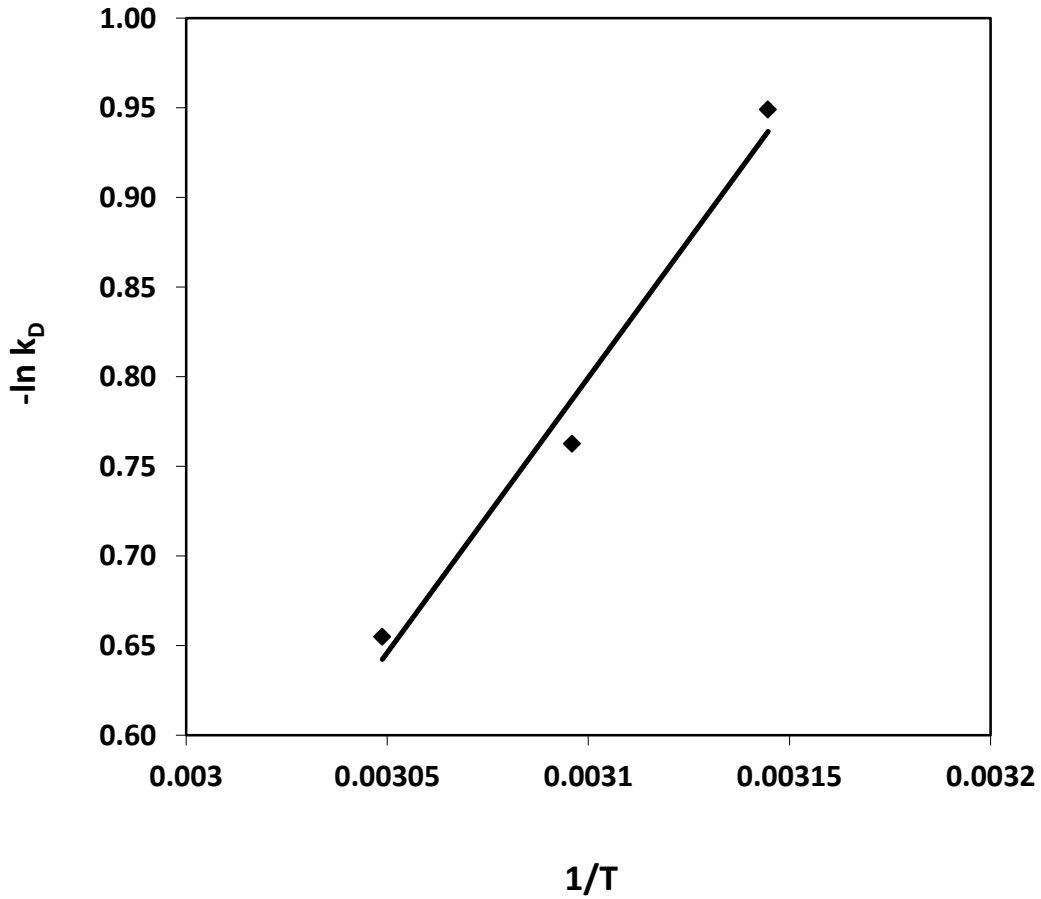
| S_0 (g/L) | Model denklem | σ | R^2 |
|---|--|----------|--------|
| 10-60 g/L | $A = (100-56.78)\exp(-0.2408.t) + 56.78$ | 2.6382 | 0.9851 |
| % E_0 (hacim/hacim) | | | |
| 0.20 | $A = (100-51.96)\exp(-0.3647.t) + 51.96$ | 2.8352 | 0.9848 |
| 0.25 | $A = (100-55.90)\exp(-0.3526.t) + 55.90$ | 3.0596 | 0.9794 |
| 0.30 | $A = (100-58.25)\exp(-0.3277.t) + 58.25$ | 3.5832 | 0.9693 |
| 0.35 | $A = (100-61.92)\exp(-0.3113.t) + 61.92$ | 2.9791 | 0.9745 |
| 0.40 | $A = (100-63.30)\exp(-0.2748.t) + 63.30$ | 2.4985 | 0.9807 |
| pH | | | |
| 6.5 | $A = (100-62.83)\exp(-0.2848.t) + 62.83$ | 2.9573 | 0.9747 |
| 7.0 | $A = (100-58.25)\exp(-0.3277.t) + 58.25$ | 3.5832 | 0.9693 |
| 7.5 | $A = (100-50.29)\exp(-0.3805.t) + 50.29$ | 4.1455 | 0.9696 |
| 8.0 | $A = (100-42.94)\exp(-0.4118.t) + 42.94$ | 4.3307 | 0.9738 |
| 8.5 | $A = (100-38.25)\exp(-0.4664.t) + 38.25$ | 4.2437 | 0.9781 |
| 9.0 | $A = (100-35.07)\exp(-0.5016.t) + 35.07$ | 4.4873 | 0.9776 |
| T (°C) | | | |
| 45 | $A = (100-41.33)\exp(-0.3871.t) + 41.33$ | 4.4455 | 0.9743 |
| 50 | $A = (100-38.25)\exp(-0.4664.t) + 38.25$ | 4.2437 | 0.9781 |
| 55 | $A = (100-37.21)\exp(-0.5195.t) + 37.21$ | 4.7466 | 0.9732 |
| 60 | $1/A = 1/96.15 + 0.00084.t$ | 0.0084 | 0.9749 |
| 65* | $1/A = 1/101.52 + 0.0091.t$ | 0.0089 | 0.9913 |

* 0-40 dakika için

Alcalase enzimi için inaktivasyon enerjisi 45-55°C sıcaklık aralığı için, Eşitlik 8.7'den elde edilen inaktivasyon sabitleri (k_D , dak^{-1}) kullanılarak Arrhenius bağıntısından hesaplanabilir (Eşitlik 8.9).

$$\ln k_d = \ln k_{D0} - \frac{E_D}{RT} \quad (8.9)$$

İnaktivasyon enerjisini (E_D) belirleyebilmek amacı ile $\ln k_D$ terimine karşı çizilen $1/T$ grafiği Şekil 8.50'de sunulmuştur. Şekil 8.50'den görüldüğü gibi elde edilen verilerin Eşitlik 8.9'a uygunluğu açıkça görülmektedir. Yapılan modelleme sonucunda ($\sigma = 0.0302$, $R^2 = 0.9897$) E_D terimi, 25.44 kJ/mol olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu inaktivasyon enerjisi değeri, literatürde daha önce Alcalase enzimi için bildirilen değerle benzer bulunmuştur. Farklı substratlar kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda, Alcalase enzimi için inaktivasyon enerjisi; Marquez ve Vazquez [123] tarafından 25.35 kJ/mol, Adler-Nissen [8] tarafından 270.0 kJ/mol olarak rapor edilmiştir.

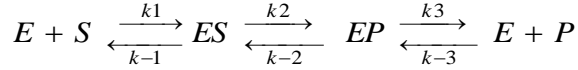


Şekil 8.50 Enzim inaktivasyon sabitinin sıcaklıkla değişimi

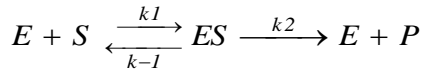
8.8.2 Michaelis-Menten kinetiği

Enzim katalizinin ana kuramı Michaelis-Menten ve Haldane'in çalışmaları üzerine kurulmuştur [132]. En basit enzim katalizli sistem, isomerizasyon ve parçalanma reaksiyonlarında olduğu gibi tek bir substratın ürüne dönüştüğü reaksiyonlardır [133].

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;

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] \quad (8.10)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[S][E] + (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (8.11)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (8.12)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = v \quad (8.13)$$

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

8.12 aşağıdaki şekilde basitleşir;

$$k_1[S][E] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (8.14)$$

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

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad (8.15)$$

yazılabilir.

Eşitlik 8.15'ten $[E]$ terimi çekilir ve Eşitlik 8.14'te yerine yerleştirilirse;

$$[ES] = \frac{k_1[S][E]_0}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} = \frac{[E]_0[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \quad (8.16)$$

ifadesi elde edilir. Bu ifade Eşitlik 8.13'te yerine konulursa;

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_0[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \quad (8.17)$$

ifadesi elde edilir.

Üç hız sabitini içeren terim tek bir sabitte toplanırsa;

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (8.18)$$

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

$[E]_0 = [ES]$ dir. Öyleyse;

$$v_{\max} = k_2[ES] = k_2[E]_0 \quad (8.19)$$

Eşitlik 8.18 ve 8.19 ifadeleri Eşitlik 8.17'de yerine yerleştirildiğinde Michaelis-Menten denklemi (Eşitlik 8.20) elde edilir [133,134].

$$v = \frac{v_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (8.20)$$

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 düşüğe 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 [133].

K_m ve V_{max} değerlerinin grafik yöntemle eldesi

Michaelis-Menten denklemi (Eşitlik 8.20), 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 [135].

Lineweaver-Burke denklemi

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{v_{\max}} \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (8.21)$$

Eşitlik 8.21 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 eksenini kestiği nokta $-1/K_m$ değerini verir (Şekil 8.51 (a)).

Eadie-Hofstee denklemi

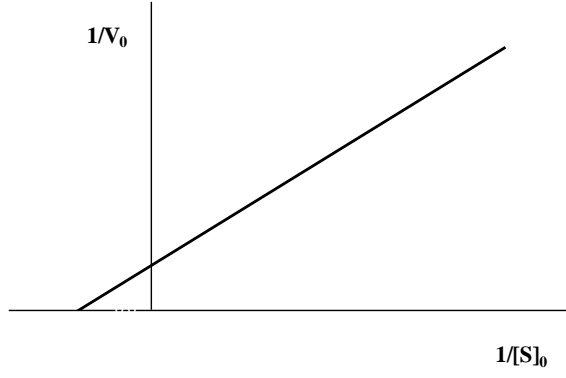
$$v_0 = -K_m \frac{v_0}{[S]_0} + v_{\max} \quad (8.22)$$

Eşitlik 8.22 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 8.51 (b)).

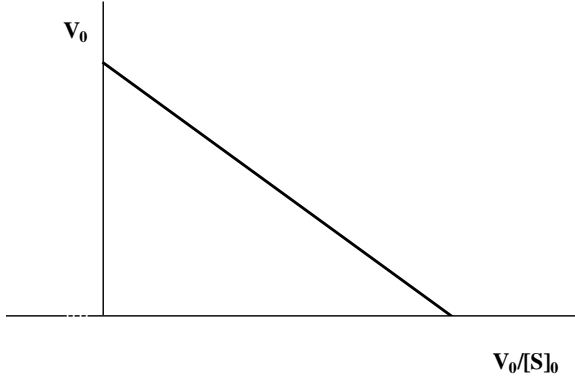
Hanes-Woolf denklemi

$$\frac{[S]_0}{v_0} = \frac{[S]_0}{v_{\max}} + \frac{K_m}{v_{\max}} \quad (8.23)$$

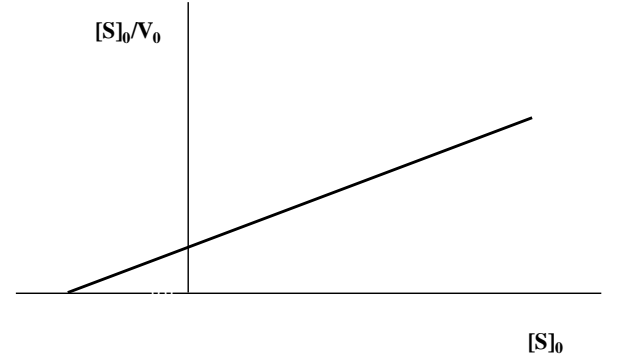
Eşitlik 8.23 için, $[S]_0$ 'a karşı $[S]_0/v_0$ çizildiğinde eğim $1/v_{\max}$ değerini, doğrunun x eksenini kestiği nokta $-K_m$ değerini, y eksenini kestiği nokta K_m/v_{\max} değerini verir (Şekil 8.51 (c)).



(a) Lineweaver-Burke grafiği



(b) Eadie-Hofstee grafiği



(c) Hanes-Woolf grafiği

Şekil 8.51 Michaelis-Menten denklemindeki kinetik parametrelerin grafik yöntemlerle eldesi

8.8.2.1 Susam küspesi proteininin enzimatik hidrolizinin Michaelis-Menten kinetiğine uygunluğunun incelenmesi

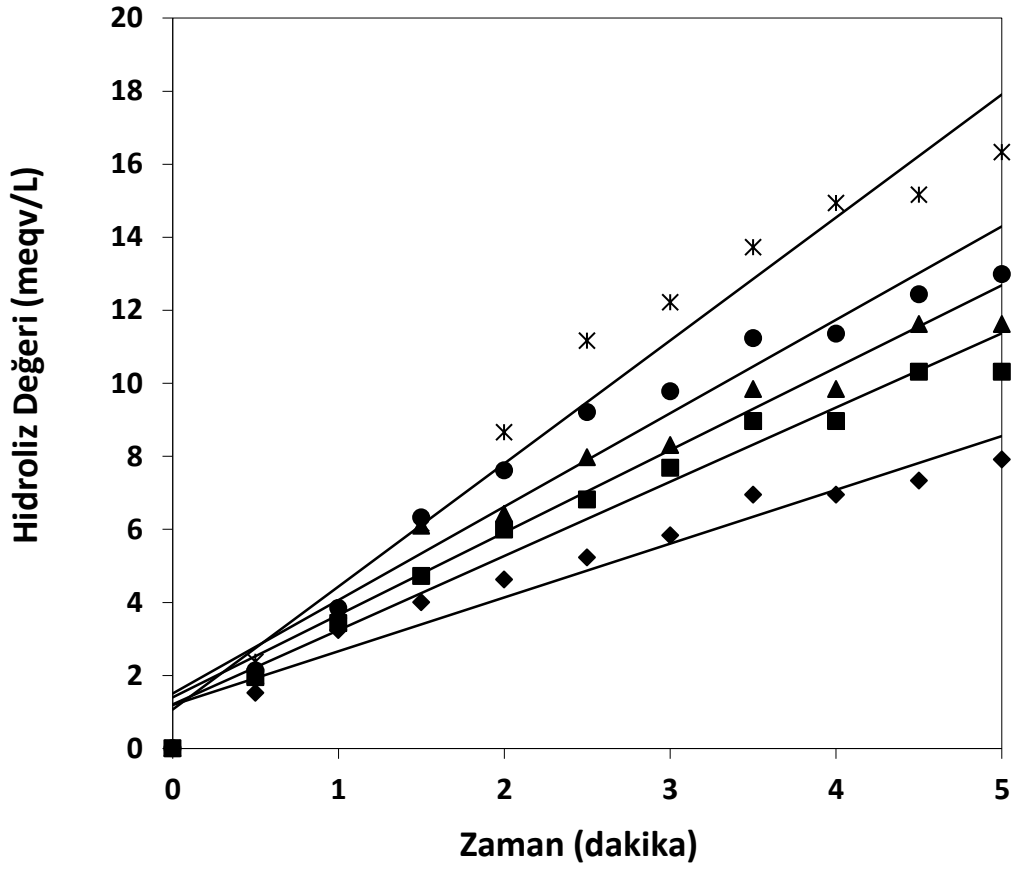
Susam küspesi proteininin Alcalase enzimi ile hidroliz kinetiğinin Michaelis-Menten kinetiğine uygunluğunu incelemek amacıyla, hidroliz reaksiyonları 10, 15, 20, 25 ve 30 g protein/L substrat konsantrasyonlarında, daha önce belirlenen optimum reaksiyon şartlarında, 50°C ve pH 8.5'de, % 0.30 (hacim/hacim) enzim ilavesi ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonların başlangıç hızlarını belirleyebilmek amacıyla her deney için hidroliz değerleri (meqv/L) zamana karşı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar

Şekil 8.52’de grafiksel olarak sunulmuştur. Başlangıç hızları, deneysel verilere uyan lineer modellerin eğimlerinden hesaplanmış, elde edilen hız değerleri ve modellere ait istatistiksel değerler Çizelge 8.20’de verilmiştir.

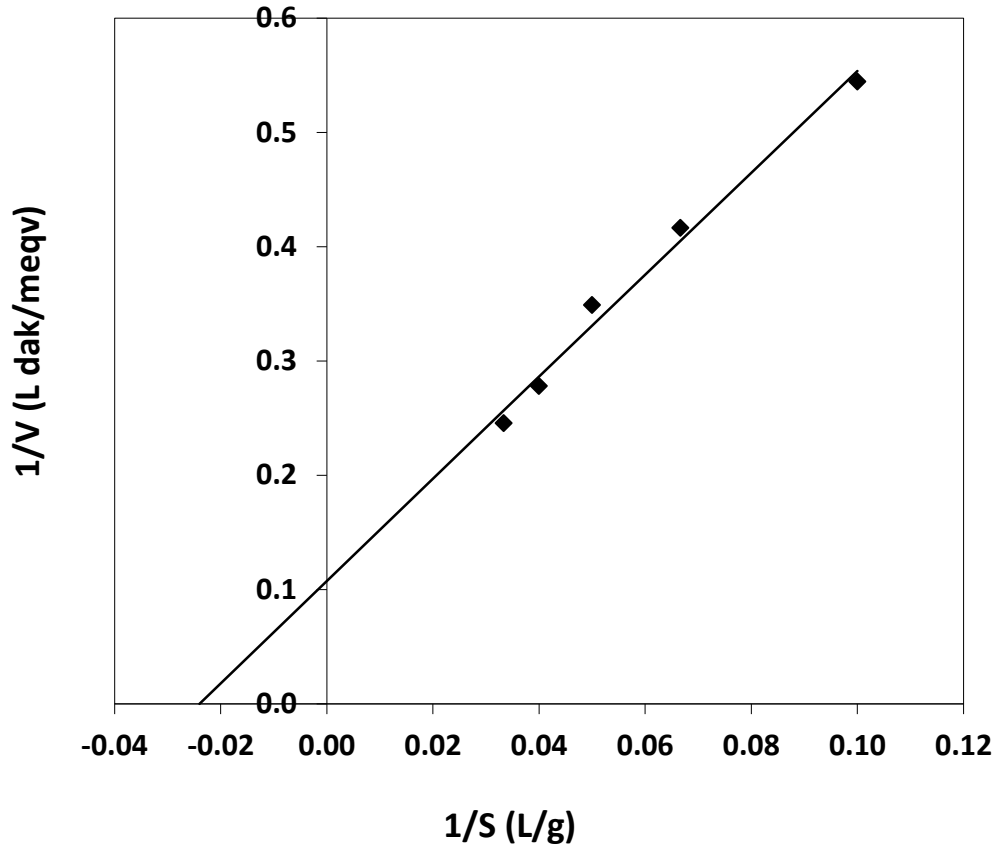
Hidroliz değeri verileri kullanılarak elde edilen başlangıç hız değerleri için çizilen Lineweaver-Burke grafiği ($R^2= 0.9936$, $\sigma= 0.0156$) Şekil 8.53’te sunulmuştur. Şekil 8.53’ten kinetik parametreler $K_m= 41.17$ g/L ve $V_{max}= 9.24$ meqv/L.dak olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 8.20 Farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen hidroliz değeri verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistiksel değerler, T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim)

| S_0 (g protein/L) | Eğim (v_0) (meqv/L.dak) | Standart Sapma (σ) | R^2 |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------|
| 10 | 1.9432 | 0.6306 | 0.9832 |
| 15 | 2.4018 | 0.7386 | 0.9849 |
| 20 | 2.8671 | 0.7786 | 0.9881 |
| 25 | 3.5977 | 0.6939 | 0.9940 |
| 30 | 4.0746 | 0.8356 | 0.9932 |



Şekil 8.52 Farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen hidroliz değerleri, T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, ■ S= 15 g protein /L, ▲ S= 20 g protein /L, ● S= 25 g protein /L, ✖ S= 30 g protein /L)

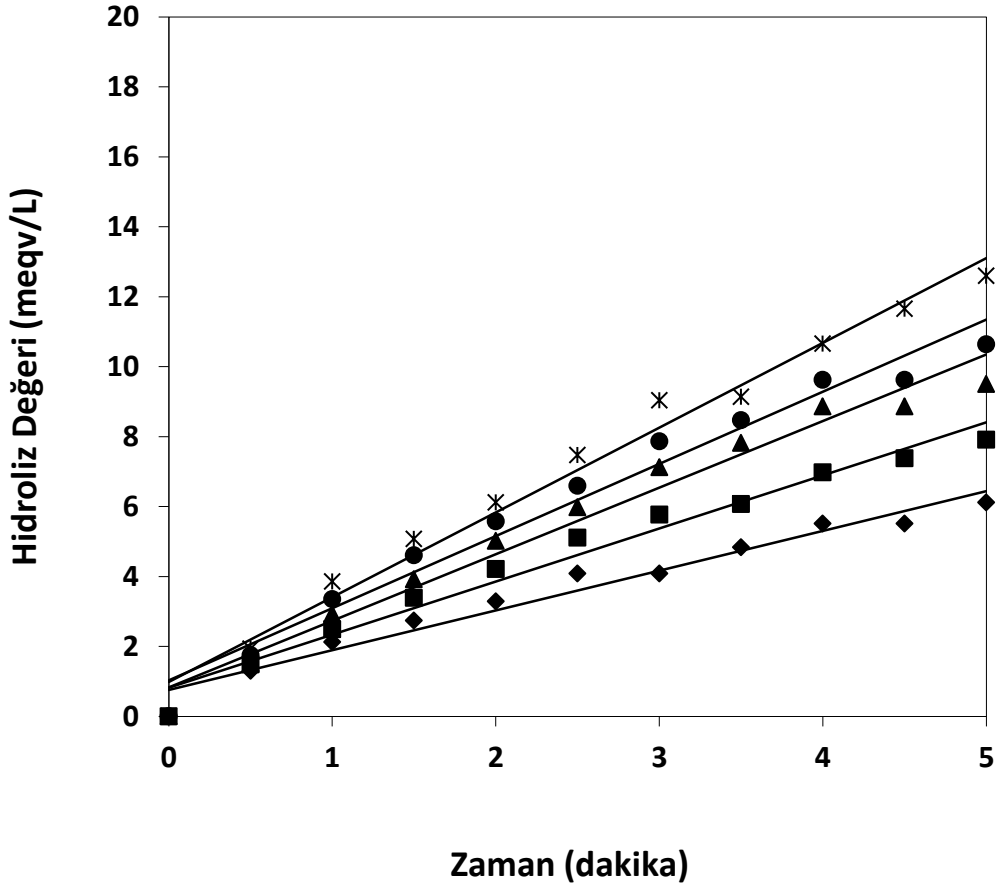


Şekil 8.53 Zamana karşı incelenen hidroliz değeri verilerinden elde edilen hız değerleri için çizilen Lineweaver-Burke grafiği T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim)

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

Michaelis-Menten kinetik parametrelerinin sıcaklık ile değişimini incelemek amacıyla başlangıç hız deneyleri, 10, 15, 20, 25 ve 30 g protein/L substrat konsantrasyonlarında, pH 8.5 değerinde, % 0.30 (hacim/hacim) enzim ilavesi ile 40, 45 ve 50°C sıcaklık değerlerinde gerçekleştirilerek hidroliz değerleri zamana bağlı olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 8.54-8.55'te (T=50°C için bkz Şekil 8.52) grafiksel olarak sunulmuştur. Her set sıcaklık deneyi için, deneysel verilere uyan lineer modellerin eğimlerinden hesaplanan başlangıç hızları ve modellere ait istatistik değerler Çizelge 8.21-8.22'de verilmiştir (T=50°C için bkz Çizelge 8.20). Modellerden elde edilen başlangıç hız verileri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burke grafikleri Şekil 8.56'da

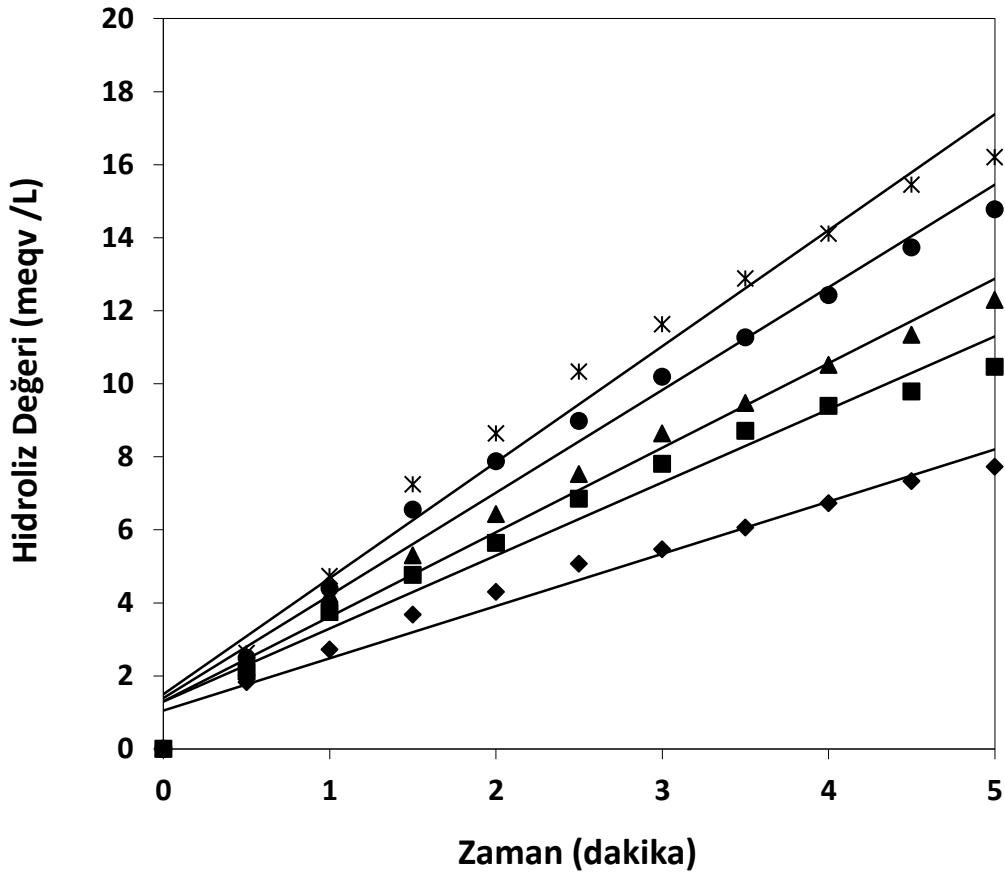
sunulmuş, grafiklerinden elde edilen kinetik parametreler ve istatistiksel değerler Çizelge 8.23'te sunulmuştur.



Şekil 8.54 40°C Sıcaklıkta farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen hidroliz değerleri, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, ■ S= 15 g protein/L, ▲ S= 20 g protein/L, ● S= 25 g protein /L, ✱ S= 30 g/L)

Çizelge 8.21 40°C Sıcaklıkta farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen hidroliz değeri verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistiksel değerler, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim)

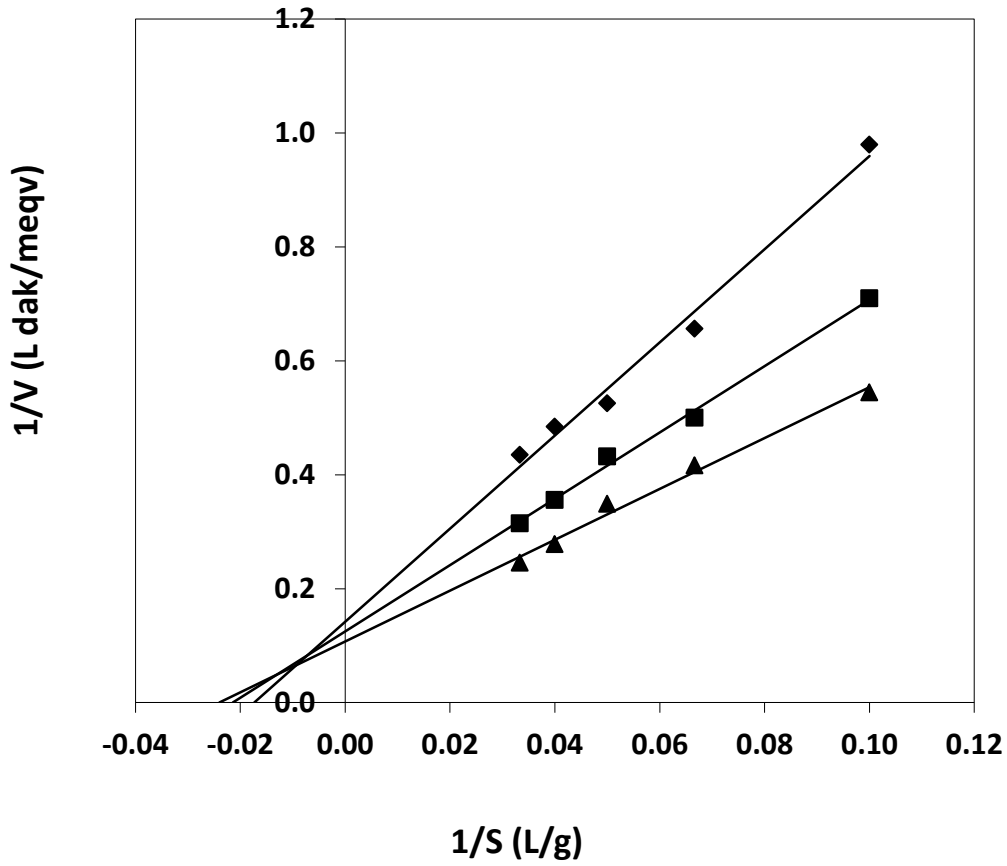
| S_0 (g protein/L) | Eğim (v_0) (meqv/L.dak) | Standart Sapma (σ) | R^2 |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------|
| 10 | 1.1366 | 0.3811 | 0.9821 |
| 15 | 1.5229 | 0.4694 | 0.9848 |
| 20 | 1.9034 | 0.5537 | 0.9864 |
| 25 | 2.0644 | 0.6104 | 0.9860 |
| 30 | 2.2989 | 0.7056 | 0.9849 |



Şekil 8.55 45°C Sıcaklıkta farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen hidroliz değerleri, pH=8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, ■ S= 15 g protein/L, ▲ S= 20 g protein/L, ● S= 25 g protein/L, ✖ S= 30 g protein/L)

Çizelge 8.22 45°C Sıcaklıkta farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen hidroliz değeri verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistiksel değerler, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim)

| S_0 (g protein/L) | Eğim (v_0) (meqv/L.dak) | Standart Sapma (σ) | R^2 |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------|
| 10 | 1.4292 | 0.4721 | 0.9826 |
| 15 | 1.9992 | 0.6634 | 0.9825 |
| 20 | 2.3145 | 0.6216 | 0.9884 |
| 25 | 2.8125 | 0.7259 | 0.9893 |
| 30 | 3.1765 | 0.8681 | 0.9880 |



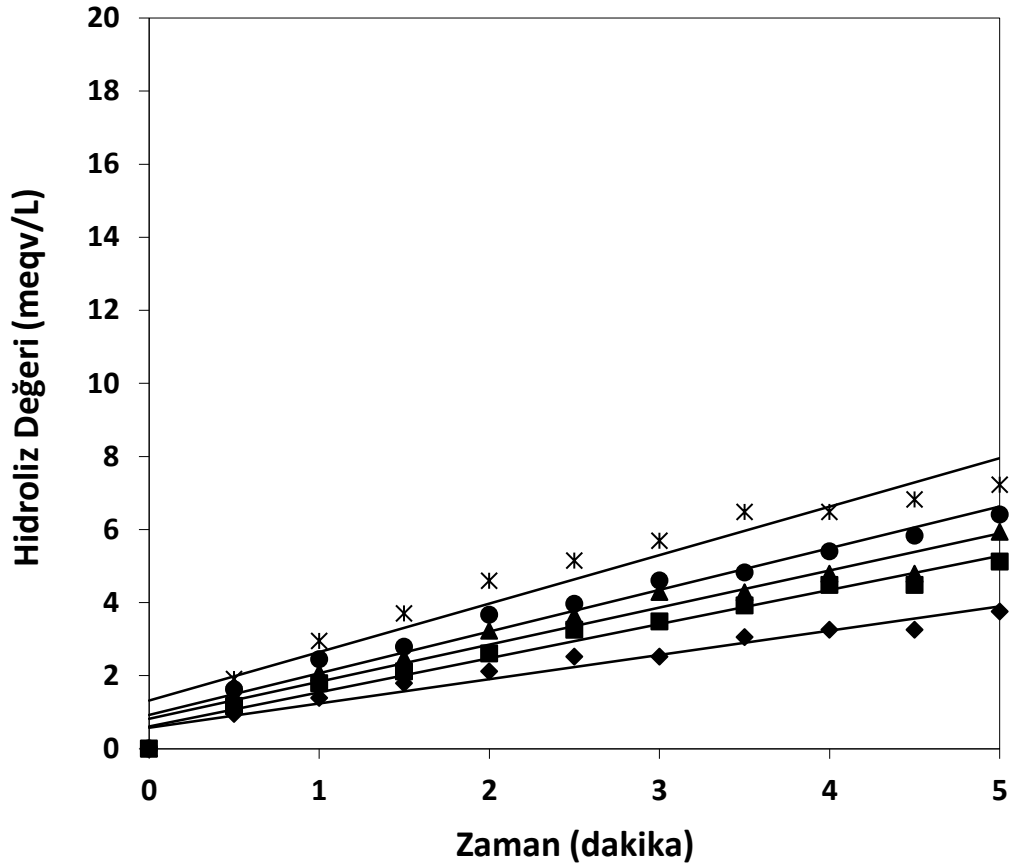
Şekil 8.56 Farklı sıcaklık değerlerinde, susam küspesi proteininin Alcalase enzimi ile hidrolizi için elde edilen Lineweaver-Burke grafikleri, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim)
(◆ 40°C, ■ 45°C, ▲ 50°C)

Çizelge 8.23 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.

Çizelge 8.23 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 |
| K_m (g/L) | 57.63 | 46.76 | 41.17 |
| V_{max} (meqv/L.dak) | 7.05 | 8.03 | 9.24 |
| V_{max}/K_m | 0.1223 | 0.1717 | 0.2244 |
| σ | 0.0296 | 0.0123 | 0.0156 |
| R^2 | 0.9931 | 0.9977 | 0.9936 |

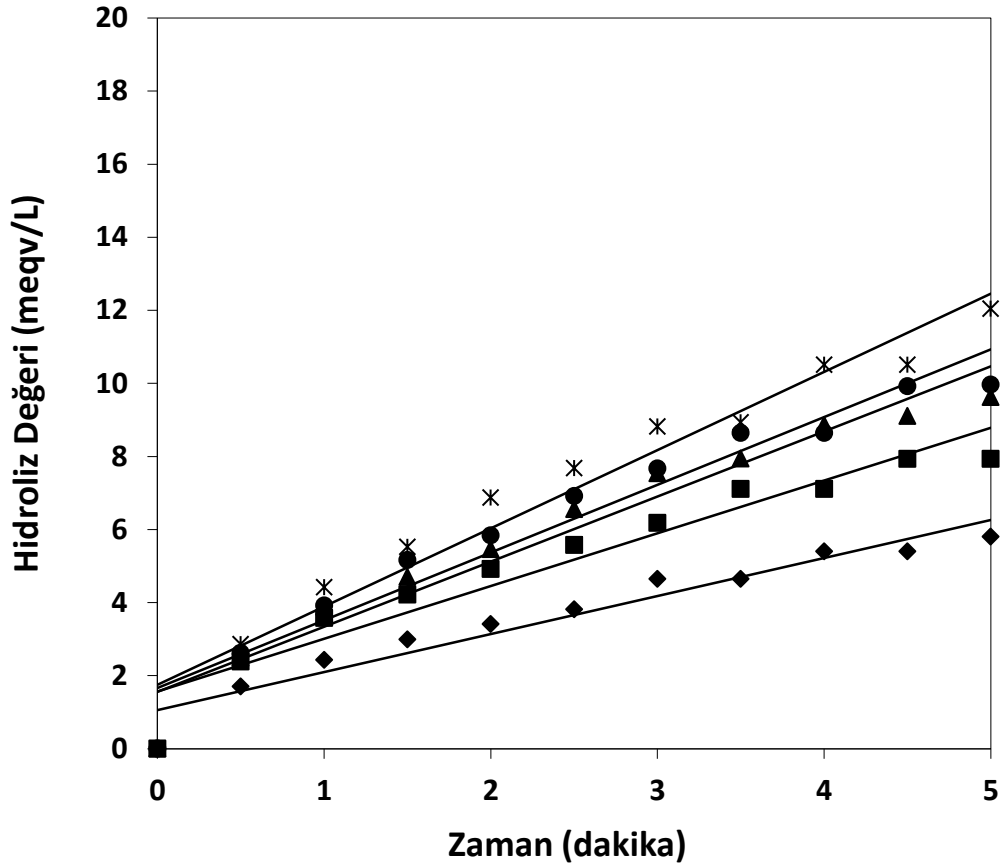
Kinetik parametrelerin pH ile değişimini incelemek amacıyla başlangıç hız deneyleri, 10, 15, 20, 25 ve 30 g protein/L substrat konsantrasyonlarında, 50°C sıcaklıkta, % 0.30 (hacim/hacim) enzim ilavesi ile pH 7, 7.5, 8 ve 8.5 değerlerinde gerçekleştirilerek hidroliz değerleri zamana bağlı olarak incelenmiş, elde edilen sonuçlar Şekil 8.57-8.59'da (pH=8.5 için bkz Şekil 8.52) grafiksel olarak sunulmuştur. Her set için, deneysel verilere uyan lineer modellerin eğimlerinden hesaplanan başlangıç hızları ve modellere ait istatistiksel değerler Çizelge 8.24-8.26'da verilmiştir (pH=8.5 için bkz Çizelge 8.20). Modellerden elde edilen başlangıç hız verileri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burke grafikleri Şekil 8.60'da sunulmuş, grafiklerinden elde edilen kinetik parametreler ve istatistiksel değerler ise Çizelge 8.27'de sunulmuştur.



Şekil 8.57 pH 7 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen hidroliz değerleri, T= 50°C, E= % 0.30 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, ■ S= 15 g protein/L, ▲ S= 20 g protein/L, ● S= 25 g protein/L, ✖ S= 30 g protein/L)

Çizelge 8.24 pH 7 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen hidroliz değeri verilerine uyum lineer modeller için eğim ve istatistiksel değerler, T= 50°C, E= % 0.30 (hacim/hacim)

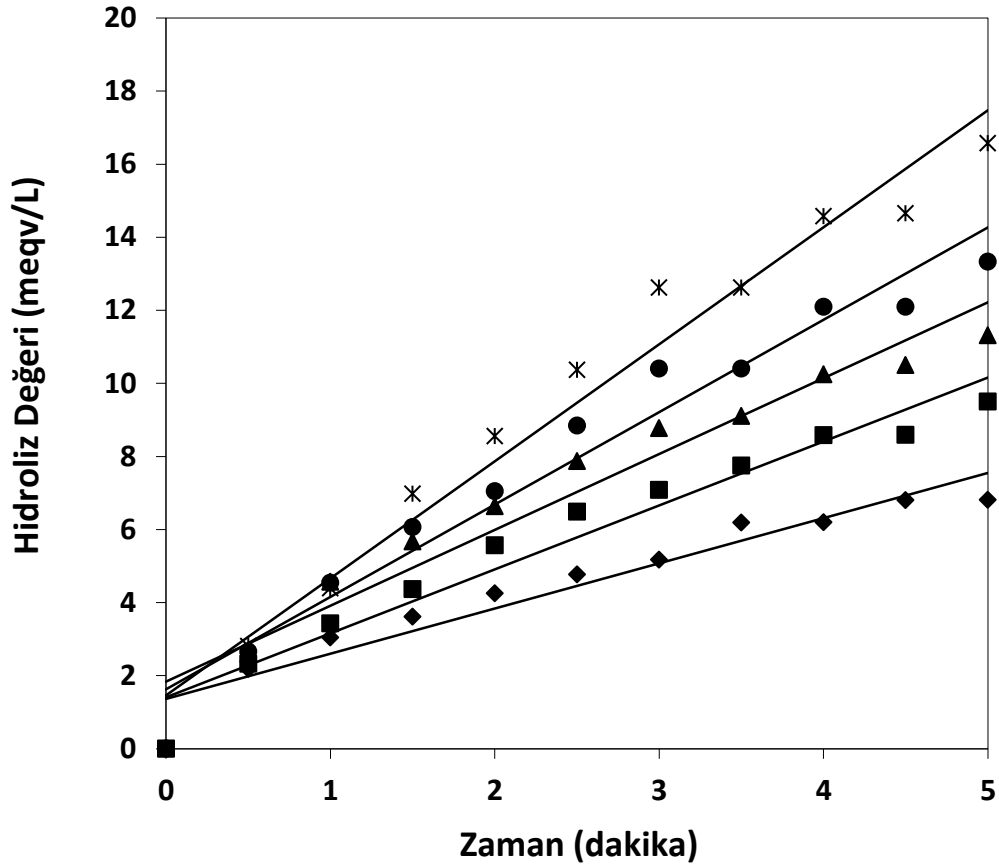
| S ₀ (g protein/L) | Eğim (v ₀) (meqv/L.dak) | Standart Sapma (σ) | R ² |
|---------------------------------|--|-----------------------|----------------|
| 10 | 0.8163 | 0.2249 | 0.9815 |
| 15 | 1.0308 | 0.3913 | 0.9786 |
| 20 | 1.1289 | 0.5792 | 0.9723 |
| 25 | 1.2875 | 0.5978 | 0.9732 |
| 30 | 1.4213 | 0.7367 | 0.9716 |



Şekil 8.58 pH 7.5 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen hidroliz değerleri, T= 50°C, E= % 0.30 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, ■ S= 15 g protein/L, ▲ S= 20 g protein/L, ● S= 25 g protein/L, ✕ S= 30 g protein/L)

Çizelge 8.25 pH 7.5 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen hidroliz değeri verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistiksel değerler, T= 50°C, E= % 0.30 (hacim/hacim)

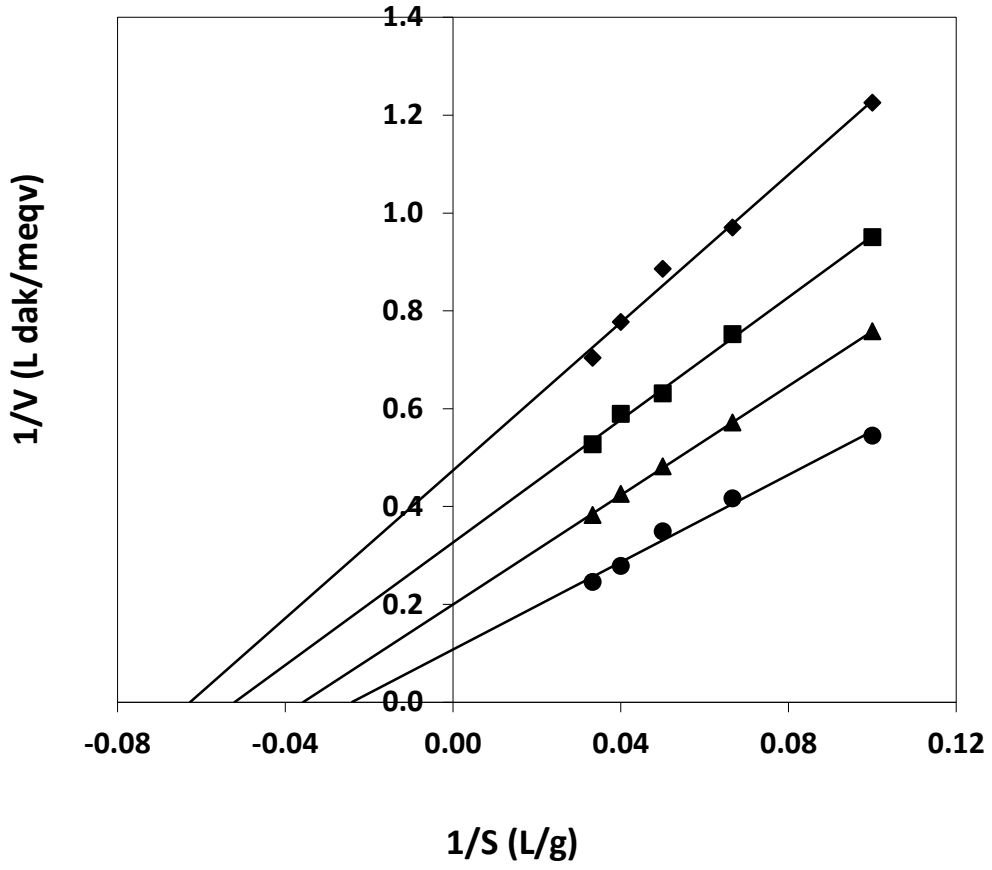
| S_0 (g protein/L) | Eğim (v_0) (meqv/L.dak) | Standart Sapma (σ) | R^2 |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------|
| 10 | 1.0524 | 0.3063 | 0.9849 |
| 15 | 1.3293 | 0.4412 | 0.9897 |
| 20 | 1.5848 | 0.4383 | 0.9909 |
| 25 | 1.6966 | 0.8427 | 0.9825 |
| 30 | 1.8979 | 0.8987 | 0.9830 |



Şekil 8.59 pH 8 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen hidroliz değerleri, T= 50°C, E= % 0.30 (hacim/hacim) (◆ S= 10 g protein/L, ■ S= 15 g protein/L, ▲ S= 20 g protein/L, ● S= 25 g protein/L, ✱ S= 30 g protein/L)

Çizelge 8.26 pH 8 değerinde farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen hidroliz değeri verilerine uyan lineer modeller için eğim ve istatistiksel değerler, T= 50°C, E= % 0.30 (hacim/hacim)

| S ₀ (g protein/L) | Eğim (v ₀) (meqv/L.dak) | Standart Sapma (σ) | R ² |
|---------------------------------|--|-----------------------|----------------|
| 10 | 1.3196 | 0.2711 | 0.9949 |
| 15 | 1.7501 | 0.5087 | 0.9926 |
| 20 | 2.0768 | 0.5488 | 0.9952 |
| 25 | 2.3502 | 1.0055 | 0.9905 |
| 30 | 2.6157 | 1.1349 | 0.9909 |



Şekil 8.60 Farklı pH değerlerinde, susam küspesi proteininin Alcalase enzimi ile hidrolizi için elde edilen Lineweaver-Burke grafikleri, T= 50°C, E= % 0.30 (hacim/hacim) (◆ pH 7, ■ pH 7.5, ▲ pH 8, ● pH 8.5)

Çizelge 8.27 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.

Çizelge 8.27 pH deneyleri için çizilen Lineweaver-Burke grafiklerden elde edilen kinetik parametreler ve grafiklere ait istatistiksel değerler

| Kinetik sabitler ve istatistiksel değerler | pH | | | |
|--|--------|--------|--------|--------|
| | 7.0 | 7.5 | 8.0 | 8.5 |
| K_m (g/L) | 15.96 | 19.21 | 27.97 | 41.17 |
| V_{max} (meqv/L.dak) | 2.11 | 3.06 | 5.01 | 9.24 |
| V_{max}/K_m | 0.1322 | 0.1593 | 0.1791 | 0.2244 |
| σ | 0.0240 | 0.0111 | 0.0029 | 0.0156 |
| R^2 | 0.9947 | 0.9983 | 0.9998 | 0.9936 |

8.8.2.3 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 inhibisyonudur. Kompetitiv inhibitör varlığında V_{max} değeri değişmez, ancak K_m değeri artış gösterir. Kompetitive inhibisyonu için hız denklemi;

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_m(1 + \frac{[I]}{K_i}) + [S]} = \frac{v_{max}[S]}{K_{m_{göz}} + [S]} \quad (8.24)$$

şeklinindedir. Eşitlik 8.24'de [I] inhibitör konsantrasyonu, K_i inhibisyon sabitidir. Kinetik parametrelerin eldesi için hız denklemi lineer hale getirilir ve Lineweaver-Burke grafiği çizilirse Şekil 8.61 (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;

$$v = \frac{\frac{v_{\max}}{(1 + [I]/K_i)} [S]}{K_m + [S]} = \frac{v_{\max_{göz}} [S]}{K_m + [S]} \quad (8.25)$$

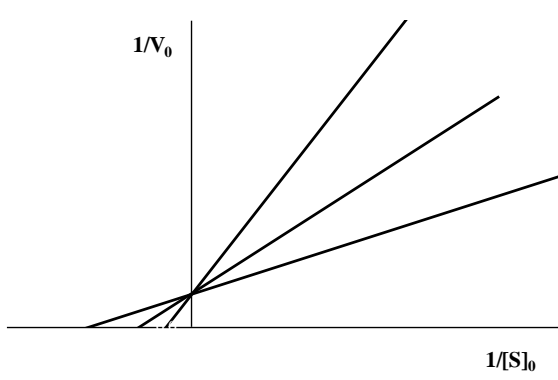
şekindedir. Eşitlik 8.25 lineer hale getirilir ve Lineweaver-Burke grafiği çizilirse Şekil 8.61 (b) elde edilir.

Unkompetitiv (yarı yarışmalı) inhibisyon

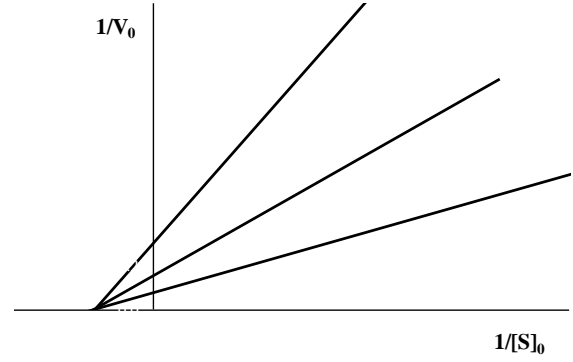
Bu tür inhibisyonda inhibitör serbest enzime bağlanmaz, enzim substrat kompleksine bağlanarak kompleksin ürün oluşturmasını engeller. Unkompetitiv inhibisyonda hem V_{\max} hem de K_m değeri azalır. Unkompetitiv inhibisyon için hız denklemi;

$$v = \frac{\frac{v_{\max}}{(1 + [I]/K_i)} [S]}{\frac{K_m}{(1 + [I]/K_i)} + [S]} = \frac{v_{\max_{göz}} [S]}{K_{m_{göz}} + [S]} \quad (8.26)$$

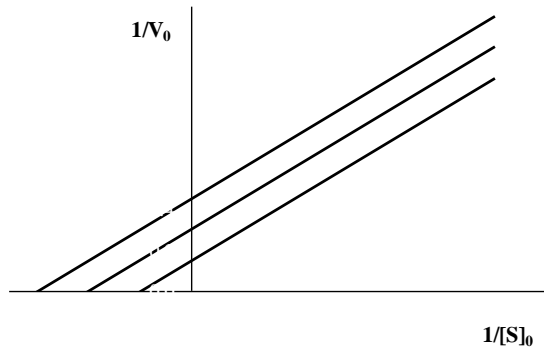
şekindedir. Kinetik parametrelerin eldesi için hız denklemi lineer hale getirilir ve Lineweaver-Burke grafiği çizilirse Şekil 8.61 (c) elde edilir [135-137].



(a) Kompetitive (yarışmalı) inhibisyon



(b) Nonkompetitive (yarışmasız) inhibisyon

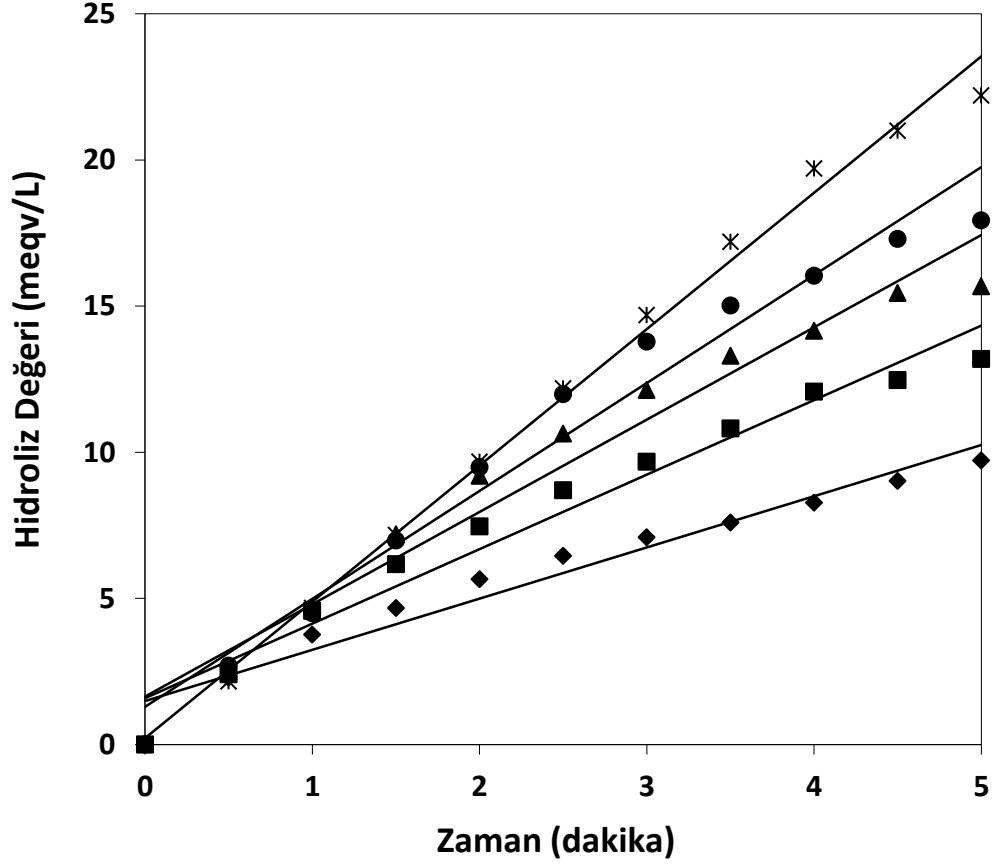


(c) Unkompetitive (yarı yarışmalı) inhibisyon

Şekil 8.61 Farklı inhibisyon türleri için Lineweaver-Burke grafikleri

Susam küspesi proteininin hidroliz reaksiyonunda Alcalase enzimi için ürün inhibisyon türünün belirlenebilmesi amacıyla, öncelikle deneylerde kullanılacak hidrolizatın eldesi için, elde edilen optimum proses şartlarında (15 g protein/L substrat konsantrasyonunda, 50°C sıcaklıkta, pH 8.5'te, % 0.30 (hacim/hacim) enzim ilavesi ile) hidroliz reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. 120 dakikalık reaksiyon süresi sonunda Alcalase enzimi ısı ile inaktive edildikten sonra, ortamda kalan hidrolizlenmeyen proteini çözeltiden ayırmak için, hidrolizat çözeltisi 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, 15, 20, 25 ve 30 g protein/L substrat konsantrasyonlarında, 50°C sıcaklık ve pH 8.5'te, % 0.30 (hacim/hacim) enzim ilavesi ile gerçekleştirilmiştir. Her deney için zamana karşı incelenen hidroliz değerleri (meqv/L) Şekil 8.62-8.64'te grafiksel olarak

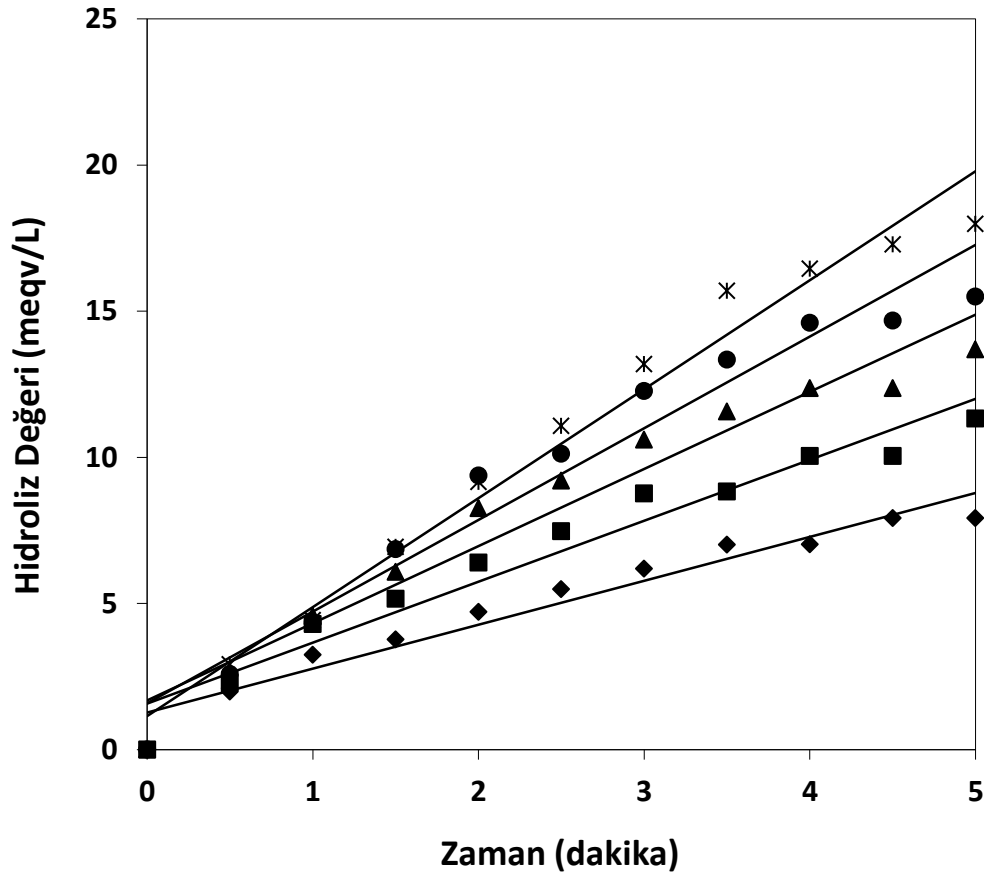
sunulmuştur (kontrol deneyleri için bkz. Şekil 8.52). Her set için, deneysel verilere uyan lineer modellerin eğimlerinden hesaplanan, başlangıç hızları ve modellere ait istatistiksel değerler Çizelge 8.28- 8.30'da verilmiştir.



Şekil 8.62 Farklı substrat konsantrasyonlarında, reaksiyon çözeltisine % 15 (hacim/hacim) oranında hidrolizat ilavesi ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen hidroliz değerleri, T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim)
(◆ S= 10 g protein/L, ■ S= 15 g protein/L, ▲ S= 20 g protein/L, ● S= 25 g protein/L, ⋈ S= 30 g protein/L)

Çizelge 8.28 % 15 (hacim/hacim) hidrolizat ilavesi için, farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen hidroliz değeri verilerine uyan lineer modellere ait eğim ve istatistiksel değerler, T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim)

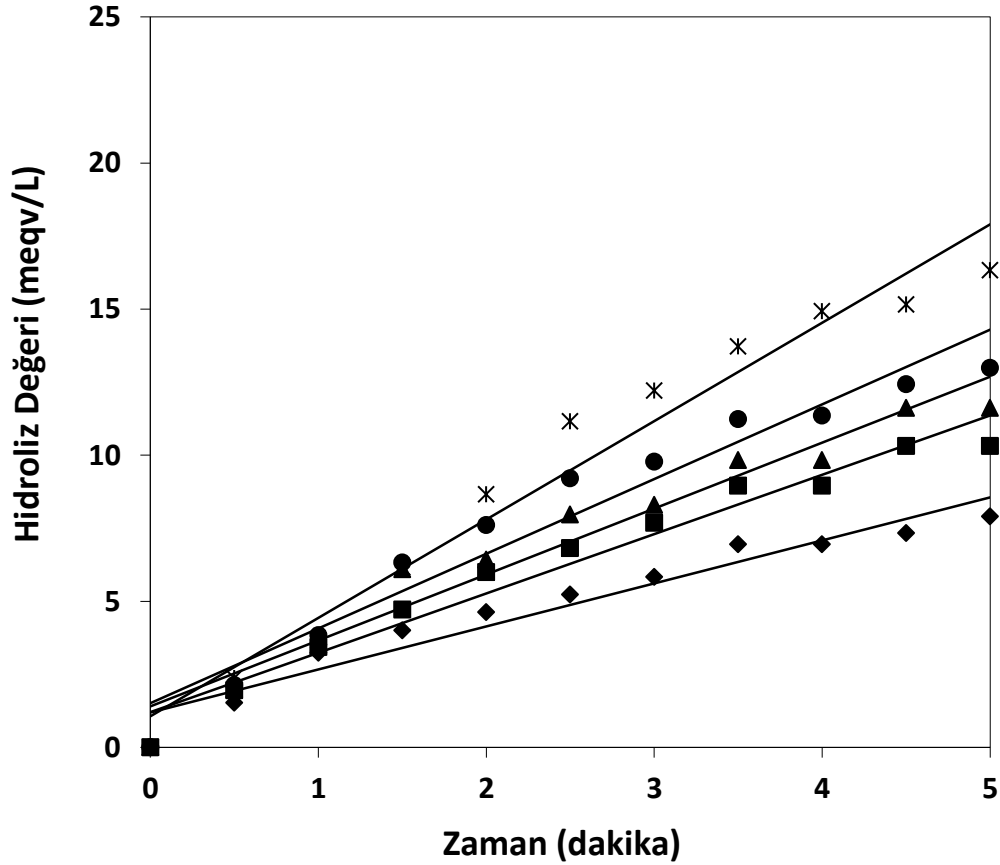
| S_0 (g protein/L) | Eğim (v_0) (meqv/L.dak) | Standart Sapma (σ) | R^2 |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------|
| 10 | 0.8810 | 0.3850 | 0.9908 |
| 15 | 1.4728 | 0.3402 | 0.9973 |
| 20 | 1.8148 | 0.5358 | 0.9955 |
| 25 | 2.2470 | 0.8308 | 0.9936 |
| 30 | 2.5012 | 1.3133 | 0.9867 |



Şekil 8.63 Farklı substrat konsantrasyonlarında, reaksiyon çözeltisine % 30 (hacim/hacim) oranında hidrolizat ilavesi ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen hidroliz değerleri, T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim)
 (◆ S= 10 g protein/L, ■ S= 15 g protein/L, ▲ S= 20 g protein/L, ● S= 25 g protein/L, ✖ S= 30 g protein/L)

Çizelge 8.29 % 30 (hacim/hacim) hidrolizat ilavesi için, farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen hidroliz değeri verilerine uyan lineer modellere ait eğim ve istatistiksel değerler, T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim)

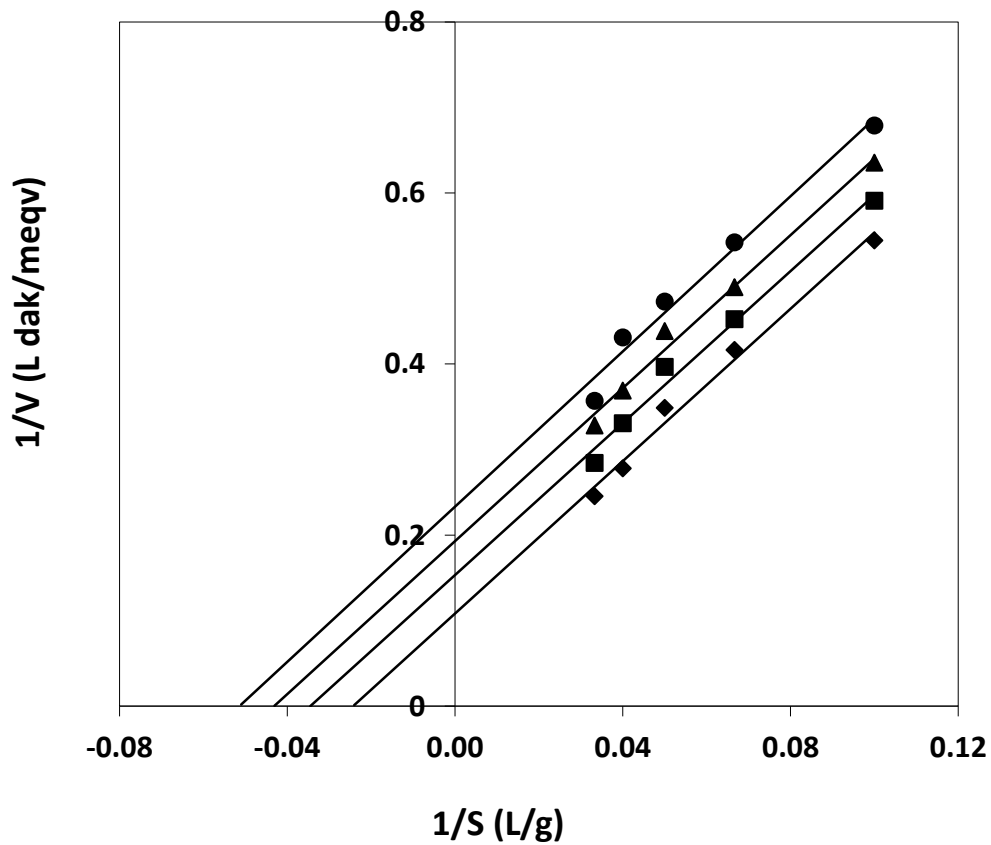
| S_0 (g protein/L) | Eğim (v_0) (meqv/L.dak) | Standart Sapma (σ) | R^2 |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------|
| 10 | 1.5736 | 0.6055 | 0.9817 |
| 15 | 2.0412 | 0.7959 | 0.9845 |
| 20 | 2.2795 | 1.0694 | 0.9841 |
| 25 | 2.7108 | 1.1881 | 0.9773 |
| 30 | 3.0459 | 1.4759 | 0.9818 |



Şekil 8.64 Farklı substrat konsantrasyonlarında, reaksiyon çözeltisine % 45 (hacim/hacim) oranında hidrolizat ilavesi ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için zamana karşı elde edilen hidroliz değerleri, T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim)
 (◆ S= 10 g protein/L, ■ S= 15 g protein/L, ▲ S= 20 g protein/L, ● S= 25 g protein/L, ✖ S= 30 g protein/L)

Çizelge 8.30 % 45 (hacim/hacim) hidrolizat ilavesi için, farklı substrat konsantrasyonlarında zamana karşı elde edilen hidroliz değeri verilerine uyan lineer modellere ait eğim ve istatistiksel değerler, T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim)

| S_0 (g protein/L) | Eğim (v_0) (meqv/L.dak) | Standart Sapma (σ) | R^2 |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------|
| 10 | 1.4730 | 0.6106 | 0.9901 |
| 15 | 1.8443 | 0.7327 | 0.9870 |
| 20 | 2.1137 | 0.8642 | 0.9843 |
| 25 | 2.3202 | 0.9311 | 0.9844 |
| 30 | 2.8019 | 1.1072 | 0.9828 |



Şekil 8.65 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesinde, susam küspesi proteininin Alcalase enzimi ile hidrolizi için elde edilen Lineweaver-Burke grafikleri, T= 50°C, pH= 8.5, E= % 0.30 (hacim/hacim) (♦ kontrol, ■ % 15 (hacim/hacim), ▲ % 30 (hacim/hacim), ● % 45 (hacim/hacim))

Modellerden elde edilen başlangıç hız verileri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burke grafiği (Şekil 8.65) inhibisyon türünün unkompetitiv olduğunu göstermiştir. Lineweaver-Burke grafiğinden elde edilen kinetik parametreler ve grafiklere ait istatistiksel değerler Çizelge 8.31’de verilmiştir.

Çizelge 8.31 Farklı miktarlarda hidrolizat ilavesinde, zamana karşı incelenen hidroliz değeri 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) | 41.17 | - | - | - |
| $K_m^{göz}$ (g/L) | - | 28.97 | 23.22 | 19.46 |
| V_{max} (meqv/L.dak) | 9.24 | - | - | - |
| $V_{max}^{göz}$ (meqv/L.dak) | - | 6.52 | 5.19 | 4.29 |
| K_i (% hacim/hacim) | - | 35.60 | 38.81 | 40.32 |
| K_i (ort., % hacim/hacim) | | 38.24 | | |
| σ | 0.0156 | 0.0163 | 0.0154 | 0.0208 |
| R^2 | 0.9936 | 0.9930 | 0.9938 | 0.9890 |

Literatürde, susam küspesi proteininin hidrolizi sınırlı bir şekilde incelenmiş olup, bu çalışmada susam küspesi proteininin enzimatik hidrolizi ve kinetiği kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve elde edilen kinetik veriler Çizelge 8.32’de sunulmuştur.

Çizelge 8.32 Susam küspesi proteininin enzimatik hidroliz kinetiğine ait veriler

| Kinetik model | Proses şartları | Kinetik sabitler |
|---|---|---|
| <p>Michaelis-Menten (unkompetitiv inhibisyon)</p> $v = \frac{\frac{v_{\max}}{(1 + [I]/K_i)} [S]}{\frac{K_m}{(1 + [I]/K_i)} + [S]} \quad (8.26)$ | <p>pH 8.5, 50°C S = 10-30 g/L E = % 0.3 (hacim/hacim)</p> | <p>Baz sarfiyatı verilerinden; K_m= 41.17 g/L V_{max}= 9.24 meqv/L.dak K_i= % 38.24 (hacim/hacim)</p> |
| <p>$\frac{dX}{dt} = a \cdot \exp(-b \cdot X) \quad (8.5)$ X: Hidroliz veya çözünürlük derecesi</p> | <p>pH 6.5-9, 45-65°C S = 10-30 g/L E= % 0.20-0.40 (hacim/hacim)</p> | <p>Denklem katsayıları Çizelge 8.18'de verilmiştir.</p> |
| <p>$A = (100 - \gamma) \exp(-k_D \cdot t) + \gamma \quad (8.7)$</p> | <p>pH 6.5-9, 45-55°C</p> | <p>İnaktivasyon sabitleri Çizelge 8.19'da verilmiştir.</p> |
| <p>$1/A = 1/A_0 + k \cdot t \quad (8.8)$ A: % enzim aktivitesi</p> | <p>60-65°C</p> | |

8.9 Susam Küspesi Protein Hidrolizatlarının Fonksiyonel Özelliklerinin İncelenmesi

8.9.1.1 Su Tutma Kapasitesi

Protein kaynaklı katkıların absorblayıp yapıda tuttıkları su, gıdaların tekstürel niteliklerine ve bazı özelliklerine katkıda bulunmaktadır. Bunlar çoğunlukla et ürünlerinde ve hamurlarda gözlenen özelliklerdir. Su absorpsiyonu yoluyla protein, su alarak şişer ve böylece karakteristik olan yapı, tekstür, viskozite gibi gıdanın bazı önemli reolojik özellikleri ortaya çıkar. Bu nedenle gıda proteinlerinin su tutması pratikte büyük önem taşımaktadır. Proteinlerin su tutma kapasitesi, protein molekülünün bu özelliklerini ortaya koymak için yararlı olmaktadır. Protein molekülünün su tutma yeteneği boyutun, şeklin, hidrofilik ve hidrofobik etkileşimlerin bir fonksiyonudur. Su

tutma yeteneği lipitlerin ve karbonhidratların bulunmasından, yüzeydeki amino asit kalıntılarının özelliklerinden etkilenmektedir [66,71,138].

Susam küspesi proteini ve hidrolizatlarının su tutma kapasiteleri Çizelge 8.33'te verilmiştir. Çizelge 8.33 incelendiğinde, su tutma kapasitesinin hidroliz derecesinin artışı ile arttığı görülmektedir. Tüm susam küspesi protein hidrolizatları doğal proteinden daha yüksek su tutma kapasitesine sahiptir. Su tutma kapasitesinde artan hidroliz derecesi ile gözlemlenen artış, enzimatik hidroliz esnasında –COOH ve –NH₂ gibi polar grupların sayısının artışına bağlı olabilir [139,140].

Proteinlerin su ve/veya yağ ile olan etkileşimleri tat ve tekstür gibi özellikleri etkilendiğinden dolayı gıda sistemlerinde çok önemlidir. Aletor vd. [141] tarafından çorba ve sos gibi viskoz gıdalar için 1.49 ile 4.72 (g/g) arasındaki su tutma kapasitesi değerleri kritik değer olarak belirtilmiştir. Bu nedenle, yüksek su tutma kapasitesinden dolayı susam küspesi protein hidrolizatları gıda endüstrisinde; ekmeklerde ve keklerde su kaybını önlemek, pişirilmiş ve dondurulmuş gıdaların kullanımını arttırmak için kullanılabilir [71,81].

Enzimatik hidrolizin sonucu olarak iyileştirilmiş su tutma kapasitesi; susam proteinin enzimatik hidrolizi için Kanu vd. [82] tarafından; balık yan ürünlerinin enzimatik hidrolizi için Balti vd. [140] tarafından; kolza proteinin enzimatik hidrolizi için Vioque vd. [71] tarafından ve peynir altı suyu proteininin enzimatik hidrolizi için Sinha vd. [142] tarafından da ifade edilmiştir.

Çizelge 8.33 Susam küspesi proteini ve hidrolizatlarının su ve yağ tutma kapasitesi değerleri

| Örnek | Su Tutma Kapasitesi (g su/g protein) | Yağ Tutma Kapasitesi (ml yağ/g protein) |
|---------------|---|--|
| Doğal Protein | 2.67 ± 0.06 | 1.21 ± 0.07 |
| DH10 | 3.31 ± 0.04 | 1.67 ± 0.06 |
| DH30 | 3.34 ± 0.08 | 2.03 ± 0.07 |
| DH45 | 3.38 ± 0.04 | 2.14 ± 0.05 |
| DH60 | 3.41 ± 0.05 | 2.24 ± 0.08 |
| DH120 | 3.43 ± 0.09 | 2.21 ± 0.03 |

*Değerler standart sapması ile birlikte verilmiştir.

Diğer kaynaklardan elde edilen izolat veya konsantratlar için tespit edilen su tutma kapasitesi değerleri; bezelye izolatında 1.7 g/g [143], bakla izolatında 1.8 g/g [143], soya izolatında 1.3 g/g [143], farklı nohut izolatlarında 2.3-3.5 g/g aralığında [144], farklı pirinç kepeği konsantratlarında 3.87-5.60 g/g [145] ve keten tohumu konsantratında 2.70 g/g [146] olarak bulunmuştur.

8.9.1.2 Yağ Tutma Kapasitesi

Protein ve lipitler arasındaki etkileşim birçok gıdanın duyusal kalitesini de etkilemektedir. Bu etkileşimler çeşitli bağlar aracılığıyla olur ve pH, iyonik güç, sıcaklık ve sistemdeki diğer değişkenlerden etkilenirler.

Susam küspesi proteini ve hidrolizatlarının yağ tutma kapasiteleri Çizelge 8.33'te verilmiştir. Çizelge 8.33 incelendiğinde, tüm susam küspesi protein hidrolizatları için doğal proteinden daha yüksek yağ tutma kapasitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Hidrolizatların yüksek yağ tutma kapasitesi, enzimatik hidroliz sonucu protein yapısının çeşitli peptitlere parçalanması ile açıklanabilir. Enzimatik hidroliz hidrofobik yüzeyi ve protein molekülünün esnekliğini arttırdığından dolayı proteinlerin yağ tutma kapasitesini geliştirebilmektedir [71,82,144]. Susam küspesi protein hidrolizatları yağ tutma kapasitesi değerleri, susam protein konsantresi için Onsaard vd. [81] tarafından; buğday proteini ve soya proteini için Tomotake vd. [147] tarafından bulunan değerlerle benzer; kasein için Tomotake vd. [147] tarafından bulunan değerlerden farklı bulunmuştur. Farklı proteinlerin farklı yağ tutma kapasitelerine sahip olması amino asit kompozisyon çeşitliği ve hidrofobisiti, degradasyon derecesi, protein boyutu ve esnekliği gibi çeşitli parametrelerle ilgili olabilir [82]. Sonuç olarak, susam küspesi protein hidrolizatları et ve şekerleme endüstrilerinde fonksiyonel malzeme olarak kullanılabilir.

8.9.1.3 Köpük Kapasitesi ve Stabilitesi

Köpük kapasitesi proteinlerin su/hava ara yüzeyinde yüzey gerilimini azaltması sonucu ortaya çıkar [61]. Bazı proteinler yüksek köpük oluşturma yeteneğine sahiptir. Bu köpük oluşturma yeteneği protein cinsine, denaturasyon derecesine, pH'a, sıcaklığa ve çırpma yöntemlerine bağlıdır. Köpük stabilitesi ise kararlı köpük oluşturma

kapasitesidir ve jeller, kekler, tatlılar ve sufle benzeri ürünlere dâhil edilecek proteinlerin önemli bir gereksinimidir. Enzimatik hidrolizin köpük kapasitesini arttırdığı ancak köpük stabilitesini azalttığı belirtilmiştir [71].

Susam küspesi proteini ve hidrolizatlarının köpürme özellikleri Çizelge 8.34 ve Çizelge 8.35'te verilmiştir. Susam küspesi hidrolizatlarının, susam küspesi proteininden daha yüksek köpük kapasitesine sahip olduğu Çizelge 8.34'ten görülmektedir. Köpük kapasiteleri % 45.2 değerinden sırası ile DH10, DH30, DH45, DH60 ve DH120 için % 113.6, 116.4, 123.4, 136.8 ve 140.2 değerlerine artmıştır.

Çizelge 8.34 Susam küspesi proteini ve hidrolizatlarının köpük kapasitesi değerleri

| Örnek | Çırpma öncesi hacim (ml) | Çırpma sonrası hacim (ml) | Köpük Kapasitesi (%) |
|---------|--------------------------|---------------------------|----------------------|
| Protein | 50 | 72.6 ± 3.2 | 45.2 ± 6.3 |
| DH10 | 50 | 106.8 ± 1.4 | 113.6 ± 2.8 |
| DH30 | 50 | 108.2 ± 1.3 | 116.4 ± 2.6 |
| DH45 | 50 | 111.7 ± 0.7 | 123.4 ± 1.4 |
| DH60 | 50 | 118.4 ± 3.6 | 136.8 ± 7.1 |
| DH120 | 50 | 120.1 ± 1.5 | 140.2 ± 3.1 |

*Değerler standart sapması ile birlikte verilmiştir.

Susam küspesi protein hidrolizatlarının, köpük kapasiteleri artan hidroliz derecesi ile artış gösterirken; köpük stabilitesi azalmıştır. Enzimatik hidroliz köpük kapasitesini geliştirmesine rağmen köpük stabilitesinde azalmaya yol açmıştır. Yüksek hidroliz dereceli hidrolizatlar köpürme özelliğine sahiptirler; ancak peptit boyutlarındaki küçülme ve hidrofilitelerine bağlı olarak köpük korunamaz [62,71,148-149]. Enzimatik hidroliz sonucu köpük kapasitesinin artması ve köpük stabilitesinin azalması eğilimi Bandyopadhyay vd. [150], Guan vd. [61] ve Bandyopadhyay ve Ghosh [44] tarafından da bildirilmiştir.

Çizelge 8.35 Susam küspesi proteini ve hidrolizatlarının köpük stabilitesi değerleri

| Örnek | Çırpma öncesi hacim (ml) | Köpük Stabilitesi | | | |
|---------|--------------------------|-------------------|------------|------------|------------|
| | | 10 dak | 30 dak | 45 dak | 60 dak |
| Protein | 50 | 49.4 ± 0.5 | 42.8 ± 0.5 | 38.9 ± 0.6 | 31.5 ± 0.3 |
| DH10 | 50 | 66.6 ± 1.1 | 62.3 ± 1.0 | 60.2 ± 0.9 | 57.7 ± 0.7 |
| DH30 | 50 | 64.5 ± 1.0 | 60.7 ± 1.5 | 59.4 ± 1.3 | 56.5 ± 1.6 |
| DH45 | 50 | 63.2 ± 1.2 | 58.8 ± 0.1 | 57.1 ± 0.6 | 55.6 ± 1.3 |
| DH60 | 50 | 62.7 ± 0.7 | 58.2 ± 0.6 | 56.6 ± 0.3 | 54.9 ± 0.6 |
| DH120 | 50 | 62.1 ± 1.5 | 58.4 ± 0.2 | 55.7 ± 1.6 | 54.1 ± 0.6 |

*Değerler standart sapması ile birlikte verilmiştir.

8.9.1.4 Emülsiyon Aktivite İndeksi ve Emülsiyon Stabilite İndeksi

Yüzey hidrofobisitesi ve protein konsantrasyonu proteinlerin emülsiyon özelliklerini belirleyen temel karakteristiklerdendir. Proteinlerin esnekliği ve çevresel değişimler karşısında yapısal adaptasyona uğraması yüzey aktivitesi olarak ifade edilmektedir [68]. Emülsiyon aktivite indeksi (EAI); proteinin flokulasyon ve birleşmeyi önleyerek emülsiyonun oluşumu süresince su/yağ arayüzeyine hızlı bir şekilde adsorblanabilme yeteneğini yansıtır. Emülsiyon stabilite indeksi (ESI) ise proteinin, yağ globüllerinin flokulasyon ve birleşmesini önleyerek belirli bir süre stabil bir emülsiyon sağlayabilme yeteneğinin ölçüsüdür [72]. Proteinin kaynağı, konsantrasyonu, çözünebilme yeteneği, pH, sıcaklık, ekipman ve metot gibi çeşitli faktörler ve koşullar proteinlerin emülsiyon özelliklerini etkilerler [151].

Susam küspesi proteini ve hidrolizatlarının emülsiyon özellikleri Çizelge 8.36'da verilmiştir. Çizelge 8.36 incelendiğinde, emülsiyon kapasitesi açısından hidrolizatların protein daha iyi bir emülgatör olduğu görülmektedir. Bu durum, gıdalarda hem su hem de yağ ile etkileşebilen yüklü amino asitlerin varlığından kaynaklanabilir. Bu etkileşim proteinleri iyi bir emülgatör yapmaktadır [152]. Yüzeydeki protein moleküllerinin yeterince ortaya çıkması ile hidrofobik grupların açığa çıkması mümkündür. Bu durum, proteinlerin emülsiyon kapasitesini arttırabilir [82].

Çizelge 8.36 Susam küspesi proteini ve hidrolizatlarının emülsiyon aktivite indeksi ve emülsiyon stabilite indeksi değerleri

| Örnek | EAI (m ² /g) | ESI (dakika) |
|---------|-------------------------|--------------|
| Protein | 112.5 ± 1.3 | 38.6 ± 1.2 |
| DH10 | 176.5 ± 1.0 | 49.5 ± 0.4 |
| DH30 | 180.7 ± 0.5 | 49.4 ± 0.7 |
| DH45 | 191.5 ± 1.6 | 49.2 ± 0.6 |
| DH60 | 193.6 ± 0.8 | 49.1 ± 1.2 |
| DH120 | 204.6 ± 1.9 | 48.7 ± 0.7 |

*Değerler standart sapması ile birlikte verilmiştir.

Enzimatik hidrolizin susam küspesi proteinin emülsiyon aktivite indeksini arttırdığı Çizelge 8.35'te açıkça görülmektedir. Enzimatik hidrolizin emülsiyon özelliklerini geliştirdiği Wu vd. [153], Guan vd. [61] ve Bandyopadhyay vd. [150] tarafından da bildirilmiştir. Yüksek çözünürlük ve küçük molekül boyutundaki hidrolizatlar difüzyonu kolaylaştırmalı ve protein ve yağ arasındaki etkileşimi arttırmalıdır. Enzimatik hidroliz emülsiyon stabilitesini de arttırmaktadır. Emülsiyon stabilite indeksi 38.61 dakika değerinden 49.16 dakika değerine artmıştır (Çizelge 8.36).

8.9.2 Fonksiyonel özelliklerin literatürde varolan verilerle karşılaştırılması

Bu çalışmada susam küspesi protein hidrolizatlarının fonksiyonel özellikleri kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve elde edilen sonuçlar literatürde varolan veriler ile karşılaştırılmış ve Çizelge 8.37'de sunulmuştur.

Çizelge 8.37 Fonksiyonel özelliklerin literatürde varolan verilerle karşılaştırılması

| Kaynak | Substrat | Fonksiyonel Özellikler |
|------------------------------------|------------------------------|--|
| Cano-Medina vd. [80] | Susam protein konsantresi | Emülsiyon kapasitesi % 38, emülsiyon stabilitesi % 51, köpürme kapasitesi % 117 |
| Onsaard vd. [81] | Susam protein konsantresi | Su tutma kapasitesi 1.98 g su /g protein Yağ tutma kapasitesi 2.69 g yağ/ g protein Emülsiyon aktivite indeksi 96.66 m ² /g Emülsiyon stabilite indeksi 44.4 dakika |
| Kanu vd. [82] | Susam küspesi hidrolizatı | Su tutma kapasitesi % 82.2 Yağ tutma kapasitesi % 74.5 Emülsiyon kapasitesi % 73 Köpürme kapasitesi % 85 Köpük stabilitesi % 9.14 (60. Dakika) |
| Sreedevi ve Sivasankar [40] | Susam protein hidrolizatları | Emülsiyon stabilitesi 11.6 dakika |
| Kanu vd. [84] | Susam protein izolatu | Su absorplama 129 g Yağ absorplama 302 g Emülsiyonkapasitesi 170 ml yağ/mg Köpürme kapasitesi % 79 Köpük stabilitesi % 60 (60. Dakika) |
| Khalid vd. [85] | Susam protein izolatu | Su tutma kapasitesi 2.10 ml su /g protein Yağ tutma kapasitesi 1.50 ml yağ/ g protein Emülsiyon kapasitesi % 75 Emülsiyon stabilitesi % 62 Köpürme kapasitesi %112 Köpük stabilitesi % 43 (60. Dakika) |
| Bandyopadhyay ve Ghosh [44] | Susam protein izolatu | Emülsiyon aktivite indeksi 189.38 m ² /g Emülsiyon stabilite indeksi 46.68 dakika Köpürme kapasitesi % 119 Köpük stabilitesi 52 ml (60. Dakika) |
| Taha vd. [86] | Susam protein hidrolizatı | Su tutma kapasitesi % 340 Yağ tutma kapasitesi % 2.06 Emülsiyonkapasitesi 20.5 ml yağ/100 g Köpük stabilitesi % 47.4 (2. Dakika) |
| Bu çalışmada | Susam küspesi hidrolizatı | Su tutma kapasitesi 3.43 g su /g protein Yağ tutma kapasitesi 2.21 ml yağ/ g protein Emülsiyon aktivite indeksi 204.6 m ² /g Emülsiyon stabilite indeksi 48.7 dakika Köpürme kapasitesi % 140.2 Köpük stabilitesi 54.1 ml (60. Dakika) |

SONUÇLAR ve ÖNERİLER

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 proteininin hidrolizi üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Soyanın yanı sıra; bezelye, nohut, bakla üzerlerinde gerçekleştirilen çalışmalarla dikkat çeken bitkisel protein kaynakları arasında yer almaktadır. Ülkemizde, yağ endüstrisinden atık olarak elde edilen susam küspesi yüksek protein ve mineral içeriğinden dolayı değerli bir besin maddesi olmasına karşın, günümüzde sadece hayvan yemi olarak kullanılmaktadır, ancak bazı ülkelerde ekmeğe de karıştırılmaktadır. Gıda endüstrisinde kullanımının olmamasının nedeni çözünürlüğünün az olmasıdır. Bu nedenle bu çalışmada, protein kaynağı olarak susam küspesi seçilmiş ve susam küspesinin enzimatik hidrolizi, kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve elde edilen sonuçlar aşağıda kısaca özetlenmiştir:

1. Susam küspesi proteini hidroliz reaksiyonunun optimizasyonunda kullanılacak uygun enzimi belirleyebilmek amacıyla beş ticari proteaz enzimi ile (Alcalase, Neutrase, Flavourzyme, Protamex ve PTN) ön denemeler gerçekleştirilerek, enzimlerin susam küspesi proteininin hidrolizi ve çözünürlüğü üzerindeki

etkinlikleri incelenmiş ve Alcalase enziminin diğer enzimlerden daha etkin olduğu belirlenmiştir.

2. Hidroliz derecesini belirlemek için kullanılan pH-stat yöntemini, enzimlerin susam küspesi proteininin Alcalase enzimi ile hidrolizi için kalibre etmek, diğer bir deyişle farklı sıcaklıklar için enzimlerin susam küspesi proteininin 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 enzimlerin susam küspesi proteininin hidrolizatları için pK değerleri; 40°C, 50°C ve 60°C sıcaklıklarda sırasıyla 6.87, 6.64 ve 6.41 olarak, OPA yöntemi ile yapılan kalibrasyon sonucunda aynı sıcaklıklar için pK değerleri sırasıyla; 6.88, 6.65 ve 6.42 olarak bulunmuştur.

3. Substrat konsantrasyonunun hidroliz işlemine etkisi incelendiğinde; substrat konsantrasyonu arttırıldığında, 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 15 g protein/L substrat konsantrasyonu değerinden sonra belirgin şekilde azaldığı görülmüş, bu nedenle 15 g protein/L substrat konsantrasyonu optimum substrat konsantrasyonu olarak seçilmiş ve diğer tüm deneylerde başlangıç substrat konsantrasyonu olarak bu değer kullanıma karar verilmiştir.

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 % 0.30 (hacim/hacim) enzim miktarının üzerindeki enzim değerleri için, hidroliz ve protein çözünürlük derecesi değerlerindeki artışın belirgin şekilde yavaşladığı görülmüştür. % 0.30 (hacim/hacim) enzim miktarının üzerindeki değerler için reaksiyonun daha yavaş ilerlemesi, substratın enzim ile doyurulmuş olmasından dolayı hidroliz reaksiyonunun diğer faktörlerden çok substrat konsantrasyonu tarafından limitlenmiş olabileceğini göstermektedir.

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 arttıkça enzim aktivitesinin sabitlendiği değerlerde de belirgin bir artış olduğu saptanmıştır. Farklı enzim miktarları ile gerçekleştirilen deneyler sonucunda, % 0.30 (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 50°C'de elde edildiği, dolayısı ile bu sıcaklık değerinin susam küspesi proteininin hidroliz reaksiyonu için optimum değer olduğu saptanmıştır. Sıcaklığın enzim stabilitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde, 45-55°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 40 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 8.5 değerine kadar artış gösterdiği, pH 9 değeri için elde edilen sonuçların ise hemen hemen pH 8.5 değeri için elde edilen sonuçlarla aynı olduğu bulunmuştur.

pH'in enzim stabilitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde; pH 6.5-8.5 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 8.5 değerinde elde edildiğinden, reaksiyon için uygun pH değeri 8.5 olarak seçilmiştir.

7. Substrat olarak susam küspesi yerine susam kullanımının hidroliz derecesine ve çözünen protein miktarına etkisi incelendiğinde; hidroliz derecesi, çözünürlük derecesi ve enzim aktivite değerleri, susam küspesi deneylerinden elde edilen değerler ile karşılaştırıldığında, susam tohumunun yağ içeriğinden dolayı daha az bulunmuştur.
8. 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.
9. 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 kademedede gerçekleştirilmesi ile % 8, dört kademedede gerçekleştirilmesi ile % 19 oranında arttığı bulunmuştur.

- 10.** Susam küspesine uygulanan ısıl ön işlemin hidroliz reaksiyonuna etkisi incelendiğinde; hidroliz öncesi ortamda bulunan çözünmüş protein miktarının ön işlem uygulanması sonucu yükseldiği ancak ısıl ön işlemin hidroliz ve çözünlük 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.
- 11.** Susam küspesine 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 çözünlük verimini artırıcı bir etkisi olmadığı görülmüştür. Ön işlemin enzim stabilitesine etkisi incelendiğinde, kontrol deneyi ile karşılaştırıldığında aktivite değerlerinde az da olsa bir düşüş meydana geldiği görülmektedir.
- 12.** Susam küspesine 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 çözünlüğünün daha hızlı gerçekleştiği belirlenmiştir. Ön işlemin enzim stabilitesine etkisi incelendiğinde, sonikasyonun enzim stabilitesini etkilemediği görülmüştür.
- 13.** Sonikasyon parametrelerinin, akustik güç ve frekans aralığının, hidroliz reaksiyonu üzerindeki etkileri incelendiğinde; akustik gücün susam küspesi proteininin hidrolizi için reaksiyon hızını artırıcı bir etkisinin olmadığı, frekans değerinin arttırılması 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 8.3’de susam küspesi proteininin hidroliz ve çözünlüğü için zamana karşı elde edilen tüm

deneysel veriler analiz edilmiş; ve hidroliz ile çözünürlük kinetiğinin aşağıda verilen eksponansiyel denklem (Eşitlik 8.5) ile ifade edilebileceği bulunmuştur.

$$\frac{dX}{dt} = a \cdot \exp(-b \cdot X) \quad (8.5)$$

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 22.29, çözünürlük için 4.52 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; Apar and Özbek, 2008). 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 değeri için farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

15. Bölüm 8.3'de elde edilen veriler için; hidroliz derecesi ve çözünürlük arasındaki ilişki ayrıca incelenmiş ve gerçekleştirilen tüm deneyler için aşağıda verilen genel bağıntının (Eşitlik 8.6) kullanılabileceği bulunmuştur;

$$X_{HD} = 0.3048 \cdot X_{pç} + 0.0107 \quad (8.6)$$

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,

gluteninin Alcalase ile hidrolizi için Apar ve Özbek (2008) tarafından da bildirilmiştir.

16. Enzim inaktivasyon kinetiğini belirleyebilmek amacı ile Bölüm 8.3'te zamana karşılık elde edilen enzim aktivite verileri analiz edilmiş; substrat, enzim başlangıç konsantrasyonu ve pH deneylerinin tümü ile, 45-55°C sıcaklık 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 8.7) uyduğu belirlenmiştir.

$$A = (100 - \gamma)\exp(-k_D.t) + \gamma \quad (8.7)$$

Diğer yandan, 55°C sıcaklık değerinin üzerinde gerçekleştirilen deneyler için yapılan modelleme çalışmaları sonucunda elde edilen verilerin ikinci mertebe inaktivasyon kinetiğine (Eşitlik 8.8) uyduğu belirlenmiştir. İnaktivasyon kinetiğindeki bu kayma, belirli bir sıcaklık değerinin üzerine çıkıldığında protein yapısında meydana gelen deformasyonlar sonucunda enzimin stabilitesini koruyamaması, dolayısı ile inaktivasyon hızında meydana gelen artış ile açıklanabilir.

$$1/A = 1/A_0 + k.t \quad (8.8)$$

17. Alcalase enzimi için inaktivasyon enerjisi 45-55°C sıcaklık aralığı için, 25.54 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. Susam küspesi proteininin Alcalase enzimi ile hidroliz kinetiğinin Michaelis-Menten kinetiğine uygunluğunu incelemek amacıyla, gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları için başlangıç hızları hidroliz değeri (meqv/L) verileri kullanılarak

hesaplanmıştır. Hidroliz değeri verileri kullanıldığında kinetik parametreler; $K_m = 41.17 \text{ g/L}$, $V_{max} = 9.24 \text{ meqV/L.dak}$ olarak hesaplanmıştır.

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. Susam küspesi proteininin 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 $K_i = \% 38.24$ (hidrolizat hacmi/reaksiyon çözeltisi hacmi) olarak hesaplanmıştır.
22. Susam küspesi proteininin hidrolizatlarının fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, gerçekleştirilen deneyler sonucunda, su tutma kapasitesinin hidroliz derecesinin artışı ile arttığı görülmektedir. Susam küspesi protein hidrolizatları doğal proteinden daha yüksek su tutma kapasitesine sahiptir. Su tutma kapasitesinde artan hidroliz derecesi ile gözlemlenen artış, enzimatik hidroliz esnasında $-\text{COOH}$ ve $-\text{NH}_2$ gibi polar grupların sayısının artışına bağlı olabilir.
Susam küspesi protein hidrolizatları için doğal proteinden daha yüksek yağ tutma kapasitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Enzimatik hidroliz hidrofobik yüzeyi ve protein molekülünün esnekliğini arttırdığından dolayı proteinlerin yağ tutma kapasitesini geliştirebilmektedir.
Susam küspesi hidrolizatlarının, susam küspesi proteininden daha yüksek köpük kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Enzimatik hidroliz köpük kapasitesini geliştirmesine rağmen köpük stabilitesinde azalmaya yol açmıştır.

Emülsiyon kapasitesi açısından hidrolizatların protein daha iyi bir emülgatör olduğu görülmektedir. Bu durum, gıdalarda hem su hem de yağ ile etkileşebilen yüklü amino asitlerin varlığından kaynaklanabilir.

Sonuç olarak;

- Hidroliz işleminin verimi, kullanılan enzim ve substrat miktarına, proses şartlarına bağlı olarak değişmektedir. Gerçekleştirilen deneysel çalışmalar sonucunda, susam küspesi proteininin Alcalase enzimi ile hidrolizi sonucu, % hidroliz derecesi ve çözünen protein miktarını maksimize edebilmek için optimum proses şartları belirlenmiştir.
- Belirlenen optimum reaksiyon şartlarında; 15 g protein/L substrat konsantrasyonu, % 0.30 (hacim/hacim) enzim miktarı, 50°C sıcaklık, pH 8.5, 120 dakika süreyle gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu sonucunda; % 26.3 hidroliz derecesi ve % 82.1 protein çözünürlüğü elde edilmiş ve enzimin aktivitesini % 56 oranında kaybettiği saptanmıştır.
- Proses parametrelerinin optimizasyonunun 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, susam küspesi proteini hidroliz kinetiği için teorik ve bilimsel açıdan literatüre katkıda bulunulmuştur.
- Enzimatik hidroliz sonucunda susam küspesi protein hidrolizatlarının fonksiyonel özellikleri iyileştirilmiştir. Gıda sanayi atığı olan susam küspesinin enzimatik hidrolizi sonucunda oluşan Susam küspesi protein hidrolizatlarının sahip olduğu fonksiyonel karakteristikleri, bu hidrolizatların endüstriyel gıda uygulamalarında doğal katkı olarak kullanımına olanak sağlamaktadır.
- Sonuç olarak, protein hidrolizatlarının eldesi için susam yerine gıda atığı olan susam küspesinin, daha iyi fonksiyonel özelliklere sahip olmasından dolayı kullanımını tercih edilmelidir.

Bundan sonraki çalışmalarda, protein hidrolizi ile ilgili proses veriminin arttırılabilmesi ve enzim stabilitesinin mümkün olduğu kadar korunabilmesi için,

- Farklı kaynaklı proteaz enzimleri,
- İmmobilize edilmiş proteaz enzimleri,
- Enzim stabilitesini sağlayan diğer katkı maddeleri,
- Farklı reaktör tipleri (membran reaktörler veya kombine reaktör sistemleri),
- Substrat olarak protein içeren farklı gıda atıkları vb.

incelenebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Giese, J., (1994). "Proteins as Ingredients: Types, Functions, Applications", *Food Technology*, 48(10): 50-60.
- [2] Schmidl, M.K., Taylor, S.L. ve Nordlee, J.A., (1994). "Use of Hydrolysate Based Products in Special Medical Diets", *Food Technology*, 48(10): 77-85.
- [3] Frokjaer, S., (1994). "Use of Hydrolysates for Protein Supplementation", *Food Technology*, 48(10): 86-88.
- [4] Clemente, A., (2000). "Enzymatic Protein Hydrolysates in Human Nutrition", *Food Science and Technology*, 11: 254-262.
- [5] Kim, J.M., Whang, J.H., Kim, K.M., Koh, J.H. ve Suh, H.J., (2004). "Preparation of Corn Gluten Hydrolysate with Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Activity and Its Solubility and Moisture Sorption", *Process Biochemistry* 39: 989-994.
- [6] Karamac, M., Amarowicz, C. ve Kostyra, H., (2002). "Effect of Temperature and Enzyme/Substrate Ratio on the Hydrolysis of Pea Protein Isolates by Trypsin", *Czech Journal of Food Science*, 20 (1): 1-6.
- [7] Adler-Nissen, J., (1976). "Enzymatic Hydrolysis of Proteins for Increased Solubility", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24: 1090-1093.
- [8] Adler-Nissen, J., (1986). *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*, Elsevier Applied Science Publishers, London and New York.
- [9] Drago, S.R. ve Gonzalez, R.J., (2001). "Foaming Properties of Enzymatically Hydrolysed Wheat Gluten", *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1: 269-273.
- [10] Friedman, M., (1996). "Nutritional Value of Proteins from Different Food Sources", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 6-29.
- [11] Adler Nissen, J., (1978). "Hydrolysis of Soy Protein", US Patent 4,100,024.
- [12] Adler Nissen, J., (1978). "Enzymatic Hydrolysis of Soy Protein for Nutritional Fortification of Low pH Food", *Annals of Nutrition and Alimentation*, 32: 205-216.

- [13] Constantinides, A. ve 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.
- [14] Don, L.S.B., Pilosof, A.M.R. ve 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.
- [15] Achouri, A., Zhang, W. ve 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.
- [16] Wu, W.U., Hettiarachchy, N.S. ve 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.
- [17] Lee, J.Y., Lee, H.D. ve Lee, C.H., (2001). "Characterization of Hydrolysates Produced by Mild Asid Treatment and Enzymatic Hydrolysis of Defatted Soybean Flour", *Food Research International*, 34: 217-222.
- [18] Jung, S., Roussel-Philippe, C., Briggs, J.L., Murphy, P.A. ve Johnson, L.A., (2004). "Limited Hydrolysis of Soy Proteins with Endo- and Exoproteases", *Journal of the American Oil Chemists Society*, 81(10): 953-960.
- [19] Surowka, K. ve Zmudzinski, D., (2004). "Functional Properties Modification of Extruded Soy Protein Concentrate Using Neutrased", *Czech Journal of Food Sciences*, 22(5): 163-174.
- [20] Chiang, W.D., Tsou, M.J., Tsai, Z.Y. ve 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.
- [21] Lamsal, B.P., Reitmeier, C., Murphy, P.A. ve 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.
- [22] Lamsal, B.P., Jung, S. ve Johnson, L.A., (2007). "Rheological Properties of Soy Protein Hydrolysates Obtained from Limited Enzymatic Hydrolysis", *LWT*, 40: 1215-1223.
- [23] Moreno, M.M.C. ve Cuadrado, F.V., (1993). "Enzymatic Hydrolysis of Vegetable Proteins: Mechanism and Kinetics", *Process Biochemistry* 28: 481-490.
- [24] Karamac, M., Amarowicz, R., Kostyra, H. ve Sijtsma, L., (1998). "Hydrolysis of Pea Protein Isolate 'Pisane' By Trypsin", *Nahrung*, 42: 219.
- [25] Periago, J.M., Vidal, L.M., Ros, G., Rincon, F., Martinez, C., Lopez, G., Rodrigo, J. ve Martinez, I., (1998). "Influence of Enzymatic Treatment on the Nutritional and Functional Properties of Pea Flour", *Food Chemistry*, 1(63): 71-78.
- [26] Soral-Smietana, M., Swigon, R., Amarowicz, R. ve Sijtsma, L., (1998). "Solubility of Trypsin Pea Protein Hydrolysates", *Nahrung*, 42: 217-218.

- [27] Sijtsma, L., Tezera, D., Hustinx, J. ve Vereijken, J.M., (1998). "Improvement of Pea Protein Quality by Enzymatic Modification", *Nahrung*, 42: 215-216.
- [28] Soral-Smietana, M., Amarowicz, R., Swigon, A. ve Sijtsma, L., (1999). "Comparition of Solubility of Pea Protein Hydrolysate by Three Analytical Methods", *International Journal of Food Science and Nutrition*, 50: 407-411.
- [29] Marquez, M.C. ve Fernandez, V., (2002). "pH Stat Method to Evaluate the Heat Inactivation of Subtilisin Inhibitor in Legumes", *Chemical and Biochemical Engineering*, 16(1): 31-35.
- [30] Raymundo, A., Empis, J. ve Sousa, I., (1998). "White Lupin Protein Isolate as a Foaming Agent", *Food Research and Technology*, 207(2): 91-96.
- [31] Lqari, H., Pedroche, J., Giron-Calle, J., Vioque, J. ve Millan, F., (2005). "Production of *Lupinus Angustifolius* Protein Hydrolysates with Improved Functional Properties", *Grasas y Aceites*, 56(2): 135-140.
- [32] Bombara, N., Anon, M.C. ve Pilosof, A.M.R., (1997). "Functional Properties of Protease Modified Wheat Flours", *Lebensm.-Wiss. u-Technol*, 30: 441-447.
- [33] Nouri, L., Legrand, J., Popineau, Y. ve 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.
- [34] Popineau, Y., Huchet, B., Larre, C. ve 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.
- [35] Wang, J., Zhao, M., Yang, X. ve Jiang, Y., (2006). "Improvement on Functional Properties of Wheat Gluten by Enzymatic Hydrolysis and Ultrafiltration", *Journal of Cereal Science*, 44: 93-100.
- [36] Kong, X., Zhou, H. ve Qian, H., (2007). "Enzymatic Preparation and Functional Properties of Wheat Gluten Hydrolysates", *Food Chemistry*, 101: 615-620.
- [37] Kong, X., Zhou, H. ve Qian, H., (2007). "Enzymatic Hydrolysis of Wheat Gluten by Proteases and Properties of the Resulting Hydrolysates", *Food Chemistry*, 102: 759-763.
- [38] Wang, J.S., Zhao M.M., Zhao Q.Z., Bao Y. ve Jiang Y.M., (2007). "Characterization of Hydrolysates Derived from Enzymatic Hydrolysis of Wheat Gluten", *Journal of Food Science*, 72(2): 103-107.
- [39] Wang, J.S., Zhao, M.M., Zhao, Q.Z. ve Jiang, Y.M., (2007). "Antioxidant Properties of Papain Hydrolysates of Wheat Gluten in Different Oxidation Systems", *Food Chemistry*, 101: 1658–1663.
- [40] Sreedevi, S., ve Sivasankar, B., (2009). "Emulsifying properties of sesame seed protein hydrolyzates", *Asian Journal of Chemistry*, 21(2): 1131-1136.
- [41] Uğurluay, S., (2002). Susam (*Sesamum Indicum* L.) bitkisinin hasat mekanizasyonu olanaklarının belirlenmesi üzerinde bir araştırma, Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

- [42] Escamilla-Silva, E.M., Guzman-Maldonado, S.H., Cano-Medinal, A. ve Gonzalez-Alatorre, G., (2003). "Simplified process for the production of sesame protein concentrate. Differential scanning calorimetry and nutritional, physicochemical and functional properties", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 972-979.
- [43] Toshihiko Osawa, A., Keiko Nagai, O. ve Kyoko Shibuya, N., 1999. Protein composition derived from sesame seed and use thereof. US Patent 5,993,795.
- [44] Bandyopadhyay, K. ve Ghosh, S., (2002). "Preparation and characterization of papain-modified sesame (*Sesamum indicum* L.) protein isolates", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6854-6857.
- [45] Inyang, U.E. ve Iduh, A.O., (1996). "Influence of pH and salt concentration on protein solubility, emulsifying and foaming properties of sesame protein concentrate", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(12): 1663-1667.
- [46] Radha, C., Kumar, P.R. ve Prakash, V., (2008). "Preparation and characterization of a protein hydrolysate from an oilseed flour mixture", *Food Chemistry*, 106(3): 1166-1174.
- [47] Adler-Nissen, J., (1993). Proteases. In *Enzymes in food processing*, Nagodawithana, T., Reed, G., Eds., Academic Press, San Diego, 159-203.
- [48] Van der Ven, C., (2002). "Biochemical and Functional Characterisation of Casein and Whey Protein Hydrolysates", Ph.D. Thesis, Wageningen University, The Netherlands.
- [49] Sathe, S.K., (2002). "Dry Bean Protein Functionality", *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(2): 175-223.
- [50] Larkins, B. A., Lending, C.R. ve Wallace, J.C., (1993). "Modification of Maize-Seed-Protein Quality", *The American Journal of Clinical Nutrition*, 58: 264S-269S.
- [51] Shewry, P.R. ve 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.
- [52] Lastity, R., (1984). *The Chemistry of cereal proteins*, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- [53] Osborne, T.B., (1924). *The Vegetable Proteins*, 2nd edn, Longmans Green and Co., London.
- [54] 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.
- [55] Shewry, P.R., Beaudoin, F., Jenkins, J., Griffiths-Jones, S. ve Mills, E.N.C., (2002). "Plant Protein Families and Their Relationships to Food Allergy", *Biochemical Society Transactions*, 30: 906-910.
- [56] Bozkurt, G., (2006). Susam yağının antioksidan özellikteki başlıca bileşenlerinin nitelik ve nicelikleri üzerine araştırmalar, Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

- [57] Tan, A.S. ve Kaya, G., (2001). Susam, Sanayi Bitkileri Alt Komisyon Raporu, Ankara
- [58] Uzun, B., (1997). Susamda verim, verim komponentleri ve yağ miktarının varyasyonu ve verimle ilişkili özellikler, Yüksek lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- [59] Fıratlıgil-Durmuş, E. ve Evranuz, Ö., (2010). Kırmızıbiber tohumunu ve proteininin çözünürlük ve emülsiyon özellikleri”, İtü Dergisi, 9(4): 33-44.
- [60] Mahajan, A., Dua, S. ve Bhardwaj, S., (2002). “Simple physical treatment as an effective tool to improve the functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* var. *toria*) and sesame seed (*Sesamum indicum*) meals”, International Journal of Food Sciences and Nutrition, 53: 455–463.
- [61] Guan, X., Yao, H., Chen, Z., Shan, L. ve Zhang, M., (2007). “Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by trypsin”, Food Chemistry, 101: 163-170.
- [62] Yin, S.W., Tang, C.H., Cao, J.S., Hu, E.K., Wen, Q.B. ve Yang, X.Q., (2008). “Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate”, Food Chemistry, 106: 1004-1013.
- [63] Kamara, M.T., Amadou, I., Tarawalie, F. ve Huiming, Z., (2010). “Effect of enzymatic hydrolysis on the functional properties of foxtail millet (*Setaria italica* L.) proteins”, International Journal of Food Science and Technology, 45: 1175–1183.
- [64] Damodaran, S., (2007). “Amino acids, Peptides and Proteins”, Fennema’s Food Chemistry, 4th ed. (Editör: Damodaran, S., Parkin, K. L. And Fennema, O. R.) CRC Press, New York, 217-331.
- [65] Boduş, G., (2010). “Mercimek proteini konsantresi ve hidrolizatının bazı fonksiyonel ve biyoaktif özelliklerinin incelenmesi”, Yüksek lisans tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin.
- [66] Saldamlı, İ. ve Temiz, A., (1998). “Gıda Kimyası”, Hacettepe Üni. Yayınları, Ankara.
- [67] Taha, F.S ve Ibrahim, M.A., (2002). “Effect of degree of hydrolysis on the functional properties of some oilseed proteins”. *Grasas y Aceites*, 53(3): 273-281.
- [68] Tokatlı, M., (2007). Kuşburnu Proteinlerinin Bazı Kimyasal ve Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek lisans tezi, Gaziantep Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep.
- [69] Makrı, E., Papalamprou, E. ve Doxastakis, G., (2005). “Study of Functional Properties of Seed Storage Proteins from Indigenous European Legume Crops (Lupine, Pea, Broad Bean) in Admixture with Polysaccharides”, *Food Hydrocolloids*, 19: 583-594.
- [70] Kinsella, J. E., (1976). “Functional properties of proteins in foods: A survey”, *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 7(3): 219-280.
- [71] Vioque, J., Sanchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J. ve Millan, F., (2000). “Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties”, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(4): 447-450.

- [72] Mahmoud, M.I., (1994). "Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products", *Food Technology*, 48(10): 89-95.
- [73] Subagio, A., (2006). "Characterization of Hyacinth Bean (*lablab purpureus* L. Sweet) Seeds from Indonesia and Their Protein Isolate", *Food Chemistry*, 95: 65-70.
- [74] Cameron, D.R., Weber, M.E., Idziak, E.S., Neufeld, R.J. ve Cooper, D.G., (1991). "Determination of Interfacial Areas in Emulsions Using Turbidimetric and Droplet Size Data: Correction of the Formula for Emulsifying Activity Index", *Journal of Agricultural of Food Chemistry*, 39: 655-659.
- [75] Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S ve Deshpande, V.V., (1998). "Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 597-635.
- [76] Baeza, G., Correa, D. ve Salas, C., (1990). "Proteolytic Enzymes in *Carica Candamarcensis*", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 51(1): 1-9.
- [77] Hemavathi, A.B., Hebbar, H.U. ve Raghavarao, K.S.M.S., (2007). "Reverse micellar extraction of bromelain from *Ananas comosus* L. Merryl", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82: 985-992.
- [78] Klomkiao, S., Kishimura, H., Yabe, M. ve 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.
- [79] Pedersen B., (1994). "Removing Bitterness From Protein Hydrolysates", *Food Technology*, 48(10): 96-98.
- [80] Cano-Medina, A., Jiménez-Islas, H., Dendooven, L., Herrera, R.P., González-Alatorre, G. ve Escamilla-Silva, E.M., (2011). "Emulsifying and foaming capacity and emulsion and foam stability of sesame protein concentrates", *Food Research International*, 44: 684-692.
- [81] Onsaard, E., Pomsamud, P. ve Audtum, P., (2010). "Functional properties of sesame protein concentrates from sesame meal", *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 3(04): 420-431.
- [82] Kanu, P.J., Kanu, J.B., Sandy, E.H., Kandeh, J.B.A., Mornya, P.M.P. ve Huiming, Z., (2009). "Optimization of enzymatic hydrolysis of defatted sesame flour by different proteases and their effect on the functional properties of the resulting protein hydrolysate", *American Journal of Food Technology*, 4(6): 226-240.
- [83] Sreedevi, S., Balasubramanian, V. ve Sivasankar, B., (2009). "Foaming properties of sesame seed protein hydrolyzates", *Asian Journal of Chemistry*, 21(2): 1547-1551.
- [84] Kanu, P.J., Kerui, Z., Hui Ming, Z., Haifeng, Q., Kanu, J.B. ve Kexue, Z., (2007). "Sesame protein 11: Functional Properties of sesame (*Sesamum indicum* L.) protein isolate as influenced by pH, temperature, time and ratio of flour to water during its production", *Asian Journal Biochemistry*, 2(5): 289-301.

- [85] Khalid, E.K., Babiker, E.E. ve El Tinay, A.H., (2003). "Solubility and functional properties of sesame seed proteins as influenced by pH and/or salt concentration". *Food Chemistry*, 82(3): 361-366.
- [86] Taha, F.S., Ibrahim, M.A. ve El-Zanaty, E.A., (2002). "Optimum conditions for enzymatic degradation of some oilseed proteins", *Grasas y Aceites*, 53(3): 267-272.
- [87] Perez, C. ve Saad, R., (1984). "Enzymatic modification of proteins of commercial sesame meals", *Archivos Latinoamericanos De Nutrition*, 34(4): 735-748.
- [88] Jacobsen, C.F., Leonis, J., Linderstrom-Lang, K. ve Ottesen, M., (1957). "The pH-Stat and Its Use in Biochemistry", *Methods of Biochemical Analysis*, 4: 171-210.
- [89] Okuyama, T. ve Satake, K., (1960). "On the Preparation and Properties of 2,4,6-Trinitrophenyl-Amino Acids and Peptides", *Journal of Biochemistry*, 47: 454-466.
- [90] Satake, K., Okuyama, T., Ohashi, M. ve Shinoda, T., (1960). "The Spectrophotometric Determination of Amine, Amino Acid and Peptide with 2, 4, 6-Trinitrobenzene 1-Sulfonic Acid", *Journal of Biochemistry*, 47: 654-660.
- [91] Adler-Niessen, J., (1979). "Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid", *Agricultural Food Chemistry*, 27: 1256-1262.
- [92] Nielsen, P.M., Peterson, D. ve Dambmann, C., (2001). "Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis", *Journal of Food Science*, 66: 642-646.
- [93] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. ve Randall, R.J., (1951). "Protein Measurement with Folin Phenol Reagent", *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- [94] Tomarelli, R., Charney, M. ve 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.
- [95] Sarath, G., De La Motte, R. ve Wagner, F.W., (1989). *Proteolytic Enzymes, A Practical Approach, Protease Assay Methods*. In: Beynon R.J., Bond J.S., editors. Oxford, UK: IRL Press.
- [96] Aikat, K. ve 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.
- [97] Ferreira, L., Ramos, M. A., Dordick, J. S. ve 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.
- [98] Barros, R.M. ve Malcata, F.X., (2004). "A Kinetic Model for Hydrolysis of Whey Proteins by Cardosin A Extracted From *Cynara Cardunculus*", *Food Chemistry*, 88: 351-359.
- [99] Novozymes' Analytical method, EB-SM-0348.02/01.

- [100] Bradford, M.M., (1976). "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities Utilizing the Principle of Protein Dye Binding", *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- [101] Chabanon, G., Chevalot, I., Framboisier, X., Chenu, S. ve Marc, I., (2007). "Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates". *Process Biochemistry*, 42, 1419–1428.
- [102] Pearce, K.N. ve Kinsella, J.E., (1978). "Emulsifying properties of protein: evaluation of a turbidimetric technique", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26: 716-723.
- [103] Levenberg, K., (1944). "A Method for the Solution of Certain Non-Linear Problems in Least Squares", *Quarterly of Applied Mathematics*, 2: 164-168.
- [104] Marquardt, D., (1963). "An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters" *SIAM Journal of Applied Mathematics*, 11: 431-441.
- [105] Dzwolak, W. ve Ziajka, S., (1999). "Enzymatic Hydrolysis of Milk Proteins under Alkaline and Acidic Conditions", *Journal of Food Science*, 64(3): 393–395.
- [106] Camacho, F., Gonzalez-Tello, P., Paez-Duenas, M.P.N., Guadix, E.M. ve Guadix, A., (2001). "Correlation of Base Consumption with the Degree of Hydrolysis in Enzymic Protein Hydrolysis", *Journal of Dairy Research*, 68: 251-265.
- [107] Steinhardt, J. ve 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.
- [108] Constantinides, A. ve 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.
- [109] Apar, D.K. ve Ozbek, B., (2008). "Corn gluten hydrolysis by Alcalase: Effects of process parameters on hydrolysis, solubilisation and enzyme inactivation", *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 22(2): 203-212.
- [110] Ophart, C.E., Virtual Chembook, Denaturation of Proteins, <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/568denaturation.html>, 10 Ocak 2012.
- [111] Mondal, K., Roy, I. ve 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.
- [112] Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Zang, X., Li, H. ve Gao, M., (2006). "The Effect of Microwave Irradiation on Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw", *Bioresource Technology*, 97: 1964-1968.
- [113] Vulfson, E.N., Sarney, B.D. ve Law, B.A., (1991). "Enhancement of Subtilisin Catalysed Interesterification in Organic Solvents by Ultrasonic Irradiation", *Enzyme and Microbial Technology*, 13: 123-126.

- [114] Sakakibara, M., Wang, D., Takahashi, R., Takahashi, K. ve Mori, S., (1996). "Influence of Ultrasound Irradiation on Hydrolysis of Sucrose Catalyzed by Invertase", *Enzyme and Microbial Technology*, 18(1): 444-448.
- [115] Ramachandran, K., Al-Zuhair, S., Fong, C.S. ve Gak, C.W., (2006). "Kinetic Study on Hydrolysis of Oils by Lipase with Ultrasonic Emulsification", *Biochemical Engineering Journal*, 32(1): 19-24.
- [116] Şener, N., Apar, D.K. ve Özbek, B., (2006). "A Modelling Study on Milk Lactose Hydrolysis and Beta-Galactosidase Stability under Sonication", *Process Biochemistry*, 41(7): 1493-1500.
- [117] O'Meara, G.M. ve 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", *Biotechnology and Bioengineering*, 27: 861-869.
- [118] Sousa, R., Lopes, G.P., Tardioli, P.W., Giordano, R.L.C., Almeida, P.I.F. ve Giordano, R.C., (2004). "Kinetic Model for Whey Protein Hydrolysis by Alcalase Multipoint-Immobilized on Agrose Gel Particles", *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2: 147-153.
- [119] Tardioli, P.W., Sousa, R., Giordano, R.C. ve Giordano, R.L.C., (2005). "Kinetic Model of Hydrolysis of Polypeptides Catalyzed by Alcalase Immobilized on 10 % Glyoxyl-Agarose", *Enzyme and Microbial Technology*, 36: 555-564.
- [120] Margot, A., Flaschel, E. ve Renken, A., (1997). "Empirical Kinetic Models for Tryptic Whey Protein Hydrolysis", *Process Biochemistry*, 32: 217-223.
- [121] Moreno, M.M.C. ve Cuadrado, F.V. (1993). "Enzymatic Hydrolysis of Vegetable Proteins: Mechanism and Kinetics", *Process Biochemistry*, 28: 481-490.
- [122] Gonzalez-Tello, P., Camacho, F., Jurado, E., Paez, M.P. ve Guadix, E.M., (1994). "Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins: I. Kinetic Models", *Biotechnology and Bioengineering*, 44: 523-528.
- [123] Marquez, M.C. ve Vazquez, M.A., (1999). "Modelling of Enzymatic Protein Hydrolysis", *Process Biochemistry*, 35: 111-117.
- [124] Chen, D.H., Chen, H.H. ve Huang, T.C., (1995). "Deactivation Kinetics of Yeast Alcohol Dehydrogenase in Aerosol OT/Isooctane Reverse Micelles", *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 28: 551-555.
- [125] Colombie, S., Gaunand, A. ve Lindet, B., (2001). "Lysozyme Inactivation and Aggregation in Stirred-Reactor", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11: 559-565.
- [126] Marin-Zamora, M.E., Rojas-Melgarejo, F., Garcia-Canovas, F. ve 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.
- [127] Fadiloğlu, S., Erkmen, O. ve Şekeroğlu, G., (2006). "Thermal Inactivation Kinetics of Alkaline Phosphatase in Buffer and Milk", *Journal of Food Processing and Preservation*, 30: 258-268.

- [128] Sadana, A. ve Henley, J., (1987). "Single-Step Unimolecular Non-1st-Order Enzyme Deactivation Kinetics", *Biotechnology and Bioengineering*, 30(6): 717-723.
- [129] Schokker, E.P. ve 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", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1681-1686.
- [130] Özbek, B. ve Ülgen, K., (2000). "The Stability of Enzymes After Sonication", *Process Biochemistry*, 35(9): 1037-43.
- [131] Ladero, M., Ruiz, G., Pessela, B.C.C., Vian, A., Santos, A. ve 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.
- [132] Montgomery, R., Conway, T., Spector, A. ve Chappell, D., (1996). *Biochemistry*, Mosby-Year Book Inc., St. Louis.
- [133] Bisswanger, H., (2002). *Enzyme Kinetics*, Wiley-VCH, Weinheim.
- [134] Bailey, J.E. ve Ollis, D.F., (1987). *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill, New York.
- [135] Kuchel, P.W. ve Ralston, G.B., (1988). *Theory and Problems of Biochemistry*, McGraw-Hill, New York.
- [136] Segel, I.H., (1993). *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems*, Wiley, New York.
- [137] Telefoncu, A., (Editör) (1997). *Enzimoloji: Uslan, H.A., Enzim Kinetiği*, Ege Üniversitesi yayınları, İzmir.
- [138] Ragab, D.M., Babiker, E.E. ve Eltinay, A.H., (2004). "Fractionation, solubility and functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) proteins as affected by pH and/or salt concentration", *Food Chemistry*, 84: 207–212.
- [139] Wasswa, J., Tang, J., Gub, X.H. ve Yuan, X., (2007). "Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin", *Food Chemistry* 104: 1698–1704.
- [140] Balti, R., Bougatef, A., Ali, N.E., Zekri, D., Barkia, A. ve Nasri, M., (2010). "Influence of degree of hydrolysis on functional properties and angiotensin I-converting enzyme-inhibitory activity of protein hydrolysates from cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-products". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 2006-2014.
- [141] Aletor, O., Oshodi, A.A. ve Ipinmoroti, K., (2002). "Chemical composition of common leafy vegetables and functional properties of their leaf protein concentrates", *Food Chemistry*, 78(1): 63–68.
- [142] Sinha, R., Radha, C., Prakash, J. ve Kaul, P., (2007). "Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation", *Food Chemistry*, 101(4): 1484-1491.

- [143] Fernandez-Quintela, A., Macarulla, M.T., Del Barrio, A.S. ve Martinez, J.A., (1997). "Composition and Functional Properties of Protein Isolates Obtained From Commercial Legumes Grown in Northern Spain", *Plant Foods for Human Nutrition*, 51: 331-342.
- [144] Kaur, M. ve Singh, N., (2007). "Characterization of Protein Isolates from Different Indian Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Cultivars", *Food Chemistry*, 102(1): 366-374.
- [145] Chandi, G.K. ve Sogi, D.S., (2007). "Functional Properties of Rice Bran Protein Concentrates", *Journal of Food Engineering*, 79(2): 592-597.
- [146] Martinez-Flores, H.E., Barrera, E.S., Garnica-Romo, M.G., Penagos, C.J.C., Saavedra, J.P. ve Macazaga-Alvarez, R., (2005). "Functional Characteristics of Flaxseed Protein Concentrate Obtained Applying Using Surface Response Methodology", *Journal of Food Science*, 71(8): C495-C498.
- [147] Tomotake, H., Shimaoka, I., Kayashita, J., Nakajoh, M. ve Kato, N., (2002). "Physicochemical and functional properties of buckwheat protein product", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7): 2125-2129.
- [148] Mahajan, A. ve Dua, S., (1998). "Role of enzymatic treatments in modifying the functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* var. toria) meal", *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 49(6): 435-440.
- [149] Pedroche, J., Yust, M.M., Lqari, H., Giron-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J. ve Millan, F., (2004). "*Brassica carinata* protein isolates: chemical composition, protein characterization and improvement of functional properties by protein hydrolysis", *Food Chemistry*, 88(3): 337-346.
- [150] Bandyopadhyay, K., Misra, G. ve Ghosh, S., (2008). "Preparation and characterisation of protein hydrolysates from Indian defatted rice bran meal", *Journal of Oleo Science*, 57(1) : 47-52.
- [151] Bilgi, B. ve Çelik, S., (2004). "Solubility and Emulsifying Properties of Barley Protein Concentrate", *European Food Research and Technology*, 218: 437-441.
- [152] Chove, B.E., Grandison, A.S. ve Lewis, M.J., (2002). "Emulsifying properties of soy protein isolates obtained by micro filtration", *Journal of the Science of Food Agriculture*, 82: 267-372.
- [153] Wu, W.U., Hettiarachchy, N.S. ve 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.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Elçin DEMİRHAN YILMAZ
Doğum Tarihi ve Yeri :21.04.1981 İstanbul
Yabancı Dili :İngilizce
E-posta :demirhan@yildiz.edu.tr

ÖĞRENİM DURUMU

| Derece | Alan | Okul/Üniversite | Mezuniyet Yılı |
|-----------|--------------------|----------------------------------|----------------|
| Y. Lisans | Kimya Mühendisliği | Yıldız Teknik Üniversitesi | 2007 |
| Lisans | Kimya Mühendisliği | Yıldız Teknik Üniversitesi | 2004 |
| Lise | Fen Bilimleri | Adnan Menderes Anadolu Lisesi | 1999 |

İŞ TECRÜBESİ

| Yıl | Firma/Kurum | Görevi |
|------------|---|------------------------|
| 2005-Halen | Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Metalurji Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü | Araştırma Görevlisi |

YAYINLARI

Makale

Uluslararası Makaleler

1. Demirhan, E., Apar (Kılıç), D. and Özbek (Kın), B., 2007, "Effect of Impeller Speed and Viscosity on Whey Lactose Hydrolysis and β -Galactosidase Stability", *Chemical Engineering Communications*, **194(8)**: 1078-1093.
2. Dadalı, G., Demirhan, E. and Özbek (Kın), B., 2007, "Microwave Heat Treatment of Spinach: Drying Kinetic and Effective Moisture Diffusivity ", *Drying Technology*, **25(10)**: 1703-1712.
3. Dadalı, G., Demirhan, E. and Özbek (Kın), B., 2007, "Colour Change Kinetics of Spinach Undergoing Microwave", *Drying Technology*, **25(10)**: 1713-1723.
4. Demirhan, E. Apar (Kılıç), D. and Özbek (Kın), B., 2008, "Product Inhibition of Whey Lactose Hydrolysis", *Chemical Engineering Communications*, **195(3)**: 293-304
5. Demirhan, E., Apar (Kılıç), D. and Özbek (Kın), B., 2008, "Effect of Hydrolysis Products and Mg^{+2} , Mn^{+2} and Ca^{+2} Ions on Whey Lactose Hydrolysis and β -Galactosidase Stability", *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **83(5)**: 625-636
6. Şener, N., Apar (Kılıç), D., Demirhan E. and Özbek (Kın), B., 2008, "Milk Lactose Hydrolysis in a Batch Reactor: Optimisation of Process Parameters, Kinetics of Hydrolysis and Enzyme Inactivation", *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, **22(2)**: 185-193
7. Dadalı, G., Demirhan, E. and Özbek (Kın), B., 2008, "Effect of Drying Conditions on Rehydration Kinetics of Microwave Dried Spinach", *Food and Bioproducts Processing*, **86(C4)**: 235-241.
8. Demirhan, E. and Özbek (Kın), B., 2009, "Colour Change Kinetics of Microwave Dried Basil", *Drying Technology*, **27(1)**: 156-166.
9. Demirhan, E. and Özbek (Kın), B., 2009, "A Modelling Study on Hydrolysis of Lactose Recovered from Whey and β -Galactosidase Stability under Sonic Treatment", *Chemical Engineering Communications*, **196(7)**: 767-787.

10. Apar (Kılıç) D., Demirhan E., Özbek (Kın), B. and Dadalı, G., 2009, "Rehydration Kinetics of Microwave Dried Okra as Affected by Drying Conditions", *Journal of Food Processing and Preservation*, **33(5)**: 618-634.
11. Demirhan E., Apar (Kılıç) D. and Özbek (Kın), B., 2010, "A modelling study on hydrolysis of whey lactose and stability of beta-galactosidase", *Korean Journal of Chemical Engineering*, **27(2)**: 536-545.
12. Demirhan E. and Özbek (Kın), B., 2010, "Microwave drying characteristics of basil" *Journal of Food Processing and Preservation*, **34(3)**: 476-494.
13. Demirhan E. and Özbek (Kın), B., 2010, "Rehydration kinetics of microwave dried basil" *Journal of Food Processing and Preservation*, **34(4)**: 664-680.
14. Demirhan, E. and Özbek (Kın), B., 2010, "Drying Kinetics and Effective Moisture Diffusivity of Purslane Undergoing Microwave Heat Treatment", *Korean Journal of Chemical Engineering*, **27(5)**: 1377-1383.
15. Demirhan E., Apar (Kılıç) D., and Özbek (Kın), B., 2011, " Sesame Cake Protein Hydrolysis by Alcalase: Effects of Process Parameters on Hydrolysis, Solubilization and Enzyme Inactivation", *Korean Journal of Chemical Engineering*, **28(1)**: 195-202.
16. Demirhan E., Apar (Kılıç) D., and Özbek (Kın), B., 2011 "A Kinetic Study on Sesame Cake Protein Hydrolysis By Alcalase", *Journal of Food Science*, **76(1)**: C64-C67.
17. Demirhan E. and Özbek (Kın), B., 2011, "Thin-Layer Drying Characteristics and Modelling of Celery Leaves Undergoing Microwave Treatment", *Chemical Engineering Communications*, **198(7)**: 957-975.
18. Demirhan E. and Özbek (Kın), B., 2011, "Colour Change Kinetics of Celery Leaves Undergoing Microwave Heating", *Chemical Engineering Communications*, **198(10)**: 1189-1205.
19. Demirhan, E., Apar (Kılıç), D., Payer, G. and Özbek (Kın), B., 2011, "A modelling study on kefir grain biomass growth: Influence of various minerals" *International Journal of Dairy Technology*, **64(3)**: 402-407.

20.Akgül, F.B., Demirhan, E., Apar, D.K. and Özbek (Kın), B., 2012, “Investigation of Skimmed Milk Lactose Hydrolysis and β -Galactosidase Stability in Various Reactor Types”, *International Journal of Dairy Technology*, (Baskı aşamasında)

Ulusal Makaleler

1.Demirhan E., Apar (Kılıç) D., and Özbek (Kın), B., 2012, “pH-Stat Calibration For Sesame Cake Protein Hydrolysis By Alcalase”, *SİGMA-Journal of Engineering and Natural Sciences-Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, SİGMA-694, kabul edildi, (Baskı aşamasında).

Bildiri

Uluslararası Bildiriler

- 1. Dadalı G., Apar (Kılıç), D., Demirhan E. and Özbek (Kın), B., 2006,** “Colour Change Kinetics of Okra and Spinach During Microwave Drying”, *17th International Congress of chemical and process engineering (CHISA 2006)*, 27-31 August 2006, Prague, Czech Republic, Summaries 4-System Engineering, P5.146, pp. 1407.
- 2. Dadalı G., Apar (Kılıç), D., Demirhan E. and Özbek (Kın), B., 2006,** “Microwave Drying Kinetics of Okra and Spinach”, *17th International Congress of chemical and process engineering (CHISA 2006)*, 27-31 August 2006, Prague, Czech Republic, Summaries 4-System Engineering, P5.147, pp. 1408.
- 3. Dadalı G., Apar (Kılıç), D., Demirhan E. and Özbek (Kın), B., 2006,** “Rehydration Kinetics of Okra and Spinach During Microwave Drying”, *17th International Congress of chemical and process engineering (CHISA 2006)*, 27-31 August 2006, Prague, Czech Republic, Summaries 4-System Engineering, P5.148, pp. 1409.
- 4. Demirhan E., Apar (Kılıç), D. and Özbek (Kın), B., 2006,** “Effect of Process Variables on Whey Lactose Hydrolysis and Enzyme Stability”, *6th European Symposium on Biochemical Engineering Science (ESBES-6)*, August 27-30, Salzburg, Austria, A4, pp. 130.
- 5. Demirhan E., Apar (Kılıç), D. and Özbek (Kın), B., 2006,** “Effect of Hydrolysis Products of Whey Lactose on Hydrolysis and Enzyme Stability”, *6th European Symposium on Biochemical Engineering Science (ESBES-6)*, August 27-30, Salzburg, Austria, A5, pp. 131.
- 6. Demirhan E., Apar (Kılıç), D. and Özbek (Kın), B., 2006,** “Influence of Mg^{+2} , Mn^{+2} and Ca^{+2} Ions on Whey Lactose Hydrolysis and Enzyme Stability”, *6th European Symposium on Biochemical Engineering Science (ESBES-6)*, August 27-30, Salzburg,

Austria, A6, pp. 132.

7. **Demirhan, E. and Özbek (Kın), B., 2007**, "Investigation of Whey Lactose Hydrolysis and Enzyme Stability by a Sonifier", *13th European Congress on Biotechnology (ECB-13)*, September 16-19, Barcelona, Spain, pp. 217.
8. **Demirhan, E. and Özbek (Kın), B., 2007**, "Effect of Glucose and Galactose on Whey Lactose Hydrolysis and Enzyme Stability Under Sonic Treatment", *13th European Congress on Biotechnology (ECB-13)*, September 16-19, Barcelona, Spain, pp. 217.
9. **Demirhan, E., Apar (Kılıç), D. and Özbek (Kın), B., 2007**, "Estimation of Kinetic Parameters for Whey Lactose Hydrolysis Inhibited by Glucose and Galactose", *13th European Congress on Biotechnology (ECB-13)*, September 16-19, Barcelona, Spain, pp. 218.
10. **Dadalı, G., Demirhan E., Apar (Kılıç), D. and Özbek (Kın), B., 2007**, "Porosity Analysis of Spinach and Okra Dried Under Microwave Treatment", *2nd International Congress on Food and Nutrition (ICFN-2)*, October 24-26, Istanbul, Turkey, pp. 229.
11. **Demirhan E. and Özbek (Kın), B., 2008**, "Microwave Drying Kinetics of Basil", *18th International Congress of chemical and process engineering (CHISA 2008)*, 24-28 August 2008, Prague, Czech Republic, Summaries 4-System Engineering, P5.215, pp. 1610.
12. **Demirhan E. and Özbek (Kın), B., 2008**, "Colour Change Kinetics of Basil During Microwave Drying", *18th International Congress of chemical and process engineering (CHISA 2008)*, 24-28 August 2008, Prague, Czech Republic, Summaries 4-System Engineering, P5.216, pp. 1611.
13. **Demirhan E. and Özbek (Kın), B., 2008**, "Rehydration Kinetics of Basil During Microwave Drying", *18th International Congress of chemical and process engineering (CHISA 2008)*, 24-28 August 2008, Prague, Czech Republic, Summaries 4-System Engineering, P5.217, pp. 1612.
14. **Derman, S., Demirhan, E., Akdetse, Z. and Özbek, B., 2008**, "Covalent Conjugation of β -Galactosidase Enzyme with Polyacrylic Acide", *International Enzyme Engineering Symposium (IEES'08)*, October 1-5, Kuşadası, Türkiye, AES02, pp. 75.

- 15. Derman, S., Demirhan, E., Akdetse, Z. and Özbek, B., 2008**, “Covalent Conjugation of β -Galactosidase Enzyme with Copolymers of Acrylic Acid and N-Vinylpyrrolidone-2”, International Enzyme Engineering Symposium (*IEES'08*), October 1-5, Kuşadası, Türkiye, AES03, pp. 76.
- 16. Demirhan E. and Özbek (Kın), B., 2010**, “Drying Kinetics of Celery Leaves Undergoing Microwave Heat Treatment”, *6th Chemical Engineering Conference for Collaborative Research in Eastern Mediterranean Country (EMCC-6)*, March 7-12, Antalya, Türkiye, pp.276.
- 17. Demirhan E. and Özbek (Kın), B., 2010**, “Colour Change Kinetics of Celery Leaves During Microwave Drying”, *6th Chemical Engineering Conference for Collaborative Research in Eastern Mediterranean Country (EMCC-6)*, March 7-12, Antalya, Türkiye, pp.277.
- 18. Demirhan E., Apar (Kılıç), D. and Özbek (Kın), B., 2010**, “Effect of Substrate and Enzyme Concentration on Sesame Cake Protein Hydrolysis and Alcalase Stability”, *8th European Symposium on Biochemical Engineering Science (ESBES-8)*, September 5-8, Bologna, Italy, A7_07.21, pp. 251.
- 19. Demirhan E., Apar (Kılıç), D. and Özbek (Kın), B., 2010**, “pH-Stat Calibration for Sesame Cake Protein Hydrolysis by Alcalase”, *8th European Symposium on Biochemical Engineering Science (ESBES-8)*, September 5-8, Bologna, Italy, A7_07.22, pp. 252.
- 20. Demirhan E., Apar (Kılıç), D. and Özbek (Kın), B., 2011**, “Influence of Temperature and pH on Sesame Cake Protein Hydrolysis and Alcalase Stability”, *1st European Congress of Applied Biotechnology (ECAB 2011)*, September 25-29, Berlin, Germany, P41.19.
- 21. Demirhan E., Apar (Kılıç), D. and Özbek (Kın), B., 2011**, “Product Inhibition of Sesame Cake Protein Hydrolysis”, *1st European Congress of Applied Biotechnology (ECAB 2011)*, September 25-29, Berlin, Germany, P41.20.
- 22. Akgül, F.B., Demirhan E., Apar (Kılıç), D. and Özbek (Kın), B., 2011**, “An Experimental Study on Skimmed Milk Lactose Hydrolysis in Various Reactor Types”, *1st European Congress of Applied Biotechnology (ECAB 2011)*, September 25-29, Berlin, Germany, P41.21.

23. **Demirhan E., Apar (Kılıç), D. and Özbek (Kın), B., 2011,** “Effect of Temperature and pH on Kinetics of Sesame Cake Hydrolysis”, *European Biotechnology Congress 2011*, September 28- October 1, Istanbul, Turkey, H6, pp. S81.
24. **Payer, G., Apar (Kılıç), D., Demirhan E. and Özbek (Kın), B., 2011,** “Experimental Study on the Effect of Mg²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺ and Fe³⁺ Ions on Kefir Grain Biomass Propagation”, *European Biotechnology Congress 2011*, September 28- October 1, Istanbul, Turkey, I11, pp. S93.
25. **Demirhan E., Apar (Kılıç), D., Yalçın, B.E., Gürses, B. and Özbek (Kın), B., 2011,** “An Experimental Study on the Influence of Cu²⁺, Mn²⁺ and PO₄³⁻ Ions on the Kefir Grain Biomass Increase”, *4th International Congress on Food and Nutrition*, October 12-14, Istanbul, Turkey, P-105, pp. 157.
26. **Demirhan E., Apar (Kılıç), D., Akpınar, Z. and Özbek (Kın), B., 2011,** “The Effect of Microwave Drying on the Degradation of Vitamin C in Basil, Purslane and Celery Leaves”, *4th International Congress on Food and Nutrition*, October 12-14, Istanbul, Turkey, P-190, pp. 198.

Ulusal Bilidiriler

1. **Demirhan, E., Şener, N., Apar (Kılıç), D., Özbek (Kın), B., 2007,** “Sonikasyon Parametrelerinin Sütteki Laktoz ve Peynir Altı Suyundan Elde Edilen Laktozun Hidrolizi Ve Enzim Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi” *15. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi (Biyoteknoloji 2007)*, 28-31 Ekim, Antalya, pp. 50

Proje

1. **“Gıdaların Mikrodalga Tekniği ile Kullanılarak Kurutulması, Doku ve Renk Özelliklerinin İncelenmesi ve Modellenmesi”** Görevi proje ekibinde yer almak. Destekleyen kuruluş; Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü. (Eylül 2004 – Temmuz 2007).
2. **“Çeşitli Absorbentlere Protein Adsorpsiyonunun İncelenmesi”** Görevi proje ekibinde yer almak. Destekleyen kuruluş; Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü. (Eylül 2011 – Halen devam ediyor).
3. **“Yapay Substratlarla Kefir Biyokütlesi Üretimi ve Kefir Fermentasyon Kinetiğinin İncelenmesi”** Görevi proje ekibinde yer almak. Destekleyen kuruluş; Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü. (Mayıs 2011 – Halen devam ediyor).

4. **“Susam Küspesindeki Proteinin Hidrolizi: Proses Parametrelerinin Optimizasyonu, Hidroliz, Çözünürlük, Enzim İnaktivasyon Kinetiği ve Fonksiyonel Özelliklerinin İncelenmesi”** Görevi proje ekibinde yer almak. Destekleyen kuruluş; Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü. (Mart 2009 – Halen devam ediyor).
5. **“Mısır Gluteni Hidrolizatının Acı Tadının Giderilmesi”** Görevi proje ekibinde yer almak. Destekleyen kuruluş; Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü. (Mart 2009 – Halen devam ediyor).

ÖDÜLLERİ

1. **YTÜ -Teşekkür Belgesi:** SCI/SCI-Expanded kapsamındaki bilimsel dergilerde **2010-2011 yılında en fazla uluslararası yayın yapan Araştırma Görevlileri arasında 3. Sırayı almak (2012).**
2. **YTÜ -Teşekkür Belgesi:** SCI/SCI-Expanded kapsamındaki bilimsel dergilerde **2009-2010 yılında en fazla uluslararası yayın yapan Araştırma Görevlileri arasında 2. Sırayı almak (2011).**
3. **YTÜ-Teşekkür Belgesi:** SCI/SCI-Expanded kapsamındaki bilimsel dergilerde **2007-2009 yıllarında en fazla uluslararası yayın yapan Araştırma Görevlileri arasında 1. Sırayı almak (2010).**
4. **YTÜ-Teşekkür Belgesi:** SCI/SCI-Expanded kapsamındaki bilimsel dergilerde yapmış olduğu uluslararası yayınlardan dolayı **(2008).**
5. **Tübitak Uluslararası Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülleri, 2011, 2010, 2009, 2008, 2007.**
6. **Yıldız Teknik Üniversitesi Rektörlüğü tarafından sunulan “Üniversite İkinciliği Plaketi”, 2004.**