

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KAZEİNOMAKROPEPTİDİN JELLEŞMESİNDE pH VE
TRANSGLUTAMİNAZ ENZİMİNİN ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra KOCAMAN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

AĞUSTOS 2016

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KAZEİNOMAKROPEPTİDİN JELLEŞMESİNDE pH VE
TRANSGLUTAMİNAZ ENZİMİNİN ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Esra KOCAMAN
(506141512)**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Meral KILIÇ AKYILMAZ

AĞUSTOS 2016

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506141512 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi ESRA KOCAMAN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “KAZEİNOMAKROPEPTİDİN JELLEŞMESİNDE pH VE TRANSGlutAMİNAZ ENZİMİNİN ETKİSİ”başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Meral KILIÇ AKYILMAZ**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Gürbüz GÜNEŞ**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Talip KAHYAOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : 11 Ağustos 2016
Savunma Tarihi : 17Ağustos 2016





Aileme,



ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmam süresince bana yol gösteren, ilgi ve desteğini esirgemeyen, birikimleri ile beni yönlendiren sevgili hocam Prof. Dr. Meral KILIÇ AKYILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında bana değerli öneri ve yönlendirmeleri ile birlikte analizler süresince her konuda yardımcı olan çalışma arkadaşlarım Gülnaz ARTAN, Turgay ÇETİNKAYA ve Seyithan KAYA'ya teşekkür ederim.

Hayatım ve tüm eğitim yaşıntım boyunca, başarımla beraber, her türlü zor zamanıma da ortak olan canım annem Ayten KOCAMAN' a ve canım babam Emin KOCAMAN'a, bana her konuda desteklerini ve güvenlerini esirgemedikleri için sonsuz teşekkür ederim.

Ağustos 2016

Esra KOCAMAN
(Gıda Mühendisi)



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
SEMBOLLER	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ	xv
ŞEKİL LİSTESİ	xvii
RESİM LİSTESİ	xix
ÖZET	xxi
SUMMARY	xxiii
1. GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	2
1.1.1 Kazeinomakropeptid	2
1.1.2 Transglutaminaz enzimi	5
1.1.3 Gıda sektöründe transglutaminaz enzimi kullanımı	7
1.1.4 Süt ürünlerinde transglutaminaz enzimi kullanımı	7
1.1.5 Süt proteinlerinin jelleşmesi ve transglutaminazın jelleşmeye etkisi	10
1.1.5.1 KMP'nin jelleşmesi	13
2. MATERYAL VE METOD	15
2.1 Materyal	15
2.2 Metod	15
2.2.1 KMP'nin bileşiminin belirlenmesi	15
2.2.2 KMP'nin yüzey hidrofobisitesinin belirlenmesi	16
2.2.3 Transglutaminaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	16
2.2.4 KMP'nin transglutaminaz enzimi ile çapraz bağlanması	17
2.2.5 KMP'nin jelleşme özelliklerinin belirlenmesi	19
2.2.5.1 İstatiksel analizler	20
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	21
3.1 KMP'nin bileşiminin belirlenmesi	21
3.2 KMP'nin yüzey hidrofobisitesi	21
3.3 Transglutaminaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	22
3.4 KMP'nin transglutaminaz ile çapraz bağlanması	22
3.5 KMP'nin jelleşme özellikleri	26
3.5.1 Enzim ilavesiz KMP'nin jelleşme özellikleri	26
3.5.2 Transglutaminaz enzimi uygulamasının KMP'nin jelleşme özelliklerine etkisi.	30
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	37
KAYNAKLAR	39
EKLER	45
ÖZGEÇMİŞ	51

KISALTMALAR

ANS	: 8-Anilinonaftalin-1-sulfonik asit
APS	: Amonyum persülfat
GDL	: Glukono delta-lakton
GMP	: Glikomakropeptid
HCl	: Hidroklorik asit
HCl	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
KMP	: Kazeinomakropeptid
NaOH	: Sodyum hidroksit
NEM	: N-etilmaleimid
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid jel elektroforez
TEMED	: Tetrametiletildiamin
Tgaz	: Transglutaminaz
TCA	: Trikloroasetik asit



SEMBOLLER

Hz	: Hertz
MPa	: mega Paskal
G'	: Elastik modül
G''	: Viskoz modül
U	: Ünite
nm	: nanometre
µL	: mikrolitre
γ	: gama



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : SDS jellerinin bileşimi.	18
Çizelge 3.1 : KMP'nin bileşimi.	21
Çizelge 3.2 : KMP'nin farklı pH değerlerindeki hidrofobisitesi	21
Çizelge 3.3 : KMP'nin %20 konsantrasyonda farklı pH değerlerinde jelleşme sıcaklığı	28
Çizelge 3.4 : KMP'nin %20 konsantrasyonda farklı pH değerlerinde sıcaklık taraması sonuçları.	28
Çizelge 3.5 : KMP'nin %20 konsantrasyonda farklı pH değerlerinde stres taraması sonuçları.	29
Çizelge 3.6 : KMP'nin %20 konsantrasyonda transglutaminaz uygulaması sonucunda jelleşme sıcaklığı.	32
Çizelge 3.7 : KMP'nin %20 konsantrasyonda transglutaminaz uygulaması sonucunda elde edilen sıcaklık taraması sonuçları.	33
Çizelge 3.8 : KMP'nin %20 konsantrasyonda transglutaminaz uygulaması sonucunda elde edilen stres taraması sonuçları.	33
Çizelge 3.9 : KMP'den %20 konsantrasyonda transglutaminaz uygulaması sonucunda 70°C'de elde edilen jellerde stres taraması sonuçları.	34



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 3.1 :** KMP'nin transglutaminaz enzimi ile çapraz bağlanması sonucunda ortamda kalan serbest KMP ve diğer proteinler. a) Enzimsiz %0,5 KMP, b) 60 U/gKMP transglutaminaz ile 60 dk muamele edilmiş %0,5 KMP. Enzimsiz olan kromatogramda soldan sağa: GMP1, KMP1, GMP2, KMP2, β -laktoglobulin A-B.....**23**
- Şekil 3.2 :** %0,5 konsantrasyonda KMP'nin 60 U/gKMP oranında transglutaminaz ile zamana bağlı olarak reaksiyonu sonucunda ortamda kalan serbest KMP1 ve KMP2 miktarları.....**24**
- Şekil 3.3 :** Farklı konsantrasyonlarda KMP'nin farklı konsantrasyonlarda transglutaminaz ile 60 dk reaksiyon sonrasında ortamda kalan serbest KMP miktarı.a) KMP1, b) KMP2**24**
- Şekil 3.4 :** KMP'nin %20 konsantrasyonda farklı pH değerlerinde sıcaklık taraması grafikleri. a) Yakınlaştırılmış grafik, b) Tüm grafik.**27**
- Şekil 3.5 :** KMP'nin %20 konsantrasyonda farklı pH değerlerinde frekans taraması grafikleri. a) pH 6,7 b) 4,5 c) 3,5.....**29**
- Şekil 3.6 :** KMP'nin %20 konsantrasyonda transglutaminaz uygulaması sonucunda pH 4,5'te elde edilen sıcaklık taraması grafikleri. a) Yakınlaştırılmış grafik, b) Tüm grafik..**31**
- Şekil 3.7 :** KMP'nin %20 konsantrasyonda transglutaminaz uygulaması sonucunda pH 3'te elde edilen sıcaklık taraması grafikleri.**32**
- Şekil 3.8 :** KMP'nin %20 konsantrasyonda 20U/gKMP transglutaminaz uygulaması sonucunda elde edilen frekans taraması grafikleri. a) pH 3, b) pH 4,5 .**33**
- Şekil 3.9 :** KMP'den %20 konsantrasyonda transglutaminaz uygulaması sonucunda 70°C'de elde edilen jellerde frekans taraması grafikleri. a)Enzimsiz, b) 1U/gKMP, c)20U/gKMP.....**35**



RESİM LİSTESİ

Sayfa

Resim 1.1 : aKMP ve gKMP'nin hidroforik yk görüntüleri..	2
Resim 1.2 : Transglutaminaz ile katalizlenen mekanizmalar: a) Açıl transfer b) Protein veya peptidlerde glutamin ve lisin çapraz baēlantısı c) Deamidasyon.....	5
Resim 1.3 : KMP'nin jelleşme aşamaları. Semboller: H: hidroforik etkileşimler, E: elektrostatik etkileşimler, (KMP) _M : KMP monomerleri, (KMP) _D : KMP dimerleri, [(KMP) _D] _n : KMP polimerleri.....	13
Resim 3.1 : KMP rneklerinin SDS-PAGE görüntüsü. Soldan saēa: Standartlar, %0,5 KMP, 60 U/gKMP transglutaminaz ile 60 dk muamele edilmiş %0,5 KMP	25



KAZEİNOMAKROPEPTİDİN JELLEŞMESİNDE pH VE TRANSGLUTAMİNAZ ENZİMİNİN ETKİSİ

ÖZET

Kazeinomakropeptid peyniraltı suyundan elde edilen biyolojik aktiviteye sahip bir polipeptiddir. Bu çalışmada, kazeinomakropeptidin jelleşme özelliklerine pH ve transglutaminaz enziminin etkileri incelenmiştir. Kazeinomakropeptid çözeltilerinin pH değeri 3,0-6,7 aralığındaki değerlere ayarlanarak jelleşme sıcaklığı, jel sertliği ve kırılma gerilimi değerleri sıcaklık ve stres taramaları yapılarak belirlenmiştir. Kazeinomakropeptidin tüm pH değerlerinde jel oluşturabildiği, en sert jelin pH 4,5'te, en zayıf jelin ise pH 6,7'de elde edildiği belirlenmiştir. pH değeri düştükçe jelleşmenin daha düşük sıcaklıklarda başladığı saptanmıştır. Kazeinomakropeptidin hidrofobisitesi pH değeri düştükçe artmıştır. Transglutaminaz enziminin kazeinomakropeptidi çapraz bağlayarak polimerler oluşturabildiği ters faz-HPLC ile serbest KMP'deki azalış ve SDS-PAGE ile moleküler kütlenin artması ile belirlenmiştir. Kazeinomakropeptid çözeltisine transglutaminaz enzimi 1-20 U/g aktivitede uygulandığında jelleşmesinin etkilendiği tespit edilmiştir. Transglutaminaz enziminin kazeinomakropeptidin jelleşmesini enzim aktivitesine, jelleşme pH ve sıcaklığına bağlı olarak farklı şekilde etkilediği bulunmuştur. Jelleşme pH'sı 4,5 olduğunda transglutaminaz enziminin kazeinomakropeptid jelini zayıflattığı tespit edilmiştir. Jelleşme sıcaklığı 90°C olduğunda, 1 U/g transglutaminazın pH 3'te elde edilen jeli kuvvetlendirdiği bulunmuştur. Jelleşme sıcaklığı 70°C olduğunda ise 20 U/g transglutaminazın pH 3'te elde edilen kazeinomakropeptid jelini kuvvetlendirdiği bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, kazeinomakropeptidin içeriğinde düşük oranda bulunan diğer peyniraltı suyu proteinlerinin de pH ve sıcaklığa bağlı olarak jelleşmeye etki ettiklerini göstermiştir.



EFFECTS OF pH AND TRANSGLUTAMINASE ENZYME ON GELATION OF CASEINOMACROPEPTIDE

SUMMARY

Caseinomacropeptide is a polypeptide which has biological and functional properties. In this research, effects of pH and transglutaminase enzyme on gelation properties of caseinomacropeptide were investigated. Commercial caseinomacropeptide (CMP) was used as is. CMP was found to contain 80.4% protein, 4.9% moisture and 5.3% ash. According to the manufacturer, CMP powder had CMP at a level of 63%. CMP solutions were prepared with deionized distilled water by holding overnight at 4°C. Commercial transglutaminase enzyme, Activa MP, with an enzyme activity of 100U/g was used. Enzyme was used at activities in the range of 1-60 U/g CMP powder.

Hydrophobicity of CMP was measured by using fluorescent ANS-probe method at pH values of 2.5, 3.5 and 6.7. Excitation wavelength was adjusted to 390 nm and emission wavelength to 480 nm. Hydrophobicity of CMP increased as the pH was reduced. This was explained by inaccessibility of hydrophobic regions to the probe as a result of aggregation.

Formation of polymers via cross-linking by transglutaminase was observed by reversed phase HPLC and SDS-PAGE analysis. In the HPLC analysis, amount of free CMP was decreased after enzyme treatment. In SDS-PAGE analysis, formation of large polymers with molecular mass above 66 kDa was seen after enzyme treatment. These results showed that enzyme was able to cross-link CMP.

Gelation properties of CMP were determined by rheometer. pH values of the CMP solutions were adjusted to pH values in the range of 3.0-6.7. Gelation temperature was determined by temperature sweep in the range of 25-90°C. After temperature sweep, temperature was kept at 90°C for 30 minutes, then decreased to 25°C in five minutes and then held at 25°C for 10 minutes to follow gelation. Gelation temperature was determined when elastic modulus (G') crossed viscous modulus (G''). Separate samples were prepared and held at 90°C for 30 minutes in a water bath for stress sweep measurements. Gel hardness was taken as the maximum G' value obtained in stress sweep measurement. Break stress was determined as the shear stress value at which G' crossed G'' value. Frequency sweep was also performed at 25 °C in these samples. CMP was found to form a gel at a concentration of 20%. Among all pH values, the hardest gel structure was obtained at a pH value of 4.5. The weakest gel was obtained at a pH value of 6.7. Gelation of CMP started at a lower temperature as the pH value was decreased. At pH values 3 and 3.5, G' value was found to decrease at temperatures above 70°C during temperature sweep. In temperature sweep of the sample at pH 4.5 there were two clear step increases in G' showing gelation of two different components of CMP powder. Frequency sweep measurements of the samples showed slight differences.

Effect of transglutaminase enzyme on gelation of CMP was studied at pH 3 and 4.5, enzyme activities of 1 and 20 U/g CMP powder. Enzyme incubation was performed

at 40°C for 1 hour. After incubation, solutions were cooled in ice-water bath. Temperature and stress sweep measurements were carried out as done for CMP solutions without enzyme. As it was observed that G' value of the CMP sample at pH 3 decreased after 70°C, additional samples were prepared and allowed to gel at 70°C in a water bath. Treatment with transglutaminase enzyme affected CMP gels differently depending on enzyme activity, gelation pH and temperature. Gelation temperature of CMP was changed after enzyme treatment. Transglutaminase treatment weakened the CMP gels obtained at pH 4.5 regardless of enzyme activity at gelation temperature of 90°C. Gel hardness of CMP treated with 1 U/g transglutaminase increased compared to that of the sample without the enzyme. When CMP gels were prepared at pH 3 and 70°C, transglutaminase at an activity of 20 U/g was found to increase gel hardness and break stress.

Transglutaminase was found to affect gel properties of CMP depending on enzyme activity, gelation pH and temperature. The results showed that not only CMP but also other minor whey proteins present in the CMP powder contributed to gelation especially at pH 4,5 and temperature of 90°C. Further studies could be conducted to determine optimum transglutaminase activity required for a strong and stable CMP gel.

1. GİRİŞ

Gıdalarda yapı oluşumunun sağlanmasında kullanılan önemli yapıtaşlarından biri proteindir. Gıda proteinleri birçok üründe işlenebilme özelliğini geliştirdiği gibi, ürünlerin raf ömrü sırasında dayanıklılığını da artırırlar. Protein moleküllerinin çapraz bağlarla agregatlar meydana getirip, üç boyutlu jel yapısı oluşturmaları istenen yapıda yeni gıda ürünü geliştirmede önemlidir (Matsumura ve Moti, 1996). Proteinlerin fonksiyonları geliştirmek amacıyla yapılarını fiziksel, kimyasal veya enzimatik olarak değiştirmek mümkündür. Enzimatik yöntemlerde reaksiyonların daha spesifik olması ve toksik etkilerin önlenmesi sebebiyle bu yöntemlerin kimyasal ve fiziksel işlemlere göre daha avantajlı olduğu bildirilmiştir (Schorsch ve diğ., 2000).

Kazeinomakropeptid (KMP) peynir üretiminde sütün rennet enzimi ile pıhtılaşma sürecinde kazein misellerindeki κ -kazeinlerin hidrolize olması sonucunda ortaya çıkan bir peptiddir. Rennet enzimi κ -kazeinin phe105-met106 peptid bağını hidrolize ederek para- κ -kazein ve kazeinomakropeptidin oluşumunu sağlar (Molle ve Leonil, 2005). Suda çözünür KMP peyniraltı suyuna geçerken para- κ -kazein peynire işlenir. KMP β -laktoglobulin ve α -laktalbuminden sonra peyniraltı suyundaki proteinler içinde en fazla bulunan protein fraksiyonudur (Thoma-Worringer ve diğ., 2006). Kazeinomakropeptid biyolojik ve fonksiyonel özellikleri açısından oldukça önemli bir peptiddir (Thoma-Worringer ve diğ., 2006). Biyolojik açıdan bakteriyel ve viral bulaşmayı önlerken, jelleşme, emülsifikasyon ve köpük oluşturma gibi fonksiyonel özelliklere sahiptir. Biyoaktif peptid olarak değerlendirilen kazeinomakropeptid yeni fonksiyonel gıdaların üretimi için son yıllarda gıda bilimi ve beslenme alanlarında oldukça ilgi görmektedir (Yetişemiyen ve Yıldız, 2008).

Transglutaminaz protein yapısını değiştirebilen bir enzimdir. Transglutaminaz proteinlerin yapısında bulunan glutamin ve lisin arasında molekül içi ve moleküller arası kovalent çapraz bağlar oluşturarak yüksek molekül ağırlıklı polimerlerin oluşmasını sağlamaktadır. Transglutaminaz farklı proteinler, süt, et, soyalı ve

fırıncılık ürünlerinde yapının güçlendirilmesi ve dayanıklılığının sağlanması amacıyla kullanılmaktadır.

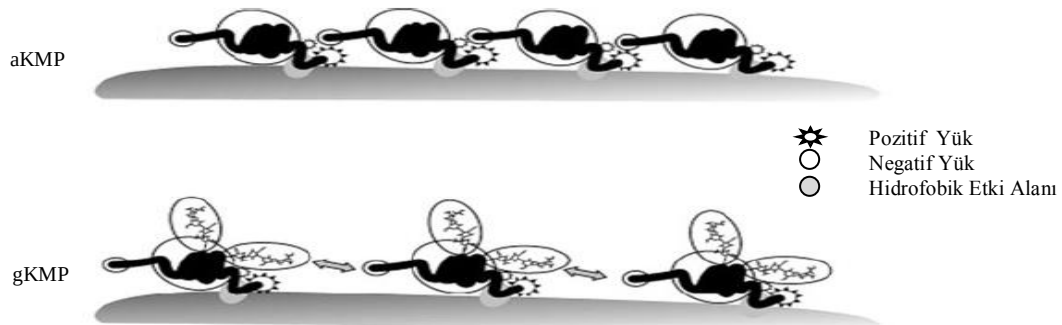
Bu çalışmada, pH ve transglutaminaz enziminin kazeinomakropeptidin jelleşme özellikleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Kazeinomakropeptid

KMP, peynir üretimi sırasında sütün rennet enzimi ile pıhtılaşma sürecinde açığa çıkan bir peptiddir. Rennet enzimi kazein misellerindeki κ -kazeinlerin phe105-met106 peptid bağıını hidrolize ederek para- κ -kazein ve KMP oluşumuna sebep olmaktadır. KMP çözünür olduğu için peyniraltı suyuna geçmektedir. KMP, β -laktoglobulin ve α -laktalbuminden sonra peyniraltı suyunda en fazla bulunan protein fraksiyonudur (Thoma-Worringer ve diğ., 2006). KMP κ -kazeinin C-terminalindeki 64 aminoasitten meydana gelmekte ve yapısında 3 adet glutamik asit ve 2 adet lisin bulunmaktadır.. Her bir molekülde 4 tane şeker kalıntısı olduğundan kısmen hidrofilik karakterlidir (Tolkach ve Kulozik, 2005).

KMP glikozilasyon ve fosforilasyon gibi genetik çeşitlilik ve modifikasyonlar sebebiyle heterojen bir polipeptit yapısı göstermektedir. Aromatik olmayan (fenilalalin, triptofan, tirozin ve sistein gibi) amino asitleri içermez. Aynı oranlarda iki genetik türü bulunmaktadır. Glikolize ve fosforile olmuş şekli glikomakropeptid (gKMP veya GMP) ve fosforile olup glikolize olmamış aglikomakropeptid (aKMP veya KMP) olmak üzere iki formunun olduğu bilinmektedir. aKMP ve gKMP'nin hidroforik yük görüntüleri Resim 1.1'de gösterilmiştir. Bu çalışmada aKMP ve gKMP yerine KMP kısaltması kullanılmıştır.



Resim 1.1 : aKMP ve gKMP'nin hidroforik yük görüntüleri (Kreuz ve diğ., 2009).

Kazeinomakropeptidin biyoaktif özelliklerinin olduğu ve özellikle bifidobakteriler olmak üzere bakteri gelişimini teşvik ettiği bildirilmektedir (Thoma-Worringer ve diğ., 2006). Ayrıca kan dolaşımını ve bağışıklık sistemini düzenleyici, bakteriyel ve viral bulaşmayı önleyici etkiler gösterdiği bildirilmektedir (Molle ve Leonil, 2005 ; Janer ve diğ., 2004; Thoma ve diğ., 2006). Ayrıca fenilalanin bulundurmadığından fenilalanini metabolize edemeyen hasta diyetlerinde kullanılabilir (Thoma-Worringer ve diğ., 2006; Molle ve Leonil, 2005). Ancak fazla miktarda treonin aminoasidi barındırdıklarından beyin gelişimini olumsuz yönde etkilediği ve hipertreoninemaya neden olabileceği bildirilmektedir (Tolkach ve Kulozik, 2005).

Kazeinomakropeptidin yapısal fonksiyonel özellikleri de araştırılmıştır. Kazeinomakropeptidin emülsifiye etme özelliği olduğu ve bilhassa alkali pH değerlerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Thoma-Worringer ve diğ., 2006; Thoma ve diğ., 2006). Kazeinomakropeptidin jel oluşturma özelliği olduğu bildirilmiştir (Martin-Diana ve diğ., 2004). Ayrıca köpük oluşturma özelliğinden dolayı da ürünlerde hacim artışı sağladığı belirlenmiştir (Thoma-Worringer ve diğ., 2006).

KMP'nin monomer halde molekül ağırlığının 6,7 kDa olduğu bildirilmiştir. (Sharma ve diğ., 2013). Ancak yapılan bazı çalışmalarda 9 kDa olduğu da bildirilmiştir (Mikelsen ve diğ., 2005). Bunun nedeninin KMP'nin yapısındaki farklılıklardan dolayı olduğu düşünülmektedir

Mikelsen ve diğ. (2005) kimozen ve pepsin enzimi ile 2,5 ve 6,6 pH'da κ -kazeinin hidrolize olmasıyla oluşan KMP'nin oluşumunu çalışmışlardır. KMP'nin molekül ağırlığının belirlenmesi için SDS-PAGE ve boyut dışlama kromatografisi analizleri yapmışlardır. Bu çalışmalarda 6,6 pH değerinde hidroliz yapıldığında KMP'nin molekül ağırlığının 35 kDa olduğu bulunmuştur. KMP üretimi 2,5 pH değerinde yapıldığında ise 35, 18 ve 9 kDa olmak üzere birden fazla fraksiyon elde edilmiştir. Bu molekül ağırlıklarının da sırasıyla KMP'nin tetramer, dimer ve monomer formlarının olduğunu ifade etmişlerdir (Mikelsen ve diğ., 2005).

Yapılan başka bir çalışmada ise rennet enzimiyle tatlı peynir altı suyundan elde edilen KMP SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. Sonuçta 14, 20, 41 kDa molekül ağırlıklarında bantlar gözlenmiştir. Bu bantların sırasıyla dimer, trimer ve oligomer olduğu düşünülmektedir (Rojas ve Torres, 2013).

Kazeinomakropeptidin üretiminde membran ve kromatografik ayırma teknikleri kullanılmaktadır (Tolkach ve Kulozik, 2005). Başlangıç materyali olarak yağsız süt ya da rennet ile elde edilen kazein/kazeinat kullanılmaktadır (Martin-Diana ve diğ., 2004). Sütten KMP elde edilme yöntemleri aşağıda açıklanmıştır;

a) Kromatografik yöntemler: Tatlı peynir altı suyundan kazeinomakropeptid elde etme işleminde iyon değişim kromatografisi kullanılmaktadır. Düşük pH'da ($\text{pH} < 4$) uygulanan bu yöntemde, kazeinomakropeptid negatif yüklü, serum proteinleri de pozitif yüklü olduğu için anyon değiştiriciye kazeinomakropeptidin adsorbsiyonu, katyon değiştiriciye de serum proteinlerinin adsorbsiyonu olmaktadır. Bu yöntemin dezavantajı pahalı olması ve pH ayarlama işleminin kapasiteyi sınırlamasıdır. Kazeinomakropeptidin izolasyonunda ve saflaştırılmasında en çok tercih edilen iyon değişim kromatografisi iken jel kromatografisi ve hidrofobik interaksiyon kromatografisi de kullanılmaktadır (Thoma-Worringer ve diğ., 2006)

b) Membran teknikleri: Membran teknolojisi kullanılarak kazeinomakropeptid elde edilmesinde yağsız süt mikrofiltrasyon ile kazein ve serum proteinleri olarak ayrılmaktadır. Kazein rennet enzimi ile pıhtılaştırıldıktan sonra, pıhtı kısmı uzaklaştırılmaktadır. Kazeinomakropeptidce zengin serum mikrofiltrasyon ya da diafiltrasyon uygulanarak saflaştırılır. Son aşamada ultrafiltrasyon işlemi ile beraber konsantre kazeinomakropeptid elde edilmektedir. Bu teknik diğer yöntemlere kıyasla yüksek kapasitede sürekli çalışma imkanı sunmakla birlikte pH değişikliği yapılmadan ve süt proteinlerinin doğal özellikleri bozulmadan ayrılma sağlandığı bildirilmektedir (Thoma-Worringer ve diğ., 2006; Tolkach ve Kulozik, 2005).

Başka bir yöntemde tatlı peynir altı suyuna 90°C 'de 1 saat ısı işlem uygulanarak serum proteinleri denatüre edilmektedir. Sonrasında mikrofiltrasyon işlemi ile denatüre serum proteinleri ve kazein partikülleri retentatta, kazeinomakropeptid bakımından zengin kısım ise permeatta toplanmaktadır (Thoma-Worringer ve diğ., 2006; Tolkach ve Kulozik, 2005).

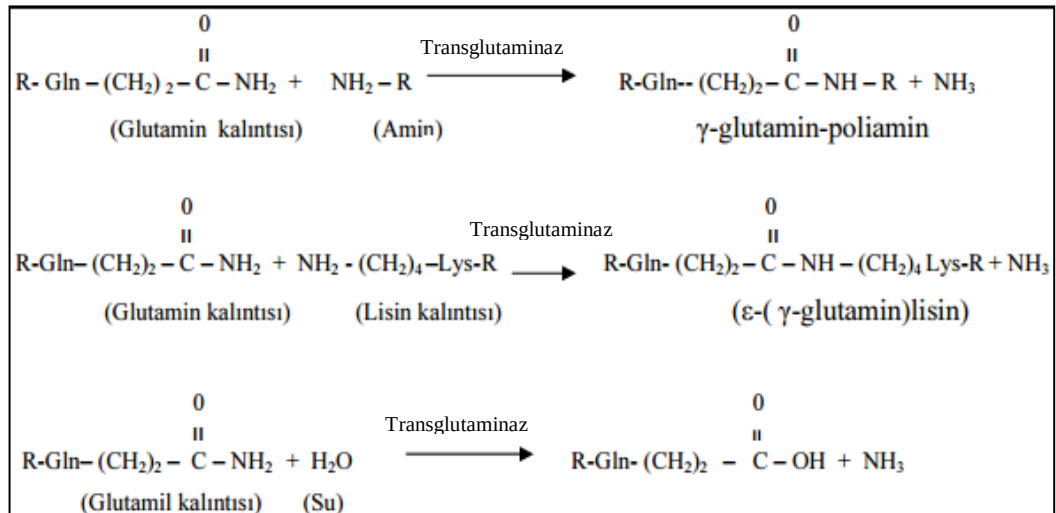
Diğer bir yöntemde hidroklorik asit ile pH'sı 3,5'a ayarlanan peyniraltı suyu 90°C 'de 1 saat ısı işleme tabi tutulmaktadır. Çökmüş serum proteinlerini uzaklaştırmak için santrifüjasyon veya ultrafiltrasyon işlemi uygulanmaktadır. Elde edilen süpernatantın pH'sı 7'ye ayarlanıp ikinci ultrafiltrasyon işlemiyle konsantre kazeinomakropeptid elde edilmektedir (Thoma-Worringer ve diğ., 2006).Tolkach ve

Kulozik (2005)'in yaptıkları bir çalışmada, KMP'nin serum proteinleri olan β -laktoglobulin ve α -laktalbuminden ayrılmasında transglutaminaz enzimi kullanmışlardır. KMP iki glutamin ve üç lizin amino asidi içerdiğinden transglutaminaz enzimi KMP'ye kolayca bağlanıp kovalent bağ oluştururken, globüler yapıdaki serum proteinlerinde çok az bağlanma olduğu saptanmıştır. Bu şekilde molekül ağırlığı büyütülen KMP agregatları mikrofiltrasyon yoluyla uzaklaştırılıp serum proteinlerinden ayrılmıştır (Tolkach ve Kulozik, 2005).

1.1.2 Transglutaminaz enzimi

Transglutaminaz amin birleşmesi, çapraz bağ oluşumu tepkimeleri ile proteinleri modifiye edebilen bir enzimdir. Transglutaminaz proteinlerin yapısında glutamin ve lizin arasında izopeptid bağ yapabilme kabiliyetine sahip bir enzimdir. Bu şekilde molekül içi ve moleküller arası kovalent çapraz bağ oluşturarak yüksek molekül ağırlıklı polimerlerin oluşmasını sağlamaktadır.

Transglutaminaz tarafından katalizlenen diğer iki reaksiyon ise, açıl transfer ve deamidasyon reaksiyonlarıdır. Açıl reaksiyonu enzimin primer aminlerin bulunduğu ortamlarda proteinlerin glutaminlerini aminlere çapraz bağlamasıyla gerçekleşir. Deamidasyon reaksiyonları ise lizin ve primer aminlerin olmadığı ortamlarda suyun nükleotid gibi davranması sonucu glutaminlerin deamidasyonudur (Öner, 2004). Transglutaminaz enziminin katalizlediği mekanizmalar Resim 1.2'de gösterilmiştir.



Resim 1.2: Transglutaminaz ile katalizlenen mekanizmalar: a) Açıl transfer b) Protein veya peptidlerde glutamin ve lizin çapraz bağlantısı c) Deamidasyon (Kashiwagi ve diğ., 2002).

Transglutaminaz enzimi çoğu hayvan dokusunda bulunup vücut sıvısında kanın pıhtılaşması, yaraların iyileşmesi, epidermal keratinizasyonu ve eritrosit membranının sertleşmesi gibi birçok görevi üstlenir. (Aeschlimann ve Paulsson, 1994). Transglutaminaz enzimi bitki, balık ve mikroorganizmalarda da görülür.

Transglutaminaz enziminin üretimi için genel olarak üç yaklaşımın mevcut olduğu ifade edilmektedir (Uran ve diğ., 2013). Transglutaminaz enzimi hayvanların doku ve vücut sıvılarından ekstraksiyon ve saflaştırma yoluyla elde edilebilir. Sığır ya da domuz kanından da elde etmek mümkündür ancak bu şekilde elde edilen enzim aktive edilmek zorunda kalınmaktadır. Ayrıca kırmızı renk oluşumu da gıda ürününe olumsuz etki yapabilmektedir. Bu sebeplerden dolayı, bu yaklaşım ticari üretim için uygun görülmemektedir. Başka bir yaklaşım ise *Escherichia coli*, *Bacillus*, maya ve *Aspergillus* gibi mikroorganizmaların genetiği değiştirilerek elde etme yöntemidir. Ancak bu yöntem de hem maliyet açısından hem de gıda mevzuatlarına uygun olmamasından dolayı ticari üretim için kullanılmamaktadır. Sonuncu ve ticari üretimin asıl gerçekleştirildiği yaklaşım ise transglutaminaz enzimi üreten mikroorganizmalardır. Özellikle *Streptoverticillium* (*S. mobaraense* ve *S. griseocameun*) türü bakteriler kullanılmaktadır. Daha ekonomik olması ve kolay elde edilebilmesi sebebiyle gıdalarda daha çok mikroorganizmalardan elde edilen transglutaminazlar kullanılır (Uran ve diğ., 2013).

Mikrobiyal transglutaminaz 5-8 pH aralığında etkili olarak çalışabilmektedir. Optimum pH değeri 7 olarak bildirilmiştir. Mikrobiyal transglutaminaz enzimi 40°C'ye kadar stabildir, 50°C'ye kadar enzim aktivitesi kademeli olarak artmaktadır (Öner, 2004).

Enzimin inaktivasyonu 65°C'de 2 saat sürede ya da 80°C de 1 dakikadan daha kısa bir sürede gerçekleştirilebilir (Schorsch ve diğ., 2000). Termal bir reaksiyon ile etkileşim problemini ortadan kaldırmak için bazı çalışmalarda enzim inaktivasyonu N-etilmaleimid (NEM) ile sağlanmaktadır. NEM transglutaminaz enziminin katalitik aktivitesini inhibe eden disülfid engelleyici bir ajandır (Jaros ve diğ., 2010).

Mikrobiyal transglutaminazın molekül ağırlığı ise hem SDS-PAGE hem de jel kromatografi yönteminde 40000 Da olarak ölçülmüştür. Daha sonraki duyarlı ölçümlerde ise molekül ağırlığı 38000 Da olarak bulunmuştur (Kuraishi ve diğ., 1997).

1.1.3 Gıda sektöründe transglutaminaz enzimi kullanımı

Bir çok gıda proteini transglutaminaz enzimi için iyi bir substrattır. Transglutaminaz enziminin gluten ,yumurta proteinleri, baklagil proteinleri ve özellikle süt proteinleriyle çapraz bağ oluşturmaları sebebiyle gıda endüstrisinde birçok üründe çalışmalar yapılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Yüksel ve Erdem, 2007).

Sığır jellerinde mikrobiyal transglutaminaz enziminin jelleşme ve tekstür özelliklerine etkisi incelenmiştir (Pietrasik ve Li-Chan,2002). Çalışmada %0,5 mikrobiyal transglutaminaz içeren örneklerin, içermeyenlere göre daha fazla su bağlayabildikleri ve daha az pişirme kaybına neden olduğu ortaya konulmuştur. Sertlik ve kırılabilirliğin de enzim ilaveli örneklerde daha fazla olduğu gözlenmiştir. Mikrobiyal transglutaminaz ilavesi jelin renk parametrelerinde bir değişikliğe neden olmamıştır.

Başka bir çalışmada, tavuk etine %0,3 transglutaminaz enzimi eklenmiş 40°C'de 30 dk inkübasyon ve basınç uygulaması (500 MPa) ile kombine olarak örnekler uygulanmıştır (Trespacios ve Pla, 2007). Enzim ilavesi yapıp basınç uygulanan örnekler, sadece basınç uygulananlara göre daha sıkı ve homojen bir yapı göstermiştir. Ayrıca sertlik ve çiğnenebilirlik özelliğinde de olumlu sonuç alınmıştır.

Balık etinde de yapıyı korumak ve geliştirmek amacıyla enzim uygulanmıştır. Üç farklı konsantrasyonda (%0,5-1,5) enzim, %0-2 konsantrasyonlarında NaCl varlığında yapılan çalışmalarda, en iyi sertlik ve su tutmanın elde edildiği kombinasyonun %1 enzim ve %1 NaCl olduğu bulunmuştur (Vacha diğ., 2006).

Transglutaminaz enziminin 11S ve 7S soya proteinleri üzerinde de etkili olduğu bildirilmiştir. Tekstürel olarak zayıf olan tofu ürününde yapının korunması üzerine yapılan bir çalışmada transglutaminaz enziminin eklenmesinin daha sıkı bir tofu oluşumunu sağladığı bildirilmiştir (Motoki ve Seguro, 1998). Ayrıca kullanılan enzim konsantrasyonu arttıkça kırılma kuvvetinde de artış gözlenmiştir (Yasir ve diğ., 2007).

1.1.4 Süt ürünlerinde transglutaminaz enzimi kullanımı

Süt proteinleri çok karmaşık yapıda olup 30'dan fazla fraksiyondan oluşurlar. Genel olarak kazein ve serum proteinleri olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Kazein sütte en fazla bulunan proteindir ve misel yapısındadır. Rennet enzimi ya da asit

kullanılarak koagüle edilebilen fraksiyondur. Serum proteinleri ise kazein dışında kalan kısımdır ve pıhtılaştırılamaz. Ancak 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda denatüre olurlar. Sütün asitliğinin 4.6 pH'ya düşürülüp, 90°C'ye ısıtılması sonucu kazein ve serum proteinleri çöker. Serum kısmında kalan azotlu maddeler proteoz-peptondur ve ısıya karşı stabil olup %12'lik trikloroasetik asitte (TCA) çökerler.

Transglutaminazın süt proteinlerinin üzerinde etkili olduğu ancak kazein ve serum proteinlerine etkisinin farklı olduğu bulunmuştur. Kazeinler transglutaminaz için iyi bir substrat iken, globüler yapıdaki serum proteinleri denatüre olmadıkları durumda transglutaminazdan düşük düzeyde etkilenirler (Schorsch ve diğ., 2000).

Kazein ve serum protein fraksiyonları da kendi içinde transglutaminaz enziminin etkisi açısından farklılık gösterebilmektedirler. Zerrin ve diğ. (2009)'nin yaptıkları bir çalışmada transglutaminaz enzimi için en iyi kazein fraksiyonunun miselin dış kısmında yer almasından dolayı κ -kazein olduğunu belirtmişlerdir. Bunu β -kazeinin takip ettiğini ve en zayıf substrat olarak α -kazeinin olduğunu bildirmişlerdir (Yüksel ve Erdem, 2009).

Serum proteinlerinin globüler yapılarının açılıp primer hale gelmeleri için indirgeyici ajanlar kullanılmaktadır (Faergemand ve diğ., 1997). Aynı amaçla enzim reaksiyonundan önce ısı yoluyla protein denatürasyonu yapılarak serum proteinleri transglutaminaz enzimi için iyi bir substrat durumuna getirilebilmektedir (Lorenzen, 2000).

Gauch ve diğ. (2008) α -laktalbumin ve β -laktoglobulin proteinlerinin transglutaminaz enzimi ile polimerleşmesini inceledikleri çalışmada, optimum reaksiyon sıcaklık ve süresinin 36°C'de 4 saat olduğunu bulmuşlardır. Enzim miktarı 50 U/g protein değerine artırıldıkça, polimerleşmenin de doğru orantılı olarak substrat doygunluğuna kadar arttığını gözlemlemişlerdir. Polimerleşme sonucunda moleküler ağırlıkta ve kıvam indeksinde artış görülmüştür.

Transglutaminaz enziminin serum proteinlerinde çapraz bağ oluşturabilmesinin içinde bulundukları ortama göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Örneğin sadece β -laktoglobulinin bulunduğu bir ortamda bu protein transglutaminaz enzimi için iyi bir substrat olma özelliği taşıdığı ve enzim etkisiyle dimer, polimer gibi yapılar oluşturabildiği saptanmıştır (Han ve Damodaran 1996). Ancak β -laktoglobulin ve β -kazeinden oluşan ikili bir sistemde, β -kazein polimerleşebilirken, β -laktoglobulinin

enzimin aktif kısmına bağlanamadığı ve dimer, polimer gibi yapılar oluşturamadığı bildirilmiştir. Benzer şekilde β -kazeinin bovin serum albumin varlığında polimerleşme göstermediği, α -laktalbumin ile birlikte olduğunda dimer ve polimer yapılar oluşturduğu bildirilmiştir. Han ve Damodaran (1996) yaptıkları çalışmada polimerleşmenin, ortamı oluşturan proteinlerin birbirleriyle termodinamik uyumuna bağlı olarak değiştiği sonucuna varmışlardır.

Transglutaminaz enzimi birçok süt ürününde fiziksel yapının iyileştirilmesi amacıyla kullanılmış ve en uygun koşullar belirlenmeye çalışılmıştır. Yumuşak peynirde transglutaminaz enziminin ürün yapısına etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, ürüne farklı konsantrasyonlarda ve zamanlarda transglutaminaz enzimi ilavesi yapılmıştır (Mahmood ve Sebo, 2009). Bu çalışmada, üretim için en uygun konsantrasyonun 60 U/L olduğu bulunmuştur. Pıhtılaşmadan önce, pıhtılaşma anında ve pıhtılaşma sonrası olarak yapılan ilaveler arasında en uygun zamanın, pıhtılaşma sonrası olduğu belirlenmiştir. Bu şekilde üretilen peynirlerde, enzim ilavesi yapılmamış ürünlere göre peynir altı suyunda kalan proteinin önemli oranda azaldığı ve peynir sertliğinde önemli bir artış olduğu gözlenmiştir. Yapılan duyu analizlere göre de enzim ilaveli ürünün, enzim ilavesi olmayan ürüne göre daha iyi kremsi bir yapı özelliğinde olduğu saptanmıştır. Ayrıca enzim ilaveli ürünün aroma, tekstür, renk, acılık gibi özellikler konusunda da daha üstün olduğu ifade edilmiştir.

Son yirmi yıldır yağsız ve az yağlı ürünler tüketiciler tarafından ilgi görmektedir. Ancak üründen bazı gıda bileşenlerinin ayrılması gıdalarda tekstürel olarak bazı problemlere yol açabilir. Bunun önüne geçmek için katkı maddeleri kullanılmaktadır. Özellikle geleneksel yoğurt üretiminde stabilizörlerin kullanımı birçok ülkede yasaklanmıştır ve kullanılması tercih edilmemektedir. Bu durum da alternatif yöntemler geliştirmeyi gerekli kılmaktadır. Transglutaminaz enzimi yağsız ve az yağlı ürünlerde bu amaçla denenmiştir.

Yağsız yoğurt üretiminde süte 0-0,5 g/L arasındaki konsantrasyonlarda transglutaminaz enzimi ilavesi yapılmıştır (Ozer ve diğ.,2007). Çalışmada enzimin vizkoziteyi arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca serum ayrılmasında da kullanılan enzim konsantrasyonu arttıkça önemli bir azalma görülmüştür. Transglutaminaz enzimi su tutma kapasitesini artırarak jeli güçlendirmiştir. Üretim için 0,3 g/L enzim kullanımının iyi olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuçta transglutaminaz enziminin

oluşturduğu çapraz bağlanmanın ürünün yapısını iyileştirmede kullanılabileceği ve katkı maddelerine bir alternatif olabileceği düşünülmüştür.

Transglutaminaz enziminin yoğurt üretiminde kullanılması konusunda yapılan başka bir çalışmada, %100 süttten ve %20 peynir altı suyu-%80 süt ve %30 peynir altı suyu-%70 süt ile yapılandırılan örnekler 0,5 U/g protein olacak şekilde transglutaminaz enzimi ilaveleri yapıp örneklerin reolojik davranışları, serum ayrılması ve tekstür özellikleri incelenmiştir (Gauche ve diğ., 2009). Örnekler arasında serum ayrılması en az ve kıvamı en fazla olan örneğin %100 süttten oluşan örnek olduğu görülmüştür. Bu durumun, %100 süt olan örnekte transglutaminaz enzimi için iyi bir substrat olan kazeinin diğer örnekler göre daha fazla bulunmasıyla ve daha fazla çapraz bağların oluşabilmesiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Labne üretiminde 0-4 U/g protein oranlarında değişen transglutaminaz ilavesi yapılmıştır (Aloğlu ve Öner, 2013). Enzim oranı arttıkça labnenin sertliğinde de önemli bir artış olduğu gözlenmiştir. Ayrıca enzim ilaveli ürünlerin enzim ilavesiz kontrole göre kuru, pürüzsüz ve daha beyaz bir yüzeye sahip olduğu bulunmuştur.

Ayran üretiminde enzimle muamele edilmiş süttten geleneksel yöntemle üretilen ayran örneklerinde viskozitede önemli oranda artış ve serum ayrılmasında azalma belirlenmiştir (Şanlı ve diğ.,2011). Enzimin ayran örneklerinin kimyasal özellikleri ve aroma bileşenlerinde üzerine önemli bir etkisinin olmadığı bulunmuştur.

Edam peyniri üretiminde süte transglutaminaz enziminin oranda eklenmesinin, peynirin nem içeriğini artırarak peynir veriminin de %4 oranında artmasını sağlamıştır (Aaltonen ve diğ., 2014). Transglutaminaz enzimin kontrolü protein standardizasyon aşamasında enzim inaktive edilerek sağlanmıştır.

Dondurma üretiminde 4U/g yağ transglutaminaz enzimi eklenmesi sonucunda dondurmada hacim, yağ kümeleşmesi ve erimeye karşı direnç özelliklerinde önemli düzeyde artış olduğu bulunmuştur (Rossa ve diğ., 2012).

1.1.5 Süt proteinlerinin jelleşmesi ve transglutaminazın jelleşmeye etkisi

Sütün jelleşmesi asidifikasyon ve rennet enzimi ile olmak üzere iki yolla gerçekleşmektedir. Bu jeller kovalent olmayan zayıf bağlardan oluşur. Asidifikasyon ile jelleşmede ilk aşama, misellerdeki tüysü yapıların bozulup, κ -kazeinin nötralize olmasıdır. Asidifikasyon sırasında kalsiyum fosfat serbest kalır. Kazein molekülleri,

özellikle α - ve β -kazein miselden ayrılıp, izoelektrik noktaya yaklaştıkça pozitif yükü yüklenir ve negatif yüklü misel ile tekrar birleşir. Bu durum miselde bir elektrostatik etkileşime sebep olur ve protein jelleri oluşur (Fox ve Mulvihill, 1990).

Rennet enzimi ile jelleşmede enzimatik, agregasyon ve jelleşme aşamaları olmak üzere 3 farklı aşama mevcuttur. κ -Kazein rennet enzimi ile para- κ -kazein ve kazeinomakropeptid olarak iki kısma ayrılır. κ -Kazeinin %85'i enzim ile parçalandıktan sonra stabiliteleri bozulan kazein miselleri, iyon halinde Ca^{+2} varlığında birleşerek pıhtı oluştururlar. Kümeleşen kazein miselleri birleşmeye devam ederek daha büyük partikülleri oluştururlar. Kazeinin izoelektrik noktası olan 4,6-4,7'de kazein çöker ve süt tamamen pıhtılaşmış ve jelleşmiş olur (de Kruif ve diğ., 1992).

Transglutaminaz enziminin süt proteinlerinin reolojik özelliklerini herhangi bir olumsuz duruma sebebiyet vermeden geliştirdiği bildirilmektedir. Kazein jellerinin oluşmasında transglutaminaz enzimi ilavesi ile daha hızlı ve viskoz bir jelin oluştuğu bulunmuştur (Flanagan ve diğ., 2003).

Jel oluşumunda transglutaminaz enziminin kullanılması kovalent bağların oluşmasına olanak verdiğinden daha güçlü jel yapısı elde edilmesini sağlamaktadır. İstenen jel özelliklerinin elde edilmesinde sıcaklık, pH ve enzimle inkübasyon süresi en önemli parametrelerdir.

Transglutaminaz enzimi ile muamele edilen kazein misellerinin jel oluşturmasıyla ilgili bir çalışmada, transglutaminaz enzimi ilaveli jellerde daha viskoz ve güçlü yapı meydana geldiği bulunmuştur (Schorsch ve diğ., 2000). Ayrıca bu jellerde serum ayrılmasının olmadığı ve ürün işlenirken meydana gelen sıcaklık değişimlerinde kararlı bir yapı gösterdikleri bulunmuştur.

Kazein jelleri ile ilgili yapılan başka bir çalışmada, enzim ve protein konsantrasyonları, pH, asidifikasyon yöntemi ve jelleşme sıcaklığı gibi faktörlerin etkisi araştırılmıştır. Kazein misellerinin jelleşmesi 50°C'de 5,4 pH değerinin altında gerçekleşmiştir. Çapraz bağların oluşması, yavaş bir asidifikasyon işleminden sonra enzim ilavesi şeklinde yapılabileceği gibi, transglutaminaz enzimi ile 50°C'de ön inkübasyon sonrasında HCl ile asidifikasyon uygulamasıyla da elde edilebilir. İkinci durumda jel oluşum süresinin daha kısa ve jelin daha güçlü bir yapıda olduğu saptanmıştır. Ayrıca HCl ile asidifikasyon yerine GDL kullanılarak asidifikasyon

işleminin yapılmasında jelin sertliği üzerinde olumlu etkide bulunduğu gözlenmiştir (Schorsch ve diğ., 2000).

Enzim-substrat oranının iyi ayarlanması yeterli düzeyde çapraz bağların oluşması için önemlidir. Ancak fazla miktarda çapraz kovalent bağlar içeren bir jel daha iyi fiziksel özellikler göstermeyebilir. Jaros ve diğ. (2009) kazeinle yaptıkları çalışmada, belli bir düzeyde oluşan oligomerizasyonun jelde sertliği artırdığını, ancak %70'in üzerinde çapraz bağlanmanın daha zayıf jel oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Bunun sebebini, oluşan agregatların protein ağı oluşumunu engellemesi olarak açıklamışlardır. Jaros ve diğ. (2009) oluşan agregatlardaki çapraz bağların, misellerin yalnızca iç kısmında bulunduğunu ifade etmişlerdir. Ancak transglutaminaz enziminin, iyi bir ağ oluşumu için yüzeyde bulunan κ -kazein ile etkileşim halinde olması gerektiği bildirilmiştir. Dolayısıyla dimer, trimer gibi yapılar jelde reolojik özellikleri olumlu yönde etkilerken, daha büyük moleküllü agregatların jel oluşturmada daha kontrollü davranılması gerektiği sonucuna varmışlardır.

Jaros ve diğ. (2013) polimerleşme derecesine etki eden faktörler olan enzim ve substrat konsantrasyonlarından başka, sistemde başlangıçta var olan agregatların, kovalent bağların ve polimerleşmenin artmasına etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir. Sistemde önceden oluşturulan agregatlar arasında gerçekleşen kovalent bağların jel kalitesini artırdığını bildirmişlerdir. Transglutaminaz ile uzun süre inkübasyon uygulaması zayıf jellerin oluşumuna sebep olduğundan, başlangıçta sistemdeki agregat boyutu ayarlanarak istenen sertlikte bir jel elde edilebileceği bulunmuştur (Jaros ve diğ., 2013).

Lauber ve diğ. (2000) 3 U/g protein mikrobiyal transglutaminaz kullandıkları çalışmalarında, 60 dakikalık inkübasyon süresine kadar kazein oligomerizasyonu ile jel sertliğinde doğru orantılı bir artış gözlemlemişlerdir. Ancak daha uzun inkübasyon süresinde, oligomerizasyon derecesi ve jelin sertliğinde bir artış görülmemiştir.

Jong ve Koppelman (2002) transglutaminaz enzimi muamele edilmiş, çapraz bağlar içeren %10'luk β -kazein çözeltisine daha sonra ısı uygulamışlardır. Bu şekilde transglutaminaz enziminin inkübasyon süresi uzamış, oluşturulan jelde enzimsiz kontrol jelin yapısına göre daha zayıf bir yapı elde edilmiştir. Bunun sebebini de

büyük oligomerlerin oluşup homojen bir protein ağının elde edilmesini engellemeleri olarak açıklamışlardır.

Jaros ve diğ. (2010) kazeinde 3 U/g protein transglutaminaz kullanarak yaptıkları çalışmada 40°C’de 3 saat inkübasyon süresine kadar jel sertliğinde artma gözlemişlerdir. Ancak bundan sonra artan sürede jel sertliği azalmıştır.

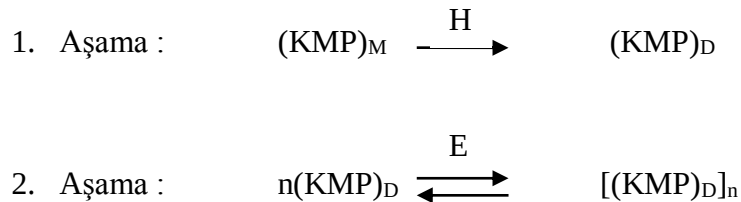
Nio ve diğ. (2014)’nin jelleşmeye protein konsantrasyonunun etkisini gözlemlemek için yaptığı çalışmada, kazein ve soya globulinleri farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. α -Kazeinde %2 konsantrasyonda jelleşme görülmezken, %3’lük α -kazein çözeltisinde sıkı bir jel oluşumu gözlenmiştir. Substrat olarak soya globulinleri kullanıldığı zaman ise %5’lik protein çözeltisinde jelleşme oluşmamış ancak % 8’lik çözeltide jelleşme oluşumu gözlenmiştir.

Protein konsantrasyonu ile alakalı yapılan başka bir çalışmada %1,5’in altında hazırlanan kazein çözeltilerinde jel oluşumu gözlenmediği bildirilmiştir (Schorsch ve diğ., 2000).

Rennet enzimi ile oluşan jellerde transglutaminaz kullanımında enzimin ilave edildiği zamanın önemli olduğu bildirilmiştir. Yüksel ve diğ.(2011) rennet jeli ile yaptıkları çalışmada transglutaminaz enzimini rennet ilavesinden önce, rennet ilavesiyle aynı anda ve ilave sonrasında olmak üzere 3 farklı aşamada eklemişlerdir. En iyi sonuç transglutaminaz enziminin rennet eklenmesinden 5 dk sonra ilave edilmesi durumunda elde edilmiştir. Bu örnekte su tutma kapasitesi ve rennet jeli sertliğinin en fazla olduğu da tespit edilmiştir. Transglutaminaz enziminin rennet enziminden önce ilave edilmesi rennet jelinin oluşmasını engellemiştir.

1.1.5.1 KMP’nin jelleşmesi

Literatürde KMP’nin jelleşmesinin iki aşamadan oluştuğu belirtilmektedir (Martinez ve diğ., 2011). Bu aşamalar Resim 1.3’te verilmiştir.



Resim 1.3: KMP’nin jelleşme aşamaları. Semboller: **H**: hidrofobik etkileşimler, **E**: elektrostatik etkileşimler, **(KMP)_M**: KMP monomerleri, **(KMP)_D**: KMP dimerleri, **[(KMP)_D]_n**: KMP polimerleri (Martinez ve diğ., 2011).

İlk aşama KMP'nin sıcaklık ve pH uygulamasıyla monomer halden dimer hale gelmesidir. İkinci aşama ise, dimer yapıların elektrostatik etkileşimler sonucunda polimer yapılar oluşturmalarıdır. İkinci aşamadaki tepkimeler geri dönüşümlüdür. (Resim 1.3)

KMP dimerleri 4,5-6,5 pH'da negatif yüklüdür (Martinez ve diğ., 2011). Glikozilasyon ile pH 4,5'un altında KMP pozitif yükle yüklenmeye başlar. pH 4'ün altında ise tüm KMP'ler pozitif yükle yüklenir. pH 3,15'te KMP pozitif yüklüdür. Pozitif yüklü KMP, GMP içeren negatif yüklü dimerlerle etkileşir ve güçlü bir elektrostatik etkileşim ortaya çıkar. pH 3,1'in altında GMP içeren dimerler de pozitif yüklenirler ancak bu değer altında etkileşimler azalır. Bu pH değeri altında oluşan jellerin elastikiyet özelliği de azalır. Bu interaksiyon sialik asidin izoelektrik noktası olan pH 2,2'ye kadar devam eder (Martinez ve diğ., 2011).

Farias ve diğ. (2010) KMP'nin jelleşmesiyle alakalı yaptıkları çalışmada 25°C'de %3-10 protein konsantrasyonunda çalışmışlardır. Jelleşme için minimum konsantrasyonun pH değerine bağlı olduğunu bildirmişlerdir. pH 3-3,5'ta jelleşme konsantrasyonunun %3 olduğunu belirlemişlerdir. Bu konsantrasyonda jelleşme 150-370 saatte gözlenmiştir. pH 4'ün üzerinde %3-10 konsantrasyonlarda jelleşme gözlenmemiştir.

Başka bir çalışmada, %9,3 KMP konsantrasyonunda 20°C'de pH 4,5'ta jelleşme olduğu ifade edilmiştir (Burtan ve Skudder,1987).

Martinez ve diğ. (2011) %12 KMP konsantrasyonu, oda sıcaklığı ve 70°C'de çalışmışlardır. Oda sıcaklığında yapılan jelleşmeye göre 70°C'de jelleşme süresinin pH 3,5'tan 2'ye doğru azaltıldıkça kısaldığını gözlemlemişlerdir. 70°C'de jel sertliğinin en fazla olduğu pH değerleri ise 3 ve 3,5 olarak bulunmuştur.

Transglutaminaz enziminin KMP üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Tolkach ve Kulozik, 2005). KMP'nin peyniraltı suyunda bulunan diğer proteinlerden ayrılması için KMP transglutaminaz enzimi ile polimerize edilmiş ve mikrofiltrasyon ile diğer serum proteinlerinden ayrılmıştır.

Literatürde transglutaminaz enziminin KMP'nin jelleşmesine etkisi konusunda yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, KMP'nin jelleşme özelliklerine pH ve transglutaminaz enziminin etkisi araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

Transglutaminaz enzimi olarak Activa MP (Ajinomoto Foods Europe, Paris, Fransa) kullanılmıştır. Üretici bilgilerine göre bu üründe 100 U/g aktivitede transglutaminaz bulunmaktadır. Üretici firmaya göre, enzim ürünün ağırlıkça %1'ini oluşturmakta ve içeriğinde ayrıca maltodekstrin de bulunmaktadır.

Kazeinomakropeptid (Lacprodan CGMP-10, Arla Food Ingredients, Danimarka) toz halinde temin edilmiştir. Çözeltiler deiyonize saf su ile hazırlanmıştır.

2.2 Metod

2.2.1 Kazeinomakropeptidin bileşiminin belirlenmesi

Kazeinomakropeptidin kuru madde içeriği 1 g örnek alınarak vakumlu etüv yöntemiyle 70°C'de belirlenmiştir. Kül içeriği 1 g örnek kullanılarak 550°C'de yakma işlemi yapılarak belirlenmiştir. Protein tayini Kjeldahl yöntemi kullanılarak yapılmıştır. KMP'den 0,25 g örnek alınarak 12 g potasyum sülfat, 0,05 g bakır sülfat ve 20 mL sülfürik asit varlığında yakma işlemi yapılmıştır. Örnek yerine 1 g sukroz kullanılarak kör deneme yapılmıştır. Yakma işleminde 150°C'den başlanarak, sıcaklık yaklaşık her yarım saatte bir 50°C olacak şekilde kademeli olarak 430°C'ye kadar artırılmıştır. Sıcaklık 430°C'ye geldikten ve tüplerin içerisindeki sıvı berrak bir hal aldıktan sonra, 430°C'de 1 saat daha yakmaya devam edilmiştir. Örnekler oda sıcaklığına soğutulduktan sonra distilasyon işlemi için örneklerle 30 mL saf su ve 65 mL %40'luk (w/v) NaOH eklenmiştir. Kondensat 50 mL %4 (w/v) borik asit çözeltisi 1 damla metil kırmızısı (0,2g/100 mL %95'lik etanolde) ve 5 damla bromokresol yeşili (0,167 g/100 mL %95'lik etanolde) içeren 250 mL'lik erlen de 150 mL hacim elde edilene kadar toplanmıştır. Titrasyon aşamasında 0,1 N HCl kullanılmıştır. Örneklerdeki toplam azot, kullanılan HCl hacminden kör denemede harcanan asit

hacmi çıkarılarak hesaplanmıştır. Toplam azotun toplam proteine dönüştürülmesinde 6,38 faktörü kullanılmıştır.

2.2.2 KMP'nin yüzey hidrofobisitesinin belirlenmesi

KMP'in yüzey hidrofobisitesi ANS floresan probu kullanılarak belirlenmiştir (Alizadeh-Pasdar ve Li-Chan, 2000; Wang ve diğ., 2013). KMP çözeltileri %0,001-0,1 konsantrasyonda 0,01 N HCl ya da NaOH kullanılarak 2,5, 3,5 ve 7 pH değerlerinde hazırlanmıştır. ANS çözeltisi 3 mM konsantrasyonda fosfat tamponu (pH 7) içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler ve ANS çözeltisi önce 15 dk manyetik karıştırıcıda, daha sonra ise ultrasonik banyoda 15 dk olmak üzere karıştırılmıştır. KMP çözeltileri yaklaşık 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. KMP çözeltisine (10 mL) 50 µL ANS çözeltisi eklenmiş ve karışım 15 dk karanlıkta oda sıcaklığında bekletilmiştir. KMP örneklerinin ve örnek-ANS karışımlarının floresan şiddeti floresan spektrofotometre (LS 55, Perkin Elmer, ABD) ile belirlenmiştir. Spektrofotometrede okuma yapılırken uyarı ve emisyon dalga aralık değerleri 5 nm olarak ayarlanmıştır. Uyarı dalga boyu değeri 390 nm'ye, emisyon dalga boyu değeri ise 480 nm'ye ayarlanarak örneklerin floresan şiddeti okunmuştur. Floresan spektrofotometrede meydana gelebilecek değişimlerin düzeltilmesi için her okuma sırasında 10 mL metanol ve 50 µL ANS çözeltisi karışımının floresan değeri belirlenmiş ve bu değer kullanılarak örnek değerleri standardize edilmiştir. Her bir KMP-ANS karışımının floresan şiddetinden karşılık gelen konsantrasyonda KMP çözeltisinin floresan şiddeti ve tampon-ANS çözeltisinin floresan şiddeti çıkarılarak net floresan şiddeti belirlenmiştir. Net floresan şiddeti değerleri protein konsantrasyonuna göre grafiğe geçirilmiş ve doğrusal ilk kısmın eğimi yüzey hidrofobisite değeri (S_0) olarak belirlenmiştir.

2.2.3 Transglutaminaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Transglutaminaz enziminin aktivitesinin belirlenmesinde Folk ve Cole (1966)'nin metodu kullanılmıştır. Reaksiyon kokteylinin hazırlanmasında 120 mg karbobenzoksil-L-glutaminilglisin reaktifine 2 mL 1 M Tris tampon çözeltisi (asetik asitle pH 6) ve 5 mL 0,2 M Hikroksilamin ve 0,02 M Glutatyon çözeltileri karışımı eklenmiştir. Tekrar karıştırılıp NaOH çözeltisi ile pH 6'ya ayarlanmıştır. Karışımın son hacmi distile su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Transglutaminaz enziminin 2U/mL çözeltisi kullanılmıştır. Enzim çözeltisinden 0,03 mL alınarak 0,2 mL

reaksiyon kokteyli ile karıştırılmış ve karışım 10 dakika 37°C’de inkübe edilmiştir. Reaksiyonun durdurulması için 0,5 mL %12’lik (w/v) TCA ve 0,5 mL %5 (w/v) FeCl₃ çözeltileri eklenmiştir. Enzim ve reaksiyon kokteyli kullanılarak inkübasyon yapılmadan reaksiyon hemen durdurularak enzim körü hazırlanmıştır. Standart olarak 0,1 mL L-Glutamik asit γ -mono hidroksimat çözeltisi kullanılmıştır. Standart yerine 0,1 mL distile su kullanılarak standart körü hazırlanmıştır. Örnekler ve körler karıştırılarak 5 dakika santrifuj edilmiştir. Örneklerin absoransı 525 nm’de spektrofotometre (UV-1700, Shimadzu, Japonya) ile ölçülmüştür.

Standardın sönümlleme katsayısı (E_{standart}) ve aşağıdaki formül kullanılarak hesaplama yapılmıştır:

$$\text{Ünite/mg enzim} = (A_{\text{örnek}} - A_{\text{örnek körü}} - A_{\text{enzim körü}}) \times 1,23 / (E_{\text{standart}} \times \text{mg}_{\text{enzim}} \times 10)$$

2.2.4 KMP’nin transglutaminaz enzimi ile çapraz bağlanması

KMP çözeltileri deiyonize saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Çözelti önce manyetik karıştırıcıda 15 dk, daha sonra ultrasonik karıştırıcıda 15 dk olmak üzere karıştırılmış ve bir gece oda sıcaklığında bekletilmiştir. Transglutaminaz enzimi 1, 8, 20 ve 60 U/g KMP olacak şekilde eklenmiştir. Karışım sürekli karıştırılarak 40°C’de su banyosu içerisinde 2 saat tutulmuştur. Enzim reaksiyonu sırasında farklı zamanlarda örnek alınarak enzim inaktivasyonu yapılmıştır. Enzimin inaktivasyonu 80°C’de 2 dk bekletilerek sağlanmıştır. İşlem sonrası örnekler, buzlu suda 5 dk soğutulmuştur. Örneklerdeki serbest KMP konsantrasyonu Thoma-Worringer ve diğ. (2006) yöntemi kullanılarak ters faz-HPLC yöntemi ile belirlenmiştir.

Ters faz-HPLC analizinde mobil faz olarak trifloroasetik asidin sulu çözeltisi (%0,1, v/v) ve trifloroasetik asidin asetonitril-su (800:200,v/v) karışımındaki çözeltisi (%0,055, v/v) A ve B çözgeni olarak gradiyen akış koşullarında kullanılmıştır. Gradiyen akış programı olarak B çözgeni için 0 dk-%10, 0-17 dk %49, 17-22 dk %52, 22-25,5 dk %55, 25,5-30,5 dk, 10 dk %100 olarak yürütülmüştür. Protein ve türevlerinin ayrılmasında HPLC sistemi (Waters, Milford, MA, ABD) ve PLRP-S kolonu (300 Å, 8 μ M, 250×4,6 mm, Agilent, ABD) 40°C’de 1 mL/dk akış hızında kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi olarak 20 μ L kullanılmıştır. Piklerin belirlenmesi için PDA (Waters 2996, Milford, ABD) detektörü ile 226 nm’de absorans okuması yapılmıştır. Örneklerde enzim reaksiyonu sonrasında kalan serbest KMP miktarı,

enzimli örnekte bulunan KMP pik alanının enzimsiz örnekte bulunan KMP pik alanına göre yüzde olarak ifade edilmiştir.

KMP'nin transglutaminaz ile polimerize edilip edilmediği SDS-PAGE yöntemi ile belirlenmiştir. KMP'nin %0,5 konsantrasyonda çözeltileri kullanılmıştır. KMP çözeltisinin hazırlanmasında distile su kullanılmış, önce manyetik karıştırıcıda ve daha sonra ultrasonik karıştırıcıda 15'er dk olmak üzere karıştırma yapıldıktan sonra 1 gece buzdolabı sıcaklığında bekletme yapılmıştır.

Elektroforez yönteminde %15'lik yürütme jeli ve %4'lük sıralama jeli konsantrasyonları kullanılmıştır (Çizelge 2.1). Jellerin hazırlanmasında distile suya sırasıyla Tris tamponu, SDS ve akrilamid eklenmiş, son olarak APS ve TEMED aynı anda karışıma eklenmiştir. Yürütme jeli döküldükten sonra düzgün şekil alması için izopropanol ile kuruyana kadar bekletilmiştir. Sonrasında sıralama jeli dökülmüştür.

Çizelge 2.1: SDS jellerinin bileşimi.

	Yürütme (%15)	Sıralama (%4)
dH ₂ O	2,85 mL	3,15 Ml
%40 Akrilamid	3 mL	0.50 Ml
1,5 M Tris (pH: 8,8)	2 mL	-
1 M Tris (pH: 6,8)	-	1,25 Ml
%10 SDS	80 µL	50 µL
APS (%10)	80 µL	50 µL
TEMED	8 µL	5 µL

Örnekler 21 µL hacimde 7 µL Laemmli tamponu ile karıştırılmış, %5 β-merkaptoetanol ve DTT indirgeyici maddeleri eklenmiştir. Laemmli tamponu 4x olacak şekilde kullanılmıştır. Laemmli tamponu 60 mM Tris-HCl pH 6,8, %2 SDS, %10 gliserol, %5 β-merkaptoetanol, %0,01 bromofenol mavisi kullanılarak hazırlanmıştır.

Örnekler 95°C'de 15 dk denatüre edilmiştir. Protein standartları olarak 14,4-116 kDa aralığında (SM0431, Fermentas, Waltham ABD) standardı 95°C'de 5 dk denatüre edilmiştir. Yürütme işlemi elektroforez cihazıyla (Mini-V 8.10, Whatman,

Maidstone, UK), sıralama kısmında 30 V ve yürütme kısmında ise 100 V uygulanarak yapılmıştır.

Jelin boyanmasında %0,1'lik Coomassie mavisi çözeltisi kullanılmış ve çalkalayıcıda 1 gece boyunca boyama işlemi sürdürülmüştür. Boyama işleminden sonra jel, fazla boyanın uzaklaştırılması için %10 asetik asit içeren çözeltiye alınmıştır. Yaklaşık 45 dk çalkalayıcıda bekletildikten sonra görüntü alma işlemi Densitometre (GS-800, Biorad, ABD) ve PDQuest programı (7.4.0, Biorad, ABD) ile yapılmıştır.

2.2.5 KMP'nin jelleşme özelliklerinin belirlenmesi

KMP'nin jel oluşturması için gerekli minimum konsantrasyon %20 (w/v) olarak bulunduğundan ölçümlerde bu konsantrasyon kullanılmıştır. Enzimli (1 ve 20 U/g KMP) ve enzimsiz örnekler yukarıda bahsedildiği şekilde hazırlanmıştır. Enzimsiz örneklerin pH'sı 4 N HCl kullanılarak 3,0-6,7 arasında değerlere ayarlanmıştır. Enzimli örnekler 40°C'de su banyosu içerisinde 2 saat tutulduktan sonra buzlu su banyosunda soğutulmuştur. Bu örneklerin pH değerleri 3 ve 4,5'e ayarlanmış ve reolojik ölçümlere kadar buzlu su banyosunda tutulmuşlardır.

Örneklerin jelleşme özellikleri reometre (Rheostress1, Thermo-Haake, Almanya) kullanılarak belirlenmiştir. Ölçümler 35 mm çapında konik plaka sensörü (CP35mm-2°Ti, Thermo-Haake, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Reolojik ölçümler lineer viskoelastik bölgede yapılmıştır. Örneklerin analizi sırasında su kaybının önlenmesi için plakanın kenarları parafin yağı ile kaplanmıştır. Örneklerde 25-90°C aralığında 0,0001 kayma gerinimi ve 0,1 Hz frekansta sıcaklık taraması yapılarak jelleşme sıcaklığı belirlenmiştir. Örnek daha sonra 90°C'de 30 dk tutulmuş, 25°C'ye 5 dk içinde soğutulmuş ve 25°C'de 10 dk tutularak jelleşmenin devam edip etmediği izlenmiştir. Jelleşmenin olduğu sıcaklık elastik modül (G') değerinin viskoz modül (G'') değerini geçtiği sıcaklık olarak belirlenmiştir. Kayma stresi taraması için, 10 mL KMP çözeltisi örneği 70 veya 90°C'de su banyosunda 30 dk bekletilip buzlu su banyosunda soğutularak jelleştirilmiştir. Elde edilen jellerden örnek alınarak 0,1 Hz frekansta 25°C'de 0-1000 Pa arasında kayma stresi taraması yapılarak kırılma stresi belirlenmiştir. Jel sertliği değeri olarak ölçülen en yüksek G' değeri alınmıştır. Jel örneklerinde ayrıca 0,0001 kayma geriniminde 25°C'de 0,1-100 Hz aralığında frekans taraması yapılarak zamana bağlı dayanıklılık belirlenmiştir.

2.2.5.1 İstatiksel analizler

Denemeler ve ölçümler en az iki tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Uygulanan işlemlerin ölçülen özelliklere etkilerinin belirlenmesinde tek yollu Anova analizi kullanılmıştır (SPSS 10, A.B.D.). Ortalamalar arasındaki farklılıklar Tukey testi ile 0,05 önem düzeyinde belirlenmiştir.



3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 KMP'nin bileşiminin belirlenmesi

KMP örneğinin bileşimi Çizelge 3.1'de verilmiştir. Bulunan değerler üretici firma tarafından bildirilen değerlere yakın bulunmuştur. KMP örneğinde KMP dışında β -laktoglobulin, α -laktalbumin, bovin serum albumin gibi diğer peyniraltı suyu proteinleri bulunmaktadır. Ayrıca laktoz da bulunmaktadır.

Çizelge 3.1: KMP'nin bileşimi.

Bileşen	Oran (% , kütlece)
Protein	80,4
KMP	63,2*
Kuru madde	4,9
Kül	5,3

*Üretici firma tarafından bildirilen değer.

3.2 KMP'nin Yüzey Hidrofobisitesi

KMP örneğinin yüzey hidrofobisitesi pH değeri arttıkça azalmıştır (Çizelge 3.2). Bunun sebebinin molekülde bulunan hidrofobik bölgelerin birbiri ile bağlanması ve kapanması sonucunda ANS probunun bu bölgelere erişememesi olduğu düşünülmektedir. Martinez ve diğ. (2011) çalışmalarında KMP'nin pH 2,5 değerinin altında ve 6,5 değerinin üstünde monomer halde olduğunu bildirmişlerdir.

Çizelge 3.2: KMP'nin farklı pH değerlerindeki hidrofobisitesi.

pH	Hidrofobisite katsayısı (S_0)
2,5	10176 $\pm$ 53
3,5	2347 $\pm$ 285
6,7	208 $\pm$ 5

Das ve Kinsella (1989) β -laktoglobulin ile 2,8,4,3, 5,0, 7,6 ve 9,7 pH değerlerinde yaptıkları çalışmada en fazla hidrofobisitenin 2,8 değerinde olduğunu, pH arttıkça hidrofobisitenin azaldığını bulmuşlardır Shimizu ve diğ. (1985) de β -laktoglobulinin hidrofobisitesinin en yüksek pH 3'te olduğunu gözlemlemişlerdir. Alizadeh-Pasdar ve Li-Chan (2000) β -laktoglobulinin hidrofobisite değerlerinin 3 ve 9 pH değerlerinde 5 ve 7 pH değerine göre daha fazla olduğunu gözlemişlerdir.

3.3 Transglutaminaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

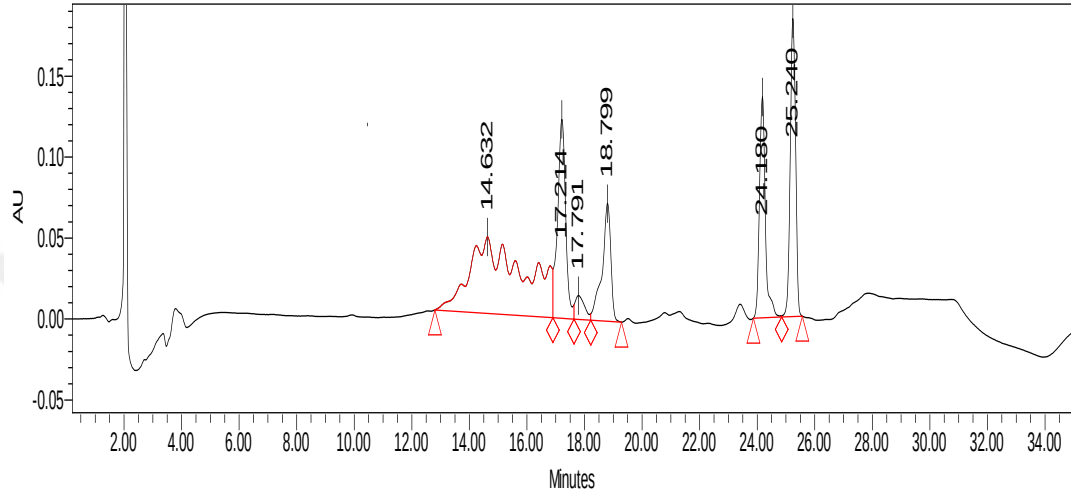
Transglutaminaz aktivitesinin belirlenmesinde, 1 Ünite transglutaminaz enziminin, pH 6'da 37°C'de karbobenzoksil-L-glutaminilglisin ve hidroksilaminden dakikada 1 μ mol L-Glutamik asit γ -mono hidroksimat oluşturmaya prensibine dayanan yöntem uygulanmıştır. Yönteme göre transglutaminaz enzim aktivitesi 109 ± 20 U/g olarak bulunmuştur. Bu değer üretici firmanın bildirdiği yaklaşık 100 U/g değerine yakındır. Bu çalışmada bulunan transglutaminaz enzim aktivitesi bir çok çalışmadaki sonuçlarla da örtüşmektedir. Jaros ve diğ. (2010) enzim aktivitesini 100 U /g olarak bulmuşlardır. Wang ve diğ. (2013) yaptıkları çalışmada enzim aktivitesini 102 U/g şeklinde bulmuşlardır.

3.4 KMP'nin Transglutaminaz ile Çapraz Bağlanması

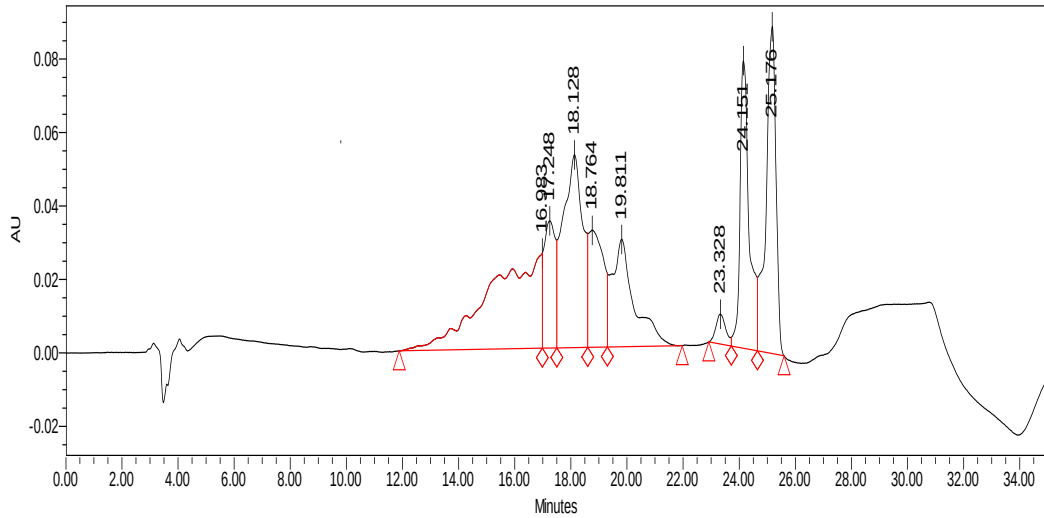
KMP'nin transglutaminaz ile çapraz bağlanma reaksiyonu farklı konsantrasyonlarda KMP ve enzim kombinasyonlarında ve farklı sürelerde denemeler yapılarak karakterize edilmeye çalışılmıştır. Reaksiyondan sonra ortamda kalan serbest KMP oranı çapraz bağlanma düzeyini ifade etmek için kullanılmıştır. KMP ters faz-HPLC analizinde 4 adet pik göstermektedir (Şekil 3.1a). Bunlar kullanılan Thoma-Worringer ve diğ. (2006) yöntemine göre GMP1-KMP1-GMP2-KMP2 olarak adlandırılmışlardır. Enzim reaksiyonu sırasında KMP molekülleri çapraz bağlandıkça pikler küçülmüş ve birbirlerine yaklaşmışlardır (Şekil 3.1b). Bu durumda serbest KMP oranını belirlemek için alanın kullanımı yanlış sonuçlar vermiştir. Bu nedenle piklerin yüksekliği serbest KMP oranını belirlemek için esas alınmıştır. Yüksekliği takip edilebilen iki büyük pikin, KMP1 ve KMP2, yükseklikleri serbest KMP oranını belirlemek için kullanılmıştır (Şekil 3.1). Her iki KMP için enzim reaksiyonundan

sonra elde edilen pik alanı başlangıç pik alanına bölünerek %Serbest KMP oranı hesaplanmıştır.

a)



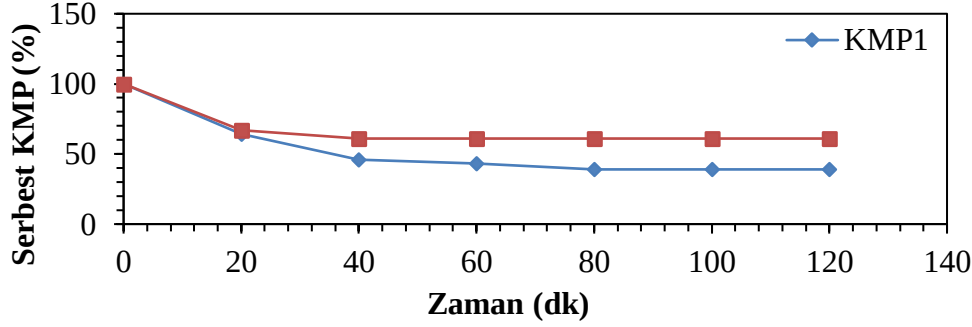
b)



Şekil 3.1: KMP'nin transglutaminaz enzimi ile çapraz bağlanması sonucunda ortamda kalan serbest KMP ve diğer proteinler. a) Enzimsiz %0,5 KMP, b) 60 U/gKMP transglutaminaz ile 60 dk muamele edilmiş %0,5 KMP. Enzimsiz olan kromatogramda soldan sağa: GMP1, KMP1, GMP2, KMP2, β -laktoglobulinA-B.

Enzim reaksiyonunun zamana bağımlılığını belirlemek için %0,5 KMP 60 U/g KMP transglutaminaz enzimi ile 2 saat süresince muamele edilmiştir. Bu denemede ortamdaki serbest KMP oranının ilk 20 dakikada yüksek düzeyde değiştiği daha sonra 60 dakikaya kadar da bir azalma olduğu ve bu zamandan sonra sabit kaldığı

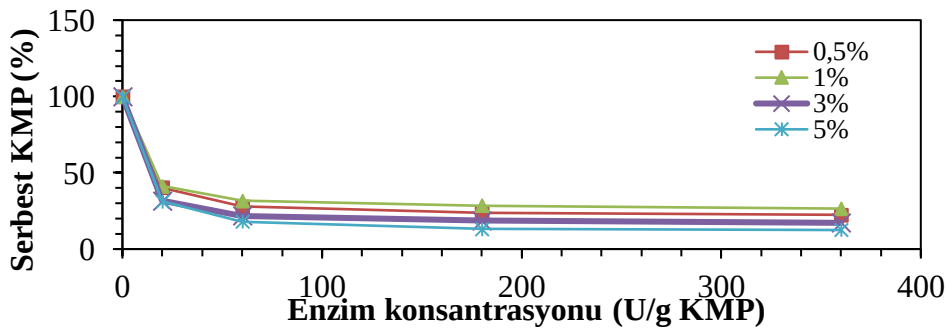
tespit edilmiştir. Transglutaminaz enzimi KMP1'i %60 düzeyinde, KMP2'yi ise %40 düzeyinde çapraz bağlamıştır (Şekil 3.2). Benzer sonuçlar Tolkach ve Kulozik (2005) tarafından da bildirilmiştir. Bu denemeye dayanarak enzim reaksiyonu süresi 60 dakika olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.2: %0,5 konsantrasyonda KMP'nin 60 U/gKMP oranında transglutaminaz ile zamana bağlı olarak reaksiyonu sonucunda ortamda kalan serbest KMP1 ve KMP2 miktarları.

Farklı başlangıç konsantrasyonlarında KMP ile yapılan denemelerde transglutaminazın 60 dk sonunda benzer düzeyde çapraz bağlama düzeyine sebep olduğu bulunmuştur (Şekil 3.2a ve b). Her KMP konsantrasyonunda enzim konsantrasyonu 20 U/g KMP olduğunda serbest KMP oranında ani bir azalma gözlenmiş, 60 U/g KMP oranında azalma devam etmiş ve daha yüksek enzim konsantrasyonlarında çok az değişmiştir. Bulunan sonuçlar enzimin düşük konsantrasyonlarda etkili olduğunu göstermiştir. Bu nedenle daha sonraki enzim denemelerinde en yüksek 20 U/g KMP transglutaminaz enzimi kullanılmıştır. Ayrıca enzimlerin bir gıda bileşeni olarak üretim maliyetlerinin ve dolayısıyla fiyatlarının yüksek olması az kullanılmalarını gerektirmektedir.

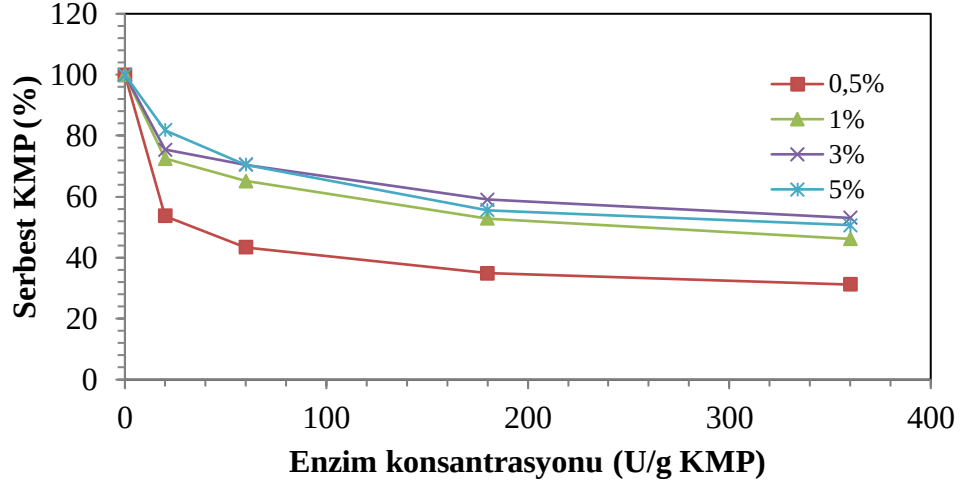
a)



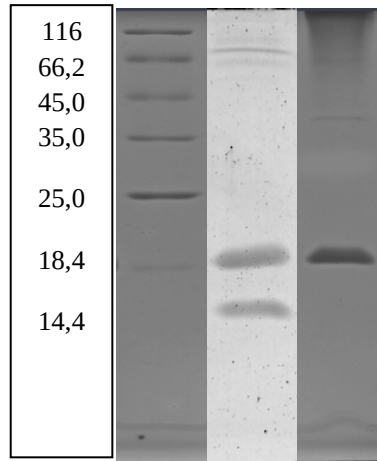
Şekil 3.3: Farklı konsantrasyonlarda KMP'nin farklı konsantrasyonlarda transglutaminaz ile 60 dk reaksiyon sonrasında ortamda kalan serbest KMP miktarı. a) KMP1, b) KMP2.

Şekil 3.3(devamı):

b)



SDS-PAGE analizinde de, KMP örneğinde β -laktoglobulin (18 kDa), α -laktalbumin (14 kDa), bovin serum albumin (66 kDa) varlığı tespit edilmiştir (Resim 3.1). KMP ve türevleri hem miktarlarının çok az olması ve peptidlerin kullanılan boya ile tam olarak boyanamaması sebepleriyle tam olarak ayırt edilememiştir. KMP'nin moleküler kütesinin 7-9 kDa aralığında olduğu bildirilmektedir (Mikkelsen ve diğ., 2005). Ayrıca pH 6,5 altında dimer ve agregat oluşturduğu bildirilmektedir (Martinez ve diğ., 2011). Dimer veya polimer oluşturma durumunda KMP bantlarının β -laktoglobulin veya α -laktalbuminin bantlarıyla çakışmaları da söz konusu olabilir.



Resim 3.1: KMP örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü. Soldan sağa : Standartlar, %0,5 KMP, 60 U/gKMP transglutaminaz ile 60 dk muamele edilmiş %0,5 KMP.

Mikkelsen ve diğ. (2005) KMP'nin tetramerik, dimerik ve monomerik formlarının moleküler kütlelerini sırasıyla 35, 18 ve 9 kDa olarak bulmuşlardır.

Rojas ve diğ. (2013) kullandıkları KMP örneğinde 14, 20, 41 kDa molekül ağırlıklarında bantlar gözlemlenmiştir. Bu bantların KMP'nin sırasıyla dimer, trimer ve oligomer formlarının olduğunu bildirmişlerdir. Bantların tam olarak ayırt edilebilmesi için farklı boya kullanımı ile detaylı analizlerin yapılması gerekmektedir.

Resim 3.1'de 60 U/g KMP transglutaminaz enzimi uygulandığında 14,4 kDa civarındaki piklerin kaybolduğu ve 66 kDa ve üzerindeki piklerin arttığı gözlenmiştir. Bu durum transglutaminaz enzimi ile çapraz bağlanma sonucunda yüksek molekül ağırlıklı polimerlerin oluştuğunu göstermiştir.

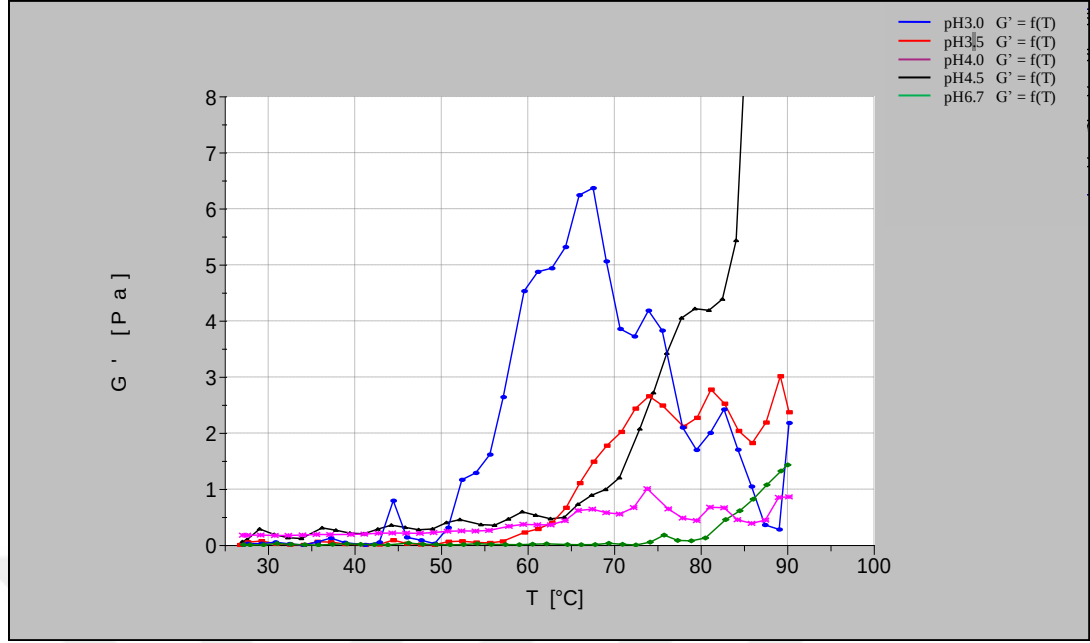
3.5 KMP'nin Jelleşme Özellikleri

3.5.1 Enzim ilavesiz KMP'nin jelleşme özellikleri

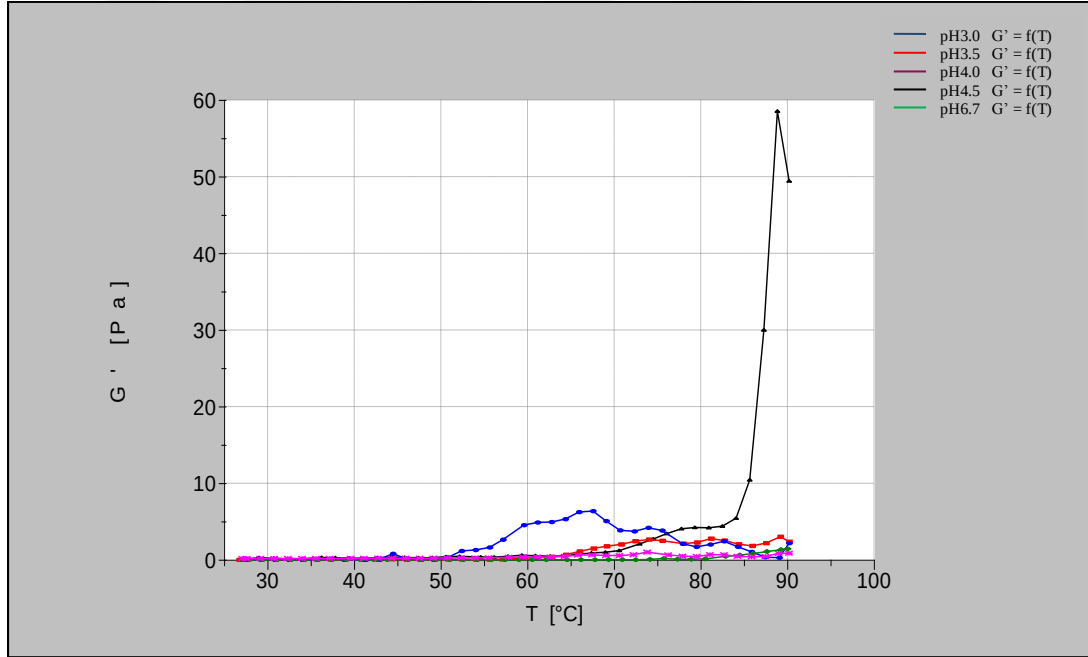
KMP %20 konsantrasyonda hazırlanarak reometrede sıcaklık taramasına tabi tutulmuştur (Şekil 3.4). Jel oluşumu sırasında G' değerinin G'' değerini geçtiği sıcaklık jelleşme sıcaklığı olarak belirlenmiştir. G' değerinin 25°C 'den 90°C 'ye ısıtma sırasında yükseldiği, 90°C 'de tutma ve 25°C 'ye soğutma aşamalarında da sürekli yükseldiği gözlenmiştir. En sert jelin β -laktoglobulin ve α -laktalbuminin izoelektrik noktalarına yakın pH 4,5'te elde edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu iki proteinin denatürasyon sıcaklığı 70°C 'nin üzerindedir. Bu nedenle bu iki proteinin de jel sertliğine katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

Martin-Diana ve diğ. (2006) de KMP'nin pH 7'de jel oluşturduğunu, jel sertliğinin 90°C 'ye ısıtma sırasında yükseldiğini bildirmişler, G' değerinde ikinci bir yükselme görmüşlerdir. Martinez ve diğ. (2011) ise KMP'nin %12 konsantrasyonda pH 4,5 ve üzerinde jel oluşturmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada pH 4,5'te ve pH 6,7'de jelleşme gözlenmiştir. pH 6,7'de oluşan jelin diğer pH değerlerinde elde edilenlere göre daha zayıf olduğu bulunmuştur.

a)



b)



Şekil 3.4: KMP'nin %20 konsantrasyonda farklı pH değerlerinde sıcaklık taraması grafikleri. a) Yakınlaştırılmış grafik, b) Tüm grafik.

KMP'nin jelleşme sıcaklığı pH'ya bağlı olarak değişmiştir. pH değeri düştükçe jelleşme sıcaklığında düşüş gözlenmiştir. Jelleşme sıcaklığı G' değerinin 0,5-1 Pa değerini geçtiği sıcaklık olarak da bildirilmektedir. O nedenle bu sıcaklık değerleri de Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3: KMP'nin %20 konsantrasyonda farklı pH değerlerinde jelleşme sıcaklığı.

pH	Jelleşme sıcaklığı (°C)	T (°C)	T (°C)
		@ G'>0,5 Pa	@ G' > 1 Pa
3,0	57	51	52
3,5	65	64	66
4,0	.*	65	.***
4,5	66	66	69
6,7	73	83	87

*Başlangıçta G' değeri G'' değerinden yüksek, jelleşme ölçümünden önce olmuş.

**G' değeri 1 Pa'ı geçmemiş.

KMP'nin ısıtma ve soğutma sonrasındaki elastik modül değerleri Çizelge 3.4'de verilmiştir. En yüksek G' değerleri pH 4,5'te, en düşük G' değerleri ise pH 6,7'de elde edilmiştir. Genel olarak ısıtma ve soğutma sırasında jelleşme devam etmiştir. Sadece pH 3,5'te G' değerinde 90°C'den 25°C'ye soğutma sırasında düşüş gözlenmiştir. Bunun sebebi de jelin zayıf olması olabilir.

Çizelge 3.4: KMP'nin %20 konsantrasyonda farklı pH değerlerinde sıcaklık taraması sonuçları.

pH	G' _{90°C} (Pa)	G' _{90°C,30dk} (Pa)	G' _{25°C} (Pa)	G' _{25°C,10dk} (Pa)
3,0	2,2	63,4	234,4	180,7
3,5	3,0	1109,9	254,2	232,9
4,0	0,9	95,6	326,1	264,0
4,5	58,5	1279,0	2262,0	1490,0
6,7	1,4	33,7	94,4	62,6

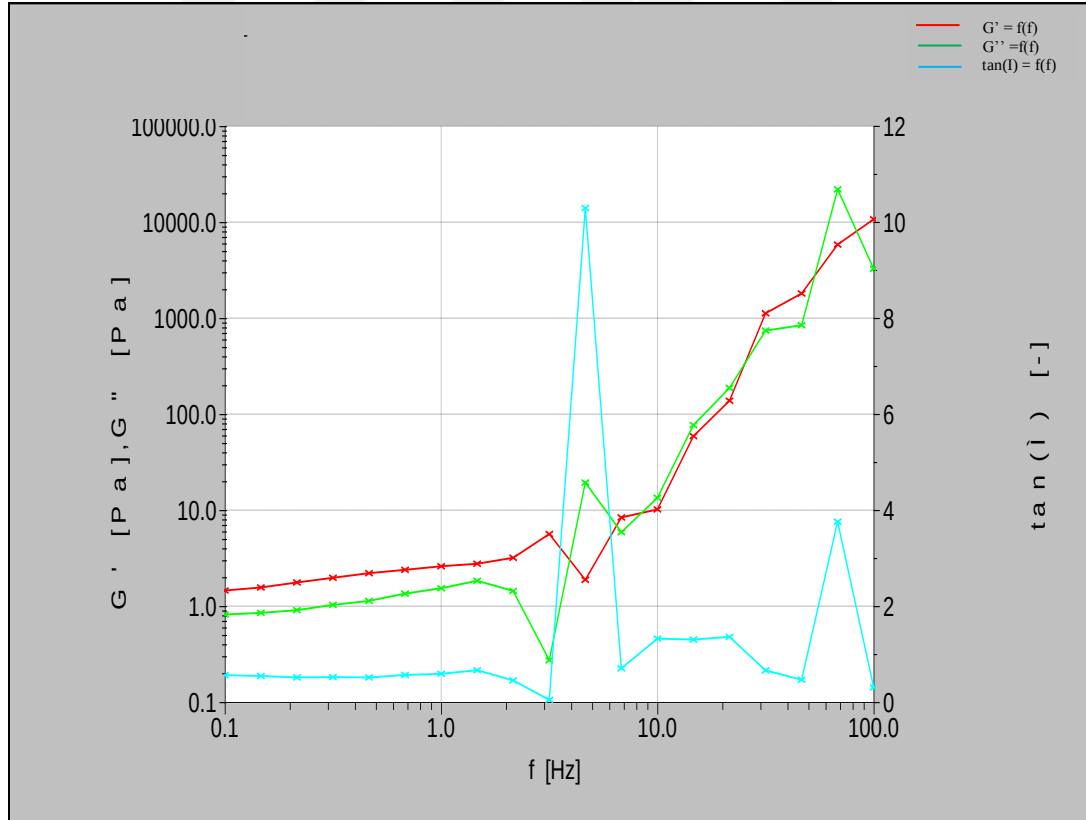
Su banyosunda ısıtma ile hazırlanan jellerde yapılan stres taraması sonuçlarında hem jel sertliği hem de kırılma stresi sonuçlarına göre en sert jel pH 4,5'te olduğu gözlenmiştir. En yumuşak jel ise pH 6,7'de elde edilmiştir. Bu pH değerlerindeki stres taraması sonuçları Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5: KMP'nin %20 konsantrasyonda farklı pH değerlerinde stres taraması sonuçları.

pH	Jel sertliği (G'_{maksimum} , Pa)	Kırılma stresi (Pa)
3,0	$316,0 \pm 8,5^b$	$95,7 \pm 2,5^{ab}$
3,5	$248,0 \pm 69,8^b$	$43,8 \pm 0,4^{bc}$
4,0	$226,8 \pm 26,7^b$	$36,0 \pm 0,4^c$
4,5	$1249,5 \pm 9,2^a$	$133,5 \pm 30,9^a$
6,7	$23,7 \pm 19,7^c$	$1,8 \pm 0,4^c$

Frekans taramalarında da stres taramalarına benzer sonuçlar gözlenmiştir. pH 6,7'deki jelin dayanıksız olduğu gözlenmiştir. pH 3 ve 4,5'taki jellerin daha dayanıklı olduğu gözlenmiştir. pH 3, 4,5 ve 6,7'deki frekans taraması sonuçları Şekil 3.5 (a,b,c) 'de verilmiştir.

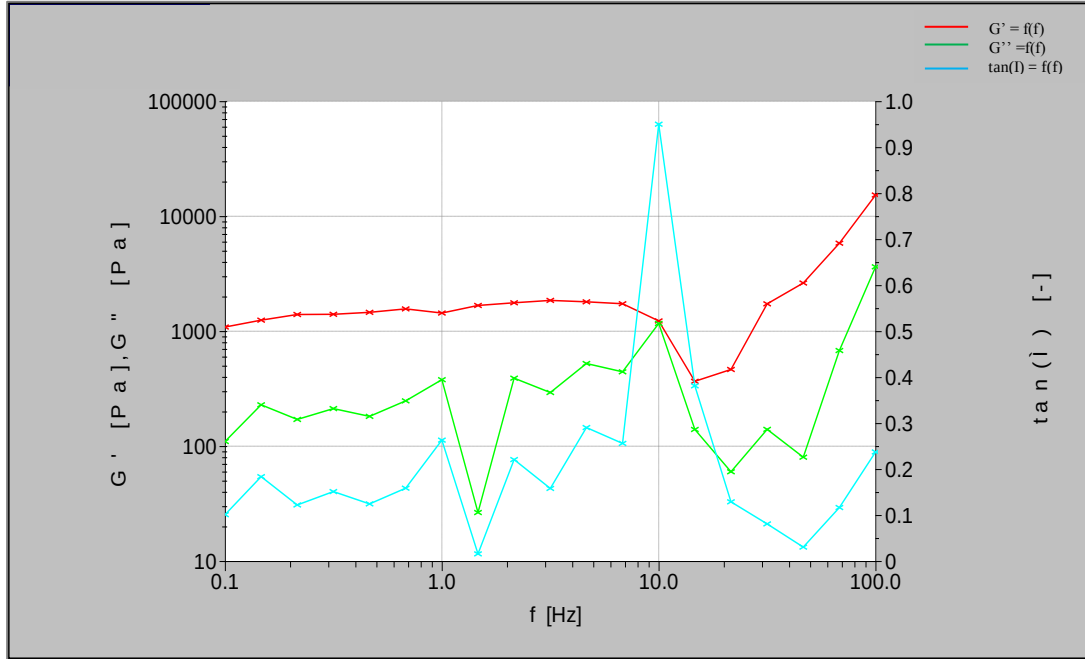
a)



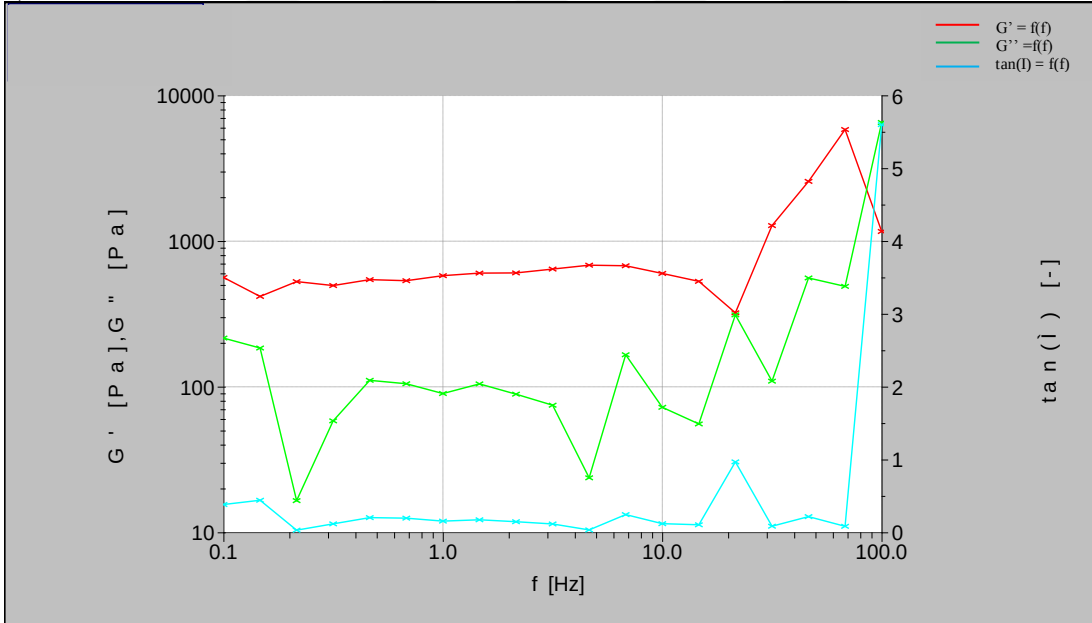
Şekil 3.5: KMP'nin %20 konsantrasyonda farklı pH değerlerinde frekans taraması grafikleri. a) pH 6,7 b) 4,5 c) 3,5.

Şekil 3.5(devamı):

b)



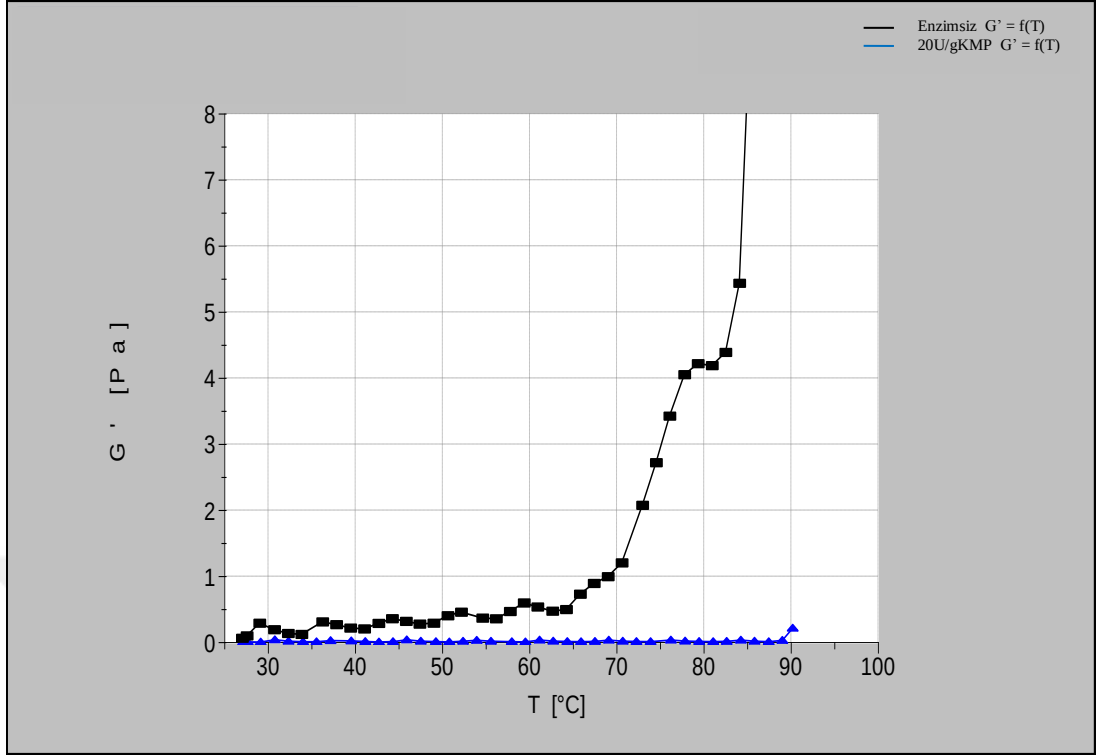
c)



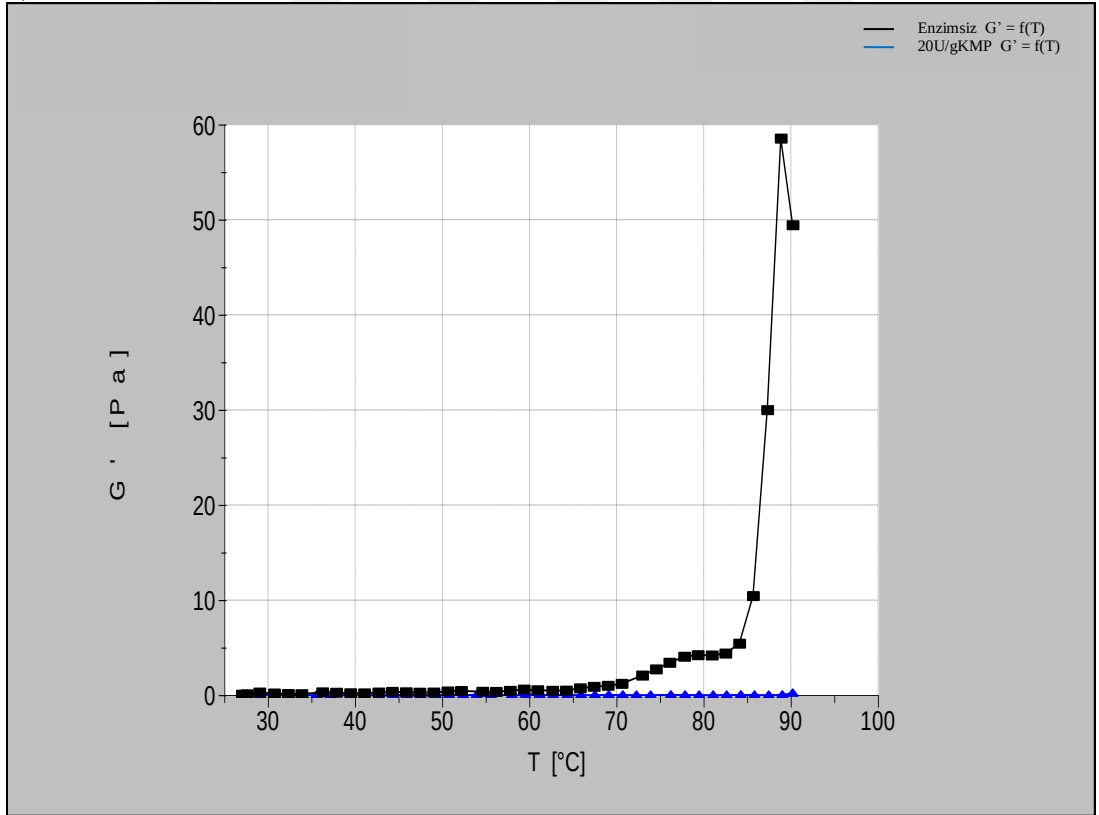
3.5.2 Transglutaminaz enzimi uygulamasının KMP'nin jelleşme özelliklerine etkisi

KMP'nin transglutaminaz enzimi ile muamele sonrasındaki jelleşme özellikleri %20 KMP konsantrasyonunda ve 1 ve 20 U/gKMP enzim aktivitesinde ve pH 3 ve 4,5'te incelenmiştir. pH 4,5 değeri için enzimsiz ve 20 U/g KMP içeren KMP çözeltilerinin sıcaklık taraması sonuçları Şekil 3.6'da, 3 pH için sıcaklık taraması sonuçları Şekil 3.7'de verilmiştir.

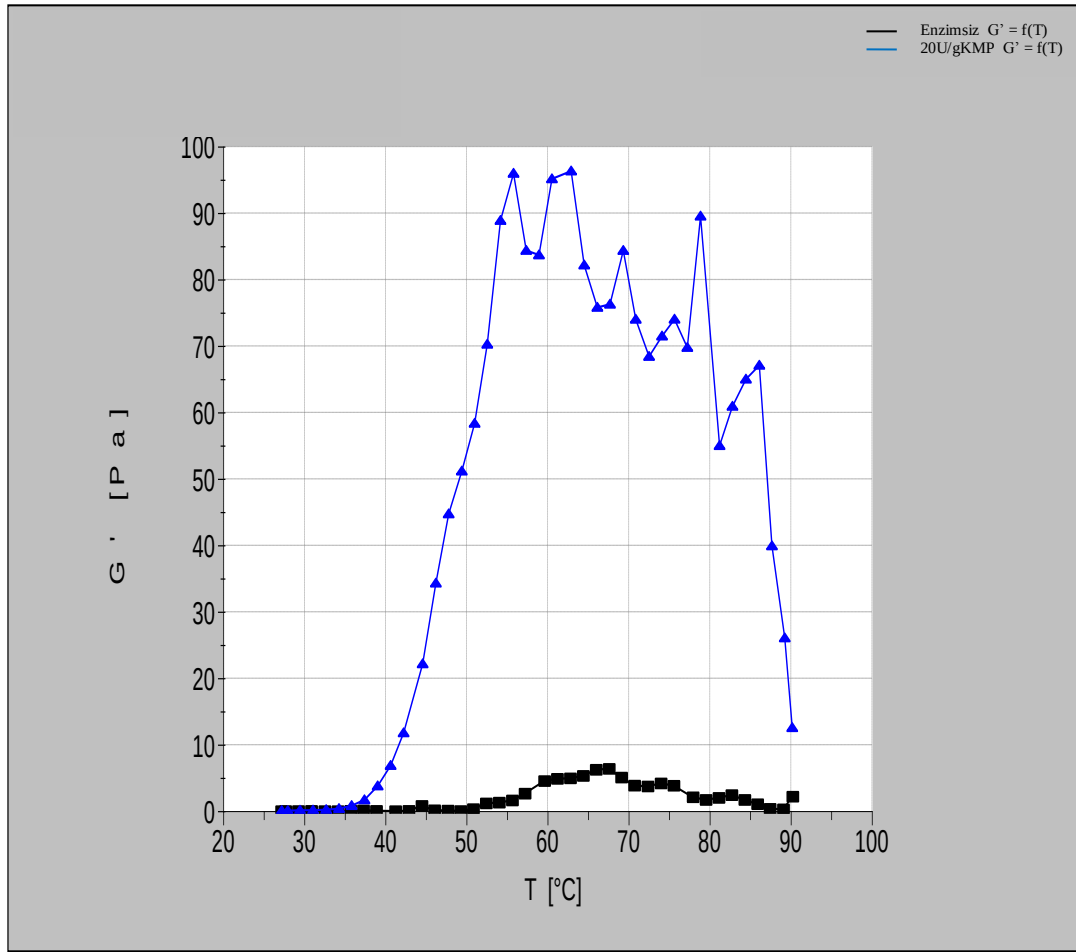
a)



b)



Şekil 3.6: KMP'nin %20 konsantrasyonda transglutaminaz uygulaması sonucunda pH 4,5'te elde edilen sıcaklık taraması grafikleri. a) Yakınlaştırılmış grafik, b) Tüm grafik.



Şekil 3.7: KMP'nin %20 konsantrasyonda transglutaminaz uygulaması sonucunda pH 3'te elde edilen sıcaklık taraması grafikleri.

%20 konsantrasyonda transglutaminaz uygulaması sonucunda elde edilen jelleşme sıcaklığı sonuçları Çizelge 3.6'da, sıcaklık taraması G' değerleri de Çizelge 3.7'de verilmiştir. Transglutaminaz pH ve enzim aktivitesine bağlı olarak KMP'nin jelleşme sıcaklığını ve G' değerlerini etkilemiştir.

Çizelge 3.6: KMP'nin %20 konsantrasyonda transglutaminaz uygulaması sonucunda jelleşme sıcaklığı.

pH	Enzim (U/g KMP)	Jelleşme sıcaklığı (°C)	T (°C) @ $G' > 0,5$ Pa	T (°C) @ $G' > 1$ Pa
3,0	0	57	51	52
	1	47	43	46
	20	35	35	36
4,5	0	66	66	69
	1	87	.*	-
	20	88	-	-

*- : Yüksek değer

Çizelge 3.7: KMP'nin %20 konsantrasyonda transglutaminaz uygulaması sonucunda elde edilen sıcaklık taraması sonuçları.

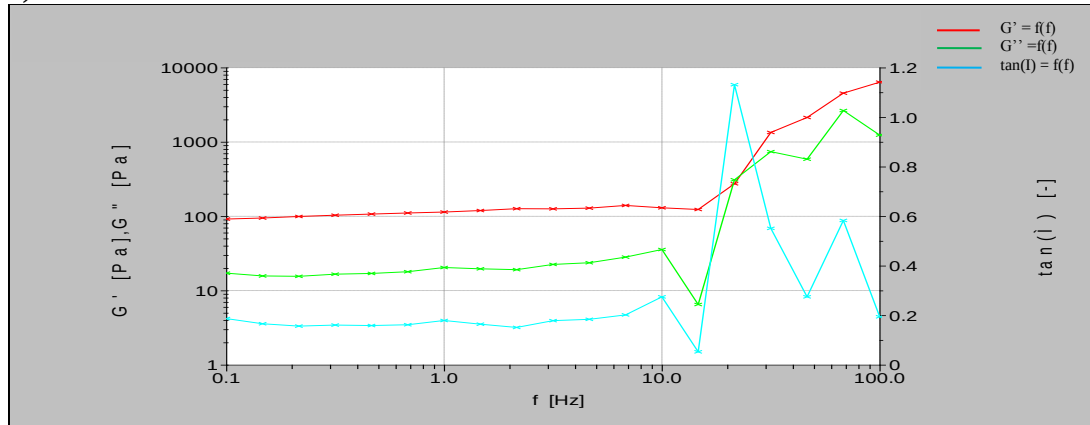
pH	Enzim (U/g KMP)	$G'_{90^{\circ}\text{C}}$ (Pa)	$G'_{90^{\circ}\text{C},30\text{dk}}$ (Pa)	$G'_{25^{\circ}\text{C}}$ (Pa)	$G'_{25^{\circ}\text{C},10\text{dk}}$ (Pa)
3,0	0	2,2	63,4	234,4	180,7
	1	6,8	169,6	182,1	520,5
	20	12,6	42,1	325,1	471,9
4,5	0	58,5	1279,0	2262,0	1490,0
	1	0,5	25,0	41,2	27,0
	20	0,3	56,9	210,1	167,2

Stres taraması sonuçlarına göre, transglutaminaz enzimi 1 U/g KMP aktivitede jel sertliğini pH 3'te elde edilen jellerde artırmıştır. pH 4,5'te ise KMP'nin jel sertliğini ve stres dayanımını zayıflatmıştır (Çizelge 3.8). Frekans taramalarında pH 'teki jelin daha yüksek frekanslara dayanabildiği bulunmuştur.

Çizelge 3.8: KMP'den %20 konsantrasyonda transglutaminaz uygulaması sonucunda 90°C'de elde edilen jellerde stres taraması sonuçları.

pH	Enzim (U/g KMP)	Jel sertliği (G'_{maksimum} , Pa)	Kırılma stresi (Pa)
3,0	0	$316,0 \pm 8,5^c$	$95,7 \pm 2,5^{ab}$
	1	$499,0 \pm 4,2^b$	$66,3 \pm 15,8^{bc}$
	20	$145,2 \pm 60,4^d$	$36,8 \pm 6,5^{cd}$
4,5	0	$1259,5 \pm 23,3^a$	$133,5 \pm 30,9^a$
	1	$10,4 \pm 4,0^e$	$1,4 \pm 0,5^d$
	20	$33,9 \pm 4,3^e$	$10,1 \pm 2,7^{cd}$

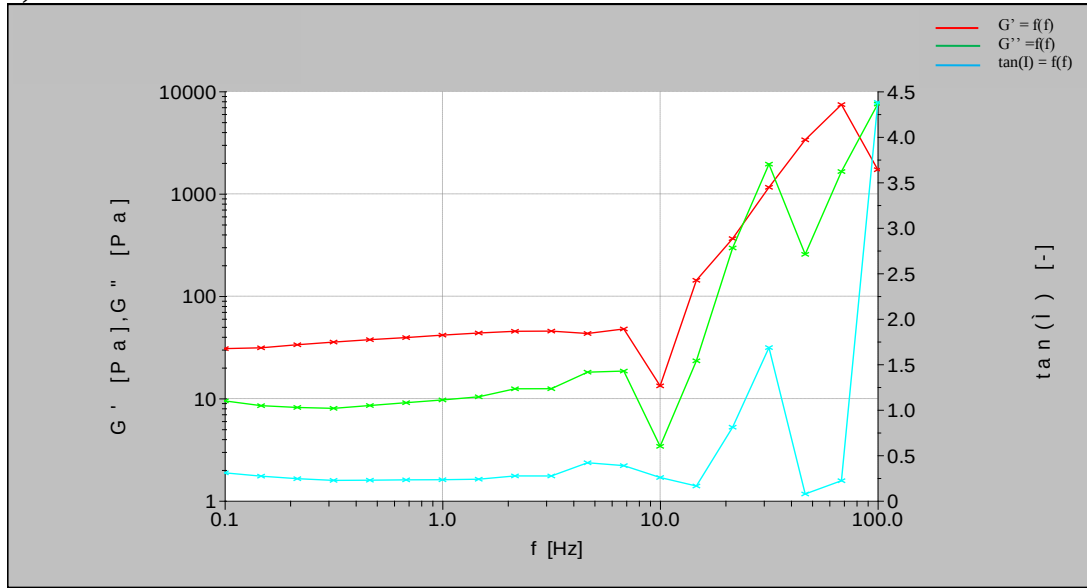
a)



Şekil 3.8: KMP'den %20 konsantrasyonda 20 U/g KMP transglutaminaz uygulaması sonucunda 90°C'de elde edilen jellerde frekans taraması grafikleri. a) pH 3, b) pH 4,5.

Şekil 3.8(devamı):

b)

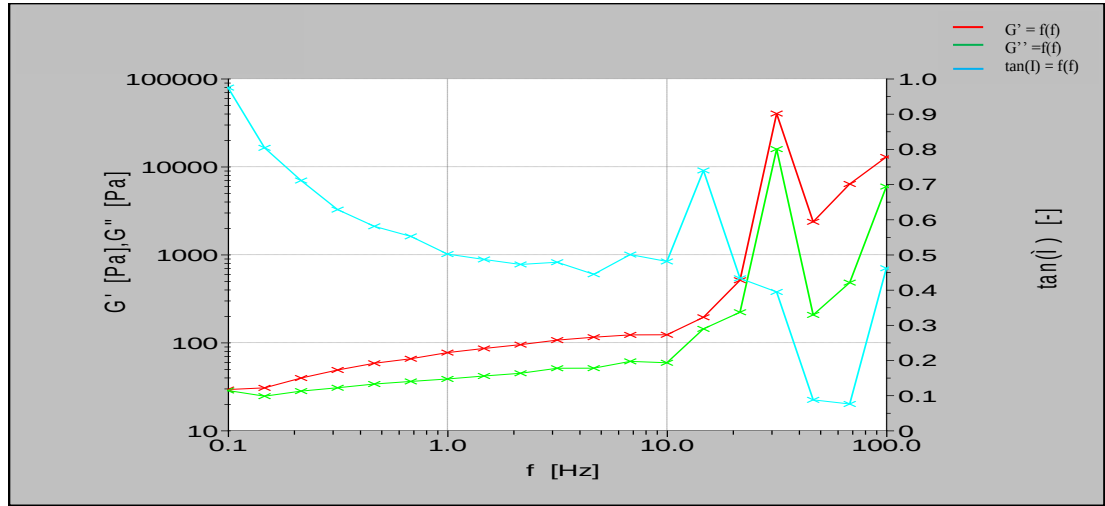


KMP'nin jelleşmesi sırasında elde edilen sıcaklık taramalarında pH 3'te 90°C'de jelin zayıfladığı ve G' değerlerinin düştüğü gözlemlendiğinden jeller 70°C'de su banyosunda da hazırlanmış ve stres taramaları yapılmıştır. Bu durumda jel sertliğinin ve kırılma geriliminin 20 U/g KMP enzim aktivitesinde arttığı gözlenmiştir. KMP'ye enzim eklendikten sonra inkübasyon yapılmadan hemen su banyosunda ısıtma ile elde edilen jelde yapılan ölçümlerde, elde edilen sonuca enzimin ortamda bulunması değil aktivitesinin sebep olduğu doğrulanmıştır. %20 konsantrasyonda transglutaminaz uygulaması sonucunda 70°C'de elde edilen jellerde, jel sertliği ve kırılma stresi Çizelge 3.9'da verilmiştir.

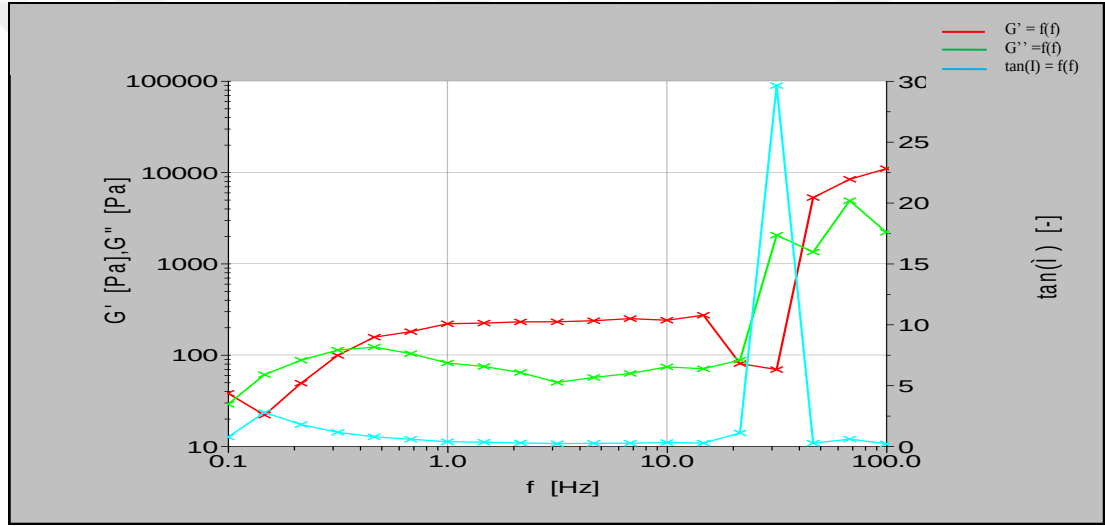
Çizelge 3.9: KMP'den %20 konsantrasyonda transglutaminaz uygulaması sonucunda 70°C'de elde edilen jellerde stres taraması sonuçları.

pH	Enzim (U/g KMP)	Jel sertliği (G'_{maksimum} , Pa)	Kırılma stresi (Pa)
3	0	251,6±97,8 ^b	44,7±9,9 ^b
	20(etkisiz)	119,4±21,8 ^b	53,3±0,5 ^b
	1	147,0±41,9 ^b	68,0±6,5 ^b
	20	488,5±53,3 ^a	235,6±56,5 ^a

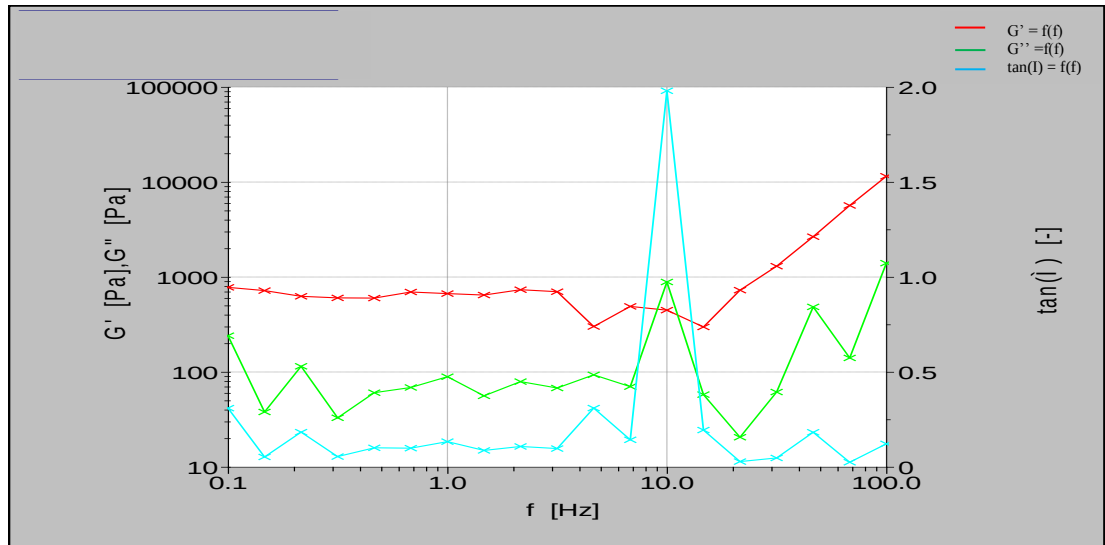
a)



b)



c)



Şekil 3.9: KMP'den %20 konsantrasyonda transglutaminaz uygulaması sonucunda 70°C'de elde edilen jellerde frekans taraması grafikleri. a)Enzimsiz, b) 1U, c)20U.

Elde edilen sonuçlar transglutaminaz enzimi tarafından oluşturulan çapraz bağların pH 4,5 olduğunda KMP'nin jelleşmesini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. Bu sonucun jelleşmeye katkıda bulunan diğer serum proteinleri özellikle β -laktoglobulin ve α -laktalbumin ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Jelin 90°C'ye ısıtılınca güçlenmesi de bu proteinlerin katkısı olduğunu göstermektedir. Transglutaminazın bu proteinleri çapraz bağlaması sonucunda jel zayıflamış olabilir. Ancak pH 3'te ve 70°C'de KMP'nin jelleşmesine transglutaminaz enzimi olumlu etkide bulunmuştur. Transglutaminaz 20 U /g KMP aktivitede oluşturduğu çapraz bağlarla jelin sertliğini ve stres dayanımını artırmıştır. KMP jellerinin güçlendirilmesinde kullanılabilecek optimum transglutaminaz enzimi aktivitesinin belirlenmesi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

KMP çözeltileri için G' değerlerinin 3 pH değerinde 70°C'den sonra düştüğü gözlenmiştir. Enzim ilavesinden sonra jelleşme sıcaklığı değişmiştir. Enzim ilavesinin 90°C'de pH 4,5'te KMP jellerini enzim aktivitesine bağlı olmadan zayıflattığı belirlenmiştir. Jel sertliği 1U/g enzim içeren jellerde, enzim içermeyenlere göre daha fazla bulunmuştur. pH 3 ve 70°C'de 20 U/g enzim içeren örneklerde jel sertliği ve jel dayanıklılığının arttığı gözlenmiştir.

Transglutaminaz enziminin KMP'nin jelleşmesini pH ve sıcaklığa bağlı olarak farklı şekilde etkilediği ortaya konulmuştur. Sonuçlar KMP'nin jelleşmesinde, diğer minör serum proteinlerinin de etkili olduğu ve jelleşmeyi olumlu yönde artırdığını göstermiştir. Özellikle pH 4,5 ve 90°C'de serum proteinlerin daha güçlü jel oluşturduğu gözlenmiştir. Konuyla alakalı yapılan çalışmalarda, daha güçlü ve stabil jel elde edilmesi için optimum transglutaminaz aktivitesi belirlenmelidir.



KAYNAKLAR

- Aaltonen, T., Huumonen, I., & Myllärinen, P. (2014). Controlled transglutaminase treatment in Edam cheese-making. *International Dairy Journal*, 38(2), 179–182.
- Aeschliman, D. (1944). Transglutaminases: Protein cross-linking enzymes in tissues and fluids. *Thrombosis and haemostasis*, 71, 402-415.
- Aguilera JM. 1992. Generation of Engineered Structures in Gels, in Physical Chemistry of Foods (Schartzberg, H.G. and Hartel, R.W. eds), pp.387-421, Marcel Dekker
- Alizadeh-Pasdar, N., & Li-Chan, E. C. (2000). Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 328-334.
- Aloğlu, H. Ş., & Öner, Z. (2013). The effect of treating goat's milk with transglutaminase on chemical, structural, and sensory properties of labneh. *Small Ruminant Research*, 109(1), 31-37.
- Blanshard JMV, Mitchell JR.(1998). Food Structure- Its Creation and Evaluation, Bittenworths.
- Bonomi, F., Iametti, S., Pagliarini, E., & Peri, C. (1988). A spectrofluorimetric approach to the estimation of the surface hydrophobicity modifications in milk proteins upon thermal treatment. *Milchwissenschaft*, 43(5), 281-285.
- Das, K. P., & Kinsella, J. E. (1989). pH dependent emulsifying properties of β -lactoglobulin. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 10(1), 77-102.
- Eissa, A. S., Bisram, S., & Khan, S. A. (2004). Polymerization and gelation of whey protein isolates at low pH using transglutaminase enzyme. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(14), 4456-4464.
- Faergemand, M., Otte, J., & Qvist, K. B. (1997). Enzymatic cross-linking of whey proteins by a Ca²⁺-independent microbial transglutaminase from *Streptomyces lydicus*. *Food Hydrocolloids*, 11(1), 19-25.
- Farías, M. E., Martinez, M. J., & Pilosof, A. M. R. (2010). Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation. *International dairy journal*, 20(2), 79-88.
- Folk, J. E., & Cole, P. W. (1966). Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase I. purification and properties of the enzyme: identification of a functional cysteine essential for activity. *Journal of Biological Chemistry*, 241(23), 5518-5525.
- Fox, P. F., & Mulvihill, D. M. (1990). Casein. In *Food gels* (pp. 121-173). Springer Netherlands.

- Gauche, C., Vieira, J. T., Ogliari, P. J., & Bordignon-Luiz, M. T.** (2008). Crosslinking of milk whey proteins by transglutaminase. *Process Biochemistry*, 43(7), 788-794.
- Gauche, C., Tomazi, T., Barreto, P. L. M., & Ogliari, P. J.** (2009). LWT - Food Science and Technology Physical properties of yoghurt manufactured with milk whey and transglutaminase. *LWT - Food Science and Technology*, 42(1), 239-243.
- Han, X. Q., & Damodaran, S.** (1996). Thermodynamic compatibility of substrate proteins affects their cross-linking by transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5), 1211-1217.
- Janer C, Pelaez C, Requena T.** (2004). Caseinomacropeptide and whey proteinconcentrate enhance *Bifidobacterium lactis* growth in milk. *Food Chemistry* 86(2004) 263-267.
- Jaros, D., Jacob, M., Otto, C., & Rohm, H.** (2010). Excessive cross-linking of caseins by microbial transglutaminase and its impact on physical properties of acidified milk gels. *International Dairy Journal*, 20(5), 321-327.
- Jaros, D., Partschefeld, C., Henle, T., & Rohm, H.** (2006). Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications. *Journal of texture studies*, 37(2), 113-155.
- Jaros, D., Schwarzenbolz, U., Raak, N., Löbner, J., Henle, T., & Rohm, H.** (2014). Cross-linking with microbial transglutaminase: Relationship between polymerisation degree and stiffness of acid casein gels. *International Dairy Journal*, 38(2), 174-178.
- DeJong, G. A. H., & Koppelman, S. J.** (2002). Transglutaminase catalyzed reactions: impact on food applications. *Journal of Food Science*, 67(8), 2798-2806.
- Kashiwagi, T., Yokoyama, K. I., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H., & Suzuki, E. I.** (2002). Crystal Structure of Microbial Transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(46), 44252-44260.
- Kuraishi, C., Sakamoto, J., Yamazaki, K., SUSA, Y., KUHARA, C., & SOEDA, T.** (1997). Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *Journal of Food Science*, 62(3), 488-490.
- Kuraishi, C., Sakamoto, J., Yamazaki, K., & Susa, Y.** (1997). Production of Restructured Meat using Microbial Transglutaminase without Salt or Cooking, 62(3), 488-491.
- Kanaji, T., Ozaki, H., Takao, T., Kawajiri, H., Ide, H., Motoki, M., & Shimonishi, Y.** (1993). Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* sp. strain s-8112. *Journal of Biological Chemistry*, 268(16), 11565-11572.
- Kreuß, M., Strixner, T., & Kulozik, U.** (2009). The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropeptide. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1818-1826.
- De Kruif, C. G., Jeurnink, T. J., & Zoon, P.** (1992). The viscosity of milk during the initial stages of renneting. *Nederlands melk en Zuiveltijdschrift*, 46(2), 123-137.

- Lauber, S., Henle, T., & Klostermeyer, H.** (2000). Relationship between the crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yoghurt. *European Food Research and Technology*, 210(5), 305-309
- Lauber, S., Henle, T., & Klostermeyer, H.** (2000). Relationship between the crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yoghurt. *European Food Research and Technology*, 210(5), 305-309.
- Lorenzen, P. C.** (2000). Techno-functional properties of transglutaminase-treated milk proteins. *Milchwissenschaft*, 55(12), 667-670.
- Martin-Diana AB, Pelaez C, Requena T.** 2004. Reological and structural properties of fermented goat's milk supplemented with caseinomacropeptide and whey protein concentrate. *Milchwissenschaft*, 59, 383-386.
- Martín-Diana, A. B., Gomez-Guillén, M. C., Montero, P., & Fontecha, J.** (2006). Viscoelastic properties of caseinmacropeptide isolated from cow, ewe and goat cheese whey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(9), 1340-1349.
- Matsumura Y, Moti T.** 1996. Gelation, in *Methods of Testing Protein Functionality* (Hall, G.M. ed.), pp. 76-109, Blackie.
- Molle D, Leonil J.** 2005. Quantitative determination of bovine κ -caseinmacropeptide in dairy products by LC/ESI/MS and LC/ESI/MS/MS. *International Dairy Journal* 15 (2005) 419-428.
- Mounsey, J. S., O'Kennedy, B. T., & Kelly, P. M.** (2005). Influence of transglutaminase treatment on properties of micellar casein and products made therefrom. *Le Lait*, 85(4-5), 405-418.
- Mahmood, W. A., & Sebo, N. H.** (2009). Mesopotamia J. of Agric. (ISSN 1815-316X) Vol.(37) No.(4) 2009, (4).
- Motoki, M., & Seguro, K.** (1998). Transglutaminase and its use for food processing, 9, 204-210.
- Mikkelsen, T. L., Frøkiær, H., Topp, C., Bonomi, F., Iametti, S., Picariello, G., ... & Barkholt, V.** (2005). Caseinomacropeptide self-association is dependent on whether the peptide is free or restricted in κ -casein. *Journal of dairy science*, 88(12), 4228-4238.
- Martinez, M. J., Fariás, M. E., & Pilosof, A. M.** (2011). Casein glycomacropeptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating. *Food hydrocolloids*, 25(5), 860-867.
- Nakai, S., Li-Chan, E., & Arteaga, G. E.** (1996). 8 Measurement of surface hydrophobicity. *Methods of testing protein functionality*, 226.
- Nio, N., Motoki, M., & Takinami, K.** (1985). Gelation of casein and soybean globulins by transglutaminase. *Agricultural and biological chemistry*, 49(8), 2283-2286.
- Rojas, E., & Torres, G.** (2013). Isolation and recovery of glycomacropeptide from milk whey by means of thermal treatment. *Food Science and Technology (Campinas)*, 33(1), 14-20.
- O'sullivan, M. M., Kelly, A. L., & Fox, P. F.** (2002). Influence of transglutaminase treatment on some physico-chemical properties of milk. *Journal of Dairy Research*, 69(03), 433-442.
- Ozer, B., Kirmaci, H. A., Oztekin, S., Hayaloglu, A., & Atamer, M.** (2007). Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. *International dairy journal*, 17(3), 199-207.

- Ozer, B., Kirmaci, H. A., Oztekin, S., Hayaloglu, A., & Atamer, M. (2007). Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. *International dairy journal*, 17(3), 199-207
- Oner, Z., Karahan, A. G., Aydemir, S., & Aloglu, H. S. (2008). Effect of transglutaminase on physicochemical properties of set-style yogurt. *International Journal of Food Properties*, 11(1), 196-205.
- Öner, Z. (2004). Mikrobiyal Transglutaminazın Özellikleri ve Gıda Sanayiinde Kullanılma Olanakları. *Gıda Dergisi*, 29(4).
- Özrenk, E. (2006). The use of transglutaminase in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 59(1), 1-7.
- Pierro, P. D., Mariniello, L., Sorrentino, A., Giosafatto, C. V. L., Chianese, L., & Porta, R. (2010). Transglutaminase-induced chemical and rheological properties of cheese. *Food Biotechnology*, 24(2), 107-120.
- Pietrasik, Z., & Li-Chan, E. C. Y. (2002). Binding and textural properties of beef gels as affected by protein, κ -carrageenan and microbial transglutaminase addition. *Food Research International*, 35(1), 91-98.
- Rojas, E., & Torres, G. (2013). Isolation and recovery of glycomacropeptide from milk whey by means of thermal treatment. *Food Science and Technology (Campinas)*, 33(1), 14-20.
- Rossa, P. N., Burin, V. M., & Bordignon-Luiz, M. T. (2012). Effect of microbial transglutaminase on functional and rheological properties of ice cream with different fat contents. *LWT-Food Science and Technology*, 48(2), 224-230.
- Schorsch, C., Carrie, H., & Norton, I. T. (2000). Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase: influence of cross-links in acid-induced gelation. *International Dairy Journal*, 10(8), 529-539.
- Blanshard JMV, Mitchell JR. 1998. Food Structure- Its Creation and Evaluation, Bittenworths
- Sharma, R., Rajput, Y. S., & Mann, B. (2013). Chemical and functional properties of glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: a review. *Dairy science & technology*, 93(1), 21-43.
- Shimizu, M., Saito, M., & Yamauchi, K. (1985). Emulsifying and structural properties of β -lactoglobulin at different pHs. *Agricultural and biological chemistry*, 49(1), 189-194.
- Şanlı, T., Sezgin, E., Şenel, E., & Benli, M. (2011). Geleneksel Yöntemle Ayran Üretiminde Transglutaminaz Kullanımının Ayranın Özellikleri Üzerine Etkileri. *Gıda Dergisi*, 36(4).
- Trespalacios, P., & Pla, R. (2007). Simultaneous application of transglutaminase and high pressure to improve functional properties of chicken meat gels. *Food Chemistry*, 100(1), 264-272.
- Truong, V. D., Clare, D. A., Catignani, G. L., & Swaisgood, H. E. (2004). Cross-linking and rheological changes of whey proteins treated with microbial transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1170-1176.
- Téllez-Luis, S. J., Uresti, R. M., Ramirez, J. A., & Vazquez, M. (2002). Low-salt restructured fish products using microbial transglutaminase as binding agent. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(9), 953-959.
- Tang, C., YANG, X. Q., Chen, Z., Wu, H., & PENG, Z. Y. (2005). Physicochemical and structural characteristics of sodium caseinate

- biopolymers induced by microbial transglutaminase. *Journal of Food Biochemistry*, 29(4), 402-421.
- Thomä, C., Krause, I., & Kulozik, U.** (2006). Precipitation behaviour of caseinomacropeptides and their simultaneous determination with whey proteins by RP-HPLC. *International Dairy Journal*, 16(4), 285-293.
- Thoma-Worringer C, Sorensen J, Lopez-Fandino R.** 2006. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *International Dairy Journal* 16(2006) 1324-1333.
- Tolkach, A., & Kulozik, U.** (2005). Fractionation of whey proteins and caseinomacropeptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques. *Journal of Food Engineering*, 67(1), 13-20.
- Wang, W., Zhong, Q., & Hu, Z.** (2012). Nanoscale understanding of thermal aggregation of whey protein pretreated by transglutaminase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(2), 435-446.
- Uran, H., Aksu, F., Yılmaz, İ., & Durak, M. Z.** (2013). Transglutaminaz Enziminin Tavuk Köftesinin Kalite Özelliklerine Etkisi.
- Vácha, F., Novik, I., Spicka, J., & Podola, M.** (2006). Determination of the effect of microbial transglutaminase on technological properties of common carp (*Cyprinus carpio* L.) meat. *Czech Journal of Animal Science*, 51(12), 535.
- Vasbinder, A. J., Rollema, H. S., Bot, A., & De Kruif, C. G.** (2003). Gelation mechanism of milk as influenced by temperature and pH; studied by the use of transglutaminase cross-linked casein micelles. *Journal of dairy science*, 86(5), 1556-1563.
- Yasir, S. B. M., Sutton, K. H., Newberry, M. P., Andrews, N. R., & Gerrard, J. A.** (2007). The impact of transglutaminase on soy proteins and tofu texture. *Food Chemistry*, 104(4), 1491-1501.
- Yetişemiyen, A., & Yıldız, F.** Süt Teknolojisinde Kazeinomakropeptidlerin Önemi ve Elde Edilmesi.
- Yokoyama, K., Nio, N., & Kikuchi, Y.** (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(4), 447-454.
- Yuksel, Z., Avci, E., & Erdem, Y. K.** (2011). Modification of the renneting process in Berridge substrate by transglutaminase. *International journal of dairy technology*, 64(3), 365-371.
- Yüksel, Z., & Erdem, Y. K.** (2009). MODIFICATION OF BOVINE MILK PROTEIN SYSTEM BY TRANSGLUTAMINASE. *GIDA/The Journal of FOOD*, 34(6).
- Yüksel, Z., & Erdem, Y. K.** (2007). Gıda endüstrisinde transglutaminaz uygulamaları: 1. Enzimin genel özellikleri. *Gıda Dergisi*, 32(6).
- Yüksel, Z., & Erdem, Y. K.** (2008). Gıda Endüstrisinde Transglutaminaz Uygulamaları: 2. Enzimin Gıda Süreçlerinde Kullanım Olanakları. *Gıda Dergisi*, 33(3).



EKLER

EK A: HPLC kromotogramları

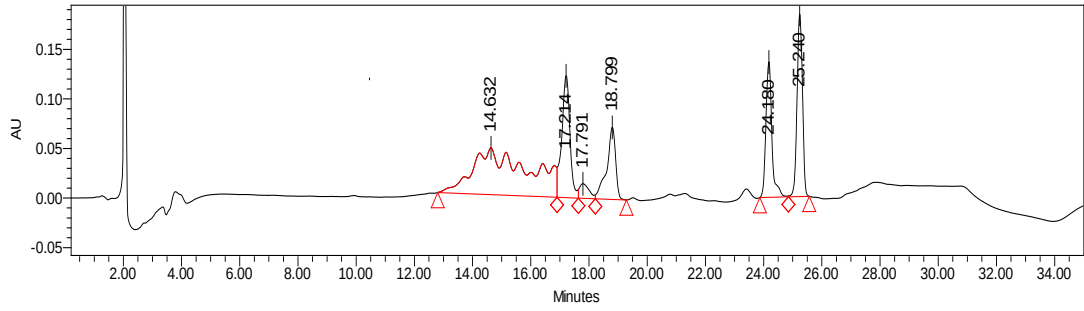
EK B: Enzim standardı sönümlenme katsayısı

EK C: Floresan spektrofotometre sonuçları

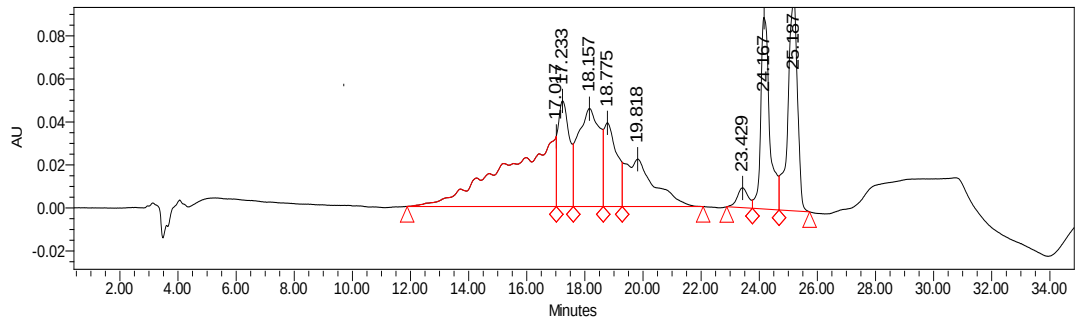




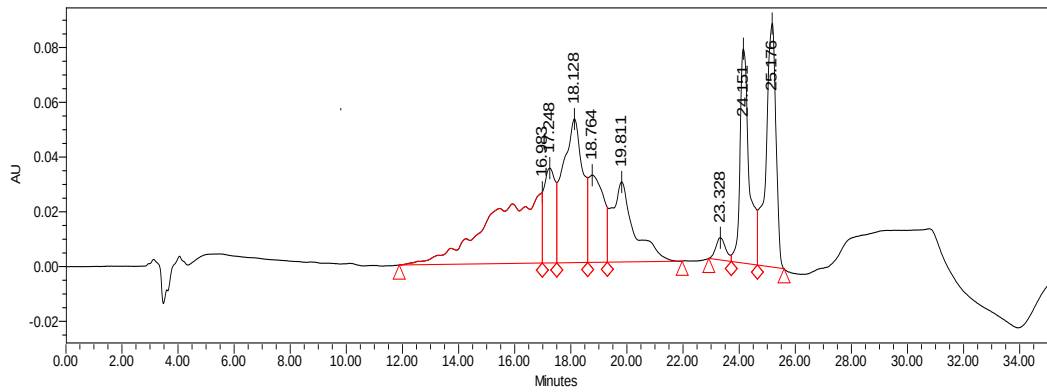
EK A



Şekil A.1: %0,5 konsantrasyonda KMP'nin HPLC kromatogramı

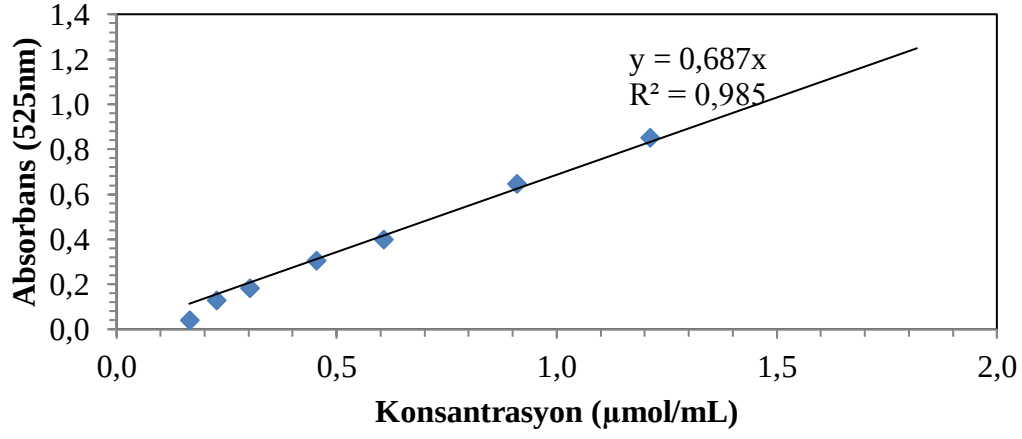


Şekil A.2: %0,5 konsantrasyonda KMP'nin 20 U/g transglutaminaz enzimi ile 60 dk inkübasyonu sonrasında elde edilen HPLC kromatogramı



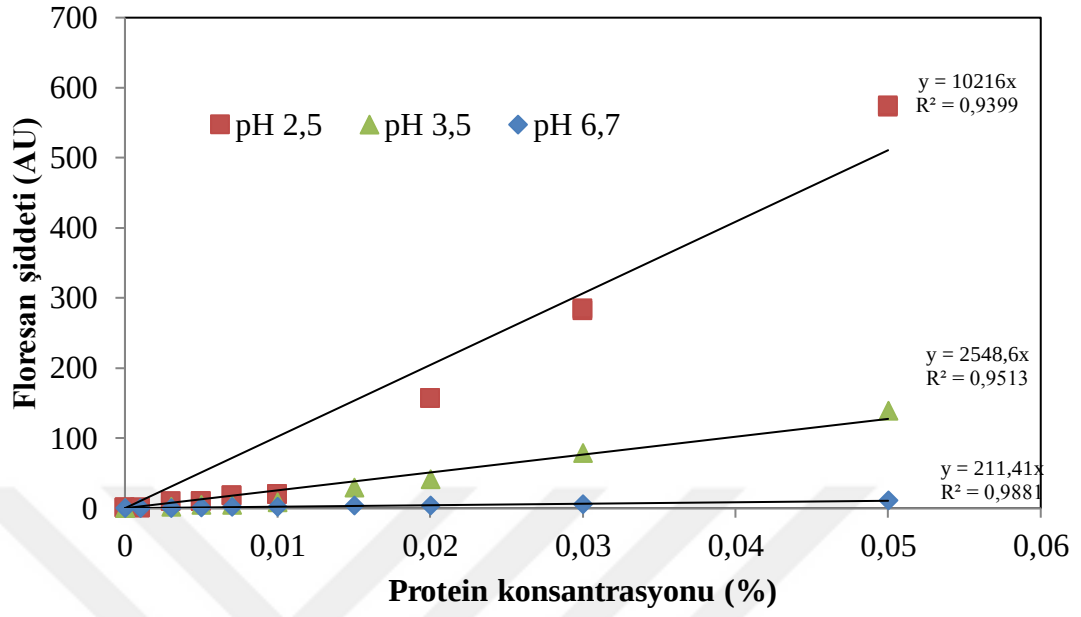
Şekil A.3: %0,5 konsantrasyonda KMP'nin 60 U/g transglutaminaz enzimi ile 60 dk inkübasyonu sonrasında elde edilen HPLC kromatogramı

EK B



Şekil B: L-Glutamik asit γ -mono hidroksimatın sönümlenme katsayısı

EK C



Şekil C: 2,5, 3,5 ve 6,7 pH değerlerinde floresan spektrofotometre ölçüm sonuçları.



ÖZGEÇMİŞ



Ad-Soyad : Esra KOCAMAN
Doğum Tarihi ve Yeri : 29.04.1992 Bursa
E-posta : kocamanes@itu.edu.tr

EĞİTİM:

- **Lisans** : Afyon Kocatepe Üniversitesi
- **Yüksek Lisans** : İstanbul Teknik Üniversitesi