

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FENİLKETONÜRİ HASTALARINA YÖNELİK FENİLALANIN İÇERİĞİ
AZALTILMIŞ BİR UN GELİŞTİRİLMESİ**

Özlem KILIÇ BÜYÜKKURT

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

2017

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FENİLKETONÜRİ HASTALARINA YÖNELİK FENİLALANIN İÇERİĞİ
AZALTILMIŞ BİR UN GELİŞTİRİLMESİ**

Özlem KILIÇ BÜYÜKKURT

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

2017

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FENİLKETONÜRİ HASTALARINA YÖNELİK FENİLALANİN İÇERİĞİ
AZALTILMIŞ BİR UN GELİŞTİRİLMESİ

Özlem KILIÇ BÜYÜKKURT

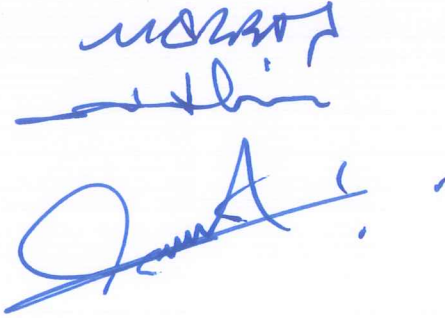
YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 18/07/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/~~Oyçokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mustafa ERBAŞ

Prof. Dr. Mehmet İNAN

Doç. Dr. Münir ANIL



ÖZET

FENİLKETONÜRİ HASTALARINA YÖNELİK FENİLALANIN İÇERİĞİ AZALTILMIŞ BİR UN GELİŞTİRİLMESİ

Özlem KILIÇ BÜYÜKKURT

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Mustafa ERBAŞ
Temmuz 2017, 53 sayfa

Kalıtsal bir protein metabolizma bozukluğu hastalığı olan fenilketonüri (FKU) hastalığının tedavisinde fenilalanince kısıtlı diyet tedavinin temelini oluşturmaktadır. Ancak diyet tedavisinin ömür boyu uygulanması hastalar için zor olmakta ve diyet tedavisi uygulanmadığı zaman hastalık belirtileri ortaya çıkmaktadır. Bu sebeple fenilalanin içeriği azaltılmış ve/veya giderilmiş gıdaların üretiminin FKU hastalarının diyetlerinde önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir.

Yapılan literatür taramasında FKU hastalarına fenilalanin amonyum liyaz (FAL) enziminin oral uygulaması gibi araştırmalara rastlanılmış, ancak FAL enziminin gıdalara uygulanmasıyla FKU hastalarına yönelik olarak fenilalanin içeriği azaltılmış temel ve tam gıda üretimi içeren bir araştırmaya rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada, ana gıda kaynaklarından biri olan buğday ununda bulunan proteinlerin, sindirim enzimleri ile *in vitro* olarak hidroliz edilmesiyle serbestleşebilen fenilalanin amino asidinin serbestleştirilmesi ve bu serbestleşebilen fenilalanin amino asidinin miktarını azaltmak amacıyla FAL enzimi içeren mısır filizi ekstraktı uygulandıktan sonra kurutularak FKU hastaları için fenilalanin içeriği azaltılmış bir unun hazırlanması amaçlanmıştır.

Çalışmada ilk olarak; buğday ununda bulunan proteinler sindirim enzimleri ile *in vitro* protein sindirimine tabi tutularak hidroliz edilmiştir. *In vitro* hidroliz sonucu içeriği yaklaşık 15 kat artan serbest fenilalanin amino asidini azaltmak amacıyla, mısır filizi yetiştirilmiş ve FAL enzim aktivitesinin maksimum (6.09 $\mu\text{mol/h.g}$) tespit edildiği çimlenmenin 7. gününde hasat edilmiştir. Filizlerden elde edilen ekstrakt ile FAL enzim uygulaması yapılmış ve bu uygulamanın serbest fenilalanin içeriği üzerine önemli bir azaltıcı (%49.78) etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

In vitro sindirim ve mısır filizi FAL enzim uygulaması sonrasında elde edilen sulu gıda materyali kurutularak boyut küçültme işlemi uygulanmıştır. Böylelikle FKU hastalarına yönelik olarak fenilalanin içeriği azaltılmış bir un üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bu unun; su tutma kapasitesi 1.13 g su/g KM, suda çözünürlük indeksi 7.39 g/g, su absorpsiyonu indeksi 1.02 g/100 g, nem içeriği %11.35, su aktivitesi 0.41, pH 5.99, titrasyon asitliği %0.248, toplam protein %11.54, enzime dirençli nişasta içeriği %0.58, renk değerleri olan L^* , a^* , b^* sırasıyla 71.62, -4.37, 20.92 ve yığın yoğunluğu 1.03 g/mL olarak tespit edilmiş ve bu değerler buğday unu değerleri ile kıyaslanmıştır. Ayrıca, fenilalanin içeriği azaltılmış un ile bisküvi üretimi gerçekleştirilmiş ve bu ürünün duyusal olarak tüketilebilir olduğu tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: *In vitro* sindirim, Fenilketonüri, Fenilalanin, Fenilalanin amonyum liyaz.

JÜRİ: Doç. Dr. Mustafa ERBAŞ (Danışman)
Prof. Dr. Mehmet İNAN
Doç. Dr. Münir ANIL

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A NEW TYPE OF FLOUR WITH REDUCED PHENYLALANINE CONTENT FOR PHENYLKETONURIA PATIENTS

Özlem KILIÇ BÜYÜKKURT

M.Sc. Thesis in Food Engineering
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa ERBAŞ
July 2017, 53 pages

Phenylalanine-restricted diet is the basis of the treatment for phenylketonuria (PKU) disease which is a disease of hereditary disorder of protein metabolism. However, a lifelong diet therapy is difficult for patients to apply and symptoms of disease appear when dietary therapy is not applied. Therefore production of foods with reduced and/or removed phenylalanine content is known to have an important role in the diet of the patients.

In literature review, the studies like oral application of phenylalanine ammonium lyase enzyme to patients with PKU were found. However, no research has been seen on the staple and whole food production by phenylalanine ammonium lyase enzyme application with reduced phenylalanine content for patients with PKU.

In this study, the release of the hydrolysable phenylalanine amino acid by *in vitro* hydrolysis of proteins in wheat flour, one of the main staple foods, with digestive enzymes and application of corn seedlings extract containing phenylalanine ammonium lyase enzyme in order to reduce the content of free phenylalanine and then drying of obtained product to prepare a type of flour with reduced phenylalanine content for PKU patients were aimed.

As a first step of the study, protein content of wheat flour was subjected to *in vitro* hydrolysis with digestive. Corn seedlings were cultivated and harvested on 7th day of germination, on which the maximum phenylalanine ammonium lyase enzyme activity (6.09 $\mu\text{mol/h.g}$) was determined, in order to reduce free phenylalanine amino acid content which was increased about 15 fold by *in vitro* hydrolysis. It was determined that the extract obtained from corn seedlings had a significant reducing effect (49.78%) on the content of free phenylalanine.

After *in vitro* digestion and phenylalanine ammonium lyase enzyme application, the obtained aqueous food material was dried and subjected to size reduction. Thus a flour production with the reduced phenylalanine content was obtained for PKU patients. The water holding capacity was determined as 1.13 g water/g dried flour, water solubility value as 7.39 g/g, water absorption index as 1.02 g/100 g, moisture content as 11.35%, water activity as 0.41, pH as 5.99, titration acidity as 0.248%, total protein as 11.54%, enzyme resistant starch content as 0.58%, L^* , a^* , b^* as 71.62, -4.37, 20.92, bulk density as 1.03 g/mL for the obtained flour and, these values were compared with values of wheat flour. The biscuit production was also carried out using the flour with reduced phenylalanine content and the obtained product was well accepted by sensory panelists.

KEYWORDS: *In vitro* digestion, Phenylalanine, Phenylketonuria, Phenylalanine ammonia lyase.

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Mustafa ERBAŞ (Supervisor)
Prof. Dr. Mehmet İNAN
Assoc. Prof. Dr. Münir ANIL

ÖNSÖZ

FKU hastalığı, fenilalanin hidroksilaz (FAH) enziminin yokluğu veya eksikliği nedeniyle fenilalanin amino asidini metabolize edemeyen bireylerde görülen doğumsal bir protein metabolizma hastalığıdır. Esansiyel bir amino asit olan fenilalanin, sağlıklı bireylerde geri dönüşümsüz olarak tirozine dönüştürülerek metabolize edilirken; FKU hastalığına sahip bireylerde bu dönüşümün gerçekleşmemesi sebebiyle fenilalanin vücut sıvılarında birikmekte ve özellikle sinir ve beyin dokularında hasara neden olmaktadır. Bu nedenle, FKU hastalarında fenilalanince kısıtlı diyet bu hastalığın tedavisinin temelini oluşturmaktadır. Bu diyet tedavisinde protein içeriği yüksek olan et, süt, tahıl ve bunların ürünleri yasak, meyve ve sebzeler sınırlı serbest ve bitkisel sıvı yağ, nişasta gibi ürünler serbest olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca bu hastaların diyet tedavisinde; fenilalanin içermeyen veya fenilalanin içeriği azaltılmış özel amino asit karışımları ve düşük proteinli gıdalar da kullanılmaktadır. FKU hastaları, hayatları boyunca bu diyet tedavisini sürdürmekte zorlanmakta, ayrıca beslenme bakımından tam olmayan bir şekilde beslendikleri için çok daha farklı sağlık sorunları ile de karşılaşmaktadırlar.

Bu çalışmada; FKU hastalarına yönelik olarak hastaların beslenme kalitesinin artırılması ve dolayısıyla sağlık risklerinin minimize edilmesi amacıyla fenilalanin içeriği azaltılmış bir un geliştirilmiştir.

Bu çalışma ile birlikte FKU hastaları için fenilalanin içeriği azaltılmış bir un eldesinin yanı sıra hastalar bu unu evsel gıdaların üretimlerinde de kullanabileceklerdir. Böylelikle çoğu ithal olan gıdalara yapılan harcamalar azaltılabilecek ve hem hastalara hem de Sosyal Güvenlik Kurumlarına ekonomik olarak katkı sağlanabilecektir.

Yüksek lisans eğitimimde ve bu tezin hazırlanmasında bana yol gösteren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa ERBAŞ'a, bu tez sırasında çalışmalarına destek olan Arş. Gör. Dr. Sultan ARSLAN TONTUL'a, Arş. Gör. Atike Nur DURAK'a, Arş. Gör. Elif AYKIN DİNÇER'e, Arş. Gör. Ceren MUTLU'ya, Uzman Cihadiye CANDAL'a ve yüksek lisans öğrencisi Andaç KOÇ'a teşekkür ederim.

Ayrıca, tüm eğitimim boyunca maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan aileme ve beni destekleyen eşime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Fenilketonüri.....	3
2.1.1. FKU hastalığının tarihçesi	3
2.1.2. Türkiye’de ve dünyada FKU hastalığı	3
2.1.3. FKU hastalığının oluşumu	4
2.1.3.1. FKU hastalığının sınıflandırılması	5
2.1.4. FKU hastalığı tanı ve belirtileri	5
2.1.5. FKU hastalığının diyet tedavisi ve temel prensipleri.....	6
2.1.6. FKU hastaları için gıda üretim yöntemleri	8
2.1.6.1. Amino asit karışımları	8
2.1.6.2. Düşük proteinli gıdalar	8
2.1.6.1. Yüksek molekül ağırlıklı nötr amino asit destek tedavisi	9
2.1.6.2. Protein ikamesi.....	9
2.1.6.3. Proteince zengin gıdaların hidrolizi	10
2.2. FKU Hastalığı İçin Alternatif Tedavi Yöntemleri.....	10
2.2.1. Gen tedavisi	10
2.2.2. Sapropterin dihidroklorid tedavisi	10
2.2.3. Enzim ikame ve oral enzim tedavisi	11
2.2.3.1. Fenilalanin amonyum liyaz (FAL) enzimi	12
2.2.3.2. Buğday ve unu.....	13
2.2.3.3. Mısır ve diğer bazı bitkilerin FAL enzim aktiviteleri	13
3. MATERYAL ve METOT	15
3.1. Materyal.....	15
3.2. Metot.....	15
3.2.1. Gıda materyalinin <i>in vitro</i> sindirime hazırlanması	15
3.2.2. Gıda proteinlerinin <i>in vitro</i> enzimatik hidrolizi	15
3.2.2.1. Mide sindirimi	15
3.2.2.2. İnce bağırsak sindirimi	15
3.2.3. FAL enzimi içeren mısır filizinin yetiştirilmesi ve FAL enzim aktivitesinin maksimum olduğu günün belirlenmesi.....	16
3.2.4. FAL enzimi içeren mısır filizinin uygulanması	16
3.2.5. Kurutma	17
3.2.5.1. Sulu gıda materyalinin rotary evaporatörde konsantre edilmesi.....	17
3.2.5.2. Vakum kurutma.....	17
3.2.6. Araştırma planı ve istatistiksel yöntemler	19
3.2.7. Kimyasal analiz yöntemleri	19
3.2.7.1. FAL enzim aktivite analizi.....	19
3.2.7.2. Buğday ununda toplam amino asit analizi	20

3.2.7.3. Serbest fenilalanin analizi	21
3.2.7.4. Su tutma kapasitesi analizi	22
3.2.7.5. Suda çözünürlük ve su absorpsiyon indeksi.....	23
3.2.7.6. Kurumadde analizi	23
3.2.7.7. Su aktivitesi analizi	23
3.2.7.8. pH ve titrasyon analizi.....	23
3.2.7.9. Toplam protein analizi	24
3.2.7.10. Enzime dirençli nişasta analizi	24
3.2.8. Fiziksel analiz yöntemleri	25
3.2.8.1. Renk analizi.....	25
3.2.8.2. Yığın yoğunluğu analizi	25
3.2.9. Duyusal analiz.....	25
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	27
4.1. Mısır Filizi FAL Enzim Aktivitesi	27
4.2. Buğday ununun toplam amino asit değerleri.....	27
4.3. <i>In vitro</i> Sindirim ve FAL Enzim Uygulamasının Unun Serbest Fenilalanin İçeriği Üzerine Etkisi	28
4.4. Fenilalanin İçeriği Azaltılmış Unun Bazı Kimyasal ve Fiziksel Analiz Sonuçları.....	31
4.4.1. Fenilalanin içeriği azaltılmış unun su tutma kapasitesi, su absorpsiyon ve suda çözünürlük indeks değerleri	31
4.4.2. Fenilalanin içeriği azaltılmış unun nem içeriği ve su aktivitesi değerleri	33
4.4.3. Fenilalanin içeriği azaltılmış unun pH ve titrasyon asitliği değerleri	34
4.4.4. Fenilalanin içeriği azaltılmış unun toplam protein içeriği	36
4.4.5. Fenilalanin içeriği azaltılmış unun enzime dirençli nişasta (EDN) değerleri	37
4.4.6. Fenilalanin içeriği azaltılmış unun renk değerleri	38
4.4.7. Fenilalanin içeriği azaltılmış unun yığın yoğunluğu değerleri	39
4.5. Duyusal Analiz	40
5. SONUÇ	42
6. KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

d	Yoğunluk
dk	Dakika
dL	Desilitre
F	Faktör
g	Gram
g	Yer çekimi ivmesi
h	Saat
kDa	Kilodalton
L	Litre
m	Kütle
mbar	Milibar
mEq	Miliekivalent gram
mL	Mililitre
mg	Miligram
mmol	Milimol
M	Molar
nm	Nanometre
N	Normalite
rpm	Dakikadaki devir sayısı (Round per minute)
s	Saniye
U	Enzim ünitesi
V	Hacim
µL	Mikrolitre
µmol	Mikromol
°C	Santigrat derece

Kısaltmalar

BH ₄	6R-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterin
EDN	Enzime dirençli nişasta
EEG	Elektroensefalografisi
FAUN	Fenilalanin içeriği azaltılmış un
FKU	Fenilketonüri
GMP	Glikomakropeptit
KM	Kurumadde
KO	Kareler ortalaması
FAH	Fenilalanin hidroksilaz
FAL	Fenilalanin amonyum liyaz
PEG	Polietilen glikol
SAI	Su absorpsiyon indeksi
ŞÇİ	Suda çözünürlük indeksi
SD	Serbestlik derecesi
SMS	Simüle mide sıvısı
STK	Su tutma kapasitesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Fenilalaninin tirozine dönüşüm mekanizması	4
Şekil 2.2. Fenilalanin metabolizması	4
Şekil 2.3. FAH ve FAL enzimleri ile katalizlenmiş reaksiyonlar	12
Şekil 3.1. Fenilalanin içeriği azaltılmış un örneği üretiminin akım şeması	18
Şekil 3.2. FAL enzim aktivite analizinde kullanılan trans-sinamik asit kalibrasyon grafiği	20
Şekil 3.3. Serbest fenilalanin analizinde kullanılan fenilalanin kalibrasyon grafiği.....	22
Şekil 4.1. <i>In vitro</i> sindirim ve mısır filizi ile yapılan FAL enzim uygulamasının unun serbest fenilalanin içeriği üzerine etkisi	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Duyusal analiz formu.....	26
Çizelge 4.1. Mısır filizinde çimlenmenin 7. gününde FAL enzim aktivite değerlerine ait I. ve II. tekerrür verileri.....	27
Çizelge 4.2. Fenilalanin içeriği azaltılmış un üretiminde kullanılan unun toplam amino asit içeriği (mg/kg).....	28
Çizelge 4.3. <i>In vitro</i> sindirim ve FAL enzim uygulamasının unun serbest fenilalanin içeriği üzerine etkilerine ait I. ve II. tekerrür verileri.....	30
Çizelge 4.4. <i>In vitro</i> sindirim ve FAL enzim uygulamasının unun serbest fenilalanin içeriği üzerine etkilerine ait varyans analiz sonuçları.....	30
Çizelge 4.5. <i>In vitro</i> sindirim ve FAL enzim uygulamasının unun serbest fenilalanin içeriği üzerine etkilerine ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	31
Çizelge 4.6. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun su tutma kapasitesi, su absorpsiyon ve suda çözünürlük indeksi değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları.....	32
Çizelge 4.7. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun su tutma kapasitesi, su absorpsiyonu ve suda çözünürlük indeksi değerlerindeki değişime ait varyans analizi sonuçları.....	32
Çizelge 4.8. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun su tutma kapasitesi, su absorpsiyon ve suda çözünürlük indeksi değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları (\pm standart hata).....	32
Çizelge 4.9. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun nem içeriği ve su aktivitesi değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları.....	34
Çizelge 4.10. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun nem içeriği ve su aktivitesi değerlerindeki değişime ait varyans analizi sonuçları.....	34
Çizelge 4.11. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun nem içeriği ve su aktivitesi değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları (\pm standart hata).....	34
Çizelge 4.12. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun pH ve titrasyon asitliği değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları.....	34
Çizelge 4.13. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun pH ve titrasyon asitliği değerlerindeki değişime ait varyans analizi sonuçları....	35

Çizelge 4.14. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun pH ve titrasyon asitliği değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları (\pm standart hata).....	35
Çizelge 4.15. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun % protein içeriği değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları.....	36
Çizelge 4.16. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun % protein içeriği değerlerindeki değişime ait varyans analiz sonuçları.....	36
Çizelge 4.17. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun % protein içeriği değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları (\pm standart hata)	36
Çizelge 4.18. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun % EDN içeriği değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları.....	37
Çizelge 4.19. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun % EDN içeriği değerlerindeki değişime ait varyans analiz sonuçları.....	37
Çizelge 4.20. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun % EDN içeriği değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları (\pm standart hata)	37
Çizelge 4.21. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun renk değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları.....	38
Çizelge 4.22. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun renk değerlerindeki değişime ait varyans analizi sonuçları.....	38
Çizelge 4.23. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun renk değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları (\pm standart hata)	38
Çizelge 4.24. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun yığın yoğunluğu değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları.....	39
Çizelge 4.25. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun yığın yoğunluğu değerlerindeki değişime ait varyans analizi sonuçları	39
Çizelge 4.26. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun yığın yoğunluğu değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları (\pm standart hata)	39
Çizelge 4.27. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış undan üretilen bisküvilerin duyusal analiz değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları.....	41
Çizelge 4.28. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış undan üretilen bisküvilerin duyusal analiz değerlerine ait varyans analiz sonuçları	41

Çizelge 4.29. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış undan üretilen biskivilerin duyusal analiz değerlerine ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları (\pm standart hata)	41
---	----

1. GİRİŞ

Bilimin ilerlemesi ve araştırma olanaklarının artması ile birlikte günümüzde yüzlerce kalıtsal hastalık tanımlanmış olup bu hastalıkların birçoğunun otozomal resesif geçişli olduğu tespit edilmiştir. Kalıtsal metabolik hastalıkların tanımı ilk kez 1908 yılında Sir Archibald Garrod tarafından yapılmıştır (Gilbert-Barness ve Farrell 2016). Bu kalıtsal metabolik hastalıklar, genetik hatalar nedeniyle (Chaturvedi vd 2016) oluşan bazı enzimlerin ve/veya kofaktörlerinin eksikliği veya yokluğunda ortaya çıkmaktadır. Bunun sonucunda metabolizmada bazı metabolitler birikmekte ya da bazı organların normal çalışabilmesi için gerekli olan bazı metabolitlerin eksikliği meydana gelmektedir. Bu hastalıkların tedavisinde erken teşhis büyük önem arz etmektedir. Erken teşhis sayesinde hastaların engelli olma durumu ve ölüm riski azalmaktadır (Chaturvedi vd 2016).

Kalıtsal metabolik hastalıklar; karbonhidrat metabolizma bozukluğu (glikojen depo hastalığı), protein metabolizma bozuklukları (fenilketonüri, tirozinemi, vb.), lizozomal depo bozuklukları (Gaucher hastalığı), organik asit metabolizma bozuklukları (alkaptonüri, metilmalonik, propiyonik vb.), üre döngüsü bozuklukları ve şeker intoleransları (laktoz intolerans, galaktozemi, herediter früktoz intoleransı) olarak sınıflandırılabilir (Kara 2012, Gilbert-Barness ve Farrell 2016).

Protein metabolizma bozukluğu hastalıklarından biri olan fenilketonüri (FKU) hastalığı da, fenilalanin hidroksilaz (FAH) enziminin ve/veya bu enzimin kofaktörü olan tetrahidrobiopterin (6R-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterin, BH₄) maddesinin eksik veya yetersiz olmasından kaynaklanan otozomal resesif geçişli bir hastalıktır (Uskun 2001, Cleary 2014).

Gıdalarla alınan ve esansiyel bir amino asit olan L-fenilalanin, sağlıklı bireylerde karaciğerden salgılanan FAH enzimi tarafından geri dönüşümsüz olarak tirozine dönüştürülürken, FKU hastalığına sahip bireylerde ise; fenilalanin, FAH enzimi ve/veya kofaktörü olan BH₄ maddesinin yokluğu veya eksikliği nedeniyle tirozine dönüştürülemez ve vücut sıvılarında ve beyin dokusunda birikmektedir (Özer 2004, Yakıcı ve Arıcı 2006, Özer vd 2008, Köksal ve Gökmen 2012, Pimentel vd 2014, Banta-Wright vd 2015, Üstüner Top ve Küçük Alemdar 2015).

Vücut sıvılarında ve beyin dokusunda biriken fenilalanin, FKU hastalarının sinir ve beyin dokularında hasara neden olmaktadır. Bunun yanı sıra, bu bireylerde melanin sentezinin azalması nedeniyle cilt, saç ve gözlerde ebeveynlere göre daha açık renk oluşması, idrar ve terin küf gibi kötü kokması, yürümede ve oturmada zorluk, gelişim ve zeka geriliği, agresif ve otistik davranışlar, hiperaktivite, dikkat eksikliği, beyin elektroensefalografisinde (EEG) anormallikler, havale, kusma ve dermatolojik rahatsızlıklar ortaya çıkabilmektedir (Seçkin ve Erturan 1999, Uskun 2001, Yazgan 2003, Tanzer 2007, Köksal ve Gökmen 2012, Pimentel vd 2014, Liemburg vd 2015).

Kalıtsal metabolik hastalıklar, çeşitli takviyeler ve ilaçlarla birlikte ömür boyu diyet tedavisi gerektiren hastalıklardır ve fenilketonüri hastalığında da fenilalanince kısıtlı diyet tedavinin temelini oluşturmaktadır (Strisciuglio ve Concolino 2014, Ho vd 2016). Bu diyet tedavisinde FKU hastalarının tüketebilecekleri gıdalar oldukça sınırlıdır ve bu hastalar, gelişimleri için gerekli olan proteinleri tam olarak alamamaktadırlar. Bu

nedenle diyetlerinde fenilalanin içermeyen veya fenilalanin içeriği azaltılmış özel amino asit karışımları ve düşük proteinli gıdalar kullanmaktadır. FKU hastaları, beslenme açısından birçok besin maddelerinden yeterince yararlanamadıklarından dolayı çeşitli sağlık sorunları ile de karşı karşıya kalabilmektedir. Ayrıca bu ürünlerin birçoğu ithal olduğu için hem kamu hem de hastalar için ekonomik zorluklara neden olmaktadır.

FKU hastalarının daha kaliteli bir yaşam sürdürmeleri amacıyla gen, sapropterin dihidroklorid, enzim ikame ve oral enzim tedavisi gibi yeni tedavi yaklaşımları için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Pimentel vd 2014).

FKU hastaları için enzim ikame ve oral enzim tedavisi çalışmalarında fenilalanin amonyum liyaz (FAL) enzimi de kullanılmaktadır. Bitkisel ve mikrobiyal kaynaklı olan FAL enzimi, otokatalitik olması nedeniyle kofaktöre ihtiyaç duymadan fenilalanini trans-sinamik asite ve amonyağa dönüştürmektedir (Sarkissian ve Gámez 2005, Babaoğlu-Aydaş vd 2013). Trans-sinamik asit karaciğerde benzoik asite dönüştürüldükten sonra idrarla benzoik asit ve hipurat olarak dışarı atılmaktadır. Oluşan amonyak ise metabolik olarak önemsiz kabul edilmektedir (Kim vd 2004).

FKU hastaları diyetlerinde et, süt, tahıl gibi temel ve tam gıda kaynaklarını tüketememektedirler. Bu hastalara yönelik olarak hazırlanmış gıdalar genellikle belirli ve sınırlı sayıda besin bileşenlerinin karışımları şeklindedir. Bu bakımdan FKU hastaları, beslenmelerinde tam gıdaların tanımlanmış ve tanımlanmamış olan birçok besin maddesinden mahrum kalmaktadır. Yapılan literatür taramasında ise FKU hastalarına yönelik olarak fenilalanin içeriği azaltılmış temel ve tam gıda kaynağından bir gıda üretimini içeren bir araştırmaya rastlanılmamıştır.

Yukarıda bahsedilen nedenlerle bu tez çalışmasında; FKU hastalarının gıdalarında önemli bir çeşitlilik ve alternatif oluşturması, hastaların gıda masraflarının azaltılması ve onların yaşam kalitelerinin daha iyi hale getirilmesi amacıyla FKU hastalarına yönelik olarak tam bir gıda kaynağından fenilalanin içeriği azaltılmış bir un hazırlanması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, ana gıda kaynaklarından biri olan unda bulunan proteinler sindirim enzimleri (pepsin, tripsin, kimotripsin, karboksipeptidaz ve proteaz) ile *in vitro* olarak hidroliz edilmesiyle serbestleşebilen fenilalanin amino asidi serbestleştirilmiştir. FAL enzimi içeren mısır filizi, FAL enzim aktivitesinin en yüksek olduğu çimlenmenin 7. günü serbestleşebilen fenilalanin amino asidini azaltmak amacıyla uygulanmıştır. *In vitro* sindirim ve FAL enzim uygulaması sürecinde yapılan örneklemelerde serbest fenilalanin içeriği takip edilmiştir. *In vitro* sindirim ve FAL enzim uygulaması sonucu elde edilen sulu gıda materyali rotary evaporatörde konsantre edildikten sonra vakum kurutucuda kurutularak FKU hastalarına yönelik fenilalanin içeriği azaltılmış bir un hazırlanmıştır. Üretim sonunda fenilalanin içeriği azaltılmış bu unun su tutma kapasitesi, suda çözünürlük ve su absorpsiyonu indeksi, kurumadde, su aktivitesi, pH, titrasyon asitliği, toplam protein, enzime dirençli nişasta içeriği, renk ve yığın yoğunluğu değerleri tespit edilmiştir. Son olarak fenilalanin içeriği azaltılmış undan bisküvi üretimi gerçekleştirilmiş ve bu bisküvilerin duyuusal özellikleri belirlenmiştir.

2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMASI

2.1. Fenilketonüri

Genetik hatalar nedeniyle bazı enzimlerin ve/veya kofaktörlerinin eksikliği veya yokluğunda oluşan metabolik hastalıklardan birisi de FKU hastalığıdır. FKU, doğumsal bir protein metabolizma bozukluğu hastalığı olarak karaciğerden salgılanan hepatik bir enzim olan (Van Vliet vd 2015, Trunzo vd 2015) ve 12. kromozomda yer alan bir gen tarafından kodlanan (Nyhan vd 2005) FAH (EC 1.14.16.1) enziminin ve/veya bu enzimin kofaktörü olan BH₄ maddesinin eksik veya yetersiz olmasından kaynaklanan otozomal resesif geçişli kalıtsal bir hastalıktır (Aktuğlu Zeybek 2003, Rohr vd 2015).

L-fenilalanin, gıda proteinlerinde ortalama %5 oranında bulunan (MacDonald vd 2011) ve gıdalarla birlikte alınan esansiyel bir amino asittir (Fernanda Schuck vd 2015). Normal bireylerde vücudun gelişimi için günde 9.1 mg/kg fenilalanin yeterli olmaktadır (Mohsen vd 2010). Ancak fazla miktarda alınan fenilalanin, sağlıklı bireylerde karaciğerden salgılanan FAH enzimi (Nyhan vd 2005) tarafından geri dönüşümsüz olarak tirozine dönüştürülüp asetoasetik asit ve fumarik asit üzerinden metabolize edilmektedir. Ancak FKU hastalığına sahip bireylerde ise; fenilalanin FAH enzimi eksikliği veya yokluğu nedeniyle tirozine dönüştürülemeyerek vücut sıvılarında birikmekte ve özellikle sinir ve beyin dokularında hasara neden olmaktadır (Özer 2004, Yakıcı ve Arıcı 2006, Özer vd 2008, Köksal ve Gökmen 2012, Banta-Wright vd 2015, Üstüner Top ve Küçük Alemdar 2015). FKU hastalarının sinir ve beyin dokularındaki hasar nedeniyle bu hastalarda çeşitli nörolojik anormallikler görülmektedir (Nyhan vd 2005, Rohr vd 2015, Verduci vd 2016).

2.1.1. FKU hastalığının tarihçesi

FKU hastalığı ilk olarak 1934 yılında Dr. Asbjorn Fölling tarafından Norveçli bir ailenin zihinsel engelli çocuklarının idrarında fenilpirüvik asit bulunması ile fenilpirüvik oligofreni (phenylpyruvic oligophrenia) olarak tanımlanmıştır (Seçkin ve Erturan 1999, Cleary 2014, Pimentel vd 2014). Daha sonra ABD’de Dr. George Jervis FKU hastalarında enzimatik bozukluğun karaciğerde FAH enziminin fenilalanini tirozine çevirememesinden kaynaklandığını (Nyhan vd 2005) ve 1954-1955 yıllarında ise bir araştırmacı grubu (Bickel, Woolf, Armstrong ve Tyler), diyetle fenilalanin kısıtlamasının zekâ geriliğini önlediğini tespit etmiştir (Öztürk 2008). FKU tanısı için toplumsal taramaya yönelik ilk test, 1957 yılında Dr. Willard Centerwall tarafından uygulanmaya başlanmıştır (Aktuğlu Zeybek 2003).

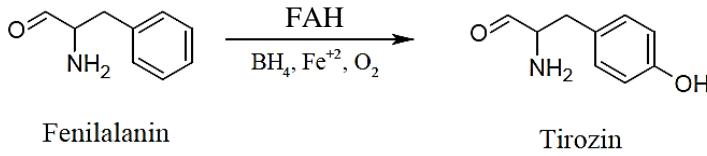
2.1.2. Türkiye’de ve dünyada FKU hastalığı

FKU hastalığı, akraba evliliklerinden doğan bireylerde daha sık görülmektedir (Aktuğlu Zeybek 2003, Sönmez 2008). Akraba evliliklerinin, gelişmiş ülkelere göre daha fazla olduğu ülkemizde hastalığın görülme oranı 1/4500 iken, bu oran; İtalya’da 1/7000, Almanya’da 1/9000, İngiltere’de 1/10000, Amerika’da 1/15000 Fransa’da 1/18000, Japonya’da 1/125000, Finlandiya’da 1/200000 ve dünyada ise 1/10000 değerindedir (Sariboğa 2008, Blau vd 2010, Goldar vd 2016).

FKU hastalığı, anne ve babanın FKU taşıyıcısı olması durumunda da oluşabilmekte ve bu durumda hastalığın oluşma ihtimali %25 oranında olmaktadır. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı Neonatal Tarama Programı Genelgesine (2006/130) göre her 100 kişiden 4'ü FKU hastalığı taşıyıcısı durumundadır ve her yıl yaklaşık 300 birey FKU hastası olarak doğmaktadır (Anonim 2016a).

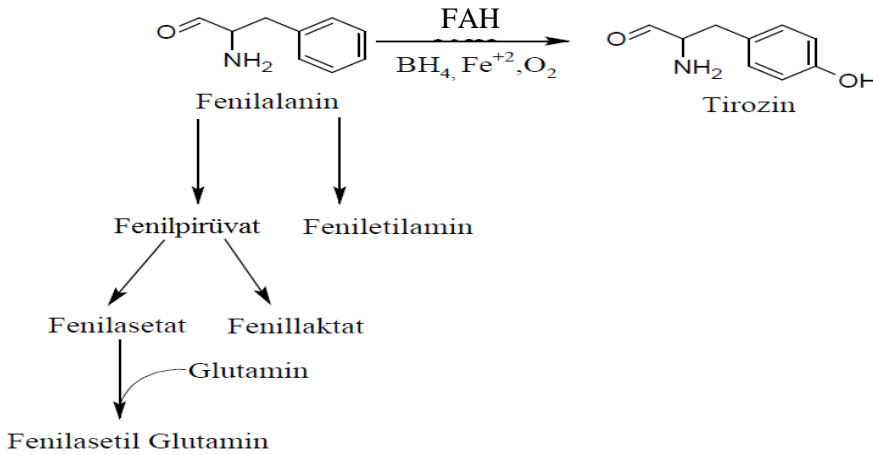
2.1.3. FKU hastalığının oluşumu

Vücudumuz için esansiyel bir amino asit olan fenilalanin, normal bireylerde FAH enzimi ile geri dönüşümsüz olarak tirozine dönüşmektedir. FAH enzimi oksijen molekülünden (O_2) aldığı oksijen atomunu hidroksile ederek (-OH) fenilalanine ilave edip, Şekil 2.1'de görüldüğü gibi fenilalanini tirozine dönüştürmektedir. FAH enzimi, bu reaksiyonu katalizleyebilmek için kofaktörü olan BH_4 ve aktivatörü olan $+2$ değerlikli demire (Fe^{+2}) gereksinim duymaktadır (Kim vd 2004).



Şekil 2.1. Fenilalaninin tirozine dönüşüm mekanizması

FAH enziminin eksikliğinde veya kofaktörü BH_4 'ün sentezi ve/veya geri dönüşüm bozuklukları nedeniyle yetersiz çalışması durumunda fenilalanin, tirozine çevrilememekte ve kanda, diğer vücut sıvılarında ve beyin dokusunda birikmeye başlamaktadır (Cleary 2014). Kanda ve diğer vücut sıvılarında biriken fenilalanin, Şekil 2.2'de görüldüğü gibi deaminasyon sonucu fenilpirüvata ve feniletilamine dönüşür. Sonrasında ise fenilpirüvat indirgenme ürünleri olan fenillaktat, fenilasetat ve fenilasetilglutamine dönüşmektedir. Oluşan bu metabolitler kısmen idrarla dışarı atılmakla birlikte kan ve vücut sıvılarında birikerek zekâ geriliği gibi çeşitli sorunlara da neden olmaktadır. Ayrıca, biriken fenilalanin, vücut için gerekli olan diğer amino asitlerin gastrointestinal sistemde emilimini de azaltmaktadır (Ası 1999).



Şekil 2.2. Fenilalanin metabolizması

2.1.3.1. FKU hastalığının sınıflandırılması

FKU hastalığına sahip bireyler, kan fenilalanin konsantrasyonuna göre sınıflandırılmaktadırlar. Sağlıklı yeni doğanlarda kan fenilalanin konsantrasyonu 2 mg/dL (120 µmol/L) değerinden daha düşük olmaktadır (Blau vd 2014). Fenilalanin konsantrasyonu 2-10 mg/dL (120-600 µmol/L) olanlar hiperfenilalaninemi, 10-20 mg/dL (600-1200 µmol/L) olanlar orta dereceli FKU, 20 mg/dL (1200 µmol/L) değerinden daha yüksek olanlar ise klasik FKU hastası olarak tanımlanmaktadır (Kara 2012, Trunzo vd 2015). Fenilalanin/tirozin oranı normal bireylerde 0.6-1 arasında iken, hiperfenilalaninemi hastalarında bu değer 3'den daha yüksek olmaktadır (Karadeniz 2013, Cleary 2014).

2.1.4. FKU hastalığı tanı ve belirtileri

FKU tanısı, yeni doğan tarama programı içerisinde ilk olarak 1960'lı yıllarda Dr. Robert Guthrie tarafından geliştirilmiş olan "Guthrie" testi ile yeni doğanlarda topuk kanında yapılmaktadır (Bannick vd 2015, Blau vd 2016, Verduci vd 2016). Bu test, bakteriyel inhibisyon esasına dayanmaktadır. Bu inhibisyonda, *Bacillus subtilis* bakterisi beta-tiyenilalanin eklenen ortamda fenilalanin olmadan üreyememektedir. Topuktan alınan kan örneği filtre kâğıdına damlatılmakta ve daire şeklinde kesilen örnek besi yeri üzerine yerleştirilmektedir. Ortamda yeterli miktarda fenilalanin var ise bu bakteri kan örneğinin altında üremeye başlamakta ve test pozitif olarak değerlendirilmektedir (Nyhan vd 2005).

Guthrie testi, 1987 yılından bu yana Sağlık Bakanlığı'nca ülkemizde de uygulanmaktadır (Anonim 2016a). Kan örneğinin alınmasından önce tercihen yeni doğanın en az 24 saat beslenmiş olması gerekmektedir (Seçkin ve Erturan 1999). Ayrıca, hiperfenilalaninemi olduğu düşünülen hastalarda biyopterin metabolizma bozukluğu ayırıcı tanısı için BH₄ yükleme testi uygulanmaktadır (Kara 2012).

FKU hastalığı olan yeni doğanlar ilk aylarda sağlıklı bireylerden ayırt edilmezler ancak ilerleyen aylarda hastalık belirtilerini göstermeye başlar. Bu hastalığın belirtileri; melanin pigmenti sentezinin azalması nedeniyle cilt, saç ve gözlerde ebeveynlere göre daha açık renk oluşması, idrar ve terin küf ya da ölü fare gibi kötü kokması, yürümede ve oturmada zorluk, gelişim ve zeka geriliği, agresif ve otistik davranışlar, hiperaktivite, dikkat eksikliği, beyin elektroensefalografisinde (EEG) anormallikler, havale, kusma ve dermatolojik rahatsızlıklar olarak ortaya çıkabilmektedir (Seçkin ve Erturan 1999, Uskun 2001, Yazgan 2003, Tanzer 2007, Cleary 2014, Pimentel vd 2014, Strisciuglio ve Concolino 2014, Liemburg vd 2015). Ayrıca FKU hastalığı, sinir sistemini saran ve iletim için önemli bir kılıf olan miyelin sentezini de etkilemektedir (Bannick vd 2015).

FKU'lu yeni doğanların, zaman içerisinde beyin gelişimleri yeterli olmadığı için kafa yapıları sağlıklı olanlara göre küçük olmaktadır (Lam vd 2008, Özer vd 2008). Yeni doğanlarda erken tanı ve fenilalanince kısıtlı diyet ile normal zekâ düzeyine erişilebilmek mümkün olabilmekte iken üç ay içerisinde diyet ve tedaviye başlanmaz ise zihinsel engellilik kaçınılmaz bir hal almaktadır (Aktuğlu Zeybek 2003, Sönmez 2008).

Kandaki yüksek fenilalanin seviyesi, vücut için önemli olan protein ve nörotransmitterlerin sentezinde gerekli olan lüsin, lisin, tirozin ve triptofan gibi serbest

amino asitlerin beyine taşınmasında bariyer görevi görmektedir (Verduci vd 2016). Ayrıca fenilalanin; tirozin ve triptofan gibi amino asitlerin sentezlenmesinde de görevlidir. Bu nedenle, fenilalaninin kanda birikmesi sonucunda tirozin ve triptofan gibi amino asitlerin eksikliği de görülmektedir (Sarkissian ve Gámez 2005). Tirozin ve triptofan amino asitleri; epinefrin, norepinefrin, dopamin ve serotonin gibi nörotransmitterlerin (Nyhan vd 2005, Bannick vd 2015) ve melanin gibi bileşiklerin öncül amino asitleri olduğu için bu bileşiklerin sentezlenmelerini de kısıtlamakta ve bunların düşük konsantrasyonlarda kalmasına neden olmaktadır (Jahya vd 2013, Fernanda Schuck vd 2015, Bruinenberg vd 2016).

2.1.5. FKU hastalığının diyet tedavisi ve temel prensipleri

FKU hastalığı için tıbbi olarak kesin bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Bu hastalar için fenilalanince kısıtlı diyet tedavinin temelini oluşturmaktadır (Goldson vd 2008, Pimentel vd 2014) ve bu diyet tedavisi kişiye özel olarak düzenlenmektedir.

Kandaki fenilalanin miktarı 6 mg/dL (3600 µmol/L) değerinden daha fazla olanlarda, fenilalanince kısıtlı diyet uygulanması gerekmektedir (Kara 2012, Banta-Wright vd 2015, Liemburg vd 2015). Diyet tedavisinin temel amacı kandaki fenilalanin değerinin kontrol edilerek hastanın normal bir hayat sürdürebilmesini sağlayabilmektir. Diyete başlandıktan sonra kandaki fenilalanin değeri 2-6 mg/dL (120-3600 µmol/L) arasında tutulmaya çalışılmaktadır (Jahya vd 2013, Üstüner Top ve Küçük Alemdar 2015, Turki vd 2015).

FKU hastalarının diyetlerinde gıdalar; tüketimi yasak, sınırlı serbest ve serbest gıdalar olarak sınıflandırılabilir (Çizelge 2.1). Bu sınıflandırmanın FKU hastalar ve ailesi tarafından iyi bir şekilde bilinmesi ve uygulanması oldukça önemlidir. Et, balık, yumurta, süt, tahıl ve baklagil ve bunların ürünlerini içeren gıdalar, aspartam içerebilen çeşitli sakız ve içecekler tüketimi yasak ürünler olarak sınıflandırılmaktadır (Özer vd 2008, Karadeniz 2013, Rohr vd 2015). Nişasta, şeker, bitkisel sıvı yağ gibi gıdaların tüketimi serbest iken meyve-sebzeler gibi gıdaların tüketimi ise sınırlı serbest gıdalar olarak sınıflandırılmakta ve hastaya göre porsiyonlar şeklinde verilmektedir (Pimentel vd 2014, Üstüner Top ve Küçük Alemdar 2015).

FKU hastalarının diyeti; temel olarak yağ ve karbonhidrat açısından zengin ve fenilalanin hariç tüm amino asitlerin takviyesine dayanmaktadır. FKU hastaları, fenilalaninin metabolizma edilmesi sonucu oluşan tirozinden de yoksun kaldığı için dopamin, norepinefrin ve epinefrin gibi nörotransmitterlerin, tiroksin ve melanin gibi deri pigmentlerin eksiklikleri de görülmektedir. Bu yüzden FKU hastalarında tirozin esansiyel amino asit konumuna geçmekte (Sarkissian ve Gámez 2005, Ney vd 2016) ve bu hastaların tirozin alımı da önemli olmaktadır (MacDonald vd 2011, Karadeniz 2013). Bu nedenlerle FKU hastalarının kanındaki fenilalanin ve tirozin miktarının büyüme ve gelişme için yeterli olup olmadığı düzenli olarak takip edilmeli ve zihinsel gelişimleri izlenmelidir. FKU hastalarının, fenilalanince kısıtlı diyeti hayat boyu disiplinli bir şekilde sürdürmeleri gerekmektedir (Bannick vd 2015, Van Vliet vd 2015).

Çizelge 2.1. FKU hastalarının diyetlerinde önemli olan gıdaların sınıflandırılması

Tüketimi Yasak Gıdalar
<ul style="list-style-type: none"> • Et ve et ürünleri (sakatat, sucuk, salam, sosis, pastırma vd.) • Süt ve süt ürünleri (süt, yoğurt, kefir, peynir, sütlü tatlılar vd.) • Yağlı tohumlar (fındık, fıstık, ceviz, badem, çekirdek vd.) • Tahıllar (buğday, çavdar, arpa, yulaf unu vd.) • Kuru baklagiller (kuru fasulye, nohut, mercimek vd.) • Kek, kurabiye, bisküvi, pasta, kraker vb. hazır gıdalar • Aspartam içeren ürünler (sakız, diyet kola vd.) • Yumurta
Tüketimi Sınırlı Serbest Gıdalar*
<ul style="list-style-type: none"> • Sebzeler (biber, domates, salatalık vd.) • Meyveler (elma, armut, kayısı vd.) • Bal, pekmez vd.
Tüketimi Serbest Gıdalar
<ul style="list-style-type: none"> • İçecekler (soda, çay, bitki çayları, kahve, diyet olmayan gazlı içecekler vd.) • Şekerlemeler (sade lokum, sade akide şekeri vd.) • Yağlar (bitkisel sıvı yağlar, margarinler vd.)

*Belirli miktarda fenilalanin içerdikleri için porsiyonlar halinde tüketilmesi gerekmektedir (Köksal ve Gökmen 2012).

Diyet tedavisinde fenilalanin içermeyen veya fenilalanin içeriği azaltılmış ve vitamin, mineral ve tirozince zenginleştirilmiş özel amino asit karışımları da kullanılmaktadır (Liemburg vd 2015, Bannick vd 2015, Crujeiras vd 2015). Bu hastalar için hazırlanmış amino asit karışımları; PKU-Milupa (Almanya), Balviten (Polonya), Phenylton, Nutricia, Loprofin (Hollanda), Lofenelac (Amerika) ve Vitaflo (İngiltere) gibi bazı firmalar tarafından üretilmektedir. Ancak bu ürünler, yüksek fiyat ve hoşça gitmeyen koku ve tat gibi özellikleri nedeniyle hastalar tarafından tercih edilmemektedir (Ney vd 2009).

Fenilalanin, esansiyel bir amino asit olması sebebiyle FKU hastaları da gelişimleri için bu amino aside ihtiyaç duymaktadırlar. Orta dereceli FKU hastaları günde 250 ila 400 mg değerleri arasındaki fenilalanini tolere edebilirken klasik FKU hastaları ise; günde ancak 250 mg'a kadar fenilalanini tolere edebilmektedirler (Blau vd 2010). Bu miktarların üzerindeki fenilalanin ise sağlık sorunlarını tetiklemektedir.

Bunların yanı sıra, FKU hastalığına sahip bayanların gebelik durumunda kanda biriken fenilalanin fetüse teratojenik etki göstermektedir. Kanda biriken bu fenilalanin plasenta yoluyla yeni doğanın dolaşımına katılarak gelişim bozukluklarına sebep olmaktadır. Ancak hasta gebe bayanlar, diyetlerini düzenli bir şekilde takip ederlerse sağlıklı yeni doğanlara sahip olabilmektedir (Waisbren vd 2015).

FKU'lu yeni doğanların büyüme ve gelişmesinde önemli rol oynayan özellikle uzun zincirli doymamış yağ asitlerince zengin olan anne sütüne gereksinim duyulmaktadır (Küçükkasap 2013). Ancak anne sütü tüketimi sınırlı olarak yaptırılmalı ve kanda istenen 2-6 mg/dL fenilalanin değerine göre ayarlanmalıdır (Sönmez 2008,

Banta-Wright vd 2015). Geçmiş yıllarda FKU tanısı konulmuş yeni doğanların, fenilalanin riski nedeniyle anne sütü almalarına izin verilmemekteydi (Banta-Wright vd 2015). Ancak inek sütünde (129 mg/100g) anne sütüne (34 mg/100g) göre daha yüksek oranda fenilalanin bulunduğu anlaşılması ve anne sütüyle beslenen yeni doğanların gelişimlerinin daha iyi olması nedenleriyle yeni doğanların kısmen anne sütü almasının daha doğru olduğu değerlendirilmiştir (Sönmez 2008, Türkomp 2015).

2.1.6. FKU hastaları için gıda üretim yöntemleri

FKU hastaları, fenilalanince kısıtlı diyeti hayatları boyunca sürdürmek zorundadırlar. Hastalar bu diyetle şeker, yağ, nişasta gibi gıdaları serbestçe tüketebilirken meyve ve sebzeleri kısıtlı olarak tüketebilmektedirler. Bunların dışında kalan diğer bütün gıdaları tüketmeleri FKU hastaları için sakıncalı olmaktadır.

FKU hastalarının yaşam kalitesini artırmak amacı ile çeşitli amino asit karışımları ve düşük proteinli gıdalar hastaların diyetlerinde kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra yüksek molekül ağırlıklı nötr amino asit destek tedavisi (large neutral amino acid, LNAA), glikomakropeptit (GMP) gibi protein ikamesi ve proteince zengin gıdaların hidrolizi ile elde edilen gıdalar FKU hastalarının diyetlerinde kullanılmak amacıyla üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

2.1.6.1. Amino asit karışımları

Hayvansal gıdalar, tahıllar ve baklagiller, vitamin ve mineral bakımından oldukça zengindir. FKU hastalarının bu tür gıdaları tüketmeleri sakıncalı olduğu için B₂, B₃, B₆, B₉, B₁₂ vd vitamin ve selenyum, çinko, demir, kalsiyum gibi mineralleri yeterli olarak alamamaktadırlar (Öztürk 2008, Crujeiras vd 2015). Bu nedenlerle kemik mineral yoğunluğu FKU hastalarında normal insanlara göre daha düşük olabilmektedir (Cleary 2014). B₁₂ vitamin eksikliği FKU hastalarının yaşı ilerledikçe daha sık görülmekte ve bu da nörolojik sorunları daha da artırmaktadır. Bu sebeple FKU hastalarının uyguladıkları diyetin vitamin ve minerallerle takviye edilmesi gerekmektedir (MacDonald vd 2011, Crujeiras vd 2015). Bu amaçla, diyet tedavisinde; vitamin, mineral, az miktarda karbonhidrat ve yağ içeren amino asit karışımları kullanılmaktadır (Htun vd 2015). Bunun yanı sıra, fenilalanin içermeyen, fenilalanin içeriği azaltılmış ve tirozince zenginleştirilmiş olan amino asit karışımları da bulunmaktadır. Bu ürünler genellikle yapay amino asit karışımları şeklindedir ve FKU hastalarının amino asit ihtiyacının yanı sıra enerji gereksinimlerinin karşılanmasında da önemli rol oynamaktadır (Küçükbaş 2013). Ancak bu ürünler, tat ve kokuları nedeniyle FKU hastaları tarafından zorlukla tüketilebilmektedir (MacLeod vd 2010, Zaki vd 2016).

2.1.6.2. Düşük proteinli gıdalar

Diyetin bırakılması veya düzensiz olarak uygulanması hastalarda geriye dönüşümsüz nörolojik riskler oluşturmaktadır (Sönmez 2008, MacDonald vd 2011, Banta-Wright vd 2015, Turki vd 2015). Ancak fenilalaninin bir esansiyel amino asit olması nedeniyle belirli miktarda alınması da gerekmektedir. Bu da düşük proteinli gıdalar ile sağlanmaktadır (Soltanzadeh ve Mirmoghtadaie 2014, Rohr vd 2015). Düşük proteinli gıdalar genel olarak protein içeriği düşürülmüş ve çölyak hastaları için hazırlanmış olan glutensiz ürünlerdir. Fenilalanin diyetle birlikte hiç alınmaması halinde

özellikle süt çocuklarında; iştahsızlık, anemi ve döküntü oluşmakta ve hatta ölüme kadar giden sonuçlara yol açabilmektedir (Karadeniz 2013). Bu nedenle diyetle fenilalanin alımı önemli olmakta ve günlük olarak alınması gereken fenilalanin miktarı kişinin yaşı ve kilosuna göre değişmektedir (Rohr vd 2015).

2.1.6.1. Yüksek molekül ağırlıklı nötr amino asit destek tedavisi

FKU hastalığının diyet tedavisi yüksek molekül ağırlıklı nötr amino asit kullanımı ile de desteklenebilmektedir. Tirozin, triptofan, treonin, izolösin gibi yüksek molekül ağırlıklı nötr amino asitler gastrointestinal ve kan-beyin bariyerini geçerken fenilalaninle aynı yol ve taşıyıcıyı kullanmaktadırlar. Bu nedenle de yüksek molekül ağırlıklı nötr amino asitlerin FKU hastalarının diyetlerine eklenmesi taşınma yönüyle fenilalaninle rekabet etmeleri nedeniyle fenilalaninin vücut sıvılarına daha az alınmasına neden olmakta ve beyin dokularında biriken fenilalanin miktarını da azaltabilmektedir (Koch vd 2003, Van Vliet vd 2015). Böylelikle kandaki fenilalanin azalırken, FKU hastaları için esansiyel bir amino asit haline gelen tirozinin miktarı da artırılabilir (Soltanzadeh ve Mirmoghtadaie 2014). Fenilalanin konsantrasyonunun azalması ise beyin nöropsikolojik işlevini artırmaktadır (Strisciuglio ve Concolino 2014).

Bu konuyla ilgili olarak FKU hastası fareler üzerinde yapılmış bir çalışmada, fareler 3 gruba ayrılarak farklı diyet tedavileri uygulanmıştır. Birinci gruba yüksek molekül ağırlıklı nötr amino asit takviye edilmiş diyet, ikinci gruba eş kaloride yüksek proteinli kontrol diyet ve üçüncü gruba ise kısıtlanmasız normal diyet altı hafta boyunca uygulanmıştır. Yüksek molekül ağırlıklı nötr amino asit takviye edilmiş diyetle kan fenilalanin konsantrasyonu normal diyete göre %67 azaldığı, yüksek proteinli diyetle ise normal diyete göre kan fenilalanin seviyesinin çok yüksek miktarlarda olduğu tespit edilmiştir (Van Vliet vd 2015).

2.1.6.2. Protein ikamesi

Düşük proteinli gıdalara veya amino asit karışımlarına alternatif olarak protein ikamesi olarak glikomakropeptit (GMP) kullanımı ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Peynir üretiminde bir yan ürün olan peynir altı suyundan izole edilen GMP, peynir altı suyu toplam proteinlerinin %15 ila %20'sini oluşturan ve β -lactoglobulin ve α -lactalbuminden sonra en çok bulunan proteindir (LaClair vd 2009, Soltanzadeh ve Mirmoghtadaie 2014). GMP, dallanmış amino asitlerce zengin fakat aromatik amino asitlerce fakirdir. Aromatik bir amino asit olan fenilalanince de fakir olması sebebiyle GMP, FKU hastaları için uygun doğal bir protein kaynağıdır (Zaki vd 2016, Goldar vd 2016). Ayrıca GMP, treonin, izolösin gibi yüksek molekül ağırlıklı nötr amino asitleri de yapısında bulundurmaktadır (Ney vd 2016). Bu sayede kan-beyin bariyerini geçerken fenilalaninle aynı taşıyıcıyı kullanan bu yüksek molekül ağırlıklı nötr amino asitlerin, beyindeki fenilalanin miktarını azalttığı da belirtilmiştir (MacLeod vd 2010). Bunların yanı sıra GMP, sindirimini ve emilimin yavaş olması nedeniyle amino asit karışımlarına göre tokluk hissi daha fazla olmaktadır (Ney ve Etzel 2017). Tüm bu nedenlerden dolayı protein ikamesi olarak GMP kullanımı FKU hastalarının diyetlerine uyum sağlaması açısından önemli bir avantaj sağlamaktadır (MacLeod vd 2010, Strisciuglio ve Concolino 2014).

Bu konuyla ilgili olarak, GMP'in sentetik amino asit karışımları yerine kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi amacıyla FKU hastası çocuklar üzerinde yapılan bir çalışmada, günlük olarak alınması gereken protein; amino asit karışımları ve amino asit karışımı %50 oranında GMP ile değiştirilerek 2 şekilde verilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda, fenilalanin/tirozin oranlarında önemli bir fark gözlenmemiştir. Bu nedenle, besin değeri ve lezzeti açısından da daha tatmin edici olan ve toksik etki göstermeyen GMP'nin FKU hastalarının diyetinde amino asit karışımlarının %50'si yerine kullanılabileceği değerlendirilmiştir (Zaki vd 2016).

2.1.6.3. Proteince zengin gıdaların hidrolizi

FKU hastalarının diyetlerinde kullanabilecekleri alternatif ürünlerin geliştirilmesi amacıyla üzerinde çalışılan bir başka konu ise protein içeriği yüksek olan gıdaların hidroliz edilmesidir. Bu amaçla, yüksek protein içeriğine sahip gıdalar proteaz enzimleri ile hidroliz edilmekte ve ortaya çıkan serbest aromatik amino asitler reçine veya aktif karbon kullanımı ile uzaklaştırılmaktadır (Lopes vd 2008, Silvestre vd 2011). Bunun sonucunda fenilalanin içeriği azaltılmış gıda protein hidrolizatları elde edilmektedir.

Bu konuyla ilgili olarak yapılmış bir çalışmada, buğday unu *Bacillus licheniformis* ve ananas kabuklarından elde edilen enzim ekstraktları ve pankreatin enzimleriyle protein hidrolizi gerçekleştirilmiş ve elde edilen hidrolizat aktif karbondan geçirildikten sonra fenilalanin içeriğinin %66.28 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Carreira vd 2008).

2.2. FKU Hastalığı İçin Alternatif Tedavi Yöntemleri

FKU hastaları için uygulanan fenilalanince kısıtlı diyet başarılı bir tedavi yöntemi olmasına rağmen yaşam boyu sürdürülmesi ve takip edilmesi zordur. Bu nedenle; gen, sapropterin dihidroklorid, enzim ikame ve oral enzim tedavisi gibi yeni tedavi yöntemleri üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

2.2.1. Gen tedavisi

FAH enzimi, 12. kromozomda bulunan bir gen (12q23.2) (Anonim 2017b) tarafından kodlanan hepatik bir enzim olup karaciğerde sentezlenmektedir. FAH enzimini kodlayan bu gendeki hata nedeniyle FKU hastalığı oluşmaktadır. Bu nedenle karaciğerdeki FAH enzimini sentezleyen bölgenin iyileştirilmesine yönelik olarak gen tedavisi uygulama çalışmaları yapılmaktadır. (Kim vd 2004, Özer 2004). Ancak gen tedavisi günümüzde henüz tam olarak kontrol edilebilir sonuçlar vermemiştir (Kara 2012).

2.2.2. Sapropterin dihidroklorid tedavisi

Tıbbi tedavi olarak, ilk uygulaması 1999 yılında başlamış olan sapropterin dihidroklorid tedavisi ile (Van Spronsen ve Derks 2014), bazı hiperfenilalaninemi ve orta dereceli FKU hastalarının kan fenilalanin düzeyi kontrol altına alınabilmektedir (Trunzo vd 2015). Sapropterin dihidroklorid, FAH enziminin stabilitesini ve doğru katlanmasını sağlayan bir şaperon olarak hareket etmektedir (Strisciuglio ve Concolino 2014, Tansek vd 2016). Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanan KUVAN® isimli ilaç (Sapropterin dihydrochloride, Biomarin Pharmaceutical, Novato, CA, ABD) FAH

enziminin kofaktörü olan doğal BH₄'ün sentetik formülasyonunu içeren oral bir tablettir (Elsas vd 2011, Cleary 2014, Anonim 2015). FAH enziminin kofaktörü olan BH₄, diyet fenilalanin toleransını artırarak diyet tedavisine yardımcı olmakta ve bu yolla birçok hastanın yaşam kalitesi artırılmaktadır (Kara 2012). Yapılan bazı klinik çalışmalarda sapropterin dihidrokloridin kandaki fenilalanin değerini %30'a kadar azalttığı sonucuna ulaşılmıştır (Elsas vd 2011, Strisciuglio ve Concolino 2014, Turki vd 2015).

Bu konuyla ilgili olarak bazı tıp merkezlerinde sapropterin dihidroklorid (KUVAN®) kullanan FKU hastalarında yapılan bir anket çalışmasında, hastaların fenilalanine toleransının artması ve davranış değişikliklerinin göz önüne alınmasıyla sapropterin dihidroklorid kullanımının kan fenilalanin seviyesini düşürdüğü rapor edilmiştir (Gordon vd 2012). Orta dereceli hiperfenilalaninemi hastaları üzerinde yapılan bir başka çalışmada, hastalar diyetleriyle beraber 2 yıl boyunca sapropterin dihidroklorid (KUVAN®) tedavisi görmüşler ve bu süre sonunda hastaların diyetleriyle daha fazla fenilalanin alabildikleri, kan fenilalanin seviyesinin önemli düzeyde değişmediği ancak fenilalanin/tirozin oranının düştüğü tespit edilmiştir (Tansek vd 2016).

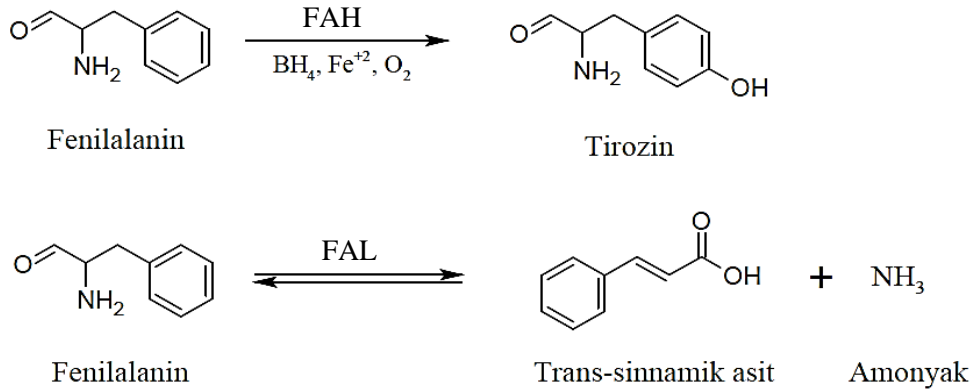
2.2.3. Enzim ikame ve oral enzim tedavisi

FKU hastalığı için FAH ve FAL enzimleri ile enzim ikame çalışmaları gerçekleştirilmektedir. Her iki enzimde fenilalanini metabolize etmekte, ancak FAH enziminin izolasyonunda çok yüksek miktarda kaynak materyali gerekmekte ve bu enzimin doğal olarak kararsız olması nedeniyle de saflaştırılmasında büyük zorluklar yaşanmaktadır. Ayrıca FAH enzimi fenilalanini tirozine dönüştürmek için; kofaktör olarak BH₄, aktivatör olarak demir (Fe⁺²) ve oksijene (O₂) ihtiyaç duymaktadır. FAH enzimi ile ikame çalışmaları bu nedenlerle genellikle başarısızlıkla sonuçlanmaktadır (Kim vd 2004, López-Villalobos vd 2014).

FKU hastaları için, enzim ikame tedavisinde FAH enzimi yerine otokatalitik bir enzim olan FAL enziminin kullanılması daha uygun olmaktadır (Sarkissian ve Gámez 2005, Babaoğlu-Aydaş vd 2013). FAL enzimi FAH enziminin aksine kofaktöre ihtiyaç duymadan fenilalanini trans-sinamik aside ve amonyağa dönüştürmektedir (Şekil 2.3) (Cliff vd 2016).

Oral enzim tedavisi de rekombinant FAL enziminin oral olarak verilmesi prensibine dayanmaktadır (Lam vd 2008). FKU hastalarının diyetleri ile birlikte oral enzim tedavisinin uygulanması bu hastalar için alternatif oluşturmaktadır. Ancak kan fenilalanin değerini düşürmek için oral olarak verilmesi gereken FAL enzim miktarının fazla olması ve enzimin intestinal proteazlara karşı hassasiyet göstermesi sebebiyle bu tedavi yönteminin yeterli etki göstermediği belirtilmektedir (Lam vd 2008, Goldson vd 2008, Cliff vd 2016).

Vücuda enjekte edilen FAL enziminin ise; bağışıklık sistemini etkileyerek çeşitli reaksiyonlara neden olabildiği belirtilmiştir. Ancak FAL enziminin polietilen glikolle (PEG) bağlanması sonucu bağışıklık sisteminin verdiği reaksiyonların azaltıldığı belirtilmiştir (Strisciuglio ve Concolino 2014).



Şekil 2.3. FAH ve FAL enzimleri ile katalizlenmiş reaksiyonlar

Enzim ikame tedavisi ve oral enzim tedavisi için gerekli olan enzim, enzimin üretim aşamalarından ekstraksiyon ve saflaştırma hem zaman alıcı hem de yüksek maliyetli olmaktadır. Ayrıca, yapılan birçok optimizasyon çalışmalarına rağmen elde edilen enzimin verimli bir şekilde çalışmadığı ve kısa bir sürede inhibe olduğu tespit edilmiştir (McInnis vd 2009).

2.2.3.1. Fenilalanin amonyum liyaz (FAL) enzimi

FAL enzimi (EC 4.3.1.24) (Şirin vd 2016, Barron vd 2017), FAH enzimi gibi fenilalanini metabolize etmektedir. Ancak FAL enzimi, FAH enziminin aksine kofaktöre ihtiyaç duymaksızın otokatalitik olarak fenilalanini deaminasyon reaksiyonu ile trans-sinamik asit ve önemsiz miktarda amonyağa dönüştürmektedir (McInnis vd 2009, López-Villalobos vd 2014). Oluşan trans-sinamik asit ise karaciğerde benzoik aside dönüştürüldükten sonra idrarla birlikte benzoik asit ve hipurat olarak dışarı atılmaktadır (Goldson vd 2008, Şirin vd 2016). Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, trans-sinamik asidin toksik etki göstermediği de tespit edilmiştir (Kim vd 2004).

İnsanlarda ve hayvanlarda bulunmayan FAL enzimi bazı mantar (*Ustilago maydis*), maya (*Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*), ve bakterilerde (*Anabaena variabilis*, *Nostoc punctiforme*) bulunmaktadır (Barron vd 2017). Bunun yanı sıra kırmızı ve beyaz buğday filizi, mısır, yeşil mercimek, soya fasulyesi vb. yüksek FAL aktivitesine sahiptir (Reichert vd 2009, Babaoğlu-Aydaş vd 2013). Ayrıca, *Escherichia coli*'den de farklı aktivitelere izole edilebilmektedir.

FAL enzimi, bitkilerde savunma mekanizmasında ve fenilpropanoid metabolik yolda üretilen kumarin, lignan, flavonoid, hidroksisinnamik esterler ve antosiyaninler gibi ikincil metabolit ürünlerin oluşumunda öncül bir enzimdir (McInnis vd 2009, López-Villalobos vd 2014, Barron vd 2017). Bu metabolik yol, fenilalaninin trans-sinamik aside dönüşümünden sorumludur (Zang vd 2015). Ayrıca, FAL enzimi tarafından oluşturulan trans-sinamik asit, bitkilerin stres yanıtlarında önemli rol oynamaktadır (Goldson vd 2008, Lam vd 2008).

Genel olarak 77-83 kDa arasında alt birimleri ile birlikte tetramerik halde bulunan (Goldson vd 2008, Van Spronsen ve Derks 2014) ve geniş bir sıcaklık aralığında kararlı

olan FAL enzimi optimum aktivitesini 30°C sıcaklıkta ve ortamın pH değeri 8.5 olduğu şartlarda göstermektedir (Sarkissian ve Gámez 2005). Bunun yanı sıra FAL enzim aktivitesi; ışık, tuz ve stres ile beraber artabilmektedir (Şirin vd 2016).

Bitkisel ve mikrobiyal kaynaklı olan bu enzim oral yoldan verilerek vücutta biriken fenilalanini zararsız olan trans-sinamik aside ve amonyağa dönüştürerek vücuttan atılmasını sağlamaktadır. FAL enzimi tarafından oluşturulan trans-sinamik asit organik bir bileşiktir ve günlük yaklaşık 3 g trans-sinamik asidin hem FKU hastaları hem de normal bireyler için zararsız olduğu belirtilmiştir (Sarkissian ve Gámez 2005). Yapılan bir çalışmada, FAL enziminin, kan fenilalanin düzeyini farelerde %76 düzeyinde düşürdüğü belirtilmiştir (Özer 2004). Böylelikle vücutta fenilalanin birikimini önlenmesi ve hastaların daha kaliteli bir yaşam geçirmesi sağlanabilmektedir.

FAL enzimi ile ilgili çalışmalarda, FKU hastalarının kullanımı için yarı geçirgen immobilize FAL enzim kapsülü ve *Escherichia coli* veya *Lactobacillus lactis* hücrelerinden rekombinant olarak FAL enzimi üretimi gibi çeşitli yöntemler araştırılmıştır. Bunun yanı sıra enjekte edilebilir FAL enzimi de araştırılmış, ancak bu enzim deri altına enjekte edildiğinde bağışıklık sisteminin olumsuz reaksiyon vermesiyle karşılaşmıştır (Sarkissian ve Gámez vd 2005).

2.2.3.2. Buğday ve unu

Buğday, *Poacea* familyasından olup, kültürü yapılan en eski bitkidir (Devi Sowjanya vd 2015). *Triticum aestivum*, *triticum durum* ve *triticum compactum* olmak üzere üç temel türü bulunmaktadır. İnsan beslenmesinde önemli rol oynayan buğday, dünyada ve ülkemizde üretimi ve tüketimi en fazla olan tahıl ürünüdür (Bilgin ve Korkut 2005). Buğdaydan, başta ekmek olmak üzere bulgur, makarna, bisküvi, irmik, nişasta gibi çeşitli unlu mamuller ve diğer gıda ürünleri üretilebilmektedir. Buğday ve unu içerdiği protein, karbonhidrat, çeşitli mineraller, vitaminler ve enzimlerle sağlık açısından önemli bir tahıl ürünüdür.

2.2.3.3. Mısır ve diğer bazı bitkilerin FAL enzim aktiviteleri

Mısır, *Poacea* familyasından olup dünyada buğday ve pirinç ile birlikte en çok tüketilen üç tahıldan biridir (Süzer 2003). Mısır; tiamin (B₁), niasin (B₃), pantotenik asit (B₅) ve folik asit (B₉) gibi B vitaminleri, besinsel lif, magnezyum, fosfor gibi elementler açısından zengindir (Anonim 2017a). ABD Tarım Bakanlığı Tarımsal Araştırma Servisi (USDA) veri tabanlarına göre tatlı ve sarı mısır, 0.150g/100g fenilalanin içermektedir. İçerdiği bu besin değerlerinin kalitesi mısırın çimlendirilmesi ile birlikte artmakta ve özellikle çimlenme ile tane içerisinde bulunan enzimler daha aktif hale gelmektedir (Pauca-Menacho vd 2017).

Japon çeşidi mısırın (*Zea mays* L. cv. japonica) çimlendirilmesi ile elde edilen mısır filizi kökleri, yüksek antosiyanin içeriğinden kaynaklanan yüksek bir FAL aktivitesi göstermektedir (López-Villalobos vd 2014). Bu aktivite de mısır filizi köklerin kabuk, endodermis ve damarlı dokularında birikmektedir (McInnis vd 2009).

Bu konuyla ilgili olarak yapılan bir çalışmada bitkilerde bulunan FAL enziminin oral olarak FKU hastalarına verilmesi yoluyla hastalar için alternatif tedavi yöntemi oluşturulması amaçlanmış ve çeşitli meyve, bakla ve tahıl tanelerinde FAL enzim aktivitesi araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda, kırmızı yazlık buğdayın (*Triticum aestivum*) çimlenmesinin yedinci gününde en yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu buğday filizinin yaprak ve köklerindeki enzim aktivitesi sırasıyla 1.37 ila 1.61 $\mu\text{mol/h.g}$ taze ağırlık ve 11.90 ve 6.48 $\mu\text{mol/h.g}$ kuru ağırlık olarak tespit edilmiştir (Goldson vd 2008).

FKU hastalarının diyetlerine FAL enziminin takviye olması için yapılan başka bir çalışma da ise, kırmızı yazlık buğday filizlerinde doğal olarak bulunan FAL enziminin aktivitesi, -20°C 'de 3 ay boyunca taze ve dondurularak kurutulmuş olarak depolanan filizlerde takip edilmiştir. Araştırmada dondurularak kurutulmuş ve depolanmış örneklerin FAL enzim aktivitesini kaybettiği, taze filizlerin ise yaprak ve köklerini FAL enzim aktivitesinin depolama sonunda sırasıyla %62 ve %89 oranlarında korunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu araştırmada taze filizlerin yaprak ve köklerinin FAL aktivitesinin 3 saatlik *in vitro* sindirim süreci sonunda %36 ve %42 oranında kaldığı belirlenmiş ve bu değerlerin sırasıyla 4.3 ve 3.7 $\mu\text{mol/h.g}$ kuru ağırlık enzim aktivitesine denk geldiği bildirilmiştir (Lam vd 2008).

Bu tez çalışmasında; yenilebilir, kolay ulaşılabilir ve yüksek enzim aktivitesine sahip olması nedenleriyle FAL enzim kaynağı olarak mısır tahılı seçilmiştir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Çalışmada, protein ve kül içerikleri sırasıyla %10.5 ve %0.8 olan Türk Gıda Kodeksi Buğday Unu Tebliği'ne uygun buğday unu ve *Zea mays* spp. mısır kullanılmıştır. Ayrıca, sindirim enzimleri; sığır kaynaklı olan pepsin (2500 U/mg protein), tripsin (15 U/ml), kimotripsin (40 U/mg protein), karboksipeptidaz (70 U/mg protein) ve proteaz (500 U/g) enzimleri ve kimyasal maddeler niteliklerine uygun olarak analitik ve kromatografik saflıkta Sigma-Aldrich (Co. LLC., ABD) firmasından temin edilerek kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Gıda materyalinin *in vitro* sindirime hazırlanması

In vitro sindirim için buğday unu, simüle mide sıvısı (SMS, 0.15 M NaCl) ilavesiyle kurumadde içeriği yaklaşık %8'e ayarlanmıştır. Bu şekilde hazırlanmış olan sulu gıda materyali 75°C'de 5 dk gıda güvenliğinin sağlanması amacıyla pastörize edildikten sonra soğutulmuş ve insan sindirim sisteminde gıdaların protein sindirimleri simüle edilerek *in vitro* protein sindirimine tabi tutulmuştur.

3.2.2. Gıda proteinlerinin *in vitro* enzimatik hidrolizi

Proteinlerin enzimatik hidrolizinde, Picariello vd (2015), Gianfrani vd (2015) ve COST-INFOGEST çalışma grubu (Minekus vd 2014) metodları yalnızca *in vitro* protein sindirimi için modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu hidrolizde, protein sindirim enzimleri; pepsin, tripsin, kimotripsin, karboksipeptidaz ve proteaz enzimleri kullanılmıştır.

3.2.2.1. Mide sindirimi

Mide sindirimi için kurumadde içeriği SMS ile yaklaşık olarak %8'e ayarlanan un-SMS karışımı pastörize edilip 37°C'ye soğutulduktan sonra 1 M HCl kullanılarak pH değeri 2.5'e ayarlanmış ve enzim: protein oranı 1:50 (w/w) olacak şekilde pepsin enzimi ilave edilerek 500 rpm hızda 1 dk karıştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan homojenizat midedeki hidrolizi simüle etmek için 50 rpm hızda, 37°C sıcaklıkta ve pH değeri 2.5'te sabit tutularak manyetik karıştırıcı üzerinde 3 saat süreyle sindirim işlemi gerçekleştirilmiş ve böylelikle proteinlerin polipeptitlere hidroliz edilmesi sağlanmıştır.

3.2.2.2. İnce bağırsak sindirimi

Mide sindirimi simüle edilmiş homojenizat, 1 M NaOH çözeltisi ile pH değeri 7'ye ayarlandıktan sonra üzerine enzim: protein oranları sırasıyla 1:100 (v/w), 1:100 (w/w) ve 1:250 (v/w) olan tripsin, kimotripsin ve karboksipeptidaz enzimleri eklenerek 500 rpm hızda 1 dk karıştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan homojenizat 50 rpm hızda, 37°C sıcaklıkta ve pH değeri 7'de sabit tutularak manyetik karıştırıcı üzerinde 2 saat süreyle sindirim işlemi gerçekleştirilerek ince bağırsak sindiriminin 1. kısmı tamamlanmıştır. Böylelikle, mide sindiriminde oluşan muhtemel polipeptitler peptit ve amino asitlere hidroliz edilmiştir.

İnce bağırsak sindiriminin 2. kısmında ise homojenizatta kalan küçük peptitleri de amino asitlere hidroliz etmek için enzim: protein oranı 1:50 (v/w) olacak şekilde proteaz enzimi ilave edilmiştir. Bu homojenizat tekrar 50 rpm hızda, 37°C sıcaklıkta, pH değeri 7'de 2 saat daha sindirime tabi tutulmuştur. Böylelikle ince bağırsak sindiriminin ikinci kısmı da tamamlanarak *in vitro* protein hidrolizi tamamlanmıştır.

In vitro protein sindirimi gerçekleştirilen homojenizat üzerine FAL enzimi uygulaması yapılmadan önce, *in vitro* sindirimde kullanılan enzimlerin proteolitik aktivitelerinin durdurulması amacıyla homojenizat 75°C'de 30 dk pastörize edilmiştir.

3.2.3. FAL enzimi içeren mısır filizinin yetiştirilmesi ve FAL enzim aktivitesinin maksimum olduğu günün belirlenmesi

Saf su içerisinde bir gece bekletilen mısır taneleri (López-Villalobos vd 2014), pH değeri yaklaşık 6 olan çok amaçlı bitki toprağına yerleştirilerek oda sıcaklığında ve doğal ışık altındaki 15x57x11.5 cm boyutlarında olan plastik saksı içerisinde çimlendirilmeye bırakılmıştır. Çimlendirilme sürecinde günlük eşit miktarda su verilmiştir.

Mısır filizinde FAL enzim aktivite analizi Goldson vd (2008) metodu modifiye edilerek kullanılmıştır. Mısır taneleri çimlenme ortamına yerleştirildikten sonra (0. gün), tanelerin tamamının filizlenmeye başladığı 4. günden itibaren 8. güne kadar her gün FAL enzim aktivite analizi gerçekleştirilmiştir. Buna göre; tüm örneklerde çimlenmenin 7. gününde FAL enzim aktivitesinin en yüksek olduğu tespit edilmiştir (Goldson vd 2008).

3.2.4. FAL enzimi içeren mısır filizinin uygulanması

FAL enzim uygulaması; mısır filizi ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre, FAL enzim aktivitesinin en yüksek olduğu çimlenmenin 7. günü filiz miktarı, *in vitro* sindirimde kullanılan un miktarının %10'u kadar tartılmıştır. Filiz: su oranı 1:5 (w/w) olacak şekilde filizler, +4°C'deki su ile havanda ezilerek 1500xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen ekstrakt süzülüş ve tekrar 1500xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında, ekstrakt alınarak moleküler ağırlığı ayırma sınırı (MWCO) 6-8 kDa olan diyaliz tüplerine aktarılmış ve +4°C'de bir gece boyunca diyaliz edilmiştir (Babaoğlu-Aydaş vd 2016). Böylelikle, 6-8 kDa'dan daha büyük olan FAL enzimini de içeren proteinler ekstraktta tutulmuş, daha küçük olan moleküllerin ve safsızlıkların ekstraktan ayrılması sağlanmıştır.

Daha sonra *in vitro* sindirimi gerçekleştirilen homojenizat, FAL enziminin optimum çalışma koşulları olan pH 8.5'e ve 30°C sıcaklığa ayarlanmıştır. Homojenizat üzerine diyaliz tüplerinden geçirilen ve FAL enzimi içeren ekstraktlar eklenmiştir. *In vitro* sindirim sürecinde serbestleşen fenilalanin amino asitlerini azaltmak amacıyla homojenizat sıcaklık ve pH değerleri sabit tutularak manyetik karıştırıcı üzerinde 50 rpm hızda 4 saat boyunca inkübe edilmiş ve uygulamanın fenilalanin içeriği üzerine etkisini belirlemek amacıyla inkübasyonun her 20 dk'sında bir örnek alınmıştır (Sarkissian ve Gámez 2005, Goldson vd 2008, Lam vd 2008).

3.2.5. Kurutma

3.2.5.1. Sulu gıda materyalinin rotary evaporatörde konsantre edilmesi

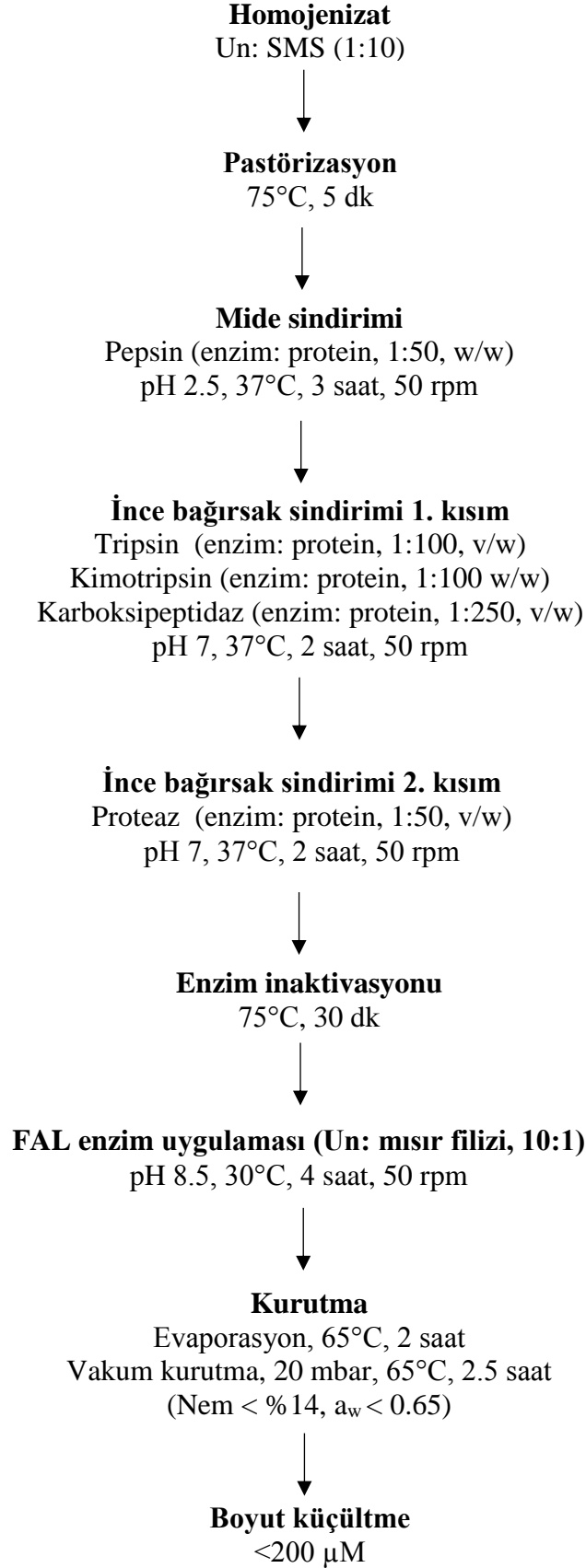
Fenilalanin içeriği azaltılmış un üretimi için, *in vitro* sindirim ve mısır filizi FAL enzim uygulamasının ardından elde edilen sulu gıda materyalinin vakum kurutucuda kurutma işleminden önce rotary evaporatörde (Laborota 4000, Heidolph, Almanya) fazla suyu uzaklaştırılarak konsantre edilmiştir. Bunun için 500 mL örnek 65°C'de geri soğutucuya bağlanarak vakum uygulaması ile 2 saat boyunca fazla suyun uzaklaştırılarak örnek hacmi yaklaşık 100 mL oluncaya kadar konsantre edilmiştir.

3.2.5.2. Vakum kurutma

Rotary evaporatörde fazla suyu uzaklaştırılarak konsantre edilen yaklaşık 100 mL örnek, vakum kurutucunun (VO200, Memmert, Almanya) tepsisine ince bir tabaka halinde serilmiş ve 65°C'de, 20 mbar vakum basınç değerinde 2.5 saat boyunca nem içeriği %14 ve su aktivitesi 0.65 değerinin altına düşünceye kadar kurutulmuştur.

Nem içeriği %14'ün ve su aktivitesinin 0.65'in altına düşünceye kadar kurutulan örnek bir öğütücüde (GM-7230 Değirmen, 220-240V AC, 50 Hz, 180 W, Goldmaster, Türkiye) boyut küçültme işlemine tabi tutularak tekrar un haline getirilmiştir.

Fenilalanin içeriği azaltılmış unun üretimine ait akım şeması Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Fenilalanin içeriği azaltılmış un örneği üretiminin akım şeması

3.2.6. Araştırma planı ve istatistiksel yöntemler

Araştırmada; ana gıda kaynağı olan unun kurumadde içeriği yaklaşık %8 olacak şekilde SMS ilave edildikten sonra pastörizasyon için 75°C'ye kadar ısıtılmış ve bu sıcaklıkta 5 dk tutulduktan sonra soğutularak kullanılmıştır. Soğutulan sulu gıda materyali insan sindirim sisteminde gıdaların sindirimini simüle etmek için *in vitro* protein sindirime tabi tutulmuştur. Böylelikle proteinler yaklaşık *in vivo* sindirimde olduğu gibi dışarda parçalanarak muhtemel peptit ve serbest amino asitleri önceden elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen bu homojenizat, serbest fenilalanin içeriğini azaltmak amacıyla FAL enzimi içeren mısır filizi ile muamele edilmiş ve ortaya çıkan serbest fenilalanin amino asidinin azaltılması sağlanmıştır. Bu yolla elde edilen fenilalanini azaltılmış homojenizat rotary evaporatörde fazla suyu uzaklaştırılarak vakum kurutucuda kurutulmuş, öğütücü yardımıyla boyut küçültme işlemine tabi tutularak kilitli plastik torbalara alınmış ve analiz edilinceye kadar buzdolabı şartlarında depolanmıştır.

Araştırmada; mide aşamasında 4 adet, ince bağırsak 1. kısmında 3 adet ve ince bağırsak 2. kısmında ise 3 adet daha olmak üzere *in vitro* sindirim sürecinde toplam 10 adet ve FAL enzimi içeren mısır filizinin 240 dakikalık uygulanma sürecinde ise sürecin her 20 dakikasında bir adet olmak üzere 13 adet örnekleme yapılmıştır.

In vitro sindirim ve fenilalanin içeriğini azaltmak için yapılan FAL enzim uygulamasının unun serbest fenilalanin içeriği üzerine etkisini belirlemek için serbest fenilalanin analizi yapılmıştır. Elde edilen fenilalanin içeriği azaltılmış un örneğinin, bazı kimyasal (su tutma kapasitesi, suda çözünürlük ve su absorpsiyonu, kurumadde, su aktivitesi, pH, titrasyon asitliği, toplam protein, EDN içeriği), fiziksel (renk ve yığın yoğunluğu) ve bu unun duyuşal olarak tüketilebilirliğini belirlemek için duyuşal analiz yapılmıştır. Ayrıca, fenilalanin içeriği azaltılmış un üretiminde kullanılan mısır filizinde bulunan FAL enziminin aktivitesini belirlemek amacıyla FAL enzim aktivite analizi de yapılmıştır.

Araştırma iki tekerrürlü, analizler ise iki paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda elde edilen verilere tek yönlü Varyans analizi ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmıştır. Tüm istatistik hesaplamalar SAS istatistik programı (Cary, NC, ABD) ile gerçekleştirilmiş olup değerler ortalama \pm standart hata şeklinde düzenlenmiştir.

3.2.7. Kimyasal analiz yöntemleri

3.2.7.1. FAL enzim aktivite analizi

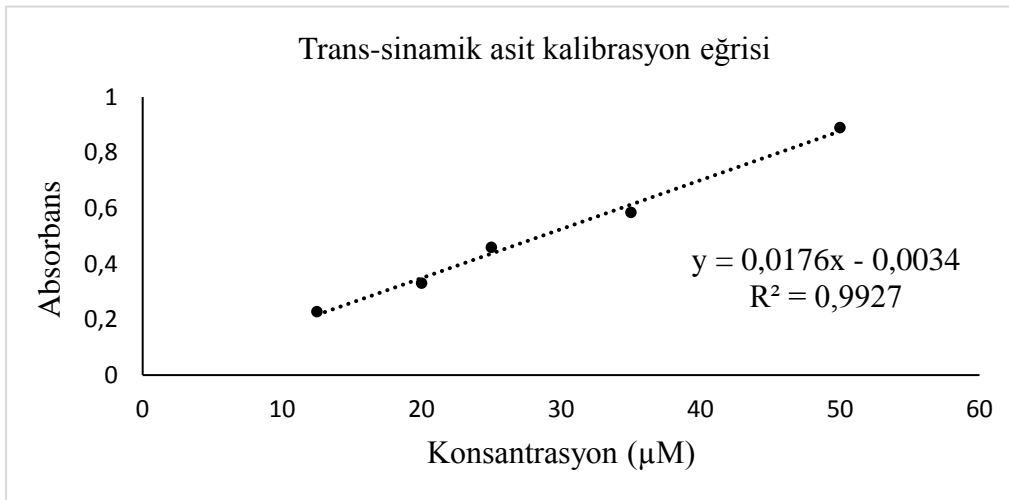
FAL enzim aktivite analizi, *in vitro* sindirimden sonra fenilalanin içeriğinin azaltılmasında kullanılmış olan mısır filizlerinde bulunan FAL enziminin aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Goldson vd'deki (2008) yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir.

Buna göre; filiz örnekleri, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 1 mmol/L etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), 10 mmol/L 2-merkaptöetanol ve 25 g/L polivinilpolipirolidondan oluşan ekstraksiyon tamponu ile filiz: ekstraksiyon tampon oranı 1:10 (w/v) olacak şekilde havanda homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler 4°C'de 1 saat inkübe

edilmiş ve 23500xg'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen ekstrakttaki tuzları gidermek için Zeba™ Spin Desalting (7K MWCO, Thermo Scientific, Rockford, IL 61105 USA) kolon kullanılarak ekstrakt bu kolondan geçirilmiştir.

Kolondan geçirilen ekstraktın 100 µL'sine, 100 mmol/L Tris- HCl'den (pH 8.8) oluşan reaksiyon tamponundan 500 µL eklenmiştir. Üzerine 40 mmol/L L-fenilalanin ve 100 mmol/L Tris-HCl'den (pH 8.8) oluşan substrattan 200 µL eklenerek 37°C'de 15 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için, 250 g/L trikloroasetikasitten (TCA) 200 µL eklenmiş ve 13000xg'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Son olarak bu ekstraktların spektrofotometrede (Shimadzu UV-1800, Kyoto, Japonya) 290 nm dalga boyunda absorbans değerleri şahit örneğe karşı okunmuştur.

FAL enzimin aktivitesi, substratı parçalayıp oluşan trans-sinamik asit miktarı üzerinden hesaplanmıştır. Oluşan trans-sinamik asit miktarını hesaplamak için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 3.2). Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması amacıyla; yukarıdaki yöntemde kullanılan tamponlardan substrat tamponu hariç diğer tamponlardan toplam hacim 10 mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Ekstraksiyon tamponu ise yöntemde olduğu gibi 23500xg'de santrifüj edilerek kullanılmıştır. Elde edilen bu karışım 13000xg'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Her birinin hacmi 1 mL olacak şekilde eppendorf tüplere ayrılmış ve içerisindeki trans-sinamik asit konsantrasyonu sırasıyla 12.5, 20, 25, 35 ve 50 µmol/L olacak şekilde trans-sinamik asit standart çözeltileri eklenmiştir. Elde edilen bu standart çözeltilerin 290 nm dalga boyundaki absorbans değerleri okunmuş ve kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Goldson vd 2008, Lam vd 2008).



Şekil 3.2. FAL enzim aktivite analizinde kullanılan trans-sinamik asit kalibrasyon grafiği

3.2.7.2. Buğday ununda toplam amino asit analizi

Fenilalanin içeriği azaltılmış un üretiminde kullanılan buğday ununun toplam amino asit analizi Düzen Norwest Laboratuvarında hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları kurumda üzerinden verilmiştir.

Örnek ekstraksiyonu için; vidalı septalı kapaklı tüplere yaklaşık 0.4 g homojenize edilmiş örnek tartılarak üzerine 5 mL 6 N HCl ve oksidasyonu önlemek amacıyla 250 µL 2 mM fenol eklenmiştir. Sistein, metionin ve tirozinin geri kazanımını optimize etmek için 0.1 g Na₂SO₃ eklenmiş ve 110°C'de 24 saat boyunca etüvde tutulmuştur. Hidroliz işlemi bittikten sonra, örneğin pH değeri yaklaşık 7'ye ayarlanmış ve örneğin hacmi ultra saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar 0.45 µm filtreden geçirilmiş ve vialle aktararak HPLC cihazına verilmiştir.

Unun toplam amino asit içeriğinin belirlenmesi amacıyla Agilent HPLC 1100 cihazı kullanılmıştır. Analiz boyunca kullanılan cihaz koşulları aşağıda belirtilmiştir.

Kolon: Zorbax Eclipse AAA, 4.6x150 mm, 3.5 µm,
Dedektör: Florasan Dedektör: (EX:340 EM: 450), UV Dedektör: 338 nm
Standart Mix: Sigma 21 L-Amino Acids plus kit
İnternal Standart: Norvalin
Türevlendirme Ajanları: OPA, FMOc, Borat
Akış Hızı: 2 mL/dk
Kolon Sıcaklığı: 40°C
Mobil Faz A: 40 mM Na₂H₂PO₄.2 H₂O pH:7.8
B: Metanol: Asetonitril: Ultra Saf Su (45:45:10)

Hidroksiprolin amino asidi için kullanılan cihaz koşulları aşağıda belirtilmiştir.

Kolon: ACE 5C18, 4.6x250 mm, 5 µm
Dedektör: UV Dedektör: 265 nm
Standart Mix: Sigma 21 L-Amino Acids plus kit (Hidroksiprolin)
İnternal Standart: Norvalin
Derivatizasyon Reaktifleri: OPA, FMOc, Borat
Akış Hızı: 1 mL
Kolon Sıcaklığı: 25°C
Mobil Faz: %3 asetik asit ile hazırlanmış sodyum asetat tamponu pH:4.3 (650 mL)
ve 350 mL Asetonitril

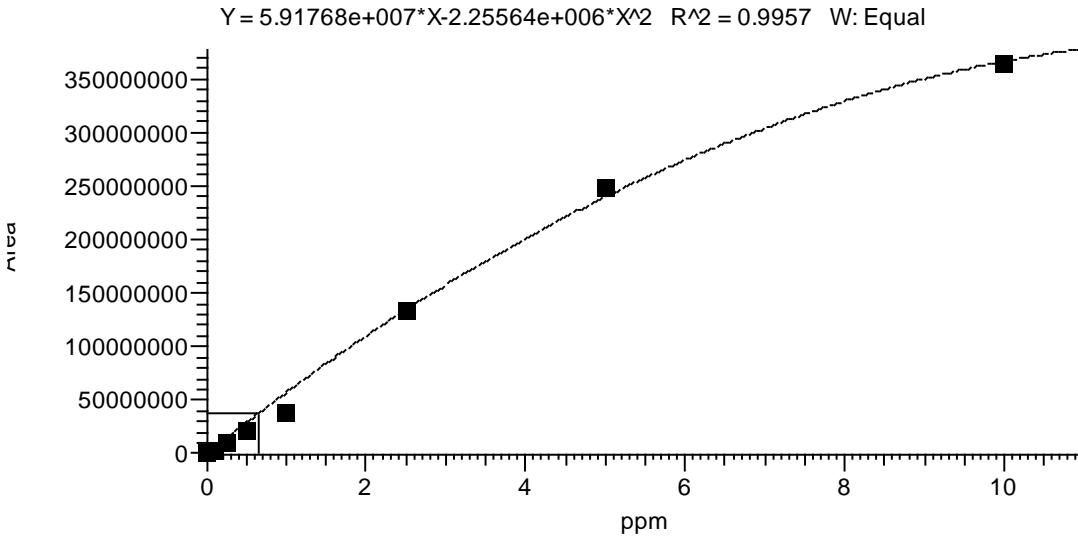
3.2.7.3. Serbest fenilalanin analizi

In vitro protein sindirimi ve FAL enzimi uygulaması sürecinde alınan örneklerde serbest fenilalanin içeriği LC-MS/MS ile Akdeniz Üniversitesi Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi'nde hizmet alımı yapılarak analiz edilmiştir.

Örnek ekstraksiyonu için, *in vitro* sindirim sürecinde alınan örneklerden 0.5 mL ve FAL enzim uygulaması sürecinde alınan örneklerden 1 mL alınmış ve üzerlerine 20 mL saf su eklenerek homojen hale gelene kadar karıştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan ekstraktlar 0.45 µm filtreden geçirilerek 0.5 mL'si viallere aktarılmış ve her bir örnek üzerine 0.5 mL mobil faz A eklenerek LC-MS/MS cihazına verilmiştir.

Pik tanımlanması ve kalibrasyon eğrisi hazırlanması amacıyla; fenilalanin amino asidi 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 ve 10 mg/kg konsantrasyonlarında hazırlanmış ve LC-

MS/MS cihazına enjekte edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 3.3'te gösterilmiştir. Analiz sonuçları kurumadde üzerinden verilmiştir.



Şekil 3.3. Serbest fenilalanin analizinde kullanılan fenilalanin kalibrasyon grafiği

Serbest fenilalanin içeriğinin belirlenmesi amacıyla Thermo TSQ Access Max LC-MS/MS cihazı kullanılmıştır. Analiz boyunca kullanılan cihaz koşulları aşağıda belirtilmiştir.

Kolon: Thermo Hypersil Gold 50x2.1 mm, 1.9 µm partikül büyüklüğü
 Kolon sıcaklığı: 40°C
 Mobil faz A: %0.1 formik asit içeren saf su
 Mobil faz B: Metanol
 Gradient programı: 0-3. dk, %100 mobil faz A; 3-8. dk, %100 mobil faz B
 Akış hızı: 400 µL/dk
 Enjeksiyon hacmi: 10 µL
 Analiz süresi: 8 dk

3.2.7.4. Su tutma kapasitesi analizi

Buğday unu ve fenilalanin içeriği azaltılmış un örneklerinin su tutma kapasitesi (STK) analizi AACC 56-20.01 metoduna göre yapılmıştır.

Analiz için yaklaşık 2 g örnek önceden darası alınmış 50 mL'lik santrifüj tüplerine tartılmıştır. Üzerine 40 mL saf su eklenmiş ve süspansiyon hale gelene kadar çalkalanmıştır. Süspansiyon haline gelen örnekler 10 dk bekletilmiş ve bekleme süresi boyunca 5dk'da bir tekrar çalkalanmıştır. Daha sonra örnekler 1000xg'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tartım yapılmış ve su tutma kapasitesi denklem (3.1)'e göre hesaplanmıştır.

$$STK \text{ (g su/gKM)} = \frac{((\text{Tüpün ağırlığı} + \text{çökelti}) - (\text{Tüpün ağırlığı})) - \text{Örnek ağırlığı}}{\text{Kuru örnek ağırlığı}} \quad (3.1)$$

3.2.7.5. Suda çözünürlük ve su absorpsiyon indeksi

Buğday unu ve fenilalanin içeriği azaltılmış un örneklerinin suda çözünürlük (SÇI) ve su absorpsiyon (SAI) indeksi analizi Shi vd (2016) metoduna göre yapılmıştır.

Bunun için yaklaşık 1.5 g örnek 50 mL'lik santrifüj tüplerine tartılmış ve üzerine 18 mL saf su eklenmiştir. Örnekler 30°C su banyosunda 30 dk bekletilmiş ve bu sürede örnekler her 5 dk'da bir çalkalanmıştır. Daha sonra 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatantlar alüminyum kap içerisine konulup 105°C'de 3 saat kurutulmuştur. Aşağıda verilen denklem (3.2) ve (3.3)'e göre sırasıyla suda çözünürlük ve su absorpsiyon indeksi hesaplanmıştır.

$$SÇI (g/100 g) = \frac{\text{Süpernatant kurumadde ağırlığı}}{\text{Kuru örnek ağırlığı}} \times 100 \quad (3.2)$$

$$SAI (g/g) = \frac{\text{Islak çökeltinin ağırlığı}}{\text{Kuru örnek ağırlığı}} \quad (3.3)$$

3.2.7.6. Kurumadde analizi

Buğday unu ve fenilalanin içeriği azaltılmış un örneklerinin kurumadde içeriği, daha önceden kurutulup darası alınmış petri kaplarına örneklerin tartılması ve bu örneklerin 105°C'deki etüvde sabit tartıma gelene kadar kurutulması ile belirlenmiştir (Elgün vd 2002).

3.2.7.7. Su aktivitesi analizi

Buğday unu ve fenilalanin içeriği azaltılmış un örneklerinin su aktivitesi (a_w) değerleri, su aktivitesi tayin cihazı Aqua Lab 4TE (USA) ile ölçülerek belirlenmiştir.

3.2.7.8. pH ve titrasyon analizi

Buğday unu ve fenilalanin içeriği azaltılmış un örneklerinin pH değerleri, pH metre (Orion Star, Thermo, Waltham, ABD) kullanılarak tespit edilmiştir. Bunun için un örnekleri 1:10 oranında saf su ile seyreltilip, homojenize edilmiştir. Elde edilen süspansiyonlar 15 dk boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve sonrasında 10 dk bekletilmiştir. Ayrılan süpernatantların pH değerleri ölçülmüştür (AACC 02-52).

Titrasyon asitliği değerlerini belirlemek için ise 1 g örnek 10 mL saf su ile karıştırılmış ve üzerine 2-3 damla fenolftalein çözeltisi eklenerek 0.1 N NaOH ile pembe renk elde edilinceye kadar titre edilmiştir. Harcanan değer okunarak sülfürik asit cinsinden denklem (3.4)'e göre hesaplanmıştır (AACC 02-31.01).

$$\% \text{ asitlik} = \frac{N \cdot V \cdot mEq}{m} \cdot 100 \quad (3.4)$$

- N : NaOH normalitesi
V : Titrasyonda harcanan NaOH hacmi (mL)
mEq : Sülfürik asidin mili ekivalent ağırlığı (g),
m : Örnek ağırlığı (kurumadde bazında, g)

3.2.7.9. Toplam protein analizi

Buğday unu ve fenilalanin içeriği azaltılmış un örneklerinin toplam protein analizi, standart metoda (AACC 46-12) göre Akdeniz Üniversitesi Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi'nde yapılmıştır.

1 g örnek tartılarak Kjeldahl tüplerine konulmuştur. Üzerine 2 adet katolizör ve 10 mL derişik H₂SO₄ (%95-98) eklenmiş ve yakma ünitesine bağlanarak 420°C'de 4 saat boyunca yakılmıştır. Yakma işleminden sonra örnekler soğutulmuş ve soğutulan örnekler üzerine 50 mL saf su eklenmiştir.

Destilasyon için 30 mL %3'lük borik asit çözeltisi ve 3-4 damla indikatör erlene eklenerek cihaza yerleştirilmiştir. Destilasyon işlemi 50 mL %30'luk NaOH çözeltisi ile 5 dk boyunca gerçekleştirilmiştir. Destilasyon işlemi bitince örnekler 0.1 N HCl ile pembe renk elde edilinceye kadar titre edilmiştir. Titrasyonda harcanan değer okunarak denklem (3.5)'e göre hesaplanmıştır (AACC 46-12).

$$\% \text{ protein} = \frac{V \cdot N \cdot 0.014 \cdot 5.7}{m} \cdot 100 \quad (3.5)$$

- N : Titrasyonda kullanılan HCl normalitesi
 V : Titrasyonda harcanan HCl hacmi (mL)
 m : Örnek ağırlığı (kurumadde bazında, g)

3.2.7.10. Enzime dirençli nişasta analizi

Buğday unu ve fenilalanin içeriği azaltılmış un örneklerinin enzime dirençli nişasta (EDN) analizi, standart metoda (AACC 32-40) göre dirençli nişasta enzim kiti (K-RSTAR, Megazyme Int. Wicklow, İrlanda) kullanılarak yapılmıştır.

Analiz için ilk olarak; 100 mg örnek tartılmış ve üzerine pankreatik α -amilaz (3 Ceralpha Unit/mg) ve seyreltilmiş amiloglikozidaz (300 U/mL) enzimlerini içeren çözeltilerden 4 mL ilave edilerek 37°C'de 16 saat süre boyunca 100 rpm hızda yatay çalkalamalı su banyosunda (WSB-30, WiseBath, Kore) inkübe edilmiştir. Böylelikle enzime dirençli olmayan nişasta hidrolize olarak kendisini oluşturan glikoza dönüşmesi sağlanmıştır. 16 saatlik inkübasyon sonunda 4 mL etil alkol (%99, v/v) ilave edilerek enzimatik reaksiyon durdurulduktan sonra örnekler 4500xg'de 5 dk santrifüj edilmiş ve örneklerin glikoz içeren sıvı kısmı uzaklaştırılarak çökelti kısmı elde edilmiştir. Çökeltide bulunan glikozun tamamen uzaklaştırılabilmesi için örnekler 8 mL etil alkol-su (%50, v/v) çözeltisi ile 2 kez yıkanmış ve tekrar 4500xg'de 5 dk santrifüjlenerek sıvı kısımlar ayrılmıştır. Elde edilen çökelti 40°C'de, 25 mbar basınçtaki vakumlu etüvde 45 dk bekletilerek kurutulduktan sonra üzerlerine EDN'nin çözünmesi için; 2 M KOH çözeltisinden 2 mL ilave edilmiş ve örnekler buz banyosu içerisinde manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak 20 dk inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda örnekler üzerine 8 mL, 1.2 M sodyum asetat tampon çözeltisi (pH 3.8) ve 0.1 mL amiloglikozidaz enzimi (3300 U/mL) ilave edilmiş ve örneklerin 50°C su banyosunda 30 dk süre boyunca 5 dk'da bir karıştırılarak inkübe edilmesiyle çözünmüş olan EDN hidroliz edilerek glikoza dönüştürülmüştür. İnkübasyon sonunda 4500xg'de 5 dk santrifüj edilen örneklerden ayrılan berrak sıvı kısmından 0.1 mL alınıp üzerine 3 mL glikoz oksidaz/peroksidaz

ayıracı (GOPOD) ilave edilmiş ve örnekler 50°C'de 20 dk daha inkübe edilmiştir. Hidroliz sonunda oluşan glikoz miktarı, spektrofotometrede (UV-1800, Shimadzu, Japonya) 510 nm dalga boyunda şahit örneğe (0.1 mL, 100 mM sodyum asetat tampon çözeltisi (pH 4.5) + 3 mL GOPOD) karşı okuma yapılarak belirlenmiş ve EDN miktarı denklem (3.6)'ya göre hesaplanmıştır.

$$\text{EDN Miktarı (g/100g örnek)} = \Delta E * (F/W) * 9.27 \quad (3.6)$$

ΔE : Örneğin absorbansı

F : Absorbanstan mikrogram dönüşümü (100/D-glikoz standart absorbansı)

W : Örnek ağırlığı (kurumadde bazında, g)

3.2.8. Fiziksel analiz yöntemleri

3.2.8.1. Renk analizi

Buğday unu ve fenilalanin içeriği azaltılmış un örneklerinin renk değerleri, renk ölçüm cihazı (Minolta CR 400, Konica Minolta, Japonya) kullanılarak L^* [(0) siyah, (100) beyaz], a^* [(+) kırmızı, (-) yeşil] ve b^* [(+) sarı, (-) mavi] değerleri tespit edilmiştir. Bunun için, cihaz kalibrasyon plakası ile kalibre edildikten sonra, cihazın ölçüm kabına alınan un örneklerinin 3 farklı noktasından ölçüm yapılarak L^* , a^* ve b^* değerleri belirlenmiştir (Protonotariou vd 2014).

3.2.8.2. Yığın yoğunluğu analizi

Buğday unu ve fenilalanin içeriği azaltılmış un örneklerinin yığın yoğunluğu analizi için yaklaşık 10 g un örneği 25 mL hacmindeki ölçü silindire tartılmıştır. Tartılan örnekler ölçü silindiri tabana 50 kez hafif hafif vurulduktan sonra elde edilen hacim kullanılarak yığın yoğunluğu analizi tartılan ağırlığın, hacme oranından g/mL olarak belirlenmiştir (Adeleke ve Odedeji 2010).

3.2.9. Duyusal analiz

Fenilalanin içeriği azaltılmış un örneklerinin duyusal olarak tüketilebilirliğini belirlemek için Protonotariou vd (2016) yöntemi modifiye edilerek bisküvi üretilmiştir. Bisküvi üretimi, fenilalanin içeriği azaltılmış un ve kontrol örneği olarak buğday ununda gerçekleştirilmiştir. Buna göre kontrol örneği için; 20 g buğday unu, 5.66 g pudra şekeri, 0.2 g soya lesitini, 0.22 g tuz ve 0.13 g sodyum asit prifosfat ve sodyum bikarbonat içeren kabartma tozu tartılmış ve bir kap içerisinde yaklaşık 1 dk karıştırılmıştır. Üzerine 4 g margarin eklendikten sonra 1 dk daha el ile karıştırılmış ve sonra üzerine 6 mL su eklenerek homojen bir hamur elde edene kadar 3 dk boyunca yoğurulmuştur. Elde edilen hamur, kalınlığı yaklaşık 2 mm olacak şekilde merdane yardımıyla açılmış ve 30 mm çapında kesilerek şekil verilmiştir. Kesilen hamurlar yağlı kâğıt üzerine alınarak pişirme işlemine tabi tutulmuştur. Pişirme işlemi 100°C'de 5 dk, 130°C'de 5 dk ve 150°C'de 2.5 dk olmak üzere kademeli olarak gerçekleştirilmiştir.

Fırın ürünlerinde hamur ve ürün yapısı üzerine glüten proteini ve nişasta etkili olmaktadır (Özüğür ve Hayta 2011). Fenilalanin içeriği azaltılmış un üretiminde *in vitro* protein sindiriminin uygulanmasına bağlı olarak glüten proteinin de parçalanması

nedeniyle bu un ile üretilen bisküvi örneklerinde hamur yapısının sağlanamadığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle yapının sağlanması ve yapışkanlığının giderilebilmesi için formülasyona 5 g buğday nişastası daha ilave edilmiştir. Ayrıca fenilalanin içeriği azaltılmış unun tuz içeriğinin de fazla olması nedeniyle bu formülasyondan tuz çıkarılmıştır. Geriye kalan bütün bileşenler aynı miktarlarda kullanılmıştır.

Üretilen bisküvilerin renk, koku, sertlik, çiğnenebilirlik, yapışkanlık, aroma-tat ve genel beğeni özellikleri, 9 eğitimli panelist tarafından kontrol örneğine kıyasla 9 puanlık hedonik skala testine göre değerlendirilmiştir. Duyusal değerlendirmede kullanılan form Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Duyusal analiz formu

Duyusal Analiz Formu	
Ürün: FKU hastalarına yönelik olarak fenilalanin içeriği azaltılmış un ile üretilen bisküvi	Tarih
Açıklama: Lütfen size verilen ürünleri aşağıdaki kalite kriterleri açısından 9 puan üzerinden değerlendiriniz.	
Kalite Kriterleri	Puan
Renk	
Koku	
Sertlik	
Çiğnenebilirlik	
Yapışkanlık	
Aroma-Tat	
Genel beğeni	
Puanlama: 1= Çok kötü, 5= Orta, 9= Çok iyi.	

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Mısır Filizi FAL Enzim Aktivitesi

Fenilalanin içeriği azaltılmış un üretiminde kullanılan mısır filizi FAL enzim aktivitesinin maksimum olduğu çimlenmenin 7. gününe ait I. ve II. tekerrür verileri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Mısır filizinde çimlenmenin 7. gününde FAL enzim aktivite değerlerine ait I. ve II. tekerrür verileri

Enzim kaynağı	FAL enzim aktivitesi ($\mu\text{mol/h.g}$ taze ağırlık)	
Mısır filizi	I.	6.10
	II.	6.08

Çizelge 4.1’e göre 1 g taze mısır filizinde enzim aktivitesi ortalama $6.09 \mu\text{mol/h.g}$ taze ağırlık olarak tespit edilmiştir.

Yüksek FAL enzim aktivitesine sahip olan bir çeşit Japon mısırın (*Zea mays* L. cv. japonica) çimlendirilmesi ile elde edilen mısır filizi köklerinin FKU hastalarına oral olarak verilmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, köklerin enzim aktivitesinin $9 \mu\text{mol/h.g}$ taze ağırlık (150 nmol/dk.g taze ağırlık) olduğu tespit edilmiştir (López-Villalobos vd 2014). FAL enzim aktivitesi ile ilgili yapılan bir çalışmada buğday filizinin enzim aktivitesi $1.37 \mu\text{mol/h.g}$ taze ağırlık olarak bulunmuştur (Goldson vd 2008).

FAL enzim aktivitesinin bitki çeşidi ve ışık, tuz ve stres ile beraber değişebileceği bildirilmiştir (Şirin vd 2016). Bu çalışmada ve literatürdeki tahıl filizi ve köklerinden elde edilen FAL enzim aktivitelerinin farklılık göstermesinin kullanılan tahılın cins ve çeşidine, sıcaklık ve nem gibi çimlendirme koşullarına ve çimlendirmede kullanılan toprağın özelliklerinden kaynaklanmış olabileceği değerlendirilmiştir.

Endemik bir bitki olan *Cyathobasis fruticulosa* (Bunge) Aellen’den izole edilen FAL enziminin FKU diyet tedavisinde kullanılmak üzere değerlendirildiği bir çalışmada, enzimin optimum pH, sıcaklık ve tampon koşullarında (pH 8.8, 37°C , 100mM Tris-HCl ve fenilalanin tamponu) enzim aktivitesi 64.9 U/mg olarak tespit edilmiştir (Şirin vd 2016). Yapılan bir diğer çalışmada ise, *Centaurea depressa* bitkisinden izole edilen FAL enzim aktivitesi 53.30 U/mg protein olarak belirlenmiştir (Babaoğlu Aydaş vd 2016).

4.2. Buğday ununun toplam amino asit değerleri

Fenilalanin içeriği azaltılmış un üretiminde kullanılan unun toplam amino asit içeriğine ait sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Fenilalanin içeriği azaltılmış un üretiminde kullanılan unun toplam amino asit içeriği (mg/kg)

Amino asit	Miktar	Amino asit	Miktar
Fenilalanin	6201	Valin	5193
Aspartik asit	4850	Methionin	1860
Glutamik asit	43926	Triptofan	310
Asparjin	112	Sistein	1838
Serin	5714	İzolösin	4363
Histidin	2702	Ornitin	321
Glisin	4562	Lösin	8626
Treonin	3577	Lisin	2890
Sitrülin	78	Hidroksiprolin	299
Arjinin	5127	Sarkosin	100
Alanin	4042	Prolin	19477
Tirozin	2923	Toplam aminoasit	129100

Çizelge 4.2'ye göre üretimde kullanılan buğday unununun 1 kg'ında yaklaşık 6200 mg fenilalanin bulunmaktadır. Yapılan literatür taramasında unun fenilalanin içeriğinin 1 kg un için 5270 mg olduğu belirtilmiştir (Türkomp 2015). *In vitro* protein sindirim sonrasında açığa çıkan serbest fenilalanin miktarının (Çizelge 4.5) bu değere göre 10 kat daha az olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeninin ince bağırsak mikrovilluslarına tutunmuş olarak görev yapan ve düşük molekül ağırlıklı peptitleri hidroliz eden proteaz (brush wall enzymes) enzimlerinin (Srichanun vd 2014, Da Encarnaçao vd 2015) *in vitro* sindirimde kullanılmamasından ve dolayısıyla proteinlerin daha çok düşük molekül ağırlıklı tripeptit ve dipeptitlere kadar hidroliz olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

4.3. *In vitro* Sindirim ve FAL Enzim Uygulamasının Unun Serbest Fenilalanin İçeriği Üzerine Etkisi

Fenilalanin içeriği azaltılmış un üretiminde *in vitro* sindirim ve FAL enzim uygulamasının unun kurumaddede serbest fenilalanin içeriği üzerine etkilerine ait I. ve II. tekerrür verileri Çizelge 4.3'te, bu verilere ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.4'te, önemli bulunan varyasyon kaynaklarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.5'te ve *in vitro* sindirimin ve FAL enzim uygulamasında kullanılan mısır filizinin unun serbest fenilalanin içeriğinin zamana karşı gösterimine ait grafik Şekil 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.4'te verilen varyans analiz sonuçlarına göre, *in vitro* sindirim aşamalarının ve FAL enzim uygulamasının unun serbest fenilalanin içeriği üzerine önemli ($P<0.01$) bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre, *in vitro* protein sindiriminin mide, bağırsak birinci ve bağırsak ikinci kısım uygulamalarının ve FAL enzim uygulamasının unun serbest fenilalanin içeriği üzerine önemli bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir. *In vitro* sindirim sırasında proteinlerin amino asit ve düşük molekül ağırlıklı peptitlere hidrolize olması ve dolayısıyla serbest fenilalanin içeriğinin artması yapılan

sindirim kısmen başarılı olduğunu göstermiştir. *In vitro* sindirimin başlangıcına göre sindirimin sonunda serbest fenilalanin içeriğinin yaklaşık 15 kat arttığı tespit edilmiştir.

In vitro sindirim sonrası serbest fenilalanin içeriğini azaltmak için uygulanan FAL enzim uygulamasında mısır filizinin unun serbest fenilalanin içeriğini azaltıcı bir etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Şekil 4.1'e göre, mısır filizi FAL enzim uygulamasının unun serbest fenilalanin içeriğini zamanla istatistiksel olarak önemli ($P<0.01$) bir şekilde etkilediği ve 240 dakikalık FAL enzim uygulama süresince serbest fenilalanin içeriğinin %49.78 kadar azalttığı tespit edilmiştir.

Rhodospiridium toruloides mayasından izole edilen FAL enzimi ile çeşitli ticari protein hidrolizatlarında bulunan fenilalaninin azaltılmasının amaçlandığı bir çalışmada, optimum reaksiyon koşullarında (42°C, pH 8.7) uygulanan FAL enziminin kazein asit hidrolizatındaki fenilalaninin seviyesinin yaklaşık %92 oranında azaltıldığı ve diğer protein hidrolizatlarında da benzer sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Castañeda vd 2015).

Düşük fenilalaninli tost ekmeği üretmek amacıyla yapılan bir çalışmada; buğday unu proteinlerinden ve fenilalanince zengin olan gliadin, susuz alkol çözeltisi kullanılarak ekstrakte edilmiş ve düşük fenilalaninli buğday unu üretilmiştir. Bu undan üretilen ekmeğin fenilalanin içeriğinin kontrol örneğine göre %43.2 azaltıldığı belirtilmiştir (Mohsen vd 2010).

Çizelge 4.3. *In vitro* sindirim ve FAL enzim uygulamasının unun serbest fenilalanin içeriği üzerine etkilerine ait I. ve II. tekerrür verileri

Uygulama	Zaman (dk)	Fenilalanin (mg/kg.KM)	
		I.	II.
Mide	0.	43.71	38.16
	60.	69.61	55.74
	120.	102.26	59.94
	180.	125.43	73.81
Bağırsak 1	0.	432.45	503.17
	60.	418.79	294.18
	120.	588.34	437.38
Bağırsak 2	0.	656.22	485.45
	60.	739.63	452.00
	120.	771.56	487.10
FAL	0.	646.16	500.12
	20.	420.69	400.46
	40.	419.17	411.09
	60.	419.12	382.66
	80.	422.20	422.20
	100.	376.00	393.76
	120.	387.58	387.58
	140.	383.42	368.84
	160.	364.96	364.96
	180.	358.02	358.02
	200.	345.23	332.99
220.	343.68	343.68	
240.	280.88	294.82	

Çizelge 4.4. *In vitro* sindirim ve FAL enzim uygulamasının unun serbest fenilalanin içeriği üzerine etkilerine ait varyans analiz sonuçları

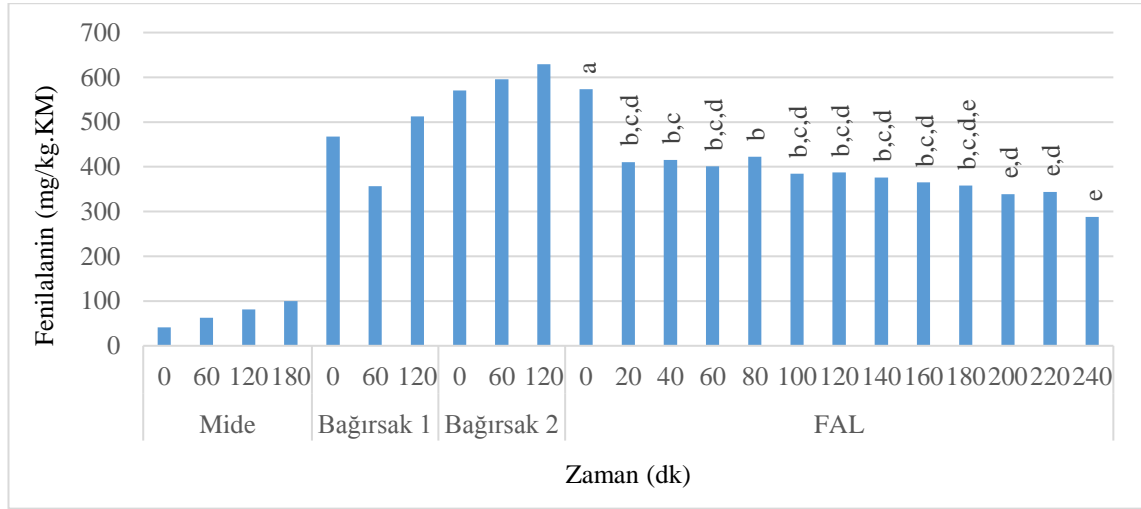
VK	SD	Fenilalanin	
		KO	F
Uygulama	3	357597.37	55.39**
Hata	42	6455.75	

** $P < 0.01$

Çizelge 4.5. *In vitro* sindirim ve FAL enzim uygulamasının unun serbest fenilalanin içeriği üzerine etkilerine ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Uygulama	N	Fenilalanin (mg/kg.KM)
Mide	8	71.08 ^c ± 10.46
Bağırsak 1	6	445.72 ^b ± 39.82
Bağırsak 2	6	598.66 ^a ± 57.69
FAL	26	389.55 ^b ± 18.10

Aynı sütundaki farklı harfler ortalamaların önemli düzeyde farklı olduğunu gösterir ($P<0.01$).



Şekil 4.1. *In vitro* sindirim ve mısır filizi ile yapılan FAL enzim uygulamasının unun serbest fenilalanin içeriği üzerine etkisi

4.4. Fenilalanin İçeriği Azaltılmış Unun Bazı Kimyasal ve Fiziksel Analiz Sonuçları

FKU hastalarına yönelik olarak üretilen fenilalanin içeriği azaltılmış unun (FAUN) su tutma kapasitesi, suda çözünürlük ve su absorpsiyonu indeksi, kurumadde, su aktivitesi, pH-titrasyon asitliği, toplam protein ve EDN içeriği gibi kimyasal özellikleri ile renk ve yığın yoğunluğu gibi bazı fiziksel özellikleri belirlenmiştir.

4.4.1. Fenilalanin içeriği azaltılmış unun su tutma kapasitesi, su absorpsiyon ve suda çözünürlük indeks değerleri

Üretimde kullanılan un (kontrol) ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun su tutma kapasitesi, su absorpsiyon ve suda çözünürlük indeks değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları Çizelge 4.6'da, bu verilere ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.7'de ve ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun su tutma kapasitesi, su absorpsiyon ve suda çözünürlük indeksi değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları

Özellik		Un	FAUN
Su tutma kapasitesi (STK, g su/ g KM)	I.	1.20	1.20
	II.	1.07	1.05
Su absorpsiyon indeksi (SAI, g/g)	I.	1.02	1.03
	II.	1.02	1.02
Suda çözünürlük indeksi (SÇI, g/100 g)	I.	0.75	7.06
	II.	0.83	7.72

Çizelge 4.7. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun su tutma kapasitesi, su absorpsiyonu ve suda çözünürlük indeksi değerlerindeki değişime ait varyans analizi sonuçları

VK	SD	STK		SAI		SÇI	
		KO	F	KO	F	KO	F
Un	1	0.0001	0.02	0.000025	1	43.56	386.29**
Hata	2	0.0106		0.000025		0.11	

** $P < 0.01$, - $P > 0.05$

Çizelge 4.8. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun su tutma kapasitesi, su absorpsiyon ve suda çözünürlük indeksi değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları (\pm standart hata)

Özellik	N	Un	FAUN
Su tutma kapasitesi (STK, g su/ g KM)	2	1.14 ^a \pm 0.07	1.13 ^a \pm 0.08
Su absorpsiyon indeksi (SAI, g/g)	2	1.02 ^a \pm 0.00	1.02 ^a \pm 0.01
Suda çözünürlük indeksi (SÇI, g/ 100 g)	2	0.79 ^b \pm 0.04	7.39 ^a \pm 0.33

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların önemli düzeyde farklı olduğunu gösterir ($P < 0.01$).

Çizelge 4.7'de verilen varyans analiz sonuçlarına göre, fenilalanin içeriğini azaltmak için yapılmış olan uygulamanın üretilen unun su tutma kapasitesi ve su absorpsiyon indeksi üzerine istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olmadığı ($P > 0.05$), ancak suda çözünürlük indeksi değerleri üzerine önemli ($P < 0.01$) bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre fenilalanin içeriği azaltılmış unun suda çözünürlük indeksi buğday ununa göre daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Bunun, *in vitro* sindirim sırasında proteinlerin peptit ve amino asitlere hidrolize olmasından ve bu peptit ve amino asitlerin de suda çözünür kurumadde miktarını artırmasından kaynaklandığı düşünülmüştür (Sharma vd 2016, Bashir vd 2017).

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre fenilalanin içeriği azaltılmış un ile buğday unun su tutma kapasitesi ve su absorpsiyon indeksi değerleri arasında istatistiksel açıdan bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. Su tutma kapasitesi ve su absorpsiyon değerleri makro moleküllerin sahip olduğu çoğunlukla hidroksil gruplarından kaynaklanmaktadır (Martínez vd 2014, Mei vd 2016, Lee vd 2017). Fenilalanin içeriğini azaltmak için uygulanan hidroliz işlemi hidroksil gruplarınca zengin nişastayı etkilemeyip yalnızca proteinler üzerine etkili olduğu için uygulamanın bu değerler üzerine önemli bir etkisinin olmadığı düşünülmüştür.

Su absorpsiyon indeksinin, nişasta ve nişastanın hidrofilik grupların miktarlarına bağlı olduğu belirtilmiştir (Silva vd 2009, Bashir vd 2017). Buna göre, buğday unu ile fenilalanin içeriği azaltılmış un arasında su tutma kapasitesi ile su absorpsiyon indeksi arasında fark bulunmaması, *in vitro* sindirimi ile sadece proteinlerin hidroliz edilmiş olmasından ve dolayısıyla nişastanın zarar görmemiş olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Yapılan bir çalışmada buğday ununun su absorpsiyon indeks değerinin ortalama 1.39 g/g olduğu tespit edilmiştir (Sharma vd 2016).

4.4.2. Fenilalanin içeriği azaltılmış unun nem içeriği ve su aktivitesi değerleri

Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun nem içeriği ve su aktivitesi değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları Çizelge 4.9’da, bu verilere ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.10’da ve ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.10’da verilen varyans analiz sonuçlarına göre, fenilalanin içeriğini azaltmak için yapılmış olan uygulamanın üretilen unların nem içerikleri üzerine istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) bir etkisinin olduğu, su aktivitesi değerleri üzerine ise önemli ($P>0.05$) bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre fenilalanin içeriği azaltılmış unun nem içeriği buğday ununa göre daha yüksek tespit edilmiştir. Bu durumun protein hidrolizi sonucu oluşan serbest amino asit ve suda çözünür peptitlerin koligatif etkisinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Artan serbest amino asit ve peptit miktarı dolayısıyla suda çözünen madde miktarını da artırmış ve bu da doğal olarak maddenin daha yüksek miktarda rutubete sahip olmasına neden olmuştur. Bu durum fenilalanin içeriği azaltılmış un örneğinin su aktivitesi değerinin destkriptif olarak daha düşük olmasından da anlaşılmaktadır.

Depolama boyunca unlarda mikrobiyal gelişmenin önlenmesi ve dolayısıyla gıda güvenliğinin sağlanması amacıyla nem içeriğinin %14’ün (Tharise vd 2014) ve su aktivitesi değerinin 0.65’in (Bell ve Labuza 2000) altında olması gereklidir. Hem nem hem de su aktivitesi sonuçları dikkate alındığında fenilalanin içeriği azaltılmış unun gıda güvenliği yönüyle güvenli bir şekilde depolanabileceği anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.9. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun nem içeriği ve su aktivitesi değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları

Örnek		Nem içeriği (%)	Su aktivitesi (a_w)
Un	I.	9.44	0.48
	II.	9.95	0.47
FAUN	I.	11.34	0.44
	II.	11.36	0.38

Çizelge 4.10. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun nem içeriği ve su aktivitesi değerlerindeki değişime ait varyans analizi sonuçları

VK	SD	Nem içeriği		Su aktivitesi	
		KO	F	KO	F
Un	1	2.73	42.06*	0.0041	4.57
Hata	2	0.06		0.0009	

* $P < 0.05$, - $P > 0.05$ Çizelge 4.11. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun nem içeriği ve su aktivitesi değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları (\pm standart hata)

Özellik	N	Un	FAUN
Nem içeriği (%)	2	9.70 ^b \pm 0.25	11.35 ^a \pm 0.01
Su aktivitesi (a_w)	2	0.47 ^a \pm 0.01	0.41 ^a \pm 0.03

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların önemli düzeyde farklı olduğunu gösterir ($P < 0.05$).

4.4.3. Fenilalanin içeriği azaltılmış unun pH ve titrasyon asitliği değerleri

Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun pH ve titrasyon asitliği değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları Çizelge 4.12'de, bu verilere ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.13'te ve ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.14'te verilmiştir.

Çizelge 4.12. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun pH ve titrasyon asitliği değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları

Örnek		pH	Titrasyon asitliği (%)
Un	I.	6.32	0.054
	II.	6.35	0.054
FAUN	I.	6.34	0.207
	II.	5.63	0.289

Çizelge 4.13. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun pH ve titrasyon asitliği değerlerindeki değişime ait varyans analizi sonuçları

VK	SD	pH		Titrasyon asitliği	
		KO	F	KO	F
Un	1	0.1225	0.97	0.03763	22.39*
Hata	2	0.1265		0.00168	

* $P < 0.05$, - $P > 0.05$

Çizelge 4.14. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun pH ve titrasyon asitliği değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları (\pm standart hata)

Özellik	N	Un	FAUN
pH	2	6.34 ^a \pm 0.01	5.99 ^a \pm 0.36
Titrasyon asitliği (%)	2	0.054 ^b \pm 0.00	0.248 ^a \pm 0.04

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların önemli düzeyde farklı olduğunu gösterir ($P < 0.05$).

Çizelge 4.13'te verilen varyans analiz sonuçlarına göre, fenilalanin içeriğini azaltmak için yapılmış olan uygulamanın üretilen unların pH değerleri üzerine istatistiksel olarak önemli ($P > 0.05$) bir etkisinin olmadığı, titrasyon asitliği değerleri üzerine ise önemli ($P < 0.05$) bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre fenilalanin içeriği azaltılmış un ile buğday unu arasında pH değerinin istatistiksel açıdan bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. Adeleke ve Odedeji (2010) tarafından yapılan bir çalışmada buğday ununun pH değeri 6.01 olarak belirtilmiştir. Romano vd (2016) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise transglutaminaz enziminin, fasulye ununun mikro yapısı, bazı fiziksel ve fonksiyonel özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmaya göre enzim uygulamasının unun pH değeri üzerine etkisinin olmadığı ve enzim uygulanan ve uygulanmayan un örneklerinin pH değeri 6.8 olarak tespit edilmiştir. Lee vd (2017) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise buğday ununun pH değeri 5.74 olarak belirtilmiştir.

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre fenilalanin içeriği azaltılmış unun titrasyon asitliği değeri buğday ununa göre daha yüksek tespit edilmiştir. Titrasyon asitliği, Türk Gıda Kodeksi Buğday Unu Tebliği'ne (2013/9) göre sülfürik asit cinsinden hesaplanmıştır. Tebliğe göre, % asitlik kurumaddede en çok %0.07 olarak belirtilmiştir. Buna göre buğday ununun titrasyon asitliği tebliğde belirten değer altındayken, fenilalanin içeriği azaltılmış unun asitlik değeri bu değer üzerinde tespit edilmiştir. Bu durumun *in vitro* sindirim ve FAL enzim uygulaması ile proteinlerin hidrolizi için ortam pH'sının ayarlanmasından ve hidroliz ile serbest amino asit miktarının artmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Fenilalanin içeriği azaltılmış unun titrasyon asitliği değeri buğday ununa göre artarken, pH değeri buğday ununa göre değişmemiştir. Bu durumun nedeni, *in vitro* sindirim sırasında serbest amino asit miktarının artmasıyla bu amino asitlerin tamponlama

özelliği göstermesi ve dolayısıyla pH değerinin değişmemesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Yapılan bir çalışmada buğday ununda titrasyon asitliği %0.057 olarak tespit edilmiştir (Ade-Omowaye vd 2008).

4.4.4. Fenilalanin içeriği azaltılmış unun toplam protein içeriği

Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun % protein içeriği değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları Çizelge 4.15'te, bu verilere ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.16'da ve ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.17'de verilmiştir.

Çizelge 4.15. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun % protein içeriği değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları

Örnek	Protein içeriği (%)	
Un	I.	12.69
	II.	12.73
FAUN	I.	11.14
	II.	11.93

Çizelge 4.16. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun % protein içeriği değerlerindeki değişime ait varyans analiz sonuçları

VK	SD	Protein içeriği	
		KO	F
Un	1	1.38	8.83
Hata	2	0.15	

- $P > 0.05$

Çizelge 4.17. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun % protein içeriği değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları (\pm standart hata)

Özellik	N	Un	FAUN
Protein içeriği (%)	2	12.71 ^a \pm 0.02	11.54 ^a \pm 0.39

Çizelge 4.16'da verilen varyans analiz sonuçlarına göre, fenilalanin içeriğini azaltmak için yapılmış olan uygulamanın üretilen unun % protein içeriği değerleri üzerine istatistiksel olarak önemli ($P > 0.05$) bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre fenilalanin içeriği azaltılmış un ile buğday ununun % protein içeriği değerleri arasında istatistiksel açıdan bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. Bunun nedenini *in vitro* sindirim ve FAL enzim uygulamasında unun azot içeriğinin ve dolayısıyla toplam protein içeriğinin değişmemesinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Yapılan bir çalışmada ekmeklik buğday unlarının protein içeriklerinin %11.85-13.44 arasında değiştiği belirtilmiştir (Yağdı 2004). Bir başka çalışmada ise tam buğday ununun protein içeriği %12.63 olarak tespit edilmiştir (Kundu vd 2017).

4.4.5. Fenilalanin içeriği azaltılmış unun enzime dirençli nişasta (EDN) değerleri

Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun % EDN içeriği değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları Çizelge 4.18’de, bu verilere ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.19’da ve ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.20’de verilmiştir.

Çizelge 4.18. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun % EDN içeriği değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları

Örnek		EDN içeriği (%)
Un	I.	0.086
	II.	0.184
FAUN	I.	0.632
	II.	0.537

Çizelge 4.19. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun % EDN içeriği değerlerindeki değişime ait varyans analiz sonuçları

VK	SD	EDN içeriği	
		KO	F
Un	1	0.2020	43.38*
Hata	2	0.0046	

* $P < 0.05$

Çizelge 4.20. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun % EDN içeriği değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları (\pm standart hata)

Özellik	N	Un	FAUN
EDN içeriği (%)	2	0.14 ^b \pm 0.05	0.58 ^a \pm 0.05

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların önemli düzeyde farklı olduğunu gösterir ($P < 0.05$).

Çizelge 4.19’da verilen varyans analiz sonuçlarına göre, fenilalanin içeriğini azaltmak için yapılmış olan uygulamanın üretilen unun % EDN içeriği değerleri üzerine istatistiksel olarak önemli ($P < 0.05$) bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre fenilalanin içeriği azaltılmış unun % EDN içeriği buğday ununa göre daha yüksek tespit edilmiştir. Bunun nedeninin, fenilalanin içeriği azaltılmış un üretimi sırasında uygulanan ısıtma, soğutma, pH ayarlama ve karıştırma işlemleri sırasında zedelenmiş nişasta granüllerindeki amiloz

zincirlerinin granülden çıkararak yeniden düzenlenmesi ve kurutma sırasında retrograde olarak Tip 3 dirençli nişastaya dönüşmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Unda EDN içeriğinin araştırıldığı bir çalışmada ısıl işlem-dondurma uygulaması yapılan un örneğinin, kontrol örneğine göre EDN içeriğinin yaklaşık 8 kat arttığı belirlenmiştir (Arcila ve Rose 2015).

4.4.6. Fenilalanin içeriği azaltılmış unun renk değerleri

Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun renk değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları Çizelge 4.21’de, bu verilere ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.22’de ve ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.23’te verilmiştir.

Çizelge 4.21. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun renk değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları

Örnek		L^*	a^*	b^*
Un	I.	90.70	-4.89	15.30
	II.	90.69	-4.93	15.39
FAUN	I.	68,89	-3.88	17.25
	II.	75.34	-4.86	24.59

Çizelge 4.22. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun renk değerlerindeki değişime ait varyans analizi sonuçları

VK	SD	L^*		a^*		b^*	
		KO	F	KO	F	KO	F
Un	1	364.04	26.24*	0.29	1.21	31.07	2.31
Hata	2	13.87		0.24		13.47	

* $P < 0.05$, - $P > 0.05$

Çizelge 4.23. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun renk değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları (\pm standart hata)

Özellik	N	Un	FAUN
L^*	2	90.70 ^a \pm 0.01	71.62 ^b \pm 3.73
a^*	2	-4.91 ^a \pm 0.02	-4.37 ^a \pm 0.49
b^*	2	15.35 ^a \pm 0.05	20.92 ^a \pm 3.67

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların önemli düzeyde farklı olduğunu gösterir ($P < 0.05$).

Çizelge 4.22’de verilen varyans analiz sonuçlarına göre, fenilalanin içeriğini azaltmak için yapılmış olan uygulamanın L^* değerleri üzerine istatistiksel olarak önemli ($P < 0.05$) bir etkisinin olduğu, a^* ve b^* değerlerinin üzerine ise önemli ($P > 0.05$) bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre fenilalanin içeriği azaltılmış unun L^* değerinin kontrol ununa göre daha düşük bir L^* değerine ve dolayısıyla daha koyu bir renge sahip olduğu tespit edilmiştir. Fenilalanin içeriği azaltılmış unun daha koyu bir renge sahip olmasının nedeninin *in vitro* sindirim sırasında uygulanan sıcaklık ve oluşan serbest amino asitlerin Maillard gibi enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarından kaynaklandığı değerlendirilmiştir. Serbest amino asitler indirgen şekerlerle Maillard reaksiyonuna girerek ürünlerin daha koyu renkli olmasına neden olmaktadır (Fennema 1996, Martínez vd 2015, Oliveira vd 2017).

4.4.7. Fenilalanin içeriği azaltılmış unun yığın yoğunluğu değerleri

Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun yığın yoğunluğu değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları Çizelge 4.24'te, bu verilere ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.25'te ve ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.26'da verilmiştir.

Çizelge 4.24. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun yığın yoğunluğu değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları

Örnek	Yığın yoğunluğu (g/mL)	
Un	I.	0.70
	II.	0.68
FAUN	I.	1.03
	II.	1.02

Çizelge 4.25. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun yığın yoğunluğu değerlerindeki değişime ait varyans analizi sonuçları

VK	SD	Yığın yoğunluğu	
		KO	F
Un	1	0.112	897.80**
Hata	2	0.000125	

** $P < 0.01$

Çizelge 4.26. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun yığın yoğunluğu değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları (\pm standart hata)

Özellik	N	Un	FAUN
Yığın yoğunluğu (g/mL)	2	0.69 ^b \pm 0.01	1.03 ^a \pm 0.01

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların önemli düzeyde farklı olduğunu gösterir ($P < 0.01$).

Çizelge 4.25'te verilen varyans analiz sonuçlarına göre, fenilalanin içeriğini azaltmak için yapılmış olan uygulamanın üretilen unların yığın yoğunluğu değerleri üzerine istatistiksel olarak önemli ($P < 0.01$) bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre fenilalanin içeriği azaltılmış unun yığın yoğunluğu değeri buğday ununa göre daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu durumun proteinlerin hidroliz olması ve bunun sonucu olarak da birim hacme daha çok kütle girmesinden ve ayrıca fenilalanin içeriği azaltılmış unun homojen olarak öğütülememesi nedeniyle partikül boyutunun buğday ununun partikül boyutundan daha yüksek olması gibi nedenlerden kaynaklandığı düşünülmüştür. Drakos vd (2017) tarafından aynı ağırlığa sahip olan unlarda partikül boyutu arttıkça yığın yoğunluğunun da arttığı bildirilmiştir.

Farklı besleme hızları ile jet öğütme yapılan arpa ve pirinç unlarında partikül boyutunun yığın yoğunluğu üzerine yapılan bir çalışmada partikül boyutu küçüldükçe yığın yoğunluğunun 0.48 g/mL'den 0.39 g/mL'ye düştüğü belirlenmiştir (Drakos vd 2017). Yapılan bir başka çalışmada ise buğday ununun yığın yoğunluğu 0.57 g/mL olarak tespit edilmiştir (Ade-Omowaye vd 2008).

4.5. Duyusal Analiz

Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış unun duyusal analiz değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları Çizelge 4.27'de, bu verilere ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.28'de ve ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.29'da verilmiştir.

Çizelge 4.28'de verilen varyans analiz sonuçlarına göre, fenilalanin içeriğini azaltmak için yapılmış olan uygulamanın üretilen bisküvi örneklerinin tüm duyusal özellikleri üzerine önemli ($P<0.01$, $P<0.05$) bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçlarına göre fenilalanin içeriği azaltılmış un dan üretilen bisküviler, duyusal puanı 9 olarak kabul edilen kontrol örneklerine kıyasla daha düşük puanlar aldığı ancak puanlarının 9 puanlık hedonik skalada kabul edilebilirlik sınırı olan 4.5 puandan da daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle fenilalanin içeriği azaltılmış un ile üretilebilecek bir unlu mamülün FKU hastaları tarafından kabul edilebilir bulunabileceği değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.27. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış undan üretilen bisküvilerin duyuusal analiz değerlerine ait I. ve II. tekerrür sonuçları

Duyuusal özellikler		Renk	Koku	Sertlik	Çiğnenebilirlik	Yapışkanlık	Aroma-Tat	Genel Beğeni
Un	I.	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00
	II.	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00
FAUN	I.	6.89	6.00	7.89	6.22	4.33	4.78	5.56
	II.	6.00	5.63	8.00	6.75	4.75	4.75	5.63

Çizelge 4.28. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış undan üretilen bisküvilerin duyuusal analiz değerlerine ait varyans analiz sonuçları

VK	SD	Renk		Koku		Sertlik		Çiğnenebilirlik		Yapışkanlık		Aroma-Tat		Genel beğeni	
		KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F	KO	F
Un	1	6.528	32.97*	10.144	296.40**	1.113	367.94**	6.325	90.07*	19.891	451.06**	17.935	79712.1**	11.594	9464.51*
Hata	2	0.396		0.034		0.003		0.070		0.044		0.0002		0.001	

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ Çizelge 4.29. Üretimde kullanılan un ve fenilalanin içeriği azaltılmış undan üretilen bisküvilerin duyuusal analiz değerlerine ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları (\pm standart hata)

Örnek	N	Renk	Koku	Sertlik	Çiğnenebilirlik	Yapışkanlık	Aroma-Tat	Genel beğeni
Un	1	9.00 ^a	9.00 ^a	9.00 ^a	9.00 ^a	9.00 ^a	9.00 ^a	9.00 ^a
FAUN	2	6.45 ^b \pm 0.44	5.82 ^b \pm 0.19	7.95 ^b \pm 0.06	6.49 ^b \pm 0.27	4.54 ^b \pm 0.21	4.77 ^b \pm 0.02	5.60 ^b \pm 0.04

Aynı sütündeki farklı harfler ortalamaların önemli düzeyde farklı olduğunu gösterir ($P < 0.01$, $P < 0.05$).

5. SONUÇ

Bu çalışmada, *in vitro* olarak protein sindirimi yapılan un örneğine, fenilalanin içeriğini azaltmak amacıyla FAL enzimi içeren mısır filizi uygulanmış ve bu uygulamadan sonra un tekrar kurutularak FKU hastaları için fenilalanin içeriği azaltılmış bir un üretme yöntemi gerçekleştirilmiştir.

Fenilalanin içeriği azaltılmış un üretiminde *in vitro* sindirimden sonra fenilalanin içeriğini azaltmak amacıyla yapılan FAL enzim uygulamasında kullanılan mısır filizinin FAL enzim aktivite değeri belirlenmiştir. *In vitro* sindirim ve FAL enzim uygulamasının unun serbest fenilalanin içeriği üzerine etkisini incelemek amacıyla alınan örneklerin serbest fenilalanin içerikleri tespit edilmiştir. Ayrıca elde edilen fenilalanin içeriği azaltılmış unda su tutma kapasitesi, suda çözünürlük indeksi, su absorpsiyon indeksi, kurumadde, su aktivitesi, pH-titrasyon asitliği, toplam protein, renk ve yığın yoğunluğu analizleri yapılmıştır. Üretilen un örneğinin duyuşal olarak tüketilebilirliğini belirlemek için bisküvi üretimi gerçekleştirilerek bu bisküvilerin duyuşal özellikleri belirlenmiştir.

Yapılan analizler sonucunda elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- FAL enzim uygulamasında kullanılan mısır filizinin çimlenmenin 7. günündeki maksimum FAL enzim aktivitesi ortalama 6.09 $\mu\text{mol/h.g}$ taze ağırlık olarak tespit edilmiştir.
- *In vitro* protein sindirim sonrasında açığa çıkan serbest fenilalanin miktarı, unun toplam fenilalanin miktarından yaklaşık 10 kat daha az olduğu tespit edilmiştir.
- *In vitro* protein sindiriminin mide, bağırsak birinci ve bağırsak ikinci kısım uygulamalarının ve FAL enzim uygulamasının unun serbest fenilalanin içeriği üzerine önemli bir etkisinin olduğu ve *in vitro* sindirim sonunda serbest fenilalanin içeriğinin yaklaşık 15 kat arttığı tespit edilmiştir.
- *In vitro* sindirim sonrası serbest fenilalanin içeriğini azaltmak için uygulanan FAL enzim uygulamasında mısır filizinin unun serbest fenilalanin içeriğini %49.78 oranında azaltıcı bir etki gösterdiği tespit edilmiştir.
- Fenilalanin içeriği azaltılmış unun su tutma kapasitesi ve su absorpsiyon indeksi değerleri üzerine fenilalanin içeriğini azaltmak için yapılmış olan uygulamanın önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Suda çözünürlük indeks değerinin ise buğday ununa göre yaklaşık 9 kat arttığı belirlenmiş olup bu değer 7.39 g/100 g olarak tespit edilmiştir.
- Fenilalanin içeriği azaltılmış unun nem içeriği buğday ununa göre artmış olup bu değer %11.35 olarak tespit edilmiştir. Fenilalanin içeriğini azaltmak için yapılmış olan uygulamanın su aktivitesi değeri üzerine ise önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

- Fenilalanin içeriği azaltılmış unun pH değeri üzerine fenilalanin içeriğini azaltmak için yapılmış olan uygulamanın önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Titrasyon asitliği değeri ise buğday ununa göre artmış olup bu değer, sülfürik asit cinsinden %0.248 olarak tespit edilmiştir.
- Fenilalanin içeriği azaltılmış unun protein içeriği üzerine fenilalanin içeriğini azaltmak için yapılmış olan uygulamanın önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.
- Fenilalanin içeriği azaltılmış unun %EDN içeriği buğday ununa göre yaklaşık 4 kat artmış olup bu değer, %0.58 olarak tespit edilmiştir.
- Fenilalanin içeriği azaltılmış unun L^* değeri buğday ununa göre düşmüş olup bu değer, 71.62 olarak tespit edilmiştir. Uygulanan işlemlerin a^* ve b^* değerleri üzerine ise önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.
- Fenilalanin içeriği azaltılmış unun yığın yoğunluğu değeri buğday ununa göre artmış olup bu değer, 1.03 g/mL olarak tespit edilmiştir.
- Fenilalanin içeriği azaltılmış un ile üretilen bisküvilerin duyusal özellikleri 9 puanlık hedonik skalaya göre yapılan değerlendirmede kabul edilebilirlik sınırı olan 4.5 ve daha yüksek puanları aldığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; uygulanan *in vitro* protein sindiriminin proteinleri hidroliz ettiği ve serbest fenilalanin içeriğini yaklaşık 15 kat artırdığı ve mısır filizi FAL enzim uygulamasının ise bu serbest fenilalanin içeriğini %49.78 kadar azalttığı ve bu undan yapılan bisküvilerin duyusal olarak kabul edilebilir bulunduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca bu tez sonucunda; *in vitro* protein sindirim sürecinin sonuna ince bağırsak mikrovilluslarına tutunmuş olarak görev yapan enzimlerinin (brush wall enzyme) de ilave edilmesinin daha çok fenilalanin amino asidinin serbest hale geçmesini sağlayacağı, FAL enzim içeriği ve aktivitesi daha yüksek bitki kaynaklarının veya biyoteknolojik yöntemlerle üretilen saf FAL enzimlerinin kullanılmasıyla bu tez çalışmasında önerilen yöntemle FKU hastalarına yönelik fenilalanin içeriği daha çok düşürülmüş tam gıda kaynaklarının üretilebileceği sonucuna varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- AACC. 2011. American Association of Cereal Chemists, Approved Methods of Analysis 11th ed. rev. Methods 02-31. The Association: St. Paul, MN, U.S.A.
- AACC. 2011. American Association of Cereal Chemists, Approved Methods of Analysis 11th ed. rev. Methods 02-52. The Association: St. Paul, MN, U.S.A.
- AACC. 2011. American Association of Cereal Chemists. Approved Methods of Analysis, 11th ed. rev. Methods 32-40. The Association: St. Paul, MN, U.S.A.
- AACC. 2011. American Association of Cereal Chemists. Approved Methods of Analysis, 11th ed. rev. Methods 46-12. The Association: St. Paul, MN, U.S.A.
- AACC. 2011. American Association of Cereal Chemists, Approved Methods of Analysis 11th ed. rev. Methods 56-20. The Association: St. Paul, MN, U.S.A.
- ADE-OMOWAYE, B.I.O., AKINWANDE, B.A., BOLARINWA, I.F. and ADEBIYI, A.O. 2008. Evaluation of tigernut (*Cyperus esculentus*) – wheat composite flour and bread. *African Journal of Food Science*, 2: 087-091.
- ADELEKE R.O. and ODEDEJI J.O. 2010. Functional Properties of Wheat and Sweet Potato Flour Blends. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9 (6): 535-538.
- AKTUĞLU ZEYBEK, Ç. 2003. Fenilketonuri Tarama Programı. *İ.U. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sağlam Çocuk İzlemi Sempozyum Dizisi*, 35: 65-71.
- ANONİM. 2015. <http://www.ilacrehberi.com/v/kuvan-100-mg-cozunebilir-tablet-d606/kub/farmakolojik-ozellikler/>. [Son erişim tarihi: 03.08.2015]
- ANONİM. 2016a. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. “Neonatal Tarama Programı Genelgesi 2006/130”. www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-3295/neonatal-tarama-programi-genelgesi-2006--130.html?vurgu=neonatal. [Son erişim tarihi: 17.02.2016]
- ANONİM. 2017a. <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2932?fgcd=&manu=&facet=&format=Full&count=&max=50&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=11167&ds=&qt=&qp=&qa=&qn=&q=&ing=#id-1>. [Son erişim tarihi: 27.03.2017]
- ANONİM. 2017b. <https://www.omim.org/entry/261600>. [Son erişim tarihi: 19.07.2017]
- ARCILA, J.A. and ROSE, D.J. 2015. Repeated cooking and freezing of whole wheat flour increases resistant starch with beneficial impacts on in vitro fecal fermentation properties. *Journal of Functional Foods*, 12: 230–236.
- ASI, T. 1999. Tablolarla Biyokimya Cilt II, Protein Metabolizması. Ankara, 234 s.

- BABAOĞLU-AYDAŞ, S., OZTURK, S. and ASLİM, B. 2013. Phenylalanine ammonia lyase (PAL) enzyme activity and antioxidant properties of some cyanobacteria isolates. *Food Chemistry*, 136: 164–169.
- BABAOĞLU-AYDAŞ, S., ŞİRİN, S. and ASLİM, B. 2016. Biochemical analysis of *Centaurea depressa* phenylalanine ammonia lyase (PAL) for biotechnological applications in phenylketonuria (PKU). *Pharmaceutical Biology*, 54 (12): 2838–2844.
- BANNICK, A.A., LAUFMAN, J.D., EDWARDS, H.L., VENTIMIGLIA, J. and FELDMAN, G.L. 2015. Outcomes of referrals to Child Protective Services for medical neglect in patients with phenylketonuria: Experiences at a single treatment center. *Molecular Genetics and Metabolism*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.06.003>.
- BANTA-WRIGHT, S.A., KODADEK, S.M., STEINER R.D. and HOUCK, G.M. 2015. Challenges to breastfeeding infants with phenylketonuria. *Journal of Pediatric Nursing*, 30: 219–226.
- BARRON, C.C., SPONAGLE, B.J.D., ARIVALAGAN, P. and D’CUNHA, G.B. 2017. Optimization of oligomeric enzyme activity in ionic liquids using *Rhodotorula glutinis* yeast phenylalanine ammonia lyase. *Enzyme and Microbial Technology*, 96: 151–156.
- BASHIR, K., SWER, T.L., PRAKASH, K.S. and AGGARWAL, M. 2017. Physico-chemical and functional properties of gamma irradiated whole wheat flour and starch. *LWT - Food Science and Technology*, 76: 131-139.
- BELL, L.N. and LABUZA, T.P. 2000. Moisture Sorption: Practical Aspects of Isotherm Measurement and Use. 2nd Edition, American Association of Cereal Chemists, Minnesota, USA, 122 p.
- BİLGİN, O. ve KORKUT, K.Z. 2005. Bazı Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Çeşit ve Hatlarının Tane Verimi ve Bazı Fenolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2 (1): 57-65.
- BLAU, N., VAN SPRONSEN, F.J. and LEVY, H.L. 2010. Phenylketonuria. *Lancet* 376: 1417–1427.
- BLAU, N., SHEN, N. and CARDUCCI, C. 2014. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 14: 655–671.
- BLAU, N. 2016. Genetics of Phenylketonuria: Then and Now. *Human Mutation*, DOI: 10.1002/humu.22980.

- BRUINENBERG, V.M., VAN VLIET, D., ATTALI, A., WILDE, M.C., KUHN, M., VAN SPRONSEN, F.J. and VAN DER ZEE, E.A. 2016. A Specific Nutrient Combination Attenuates the Reduced Expression of PSD-95 in the Proximal Dendrites of Hippocampal Cell Body Layers in a Mouse Model of Phenylketonuria. *Nutrients*, 8: 185.
- CARREIRA, R.L., SILVA, M.R., STARLING, A.L.P., AGIAR, M.J.B., JANUARIO, J.N. and SILVESTRE, P.C.M. 2008. Association of Two Enzymes for Obtaining Low Phenylalanine Protein Hydrolysates from Wheat Flour. *International Journal of Food Engineering*, 4(7), DOI: 10.2202/1556-3758.1544.
- CASTAÑEDA, M.T., ADACHI, O. and HOURS, R.A. 2015. Reduction of L-phenylalanine in protein hydrolysates using L-phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodospiridium toruloides*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42: 1299–1307.
- CHATURVEDI, S., SINGH, A.K., KESHARI, A.K., MAITY, S., SARKAR, S. and SAHA, S. 2016. Human Metabolic Enzymes Deficiency: A Genetic Mutation Based Approach. *Scientifica*, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9828672>.
- CLEARY, M.A. 2014. Phenylketonuria. Symposium: Inborn Errors of Metabolism. *Paediatrics and Child Health*, 25: 3.
- CLIFF, M.A., LAW, J.R., LUCKER, J., SCAMAN, C.H. and KERMODE, A.R. 2016. Descriptive and hedonic analyses of low-Phe food formulations containing corn (*Zea mays*) seedling roots: toward development of a dietary supplement for individuals with phenylketonuria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96: 140–149.
- CRUJEIRAS, V., ALDÁMIZ-ECHEVARRÍA, L. DALMAU, J., VITORIA, I., ANDRADE, F., ROCA, I., LEIS, R., FERNANDEZ-MARMIESSE, A. and COUCE, M.L. 2015. Vitamin and mineral status in patients with hyperphenylalaninemia. *Molecular Genetics and Metabolism*, 115: 145–150.
- DA ENCARNACÃO, J.A., FARRELL, T.L., RYDER, A., KRAUT, N.U. and WILLIAMSON, G. 2015. In vitro enzymic hydrolysis of chlorogenic acids in coffee. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59: 231–239.
- DEVI SOWJANYA, K., HARIPRASATH, K., NALINI, G.R., VEENAEESH, P. and RAVICHANDRA, S. 2015. Wheat Grass Juice - *Triticum aestivum* Linn'a Therapeutic Tool in Pharmaceutical Research, an Overview. *IJPPR Human Journals*, 3 (3): 112-121.
- DRAKOS, A., KYRIAKAKIS, G., EVAGELIOU, V., PROTONOTARIOU, S., MANDALA, I. and RITZOULIS, C. 2017. Influence of jet milling and particle size on the composition, physicochemical and mechanical properties of barley and rye flours. *Food Chemistry*, 215: 326–332.

- ELGÜN, A., ERTUGAY, Z., CERTEL, M. ve KOTANCILAR, H.G. 2002. Tahıl ve Ürünlerinde Analitik Kalite Kontrolü Laboratuvar Uygulama Kılavuzu, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi: 335, Erzurum, 245 s.
- ELSAS, L.J., GRETO, J. and WIERENGA, A. 2011. The effect of blood phenylalanine concentration on Kuvan™ response in phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, 102: 407–412.
- FENNEMA, O.W. 1996. Food Chemistry, Marcel Dekker Inc., p 1067, New York.
- FERNANDA SCHUCK, P., MALGARIN, F., CARARO, J.H., CARDOSO, F., STRECK, E.L. and FERREIRA, G.C. 2015. Phenylketonuria Pathophysiology: on the Role of Metabolic Alterations. *Aging and Disease*, 6 (5): 390-399.
- GIANFRANI, C. et al. 2015. Extensive in vitro gastrointestinal digestion markedly reduces the immune-toxicity of *Triticum monococcum* wheat: Implication for celiac disease. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59: 1844–1854.
- GILBERT-BARNESS, E. and FARRELL, P.M. 2016. Approach to diagnosis of metabolic diseases. *Translational Science of Rare Diseases*, 1: 3–22.
- GOLDAR, P., GIVIANRAD, M.H. and SHAMS, A. 2016. Effect of ultrafiltered milk permeate and non-dairy creamer powder concentration on low phenylalanine yoghurt's physicochemical properties during storage. *Journal of Food Science and Technology*, 53 (7): 3053-3059.
- GOLDSON, A., LAM, M., SCAMAN, C.H., CLEMES, S. and KERMODE, A. 2008. Screening of phenylalanine ammonia lyase in plant tissues and retention of activity during dehydration. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88: 619-625.
- GORDON, P., THOMAS, J.A., SUTER, R. and JURECKI, E. 2012. Evolving patient selection and clinical benefit criteria for sapropterin dihydrochloride (Kuvan (R)) treatment of PKU patients. *Molecular Genetics and Metabolism*, 105(4): 672-676.
- HO, G., UEDA, K., HOUBEN, R.F.A., JOA, J., GIEZEN, A., CHENG, B. and VAN KARNEBEEK, C.D.M. 2016. Metabolic Diet App Suite for inborn errors of amino acid metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism*, 117: 322–327.
- HTUN, P., NEE, J., PLOECKINGER, U., EDER, K., GEISLER, T., GAWAZ, M., BOCKSCH, W. and FATEH-MOGHADAM, S. 2015. Fish-Free Diet in Patients with Phenylketonuria Is Not Associated with Early Atherosclerotic Changes and Enhanced Platelet Activation. *Plos One*, 10 (8): e0135930.
- JAHYA, R. et al. 2013. Mental Health and Social Functioning in Early Treated Phenylketonuria: The PKU-COBESO study. *Molecular Genetics and Metabolism*, 110: 57-61.

- KARA, A. 2012. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Metabolizma Hastalıkları ve Beslenme Polikliniğinde Tanı Alan veya Takibe Giren Kalıtsal Metabolik Hastalığı Olan Hastaların Tanılarının, Klinik ve Laboratuvar Bulgularının Analizi İle Takip Sonuçlarının Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 164 s.
- KARADENİZ, Y. 2013. Fenilketonürlü Çocukların Ebeveynlerinin Duygu Durumları ve Gelecekle İlgili Beklentileri. Uzmanlık Tezi, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır, 50 s.
- KIM, W., ERLANDSEN, H., SURENDRAN, S., STEVENS, R.C., GAMEZ, A., MICHOLS-MATALON, K., TYRING, S.K. and MATALON, R. 2004. Trends in Enzyme Therapy for Phenylketonuria. *Molecular Therapy*, 10 (2): 220-224.
- KÖKSAL, G. ve GÖKMEN ÖZEL, H. 2012. Metabolik Hastalıklarda Beslenme. Sağlık Bakanlığı Yayın No: 728, Reklam Kurdu Ajansı, Ankara, 40 s.
- KOCH, R., MOSELEY, K.D., YANO, S., NELSON, M. and MOATS, R.A. 2003. Large neutral amino acid therapy and phenylketonuria: a promising approach to treatment. *Molecular Genetics and Metabolism*, 79: 110–113.
- KUNDU, M., KHATKAR, B.S. and GULIA, N. 2017. Assessment of chapatti quality of wheat varieties based on physicochemical, rheological and sensory traits. *Food Chemistry*, 226: 95–101.
- KÜÇÜKKASAP, T. 2013. Türkiye’de Fenilketonüri Hastalığında Tanı, Tedavi, İzlem ve Uygulamaların Saptanması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 172 s.
- LACLAIR, C.E., NEY, D.M., MACLEOD, E.L. and ETZEL, M.R. 2009. Purification and Use of Glycomacropeptide for Nutritional Management of Phenylketonuria. *Journal of Food Science*, 74 (4): 199-206.
- LAM, M., SCAMAN, C.H., CLEMENS, S. and KERMODE, A. 2008. Retention of Phenylalanine Ammonia-lyase Activity in Wheat Seedlings during Storage and in Vitro Digestion. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56: 11407-11412.
- LEE, M.J., KIM, M.J., KWAK, H.S., LIM, S.T. and KIM, S.S. 2017. Effects of ozone treatment on physicochemical properties of Korean wheat flour. *Food Science and Biotechnology*, 26 (2): 435-440.
- LIEMBURG, G.B. et al. 2015. Is BRIEF a useful instrument in day to day care of patients with phenylketonuria?. *Molecular Genetics and Metabolism*, 114: 425-430.
- LOPES, D.C.F., BIZZOTTO, C.S., CARREIRA, R.L., AFONSO, W.O., LOPES, C.O. and SILVESTRE, M.P.C. 2008. Removal of Phenylalanine from Protein Hydrolysates Prepared with Rice. *Journal of Food Technology*, 6 (2): 57-65.
- LÓPEZ-VILLALOBOS, A., LUCKER, J., LÓPEZ-QUIRÓZ, A.A., YEUNG, E.C., PALMA, K. and KERMODE, A.R. 2014. Preservation of high phenylalanine ammonia lyase activities in roots of Japanese Striped corn: A potential oral therapeutic to treat phenylketonuria. *Cryobiology*, 68: 436–445.

- MACDONALD, A., ROCHA, J.C., VAN RIJN, M. and FEILLET, F. 2011. Nutrition in phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, 104: 10–18.
- MACLEOD, E.L., CLAYTON, M.K., VAN CALCAR, S.C. and NEY, D.M. 2010. Breakfast with glycomacropeptide compared with amino acids suppresses plasma ghrelin levels in individuals with phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, 100: 303–308.
- MARTÍNEZ, M.M., ROSELL, C.M. and GÓMEZ, M. 2014. Modification of wheat flour functionality and digestibility through different extrusion conditions. *Journal of Food Engineering*, 143: 74–79.
- MARTÍNEZ, M.M., PICO, J. and GÓMEZ, M. 2015. Physicochemical modification of native and extruded wheat flours by enzymatic amylolysis. *Food Chemistry*, 167: 447–453.
- MCINNIS, S., CLEMENS, S. and KERMODE, A.R. 2009. The ornamental variety, Japanese striped corn, contains high anthocyanin levels and PAL specific activity: establishing the potential for development of an oral therapeutic. *Plant Cell Reports*, 28: 503–515.
- MEI, J., LIU, G., HUANG, X. and DING, W. 2016. Effects of ozone treatment on medium hard wheat (*Triticum aestivum* L.) flour quality and performance in steamed bread making. *Journal of Food*, 14 (3): 449–456.
- MINEKUS, M. et al. 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Function*, 5: 1113–1124.
- MOHSEN, S.M., YASEEN, A.A., AMMAR, A.M. and MOHAMMAD, A.A. 2010. Quality characteristics improvement of low-phenylalanine toast bread. *International Journal of Food Science and Technology*, 45: 2042–205.
- NEY, D.M., GLEASON, S.T., VAN CALCAR, S.C., MACLEOD, E.L., NELSON, K.L., ETZEL, M.R., RICE, G.M. and WOLFF, J.A. 2009. Nutritional management of PKU with glycomacropeptide from cheese whey. *Journal of Inherited Metabolism Disease*, 32 (1): 32–39.
- NEY, D.M., STROUP, B.M., CLAYTON, M.K., MURALI, S.G., RICE, G.M., ROHR, F. and LEVY, H.L. 2016. Glycomacropeptide for nutritional management of phenylketonuria: a randomized, controlled, crossover trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 104: 334–345.
- NEY, D.M. and ETZEL, M.R. 2017. Designing medical foods for inherited metabolic disorders: why intact protein is superior to amino acids. *Current Opinion in Biotechnology*, 44: 39–45.
- NYHAN, W.L., BARSHOP, B.A. and OZAND, P.T. 2005. Atlas of Metabolic Diseases Second Edition. CRC Press, pp. 127–136, USA.

- OLIVEIRA, L.C., SCHMIELE, M. and STEEL, C.J. 2017. Development of whole grain wheat flour extruded cereal and process impacts on color, expansion, and dry and bowl-life texture. *LWT - Food Science and Technology*, 75: 261-270.
- ÖZER, I. 2004. Fenilketonüri Örneğinde Doğumsal Metabolik Hastalıklarda Genel Tedavi Yaklaşımı. *Klinik Pediatri*, 3 (1): 26-30.
- ÖZER, E.A., İBANOĞLU, Ş. ve İBANOĞLU, E. 2008. Fenilketonüri Hastalığı ve Fenilalanin Kısıtlı Diyet. Türkiye 10. Gıda Kongresi, ss. 1139-1140, 21-23 Mayıs, Erciyes Üniversitesi, Erzurum.
- ÖZTÜRK, Y. 2008. Doğumsal Metabolik Hastalıklarda Beslenme. http://yesimozturk.com/PDF/YesimOzturk_MetabolikHastaliklardaBeslenme2008.pdf. [Son erişim tarihi: 17.09.2015]
- ÖZUĞUR, G. ve HAYTA, M. 2011. Tahıl Esaslı Glutensiz Ürünlerin Besinsel ve Teknolojik Özelliklerinin İyileştirilmesi. *Gıda*, 36 (5): 287-294.
- PAUCAR-MENACHO, L.M., MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C., DUEÑAS, M., FRIAS, J. and PEÑAS, E. 2017. Optimization of germination time and temperature to maximize the content of bioactive compounds and the antioxidant activity of purple corn (*Zea mays* L.) by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 76: 236-244.
- PIMENTEL, F., ALVES, R.C., COSTA, A.S.G., TORRES, D., ALMEIDA, M.F., BEATRIZ, M. and OLIVEIRA, P.P. 2014. Phenylketonuria: Protein content and amino acids profile of dishes for phenylketonuric patients. The relevance of phenylalanine. *Food Chemistry*, 149: 144–150.
- PICARIELLO, G., MIRALLES, B., MAMONE, G., SÁNCHEZ-RIVERA, L., RECIO, I., ADDEO, F. and FERRANTI, P. 2015. Role of intestinal brush border peptidases in the simulated digestion of milk proteins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59: 948–956.
- PROTONOTARIOU, S., DRAKOS, A., EVAGELIOU, V., RITZOULIS, C. and MANDALA, I. 2014. Sieving fractionation and jet mill micronization affect the functional properties of wheat flour. *Journal of Food Engineering*, 134: 24–29.
- PROTONOTARIOU, S., BATZAKI, C., YANNIOTIS, S. and MANDALA, I. 2016. Effect of jet milled whole wheat flour in biscuits properties. *LWT - Food Science and Technology*, 74: 106-113.
- REICHERT, A.I., HE, X.Z. and DIXON, R.A. 2009. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from tobacco (*Nicotiana tabacum*): characterization of the four tobacco PAL genes and active heterotetrameric enzymes. *Biochemistry Journal*, 424: 233–242.
- ROHR, F., WESSEL, A., BROWN, M., CHARETTE, K. and LEVY, H.L. 2015. Adherence to tetrahydrobiopterin therapy in patients with phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, 114: 25–28.

- ROMANO, A., GIOSAFATTO, C.V.L., DI PIERRO, P., ROMANO, R., MASI, P. and MARINIELLO, L. 2016. Impact of transglutaminase treatment on properties and in vitro digestibility of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour. *Food Research International*, 88: 239–246.
- SARIBOĞA, B. 2008. Fenilketonüri (PKU) Teşhisinde Potansiyometrik Biyosensörler Geliştirilmesi. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 112 s.
- SARKISSIAN, C. and GÁMEZ, A. 2005. Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now?. *Molecular Genetics and Metabolism*, 86: 22–26.
- SEÇKİN, Y. ve ERTURAN, N. 1999. Fenilketonüri Çocukların Ailelerinde Teşhis-Tedavi Sürecinde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler ve Bu Değişiklikleri Etkileyen Faktörler. *M.Ü. Atatürk Eğitim Fakültesi Eğitim Bilimleri Dergisi*, 11: 285-300.
- SHARMA, S., SAXENA, D.C. and RIAR, C.S. 2016. Nutritional, sensory and in-vitro antioxidant characteristics of gluten free cookies prepared from flour blends of minor millets. *Journal of Cereal Science*, 72: 153-161.
- SHI, L., Lİ, W., SUN, J., QIU, Y., WEI, X., LUAN, G., HU, Y. and TATSUMI, E. 2016. Grinding of maize: The effects of fine grinding on compositional, functional and physicochemical properties of maize flour. *Journal of Cereal Science*, 68: 25-30.
- SILVA, M.C., CARVALHO, C.W.P. and ANDRADE, C.T. 2009. The effects of water and sucrose contents on the physicochemical properties of non-directly expanded rice flour extrudates. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29 (3): 661-666.
- SILVESTRE, M.P.C., LOPES, C.O., SILVA, M.R., SILVA, V.D.M., AGUIAR, M.J.B. and AMORIN, L.L. 2011. Study of Brazilian Beans: Protein Extraction and Hydrolysis Followed by Phenylalanine Removal. *American Journal of Food Technology*, 6 (10): 893-903.
- SOLTANIZADEH, N. and MIRMOGHTADAIE, L. 2014. Strategies Used in Production of Phenylalanine-Free Foods for PKU Management. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13: 287-299.
- SÖNMEZ, G. 2008. Fenilketonüri nedir? *TEB Haberler, İnsan Sağlığı ve Hastalıklar Dergisi*, 3.
- SRICHANUN, M., TANTIKITTI, C., KORTNER, T.M., KROGDAHL, Å. and CHOTIKACHINDA, R. 2014. Effects of different protein hydrolysate products and levels on growth, survival rate and digestive capacity in Asian seabass (*Lates calcarifer* Bloch) larvae. *Aquaculture*, 428–429: 195–202.
- STRISCIUGLIO, P. and CONCOLINO, D. 2014. New Strategies for the Treatment of Phenylketonuria (PKU). *Metabolites*, 4: 1007-1017.
- SÜZER, S. 2003. Mısır Tarımı. Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Edirne, 10 s.

- ŞİRİN, S., BABAOĞLU-AYDAŞ, S. and ASLIM, B. 2016. Biochemical Evaluation of Phenylalanine Ammonia Lyase from Endemic Plant *Cyathobasis fruticulosa* (Bunge) Aellen for the Dietary Treatment of Phenylketonuria. *Food Technology and Biotechnology*, 54 (3): 296–303.
- TANSEK, M.Z., GROSELJ, U., KELVISAR, M., KOBE, H., LAMPRET, B.R. and BATTELINO, T. 2016. Long-term BH4 (sapropterin) treatment of children with hyperphenylalaninemia – effect on median Phe/Tyr ratios. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, 29 (5): 561-566.
- TANZER, F. 2007. Maternal Fenilketonüri Sendromu. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 29 (4): 179-184.
- THARISE, N., JULIANTI, E. and NURMINAH, M. 2014. Evaluation of physico-chemical and functional properties of composite flour from cassava, rice, potato, soybean and xanthan gum as alternative of wheat flour. *International Food Research Journal*, 21 (4): 1641-1649.
- TRUNZO, R. et al. 2015. Phenylalanine hydroxylase deficiency in south Italy: Genotype–phenotype correlations, identification of a novel mutant PAH allele and prediction of BH4 responsiveness. *Clinica Chimica Acta*, 450: 51–55.
- TURKI, A., MURTHY, G., UEDA, K., CHENG, B., GIEZEN, A., STOCKLER-IPSIROGLU, S. and ELANGO, R. 2015. Minimally invasive 13C-breath test to examine phenylalanine metabolism in children with phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, 115: 78–83.
- TÜRK GIDA KODEKSİ. 2013. Buğday Unu Tebliği. Tebliğ No: 2013/9.
- TÜRKOMP. 2015. Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı. <http://www.turkomp.gov.tr/compare>. [Son erişim tarihi: 10.07.2015]
- USKUN, E. 2001. Akriba Evlilikleri. <http://www.ttb.org.tr/sted/sted0201/4.html>. [Son erişim tarihi: 17.08.2015]
- ÜSTÜNER TOP, F. ve KÜÇÜK ALEMDAR, D. 2015. Fenilketonürlü Çocuğu Olan Ailelerinin Yaşadıkları Güçlükler: Niteliksel Bir Çalışma. *Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Dergisi*, 12 (1): 62-68.
- VAN VLIET, D., BRUINENBERG, V.M., MAZZOLA, P.N., VAN FAASSEN, M.H.J.R., BLAAUW, P., KEMA, I.P., HEINER-FOKKEMA, M.R., VAN ANHOLT, R., VAN DER ZEE, E.A. and VAN SPRONSEN, F.J. 2015. Large Neutral Amino Acid Supplementation Exerts Its Effect through Three Synergistic Mechanisms: Proof of Principle in Phenylketonuria Mice. *Plos One*, 10 (12): e0143833.
- VAN SPRONSEN, F.J. and DERKS, T.G.J. 2014. Recombinant phenylalanine ammonia lyase in phenylketonuria. *The Lancet*, 384 (9937): 6-8.

- VERDUCI, E., BANDERALI, G., MORETTI, F., LASSANDRO, C., CEFALO, G., RADAELLI, G., SALVATICI, E. and GIOVANNINI, M. 2016. Diet in children with phenylketonuria and risk of cardiovascular disease: A narrative overview. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 26: 171-177.
- WAISBREN, S.E., ROHR, F., ANASTASOAI, V., BROWN, M., HARRIS, D., OZONOFF, A., PETRIDES, S., WESSEL, A. and LEVY, H.L. 2015. Maternal Phenylketonuria: Long-term Outcomes in Offspring and Post-pregnancy Maternal Characteristics. *JIMD Reports*, 21: 23-33.
- YAĞDI, K. 2004. Bursa Koşullarında Geliştirilen Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Hatlarının Bazı Kalite Özelliklerinin Araştırılması. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18 (1): 11-23.
- YAKICI, T. ve ARICI, M. 2006. Portakal aromalı içeceklerde sıcaklık, pH ve depolama süresinin aspartam stabilitesi üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Edirne, 72 s.
- YAZGAN, U. 2003. Fenilketonüri. *Eczacı Dergisi*, 4: 25.
- ZAKI, O.K., EL-WAKEEL, L., EBEID, Y., EZ ELARAB, H.S., MOUSTAFA, A., ABDULAZIM, N., KARARA, H. and ELGHAWABY, A. 2016. The Use of Glycomacropeptide in Dietary Management of Phenylketonuria. *Journal of Nutrition and Metabolism*, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2453027>.
- ZANG, Y., JIANG, T., CONG, Y., ZHENG, Z. and OUYANG, J. 2015. Molecular Characterization of a Recombinant *Zea mays* Phenylalanine Ammonia-Lyase (ZmPAL2) and Its Application in *trans*-Cinnamic Acid Production from L-Phenylalanine. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 176: 924-937.

ÖZGEÇMİŞ



Özlem KILIÇ BÜYÜKKURT 1991 yılında Kastamonu'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Antalya'da tamamladı. 2009 yılında girdiği Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden 2013 yılında mezun oldu. 2015 yılının Ocak ayında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda başladığı yüksek lisans öğrenimini Temmuz 2017 yılında tamamladı. Nisan 2017'den beri Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Kadirli Uygulamalı Bilimler Yüksekokulunda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.