

Fenilketonüri Hastaları İçin Maviyemiş (*Vaccinium corymbosum L.*) İçeren Toz Puding Karışımı Üretimi

Nilüfer Ergül, Sibel Karakaya ✉

Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bornova, İzmir

Geliş Tarihi (Received): 11.04.2013, Kabul Tarihi (Accepted): 10.06.2013

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): sibel.karakaya@ege.edu.tr (S. Karakaya)

☎ 0 232 311 30 12 📠 0 232 342 75 92

ÖZET

Bu çalışmada, fenilketonüri hastaları için kazeinomakropeptit (KMP) ve kurutulmuş maviyemiş (*Vaccinium corymbosum L.*) içeren toz puding karışımı geliştirilmiştir. Bu amaçla, amino asit diziliminde fenilalanin (Phe) bulunmayan kazeinomakropeptit (KMP), peynir altı suyundan izole edilerek protein kaynağı olarak kullanılmıştır. Elde edilen liyofilize izolattaki KMP oranı 57.56 ± 0.18 olarak bulunmuştur. KMP verimi ise 71.22 ± 0.21 olarak hesaplanmıştır. Farklı oranlarda (%10, 12 veya 15) KMP izolatu ve kurutulmuş maviyemiş (%10 veya 15) içeren altı farklı toz puding karışımından duyuşal özellikler ve viskozite açısından en uygun formülasyonun %15 KMP izolatu ve %15 kurutulmuş maviyemiş içeren puding olduğu belirlenmiştir. Toz karışım ve pişmiş pudingin Phe ve tirozin (Tyr) içerikleri sırasıyla 134.05 mg Phe/100 g, 478.73 mg Tyr/100 g ve 32.39 mg Phe/100 g, 106.41 mg Tyr/ 100 g olarak saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kazeinomakropeptit (KMP), Fenilalanin, Tirozin, Peynir altı suyu

Production of Pudding Mix Containing Dried Blueberries (*Vaccinium corymbosum L.*) for Phenylketonuria Patients

ABSTRACT

In this study, pudding mix containing dried blueberry (*Vaccinium corymbosum L.*) and caseinomacropeptide (CMP) was developed for phenylketonuria patients. CMP, having no phenylalanine (Phe) in its amino acid sequence, was isolated from sweet whey as a protein source. The percentage of CMP in the lyophilized isolate was $57.56 \pm 0.18\%$. The yield of CMP was $71.22 \pm 0.21\%$. Six different pudding mixes were prepared by the addition of different proportions of CMP isolate (10, 12 or 15%) and different amounts of dried blueberries (10 or 15%). The formulation containing 15% CMP isolate and 15% dried blueberries was chosen as the best formulation according to the results of sensory evaluation and viscosity analysis. Phenylalanine and tyrosine (Tyr) contents of pudding mix and cooked pudding were 134.05 mg Phe/100 g, 478.73 mg Tyr/100 g and 32.39 mg Phe/100 g, 106.41 mg Tyr/ 100 g, respectively.

Key Words: Caseinomacropeptide (CMP), Phenylalanine, Tyrosine, Whey

GİRİŞ

Fenilketonüri (PKU), fenilalanin metabolizmasında yer alan fenilalanin hidroksilaz enzimini kodlayan gendeki mutasyon nedeni ile oluşan kalıtsal bir protein

metabolizması bozukluğudur [1, 2]. Bu enzim fenilalaninin tirozine dönüştürülmesi için gereklidir ve memeli dokularında fenilalaninin parçalanması için kullanılmaktadır [3]. Fenilalanin hidroksilaz enziminin eksikliği sonucunda fenilalanin ve onun

transaminasyonu ile oluşan metabolitleri (fenil pirüvik asit, fenillaktik asit, fenilasetik asit) hastanın kan, idrar, diğer vücut sıvıları ve beyinde birikerek bebek ve çocuklarda beyin fonksiyonlarında ciddi derecede hasara neden olmaktadır [2, 4]. Bu hasarları önlemek için fenilketonüri hastaları, yaşam boyu fenilalanince kısıtlı bir diyet tüketmek zorundadır. Her hastanın durumuna göre günlük tüketebileceği fenilalanin miktarı belirlidir ve diyet bu miktara göre planlanmaktadır [1]. Diyetle et, balık, süt ve süt ürünleri, kuruyemiş, baklagiller gibi yüksek proteinli gıdalara yer verilmemekte ve fenilalanin içeriği düşük olan sebze ve meyvelerin kontrollü tüketimi önerilmektedir [1, 2, 5]. Günlük alınması izin verilen maksimum fenilalanin miktarı hastanın durumuna, yaşına ve kilosuna göre değişmektedir [1]. Kandaki fenilalanin miktarına göre PKU: klasik PKU (kandaki Phe > 1200 µmol/L), orta derecede PKU (kandaki Phe 900–1200 µmol/L), hafif PKU (kandaki Phe 600–900 µmol/L) ve hafif hiperfenilalaninemi (kandaki Phe 120–599 µmol/L) olarak gruplandırılmaktadır [2, 6, 7]. Klasik PKU hastaları, günde yaklaşık 500 mg fenilalanini (normal bir diyetteki miktarın yaklaşık % 10'u) tolere edebilmektedirler [8]. 19 yaşından büyük yetişkinlerde tolere edilebilen üst sınır; bayanlar için 220-770 mg fenilalanin/gün, erkekler için ise 290-1200 mg fenilalanin/gün aralığında değişmektedir [9]. Çocuklarda ise bu sınır 200-400 mg fenilalanin/gün aralığında değişmektedir [10].

Ülkemiz, 3000-4500 yeni doğanda bir olmak üzere PKU'nun dünyada en sık görüldüğü ülkelerdendir (Türkiye'de ~25000 kişi). Ülkemizde her yıl ortalama 300-400 yeni PKU'lu bebek doğmaktadır [11]. Ürünlerin çoğunun ithal edilmesi hem ailelere hem de devlete mali bir yük getirmektedir. Sosyal Güvenlik Kurumu, PKU hastaları için özel formüllü un ve özel formül içeren mamul ürünlerden (makarna, şehriye, bisküvi, pirinç, yumurta ikamesi, gofret vb.) yaşa bağlı olarak aylık 31-80 TL arasında değişen tutarı karşılamaktadır [12].

Kazeinomakropeptit (KMP) diğer adlarıyla glikomakropeptit (GMP) [13, 14], κ-kazeinoglikopeptit (CGP) [15, 16], kazein glikomakropeptit [17] κ-kazeinin C-terminalindeki 64 amino asitten (κ-Casein f(106–169)) oluşmaktadır [18, 19]. Alfa-laktalbumin ve beta-laktoglobulinden sonra serum proteinleri içinde en fazla bulunan proteindir [20]. Peynir üretimi sırasında rennin enziminin κ-kazeinin Phe 105 - Met 106 zinciri arasında etki etmesiyle açığa çıkmaktadır [21]. KMP, peynir altı suyu proteinlerinin yaklaşık olarak %15-25'ini oluşturan bir proteindir. Peynir altı suyunda konsantrasyonu 1.2-1.5 g/L arasında değişmektedir [17, 20, 22, 23].

GMP, sialik asit, galaktoz, galaktozamin içeriği nedeniyle KMP'nin glikozillenmiş formudur [24]. Molekül ağırlığı glikozilasyon derecesine bağlı olarak 6 – 9 kDa arasında değişmektedir [22]. KMP, fosforillenme ve glikozillenme gibi modifikasyonlar ve genetik varyasyonlar nedeniyle heterojen yapıya sahiptir. Mevcut iki fraksiyonu a) glikozilat ve fosforilat (fosforlanmış) yani gliko-KMP (gKMP) veya GMP (% 50'sini oluşturur) ve b) şeker molekülü içermeyen (aglikon) form yani agliko-KMP (aKMP) veya non-GMP

(nGMP)'dir [14, 25]. Başlıca karbonhidratları; sialik asit (N-asetilneuraminik asit, NANA, NeuAc), galaktoz (Gal) ve N-asetilgalaktozamindir (GalNAc)'dir [20, 25]. Dallanmış zincirli amino asitler izolösin ve valin bakımından zengindir, ancak aromatik amino asitler olan fenilalanin, triptofan ve tirozin ile arginin, sistein ve histidin içermez [17, 19, 20, 24]. Aminoasit diziliminde fenilalanin bulunmadığı için fenilketonüri hastalarının diyetinde yer alabilmektedir [8, 20, 21, 23].

Bu çalışmada, gıda çeşitliliğindeki kısıt nedeniyle fenilketonüri hastalarının diyetlerine, yeni bir çeşidin eklenmesi ve protein gereksinimlerinin kısmen karşılanması amacıyla KMP içeren fenilalanini düşük meyvelli toz puding karışımının geliştirilmesi hedeflenmiştir.

MATERYAL ve METOT

Materyaller

Çalışmada kullanılan tatlı peynir altı suyu ve histidin, lösin, metiyonin, tirozin, triptofan amino asitleri Pınar Süt Mamülleri Sanayi A.Ş.'den, taze maviyemiş meyvesi (*Vaccinium corymbosum* L.) GİFİMEY - Giresun Fide, Fidan, Maviyemiş Meyvecilik ve Orman Ürünleri Ltd. Şti'nden, yabanmersini aroması ve pancar kökü kırmızısı Dr. Oetker Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş.'den, sitrik asit Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden temin edilmiştir. Toz şeker, mısır nişastası, sodyum klorür (tuz) İzmir'deki bir hipermarketten satın alınmıştır. Standart olarak kullanılan KMP, DAVISCO Food International, Inc. (LeSueur, MN, ABD) şirketinden satın alınmıştır. Fenilalanin standardı (91331), Fluka'dan, tirozin standardı (93829), trifloraasetik asit (T6508), sodyum hidroksit (06203), hidroklorik asit (07102), ethanol (32221), asetonitril (HPLC-34851), Sigma-Aldrich firmasından, orto-fosforik asit (100563), potasyum dihidrojen fosfat (104873) Merck'ten satın alınmıştır. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden temin edilmiştir.

KMP İzolasyonu

KMP izolasyonunda Martin-Diana et al. [26] tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. KMP'nin ısı stabilitesinin yüksek olmasından yararlanarak, 1 N HCl ile pH'sı 5.2'ye ayarlanan peynir altı suyuna, 90-95°C'de 60 dakika ısı işlem uygulanmıştır. Daha sonra çöken serum proteinlerini (α-laktalbumin, β-laktoglobulin vd.) uzaklaştırmak için santrifüj işlemi (10000 x g, 4°C, 20 dakika) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sıvı kısım (KMP içeren kısım), ultrafiltrasyonla (MASD 10 kDa, 50°C - Sartocoon Slice Ultrafiltration System, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Germany) konsantre edilmiştir. Ultrafiltrasyon sonucu elde edilen retentatın hacmi saf su ile artırılmış, böylece kalan laktöz ve tuzlar diafiltrasyonla uzaklaştırılmıştır. İzole edilen KMP'yi içeren retentat, dondurarak kurutulduktan (-45°C, 0.045 bar - Labconco 2.5 FreeZone, USA) sonra analizlere kadar - 20°C'de depolanmıştır.

Protein Fraksiyonu Analizi

Başlangıç peynir altı suyu, elde edilen sıvı kısım, süzüntü, retentat ve liyofilize KMP izolatının protein fraksiyonu analizinde Zıt Faz Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC-Hewlett-Packard (HP) Agilent 1200 Series HPLC) kullanılmıştır. Protein fraksiyonu analizi, Ferreira and Oliveira [27] tarafından önerilen yonteme göre gerçekleştirilmiştir. Analizde UV dedektör ve polistirendivinilbenzen kolon (PLRP-S, 8 µm, 300Å, 250 mm*4.6 mm) kullanılmıştır. KMP ve diğer peynir altı suyu proteinleri, 214 nm dalga boyunda, 1 mL/min akış hızında, 40°C sıcaklıkta ve iki mobil faz kullanılarak saptanmıştır. Mobil faz A %0.1 (v/v) Trifluoroasetik asit (TFA) çözeltisi (su ile hazırlanmış) ve mobil faz B %0.09 (v/v) Trifluoroasetik asit (TFA) (asetonitril (80):su (20)) içermektedir. Analizde dereceli elüsyon programına göre çalışılmış olup enjeksiyon sonrası şu sıra takip edilmiştir: 0. dak. %80 mobil faz A; 1–6. dakika %20–40 B; 6–16. dakika %40–45 B; 16–19. dakika %45–50 B; 19–20. dakika %50 B; 20–23. dakika %50–70 B; 23–24. dakika %70–100 B; 25. dakika %100 B; 27–30. dakika %20 B. Elde edilen izolattaki KMP miktarı, HPLC'de saptanan protein fraksiyonu kromatogramındaki KMP piklerinin kalibrasyon grafiği eşitliği (1. denklem) yardımıyla hesaplanan kantitatif değeridir. KMP kalibrasyon grafiği, suda çözülen farklı konsantrasyonlardaki (0.6 mg/mL-10 mg/mL) standart KMP ile çizilmiştir. Enjeksiyon hacmi ve enjeksiyon için hazırlanan konsantrasyon dikkate alınarak, liyofilize izolattaki KMP miktarı (saflık) ve izolatın toplam proteinindeki KMP oranı hesaplanmıştır.

$$y = 401521.005x + 203.2558, \quad (1)$$

$$R^2 = 0.9995,$$

$$y = \text{pik alanı (mAU * s)},$$

$$x = \text{KMP konsantrasyonu (mg)}.$$

Peynir altı suyundaki KMP'nin verimi ise, izolasyonda kullanılan peynir altı suyunun toplam hacmi dikkate alınarak, başlangıçta peynir altı suyunda bulunan KMP miktarı baz alınarak hesaplanmıştır.

Su Tutma Kapasitesi (STK)

KMP izolatına uygulanan su tutma kapasitesi analizi için, 5 g örnek (M_2) 25 mL distile su ile önceden darası alınmış (M_1) 50 mL'lik santrifüj tüpleri içerisinde çözülmüş ve 5 dakika süresince her 30 saniyede bir 5 saniye ara verilerek vortekste karıştırılmıştır. Ardından tüpler 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve 2350 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüplerin üzerinde biriken sıvı alınıp tüp yeniden tartılmıştır (M_3). Su tutma kapasitesi, bir gram örneğin absorpladığı su miktarı olarak g/g cinsinden formülle (2. denklem) hesaplanmıştır [28].

$$\text{Su tutma kapasitesi} = [M_3 - (M_1 + M_2)] / M_2 \quad (2)$$

Puding Hazırlama Aşaması

Taze maviyemiş meyvesi temin edildikten sonra küçük paketler halinde dondurulmuştur. Donmuş haldeki maviyemişlerin boyutları, liyofilizatöre (HETOSICC Heto

Lab Equipment, Danimarka) alınmadan önce gözündürmeden küçültülmüş ve vakum altında (0.025 torr) $-42 \pm 3^\circ\text{C}$ 'de kurutulmuştur. Kurutulan maviyemişler toz puding karışımına eklenmek üzere öğütülmüş ve analizlere kadar -20°C 'de depolanmıştır.

Yüzde10, 12 veya 15 oranında liyofilize KMP izolatı ile %10 veya 15 oranında kurutulmuş maviyemiş içeren altı farklı toz puding karışımı hazırlanmıştır. Toz puding karışımlarına şeker, mısır nişastası, sitrik asit (%1), tuz (%0.39), yaban mersini aroması (%0.11), pancar kökü kırmızısı (%0.36), histidin (%0.20), lösin (%0.70), metiyonin (%0.09), tirozin (%0.68), triptofan (%0.09) eklenmiştir. Bu toz karışımlar (56 g), içme niteliğindeki 250 mL soğuk su ilavesiyle ev tipi ısıtıcı sürekli karıştırılarak $80-85^\circ\text{C}$ 'de pişirilmiştir. Puding kaplarına alınan örnekler önce 30 dakika oda koşullarında soğutulmuş, sonra 60 dakika süresince buzdolabında $4-5^\circ\text{C}$ 'de bekletilmiştir.

Fenilalanin ve Tirozin Analizi

Fenilalanin ve tirozin analizi Andrensek ve ark. [29] yöntemi modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Fenilalanin ve tirozin miktarını belirlemek için öncelikle örneğin bileşimindeki proteinin asidik ortamda amino asitlerine hidrolizi gerçekleştirilmiş, daha sonra elde edilen hidrolizattaki fenilalanin ve tirozin konsantrasyonu RP-HPLC (Hewlett-Packard (HP) Agilent 1200 Series HPLC) ile saptanmıştır. Analizde floresans dedektör ve Vydac 201TP54 C18 kolon (5 µm, 25 cm*4.6 mm) kullanılmıştır. Fenilalanin ve tirozin analizi, 214 nm dalga boyunda, 1.2 mL/min akış hızında, 25°C sıcaklıkta ve fosfat tampon çözeltisi kullanılarak saptanmıştır. Mobil faz olarak 0.0125 M KH_2PO_4 (pH 3.5) kullanılmıştır. Örneklerdeki fenilalanin ve tirozin miktarlarının bulunmasında kullanılan kalibrasyon grafikleri, (3. ve 4. denklem) farklı konsantrasyonlardaki fenilalanin ve tirozin standartları (0.005–0.500 mg/mL) kullanılarak oluşturulmuştur. Fenilalanin standartları suda, tirozin standartları ise 0.1 M HCl'de hazırlanmıştır.

$$y = 70592.6515x - 18.675081, \quad (3)$$

$$R^2 = 0.9988,$$

$$y = \text{pik alanı (mAU * s)},$$

$$x = \text{fenilalanin konsantrasyonu (mg)}.$$

$$y = 230648.823x + 15.865271, \quad (4)$$

$$R^2 = 0.9997,$$

$$y = \text{pik alanı (mAU * s)},$$

$$x = \text{tirozin konsantrasyonu (mg)}.$$

Viskozite Analizi

Pişirilerek buzdolabında bekletilen pudinglerin viskozitesi oda sıcaklığında (25°C) rotasyonel viskozimetre ile ölçülmüş ve değer sabitlendiğinde okunarak kaydedilmiştir. Viskozite Brookfield DV III Reometre, 27 numaralı başlık kullanılarak 20 rpm (6.8 saniye^{-1}) ve 40 rpm (13.6 saniye^{-1}) kayma hızında belirlenmiştir.

Kimyasal Analizler

Örneklerin nem ve kül analizi gravimetrik metoda göre yapılmıştır [30]. Protein içerikleri Kjeldahl Metoduyla belirlenmiştir [30]. Protein miktarı hesaplanırken KMP izolatu için faktör 6.47 diğer örnekler için ise 6.25 kullanılmıştır.

Duyusal Analiz

Çalışmada duysal analiz iki farklı aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada farklılık testlerinden sıralama testi kullanılmıştır. %10, 12 veya 15 oranında liyofilize KMP izolatu ile %10 veya 15 oranında kurutulmuş maviyemiş meyvesi içeren altı adet toz puding karışımıyla hazırlanan pudinglere uygulanan sıralama testi karakterin (görünüş, lezzet, tercih) yoğunluğu bakımından artan bir sıra ile yapılmıştır. Bu amaçla 10 panelistle çalışılmıştır. İkinci aşamada ise sıralama testinde tercih edilen örneğin tüketici kabulünü değerlendirmek üzere tüketici tercih testlerinden beğeni derecesi (hedonik skala) testi kullanılmıştır. Hedonik skala, "çok beğendim – beğendim - orta derecede beğendim – beğenmedim - hiç beğenmedim" ifadeleri ile oluşturulmuştur. Bu amaçla 25 panelistle çalışılmıştır.

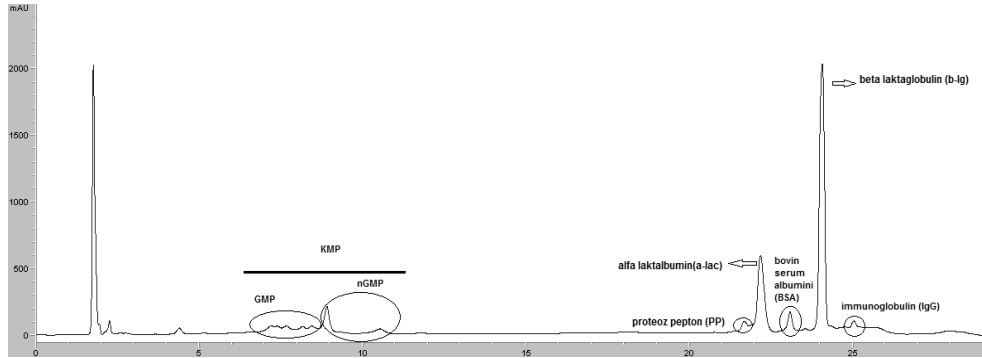
İstatistiksel Analiz

Üç tekrar olarak gerçekleştirilen duysal analizler SPSS for Windows (Version 15; SPSS Institute Inc., Chicago, IL, ABD) paket programı ile varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuş ve ortalamalar arasındaki farklılık % 95 güven aralığında Duncan testi ile değerlendirilmiştir. Fenilalanin, tirozin ve kimyasal analizlere ait sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verilmiştir.

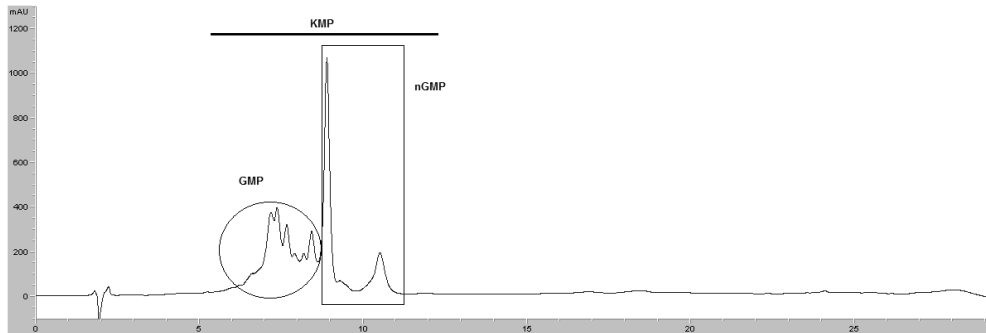
BULGULAR VE TARTIŞMA

KMP İzolasyonu ve Analizleri

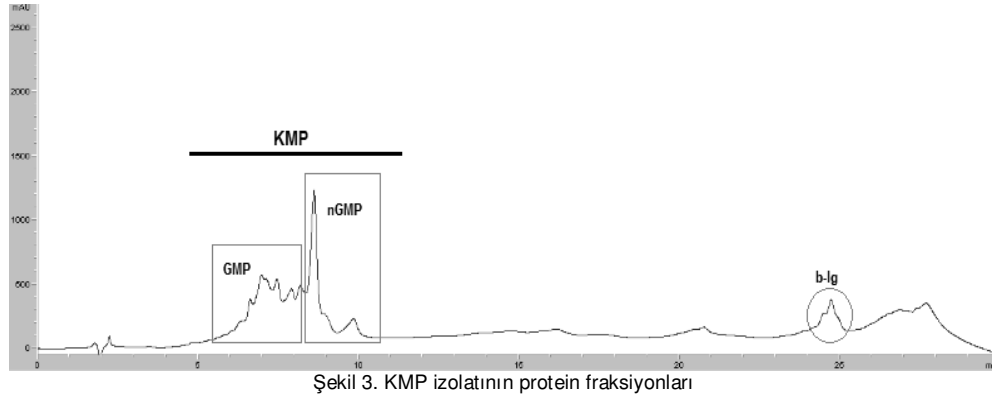
Kaşar peyniri üretiminden elde edilen tatlı peynir altı suyunun protein fraksiyonları Şekil 1'de verilmiştir. Elde edilen kromatogramdaki KMP pikleri DAVISCO Food International Şirketi'nden satın alınan ve özel gıda takviyesi olarak kullanılan KMP kromatogramı (Şekil 2) ile belirlenmiştir. Çalışmada KMP izolasyonu hedeflendiği için peynir altı suyundaki diğer protein fraksiyonları literatürde peynir altı suyu için verilen kromatogramlardaki piklerin alınma zamanları ile karşılaştırılarak belirlenmiştir [31]. Kullanılan tatlı peynir altı suyunda sırasıyla KMP (GMP ve nGMP), proteoz pepton (PP), alfa laktalbumin (α -lac), bovin serum albumini (BSA), beta-laktoglobulin (β -lg), immunoglobulin (IgG) bulunduğu belirlenmiştir.



Şekil 1. Tatlı peynir altı suyunun protein fraksiyonları



Şekil 2. Standart KMP'nin protein fraksiyonları



Şekil 3. KMP izolatının protein fraksiyonları

Şekil 3'te KMP izolatının kromatogramı görülmektedir. Elde edilen izolattaki KMP miktarı (kuru maddede %68.31) diğer izolasyon yöntemleriyle (kromatografik yöntemler gibi) elde edilen KMP miktarından (%70-80, [32]; %80-88, [33, 34]) düşük olmasına rağmen, uyguladığımız yöntemde ısı işlemin uygulanması, diğer peynir altı suyu proteinlerinin uzaklaştırılması amacıyla kimyasalların (trikloroasetik asit gibi) kullanımına gerek bırakmadığı için elde edilen KMP'nin gıda bileşeni ve farmasötik olarak kullanımı mümkün olmaktadır [26, 35]. Ayrıca ultrafiltrasyon yöntemleri basit olmasının yanı sıra elde edilen protein fraksiyonlarının özelliklerinde önemli değişimlere yol açmamaktadır. Fakat izole edilen KMP'nin saflık oranı iyon değişim kromatografisi gibi kromatografik yöntemlerle izole edilenlere göre daha düşüktür [17, 19, 20].

KMP izolatının kimyasal kompozisyonu Tablo 1'de gösterilmiştir. Hammadde olarak kullanılan tatlı peynir altı suyunun nem miktarı 93.72 ± 0.142 , protein miktarı ise 0.89 ± 0.027 (kuru maddede 14.17 ± 0.430) olarak saptanmıştır. Elde edilen izolatın protein içeriği 79.02 ± 0.82 (kuru maddede 93.78 ± 0.98) olarak bulunmuştur. Bu değer literatürde elde edilen %76.71 [35]; %82.1 [36]; %79.50 [16]; %76.80 [26] değerleriyle uyumludur.

Tablo1. KMP izolatının kimyasal kompozisyonu

| | KMP izolatı ¹ |
|------------------------------------|--------------------------|
| Nem (%) | 15.74 ± 0.09 |
| Kül (%) | 2.76 ± 0.02 |
| Protein (%) | 79.02 ± 0.82 |
| Fenilalanin (mg Phe/100 g izolat) | 330.54 ± 12.92 |
| Fenilalanin (mg Phe/g protein) | 4.19 ± 0.16 |
| PAS'daki KMP oranı (%) | 0.127 |
| PAS proteinindeki KMP oranı (%) | 14.27 |
| İzolattaki KMP oranı (%) | 57.56 ± 0.18 |
| İzolat proteinindeki KMP oranı (%) | 72.84 ± 0.23 |
| Verim (%) | 71.22 ± 0.21 |

¹Değerler ortalama \pm SD olarak verilmiştir.

KMP izolasyonunda, izolatın saflığının başarısında en önemli ölçüt izolattaki fenilalanin miktarıdır. KMP izolatının fenilalanin içeriği 330 mg Phe/100 g izolat bulunmuştur. Bu değer, standart KMP'nin fenilalanin miktarından (419 mg Phe/100 g toz; 5 mg Phe/g protein) daha düşük çıkmıştır. Aynı izolatın tirozin miktarı ise standart KMP'ye (83.80 mg Tyr/100 g toz; 1 mg Tyr/g protein) göre daha yüksek bulunmuştur. [36] yaptığı

çalışmada %2.4 (w/w) fenilalanin ve %0.6 (w/w) tirozin içeriğine sahip 180 g KMP izole etmişlerdir. [35] tarafından elde edilen izolattaki fenilalanin oranı %0.6 (w/w), tirozin oranı ise %0.3 (w/w) olmuştur. [37] yaptıkları patent çalışmasında, başlangıçtaki fenilalanin miktarının 1/3'ünü içeren KMP elde etmişlerdir. [26] ısıtma-ultrafiltrasyon yöntemiyle elde ettikleri izolatın fenilalanin içeriğinin %2.7 olduğunu ve tirozin içermediğini bildirmişlerdir.

Kullanılan tatlı peynir altı suyunun KMP konsantrasyonunun 1.27 g/L olduğu ve tatlı peynir altı suyu proteininin %14.72'sini KMP'nin oluşturduğu saptanmıştır (Tablo 1). Yapılan çalışmalar incelendiğinde tatlı peynir altı suyunun KMP konsantrasyonunun, 1.20 g/L-1.50 g/L arasında değiştiği ve tatlı peynir altı suyu proteininin %15-25 aralığında değişen KMP içerdiği belirlenmiştir [8, 17, 20, 22, 24].

Elde edilen liyofilize izolattaki ve izolatın proteinindeki KMP oranları (Tablo 1) literatürde elde edilen %82 [16]; %81-84.80 [35]; %52.22-62.80 [38]; %87.40 [26]; %70 [37] ve %78-80 [39] değerlerden daha düşük olarak belirlenmiştir. Ayrıca Chatterton et al. [16] elde ettikleri izolatta % 71.55 oranında KMP bulunduğunu ve proteininin %90 oranında KMP içerdiğini bildirmişlerdir. İzolatın KMP verimi ise 71.22 ± 0.21 olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmalar incelendiğinde KMP veriminin kullanılan izolasyon yöntemlerine bağlı olarak %18 - %69 arasında değiştiği belirlenmiştir [26, 35, 38].

KMP izolatının STK'si 0.25 ± 0.01 g su/g izolat olarak bulunmuştur. KMP iyi bir emülsiyon ajanı olmakla birlikte ticari peynir altı suyu protein konsantrasyonlarında KMP bulunmasının jel kuvveti ve su tutma kapasitesini olumsuz etkilediği belirlenmiştir. KMP protein jelinin ağısı yapısına katılmadığı için protein konsantrasyonunun su tutma kapasitesiyle yarışmaktadır [40]. KMP'ye kıyasla diğer peynir altı suyu proteinlerinin su tutma kapasiteleri daha yüksektir. 25°C'de farklı asitlik düzenleyici kullanarak hazırlanan β -Lg türevi tozların, su tutma kapasitelerinin 2.66 ± 0.08 ile 8.38 ± 0.07 g su/g protein arasında değiştiği saptanmıştır [41]. Bu değerle karşılaştırıldığında, çalışmada KMP için saptanan su bağlama kapasitesinin diğer bir peynir altı suyu olan β -lg'e oranla çok daha düşük olduğu görülmektedir.

Maviyemiş Analizleri

Kurutulmuş maviyemişin nem içeriği %5.12±0.20 olarak bulunmuştur. Protein, fenilalanin ve tirozin miktarları ise kuru madde bazında sırasıyla %5.26±0.001, 119.41±9.94 mg Phe /100 g, 89.07±4.75 mg Tyr/100 g olarak saptanmıştır. Kurutulmuş maviyemişin protein içeriği literatürde yer alan %4.9±0.9 [42] değeri ile uyumludur. Fenilalanin miktarı, literatürde [42] belirtilen değerden (kuru madde bazında 153 mg Phe/100 g) düşük olup, tirozin içeriği ise literatürde [42] belirtilen değerden (kuru madde bazında 53 mg Tyr/100 g) daha yüksektir.

Pudinglerin Viskozite Değerleri

Farklı oranlarda (%10, 12 veya 15) liyofilize KMP izolatu ile %10 veya 15 oranında kurutulmuş maviyemiş meyvesi içeren altı farklı puding örneğinin viskozite değerleri Tablo 2'de gösterilmiştir. Buna göre 20 rpm ve 40 rpm kayma hızında viskozite değeri (7900 cp ve 5600 cp) en yüksek puding, %10 KMP izolatu ve %15 kurutulmuş maviyemiş içeren pudingdir. 20 rpm ve 40 rpm kayma hızında viskozite değeri (1063 cp ve 875 cp) en düşük puding ise, % 15 KMP izolatu ve %10 kurutulmuş maviyemiş içeren puding olmuştur.

Tablo 2. Farklı oranlarda KMP izolatu ve kurutulmuş maviyemiş içeren altı farklı pudingin viskozite değerleri

| | Puding örnekleri ¹ | | | | | |
|--------------------------------------|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Kayma hızı (rpm) | 20 | 20 | 20 | 40 | 20 | 20 |
| Kayma gerilimi (D /cm ²) | 322.2 | 515.1 | 232 | 359.6 | 68.9 | 164.9 |
| Tork (%) | 37 | 65 | 27.3 | 34.4 | 8.6 | 19.6 |
| Viskozite (cp) | 4650 | 7900 | 3375 | 5575 | 1063 | 2450 |
| Kayma hızı (rpm) | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| Kayma gerilimi (D/cm ²) | 448 | 770 | 301.7 | 480 | 116.4 | 232.9 |
| Tork (%) | 52 | 90 | 35.5 | 51 | 14 | 27.8 |
| Viskozite (cp) | 3269 | 5600 | 2300 | 3800 | 875 | 1763 |

¹Pudingler: 1: %10 KMP izolatu ve %10 kurutulmuş maviyemiş, 2: %10 KMP izolatu ve %15 kurutulmuş maviyemiş, 3: %12 KMP izolatu ve %10 kurutulmuş maviyemiş, 4: %12 KMP izolatu ve %15 kurutulmuş maviyemiş, 5: %15 KMP izolatu ve %10 kurutulmuş maviyemiş, 6: %15 KMP izolatu ve %15 kurutulmuş maviyemiş.

Peynir altı suyu protein konsantrasyonunun jel oluşumu ve su tutma kapasitesine etki eden en önemli faktörlerden biri protein kompozisyonudur. Jel oluşumunda en etkin protein β-laktoglobulindir. KMP'nin jelleşme özelliğine karşın, jel oluşumu ve su tutma kapasitesi diğer serum proteinlerinden daha düşük olup, KMP içeren peynir altı suyu protein konsantrasyonunun jel oluşum kapasitesi, KMP içermeyene göre yaklaşık 3 kat daha düşük bulunmuştur [40].

National Dysphagia Diet Task Force [43], 25 °C'de ve 50 saniye⁻¹ kayma hızında, kıvamlı sıvıların viskozite değerlerini, sulu kıvamlılar için 1 - 50 cp, nektar benzeri kıvamlılar için 51 - 350 cp, bal benzeri kıvamlılar için 351-1750 cp, puding benzeri kıvamlılar için >1750 cp olarak sınıflandırmıştır. Hazırlandıktan sonra 4 °C'de saklanan su bazlı, inulin ve süt proteini içeren çilekli puding örneklerinin, 0.01-100 saniye⁻¹ arasında değişen kayma hızında, ARES deformasyon kontrollü reometre kullanılarak 25 °C'de yapılan ölçüm sonuçlarına göre, görünür viskozitesi 1.5 Pa.s (1500 cp) olarak bulunmuştur [44]. Thermo Haake RheoStress reometre kullanarak üç farklı kayma hızında (25-50-100 saniye⁻¹), yağsız süt, su ve modifiye mısır nişastası içeren vanilyalı pudingin viskozitesinin, 15 °C'de 2-12 Pa.s (2000-12000 cp) ve 30 °C'de ise 2-8 Pa.s (2000-8000 cp) arasında değiştiği saptanmıştır [45]. Süt ile hazırlanmış ve farklı miktarlarda nişasta içeren puding örneklerinin 65 °C'de RVT model Brookfield Viskozimetre ile saptanan viskozite değerlerinin, 3014.3 cp ile 22116.3 cp arasında değiştiği belirlenmiştir [46].

Çalışmada hazırlanan puding örneklerinin 40 saniye⁻¹ kayma hızında elde edilen viskoziteleri, National Dysphagia Diet Task Force [43] tarafından belirlenen sınıflandırma ölçeğine göre değerlendirildiğinde %15 KMP izolatu ve %15 kurutulmuş maviyemiş içeren örneğin puding benzeri kıvamlılar için belirtilen değere en yakın olan örnek olduğu belirlenmiştir.

Duyusal Analizler

Duyusal analizin ilk aşamasında, karakterin (görünüş, lezzet, tercih) yoğunluğu bakımından artan bir sıra ile (1:beğenmedim - 6:beğendim) yapılan sıralama testine tabi tutulan altı farklı toz puding karışımıyla hazırlanan pudinglerin sonuçları Tablo 3'te gösterilmiştir. İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında %15 KMP izolatu ve %15 kurutulmuş maviyemiş içeren puding, 5.10±1.52 ile en yüksek genel puanlamayı almıştır. Lezzet kriteri dikkate alındığında, %12 KMP izolatu ve %10 kurutulmuş maviyemiş içeren puding ile %15 KMP izolatu ve %15 kurutulmuş maviyemiş içeren puding tercih edilmiştir (*P*<0.05). Genel kabul edilebilirlik açısından karşılaştırıldığında, %12 KMP izolatu ve %10 kurutulmuş maviyemiş, %12 KMP izolatu ve %15 kurutulmuş maviyemiş ile %15 KMP izolatu ve %15 kurutulmuş maviyemiş içeren pudingler birbirlerinden farklı olmadığı belirlenmiştir. Duyusal ve viskozite analizleri dikkate alındığında %15 KMP izolatu ve %15 kurutulmuş maviyemiş içeren puding tercih edilmiştir.

Tablo 3. Farklı oranlarda KMP izolatu ve kurutulmuş maviyemiş içeren altı pudingin duyuusal değerlendirilmesi

| Pudingler | Toplam Panelist | Görünüş ² | Lezzet ² | Tercih ² |
|-----------|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | 10 | 3.20 ± 1.81 ^{ab} | 3.40 ± 1.51 ^{ab} | 3.40 ± 1.51 ^{ab} |
| 2 | 10 | 3.50 ± 1.35 ^{ab} | 2.10 ± 1.66 ^a | 2.10 ± 1.66 ^a |
| 3 | 10 | 3.10 ± 1.79 ^{ab} | 4.20 ± 0.79 ^{bc} | 4.00 ± 1.25 ^{bc} |
| 4 | 10 | 3.90 ± 1.73 ^{ab} | 3.50 ± 1.90 ^{ab} | 3.70 ± 1.70 ^{bc} |
| 5 | 10 | 2.60 ± 1.58 ^a | 2.70 ± 1.25 ^a | 2.70 ± 1.25 ^{ab} |
| 6 | 10 | 4.70 ± 1.64 ^b | 5.10 ± 1.52 ^c | 5.10 ± 1.52 ^c |

¹ Pudingler: 1: %10 KMP izolatu ve % 10 kurutulmuş maviyemiş, 2: %10 KMP izolatu ve %15 kurutulmuş maviyemiş, 3: %12 KMP izolatu ve %10 kurutulmuş maviyemiş, 4: %12 KMP izolatu ve %15 kurutulmuş maviyemiş, 5: %15 KMP izolatu ve %10 kurutulmuş maviyemiş, 6: %15 KMP izolatu ve %15 kurutulmuş maviyemiş. ² Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Aynı sütundaki farklı harfler % 95 güven aralığında istatistiksel olarak anlamlı farklılığı belirtir ($P < 0.05$).

İkinci aşamada, tercih edilen pudingin, hedonik skala kullanılarak genel beğeni için sunulduğu panelde, 5 kişi "Çok beğendim.", 9 kişi "Beğendim.", 9 kişi "Orta derecede beğendim.", 2 kişi "Az beğendim." ifadesini işaretlemişlerdir. "Hiç beğenmedim." ifadesini kullanan olmamıştır.

Pudinglerin Analizleri

Yüzde 15 KMP izolatu ve %15 kurutulmuş maviyemiş içeren pudingin hem toz karışımına hem de pişmiş örneğine uygulanan fenilalanin, tirozin ve kimyasal analizlerin sonuçları Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Yüzde 15 KMP izolatu ve % 15 kurutulmuş maviyemiş içeren toz puding karışımının ve pişmiş pudingin kompozisyonu

| | Toz puding karışımı ¹ | Pişmiş puding ¹ |
|--------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| Nem (%) | 4.09 ± 0.39 | 77.42 ± 0.15 |
| Kül (%) | 0.94 ± 0.04 | 0.15 ± 0.01 |
| Yağ (%) | ≤ 0.5 | |
| Protein (%) | 13.22 ± 0.72 | |
| Karbonhidrat (%) | 81.25 ± 0.86 | 18.37 ± 0.61 |
| Enerji (kkal/100 g) | 382.36 ± 3.12 | 91.25 ± 0.08 |
| Phe (mg Phe/100 g örnek) | 134.05 ± 2.98 | 32.39 ± 5.30 |
| Phe (mg Phe/g protein) | 10.16 ± 0.23 | 8.60 ± 1.41 |
| Tyr (mg Tyr/100 g örnek) | 478.73 ± 25.97 | ≤ 0.5 |
| Tyr (mg Tyr/g protein) | 36.21 ± 1.96 | 3.77 ± 0.91 |

¹ Değerler ortalama ±SD olarak verilmiştir.

Diyetlerinde ticari GMP içeren ürünleri (portakal/çikolata/ karamel aromalı içecekler, çilekli puding, çikolatalı puding, sos, tarçınlı çitir bar) tüketen klasik PKU hastalarının kan plazma fenilalanin oranları, 10 hafta boyunca izlenmiştir. Bu ürünlerin porsiyon (55 g ile 340 g arasında değişmektedir) başına 5-10 g protein ve 15-30 mg fenilalanin içerdikleri, çilekli pudingin ise 114 g'ında 5 g protein, 13 mg fenilalanin bulunduğu ve enerji değerinin 220 kkal olduğu belirtilmiştir. 10 hafta sonunda, PKU hastalarının kan plazmasındaki fenilalanin değerlerinde %13-14 kadar bir düşüş sağlandığı ($P < 0.05$) ve KMP içeren ürünlerin fenilketonüri hastalığının metabolik kontrolünde yardımcı olduğu bildirilmiştir [8].

GMP içeren çilekli puding, çilekli pestil, çikolata aromalı içecek, kraker, portakal aromalı enerji içeceğinin fenilketonüri hastaları tarafından duyuusal açıdan kabul edilebilirliklerinin araştırıldığı çalışmada bu ürünlerin yanı sıra ticari amino asit karışımı içeren çikolata aromalı içecek ve düşük proteinli kraker de yer almıştır. Duyusal kabulü en yüksek ürün, GMP içeren çilekli puding olmuştur. Çilekli pudingin bir porsiyonunun (113 g) enerjisi 213 kkal ve protein içeriği 5.7 g olarak saptanmış, diğer ürünlerin ise porsiyon (15 g ile 236 g

arasında değişen) başına 0.1 g ile 11.4 g arasında değişen miktarda protein içerdiği belirlenmiştir [23].

Çalışmada hazırlanan maviyemiş içeren pudingin 113 g'ı 4.26 g protein, 36.60 mg fenilalanin ve 104.2 kkal enerji içermektedir. Klasik PKU hastaları, günde yaklaşık 500 mg fenilalanini (normal bir diyetdeki miktarın yaklaşık %10'u) tolere edebilmektedirler [8]. 19 yaşından büyük yetişkinlerde tolere edilebilen üst sınır; bayanlar için 220-770 mg fenilalanin/gün, erkekler için ise 290-1200 mg fenilalanin/gün aralığında değişmektedir [9]. Çocuklarda ise bu sınır 200-400 mg fenilalanin/gün aralığında değişmektedir [10]. Elde edilen sonuçlar bu çalışmada hazırlanan pudingin enerji değeri ve besin içeriği açısından fenilketonüri hastalarının diyetinde yer alabilecek nitelikte olduğunu göstermektedir.

SONUÇ

Çalışmada elde edilen sonuçlar, KMP'nin fenilketonüri hastalarının diyetlerinde kullanılabilir alternatif protein kaynağı olduğunu göstermiştir. KMP içeren ve zorunlu amino asitlerle desteklenmiş ürünler, fenilketonüri hastalığının metabolik kontrolünde yardımcı olabilecek niteliktedir. Ek olarak KMP içeren ürünlerin

lezzetli ve kabul edilebilir olduğu duysal analiz sonuçlarıyla ortaya konmuştur. Ayrıca KMP'nin, tatlı peynir altı suyundan izole edilmesi, yan ürün veya atık olarak kabul edilen peynir altı suyuna ek bir katma değer sağlamaktadır. Sonuç olarak, bu çalışmanın fenilketonüri hastalarına yönelik yeni ürünlerin oluşturulması ile KMP izolasyonuna yönelik çalışmalara katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu projenin gerçekleştirilmesi için gerekli maddi desteği sağlayan TÜBİTAK Tarım, Ormanlık ve Veterinerlik Araştırma Destek Grubu (TOVAG)'na teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- [1] Seçkin, Y., 2007. Fenilketonürlü çocukların psiko-pedagojik sorunları ve çözümleri. *IX. Uluslararası Katılımlı Beslenme ve Metabolizma Kongresi*, İstanbul, 39-43.
- [2] Waisbren, S.S., Noel, K., Fahrbach, K., Cella, C., Frame, D., Dorenbaum, A., Levy, H., 2007. Phenylalanine blood levels and clinical outcomes in phenylketonuria: a systematic literature review and meta analysis. *Molecular Genetics and Metabolism* 92: 63-70.
- [3] Linder, M.C., 1991. Nutrition and Metabolism of Proteins, In *Nutritional Biochemistry and Metabolism*, M.C., 2nd ed., Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut., 105p.
- [4] National Institutes of Health (NIH), 2000. Phenylketonuria (PKU): Screening and Management. NIH Consensus Statement, 17, 1–33p.
- [5] Özer, E.A., Banoğlu, Ş., Banoğlu, E., 2008. Fenilketonüri hastalığı ve fenilalanin kısıtlı diyet. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, Erzurum, 1139.
- [6] Proņina, N., Lugovska, R., 2011. Association between minihaplotypes and mutations at the phenylalanine hydroxylase locus in Latvian phenylketonuria patients. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*, Section B 65 (3/4): 73–79.
- [7] Williams, R.A., Mamotte, C.D.S., Burnett, J.R., 2008. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism *Clin. Biochem.* 29: 31–41.
- [8] Ney, D.M., Gleason, S.T., Calcar, S.C., MacLeod, E.L., Nelson, K.L., Etzel M.R., Rice, G.M., Wolff, J.A., 2009. Nutritional management of PKU with glycomacropeptide from cheese whey. *Journal Inheret Metabolic Disease* 32: 32–39.
- [9] Acosta, P., Yanicelli, S., 2001. The Ross metabolic formula system nutrition support protocols, 4th ed., Columbus, Ohio: Ross Laboratories, Ross Product Division, 1-32.
- [10] Weetch, E., MacDonald, A., 2006. The determination of phenylalanine content of foods suitable for phenylketonuria. *J. Hum Nutr Dietetic.* 19:229–236.
- [11] Altunsu, T., 2007, Ulusal yenidoğan tarama programı, *IX. Uluslararası Katılımlı Beslenme ve Metabolizma Kongresi*, İstanbul, 123-125.
- [12] http://www.pkuvesiz.com/mevzuat_ve_uygulamalar.asp (Erişim Tarihi: 30.03.2013).
- [13] Tullio, L.T., Karkle, E.N.L., Cândido, L.M. B., 2007. Review: isolation and purification of milk whey glycomacropeptide. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos* 25: 121-132.
- [14] Yetişemeyen, A., Yıldız, F., 2008. Süt teknolojisinde kazeinomakropeptidlerin önemi ve elde edilmesi, *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, Erzurum, 83-86.
- [15] Saito, T., Itoh, T., 1992. Variations and distributions of oligosidically linked sugar chains in bovine k-casein A. *Journal of Dairy Science* 75: 1768–1774.
- [16] Chatterton, D.E.W., Holst, H.H., 2002. *Process for preparing a kappa-caseino glycomacropeptide or a derivative thereof*. European Patent 1037537.
- [17] Abd El-Salam, M.H., 2006. Separation of casein glycomacropeptide from whey: methods of potential industrial application. *International Journal of Dairy Science* 1(1): 93-99.
- [18] Kim, Y.J., Park, S., Oh, Y.K., Kang, W., Kim, H.S., Lee, E.Y., 2005. Purification and characterization of human caseinomacrapeptide produced by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expression and Purification* 41: 441-446.
- [19] Tolkach, A., Kulozik, U., 2005. Fractionation of whey proteins and caseinomacropeptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques. *Journal of Food Engineering* 67: 13-20.
- [20] Thoma-Worringer, C., Sorensen, J., Lopez-Fandino, R., 2006. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *International Dairy Journal* 16: 1324-1333.
- [21] Molle, D., Leonil, J., 2005. Quantitative determination of bovine k-casein macropeptide in dairy products by LC/ESI/MS and LC/ESI/MS/MS. *International Dairy Journal* 15: 419-428.
- [22] Manso, M.A., López-Fandiño, R., 2004. κ-Casein macropeptides from cheese whey: physicochemical, biological, nutritional, and technological features for possible uses. *Food Reviews International* 20(4): 329–355.
- [23] Lim, K., Calcar, S.C., Nelson, K.L., Gleason, S.T., Ney, D.M., 2007. Acceptable low-phenylalanine foods and beverages can be made with glycomacropeptide from cheese whey for individuals with PKU. *Molecular Genetics and Metabolism* 92: 176–178.
- [24] LaClair, C.E., Ney, D.M., Macleod, E.L., Etzel, M.R., 2009. Purification and use of glycomacropeptide for nutritional management of phenylketonuria, *Journal of Food Science* 74(4): E199-E206.
- [25] Brody, E.P., 2000. Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition* 84(1): S39-S46.
- [26] Martin-Diana, A.B., Fraga, M.J., Fontecha, J., 2002. Isolation and characterisation of caseinomacropeptide from bovine, ovine, and caprine cheese whey. *European Food Research and Technology* 214: 282–286.

- [27] Ferreira, Isabel, M.P.L.V.O., Oliveira, M.B.P.P., 2003. Determination of caseinomacropeptide by an RP-HPLC method and monitoring of the addition of rennet whey to powdered milk. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 26(1): 99–107.
- [28] Esposito, F., Arlotti, G., Bonifati, A.M., Napolitano, A., Vitale, D., Fogliano, V., 2005. Antioxidant activity and dietary fibre in durum wheat bran by-products. *Food Research International* 38: 1167-1173.
- [29] Andresek, S., Golc-Wondra, A., Prosek, M., 2003. Determination of phenylalanine and tyrosine by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International* 86(4): 753-757.
- [30] AOAC, 1995. Official Methods of Analysis of the Association Agricultural Chemists Washington, DC.
- [31] Elgar, D.F., Norris, C.S., Ayers, J. S., Pritchard, M., Otter, D.E., Palmano, K.P., 2000. Simultaneous separation and quantitation of the major bovine whey proteins including proteose peptone and caseinomacropeptide by reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene–divinylbenzene. *Journal of Chromatography A* 878(2): 183-96.
- [32] Outinen, M., Tossavainen, O., Syvaöja, E.L., Korhonen, H., 1995. Chromatographic isolation of k-caseinomacropeptide from cheese whey with a strong basic anion exchange resin. *Milchwissenschaft* 50: 570-574.
- [33] Kawasaki, Y., Dosako, S., 1994. Process of producing k-casein glycomacropeptides. United States Patent 5278288.
- [34] Kawasaki Y., Dosako, S., Shimatani, M., Idota, T., 1994. Process for producing k-casein glycomacropeptides. United States Patent 5280107.
- [35] Kawasaki, Y., Kawakami, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Tomizawa, A., Kotake, M., Nakajima, I., 1993. pH-Dependent molecular weight changes of kappa-casein glycomacropeptide and its preparation by ultrafiltration. *Milchwissenschaft* 48(4): 191–196.
- [36] Tanimoto, M., Kawasaki, Y., Dosako, S., Ahiko, K., 1992. Large-scale preparation of k-casein glycomacropeptide from rennet casein whey. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 56(1): 140-141.
- [37] Nielsen, P., Tromholt, N., 1994. *Method for production of a kappa-casein glycomacropeptide and use of a kappa-casein glycomacropeptide*. World Patent WO 94/15952.
- [38] Lieske, B., Konrad, G., Kleinschmidt, T.H., 2004. Isolation of caseinomacropeptide from rennet whey by a multistage ultrafiltration process, III. Influence of pH in the first ultrafiltration-step on the chemical properties of isolated caseinomacropeptide. *Milchwissenschaft* 59: 408-410.
- [39] Tanimoto, M., Kawasaki, Y., Shinmoto, H., Dosako, S., Tomizawa, A., 1991. *Process for producing k-casein glycomacropeptide*. United States Patent 5075424.
- [40] Veith, P.D., Reynolds, E.C., 2004. Production of a high gel strength whey protein concentrate from cheese whey. *Journal of Dairy Science* 87: 831–840.
- [41] Resch, J.J., Daubert, C.R., Foegeding, E.A., 2005. The effects of acidulant type on the rheological properties of beta-lactoglobulin gels and powders derived from these gels. *Food Hydrocolloids* 19(5): 851-860.
- [42] Mazza, G., 2006. Compositional and functional properties of saskatoon berry and blueberry. *International Journal of Fruit Science* 5 (3): 101-120p.
- [43] National Dysphagia Diet Task Force, 2002. National dysphagia diet: standardization for optimal care. Chicago, IL: American Dietetic Association, 36p.
- [44] Quinchia, L.A., Valencia, C., Partal, P., Franco, J. M., Brito-De La Fuente, E., Gallegos, C., 2011. Linear and non-linear viscoelasticity of puddings for nutritional management of dysphagia. *Food Hydrocolloids* 25: 586–593.
- [45] Anderson, M.C., Shoemaker, C.F., Singh, R.P., 2006. Rheological characterization of aseptically packaged pudding. *Journal of Texture Studies* 37(6): 681-695.
- [46] Erkek, J., 2003. Puding tipi ürünlerde reolojik özelliklerin objektif ve subjektif yöntemlerle saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, İzmir.