



Gıda Endüstrisinde Antifriz Proteinlerin Önemi

*¹Filiz YANGILAR, ²Pınar OĞUZHAN YILDIZ

¹Erzincan Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Erzincan

²Ardahan Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ardahan

ÖZET

Anahtar Kelimeler:
Antifriz protein, buz kristalleri, gıda endüstrisi

Antifriz proteinler (AFP); üç amino asitlik bir peptid zincirinin üçüncü amino asidine kovalant bağlarla bağlanmış bir disakkarit molekülünden oluşan birimlerin (alanin-alanin-threonin-galaktozil-N-asetilgalaktozamin) tekrarlanması ile meydana gelen glikopeptid yapılardır. Buz yüzeyine bağlanabilen, buz kristallerinin büyüebilmelerini ve yeniden kristallenmelerini kontrol edebilme yeteneğine sahip özel proteinlerdir. Bu özelliklerinden dolayı yapısal ve mekaniksel hasarları önleme etkisi göstererek gıdaların duyuşal özelliklerini geliştirmektedirler. Özellikle donmuş gıdalarda yeniden kristallenmenin önlenmesinde etkili olup, çözündürülme işleminde damlama kaybını azaltmakta ve raf ömrünü uzatmaktadır. Gıda endüstrisi için bu kadar fonksiyonel özelliklere sahip olan bu özel proteinlerin geliştirilmesi ve çeşitli tekniklerle uygulama alanlarının yaygınlaştırılmasının önemi vurgulanmıştır.

The Important of Antifreeze Proteins's in Food Industry

ABSTRACT

Key Words:
Antifreeze protein, ice crystals, food industry

Antifreeze proteins (AFP) are glycopeptide structures which is occurred by repeated disaccharide molecules linked with covalent bonds to three amino acids with peptide chain the third amino acid. Bindings structural of ice, growth of the ice crystals and ability of controlled re-crystalization are a special proteins. By showing prevent the effect of structural and mechanical damage is improved sensory properties of foods because of this speciality. Especially, it is expanded shelf-life and reduced drip loss as process of thawing in frozen foods. This special protein to develop which is have so much functional properties for food industry and promote the application fields with various techniques are emphasized.

1. Giriş

Gıdaların raf ömrünün uzatılmasında dondurma işlemi başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak dondurma işleminin sıcaklığı ve ürünün depolama şartları uygun olmadığında bazı problemler ortaya çıkabilir. Dondurulmuş gıda üretiminde yapısal zararları azaltmak için buz oluşumunun hızlı olması gerekir. Buz ve yeniden kristal oluşumları sadece buz kristallerinin sayısı ve büyüklüğü ile değil aynı zamanda şekilleri ve hareket özellikleri üzerine de sıcaklık dalgalanmaları ile ilişkilidir. Yeniden kristal oluşumu buz içeriğinde bir değişiklik olmadan buz kristalleri içerisinde moleküler difüzyon ile su moleküllerinin göç etmesi yolu ile oluşan bir olaydır [1, 2]. Dondurma işlemindeki yenilikçi yaklaşımlar, tüketici ve market memnuniyetini karşılayacak yüksek kaliteli dondurulmuş ürünler elde edilmesine imkân sağlamıştır. Bu yaklaşımlardan birisi olan AFP'ler buz kristallerinin şeklini, büyüklüğünü değiştiren ve yeniden oluşumlarını kontrol edebilme yeteneğine sahip özel proteinler olup [3, 4] düşük sıcaklıklarda organizmayı soğuk çevre şartlarından korumaktadırlar [5-11]. Bu proteinler modifiye buz kristallerinin geliştirilmesi, sıkıştırılması ve yeni buz kristallerinin oluşumunun engellenmesinde erime noktasının altındaki sulu çözeltilerin donma noktalarını düşürmektedirler [12]. AFP'ler balık, böcek, bitki, akarlar, örümcekler ve bakteri ile mantarlar [13, 14] gibi çok sayıda organizmada bulunurlar [15]. Bunlar sıfırın

altındaki ortamlarda canlı kalmalarına olanak veren bir polipeptid grubu bileşikler olup [16-18] osmotik plazma basıncını artırmaksızın deniz suyunun donma noktasının altındaki sıcaklıklarda balık kanının sıcaklığını koruyarak canlılıklarının devam ettirebilmelerini sağlamaktadırlar [19-26]. Ayrıca bu proteinler; bazı bitki, mikrop ve ekzotermik hayvanlar tarafından donmanın zararlarından korunmak için üretilmektedirler [27].

AFP'ler ilk olarak De Vries tarafından 1969 yılında soğuk sularda yaşayan balıkların kanında bulunmuştur [22, 28, 29]. *Solanum dulcamara* [30], *Secale cereale* L. [31, 32], *Prunus persica* [33], *Daucus carota* L. [34, 35], *Triticum aestivum* L. [36], *Arachis hypogaea* [37], *Picea abies* [38], *Rhodiola algida* var. *tangutica* [39] ve *Lolium perenne* [40, 41] gibi donmaya karşı dayanıklı bitkilerin çoğunda da rastlanılmıştır.

2. Antifiriz proteinlerin yapısı ve sınıflandırılması

AFP'ler benzer fonksiyonel özellikler göstermelerine rağmen türler arasında farklı yapısal özelliklere sahiptir [14, 29, 42-44]. Bazı balık AFP'lerinin moleküler ağırlıkları 2.5 KD ile 36 KD arasında değişim göstermektedir. Bu yapısal ve kompozisyonel farklılık AFP'lerin orjinindeki farklılıktan kaynaklanmaktadır [22]. Bazı AFP'lerin özellikleri Tablo 1'de verilmiştir [18].

Tablo 1. Bazı antifiriz proteinlerin özellikleri

Antifiriz protein	Molekül ağırlığı, Da	Aminoasitler	Ayırt edici özellikler
Balık glikoproteinleri ^a	2600-34000	(Ala-Ala-Thr) Amino asitlerin 2/3'ü alanin	Thr'ne o-bağlı disakkarit
Balık Tip I ^b	3300-3400	11 Amino asitli tekrarlayan birim, Amino asitlerin 2/3'ü Ala	Tekli α -heliks
Balık tip II ^b	14000-24000	Cys yüksek	"Normal" proteine daha çok benzer
Böcek ^c	15000	Cys ve Thr yüksek	Balığınkinin 10 katı yüksek aktivite

^aMorina balığı; ^bDil balığı; ^cSarı un kurdu böceği

Antifiriz proteinler genel bir moleküler yapıya sahip olmamakla beraber balıklarda beş farklı antifiriz protein [antifiriz glikoprotein (AFGP), Tip I, Tip II, Tip III ve Tip IV] belirlenirken; böceklerde, yosunlarda ve bakterilerde de çeşitli antifiriz proteinler tanımlanmıştır. Bu proteinler heliks, globüler ve barrel dizilimlere sahiptir [45, 46]. Antifiriz proteinlerinin birinci grubu olan AFGP'ler ilk olarak De Vries tarafından Antartik notothenoid

balıklarında [28, 47] daha sonra ise çeşitli morina balıkları ile antartik gümüş balıklarında da (*Pleuragramma antarcticum*) bulunmuştur [48-50]. AFGP'ler balık (e.g., Antractic Notothenioids ve Arctic Cod) kan serumundaki protein fraksiyonlarından [51] ve moleküler ağırlıkları 2.6 KDa ile 3.3 KDa arasındadır [52, 53]. AFGP'ler ya termal histerisiz proteinleri (THP) ya da buz yapısındaki proteinleri (ISP) içermektedir. THP'ler balık, böcek, bitki, mantar ve

Yangılar ve Yıldız, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 32(1):81-87

bakterilerden türetilmiştir ve suyun donma noktasına kadar sıkıştırılarak buz kristal oluşumunu önlediği bilinmektedir [54]. Bununla birlikte ISP'ler ise suyun donmasını önlemeden ziyade buz kristallerinin kümeleşmesini, şekil ve büyüklüğünü sağlamaktadırlar [55]. ISP'ler adsorbsiyon–inhibisyon mekanizması boyunca buz kristallerinin morfolojisini ve büyümesini etkilemektedir [50, 56]. Antifiriz proteinlerinin ikinci grubu olan Tip I ise, birincil yapısı kararlı sarmal yapıda olup toplam 11 amino asitten meydana gelirken ikincil yapısı; basit, uzun ampifatik (molekülünün yapısında hem hidrofobik hem de hidrofilik grubun bulunması) alfa sarmal bir yapıya sahiptir [46]. Molekül ağırlıkları 3.3 ile 4.5 kDa arasındadır ve pisi balığında (*Platichthys flesus*) bulunmaktadır. Tip II ise; molekül ağırlıkları 11 ile 24 kDa arasında olup sardalya balığı (*Sardina pilchardus*), kaya balığı (*Macrozoarces americanus*) ve kurt balığında (*Anarhichas lupus*) bulunmaktadır. Tip III ise; birincil yapısı genel antifiriz protein yapısında olup Tip I antifiriz proteine benzer özellik göstermektedir. Bu antifiriz proteinlerin ikincil yapısı ise β -sandviç modelde olup, üçüncül yapısı bilinmemektedir [46, 57, 58]. 6.5 kDa molekül ağırlıklarına sahip olup kurt balığında (*Anarhichas lupus*) rastlanılmıştır. Tip IV ise; 12 kDa molekül ağırlığında olup uzun boynuzlu iskorpit plazmasında (*Myoxocephalus octodecimspinosus*) rastlanılmıştır [52, 59, 60]. Alfa sarmal yapıda ve glutamat ile glutamin amino asitleri bakımından zengin bir glikoproteindir [46, 61].

3. Antifiriz proteinlerin kullanım alanları

Yüksek değerli AFP'ler fonksiyonel özellikleri açısından gıdadan tıp alanına kadar çok geniş bir ticari alanda kullanıma sahiptirler [19, 62-65]. Endüstriyel ve biyomedikal amaçlar için doğal AFP'ler den ziyade ısı direnci yüksek olan mühendislik AFP'leri daha çok tercih edilmektedir [25]. Buz kristallerinin gelişiminde etkili olan AFP'ler su ürünleri, organ, hücre naklinde ve dondurulmuş gıdaların raf ömrünün uzatılmasında ve kalitesinin artırılmasında yaygın uygulama alanlarına da sahiptir [19-26, 62]. Hücrelerin, dokuların, organların, membranların düşük sıcaklıkta depolanmalarına ilaveten kanser tedavilerinde başarılı bir şekilde uygulanması ile beraber ısı işleme (pastörizasyon) karşı dayanıklı olan bu AFP'ler gıda depolanmalarında başarı ile kullanılabilir [66-75]. AFP'ler dondurulmuş gıdalarda; depolama, taşıma ve çözündürme işlemlerindeki yeniden buzlanmanın önlenmesinde, minimal besin kayıplarının ve hücresel zararlarının azaltılmasında ve gıda tektürünün korunmasında da etkili olmaktadır [19]. Antifiriz proteinler dondurulmuş hamurun raf ömrünün kısa olması nedeni ile ortaya çıkan olumsuzlukları en aza indirgeyebilmektedir. Donma sırasında, antifiriz proteinler monomer veya iyon halinde çözeltide bulunan parçacıkların daha büyük parçacık oluşturmak üzere bir araya gelmesini de engellemektedir [3, 46]. Hızlı dondurma ve çözündürme işlemlerinde bozulabilir ürünlerin depolama özelliklerini geliştirmek amacıyla da

kullanılmaktadır [74, 76]. Bununla birlikte yağ ve gaz borularının deformasyonunun önlenmesinde, yüzeyi korumak için boya ve cilada katkı maddesi olarak uygulanmaktadır [77-79].

4. Antifiriz proteinler ile ilgili yapılan çalışmalar

Araştırmacılar hücre materyalin (doku, kırmızı kan hücresi ve sperm) dondurulması ve çözündürülmesi işleminde AFP'lerin yararlı etkiler sağladığını ve oosit, sperm ve adenokarsinoma hücrelerinin canlılıklarını AFP'lerin varlığında devam ettirdiklerini bildirmişlerdir [3, 80-82].

Dondurma üretiminde [56], dondurulmuş ette [83, 84], sebzelerde [85], havuç, lahan, ıspanak, mısır, yazlık yulaf, kışık pirinç, yazlık-kışık (kanola, buğday ve çavdar) bitkilerde [86] ve terede bu protein ile ilgili birçok çalışma mevcuttur [10].

Payne ve Young [84] kuzu etine belirli konsantrasyonlarda AFPG'leri (*Antartic morina* balığından elde ettikleri) enjekte ederek çözündürdükten sonraki et kalitesini düşük pH değerlerinde takip ederek glikoliz oranını araştırmışlardır. *Longissimus dorsi* kaslarının kesimden sonraki 24 saat içerisinde karkastan uzaklaştırarak örnekleri vakum paketlenip 2-16 hafta arasında -20°C'de depolanmışlardır. Örneklerin çözündürme işleminden sonra damlama kaybı ve duyu özelliklerini incelemişlerdir. Sonuç olarak AFPG'lerin enjeksiyonunun yapıldığı örneklerin pH değerlerini etkilemediğini ve önemli bir değişiklik gözlenmediğini bildirmişlerdir.

Desjardins ve ark. [65] düşük su sıcaklığına maruz kalan yüksek konsantrasyonlu plazma üretebilme yeteneğine sahip AFP'lerin optimal gelişme sıcaklığında (9-12°C) Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*) balığının büyümesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Araştırma sonucunda, sıfır altındaki sıcaklıklara toleranslı olan AFP'lerin büyüme oranlarının geliştirilebileceği sıcaklık değişimleri ile sağlanabileceği görülmüştür.

Zhang ve ark. [3] yürüttükleri bir çalışmada %18,3 antifiriz proteini içeren havuçların dondurulmuş hamurların fermantasyon kapasitesi üzerine etkisini incelemişlerdir. Protein ilaveli havuçların dondurma-çözündürme ve kristal oluşumunu bağlama boyunca termal histerisiz olgusuna neden olduğu ve maya ölümlerini azalttığı ayrıca hamurun tutma kapasitesini artırdığı tespit edilmiştir. Donmuş hamur fermantasyonunun geliştirilmesinde havuç konsantrasyonunun başarılı bir şekilde uygulanabileceğini rapor etmişlerdir.

Zhang ve ark. [9] yaptıkları diğer bir çalışmada ise, %15,4 (w/w) antifiriz proteini içeren havuç (*Daucus carota*) konsantrasyonunun dondurulmuş hamurun tekstürel özellikleri ve uçucu bileşikleri üzerine etkilerini araştırmışlardır. Havuç konsantrasyonunun AFP içeriğinden dolayı kontrol grubuna göre tekstürel açıdan daha yumuşak ve daha kararlı bir yapı sergilediği sonucuna ulaşılmıştır.

Martinez-Páramo ve ark. [87] zebra balığı embriyolarını proteinli ortamda inkübe ederek 4-10°C'lik soğuk bir ortamda AFP davranışlarını incelemişlerdir. 10°C'deki sıcaklıktaki embriyoların canlılıklarında önemli bir artış

Yangılar ve Yıldız, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 32(1):81-87

görülmüştür. AFP varlığının azaltıldığı kontrollü şartlar altında, AFP uygulanmış embriyoların %14,2'sinde ve kontrol örneklerinin %48,9'da kayıpların olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar güvenilir bir metot olan proteinli ortamda embriyoların inkübe edilmesinde AFP'lerin başarılı uygulanabileceğini bildirmişlerdir.

Hawes ve ark. [88] Antarctic springtail (*Gomphiocephalus hodgsoni*) balığından 9 kDA molekül ağırlığına sahip AFP'leri izole etmişlerdir. Bu işlem için kromatografik ayırma tekniklerine ihtiyaç duyulmadan tek başına AFP'nin doğrudan izolasyonunun mümkün olabileceğini rapor etmişlerdir.

Ding ve ark. [89] dondurma ve dondurma-çözünme işlemi süresince hamurun su tutma kapasitesi ve termal özellikleri üzerine pirinç AFP'lerinin etkisini incelemişlerdir. Sonuçlar dondurma işleminden sonraki hamurun belirgin bir ısı artışı, dondurma sıcaklığında, erime sıcaklığında ve ışık geçirgenliğinde artış görülürken, erime entalpisinde ve taze hamurun donmuş su içeriğinde azalmalar görülmüştür. Dondurulmuş hamurun su dağılımına etkisi ve nem içeriği ile dondurma-çözündürme işlemindeki suyun hareketliliği üzerinde de azalma gözlemlenmiştir.

5. Sonuç

Gıda endüstrisinin çeşitli alanlarında kaliteli ve güvenilir bir gıda üretimini sağlamak amacıyla geliştirilen güncel birçok metot kullanılmaya başlanılmıştır. Bu metotlardan biri olan AF proteinleri gıdalarda yüksek üretim maliyetleri ve elde edilebilirliklerinin zor olması gibi nedenlerden dolayı henüz pek fazla ticari kullanım alanına sahip değildir. Bu tekniğin ülkemiz gıda endüstrisi açısından uygulanmasının yaygınlaştırılması için uygulama ve kontrol yöntemlerinin geliştirilmesi ve bununla bilimsel araştırma ve endüstri uygulamaları ile desteklenmesi gerekmektedir.

6. Kaynaklar

- Blond, G., Le Meste, M., Principles of frozen storage. Y.E. Hui, P. Cornillon, I.G. Legaretta, M.H. Lim, K.D. Murrell, W., Nip (Eds.), Handbook of Frozen Foods, Marcel Dekker, New York, pp. 30, 2004
- Matsumura, K., Hyon, S.H., Polyampholytes as low toxic efficient cryoprotective agents with antifreeze protein properties, Biomaterials, 30 (27): 4842-4849, 2009.
- Zhang, C., Zhang, H., Wang, L., Effect of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins on the fermentation capacity of frozen dough, Food Research International, 40: 763-769, 2007.
- Qiu, L., Mao, X., Hou, F., Ma, J., A novel function – Thermal protective properties of an antifreeze protein from the summer desert beetle *Microdera punctipennis*, Cryobiology, 66 (1): 60-68, 2013.
- Strom, C.S., Liu, X.Y., Jia, Z., Ice surface reconstruction as antifreeze protein-induced morphological modification mechanism, Journal of the American Chemical Society, 127: 428-440, 2005.
- Scotter, A.J., Marshall, C.B., Graham, L.A., Gilbert, J.A., Garnham, C.P., Davies P.L., The basis for hyperactivity of antifreeze proteins, Cryobiology, 53: 229-239, 2006.
- Robles, V., Barbosa, V., Herráez, M.P., Martínez-Páramo, S., Cancela, M.L., The antifreeze protein type I (AFP I) increases seabream (*Sparus aurata*) embryos tolerance to low temperatures, Theriogenology, 68: 28-289, 2007.
- Wathen, B., Jia, Z., Controlling the freezing process with antifreeze proteins, D. Sun (Ed.), Emerging Technologies for Food Processing, Elsevier, London, pp. 653-674, 2005.
- Zhang, C., Zhang, H., Wang, L., Guo, X., Effect of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins on texture properties of frozen dough and volatile compounds of crumb, Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 41: 1029-1036, 2008.
- Cruz, R.M.S., Viera, M.C.V., Silva, C.L.M., The response of watercress (*Nasturtium officinale*) to vacuum impregnation: Effect of an antifreeze protein type I, Journal of Food Engineering, 95: 339-345, 2009.
- Jarżabek, M. Pukacki, P.M., Nuc, K., Cold-regulated proteins with potent antifreeze and cryoprotective activities in spruces (*Picea* spp.), Cryobiology, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.01.007>, 2009
- Bayer-Giraldi, M., Weikusat, I., Besir, H., Dieckmann, G., Characterization of an antifreeze protein from the polar diatom *Fragilariopsis cylindrus* and its relevance in sea ice, Cryobiology, 63, 210-219, 2011.
- Tsvetkova, N.M., Phillips, B.L., Krishnan, V.V., Feeney, R.E., Fink, W.H., Dynamics of Antifreeze Glycoproteins in the Presence of Ice, Biophysical Journal, 82: 464-473, 2002.
- Amornwittawat, N., Wang, S., John, G., Duman, J.G., Wen, X., Polycarboxylates enhance beetle antifreeze protein activity, Biochimica et Biophysica Acta, 1784: 1942-1948, 2008.
- Yang, C., Sharp, K.A., The mechanism of the type III antifreeze protein action: a computational study, Biophysical Chemistry, 109 (1): 137-148, 2004.
- Tomczak, M.M., Christopher B. Marshall, C.B., Gilbert, J.A. Davie, P.L., A facile method for determining ice recrystallization inhibition by antifreeze proteins, Biochemical and Biophysical Research Communications, 311: 1041-1046, 2003.
- Pertaya, N., Marshall, C.B., DiPrinzio, C.L., Wilen L., Thomson, E.S., Wettlaufer, J.S., Davies, P.L., Braslavsky, I., Fluorescence microscopy evidence for

Yangılar ve Yıldız, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 32(1):81-87

- quasi-permanent attachment of antifreeze proteins to ice surfaces, *Biophysical Journal*, 92 (10): 3663-3673, 2007.
17. Anonim, Antifriz proteinler ve gıdalarda kullanım potansiyelleri www.gidadernegi.org/TR/Genel/dg.ashx?DIL=1...TURHAN+S (Erişim Tarihi: 21. 01. 2015).
 18. Griffith, M., Ewart K.V., Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods, *Biotechnology Advances*, 13: 375-402, 1995.
 19. Chen, G., Jia, Z., Ice-binding surface of fish type III antifreeze, *Biophysical Journal*, 77: 1602-1608, 1999.
 20. Breton, G., Danyluk, J., Ouellet, F., Sarhan, F., Biotechnological applications of plant freezing associated proteins, *Biotechnology Annual Reviews*, 6: 59-101, 2000.
 21. Kaiser, J., New prospects for putting organs on ice, *Science*, 295: 1015, 2002.
 22. Garcia-Arribas, O., Mateo, R. Tomczak, M.M. Davies, P.L. Mateu, M.G., Thermodynamic stability of a cold-adapted protein, type III antifreeze protein, and energetic contribution of salt bridges, *Protein Science*, 16: 227-238, 2007.
 23. Kundu, S., Roy, D., Temperature-induced unfolding pathway of a type III antifreeze protein: Insight from molecular dynamics simulation, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 27: 88-94, 2008.
 24. Crevel, R.W.R., Fedyk, J.K., Supurgeon, M.J., Antifreeze proteins: characteristics, occurrence and human exposure, *Food and Chemical Toxicology*, 40(7): 899-903. 2002.
 25. Mao, X., Liu Z, Maa, J., Pang H., Zhang, F., Characterization of a novel b-helix antifreeze protein from the desert beetle *Anatolica polita*, *Cryobiology*, 62: 91-99, 2011.
 26. Lioua, Y.C., Daley, M.E., Graham, L.A., Kay, C.M., Walker, V.K., Sykes, B.D., Davies, P. L., Folding and Structural Characterization of Highly Disulfide-Bonded Beetle Antifreeze Protein Produced in Bacteria, *Protein Expression and Purification*, 19 (1): 148-157, 2000.
 27. De Vries, A.L., Wohlschlag D.E., Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science*, 163: 1074-1075, 1969.
 28. Fletcher, G.L., Hew, C.L., Davies, P.L., Antifreeze proteins of teleost fishes, *Annual Review of Physiology*, 63: 359-390, 2001.
 29. Duman, J.G., Purification and characterization of a thermal hysteresis protein from plant, bittersweet nightshade *Solanum dulcamara*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1206: 129-135, 1994.
 30. Hon, W.C., Griffith, M., Chong, P., Yang, D.S.C., Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye leaves, *Plant Physiology*, 104: 971-980, 1994.
 31. Hon, W., Griffith, M., Mlynarz, Andrzej., Kwok, Y., Yang, S.C., Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins, *Plant Physiology*, 109: 879-889, 1995.
 32. Wisniewski, M., Webb, R., Balsamo, R., Close, T.J., Yu, X.M., Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: A dehydrin from peach (*Prunus persica*), *Physiologia Plantarum*, 105 (4): 600-608, 1999.
 33. Smallwood, M., Worrall, D., Byass, L., Elias, E., Ashford, D., Doucet, C.J., Holt, C., Telfor, J., Lillford, P., Bowles, D.J., Isolation and characterization of a novel antifreeze protein from carrot (*Daucus carota*), *Biochemical Journal*, 340: 385-391, 1999.
 34. Worrall, D., Byass, L., Elias, E., Ashford, D., Smallwood, M., Sidebottom, C., Lillford, P., Telfor, J., Holt, C., Bowles, D.J., A Carrot Leucine-Rich-Repeat Protein That Inhibits Ice Recrystallization, *Science*, 282: 115-117, 1998.
 35. Chun, J.U. Yu, X.M., Griffith, M., Genetic studies of antifreeze proteins and their correlation with winter survival in wheat, *Euphytica*, 102 (2): 219-226, 1998.
 36. Dave, R.S., Mitra, R.K., A low temperature induced apoplastic protein isolated from *Arachis hypogaea*, *Phytochemistry*, 49: 2207-2213, 1998.
 37. Sabala, I. Egertsdotter, U. Fircks, H.V., Arnold, S.V., Abscisic acid-induced secretion of an antifreeze-like protein in embryogenic cell lines of *Picea abies*, *Journal of Plant Physiology*, 149: 163-170, 1996.
 38. Lu, C.F., Jian, L.C., Kuang, T.Y., Secretory antifreeze proteins produced in suspension culture cells of *Rhodiola algida* var. *tangutica* during cold acclimation, *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 27: 555-559, 2000.
 39. Pudney, P.D.A., Buckley, S.L., Sidebottom, C.M., Twigg, S.N., Sevilla, M.P., Holt, C.B., Roper, D., Telford, J.H., McArthur, A.J., Lillford P.J., The physico-chemical characterization of boiling stable antifreeze protein from a perennial grass (*Lolium perenne*), *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 410: 238-245, 2003.
 40. Cai, Y., Liua, S., Liaoa, X., Ding, Y., Sun, J., Zhang, D., Purification and partial characterization of antifreeze proteins from leaves of *Ligustrum lucidum* Ait, *Food and Bioproducts Processing*, 89: 98-102, 2011.
 41. Yeh, Y., Feeney, R.E., Antifreeze Proteins: Structures and Mechanisms of Function, *Chemical Reviews*, 96 (2): 601-618, 1966.
 42. Harding, M.M., Ward, L.G., Hayme, A. D. J., Type I 'antifreeze' proteins Structure-activity studies and mechanisms of ice growth inhibition, *European Journal of Biochemistry*, 264 (3): 653-665, 1999.
 43. Nguyen, D.H., Colvin, M.E., Yeh, Y., Feeney, R.E., Fink, W.H., The Dynamics, Structure, and Conformational Free Energy of Proline-Containing Antifreeze Glycoprotein, *Biophysical Journal*, 82 (6): 2892-2905, 2002.

Yangılar ve Yıldız, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 32(1):81-87

44. Clarke, A., Johnston, N.M., Antarctic marine benthic diversity, *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 41: 47-114, 2003.
45. Aşçı, A., Göçer, E.M.Ç., Küçükçetin, A., Antifiriz Proteinler ve Gıda Teknolojisinde Kullanımı, Akademik Gıda, 2011.
46. DeVries, A.L., Komatsu, S.K., Feeney, R.E., Chemical and physical properties of freezing point-depressing glycoproteins from Antarctic fishes. *Journal of Biological Chemistry*, 245 (11): 2901-2908, 1970.
47. Raymond, J.A., Lin, Y., DeVries, A.L., Glycoprotein and protein antifreezes in two Alaskan fishes. *Journal of Experimental Zoology*, 193 (1): 125-130, 1975.
48. Van Voorhies, W.V., Raymond, J.A., DeVries, A.L., Glycoproteins as biological antifreeze agents in the cod, *Gadus ogac* (Richardson), *Physiological Zoology*, 347-353, 1978.
49. Hassas-Roudsari, M., Goff, H.D., Ice structuring proteins from plants: Mechanism of action and food application, *Food Research International*, 46 (1): 425-436, 2012.
50. Antson, A.A., Smith, D.J., Roper, D.I., Lewis, S., Caves, L.S., Verma, C.S., Buckley, S.L., Lillford, P.J., Hubbard, R.E., Understanding the mechanism of ice binding by type III antifreeze proteins. *Journal of Molecular Biology*, 305 (4): 875-889, 2001.
51. Harding, M.M., Erberg, P.I., Haymet, A.D.J., Antifreeze glycoproteins from polar fish, *European Journal of Biochemistry*, 270: 1381-1392, 2003.
52. Tachibana, Y., Fletcher, G.L., Fujitani, N., Tsuda, S., Monde, K., Nishimura, S.I., Antifreeze glycoproteins: elucidation of the structural motifs that are essential for antifreeze activity, *Angewandte Chemie*, 116 (7): 874-880, 2004.
53. Graether, S.P., Sykes, B.D., Cold survival in freeze-intolerant insects, *European Journal of Biochemistry*, 271 (16): 3285-3296, 2004.
54. Clarke, C.J., Buckley, S.L., Lindner, N., Ice structuring proteins-A new name for antifreeze proteins, *CryoLetters*, 23 (2): 89-92, 2002.
55. Regand, A., Goff, H.D., Ice recrystallization inhibition in ice cream as affected by ice structuring proteins from winter wheat grass, *Journal of Dairy Science*, 89 (1): 49-57, 2006.
56. Ewart, K.V., Lin, Q., Hew, C.L., Structure, function and evolution of antifreeze proteins, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55: 271-283, 1999.
57. Bektaş, G.I., Altıntaş, A., Antifreeze proteins. *Journal of Etlik Veterinary Microbiology*, Turkey, 2007.
58. Davies, P.L., Sykes, B.D., Antifreeze proteins, *Current Opinion in Structural Biology*, 7 (6): 828-834, 1997.
59. Pertaya, N., Marshall, C.B., DiPrinzio, C.L., Wilen, L., Thomson, E.S., Wettlaufer, J. S., Davies, P.L., Thomson, E.S., Braslavsky, I., Fluorescence microscopy evidence for quasi-permanent attachment of antifreeze proteins to ice surfaces, *Biophysical journal*, 92 (10): 3663-3673, 2007.
60. Deng, G., Andrews, D.W., Laursen, R.A., Amino acid sequence of a new type of antifreeze protein, from the longhorn sculpin *Myoxocephalus octodecimspinosus*, *FEBS letters*, 402 (1): 17-20, 1997.
61. Fletcher, G.L., Goddard, S.V., Yalın, G.W., Antifreeze proteins and their genes: From basic research to business opportunity, *Chemtech*, 29 (6): 17-28, 1999.
62. Pham, L., Dahiya, R., Rubinsky, B., An in Vivo Study of Antifreeze Protein Adjuvant Cryosurgery, *Cryobiology*, 38 (2): 169-175, 1999.
63. Amir, G., Horowitz, L., Rubinsky, B., Yousif, J.L., Lavee, J., Smolinsky, A.K., Prolonged 24-hour subzero preservation of heterotopically transplanted rat hearts using antifreeze proteins derived from arctic fish, *The Annals of Thoracic Surgery*, 77 (5): 1648-1655, 2004.
64. Desjardins, M., Le François, N.R., Fletcher, G.L., Blier, P.U., High antifreeze protein levels in wolffish (*Anarhichas lupus*) make them an ideal candidate for culture in cold, potentially ice laden waters, *Aquaculture*, 272 (1): 667-674, 2007.
65. Rubinsky, B., Arav, A., Mattioli, M., DeVries, A.L., The effect of antifreeze glycopeptides on membrane potential changes at hypothermic temperatures, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173: 1369-1374, 1990.
66. Chao, H., Davies, P.L., Carpenter, J.F., Effects of antifreeze proteins on red blood cell survival during cryopreservation, *Journal of Experimental Biology*, 199 (9): 2071-2076, 1996.
67. Muldrew, K., Rewcastle, J., Donnelly, B.J., Saliken, J.C., Liang, S., Goldie, S., Olson, M., Baissalov, R., Sandison, G., Flounder antifreeze peptides increase the efficacy of cryosurgery, *Cryobiology*, 42 (3): 182-189, 2001.
68. Soltys, K.A., Batta, A.K., Koneru, B., Successful nonfreezing, subzero preservation of rat liver with 2, 3-butanediol and type I antifreeze protein, *Journal of Surgical Research*, 96 (1): 30-34, 2001.
69. Karanova, M.V., Pronina, N.D., Tsvetkova, L.I., The effect of antifreeze glycoproteins on survival of fish spermatozoa under the conditions of long-term storage at 4 °C, *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 29 (1): 75-79, 2002.
70. Amir, G., Rubinsky, B., Kassif, Y., Horowitz, L., Smolinsky, A.K., Lavee, J., Preservation of myocyte structure and mitochondrial integrity in subzero cryopreservation of mammalian hearts for transplantation using antifreeze proteins -an electron microscopy study, *European Journal of Cardio Thoracic Surgery*, 24 (2): 292-297, 2003.
71. Egolf, P.W., Kauffeld, M., From physical properties of ice slurries to industrial ice slurry applications, *International Journal of Refrigeration*, 28 (1): 4-12, 2005.
72. Inada, T., Modak, P.R. Growth control of ice crystals by poly (*vinyl alcohol*) and antifreeze protein in ice

Yangılar ve Yıldız, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 32(1):81-87

- slurries, *Chemical Engineering Science*, 61 (10): 3149-3158, 2006.
73. Tyshenko, M.G., d'Anjou, M., Davies, P.L., Daugulis, A.J., Walker, V.K., Challenges in the expression of disulfide bonded, threonine-rich antifreeze proteins in bacteria and yeast, *Protein Expression and Purification*, 47 (1): 152-161, 2006.
 74. Can, Ö., Holland, N.B., Modified Langmuir isotherm for a two-domain adsorbate: Derivation and application to antifreeze proteins, *Journal of Colloid and Interface Science*, 329 (1): 24-30, 2009.
 75. Li, B., Sun, D.W., Novel methods for rapid freezing and thawing of foods -a review, *Journal of Food Engineering*, 54 (3): 175-182, 2002.
 76. IFAM, IFAM Jahresbericht, Fraunhofer-Institut für Fertigungstechnik und Angewandte Materialforschung Bremen, 2006/2007.
 77. Bayer-Giraldi, M., Weikusat, I., Besir, H., Dieckmann, G., Characterization of an antifreeze protein from the polar diatom *Fragilariopsis cylindrus* and its relevance in sea ice, *Cryobiology*, 63 (3): 210-219, 2011.
 78. Gordienko, R., Ohno, H., Singh, V.K., Jia, Z., Ripmeester, J.A., Walker, V.K., Towards a green hydrate inhibitor: imaging antifreeze proteins on clathrates, *PloS one*, 5 (2): 8953, 2010.
 79. Arav, A., Rubinsky, B., Fletcher, G., & Seren, E. (1993). Cryogenic protection of oocytes with antifreeze proteins. *Molecular Reproduction and Development*, 36 (4): 488-493.
 80. Payne, S.R., Oliver, J.E., Upreti, G.C., Effect of Antifreeze Proteins on the Motility of Ram Spermatozoa in *Cryobiology*, 31: 180–184, 1996.
 81. Koushafar, H., Pham, L., Lee, C., Rubinsky, B., Chemical adjuvant cryosurgery with antifreeze proteins, *Journal of Surgical Oncology*, 66 (2): 114-121, 1997.
 82. Payne, S.R., Sandford, D., Harris, A., Young, O.A., The effects of antifreeze proteins on chilled and frozen meats, *Meat Science*, 37 (1994): 429–438, 1994.
 83. Payne, S.R., Young, O.A., Effects of pre-slaughter administration of antifreeze proteins on frozen meat quality, *Meat Science*, 41: 147–155, 1995.
 84. Cutler, A.J., Saleem, M., Kendall, E., Gusta, L.V., Georges, F., Fletcher, G.L., Winter flounder antifreeze protein improves the cold hardiness of plant tissues, *Journal of Plant Physiology*, 135: 351–354, 1989.
 85. Atıcı, Ö., Nalbantoğlu, B., Antifreeze proteins in higher plants, *Phytochemistry*, 64 (7): 1187-1196, 2003.
 86. Martínez-Páramo, S., Barbosa, V., Pérez-Cerezales, S., Robles, V., Herraes, M.P., Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos, *Cryobiology*, 58 (2): 128-133, 2009.
 87. Hawes, T.C., Marshall, C.J., Wharton, D.A., A 9kDa antifreeze protein from the Antarctic springtail, *Gomphiocephalus hodgsoni*. *Cryobiology*, 69 (1): 181-183, 2014.
 88. Ding, X., Zhang, H., Wang, L., Qian, H., Qi, X., Xiao, J., Effect of barley antifreeze protein on thermal properties and water state of dough during freezing and freeze-thaw cycles, *Food Hydrocolloids*, In Press: doi:10.1016/j.foodhyd.2014.12.025, 2014