

FENİLKETONÜRİ HASTALARI İÇİN FENİLALANİN İÇERİĞİ AZALTILMIŞ BİR UN GELİŞTİRİLMESİ

Özlem Kılıç Büyükkurt¹, A. Nur Durak², Mustafa Erbaş^{2*}

¹Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Kadirli Uygulamalı Bilimler Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Bölümü, Osmaniye, Türkiye

²Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya, Türkiye

Geliş / Received: 08.02.2018; Kabul / Accepted: 04.06.2018; Online baskı / Published online: 05.10.2018

Kılıç Büyükkurt, Ö., Durak, A.N., Erbaş, M. (2018). Fenilketonüri hastaları için fenilalanin içeriği azaltılmış bir un geliştirilmesi. GIDA (2018) 43 (5): 812-825 doi: 10.15237/gida.GD18029

Kılıç Büyükkurt, Ö., Durak, A.N., Erbaş, M. (2018). Development of a new of flour with reduced phenylalanine content for phenylketonuria patients. GIDA (2018) 43 (5): 812-825 doi: 10.15237/gida.GD18029

ÖZ

Fenilketonüri (FKU) hastalığının tedavisinde, fenilalanince kısıtlı diyet tedavinin temelini oluşturmaktadır. Bu nedenle; FKU hastalarının diyetlerinde önemli bir çeşitlilik oluşturmak için buğday unundan fenilalanin içeriği azaltılmış yeni bir un (FAUN) hazırlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla, unda bulunan proteinler *in vitro* olarak hidroliz edilmiş ve amino asitlerin serbestleşmesi sağlanmıştır. Serbestleşebilen bu amino asitlerin içerisindeki fenilalaninin miktarını azaltmak için ise, hidrolizata fenilalanin amonyum liyaz (FAL) enzimi içeren mısır filizi ekstraktı uygulanmış ve sonrasında elde edilen ürün kurutulularak tekrar un haline getirilmiştir. Araştırma sonucunda, *in vitro* hidroliz ile unun serbest fenilalanin içeriğinin yaklaşık 15 kat arttığı ve 6.09 µmol/sa.g FAL enzim aktivitesine sahip mısır filizi ekstraktı uygulamasının da unun serbest fenilalanin içeriğini yaklaşık %50 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca FAUN ile üretilen bisküvilerin, duyuşal özellikleri 9 puanlık hedonik skalaya göre yapılan değerlendirmede 4.5 ve daha yüksek puanları aldığı tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Fenilketonüri, fenilalanin, fenilalanin amonyum liyaz

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

ABSTRACT

Phenylalanine-restricted diet is the basis of treatment for phenylketonuria (PKU). Therefore; it was aimed to prepare new flour with reduced phenylalanine (FRP) content from wheat flour in order to create a significant diversity in PKU patients' diet. For this purpose, proteins in flour were hydrolyzed by *in vitro* and amino acids were released. In order to reduce the amount of phenylalanine in these free-amino acids, corn seedling extracts containing phenylalanine ammonium lyase (PAL) was applied to hydrolysate, the resulting product was dried and obtained again flour. As a result of the research, it was determined that free phenylalanine content of flour was increased about 15-fold by *in vitro* and application of corn seedling extract with PAL enzyme activity of 6.09 µmol/h.g reduced about 50% of free phenylalanine content of flour. It was also determined that biscuits produced with FRP had sensorial scores of 4.5 or higher, based on the hedonic scale of 9 points.

Keywords: Phenylketonuria, phenylalanine, phenylalanine ammonia lyase

*Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding author

✉ erbas@akdeniz.edu.tr

☎ (+90) 242 310 6575

☎ (+90) 242 227 4564

GİRİŞ

Fenilketonüri (FKU) hastalığı, hepatik bir enzim olan fenilalanin hidrosilaz (FAH, EC 1.14.16.1) enziminin ve/veya bu enzimin kofaktörü olan tetrahidrobiyopterin (6R-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiyopterin, BH₄) maddesinin eksik veya yetersiz olmasından kaynaklanan otozomal resesif geçişli bir protein metabolizma bozukluğu hastalığıdır (Cleary, 2014; Pinto vd., 2017; Ramírez vd., 2017; Vieira Neto vd., 2018).

Gıdalarla birlikte alınan ve esansiyel bir amino asit olan fenilalanin (Vieira Neto vd., 2018), sağlıklı bireylerde FAH enzimi tarafından geri dönüşümsüz olarak tirozine dönüştürülmektedir. Ancak FKU hastalığına sahip bireylerde; fenilalanin, FAH enzimi ve/veya BH₄ kofaktörünün yokluğu veya eksikliği nedeniyle tirozine dönüştürülemezken kan gibi vücut sıvılarında ve beyin dokusunda birikmektedir (Özer vd., 2008; Banta-Wright vd., 2015; Üstüner Top ve Küçük Alemdar, 2015). Biriken bu fenilalanin; idrar ve terin küf gibi kötü kokmasına, yürümede ve oturmada zorluklara, gelişim ve zeka geriliğine, agresif ve otistik davranışlara, hiperaktiviteye, dikkat eksikliğine, havale, kusma ve dermatolojik rahatsızlıklara neden olmaktadır. Ayrıca, bu bireylerde melanin sentezinin azalması nedeniyle cilt, saç ve gözlerde ebeveynlere göre daha açık renk oluşmaktadır (Köksal ve Gökmen Özel, 2012; Liemburg vd., 2015; Ramírez vd., 2017; Kose vd., 2018).

FKU hastalığında fenilalanince kısıtlı diyet tedavinin temelini oluşturmaktadır (Strisciuglio ve Concolino, 2014; Ho vd., 2016). Bu diyet tedavisinde temel amaç, kan fenilalanin değerini kontrol ederek hastaların normal bir yaşam sürdürmesini sağlamaktır (Vieira Neto vd., 2018; Kose vd., 2018). Bu nedenle hastaların diyetlerinde tüketebilecekleri gıdalar sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre; et, süt, balık, yumurta, tahıllar ve bunların ürünleri gibi protein içeriği yüksek olan gıdalar ve aspartam içeren ürünler tüketilmesi yasak olan gıdalardır (Rohr, 2015; Babaoğlu-Aydaş vd., 2016; Evans vd., 2018). Meyve, sebze gibi düşük protein içeriğine sahip olan gıdalar tüketilmesi sınırlı serbest ve nişasta, bitkisel sıvı yağ gibi protein

içermeyen gıdalar ise tüketimi serbest olan gıdalardır (Goldar vd., 2016). FKU hastaları, fenilalaninin metabolize edilmesi sonucu oluşan tirozinden de yoksun kaldığı için bu hastalarda tirozin esansiyel amino asit konumuna geçmektedir (MacDonald vd., 2011; Karadeniz, 2013; Ney vd., 2016). Bu nedenle diyet tedavisinde fenilalanin içermeyen veya fenilalanin içeriği azaltılmış tirozince zenginleştirilmiş amino asit karışımları ve düşük proteinli ürünler de kullanılmaktadır (Strisciuglio ve Concolino, 2014; Liemburg vd., 2015; Bannick vd., 2015; Crujeiras vd., 2015).

Fenilalanince kısıtlı diyet başarılı bir tedavi yöntemi olmasına rağmen hastaların bu diyeti yaşam boyu sürdürmesi zor olmaktadır. Bu nedenle; yüksek molekül ağırlıklı nötr amino asit (large neutral amino acid, LNAA) desteği, glikomakropeptit (GMP) protein ikamesi ve proteince zengin gıdaların hidrolizi ile elde edilebilen fenilalanin içeriği azaltılmış gıdaların üretimi gibi bu hastaların beslenmesine yönelik yöntemler ve gen, sapropterin dihidroklorid, enzim ikame ve oral enzim tedavisi gibi hastalığın yeni tedavi yöntemleri üzerinde çeşitli araştırmalar yapılmaktadır (Pimentel vd., 2014; Pinto vd., 2017). FKU hastaları için enzim ikame ve oral enzim tedavisi çalışmalarında bitkisel ve mikrobiyal kaynaklı bir enzim olan fenilalanin amonyum liyaz (FAL, EC 4.3.1.24) enzimi kullanılmaktadır (Şirin vd., 2016; Barron vd., 2017). Moleküler ağırlığı 77-83 kDa arasında alt birimleri ile birlikte tetramerik halde bulunan FAL enzimi (Goldson vd., 2008), FAH enzimi gibi fenilalanini metabolize etmekte, ancak otokatalitik olması nedeniyle kofaktöre ihtiyaç duymadan fenilalanini trans-sinamik asite ve önemsiz miktarda amonyağa dönüştürmektedir (Sarkissian ve Gámez, 2005; McInnis vd., 2009; Babaoğlu-Aydaş vd., 2013; Ramírez vd., 2017).

Gıdaların fenilalanin içeriğinin azaltılması ile ilgili olarak yapılan 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). Yapılan bir başka çalışmada ise düşük fenilalaninli tost ekmeği üretmek amacıyla; buğday unu proteinlerinden ve fenilalanince zengin olan gliadin fraksiyonu, susuz alkol çözeltisi kullanılarak ekstrakte edilerek düşük fenilalaninli buğday unu üretilmiştir. Bu undan üretilen ekmeğin fenilalanin içeriğinin kontrol örneğine göre %43.2 azaltıldığı belirtilmiştir (Mohsen vd., 2010). Bunun yanı sıra bazı tahıl filizlerinin FKU hastalarına oral olarak verilmesi gibi çalışmalar da mevcuttur. FAL enzimini, FKU hastalarına oral yolla vermek amacıyla yapılan bir çalışmada; bir çeşit Japon mısırı (*Zea mays* L. cv. japonica) çimlendirilmiş ve elde edilen mısır filizi köklerinin enzim aktivitesinin 9 µmol/sa.g taze ağırlık gibi yüksek bir değere sahip olduğu tespit edilmiştir (López-Villalobos vd., 2014).

FKU hastaları diyetlerinde protein içeriği yüksek temel ve tam gıda kaynaklarını tüketememekteler. Bu hastalara yönelik olarak hazırlanmış gıdalar genellikle belirli ve sınırlı sayıda besin bileşenlerinin karışımları şeklindedir. Bu bakımdan FKU hastaları, beslenmelerinde temel ve tam gıdaların tanımlanmış ve tanımlanmamış olan birçok besin maddesinden mahrum kalmaktadır.

Yukarıda bahsedilen nedenlerle, bu çalışmada; FKU hastalarının diyetlerinde önemli bir alternatif ve çeşitlilik oluşturması ve hastaların yaşam kalitelerini yükseltebilmesi için bu hastalara yönelik olarak tam bir gıda kaynağı olan buğday unundan fenilalanin içeriği azaltılmış yeni bir un hazırlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla; unda bulunan proteinler, sindirim enzimleri ile *in vitro* olarak hidroliz edilmiş ve olabildiğince amino asitlerin serbestleşmesi sağlanmıştır. Serbestleşebilen bu amino asitler içerisinde fenilalanin amino asidinin miktarını azaltmak için ise hidrolizata FAL enzimi içeren mısır filizi ekstraktı uygulanmış ve sonrasında elde edilen ürün kurutulularak tekrar un haline getirilmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Araştırmada, 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. mısıır kullanılmıştır. Ayrıca, pepsin (2500 U/mg protein), tripsin (15 U/ml), kimotripsin (40 U/mg protein), karboksipeptidaz (70 U/mg protein) ve proteaz (500 U/g) sindirim enzimleri ile kimyasal maddeler niteliklerine uygun olarak analitik ve kromatografik saflıkta Sigma-Aldrich (Co. LLC., ABD) firmasından temin edilerek kullanılmıştır.

Yöntem

Mısır filizlerinden FAL enzimi içeren ekstraktın elde edilmesi

Bu çalışmada; gıda olarak tüketilebilir, kolay bulunabilir ve yüksek enzim aktivitesine sahip olması nedenleriyle FAL enzim kaynağı olarak mısır tahılı kullanılmıştır. Saf su içerisinde bir gece boyunca bekletilen mısır taneleri (López-Villalobos vd., 2014), pH değeri yaklaşık 6 olan çok amaçlı bitki toprağına yerleştirilerek oda sıcaklığında ve doğal ışık altında plastik saksı içerisinde çimlendirilmeye bırakılmıştır. Mısır taneleri çimlenme ortamına yerleştirildikten sonra (0. gün) tanelerin tamamının filizlenmeye başladığı 4. günden itibaren 8. güne kadar her gün FAL enzim aktivite analizi, modifiye edilmiş olan Goldson vd., (2008) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre; çimlenmenin 7. gününde FAL enzim aktivitesinin en yüksek olduğu tespit edilmiştir ve üretimde kullanılan mısır filizleri çimlenmenin 7. gününde hasat edilerek kullanılmıştır.

Hasat edilen mısır filizleri üzerine; filiz: su oranı 1:5 (w/w) olacak şekilde soğuk (+4°C) su ilave edildikten ve havanda iyi bir şekilde ezildikten sonra karışım 1500xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant 1500xg'de 5 dk tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında, süpernatant alınarak moleküler ayırma sınırı (MWCO) 6-8 kDa olan diyaliz tüplerine aktarılmış ve +4°C'de bir gece boyunca diyaliz edilerek düşük molekül ağırlıklı maddelerden arındırılarak FAL enziminin konsantrasyonu bir ekstrakt olarak elde edilmiştir (Babaoglu-Aydaş vd., 2016).

In vitro sindirim

Buğday ununda bulunan proteinlerin *in vitro* sindiriminde, Picariello vd., (2015), Gianfrani vd.,

(2015) ve COST-INFOGEST çalışma grubu (Minekus vd., 2014) metodları yalnızca *in vitro* protein sindirimi için modifiye edilerek kullanılmıştır. *In vitro* protein sindirimi için öncelikle buğday ununun kurumadde içeriği, simüle mide sıvısı (SMS, 0.15 M NaCl) ile yaklaşık %8'e ayarlanmış ve gıda güvenliğinin sağlanması amacıyla 75°C'de 5 dk pastörize edilerek soğutulmuştur. Soğutulan sulu gıda materyalinin pH değeri, 1 M HCl ile 2.5'e ayarlanmış ve enzim: protein oranı 1:50 (w/w) olacak şekilde pepsin enzimi ilave edilerek 500 rpm hızda 1 dk boyunca homojenize olması için karıştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan homojenizat midedeki hidrolizi simüle etmek için 50 rpm hızda, 37°C sıcaklıkta ve pH değeri 2.5'te sabit tutularak 3 saat süreyle sindirim işlemi gerçekleştirilmiştir.

Mide sindirimi gerçekleştirilen homojenizatın ince bağırsak sindirimi iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Öncelikle homojenizatın pH değeri, 1 M NaOH çözeltisi ile 7'ye ayarlanmış ve üzerine enzim: protein oranları sırasıyla 1:100 (v/w), 1:100 (w/w) ve 1:250 (v/w) olacak şekilde tripsin, kimotripsin ve karboksipeptidaz enzimleri eklenerek 500 rpm hızda 1 dk boyunca karıştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan homojenizat 50 rpm hızda, 37°C sıcaklıkta ve pH değeri 7'de sabit tutularak 2 saat süreyle sindirim işlemi gerçekleştirilerek ince bağırsak sindiriminin ilk aşaması gerçekleştirilmiştir. İnce bağırsak sindiriminin ikinci aşamasında ise ince bağırsak mikrovilluslarına tutunmuş olarak görev yapan enzimlerin (brush wall enzyme) hidrolizini simüle etmek ve homojenizatta kalan dipeptit, tripeptit gibi küçük peptitleri de amino asitlere hidroliz etmek için aynı sıcaklık ve pH değerinde 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 aşaması da tamamlanarak *in vitro* protein sindirimi tamamlanmıştır. *In vitro* sindirim sonrası sindirim enzimlerinin proteolitik aktivitelerinin durdurulması amacıyla homojenizat 75°C'de 30 dk ısı işleme tabi tutulmuş ve ardından FAL enzim uygulaması gerçekleştirilmiştir.

FAL enzimi içeren mısır filizi ekstraktın uygulaması

FAL enzim uygulaması, *in vitro* sindirim sonrası serbest fenilalanin içeriğini azaltmak için gerçekleştirilmiştir. *In vitro* sindirimi gerçekleştirilen homojenizatın pH değeri ve sıcaklığı, FAL enziminin optimum çalışma koşulları olan sırasıyla 8.5 ve 30°C'ye ayarlanarak homojenizat üzerine *in vitro* sindirimde kullanılan un miktarının %10'u kadar mısır filizinden elde edilmiş olan FAL enzimi içeren ekstrakt eklenmiştir. Homojenizatın pH ve sıcaklık değerleri sabit tutularak 50 rpm hızda 4 saat boyunca inkübe edilerek *in vitro* sindirim sürecinde serbestleşen fenilalanin amino asitlerinin azaltılması amaçlanmıştır (Sarkissian ve Gámez, 2005; Goldson vd., 2008; Lam vd., 2008).

Kurutma

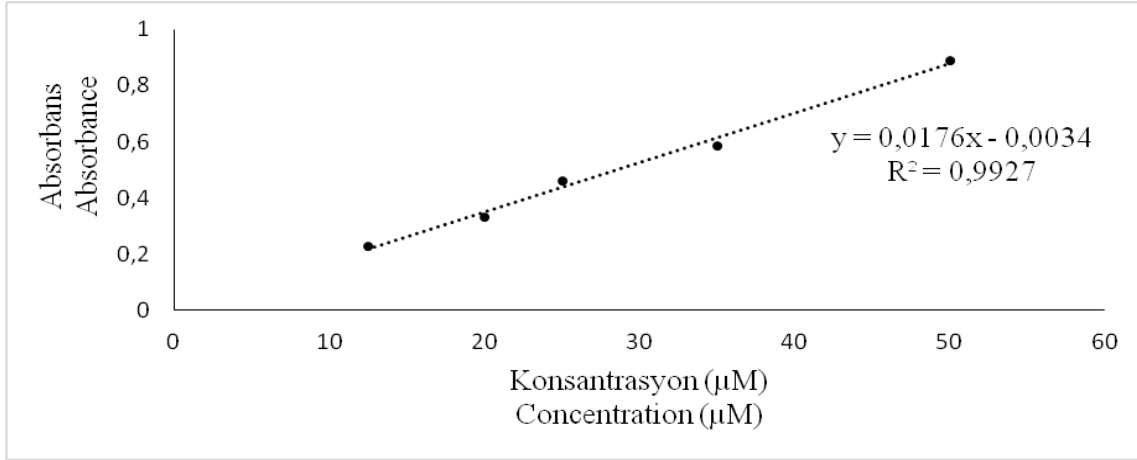
In vitro sindirim ve mısır filizi ekstraktı FAL enzim uygulamasının ardından elde edilen homojenizat, 65°C'de 2 saat süreyle rotary evaporatörde (Laborota 4000, Heidolph, Almanya) konsantre edilmiş, daha sonra vakum kurutucuda (VO200, Memmert, Almanya) 65°C'de, 20 mbar vakum altında 2.5 saat boyunca nem içeriği %14 ve su aktivitesi 0.65 değerinin altına düşünceye kadar kurutulmuştur. Kurutulan örnek, bir öğütücüde (GM-7230 Değirmen, 220-240V AC, 50 Hz, 180 W, Goldmaster, Türkiye) boyut küçültme işlemine tabi tutularak fenilalanin içeriği azaltılmış un (FAUN) haline getirilmiştir.

Mısır filizi FAL enzim aktivite analizi

Mısır filizi FAL enzim aktivite analizi, modifiye Goldson vd., (2008)'e göre gerçekleştirilmiştir. Öncelikle; filiz örnekleri, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 1 mmol/L etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), 10 mmol/L 2-merkaptoetanol ve 25 g/L polivinilpolipirrolidondan 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 difüzyon için bekletildikten sonra 23500xg'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanttaki tuzları gidermek için ekstrakt tuz giderici kolondan (Zeba™ Spin Desalting 7K MWCO, Thermo Scientific, IL, USA) 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 kontrol örneğe karşı okunmuştur. FAL enzim aktivitesi, FAL enziminin fenilalanini dönüştürmesiyle oluşan trans-sinamik asit miktarı üzerinden Şekil 1'de verilen kalibrasyon eğrisi ile hesaplanmıştır.



Şekil 1. Trans-sinamik asit kalibrasyon eğrisi

Figure 1. Trans-cinamic acid calibration curve

Buğday ununda toplam amino asit analizi

FAUN üretiminde kullanılan buğday ununun toplam amino asit analizi Aykın-Dinçer vd., (2017) yöntemine göre gerçekleştirilmiş ve analiz sonuçları kurumadde üzerinden verilmiştir.

Serbest fenilalanin analizi

In vitro protein sindirimi ve FAL enzimi uygulaması sürecinde alınan örneklerde serbest fenilalanin içeriği analizi Kıvrak vd., (2014) yöntemine göre LC-MS/MS sisteminde yapılmıştır.

Diğer kimyasal analizler

Buğday unu ve FAUN örneklerinin; su tutma kapasitesi analizi AACC (2011) 56-20.01 standart metoda göre, suda çözünürlük ve su absorpsiyon indeksi analizleri Shi vd., (2016)'ya göre, kurumadde analizi Elgün vd., (2002)'ye göre, pH ve titrasyon asitliği analizi AACC (2011) 02-52 ve AACC (2011) 02-31.01 standart metodlarına göre, toplam protein analizi AACC (2011) 46-12 standart metoda göre ve enzime dirençli nişasta (EDN) analizi AACC (2011) 32-40 standart metoda göre dirençli nişasta enzim kiti (KRSTAR,

Megazyme Int. Wicklow, İrlanda) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Su aktivitesi analizi ise, su aktivitesi tayin cihazı (Aqua Lab 4TE, USA) kullanılarak yapılmıştır.

Fiziksel analizler

Buğday unu ve FAUN örneklerinin renk değerleri, renk ölçüm cihazının (Minolta CR 400, Konica Minolta, Japonya) ölçüm kabına alınan un örneklerinin 3 farklı noktasından ölçüm yapılmasıyla L^* , a^* ve b^* değerleri olarak belirlenmiştir (Protonotariou vd., 2014). Yığın yoğunluğu analizi ise Adeleke ve Odedeji (2010)'a göre gerçekleştirilmiştir.

Duyusal analiz

FAUN örneklerinin duyuusal tüketilebilirliğini belirlemek için FAUN ve kontrol örneği olarak buğday ununda, modifiye edilmiş Protonotariou vd., (2016) yöntemine göre bisküvi üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen bisküvilerin renk, koku, sertlik, çiğnenebilirlik, yapışkanlık, aromata ve genel beğeni özellikleri, 9 eğitilmiş panelist tarafından kontrol örneğine kıyasla 9 puanlık hedonik skala testine göre değerlendirilmiştir.

İstatistiksel analiz

Araştırmanın mide aşamasında 4 adet, ince bağırsak sindiriminin birinci aşamasında 3 adet ve ince bağırsak sindiriminin ikinci aşamasında ise 3 adet daha olmak üzere *in vitro* sindirim sürecinde toplam 10 adet ve FAL enziminin 240 dakikalık uygulanma sürecinde ise sürecin her 20 dakikasında 1 adet olmak üzere toplam 13 adet örnekleme 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.

BULGULAR VE TARTIŞMA**Mısır filizi enzim aktivitesi**

FAUN üretiminde kullanılan mısır filizi FAL enzim aktivitesinin maksimum olduğu çimlenmenin 7. günü ortalama 6.09 $\mu\text{mol/sa.g}$ taze ağırlık enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Literatürdeki yüksek FAL enzim aktivitesine sahip olan bir çeşit Japon mısırının (*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 $\mu\text{mol/sa.g}$ taze ağırlık olduğu tespit edilmiştir (López-Villalobos vd., 2014). FAL enzim aktivitesi ile ilgili yapılan bir başka çalışmada ise buğday filizinin enzim aktivitesi 1.37 $\mu\text{mol/sa.g}$ taze ağırlık olarak bulunmuştur (Goldson vd., 2008). FAL enzim aktivitesinin bitki çeşidi, ışık, tuz ve stres ile beraber değişebileceği bildirilmiştir (Şirin vd., 2016).

***In vitro* protein hidrolizi ve FAL enzim uygulamasının unun serbest fenilalanin içeriği üzerine etkisi**

Araştırmada kullanılan buğday ununun toplam amino asit içeriğine ait sonuçlar Çizelge 1’de ve bu unun *in vitro* sindirim ve FAL enzim uygulaması sonrasındaki serbest fenilalanin içeriklerine ait sonuçlar Çizelge 2’de verilmiştir. Araştırmada kullanılan buğday ununun toplam fenilalanin içeriğinin 6201 mg/kg olduğu tespit edilmiştir. Literatürde de buğday ununun toplam fenilalanin

içeriği 5270 mg/kg olduğu belirlenmiştir (Türkomp, 2015). *In vitro* protein sindirim sonrasında açığa çıkan serbest fenilalanin miktarının (629.33 mg/kg, Çizelge 2) bu değere göre yaklaşık 10 kat daha az olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun ince bağırsak mikrovilluslarına tutunmuş olarak görev yapan ve düşük molekül ağırlıklı peptitleri amino asitlere hidroliz eden proteaz (brush wall enzymes) enzimlerinin (Srichanun vd., 2014; Da Encarnação vd., 2015) *in vitro* sindirimde kullanılmamasından ve dolayısıyla proteinlerin tripeptit ve dipeptitlerden sonra amino asitlere kadar yeterince hidrolize olmamasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

In vitro protein sindiriminin mide, bağırsak birinci ve bağırsak ikinci aşama uygulamalarının ve FAL enzim uygulamasının unun serbest fenilalanin içeriği üzerine önemli bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.01$). *In vitro* sindirim sırasında proteinlerin amino asit ve düşük molekül ağırlıklı peptitlere hidrolize olması ve dolayısıyla serbest fenilalanin içeriğinin artması, yapılan *in vitro* sindirimin kısmen başarılı olduğunu göstermiştir. *In vitro* sindirim ve FAL enzim uygulamasının zamana bağlı olarak unun serbest fenilalanin içeriği üzerine etkisi Şekil 2’de gösterilmiştir. Unun serbest fenilalanin içeriğinin *in vitro* sindirimin başlangıcından sonuna kadar yaklaşık 15 kat arttığı ve FAL enzim uygulamasının başından (629.33 mg/kg) sonuna (287.85 mg/kg) kadar ise %54.2 azaldığı tespit edilmiştir. *Rhodosporidium toruloide*s mayasından izole edilen FAL enzimi ile çeşitli ticari protein hidrolizatlarında bulunan fenilalaninin azaltılmasının amaçlandığı bir çalışmada, reaksiyon koşullarında (42°C, pH 8.7) uygulanan FAL enziminin kazein asit hidrolizatındaki fenilalanin seviyesinin yaklaşık %92 oranında azaltıldığı ve diğer protein hidrolizatlarında da benzer sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Castañeda vd., 2015). Gliadin içermeyen buğday unundan düşük fenilalaninli tost ekmeği üretmek amacıyla yapılan başka bir çalışmada ise bu undan üretilen ekmeğin fenilalanin içeriğinin kontrol örneğine göre %43.2 azaltıldığı belirtilmiştir (Mohsen vd., 2010).

Çizelge 1. Araştırmada kullanılan buğday unun toplam amino asit içeriği (mg/kg.KM)
Table 1. The total amino acid content of wheat flour used in the research (mg/ kg.DM)

Amino asit <i>Amino acid</i>	Miktar <i>Quantity</i>	Amino asit <i>Amino acid</i>	Miktar <i>Quantity</i>
Fenilalanin <i>Phenylalanine</i>	6201	Valin <i>Valine</i>	5193
Aspartik asit <i>Aspartic acid</i>	4850	Methionin <i>Methionine</i>	1860
Glutamik asit <i>Glutamic acid</i>	43926	Triptofan <i>Tryptophane</i>	310
Asparjin <i>Asparagine</i>	112	Sistein <i>Cysteine</i>	1838
Serin <i>Serine</i>	5714	İzolösin <i>Isoleucine</i>	4363
Histidin <i>Histidine</i>	2702	Ornitin <i>Ornithine</i>	321
Glisin <i>Glycine</i>	4562	Lösin <i>Leucine</i>	8626
Treonin <i>Threonine</i>	3577	Lisin <i>Lysine</i>	2890
Sitrülin <i>Citruline</i>	78	Hidroksiprolin <i>Hydroxyproline</i>	299
Arjinin <i>Arginine</i>	5127	Sarkosin <i>Sarcosine</i>	100
Alanin <i>Alanine</i>	4042	Prolin <i>Proline</i>	19477
Tirozin <i>Tyrosine</i>	2923	Toplam amino asit <i>Total amino acid</i>	129100

n=2

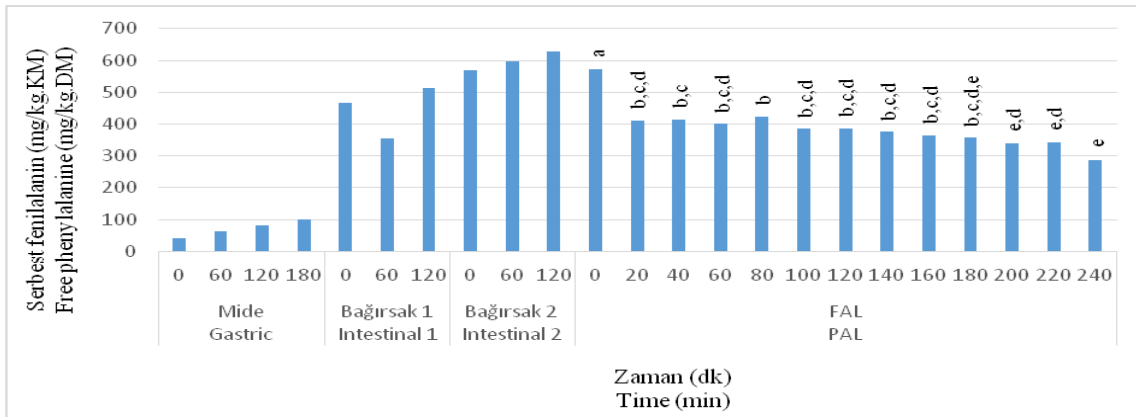
Çizelge 2. *In vitro* sindirim ve FAL enzim uygulamasının unun ortalama serbest fenilalanin içeriği üzerine etkisi

Table 2. Effect of *in vitro* digestion and PAL enzyme application on average free phenylalanine content of flour

Uygulama <i>Application</i>	Fenilalanin (mg/kg.KM) <i>Phenylalanine (mg/ kg.DM)</i>
Un <i>Flour</i>	40.93 ^e ± 2.78
Mide <i>Gastric</i>	99.62 ^d ± 25.81
Bağırsak 1 <i>Intestinal 1</i>	512.86 ^b ± 75.48
Bağırsak 2 <i>Intestinal 2</i>	629.33 ^a ± 142.23
FAL <i>PAL</i>	287.85 ^c ± 6.97
Önem <i>Significance</i>	**

Aynı sütündeki farklı harfler ortalamaların istatistiksel olarak önemli düzeyde ($P < 0.01$) farklı olduğunu gösterir.
n=2

The different letters in the same column indicate that the averages are statistically significantly ($P < 0.01$) different.



Şekil 2. *In vitro* sindirim ve FAL enzim uygulamasının unun serbest fenilalanin içeriği üzerine etkisi
Figure 2. Effect of *in vitro* digestion and PAL enzyme application on free phenylalanine content of flour

Buğday ununun ve FAUN'un bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri

Araştırmada kullanılan buğday unu ve FAUN'un bazı fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları Çizelge 3'te verilmiştir. Buna göre, FAUN'un suda çözünürlük indeksinin buğday ununa göre çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bunun, *in vitro* sindirim sırasında proteinlerin peptit ve amino asitlere hidrolize olmasından ve dolayısıyla suda çözünür kurumadde miktarının artmasından kaynaklandığı düşünülmüştür (Sharma vd., 2016; Bashir vd., 2017). FAUN'un yığın yoğunluğu değerinin buğday ununa göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun, proteinlerin hidroliz olmasıyla birim hacme daha çok kütle girmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Yapılan bir çalışmada tam buğday ununun yığın yoğunluğu 0.63 g/mL olarak tespit edilmiştir (Sakhare ve Prabhasankar, 2017). FAUN'un nem içeriği buğday ununa göre daha yüksek tespit edilmiştir. Bu durumun, proteinlerin hidrolizi sonucu oluşan serbest amino asit ve suda çözünür peptitlerin koligatif etkisinden kaynaklandığı değerlendirilmiştir. FAUN'un titrasyon asitliği değeri buğday ununa göre daha yüksek tespit edilmiştir. Buğday ununun titrasyon asitliği, Anonymous (2013)'e göre yüzde asit olarak sülfürik asit cinsinden kurumadede en çok %0.07 olarak belirtilmiştir. Buna göre buğday ununun titrasyon asitliği belirtilen değerler altındayken, FAUN'un 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. FAUN'un titrasyon asitliği değeri buğday ununa göre artarken, pH değeri buğday ununa göre değişmemiştir. Bu durumun nedeni, *in vitro* sindirim sırasında serbest miktarının artmasıyla bu amino asitlerin tamponlama özelliği göstermesi ve dolayısıyla pH değerinin değişmemesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Ade-Omowaye vd., (2008) tarafından yapılan bir çalışmada buğday ununun titrasyon asitliği %0.057, Adeleke ve Odedeji (2010) tarafından yapılan bir çalışmada buğday ununun pH değeri 6.01 olarak belirtilmiştir. FAUN ile buğday ununun toplam protein içeriği arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadığı ($P > 0.05$) tespit edilmiştir. Bu durumun *in vitro* protein sindiriminde ve FAL enzim uygulamasında unun azot içeriğinin ve dolayısıyla toplam protein içeriğinin değişmemesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Yapılan bir çalışmada ekmeklik buğday unularının protein içeriklerinin %11.85-13.44 arasında değiştiği belirtilmiştir (Yağdı, 2004). FAUN'un enzime dirençli nişasta içeriği buğday ununa göre yaklaşık 4 kat daha yüksek tespit edilmiştir. Bu durum, FAUN üretiminde uygulanan ısıtma, soğutma, pH ayarlama ve karıştırma işlemleri sırasında zedelenmiş nişasta granüllerindeki amiloz zincirlerinin granülden çıkararak yeniden düzenlenmesi ve kurutma ile de retrograde olarak Tip 3 dirençli nişastaya dönüşmesinden kaynaklandığı değerlendirilmiştir (Candal vd., 2016). Çeşitli nişasta türleri üzerine yüksek basınç ve sıcaklık uygulaması etkisinin araştırıldığı bir

çalışmada basınç ve sıcaklık arttıkça jelatinizasyon derecesinin arttığı ve sonucunda ise EDN içeriğinin arttığı bildirilmiştir (Papathanasiou vd., 2015). Unda EDN içeriğinin araştırıldığı bir başka

çalışmada ise ıslı işlem ve dondurma uygulaması yapılan un örneğinin, kontrol örneğine göre EDN içeriğinin yaklaşık 8 kat arttığı belirlenmiştir (Arcila ve Rose, 2015).

Çizelge 3. Araştırmada kullanılan unun ve FAUN'un bazı fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları
Figure 3. The results of some physical and chemical analysis of the flour used in research and FRP

Özellikler Properties	Un Flour	FAUN FRP	Önem Significance
Su tutma kapasitesi (g su/ g KM) Water holding capacity (g su/ g DM)	1.14 ^a ± 0.07	1.13 ^a ± 0.08	-
Su absorpsiyon indeksi (g/g) Water absorption index (g/g)	1.02 ^a ± 0.00	1.02 ^a ± 0.01	-
Suda çözünürlük indeksi (g/ 100 g) Water solubility index (g/ 100 g)	0.79 ^b ± 0.04	7.39 ^a ± 0.33	**
Yığın yoğunluğu (g/mL) Bulk density (g/mL)	0.69 ^b ± 0.01	1.03 ^a ± 0.01	**
Nem içeriği (%) Moisture content (%)	9.70 ^b ± 0.25	11.35 ^a ± 0.01	*
Su aktivitesi (a _w) Water activity (a _w)	0.47 ^a ± 0.01	0.41 ^a ± 0.03	-
pH pH	6.34 ^a ± 0.01	5.99 ^a ± 0.36	-
Titrasyon asitliği (% sülfürik asit cinsinden) Titratable acidity (% in sulfuric acid)	0.054 ^b ± 0.00	0.248 ^a ± 0.04	*
Toplam protein içeriği (%) Total protein content (%)	12.71 ^a ± 0.02	11.54 ^a ± 0.39	-
EDN (Enzime Dirençli Nişasta) içeriği (%) ERS (Enzyme Resistant Starch) content (%)	0.14 ^b ± 0.05	0.58 ^a ± 0.05	*

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların istatistiksel olarak önemli düzeyde ($P < 0.01$, $P < 0.05$) farklı olduğunu gösterir. n=2

The different letters on the same line indicate that the averages are statistically significantly ($P < 0.01$, $P < 0.05$) different.

Araştırmada kullanılan unun ve FAUN'un renk analizi sonuçları Çizelge 4'te verilmiştir. Buna göre, FAUN'un buğday ununa göre daha düşük bir L^* değerine ve dolayısıyla daha koyu bir renge sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun nedeninin *in vitro* sindirim sırasında oluşan serbest amino asitlerin süreçte ve özellikle unun kurutulma aşamasında Maillard reaksiyonuna

girerek enzimatik olmayan esmerleşme yoluyla ürünün rengini koyulaştırmasından 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).

Çizelge 4. Araştırmada kullanılan un ve FAUN'un renk analiz sonuçları
Figure 4. The results of color analysis of the flour used in research and FRP

Renk Color	Un Flour	FAUN FRP	Önem Significance
L^*	90.70 ^a ± 0.01	71.62 ^b ± 3.73	*
a^*	-4.91 ^a ± 0.02	-4.37 ^a ± 0.49	-
b^*	15.35 ^a ± 0.05	20.92 ^a ± 3.67	-

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların önemli düzeyde farklı olduğunu gösterir ($P < 0.05$). n=2

The different letters on the same line indicate that the averages are statistically significantly different ($P < 0.05$).

Duyusal değerlendirme

Araştırmada kullanılan undan ve FAUN'dan üretilen bisküvilerin duysal analiz sonuçları Çizelge 5'te verilmiştir. Buna göre, fenilalanin içeriğini azaltmak için yapılmış olan uygulamanın üretilen bisküvi örneklerinin tüm duysal özellikleri üzerine önemli ($P<0.01$, $P<0.05$) bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir. FAUN'dan

üretilen bisküvilerin, duysal 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 daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle FAUN ile üretilebilecek bir unlu mamulün FKU hastaları tarafından kabul edilebilir bulunabileceği değerlendirilmiştir.

Çizelge 5. Araştırmada kullanılan undan ve FAUN'dan üretilen bisküvilerin duysal analiz sonuçları
Figure 5. The results of sensory analysis of biscuits produced with flours used in the research

Özellikler <i>Properties</i>	Un <i>Flour</i>	FAUN <i>FRP</i>	Önem <i>Significance</i>
Renk <i>Color</i>	9.00 ^a	6.45 ^b ± 0.44	*
Koku <i>Odor</i>	9.00 ^a	5.82 ^b ± 0.19	**
Sertlik <i>Hardness</i>	9.00 ^a	7.95 ^b ± 0.06	**
Çiğnenebilirlik <i>Chewiness</i>	9.00 ^a	6.49 ^b ± 0.27	*
Yapışkanlık <i>Adhesiveness</i>	9.00 ^a	4.54 ^b ± 0.21	**
Aroma-Tat <i>Aroma-Flavor</i>	9.00 ^a	4.77 ^b ± 0.02	**
Genel Beğeni <i>General acceptance</i>	9.00 ^a	5.60 ^b ± 0.04	*

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların önemli düzeyde ($P<0.01$, $P<0.05$) farklı olduğunu gösterir. n=2
The different letters on the same line indicate that the averages are statistically significantly ($P<0.01$, $P<0.05$) different.

SONUÇ

Bu araştırmada, *in vitro* protein sindirimi yapılan un örneğine, fenilalanin içeriğini azaltmak amacıyla FAL enzimi içeren mısır filizi ekstraktı uygulanmış ve bu uygulamadan sonra un tekrar kurutularak FKU hastaları için fenilalanin içeriği azaltılmış bir un üretme yöntemi gerçekleştirilmiştir. Uygulanan *in vitro* protein sindiriminin un proteinlerini hidroliz ettiği ve serbest fenilalanin içeriğini yaklaşık 15 kat arttırdığı, mısır filizi ekstraktı FAL enzim uygulamasının ise bu serbest fenilalanin içeriğini yaklaşık %50 oranında azalttığı ve bu undan yapılan bisküvilerin de duysal olarak kabul edilebilir bulunduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma 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 da bu araştırmada önerilen yöntemle FKU hastalarına yönelik fenilalanin içeriği daha çok düşürülmüş tam gıda kaynaklarının üretilebileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

AACC (2011). American Association of Cereal Chemists, Approved Methods of Analysis. 11th Edition. rev. Methods 02-31. The Association: St. Paul, MN, the U.S.A.

AACC (2011). American Association of Cereal Chemists, Approved Methods of Analysis. 11th Edition. rev. Methods 02-52. The Association: St. Paul, MN, the U.S.A.

- AACC (2011). American Association of Cereal Chemists, Approved Methods of Analysis. 11th Edition. rev. Methods 32-40. The Association: St. Paul, MN, the U.S.A.
- AACC (2011). American Association of Cereal Chemists, Approved Methods of Analysis. 11th Edition. rev. Methods 46-12. The Association: St. Paul, MN, the U.S.A.
- AACC (2011). American Association of Cereal Chemists, Approved Methods of Analysis. 11th Edition. rev. Methods 56-20. The Association: St. Paul, MN, the U.S.A.
- Ade-Omowaye, B.I.O., Akinwande, B.A., Bolarinwa, I.F., Adebisi, A.O. (2008). Evaluation of tigernut (*Cyperus esculentus*) –wheat composite flour and bread. *Afr J Food Sci*, 2: 087-091.
- Adeleke R.O., Odedeji J.O. (2010). Functional Properties of Wheat and Sweet Potato Flour Blends. *Pakistan J Nutr*, 9(6): 535-538, doi: 10.3923/pjn.2010.535.538.
- Anonymous (2013). Türk Gıda Kodeksi. Buğday Unu Tebliği (2013/9). Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 2 Nisan 2013 tarih ve 28606 sayılı Resmî Gazete, Ankara.
- Arcila, J.A., Rose, D.J. (2015). Repeated cooking and freezing of whole wheat flour increases resistant starch with beneficial impacts on in vitro fecal fermentation properties. *J Funct Food*, 12: 230–236, doi: 10.1016/j.jff.2014.11.023.
- Aykın-Dinçer, E., Koç, A., Erbaş, M. (2017). Extraction and physicochemical characterization of broiler (*Gallus gallus domesticus*) skin gelatin compared to commercial bovine gelatin. *Poult Sci*, 96(11): 4124–4131, doi: 10.3382/ps/pex237.
- Babaoğlu-Aydaş, S., Ozturk, S., Aslım, B. (2013). Phenylalanine ammonia lyase (PAL) enzyme activity and antioxidant properties of some cyanobacteria isolates. *Food Chem*, 136(1): 164–169, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.07.119.
- Babaoğlu-Aydaş, S., Şirin, S., Aslım, B. (2016). Biochemical analysis of *Centaurea depressa* phenylalanine ammonia lyase (PAL) for biotechnological applications in phenylketonuria (PKU). *Pharm Biol*, 54(12): 2838–2844.
- Bannick, A.A., Laufman, J.D., Edwards, H.L., Ventimiglia, J., Feldman, G.L. (2015). Outcomes of referrals to Child Protective Services for medical neglect in patients with phenylketonuria: Experiences at a single treatment center. *Mol Genet Metab*, 115(4): 151-6, doi: 10.1016/j.ymgme.2015.06.003.
- Banta-Wright, S.A., Kodadek, S.M., Steiner R.D. Houck, G.M. (2015). Challenges to breastfeeding infants with phenylketonuria. *J Pediatr Nurs*, 30: 219–226, doi: 10.1016/j.pedn.2014.05.003.
- Barron, C.C., Sponagle, B.J.D., Arivalagan, P., D’cunha, G.B. (2017). Optimization of oligomeric enzyme activity in ionic liquids using *Rhodotorula glutinis* yeast phenylalanine ammonia lyase. *Enzyme Microb Technol*, 96: 151–156, doi: 10.1016/j.enzmictec.2016.10.010.
- Bashir, K., Swer, T.L., Prakash, K.S., Aggarwal, M. (2017). Physicochemical and functional properties of gamma irradiated whole wheat flour and starch. *LWT - Food Sci Technol*, 76: 131-139, doi: 10.1016/j.lwt.2016.10.050.
- Candal, C., Kılıç, Ö., Erbaş, M. (2016). Enzime Dirençli Nişasta Üretim Yöntemleri ve Gıda Endüstrisinde Kullanım Amaçları. *GIDA* 41(6): 419-426, doi: 10.15237/gida.GD16015.
- Carreira, R.L., Silva, M.R., Starling, A.L.P., Agiar, M.J.B., Janeiro, J.N., Silvestre, P.C.M. (2008). Association of Two Enzymes for Obtaining Low Phenylalanine Protein Hydrolysates from Wheat Flour. *Int J Food Eng*, 4(7), doi: 10.2202/1556-3758.1544.
- Castañeda, M.T., Adachi, O., Hours, R.A. (2015). Reduction of L-phenylalanine in protein hydrolysates using L-phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodospiridium toruloides*. *J Ind Microb Biotech*, 42(10): 1299-307. doi: 10.1007/s10295-015-1664-z.
- Cleary, M.A. (2014). Phenylketonuria. Symposium: Inborn Errors of Metabolism. *Paediatr Child Health*, 25: 3.
- Crujeiras, V., Aldámiz-Echevarría, L. Dalmau, J., Vitoria, I., Andrade, F., Roca, I., Leis, R., Fernandez-Marmiesse, A., Couce, M.L. (2015). Vitamin and mineral status in patients with

- hyperphenylalaninemia. *Mol Genet Metab*, 115: 145–150, doi: 10.1016/j.yimgme.2015.06.010.
- Da Encarnaçao, J.A., Farrell, T.L., Ryder, A., Kraut, N.U., Williamson, G. (2015). In vitro enzymic hydrolysis of chlorogenic acids in coffee. *Mol Nutr Food Res*, 59(2): 231–239, doi: 10.1002/mnfr.201400498.
- Elgün, A., Ertugay, Z., Certel, M., Kotancılar, H.G. (2002). *Tabul ve Ürünlerinde Analitik Kalite Kontrolü Laboratuvar Uygulama Kılavuzu*, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi: 335, Erzurum, Türkiye, 245 s.
- Evans, S., Daly, A., Chahal, S., Ashmore, C., MacDonald, J., MacDonald, A. (2018). The influence of parental food preference and neophobia on children with phenylketonuria (PKU). *Mol Genet Metab Rep*, 14: 10–14, doi: 10.1016/j.yimgmr.2017.10.007.
- Fennema, O.W. (1996). *Food Chemistry*. Marcel Dekker Inc., New York, the USA, 1067 p.
- Gianfrani, C., Camarca, A., Mazzarella, G., Di Stasio, L., Giardullo, N., Ferranti, P., Picariello, G., Rotondi Aufiero, V., Picascia, S., Troncione, R., Pogna, N., Auricchio, S., Mamone, G. (2015). Extensive in vitro gastrointestinal digestion markedly reduces the immune-toxicity of *Triticum monococcum* wheat: Implication for celiac disease. *Mol Nutr Food Res*, 59(9): 1844–1854, doi: 10.1002/mnfr.201500126.
- Goldar, P., Givianrad, M.H., Shams, A. (2016). Effect of ultrafiltered milk permeate and non-dairy creamer powder concentration on low phenylalanine yoghurt's physicochemical properties during storage. *J Food Sci Technol*, 53(7): 3053–3059.
- Goldson, A., Lam, M., Scaman, C.H., Clemes, S., Kermode, A. (2008). Screening of phenylalanine ammonia lyase in plant tissues and retention of activity during dehydration. *J Sci Food Agric*, 88(4): 619–625, doi: 10.1002/jsfa.3126.
- Ho, G., Ueda, K., Houben, R.F.A., Joa, J., Giezen, A., Cheng, B., Van Karnebeek, C.D.M. (2016). Metabolic Diet App Suite for inborn errors of amino acid metabolism. *Mol Genet Metab*, 117(3): 322–327, doi: 10.1016/j.yimgme.2015.12.007.
- Karadeniz, Y. (2013). Fenilketonürlü Çocukların Ebeveynlerinin Duygu Durumları ve Gelecekle İlgili Beklentileri. Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Diyarbakır, Türkiye, 50 s.
- Kıvrak, I., Kıvrak, S., Harmandar, M. (2014). Free amino acid profiling in the giant puffball mushroom (*Calvatia gigantea*) using UPLC–MS/MS. *Food Chem*, 158, 88–92.
- Kose, E., Aksoy, B., Kuyum, P., Tuncer, N., Arslan, N., Ozturk, Y. (2018). The Effects of Breastfeeding in Infants With Phenylketonuria. *J Pediatr Nurs*, 38, 27–32.
- Köksal, G., Gökmen Özel, H. (2012). *Metabolik Hastalıklarda Beslenme*. Reklam Kurdu Ajans Org. Tan. Tas. Rek. San. Tic. Ltd. Şti., Ankara, Türkiye, 40 s. ISBN: 978-975-590-244-9.
- Lam, M., Scaman, C.H., Clemens, S., Kermode, A. (2008). Retention of Phenylalanine Ammonia-lyase Activity in Wheat Seedlings during Storage and in Vitro Digestion. *J Agric Food Chem*, 56(23): 11407–12, doi: 10.1021/jf8021942.
- Liemburg, G.B., Jahja R., Spronsen, F.J., de Sonnevile, L.M., van der Meere, J.J., Bosch, A.M., Hollak, C.E., Rubio-Gozalbo, M.E., Brouwers, M.C., Hofstede, F.C., Vries, M.C., Janssen, M.C., van der Ploeg, A.T., Langendonk, J.G., Huijbregts, S.C., (2015). Is Brief A Useful Instrument in Day To Day Care of Patients with Phenylketonuria?. *Mol Genet Metab*, 114: 425–430, doi: 10.1016/j.yimgme.2014.12.302.
- López-Villalobos, A., Lucker, J., López-Quiróz, A.A., Yeung, E.C., Palma, K., 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(3): 436–445, doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.03.003.
- MacDonald, A., Rocha, J.C., Van Rijn, M., Feillet, F. (2011). Nutrition in phenylketonuria. *Mol Genet Metab*, 104: 10–18, doi: 10.1016/j.yimgme.2011.08.023.
- Martínez, M.M., Pico, J., Gómez, M. (2015). Physicochemical modification of native and

- extruded wheat flours by enzymatic amylolysis. *Food Chem*, 167: 447–453.
- McInnis, S., Clemens, S., Kermod, 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 Rep*, 28: 503–515, doi: 10.1007/s00299-008-0650-6.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S., Weitschies, W., Brodtkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food –an international consensus. *Food Funct*, 5(6): 1113–1124, doi: 10.1039/c3fo60702j.
- Mohsen, S.M., Yaseen, A.A., Ammar, A.M., Mohammad, A.A. (2010). Quality characteristics improvement of low-phenylalanine toast bread. *Int J Food Sci Technol*, 45: 2042–205, doi: 10.1111/j.1365-2621.2010.02365.x.
- Ney, D.M., Stroup, B.M., Clayton, M.K., Murali, S.G., Rice, G.M., Rohr, F., Levy, H.L. (2016). Glycomacropeptide for nutritional management of phenylketonuria: a randomized, controlled, crossover trial. *Am J Clin Nutr*, 104(2): 334–345, doi: 10.3945/ajcn.116.135293.
- Oliveira, L.C., Schmiele, M., 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 Sci Technol*, 75: 261–270, doi: 10.1016/j.lwt.2016.08.064.
- Özer, E.A., İbanoğlu, Ş., İbanoğlu, E. (2008). Fenilketonüri Hastalığı ve Fenilalanin Kısıtlı Diyet. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs 2008, Erzurum, Türkiye, 1139 s.
- Papathanasiou, M.M., Reineke, K., Gogou, E., Taoukis, P.S., Knorr, D. (2015). Impact of high pressure treatment on the available glucose content of various starch types: A case study on wheat, tapioca, potato, corn, waxy corn and resistant starch (RS3). *Innov Food Sci Emerg*, 30: 24–30, doi: 10.1016/j.ifset.2015.05.003.
- Picariello, G., Miralles, B., Mamone, G., Sánchez-Rivera, L., Recio, I., Addeo, F., Ferranti, P. (2015). Role of intestinal brush border peptidases in the simulated digestion of milk proteins. *Mol Nutr Food Res*, 59(5): 948–956, doi: 10.1002/mnfr.201400856.
- Pimentel, F., Alves, R.C., Costa, A.S.G., Torres, D., Almeida, M.F., Beatriz, M., Oliveira, P.P. (2014). Phenylketonuria: Protein content and amino acids profile of dishes for phenylketonuric patients. The relevance of phenylalanine. *Food Chem*, 149: 144–150, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.10.099.
- Pinto, A., Almeida, M.F., Ramos, P.C., Rocha, S., Guimas, A., Ribeiro, R., Martins, E., Bandeira, A., Macdonald, A., Rocha, J.C. (2017). Nutritional status in patients with phenylketonuria using glycomacropeptide as their major protein source. *Eur J Clin Nutr*, 71(10): 1230–1234, doi: 10.1038/ejcn.2017.38.
- Protonotariou, S., Drakos, A., Evageliou, V., Ritzoulis, C., Mandala, I. (2014). Sieving fractionation and jet mill micronization affect the functional properties of wheat flour. *J Food Eng*, 134: 24–29, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2014.02.008.
- Protonotariou, S., Batzaki, C., Yanniotis, S., Mandala, I. (2016). Effect of jet milled whole wheat flour in biscuits properties. *LWT - Food Sci Technol*, 74: 106–113.
- Ramírez, A.M., Rodríguez-López, A., Ardila, A., Beltran, L., Patarroyo, C.A., Del Pilar Melendez, A., Sánchez, O.F., Alméciga-Díaz, C.J. (2017). Production of human recombinant phenylalanine hydroxylase in *Lactobacillus plantarum* for gastrointestinal delivery. *Eur J Pharm Sci*, 109: 48–55, doi: 10.1016/j.ejps.2017.07.033.
- Rohr, F., Wessel, A., Brown, M., Charette, K., Levy, H.L. (2015). Adherence to tetrahydrobiopterin therapy in patients with phenylketonuria. *Mol Genet Metab*, 114(1): 25–8, doi: 10.1016/j.ymgme.2014.10.013.
- Sakhare, S.D., Prabhasankar, P. (2017). Effect of roller milled fenugreek fiber incorporation on

- functional, thermal and rheological characteristics of whole wheat flour. *Food Measure*, 11(3): 1315–1325, doi: 10.1007/s11694-017-9509-2.
- Sarkissian, C., Gámez, A. (2005). Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now?. *Mol Genet Metab*, 86: 22–26.
- Sharma, S., Saxena, D.C., Riar, C.S. (2016). Nutritional, sensory and in-vitro antioxidant characteristics of gluten free cookies prepared from flour blends of minor millets. *J Cereal Sci*, 72: 153-161, doi: 10.1016/j.jcs.2016.10.012.
- Shi, L., Li, W., Sun, J., Qiu, Y., Wei, X., Luan, G., Hu, Y., Tatsumi, E. (2016). Grinding of maize: The effects of fine grinding on compositional, functional and physicochemical properties of maize flour. *J Cereal Sci*, 68: 25-30, doi: 10.1016/j.jcs.2015.11.004.
- Srichanun, M., Tantikitti, C., Kortner, T.M., Krogdahl, Å., 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, doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.03.004.
- Strisciuglio, P., Concolino, D. (2014). New Strategies for the Treatment of Phenylketonuria (PKU). *Metabolites*, 4(4): 1007-1017, doi: 10.3390/metabo4041007.
- Şirin, S., Babaoğlu-Aydaş, S., Aslım, B. (2016). Biochemical Evaluation of Phenylalanine Ammonia Lyase from Endemic Plant *Cyathobasis fruticulosa* (Bunge) Aellen for the Dietary Treatment of Phenylketonuria. *Food Technol Biotechnol*, 54(3): 296–303.
- TÜRKOMP (2015). Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı. <http://www.turkomp.gov.tr/compare> (Accessed: 26 January 2018).
- Üstüner Top, F., Küçük Alemdar, D. (2015). Fenilketonürlü Çocuğu Olan Ailelerinin Yaşadıkları Güçlükler: Niteliksel Bir Çalışma. *Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Dergisi*, 12(1): 62-68.
- Vieira Neto, E., Maia Filho, H.S., Monteiro, C.B., Carvalho, L.M., Tonon, T., Vanz, A.P., Schwartz, I.V.D., Ribeiro, M.G. (2018). Quality of life and adherence to treatment in early-treated Brazilian phenylketonuria pediatric patients. *Braz J Med Biol Res*, 51(2): e6709, doi: 10.1590/1414-431X20176709.
- Yağdı, K. (2004). Bursa Koşullarında Geliştirilen Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Hatlarının Bazı Kalite Özelliklerinin Araştırılması. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18(1): 11-23.