



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü



**İKİ AŞAMALI EMÜLSİYON YÖNTEMİYLE  
ÜRETİLEN PEYNİR ALTI SUYU  
MİKRO-PARÇACIKLARININ FİZİKOKİMYASAL  
ÖZELLİKLERİ VE KEFİRDE KULLANILMASI**

**Doktora Tezi**

Alev Emine İNCE COŞKUN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

İzmir  
2022

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü

**İKİ AŞAMALI EMÜLSİYON YÖNTEMİYLE  
ÜRETİLEN PEYNİR ALTI SUYU  
MİKRO-PARÇACIKLARININ FİZİKOKİMYASAL  
ÖZELLİKLERİ VE KEFİRDE KULLANILMASI**

Alev Emine İNCE COŞKUN

Danışman: Prof. Dr. Özgül ÖZDESTAN OCAK

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı  
Gıda Mühendisliği Doktora Programı

İzmir  
2022



**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ****ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum **“İki Aşamalı Emülsiyon Yöntemiyle Üretilen Peynir Altı Suyu Mikro-Parçacıklarının Fizikokimyasal Özellikleri ve Kefirde Kullanılması”** başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

10 / 2 / 2022

Alev Emine İNCE COŞKUN



## ÖZET

# İKİ AŞAMALI EMÜLSİYON YÖNTEMİYLE ÜRETİLEN PEYNİR ALTI SUYU MİKRO-PARÇACIKLARININ FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ VE KEFİRDE KULLANILMASI

İNCE COŞKUN, Alev Emine

Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özgül ÖZDESTAN OCAK

Şubat 2022, 199 sayfa

Proteinler, insan vücudunda hem yapısal hem de fonksiyonel özelliklere sahiptir. Bu nedenle proteinler beslenmede önemli yer tutmaktadır. Gıdalardaki proteinlerin, doygunluk hissini arttırma, kas ve kemik gelişimini destekleme gibi fonksiyonel özellikleri bulunmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı proteinler, yaşlıların, obezite hastalarının ve sporcuların beslenmesinde özel bir öneme sahiptir. Bu tür grupların beslenmelerinde proteini arttırılmış gıdalar kullanılmaktadır. Ancak, bu gıdaların işlenmesi zordur, çünkü işleme sırasında proteinler yapısal olarak değişmekte ve kıvam artışı, bulanıklık, jelleşme gibi istenmeyen sonuçlara neden olabilmektedir. Bu olumsuz sonuçları engellemek için uygulanan yöntemlerden bir tanesi proteinlerin kontrollü şekilde denatüre edilmesidir. Bu projede, peynir altı suyu (PAS) proteinleri iki aşamalı emülsifikasyon adı verilen bir yöntemle mikron boyutunda parçacıklar haline getirilmiş, bu parçacıkların dispersiyon içindeki davranışları incelenmiş ve parçacıklar kefirde fonksiyonel bileşen olarak kullanılmıştır.

PAS proteini parçacıklarının NaCl, MgCl<sub>2</sub> ve AlCl<sub>3</sub> tuzlarının varlığında davranışları incelenmiş ve parçacıkların +1, +2 ve +3 değerlikli katyonların bulunduğu ortamlarda DLVO teorisinden türetilen Schulze-Hardy kuralına uygun davrandığı tespit edilmiştir. Ayrıca, +2 ve +3 değerlikli iyonların bulunduğu sistemlerde spesifik iyon etkisi gözlemlenmiştir. Tuz iyonlarının varlığında, PAS proteini parçacıkları koloidal parçacıklar gibi davranmıştır.

Isıl işlemlerin etkisini görebilmek için, PAS proteini parçacıklarının ısı stabilitesi, protein ve polisakkarit içeren farklı ortamlarda araştırılmıştır. Arap zampının bulunduğu sistemlerde, parçacıklar ısıya karşı dayanıklı hale gelmiştir. Isı stabilitesini sağlayan mekanizmanın, protein parçacıkları ve Arap zampı arasındaki sterik etkileşim olduğu düşünülmektedir.

PAS proteini parçacıkları, köpük sistemlerinde kullanılarak yüzey aktif özellikleri incelenmiş ve parçacıkların elektriksel yüklerinin yüksek olmasının köpük stabilitesini arttırdığı tespit edilmiştir. Bu durum, ham proteinlerin davranışlarından farklıdır ve PAS proteini parçacıklarının kolloidal özellikte olduğunun farklı bir göstergesidir.

Fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenen PAS proteini parçacıkları, kefirde proteini arttırmak ve serum ayrılması problemini geciktirmek amaçlı kullanılmıştır. Kefirde protein içerikleri farklı olan iki tür PAS proteini parçacığı kullanılmıştır. Protein içeriği yüksek olan parçacıklar, kefirdeki protein miktarını, fizikokimyasal ve duyuşsal özellikleri bozulmadan, 2 katına çıkarabilmiştir. Protein içeriği düşük olan parçacıklar ise kefirdeki serum ayrılmasını geciktirmiştir. Mikro-yapıları farklı PAS proteini parçacıkları, yapı-fonksiyon ilişkisine bir örnek oluşturmuştur. Kefir örnekleri biyojen amin açısından da analiz edilmiş ancak konsantrasyonları güvenli sınırların içerisinde bulunmuştur. Depolama süresince yapılan analizlerde, biyojen aminlerin hem oluştuğı hem de degrade olduğuna tespit edilmiştir.

Bu çalışma, esnek bir yöntem olan iki aşamalı emülsifikasyon yöntemiyle üretilen PAS proteini parçacıklarının fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesinde ve bu parçacıkların ilk defa kefirde kullanılmasında öncüdür. Parçacıkların olası kullanım alanlarının protein miktarı arttırılmış gıdalar, kontrollü salınım sistemleri ve enkapsülasyon uygulamaları olabileceğı öngörülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** Arap zampı, biyojen amin, çok değerlikli iyon, dekstran, fonksiyonel gıda, ısı stabilitesi, kolloidal stabilite, köpük stabilitesi, kritik koagülasyon konsantrasyonu, protein parçacığı, sertlik, tiramin, yumuşak parçacık

**ABSTRACT****INVESTIGATION OF PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF WHEY PROTEIN MICRO-PARTICLES PRODUCED USING TWO-STEP EMULSIFICATION METHOD AND THEIR USE IN KEFIR**

İNCE COŞKUN, Alev Emine

PhD in Food Eng.

Supervisor: Prof. Dr. Özgül ÖZDESTAN OCAK

February 2022, 199 pages

Proteins have both structural and functional properties in the human body. Therefore, proteins are important in human nutrition. Food proteins have functional properties such as increasing satiety and supporting muscle and bone development. Due to these properties, proteins have special importance in the nutrition of the elderly, obese, and sportsmen. In the nutrition of such groups, protein-enriched foods are used. However, the processing of protein-enriched foods is challenging because the proteins undergo structural changes which may cause unwanted results such as increased viscosity, turbidity, or gelation. One of the methods to prevent these unwanted outcomes is the controlled denaturation of the proteins. In this project, whey protein isolate (WPI) micro-particles were produced by using two-step emulsification method, the behavior of these particles in the dispersion was investigated, and the particles were used as functional components in kefir.

The behaviour of WPI particles in the presence of NaCl, MgCl<sub>2</sub>, and AlCl<sub>3</sub> salts was investigated and it was determined that the particles behave in accordance with the Schulze-Hardy rule, which was derived from the DLVO theory. In addition, specific ion effects were observed in systems with divalent and trivalent ions. WPI particles behaved like colloidal particles in the presence of salt ions.



To see the effect of heat treatment, the heat stability of WPI particles was investigated in different media containing protein and polysaccharides. In systems containing gum Arabic, WPI particles became heat stable. The mechanism behind this is thought to be the steric interaction between protein particles and gum Arabic.

By using WPI particles in foam systems, the surface-active properties were examined and it was determined that particles with high electrostatic charges increased the foam stability. This behaviour is different from the behaviour of native proteins and this situation is another indication of the colloidal nature of WPI particles.

WPI particles, whose physical and chemical properties were determined, were used to increase the protein content in kefir and to retard the serum separation. Two types of WPI particles with different protein contents were used in kefir. Dense WPI particles could double the protein amount in kefir without changing the physicochemical and sensory properties of the plain one. Soft WPI particles, with low protein content, delayed serum separation. WPI particles with different microstructures provided a good example of a structure-function relationship. Kefir samples were also analyzed for biogenic amine content that could pose a risk; however, the total biogenic amine content was found within the safe limits. During the storage of kefir samples, it was found that biogenic amines were both formed and degraded.

With this study, WPI particles, produced by using a flexible method called two-step emulsification, were investigated in terms of their physical and chemical properties and used in kefir for the first time. The possible use areas of these particles could be protein-enriched foods, controlled release systems, and encapsulation applications.

**Keywords:** biogenic amine, colloidal stability, critical coagulation concentration, dextran, foam stability, functional food, gum Arabic, hardness, heat stability, multivalent ion, protein particle, soft particle, tyramine

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasına proteini arttırılmış gıdaların işlenmesi sırasındaki zorlukların bir kısmının giderilmesini amaçlayarak başladım. Proteinlerin ısı işlemlere dayanıklı hale gelmesini iki aşamalı emülsifikasyon yöntemiyle mikro-parçacıklar üreterek gerçekleştirdim. Bu şekilde elde edilen parçacıkların, ham proteinlerden farklı özellikler kazandığını düşünerek, tuz iyonları ile etkileşimleri, yüzey aktif özellikleri gibi farklı fiziksel ve kimyasal özelliklerini inceledim. Tezimin son aşamasında ise bu parçacıkları kefirde kullanarak, proteini arttırılmış fonksiyonel bir içecek elde ettim.

Çalışma kapsamında, peynir altı suyu proteini parçacıklarının fiziksel ve kimyasal özelliklerini detaylı bir şekilde inceleyerek, parçacıkların farklı davranışlarına sebep olan mekanizmaları tartıştım. Parçacıkların eklenmesiyle kefirde gerçekleşen fiziksel ve kimyasal değişiklikleri detaylı olarak araştırdım. Elde edilen verilerin, proteini arttırılmış gıdalar da dahil olmak üzere, kontrollü salınım sistemleri, enkapsülasyon uygulamaları gibi alanlarda da kullanılabileceğini düşünmekteyim.

İZMİR

10 / 2 / 2022

Alev Emine İNCE COŞKUN



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

İÇ KAPAK .....	ii
KABUL ONAY SAYFASI.....	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	iii
ÖZET .....	v
ÖNSÖZ .....	ix
İÇİNDEKİLER.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xv
TABLolar DİZİNİ .....	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xxiii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	5
2.1. Proteinlerin Yapısı ve Genel Özellikleri.....	5
2.2. Peynir Altı Suyu (PAS) Proteinlerinin Genel Özellikleri .....	8
2.3. Protein Parçacıklarının Üretim Yöntemleri ve Genel Özellikleri .....	11
2.4. Protein Parçacıklarının İyonik Ortamlardaki Davranışları .....	15
2.4.1. DLVO teorisi yaklaşımı.....	19
2.4.2. Spesifik iyon etkisi yaklaşımı .....	22
2.5. Protein Parçacıklarının Isı Stabiliteleri .....	23
2.6. Proteinlerin ve Protein Parçacıklarının Yüzey Aktif Özellikleri .....	29
2.7. Proteince Zenginleştirilmiş Gıdalar .....	37
2.8. Fonksiyonel Bir İçecek Olarak Proteince Zenginleştirilmiş Kefir .....	40
2.9. Biyojen Aminler .....	42
2.10. Tezin Konusu ve Amacı .....	48
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	50
3.1. Materyal .....	50
3.2. Yöntem .....	50
3.2.1. Peynir altı suyu (PAS) proteini parçacıklarının ve dispersiyonların hazırlanması.....	50

## İÇİNDEKİLER (devam)

3.2.2.	Deneme deseni.....	53
3.2.3.	Parçacıkların karakterizasyonu.....	55
3.2.4.	pH ölçümü ve ayarlanması.....	57
3.2.5.	Makro jellerin hazırlanması ve sıkıştırma testi .....	58
3.2.6.	Tuz içeren dispersiyonların hazırlanması, stabilite incelemesi ve iyonik kuvvet hesaplanması.....	58
3.2.7.	Arap zıncığı ve dekstran içeren dispersiyonların hazırlanması, ısıtılması ve parçacıkların şişme oranlarının hesaplanması.....	60
3.2.8.	Ozmotik basınç ölçümleri .....	60
3.2.9.	Reolojik ölçümler .....	61
3.2.10.	Dispersiyon ve çözeltilerden köpük hazırlanması ve stabilite incelemesi.....	62
3.2.11.	Optik mikroskop görüntülemesi .....	64
3.2.12.	Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülemesi .....	64
3.2.13.	Kefir örneklerinin hazırlanması ve kefirdeki analizler .....	65
3.2.14.	Duyusal analiz .....	71
3.2.15.	İstatistiksel analiz .....	72
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	73
4.1.	Peynir Altı Suyu (PAS) İzolatı Parçacıklarının Karakterizasyonu .....	73
4.1.1.	İki aşamalı emülsifikasyon yöntemiyle parçacıkların üretilmesi ....	73
4.1.2.	Parçacıkların boyutları .....	75
4.1.3.	Parçacıkların elektriksel yükleri .....	78
4.1.4.	Parçacıkların hacimsel oranları ve yoğunlukları .....	80
4.1.5.	Parçacıklardaki protein konsantrasyonu .....	81
4.2.	PAS Proteini Parçacıklarının Tuz İyonlarıyla Etkileşimi .....	83
4.2.1.	Görsel gözlemler.....	83
4.2.2.	DLVO teorisi yaklaşımı .....	90
4.2.3.	Spesifik iyon etkisi yaklaşımı.....	96
4.3.	PAS Proteini Parçacıklarının Isı Stabiliteleri .....	98
4.3.1.	Parçacıkların boyut dağılımları .....	98
4.3.2.	Parçacıkların dinamik viskoziteleri ve şişme oranları .....	103

## İÇİNDEKİLER (devam)

4.3.3.	Dispersiyonların reolojik özellikleri.....	108
4.4.	PAS Proteini Parçacığı Dispersiyonlarının Köpüklenme Özellikleri...	112
4.4.1.	PAS proteini parçacıklarının boyutlarının köpüklenme özelliklerine etkisi.....	113
4.4.2.	PAS proteini parçacıklarının sertliğinin köpüklenme özelliklerine etkisi.....	117
4.4.3.	PAS proteini parçacıklarının elektriksel yüklerinin köpüklenme özelliklerine etkisi.....	121
4.4.4.	Farklı pH ve konsantrasyondaki ham PAS proteini çözeltilerinin köpüklenme özellikleri.....	129
4.5.	PAS Proteini Parçacıklarının Kefirde Kullanımı.....	134
4.5.1.	Kefir örneklerindeki protein konsantrasyonu.....	135
4.5.2.	Duyusal analiz.....	138
4.5.3.	Renk analizi.....	139
4.5.4.	Kefir örneklerindeki yağ ve kuru madde miktarı.....	141
4.5.5.	pH değerleri ve titrasyon asitliği.....	142
4.5.6.	Kayma viskozitesi.....	143
4.5.7.	Serum ayrılması.....	145
4.5.8.	Toplam serbest amino asit (TSAA) değerleri.....	147
4.5.9.	Biyojen amin değerleri.....	148
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER .....	153
	KAYNAKLAR DİZİNİ.....	159
	TEŞEKKÜR.....	196
	ÖZGEÇMİŞ.....	197
	EKLER.....	..



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Amino asitlerin genel yapısı .....	5
Şekil 2.2. Proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları.....	6
Şekil 2.3. Proteinlerin ısı ile denatürasyonu .....	7
Şekil 2.4. İki aşamalı emülsifikasyon yönteminin şematik gösterimi .....	13
Şekil 2.5. İki aşamalı emülsifikasyon yöntemiyle pH 6.8’de ve pH 5.5’te üretilmiş PAS proteini parçacıklarının SEM görüntüleri .....	14
Şekil 2.6. pH 6.8 ve pH 5.5’te üretilen PAS proteini mikro-parçacık dispersiyonlarının farklı pH değerlerindeki stabiliteeleri.....	15
Şekil 2.7. pH 6.8’de üretilen PAS proteini parçacığının kademeli pH değişimi ile boyutunun değişiminin CLSM görüntülemesi .....	16
Şekil 2.8. Sodyum kazeinat parçacıklarının farklı pH ortamlarındaki bütünlükleri.....	17
Şekil 2.9. Jelatin parçacıklarının farklı pH ortamlarındaki bütünlükleri .....	17
Şekil 2.10. Stabil parçacıkların DLVO teorisine göre interaksyon enerjilerinin gösterimi.....	20
Şekil 2.11. Sodyum kazeinat parçacığının (a) ısıtılmadan önceki ve (b) ısıtıldıktan sonraki SEM görüntüsü.....	24
Şekil 2.12. Arap zamkının (a) arabinogalaktan omurga ve (b) glikoprotein yan dalının kimyasal yapısı .....	26
Şekil 2.13. PAS proteinleri ile Arap zamkının olası elektrostatik etkileşiminin gösterimi.....	27
Şekil 2.14. Sürfaktanların ara yüzeydeki dağılımı ve sağladığı stabilite .....	29
Şekil 2.15. Emülsiyon sistemlerinde görülen destabilizasyon mekanizmaları .....	30
Şekil 2.16. Köpük sistemlerinde görülen destabilizasyon mekanizmaları .....	31
Şekil 2.17. Pickering emülsiyonların oluşum mekanizması .....	34
Şekil 2.18. Farklı biyopolimer ve biyo-parçacıkların SEM görüntüleri.....	35



## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil 2.19. Yüzey yapıları farklı silika nano-parçacıklarının SEM görüntüleri....	36
Şekil 2.20. Biyojen aminlerin oluşum mekanizmaları.....	43
Şekil 2.21. Biyojen aminlerden bazılarının kimyasal yapıları .....	44
Şekil 3.1. (a) Yüksek hızlı karıştırıcı ve (b) basınçlı homojenizatör .....	52
Şekil 3.2. PAS proteini parçacıklarının üretim aşamalarının şematik gösterimi	53
Şekil 3.3. Köpüklendirme kolonunun şematik gösterimi.....	63
Şekil 3.4. Duyusal analiz puanlama testi.....	72
Şekil 4.1. PAS proteini parçacıklarının basınçlı homojenizatörle homojenize edilmeden (a) önceki ve (b) sonraki mikroskop görüntüleri .....	73
Şekil 4.2. (a) 8000 devir/dk'da pH 6.8'de oluşturulan PAS proteini parçacığının distile su içinde ısıtılmadan önce ve ısıtıldıktan sonraki boyut dağılımları (b) 10000, 7000 ve 4000 devir/dk'da pH 6.8'de oluşturulan parçacıkların boyut dağılımları.....	76
Şekil 4.3. Ham PAS proteini, pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacığı ve pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacığının farklı pH ortamlarındaki zeta potansiyel değerleri .....	78
Şekil 4.4. pH 6.8 ve pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıklarının dispersiyonun pH değerine göre dağılım oranları .....	79
Şekil 4.5. %20, %25 ve %30 PAS proteini çözeltisi ile hazırlanan makro jellerin kuvvet-deformasyon eğrileri .....	82
Şekil 4.6. (a) Dispersiyonların ve (b) çözeltilerin farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında çökme davranışları .....	84
Şekil 4.7. pH 6.8'de üretilen $\Phi \sim 0.15$ olan parçacık dispersiyonlarının ve ağırlıkça %2.5 ham PAS çözeltilerinin (a) NaCl, (b) $MgCl_2$ ve (c) $AlCl_3$ iyonlarının varlığındaki stabilite davranışları.....	85
Şekil 4.8. 2 mmol/L $AlCl_3$ içeren PAS proteini parçacığı dispersiyonlarının fiziksel görüntüsü.....	89

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

- Şekil 4.9. (a) Farklı konsantrasyonlarda NaCl, MgCl<sub>2</sub> ve AlCl<sub>3</sub> içeren dispersiyonlardaki PAS proteini parçacıkları arasındaki Debye uzunlukları (b) Elektrik çift tabakanın ve bu uzunluğun elektriksel potansiyele etkisinin şematik gösterimi ..... 92
- Şekil 4.10. PAS dispersiyonlarının farklı değerlerdeki tuz iyonlarının varlığında KKK değerleri ..... 93
- Şekil 4.11. PAS dispersiyonlarının (a) NaCl, (b) MgCl<sub>2</sub> ve (c) AlCl<sub>3</sub> tuzlarının farklı konsantrasyonları için elde edilen interaksiyon potansiyeli grafikleri ..... 95
- Şekil 4.12. (a) Saf su, (b) %1 PAS, (c) %4 PAS, (d) %1 dekstran, (e) %4 dekstran, (f) %1 Arap zımkı ve (g) %4 Arap zımkı çözeltisi içinde dispers edilmiş PAS proteini parçacıklarının ısıtılmadan önceki ve sonraki boyut dağılımları ..... 99
- Şekil 4.13. (a) Saf su, (b) %1 PAS, (c) %4 PAS, (d) %1 dekstran, (e) %4 dekstran, (f) %1 Arap zımkı ve (g) %4 Arap zımkı çözeltisi içinde dispers edilmiş PAS proteini parçacıklarının ısıtılmadan önceki ve sonraki dinamik viskozite değerlerine karşın hacimsel oran grafikleri ..... 103
- Şekil 4.14. (a) PAS proteini, (b) dekstran ve (c) Arap zımkı çözeltilerinin %1 ve %4 konsantrasyonlarındaki 90°C'de 30 dakika boyunca ısıtılma işlemi öncesi ve sonrası kayma viskoziteleri ..... 109
- Şekil 4.15. (a) Saf su, (b) PAS, (c) dekstran ve (d) Arap zımkı çözeltileri içinde dispers edilmiş PAS proteini parçacıklarının ( $\Phi \sim 0.4$ ) ısıtılmadan önceki ve sonraki kayma viskozitesi değerleri ..... 110
- Şekil 4.16. Ortalama boyutları 2 µm, 4 µm ve 5 µm olan PAS proteini parçacığı dispersiyonlarının oluşturduğu (a) köpük yüksekliği, (b) sıvı yüksekliği ve (c) baloncuk boyutu grafikleri ..... 115
- Şekil 4.17. Protein içerikleri %15.6, %18.5 ve %23.4 olan PAS proteini parçacığı dispersiyonlarının oluşturduğu (a) köpük yüksekliği, (b) sıvı yüksekliği ve (c) baloncuk boyutu grafikleri ..... 119

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil 4.18. PAS proteini parçacıklarının pH değeri pH 3, pH 5.5, pH 6 ve pH 7.4 olan dispersiyonlardaki boyut dağılımları.....	121
Şekil 4.19. pH 3, pH 5.5 ve pH 6 değerlerindeki PAS proteini parçacığı dispersiyonlarının (a) köpük yüksekliği, (b) sıvı yüksekliği ve (c) baloncuk boyutu grafikleri .....	123
Şekil 4.20. pH 8, pH 9 ve pH 10 değerindeki PAS proteini parçacığı dispersiyonlarının köpük stabiliteleri.....	125
Şekil 4.21. pH 3, pH 5.5 ve pH 9 değerindeki PAS proteini parçacığı dispersiyonlarının köpük stabiliteleri.....	125
Şekil 4.22. Köpük ara yüzeyinde bulunan PAS proteini parçacıklarının farklı büyütme oranlarındaki krayo-SEM görüntüleri; (a) 3500×, (b) 50000× ve (c) 10000×.....	127
Şekil 4.23. Ağırlıkça %2, %4, %6 ve %8 ham PAS proteini içeren çözeltilerin (a) köpük yüksekliği ve (b) baloncuk boyutu grafikleri.....	130
Şekil 4.24. pH 2, pH 3, pH 5.5, pH 6 ve pH 9 değerlerindeki %2'lik ham PAS çözeltilerinin (a) köpük yüksekliği, (b) sıvı yüksekliği ve (c) baloncuk boyutu grafikleri .....	132
Şekil 4.25. Farklı kefir örneklerinin (a) 0. ve (b) 2. haftalardaki duyusal analiz testi sonuçları.....	138
Şekil 4.26. Kefir örneklerinin zamana göre (a) pH ve (b) titrasyon asitliği değişimleri .....	142
Şekil 4.27. (a) Sade kefirin, (b) $\Phi \sim 0.12$ olan pH 6.8 PAS proteini parçacığı içeren kefirin, (c) $\Phi \sim 0.12$ olan pH 5.5 PAS proteini parçacığı içeren kefirin 1., 7. ve 14. günlerdeki kayma viskozitesi değerleri .....	144
Şekil 4.28. Depolama süresince kefir örneklerindeki serum ayrılması.....	146
Şekil 4.29. Depolama süresince kefir örneklerindeki toplam serbest amino asit değerlerinin değişimi.....	148

Şekil 4.30. (a) Biyojen amin standart çözeltilerinin ve (b) pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacıklarını  $\Phi \sim 0.12$  oranında içeren kefir örneğinin HPLC kromatogramları ..... 149





## TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. PAS proteinlerinin kompozisyonu ve bileşenlerinin termal özellikleri .	9
Tablo 2.2. Kimyasal yapılarına ve içerdikleri amin grubu sayısına göre biyojen aminlerin sınıflandırılması .....	45
Tablo 3.1. Deneme planı .....	54
Tablo 3.2. HPLC Dereceli elüsyon programı.....	71
Tablo 4.1. Karıştırıcı hızına göre oluşan parçacıkların boyutları.....	75
Tablo 4.2. Farklı konsantrasyonlarda PAS proteini içeren makro jellerin Young modülüs değerleri .....	83
Tablo 4.3. Farklı hacimsel oranlardaki PAS proteini parçacığı dispersiyonlarının iki ve üç değerlikli tuz iyonları varlığındaki KKK değerleri .....	97
Tablo 4.4. PAS, dekstran ve Arap zamkı çözeltilerinin farklı konsantrasyonlardaki ozmolalite değerleri .....	102
Tablo 4.5. PAS proteini parçacıklarının farklı sürekli fazlar içinde 90°C'de 30 dakika boyunca ısıtılma sonrasındaki şişme oranları .....	106
Tablo 4.6. Farklı boyutlarda PAS proteini parçacığı içeren dispersiyonların köpüklenme yetenekleri .....	113
Tablo 4.7. Farklı sertliklerde PAS proteini parçacığı içeren dispersiyonların köpüklenme yetenekleri .....	117
Tablo 4.8. PAS proteini parçacıklarının farklı pH değerlerindeki dispersiyonlarının köpüklenme yetenekleri .....	122
Tablo 4.9. Ham PAS çözeltilerinin farklı pH değerlerinde köpüklenme yetenekleri.....	131
Tablo 4.10. Farklı hacimsel oranlarda pH 6.8'de ve pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacığı içeren kefir örneklerinin protein miktarı.....	135
Tablo 4.11. Farklı PAS proteini parçacığı dispersiyonlarındaki toplam protein konsantrasyonu .....	136

**TABLULAR DİZİNİ (devam)**

Tablo 4.12. Farklı miktarlarda ham PAS proteini eklenmiş kefir örneklerindeki toplam protein konsantrasyonu.....	137
Tablo 4.13. Kefir örnekleri için CIE L * a * b * değerleri.....	139
Tablo 4.14Kefir örneklerinde kuru madde miktarları.....	141
Tablo 4.15. Kefir örneklerinde depolama süresince tespit edilen biyojen amin konsantrasyonları.....	150



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

g

g

kDa

L

mV

mOzm

nm

 $\eta$ 

ppm

 $\Phi$  $\mu\text{m}$ 

### Açıklama

Gram

Yerçekimi kuvveti

Kilo Dalton

Litre

Mili volt

Mili ozmolal

Nanometre

Dinamik viskozite

Milyonda bir kısım

Parçacık hacimsel oranı

Mikrometre

### Kısaltmalar

CLSM

DLVO

Overbeek

KKK

PAS

s/y

SEM

ŞO

TA

UV

Lazer taramalı konfokal mikroskop

Derjaguin, Landlau, Verwey,

kritik koagülasyon konsantrasyonu

Peynir altı suyu

Yağ içinde su

Taramalı elektron mikroskobu

Şişme oranı

Titrasyon asitliği

Ultraviyole





## 1. GİRİŞ

Proteinler, hücrelerin temel bileşeni ve yapıtaşıdır. Organizmaların büyümesi için birçok aşamada gerekmektedir. Büyüme, her organizma için farklı şekilde ölçülmekte ve büyüme sırasında protein ihtiyacı artmaktadır. Proteinler, amino asitlerden oluşmaktadır. Amino asitlerin bir kısmı vücutta sentezlenebilirken, bir kısmı sentezlenemez ve dışarıdan besinlerle almak gerekir. Bunlar esansiyel amino asitlerdir.

İnsan beslenmesinde önemli yer tutan proteinler, yalnızca gelişme çağında olanlar için değil, yetişkin bireyler için de tüketilmesi zorunlu bir bileşendir. Çünkü proteinler vücutta zamanla parçalanarak azotlu bileşiklere dönüştürülür ve atılır. Bu nedenle, atılan ve kaybolan amino asitleri karşılayabilmek için protein alımı şarttır.

Proteinlerin hücrelere yapısal özellik sağlamalarının yanı sıra, içeriğindeki amino asitlerin tür ve miktarına göre besleyicilik, doyumluk hissi sağlama, kas ve kemik gelişimini destekleme gibi fonksiyonel özellikleri de bulunmaktadır. Çalışmalarda proteince zengin bir diyetin, fizyolojik olarak yağ ve karbonhidrat ağırlıklı diyetlere göre daha sağlıklı olduğu ortaya konmuştur (Anderson and Moore, 2004). Proteinlerin, yağ ve karbonhidratlara göre daha yüksek doyumluk hissi sağladığı bilinmektedir (Latner and Schwartz, 1999), çünkü proteinlerin metabolize edilmesi daha uzun sürmektedir. Bu durum özellikle hayvansal proteinlerin metabolize edilmesinde daha net ortaya çıkmaktadır. Ancak hayvansal proteinlerin tüketiminde, içeriklerindeki doymuş yağlar kardiyovasüler problemlerin ortaya çıkmasını hızlandırabileceğinden, sınırlandırılması ya da dengelenmesi gerekmektedir.

Proteince zenginleştirilmiş, yağ ve karbonhidrat miktarı dengelenmiş gıdalar piyasada birçok bilinçli tüketici grubu tarafından ilgi görmektedir. Bebek mamaları, sporcu içecekleri veya medikal içecekler bu tür dizayn edilmiş gıdalar grubunda yer almaktadır. Proteince zenginleştirilmiş gıdalar, sağlıklı bireyler için tercih edilebilir nitelikte olsa da, bazı hastalar ve yaşlı bireylerin beslenmesinde zorunludur. Örneğin, uzun süre yoğun bakımda yatan ya da kemoterapi ilaçları alan hastalarda, mide bulantısı veya bağırsak fonksiyonlarının yetersizliği

nedeniyle, ağız yoluyla dengeli beslenme bazen mümkün olmamaktadır. Yaşlı bireylerin beslenmesinde de çiğneme ve yutma fonksiyonlarında problemler olabildiği için proteince zengin katı gıdalar yerine sıvı formda gıdalar tercih edilmektedir. Benzer şekilde, obezite hastalarında da yağ ve karbonhidrat miktarının sınırlandırılması ve uzun süre doyumluk hissi sağlaması nedeniyle proteince zenginleştirilmiş gıdalar sıklıkla tercih edilmektedir (Sağlam, 2012). Bu grupların beslenmesinde protein miktarının yüksek olmasının yanı sıra amino asitlerin dengeli olması da önemlidir.

Proteince zenginleştirilmiş içeceklerin hedef gruplara yönelik tasarlanması, ürünün piyasadaki çeşitliliği ve bilinirliğini de arttıracaktır. Ancak protein miktarı arttırılmış içeceklerin tasarlanması zordur, çünkü proteinler içeceğin hazırlanması sırasındaki ısıl işlemlerden yapısal olarak etkilenmekte ve görsel ve/veya duyuşsal bozukluklara neden olmaktadır. Ayrıca, ilave proteinler içekteki diğer bileşenlerle de etkileşime girerek stabilite problemleri oluşturabilmektedir. Bu nedenle, yüksek proteinli içecekler tasarlanırken birçok yönden test edilmesi gerekmektedir.

Peynir altı suyu (PAS) proteinleri ve kazeinler, dengeli amino asit kompozisyonuna sahip süt proteinleridir. PAS proteinleri, protein içeren süt içecekleri, bebek mamaları, bisküvi gibi gıdalarda yaygın olarak kullanılmakta; ancak sıcaklık, pH gibi çevresel faktörlerden çabuk etkilenmektedir. Gıdaların işlenmesi sırasında turbidite (bulanıklık) veya viskozite artışı, ya da jelleşme gibi istenmeyen durumlar meydana gelebilmektedir. Proteinlerin, işlenmesini kolaylaştırmak ve son üründe meydana gelebilecek olumsuz etkilerden kurtulmak için, ısı stabilitelerini arttırma çalışmaları yapılmıştır. Bunlardan bir tanesi de kontrollü denatürasyon ile mikro-parçacık üretimidir (Sağlam et al., 2011).

Bu tez kapsamında, PAS proteini izolatu parçacıkları iki aşamalı emülsifikasyon yöntemi adı verilen bir yöntemle, kontrollü ısı denatürasyonu sağlanarak elde edilmiştir. Tezin konusu, bu parçacıklarının fizikokimyasal özelliklerinin araştırılması ve bir model gıdada kullanılmasıdır. Protein parçacıklarının yapısal özellikleri, tuz iyonlarıyla etkileşimi, ısıya karşı dayanıklılıkları ve yüzey aktif özellikleri incelenmiştir. Son olarak da parçacıkların model gıda olarak seçilen asitli bir fermente süt içeceği olan kefirde

kullanımı ve kefirin reolojik özellikleri ile fizikokimyasal yapısına etkileri araştırılmıştır.

Parçacıklarda yapısal özellikler, iç yapı ve yüzey yapısı olarak iki farklı kategoride değerlendirilmiştir. İki aşamalı emülsifikasyon yöntemiyle elde edilen parçacıklarda iç yapı, proteinler arasındaki etkileşim değiştirilmediğinden genellikle sabit tutulmuştur. Yüzey yapısı ise hem iç yapıya hem de dispersiyon içindeki diğer bileşenlerle olan etkileşime bağlı olarak değişebilmektedir. Tezin kapsamında kullanılan parçacıkların iç ve yüzey yapıları çoğunlukla sabit tutulmuştur.

Parçacıkların +1, +2 ve +3 değerliklerindeki tuz iyonlarıyla etkileşimi ve dispersiyonların bu iyonların varlığındaki davranışları görsel olarak incelenmiş ve olası mekanizmalar tartışılmıştır. Buradaki amaçlardan bir tanesi parçacıkların, gıdaların içindeki diğer bileşenlerden biri olan tuz iyonlarıyla nasıl etkileşim göstereceğini incelemektir. Bir diğer amaç ise PAS proteini mikro-parçacıklarının kolloidal parçacıklara ve ilgili teorilere hangi derecede uyum sağladığını incelemektir. Çünkü bu parçacıkların yalnızca gıda sistemlerinde değil, kontrollü salınım gibi geniş bir alanı kapsayan kozmetik, eczacılık gibi alanlarda da kullanımı olasıdır.

PAS proteini parçacıklarının ısıya karşı dayanıklılığı daha önce çalışılmıştır (Sağlam et al., 2013a), ancak tam mekanizması bilinmemektedir. Bu çalışmadaki amaçlardan bir tanesi protein parçacıklarının ısı stabilitelerini arttırmak, diğeri de etkin mekanizma hakkında daha derin bilgiye sahip olmaktır. PAS proteinlerinin mikro-parçacık haline getirilmesindeki temel amaç, ısıya karşı dayanıklılığı az olan ham PAS proteinlerine göre daha dayanıklı bir sistem oluşturmaktır. pH 5.5'te üretilen parçacıklarda bu durum yüksek oranda sağlanmıştır, ancak pH 6.8'de üretilen parçacıklarda ısı stabilitesi kısmen sağlanabilmiştir (Sağlam et al., 2013a). Bu parçacıkların, nötr pH değerinde kullanılması gerektiği sistemlerde, örneğin proteini arttırılmış süt içeceklerinde veya medikal içeceklerde, ısı stabilitesi önemli olacaktır. Bu nedenle, nötr pH değerinde de parçacıkların ısı stabilitesini arttırmak, stabiliteyi etkileyen faktörleri belirlemek ve etki mekanizmalarını bulmak amaçlanmıştır.

Parçacıkların bir başka fonksiyonel özelliği olarak da yüzey aktif özellikleri araştırılmıştır. Özellikle süt içeceklerinde, zenginleştirme amaçlı eklenen katkı maddeleri bazen stabilite problemlerine yol açarak, ürünlerin raf ömürlerini kısaltabilmektedir. Stabilite problemleri genellikle yüzey aktif maddelerle (sürfaktan) giderilmektedir. PAS proteini parçacıklarının bu özelliklerinin belirlenmesi, ilave sürfaktan kullanımını da ortadan kaldıracaktır. Bu tezin kapsamında seçilen kefir içeceğinde, protein parçacıklarının kefirdeki serum ayrılma problemini azaltması ve tekstürel özelliklerini değiştirmeden protein miktarını arttırması amaçlanmıştır.

Kefir içeceğinin bu tez kapsamında seçilmesinin iki nedeni vardır. Birincisi, kefirin bir süt ürünü olması, PAS proteini parçacıklarının incelenen özelliklerinin test edilebilmesi açısından kolaylık sağlamasıdır. Asitli bir içecek olması nedeniyle iki farklı tür (pH 6.8 ve pH 5.5'te üretilen) PAS proteini parçacığının kullanımı da test edilmiştir. Böylece, kefirin tekstürel özellikleri bozulmadan protein miktarını arttırmak amaçlanmıştır. Kefirde test edilen PAS proteini parçacıklarının, sporcu içeceklerinde veya medikal içeceklerde kullanımında öncü olması beklenmektedir. İkinci neden ise, kefirde görülen serum ayrılması probleminin, PAS proteini mikro-parçacıkları sayesinde azalma ihtimalidir. Kefirin endüstriyel üretiminde ve depolanması süresince serum ayrılması sorun teşkil etmektedir. PAS proteini parçacıklarının yüzey aktif özellikleri sayesinde, kefirdeki bu sorunu azaltması da amaçlanmıştır.

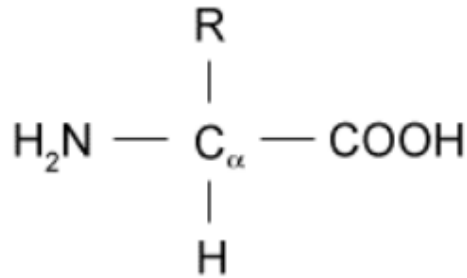
Bu çalışmanın özgün değeri, iki aşamalı emülsifikasyon yöntemiyle üretilen PAS proteini mikro-parçacıklarının ilk kez kefir içinde kullanılacak olmasıdır. Çalışmadan elde edilecek sonuçlar teorik ve pratik alanlarda değerlendirilebilir. Parçacıkların fizikokimyasal özelliklerinin bir kısmına önceki bazı çalışmalarda değinilmiştir ancak tuz ortamlarındaki davranışları ve yüzey aktif özelliklerinin belirlenmesi bu çalışmanın teorik açıdan özgün değerini oluşturmaktadır. Elde edilen verilerin uygulaması olarak proteince zenginleştirilmiş kefir üretimi ve parçacıkların kefire yapısal olarak kattığı özellikler ise çalışmanın pratik açıdan özgün değerini oluşturmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Proteinlerin Yapısı ve Genel Özellikleri

Proteinler, amino asit monomerlerinden oluşan ve oldukça kompleks yapıda polimerlerdir. Vücutta hemen hemen tüm metabolik olaylarda rol almakta, besinsel değerleri ve doyurucu özellikleri ile günlük beslenmede önemli yer tutmaktadır (Anderson and Moore, 2004; Chungchunlam et al., 2017; Halton and Hu, 2004; Westerterp-Plantenga et al., 2012).

Amino asitlerin yapısında hem amino hem de karboksil grubu bulunmaktadır (Şekil 2.1). Merkezde  $\alpha$ -karbon olarak adlandırılan karbon atomu bulunmaktadır. Tüm amino asitlerde bu karbon atomuna bağlı bir amino grubu, bir karboksil grubu, bir hidrojen atomu ve bir tane de radikal (R) grubu yer almaktadır. R grubu değişken yan zincir olarak da adlandırılmakta ve amino asidin fonksiyonel özelliklerini belirlemede önemli payı bulunmaktadır. R grubunun yapısı, boyutu, elektriksel yükü ve suda çözünürlüğü gibi fizikokimyasal özellikleri amino asidin hidrofilik, hidrofobik, asidik, bazik veya aromatik özelliklerini belirlemektedir (Lopez and Mohiuddin, 2021; Wu, 2021).

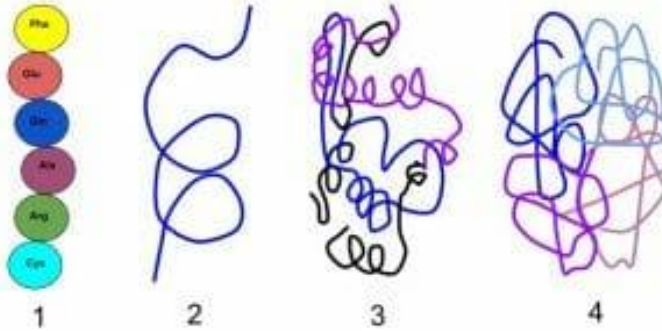


Şekil 2.1. Amino asitlerin genel yapısı (Blazewicz et al., 2006).

Yapısındaki farklı gruplardan dolayı bir proteinin net yükü, ortamın pH değerine göre değişmektedir. Bir amino asit veya proteinin net yükünün sıfır olduğu pH değerine izoelektrik nokta adı verilmektedir. Bu değer üzerindeki pH'larda protein negatif yüklü, altındaki pH'larda da pozitif yüklüdür. İzoelektrik

noktasında elektriksel yüklerin toplamı sıfırlandığından, bu nokta proteinlerin genelde en çok agregat oluşturduğu pH değeridir (Wu, 2021).

Amino asitler birbirleri arasında kondensasyon tepkimeleriyle kovalent bağ oluşturarak protein polimerlerini oluşturmaktadır. Bu kovalent bağlara peptid adı verilmektedir. Proteinlerin 4 yapısal düzeyi bulunmaktadır: birincil (primer), ikincil (sekonder), üçüncül (tersiyer) ve dördüncül (kuaterner) yapı (Şekil 2.2). Amino asitlerin düz polimer zinciri yapısı, proteinin birincil yapısını ifade etmektedir. İkincil yapı ise, düz polimer zincirinin hidrojen bağlarıyla düzenli kıvrılması veya katlanmasıyla oluşmaktadır. Örneğin,  $\alpha$ -heliks ve  $\beta$ -tabaka yapıları, düz zincir yapıların kıvrılması ve katlanmasıyla oluşmuş ikincil yapılardır. İkincil yapılar, bir zincirin kendi içinde katlanmasıyla oluşabileceği gibi farklı iki zincir arasında da olabilmektedir. Üçüncül yapı, ikincil yapı elemanlarının katlanmaları veya R grupları arasındaki hidrofobik, van der Waals, iyonik etkileşimler, tuz köprüleri, hidrojen bağları, sülfür bağları gibi etkileşimlerle meydana gelmektedir (Regnier, 1987). Dördüncül yapı ise, ikincil veya üçüncül yapıdaki proteinlerin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır.

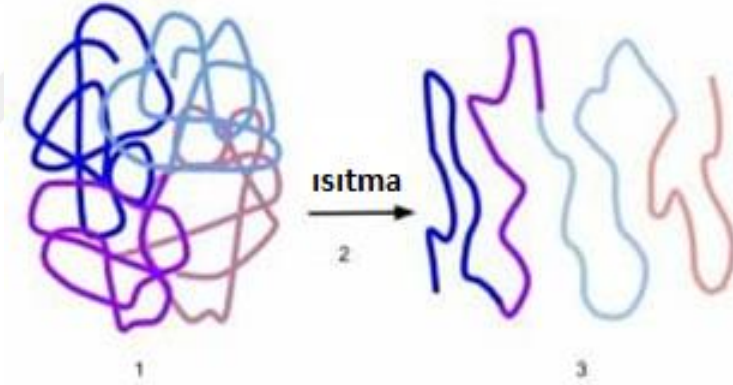


**Şekil 2.2.** Proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları (Biologydictionary.net Editors, 2016).

Proteinler, şekillerine göre fibril veya küresel yapıda olabilmektedir. Fibril ve küresel yapıdaki proteinler çoğunlukla üçüncül ve dördüncül yapıya sahiptir. Fibril proteinler, genelde tek tip bir ikincil yapı proteinin katlanmasıyla oluşmaktadır. Küresel proteinler ise farklı ikincil yapıdaki proteinleri içerebilmektedir. Bu proteinlerin yapısındaki farklılıklar, işlevselliklerini de

etkilemektedir. Örneğin, saç ve tırnaktaki gibi fibril proteinler, yapısal özellik gösterirken; küresel proteinler enzim, regülatör proteinler, immunoglobulinler gibi farklı fonksiyonel özellikler göstermektedir (Squire and Parry, 2017).

Proteinler üç boyutlu yapıdadır ve biyolojik olarak aktif olan yapısı bozulmamış proteinlere doğal (ham) protein denmektedir. Üç boyutlu yapı, proteinin fonksiyonunu belirlemektedir. Peptit bağları koparılmadan, proteinin üç boyutlu yapısı bozulur veya değişirse denatürasyon meydana gelmektedir (Şekil 2.3). Denatürasyon, protein çözünürlüğünü önemli derecede değiştirmektedir. Proteinler genellikle, 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, çok yüksek ya da çok düşük pH değerlerinde, ve organik çözücülerde denatüre olmaktadır. Dördüncül yapıdaki bir proteinin denatürasyonunda ise, dördüncül yapıyı oluşturan ikincil ya da üçüncül yapılar ortaya çıkabilmekte veya tesadüfi kıvrılma ve bükülmelerle protein yeniden yapılabilmektedir (Sunde and Blake, 1998).



**Şekil 2.3.** Proteinlerin ısı ile denatürasyonu (Biologydictionary.net Editors, 2016).

Proteinler, bitkisel ve hayvansal kaynaklı olabilmektedir ve beslenmede çok önemli yer tutmaktadır. Gıda yoluyla alınan proteinler, sindirim sisteminde serbest amino asitlere dönüşmekte ve yeni proteinlerin sentezlenmesine olanak vermektedir. Doğada bulunan 300'den fazla amino asitten yalnızca 20 tanesi, insanlarda protein sentezi metabolizmasında sorumludur. Bunlar alanin, arjinin, asparajin, aspartik asit, sistein, glutamik asit, glutamin, glisin, histidin, lösin, izölösin, lisin, metiyonin, fenilalanin, prolin, serin, treonin, triptofan, tirozin ve valindir. Yeni keşfedilen ve 21. ve 22. amino asit olarak kabul edilen selenosistein ve pirolizin insanlarda protein sentezinde rol almaz, ancak



pirolizinin ribozomal protein sentezi sırasında, protein zincirine katıldığı bilinmektedir (Lopez and Mohiuddin, 2021). İnsanlar protein metabolizmasından sorumlu 20 amino asidin yaklaşık yarısını vücutta sentezleyebilmekte, ancak 9 tanesini, yani esansiyel amino asitleri, sentezleyememektedirler. Bu nedenle esansiyel amino asitlerin gıda yoluyla alınması zorunludur. Esansiyel amino asitler histidin, lösin, izolösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, treonin, triptofan ve valindir (Lopez and Mohiuddin, 2021).

Her yaş grubu için gerekli olan proteinler, özellikle hasta ve yaşlı bireylerin beslenmesinde ayrı bir önem taşımaktadır. Proteinlerin doygunluk sağlanması, kas ve kemik gelişimini desteklemesi medikal beslenmede kullanımını da arttırmaktadır. Gıdalarda besinsel değerleri arttırmasının yanı sıra, proteinlerin yapı geliştirici özelliklerinden de faydalanılmaktadır. Bu özellikler, genellikle kıvam arttırma, jelleşme, su çekme ve tutma kapasitesini arttırma ve stabilizatör etkilerini kapsamaktadır (Wilding et al., 1984).

## **2.2. Peynir Altı Suyu (PAS) Proteinlerinin Genel Özellikleri**

PAS proteinleri, peynir üretimi sırasında atık madde olarak çıkan, gıda sektöründe yaygın olarak kullanılan, besinsel değeri yüksek proteinlerdir (Farrell et al., 2004). Peynir üretimi sonrasında, serum fazında çözünebilir olarak kalmaktadır. PAS proteinleri beta-laktoglobulin, alfa-laktalbumin, serum albuminleri ve immunoglobulin fraksiyonlarını içermektedir (Tablo 2.1). Beta-laktoglobulin, PAS proteini içinde yaklaşık %55-60'lık bir konsantrasyonla en yüksek miktarda bulunmaktadır. Molekül ağırlığı 18.4 kDa ve izoelektrik noktası pH 5.4'tür (van den Akker et al., 2014). Küresel yapıda olan beta-laktoglobulinde 2 tane disülfid köprüsü ve 1 tane serbest tiyol grubu bulunmaktadır (Elzoghby et al., 2015) Alfa-laktalbumin ise PAS proteinlerinin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır. Molekül ağırlığı 14.2 kDa olup izoelektrik noktası pH 4.4'tür. Alfa-laktalbumin de küresel yapıdır ve yapısında 4 tane disülfid köprüsü bulunmaktadır (Kelly et al., 2009; de Kruijff, 2012). Serum albuminleri, PAS proteinlerinin %5'ini oluşturmaktadır. Molekül ağırlıkları ortalama 66.5 kDa'dır ve izoelektrik noktası pH 4.7'dir (Ge et al., 1998). PAS proteinlerinin ortalama molekül ağırlığı 21 kDa ve izoelektrik noktası yaklaşık pH 5.2'dir.

**Tablo 2.1.** PAS proteinlerinin kompozisyonu ve bileşenlerinin termal özellikleri (Guo and Wang, 2016'dan adapte edilmiştir).

	PAS proteini içindeki konsantrasyon (%)	İzoelektrik noktası (pH)	Molekül ağırlığı (kDa)	Denatürasyon sıcaklığı (°C)	Isı stabilitesi
Beta-laktoglobulin	55	5.4	18.4	82	Düşük
Alfa-laktalbumin	20	4.4	14.2	61	Yüksek
Serum albuminleri	5	4.7	66.5	66	Çok düşük
İmmunoglobulin	8	5-8	150	72	Çok düşük
Glikomakro-peptitler	12	<3.8	8.6		Yüksek

PAS proteinleri, sulu çözelti içinde 70°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ısıtıldığında denatüre olmaktadır (Corredig and Dalgleish, 1996). PAS proteinlerinin nötr pH değerlerinde ısıtılması sonucunda, ilk aşamada küresel yapı açılmakta ve reaktif tiyol grupları yeni bağlar kurmak için hazır hale gelmektedir. Daha sonra, reaktif tiyol grupları, sülfidril ve disülfid bağlarıyla yer değiştirme reaksiyonuna girerek agregatları oluşturmaktadır. Daha fazla reaksiyona girecek tiyol grubu kalmadığında, agregat oluşumu durmaktadır (Hoffmann and Mill, 1999). Bu şekilde, nötr ve alkali pH değerlerinde elde edilen agregatlar küresel yapılar oluşturmaktadır (Lazidis et al., 2016). Ancak, PAS proteinleri düşük pH değerlerinde (örneğin pH 2) monomerik yapıya geçtiğinden, ısıtıldıklarında fibril yapıda agregatlar meydana gelmektedir (Serfert et al., 2014).

PAS proteini piyasada konsantre, izolat ve hidrolizat olmak üzere üç farklı şekilde bulunmaktadır. Protein içeriği, PAS konsantresinde yaklaşık %30-89 arasında, PAS izolatında ise %90'ın üzerindedir. Hidrolizatlar ise belirli bir amaca yönelik özel olarak üretilen, metabolize edilmesi kolay, alerjik özellikleri daha az olan türdür. Ancak hidrolizatları üretmek diğerlerine kıyasla daha maliyetlidir (Foegeding et al., 2002). PAS izolatı, protein içeriğinin yüksek olması, diğerlerine kıyasla daha saf olması ve besleyici değerinin yüksek olması sebebiyle gıda endüstrisinde ve bilimsel araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır.

PAS proteinlerinin yapısında lösin, izölösün ve valin gibi kas gelişimini desteklediği bilinen amino asitler bol miktarda bulunmaktadır (Ha and Zemel, 2003). Bu nedenle, yüksek protein içeren süt içecekleri, yaşlı veya bebek beslenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak PAS proteinlerinin yapısı iyonik kuvvet, pH, sıcaklık gibi çevresel etmenlere göre hızla değişmektedir. Özellikle yüksek proteinli gıdaların üretiminde ve depolanması sırasında proteinlerin denatürasyonundan ve agregat oluşumundan kaynaklı stabilite sorunları meydana gelebilmektedir.

Örneğin, PAS proteini içeren içecek formülasyonlarında, pastörizasyon sonrasında agregat oluşumu ile birlikte turbidite artmakta, depolama süresince bu durum faz ayırımına dönüşebilmektedir. Isıl işlem sonrasında, viskozitenin artması da sorun teşkil etmektedir, çünkü ürünün işlenebilirliğini kısıtlamaktadır. PAS proteini konsantrasyonu arttırılırsa, ısıtma sonucu jelleşme de görülebilmektedir. Önceki çalışmalarda, PAS proteinleriyle zenginleştirilmiş süt içeceklerinde, ısıl işlem sonucu faz ayırımına neden olan agregatlar gözlemlenmiştir (Singh and Nath, 2004). Bu içeceklerde, ağızda kumlu bir his ve kötü koku olduğu belirtilmiştir. Yoğurdu protein bakımından zenginleştirmek için yapılan başka çalışmalarda da eklenen proteinlerden aynı olumsuz sonuçlar alınmıştır (Drake et al., 2000; Remeuf et al., 2003).

PAS proteinlerinin gıda işleme ve depolama süresindeki olumsuz özelliklerini azaltmak ve ısı stabilitesini arttırmak için farklı yöntemler denenmiştir. Proteinin yapısındaki yer değiştirme reaksiyonlarına katılan sülfidril ve disülfid gruplarının bloke edilmesi, ısıl işlem sırasındaki reaksiyonu durduracağı için bu işlemin, proteinin ısı stabilitesini de arttırması beklenmektedir. Lesitin (Ikeada and Foegeding, 1999), sodyum kazeinat (Mounsey and O'Kennedy, 2010), şeker çözeltileri (Rich and Foegeding, 2000) eklenmesi, karbonhidratlarla kompleks oluşturması (Zhu et al., 2010), enzimatik çapraz bağlama (Zhong et al., 2013) PAS proteinlerinin ısı stabilitesini arttırdığı bilinen yöntemlerden bazılarıdır. Bunların yanı sıra, enzimatik hidroliz, kontrollü agregat oluşturma, ultrasonikasyon, mikropartikülasyon gibi işlemlerle de PAS proteinlerinin ısı stabilitesinin arttığı belirtilmiştir (Ashokkumar et al., 2009; Zhang and Zhong, 2009; 2010).

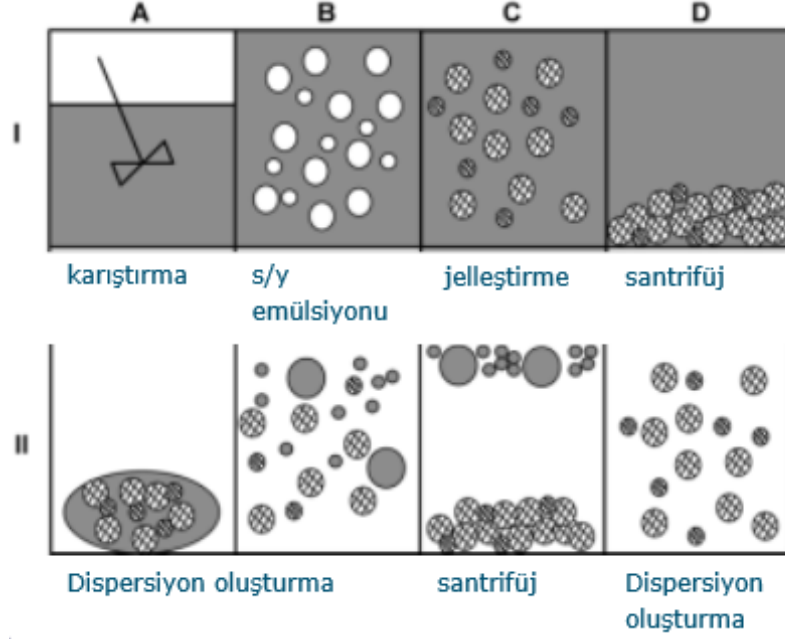
### 2.3. Protein Parçacıklarının Üretim Yöntemleri ve Genel Özellikleri

Protein parçacıkları nano veya mikro boyutta, iç yapısı ve yüzey özellikleri kontrol edilerek üretilen ve genellikle kolloidal özellik gösteren parçacıklardır. Literatürde mikro jel, nano jel, partikül ya da parçacık gibi isimleri bulunmaktadır. Bu tür parçacıkların üretim yöntemleri temel olarak iki ana kategoride değerlendirilmektedir: ısı işlemler ve ısı olmayan işlemler.

Isıl işlemler, çoğunlukla küresel proteinlerin denatürasyonunda kullanılmaktadır. Protein konsantrasyonuna göre jelleşme veya agregat oluşumu gözlenmektedir. Önceki çalışmalarda PAS proteinleri (Zhang and Zhong, 2009), soya proteini (Wang et al., 2021a), ve bezelye proteini (Doan and Ghosh, 2019) ısı ile denatüre edilerek parçacıklar elde edilmiştir. Simplese, LeanCreme gibi isimlerle ticari olarak da uzun süredir gıda endüstrisinde yer alan mikropartiküle edilmiş PAS proteinleri ısı işlemlerle üretilmiştir. Bu parçacıkların şekilleri küresel olup boyutları 1 ile 10 µm arasında değişmekte ve ısıya karşı dayanıklı yağ ikame maddesi olarak kullanılmaktadır. Üretimleri sırasında ısıtma ve kesme (shear) işlemleri birlikte uygulanmaktadır (Wijayanti et al., 2014).

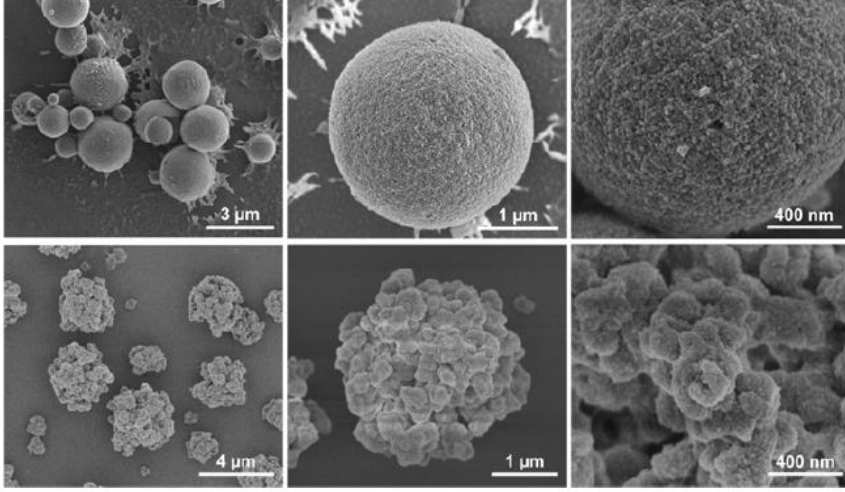
Isıl olmayan yöntemlerle parçacık üretimi ise enzimatik işlemler, elektrostatik yüklerin değişimi veya bu işlemlerle birlikte kısa bir ön-ısıtma işleminin kombinasyonlarını içermektedir (Mehalebi et al., 2008; Nivala et al., 2017; Zhang and Zhong, 2009). Örneğin enzimatik işlemde, proteinlerin çapraz bağlarla yapıları değiştirilerek, parçacıklar elde edilebilmektedir. Bunun yanı sıra, hidrojen bağları, elektriksel kuvvetler ve kovalent olmayan etkileşimler de parçacıkların oluşumunda yer almaktadır. Çalışmalarda genellikle protein çözeltilerine kısa süreli bir ısı ön işlem uygulanarak hidrofobik etkileşimlerle parçacık bütünlüğüne katkı sağlanmakta, sonra da ısı olmayan işlemlerle jelleştirme ve parçacık üretimi gerçekleştirilmektedir. Önceki bir çalışmada beta-laktoglobulinin ısı ön işlemle agregat oluşturması sağlanmış ve bu agregatlar asitlendirme yöntemiyle jelleştirilerek parçacık üretimi gerçekleştirilmiştir (Alting et al., 2002).

Parçacık üretiminde bir başka yöntem de iki aşamalı emülsifikasyon yöntemidir ve bu yöntem ısı işlemler ve ısı olmayan işlemlere uygulanabilmektedir (Zhang and Zhong, 2009). Şematik gösterimi Şekil 2.4'te verilmiştir (Sağlam et al., 2011). İki aşamalı emülsifikasyon, esnek bir yöntem olup parçacığın boyutu, pH değeri, konsantrasyonu gibi özelliklerin kontrollü olarak ayarlanabilmesine olanak vermektedir. Bununla birlikte, protein kaynağı ve parçacığın yüzey özelliklerinin de kontrollü olarak değiştirilebilmesini sağlamaktadır (İnce Coşkun et al., 2015). Böylece, parçacıklar farklı proteinlerden, nano veya mikro boyutta, istenilen pH değeri ve protein konsantrasyonunda elde edilebilmiştir. Sağlam et al. (2011)'ın geliştirdiği bu yöntem, parçacıkların jelleştirme işlemi sırasında kullanılan bir yağ fazını ve yağdan arınmış parçacıkların elde edilmesini sağlayan bir su fazını içerdiğinden iki aşamalı olarak adlandırılmıştır. Temel olarak, bir protein çözeltisi, yağ fazının içinde emülsifiye edilerek yağ içinde su emülsiyonu oluşturulmaktadır. Oluşan damlacıklar ısıtma, soğutma, pH değişimi, enzimatik işlemlerle çapraz bağ oluşturma gibi yöntemlerle jelleştirilerek katı parçacıklar elde edilmektedir. Oluşan parçacıklar, santrifüjle yağ fazından ayrılmakta, ancak parçacıkların arasında kalan az miktarda yağı temizlemek için de sürfaktan özellik içeren bir sulu fazla yıkama işlemi yapılmaktadır. Yıkama işlemi, parçacıkların sulu fazda dispers edilerek tekrar santrifüj edilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Yıkama işlemi sırasında, sulu faza farklı biyopolimerler eklenerek parçacıklara fonksiyonel özellikler kazandırılmaktadır. Örneğin, parçacıkların yüzey yapıları değiştirilebilmekte, parçacıklara bir çeşit kaplama yapılabilmekte veya elektrostatik etkilerle parçacıklar arasındaki etkileşim değiştirilebilmektedir. İkili emülsifikasyon yöntemi, kesikli işlem (batch process) olarak uygulandığından, endüstriyel uygulamaları sınırlıdır.



Şekil 2.4. İki aşamalı emülsifikasyon yönteminin şematik gösterimi (Sağlam et al., 2011).

İlk aşama olan protein çözeltisinin hazırlanması sırasında parçacıkların konsantrasyonu veya pH değeri belirlenebilmektedir. Önceki bir çalışmada, Sağlam et al. (2012) iki aşamalı emülsifikasyon yönteminde ısı ile denatürasyonu kullanarak, PAS proteini izolatu parçacıklarını pH 6.8 ve pH 5.5 olmak üzere iki farklı pH değerinde üretmişlerdir (Şekil 2.5). pH 6.8 değeri, herhangi bir asit ya da baz eklenmemiş, protein çözeltisinin kendi değeridir. pH 5.5'te üretilen parçacıklar için, emülsifiye edilmeden önceki protein çözeltisinin pH değeri ayarlanmıştır. pH 5.5 değeri, PAS proteinlerinin izoelektrik noktası olup, bu noktada protein içeriği daha yüksek parçacıkların üretimi hedeflenmiştir. Üretilen PAS proteini parçacıklarının fiziksel özellikleri ile pH ve ısı stabiliteleri araştırılmıştır (Sağlam et al., 2012; 2013a). pH 6.8'de üretilen parçacıklar, proteinlerin izoelektrik noktasından uzakta olduklarından elektriksel itme kuvvetleri parçacıkların yapısındaki proteinleri birbirlerinden uzakta tutmuş, dolayısıyla parçacıklar düzgün küresel yapıda oluşmuştur. Yapılarındaki protein konsantrasyonu ağırlıkça yaklaşık %18 olarak bulunmuştur. pH 5.5'te üretilen parçacıklar ise proteinlerin izoelektrik noktasında olduğundan daha yoğun yapıdadır, yüzey yapıları pürüzlü olup içeriğindeki protein konsantrasyonu yaklaşık %39 olarak belirtilmiştir (Sağlam et al., 2012).



**Şekil 2.5.** İki aşamalı emülsifikasyon yöntemiyle pH 6.8’de (üst sıra) ve pH 5.5’te (alt sıra) üretilmiş PAS proteini parçacıklarının SEM görüntüleri (Sağlam et al., 2012).

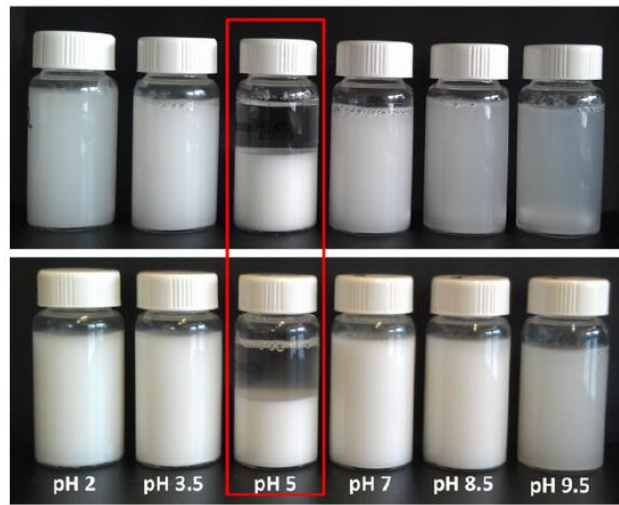
Proteinin kaynağının değiştirildiği farklı bir çalışmada ise yine iki aşamalı emülsifikasyon yöntemi kullanılarak, sodyum kazeinat ve jelatin parçacıkları farklı jelleşme mekanizmalarıyla üretilmiştir (İnce Coşkun et al., 2015). Çalışmada, sodyum kazeinat parçacıkları, bir asitleyici olan glukano-delta-lakton (GDL) eklenmiş protein çözeltisinin yağ fazında emülsifiye edilmesiyle oluşturulmuştur. Asitlendirme işleminin yavaş gerçekleşmesi, protein çözeltisinin jelleşmeden önce emülsifiye edilebilmesine olanak sağlamıştır. Bu sayede protein çözeltisi yağ içinde damlacıklar halinde oluşturulabilmiş ve asitlenme işlemi tamamlanınca damlacıklar jelleşerek katı hale geçmiştir. Parçacıklar santrifüjle ıslak pelet halinde elde edilmiştir.

Aynı çalışmada yine iki aşamalı emülsifikasyon yöntemiyle jelatin parçacıkları, jelatin çözeltisi 60°C’deyken, oda sıcaklığındaki yağ fazında emülsifiye edildikten sonra buz banyosu içinde soğutularak elde edilmiştir (İnce Coşkun et al., 2015). Jelatin, ısıya duyarlı olduğu için, parçacıkların daima 40°C’nin altında tutulması gerekmektedir. Aksi takdirde, parçacıklar eriyerek bütünlüklerini kaybetmekte ve jelatin çözeltisi olarak kalmaktadır. Bu nedenle, parçacıkların yağdan arındırılması işlemi sırasında da buz banyosu kullanılarak soğuk tutulması sağlanmıştır.

## 2.4. Protein Parçacıklarının İyonik Ortamlardaki Davranışları

Ham proteinler, çözeltilerinde belirli bir elektriksel yük taşıdıklarından birbirlerini itmekte, böylece buldukları ortamda çökme davranışı göstermeden çözünmüş halde kalabilmektedir. Protein parçacıklarının ise dispersiyon içinde stabil kalabilmeleri için belirli koşulları sağlaması gerekmektedir. Genellikle yüksek elektriksel itme kuvvetinin varlığında, parçacıklar birbirlerini iterek agregat oluşumuna karşı koyabilmekte; ancak elektriksel yükler azaldığında parçacıklar birbirlerine yaklaşarak agregatları oluşturmaktadır. Bunun sonucunda da makro ölçekte bulanıklığın artması veya faz ayrımı gözlemlenmektedir.

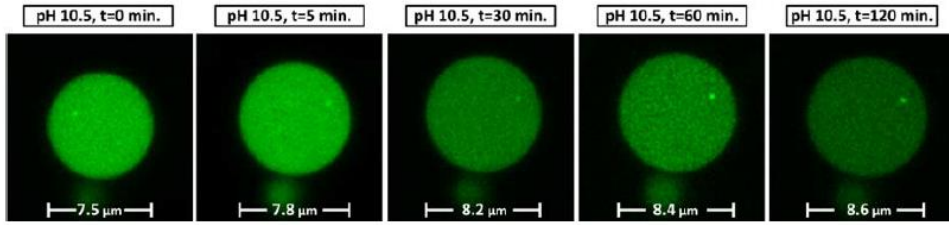
Önceki bir çalışmada, pH 5.5 ve pH 6.8’de üretilen PAS proteini parçacıklarının bulunduğu dispersiyonlar pH 2 ve pH 10 arasında farklı değerlere ayarlanmış ve parçacıkların davranışları incelenmiştir (Sağlam et al., 2013b). Dispersiyonun pH değeri 5’teyken iki parçacık türü için de faz ayrımı gözlemlenmiştir (Şekil 2.6). Bunun nedeni, pH 5 noktasının, proteinlerin izoelektrik noktasına yakın olması, dolayısıyla parçacıklardaki elektriksel kuvvetlerin de sıfıra yakın olmasındandır. pH 2 ve pH 9.5’te görülen beyazdan griye dönüşün nedeninin de parçacıkların içinde bulunan proteinler arasındaki elektriksel itme kuvvetinin artması sonucu parçacıkların şişmesi ve/veya kısmen parçalanması olduğu düşünülmektedir.



Şekil 2.6. pH 6.8 (üst sıra) ve pH 5.5’te (alt sıra) üretilen PAS proteini mikro-parçacık dispersiyonlarının farklı pH değerlerindeki stabilite gösterimleri (Sağlam et al., 2013b).

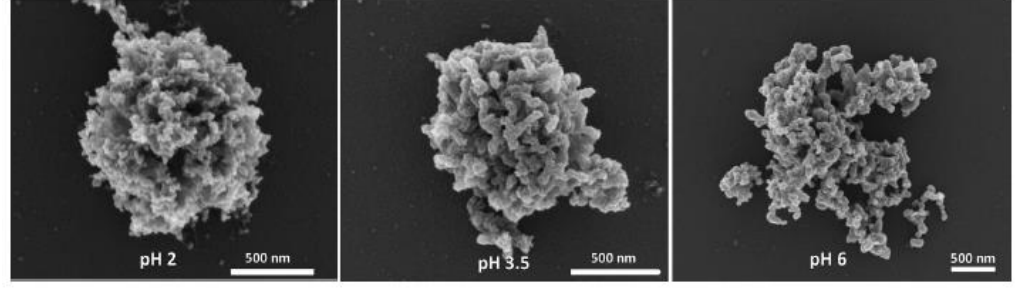


Aynı çalışmada, pH 6.8’de üretilen PAS proteini parçacıklarının ortamın pH değerinden etkilenerek şişme özelliği gösterdiği belirtilmiştir (Sağlam et al., 2013b). Parçacıkların boyutları, izoelektrik noktasından uzaklaştığında artmıştır. Parçacıkların şişmesi, lazer taramalı konfokal mikroskop (CLSM) ile de görüntülenmiştir (Şekil 2.7). Bunun için, pH 6.8’de üretilen parçacıklar nötr pH değerindeki dispersiyon içindeyken bir yüzeye sabitlenmiştir. Böylece sulu fazın pH değeri kademeli olarak değiştirildiğinde hep aynı parçacığın görüntüsü elde edilmiş ve parçacık boyutu hakkında net bir bilgi edinilmiştir. Parçacık boyutundaki artış, parçacıkların daha yumuşak olmasını sağladığı gibi dispersiyon içinde parçacık hacimsel oranının da artmasına sebep olmaktadır.



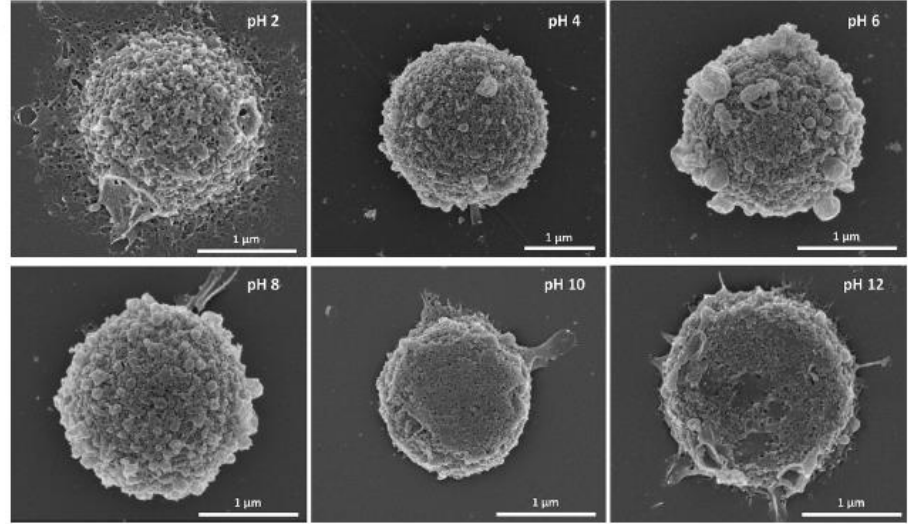
Şekil 2.7. pH 6.8’de üretilen PAS proteini parçacığının kademeli pH değişimi ile boyutunun değişiminin CLSM görüntülemesi (Sağlam et al., 2013b).

İkili emülsifikasyon yöntemiyle üretilen sodyum kazeinat parçacıklarının farklı pH değerlerindeki dispersiyonlarda gösterdiği davranış ise PAS proteini parçacıklarınınkinden farklı olmuştur (İnce Coşkun et al., 2015). Sodyum kazeinat parçacıkları, asitlendirme yöntemiyle yani proteinler arasındaki elektriksel etkileşimlerle oluşturulduğu için dispersiyonların pH değeri değiştikçe parçacıkların bütünlükleri de bozulmuştur. Parçacıkların, farklı pH değerlerindeki dispersiyonların içindeyken bütünlüklerini gösteren SEM görüntüleri Şekil 2.8’de verilmiştir. Kazeinlerin izoelektrik noktası pH 4’e yakın olduğundan (Ruis et al., 2007) pH 3.5’te en yoğun yapıda görülen parçacık, pH 2’de daha delikli bir yapı kazanmıştır. pH 6’da ise parçacığı bir arada tutan kuvvetler ortadan kalkmış ve parçacık dağılmaya başlamıştır. Kazeinat parçacıklarının ortamın pH değerine duyarlı olmaları, bu parçacıkların kontrollü salınım sistemlerinde kullanılabilmesinin önünü açmaktadır.



**Şekil 2.8.** Sodyum kazeinat parçacıklarının farklı pH ortamlarındaki bütünlükleri (İnce Coşkun et al., 2015).

Aynı çalışmada üretilen jelatin parçacıklarının ise ortamdaki iyonik yük değişimine daha dayanıklı oldukları bulunmuştur (İnce Coşkun et al., 2015). Parçacıklar farklı pH değerlerindeki ortamlarda bütünlüklerini korumuştur (Şekil 2.9). Jelatin parçacıkları da aynı PAS proteini parçacıkları gibi jelatinin izoelektrik noktasından (pH ~9) uzaklaştıkça şişmiş ve bu durum kayma viskozitesi ölçümlerinde tespit edilmiştir. Jelatinin şişme kapasitesi çok yüksek olduğundan (Skopinska-Wisniewska et al., 2021), farklı pH ortamlarında parçacık bütünlüğünün bozulmaması ancak esnekliğinin değişmesi beklenen bir sonuçtur.



**Şekil 2.9.** Jelatin parçacıklarının farklı pH ortamlarındaki bütünlükleri (İnce Coşkun et al., 2015).

Parçacıkların üzerindeki elektriksel kuvvetler, ortamdaki iyonların varlığından etkilenmektedir. Elektriksel kuvvetler, ortamdaki pH değerini değiştiren iyonlardan etkilenebileceği gibi, tuz iyonlarından da etkilenmektedir. Gıda endüstrisinde tuzlar, patojen veya gıdayı bozan mikroorganizmaların

çoğalmasının önlenmesinde, su tutma kapasitesinin artmasında, tekstür ve aroma gelişimi sağlamada, işlenmiş et ve fırıncılık ürünlerinde jelleşmenin ve tekstürün kontrolünü sağlamada, fermantasyonun kontrollü bir şekilde ilerlemesinde ve deniz ürünlerinde koruyucu olarak kullanılmaktadır (Elias et al., 2019; Tim, 2002). Gıdalarda yaygın olarak NaCl bulunmaktadır. Bunun yanında, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaNO<sub>3</sub>, Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> gibi tuzlar da gıda işleme sırasında kullanılmaktadır. Alüminyum tuzları, genelde meyvelerin kaplanması için kullanılan alüminyum pektat oluşumu için düşük miktarlarda kullanılmaktadır (Blekas, 2016).

Farklı değerliklerdeki tuz iyonlarının ortamda bulunan diğer elektriksel yüke sahip bileşenlerin stabiliteğini değiştirdiği bilinmektedir. Tuz iyonlarının, protein ve kolloidal parçacık stabiliteğine etki ettiği farklı çalışmalar mevcuttur (Curtis and Lue, 2006; Dumetz et al., 2007; Ginsburg and Carroll, 1965). Örneğin, tek değerlikli tuz iyonları, parçacıkların yüzeyindeki elektriksel yüklere perdeleme etkisi gösterirken, çok değerlikli tuz iyonları, yüzeydeki elektriksel yükü ters işaretleri bölgelere bağlanarak tuz köprüsü oluşturabilmekte ya da spesifik iyon etkisiyle parçacığın elektriksel yükünü değiştirebilmektedir (Lyklema, 2014; Nicolai and Durand, 2013). Elektriksel yükü değişen parçacığın dispersiyondaki stabilitesi veya davranışı da değişmektedir. Örneğin elektriksel yükü azalan parçacıklar koagüle olarak çökme davranışı gösterebilmektedir.

Koagülasyon terimi, agregasyondan farklı olarak parçacıklar için kullanılmaktadır. Literatürde, koagülasyon terimi, elektriksel olarak yüklü parçacıkların bir araya gelmesi şeklinde de tanımlanmıştır (Nichols et al., 2002). Agregat ise, genellikle çözeltilerde oluşan kümelenmeleri ifade etmektedir.

Kolloidal sistemler, günlük hayatta sadece gıda ürünlerinde değil, diğer birçok alanda da karşımıza çıkmaktadır. Örneğin, parfümlerde, böcek ilaçlarında, diş macunlarında, mürekkep ve boyalarda, yalıtım için kullanılan inşaat malzemelerinde de kolloidal sistemler sıklıkla yer almaktadır. Gıdalarda ise, başta sütün kendisi olmak üzere, krema, mayonez, sürülebilir jel türü gıdalar ve salata soslarında kolloidal sistemler bulunmaktadır. Bütün kolloidal sistemler oldukça farklı bileşenler içerse de temel stabilite mekanizmaları aynıdır.

Önceki çalışmalarda silika (Metin et al., 2014), lateks (Cao et al., 2015), kil (Saka ve Güler, 2006), ya da metal parçacık dispersiyonlarının (van Leeuwen et al., 2012) farklı tuzlarla olan etkilerine bakılmıştır. Bu çalışmalarda NaCl, CaCl<sub>2</sub>, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> ve LaCl<sub>3</sub> gibi +1, +2, ve +3 değerlikli katyonların bulunduğu tuzlar kullanılmış ve kolloidal parçacıkların hangi konsantrasyonlarda koagülasyon gösterdikleri tespit edilmiştir. Tuz iyonlarının değerlikleri arttıkça, kolloidal parçacıkların koagüle olmaya başladıkları tuz konsantrasyonları genellikle azalmıştır. Bu mekanizmayı açıklayan iki farklı yaklaşım bulunmaktadır: DLVO teorisi yaklaşımı ve spesifik iyon etkisi yaklaşımı. Bu yaklaşımlar kolloidal parçacıkların davranışlarını önceden tahmin etmekte ve matematiksel açıklamalar sunmaktadır.

#### 2.4.1. DLVO teorisi yaklaşımı

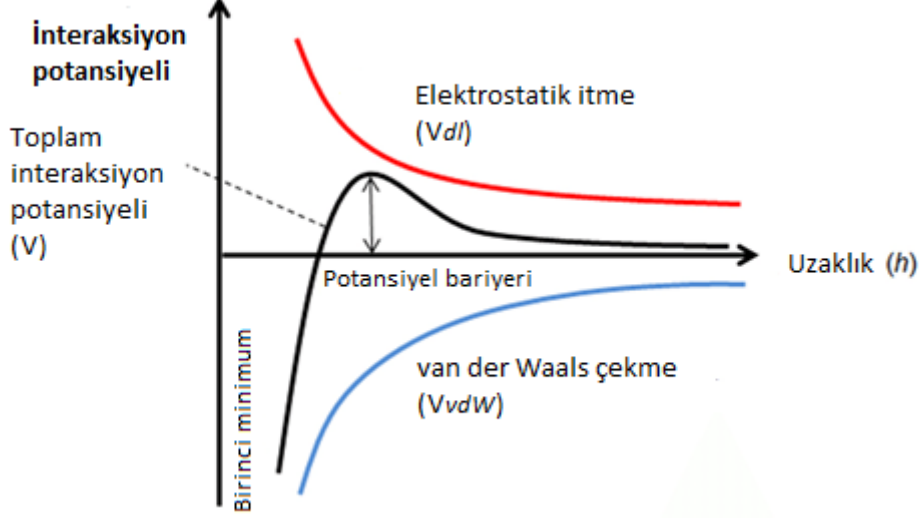
DLVO (Derjaguin, Landlau, Verwey, Overbeek) teorisi, kolloidal parçacık dispersiyonlarının stabiliteelerini van der Waals çekme ve elektriksel itme kuvvetleriyle açıklamıştır (Verwey, 1947). Teori, belirli varsayımlara dayanmaktadır. Bu varsayımlar;

1. Dispersiyonun seyreltik olması,
2. Yalnızca van der Waals çekme ve elektriksel itme kuvvetlerinin etkin olması,
3. Parçacıkların elektriksel yükler bakımından homojen olması,
4. İyonların dağılımında elektrostatik kuvvetler, Brownian hareketi ve entropinin etkin olmasıdır.

DLVO teorisi, kolloidal parçacıklar arasındaki interaksiyon potansiyelini, van der Waals çekme ( $V_{vdw}(h)$ ) ve çift katman itme kuvvetlerinin ( $V_{dl}(h)$ ) toplamına göre ifade etmektedir (Hsu and Liu, 1998),

$$V(h) = V_{vdw}(h) + V_{dl}(h)$$

$h$ , kolloidal parçacıklar arasındaki uzaklığı göstermektedir. DLVO teorisine göre stabil kolloidal parçacıkların interaksiyon enerjilerinin şematik gösterimi Şekil 2.10'da verilmiştir.



**Şekil 2.10.** Stabil parçacıkların DLVO teorisine göre interaksiyon enerjilerinin gösterimi (Cardellini et al., 2016).

Van der Waals etkileşimi aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır:

$$V_{vdW}(h) = \pi R[-H/(12\pi h)];$$

$R$ , kolloidal parçacığın yarıçapını,  $H$  ise Hamaker sabitini temsil etmektedir. Hamaker sabiti, proteinler için  $1.0 \times 10^{-20}$  J ile  $2.2 \times 10^{-20}$  J arasında değişmektedir (Roth et al., 1996) ve artan tuz konsantrasyonu ile bu sabitin azaldığı belirtilmiştir (Leite et al., 2012).

İkili itme kuvveti ise aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır:

$$V_{dl}(h) = \pi R[64k_B T c_0 \Gamma_0 \exp(-\kappa h)/\kappa^2];$$

$k_B$ , Boltzmann sabitini;  $T$ , sıcaklığı;  $c_0$ , iyon konsantrasyonunu;  $1/\kappa$ , Debye uzunluğunu ifade etmektedir. Debye uzunluğu, kolloidal parçacıklar arasındaki ikili elektriksel katmandır (elektriksel çift tabaka) ve aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır:

$$\kappa^{-1} = [(\epsilon\epsilon_0 k_B T) / (2e^2 \sum_i z_i^2 n_i)]^{1/2}$$

$\epsilon$ , çözücünün elektriksel geçirgenliğini;  $\epsilon_0$ , vakumun elektriksel geçirgenliğini;  $e$ , elementer yükü;  $z$ , iyonun değerliğini;  $n$ , dispersiyondaki iyon konsantrasyonunu ve  $i$ , ortamdaki farklı iyonları temsil etmektedir.  $\Gamma_0$  ise aşağıdaki formülle ifade edilmektedir;

$$\Gamma_0 = \tanh(ze\Phi_0(4k_B T))$$

Formüldeki  $\Phi_0$ , parçacıkların yüzey potansiyelini göstermekte ve yüksek yüzey potansiyeline sahip parçacıklarda genellikle  $2k_B T/e$  ( $\sim -50$  mV) olarak hesaplanmaktadır (Verwey, 1947).

Tuz içeren kolloidal parçacık dispersiyonlarında sedimentasyonun gözlemlendiği en düşük tuz konsantrasyonuna kritik koagülasyon konsantrasyonu (KKK) adı verilmiştir. KKK değeri, birçok kolloidal parçacık için DLVO teorisi ile açıklanmıştır.

Tuz iyonlarının KKK'larında interaksiyon potansiyeli ve birinci dereceden türevi sifıra eşitlenir:

$$V(h = h_m) = 0$$

$$(d V(h) / dh)_{h_m} = 0$$

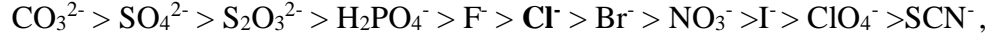
$h_m$ , iki parçacık arasındaki en yüksek interaksiyon potansiyelinin görüldüğü uzaklığı ifade etmektedir.

Kolloidal sistemler için KKK, genellikle karşı iyon yükünün değerliğiyle ters orantılı olarak bulunmuştur (Overbeek, 1980). Bu kural, DLVO teorisinden hesaplanan Schulze-Hardy kuralı olarak bilinmekte ve  $KKK \propto z^{-n}$  ile ifade edilmektedir.  $n$  değeri, kolloidal parçacıkların yüzey potansiyeline bağlı olarak 2 ile 6 arasında değerler alabilmektedir (Metcalf and Healy, 1990; Sano et al., 2000). Yüzey potansiyeli yüksek olan kolloidal sistemlerde  $n$  değeri genellikle 6'dır.

### 2.4.2. Spesifik iyon etkisi yaklaşımı

DLVO teorisi, kolloidal sistemlerin stabilitesini hesaplamada, genellikle NaCl, KCl gibi tek değerlikli tuz iyonlarının varlığında oldukça başarılı tahminler yapmakta, ancak  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  gibi çok değerlikli iyonların varlığında ölçülen ile tahmin edilenler değerler arasında fark görülmektedir. Bu durum spesifik iyon etkisinden kaynaklanabilmektedir. Spesifik iyon etkisi, parçacıklar üzerindeki elektriksel yüklerin heterojen dağılımı ile hidratlı katyonların parçacık yüzeyine bağlanma isteğinin yüksekliğinden kaynaklanmaktadır. Bu etki, DLVO teorisinin tahminlerinden sapmalara neden olmuştur (Dumetz et al., 2007; Guldbbrand et al., 1984; Nicolai and Durand, 2013; Sano et al., 2000; Szilagyi et al., 2013). DLVO teorisindeki varsayımlardan bazıları, gerçek durumlarla örtüşmeyebilir. Örneğin, dispersiyon yeterince seyreltik değilse veya elektriksel yükler parçacıklar üzerinde homojen dağılmamışsa, DLVO teorisinden sapmalar görülmektedir. Tek değerlikli iyonlar, kolloidal parçacıkların üzerindeki yayılım (diffuse) katmanında etkili olurken, çok değerlikli iyonlar parçacığa daha yakın olan Stern katmanına etki etmektedir. Dolayısıyla, çok değerlikli iyonların parçacıkların elektriksel yükünü azaltma ve yükün işaretini değiştirme kapasitesi bulunmaktadır. Bu nedenle, çok değerlikli iyonların varlığında, spesifik iyon etkisi baskın olarak görülmektedir.

Önceki çalışmalarda spesifik iyon etkisinin çözeltilerin kararlı yapısını (Vlachy et al., 2009), parçacıkların yüzey özelliklerini ve agregasyon mekanizmalarını (Dordovic et al., 2016), oluşan agregatların mikro-yapılarını (Roy et al., 2012) ve jellerin şişme özelliklerini (Swann et al., 2010) değiştirebildiği bulunmuştur. Ayrıca, spesifik iyon etkisinin proteinlerin çözünmesinde, polimer ve sürfaktanların sislenme noktasında, enzim aktivitelerinde, elektrolit çözeltilerinin yüzey aktif özelliklerini değiştirmede de rolü olduğu bilinmektedir (Kang et al., 2020). Özellikle ham protein çözeltilerinde agregat oluşumuna sebep olan veya proteinlerin suda çözünmesini kolaylaştıran farklı iyonlar bulunmaktadır. Bu farklı iyonların, Hofmeister serisi adı verilen bir iyon sıralamasıyla proteinler üzerindeki etki dereceleri belirlenmiştir. Hofmeister serisi negatif yüklü iyonlar için;



pozitif yüklü iyonlar için ise;

$\text{N}(\text{CH}_3)_4^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$  şeklindedir (Hofmeister, 1888). Klorür ve sodyum iyonları, sayı doğrusundaki sıfır noktası gibi kabul edilmektedir ve bu iyonların solunda kalan iyonların hidrasyonu zayıftır. Bu iyonlar genellikle ham proteinleri bu yapılarıyla korumayı destekler ve bazen de tuzla çökeltme (salting out) adı verilen bir etkiye sebep olurlar. Sodyum ve klorür iyonlarının sağında kalan iyonların ise hidrasyonları kuvvetlidir ve genellikle ham proteinlerin denatüre olmasına, bazen de tuzla çözündürme (salting in) adı verilen etkiye sebep olurlar (Kang et al., 2020).

## 2.5. Protein Parçacıklarının Isı Stabiliteleri

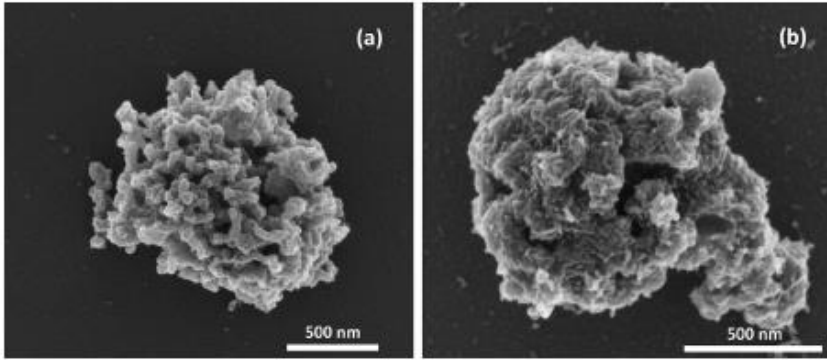
Pastörizasyon, sterilizasyon gibi ısı işlemler, gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yüzden, gıdalarda kullanılmadan önce protein parçacıklarının ısı stabilitesini araştırmak gerekmektedir. Protein parçacıklarının üretilme amaçlarından bir tanesi de ham proteinlere göre ısı stabilitelerinin yüksek olmasını sağlamak, böylece gıda işleme sırasında ham proteinlerden gelen olumsuz etkilerin önüne geçmektir (Sağlam et al., 2012). Bu yüzden, tasarlanan parçacıklarının ham proteinlere göre daha yüksek bir ısı stabilitesine sahip olması gerekmektedir.

Literatürde protein parçacıklarının ısı stabilitelerini arttırmaya yönelik çalışmalar mevcuttur. Özellikle süt proteinleriyle ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Chevallier et al., 2018; Sauer and Moraru, 2012; Zhang and Zhong, 2009). Bir çalışmada PAS proteini parçacıkları, transglutaminaz enzimiyle çapraz bağ oluşturması sağlanarak oluşturulmuş ve bu parçacıkların 90°C'de 20 dakika ısıtıldıktan sonra bile agregat oluşturmaya karşı direnç kazanması sağlanmıştır (Zhang and Zhong, 2009). Başka benzer bir çalışmada ise yine PAS proteinleri NaCl varlığında ısıtılarak agregat oluşturmaları sağlanmış ve ısı stabiliteleri artırılmıştır (Zhang and Zhong, 2010). Agregatları içeren çözelti 80°C'de 20 dakika boyunca ısıtılmış ve jelleşmeye karşı dirençli bulunmuştur.



Süt proteinlerinden PAS proteinleri dışında, kazeinlerin ısı stabiliteleriyle ilgili çalışmalar da yapılmıştır. Sütteki kazein miselleri, ısı stabiliteleri serum proteinlerine göre yüksek kolloidal parçacıklardır. Ancak, belirli pH ve sıcaklık koşullarında misel yapıları açılarak bütünlükleri bozulmakta ve sonucunda flokülasyon, jelleşme ya da faz ayrımı gözlemlenmektedir. Kazeinlerin ısı stabilitelerini araştırmak için yapılan bir çalışmada, kazein misel çözeltileri farklı pH değerlerinde hazırlanmış ve ısıtılmıştır (Sauer and Moraru, 2012). Çalışmadaki verilere göre pH <6.7'de kazeinler görünür şekilde koagüle olmuş, pH =6.9'da kazein parçacıklarının boyutlarında bir artış gözlenmiş, pH >6.9'da ise herhangi bir değişiklik olmamıştır. Artan pH değerlerinde  $\kappa$ - ve  $\beta$ -kazeinin disosiasyonu artmış ve kazeinin agregat olması sınırlanmıştır, dolayısıyla ısı stabilitesi de artmıştır.

İnce Coşkun et al. (2015)'un yaptığı farklı bir çalışmada da, iki aşamalı emülsifikasyon yöntemiyle izoelektrik noktada üretilen sodyum kazeinat parçacıklarının 90°C'de 30 dakika boyunca ısıtıldıktan sonra bütünlüklerini koruduğu, yalnızca yüzey yapılarında değişikliklerin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2.11). Yüzey yapısındaki değişikliğin, sulu fazda bulunan PAS proteinlerinin denatüre olarak parçacıkların yüzeyinde birikmesinden kaynaklanıyor olabileceği ifade edilmiştir.



**Şekil 2.11.** Sodyum kazeinat parçacığının (a) ısıtılmadan önceki ve (b) ısıtıldıktan sonraki SEM görüntüsü (İnce Coşkun et al. 2015).

Aynı yöntemle üretilen jelatin proteini parçacıklarının ısı stabilitesi de araştırılmıştır (İnce Coşkun et al., 2015). Jelatin ısıya duyarlı bir protein olduğundan, protein parçacıkları da 40°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda eriyerek

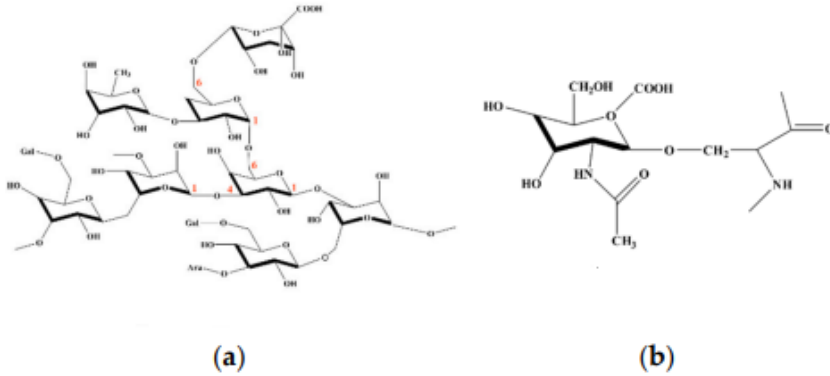
bütünlüklerini kalıcı olarak kaybetmişlerdir. Isı stabilitesini arttırmak için yapılan farklı bir çalışmada jelatinin, nişasta ile çapraz bağ oluşturması sağlanmış ve jelatin proteini için çok kısıtlı bir ısı stabilitesi sağlanabilmiştir (Skopinska-Wisniewska et al., 2021). Bir başka çalışmada da jelatin proteininin, UV-uyarımli şekilde glikoz ile çapraz bağ oluşturması sağlanmıştır ve jelatin jelinin 85°C'ye 30 dakika dayanabileceği hale getirilmiştir (Masutani et al., 2014).

Yapılan farklı bir çalışmada da, yine iki aşamalı emülsifikasyon yöntemiyle üretilen PAS proteini parçacıklarının ısı stabiliteleleri daha detaylı araştırılmıştır. pH 5.5 ve pH 6.8'de üretilen iki farklı tip PAS proteini parçacığı dispersiyonları 90°C'de 30 dakika boyunca ısıtılarak viskozite, parçacık boyutu, jelleşme gibi özellikleri incelenmiştir (Sağlam et al., 2012). Çalışmada daha yoğun protein içeren pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıkların ısıtıldıktan sonra parçacık boyutlarının değişmediği ve bu dispersiyonların kayma viskozitelerinin de sabit kaldığı belirtilmiştir. Ancak ısıtılma sonrası, pH 6.8'de üretilen parçacıkların parçacık boyut dağılımlarının yüksek değerlere kaydığı ve dispersiyonların viskozitelerinin de arttığı tespit edilmiştir. Daha yoğun yapıdaki pH 5.5 parçacıklarının denatürasyonun üretim aşamasındaki ısıtma sonucu tamamlandığı, sülfidril ve disülfid bağlarının yer değiştirme reaksiyonlarının devam etmediği düşünülmektedir. Dolayısıyla bu parçacıklarının ısı stabiliteleleri de diğer parçacıklara göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak, pH 6.8'de üretilen parçacıklar, belirli bir elektriksel yüke sahip olduklarından daha esnek yapıya sahiptir ve ısıtılma sonucu yeni bağların oluşmasına olanak tanımaktadır (Sağlam et al., 2012).

Benzer bir çalışmada ise, pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacıklarının ısı stabiliteleleri çevresel faktörlere bağlı olarak araştırılmıştır (Sağlam et al., 2013a). Bunun için dispersiyonlar, stabilizatör etki sağlayan bir çeşit protein (%1'lik ham PAS proteini veya sodyum kazeinat çözeltisi) ya da polisakkarit (Arap zamkı çözeltisi) çözeltisi içinde oluşturulmuştur. pH 6.8'de üretilen parçacıklar, dispersiyonda stabilizatör olarak ham proteinlerin bulunması durumunda, ısıtılma sonucu şişerek viskozite artışına neden olmuştur. Konsantrasyonları çok düşük olsa da, ham proteinlerin denatürasyonunun, yani yeni bağlar oluşturmalarının, parçacıkların koagüle olmalarına neden olabileceği düşünülmüştür. pH 6.8'de

üretilen PAS proteini parçacıkları, bir polisakkarit olan Arap zamkı çözeltisinde ısıtıldıklarında ise viskozite artışı engellenmiş, parçacık boyut dağılımının sabit kaldığı bulunmuştur. Arap zamkının varlığı PAS proteini parçacıklarının ısı stabilite arttırmıştır. Ancak bu stabilite artışının mekanizması açıklanamamıştır.

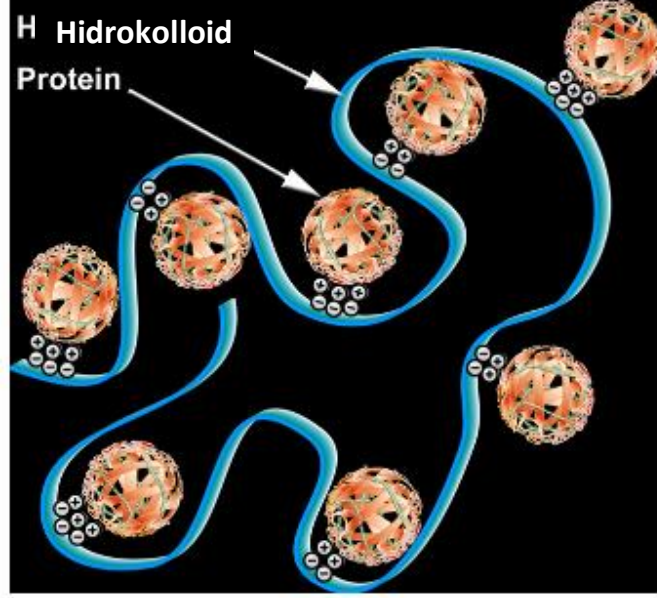
Arap zamkının yapısında yaklaşık %98 oranında arabinogalaktan bir omurga ve yaklaşık %2 oranında glikoprotein yan dallar bulunmaktadır (Weinbreck et al., 2004a; Yadav et al., 2007). Arap zamkının genel kimyasal yapısı Şekil 2.12'de gösterilmiştir. Yapısında protein bulunması, Arap zamkına hidrofobik özellik sağlamakta, dolayısıyla emülsifiye edici olarak kullanımına olanak tanımaktadır (Yadav et al., 2007). Ayrıca, Arap zamkının, polisakkarit (arabinogalaktan) omurgasındaki karboksil grupları ve protein dallardaki amino grupları sayesinde iyonik ortamlarda elektriksel yükü değiştirebilmektedir (de Kruif and Tuinier, 2001).



**Şekil 2.12.** Arap zamkının (a) arabinogalaktan omurga ve (b) glikoprotein yan dalının kimyasal yapısı (Palumbo et al., 2020).

Arap zamkının pKa değeri, yani ayrışma değeri, pH 2 civarındadır (Gulao et al., 2016) ve PAS proteini çözeltisi içinde Arap zamkı çoğunlukla negatif yüklüdür. Dolayısıyla, Arap zamkı ve PAS proteinleri arasındaki etkileşimin çoğunlukla elektrostatik kuvvetler olduğu düşünülmektedir (Klein et al., 2010). İki polimerin oluşturduğu kompleks yapının zeta potansiyeli, polimerlerin ayrı ayrı zeta potansiyel değerlerinin arasında bulunmuştur. Bu da, Arap zamkının proteinlerin belirli bölgelerine güçlü şekilde tutunduğunun bir göstergesidir. Bu durumda, negatif yüklü Arap zamkı, PAS proteinin üzerindeki pozitif yüklü

bölgelere elektrostatik kuvvetlerle bağlanmaktadır (Şekil 13). Elektrostatik etkileşimlerle oluşmuş Arap zankı-PAS proteini kompleksi esansiyel yağların enkapsülasyonunda ve kontrollü salınımında kullanılmıştır (Weinbreck et al., 2004b).



Şekil 2.13. PAS proteinleri ile Arap zankının olası elektrostatik etkileşiminin gösterimi (Klein et al., 2010).

Arap zankı ve proteinler arasındaki etkileşim mekanizmasını daha iyi anlayabilmek için, farklı polisakkaritlerle proteinlerin etkileşimine de bakılabilir. Böylece Arap zankının bilinen özelliklerinden hangilerinin etkin olduğu konusunda bir yorum yapılabilir. Örneğin ksantan, çözeltilerinde genelde negatif yüklü, jelleşme yapmayan ve lineer yapıda omurgası bulunan bir polisakkarittir (Zhang et al., 2014). Ksantan genellikle kıvam arttırıcı özelliğinden dolayı salata sosu ve fırıncılık ürünlerinde kullanılmaktadır (Saha and Bhattacharya, 2010). Önceki bir çalışmada PAS proteini parçacıklarıyla ksantanın etkileşimi incelenmiştir (İnce Coşkun, 2020). Çalışmada parçacık hacimsel oranı ve ksantan konsantrasyonu değiştirilen dispersiyonların stabiliteleri farklı yöntemlerle tespit edilmiştir. Hazırlanan dispersiyonların pH değeri yaklaşık 6.8 olarak belirtilmiştir. Bu pH değerinde, hem parçacıklar hem de ksantan negatif yüklü olduğundan, birbirlerine elektriksel çekme kuvveti uygulamamaktadır. Parçacıkların destabilizasyonun, düşük hacimsel oranlarda daha hızlı

gerçekleştiği, 0.05-0.075 g/L aralığındaki ksantan konsantrasyonlarının da dispersiyonlardaki faz ayrımını hızlandırdığı tespit edilmiştir. Buna göre, ksantan ve koloidal protein parçacıkları arasında tükenme (depletion) kuvvetlerinin etkin olduğu bulunmuştur (İnce Coşkun, 2020).

Bir başka polisakkarit olan dekstran ise Arap zambanının tersine, lineer yapıda, hidrofilik ve nötr karakterde bir biyopolimerdir (Lu et al., 2009). Hidrofilik bir molekül olmasından dolayı, dekstranın hidrofobik etkileşimlere katılması beklenmemektedir. Aynı şekilde, nötr yapısından ve çözeltilerde iyonik hale gelmemesinden dolayı, proteinlerle elektrostatik bir etkileşim içinde olması da beklenmemektedir. Bunların yerine, dekstranın yapısındaki hidroksil grupları sayesinde hidrojen bağı oluşturması daha yüksek olasılıktadır. Ayrıca, farklı molekül ağırlığındaki dekstran moleküllerinin boyutlarının farkından dolayı, bazı durumlarda tükenme etkileşimini (depletion interaction) tetiklemesi de mümkündür (Neu and Meiselman, 2006). Dekstran, sulu çözeltilerinde jelleşme göstermemekte, ancak %5'in üzerindeki konsantrasyonlarda viskoziteyi arttırmaktadır (Carrasco et al., 1989). Bu nedenle, gıdalarda tekstür geliştirici olarak sıklıkla tercih edilmektedir.

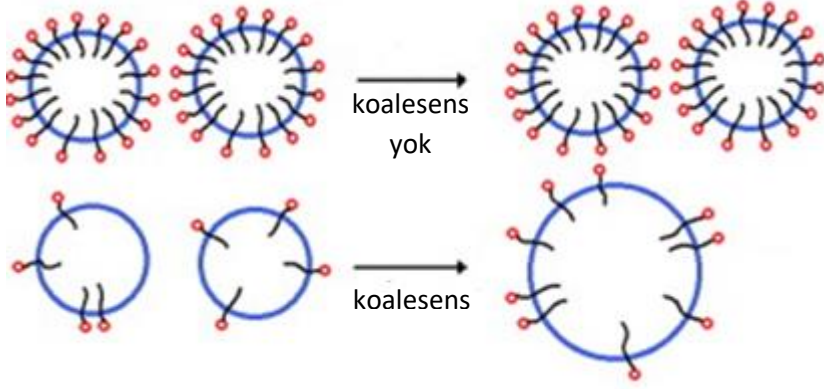
Literatürde, dekstran ve proteinlerin etkileşimleri genellikle ısı işlem uygulandıktan sonra incelenmiş, dolayısıyla da Maillard reaksiyonu ile açıklanmıştır (Spotti et al., 2013; Turan et al., 2018). Maillard reaksiyonu, bir amino asit ile indirgen şeker arasında ısı etkisiyle gerçekleşen, azotlu polimerik bileşiklerin oluştuğu, enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonudur. Bir çalışmada, PAS izolatu ile dekstranın sulu çözeltisinin 60°C'de Maillard reaksiyonu sonucu kompleks oluşumu sağlanmış ve dekstranın, proteini denatürasyon ve agregat oluşumuna karşı stabil hale getirdiği tespit edilmiştir (Zhu et al., 2008a). Ayrıca, bu şekilde oluşan dekstran-PAS proteini kompleksinin emülsiyonlarda daha kalın bir sterik bariyer oluşturduğu, yani PAS proteinlerinin emülsifiye edici özelliğinin de arttığı tespit edilmiştir (Zhu et al., 2010). Kompleks yapının oluşumunda, kovalent olmayan interaksiyonların ve sülfidril yer değiştirme reaksiyonlarının önemli rol oynadığı belirtilmiştir. Farklı bir çalışmada da PAS proteini-dekstran kompleksinin reolojik özelliklerine bakılmış ve dekstran tamamen hidrofilik yapıda olduğu için proteinlerdeki

hidrofobik interaksyonları azalttığı, bunun sonucunda da oluşan jellerin daha yumuşak yapıda olduğu gözlemlenmiştir (Spotti et al., 2014).

## **2.6. Proteinlerin ve Protein Parçacıklarının Yüzey Aktif Özellikleri**

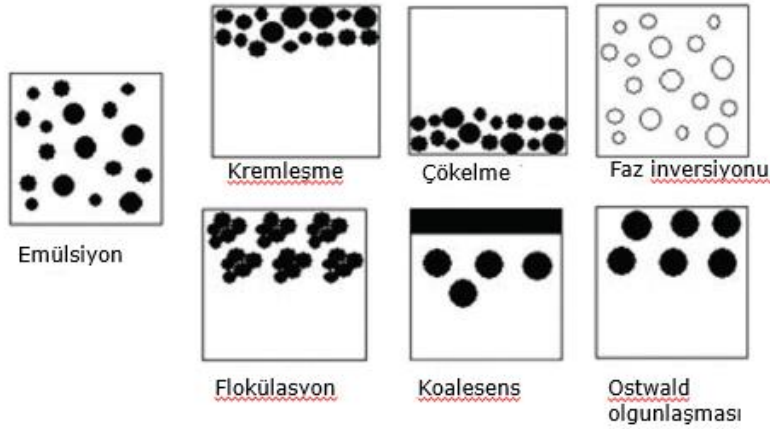
Emülsiyon sistemleri gıdalarda yaygın olarak bulunmaktadır. Protein içecekleri, dondurma, mayonez gibi gıdalar emülsiyon sistemlerine örnek olarak verilebilir. Bu sistemlerde sürekli faz, kesikli (dispers) faz ve yüzey aktif madde (sürfaktan) olmak üzere 3 ana bileşen bulunmaktadır. Emülsiyon sistemleri, termodinamik olarak stabil olmadıklarından, bu sistemleri stabil hale getirmek ve bu şekilde uzun süre tutmak zordur.

Sürfaktanlar sürekli faz ve kesikli faz arasındaki yüzeyi kaplayarak, yüzey gerilimini düşürmekte, böylece kesikli fazın sürekli faz içinde dağılmış halde kalmasını sağlamaktadır. Yaygın olarak kullanılan düşük molekül ağırlıklı sürfaktanlar, yüzeye hızlı bir şekilde tutunmakta ve yayılmakta, böylece damlacıkların koagülasyonunu engellemektedir (Dickinson, 2009). Ancak düşük molekül ağırlıklı sürfaktanlarda tutunma tersinir özellik göstermektedir ve tutunma kuvveti zayıf olabilmektedir. Yani sürfaktan, yüzeyden kolaylıkla ayrılarak su veya yağ fazında çözünebilmektedir. Bu durumda, sistemin stabilitesi de azalmaktadır. Sürfaktanların tüm ara yüzeyi kaplayarak homojen bir şekilde yayılması stabiliteye katkı sağlamaktadır. Sürfaktanların yetersiz gelmesi veya belli bir yerde kümelenmesi halinde ise, ara yüzeyde açıklıklar meydana gelmektedir; bu alanlardan kırılmalar oluşmakta ve kesikli fazın koagülasyonuna neden olmaktadır (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Sürfactanların ara yüzeydeki dağılımı ve sağladığı stabilite (Maindarkar et al., 2013).

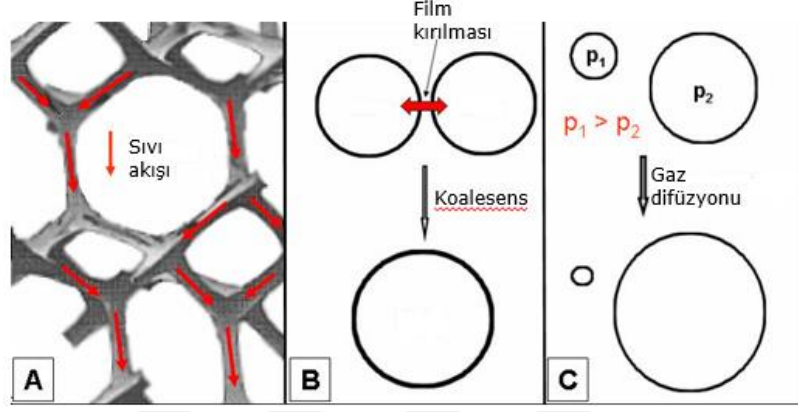
Emülsiyonlar flokülasyon, agregasyon ve koalesens gibi mekanizmalarla destabilize olmaktadır (Şekli 2.15). Destabilizasyon sonucunda kremleşme, sedimentasyon veya faz ayrımı gözlemlenebilmektedir. Bu mekanizmalardaki temel itici güç yerçekimi olup iki fazın yoğunluk farkından dolayı destabilizasyon gerçekleşmektedir (Sagis and Scholten, 2014; Tavernier et al., 2016).



Şekil 2.15. Emülsiyon sistemlerinde görülen destabilizasyon mekanizmaları (Maphosa and Jideani, 2018).

Emülsiyon ve köpük sistemlerindeki temel stabilite mekanizmaları birbirlerine benzerdir. Emülsiyonda yağ/su ara yüzeyinin kararlı kılınması, köpük sistemlerinde de hava/su ara yüzeyinin kararlı kılınması gerekmektedir. Bu nedenle, oluşum ve destabilizasyon mekanizmaları benzerdir. Köpük sistemlerinde, Şekil 2.16'da gösterilen, sıvı akışı (drenaj), film kırılması

(koalesens) ve gaz difüzyonu (disproportionation) adı verilen mekanizmalar destabilizasyona neden olmaktadır (Fameau and Salonen, 2014).



**Şekil 2.16.** Köpük sistemlerinde görülen destabilizasyon mekanizmaları (Fameau and Salonen, 2014).

Emülsiyonlardaki damlacıkların hareketleri temel fizik kurallarına göre, genellikle de damlacıkların küresel ve monodispers olduğu kabul edilerek, açıklanmaktadır (McClements, 2015). Buna göre, emülsiyonlardaki kremleşme veya dispersiyonlardaki sedimentasyon hızı Stoke's viskozite yasasına göre hesaplanmaktadır:

$$v = \frac{2r^2(\rho_{yağ} - \rho_{su})g}{9\eta}$$

$v$ , kremleşme ya da sedimentasyon hızını;  $r$ , dispers fazdaki parçacıkların yarıçapını;  $\rho$ , ilgili fazın yoğunluğunu;  $g$ , yerçekimi ivmesini ve  $\eta$ , sürekli fazın viskozitesini ifade etmektedir (Bird et al., 2002). Stoke's yasasına göre, parçacıklar küresel kabul edilmekte ve parçacıklar arasında elektrostatik veya hidrodinamik etkileşimlerin olmadığı varsayılmaktadır. Eşitliğe göre parçacık/damlacık boyutu büyük olan veya sürekli faz viskozitesi düşük olan emülsiyonlarda destabilizasyon hızı yüksektir.

Emülsiyonları ve dispersiyonları stabilize etmek için Stoke's eşitliğindeki parametreler değiştirilebileceği gibi, surfaktanların fiziksel ve kimyasal özelliklerinden de faydalanılmaktadır. Gıdalarda, proteinler ve polisakkaritler,



sürekli faz ve kesikli faz arasındaki yüzey gerilimini düşürdüklerinden, sürfaktan olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Proteinlerin hem hidrofilik hem hidrofobik amino asit parçaları taşımalarından dolayı yüzey aktif özellikleri bulunmaktadır (Hoffmann and Reger, 2014). Proteinlerin ikincil ve özellikle üçüncül yapıları sayesinde amfifilik özellik kazandıkları bilinmektedir (Koop et al., 2021). Bu nedenle, proteinler doğal polimerik sürfaktanlardır.

Kolloidal parçacıklar da sürfaktan özellik gösterebilmektedir. Sürfaktan olarak parçacıkların bulunduğu emülsiyon veya köpük sistemlerine, Pickering sistemleri adı verilmektedir (Pickering, 1907). Parçacıklar, ara yüzeylere düşük molekül ağırlıklı sürfaktanlara göre daha yavaş ancak daha güçlü tutunabilmekte ve damlacık ya da köpük yüzeyinde daha kalın bir tabaka oluşturabilmektedir (Gao et al., 2017). Yüzeyden ayrılma (desorpsiyon) enerjileri yüksek olduğundan neredeyse tersinir olmayan şekilde tutunabilmektedirler (Velikov et al., 1998). Parçacıkların ara yüzeyde oluşturduğu bu katman ve parçacıklar arasındaki etkileşimle ağ benzeri bir yapının oluşumu ara yüzeyi mekanik olarak güçlendirmekte ve böylece koagülasyona karşı dayanıklılık sağlamaktadır (Rayner et al., 2014). Pickering emülsiyon sistemlerinde kolloidal silika ve lateks parçacıkları gibi gıda dışı parçacıkların kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Adelmann et al., 2012; Binks and Lumsdon, 2001). Bu sistemlerde, ara yüzeyin parçacıklar tarafından etkili bir şekilde güçlendirildiği, böylece emülsiyon stabilitesinin arttığı belirtilmektedir. Gıdaya uygun sistemlerden ise nişasta (Tan et al., 2012), kitosan (Wei et al., 2012), PAS proteini mikro jelleri (Destribats et al., 2014) gibi parçacıkların emülsiyon sistemlerinde sürfaktan olarak kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Bu parçacıkların her biri farklı tekno-fonksiyonel özellik gösterse de, hepsinin sürfaktan özelliklerinin yüksek olduğu bildirilmiştir.

Pickering sistemlerinde, parçacıkların birbirleriyle etkileşimi oldukça önemlidir (Linke and Drusch, 2018). Parçacıklar elektrostatik veya sterik etkileşimlerle yüzeyi kaplama oranını değiştirebilmektedir. Parçacıklar ara yüzeyde bir ağ yapısı oluşturuyorsa, sistemi daha iyi stabilize etmekte, ancak elektriksel yükleri azalıp da agregat oluşturuyorsa, ara yüzeyde boşluklar kalacağından, damlacık ya da köpük baloncukları kırılmaya ve koagülasyona açık

hale gelmektedir. Bu nedenle, parçacıklar arasındaki etkileşim emülsiyon ve köpük sistemlerinin stabilitesinde önemlidir.

Parçacıkların yüzeye sıkı tutunabilmeleri ve yüzeyde kalabilmeleri için belirli özelliklerinin olması gerekmektedir. Aşağıdaki eşitlik, parçacıkların serbest yüzey enerjilerini göstermekte olup ve bu değer yüksek olması, parçacıkların sürfaktan özelliklerinin de yüksek olduğunu ifade etmektedir:

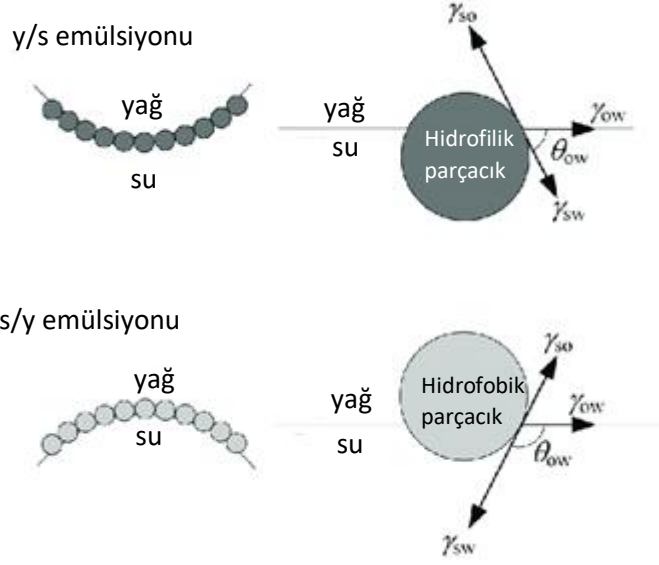
$$G = \gamma_{1S}A_{1S} + \gamma_{2S}A_{2S} + \gamma_{12}A_{12}$$

Bu eşitlikte,  $G$  yüzeye tutunmuş bir parçacığın serbest yüzey enerjisini;  $\gamma_{1S}$ ,  $\gamma_{2S}$  ve  $\gamma_{12}$  sırasıyla birinci faz-parçacık arasındaki, ikinci faz-parçacık arasındaki ve birinci-ikinci fazlar arasındaki yüzey gerilimlerini;  $A_{1S}$  ve  $A_{2S}$ , sırasıyla parçacıklarla birinci ve ikinci fazın arasındaki kontak alanını,  $A_{12}$  ise birinci ve ikinci fazın arasındaki parçacıkların olmadığı kontak alanını ifade etmektedir.

Parçacıkların yüzeyden ayrılma enerjileri ise aşağıdaki eşitlikle hesaplanmaktadır:

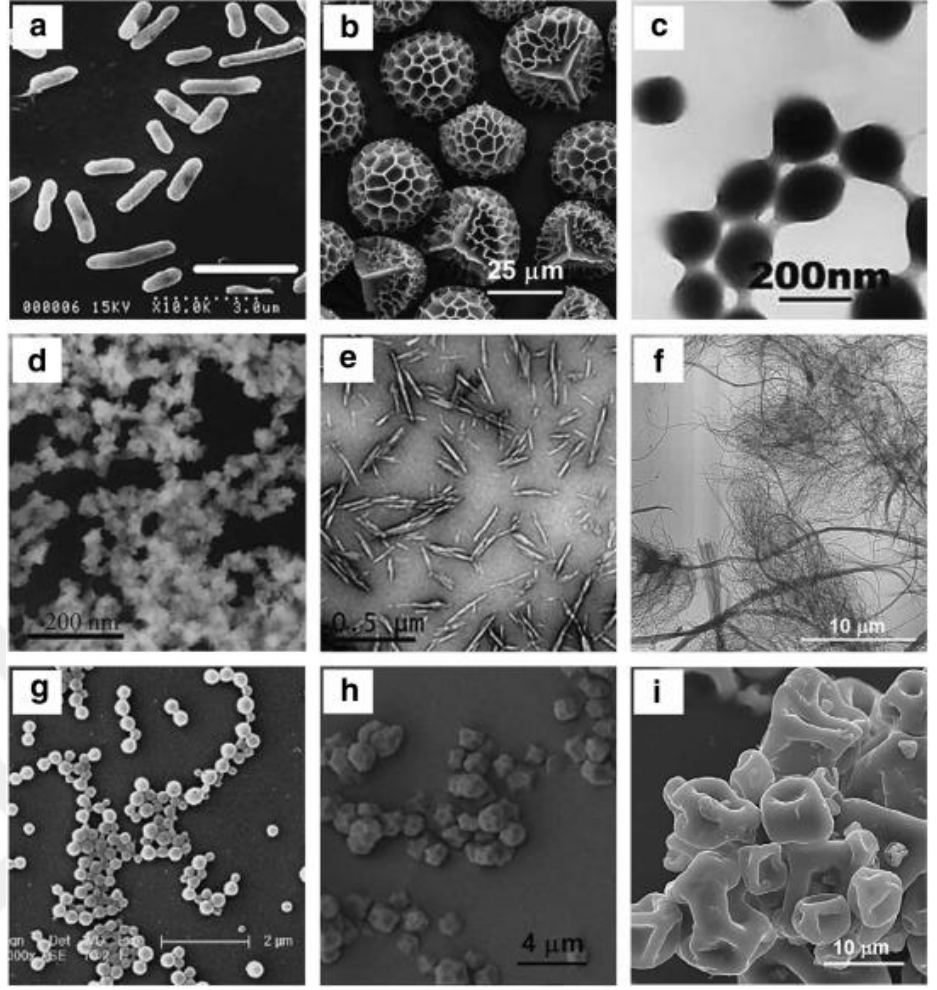
$$G = -\Delta E = \pi r^2 \gamma_{12} (1 - |\cos \theta_{12}|)^2$$

Bu eşitlikte  $r$ , parçacığın yarıçapını;  $\gamma_{12}$ , iki faz arasındaki yüzey gerilimini;  $\theta_{12}$  ise parçacığın temas açısını (contact angle) göstermektedir (Lam et al., 2014). Örneğin, küresel parçacıklarda temas açısı  $90^\circ$ 'den küçükse parçacıklar hidrofilik sürfaktan özelliği göstermekte ve su içinde yağ özelliği taşıyan emülsiyonlar oluşturmaktadır (Şekil 2.17). Temas açısı  $90^\circ$ 'den büyükse, parçacıklar hidrofobik özellik göstererek yağ içinde su emülsiyonları oluşturmaktadır. Temas açısı  $90^\circ$ 'ye yakınsa, kolloidal parçacıklar neredeyse tersinmez olarak yüzeye tutunmakta ve stabil emülsiyonlar oluşturmaktadırlar, ancak tam  $90^\circ$ 'lik temas açısına sahip parçacıklar amfifilik özellik gösterdiklerinden ara yüzeydeki davranışları da farklılık gösterebilmektedir (Agarwal, 2017). Bu tür parçacıklara Janus parçacığı adı verilmektedir, kendiliğinden kurulma (self-assembly) veya kimyasal sentez yöntemleriyle üretilebilirler (Poggi and Gohy, 2017).



Şekil 2.17. Pickering emülsiyonların oluşum mekanizması (Inoue et al., 2008).

Parçacıkların ıslanabilirlik, boyut, şekil, yüzey yapısı ve konsantrasyon gibi özellikleri de sürfaktan özelliklerini belirlemektedir (Binks, 2002). Kolloidal parçacıklardaki ıslanabilirlik, temas açısı ile ölçülmektedir. Parçacıkların boyut ve şekilleri en/boy oranını değiştirdiğinden, Pickering sistemlerde önemlidir. En/boy oranı, parçacığın kendi içindeki en kısa çapın buna dik en uzun çapa oranı olarak ifade edilmektedir. Çubuk veya disk şeklindeki parçacıkların, en/boy oranlarından dolayı sürfaktan özelliği en yüksek bulunmuştur (Tavernier et al., 2016). Farklı biyolojik kaynaklardan elde edilen ve farklı şekillerdeki nano- ve mikro-parçacıkların görüntüleri Şekil 2.18’de verilmiştir. Parçacıkların şekilleri çubuk, fibril, ya da küresel olabildiği gibi, yüzeyi sünger gibi pürüzlü veya daha düzgün olan parçacıklar da mevcuttur. Parçacıkların en/boy oranları farklı olduğu gibi, boyut dağılımlarındaki farklılık da sürfaktan özelliklerini etkilemektedir (Bindal et al., 2002).

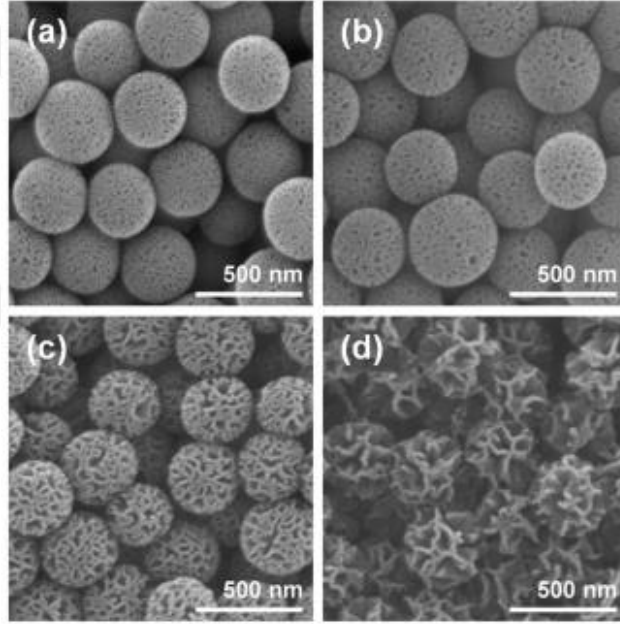


**Şekil 2.18.** Farklı biyopolimer ve biyo-parçacıkların SEM görüntüleri; (a) *E. coli* bakterisi, (b) yosun sporları, (c) etil selüloz nanoparçacıkları, (d) kitosan nanoparçacıkları, (e) pamuk selülozu nanokristalleri, (f) selüloz fiberleri, (g) nişasta nanoparçacıkları, (h) kinoa nişastası granülleri, (i) soya proteini parçacıkları (Lam et al., 2014).

Köpüklenme çalışmalarında, parçacık boyutlarıyla ilgili farklı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, beta-laktoglobulin parçacığı ve kazein miselleriyle yapılan, parçacık boyutları 0.6 ile 1.1  $\mu\text{m}$  arasında değişen farklı çalışmalarda büyük parçacıkların köpük stabilitesinde daha etkili olduğu bulunmuştur (Chen et al., 2016; Dombrowski et al., 2016). Bununla birlikte, protein-polisakarit kompleks yapılarını içeren farklı bir çalışmada ise çapı 0.5  $\mu\text{m}$ 'den küçük olan parçacıkların daha stabil sistemler oluşturduğu gözlemlenmiştir (Schmidt et al., 2010). Parçacık boyutları ve boyut dağılımları hem yüzeydeki davranışları hem de dispersiyon içindeki koagülasyon davranışlarını etkilediğinden, tek başına parçacık boyutunun Pickering sistemleri stabilize etmedeki etkisinden söz

edilememektedir. Bu nedenle, çalışmalardaki parçacık boyutu etkisi de yalnızca o çalışmadaki sisteme özgü olarak değerlendirilmektedir.

Parçacıkların yüzey yapıları da, yüzeye tutunmalarında ve birbirleriyle etkileşimlerinde önemlidir. Ancak, aynı parçacık boyutunda olduğu gibi, yüzey yapıları da farklı mekanizmalara bağlıdır, dolayısıyla fonksiyonel özellikleri de sistemlere özgüdür. Örneğin, bir çalışmada, pürüzlü yüzey yapısına sahip silika parçacıklarının su içinde yağ emülsiyonlarının stabilitesini arttırdığı bulunmuşken (Vignati et al., 2003), farklı bir çalışmada bunun tam tersi gözlenmiştir (San-Miguel and Behrens, 2012). Yüzey yapıları modifiye edilmiş aynı silika nanoparçacığı örnekleri Şekil 2.19'daki gibi olabilmektedir.



**Şekil 2.19.** Yüzey yapıları farklı silika nano-parçacıklarının SEM görüntüleri (Kang et al., 2016).

Yüzey aktif özelliği, her proteinde yeterince yüksek olmayabilir. Çeşitli kimyasal ve enzimatik işlemlerle yüzey aktif özelliği yüksek glikoprotein, lipoprotein gibi kompleksler oluşturulabilmektedir (Bouyer et al., 2012). Bunun yanı sıra, proteinlerin kısmi agregasyonunun, köpük sistemlerinde stabiliteyi arttırdığı tespit edilmiştir (Britten and Lavoie, 1992; Damodaran, 2005; Lam et al., 2014). Ham proteinlerin ortamda bulunması, köpük oluşumunu kolaylaştırmış, agregat halindeki proteinler de koloidal parçacık gibi davranarak

ara yüzeye mekanik direnç sağlamıştır. Literatürde, kazein (Chen et al., 2016), soya (Matsumiya and Murray, 2016), sodyum kazeinat (İnce Coşkun and Özdestan Ocak, 2021a) ve PAS proteinleri (Lazidis et al., 2016) ile elde edilen parçacıklarla stabilize edilen köpük sistemlerinin özellikleri çalışılmıştır. Bu çalışmaların hepsinde, parçacıkların güçlü bir şekilde yüzeye tutunduğu ve bu sayede köpük sistemlerinin stabiliteğini arttırdığı belirtilmiştir. Parçacıkların mekanik bir bariyer sağlayarak sistemlerin ömrünü uzatmasının yanı sıra, viskoziteyi arttırarak da drenaja karşı bir direnç oluşturduğu bilinmektedir (Lazidis et al., 2016). Yüzey aktif özelliklerinin parçacıkların iç yapısı ve sertliğiyle de ilişkili olduğu bilinmektedir. Örneğin, parçacıkların yumuşak yapıda olması ve şişme özelliği gösterebilmesi sürfaktan özelliklerini arttırmıştır (Ahmed, 2015). Ayrıca, denatüre olmuş soya proteinlerinin (Matsumiya and Murray, 2016) ve sodyum kazeinat parçacıklarının (İnce Coşkun and Özdestan Ocak, 2021a), ham hallerine göre daha iyi yüzey aktiflik gösterdiği de belirtilmiştir.

Parçacıkların fizikokimyasal özellikleri hava/su veya yağ/su ara yüzeyindeki davranış biçimlerini de belirlemektedir, bu nedenle özellikle tasarlanan parçacıklarda yüzey aktif özelliklerin bilinmesi emülsifiye gıdalarda ya da köpük sistemlerinde kullanım için önemlidir. Ayrıca, parçacıkların farklı polimerlere tutunma özellikleri, yalnızca gıdalarda değil, eczacılık, kozmetik gibi alanlarda, kontrollü salınım sistemlerinde de kullanımlarını olanaklı kılmaktadır.

## **2.7. Proteince Zenginleştirilmiş Gıdalar**

Proteince zenginleştirilmiş gıdalar hasta, yaşlı, bebek veya sporcu beslenmesi gibi özelleşmiş gruplarda sıklıkla kullanılmaktadır. Her bir grup için piyasada medikal veya ticari ürünler satışa sunulmaktadır. Bu ürünler ekmek, kek, süt ürünleri, meyve suları, dondurma, et ürünleri veya çorba gibi katı veya sıvı formlarda olabilir (Beelen et al., 2018).

Yapılan bir çalışmada glutensiz un karışımları, protein miktarlarını arttırmak için soya ve bezelye unlarını pirinç unuyla karıştırılarak hazırlanmıştır (Marco and Rosell, 2008a). Un karışımları, farklı unlar değişen miktarlarda

karıştırılarak, protein konsantrasyonu ağırlıkça %25 olacak şekilde hazırlanmıştır. Buna göre, elde edilen glutensiz hamurların su tutma kapasiteleri %150 oranında arttırılabilmektedir. Un karışımının yağ içinde su emülsiyonlarındaki yüzey aktif özellikleri ile hamurların mekanik özellikleri ise ancak transglutaminaz enziminin kullanılmasıyla iyileştirilebilmiştir ve enzim kullanımının proteince zenginleştirilmiş glutensiz un karışımlarına uygun olduğu ifade edilmiştir. Marco and Rosell (2008b)'in farklı bir çalışmada da soya unuyla zenginleştirilmiş pirinç unundan elde edilen ekmeklerde transglutaminaz enziminin kullanımının kabuk sertliğini arttırdığı ve daha homojen bir kabuk oluşturduğu belirtilmiştir.

Başka bir çalışmada protein ve lif bakımından zenginleştirilmiş makarnanın doyumluk hissi verme durumu araştırılmıştır (Martini et al., 2018). Sağlıklı bireylerle yapılan bu çalışmada, protein ve lif bakımından zenginleştirilmiş makarnanın doyumluk hissini arttırdığı, ancak makarnanın doyumluk hissini arttırmasıyla tadının bozulduğu tespit edilmiştir.

Farklı bir çalışmada da Shah et al. (2017), proteince zenginleştirilmiş mısır cipsi üretmişlerdir. Çalışmada mısır cipsine nohut unu ve yağı alınmış soya unu ağırlıkça %20 ve %40 olacak şekilde eklenmiş ve fiziksel, tekstürel ve duyuşal özellikleri araştırılmıştır. Buna göre, parça başına yoğunluk, su tutma kapasitesi, sertlik ve yapışkanlık artarken; genleşme oranı, esneklik, çignenebilirlik ve elastikiyet azalmıştır. Duyuşal analizlerde de ağırlıkça %15 soya unu ve %15 nohut unu içeren cipsler en yüksek skoru almıştır.

Şimşek et al. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, mercimek ve börülcenin tohumları veya filizleri ezme ve sıkma yöntemleriyle, farklı miktarlarda domates, havuç, pancar, kereviz, maydanoz, kıvırcık, karalahana, limon ve mantar sularını içeren sebze sularına eklenerek protein miktarları arttırılmıştır. Bu sebze sularının çığ ve fermente edilmiş türlerini üreterek yenilikçi, sağlıklı ve proteince zenginleştirilmiş sebze suları üretilmiştir. Benzer başka bir çalışmada ise, protein bakımından zengin lahana suyu, çilek suyu eklenerek polifenolce zenginleştirilmiş (Stüber et al., 2019), ancak protein-polifenol etkileşiminden dolayı stabilite problemlerinin arttığı belirtilmiştir. Bir başka çalışmada da maş fasulyesi ekstraktı kullanılarak elma ve domates sularının

protein miktarı arttırılmış ve besinsel açıdan zenginleştirilmiştir (Jain et al., 2014).

Proteince zenginleştirme, süt içeceklerinde de çalışılmıştır (Bertenshaw et al., 2013). Çalışmada meyve aromalı yoğurt içeceğine PAS proteini eklenmiş ve karbonhidratça zenginleştirilmiş aynı tür içeceklerle tekstürel özellikleri ve sağladığı doygunluk hissi karşılaştırılmıştır. Buna göre, maltodekstrin ve şeker içeren yoğurt içeceklerinin, proteince zenginleştirilmiş yoğurt içecekleriyle benzer tekstürel özellikler gösterdiği; ancak doygunluk hissi sağlama konusunda protein katkısının daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada da ağırlıkça %1 ile %4 arasında PAS proteini içeren su içeceklerinin obez kadın hastalar üzerindeki doygunluk hissi ve enerji alımı araştırması yapılmıştır (Poppitt et al., 2011). Bu çalışmaya göre de, kısa süreli doygunluk hissini belirgin şekilde arttığı, ancak içeceğin tüketiminden 2 saat sonra etkisinin geçtiği belirlenmiştir. Enerji alımı için gerekli miktarın da yalnızca bir kısmını karşıladığı tespit edilmiştir.

Yağsız fermente süt içeceklerinde yapılan farklı bir çalışmada ise soya, bezelye ve pirinç proteini ile buğday gluteni eklenerek fizikokimyasal, besinsel ve duyuşal özellikleri araştırılmıştır (Akin and Ozcan, 2017). Eklenen proteinlerin tekstür ve duyuşal özellikler üzerinde olumlu etkilerinin olduğu, süt içeceğinin besinsel değerini arttırdığı ve özellikle soya proteini katkısında esansiyel amino asit miktarının en yüksek olduğu belirtilmiştir.

Proteince zenginleştirilmiş içeceklerin tasarlanması, proteinlerin ortamda bulunan diğer bileşenlerle etkileşiminden dolayı zordur (Nazir et al., 2019). Örneğin, sporcu içeceklerinde proteinlerin elektrolitlerle, yani tuzlarla, etkileşimi stabilite problemleri oluşturmaktadır. Benzer şekilde polifenol-protein interaksiyonları da çökme, bulanıklık gibi stabilite problemlerine sebep olmaktadır (Stüber et al., 2019). Baccouche et al. (2013)'in yaptığı bir çalışmada PAS proteini içeren armut suları fiziksel özellikleri ve stabiliteleri bakımından incelenmiştir. İçeceklerindeki şeker, polisakkaritler, polifenoller ve minerallerle proteinlerin etkileşimi sonucu faz ayrımı görüldüğü belirtilmiştir. Proteinlerin diğer bileşenlerle başlıca etkileşiminin elektrostatik olduğu tespit edilmiş ve bu



duruma neden olan iki farklı mekanizma önerilmiştir. Birincisi kompleks oluşumu, yani proteinlerin diğer bileşenlerle birleşerek faz ayrımına neden olmasıdır. İkincisi ise termodinamik uyumsuzluk, yani proteinlerin diğer bileşenlerden ayrışarak faz ayrımına neden olmasıdır. Özellikle depolama sırasında ortaya çıkan bulanıklık, çökme ya da faz ayrımı gibi problemler nedeniyle proteince zenginleştirilmiş içeceklerde optimizasyon yapılması gerekmektedir.

## **2.8. Fonksiyonel Bir İçecek Olarak Proteince Zenginleştirilmiş Kefir**

Kefir, starter kültür ve kefir taneleriyle fermantasyon sonucu elde edilen, kıvamlı, asitli ve az miktarda alkol içerebilen bir süt ürünü içeceğidir (Akai vd., 2016). Kefirin kendine özgü tadının laktik asit bakterileri, asetik asit bakterileri ve mayalar sayesinde oluştuğu bilinmektedir (Guzel-Seydim et al., 2005).

Kefirin sağlık açısından birçok faydası bulunduğu farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Antimikrobiyal (Miao et al., 2016), antikarsinojenik (Reis et al., 2019), kolesterol düşürücü (da Silva Ghizi et al., 2021), şeker metabolizması (Hertzler and Clancy, 2003), sindirim (Moura et al., 2021) ve bağışıklık sistemlerinde (Guzel-Seydim et al., 2011a) de düzenleyici etkileri bulunmaktadır. Bu etkiler, süttten ve fermantasyon metabolitlerinden gelen ortak etkilerdir.

Kefir protein, aroma gibi bileşenlerle zenginleştirmeye uygun bir içecektir. Bu durum, protein tüketimi yüksek öneme sahip hasta veya yaşlı beslenmesinde değerlendirilebilir. Literatürde, protein miktarı arttırılmış kefir çalışmaları bulunmaktadır (Sady et al., 2009; Ziarno et al., 2021). Bu çalışmalarda protein tozu veya izolatları ham haliyle kullanılmıştır. Bu durum, tekstürel ve besinsel açıdan kefiri zenginleştirirse de duyuşsal olarak bazı problemleri de beraberinde getirmektedir. Farklı bir çalışmada ise kefirin fiziksel özelliklerini geliştirmek amacıyla denatüre PAS proteinleri ve pektini beraber kullanmışlardır (Wang et al., 2021b).

Kefir üretiminin aşamaları temel olarak;

1. Standardize edilmiş homojenize sütün 85-90°C'de 20 dakika süreyle ısıtılması,
2. 25°C'ye soğutulması,
3. Kullanılacak kültür veya kefir tanesi oranına göre %2-4.5 arasında inokülasyon,
4. pH 4.6'ya gelinceye kadar inkübasyon, ve
5. Ambalajlanarak 4°C'de depolama şeklindedir (Ersoy ve Uysal, 2003).

İşlem basamaklarından standardizasyon, homojenizasyon ve ısıtma, kefirin fizikokimyasal özelliklerini belirleyen temel basamaklardır. Standardizasyon ve homojenizasyon işlemleriyle değişebilen parametrelerden, sütteki kuru madde miktarı ve yağ damlacıklarının büyüklüğü kefirin reolojik özelliklerini belirlemede rol oynamaktadır (Ergin vd., 2017). Örneğin, yağ damlacıklarının büyük olması homojenizasyonun yetersizliğine işaret etmekte ve faz ayrımını hızlandırmaktadır, ancak damlacıkların küçük olması için yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi de sütteki kazeinlerin etkinliğini azaltarak kefirin kıvamının bozulmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, homojenizasyon basıncı ve süresi optimize edilerek kefirin fiziksel ve kimyasal özellikleri uygun hale getirilmektedir.

Sütteki kuru madde miktarı, sütün ısıtılma işlemi ve inkübasyon sıcaklığı kefirin fiziksel ve duyuşal özelliklerini etkileyen faktörlerdendir (Lee and Lucey, 2004). Kuru madde miktarının artması genellikle viskoziteyi de arttırmıştır. Örneğin, yoğurt üretiminde manda sütü kullanıldığında inek sütüne göre daha katı bir yapının elde edilmesinin nedeni, manda sütünün inek sütüne göre daha fazla protein ve özellikle daha fazla kazein içermesidir. Ayrıca, sütteki kazein misellerinin yüzey aktif özellikleri ve yağ damlacıklarının boyutları da kefirin tekstürel ve reolojik özelliklerini etkilemektedir (Özdemir ve Bodur, 1994).

Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği'ne göre, kefirdeki süt proteini ağırlıkça en az %2.7, süt yağı en fazla %10, titrasyon asitliği en az %0.6 ve maya miktarı en az 104 kob/g olarak belirlenmiştir (Anon., 2009). Kefirin

kalite parametreleri fiziksel, kimyasal, duysal ve mikrobiyolojik olmak üzere 4 farklı kategoride incelenmektedir. Kefirin fiziksel özellikleri içinde viskozite ve serum ayrılması değerlendirilmektedir. Kimyasal özellikler ise kefirdeki protein, yağ, kuru madde miktarını, kefirin pH değerini ve titrasyon asitliğini kapsamaktadır. Ayrıca, kefirdeki serbest amino asit miktarı ve biyojen amin analizi de kefirin kimyasal analizleri arasında değerlendirilmektedir (Özdestan and Üren., 2010a). Kefir, hem fermente hem de proteinli bir içecek olduğundan biyojen amin oluşumuna açık bir sistemdir.

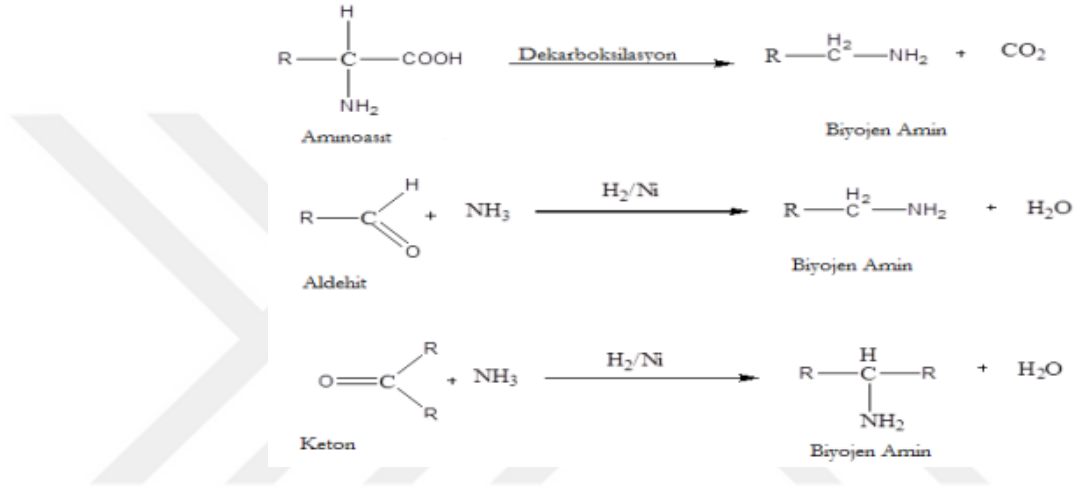
## 2.9. Biyojen Aminler

Protein miktarının artması özellikle fermente gıdalarda bazı gıda güvenliği ile ilgili tehlikeleri de beraberinde getirmektedir. Biyojen amin konsantrasyonundaki artış bu tehlikelerden biridir (Akan and Özdestan Ocak, 2021; Özdestan and Üren, 2010a). Sosis gibi fermente et ve peynir, yoğurt gibi fermente süt ürünleri biyojen amin oluşumu için ideal bir ortam oluşturan gıdalardandır. Ortamda serbest amino asitlerin varlığı ve üretim sırasında eklenen veya kontamine olan mikroorganizmalar biyojen amin oluşumuna neden olmaktadır.

Biyojen aminler, bitki ve hayvanlarda doğal olarak bulunan organik bazlı düşük molekül ağırlıklı azotlu bileşiklerdir (Ten Brink et al., 1990). Biyojen aminlerin insan vücudunda hormon, nükleik asit ve protein sentezi gibi farklı metabolik işlevleri vardır, ancak yüksek konsantrasyonlarda toksik etki göstermektedirler. Biyojen aminler bir çok gıdada doğal olarak bulunmaktadır. Örneğin, meyve, sebze, baklagiller gibi fermente olmayan gıdalarda da var oldukları bilinmektedir; ancak et, süt, soya ürünleri, şarap, bira, turşu gibi fermente gıdalarda yüksek konsantrasyonlarda oluşmaktadır (Shalaby, 1996). Normal koşullarda vücuda alınan biyojen aminler monoaminooksidaz, diaminoooksidaz ve histamin-N-metil transferaz enzimleriyle detoksifiye edilmekte, ancak yüksek miktarlarda tüketilmeleri halinde duyarlılık gelişmektedir. Örneğin, histamin yüksek konsantrasyonlarda tüketildiğinde, gıda zehirlenmelerine yol açmakta, sinir sistemi ve vasküler sistemi etkilemektedir (Parente et al., 2001). Tiramin ve beta-fentiletılamin ise hipertansiyon ve diyet

kaynaklı migrene yol açmaktadır. Daha az bilinen ve direk bir toksik etkiye sahip olmayan biyojen aminlerden putresin, kadaverin, spermin ve spermidin ise çok miktarda tüketilirse, diğer biyojen aminlerin bağırsakta emilimini ve dolayısıyla histaminin toksik etkisini arttırmaktadır (Bardocz, 1995; Bjeldanes et al., 1978).

Biyojen aminler, gıdalarda mikrobiyolojik aktivite sonucu amino asitlerin dekarboksilasyonu ile oluşmaktadır (Karpas et al., 2002). Biyojen aminlerin temel oluşum mekanizması Şekil 2.20’de gösterilmiştir.

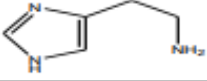
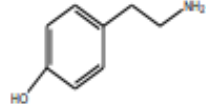
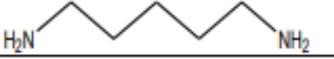
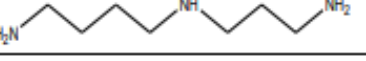

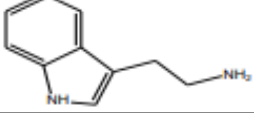
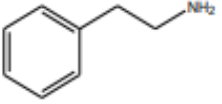
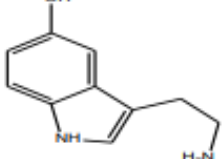
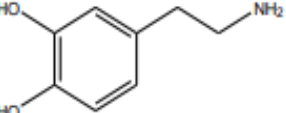
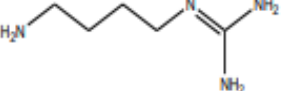


Şekil 2.20. Biyojen aminlerin oluşum mekanizmaları (Düz ve Fidan, 2016).

Biyojen amin oluşumunda ortamdaki serbest amino asit miktarı, pH değeri, su aktivitesi, tuz konsantrasyonu, sıcaklık, mikroorganizmaların sinerjistik etkisi, özellikle amino asit dekarboksilaz aktivitesine sahip mikroorganizmaların (Lactobacilli, Enterococci, Micrococci ve Enterobacteriaceae familyasına ait mikroorganizmalar) varlığı gibi faktörler etkili olmaktadır (Stratton et al., 1991). Çoğu fermente üründe laktik asit bakterileri putresin, histamin, kadaverin ve tiramin üretmektedir (Ten Brink et al., 1990). Öte yandan, fermente olmadığı halde mikrobiyal aktivitenin yüksek olabildiği su ürünlerinde de biyojen aminler yüksek miktarda olabilmektedir. Histamin kaynaklı zehirlenmelerin genellikle kontamine olmuş balık tüketiminden kaynaklanması bu yüzdendir (Önal, 2007).

Kimyasal özelliklerine göre aromatik-heterosiklik; alifatik di-, tri- ve poli-; ve alifatik uçucu aminler olarak üç gruba ayrılan biyojen aminlerden, en çok bilinen ve en fazla toksik etkiye sahip olanlar aromatik ve heterosiklik grubundan

histamin, tiramin ve beta-feniletülamindir (Mafra et al., 1999; Shalaby, 1996). Yaygın olarak bilinen biyojen aminlerden bazılarının kimyasal yapıları Şekil 2.21’de gösterilmiştir.

Histamin (HİS)	
Tiramin (TYR)	
Kadaverin (CAD)	
Spermidin (SPD)	
Spermin (SPM)	
Triptamin (TRPT)	
Feniletülamın (PHEN)	
Serotonin (SER)	
Dopamin (DOP)	
Agmatin (AGM)	

Şekil 2.21. Biyojen aminlerden bazılarının kimyasal yapıları (Düz ve Fidan, 2016).

Başlıca biyojen aminlerin kimyasal yapıları ve içerdikleri amin grubu sayısına göre sınıflandırılması da Tablo 2.2’de verilmiştir.

**Tablo 2.2.** Kimyasal yapılarına ve içerdikleri amin grubu sayısına göre biyojen aminlerin sınıflandırılması (Düz ve Fidan, 2016).

<b>Kimyasal Yapılarına Göre</b>		
<b>Aromatik-Heterosiklik Aminler</b>	<b>Alifatik, Di-, Tri- ve Poliaminler</b>	<b>Alifatik Uçucu Aminler</b>
Histamin	Putresin	Etilamin
Tiramin	Kadaverin	Metilamin
Beta-fenilettilamin	Agmatin	İzoamilamin
Triptamin	Spermin	Etanolamin
Serotonin	Spermidin	
<b>İçerdikleri Amin Grubu Sayısına Göre</b>		
<b>Monoaminler</b>	<b>Diaminler</b>	<b>Poliaminler</b>
Metilamin	Histamin	Agmatin
Etilamin	Triptamin	Spermin
İzopentilamin	Putresin	Spermidin
Etanolamin	Kadaverin	
Beta-fenilettilamin	Serotonin	
Tiramin		

Biyojen aminlerin tespit edilmesinde kolorimetrik (Leng et al., 2015), iyon değişim kromatografisi (Rabie et al., 2011), ince tabaka kromatografisi (Lapa-Guimaraes and Pickova, 2004), gaz kromatografisi (Davis et al., 1986), kapiler elektroforez (Kovacs et al., 1999) ve sıvı kromatografisi (Innocente et al., 2007) gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı sıvı kromatografisidir. Kolorimetrik yöntemde örneklerin enzimatik bir reaksiyonla asetil-histamin oluşturmaları sağlanmış, daha sonra Ellman reaktifi eklenerek, 412 nm’de UV-spektrofotometrede absorbanları ölçülmüştür (Leng et al., 2015). İyon değişim kromatografisinde de türevlendirme işlemi ninhidrin ile yapılmış ve 570 nm ve 440 nm’de kolorimetrik ölçümle biyojen aminlerin miktarları belirlenmiştir (Rabie et al., 2011). Bu yöntemin histamin konsantrasyonunu 5

mmol/L'ye kadar belirlenmesinde hassas olduğu ve öncülerine kıyasla, biyojen amin seçiciliğinin yüksek olduğu belirtilmiştir. Gaz kromatografisi kullanılan yöntemde ise, farklı biyojen aminlerin oluşturduğu temel asit metabolitleri propiyonil veya metilsilil ile türevlendirilerek belirleme yapılmıştır (Davis et al., 1986). Kapiler elektroforez yönteminde, şarap ve salam ekstraktları hidrosisüksinimidil karbamat ile türevlendirilmiş ve 25-30 dakika içinde biyojen amin miktarlarının ölçümlerinin tamamlandığı rapor edilmiştir (Kovacs et al., 1999).

Biyojen aminlerin yapılarında kromofor ya da florofor grupları bulunmadığından, bir çeşit türevlendirme işleminin yapılması gerekmektedir. Sıvı kromatografide biyojen amin tespiti için, türevlendirme işlemi farklı reaktiflerle yapılabilir. Yapılan bazı çalışmalarda kullanılan reaktifler arasında piren sülfonil klorit (Plakidi et al., 2020), dansil klorür (Innocente et al., 2007), benzoil klorür (Özdestan and Üren, 2009), süksinimidil (Pena-Gallego et al., 2009) ve florenilmetil kloroformat (Kirschbaum et al., 1994) reaktifleri bulunmaktadır. Örneğin süksinimidil türü reaktifler, biyojen aminlere piren grubu bağlayarak eksimer floresan etkisi oluşturmaktadır (Marks Rupp and Anderson, 2005). Dansil klorür reaktifinin ise, biyojenik poliaminlere yüksek seçiciliğinin olduğu bilinmektedir (Dadakova et al., 2009).

Literatürde fermente ürünlerdeki biyojen aminleri araştıran çalışmalar çok sayıda bulunmaktadır. Örneğin, bir çalışmada tavuk, hindi, dana ve domuz etinde uçucu biyojen aminler, iyon mobilite spektrometresi tekniği ile tespit edilmiştir (Karpas et al., 2002). Sıvı kromatografi yöntemi kullanılarak ise, fermente sosislerde tiramin ve histamin (Coisson et al., 2004); şarapta (Proestos et al., 2008; Yıldırım et al., 2007) ve fermente soya fasulyesinde (Shalaby, 1996) tiramin, histamin ve putresin miktarlarının fazla olduğu ortaya konmuştur. Sofralık zeytin (Hornero-Mendez and Garrido-Fernandez, 1994), turşu (Yücel and Üren, 2008), kahve çekirdekleri (Amorim et al., 1977) ve kakao tanelerinin kavrulmasıyla üretilen çikolatada da (Halasz et al., 1994) çeşitli biyojen aminlerin oluşumu tespit edilmiştir. Farklı peynir türlerinde yapılan çalışmalarda histamin, tiramin, putresin,  $\beta$ -feniletilamin, kadaverin ve triptamin (Custodio et al., 2007; Innocente et al., 2007; Martuscelli et al., 2005), yoğurtta ise histamin, tiramin,

putresin, kadaverin, spermin, spermidin ve etanolamin (Gezginç et al., 2013; Mayr and Schieberle, 2012) bulunmuştur. Uskumru ve ton balığında miktarının yüksek olduğu bilinen histamin üzerine yapılan bazı çalışmalarda marketlerde bulunan uskumrulardaki histamin konsantrasyonu, FDA tarafından izin verilen 50 ppm sınır değerinin üzerinde bulunmuştur (Tsai et al., 2005a,b). Belirli bir bölgeye ait şalgam ve kumru örneklerinde de biyojen aminler tespit edilmiş, ancak toplam biyojen amin miktarlarının çoğunlukla sağlık için güvenli sınırın altında olduğu belirtilmiştir (Özdestan and Üren, 2010b; Özdestan et al., 2012). Bunun dışında fermente olmadığı halde, biyojen amin oluşumu tespit edilen bir diğer gıda ise muzdur (Coutts et al., 1986). Muzda tespit edilen biyojen aminlerin böcek ve küf önleyici olarak koruyucu görevinin olduğu düşünülmektedir (Gloria, 2003).

Özdestan and Üren (2010a)'in çalışmasında piyasada bulunan ve Türkiye'nin farklı bölgelerinde üretilen 10 farklı kefir örneği, sıvı kromatografi ve benzoil klorür türevlendirilmesi kullanılarak, biyojen amin çeşit ve miktarları bakımından, incelenmiştir. Kefir örneklerinde 5.34 mg/L'lik konsantrasyonla en fazla miktarda tiramin tespit edilmiştir. Putresin, kadaverin ve spermidin tüm örneklerde, tiramin ise bir örnek hariç hepsinde tespit edilmiştir. Test edilen biyojen aminlerin toplamı, 2.4 ile 35.2 mg/L arasında değişmiştir. Bulunan değerlerin, 50 ppm'lik histamin sınırını aşmadığı, bu nedenle de örneklerin biyojen amin açısından güvenli olduğu ifade edilmiştir. Sağlıklı bir bireyin önerilen günlük kefir tüketim miktarının 250-300 ml olduğu düşünülürse, bu miktarlarda en fazla yaklaşık 10 mg ( $35.2 \text{ mg/L} \times 0.3 \text{ L}$ ) biyojen amin alımı herhangi bir zarar teşkil etmemektedir.

Genellikle düşük konsantrasyonlarda tespit edilmiş olsa da, fermente gıdaların veya balıkların depolanması sırasında biyojen amin miktarları güvenli limitleri aşabilmektedir. Bu nedenle, gıdalarda oluşan biyojen amin konsantrasyonlarını azaltmak için bazı çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, tarhanadaki biyojen amin konsantrasyonunu azaltmak için üzüm ve nar çekirdeklerinin ekstraktı kullanılmıştır (Akan and Özdestan Ocak, 2021; Erol and Özdestan Ocak, 2020). Çalışmalarda antioksidan özelliği yüksek olan çekirdek ekstraktlarının miktarı arttıkça biyojen amin konsantrasyonunun azaldığı



bulunmuştur. Ancak, artan ekstrakt miktarıyla birlikte duyuşsal özelliklerin de azaldığı tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada, balık filetoolarındaki biyojen amin miktarını azaltmak için etil lauril arjinat ve kitosan ile kaplama yapılmıştır (Demircan and Özdeştan Ocak, 2020). Etil lauril arjinatın histamin miktarını önemli ölçüde düşürdüğü bulunmuştur.

## 2.10. Tezin Konusu ve Amacı

Bu tezin konusu, PAS izolatından iki aşamalı emülsifikasyon yöntemiyle elde edilen mikro-parçacıkların fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve kefirde kullanılmasıdır. Öncelikle parçacıkların özellikleri model olarak seçilen saf su veya protein çözeltisi içinde incelenmiş ve belirlenmiştir. Bu kapsamda parçacıkların boyutları, elektriksel yükleri, farklı pH ortamlarındaki davranışları incelenmiştir.

İkinci aşamada, parçacıkların +1, +2 ve +3 değerlikli tuz iyonlarıyla etkileşimi ve bu etkileşimlerin nedenleri açıklanmıştır. Tuz iyonlarıyla parçacıkların etkileşimlerinde genellikle dispersiyonun stabilitesini bozan veya parçacıkların koagüle olmasına neden olan konsantrasyonlar belirlenmiştir.

Üçüncü aşamada, parçacıkların dispersiyon içinde ısıt işlemler gördükten sonraki davranışları incelenmiştir. Parçacıkların bulunduğu ortama farklı polimerler eklenerek ısı stabilitesi artırılmaya çalışılmış ve olası mekanizmalar tartışılmıştır.

Dördüncü aşamada, parçacıkların yüzey aktif özellikleri araştırılmıştır. Bunun için, köpük sistemleri kullanılmış ve ham proteinlerle karşılaştırma yapılmıştır.

Beşinci aşamada, parçacıklar model gıda olarak seçilen kefirde kullanılmıştır. Kefire eklenen parçacıkların, kefirin fiziksel, kimyasal ve duyuşsal özelliklerini bozmaması, kefiri proteince zenginleştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu tez, iki aşamalı emülsifikasyon yöntemiyle üretilen PAS proteini parçacıklarının tuzlarla etkileşiminin incelenmesi, yüzey aktif özelliklerinin

belirlenmesi ve kefirde kullanılması bakımından öncü verileri içermektedir. Bu nedenle, bu parçacıkların fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve model bir gıdada kullanılması bu tezin özgün değerini oluşturmaktadır.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

PAS proteini (HiPro ve BiPro, Lot 198-1-420) Davisco Food International Inc (Minnesota, ABD)'den alınmıştır. Kompozisyonu üretici tarafından %90.25 protein, %0.95 yağ, %2.85 kül, %0.95 laktoz ve %5 nem olarak belirlenmiştir. Polygliserol polirisinolat (PGPR) Danisco Dupont (Grindsted PGPR, Denmark) firmasından alınmıştır. Ayçiçek yağı lokal marketlerden temin edilmiştir. Sodyum klorür (NaCl), magnezyum klorür (MgCl<sub>2</sub>), alüminyum klorür (AlCl<sub>3</sub>) tuzları, dekstran (40 kDa), Arap zıkkı, borik asit (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), sodyum hidroksit, sodyum asetat, kadmiyum asetat, ninhidrin, 1,7-diaminoheptan, benzoil klorür, susuz sodyum sülfat, putresin, kadaverin, spermidin, histamin, tiramin ve L-lösin Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) markasından alınmıştır. Sülfürik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), Kjeldahl tabletleri, hidroklorik asit (HCl) ve dietil eter Merck (Darmstadt, Almanya) markasından alınmıştır. Asetonitril ve metanol ise IsoLab (Ankara, Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Kefir üretimi için UHT süt (Pınar Süt, İzmir) ve kuru kefir tanesi (Endanem, Isparta) kullanılmıştır.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Peynir altı suyu (PAS) proteini parçacıklarının ve dispersiyonların hazırlanması

PAS proteini parçacıkları iki aşamalı emülsifikasyon yöntemiyle hazırlanmıştır (Sağlam et al., 2011). Bu yönteme göre, PAS izolatu içeren bir çözelti gece boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmış ve proteinlerin tam çözülmesine olanak verilmiştir. Protein çözeltileri %20, %25 ve %30 olacak şekilde ve genellikle 250 mL'lik beherde toplam 60 g'a ayarlanarak hazırlanmıştır. Denemelerde protein çözeltilerinin pH değeri çoğunlukla değiştirilmemiş ve bu değer pH 6.8 olarak ölçülmüştür. Yalnızca kefir denemelerinde, iki farklı parçacık kullanıldığından; bir tür parçacık üretilirken protein çözeltilisinin pH değeri proteinlerin izoelektrik noktası olan pH 5.5'e ayarlanmıştır. Kefir denemelerindeki diğer parçacıklar, protein çözeltilisinin pH

değerinde herhangi bir ayarlama yapılmadan, pH 6.8’de bırakılarak üretilmiştir. Protein çözeltileri, yağ içinde su emülsiyonunun su fazını oluşturmaktadır.

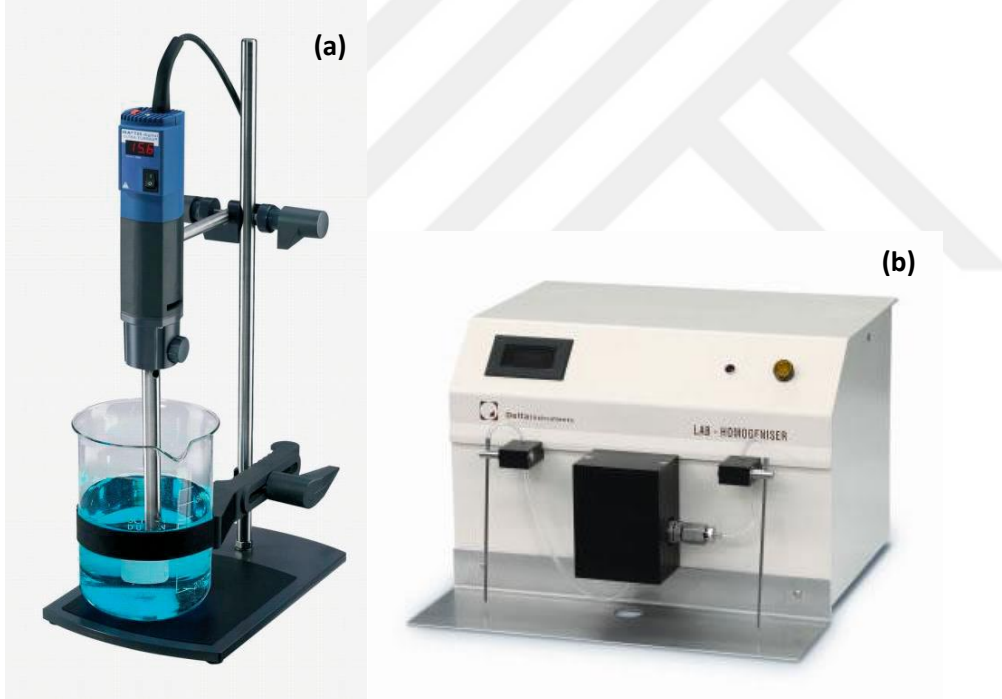
Yağ fazı, ağırlıkça %2.5 PGPR içerecek şekilde ayçiçek yağıyla en az iki saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmıştır. Çözelti, 250 mL’lik beher içinde 140 g olacak şekilde hazırlanmıştır, buna göre 3.5 g PGPR 136.5 g ayçiçek yağında çözülmüştür.

Su fazı, yağ fazı içinde %30’luk bir oran oluşturacak şekilde belirli bir devir/dk’da yüksek hızlı karıştırıcıyla (Ultraturrax, T25 Digital, IKA Werke, Almanya) 5 dakika süreyle karıştırılarak yağ içinde su emülsiyonu oluşturulmuştur. Bu emülsiyon, “iki aşamalı emülsifikasyon” yönteminin birinci aşamasını ifade etmektedir. Yüksek hızlı karıştırıcının hızı değiştirilerek damlacıkların boyutlarının değiştirilmesi de sağlanmıştır. Farklı boyutlarda parçacıkları üretmek için pH 6.8’deki PAS çözeltisi kullanılmış ve karıştırıcı hızı 4000, 7000, 8000 ve 10000 devir/dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Denemelerde yaygın olarak her iki pH değerindeki parçacık için de 8000 devir/dk karıştırma hızı kullanılmıştır.

Oluşturulan emülsiyon, 80°C’lik su banyosunda 20 dakika süreyle ısıtılmış, böylece damlacıklar jelleştirilerek parçacıklar elde edilmiştir. Daha sonra, soğuk su altında oda sıcaklığına kadar soğutulan emülsiyonlar 34000g’de 1 saat süreyle santrifüj edilerek (Avanti J-26 XP, Beckman Coulter, ABD) yağ fazı parçacıklardan ayrılmıştır.

Elde edilen ıslak pelet parçacıkları ve bir miktar da yağ çözeltilisini içermektedir. Peleti yağ fazından tamamen arındırmak için ağırlıkça %1’lik PAS proteini çözeltisiyle yıkama işlemi yapılmıştır. Buradaki %1’lik PAS çözeltisi, “iki aşamalı emülsifikasyon” yönteminin ikinci aşamasını oluşturan ve parçacıkları yağ kalıntılarında arındıracak olan sürfaktan çözeltilisini ifade etmektedir. Yıkama işleminde öncelikle pelet, %1’lik PAS çözeltisi içinde ağırlıkça 1:2 oranında yüksek hızlı karıştırıcıyla 12800 devir/dk’da 5 dakika süreyle karıştırılmıştır. Daha sonra, basınçlı homojenizatör (LabhoScope Homogeniser, Delta Instruments, Drachten, Hollanda) ile 150 barda 6 tur olacak

şekilde parçacıkların birbirlerinden ve yağ fazından ayrılması sağlanmıştır. Homojenizasyonda kullanılan yüksek hızlı karıştırıcı (Şekil 3.1a) ve basınçlı homojenizatör (Şekil 3.1b) Şekil 3.1’de gösterilmektedir. Yüzde 1’lik PAS çözeltisi içinde parçacıkları içeren dispersiyon santrifüj edilerek (34000g’de 1 saat süreyle) yağdan bir miktar arınmış pelet elde edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı kısım atılmış, yalnızca pelet kullanılmıştır. Yıkama işlemi, peletin %1’lik PAS çözeltisinde ağırlıkça 1:2 oranında yüksek hızlı karıştırıcıyla aynı değerlerde karıştırılması, basınçlı homojenizatörle aynı değerlerde homojenize edilmesi ve aynı değerlerde santrifüj edilmesiyle bir kez daha tekrarlanmıştır. Böylece yağdan tamamen arınmış parçacıkların bulunduğu ıslak pelet elde edilmiştir. Denemeler için dispersiyonların hazırlanmasında bu pelet bekletilmeden kullanılmıştır.

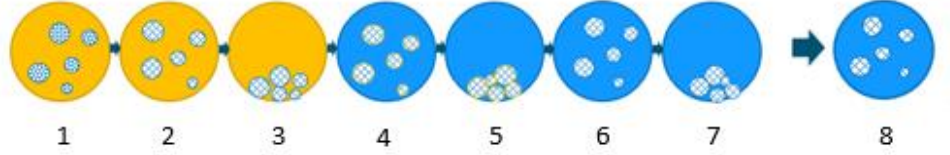


Şekil 3.1. (a) Yüksek hızlı karıştırıcı (UltraTurrax) ve (b) basınçlı homojenizatör.

Dispersiyonlar saf su, PAS proteini, dekstran veya Arap zıncı çözeltisi içinde farklı miktarlar kullanılarak hazırlanmıştır. Bu miktarlar, ön denemelerde belirlenmiş protein parçacıklarının farklı hacimsel oranlarıdır. Hazırlama işlemi sırasında, bir behere belirli miktarlarda alınan pelet ve çözeltiler, yüksek hızlı

kariştırıcıyla 12800 devir/dk'da 10 dakika süreyle kariştırılmış ve basınçlı homojenizatörle 150 barda 6 tur olacak şekilde homojenize edilmiştir.

İki aşamalı emülsifikasyon yöntemi şematik olarak şekil 3.2'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.2.** PAS proteini parçacıklarının üretim aşamalarının şematik gösterimi (1) PAS çözeltisi ile yağ içinde su emülsiyonun hazırlanması, (2) 80°C'de 20 dakika ısıtma, (3) Santrifüj ile parçacıkların yağ fazından ayrılması, (4) Parçacıkların %1'lik PAS çözeltisinde homojenize edilmesi, (5) Santrifüj ile parçacıkların sulu fazdan ayrılması, (6-7) 4 ve 5. aşamaların tekrarı, (8) Parçacıklardan dispersiyon hazırlanması. 4-7 arasındaki aşamalar parçacıkların yağdan arınmasını sağlayan yıkama aşamalarını göstermektedir.

### 3.2.2. Deneme deseni

Tez kapsamında uygulanan deneme planı Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Deneme planı

Projenin aşamaları	Yapılan analizler
PAS proteini parçacıklarının üretimi ve karakterizasyonu	<p><b>Üretim:</b> İki aşamalı emülsifikasyon yöntemi</p> <p><b>Karakterizasyon:</b></p> <p>Hacimsel oran belirlenmesi (Kapiler viskometre ve dansitometre)</p> <p>Protein konsantrasyonu analizi (DUMAS)</p> <p>Boyut dağılımı analizi (Mastersizer)</p> <p>Zeta potansiyel analizi (Zetasizer)</p> <p>Parçacıkların bütünlük stabilite analizi (UV-spektrofotometre)</p> <p>pH analizi</p> <p>Optik mikroskop incelemesi</p>
Makrojel üretimi	Sıkıştırma testleri (Tekstür cihazı)
PAS proteini parçacıklarının tuz iyonlarıyla etkileşimi	<p>Çökme stabilitesi analizi (görsel gözlem)</p> <p>Teorik hesaplamalar</p>
PAS proteini parçacıklarının ısı stabilitesinin araştırılması	<p>Ozmotik basınç analizi</p> <p>Kapiler viskometre analizi</p> <p>Kayma viskozitesi analizi</p> <p>Boyut dağılımı analizi</p>
PAS proteini parçacıklarının yüzey aktif özellikleri	<p>Köpüklendirme analizi</p> <p>Krayo-SEM (köpük örneklerinde)</p>
PAS proteini parçacıklarının kefirde kullanımı	<p>Protein analizi</p> <p>Yağ analizi</p> <p>Kuru madde analizi</p> <p>Titrasyon asitliği</p> <p>Serum ayrılması</p> <p>Renk analizi</p> <p>Toplam serbest amino asit analizi (spektrofotometrik)</p> <p>Biyojen amin analizi (HPLC)</p> <p>Duyusal analiz</p>

### 3.2.3. Parçacıkların karakterizasyonu

#### 3.2.3.1. Parçacıkların hacimsel oranlarının belirlenmesi

Parçacıkların hidrodinamik hacimsel oranı ( $\Phi$ ), Einstein'ın viskozite eşitliğine göre belirlenmiştir:

$$\eta_d = \eta_s (1 + 2.5\Phi),$$

$\eta_d$ , dispersiyonun dinamik viskozitesini ve  $\eta_s$ , sürekli fazın dinamik viskozitesini ifade eder. Bu viskozite değerleri, kinematik viskoziteyle ( $\nu$ ), dispersiyon veya çözeltinin yoğunluğu ( $\rho_d$ ) çarpılarak elde edilmiştir.

$$\eta_d = \nu \times \rho_d$$

$$\eta_s = \nu \times \rho_s$$

Kinematik viskozite değerleri, kapiler viskometre (Ubbelohde) kullanılarak iki tekrar olacak şekilde ölçülmüştür. Kodu 0B 39709 olan kapiler tüpün içine yaklaşık 15 mL örnek koyularak  $20 \pm 0.5$  °C'de iki çizgi arasından akış süresi belirlenmiştir. Bu süre saniye cinsinden hesaplanarak, kapiler tüpün katsayısıyla ( $C = 0.005045$ ) çarpılmış ve kinematik viskozite değeri hesaplanmıştır.

Yoğunluk ise salımlı U-tüpü dansitometre (Anton Paar DMA 5000, Graz, Avusturya) kullanılarak 20°C'de üç tekrar olacak şekilde ölçülmüştür. Parçacıkların yoğunluğu aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\rho_p = \frac{\rho_d - \rho_s \cdot (1 - \Phi)}{\Phi}$$

Bu eşitlikteki  $\rho_d$  ve  $\rho_s$  sırasıyla, dispersiyonun ve sürekli fazın yoğunluklarını ifade etmektedir.

Einstein'ın viskozite eşitliğinin güvenilir olarak kullanılabilmesi için dispersiyonların seyreltik olması gerekmektedir. Seyreltik dispersiyonların



kullanılması eşitlikteki doğrusallığı bozmamaktadır. Bu nedenle, dispersiyonlar ağırlıkça 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 ve 1:50 oranlarında saf suyla seyreltilerek viskozite eşitliğindeki  $\eta_d/\eta_s$  değerine karşın  $\Phi$  grafiği, eğimi 2.5 olarak şekilde çizilmiştir. Bu grafikteki değerlerden elde edilen  $\Phi$  değeri, dispersiyonun hidrodinamik hacimsel oranını vermektedir.

### **3.2.3.2. Parçacıklardaki protein konsantrasyonunun belirlenmesi**

Dispersiyon ve çözeltilerdeki protein konsantrasyonu DUMAS (Thermo Scientific, Waltham, ABD) cihazı kullanılarak belirlenmiştir (Sağlam et al., 2011). Kalay folyolar içine yaklaşık 0.2 mL örnek koyularak cihaza verilmiş ve cihazdan elde edilen yüzdelik sonuç PAS proteinleri için 6.38 katsayısıyla çarpılarak örnekteki protein miktarı bulunmuştur (Maubois and Lorient, 2016). Örnekler 3 tekrar olacak şekilde analiz edilmiştir.

Parçacıklardaki protein konsantrasyonu ( $C_{p,a/a}$ ) proteinin ağırlığı, birim ağırlıktaki dispersiyona oranlanarak aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$C_{p,a/a} = \frac{C_{d,a/h} - C_{s,a/h} \cdot (1 - \Phi)}{\Phi \cdot \rho_p}$$

Bu eşitlikteki  $C_{d,a/h}$ , dispersiyondaki protein konsantrasyonunu;  $C_{s,a/h}$ , sürekli fazdaki, yani %1'lik PAS çözeltisindeki protein konsantrasyonunu ağırlık/hacim cinsinden ifade etmektedir.  $\rho_p$ , parçacıkların yoğunluğunu;  $\Phi$  ise parçacıkların hacimsel oranlarını göstermektedir.

### **3.2.3.3. Parçacıkların boyut dağılımının belirlenmesi**

Parçacıkların boyut dağılımları, çok açılı ışık saçılımı yöntemiyle (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Worcestershire, Birleşik Krallık) ölçülmüştür. Parçacık dağıtım ünitesi olarak HydroSM 2000A saf su ile doldurularak 1200 devir/dk'da kullanılmıştır. Örnekler farklı bir sürekli faz içinde de olsa, boyut dağılımları saf su içinde yapılmıştır. Elde edilen verilerden hacim ağırlıklı ortalama çap (volume averaged mean diameter) kullanılmıştır ve örnekler üç tekrar olarak ölçülmüştür.

### **3.2.3.4. Parçacıkların zeta potansiyel değerlerinin belirlenmesi**

Parçacıkların zeta potansiyel değerleri, dinamik ışık saçılımı yöntemiyle (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, Birleşik Krallık) ölçülmüştür. Sumoluchowski modeli kullanılarak, elektroforetik mobilite zeta potansiyel değerine çevrilmiştir. Ölçümler sırasında gerekli seyreltmeler saf su ile yapılmıştır. Örnekler üç tekrar olarak ölçülmüştür.

### **3.2.3.5. Parçacıkların farklı pH değerlerindeki bütünlüğü**

Protein parçacıkları, farklı pH değerlerindeki dispersiyonlarda elektriksel itme kuvvetinin büyüklüğünden dolayı bütünlüklerini kaybedebilmektedir. PAS proteini parçacığı dispersiyonlarının pH değerleri 1 mol/L HCl veya 1 mol/L NaOH ile pH 3, pH 5.5, pH 6, pH 8 ve pH 9'a ayarlanmıştır. Herhangi bir ayarlama yapılmamış dispersiyonun pH değeri 7.4 olarak ölçülmüştür. Farklı pH değerlerindeki dispersiyonlar 34000g'de 1 saat boyunca santrifüj edilerek parçacıkların ve üst fazın ayrılması sağlanmıştır. Üst faz 0.22 µm'lik şırınga tipi filtreden süzöldükten sonra, UV-spektrofotometrede (Cary 50 Bio, Varian) 280 nm'de absorbans değeri okunmuştur. Bu değer, üst fazda biriken protein konsantrasyonunu belirlemek için kullanılmıştır. Dispersiyonlar ağırlıkça %5 protein içerecek şekilde hazırlanmıştır ve dağılan parçacıkların miktarı toplam protein miktarına oranlanarak yüzde cinsinden ifade edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi saf su ve ham PAS proteini çözeltisinin %0.2, %0.3, %0.4, %0.5, %0.7 ve %1'lik konsantrasyonlarıyla çizilmiştir (Ek 1). Denemeler üç tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

### **3.2.4. pH ölçümü ve ayarlanması**

Dispersiyonların ve çözeltilerin pH değerleri, pH metre (Schott Lab 850, Mainz, Almanya) kullanılarak ölçülmüştür. pH ayarlaması 3 mol/L HCl ve 2 mol/L NaOH kullanılarak yapılmıştır. Derişik HCl ve NaOH kullanılmasının sebebi, eklenen asit veya bazın örnekleri seyreltmesini engellemektir.

### 3.2.5. Makro jellerin hazırlanması ve sıkıştırma testi

Mikro parçacıkların iç yapısındaki sertlikleri belirlemek mümkün olmadığından, makro jeller hazırlanarak karşılaştırmalı açıklama yapılmıştır. Bunun için, PAS proteini makro jelleri pH 6.8’de ve ağırlıkça %20, %25 ve %30 konsantrasyonlarındaki PAS proteini çözeltileriyle hazırlanmıştır. Makro jelleri hazırlamak için PAS çözeltileri 50 mL’lik şırınga içinde 80°C’lik su banyosunda 20 dakika tutulmuştur. Örnekler oda sıcaklığına soğutulduktan sonra, jeller şırınga içinden itilerek çıkarılmıştır. Elde edilen jellerin çapı 18.7 mm olarak ölçülmüş ve yükseklikleri de 20 mm olacak şekilde tel ile kesilmiştir. Jel parçaları 2 gün boyunca 4°C’de saf su içinde bekletilerek, mikro parçacıkların bulunduğu koşullara benzer koşullar oluşturulmuştur.

Jel parçaları, 2 gün bekletildikten sonra tek-eksenli sıkıştırma testine alınmıştır. Silindirik jeller, tekstür cihazına (TA-XT-plus, Stable Micro Systems, İngiltere) bağlı 75 mm çapındaki probun 1 mm/sn’lik hızıyla %70 deformasyona (strain) kadar sıkıştırılmıştır. Jellerin proba yapışmasını önlemek için parafin yağı kullanılmıştır.

Sıkıştırma sırasında gerilime (stress) karşı gerinim (strain) grafiği elde edilmiştir. Bu grafiğin doğrusal kısmının eğiminden Young modülüs değeri hesaplanmıştır. Bu değer, jellerin sertlik derecelerini temsil etmektedir. Örneğin, yüksek bir Young modülüs değeri sert bir jeli belirtirken, düşük bir Young modülüs değeri kırılğan bir jeli temsil etmektedir.

### 3.2.6. Tuz içeren dispersiyonların hazırlanması, stabilite incelemesi ve iyonik kuvvet hesaplanması

Farklı değerlikteki tuz iyonlarının etkilerinin incelenmesi için tek değerlikli olarak NaCl, iki değerlikli olarak MgCl<sub>2</sub> ve üç değerlikli olarak AlCl<sub>3</sub> tuzları seçilmiştir. Hepsinde klor iyonunun -1 değerlikte olanı mevcuttur, böylece dispersiyonlardaki etkilerinin de aynı olacağı, farklılığın yalnızca anyonlardan kaynaklanacağı düşünülmüştür. Ayrıca klorür iyonunun protein stabilitesine etkisi de florür, bromür, iyodür gibi iyonlara kıyasla minimaldir (Kang et al., 2020).

Stok tuz çözeltileri 3 mol/L NaCl, 500 mmol/L MgCl<sub>2</sub> ve 50 mmol/L AlCl<sub>3</sub> olarak hazırlanmıştır. NaCl için 1, 1.5, 2 ve 3 mol/L'lik konsantrasyonlar kullanılacağı zaman, dispersiyonların hacimsel oranlarını değiştirmemek için NaCl kristalleri kullanılmıştır.

NaCl konsantrasyonu 4 mol/L'ye kadar (0, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 ve 4 mol/L), MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu 90 mmol/L'ye kadar (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 mmol/L) ve AlCl<sub>3</sub> konsantrasyonu da 5 mmol/L'ye kadar (0, 1, 2, 3, 4 ve 5 mmol/L) hazırlanmıştır. Stok tuz çözeltisi veya tuz kristalleri eklenen dispersiyonlar vorteksle karıştırılmıştır.

Stabilite incelemeleri için her dispersiyon  $\Phi \sim 0.15$  ve 3 tekrar olacak şekilde hazırlanmış, ardından 24 saat oda sıcaklığında bekletilen örneklerin görsel olarak faz ayrımları ve faz ayırım miktarları tespit edilmiştir. Faz ayırımının görüldüğü en düşük tuz konsantrasyonu, kritik koagülasyon konsantrasyonu (KKK) olarak değerlendirilmiştir.

Hacimsel oranı  $\Phi \sim 0.15$  olan dispersiyonlarla aynı protein konsantrasyonuna sahip olan %2.5 ham PAS proteini çözeltilerinin de tuz iyonlarının varlığındaki stabiliteleri incelenmiş ve parçacıklarla ham proteinlerin davranışları karşılaştırılmıştır.

### ***İyonik kuvvet hesaplaması***

Parçacıklar arasındaki elektriksel ikili katmanın kalınlığı, iki parçacık arasındaki elektriksel itme kuvvetini belirler ve iyonik kuvvete bağlıdır. İyonik kuvvet ( $I$ ) hesaplaması mol/L cinsinden aşağıdaki formülle yapılır:

$$I = I_0 + \frac{1}{2} \sum_i^n c_i z_i^2$$

$c$  çözeltideki her bir iyonun ( $i$  olarak belirtilen) molar konsantrasyonunu (mol/L),  $z$  ise çözeltideki iyonların değerliklerini ifade eder.  $I_0$  ise ortamın pH ayarlamasından gelen iyonik kuvveti ifade eder ve hesaplaması aynı şekilde yapılır (Adamczyk and Weronki, 1999; Cao et al., 2015).

### 3.2.7. Arap zankı ve dekstran içeren dispersiyonların hazırlanması, ısıtılması ve parçacıkların şişme oranlarının hesaplanması

Isı stabilitesini araştırma kapsamında parçacıklar saf su içinde ve PAS proteini, Arap zankı veya dekstran çözeltilerinin farklı konsantrasyonları içinde dispers edilmiştir. Dispersiyonlar yaklaşık  $\Phi \sim 0.1$  olacak şekilde hazırlanmıştır. Bunun için yaklaşık olarak 17 g ıslak pelet ile 145 g saf veya çözeltiler homojenize edilerek karıştırılmıştır. PAS proteini, Arap zankı ve dekstran çözeltileri ağırlıkça %1 ve %4 olacak şekilde hazırlanmıştır, böylece sürekli fazdaki polimer konsantrasyonunun stabiliteye etkisi de araştırılmıştır.

Dispersiyonlardaki parçacıkların ısıtıldıktan sonraki davranışlarını incelemek için, örnekler 90°C'lik su banyosunda 30 dakika süreyle hafif karıştırma işlemiyle beraber ısıtılmıştır. Isıtılma öncesi ve ısıtılma sonrası analizlerden önce tüm örneklerin oda sıcaklığında olmasına dikkat edilmiştir.

Parçacıkların şişme oranlarının hesaplaması için öncelikle dispersiyonlar 1:5, 1:10 ve 1:20 oranlarında kendilerine ait sürekli fazlarla seyreltilmiştir. Bu seyreltilmiş dispersiyonlarla parçacıkların ısıtılmadan önceki ( $\Phi_{i0}$ ) ve ısıtıldıktan sonraki ( $\Phi_{is}$ ) hacimsel oranları hesaplanmış ve aşağıdaki formül kullanılarak şişme oranı ( $\text{ŞO}$ ) tespit edilmiştir:

$$\text{ŞO} = (\Phi_{is} - \Phi_{i0}) / \Phi_{i0}$$

### 3.2.8. Ozmotik basınç ölçümleri

Çözeltilerde bulunan ham PAS proteini, dekstran ve Arap zankının parçacıklardaki iç ve dış basıncı değiştirebileceğinden, çözeltilerin ozmotik basınçları ölçülmüştür. Polimerlerin moleküler büyüklüğündeki farklardan oluşabilecek ozmotik basınç değişiklikleri ozmometre (Advanced Instruments, Inc. Model 3320, Norwood, Kanada) ile belirlenmiştir. Ozmometreye 20  $\mu\text{L}$  örnek verilmiştir ve sonuçlar mili-ozmolal (mOzm/kg) cinsinden elde edilmiştir. Ham PAS proteini, dekstran ve Arap zankı ağırlıkça %1, % 2.5 ve %4'lük

çözeltileri üç tekrar olacak şekilde ölçülmüştür. Kontrol örneği olarak saf su kullanılmıştır.

Ozmometre, su içindeki örneklerin ozmolalitesini donma noktasındaki düşme prensibini kullanarak belirlemektedir. Suyun donma noktası, içerisine eklenen farklı bir madde olduğunda düşüş göstermektedir. Ozmometrenin çalışma prensibi de suyun donma noktasındaki düşüşü tespit ederek içerisindeki komponentin konsantrasyonunu belirlemeye dayanmaktadır (Oppermann et al., 2015). Molekül ağırlığından veya iyonik yükten bağımsız olarak sulu çözeltideki katı madde miktarını ifade etmektedir.

### 3.2.9. Reolojik ölçümler

Kayma viskozitesi ölçümleri reometreye (Physica MCR 201, Anton Paar, Graz, Avusturya) bağlı eş eksenli silindir geometrisi (C-CC17/T200/Ti) ile yapılmıştır. Program kayma hızı  $1 \text{ s}^{-1}$ 'den  $1000 \text{ s}^{-1}$ 'e 30 dakikada logaritmik olarak çıkacak şekilde ayarlanmış ve viskozite değerleri ölçülmüştür. Sıcaklık  $25^\circ\text{C}$ 'de tutulmuştur.

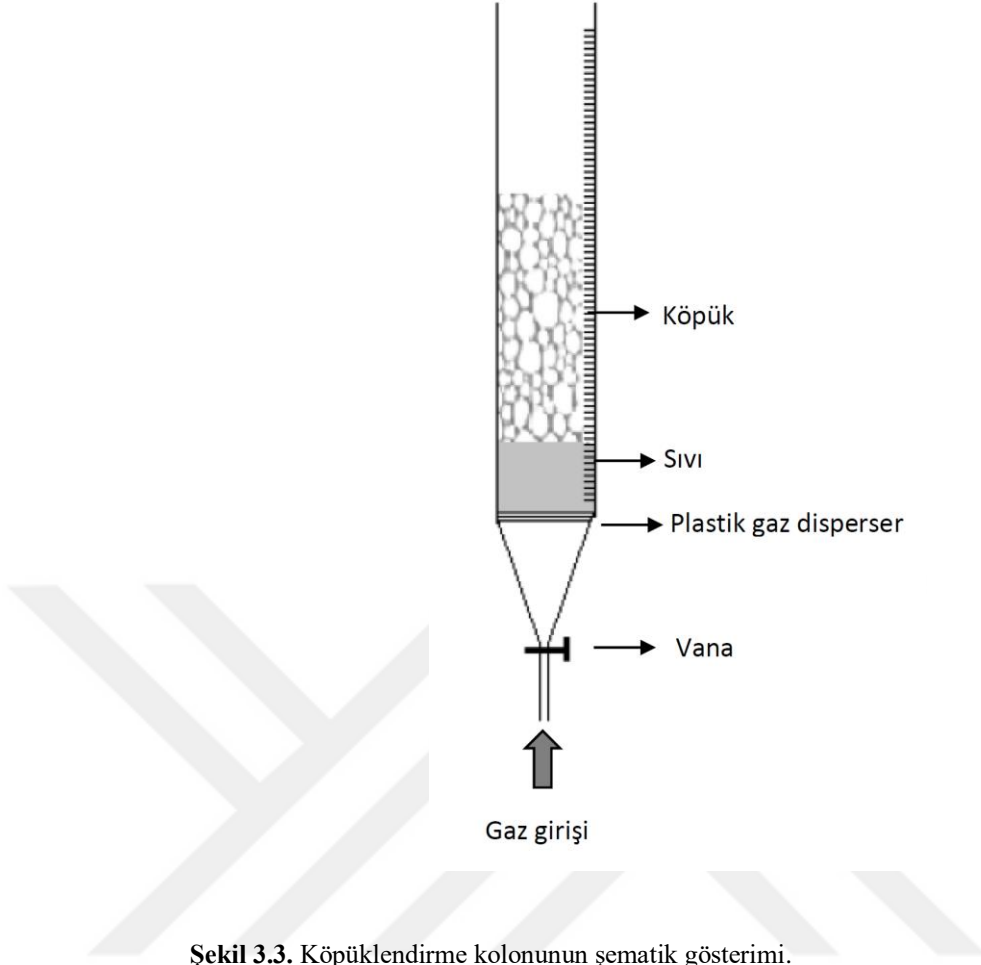
Isı stabilitesi çalışmaları için aynı reometrede farklı bir program kullanılmıştır. Bu programa göre, ısıtılmadan önceki dispersiyonların viskoziteleri, kayma hızı  $25^\circ\text{C}$  sabit sıcaklıkta  $1 \text{ s}^{-1}$ 'den  $200 \text{ s}^{-1}$ 'e logaritmik artışla 30 dakikada çıkarılarak ölçülmüştür. Daha sonra, aynı örnek sabit kayma hızında ( $1 \text{ s}^{-1}$ ) tutularak  $25^\circ\text{C}$ 'den  $90^\circ\text{C}$ 'ye 20 dakika içinde çıkarılmıştır. Bu sıcaklıkta 30 dakika boyunca aynı sabit kayma hızında tutulan örnek, 10 dakika içinde  $25^\circ\text{C}$ 'ye gelmeye programlanmıştır.  $25^\circ\text{C}$ 'ye geldiğinden emin olmak için bu sıcaklıkta 20 dakika boyunca, yine sabit kayma hızında tutulmuştur. Daha sonra, yine  $25^\circ\text{C}$ 'de viskozite ölçümü için kayma hızı  $1 \text{ s}^{-1}$ 'den  $200 \text{ s}^{-1}$ 'e logaritmik olarak çıkartılmıştır. Aynı örnek için, ölçümler iki tekrar olacak şekilde yapılmış ve ortalama değerler kullanılmıştır.

### 3.2.10. Dispersiyon ve çözeltilerden köpük hazırlanması ve stabilite incelemesi

Köpük çalışmaları için protein parçacığı dispersiyonları ve ham PAS proteini çözeltileri kullanılmıştır. Dispersiyonların hepsi saf su ile hacimsel oranları,  $\Phi \sim 0.1$  olacak şekilde hazırlanmıştır. Protein parçacıkları farklı boyut, konsantrasyon ve dispersiyonların farklı pH değerlerinde hazırlanmıştır. pH 6.8'de hazırlanan parçacıkların boyutları 2  $\mu\text{m}$ , 4  $\mu\text{m}$  ve 5  $\mu\text{m}$  olacak şekilde 3 farklı değer seçilmiştir. Parçacıkların protein konsantrasyonları %20, %25 ve %30 olacak şekilde 3 farklı değerde hazırlanmıştır. Dispersiyonların pH değerleri ise pH 3, pH 5.5, pH 6 ve pH 7.4 olmak üzere 4 farklı değerde incelenmiştir.

Ham PAS proteini çözeltileri ağırlıkça %2 protein içerecek şekilde saf suyla hazırlanmıştır. Bu değer, %25 konsantrasyonda pH 6.8'de hazırlanan parçacığın hacimsel oranı  $\Phi \sim 0.1$  olan dispersiyondaki miktarına karşılık gelmektedir. Dispersiyon ve çözeltilerdeki protein miktarları aynı tutulmaya çalışılmıştır.

Köpük örnekleri, köpüklendirme kolonunda yaklaşık 20 mL örnek kullanılarak hazırlanmıştır. Köpüklendirme kolonunun şematik gösterimi Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3. Köpüklendirme kolonunun şematik gösterimi.

Azot gazı, kolonun vanasından 300 mL/dk hızda verilmeye başlanmış ve köpük yüksekliği 20 cm olunca kesilmiştir. Azot gazının verildiği süre saniye cinsinden kaydedilerek örneklerin köpük oluşturma süresi tespit edilmiştir. Köpük stabilitesi için de, köpük ve altta kalan sıvının yüksekliği zamana bağlı olarak kaydedilmiştir. Köpük ve sıvı yüksekliği aşağıdaki formüllerle yüzde cinsinden hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Köpük yüksekliği} = (KY_{t0} - KY_t) \times 100 / (KY_{t0} - SY_{t0})$$

$$\% \text{ Sıvı yüksekliği} = SY_t \times 100 / SY_{t0}$$

Formüllerdeki  $KY_{t0}$ , köpük oluşturulduktan hemen sonraki ilk köpük yüksekliğini;  $KY_t$ , köpük oluşturulduktan sonra t anındaki köpük yüksekliğini;  $SY_{t0}$ , köpük oluşturulduktan hemen sonraki ilk sıvı yüksekliğini ve  $SY_t$  de köpük oluşturulduktan sonra t anındaki sıvı yüksekliğini cm cinsinden ifade etmektedir.



Köpükteki baloncukların boyutları da zamana bağlı olarak üst ve orta bölümlerdeki altı farklı noktadan ölçülmüş ve ortalama değer mm cinsinden ifade edilmiştir.

### **3.2.11. Optik mikroskop görüntülemesi**

Parçacıkların şekil, boyut ve agregat oluşturma durumları hakkında ön bilgi sahibi olmak için, ışın mikroskobuna (Axioskop Plus, Zeiss, Almanya) bağlı 100x yağlı objektif kullanılmıştır. Dispersiyonlar kendi sürekli fazlarıyla 1:20 veya 1:100 oranlarında seyreltilmiştir. Görüntüler, mikroskoba bağlı yük-bağlaşımlı kamera (CCD camera, Hitachi KP-D20B, Tokyo, Japonya) sistemiyle bilgisayardan elde edilmiştir.

### **3.2.12. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülemesi**

Krayo-SEM görüntülemesi köpüklendirme analizlerinde kullanılmıştır. Bunun için köpükler, deney tüpü içindeki dispersiyon çalkalanarak elde edilmiştir. Çünkü azot gazı verilerek elde edilen köpüklerin bulunduğu kolondan alınan köpük örnekleri, SEM örnekleri için kullanılan ortası delik bakır perçin için büyük gelmiştir. Bakır perçine çok az miktarda köpük örneği alınarak, sıvı etanda dondurulmuş, sonraki analizler için de sıvı azotta saklanmıştır. Örneklerin SEM için hazırlanmasında, sıvı azottaki donmuş örnekler, krayo-hazırlama ünitesine (VCT 100/MED 020, Leica, Viyana, Avusturya) yüklenmiştir. Bu ünite -92°C'de  $1.0 \times 10^{-6}$  Torr basınçta 7 dakika süreyle muamele edilmiş, sonra da örneğin üstünde 30 nm olacak şekilde tungsten püskürtülmüştür. Örnekler, bu üniteye sıcaklık ve basınç değerleri değiştirilmeden, örnek koyma yeri -120°C'deki SEM (Magellan 400, FEI, Eindhoven, Hollanda) cihazına transfer edilmiştir. Örnekler, SE dedektöründe 2 kV'ta analiz edilmiştir. Köpük örneklerinin iç yüzeyini de görüntüleyebilmek için, örnekler soğuk sistem bozulmadan krayo-hazırlama ünitesine tekrar alınmış, yüzeyleri kırılmış, tekrar dondurulmuş ve tungstenle kaplanmıştır ve aynı sistemle SEM cihazında aynı koşullarda görüntüleme yapılmıştır.

### 3.2.13. Kefir örneklerinin hazırlanması ve kefirdeki analizler

#### 3.2.13.1. Kefir örneklerinin hazırlanması

Kefir örnekleri, cam beherde 1 L UHT süte 0.5 g kefir tanesi eklenerek ve 20-24 saat aralığında oda sıcaklığında pH değeri 4.5 oluncaya kadar fermente edilmiştir. pH değeri 4.5 olunca kefir 4°C'de bir gece bekletilmiş ve daha sonra parçacıklar ağırlıkça %3, %6 ve %12 olacak şekilde kefir örneklerine eklenmiştir. Eklenen parçacıkların hacimsel oranları da yaklaşık olarak sırasıyla %3, %6 ve %12 olarak bulunmuştur. Bu parçacık oranlarındaki örnekler, ham PAS proteinin sırasıyla yaklaşık olarak ağırlıkça %1, %2.5 ve %5'lik konsantrasyonlarına eşittir. Analizlerde ham PAS proteini de kefire %1, %2.5 ve %5 oranlarında eklenerek karşılaştırma yapılmıştır. Analizler depolama süresince örneklerinin hazırlanmasının 0., 1., 7. ve 14. günlerinde yapılmıştır.

#### 3.2.13.2. Kefir örneklerinde protein, yağ ve kuru madde miktarının belirlenmesi

Protein konsantrasyonu Kjeldahl cihazıyla (Microtest, Ankara) belirlenmiştir (Ergin vd., 2017). Yaklaşık 1 g kefir örneğinin üzerine 25 mL derişik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, köpük önleyici ve Kjeldahl tableti eklenmiş ve örnek 160 dakika boyunca yakma ünitesinde hidrolize edilmiştir. Daha sonra, erlene alınan örneğin üzerine 50 mL ağırlıkça %4'lük borik asit ve indikatör olarak da 3 damla metil kırmızısı eklenmiş ve Kjeldahl cihazında ağırlıkça %40'luk NaOH ile distile edilmiştir. Distilasyon sonrası 0.1 N HCl ile titre edilen örnekteki protein konsantrasyonu aşağıdaki eşitliklere göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Azot} = [(V_1 - V_0) \times N \times 0.014] \times 100 / M$$

$$\% \text{ Protein} = \% \text{ Azot} \times F,$$

Eşitliklerdeki V<sub>1</sub>, titrasyonda kefir örneği için harcanan HCl miktarını (mL); V<sub>0</sub>, titrasyonda kör (saf su) için harcanan HCl miktarını (mL); N, HCl'nin normalite değerini; M, kullanılan örnek miktarını (g) ve F de azot faktörünü göstermektedir. Azot faktörü süt ürünleri için 6.38 olarak alınmaktadır. Protein

miktarı belirlenirken örnekler iki tekrar olacak şekilde hazırlanmış ve ortalama değerler kullanılmıştır.

Yağ oranı, Gerber metoduna göre belirlenmiştir (Ergin vd., 2017). On mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mL kefir örneği ve 1 mL amil alkol Gerber bütirometresinde karıştırılarak yağın çıkması sağlanmış, daha sonra 65°C’de 1100 devir/dakika’da 10 dakika boyunca santrifüj (Nova Safety, Nova Gerber) edilmiş ve yağ konsantrasyonu bütirometre üzerinden tıpası oynatılarak yüzde cinsinden okunmuştur. Yağ konsantrasyonu, örneklerin 2 tekrar ölçümleriyle belirlenmiştir.

Kuru madde (KM) miktarı, yaklaşık 1 g örneğin 105°C’lik etüvde en az 8 boyunca tutulması ve örneklerin sabit tartıma gelmeleriyle belirlenmiştir. Örnekler cam petri kaplarında etüve koyulmuştur. Kuru madde miktarı, aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{ KM} = (M_2 - M) \times 100 / (M_1 - M)$$

Eşitlikteki M, boş petri kabının ağırlığını; M<sub>1</sub>, petri kabıyla beraber ıslak örneğin ağırlığını; M<sub>2</sub> ise petri kabıyla beraber kurutulmuş örneğin ağırlığını ifade etmektedir. Kuru madde miktarı ölçümlerinde örnekler 2 tekrar olacak şekilde hazırlanmıştır.

### **3.2.13.3. Titrasyon asitliğinin belirlenmesi**

Örneklerdeki titrasyon asitliği (TA), 3 mL örneğin üzerine 3 damla fenolftalein indikatörü eklenerek, 0.1 N NaOH ile belirlenmiştir. Titrasyon asitliği aşağıdaki eşitlik kullanılarak yüzde cinsinden ifade edilmiştir:

$$\% \text{ TA} = V \times F \times E \times 100 / M$$

Eşitlikteki V, titrasyonda harcanan 0.1 N NaOH miktarını (mL); F, NaOH çözeltisinin faktörünü; E, 1 mL 0.1 N NaOH’ın laktik asit cinsinden mili eşdeğer asit miktarını (0.009008) ve M de kullanılan örnek miktarını (mg) ifade etmektedir. Titrasyon asitliği ölçümleri 3 tekrar olacak şekilde yapılmış ve ortalama değeri % laktik asit cinsinden (a/h) rapor edilmiştir.

#### **3.2.13.4. Serum ayrılmasının belirlenmesi**

Elli mL'lik dereceli silindir içine 20 mL kefir örneği koyularak, 4°C'de 14 gün süreyle gözlemlenmiştir. Örneklerin üzerinde biriken berrak fazın miktarı 0., 1., 7. ve 14. günlerde ölçülmüştür. Ölçümler 2 tekrar yapılmış ve ayrılan serum miktarı hacimsel olarak yüzde cinsinden rapor edilmiştir.

#### **3.2.13.5. Renk ölçümleri**

Örneklerin renk ölçümleri Minolta Renk Okuyucu (CR-10, Japonya) ile cam küvet içinde yapılmıştır. CIE L\*, a\*, b\* skalası kullanılmıştır. Toplam renk değişimi ( $\Delta E$ ) aşağıdaki eşitlikle hesaplanmıştır:

$$\Delta E = [(L^* - L)^2 + (a^* - a)^2 + (b^* - b)^2]^{1/2}$$

Eşitlikteki L\*, a\*, b\* protein parçacığı içeren kefir örneklerinin; L, a, b ise protein parçacığı içermeyen kefir örneklerinin değerlerini ifade etmektedir. Ölçümler 3 tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

#### **3.2.13.6. Toplam serbest amino asit konsantrasyonunun belirlenmesi**

Serbest amino asit tayini Folkertsma ve Fox (1992)'un yöntemine göre yapılmıştır. Kefir örnekleri hacimce 1:1 oranında 0.1 mol/L HCl ile 5 dakika boyunca karıştırılmış ve 3250g'de 10 dakika santrifüj edilerek üstte kalan serum kısmı elde edilmiştir. Elde edilen bu serum kısmına kefir ekstraktı adı verilmektedir. Serum filtre kağıdından geçirilerek içindeki olası kalıntılardan arındırılmıştır. Serumdan cam tüplere 0.3 mL alınarak, 2 mL'ye saf su ile seyreltilmiştir. Üzerine 4 mL kadmiyum (Cd)-ninhidrin reaktifi eklenerek vortekste karıştırılmış ve 10 dakika boyunca 84°C'deki su banyosunda bekletilmiştir. On dakikanın sonunda tüpler soğuk su içinde hızlı bir şekilde soğutulmuş ve spektrofotometrede 507 nm'de absorbans değerleri okunmuştur.

Cd-ninhidrin reaktifi, 0.8 g ninhidrin, 80 mL %99 saflıkta etanol, 10 mL derişik asetik asit ve 1 mL 1000 ppm'lik kadmiyum asetat kullanılarak balon jodede hazırlanmıştır.

Spektrofotometre ölçümlerinde iki tane şahit çözelti kullanılmıştır. Birinci şahit çözelti, örnek üzerine Cd-ninhidrin reaktifi yerine; etanol, asetik asit ve Cd çözeltisinden 4 mL eklenerek hazırlanmıştır. Böylece, Cd-ninhidrin reaktifinden gelen hata payı tespit edilmiştir. İkinci şahit çözeltide ise örnek yerine saf su kullanılmıştır.

Kalibrasyon eğrisi, 10 mmol/L stok L-lösin çözeltisi farklı konsantrasyonlara (0.4, 0.6, 0.8, 1, 3 ve 5 mmol/L) seyreltilerek oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisi aşağıdaki şekilde elde edilmiştir:

$$\text{Abs} = 0.1499 \times (\text{konsantrasyon, mmol/L}) - 0.0682 \quad R^2 = 0.9973$$

Serbest amino asit konsantrasyonları örneklerin hazırlandığı gün (0. gün) ve depolama süresince (1., 7., ve 14. gün) en az iki tekrar olacak şekilde ölçülmüştür.

### **3.2.13.7. Biyojen amin konsantrasyonunun belirlenmesi**

Biyojen amin tayini için örneklerin hazırlanması, türevlendirilmesi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) analizleri, Özdestan ve Üren (2009)'in metoduna göre yapılmıştır. Türevlendirme işlemi, örneklerin hazırlandığı hafta (0-3. günler arasında) ve depolama süresince (7. veya 8. gün ile 13. veya 14. gün) en az iki tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

#### **Türevlendirme**

Kefir ekstraktları, 1:1 oranında kefir örneği ile 0.2 mol/L HCL ile 5 dakika karıştırıldıktan sonra, 3250g'de 10 dakika santrifüj edilerek üstteki serum fazından elde edilmiştir. Serum fazına geçmesi sağlanan biyojen aminlerin HPLC'de analiz edilebilmesi için kuvvetli baz ortamında benzoil klorür ile türevlendirilmesi ve bu biyojen aminlerin dietil eter ile ekstraksiyonu sonrası metanolde çözünmesi sağlanmıştır.

Türevlendirme işlemi için öncelikle cam tüp içinde 2 mL kefir ekstraktı üzerine 0.5 mL saf su eklenmiştir. Standart katma yöntemiyle çalışılan örnekler

için ise, 2 mL kefir ekstraktı üzerine, 0.25 mL saf su ve 0.25 mL standart çalışma çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra tüpe, 0.1 mL iç standart (1,7-diaminoheptan) çözeltisi eklenmiştir. İç standart çözeltisi, 0.0785 g 1,7-diaminoheptan 50 ml 0.1 M HCl içinde çözdürülerek hazırlanmıştır. Takiben, 2.5 mL 2 mol/L NaOH çözeltisi eklenmiş ve 100 µL benzoil klorür eklenerek, bekletilmeden 5 dakika boyunca vortekste karıştırılmıştır. Daha sonra, 1.5 mL asetonitril eklenerek, vortekste 30 saniye karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında (20-25°C) tam 10 dakika türevlendirme işlemi için bekletilmiştir. Sürenin sonunda türevlendirme işlemi durdurmak için yaklaşık 1.5 g NaCl tüpe eklenmiş ve 1 dakika boyunca karıştırılmıştır. Türevlendirme tamamlandıktan sonra ekstraksiyon işlemine geçilmiştir.

Ekstraksiyon işlemi 50 mL'lik ayırma hunisinde yapılmıştır. Karışım, ayırma hunisine alınarak üzerine 4 mL dietil eter eklenmiş ve 1 dakika boyunca çalkalanmıştır. Üstte kalan eter fazı ayrı bir cam tüpe alınmıştır. Altta kalan sulu faz ise 4 mL dietil eter ile tekrar çalkalanmış ve üstteki eter fazı yine aynı cam tüpe alınmıştır. Bu işlem bir kez daha tekrarlanarak, aynı örnek toplam 3 defa ekstrakte edilmiştir. Toplanan üst fazlar aynı cam tüpte biriktirilmiş ve bunun içine bir spatül susuz sodyum sülfat eklenmiştir. Sodyum sülfat eklenmesinin nedeni, eter fazına geçmesi olası suyu tutmasıdır. Aksi takdirde, kromatografik işlem sırasında yanıltıcı sonuçlar çıkabilmektedir. Susuz sodyum sülfat eklenen örnek en az 5 dakika boyunca bekletilmiş, daha sonra eter fazı kuru bir cam tüpe dekante edilmiştir. Takiben, eter fazı azot gazı altında uçurulmuş ve cam tüpteki kalıntılar analize kadar -18°C'de saklanmıştır. Analiz için, cam tüpün içine 1 mL metanol eklenerek vorteksle karıştırılmış, karışım 0.45 µm'lik şırınga tipi filtreden süzülerek vialle alınmıştır.

### **Standartların hazırlanması ve türevlendirilmesi**

Standart stok çözeltisi 26.4 mg putresin, 15 mg kadaverin, 32.4 mg spermidin, 37 mg histamin ve 222.3 mg tiramin 50 mL 0.25 mol/L'lik HCl içinde çözdürülerek hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden 4 mL alınıp 25 mL'lik balon jöjeye aktarılmış ve saf su ile seyreltilerek günlük olarak kullanılan standart çalışma çözeltisi elde edilmiştir. Standartların türevlendirilmesi, örneklerin

türevlendirilmesine benzer şekilde küçük farklılıklarla yapılmıştır. Cam tüp içine 0.5 mL standart çalışma çözeltisi alınmış ve üzerine 2 mL saf su eklenmiştir. İç standart çözeltisinden 0.1 mL, 2 mol/L'lik NaOH çözeltisinden de 2.5 mL ilave edilmiştir. Daha sonra 50 µL benzoil klorür eklenerek, karışım bekletilmeden 5 dakika boyunca vorteksle karıştırılmıştır. Bu aşamadan sonraki basamaklar, örneklerin türevlendirme işlemiyle aynı şekilde gerçekleştirilmiştir.

### **Biyojen amin analizinde kromatografik koşullar**

Kromatografik koşullar Yeğin and Üren (2008)'in metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Biyojen amin analizi 20°C'de yüksek basınçlı sıvı kromatografisi cihazına (UFLC, Shimadzu, Japonya) bağlı otomatik pipet (SIL-20AHT), degaz ünitesi (DGU-20A5), dereceli elüsyon pompası (LC-20AD), fırın (CTO-20A) içinde C<sub>18</sub> kolonu (ACE, 5µm, 250×4.6 mm, Aberdeen, İskoçya) ve diyot dizimli dedektör (DAD-detector, SPD-M20A) 254 nm'de kullanılarak yapılmıştır. Akış hızı 1 mL/ dk ve enjeksiyon miktarı 10 µL olarak ayarlanmıştır. Mobil fazlar; (A) 0.05 mol/L asetat tampon çözeltisi / metanol (60/40) ve (B) metanol olarak belirlenmiştir. Mobil fazlar, kromatografi cihazına bağlanmadan önce filtre edilmiş ve ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca degaz edilmiştir. Dereceli elüsyon programı Tablo 3.2'deki gibi ayarlanmıştır:

**Tablo 3.2.** HPLC Dereceli elüsyon programı.

Zaman (dk)	%A (v/v)	%B (v/v)
0	90	10
4	70	30
10	70	30
12	60	40
16	40	60
19	30	70
22	0	100
24	0	100
30	90	10
32	90	10

#### 3.2.14. Duyusal analiz

Kefir örneklerinde duyusal analiz testi, örneklerin hazırlandığı hafta (0. hafta) ve depolama süresinin sonunda (2. hafta) 4 kişilik yarı-eğitilmiş panelistlerle 2 tekrar olacak şekilde yapılmıştır. Panelistlere her seferinde 4 örnek farklı kodlarla sunulmuştur. Bunlar pH 6.8 ve pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıklarını  $\Phi \sim 0.12$  oranında içeren kefir örnekleri, ağırlıkça %5'lik PAS izolatı tozu eklenmiş kefir örneği ve parçacık içermeyen sade kefir örneğidir. Puanlama testi Şekil 3.4'te gösterilmiştir.



## PUANLAMA TESTİ

Panelistin adı-soyadı:		Tarih:			
Ürün:					
<b>Açıklama:</b> Aşağıda verilmiş olan kalite kriterleri açısından size verilen kodlu örnekleri ayrı ayrı 5 puan üzerinden değerlendiriniz.					
Kalite Kriterleri	<b>Örnek kodları</b>				
Renk					
Koku					
Görsel kıvam					
Tüm izlenim					
Puan değerleri ile ilgili açıklama	<b>1 = Çok kötü</b>	<b>2 = Kötü</b>	<b>3 = Orta</b>	<b>4 = İyi</b>	<b>5 = Çok iyi</b>
Kalite kriterleri ile ilgili açıklamalar					
<b><u>İstenen özellikler</u></b>			<b><u>İstenmeyen özellikler</u></b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Kıvamlı yapı</li> <li>❖ Pürüzsüz yapı</li> <li>❖ Açık, krem renk</li> </ul>			<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Serum ve su ayrılması</li> <li>❖ Pütürlü yapı</li> <li>❖ Gaz belirtisi</li> <li>❖ Küf/kükürt/yabancı koku/ zayıf aroma</li> </ul>		

Şekil 3.4. Duyusal analiz puanlama testi.

**3.2.15. İstatistiksel analiz**

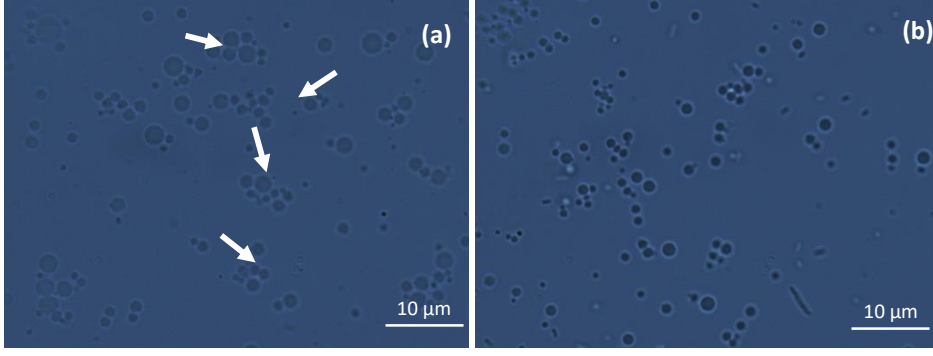
Sonuçlar, Minitab 19 (Minitab Inc. State College, PA, ABD) programı kullanılarak ANOVA varyans analizine göre Tukey's testi uygulanarak karşılaştırılmıştır. Farklar,  $p < 0.05$  önemli olarak kabul edilmiştir. Kefir analizlerinde, Pearson korelasyon testi de uygulanmıştır.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Peynir Altı Suyu (PAS) İzolatı Parçacıklarının Karakterizasyonu

#### 4.1.1. İki aşamalı emülsifikasyon yöntemiyle parçacıkların üretilmesi

İki aşamalı emülsifikasyon yönteminde parçacık üretimi, bir yağ fazı ile sürfaktan içeren su fazı içinde gerçekleştirilmiştir. Yağ fazı, yağ içinde su emülsiyonu elde etmede kullanılmıştır. Yağ fazı içindeki su damlacıkları, PAS proteini çözeltisinden oluşmaktadır. Protein çözeltisi, yağ fazı içine karıştırılarak yağ içinde su emülsiyonu elde edilmiş ve bu emülsiyon 80°C'de 20 dakika ısıtılarak PAS proteini damlacıklarının çapraz bağ oluşturması ve jelleşmesi sağlanmıştır. Bu işlemin sonucunda da, katı protein parçacıkları elde edilmiştir. Santrifüjle yağdan bir miktar ayrılması sağlanan parçacıklar, bu aşamada koagüle haldedir. Isıtma işlemi sırasında manyetik karıştırıcıyla çökmeleri engellenmiş olsa da parçacıkların kümelenmesi önlenememiştir. Kümelenmeyi önlemek için, parçacıkları yağdan tamamen arındırmak amacıyla kullanılan sürfaktan fazında parçacıklar dispers edilirken basınçlı homojenizatör kullanılmıştır. Yalnızca yüksek hızlı karıştırıcıyla elde edilen dispersiyonların bazılarında koagüle olmuş parçacıklar gözlemlenmiştir. Şekil 4.1a'da ok işaretleriyle görülen kümelenmiş parçacıklar yalnızca yüksek hızlı karıştırıcı kullanılarak elde edilen dispersiyonda tespit edilmiştir. Şekil 4.1b'de ise basınçlı homojenizatör kullanıldıktan sonraki dispersiyon gösterilmiştir ve koagüle olmuş parçacıkların çoğu birbirlerinden ayrılmıştır. Bu nedenle basınçlı homojenizatör kullanımı, parçacıkların kümelenmesini engellemek ve dolayısıyla çökmeye karşı stabiliteyi arttırmak için önemlidir.



**Şekil 4.1.** PAS proteini parçacıklarının basınçlı homojenizatörle homojenize edilmeden (a) önceki ve (b) sonraki mikroskop görüntüleri.

Basınçlı homojenizatörde ayarlanan basınç değeri ön denemelerde, koagüle oluşumunu engelleyebilen en düşük basınç olarak seçilmiştir. Katı parçacıkların deformasyonunu veya parçalanmasını engellemek için basınç değeri, genellikle parçacıkların boyutlarına göre ayarlanmaktadır. Bu çalışma kapsamında oluşturulan, 2-5 µm arasında değişen PAS proteini parçacıkları için 150 bar olarak yeterli olmuştur. Parçacıkların diğer denemeler için dispersiyon haline getirilerek hazırlanması aşamasında, ıslak pelet olarak santrifüjden çıkan parçacıklar bekletilmeden kullanılmış ve santrifüjden sonra oluşan koagülasyonu önlemek için yine basınçlı homojenizatör kullanılmıştır.

Parçacıkların sürfaktan çözeltisiyle yıkama aşaması, parçacıkların teknik özelliklerinin incelenmesinde yağ fazından tamamen ayrıldığından emin olmak için önemli bir basamaktır. Önceki bir çalışmada, Arap zankıyla yapılan yıkama işleminin, protein çözeltisi ile yapılan kadar etkili olmadığı belirtilmiştir (Sağlam et al., 2013a). Bu nedenle, parçacıkların yıkama işlemleri öncelikle daima PAS proteini çözeltisi ile yapılmış ve yağdan arındığından emin olunmuştur. Parçacıkların yüzey aktif özelliklerini inceleme amacıyla yapılan köpük denemelerinde yalnızca protein parçacıklarının etkisine bakabilmek için, parçacık hazırlama sırasında üçüncü bir yıkama basamağı eklenmiş ve bu aşamada da saf su kullanılmıştır. Serbest ham PAS proteinlerinin büyük miktarının saf suyla beraber parçacıklardan arınacağı öngörülmüştür.

İkili emülsifikasyon yöntemi, kesikli işlem olarak uygulansa da parçacıklara tekno-fonksiyonel özellikler kazandırmak için oldukça esnek bir yöntemdir (İnce Coşkun et al., 2015; Sağlam et al., 2011). Önceki çalışmalarda

PAS proteini parçacıkları bu yöntemle farklı pH değerleri, protein miktarları ve boyutlarda (İnce Coşkun and Özdehan Ocak, 2021b; Sağlam et al., 2012) üretildiği gibi, farklı protein kaynakları kullanılarak da elde edilmiştir (İnce Coşkun et al., 2015). Ayrıca PAS proteini parçacıklarının yüzey özelliklerinin modifikasyonunda bu yöntem kullanılarak, parçacıkların elektrostatik veya sterik etkileşimlerinin değişmesi sağlanabilmektedir (İnce Coşkun and Özdehan Ocak, 2020).

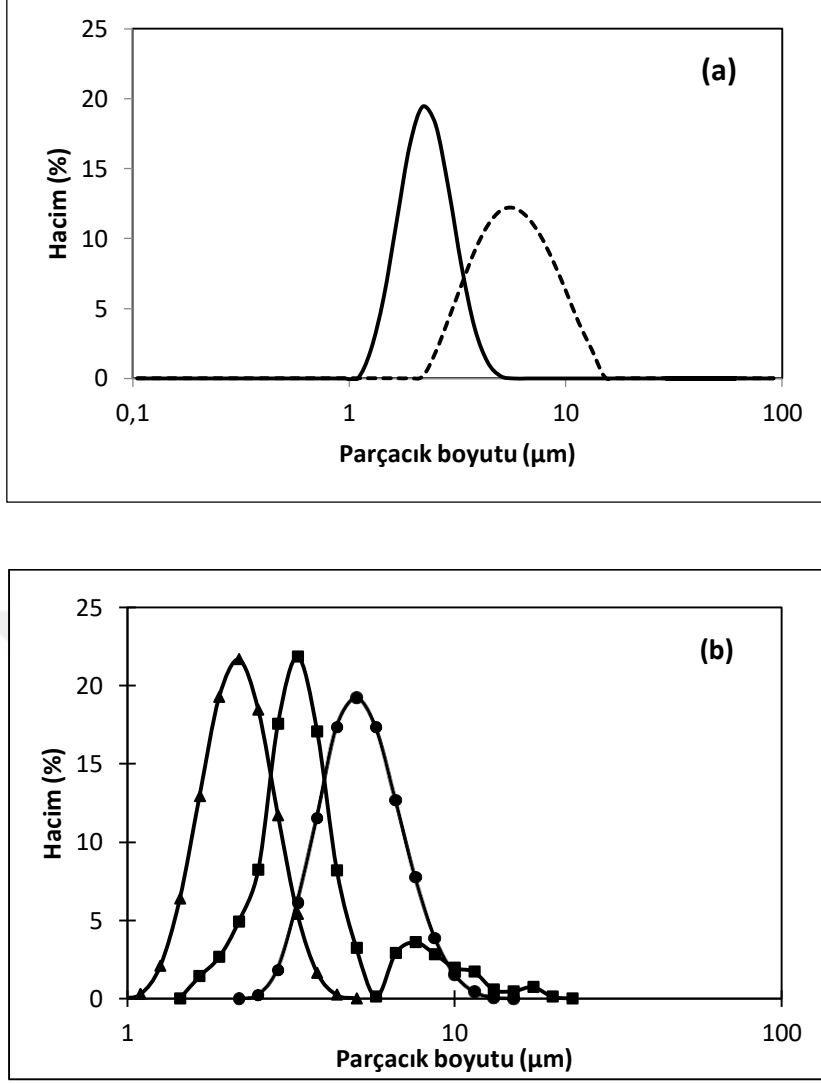
#### 4.1.2. Parçacıkların boyutları

Parçacıkların boyutlarını belirlemede emülsiyon oluştururken kullanılan yüksek hızlı karıştırıcının hızı ilk ve en önemli rolü oynamaktadır. Aynı protein miktarında, karıştırıcı hızına bağlı olarak oluşan parçacık boyutları Tablo 4.1’de verilmiştir. Parçacıkların boyut dağılımları çok açılı ışık saçılımı yöntemiyle, hacim ortalamalı, D[4,3], olarak belirlenmiştir.

**Tablo 4.1.** Karıştırıcı hızına göre oluşan parçacıkların boyutları.

Karıştırıcı hızı (devir/dk)	D[4,3] (µm)
4000	4.85
7000	4.05
8000	2.30
10000	2.19

Tablo 4.1’de verilen değerlerde karıştırıcının hızı arttıkça, daha küçük boyutlu parçacıklar oluştuğu görülmektedir. Bu değerler genellikle tekli dağılım modeli gösteren dispersiyonlardan alınmıştır. Ancak dispersiyonlar çoklu dağılım modeli de gösterebilmektedir. Bu nedenle, boyut dağılımını Şekil 4.2’de verilen grafikler üzerinden incelemek daha doğru bir yaklaşım olacaktır.



**Şekil 4.2.** (a) 8000 devir/dk'da pH 6.8'de oluşturulan PAS proteini parçacığının distile su içinde ısıtılmadan önce (düz çizgi) ve ısıtıldıktan sonraki (kesikli çizgi) boyut dağılımları (b) 10000 (▲), 7000 (■) ve 4000 (●) devir/dk'da pH 6.8'de oluşturulan parçacıkların boyut dağılımları.

Şekil 4.2a'da verilen örnek, saf su içindeki PAS proteini parçacıklarının 90°C'de 30 dakika ısıtılmadan önceki ve sonraki boyut dağılımlarını göstermektedir. Parçacıkların boyut dağılımları tekli dağılım modeli gösterebilir (yani grafikte tek bir pik olsa bile), parçacıklar belirli bir boyut aralığında yer aldıklarından, pik şekilleri de boyut dağılımı hakkında önemli bilgi vermektedir. Örneğin, dar bir pik, birçok parçacığın boyutunun yakın değerlerde olduğunu, yani monodispersitenin yüksek olduğunu gösterirken; geniş bir pikte ise farklı boyutlardaki parçacıklar yer alabilmektedir. Şekil 4.2a'da ısıtılmadan önce daha dar bir aralıkta olan parçacık boyutları, ısıtılma sonrası daha geniş bir aralığa

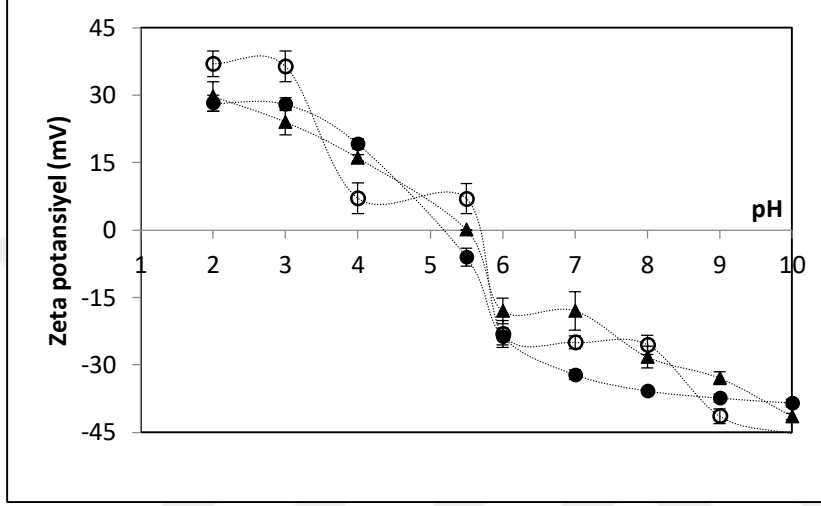
yayılmıştır. Bu durum farklı büyüklüklerde agregat oluşumunu gösterebileceği gibi, parçacıkların farklı oranlarda şişmiş olabileceğine de işaret etmektedir.

Şekil 4.2b'de ise farklı karıştırıcı hızlarıyla elde edilen parçacıkların boyut dağılımları gösterilmiştir. Ortalama parçacık boyutları sırasıyla 2  $\mu\text{m}$ , 4  $\mu\text{m}$  ve 5  $\mu\text{m}$  olarak belirlenmiştir. Boyutları ortalama 2  $\mu\text{m}$  ve 5  $\mu\text{m}$  olan parçacıklar, tekli dağılım özelliği gösterirken, boyutu ortalama 4  $\mu\text{m}$  olan parçacıklarda ise çoklu dağılım görülmüştür. Çoklu dağılımlar genellikle agregat oluşumunun bir sonucudur. Özellikle hacim ortalamalı boyut ölçümlerinin kullanıldığı durumlarda çok az miktarda agregat oluşumu bile hacimsel oranı değiştirdiğinden boyut dağılımlarında büyük bir fark gösterebilir. Bu nedenle, bazı durumlarda agregat oluşumlarından kaynaklı boyut farkını ihmal etmek için sayısal ortalamalı boyut dağılımları kullanılmaktadır. PAS proteini parçacıklarının çoklu boyut dağılımlarında agregat olduğu düşünülen yüksek boyut değerlerini gösteren pikler, parçacıkların yoğun olarak bulunduğu piklere göre çok küçüktür. Bu nedenle, yalnızca birkaç tane agregat oluşumundan bahsedilebilir ve bunların ihmal edilebilir düzeyde olduğu kabul edilmiştir.

Kolloidal parçacıklarda boyut dağılımı önemli bir özelliktir. Özellikle stabilite ve köpüklenme denemelerinde tekli dağılım gösteren parçacıkların kontrolü daha kolaydır ve parçacıkların davranışları daha sistematik açıklanabilmektedir. Bu nedenle, parçacık boyutuyla ilgili stabilite çalışmalarında çoğunlukla monodispers özellik gösteren silika ve lateks parçacıkları kullanılmıştır (Cao et al., 2015; Metin et al., 2014). Çoklu dağılım gösteren veya pik aralığı geniş olan kolloidal parçacıkların bulunduğu sistemlerde ise kontrol daha zordur. Örneğin, farklı boyutlardaki küresel parçacıkların tükenme etkileşimi (depletion interaction) nedeniyle faz ayrımı gibi stabilite problemleri gösterdikleri bilinmektedir (Parola and Reatto, 2015). Ayrıca, PAS proteini parçacıklarının esnek iç yapısı sayesinde boyutları zaman zaman dinamik özellik de kazanabilmektedir (Sağlam et al., 2013b). Bu durum, stabilite çalışmalarında ihmal edilemeyen bir durum olup, sistemi bir bütün olarak kompleks yapısıyla ele almayı gerektirmektedir.

#### 4.1.3. Parçacıkların elektriksel yükleri

Protein parçacıklarının zeta potansiyel değerleri farklı pH değerlerindeki dispersiyonlarda ölçülmüştür. Şekil 4.3'te pH 6.8'de ve pH 5.5 üretilen PAS proteini parçacıkları ile ham PAS proteinlerinin farklı pH ortamlarındaki zeta potansiyel değerleri gösterilmiştir.



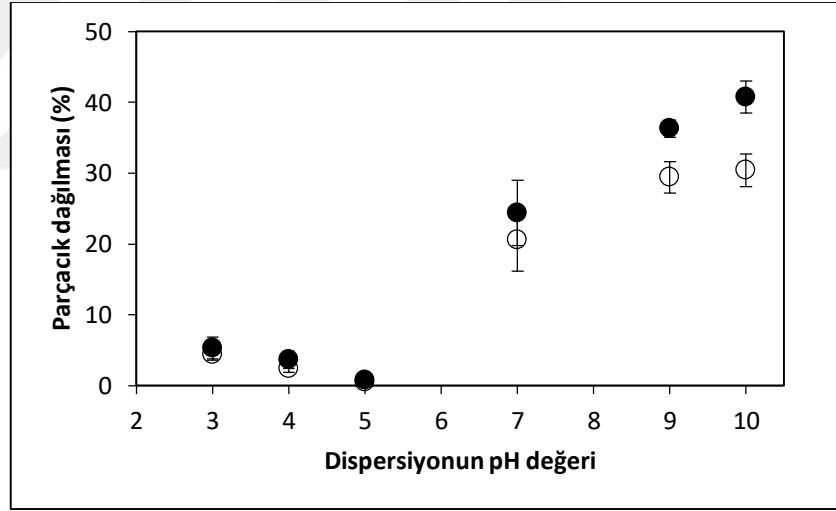
Şekil 4.3. (▲) Ham PAS proteini, (●) pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacığı ve (○) pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacığının farklı pH ortamlarındaki zeta potansiyel değerleri.

Şekil 4.3'teki verilere göre, ham PAS proteinlerinin zeta potansiyel değeri pH 5.5'te sıfırlanmıştır, dolayısıyla proteinlerin izoelektrik noktası pH 5.5'tir. Protein parçacıklarının izoelektrik noktaları ise, ham proteinlerinkine yakın değerlerdedir ancak tam pH 5.5'te değildir. Denatüre olmuş proteinlerde özellikle hidrojen ve sülfür bağlarının yer değiştirmeleriyle ortaya çıkan gruplar, proteinlerin net yüklerini değiştirebilmekte, dolayısıyla izoelektrik noktasında da sapmalar meydana gelebilmektedir. Önceki bir çalışmada, ısı ile elde edilen PAS proteini jellerinin izoelektrik noktası, ham proteinlerinkinden farklı bulunmuş; nedeni de tamamlanmamış denatürasyon olarak açıklanmıştır (Lazidis et al., 2016).

Protein parçacıklarının izoelektrik noktasından düşük pH değerlerinde pozitif yüklü, yüksek pH değerlerinde de negatif yüklü olmaları parçacıkların birbirlerini iterek koagüle olmalarını engellemiş ve çökmeye karşı stabilitesini

arttırmıştır. İzoelektrik noktasına yakın pH değerlerinde ve tam bu noktada ise dispersiyonlar sedimantasyon göstermiştir. Önceki bir çalışmada da, PAS proteini parçacığı dispersiyonlarının farklı pH değerlerindeki stabiliteleri (Şekil 2.6) aynı şekilde gözlemlenmiştir (Sağlam et al., 2013b). Bu noktalarda, parçacıklar arasındaki elektriksel itme kuvveti azaldığından dispersiyon stabilitesi bozulmuştur.

pH 6.8 ve pH 5.5'te üretilen parçacıkların farklı pH değerlerindeki dispersiyonlarda davranışları da incelenmiştir. Farklı pH değerlerinde, parçacıkların içindeki proteinlerin net elektriksel yükleri de değişeceğinden, birbirlerine uygulayacakları itme kuvvetleri de değişmektedir. İtme kuvvetinin şiddetinden parçacıkların bütünlükleri de etkilenebilmektedir. Bu nedenle, Şekil 4.4'te farklı pH değerlerindeki dispersiyonlarda bulunan parçacıkların dağılım oranları gösterilmiştir.



Şekil 4.4. pH 6.8 (●) ve pH 5.5'te (○) üretilen PAS proteini parçacıklarının dispersiyonun pH değerine göre dağılım oranları.

Asidik değerlerde, iki tür parçacığın da dağılım oranları en fazla %5 civarında olmuştur. Alkali değerlerde ise özellikle pH 6.8'de üretilen parçacıklarda dağılım oranı %40'ın üzerine çıkmıştır. İzoelektrik noktasından uzaklaşıldıkça, parçacığın içindeki proteinler arasındaki elektriksel itme kuvveti artmaktadır. Bu artış, alkali değerlerde parçacıkların bütünlüklerini bozabilecek kadar yüksektir. Dolayısıyla, nötr ve alkali pH değerlerindeki dispersiyonlarda



PAS proteini parçacıkları ve bu parçacıkların dağılmış haldeki daha küçük parçaları beraber bulunmaktadır. Asidik ortamda ise bu durum daha az görülmüştür. İzoelektrik noktasında ise dağılma oranı sıfıra yakındır. Bu nedenle, izoelektrik noktası ve yakınlarında parçacık bütünlükleri korunmuştur.

İzoelektrik noktasına yakın değerlerde parçacıkların bütünlükleri korunurken, dispersiyonlar sedimantasyon göstermişlerdir. Yalnızca parçacıkların özelliklerini araştırmak gerektiğinde, daha az dağılma eğiliminde oldukları için asidik pH'lardaki dispersiyonlar tercih edilmiştir. Nötr pH değerlerinde parçacıkların bir kısmının dağıldığı, alkali pH değerlerinde ise parçacıkların dağılmaya daha çok eğilimi olduğu ve her iki pH değerinde de parçacıkların küçük protein agregatları ile birlikte bulunduğu göz önüne alınmıştır.

#### **4.1.4. Parçacıkların hacimsel oranları ve yoğunlukları**

PAS proteini parçacıklarının yoğunlukları ve dispersiyon içindeki hacimsel oranları yalnızca pH 6.8'de üretilen parçacıklar kullanılarak belirlenmiştir.

Parçacıkların hacimsel oranları, saf su içinde hazırlanan dispersiyonlara seyreltmeler yapılarak ölçülmüş Einstein'ın viskozite eşitliği kullanılarak da hesaplanmıştır. Dispersiyonların seyreltik olmasındaki amaç, küresel parçacıkların birbirlerine olan uzaklıklarının, parçacıkların boyutlarından çok daha büyük olmasını sağlamaktır (Haines and Mazzucato, 2011). Bu şekilde, parçacıklar arasındaki etkileşim en az seviyeye indirilmekte, böylece Einstein'ın viskozite eşitliğinden elde edilen sonuçların güvenilirliği artmaktadır.

Einstein'ın viskozite eşitliğini en temel haliyle kullanırken, parçacıkların sert, küresel, her biri aynı boyutta ve birbirleriyle elektrostatik veya sterik herhangi bir etkileşimi olmayan parçacıkların varlığı kabul edilmektedir (Poon et al., 2012). Ancak PAS proteini parçacıkları ve dispersiyonlarında bu varsayımlar kısmen geçerlidir. Örneğin parçacıkların belirli bir esnekliği vardır, dolayısıyla parçacıklar tam olarak sert kabul edilemez. Boyut dağılımları belirli bir aralıktadır, dolayısıyla her biri aynı boyutta değildir. Önceki bir çalışmada, Einstein'ın viskozite eşitliğinden hesaplanan  $\Phi$  ile deneysel verilerin,  $\Phi \leq 0.03$

olduğu durumlarda hemen hemen aynı olduğu tespit edilmiştir (Pal, 2016). Parçacıkların bu hacimsel orandaki birbirleriyle etkileşimleri ihmal edilebilir olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, PAS proteini parçacıklarının da hacimsel oranları 0.03'ten küçük olacak şekilde hazırlanmıştır. Bununla birlikte, farklı bir çalışmada da hacimsel oran,  $\Phi \sim 0.0001$  olsa bile, yaklaşık %3'lük bir istatistiksel belirsizliğin varlığından bahsedilmiştir (Poon et al., 2012).

Yukarıda anlatılan varsayımlarla birlikte yapılan hesaplamalarda, parçacık hacimsel oranı,  $\Phi \sim 0.1$  olan bir dispersiyon elde etmek için PAS proteini parçacığı içeren 11.7 g ıslak peletin 100 g saf su içinde dispers edilmesi gerektiği bulunmuştur. Benzer şekilde,  $\Phi \sim 0.07$ 'lik dispersiyon için 4.1 g ıslak peletin,  $\Phi \sim 0.15$ 'lik dispersiyon için 18.6 g ıslak peletin ve  $\Phi \sim 0.4$ 'lük dispersiyon için ise 71.4 g ıslak peletin 100 g saf su içinde dispers edilmesi gerektiği tespit edilmiştir.

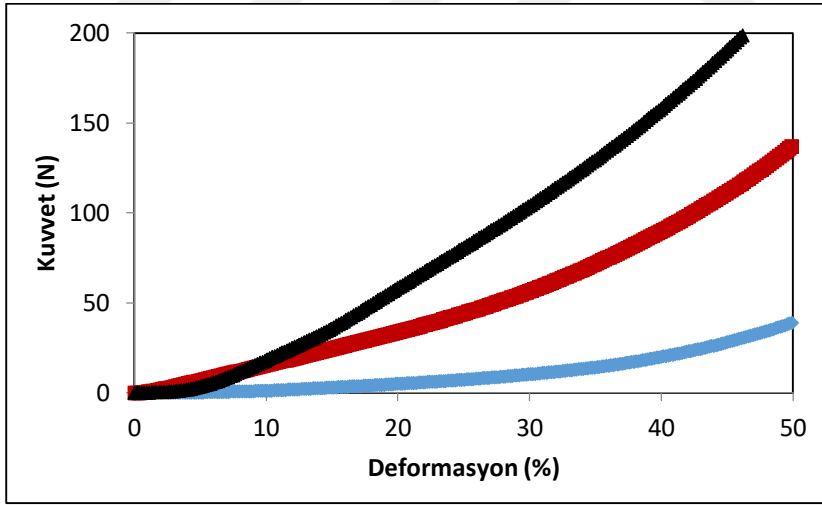
Parçacıkların yoğunlukları ise dispersiyonun ve sürekli fazının yoğunluklarının ayrı ayrı ölçülmesiyle belirlenmiştir. Örneklerden önce saf suyun yoğunluğu 20°C'de 0.99705 g/cm<sup>3</sup> olarak ölçülmüştür. Dispersiyonun sürekli fazı olan %1'lik PAS çözeltisinin yoğunluğu 0.99862 g/cm<sup>3</sup> ve hacimsel oranı 0.07 olarak belirlenen dispersiyonun yoğunluğu ise 1.00049 g/cm<sup>3</sup> olarak ölçülmüştür. Buna göre, pH 6.8'de üretilen ve herhangi bir pH ayarlaması yapılmayan dispersiyondaki parçacıkların yoğunlukları 1.025 g/cm<sup>3</sup> olarak hesaplanmıştır.

#### 4.1.5. Parçacıklardaki protein konsantrasyonu

Parçacıklardaki protein konsantrasyonu DUMAS yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. pH 6.8'de %20, %25 ve %30 PAS çözeltileriyle hazırlanan parçacıklardaki protein konsantrasyonları sırasıyla %15.6, %18.5 ve %23.4 olarak belirlenmiştir. Parçacıkların protein içeriğindeki azalma, buldukları ortamdan bir miktar su aldığını göstermektedir. Üç farklı parçacığın boyutu da ortalama 2.30 µm olarak ölçülmüş ve örnekler arasında bir fark gözlemlenmemiştir. Ancak, pH 6.8'de üretilen parçacıkların yapılarının esnek olduğu bilinmektedir (Sağlam et al., 2012). Esnek yapıları sayesinde parçacıkların su tutması ve su alarak şişmesi olasıdır. Bununla birlikte, içerdikleri protein miktarına bakılarak, sertlikleri hakkında bir fikir edinilebilir. Çözeltilerin

protein konsantrasyonu arttıkça, parçacıklardaki protein miktarları da artmıştır. Dispersiyon içinde bulunan parçacıklar yaklaşık %5-6 oranında protein kaybetmişlerdir.

Protein parçacıklarının sertlikleri, mikro-yapıları hakkında bilgi edinebilmek için önemlidir. Genellikle kolloidal katı parçacıklara göre geliştirilen formüller ve hesaplamalar, bazen esnek parçacıkların olduğu sistemlerde hatalı sonuç verebilmektedir (Pal, 2016). Esnek parçacıklar birbirleriyle ve buldukları ortamdaki diğer bileşenlerle daha kolay etkileşime girebildiği için daha kompleks bir sistem oluşturmaktadırlar. Yine de PAS proteini mikro-parçacıklarının sertlikleri hakkında genel bir fikir edinebilmek için, benzer şekilde üretilmiş farklı protein miktarlarındaki makro jellerin sertlikleri tekstür cihazıyla incelenmiştir. Makro jeller, parçacıkların üretimi sırasında kullanılan protein çözeltilerinin jelleştirilmesi ve su içinde bekletilmesiyle elde edilmiştir. Makro jellerin, uygulanan kuvvete karşın deformasyon eğrileri Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.5.** %20 (mavi), %25 (kırmızı) ve %30 (siyah) PAS proteini çözeltisi ile hazırlanan makro jellerin kuvvet-deformasyon eğrileri.

Şekil 4.5'teki eğrilerin doğrusal kısımları kullanılarak eğimleri hesaplanmıştır. Bu eğimler, Young modülüs değerlerini ifade etmektedir ve jellerin kırılmalık-sertlik karşılaştırması için bir gösterge olarak kullanılmıştır. Makro jellerin Young modülüs değerleri Tablo 4.2'de verilmiştir.

**Tablo 4.2.** Farklı konsantrasyonlarda PAS proteini içeren makro jellerin Young modülüs değerleri.

Örnek	Young modülüs (N/mm <sup>2</sup> )
%20 PAS	0.33
%25 PAS	0.63
%30 PAS	1.6

Young modülüs değerleri, protein konsantrasyonu arttıkça artmıştır. Dolayısıyla jellerin sertliklerinin de arttığı söylenebilir. Makro jellerin özelliklerinden yola çıkarak, benzer şekilde hazırlanan mikro jellerin de sertliklerinin, protein konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı söylenebilir. Bu durumda, %30 PAS çözeltisiyle hazırlanan parçacıkların, diğerlerine göre daha sert yapıda, esnekliği daha az ve içerdiği protein miktarının fazlalığından dolayı şişmesinin daha fazla olması beklenebilir. Çünkü artan protein miktarının su tutma kapasitesini de artırması beklenmektedir.

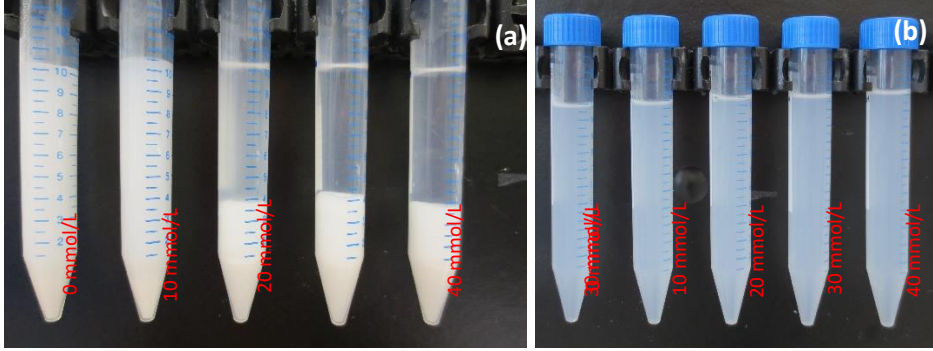
#### 4.2. PAS Proteini Parçacıklarının Tuz İyonlarıyla Etkileşimi

pH 6.8’de üretilen PAS proteini parçacıklarının 3 farklı katyonun varlığında koagüle oluşturmaları ve bununla birlikte dispersiyonlarda görülen çökme davranışları incelenmiştir. İncelemeler genellikle dispersiyonlardaki faz ayrımının görsel gözlemlenmesine dayanmaktadır. Parçacıkların tuz iyonlarının varlığındaki davranışları, literatürdeki kolloidal parçacıklarla karşılaştırılmış ve böylece PAS proteini parçacıklarının da kolloidal özellikleri tespit edilmiştir. Bununla birlikte, dispersiyonlarla aynı miktarda protein içeren ham protein çözeltilerinin tuz iyonları varlığındaki davranışlarıyla da karşılaştırma yapılmıştır.

##### 4.2.1. Görsel gözlemler

Farklı miktarlarda tuz içeren PAS proteini parçacığı dispersiyonları ve ham PAS proteini çözeltileri Şekil 4.6’da gösterilen kapalı tüplerin içinde

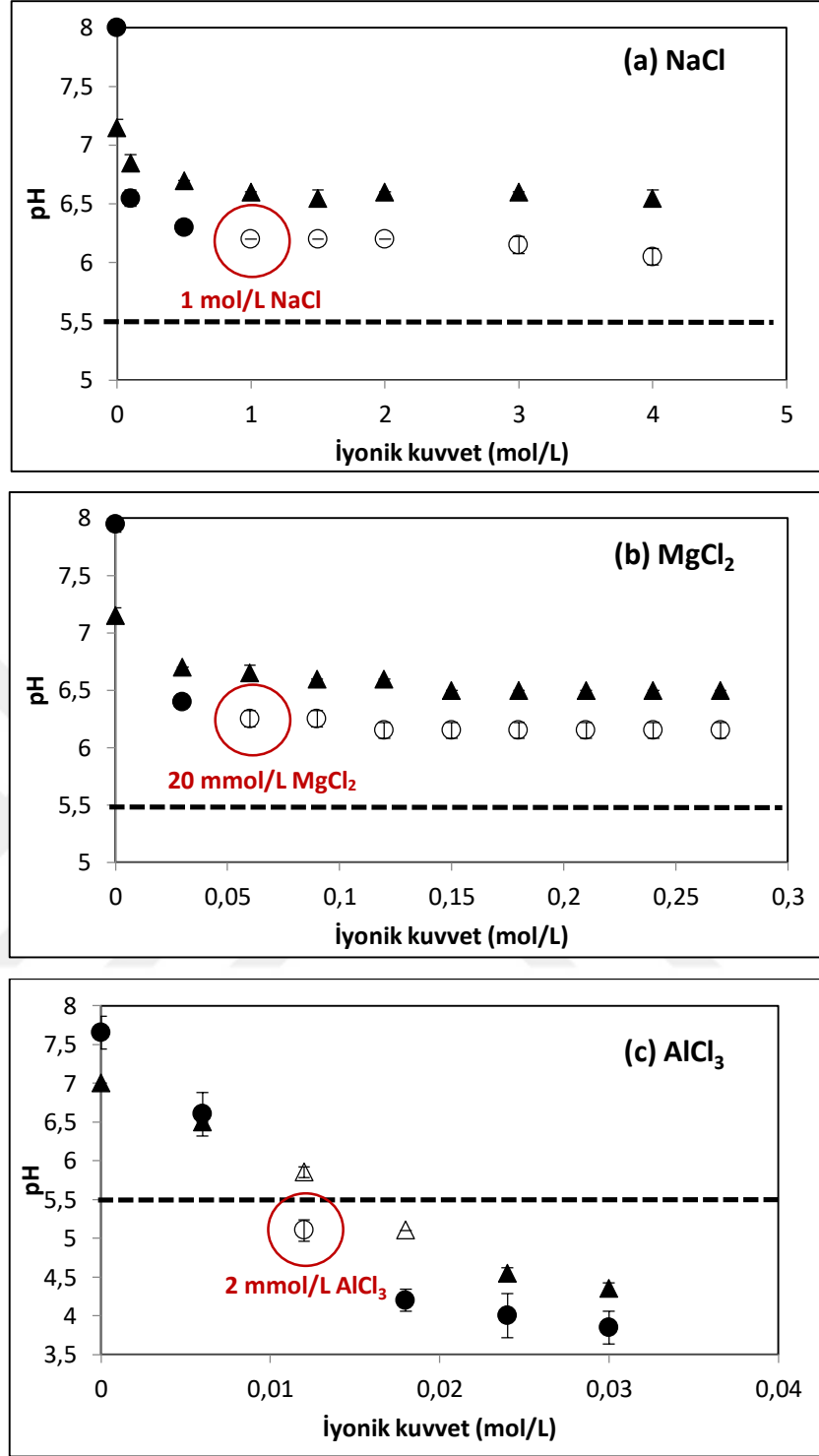
gözlemlenmiştir. Şekil 4.6 dispersiyonların ve çözeltilerin çökme özelliklerinin görülmesine örnek olarak verilmiştir.



**Şekil 4.6.** (a) Dispersiyonların ve (b) çözeltilerin farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarında çökme davranışları.

Şekil 4.6a'da tuz içermeyen ve 10 mmol/L  $MgCl_2$  içeren dispersiyonlar stabil kabul edilmiş, 20 mmol/L  $MgCl_2$  ve daha fazlasını içeren dispersiyonlar ise faz ayrımı gösterdikleri için destabilize olmuşlardır. Faz ayrımının görüldüğü en düşük tuz konsantrasyonu 20 mmol/L  $MgCl_2$  olduğu için, bu konsantrasyon kritik koagülasyon konsantrasyonu (KKK) olarak adlandırılmıştır. Şekil 4.6b'deki ham PAS proteini çözeltilerinde ise herhangi bir faz ayrımı gözlemlenmediğinden, tümü stabil olarak değerlendirilmiştir.

Görsel gözlemlerden elde edilen veriler kararlı (stabil) ya da kararlı (destabilize) şeklinde belirlenerek, Şekil 4.7'deki grafikler oluşturulmuştur. Bu grafiklerde dispersiyon ve çözeltilerden kararlı olanlar içi dolu noktalarla, kararlı olanlar ise içi boş noktalarda gösterilmiştir.



**Şekil 4.7.** (●) pH 6.8’de üretilen  $\Phi \sim 0.15$  olan parçacık dispersiyonlarının ve (▲) ağırlıkça %2.5 ham PAS çözeltilerinin (a) NaCl, (b) MgCl<sub>2</sub> ve (c) AlCl<sub>3</sub> iyonlarının varlığındaki stabilite davranışları. İçi dolu noktalar kararlı örnekleri, içi boş noktalar ise kararsız örnekleri belirtmektedir. Kesikli çizgi, PAS proteinlerinin izoelektrik noktasını göstermektedir.

Örneklerin hepsinde, iyonik kuvvet arttıkça pH değerlerinde azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu durum, protein parçacıklarının elektriksel

yüküne ters işaretli yüke sahip iyonların proteinlere daha yakın durma eğiliminden kaynaklanmaktadır. Protein parçacıkları pH 5.5'in üzerindeki değerlerde negatif yüklüdür, dolayısıyla ortamda bulunan  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ve  $\text{Al}^{3+}$  katyonları negatif parçacıklara yaklaşmaktadır. Daha önce beta-laktoglobulin ve serum albuminleri içeren protein çözeltileriyle yapılan bir çalışmada, proteinlerin izoelektrik noktalarının artan iyonik kuvvetle birlikte azaldığı tespit edilmiştir (Longsworth and Jacobsen, 1949). İsoelektrik pH değerinin azalması, proteinlerin üzerindeki negatif yüklere yakın duran su molekülündeki hidrojenle ortamda bulunan katyonların yer değiştirmesi ile ilişkilidir. Tek değerlikli ve çok değerlikli iyonların proteinlere bağlanma kuvvetleri farklıdır (Lyklema, 2014; Nicolai and Durand, 2013), bu nedenle ortamın pH değerini değiştirebilme etkileri de farklı olmaktadır.

Şekil 4.7a'daki örnekler NaCl içeren dispersiyon ve çözeltileri göstermektedir. Ölçülen pH değerleri, proteinlerin izoelektrik noktasının üzerinde olduğundan, hem ham PAS proteinleri hem de PAS proteini parçacıkları negatif yüklüdür. Bu nedenle ortamdaki  $\text{Na}^+$  iyonlarıyla proteinlerin birbirlerini çekmesi beklenmektedir. Tek değerlikli iyonların proteinler veya kolloidal parçacıkların yükleri üzerinde çoğunlukla bir perdeleme etkisi olduğu bilinmektedir (Szilagyi et al., 2014). Perdeleme etkisi, elektriksel çift tabakanın kalınlığını değiştirmekte, bu da parçacıkların birbirlerine ne kadar yakın durabileceğini belirlemektedir. Yani elektriksel çift tabakanın kalınlığı, parçacıklar arasındaki mesafeyi etkilemektedir. Tek değerlikli iyonların genellikle protein yüzeyine tutunacak kadar yüksek enerjileri olmadığından, parçacıkların net yüklerini de değiştiremezler. Dolayısıyla, ortamdaki NaCl yüksek konsantrasyonda olsa bile, dispersiyonların pH değeri, proteinlerin izoelektrik noktasının üzerinde kalmıştır. Tuz konsantrasyonunun 1 mol/L ve daha fazla olduğu dispersiyonlarda faz ayrımı gözlemlenmiştir. Böylece, PAS proteini parçacıkları için NaCl varlığında KKK 1 mol/L olarak tespit edilmiştir. Ham PAS proteini çözeltilerinde ise çalışılan NaCl konsantrasyon aralığında herhangi bir faz ayrımı gözlemlenmemiştir. NaCl varlığında ham proteinlerin, parçacıklara göre daha stabil kaldıkları söylenebilir. Bununla birlikte, dispersiyon ve çözeltilerin aynı protein ve tuz miktarındaki davranış farklılığı, parçacıkların kolloidal özellikte olduğunu göstermektedir.

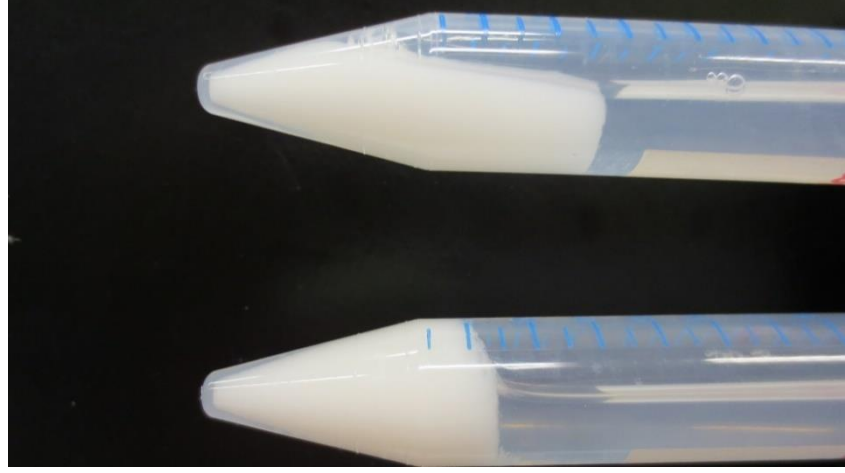
Şekil 4.7b’de iki değerlikli  $Mg^{2+}$  iyonlarını içeren dispersiyonların ve çözeltilerin stabiliteleri gösterilmektedir. Örneklerin pH değerleri, NaCl varlığındakine benzer şekilde azalarak izoelektrik noktasının üzerinde kalmıştır, dolayısıyla parçacıkların net yükleri de negatif değerlerdedir.  $Mg^{2+}$  iyonlarının proteinlerle, su moleküllerine göre daha güçlü hidrojen bağları oluşturduğu bilinmektedir (Dumetz et al., 2007). Bu iyonlar PAS proteini parçacıklarının yüzeyine güçlü hidrojen bağlarıyla tutunarak ortamdaki serbest  $H^+$  iyonlarının miktarı artmaktadır. Artan  $H^+$  iyonları da ortamın pH değerini düşürmektedir. Dispersiyonların pH değeri, iyonik kuvvetin 0.12 mol/L’den (40 mmol/L  $MgCl_2$ ) büyük olduğu değerlerde sabit kalmıştır. Bu durum, ortamda bulunan protein ve iyon miktarları arasında bir dengenin oluştuğunu göstermektedir.  $MgCl_2$  tuzu, sulu çözeltilerinde genellikle nötr veya nötre yakın asidik özellik göstermektedir (Berezovets et al., 2021). Bu nedenle, 40 mmol/L’den 90 mmol/L’ye kadar artan konsantrasyonlarda, örneklerin pH değerinde bir değişiklik gözlemlenmemiştir.  $MgCl_2$  için KKK değeri 20 mmol/L olarak bulunmuştur. Bu değer, NaCl için bulunan KKK değerinden (1 mol/L) daha düşüktür. İki değerlikli iyonların, kolloidal parçacıkların koagülasyonunda tek değerlikli iyonlara göre daha etkili olduğu bilinmektedir (Nicolai and Durand, 2013). Bu durum,  $Mg^{2+}$  iyonunun kolloidal protein parçacıklarıyla daha güçlü hidrojen bağ oluşturmasıyla da ilgilidir. Kolloidal parçacıkların belirli bir tuz konsantrasyonunun üzerinde koagülasyonuna neden olan  $Mg^{2+}$  iyonları PAS çözeltilerinde ise herhangi bir değişime neden olmamıştır. Çözeltiler tek değerlikli  $Na^+$  iyonlarının varlığındakine benzer şekilde kararlı kalmıştır.  $Mg^{2+}$  iyonları protein çözeltilerinde agregat oluşumuna yol açsa bile, bu durum makro ölçekte gözlemlenebilir bir etki oluşturmamıştır.

$AlCl_3$  güçlü bir Lewis asididir, bu nedenle sulu çözeltilerinin pH değeri genellikle pH 3.5 civarındadır (Fringuelli et al., 2001). Çok düşük konsantrasyonlarda bile pH değerini hızlıca düşürebilmektedir. Şekil 4.7c’de gösterilen  $AlCl_3$  içeren örnekler ise NaCl ve  $MgCl_2$  bulunan örneklerden farklı bir pH değişimi göstermişlerdir. Hem dispersiyonlar hem de çözeltiler 2 mmol/L  $AlCl_3$  konsantrasyonunda faz ayrımı göstermişlerdir. Bu değer aynı zamanda dispersiyonlardaki KKK olarak belirlenmiştir. Faz ayrımı görülen örneklerde pH değerleri, izoelektrik noktasına çok yakındır. Örneklerin pH değeri, artan tuz



konsantrasyonlarında izoelektrik noktasının altına düşmüştür. Bu durumda, parçacıkların net yükleri negatif değerlerden pozitif değerlere doğru bir değişim göstermektedir. pH 6 - pH 4.5 arasındaki değerlerde örnekler stabilize haldeyken, pH 4.5'in altına düştüğünde stabilite tekrar kazanılmıştır. İzoelektrik noktasına yakın pH değerlerinde azalan elektriksel itme kuvvetleri, bu noktadan uzaklaştıkça tekrar artmış ve dispersiyonu tekrar kararlı hale getirmiştir. İzoelektrik noktasının altındaki pH değerlerinde, yeni yükleri pozitif olan protein parçacıklarıyla  $Al^{3+}$  iyonlarının birbirine elektriksel itme kuvveti uygulaması beklenmektedir. Bu yeni durumda, ortamda bulunan zıt yüklü iyon  $Cl^-$  iyonu olmuştur ve dolayısıyla elektriksel çekme kuvvetinin de bu iyonla proteinler arasında gerçekleşmesi beklenmektedir. Yeni durum, tıpkı NaCl bulunan örneklerdeki gibi, ortamdaki zıt yüklü iyonların tek değerlikli olduğu duruma dönüşmüştür. Ortamdaki zıt yüklü iyonların tek değerlikli olması durumunda, özellikle düşük tuz konsantrasyonlarında kolloidal parçacıkların yavaş agregasyon düzeninde (slow aggregation regime) oldukları bilinmektedir (Trefalt et al., 2017). Bu durum, parçacıkların izoelektrik noktasının altında tekrar stabilize oldukları bölgede çok düşük hızlarda koagüle oluşturmalarını ifade etmektedir. Ancak, görsel gözlemler süresince tekrar stabilize olan örneklerde herhangi bir faz ayrımı meydana gelmemiştir.

Görsel incelemelerde,  $AlCl_3$  içeren dispersiyon ve çözeltilerin izoelektrik noktasına yakın olanlarında kıvam artışı tespit edilmiştir. Bu pH değerlerinde, tüpler Şekil 4.8'deki gibi yan tutulduğunda alt ve üst fazın karışması çok yavaş gerçekleşmiş ve üst fazın normalden daha kıvamlı olduğu gözlemlenmiştir. Bu kıvam artışı ve oluşan jel benzeri görüntünün, proteinlerin  $Al^{3+}$  iyonları varlığında bir çeşit ağ yapısı oluşturmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Çünkü  $Al^{3+}$  iyonları pH 5 civarında  $Al(OH)_2^+$ ,  $Al(OH)_2^{2+}$  ve  $Al(OH)_3$  gibi hidroksil kompleksleri oluşturmaktadır (Lee et al., 2012; Saka and Güler, 2006). Bu iyonların hepsinin bir arada bulunması, tek ve çok değerlikli iyonların bir arada bulunması anlamına gelmektedir ve her birinin proteinlerle elektrostatik etkileşimleri bir ağ yapısının oluşumunu tetikleyebilmektedir. Oluşan ağ yapısını da viskozitenin artışına neden olmaktadır.



**Şekil 4.8.** 2 mmol/L  $AlCl_3$  içeren PAS proteini parçacığı dispersiyonlarının fiziksel görüntüsü.

Kolloidal parçacıkların bulunduğu iyonik sıvılarda viskoz veya çözünme stabilizasyonlarının görülebilmektedir (Szilagyı et al., 2014). Buradaki stabilizasyondan kasıt, dispersiyonların makro ölçekteki durumları için değil, koagüle oluşumunun durması veya yavaşlamasıdır. Viskoz stabilizasyon, difüzyon kontrollü koagüle oluşumunun azalmasını; çözünme stabilizasyonu da parçacık yüzeylerine yakın elektriksel itme kuvvetlerinin artmasını ifade etmektedir. Her iki stabilizasyon türü de parçacıkların koagüle olma hızının azalmasıyla gerçekleşmektedir. PAS proteini parçacıklarının Şekil 4.8'deki durumu viskoz stabilizasyona örnek olarak verilebilir.  $AlCl_3$  tuzunun 3 mmol/L'den büyük konsantrasyonlarında bulunan PAS proteini parçacıklarının stabilizasyonu ise çözünme stabilizasyonu olabilir.

Dispersiyon ve çözeltilerde bulunan iyonlar, proteinlerin net yükünü değiştirebilme ve böylece proteinlerin stabilitesini bozabilme kapasitesine de sahiptir (Pace et al., 2009). Tuz iyonları, proteinlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini 3 temel mekanizmayla etkilemektedir. Bunlar iyonik kuvvetler, spesifik iyon etkisi ve hidrasyon etkisidir. İyonik kuvvetler ve hidrasyon kuvvetleri, elektriksel çift tabakanın özelliklerini değiştirmektedir (Kao et al., 2000). Spesifik iyon etkisi ise genellikle parçacıkların yüzeyine bağlanabilen çok değerlikli iyonların bulunduğu sistemlerde geçerli olmaktadır. Parçacıklara bağlanan katyonlar, iyonik kuvvetin yüksek olduğu durumlarda, ortamda bulunan su moleküllerindeki  $OH^-$  iyonlarını da kendilerine çekmektedir. Bu durum, sürekli

fazda  $H^+$  iyonlarının artmasına, dolayısıyla da pH değerinin düşmesine neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda, yalnızca çok değerlikli iyonların değil, tek değerlikli iyonların da proteinlerin net yükünü değiştirmede etkili olabildiği gösterilmiştir (Kao et al., 2000). Histidin gibi imidazol yan zinciri bulunan ve pH 6'ya kadar proteinlerin net yükünden farklı olarak pozitif yüklü kalabilen gruplar sayesinde, ortamdaki anyonlar lokal olarak bu pozitif bölgelere bağlanabilmekte, bunun sonucunda da sistemde beklenmeyen pH düşüşleri meydana gelebilmektedir.

PAS proteini parçacıkları dispersiyonlarında, zıt yüklü tuz iyonlarının, yani katyonların değerlikleri arttıkça, destabilizasyon için gereken minimum tuz konsantrasyonu azalmıştır. Çok değerlikli iyonların varlığındaki destabilizasyon, genellikle pH değerinin izoelektrik noktasına yaklaşmasından kaynaklanmaktadır (Roosen-Runge et al., 2013) ve çoğunlukla difüzyon kontrollü hızlı agregasyon mekanizması etkindir (Trefalt et al., 2017). Ancak PAS proteini parçacığı dispersiyonlarında, iki değerlikli  $Mg^{2+}$  iyonlarının varlığında izoelektrik noktasından uzak pH değerlerinde de destabilizasyon gözlemlenmiştir. Bu durum, farklı iyonların proteinlerle interaksiyon mekanizmalarının da farklı olabileceğinin bir göstergesidir (İnce Coşkun and Özdestan Ocak, 2020). Farklı tuz çözeltilerindeki PAS proteini parçacıklarının koagülasyon davranışlarını incelemek için iki yaklaşımdan yararlanılmıştır. Bunlar, DLVO teorisi ve spesifik iyon etkisi yaklaşımlarıdır.

#### 4.2.2. DLVO teorisi yaklaşımı

DLVO teorisine göre parçacıklar arasındaki etkileşim potansiyeli, van der Waals çekme ve elektriksel itme kuvvetlerinin toplamına eşittir. Buna göre etkileşim potansiyelinin pozitif olduğu bölgelerde, yani itme kuvvetlerinin yüksek olduğu durumlarda, parçacıkların bulunduğu dispersiyon kararlıdır ve faz ayrımı görülmemektedir. Etkileşim potansiyelinin negatif olduğu bölgelerde ise van der Waals çekme kuvvetleri baskın olduğundan, parçacıklar koagüle olma ya da çökme eğilimindedir, dolayısıyla sistemin destabilizasyonu gerçekleşmektedir.

#### 4.2.2.1. Elektriksel çift tabaka kalınlığı

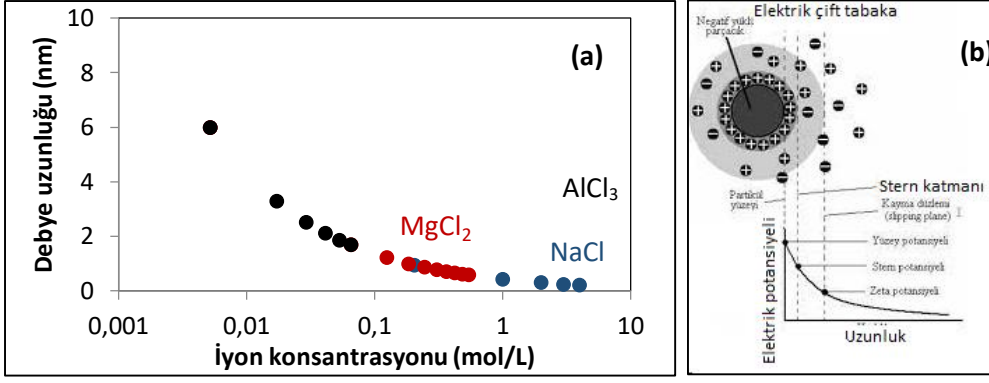
İyonik çözelti içinde bulunan parçacıklarda, elektriksel çift tabaka kalınlığı parçacıkların birbirlerine göre konumlarını belirlemede önemli rol oynamaktadır ve iyonik kuvvete bağlıdır (Verwey, 1947). Debye uzunluğu, çift tabaka kalınlığının bir ölçütü olarak ifade edilmektedir. İyonik kuvvetlerin arttığı durumlarda, Debye uzunluğu kısalmaktadır. Kısalan Debye uzunluğu çift tabaka kalınlığını da azaltmakta, dolayısıyla parçacıklar da birbirlerine yaklaşabilmektedir. PAS proteini parçacıklarının iyonik çözeltilerdeki davranışları da ilk önce Debye uzunluklarına bakılarak incelenmiştir.

Debye uzunlukları, Genel Bilgiler (2.4.1. *DLVO teorisi yaklaşımı*) bölümünde verilen formülle hesaplanmıştır:

$$\kappa^{-1} = [(\epsilon\epsilon_0 k_B T) / (2e^2 \sum_i z_i^2 n_i)]^{1/2}$$

Bu eşitlikte yer alan  $\epsilon = 80.4$ ;  $\epsilon_0 = 8.854 \times 10^{-12}$  F/m;  $k_B = 1.38 \times 10^{-23}$  J/K;  $T = 293$  K;  $e = 1.6022 \times 10^{-19}$  C olarak alınmıştır.  $z$ , iyonun değerliğini;  $n$ , dispersiyondaki iyon konsantrasyonunu ve  $i$ , ortamdaki farklı iyonları temsil etmektedir. Ortamdaki iyon konsantrasyonu, Avogadro sayısı ( $N_0 = 6.023 \times 10^{23}$ ) ve tuzdan gelen pozitif ve negatif yüklü iki farklı iyon hesaba katılarak bulunmuştur. Ortamda hiç tuz iyonları bulunmadığı zaman eşitlik sıfır değerini verdiği için, pH değerleri 7.4 olan örnekler pH 7'ye ayarlanarak ortamda az miktarda iyon olması sağlanmış böylece aynı eşitlik kullanılarak karşılaştırma yapılabilmektedir.

Bu şekilde yapılan hesaplamalara göre farklı tuz iyonlarının varlığında, parçacıklar arasındaki Debye uzunlukları Şekil 4.9a'da verilmiştir. Şekil 4.9b'de ise elektriksel çift tabakanın şematik gösterimi yer almaktadır.



**Şekil 4.9.** (a) Farklı konsantrasyonlarda NaCl (mavi), MgCl<sub>2</sub> (kırmızı) ve AlCl<sub>3</sub> (siyah) içeren dispersiyonlardaki PAS proteini parçacıkları arasındaki Debye uzunlukları (b) Elektrik çift tabakanın ve bu uzunluğun elektriksel potansiyele etkisinin şematik gösterimi.

Buna göre, aynı değerlikteki iyonun bulunduğu örnekler kendi içinde değerlendirildiğinde, artan iyon konsantrasyonu ile Debye uzunluğu azalmıştır. Bununla birlikte, tek değerlikli ve çok değerlikli iyonlar, Debye uzunluğunu değiştirme bakımından büyük bir fark göstermişlerdir. Üç değerlikli Al<sup>3+</sup> iyonlarının bulunduğu örneklerdeki Debye uzunlukları en düşük, tek değerlikli Na<sup>+</sup> iyonlarının bulunduğu örneklerdeki Debye uzunlukları ise en yüksek olarak tespit edilmiştir. Klorür iyonları bütün örneklerde bulunduğu için bu iyonların etkisi ihmal edilmiştir.

Debye uzunluğunun büyük olması, parçacıkların birbirlerinin etkileşim alanında olmadığını; küçük olması da birbirlerinin etkileşim alanında olduklarını göstermektedir (Şekil 4.9b). Parçacıkların birbirlerine yakın durabilmesi, elektriksel itme kuvvetlerinin azaldığının da bir göstergesidir, bu nedenle koagüle olmaları da olasıdır.

Tuz iyonlarının koloidal PAS proteini parçacıkları üzerindeki temel etkisi elektriksel kuvvetleri değiştirmeleridir. Bu kuvvetleri değiştirme miktarları, elektriksel çift tabakanın kalınlığını değiştirme miktarlarıyla ilgilidir ve çok değerlikli iyonların çift tabaka kalınlığını değiştirmede tek değerlikli iyonlara göre daha etkili olduğu bulunmuştur.

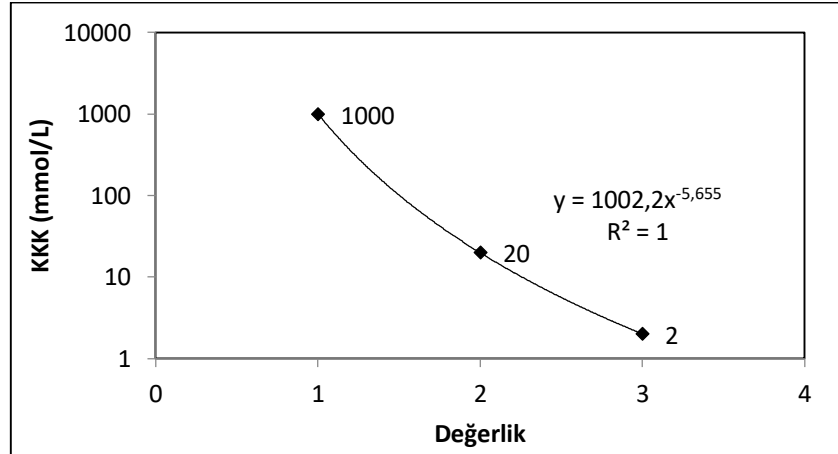
#### 4.2.2.2. Schulze-Hardy kuralı

KKK, parçacıkların hızlı bir şekilde koagüle olmaya başladıkları en düşük konsantrasyon olarak ifade edilmektedir ve zıt yüklü iyonların değeri arttıkça KKK değerinin azaldığı bilinmektedir (Trefalt, 2016). Bu çıkarım, DLVO teorisinden yola çıkarak hesaplanan Schulze-Hardy kuralı olarak bilinmektedir. Schulze-Hardy kuralı, koloidal sistemlerde KKK'nın zıt yüklü iyonun değeriyle ters orantılı olduğunu söylemektedir:

$$KKK \propto z^{-6}$$

Bu kuralda da DLVO teorisindeki varsayımlar geçerli olup, elektriksel yükü yüksek ve sabit olan parçacıklar daha uygun sonuçlar vermektedir (Hsu and Kuo, 1995).

PAS proteini parçacığı dispersiyonları için tespit edilen KKK değerleri tek değerlikli  $\text{Na}^+$  iyonlarının varlığındaki tuz için 1 mol/L, iki değerlikli  $\text{Mg}^{2+}$  iyonlarının varlığındaki tuz için 20 mol/L ve üç değerlikli  $\text{Al}^{3+}$  iyonlarının varlığındaki tuz için 2 mmol/L'dir. Bu değerlerden Şekil 4.10'daki grafik elde edilmiştir.



Şekil 4.10. PAS dispersiyonlarının farklı değerlikteki tuz iyonlarının varlığında KKK değerleri. Düz çizgi, veriler arasındaki en uygun modeli göstermektedir.

Şekil 4.10'daki veriler, PAS proteini parçacıklarının zıt yüklü iyonlarla uyumunu  $KKK \propto z^{-5.7}$  olarak göstermektedir. Üssel değeri 2 ile 6 arasında değer

alabildiği de düşünülürse (Metcalf and Healy, 1990; Sano et al., 2000), 5.7 değeri kolloidal PAS proteini parçacıkları için uygun bir değerdir. Bu durum, PAS proteini parçacıklarının bir, iki ve üç değerlikli iyonlar için Schulze-Hardy kuralına uygunluk gösterdiğini ifade etmektedir.

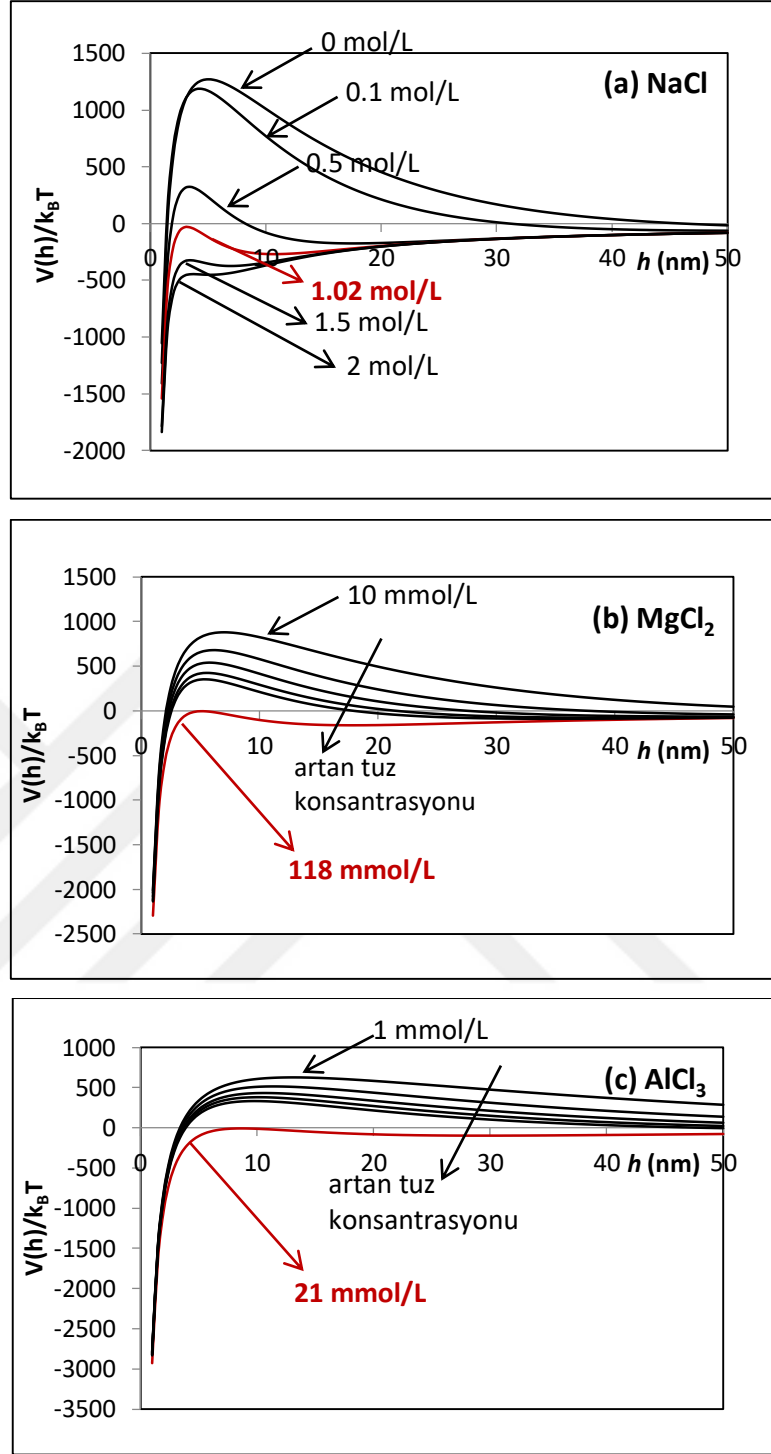
Parçacıkların,  $AlCl_3$  iyonları varlığında olduğu gibi, artan tuz konsantrasyonlarında tekrar stabilizasyonu ters Schulze-Hardy (inverse Schulze-Hardy) kuralı adı verilen bir kuralla açıklanmaktadır (Cao et al., 2015; Trefalt et al., 2017). Ancak PAS proteini parçacıkları için tekrar stabilize olma durumu yalnızca  $Al^{3+}$  iyonlarının varlığında gözlemlenmiş, tek ve iki değerlikli iyonların varlığında gözlemlenmemiştir. Bu nedenle, ters Schulze-Hardy kuralı, PAS proteini parçacıklarına uygulanamamıştır.

DLVO teorisi kapsamında, KKK değerleri interaksiyon potansiyelleri kullanılarak hesaplanmış ve bu değerler gözlemlenen deneysel verilerle karşılaştırılmıştır. Parçacıklar arasındaki interaksiyon potansiyelini hesaplamada kullanılan eşitlik aşağıdaki gibidir;

$$V(h) = \pi R[-H/(12\pi h)] + \pi R[64 k_B T c_0 N_0 \tanh(ze\Phi_0(4k_B T)) \exp(-\kappa h)/\kappa^2]$$

Bu eşitlikte  $h$  değeri, nm cinsinden hesaplanmış, parçacık boyutu yaklaşık 3  $\mu m$  ( $R = 1.5 \mu m$ ),  $H = 2 \times 10^{-20}$  J,  $k_B = 1.38 \times 10^{-23}$  J/K,  $T = 293$  K,  $N_0 = 6.023 \times 10^{23}$ ,  $e = 1.6022 \times 10^{-19}$  C ve  $\Phi_0 = 2 k_B T$  ( $\sim 50$  mV) olarak alınmıştır.  $\kappa$  değeri, Debye uzaklığının tersi,  $z$  değeri de zıt yüklü iyonun değerliğini göstermektedir.

PAS proteini parçacığı dispersiyonlarının farklı konsantrasyonlardaki farklı tuzlarla elde edilen interaksiyon potansiyeli grafikleri Şekil 4.11'de verilmiştir. İnteraksiyon potansiyelinin ve bunun birinci derece türevinin sıfıra eşit olduğu konsantrasyon değeri, DLVO teorisine göre hesaplanan KKK değerini ifade etmektedir (Hsu and Liu, 1998).



**Şekil 4.11.** PAS dispersiyonlarının (a) NaCl, (b) MgCl<sub>2</sub> ve (c) AlCl<sub>3</sub> tuzlarının farklı konsantrasyonları için elde edilen interaksiyon potansiyeli grafikleri. Kırmızı ile gösterilen değerler KKK değerini ifade etmektedir.

Şekil 4.11a'da gösterilen grafikte örneklerin NaCl iyonlarının varlığında hesaplanan KKK değeri ile deneysel verilerde bulunan KKK değeri uyum göstermektedir. Ancak Şekil 4.11b ve 4.11c'deki iki ve üç değerlikli iyonlar için



bulunan 118 mmol/L  $MgCl_2$  ve 21 mmol/L  $AlCl_3$  değerleri, deneysel olarak tespit edilen 20 mmol/L  $MgCl_2$  ve 2 mmol/L  $AlCl_3$  değerlerinden farklıdır. İki ve üç değerlikli iyonlar için hesaplamalardaki değerler, deneysel verilerden yüksek sonuçlar vermiştir. Bunun nedeni, DLVO teorisinin yüksek ve homojen yüzey potansiyeli, parçacık yüzeylerinin birbirlerinden oldukça uzak olması, parçacık boyut dağılımının genellikle monodispers kabul edilmesi gibi varsayımları olabilir (Hsu and Kuo, 1995).

Hesaplanan ve deneysel veriler arasındaki farklılıklar, DLVO teorisinin PAS proteini parçacıklarının kolloidal davranışlarını açıklamada kısıtlı kalmıştır. Tek değerlikli iyonlar için oldukça başarılı tahminler yapabilen DLVO teorisi, çok değerlikli iyonların varlığındaki çift tabaka kalınlığını bazen doğru tahmin edememektedir (Kohonen et al., 2000). Çok değerlikli iyonların varlığında, deneysel verilerin hesaplanandan daha düşük olması da spesifik iyon etkisinin varlığını güçlendirmektedir.

#### **4.2.3. Spesifik iyon etkisi yaklaşımı**

Spesifik iyon etkisini oluşturan nedenlerin başında parçacık yüzeyindeki elektriksel yüklerin heterojen dağılımı ve hidrasyona uğramış katyonların parçacık yüzeyine bağlanma istekleri yer almaktadır (Szilagyı et al., 2013). PAS proteini parçacıkları için DLVO teorisi ile hesaplanan değerlerden sapmaların görülmesi de spesifik iyon etkisinin test edilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Spesifik iyon etkisinin varlığını test etmek için, iki basit yöntem uygulanmıştır. Bunlardan birincisi KKK değerinin protein parçacıklarının hacimsel oranına bağlı olup olmadığının araştırılmasıdır. Kolloidal parçacıklar üzerinde spesifik iyon etkisi varsa, KKK değerinin parçacıkların miktarına bağlı olması gerekmektedir. Eğer parçacıklar üzerinde, spesifik iyon etkisi yok ve yalnızca tek değerlikli iyonların varlığındaki gibi perdeleme etkisi hakimse, KKK değerinin parçacık miktarından bağımsız olması beklenmektedir (İnce Coşkun and Özdestan Ocak, 2020). Hacimsel oranları değiştirilen PAS proteini parçacığı dispersiyonlarında gözlemlenen KKK değerleri Tablo 4.3'te gösterilmektedir.

**Tablo 4.3.** Farklı hacimsel oranlardaki PAS proteini parçacığı dispersiyonlarının iki ve üç değerlikli tuz iyonları varlığındaki KKK değerleri.

$\Phi$	KKK (mmol/L) MgCl <sub>2</sub>	$\Phi$	KKK (mmol/L) AlCl <sub>3</sub>
0.10	18	0.10	1.5
0.15	20	0.15	2
0.30	25	0.25	3

Tablo 4.3'teki verilere göre, KKK değerleri ortamda bulunan parçacık miktarıyla birlikte artmıştır. Örneğin, MgCl<sub>2</sub> içeren dispersiyonun parçacık hacimsel oranı  $\Phi \sim 0.15$  iken KKK değeri 20 mmol/L iken,  $\Phi \sim 0.30$  olduğunda KKK değeri 25 mmol/L'ye çıkmıştır. Benzer şekilde, AlCl<sub>3</sub> içeren dispersiyonun parçacık hacimsel oranı  $\Phi \sim 0.15$  iken KKK değeri 2 mmol/L iken,  $\Phi \sim 0.25$  olduğunda KKK değeri 3 mmol/L'ye çıkmıştır. Bu sonuçlar parçacık yüzeyine spesifik olarak bağlanan iyonların varlığına işaret etmektedir (İnce Coşkun and Özdehan Ocak, 2020).

Spesifik iyon etkisini araştırmada ikinci yöntem olarak, PAS proteini parçacıkları bulunan ve bulunmayan tuz çözeltilerinin pH değerinin ölçümü gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde yalnızca AlCl<sub>3</sub> tuzu kullanılmıştır. Spesifik iyon etkisinin olması durumunda, PAS proteini parçacığı bulunan tuz çözeltilerinin ortamdaki iyonların bir kısmını yüzeyine bağlayarak pH değerini değiştirmesi beklenmektedir. Örneğin, katyonlar, parçacık yüzeyindeki H<sup>+</sup> iyonlarıyla yer değiştirerek, bu iyonların sulu faza geçmesine sebep olmakta, bunun sonucunda sulu fazda artan H<sup>+</sup> iyonlarının da ortamın pH değerini düşürerek asitliği arttırması beklenmektedir (İnce Coşkun and Özdehan Ocak, 2020).

PAS proteini parçacığı içermeyen, 100 mmol/L AlCl<sub>3</sub> çözeltisinin pH değeri  $3.5 \pm 0.1$  olarak belirlenmiştir. Bu çözeltiliye PAS proteini parçacıkları  $\Phi \sim 0.25$  olacak şekilde eklendiğinde ise pH değeri  $3.8 \pm 0.1$  olarak ölçülmüştür. Dispersiyonun pH değerinin tekrar 3.5 olabilmesi için ise gereken AlCl<sub>3</sub> konsantrasyonu 135 mmol/L olarak tespit edilmiştir. Bu durum, Al<sup>3+</sup> iyonlarının parçacıkların yüzeyindeki H<sup>+</sup> iyonlarıyla yer değiştirdiğini, Al<sup>3+</sup> iyonlarının

yüze tutunduğunu ve parçacıklarla beraber hareket ettiğini göstermektedir. Dolayısıyla, çok değerlikli iyonların varlığında spesifik iyon adsorpsiyonunun PAS proteini parçacıkları üzerinde etkili olduğu görülmektedir.

### 4.3. PAS Proteini Parçacıklarının Isı Stabiliteleri

PAS proteini parçacıklarının ısıyla denatüre edilerek hazırlanmış olması, bu parçacıkları ham proteinlere göre daha kararlı hale getirmektedir. Ancak, parçacıkların esnek bir yapıya sahip olması, buldukları ortamların interaksyonlarını ve çevresel faktörlerden etkilenmelerini arttırmaktadır. Bu nedenle, çevresel bir faktör olan ortam sıcaklığının değişmesiyle PAS proteini parçacıklarında meydana gelen değişimler ve olası mekanizmaları incelenmiştir. Önceki çalışmalarda da pH 6.8’de üretilen PAS proteini parçacıklarının 90°C’de 30 dakika boyunca ısıtılmasının parçacıkların ve buldukları dispersiyonların fiziksel özelliklerini değiştirdiği bulunmuştur (Sağlam et al., 2012; 2013a). Bu çalışmalarda PAS proteini parçacıklarıyla aynı ortamda bulunan Arap zambının parçacıklara ısı stabilitesi sağladığı, ancak ham PAS proteini veya sodyum kazeinatın etkisiz olduğu rapor edilmiştir (Sağlam et al., 2013a). PAS proteini parçacıkları ile ortamdaki polimerlerin etkileşim mekanizmalarıyla ilgili net bir bilgi bulunmamaktadır.

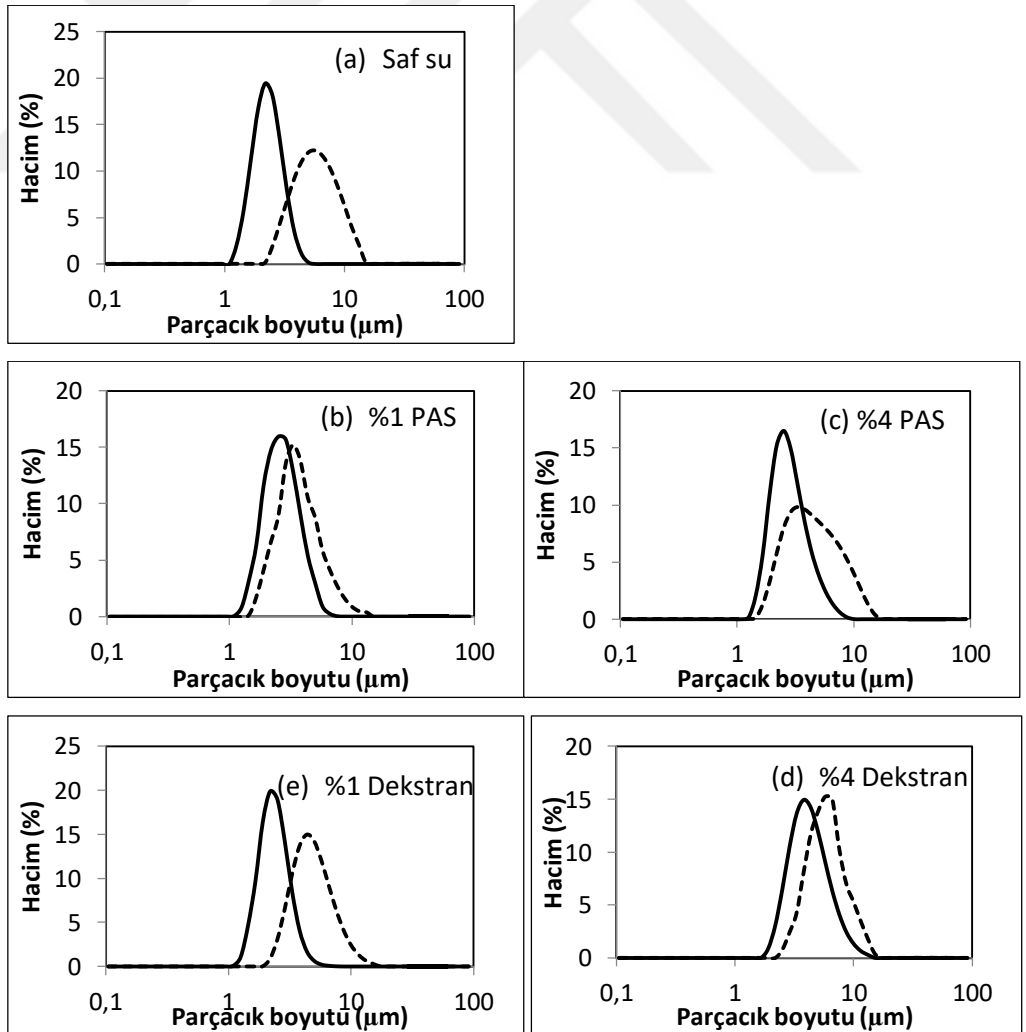
PAS proteini parçacıklarının ısıtılma sonrası davranışlarındaki değişimleri incelemek amacıyla %1 ve %4’lük protein (ham PAS proteini) ve polisakkarit (Arap zambkı ve dekstran) çözeltileri içinde  $\Phi \sim 0.1$  olan dispersiyonlar hazırlanmıştır. Parçacıkların ısıtılma öncesi ve sonrası boyut dağılımları, dispersiyonların dinamik viskozite değerleri, bu değerlerden elde edilen şişme oranları ve reolojik özellikleri karşılaştırılmış, böylece parçacıkların ısı stabilitesi ve ortamdaki polimerlerle etkileşimleri hakkında önceki çalışmalara kıyasla daha detaylı bilgi edinilmiştir.

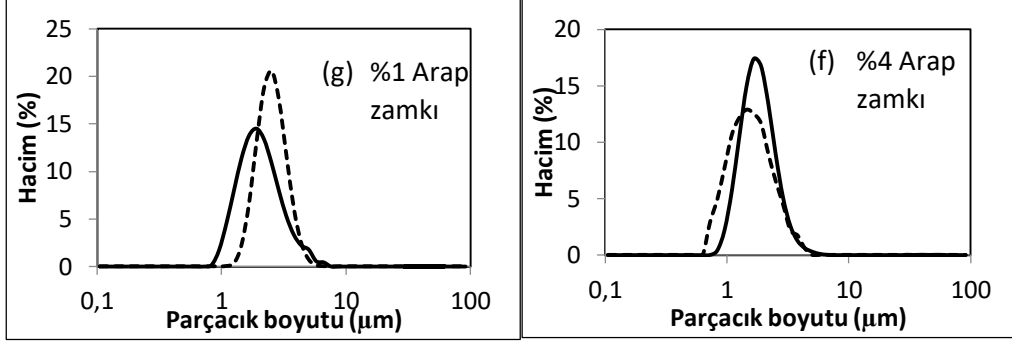
#### 4.3.1. Parçacıkların boyut dağılımları

Isıl işlemin PAS proteini parçacıkları üzerindeki etkisine öncelikle çok açılı ışık saçılım yöntemiyle bakılmıştır. Parçacıkların ısıtılmadan önceki ve sonraki

boyut dağılımları karşılaştırılmıştır. Boyut dağılımları için hacim ortalamalı sonuçlar kullanılmıştır. Parçacıkların az miktarda koagüle olmaları durumunda bile, hacim ortalamalı boyut dağılımının büyük değerler göstermesi beklenmektedir. Bununla birlikte, ısıtılma sonrası parçacıklarda yalnızca şişme meydana gelirse, boyut dağılımının daha az miktarda değişmesi öngörülmektedir.

PAS proteini parçacıklarının saf su, ham PAS proteini, dekstran ve Arap zankı çözeltileri içinde ısıtılmadan önce ve sonraki boyut dağılımları Şekil 4.12'de gösterilmektedir. Çözeltilerin farklı konsantrasyonları, PAS proteini parçacıklarıyla fiziksel veya kimyasal etkileşimi açıklamada yardımcı olmaktadır. PAS proteini parçacığı dispersiyonları hacimsel oranları  $\Phi \sim 0.10$  olarak hazırlandığından, çok yüksek oranlarda koagüle oluşumu beklenmemektedir. Ancak, ısıtılma sonrası boyut dağılımı eğrilerindeki şekil ve hacim değişikliği, şişmenin yanı sıra koagüle oluşumunun da gerçekleşebileceğini göstermektedir.





**Şekil 4.12.** (a) Saf su, (b) %1 PAS, (c) %4 PAS, (d) %1 dekstran, (e) %4 dekstran, (f) %1 Arap zamkı ve (g) %4 Arap zamkı çözeltileri içinde dispers edilmiş PAS proteini parçacıklarının ısıtılmadan önceki (düz çizgi) ve sonraki (kesikli çizgi) boyut dağılımları.

Saf su içindeki parçacıkların boyut dağılımları (Şekil 4.12a) ısıtılma sonrası artmış, koagülasyon belirtileri gözlemlenmiştir. PAS proteini çözeltilerinde (Şekil 4.12b ve c) ise parçacık boyut dağılımları, saf su içindeki dağılımlara göre daha az artmıştır. Yüzde 1 ve %4 ham PAS proteini içeren dispersiyonlarda ısıtılma sonrası ham proteinlerin denatürasyonu da boyut dağılımının artmasına katkıda bulunmuş olabilir. Dispersiyon içindeki ham PAS proteini konsantrasyonunun artması, parçacıklardaki boyut değişimini bir miktar engellemiştir. Saf su içeren dispersiyonların pH değeri 7.4 olduğundan, parçacıkların kısmen dağılma durumu da göz önüne alınmalıdır (Şekil 4.4). Dağılmış parçacıklardan oluşan agregatlar, sürekli fazdaki biyopolimer konsantrasyonunu bir miktar arttırmıştır. Ancak, parçacıkların ısı stabilitesinin düşük olması, bu agregatların sürekli fazdaki biyopolimer konsantrasyonuna etkisinin minimal olduğunu göstermektedir.

Dekstran içeren dispersiyonlarda da (Şekil 4.12 d ve e) ısıtılma sonrası PAS proteini parçacığının boyutlarında artma gözlemlenmiştir. Ham PAS proteinlerinin varlığındakine benzer şekilde, parçacıkların ısı stabilitesi %4 dekstran içeren dispersiyonlarda daha yüksektir. PAS proteini parçacıklarının saf su, ham PAS proteini çözeltileri ve Arap zamkı çözeltilerinde ısıtılmadan önceki ortalama boyutları  $\sim 2.5 \mu\text{m}$ 'dir, ancak dekstran çözeltilerinde bu değer  $\sim 4.2 \mu\text{m}$  olarak bulunmuştur. Bu durum, dekstranın ve parçacıklar arasındaki etkileşimin ısıtılma işleminden önce olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.12f ve g'de Arap zampının %1 ve %4'lük konsantrasyonlarını içeren dispersiyonlardaki parçacık boyutları görülmektedir. Yüzde 1 Arap zampı içeren dispersiyondaki parçacıklar, ısıtılma sonrası çok az bir boyut artışı göstermiştir. Yüzde 4 Arap zampı içeren örnekte ise ısıtılma sonrası boyut artışı meydana gelmemiştir.

Parçacıkların boyut dağılımları ısıtılma öncesi ve sonrasında, ortamdaki polimer türüne göre farklı davranışlar göstermiştir. Örneğin dekstran, PAS proteini parçacıklarının boyutlarını ısıtılmadan önce de etkilemiştir. Bu durumun dekstranın molekül büyüklüğüyle ilgili olduğu düşünülmektedir. Moleküler düzeyde ham PAS proteini ~20 nm (Witz et al., 1963), Arap zampı ~13 nm (Idris et al., 1998) dekstran ise ~6.6 nm'dir (Wen et al., 2013). Parçacıklar üzerindeki gözenek büyüklüğü ise 4 ile 20 nm arasında bulunmuştur (Sağlam et al., 2013b). Polimer ve gözenek boyutları göz önüne alındığında PAS proteinleri ve Arap zampının çoğunlukla sürekli fazda bulunması, dekstranın ise hem sürekli fazda hem de parçacıkların içinde olması beklenmektedir. Dekstranın, PAS proteini parçacıklarının boyutlarını ısıtılmadan önce etkilemesinin iki farklı olası mekanizmayla gerçekleşebileceği düşünülmektedir. Birincisi, dekstranın PAS proteini parçacıkları arasında tükenme interaksyonunu tetiklemiş olmasıdır (de Kruif and Tuinier, 2001; Fitzsimons et al., 2008). Bu durumda, belirli boyutlardaki PAS proteini parçacıklarının koagüle olarak daha büyük parçacıklara dönüşmesi söz konusudur. İkincisi olası mekanizma ise, dekstranın PAS proteini parçacıklarının içine girerek ağ yapısını etkileyen ozmotik basıncı değiştirmiş olmasıdır. Bu durumda ise PAS proteini parçacıklarının esnek yapısı sayesinde şişmesi göz önüne alınmalıdır.

Parçacıkların iç ve dış basıncını değiştirmeleri bakımından karşılaştırma yapabilmek için ham PAS proteinleri, dekstran ve Arap zampı çözeltilerinin ozmotik basınç değerleri ölçülmüştür. Ozmometre kullanılarak yapılan ölçümlerden elde edilen veriler Tablo 4.4'te gösterilmektedir.

**Tablo 4.4.** PAS, dekstran ve Arap zankı çözeltilerinin farklı konsantrasyonlardaki ozmolalite değerleri (mOzm/kg).

Saf su		PAS	Dekstran	Arap zankı
	%1	2	0.5	3.5
0.5	%2.5	5.5	2.5	16.5
	%4	10.5	5.5	28

Tablo 4.4'teki verilere göre, bir örneğin konsantrasyonu arttığında, ozmolalitesi de artmaktadır. Ozmolalite değeri, bir zeltide donma noktasını düşüren madde miktarını göstermektedir, yani aslında yalnızca zeltideki znmş madde miktarı hakkında bilgi vermektedir. Bu nedenle konsantrasyon arttığında ozmolalitenin artması da beklenen bir durumdur. Ancak, aynı konsantrasyon değeri göz önüne alınarak farklı zeltiler karşılaştıırıldığında, en yüksek ozmolalite Arap zankında en düşük ozmolalite de dekstranda görülmektedir. Bu durum, znen maddenin boyutları hakkında fikir vermektedir. Verilere göre dekstran, ham PAS proteini ve Arap zankına göre daha küçüktür, bu nedenle parçacık yüzeyindeki gözeneklerden dekstranın geçebilmesi daha olasıdır. Dolayısıyla, dekstran ve PAS proteini parçacıkları arasındaki etkileşimin varlığı ısıtma işlenminden öncesine dayanmaktadır.

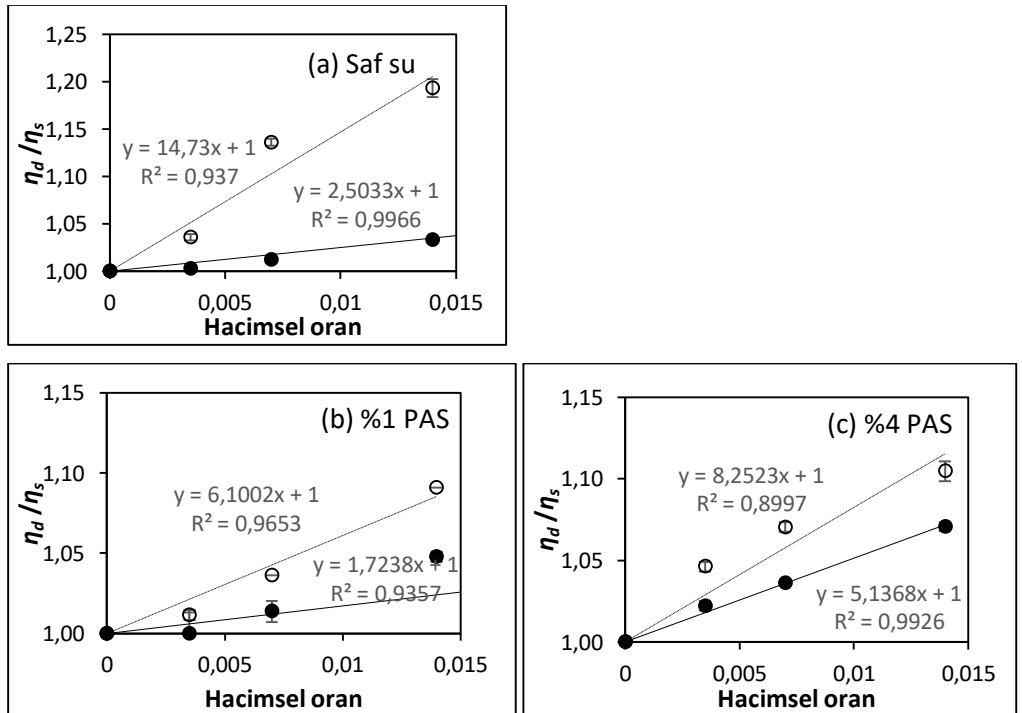
Ozmolalite değeri, makromoleküler kalabalık adı verilen bir durum hakkında da bilgi sağlamaktadır (Stagg et al., 2007). Makromoleküler kalabalık, yüksek konsantrasyonlardaki makro-moleküllerin özellikle protein zeltilerinin normalden farklı davranışlar göstermesine neden olmaktadır (Ellis, 2001). Örneğin, nceki bir çalışmada artan dekstran konsantrasyonlarının, ham proteinlerin termal stabilitelerini arttırdığı rapor edilmiş, nedeni de makromoleküler kalabalık olarak açıklanmıştır (Zhu et al., 2008b). Benzer şekilde, PAS proteini parçacıklarının boyut dağılımları ısıtılma sonrası, ham PAS proteini, dekstran ve Arap zankının artan konsantrasyonlarında ya sabit kalmış ya da görece az artmıştır. Dolayısıyla, PAS proteini parçacığı dispersiyonlarının sürekli fazındaki artan biyopolimer konsantrasyonlarının, makromoleküler kalabalık etkisi oluşturarak parçacıkların ısıtılma sonrası boyut artışını sınırlandırdığı düşünülmektedir.

### 4.3.2. Parçacıkların dinamik viskoziteleri ve şişme oranları

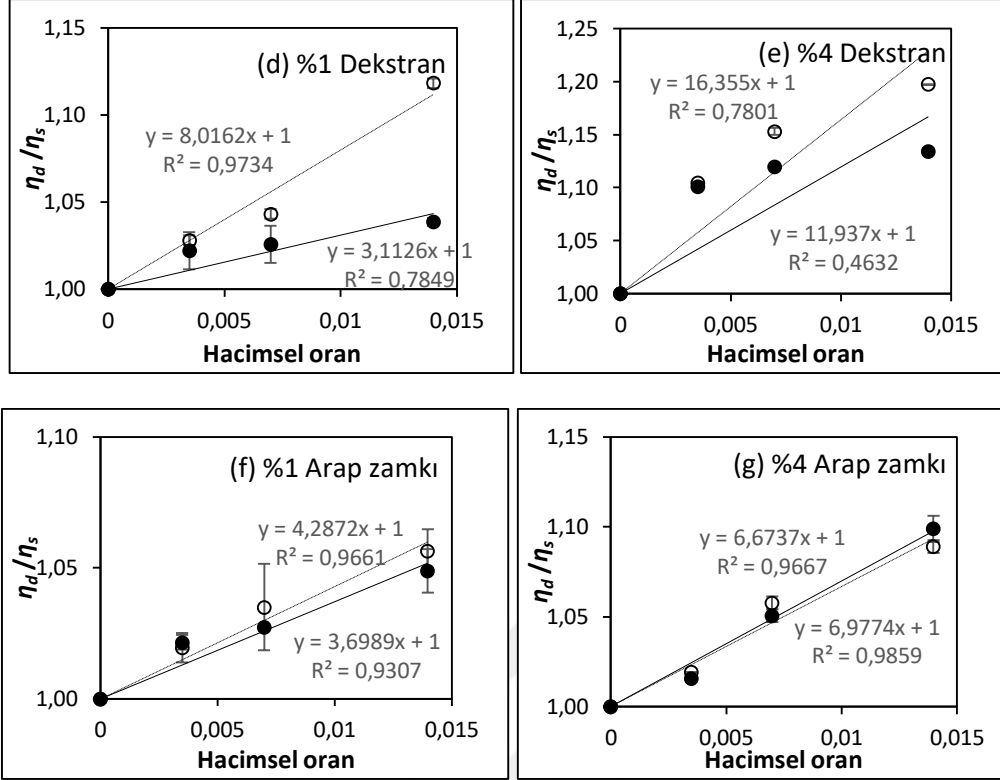
PAS proteini parçacıklarındaki ısıtılma sonrası boyut artışı, dispersiyonların dinamik viskozite değerlerinden Einstein'ın viskozite eşitliği kullanılarak hesaplanan hacimsel oranlarla karşılaştırılmıştır. Dinamik viskozite ölçümleri, çok düşük hacimsel oranlarda yapıldığından ( $\Phi \ll 0.1$ ), parçacıkların koagüle oluşturma ihtimali de çok düşüktür. Bu nedenle, ısıtılma sonrası oluşacak farklar yalnızca parçacıkların şişmesi olarak değerlendirilmiştir.

Einstein'ın viskozite eşitliğinde eğim değeri sabittir ve bu değer 2.5'tir. Saf su içeren dispersiyon kontrol örneği olarak belirlendiğinden, bu dispersiyonun ısıtılma öncesi viskoziteye karşın hacimsel oran grafiği elde edilirken eğim değeri 2.5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Diğer örneklerin hazırlanmasında da ağırlıkça aynı miktarda ıslak pelet kullanılarak, tüm örneklerin aynı miktarda parçacık içermesi sağlanmıştır.

Dispersiyonların dinamik viskozite değerleri ve hacimsel oranları Şekil 4.13'te gösterilmektedir. Bu grafiklerde görülen, ısıtılma öncesi ve sonrası eğim değerlerinin farkı, parçacıkların şişme oranlarının bir göstergesidir. Fark ne kadar büyükse, şişme oranının da o kadar büyük olması beklenmektedir.







**Şekil 4.13.** (a) Saf su, (b) %1 PAS, (c) %4 PAS, (d) %1 dekstran, (e) %4 dekstran, (f) %1 Arap zamkı ve (g) %4 Arap zamkı çözeltisi içinde dispers edilmiş PAS proteini parçacıklarının ısıtılmadan önceki (içi dolu noktalar ve düz çizgi) ve sonraki (içi boş noktalar ve kesikli çizgi) dinamik viskozite değerlerine karşın hacimsel oran grafikleri.

Saf su (Şekil 4.13a) ve ham PAS proteini (Şekil 4.13b ve c) içeren dispersiyonların ısıtılma sonrası hacimsel oran değişimleri iki eğim çizgisi arasındaki farktan net bir şekilde görülmektedir. İki eğim çizgisi arasındaki uzaklık, %4 PAS içeren dispersiyonda daha az, saf su içeren dispersiyonda ise daha büyüktür. Sürekli fazda bulunan biyopolimer miktarının artışı, PAS proteini parçacıklarının ısı stabilitelerini arttırmıştır. Bu veriler, parçacık boyutu verileriyle uyum göstermektedir. PAS proteini parçacıklarının, makromoleküler kalabalıktan dolayı bir dış basınca maruz kalmış olması, parçacıkların şişmesini baskılamış olabilir.

Şekil 4.13d ve e'de dekstran bulunan örneklerde de ısıtılma sonrası parçacıkların hacimsel oranı artmıştır. Dekstranın sürekli fazdaki konsantrasyonunun artması, parçacıkların şişmesini baskılamış, parçacıkları stabil hale getirmiştir. Bu durumun da yine makromoleküler kalabalık etkisinden

olduğu düşünülmektedir. Dekstran bulunan örneklerde, ısıtılma öncesi 2.5 olması beklenen Einstein'ın viskozite eşitliğindeki eğim değerinden sapmalar görülmüştür. Bu durum, PAS proteini parçacıklarıyla dekstranın ısıtılma öncesinde bir etkileşimi olduğu düşüncesini desteklemektedir. Özellikle %4 dekstranın bulunduğu dispersiyonda, ısıtma işlemi öncesindeki eğim oldukça yüksek bir değere çıkarak, hacimsel oranın ısıtılma öncesinde de arttığını göstermektedir. Dekstran molekülünün boyutu, PAS proteini parçacıkları üzerindeki gözeneklerden daha küçük olduğundan, parçacıkların içine girmesinden dolayı böyle bir veri elde edilmiş olabilir. Ancak, bu verilerin dağılımı ( $R^2$  değerinin düşük çıkması), yalnızca eğime bakılarak yorum yapmayı zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, ısıtılma öncesi ve sonrası karşılaştırmasını yapmak daha doğru bir yaklaşım olacaktır. Dekstran içeren örneklerde de, ısıtma işlemi sonucunda parçacıklar tıpkı ham PAS proteini içeren örneklerdeki gibi şişme göstermişlerdir.

Şekil 4.13f ve g'de Arap zankının bulunduğu örneklerin hacimsel oranları gösterilmektedir. Yüzde 1 Arap zankının bulunduğu örnekte, ısıtılma sonrası çok az miktarda bir hacimsel oran artışı gözlemlenmiştir, ancak %4 Arap zankının bulunduğu örnekte parçacıkların şişmesi tamamen engellenmiştir. Sürekli fazdaki biyopolimer konsantrasyonları düşünüldüğünde, Arap zankı da tıpkı PAS proteinleri ve dekstran gibi etki göstermiştir. Ancak Arap zankı, PAS proteini ve dekstrandan farklı olarak, parçacıkların ısı stabilitelelerini etkili bir şekilde arttırmıştır.

Parçacıkların ısıtılma sonrası şişme özelliği göstermesi, dispersiyon içinde genele yaygın bir etkidir (bulk effect). Yani tek bir parçacığın göstermiş olduğu davranış değil, dispersiyon içindeki tüm parçacıkların bir bütün halinde gösterdiği davranış olarak yorumlanmaktadır. Bu nedenle, kapiler viskometre denemelerinde, oldukça seyreltilmiş dispersiyonlarda bulunan parçacıkların genelini kapsayan özellikler hakkında bilgi edinilebilmek mümkündür. Parçacıkların şişme oranları (ŞO) da genele yaygın bir özellik olarak ele alınmalıdır. Dolayısıyla, kapiler viskometre denemelerinden elde edilen hacimsel oranların, ŞO hesaplamasında kullanılması uygun olmaktadır. Hesaplanan ŞO değerleri Tablo 4.5'te verilmiştir.

**Tablo 4.5.** PAS proteini parçacıklarının farklı sürekli fazlar içinde 90°C’de 30 dakika boyunca ısıtılma sonrasındaki şişme oranları.

Sürekli faz	ŞO
Saf su	4.9
%1 PAS	2.7
%4 PAS	0.6
%1 dekstran	1.6
%4 dekstran	0.4
%1 Arap zamkı	0.2
%4 Arap zamkı	0

ŞO hesaplamalarına göre, en yüksek değer saf su bulunan dispersiyonda, en düşük değer de %4 Arap zamkı bulunan dispersiyondadır. Saf su bulunan kontrol örneğinde parçacıkların yüksek bir ŞO değerine sahip olması, dispersiyonun pH değeri ve sürekli fazda ozmotik basıncı dengeleyecek herhangi bir biyopolimerin eksikliğinden kaynaklanıyor olabilir. Sadece %1 biyopolimer içeren dispersiyonlar karşılaştırıldığında, ham PAS proteini içeren örnek en yüksek, Arap zamkı içeren örnek ise en düşük ŞO değerine sahiptir. Bu eğilim %4 biyopolimer içeren dispersiyonlarda da aynıdır. Ham PAS proteininin konsantrasyonu %1’den %4’e çıktığında, parçacıkların ŞO değeri 4.5 kat, dekstranın konsantrasyonu %1’den %4’e çıktığında ise parçacıkların ŞO değeri 4 kat azalmıştır. Farklı biyopolimerlerin konsantrasyonlarındaki artışla, parçacıkların ŞO değerlerindeki azalma paralellik göstermiştir. Bu durum, makromoleküler kalabalığın PAS proteini parçacıklarının şişme özelliklerini değiştirmede önemli bir etkisinin olduğunu göstermektedir.

Arap zamkının bulunduğu dispersiyonlarda ise ŞO değerleri diğerlerine göre düşüktür ve %4 Arap zamkının bulunduğu dispersiyonda parçacıkların şişmesi tamamen durdurulabilmiştir. Parçacıkların şişmesi genele yaygın bir özellik olarak ele alındığından, Arap zamkının parçacıkların yüzeyini kaplamış olması beklenmektedir. Arap zamkı parçacıkların yüzeyine elektrostatik

etkileşimlerle bağlanmış ve böylece sterik bir bariyer oluşturmuş olabilir (Klein et al., 2010; Weinbreck et al., 2003). Dispersiyon içinde hem PAS proteini parçacıkları hem de Arap zamkının net yükleri negatiftir. Ancak buna rağmen, parçacıkların üzerindeki lokal pozitif yüklü yerlere Arap zamkının bağlanması olasıdır (Klein et al., 2010). Daha önceki çalışmalarda, PAS proteinleri ile Arap zamkının, net yükleri aynı işaretli olsa bile, lokal olarak farklı işarette yüke sahip bölgelerden birbirlerine bağlanmalarının mümkün olduğu bir mekanizmadan bahsedilmiştir (Klein et al., 2010; Weinbreck et al., 2003). PAS proteinleri, içeriğinde farklı proteinleri barındıran kompleks bir yapıdadır. Dolayısıyla, bu farklı proteinler aracılığıyla, elektriksel çekme kuvveti oluşturabilecek zıt yükleri aynı anda barındırması da beklenen bir özelliktir. Arap zankı da, protein parçacıkları üzerinde bulunan zıt yüklü bölgelere iyonik kuvvetlerle tutunabilir ve parçacıkların etrafını sarabilir. Bu sayede parçacıkların etrafında oluşan sterik bariyer de ısıtılma sonrası parçacıkların şişmesini engellenmiş olabilir.

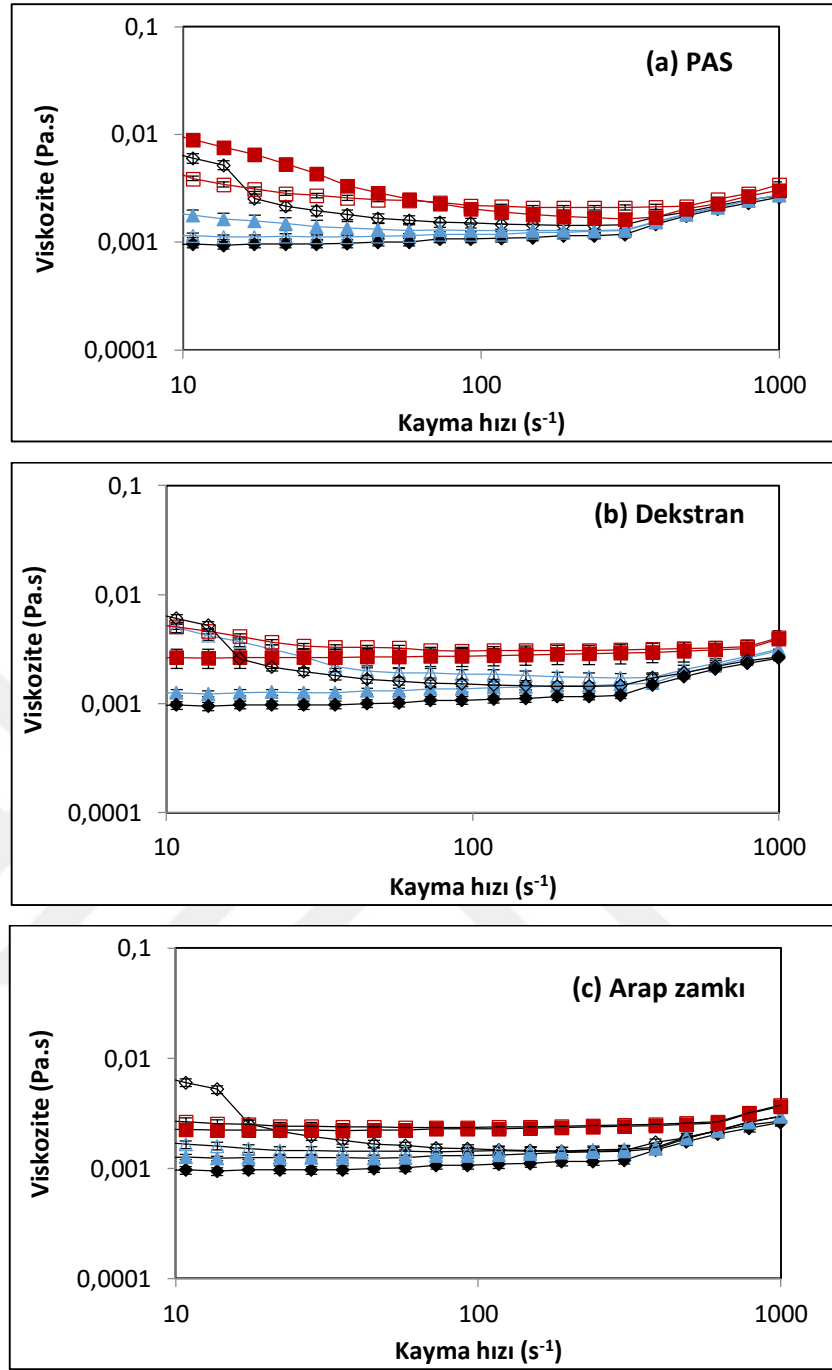
Arap zamkının, PAS proteini parçacıklarının yüzeyine tutunup tutunmadığını, yani bir çeşit kaplama yapıp yapmadığını anlayabilmek için parçacıkların net elektriksel yükleri iki farklı durum karşılaştırılarak kontrol edilmiştir. Birinci durum, parçacıkların Arap zankı çözeltisi içinde dispers edilmiş halidir. Bu dispersiyon kontrol olarak düşünülebilir ve içindeki parçacıkların zeta potansiyel değeri -40 mV olarak ölçülmüştür. İkinci durum ise, bu dispersiyondan santrifüjle ayrılan parçacıklar saf su içinde tekrar dispers edilmiştir, böylece ortamda bulunan serbest Arap zankı molekülleri uzaklaştırılmıştır. İkinci durumda belirlenen zeta potansiyel değeri -15 mV bulunmuştur. Saf su içinde bulunan PAS proteini parçacıklarının zeta potansiyel değeri ise -32 mV'tur. Parçacıkların ikinci durumda daha düşük zeta potansiyelinin olması, Arap zamkının yüzeylerinde kalarak bir kaplama oluşturduğu hipotezini desteklemektedir. Arap zamkının yalnızca %2'lik bir kısmı protein yapıdadır (Yadav et al., 2007). Bu kadar düşük orandaki bir polimerin, tüm parçacıklara iyonik kuvvetlerle bağlanarak yüzeyi kaplaması olası görünmemektedir. Bu nedenle, Arap zamkının yapısındaki polisakkarit kısmın karboksil grupları ile PAS proteinlerinin zıt yüklü bölgelerine tutunduğu düşünülmektedir (de Kruif et al., 2004).

PAS proteini parçacıklarının ısı stabilitesini arttırmada en büyük etki Arap zamkının varlığında gözlemlenmiştir. Arap zamkının, PAS proteini parçacıklarını sterik olarak stabilize ettiği düşünülmektedir. Ayrıca, parçacıkların ısı stabilitesini arttırmada moleküler kalabalığın da etkili olduğu tespit edilmiştir. Moleküler kalabalığı oluşturan unsurların boyutları, PAS proteini parçacıklarının içindeki protein ağ yapısını etkileyerek parçacık boyut dağılımını değiştirmede etkili bulunmuştur.

#### 4.3.3. Dispersiyonların reolojik özellikleri

PAS proteini parçacıklarının ısı stabiliteleri hakkında araştırma yapılırken, şimdiye kadar yapılan analizlerde dispersiyonların daima düşük hacimsel oranda olmasına dikkat edilmiştir. Böylece parçacıkların koagüle oluşturma riskleri en aza indirilmiştir. Ancak parçacıkların ısıtılması sonucu değişen özellikleri genele yaygın olduğu için dispersiyonun davranışındaki değişimler de önemlidir. Özellikle parçacıkların yüksek hacimsel oranlarda bulunduğu dispersiyonlarda, ısıtılma sonrası davranış değişiklikleri daha rahat gözlemlenebilmektedir. Bu nedenle, hacimsel oranı  $\Phi \sim 0.4$  olan dispersiyonların ısıtılma öncesi ve sonrası kayma viskoziteleri incelenmiştir.

PAS proteini parçacıklarının etkilerinin incelenmesinden önce, ortamda sürekli fazda bulunan polimerlerin 90°C'de 30 dakika boyunca ısıtılmaya verdikleri tepkiler bilinmelidir. Şekil 4.14'te saf suyun ve %1 ve %4 konsantrasyonlarında ham PAS proteini, dekstran veya Arap zamkı içeren çözeltilerin ısıtılma öncesi ve sonrasındaki kayma viskoziteleri gösterilmiştir.

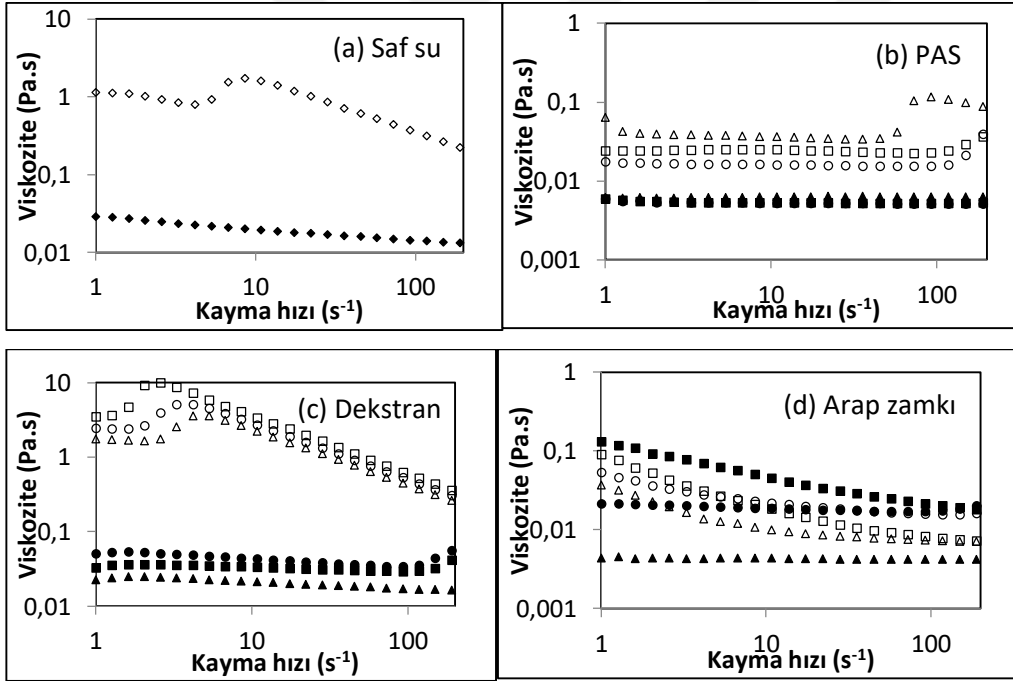


**Şekil 4.14.** (a) PAS proteini, (b) dekstran ve (c) Arap zamkı çözeltilerinin (▲, △ mavi) %1 ve (■, □ kırmızı) %4 konsantrasyonlarındaki 90°C'de 30 dakika boyunca ısıtılma işlemi öncesi (içi dolu noktalar) ve sonrası (içi boş noktalar) kayma viskoziteleri. (◆, siyah) Saf suyun ısıtılma öncesi ve sonrası viskozitesini göstermektedir.

Grafiklerde 1-10 s<sup>-1</sup> arasındaki kayma hızı ölçümlerinin tork değerleri güvenilir değerlerin altında olduğundan, 10 s<sup>-1</sup>'den büyük değerler gösterilmiştir. Şekil 4.14a'da PAS proteini, b'de dekstran ve c'de ise Arap zamkı çözeltilerinin ısıtılmadan önceki viskoziteleri saf suyunkiyile yakın değerlerdedir. Isıtılma

sonrasında da değerler 0.001 ve 0.01 Pa.s arasında yer almaktadır. Yüzde 4'lük PAS çözeltisi ısıtılma öncesinde küçük bir miktar artış göstermiştir, ancak ısıtılma sonrasında bu viskozitenin düşmüş olması, dispersiyonlardaki viskoziteye katkısının da az olacağını göstermektedir. Dekstran (Şekil 4.14b) ve Arap zımkı (Şekil 4.14c) çözeltilerinin viskoziteleri ise ısıtılma öncesi ve sonrası neredeyse aynı kalmıştır. Bu durumda, bu biyopolimerlerin dispersiyonlardaki viskoziteye katkısının çok az olacağını ya da hiç olmayacağını göstermektedir. Dolayısıyla, dispersiyonlarda ısıtılma sonrası viskozite değişimlerinin temel nedeni PAS proteini parçacıklarının varlığı olacaktır.

Şekil 4.15'te hacimsel oranları  $\Phi \sim 0.4$  olan farklı ortamlardaki PAS proteini parçacıklarının ısıtılma öncesi ve sonrası viskoziteye etkisi görülmektedir.



**Şekil 4.15.** (a) Saf su, (b) PAS, (c) dekstran ve (d) Arap zımkı çözeltileri içinde dispers edilmiş PAS proteini parçacıklarının ( $\Phi \sim 0.4$ ) ısıtılmadan önceki (içi dolu noktalar) ve sonraki (içi boş noktalar) kayma viskozitesi değerleri. Her bir grafikte ( $\blacktriangle$ ) %1, ( $\bullet$ ) %2.5 ve ( $\blacksquare$ ) %4 biyopolimer konsantrasyonunu göstermektedir. Verilerdeki standart sapma %10'un altındadır.

Grafiklerde saf su (Şekil 4.15a), PAS proteini (Şekil 4.15b) ve dekstran (Şekil 4.15c) bulunan dispersiyonların ısıtılma sonrasında viskozitelerinin arttığı görülmektedir. Dispersiyonlardaki hacimsel oran yüksek olduğu için, bu artış

hem koagüle oluşumunun hem de parçacıkların şişmesinin bir sonucu olabilir. Bu örneklerin aksine, Arap zankı bulunan örneklerde (Şekil 4.15d) ısıtılma sonrası bir viskozite artışı görülmemiştir. Arap zankı bulunanlar hariç, diğer örneklerde ısıtılma sonrası viskozite artışının yanı sıra kayma kalınlaşması da görülmektedir. Kayma kalınlaşmasının nedeni çoğunlukla parçacıkların kümelenmesi, koagüle olması veya yüzeyleri aracılığıyla fiziksel etkileşimlerinin olmasıdır (Hoffman, 1998). Dolayısıyla, kayma kalınlaşmasının görülmeye başladığı kayma hızı, parçacıkların hızlı bir şekilde koagüle olmaya başladıkları zamanı ifade etmektedir. Örneğin, saf su içeren dispersiyonda kayma kalınlaşması kayma hızı  $4 \text{ s}^{-1}$ 'de başlamıştır (Şekil 4.15a). Şekil 4.15b'deki dispersiyonlardan, %1 ham PAS proteini içeren örneğin kayma kalınlaşması  $57 \text{ s}^{-1}$ 'de, %2.5 ve %4'lük örneklerinki ise  $117 \text{ s}^{-1}$ 'de meydana gelmeye başlamıştır. Saf su bulunan örnekteki parçacıkların kısmen dağılması göz önüne alınırsa, sürekli fazdaki protein konsantrasyonu arttıkça kayma kalınlaşmasının başladığı nokta da büyük kayma hızlarına doğru ilerlemiştir. PAS proteini parçacıklarının farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerindeki kayma kalınlaşmasının incelendiği önceki bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Sağlam et al., 2013a). Sürekli fazda bulunan sodyum kazeinat konsantrasyonlarının artmasının, PAS proteini parçacığı dispersiyonlarında kayma kalınlaşmasını büyük kayma hızlarına doğru ilerlettiği rapor edilmiştir (Sağlam et al., 2013a).

Dekstran bulunan örneklerde (Şekil 4.15c), ham PAS proteini bulunan örneklerden farklı olarak kayma kalınlaşmasının başlangıcı, artan dekstran konsantrasyonlarında, daha düşük değerlere kaymıştır. Bu durum, dekstranın PAS proteini parçacıklarının içine girerek protein ağ yapısını henüz ısıtılma öncesinde değiştirmesinden kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca dekstran, tükenme etkileşimini tetikleyerek PAS proteini parçacıklarının koagüle olmasına da neden olabilmektedir. Koagüle olan PAS proteini parçacıkları ise daha büyük kolloidal parçacıklar gibi davranarak kayma kalınlaşmasının yönünü değiştirmiş olabilir. Önceki bir çalışmada, kolloidal parçacıkların boyutları arttığında, kayma kalınlaşmasının başlangıcının da düşük değerlere kaydığı belirtilmiştir (Maranzano and Wagner, 2001). Bu durum, dekstran içeren PAS proteini parçacığı içeren dispersiyonlar için de geçerlidir, ancak tüm biyopolimerler için



geçerli kabul edilemez; çünkü ham PAS proteinlerinin bulunduğu dispersiyonlar zıt bir eğilim göstermişlerdir.

Arap zamkı bulunan dispersiyonlarda (Şekil 4.15d) ise ısıtılma sonrası herhangi bir kayma kalınlaşması gözlemlenmemiştir. Arap zamkı, PAS proteini parçacıklarının etrafında bir kaplama oluşturmuş ve sterik stabilizasyonla parçacıkların koagüle olmasını engellemiştir. Parçacıkların ısıtılma sonrası şişmesinin engellenmesinin de aynı mekanizmayla olduğu düşünülmektedir.

Dispersiyonların kayma viskoziteleri, dinamik viskozite değerleriyle benzerlik göstermiştir. Dispersiyonların ölçülen bu viskozite değerleri, biyopolimer çeşidi ve konsantrasyonunun önemini ortaya koymuştur. Ham PAS proteini ve dekstranın sürekli fazda bulunduğu dispersiyonlarda, parçacıkların ısı stabilitesi kısıtlı kalmış, Arap zamkı bulunan dispersiyonlarda ise parçacıklar ısıya dayanıklı hale gelmiştir. Arap zamkının ısı stabilitesini sağlama mekanizması hala tam olarak belirlenememişse de, parçacıklara lokal elektriksel etkileşimlerle bağlandığını ve böylece sterik stabilizasyon sağladığını belirten veriler elde edilmiştir. Ayrıca, artan biyopolimer konsantrasyonunun, dispersiyonda makromoleküler kalabalık etkisi oluşturarak parçacıklara kısmi bir ısı stabilitesi sağladığı düşünülmektedir.

Kolloidal parçacıklarının ısı stabilitesi, gıda işleme ve depolama sırasında önem kazanmaktadır. Bu nedenle, ısı işlem sonrası parçacıkların birbirleriyle etkileşimleri, ortamda bulunan polimerlerin parçacıklarla elektriksel veya sterik etkileşimleri, tükenme etkileşimi, makromoleküler kalabalık gibi birçok etkileşimin araştırılmış olması sonraki bilimsel çalışmalar ve endüstriyel uygulamalar için kolaylık sağlayacaktır.

#### **4.4. PAS Proteini Parçacığı Dispersiyonlarının Köpüklenme Özellikleri**

Kolloidal parçacıkların yüzey aktif özellikleri hava/su ve yağ/su ara yüzeylerinde benzerlikler göstermektedir. PAS proteini parçacıklarının yüzey aktif özellikleri de yalnızca köpük sistemleri kullanılarak araştırılmıştır. PAS proteini parçacıklarının boyutları, sertlikleri ve elektriksel yükleri değiştirilerek köpüklenme özellikleri incelenmiş ve ham PAS proteini çözeltilerinin köpüklenme özellikleriyle karşılaştırılmıştır.

Köpük sistemlerini oluşturmak için PAS proteini parçacıklarının saf su içindeki dispersiyonları kullanılmıştır. Bunun nedeni, sürekli fazda parçacıklardan farklı bir maddenin gösterebileceği yüzey aktif özelliği ortadan kaldırmak, böylece yalnızca PAS proteini parçacıklarının özelliklerini inceleyebilmektir. Ancak, saf su kullanılarak hazırlanan dispersiyonların pH değerinin 7.4 olduğu ve bu değerde PAS proteini parçacıklarının kısmen dağılabileceği de göz önünde tutulmalıdır. Parçacıkların kısmen dağılması sonucu oluşabilecek agregatların ara yüzey oluşumunda ve stabilitesinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

#### 4.4.1. PAS proteini parçacıklarının boyutlarının köpüklenme özelliklerine etkisi

Parçacık boyutları Şekil 4.2b'de gösterildiği gibi 2  $\mu\text{m}$ , 4  $\mu\text{m}$  ve 5  $\mu\text{m}$  olacak şekilde ayarlanmıştır. Parçacıklar hazırlanırken, ölçülen boyutların mümkün olduğunca tekli dağılım göstermesi, span (pik genişliği) değerinin küçük olması ve düşük polidispersitede olmasına dikkat edilmiştir. Dispersiyonlar  $\Phi \sim 0.1$  olacak şekilde hazırlanmıştır.

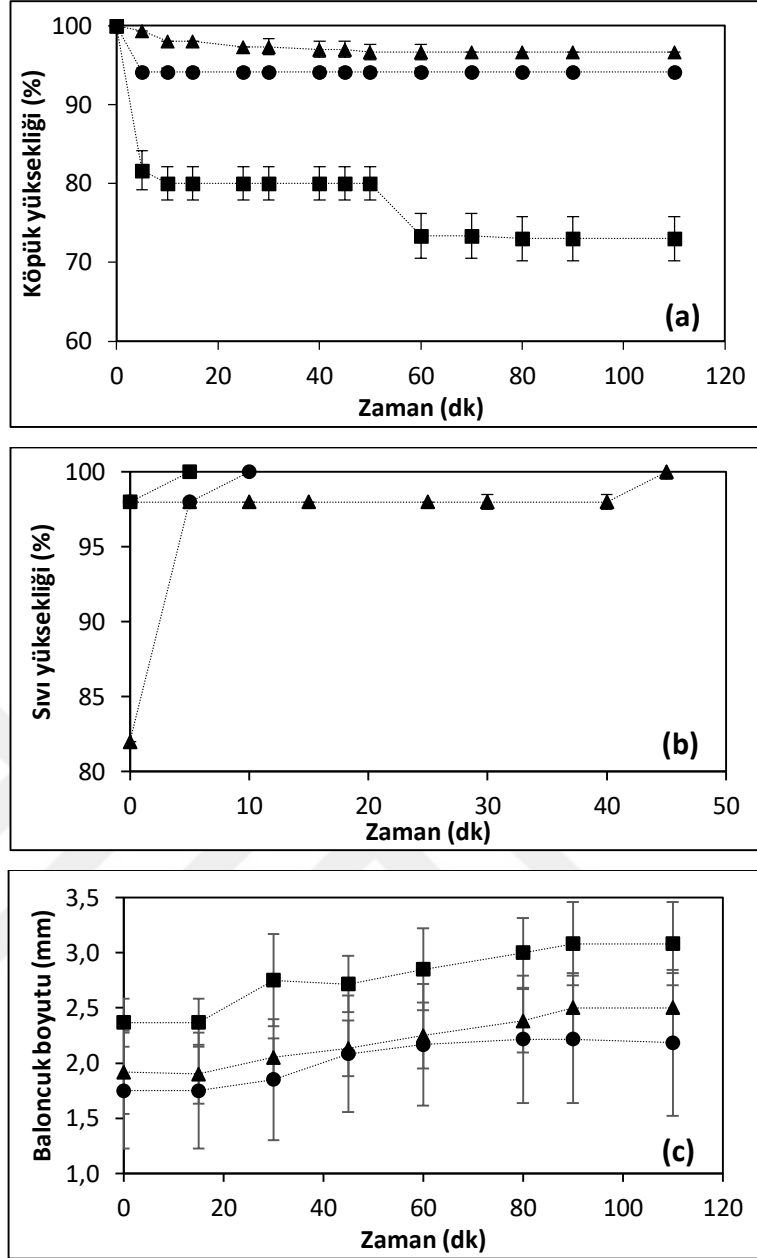
Köpüklenme yeteneğinin bir göstergesi olarak, azot gazının sabit akış hızında, köpük yüksekliği 20 cm olana kadar geçen süre tayin edilmiştir. Dispersiyonların köpük oluşturma yetenekleri saniye cinsinden Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

**Tablo 4.6.** Farklı boyutlarda PAS proteini parçacığı içeren dispersiyonların köpüklenme yetenekleri.

Dispersiyonun içerdiği ortalama PAS proteini parçacığı boyutu ( $\mu\text{m}$ )	Köpüklenme yeteneği (s)
2	21 <sup>A</sup> $\pm$ 1.4
4	19 <sup>A</sup> $\pm$ 0.7
5	20 <sup>A</sup> $\pm$ 0

Örneklerin köpüklenme yetenekleri 19-21 s arasında değişmiştir. Test edilen aralıktaki parçacık boyutunun köpüklenme yeteneğine bir etkisi görülmemiştir. Ancak parçacıkların bulunduğu pH değerinde (7.4) kısmen dağılmasıyla oluşan ve parçacıklarla aynı ortamda bulunan PAS agregatları, oligomerler ve ham protein kalıntılarının köpüklenme yeteneğini arttırdığı düşünülmektedir (Damodaran, 2005; Lazidis et al., 2016; Murray and Ettalaie, 2004). Boyutları PAS proteini parçacıklara göre küçük olan bu kalıntılar köpük oluşumu sırasında ara yüzeye daha hızlı tutunabilmektedir. Bu durumun, köpük oluşum hızını arttırdığı düşünülmektedir.

Dispersiyonların köpük yükseklikleri, sıvı yükseklikleri ve baloncuk boyutlarının zamanla değişimi Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Ortalama boyutları (▲) 2 µm, (■) 4 µm ve (●) 5 µm olan PAS proteini parçacığı dispersiyonlarının oluşturduğu (a) köpük yüksekliği, (b) sıvı yüksekliği ve (c) baloncuk boyutu grafikleri.

Farklı boyutlarda PAS proteini parçacığı içeren dispersiyonların yaklaşık 2 saat süresince gözlemlenen köpük yükseklikleri %97 ile %70 arasında değişmiştir (Şekil 4.16a). Parçacık boyutu 2 µm ve 5 µm olan dispersiyonlar, 2 saat süresince yüksek stabilite göstermiş, köpük yüksekliği %90'ın üzerinde kalmıştır. Bu kadar yüksek bir köpük stabilitesinin nedeni, havayla temas halinde olan köpüğün kuruması (drying-out) da olabilir. Ancak parçacık boyutu 4 µm olan dispersiyonun köpük yüksekliği azalmaya devam ettiği için, kuruma etkisinin

minimal olduğu düşünülmektedir. Bu örnekteki köpük yüksekliği, diğerlerine göre daha hızlı azalmıştır. Bunun nedeni, 4 µm'de üretilen parçacıklardaki ikili boyut dağılımı olabilir (İnce Coşkun and Özdestan Ocak, 2021b). Parçacıklar üretilirken, tekli dağılım göstermelerine özellikle dikkat edildiği halde, agregat oluşumu veya parçacıkların koagülasyonu gibi nedenlerle ikili dağılıma zaman içinde rastlanabilmektedir. Boyut dağılımlarının çoklu olması parçacıklar arasında boşluklar meydana getirebilmekte ve ozmotik basıncı bölgesel olarak değiştirebilmektedir. Bu durum da, ara yüzeyde bulunan parçacıklar arasında tükenme etkileşimini veya kümelenmeyi arttırmaktadır. Parçacıkların çoklu dağılım etkisinden kaynaklanan bu durumun, köpüklerdeki film kalınlığını azalttığı, film yüzeyinin homojen kaplanmasını engellediği; dolayısıyla köpük stabilitesini de olumsuz etkilediği önceki bir çalışmada da rapor edilmiştir (Bindal et al., 2002).

Şekil 4.16b'de gösterilen sıvı yüksekliğinin zamanla değişimi, dispersiyonların drenaj hızları hakkında bilgi vermektedir. Buna göre, örneklerin sıvı yükseklikleri %100 değerine 50 dakika içinde gelmiştir, yani dispersiyonlar için drenajın 1 saatten önce büyük oranda tamamlandığı söylenebilir. Drenaj sırasında, ara yüzeylerdeki sıvı kaybı nedeniyle parçacıkların hacimsel oranları artmakta ve bu durum ara yüzeyin sertleşmesine neden olmaktadır (Tzoumaki et al., 2015). Bu sert yapı, drenaj hızını ve baloncukların birleşme hızını azaltarak, köpük ömrünü uzatabilmektedir. Şekil 4.16c'de gösterilen baloncuk boyutları da yaklaşık 1 saat süresince ~1.75 mm'den ~3 mm'ye kadar artmış, daha sonra sabit kalmıştır. Sıvı yüksekliği ve baloncuk boyutlarının 1 saatten sonra sabit kalması, PAS proteini parçacığı dispersiyonlarından elde edilen köpüklerin sertleşmesinin, böylece katı-benzeri bir yapı oluşturarak köpüğü stabilize etmesinin bir göstergesi olabilir.

PAS proteini parçacıklarının farklı boyutları, köpüklerin stabilitelelerinde önemli bir değişim göstermemiştir. Ancak, çoklu dağılımın köpük stabilitesini etkilediğini söylemek mümkündür. Önceki bir çalışmada, boyutları 500 nm olan kazein misellerinin, boyutları 200 nm olanlara kıyasla köpük stabilitesini arttırdığı tespit edilmiştir (Velev et al., 1998). Beta-laktoglobulin agregatlarıyla yapılan bir başka çalışmada da, tekli dağılım gösteren 2.5 nm ve 1.1 nm

boyutlarındaki agregatlardan büyük olanların köpük stabilitesini arttırdığı söylenmiştir (Dombrowski et al., 2016). Artan parçacık boyutunun koalesensi (köpük birleşmesi) daha etkili bir şekilde engellediği rapor edilmiştir. Bununla birlikte, parçacıkların zeta potansiyel değerlerinin ve hidrofobik karakterinin de önemli olduğu vurgulanmıştır (Moro et al., 2011; Rullier et al., 2008). Proteinlerin hidrofobik özellikleri, denatürasyon sonucu üçüncül yapılarının değişmesiyle yakından ilgilidir (Koop et al., 2021). Beta-laktoglobulinin denatüre olmasıyla yüzey hidrofobikliğinin arttığı, hidrofobik karakterin artmasıyla da köpük stabilitesinin arttığı bilinmektedir (Moro et al., 2011).

#### 4.4.2. PAS proteini parçacıklarının sertliğinin köpüklenme özelliklerine etkisi

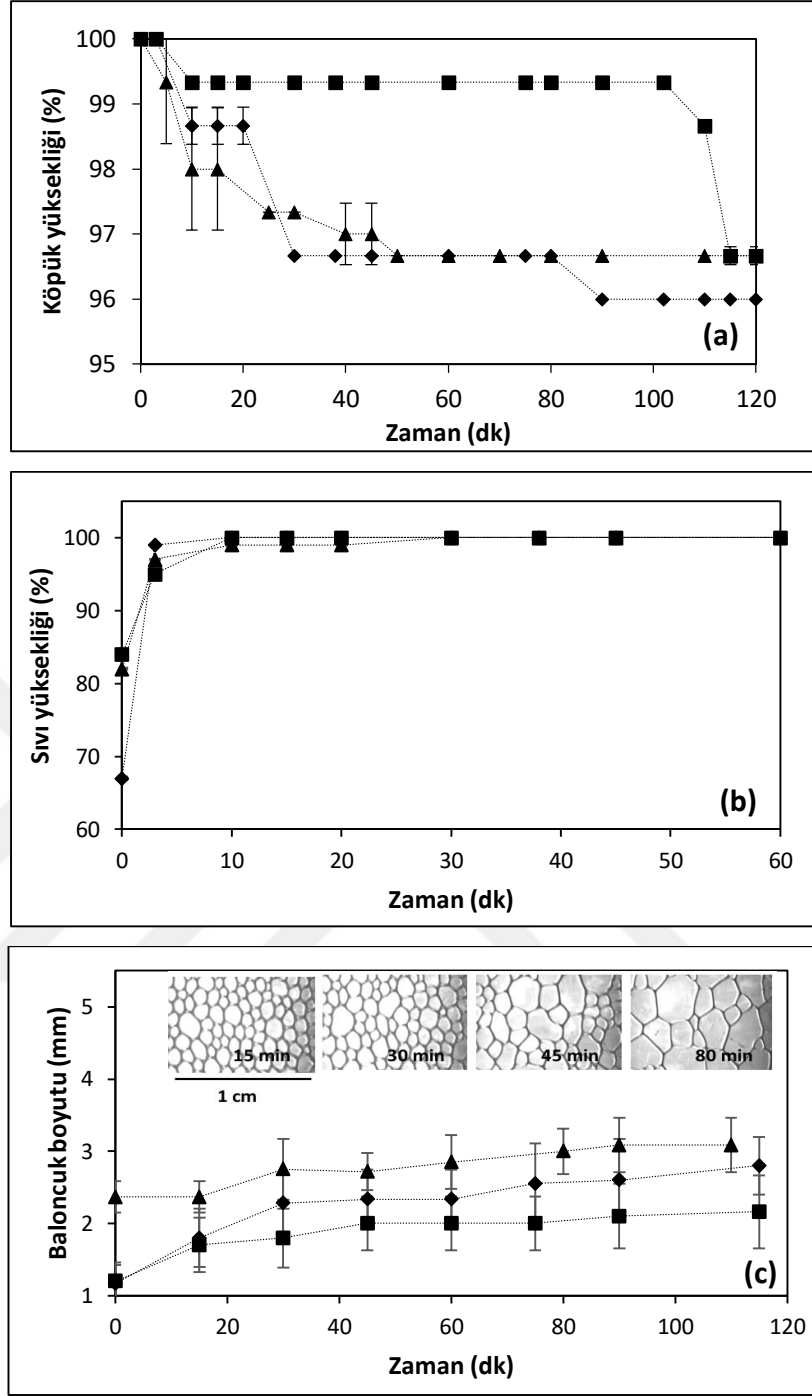
Kolloidal parçacıkların boyutlarının yanı sıra, sertliklerinin de köpüklenme özelliklerini etkilediği bilinmektedir (Buchcic et al., 2017; Fameau and Salonen, 2014). Parçacıkların sertliği, esnekliğine etki eden bir faktördür ve mikro-yapılarıyla doğrudan ilişkilidir (4.1.5. *Parçacıklardaki protein konsantrasyonu*). Bu nedenle, PAS proteini parçacıklarının sertliğini değiştirmek amacıyla farklı protein konsantrasyonlarındaki çözeltilerden parçacıklar elde edilmiştir. Yüzde 20, %25 ve %30 PAS çözeltileriyle başlanarak hazırlanan protein parçacıklarında sırasıyla % 15.6, % 18.5 ve %23.4 konsantrasyonlarında protein tespit edilmiştir. Parçacık boyutları ~2 µm'de sabit tutulmuştur. Bu parçacıklardan hazırlana dispersiyonların köpüklenme yetenekleri Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.7.** Farklı sertliklerde PAS proteini parçacığı içeren dispersiyonların köpüklenme yetenekleri.

Dispersiyondaki PAS proteini parçacığının protein konsantrasyonu (%)	Köpüklenme yeteneği (s)
15.6	21 <sup>A</sup> ± 0.7
18.5	21 <sup>A</sup> ± 1.4
23.4	20 <sup>A</sup> ± 0.7

Sertlikleri, dolayısıyla esneklikleri farklı olan PAS proteini parçacıklarının içeren dispersiyonların köpüklenme yetenekleri arasında herhangi bir fark gözlemlenmemiştir. Ancak, parçacıkların sertliğinin azalmasının köpük oluşturma yeteneklerini arttırdığına dair çalışmalar mevcuttur (İnce Coşkun and Özdehan Ocak, 2021b; Style et al., 2015). Örneğin, pH 5.5'te hazırlanan ve mikro-yapıları pH 6.8'de hazırlananlara göre daha sert olduğu bilinen PAS proteini parçacıklarının da köpüklenme yeteneklerinin düşük olduğu önceki bir çalışmada rapor edilmiştir (İnce Coşkun and Özdehan Ocak, 2021b). Esnek koloidal parçacıkların adsorpsiyon enerjilerinin de yüksek olduğu bilinmektedir (Style et al., 2015). Bu durum, parçacıkların ara yüzeyde daha uzun süre kalmasını ve uzayabilen yapıları sayesinde daha elastik ara yüzeyler oluşturmalarını sağlamaktadır. Dolayısıyla, esneyebilen yumuşak (pH 6.8'de üretilen) PAS proteini parçacıkları köpüklenme yeteneğini ve köpük stabilitesini arttırmaktadır.

Yüzde 15.6, % 18.5 ve %23.4 protein içeren PAS proteini parçacıklarından elde edilen dispersiyonların oluşturduğu köpüklerin stabilite grafikleri Şekil 4.17'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.17.** Protein içerikleri (◆) %15.6, (▲) %18.5 ve (■) %23.4 olan PAS proteini parçacığı dispersiyonlarının oluşturduğu (a) köpük yüksekliği, (b) sıvı yüksekliği ve (c) baloncuk boyutu grafikleri.

Şekil 4.17a'daki köpük yüksekliği verileri, örneklerin 2 saat süresince en fazla %96 seviyesine düştüğünü göstermektedir. Köpük stabiliteleri oldukça yüksektir ve köpük yüksekliği değerleri 3 örnekte de birbirine çok yakındır. Sıvı yüksekliklerinin de 30 dakikadan sonra stabil kaldığı gözlemlenmektedir (Şekil 4.17b). Ancak, baloncuk boyutları yaklaşık 80. dakikaya kadar artmaya devam



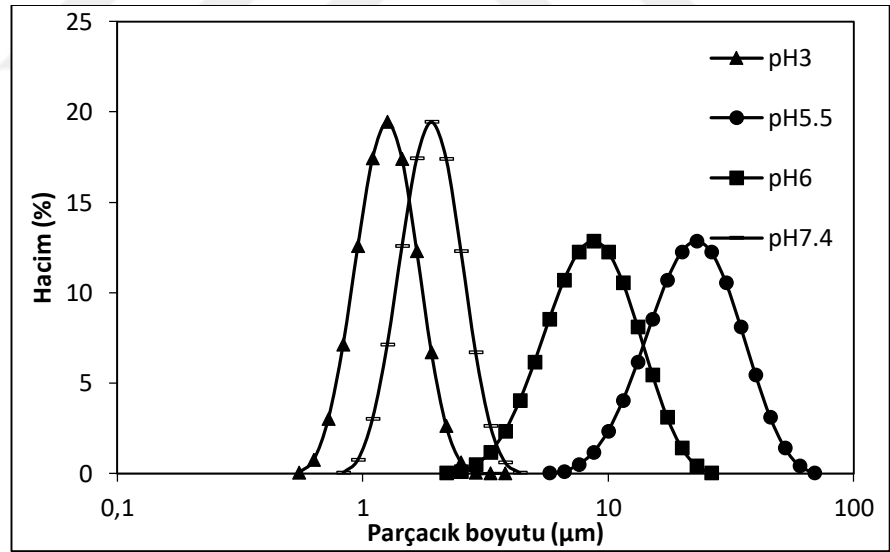
etmiştir (Şekil 4.17c). Şekil 4.17c'nin içindeki köpük fotoğrafları baloncuk birleşmesini daha net bir şekilde göstermektedir. Özellikle 45. ve 80. dakikalarda görülen tetrahedral baloncuk yapısı, drenajın bu sürede de devam etmekte olduğunu göstermektedir. Köpüğün ömrü boyunca, ara yüzeylerdeki sıvı miktarı azaldıkça köpük filmi incelmekte, böylece baloncuklar yuvarlak yapılarını kaybederek polihedral, köşeli yapılar oluşturmaktadır (Huppertz, 2010). Bu durum, gözlemlenebilen sıvı yüksekliğinden bağımsız, drenajın devam etmekte olduğunu bir göstergesidir.

pH 6.8'de ve farklı sertliklerde üretilen PAS proteini parçacıklarının köpüklenme özellikleri arasında bir fark gözlemlenmemiştir. Ancak koloidal parçacıkların sertlik ve esnekliklerinin yüzey aktif özellikleri üzerinde önemli etkisi olduğu bilinmektedir (Rullier et al., 2010). Esnek parçacıkların ara yüzeyi kaplaması daha etkin olup, köpük sistemlerini daha iyi stabilize etmektedir. Örneğin, çapraz bağ miktarı artırılarak elde edilen poli(N-izopropilakrilamid) (pNIPAM) parçacıklarının yağ/su ara yüzeyinde daha az elongasyon göstermesinden dolayı emülsiyon stabilitesini azalttığı tespit edilmiştir (Destribats et al., 2011). Yüksek oranda çapraz bağ içeren pNIPAM parçacıklarının, emülsiyon sistemlerine benzer şekilde, köpük stabilitesini de olumsuz etkilediği belirtilmiştir (Picard et al., 2017). Benzer şekilde yoğun (pH 5.5'te üretilen) PAS proteini parçacıklarının yumuşak olanlara göre daha düşük köpüklenme özellikleri gösterdiği, köpük stabilitesinin de düşük olduğu tespit edilmiştir (İnce Coşkun and Özdestan Ocak, 2021b). Parçacıkların esnekliği arttıkça ara yüzeyde yayılarak yüzeyi kaplamaları daha kolay olmaktadır; tam tersine esneklik azalırsa kırılabilirlik artacağından, ara yüzeyin daha hızlı destabilize olmasına neden olmaktadır.

#### 4.4.3. PAS proteini parçacıklarının elektriksel yüklerinin köpüklenme özelliklerine etkisi

PAS proteini parçacıklarının net yükleri, ağ yapısındaki proteinler arası etkileşimi değiştirebildiği gibi parçacıklar arası etkileşimi de değiştirmektedir. Parçacıklar, itme kuvvetlerinin artması durumunda birbirlerinden uzak, azalması durumunda da birbirlerine yakın durmaktadır (Mehalebi et al., 2008). Bu dinamik durum ara yüzeyde gerçekleştiğinde köpüğü oluşturan filmin kalınlığını ya da film yüzeyinin kaplanmasını değiştireceğinden köpük stabilitesini de değiştirmektedir.

Dispersiyonların farklı pH değerlerinde olması parçacıkların elektriksel yüklerini, bu da esnek PAS proteini parçacıklarının boyutlarını doğrudan etkilemektedir (Sağlam et al., 2013b). Bu nedenle, köpüklenme özelliklerinden önce parçacıkların farklı pH değerindeki dispersiyonlardaki boyut dağılımları Şekil 4.18’de gösterilmiştir.



Şekil 4.18. PAS proteini parçacıklarının pH değeri (▲) pH 3, (●) pH 5.5, (■) pH 6 ve (-) pH 7.4 olan dispersiyonlardaki boyut dağılımları.

pH 5.5 ve pH 6’daki dispersiyonlarda bulunan PAS proteini parçacıklarının boyut dağılımları diğerlerine göre büyük değerlere kaymış ve dağılım grafiği genişlemiştir. Bu durum, parçacıkların koagüle olduklarını göstermektedir. Nötr pH değerinde parçacık boyutu  $\sim 2$   $\mu\text{m}$ ’dir. pH 3’teki dispersiyonda bulunan

parçacıkların boyutları ise  $\sim 1.5 \mu\text{m}$  olarak ölçülmüştür; bu durum pH 3'te parçacıkların bir miktar büzüştüğünü göstermektedir.

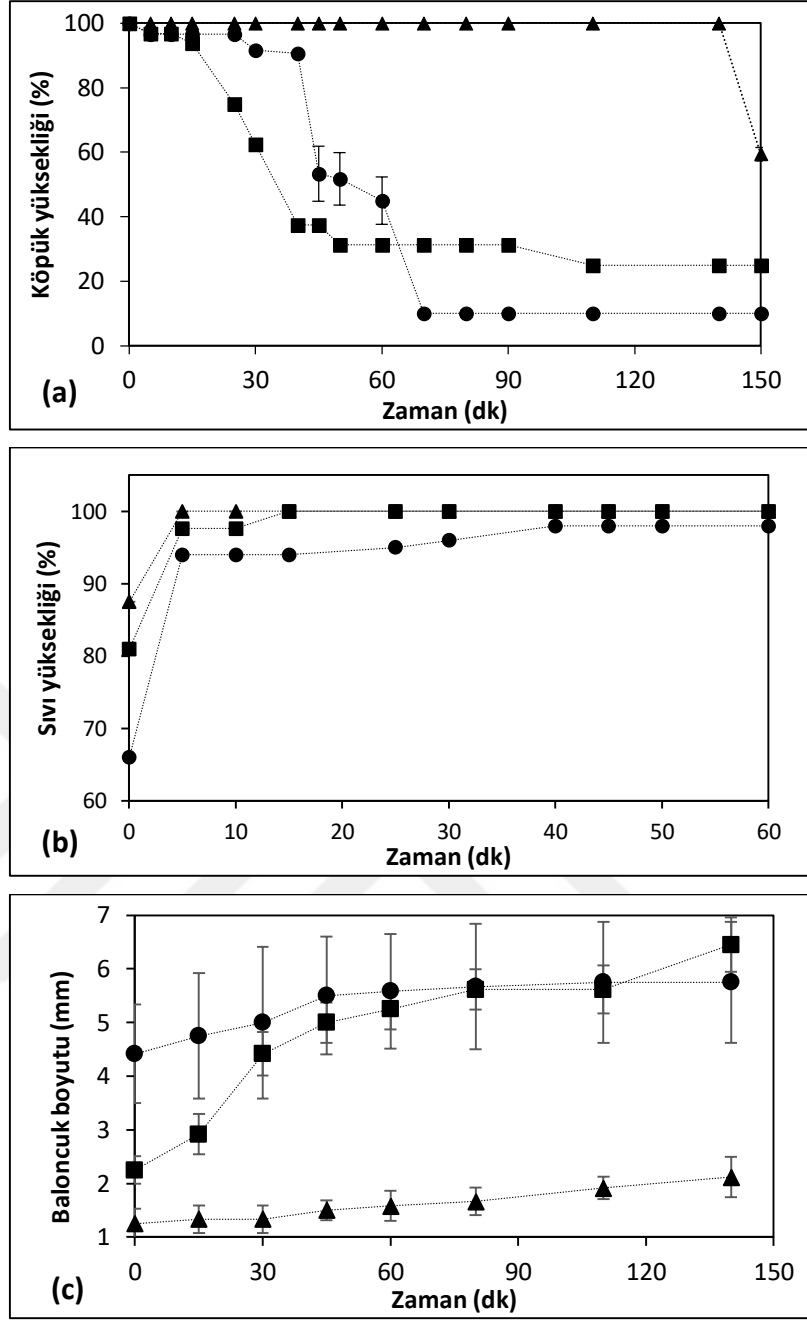
Tablo 4.8'de PAS proteini parçacıklarının farklı pH değerlerindeki dispersiyonlarının köpüklenme yetenekleri verilmiştir.

**Tablo 4.8.** PAS proteini parçacıklarının farklı pH değerlerindeki dispersiyonlarının köpüklenme yetenekleri.

Dispersiyonun pH değeri	Köpüklenme yeteneği (s)
3	$19^A \pm 0.7$
5.5	$21^A \pm 0.7$
6	$19^A \pm 0.7$

Köpüklerin 20 cm yüksekliğe ulaşması 19-21 s arasında sürmüştür ve hepsi birbirine yakın değerlerdedir. pH ayarlaması yapılan dispersiyonlar arasında en düşük köpüklenme yeteneği, proteinlerin izoelektrik noktası olan pH 5.5 değerinde tespit edilmiştir. Köpüklenme yeteneğinin bu noktada en düşük olmasının nedeni, parçacıkların koagülasyonunun ve parçacık içindeki ağ yapının sertliğinin çok artması olabilir.

Farklı elektriksel yüklerdeki PAS proteini parçacıklarının köpük stabiliteyi Şekil 4.19'da gösterilmiştir.

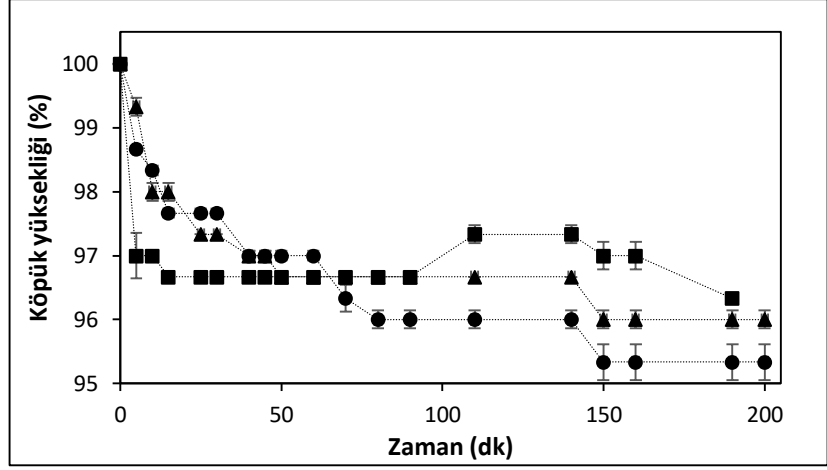


Şekil 4.19. (▲) pH 3, (●) pH 5.5 ve (■) pH 6 değerlerindeki PAS proteini parçacığı dispersiyonlarının (a) köpük yüksekliği, (b) sıvı yüksekliği ve (c) baloncuk boyutu grafikleri.

Şekil 4.19a'ya göre pH 3'teki dispersiyondan elde edilen köpük stabilitesi 2 saat boyunca oldukça yüksektir, ancak pH 5.5 ve pH 6'daki dispersiyonların oluşturduğu köpük yaklaşık 30. dakikadan itibaren azalmaya başlamış ve 1 saat içinde de başlangıçtaki köpük seviyesinin yarısına inmiştir. Örneklerdeki sıvı yüksekliği, 1 saat içinde gözlemlenebilen en yüksek seviyeye ulaşmıştır (Şekil 4.19b). Baloncuk boyutları ise pH 3'teki örneklerde küçük, pH 5.5 ve pH 6'daki

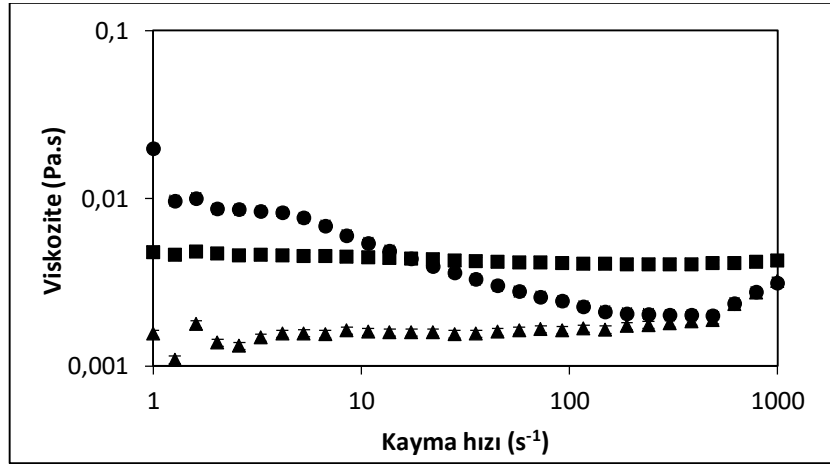
örneklerde ise daha yüksektir, sürekli artan eğilimdedir (Şekil 4.19c); örneklerin köpük stabiliteleri ile paralellik göstermiştir. pH 3'teki örnekte olduğu gibi, baloncuk boyutunun küçük olması, yüzey aktif maddenin etkinliğini göstermektedir. Yüzey aktif maddenin sulu fazda yeterli miktarda bulunması halinde, baloncuk yüzeyleri etkili ve tamamen kaplanacağı için; baloncuk boyutlarının da homojen ve küçük olması beklenmektedir (Huppertz, 2010). Ancak pH 5.5 ve pH 6'daki dispersiyonlarda bulunan parçacıklar koagüle olduklarından (Şekil 4.18) baloncuk yüzeyini tamamen kaplayamamıştır. Oluşan koagüle yapılar, köpük filminin içinde (sıvı fazda) kalabilmek için ağırdır ve filmin kırılmasına neden olmuşlardır. PAS proteini parçacıkları için izoelektrik noktasına yakın değerler köpüklenme özelliklerini olumsuz etkilemiştir, ancak izoelektrik noktasından uzaklaştıkça dispersiyonların köpüklenme özellikleri artmıştır.

Alkali değerlerdeki PAS proteini parçacığı dispersiyonları için yapılan denemelerden elde edilen köpük stabiliteleri oldukça yüksek bulunmuştur (Şekil 4.20). Köpük yükseklikleri yaklaşık 3 saat boyunca %95'in üzerinde kalmıştır. Alkali pH değerlerinde PAS proteini parçacıklarının yapılarında su tutarak şiştiği, dolayısıyla daha esnek bir hale geldikleri bilinmektedir. Parçacıkların esnekliklerinin artması, köpük stabilitesine katkı sağlamış olabilir. Çünkü esnek parçacıklar, ara yüzeyde mekanik bir bariyer oluşturmakta, drenaj hızını ve baloncukların birleşmesini azaltmakta, böylece de stabiliteyi arttırmaktadır. Ancak, alkali koşullarda parçacık dispersiyonlarının gösterdiği bu olağanüstü yüksek stabilitenin temel nedeninin, kısmen parçalanan parçacıklarla bütün halde kalan parçacıkların sinerjistik bir etkisi olduğu düşünülmektedir (İnce Coşkun and Özdestan Ocak, 2021b). Nanometre boyutundaki agregatların ve mikro-parçacıkların bir arada bulunduğu sistemlerde köpük stabilitesinin arttığı daha önce de rapor edilmiştir (Murray and Ettelaie, 2004; Lazidis et al., 2016). Elde edilen veriler, alkali koşullarda PAS proteini parçacıklarının dağılmasıyla oluşan kalıntıların köpüklenme yeteneğine önemli ölçüde katkı sağladığını, bütün olarak kalan ve kolloidal özellik gösteren parçacıkların da köpük stabilitesini arttırdığını göstermektedir.



Şekil 4.20. (▲) pH 8, (●) pH 9 ve (■) pH 10 değerindeki PAS proteini parçacığı dispersiyonlarının köpük stabiliteyi.

Özellikle viskozitenin yüksek olduğu dispersiyonlardan elde edilen köpük sistemlerinde drenaj hızının yavaş olması beklenmektedir. Dispersiyon viskozitesinin etkisini anlayabilmek için bir asidik (pH 3), bir izoelektrik noktasında (pH 5.5) ve bir tane de alkali (pH 9) değerindeki PAS proteini parçacığı dispersiyonunun kayma viskoziteleri incelenmiştir. Bu viskozite değerleri Şekil 4.21’de gösterilmektedir.



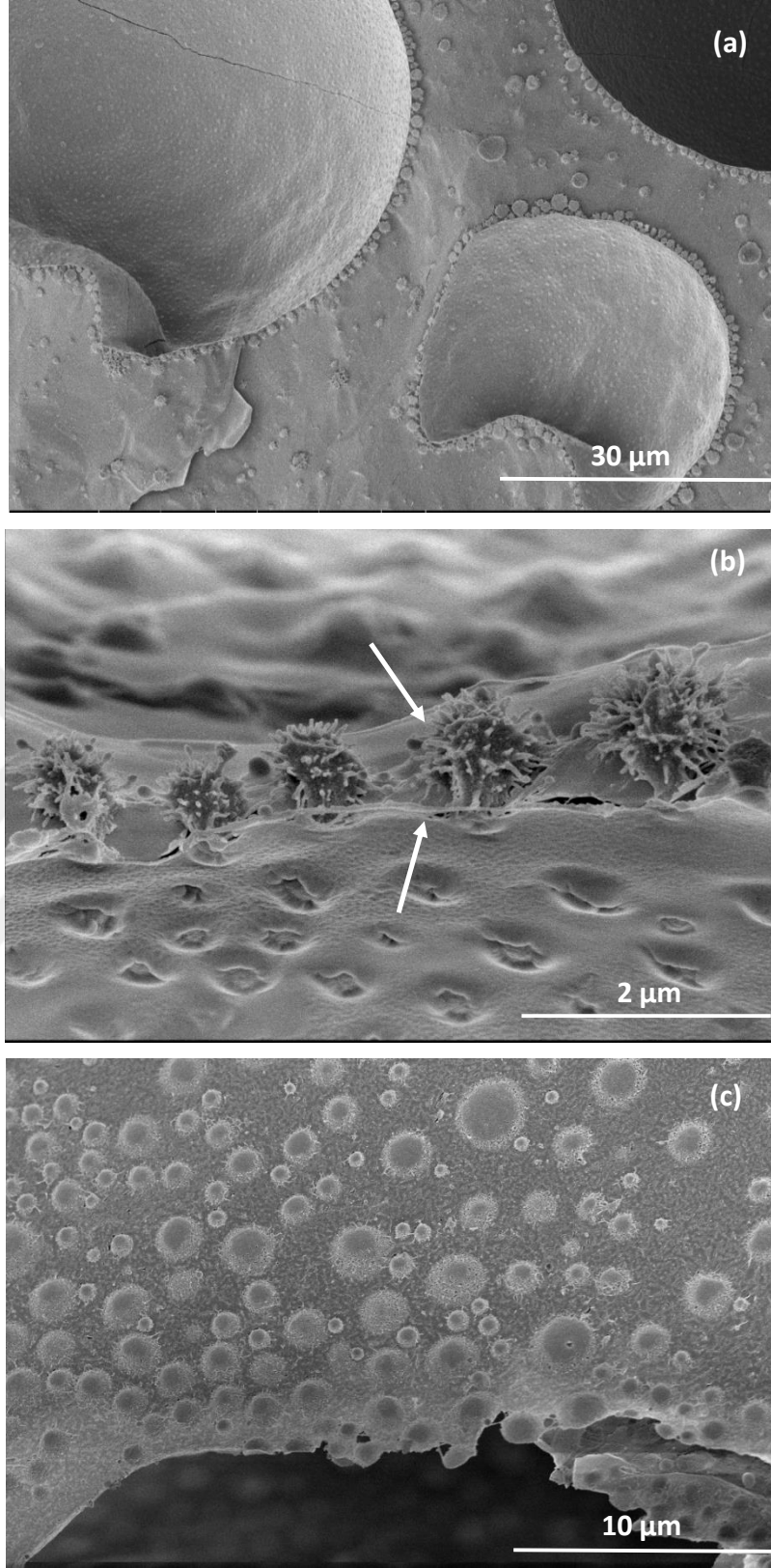
Şekil 4.21. (▲) pH 3, (●) pH 5.5 ve (■) pH 9 değerindeki PAS proteini parçacığı dispersiyonlarının köpük stabiliteyi.

Dispersiyonların viskozite değerleri 0.001 ve 0.01 Pa.s arasında değişmiştir. Kayma hızının  $10 \text{ s}^{-1}$ 'in üzerinde olduğu durumlarda pH 9'daki dispersiyonun viskozitesi diğerlerinininkinden yüksektir. pH 3 ve pH 5.5'teki dispersiyonların viskoziteleri ise birbirine çok yakındır. Ancak, köpük stabiliteyi göz

önüne alındığında pH 3 ve pH 9'daki dispersiyonların stabiliteyi yüksek, pH 5.5'teki dispersiyonun stabilitesi ise düşüktür (Şekil 4.19a). Bu durumda, PAS proteini parçacığı dispersiyonları için, viskozite stabiliteye etki eden temel faktörlerden biri olarak değerlendirilemez.

Hem asidik hem alkali dispersiyonlar göz önüne alındığında, parçacıkların elektriksel yüklerinin fazla olduğu pH değerlerinde, agregatlar ve parçacıkların bir arada bulunmasından dolayı, köpük stabilitesi yüksek bulunmuştur. Parçalanmış parçacıklardan oluşan agregatlar genellikle nanometre büyüklüğündedir ve oligomerik türlerin boyutları daha da küçüktür. Bu tür kalıntıların alkali pH değerlerinde daha fazla bulunmaktadır, çünkü parçacıkların dağılması alkali değerlerde daha fazladır (Şekil 4.4). Sulu fazdaki oligomerik türlerin pH değişimi gibi çevresel etmenlere tepkisi, mikron büyüklüğündeki parçacıklar veya nanometre büyüklüğündeki agregatlara kıyasla daha hızlı olmaktadır, bu nedenle de oligomerik türler ham proteinlere benzer davranışlar göstermektedir (Sullivan et al., 2009). Oligomer ve agregatlar arasındaki boyut farkından dolayı, oligomerlerin ara yüzeydeki adsorpsiyon hızının daha yüksek olacağı düşünülmektedir, çünkü küçük bileşenler düşük molekül ağırlıklı sürfaktanlar gibi davranarak ara yüzeye daha hızlı tutunabilmektedir (Davis and Foegeding, 2004). Bu durum PAS proteini parçacığı dispersiyonlarından elde edilen köpük sistemleri için düşünüldüğünde, parçacıklarının kısmen parçalanmasıyla oluşan küçük bileşenlerin köpüklenme yeteneğine, bütün haldeki parçacıkların da köpük stabilitesine katkı sağladığı hipotezi güçlenmektedir.

Parçacıkların köpük filmindeki konumlarını, şekillerini ve diğer özelliklerini incelemek için pH 3'teki dispersiyondan elde edilen köpük örneği taramalı elektron mikroskopuyla (SEM) incelenmiştir. Köpüklenme özelliklerinin yüksek olmasından ve parçacıkların bütün olarak kalabilmesinden dolayı pH 3'teki dispersiyon incelenmiştir. Köpük örneklerinin krayo-SEM görüntüleri Şekil 4.22'de verilmiştir.



**Şekil 4.22.** Köpük ara yüzeyinde bulunan PAS proteini parçacıklarının farklı büyütme oranlarındaki krayo-SEM görüntüleri; **(a)** 3500×, **(b)** 50000× ve **(c)** 10000×.

Parçacıkların bütün olarak gözlemlenebildiği Şekil 4.22a'da, köpük yüzeyinde parçacıkların tek katman halinde sıralandıkları görülmektedir. Daha



yüksek bir büyütme oranıyla bakıldığında (Şekil 4.22b), parçacıkların iki baloncuk arasında da tek sıra halinde buldukları görülmektedir. Köpükteki film, Şekil 4.22b'de beyaz oklarla gösterilmektedir. Bu görüntüde parçacıkların yüzeyindeki sivri yapıların krayo uygulamasından meydana geldiği düşünülmektedir. Dondurma işlemi sırasında PAS proteini parçacıklarının düzgün ve görece pürüzsüz yüzeyleri deforme olarak, iğne benzeri yapılar oluşturabilmektedir (İnce Coşkun and Özdestan Ocak, 2021b). Şekil 4.22c'de ise, PAS proteini parçacıklarının ara yüzeydeki genel görüntüsü yer almaktadır. İlk başta küresel oldukları bilinen PAS proteini parçacıklarının morfolojileri hafifçe uzayarak elips hale geçmiştir. Bu durumun gözlemlenmesinde krayo uygulamasının etkisi olabileceği gibi, esnek parçacıkların yüzey gerilimi dengesini sağlamak için uzamaları da etkili olabilir (Style et al., 2015).

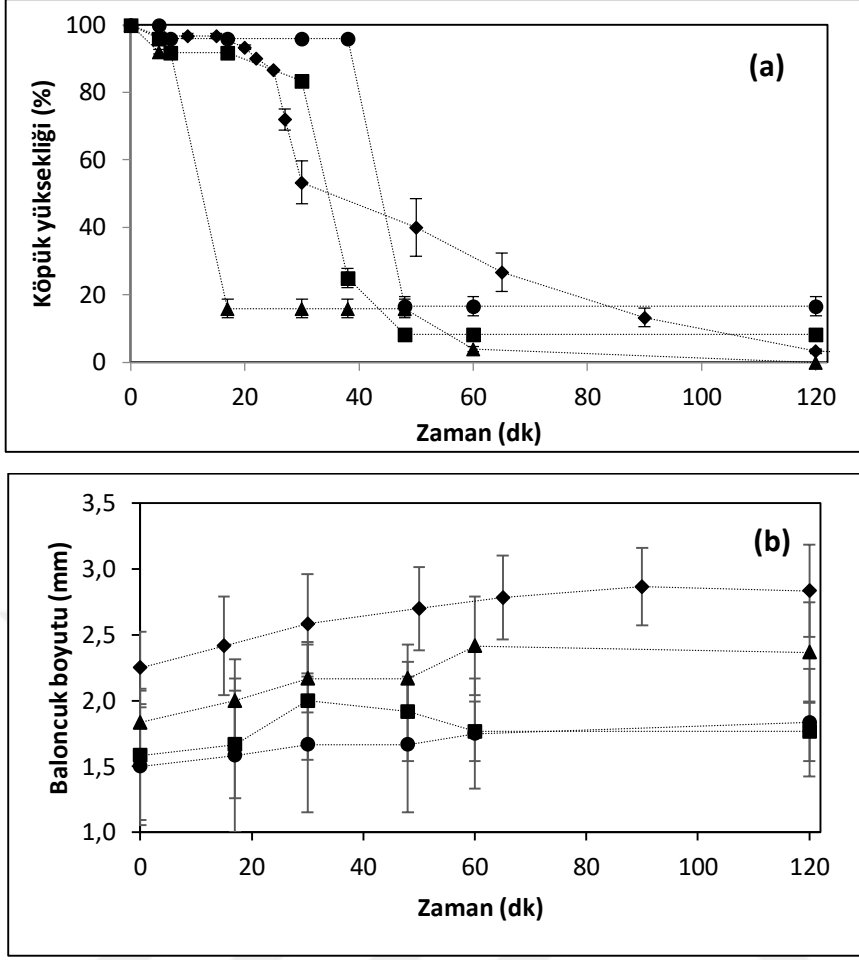
Detaylı SEM görüntüleri Ek 2-15 arasında verilmiştir. Parçacıkların çoğunlukla birbirlerine belirli bir mesafede durdukları görülmektedir. PAS proteini parçacıklarının zeta potansiyel değerleri pH 3'te ~30 mV olarak ölçülmüştür (Şekil 4.3), dolayısıyla dispersiyon kararlı yapıdadır, yani parçacıklar birbirini itmektir. Parçacıklar arasında belirli bir mesafe bulunduğundan, baloncucu oluşturan film kısmen kaplanmış durumdadır. Yüzeyi kısmen yüzey aktif maddeyle kaplı bir filmin de film kırılması (koalesens) durumuna daha yatkın olması, dolayısıyla köpük stabilitesinin düşük olması beklenmektedir. Ancak, pH 3'teki örneklerde köpük stabilitesi düşük değildir. Parçacıkların aralarındaki mesafe, film kırılmasını hızlandırmamış, köpük stabilitesini olumsuz etkilememiştir. PAS proteini parçacıklarının kısmen dağılması veya elastik yapılarından dolayı esneyerek uzaması köpük stabilitesini arttırmış olabilir. Bununla birlikte, parçacıklar arasındaki mesafe ve parçacıkların su tutma kapasiteleri, ara yüzeyde bu yüzeyi güçlendiren bir denge kurmuş olabilir, yani drenaj hızı da azalarak stabilizeye katkı sağlamış olabilir.

Farklı pH değerlerinde elde edilen köpük stabilitesi verilerine göre, parçacıkların izoelektrik noktasından uzakta olmasının stabilizeyi arttırdığı, izoelektrik noktasına yakın olmasının ise koagülasyondan dolayı stabilizeyi düşürdüğü tespit edilmiştir. PAS proteini parçacıklarının yüzey aktif özellikleri izoelektrik noktasından uzak alkali ve asidik pH değerlerinde artmaktadır.

Dispersiyon içindeki dağılmış parçacıklardan oluşan küçük bileşenlerin, köpük oluşturma yeteneğine katkı sağladığı tespit edilmiştir. Özellikle alkali pH değerlerinde köpük ömrünün oldukça yüksek olması ise, parçacıklarla birlikte agregatların, kalıntıların ve oligomerlerin aynı ortamda bulunmasının bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Bütünlüğünü koruyan parçacıklarla kısmen dağılmış parçacıkların bir arada bulunması, köpük sistemlerinin stabilizasyonunda sinerjistik etki göstermiştir.

#### **4.4.4. Farklı pH ve konsantrasyondaki ham PAS proteini çözeltilerinin köpüklenme özellikleri**

Ham PAS çözeltilerinin köpüklenme özellikleri, PAS proteini parçacığı dispersiyonlarıyla karşılaştırılmak üzere incelenmiştir. Öncelikle köpük yüzeyinin etkin bir şekilde kaplanıyor olmasını test etmek amacıyla, PAS çözeltilerinin %2 ile %8 arasında değişen konsantrasyonlarıyla köpük çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çözeltilerin pH değerlerinde bir ayarlama yapılmamış, pH 7'de sabit tutulmuştur. Örneklerin köpüklenme yetenekleri 18-20 s arasında değişmiştir. Köpük oluşumunun hızlı bir şekilde gerçekleşmesi, yüzey aktif maddenin düşük molekül ağırlıklı sürfaktan özelliği gösterdiğini, ara yüzeyde kolayca adsorplandığını ifade etmektedir. Ancak bu durum, ara yüzeyde ne kadar süre tutunacağı hakkında bilgi vermemektedir. Şekil 4.23'te de bu çözeltilerin köpük stabilite ve baloncuk boyutları gösterilmektedir.



Şekil 4.23. Ağırlıkça (◆) %2, (▲) %4, (■) %6 ve (●) %8 ham PAS proteini içeren çözeltilerin (a) köpük yüksekliği ve (b) baloncuk boyutu grafikleri.

Artan PAS proteini konsantrasyonu, köpük ömrünü kısmen artırırsa da, en yüksek konsantrasyonun olduğu çözeltide bile yaklaşık 40. dakikadan sonra köpük yüksekliği %50'nin altına inmiştir (Şekil 4.23a). Baloncuk boyutları 1.5 mm ile 3 mm arasında değişmiştir (Şekil 4.23b). Ham PAS proteini çözeltilerinde baloncuk boyutları, köpüklenme yetenekleri hakkında da bilgi verebilmektedir. Köpük oluşumu sırasında, küçük ve homojen baloncukların oluşması, yeterli miktarda sürfaktanın olduğunu göstermektedir. Protein konsantrasyonu değişen çözeltilerde de %8'lik çözeltiden elde edilen köpükteki baloncuk boyutları, %2'lik çözeltiden elde edilen köpükteki baloncuk boyutlarından daha küçüktür (Şekil 4.23b). Artan protein konsantrasyonu daha küçük baloncuk oluşumunu desteklemiştir. Köpüklenme yeteneği ve köpük stabilitesinin, artan ham protein konsantrasyonu ile arttığı bilinmektedir (Britten and Lavoie, 1992; Schwenzfeier et al., 2013). Hem baloncuk yüzeylerinin daha kalın bir protein tabakasıyla

kaplanması hem de artan viskozitenin drenaj hızını yavaşlatması nedeniyle, yüksek protein miktarında köpük stabilitesi de yüksek olmaktadır.

Protein konsantrasyonları karşılaştırılan iki sistemin farklı pH değerlerindeki karşılaştırması da yapılmıştır; bunun için protein miktarı sabit tutulmuştur. Yüzde 2 protein içeren çözeltiler pH 2 ve pH 9 arasında farklı değerlere ayarlanmış ve köpüklenme özellikleri incelenmiştir. Bu çözeltilerin köpüklenme yetenekleri Tablo 4.9'da verilmiştir.

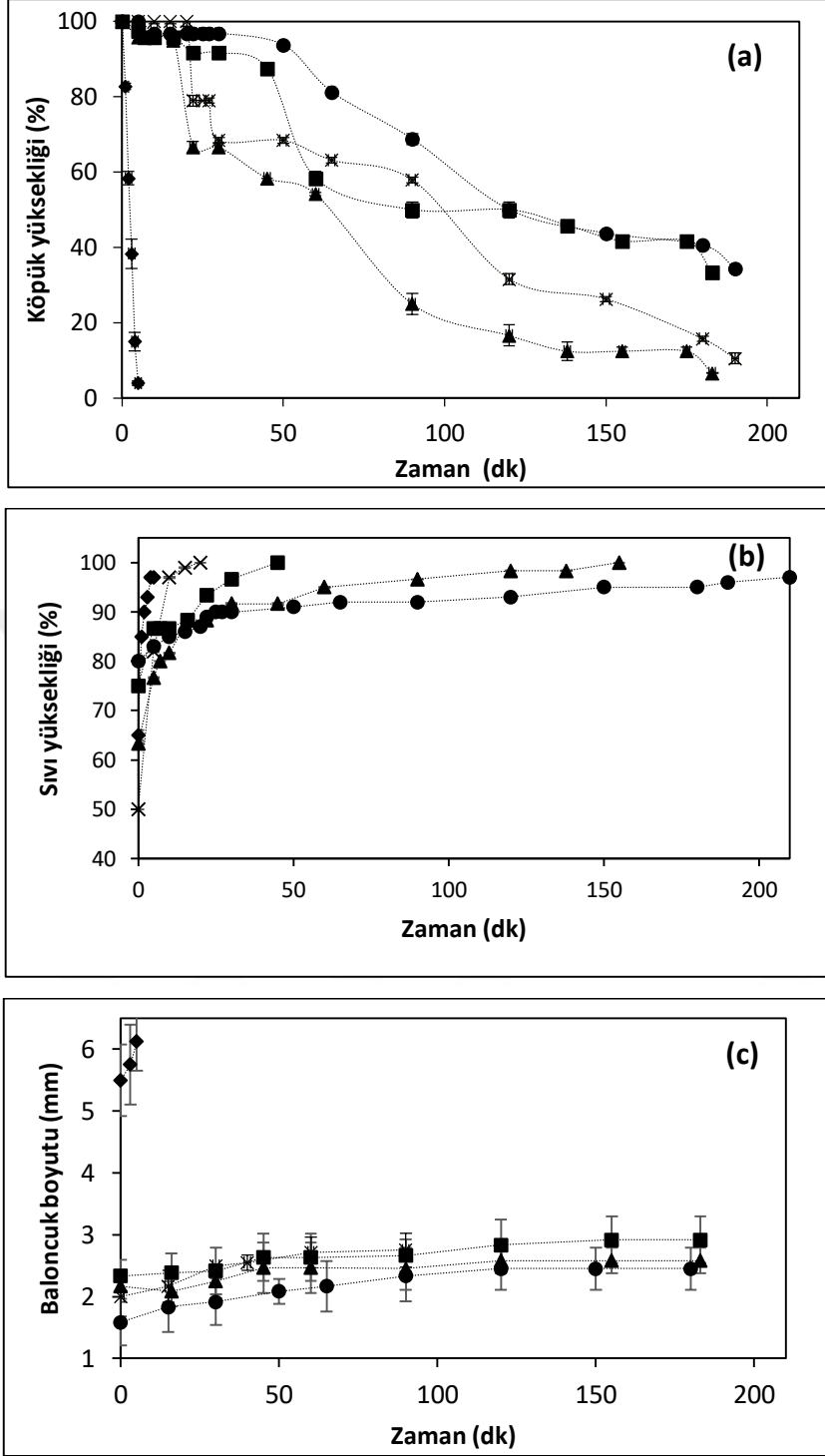
**Tablo 4.9.** Ham PAS çözeltilerinin farklı pH değerlerinde köpüklenme yetenekleri.

Çözeltinin pH değeri	Köpüklenme yeteneği (s)
2	20 <sup>AB</sup> ± 0.7
3	18 <sup>BC</sup> ± 0
5.5	16 <sup>C</sup> ± 0.7
6	15 <sup>C</sup> ± 0
9	25 <sup>A</sup> ± 2.12

Farklı harfler, çözeltiler arasındaki farkı göstermektedir (p < 0.05).

Ham PAS proteini çözeltilerinin köpüklenme yetenekleri 15-25 s arasında değişmiştir. Proteinlerin izoelektrik noktasına yakın (pH 5.5 ve pH 6) değerlerde, köpük yüksekliği 20 cm'ye kısa sürede geldiğinden köpüklenme yeteneği yüksektir, izoelektrik noktasından uzak değerlerde ise köpüklenme yeteneği diğer örneklere göre düşüktür.

Farklı pH değerlerindeki PAS çözeltilerinin köpük stabiliteyi Şekil 4.24'te verilmiştir.



Şekil 4.24. (◆) pH 2, (▲) pH 3, (●) pH 5.5, (■) pH 6 ve (×) pH 9 değerlerindeki %2'lik ham PAS çözeltilerinin (a) köpük yüksekliği, (b) sıvı yüksekliği ve (c) baloncuk boyutu grafikleri.

Şekil 4.24a'daki grafikte, pH 5.5 ve pH 6'daki çözeltilerin köpük stabiliteilerinin diğer çözeltilerinkine göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Çözeltilerdeki pH değişikliği, proteinlerin yüzey aktif özelliklerini etkilemiştir.

Sıvı yükseklikleri (Şekil 4.24b) ve baloncuk boyutları (Şekil 4.24c) da köpük stabiliteleriyle uyumlu olarak değişmiştir. Baloncuk boyutları, pH 2'deki çözelti hariç, 1.5-3 mm arasında değişmiştir. pH 2'deki çözeltinin baloncuk boyutları 5 mm'den fazladır. Bu büyük baloncuk boyutları birinci olarak örneğin köpüklenme yeteneğinin düşük olduğunu göstermektedir. İkinci olarak da örneğin çok hızlı destabilize olmaya eğilimli olduğunu ifade etmektedir. İzoelektrik noktasından uzak pH değerlerinde, ham proteinler arasındaki yüksek elektriksel itme kuvveti film yüzeylerinin tamamen kaplanamamasına sebep olmaktadır, bu da köpük stabilitesini düşürmektedir. Dolayısıyla, ham protein çözeltileri için izoelektrik noktasından uzakta olanların yüzey aktif özellikleri düşük, bu noktaya yakın olanları ise yüksektir.

Farklı pH değerlerindeki çözeltiler ve PAS proteini parçacığı dispersiyonları köpük stabiliteyi bakımından farklı eğilimler göstermiştir. Ham proteinler için en yüksek yüzey aktif özellikleri izoelektrik noktaya yakın değerlerde görülürken, protein parçacıkları için izoelektrik noktasından uzak değerlerde görülmüştür. Yüksek oranda beta-laktoglobulin içeren ham PAS proteinleri, farklı pH değerlerinde farklı oligomerik türler oluşturabilir (Foegeding et al., 2006). Bu yapılar, izoelektrik noktaya yakın pH değerlerinde, elektriksel çekme ve hidrofobik interaksiyonlarla mikrometre boyutuna ulaşabilen agregatlar oluşturur. Bu agregatlar ara yüzeyde jel benzeri bir yapı oluşturarak film dayanıklılığını da arttırmaktadır (Dombrowski et al., 2017; Marinova et al., 2009). Agregatlar, mikro boyutlardaki düzensiz parçacıklar gibi davranabilmektedir. Ayrıca, agregatların varlığı serum fazının viskozitesini arttırmakta; artan viskozite de drenaj hızını azaltarak köpük stabilitesine katkı sağlamaktadır (Lam et al., 2014; Saint-Jalmes et al., 2005; Velev et al., 1998). Dolayısıyla, ham proteinlerin izoelektrik noktaya yakın değerlerde yüzey aktif özelliklerinin artması proteinlerin kendi aralarındaki elektriksel ve hidrofobik etkileşimlerin bir sonucudur. Bu durum, aslında farklı sistemler kullanılsa bile, parçacıklar veya parçacık benzeri yapıların yüzey aktif özelliklerinin daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Eğilimlerindeki farkların dışında, ham PAS proteinleri ve PAS proteini parçacıkları köpük stabiliteyi açısından karşılaştırıldıklarında, PAS proteini parçacıklarının pH 3 değerinde köpük ömrünü çok daha uzun süre arttırdığı tespit

edilmiştir (Şekil 4.19a). Çözeltilerde ise en uzun ömürlü köpük pH 5.5 ve pH 6'da gözlemlenmiştir, ancak köpük yüksekliği %50'nin altına 2 saat içinde düşmüştür (Şekil 4.24a). Yani köpük stabilitesi PAS proteini parçacıklarının olduğu örneklerdeki kadar yüksek değildir. PAS proteini parçacıkları ara yüzeyi ham proteinlere göre daha iyi stabilize etmiştir, bu durum parçacıkların Pickering etkisiyle de ilgilidir. Kolloidal PAS proteini parçacıkları, köpük denemelerinde bir çeşit Pickering sistemi oluşturmuşlardır.

Ham PAS proteini çözeltileri ve PAS proteini parçacıkları dispersiyonları için elektrostatik etkileşimlerin, konsantrasyondan çok daha baskın olduğu tespit edilmiştir. Örneklerin pH değerleri, hem parçacıkların mikro-yapılarını hem de parçacıklar ve proteinlerin kendi aralarındaki interaksiyonlarını değiştirmektedir. Bu nedenle, proteinlerin ve protein parçacıklarının yüzey aktif özelliklerinin belirlenmesinde elektriksel yükler ve proteinler arası etkileşimler büyük önem arz etmektedir.

#### **4.5. PAS Proteini Parçacıklarının Kefirde Kullanımı**

PAS proteini parçacıklarının fiziksel ve kimyasal özellikleri, gıdaların kompleks yapılarından uzak model sistemler kullanılarak incelenmiştir. PAS proteini parçacıklarının gıda sistemlerindeki davranışları, dispersiyonlardakinden farklılık gösterebilmektedir. Çünkü ortamda bulunan her bir bileşenle parçacıkların etkileşimi sistemin genel davranışını değiştirebilmektedir. PAS proteini parçacıklarının kompleks gıda sistemlerinde kullanımını incelemek için, model gıda olarak kefir seçilmiştir. Kefirin bir süt ürünü olması PAS proteinlerinin kullanımı için uygun bir ortam sunmaktadır. Ayrıca kefir, protein miktarı artırılarak fonksiyonel özellik kazandırılmaya uygun bir içecektir.

PAS proteini parçacıklarının dispersiyonlarda tuz, protein, polisakkarit gibi farklı bileşenlerle etkileşimleri bu tezin kapsamında incelenmiştir. Kefirin yapısındaki bileşenlerle PAS proteini parçacıklarının uyumunun incelenmesi, yine bu tezin kapsamında tamamlayıcı bir çalışma olacaktır. PAS proteini parçacıklarının kefire eklenmesindeki temel amaç kefirde bulunan yaklaşık %3'lük protein konsantrasyonunu arttırmaktır. Ayrıca, parçacıkların yüzey aktif

özellikleri sayesinde kefirdeki serum ayrılması problemini de azaltabileceği öngörülmektedir.

Kefir örnekleriyle yapılan denemelerde, pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacıklarının yanı sıra, protein miktarının daha fazla olduğu bilinen, yoğun, pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıkları da kullanılmıştır. Her iki parçacık için de parçacıkların hacimsel oranları,  $\Phi \sim 0.03$ ,  $\sim 0.06$  ve  $\sim 0.12$  olacak şekilde denemeler yapılmıştır.

Farklı parçacıklar üretilirken karıştırıcı hızı sabit tutulsa bile, pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacıklarının ortalama boyutları  $\sim 2.4 \mu\text{m}$ , pH 5.5'te üretilen parçacıkların ortalama boyutları ise  $\sim 1 \mu\text{m}$  olarak tespit edilmiştir.

#### 4.5.1. Kefir örneklerindeki protein konsantrasyonu

Tablo 4.10'da kefir örneklerinde tespit edilen protein konsantrasyonları gösterilmektedir.

**Tablo 4.10.** Farklı hacimsel oranlarda pH 6.8'de ve pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacığı içeren kefir örneklerinin protein konsantrasyonları.

Hacimsel oran ( $\Phi$ )	pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacığı içeren kefirlerdeki protein konsantrasyonu (%)	pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacığı içeren kefirlerdeki protein konsantrasyonu (%)
0 (Sade kefir)		3.78 <sup>D</sup> $\pm$ 0.31
0.03	2.56 <sup>D</sup> $\pm$ 0.45	4.47 <sup>BC</sup> $\pm$ 0.23
0.06	3.30 <sup>CD</sup> $\pm$ 0.69	5.93 <sup>B</sup> $\pm$ 0.42
0.12	3.97 <sup>CD</sup> $\pm$ 0.49	8.31 <sup>A</sup> $\pm$ 0.01

Sade kefir örneğinde protein içeriği yaklaşık %3.8 bulunmuştur. PAS proteini parçacığı eklenmiş kefir örneklerindeki protein içerikleri ise %2.56 ile %8.31 arasında değişmiştir. Tablo 4.10'daki verilere göre, pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacıkları, sade kefirin protein içeriğini istatistiksel olarak arttıramamıştır. pH 5.5'te üretilen parçacıkları içeren kefir örneklerinde ise,



parçacıkların hacimsel oranı arttıkça örneklerde istatistiksel olarak protein artışı da olmuştur. En yüksek hacimsel oranda ( $\Phi \sim 0.12$ ) protein miktarı, sade kefirdekinin 2 katından daha fazla arttırılabilmektedir. pH 6.8’de üretilen parçacıklar, kefirde bulunan bakteri ve mayalar tarafından metabolize edilerek farklı bileşenlere dönüştürülmüş olabilir. pH 5.5’te üretilen parçacıklar için metabolize edilme hızı daha yavaş olabilir. Dolayısıyla, kefirdeki protein miktarını yalnızca yoğun parçacıklar arttırabilmiştir.

Kefirin pH değeri  $\sim 4.5$ ’tir ve bu pH değerinde özellikle pH 6.8 PAS proteini parçacıklarının yüksek elektriksel itme kuvvetlerinden dolayı dağılmaları da olasıdır. Ancak parçacıkların bölünmesinin, toplam protein miktarını değiştirmesi beklenmediğinden, metabolize edilmeleri daha yüksek olasılıktır.

PAS proteini parçacıklarının etkinliğini test etmek amacıyla, yaklaşık olarak aynı protein miktarlarına denk gelen ham PAS proteini eklenmiş kefir örneklerinin toplam protein içerikleri de tespit edilmiştir. Bunun için öncelikle, farklı hacimsel oranlarda pH 6.8 ve pH 5.5’te üretilen PAS proteini parçacıklarının bulunduğu dispersiyonlardaki protein konsantrasyonları bulunmuştur. pH 6.8’de üretilen PAS proteini parçacığındaki protein içeriği  $\sim 18.5\%$  ve pH 5.5’te üretilen PAS proteini parçacığındaki protein içeriği  $\sim 39\%$  olarak alınmıştır ve hesaplanan değerler Tablo 4.11’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.11.** Farklı PAS proteini parçacığı dispersiyonlarındaki toplam protein konsantrasyonları.

Hacimsel oran ( $\Phi$ )	pH 6.8 PAS proteini parçacığı içeren dispersiyondaki toplam protein konsantrasyonu (%)	pH 5.5 PAS proteini parçacığı içeren dispersiyondaki toplam protein konsantrasyonu (%)
0.03	0.5	1
0.06	1	2.4
0.12	2.2	5

Tablo 4.11’deki verilere göre hacimsel oranı  $\Phi \sim 0.06$  olan pH 6.8 PAS proteini parçacığı ile  $\Phi \sim 0.03$  olan pH 5.5 PAS proteini parçacığı aynı miktarda protein içermektedir. Aynı şekilde  $\Phi \sim 0.12$  olan pH 6.8 PAS proteini parçacığı ile

$\Phi \sim 0.06$  olan pH 5.5 PAS proteini parçacığı da yakın değerlerde protein içermektedir. Bu veriler ışığında, Tablo 4.10'daki değerlere tekrar bakılırsa, pH 6.8 PAS proteini parçacığı içeren  $\Phi \sim 0.06$  ve  $\Phi \sim 0.12$ 'deki kefir örneklerinin protein miktarları, pH 5.5 PAS proteini parçacığı içeren  $\Phi \sim 0.03$  ve  $\Phi \sim 0.06$ 'deki kefirlerden çok daha azdır. Bu durum, yumuşak (pH 6.8'de üretilen) parçacıkların metabolize edilme hızının yoğun parçacıklara göre daha fazla olduğunun bir kanıtıdır.

Tablo 4.11'deki veriler kullanılarak, %1, %2.5 ve %5 ham PAS proteini içeren kefir örneklerinin hazırlanmasına karar verilmiş ve bu örneklerdeki toplam protein konsantrasyonları Tablo 4.12'de verilmiştir. Bu değerler seçilirken, kefirdeki toplam protein miktarına katkının büyük oranda PAS proteini parçacıklarından geldiği varsayılmış, süt proteinlerinin katkısının sabit bir değer olduğu varsayılmıştır.

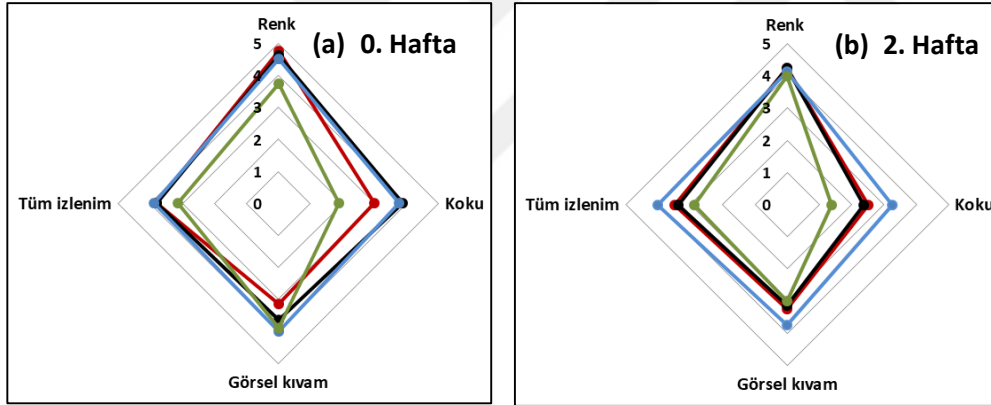
**Tablo 4.12.** Farklı miktarlarda ham PAS proteini eklenmiş kefir örneklerindeki toplam protein konsantrasyonları.

<b>Kefire eklenen ham PAS proteini konsantrasyonu (%)</b>	<b>Kefirdeki toplam protein konsantrasyonu (%)</b>
1	3.09 ± 1.15
2.5	5.78 ± 0.09
5	8.24 ± 0.30

Tablo 4.12'deki verilere göre, ham PAS proteini eklenen kefirlerde protein artışı pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıklarının protein miktarını arttırmasına benzemektedir. Protein miktarını yüksek oranda arttırmış olmasına rağmen, ham PAS proteini eklenen kefir örneklerinde yapılan duyuşal ön denemelerde yoğun bir kötü koku hissedilmiştir. Koku, acımsı ve haşlanmış tavuk kokusu benzeri olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle diğer aşamalarda kefir denemelerinde ham PAS proteini kullanılmamış, yalnızca PAS proteini parçacıklarının etkisine bakılmıştır.

#### 4.5.2. Duyusal analiz

Proteini arttırılmış fonksiyonel kefirin, gıda endüstrisinde yer alabilmesi için duyu özelliklerinin de olumlu ve yüksek olması gerekmektedir. Bu nedenle, ürünün kabul edilebilirliğini test etmek amacıyla, sade kefir ile karşılaştırılan 3 farklı fonksiyonel kefir ürünü yarı eğitimli panelist grubuna sunulmuştur. Duyu özelliklerin en belirgin şekilde gözlemlenebilmesi için hacimsel oranları en yüksek ( $\Phi \sim 0.12$ ) olan pH 6.8 ve pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıkların bulunduğu kefirler ile %5 oranında ham PAS proteini içeren kefir örneği test edilmiştir. Kalite kriterleri olarak renk, koku, görsel kıvam (yapı) ve tüm izlenim sorulmuştur. Tat kriterinin bu çalışmada yer almamasının nedeni, parçacıkların üretim aşamasında kullanılan basınçlı homojenizatörün laboratuvar ortamında genel amaçlı kullanılmasıdır. Duyu analiz testinin sonuçları Şekil 4.25'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.25.** Farklı kefir örneklerinin (a) 0. ve (b) 2. haftalardaki duyu analiz testi sonuçları. Kırmızı çizgi sade kefir örneğini; siyah çizgi pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacığı eklenmiş kefir örneğini ( $\Phi \sim 0.12$ ), mavi çizgi pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacığı eklenmiş kefir örneğini ( $\Phi \sim 0.12$ ) ve yeşil çizgi de ham PAS proteini eklenmiş kefir örneğini (%5) göstermektedir.

Şekil 4.25'teki verilere göre belirgin farklılıklar kefir örneklerinin koku özelliğinde ve haftalar arasında görülmektedir. Koku kriteri için, ham PAS proteini içeren kefir örnekleri hem 0. haftada hem de 2. haftada diğer örneklere göre düşük skorlar almıştır (Ek 16). Bu örneğin renk değeri, 0. haftada düşük skor alırken, 2. hafta değerlendirmelerinde diğer örneklerle arasında bir fark tespit edilememiştir (Ek 16). Ham PAS proteini içeren kefir örneğinin görsel kıvamının da 2. haftada bozulduğu tespit edilmiştir.

pH 6.8 PAS proteini parçacığı içeren kefir örnekleri için 2. haftada kokunun bozulduğu, diğer özelliklerinin ise büyük oranda değişmediği gözlemlenmiştir. pH 5.5 PAS proteini parçacığı içeren kefir örnekleri ise genel olarak belirlenen kalite kriterleri için en yüksek puanları almıştır. Bu parçacıkların kullanımı, özellikle PAS proteinlerinin kokusunu engellemede avantaj olabilir. Kefirin kendine özgü koku ve aromasını bozmadan protein miktarını arttırabilen parçacıklar yoğun PAS proteini parçacıkları olmuştur.

#### 4.5.3. Renk analizi

Kefir örneklerinde renk analizi Hunter kolorimetresi ile CIE L\*a\*b\* metoduna göre yapılmıştır. Veriler Tablo 4.13'te gösterilmektedir.

**Tablo 4.13.** Kefir örnekleri için CIE L\*a\*b\* değerleri.

Kefir örneği	L*	a*	b*	$\Delta E$
Sade kefir	63.68	0.41	2.14	
$\Phi \sim 0.03$ , pH 6.8 PAS proteini parçacığı	20.71 <sup>B</sup> $\pm$ 0.61	3.40 <sup>C</sup> $\pm$ 0.28	14.60 <sup>BC</sup> $\pm$ 3.22	44.89 <sup>B</sup> $\pm$ 1.46
$\Phi \sim 0.06$ , pH 6.8 PAS proteini parçacığı	31.10 <sup>A</sup> $\pm$ 0.07	1.75 <sup>D</sup> $\pm$ 0.27	6.30 <sup>C</sup> $\pm$ 4.26	33.01 <sup>C</sup> $\pm$ 0.62
$\Phi \sim 0.12$ , pH 6.8 PAS proteini parçacığı	18.18 <sup>C</sup> $\pm$ 0.06	3.05 <sup>CD</sup> $\pm$ 0.69	22.33 <sup>AB</sup> $\pm$ 0.42	49.85 <sup>A</sup> $\pm$ 0.16
Sade kefir	17.63	4.90	28.39	
$\Phi \sim 0.03$ , pH 5.5 PAS proteini parçacığı	15.40 <sup>D</sup> $\pm$ 0.10	5.45 <sup>B</sup> $\pm$ 0.11	25.09 <sup>A</sup> $\pm$ 0.35	4.04 <sup>F</sup> $\pm$ 0.33
$\Phi \sim 0.06$ , pH 5.5 PAS proteini parçacığı	13.85 <sup>D</sup> $\pm$ 0.25	6.27 <sup>B</sup> $\pm$ 0.02	22.47 <sup>AB</sup> $\pm$ 0.01	7.16 <sup>E</sup> $\pm$ 0.14
$\Phi \sim 0.12$ , pH 5.5 PAS proteini parçacığı	10.47 <sup>E</sup> $\pm$ 0.78	7.65 <sup>A</sup> $\pm$ 0.02	16.01 <sup>B</sup> $\pm$ 0.79	14.58 <sup>D</sup> $\pm$ 0.29

Farklı harfler, aynı sütunda bulunan kefir örnekleri arasındaki farkı göstermektedir ( $p < 0.05$ ).

Renk analizi, örneklerdeki görsel renk farkını belirlemenin yanı sıra kefir içindeki yağ globüllerinin kümelenerek ayrışması konusunda, yani kefir örneğinin stabilitesi hakkında da fikir vermektedir. pH 6.8 ve pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıklarını içeren kefir örneklerinin renk ölçümleri farklı günlerde yapıldığından, farklı birer kontrol örneği kullanılmıştır.

Tablo 4.13'te belirtilen sade kefir örnekleri, her iki parçacık için ayrı ayrı hazırlanan kontrol örneklerini ifade etmektedir. Kefir örneklerinde, PAS proteini parçacığının hacimsel oranı arttıkça  $L^*$  değeri pH 5.5 PAS proteini parçacıklarında azalmıştır. Renk ölçümlerinde  $L^*$  değerleri, örneğin renginin açıklığını ifade etmektedir.  $L^*$  değerinin sıfır olması siyah rengi, 100 olması ise beyaz rengi göstermektedir. Genel olarak PAS proteini parçacıklarının miktarı arttığında siyaha yakınsayan renk değerleri elde edilmiştir, ancak  $L^*$  değerinin sıfıra yaklaşması, örnekte koagüle oluşumuna da işaret edebilmektedir.  $a^*$  değerleri ise, yeşil-kırmızı renkleri arasındaki geçişi göstermektedir ve bu değerler sıfıra yakın olması herhangi bir yeşil ya da kırmızı rengin baskın olmadığını ifade etmektedir.  $b^*$  değeri ise mavi-sarı arasındaki geçişi göstermektedir. Örneklerdeki  $b^*$  değerlerinde dalgalanmalar gözlemlenmiştir. Artan  $b^*$  değerleri, örnekteki sarı rengin arttığını göstermektedir. pH 5.5 PAS proteini parçacığı içeren kefirlerin daha yüksek  $b^*$  değerine sahip olmaları, yağ globüllerinin daha çok ortaya çıkmasının bir sonucu olabilir.

Örneklerin  $\Delta E$  değerleri, kendi kontrol gruplarından ne kadar farklı olduklarını ifade etmektedir. Buna göre, pH 5.5 PAS proteini parçacıkları içeren kefirlerin rengi, kontrol grubuna pH 6.8 PAS proteini parçacıklarını içeren kefirlerden daha yakındır. Bu durum, pH 5.5 PAS proteini parçacıklarının, sade kefirin renginin daha az değişmesini sağladığını, dolayısıyla kefirin kendine özgü rengini daha çok koruyabildiğini göstermektedir.  $b^*$  değerleri her iki PAS proteini parçacığını içeren kefirler için yakın değerlerdedir, ancak  $L^*$  değerleri farklılık göstermiştir. Bu durum, pH 6.8'deki PAS proteini parçacıklarının, pH 5.5'teki parçacıklara göre daha çabuk dağılması ile ilgili olabilir. Dağılmış parçacıklar, kefir örneklerindeki opaklığı da arttırabilmektedir. Dolayısıyla,  $\Delta E$  değerleri arasındaki fark da baskın olarak  $L^*$  değerlerinden gelmektedir.

#### 4.5.4. Kefir örneklerindeki yağ ve kuru madde miktarı

Kefirdeki yağ miktarı, Gerber metoduyla sade kefir kullanılarak %2.8 olarak belirlenmiştir. PAS proteinlerinden gelen yağ miktarı çok az olduğundan hesaplamada ihmal edilmiştir.

Kefir örneklerindeki kuru madde miktarı Tablo 4.14'te gösterilmektedir.

**Tablo 4.14.** Kefir örneklerinde kuru madde miktarları.

<b>Kefir örneği (içerdiği PAS proteini parçacığı türü ve hacimsel oranı)</b>	<b>Kuru madde miktarı (%)</b>
Sade kefir	9.91 ± 1.84
Φ ~0.03, pH 6.8 PAS proteini parçacığı	9.87 ± 0.63
Φ ~0.06, pH 6.8 PAS proteini parçacığı	10.16 ± 0.20
Φ ~0.12, pH 6.8 PAS proteini parçacığı	11.49 ± 0.29
Φ ~0.03, pH 5.5 PAS proteini parçacığı	11.82 ± 0.20
Φ ~0.06, pH 5.5 PAS proteini parçacığı	12.28 ± 0.36
Φ ~0.12, pH 5.5 PAS proteini parçacığı	12.78 ± 0.34
%1 ham PAS proteini	9.79 ± 0.31
%2.5 ham PAS proteini	11.58 ± 0.16
%5 ham PAS proteini	13.78 ± 0.02

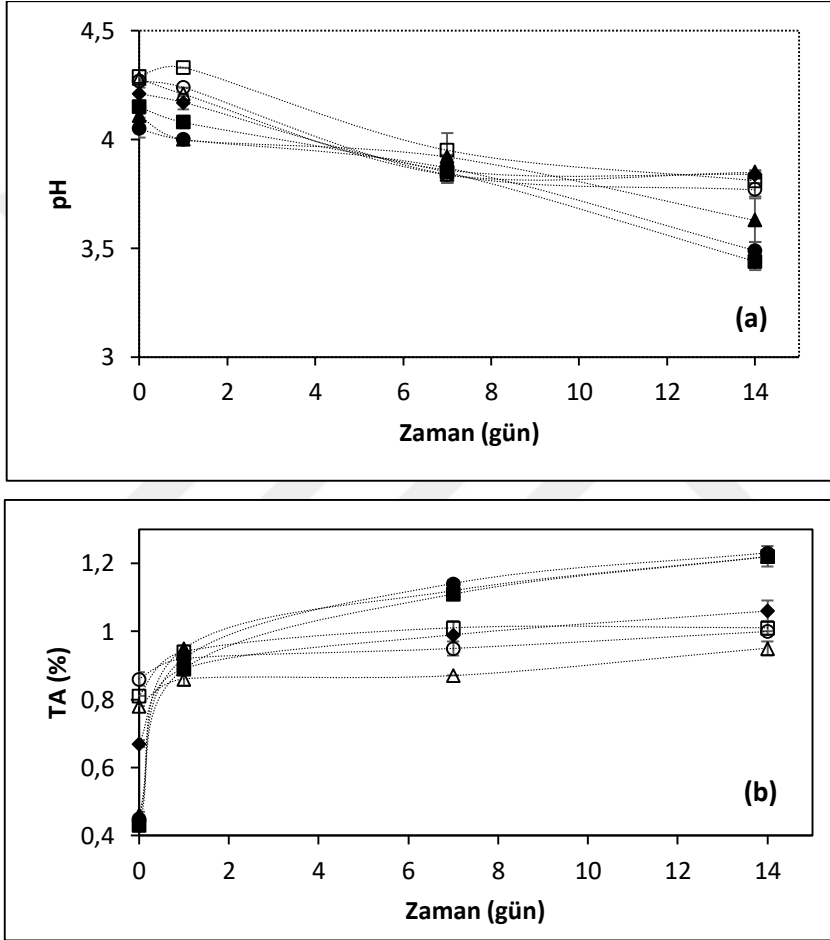
Kuru madde miktarları, PAS proteini parçacıklarının artan hacimsel oranlarına göre %9.87 ile % 12.78 arasında değişmiştir. Ham PAS proteini eklenmesi halinde ise %13.78'e çıkmıştır.

Kuru madde miktarı ve yağ oranı yüksek olan sütlerden elde edilen kefirlerin biyokimyasal özelliklerinin değiştiği ve duyuşal özelliklerinin daha iyi olduğu önceki çalışmalarda tespit edilmiştir (Akdan vd., 2020). Yağ miktarının yüksek olması, daha yumuşak içimli kefir elde edilmesini; kuru madde miktarının

yüksek olması ise daha kıvamlı bir kefir elde edilmesini sağlamakta ve kefir kültürünü oluşturan mikroorganizmaların çeşitliliğini arttırmaktadır.

#### 4.5.5. pH değerleri ve titrasyon asitliği

Kefirlerin depolama süresince pH ve titrasyon asitliği değişimleri Şekil 4.26'da gösterilmektedir.



**Şekil 4.26.** Kefir örneklerinin zamana göre (a) pH ve (b) titrasyon asitliği değişimleri. İçi dolu noktalar pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacıklarının olduğu örnekleri, içi boş noktalar ise pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıklarının olduğu örnekleri göstermektedir. (◆) sade kefir; (▲,△)  $\Phi \sim 0.03$ ; (●,○)  $\Phi \sim 0.06$ ; (■,□)  $\Phi \sim 0.12$  hacimsel oranlarındaki parçacıkları içeren kefirleri göstermektedir.

Kefir örneklerinin pH değerleri, iki haftalık depolama süresinde  $\sim 4.5$  değerinden  $\sim 3.5$ 'e kadar düşmüş (Şekil 4.26a), titrasyon asitliği (TA) de aynı sürede  $\sim 0.7$ 'den  $\sim 1.2$ 'ye çıkmıştır (Şekil 4.26b). Bunun nedeni, kefirde

metabolik aktivitesi devam eden mikroorganizmaların, örneğin laktik asit bakterilerinin, laktoz ve azot içeren bileşikleri metabolize etmesidir (Akdan vd., 2020; Buran et al., 2021).

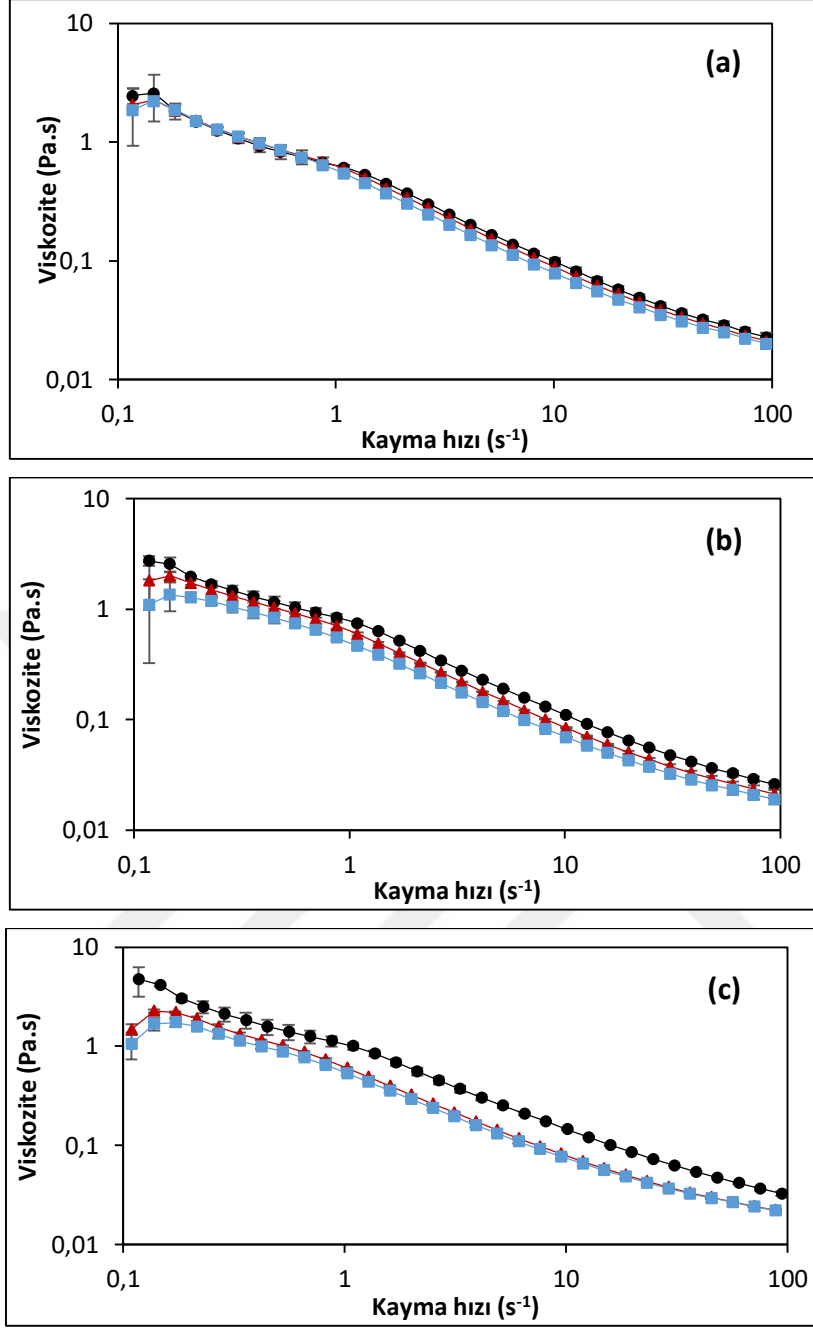
pH ve TA değerlerinin değişim hızları, iki tür PAS proteini parçacığı için farklı olmuştur. Özellikle TA grafiğinde daha açık görülebilen durumda, yumuşak parçacıkları içeren kefirlerin asitliği daha fazla, yoğun parçacıkları içeren kefirlerin asitliği daha az artmıştır. Bunun nedeni, yüksek protein miktarının bir tür tampon (buffer) etkisi oluşturması olabilir (Mennah-Govela et al., 1019). Yoğun parçacıkların bulunduğu kefirlerde, tampon etkisi daha yüksek olduğundan pH değişimine ve asitliğin artışına karşı direnç de daha yüksek olmaktadır.

#### 4.5.6. Kayma viskozitesi

Kefir viskozitesi öncelikle kefirin kendine özgü kıvamını sağlama ve tüketiciler tarafından kabul edilebilirliği açısından önem taşımaktadır. Ayrıca, kefirdeki ayrışma probleminin önlenmesi için kontrol edilmesi gereken, kefirde teknolojik özelliğe sahip bir parametredir (Setyawardani et al., 2020). Kefir viskozitesinin içeriğindeki yağ ve kuru madde miktarına bağlı olduğu bilinmektedir (Akdan vd., 2020; Ünal, 2013). Bununla birlikte, kefir yapımı sırasında kullanılan kefir mayasının bileşimi ve sıcaklık da viskoziteyi etkilemektedir (Ünal, 2013). Sıcaklıkla değişen viskozite değerlerinin genellikle Üssel Kural (Power law) modeline uyduğu rapor edilmiştir (Gursoy vd., 2020). Önceki çalışmalarda kefir viskozitesinin depolama süresince değiştiği de vurgulanmıştır (Akdan vd., 2020; Ergin vd., 2017).

Şekil 4.27’de sade kefir ve  $\Phi \sim 0.12$  olan iki tür PAS proteini parçacığı içeren kefirlerin kayma viskozitelerinin depolama süresince değişimi gösterilmektedir. Diğer hacimsel oranlardaki PAS protieni parçacığı içeren kefirlerin viskozite değişimleri Ek 17-20 arasında verilmiştir.





**Şekil 4.27.** (a) Sade kefirin, (b)  $\Phi \sim 0.12$  olan pH 6.8 PAS proteini parçacığı içeren kefirin, (c)  $\Phi \sim 0.12$  olan pH 5.5 PAS proteini parçacığı içeren kefirin (●) 1., (▲) 7. ve (■) 14. günlerdeki kayma viskozitesi değerleri.

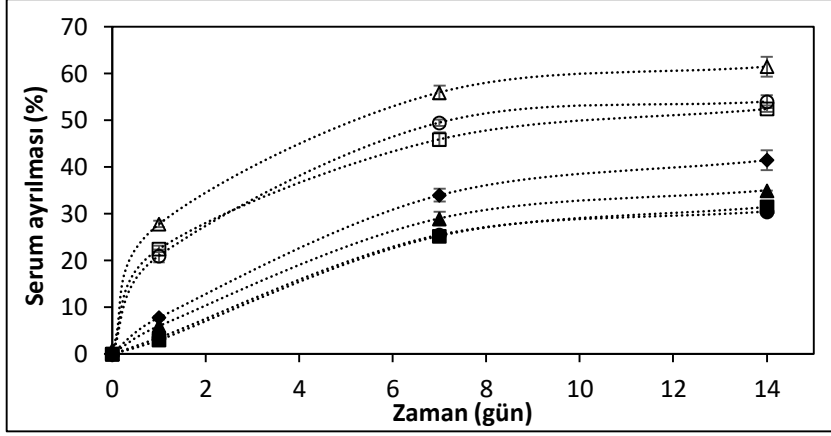
Sade kefirin viskozitesi depolama süresince değişim göstermemiştir (Şekil 4.27a). pH 6.8'de (Şekil 4.27b) ve pH 5.5'te üretilen parçacıkları (Şekil 4.27c) içeren kefir örneklerinin viskoziteleri ise depolama süresince bir miktar azalmıştır. Bunun nedeni, depolama boyunca, kefirde bulunan mikroorganizmaların protein parçacıklarını metabolize ederek parçalaması olabilir.

PAS proteini parçacıklarının  $\Phi \sim 0.05$  gibi küçük hacimsel oranlarında bile dispersiyonların viskozitelerini arttırdığı bilinmektedir (Sağlam et al., 2013a). Ancak, kefir içindeki PAS proteini parçacıklarının boyutları en fazla  $\sim 2.4 \mu\text{m}$ 'dir ve bu değer kefirde bulunan yağ damlacıkları ve mikroorganizmalardan daha küçüktür (Gul et al., 2018; Irigoyen et al., 2005; Zakhartsev and Reuss, 2018). Dolayısıyla PAS proteini parçacıklarının viskoziteye etkisinin de minimal olması beklenmektedir. Bununla birlikte, denatüre olmuş PAS proteinlerinin (PAS proteini parçacıklarının içindeki) sütte bulunan kazeinlerle elektrostatik ve sterik etkileşimlerinin arttığı bilinmektedir (Kehoe and Foegeding, 2011). Bu tür etkileşimlerin agregat ve koagüle oluşumuna neden olması, ilerleyen aşamalarda da bir ağ yapısı oluşumunu desteklemesi nedeniyle viskoziteyi arttırıcı etkileri vardır (Anema and Li, 2003). Dolayısıyla, PAS proteini parçacıklarının viskoziteye etkisi minimal de olsa gözlemlenebilir şekildedir.

#### 4.5.7. Serum ayrılması

Depolama süresince, kefirde serum ayrılması önemli bir problemdir. Serum ayrılması probleminin önüne geçebilmek için, asitli süt içeceklerinde pektin eklenmesi, keçiyoynuzu zamkı eklenmesi, sütün işleme sıcaklığının ayarlanması, depolama sıcaklığının ayarlanması gibi yöntemlere başvurulmuştur (Lucey et al., 1999; Sarıca vd., 2021). Pektinin sütteki kazeinlerin yüzeyine elektrostatik etkileşimlerle bağlanması, pektin molekülleri arasında sterik stabilizasyonu sağlamaktadır (Glahn, 1982). Dolayısıyla kazeinlerin tekrar bir ağ yapısı oluşturmasını veya kümelenmesini de engellemektedir. Ancak, süt ürünlerinde nişasta, pektin, guar zamkı, keçiyoynuzu zamkı gibi kıvam arttırıcı maddelerin kullanımı kabul edilmekle birlikte oldukça sınırlıdır.

PAS proteini parçacıklarının hem yüzey aktif özelliklerinin yüksekliği hem de viskoziteye sağladığı katkı sayesinde, kefirdeki serum ayrılmasını azaltabileceği veya geciktirebileceği düşünülmüştür. Şekil 4.28'de farklı tür ve oranlarda PAS proteini parçacığı içeren kefir örneklerindeki serum ayrılması depolama süresince gösterilmektedir.



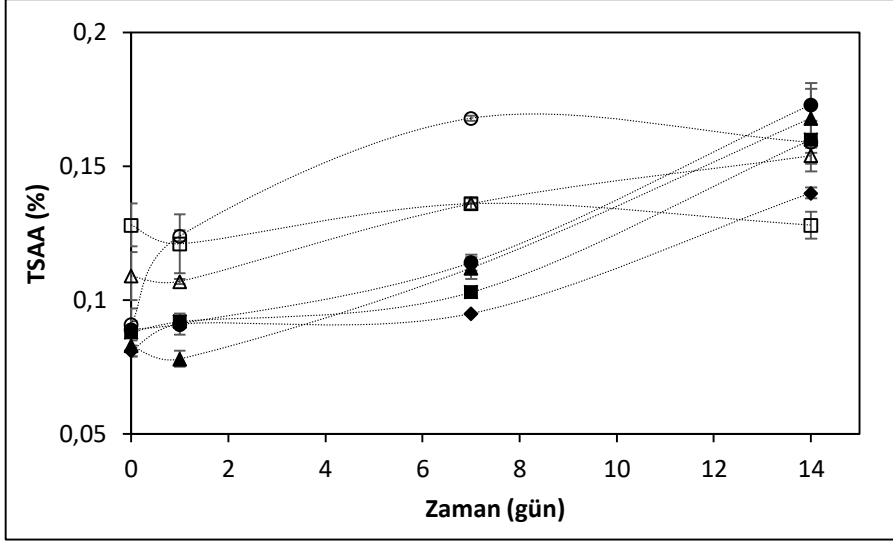
**Şekil 4.28.** Depolama süresince kefir örneklerindeki serum ayrılması. İçi dolu noktalar pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacıklarının olduğu örnekleri, içi boş noktalar ise pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıklarının olduğu örnekleri göstermektedir. (◆) sade kefir; (▲,Δ)  $\Phi \sim 0.03$ ; (●,○)  $\Phi \sim 0.06$ ; (■,□)  $\Phi \sim 0.12$  hacimsel oranlarındaki parçacıkları içeren kefirleri göstermektedir.

Hacimsel oranı  $\Phi \sim 0.03$  olan ve pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıklarını içeren kefir örnekleri en yüksek serum ayrılmasını göstermiştir, bununla birlikte pH 6.8'de üretilen ve  $\Phi \sim 0.06$  ve  $\Phi \sim 0.12$  olan kefirler ise en düşük serum ayrılmasını göstermişlerdir. Genel olarak yoğun parçacıkların bulunduğu kefirler, yumuşak parçacıkların bulunduğu kefiirlere göre daha hızlı bir ayrışma göstermişlerdir. Bunun nedeni, yoğun kefir parçacıklarının küçük boyutları olabilir. Küçük PAS proteini parçacıkları, tükenme etkileşimi yoluyla kefirdeki kazeinlerin koagülasyonuna neden olmuş olabilir (Fitzsimons et al., 2008; İnce Coşkun and Özdeştan Ocak, 2020). Bunun aksine, yumuşak parçacıkların bulunduğu kefir örneklerindeki serum ayrılması, sade kefirinkinden bile düşüktür. Yumuşak parçacıkların kefirdeki serum ayrılmasını geciktirmesinin nedeni, bu parçacıkların yüksek yüzey aktif özelliklerinden olabilir (İnce Coşkun and Özdeştan Ocak, 2021b). Ayrıca, bu parçacıkların kazeinlerle birleşerek bir ağ yapısı oluşturması ve böylece serum ayrılmasını geciktirmesi de olasıdır. Kefir içinde oluşan bir ağ yapısının viskoziteyi de değiştirmesi beklenmektedir. pH 6.8'de ve pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıklarını içeren kefir örneklerinin viskozitelerinde belirgin bir fark gözlemlenememiş olsa bile (Şekil 4.27 b ve c), yumuşak PAS proteini parçacığı içeren kefir örneklerinde serum ayrılması ve viskozite arasında bir korelasyon bulunmuştur (-0.821).

Yumuşak parçacıklar kefir stabilitesini arttırırken, yoğun parçacıklar destabilizasyonu hızlandırmıştır. Farklı tür parçacıkların serum ayrılmasını farklı hızlarda etkilemesi, parçacıkların mikro-yapılarının stabilite üzerine yani fonksiyonel özellikleri üzerine etkisinin önemini ortaya koymaktadır.

#### **4.5.8. Toplam serbest amino asit (TSAA) değerleri**

Serbest amino asitler, herhangi bir proteine bağlı bulunmayan ancak biyolojik aktivitelerde önemli görevleri olan amino asitleri ifade etmektedir. Enzimsel ve diğer metabolik aktivitelerde kullanımları oldukça hızlı gerçekleşebilmektedir. Kefirdeki bakteri ve mayaların proteolitik enzimlerle proteinleri serbest amino asitlere kadar parçalayabildikleri ve bu nedenle de kefirde serbest amino asit miktarının çok fazla olduğu bilinmektedir (Sezer, 2003). Ayrıca serbest amino asit miktarı, mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri sonucu oluşabilecek biyojen amin gibi yan ürünlerin miktarındaki değişimin de bir göstergesidir. Daha önceki bir çalışmada, toplam serbest amino asit (TSAA) değeri ile biyojen amin miktarları arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur (Akan and Özdestan Ocak, 2021). Bu nedenle, biyojen amin araştırılması yapılmadan önce, kefir örneklerindeki TSAA'nın depolama süresince değişimi incelenmiş ve kalibrasyon eğrisinden (Ek 21) elde edilen TSAA değerleri Şekil 4.29'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.29.** Depolama süresince kefir örneklerindeki toplam serbest amino asit değerlerinin değişimi. İçi dolu noktalar pH 6.8’de üretilen PAS proteini parçacıklarının olduğu örnekleri, içi boş noktalar ise pH 5.5’te üretilen PAS proteini parçacıklarının olduğu örnekleri göstermektedir. (♦) sade kefir; (▲,Δ)  $\Phi \sim 0.03$ ; (●,○)  $\Phi \sim 0.06$ ; (■,□)  $\Phi \sim 0.12$  hacimsel oranlarındaki parçacıkları içeren kefirleri göstermektedir.

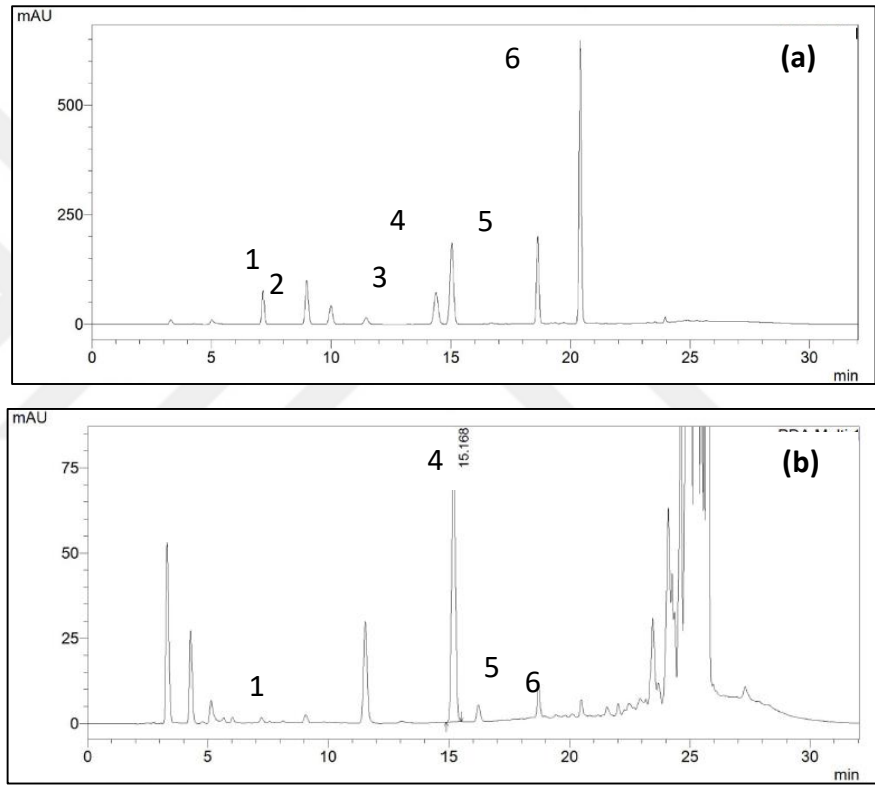
Örneklerdeki TSAA değerleri %0.08 ile %0.17 arasında değişmiştir. pH 6.8’de üretilen parçacıkların bulunduğu kefir örneklerinde TSAA zamanla artmıştır. Bunun nedeni, zamanla dağılan PAS proteini parçacıkları ve proteinlerin hidrolizi olabilir. pH 5.5’te üretilen parçacıkları içeren kefirler ise en yüksek TSAA değerini 7. günde vermiş, daha sonra artış devam etmemiştir.

Protein konsantrasyonunun artması, genel olarak TSAA’da da artışa sebep olmaktadır. Yoğun parçacıkları içeren kefirlerde birinci haftadaki verilerin daha yüksek olması da bu nedenle olabilir. Ancak 14. günde TSAA değerlerinin azalması ya da sabit kalması beklenen bir durum değildir. Serbest amino asitler, mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri sonucu, farklı bileşiklere dönüşmüş veya bir proteine bağlanmış olabilir.

#### 4.5.9. Biyojen amin değerleri

Protein miktarı yüksek fermente ürünlerde biyojen amin konsantrasyonlarının sağlığı tehdit eden seviyelere çıkabildiği bilinmektedir (Akan and Özdeştan Ocak, 2021). Protein miktarı arttırılmış kefir de biyojen aminlerin artmasına uygun bir ortam sunmaktadır. Bu nedenle kefir örneklerinde

biyojen amin incelemesi yapılmıştır. Önceki bir çalışmadan kefirde olduğu bilinen 5 farklı biyojen amin tespit edilmiştir (Özdestan and Üren, 2010a). Bunlar putresin, kadaverin, spermidin, histamin ve tiramindir. PAS proteini parçacığı içeren kefir örneklerinde de bu biyojen aminlerin varlığı ve konsantrasyonları incelenmiştir. Kefirdeki “toplam biyojen amin” konsantrasyonu da yalnızca bu 5 biyojen aminin var olduğu kabul edilerek hesaplanmış, diğer olası biyojen aminler ihmal edilmiştir. Analizde kullanılan biyojen aminlere ait standartların ve bir kefir örneğinin HPLC kromatogramı Şekil 4.30’da verilmiştir. Farklı örneklere ait HPLC kromatogramları da Ek 22-45 arasında verilmiştir.



**Şekil 4.30.** (a) Biyojen amin standart çözeltilerinin ve (b) pH 6.8’de üretilen PAS proteini parçacıklarını  $\Phi \sim 0.12$  oranında içeren kefir örneğinin HPLC kromatogramları. Pikler (1) putresin, (2) kadaverin, (3) spermidin, (4) 1,7-diaminoheptan (iç standart), (5) histamin ve (6) tiramin standartlarını göstermektedir.

Biyojen aminlerin geri kazanım oranları %62 ile %97 arasında, saptama sınırları (detection limit) ise aynı yöntemle analiz edilen biyojen aminlerde 0.2 mg/kg ile 2.5 mg/kg arasında bulunmuştur (Özdestan and Üren, 2009). Tespit edilen biyojen aminler ve konsantrasyonları Tablo 4.15’da gösterilmiştir.

**Tablo 4.15.** Kefir örneklerinde depolama süresince tespit edilen biyojen amin konsantrasyonları.

Kefir örneğinin içerdiği parçacık türü	Zaman (hafta)	Putresin (mg/kg)	Histamin (mg/kg)	Tiramin (mg/kg)	Toplam biyojen amin (mg/kg)
	0	1.37 ± 0.08	5.88 ± 0.32	8.03 ± 4.07	15.28 <sup>Bb</sup> ± 4.47
Sade kefir	1	1.98 ± 0.25	7.78 ± 0.18	18.95 ± 2.30	28.71 <sup>Ab</sup> ± 2.23
(Kontrol)	2	2.47 ± 0.36	9.48 ± 0.11	3.46 ± 0.43	15.41 <sup>Ba</sup> ± 0.91
	0	1.21 ± 0.25	5.36 ± 0.40	ND	6.57 <sup>Cb</sup> ± 2.58
pH 6.8 PAS	1	2.49 ± 0.21	10.64 ± 0.30	28.24 ± 3.85	41.37 <sup>Aa</sup> ± 3.34
Φ ~0.03	2	3.42 ± 0.16	9.96 ± 1.70	4.23 ± 0.57	17.61 <sup>Ba</sup> ± 2.44
	0	1.30 ± 0.06	5.87 ± 1.38	4.12 ± 0.51	11.29 <sup>Bb</sup> ± 1.83
pH 6.8 PAS	1	2.32 ± 0.00	9.42 ± 0.33	14.66 ± 4.55	26.40 <sup>Ab</sup> ± 4.88
Φ ~0.06	2	2.63 ± 0.13	10.05 ± 0.70	1.90 ± 0.45	14.58 <sup>ABa</sup> ± 0.38
	0	1.79 ± 0.13	7.74 ± 0.18	20.17 ± 4.62	29.70 <sup>ABa</sup> ± 4.57
pH 6.8 PAS	1	2.14 ± 0.02	11.39 ± 1.68	27.53 ± 1.58	41.06 <sup>Aa</sup> ± 3.28
Φ ~0.12	2	2.80 ± 0.44	10.88 ± 0.09	3.01 ± 0.32	16.69 <sup>Ba</sup> ± 0.21
	0	0.29 ± 0.06	1.59 ± 0.26	8.66 ± 0.26	10.54 <sup>Ab</sup> ± 0.47
pH 5.5 PAS	1	ND	ND	2.66 ± 0.30	2.66 <sup>Bc</sup> ± 0.30
Φ ~0.03	2	ND	1.14 ± 0.06	ND	1.14 <sup>Cc</sup> ± 0.06
	0	0.30 ± 0.09	0.53 ± 0.11	11.19 ± 3.99	12.02 <sup>Ab</sup> ± 4.19
pH 5.5 PAS	1	ND	ND	ND	ND
Φ ~0.06	2	0.64 ± 0.13	1.29 ± 0.11	11.30 ± 1.41	13.23 <sup>Aa</sup> ± 1.64
	0	ND	ND	12.65 ± 0.71	12.65 <sup>Ab</sup> ± 0.71
pH 5.5 PAS	1	ND	ND	13.84 ± 0.78	13.84 <sup>Ac</sup> ± 0.78
Φ ~0.12	2	ND	2.05 ± 0.06	5.08 ± 0.71	7.13 <sup>Bb</sup> ± 0.76

Büyük harfler aynı örneğin farklı haftalar arasındaki farkını, küçük harfler ise aynı haftadaki farklı örneklerin farkını göstermektedir (p < 0.05). ND: belirlenemeyen örnekleri göstermektedir.

Analizdeki 5 farklı biyojen aminden kadaverin ve spermidin, örneklerin hiç birisinde tespit edilememiştir. Tiramin, ortalama 11.1 mg/kg konsantrasyonla

kefir örneklerinde en yüksek oranda tespit edilebilen biyojen amin olmuştur. Tiraminin kefirdeki en yüksek oranda bulunan biyojen amin olduğu Özdestan and Üren (2010a)'in çalışmasında da belirtilmiştir. Tiramini, ortalama 6.5 mg/kg konsantrasyonla histamin takip etmiştir. En yüksek toplam biyojen amin konsantrasyonu (41 mg/kg) pH 6.8'de üretilen parçacıkları  $\Phi \sim 0.03$ 'te ve  $\Phi \sim 0.12$ 'de içeren kefir örneklerinin 1. haftasında tespit edilmiştir. Ancak bu konsantrasyon, güvenli kabul edilen 50 mg/kg histamin sınırının altındadır (Ruiz-Capillas and Herrero, 2019). İkinci hafta içinde ölçülen biyojen amin değerlerinde ise genel olarak bir azalma gözlemlenmiştir. Bunun nedeni, biyojen aminlerin bir kısmının degradasyonu veya farklı aminlere dönüşümü olabilir (Capozzi et al., 2012; Cueva et al., 2012).

Biyojen aminler genellikle pişirme, dondurma, tütüleme gibi ısı işlemlere dayanıklıdır; ancak gama-ışını radyasyonu ve mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri sonucu inaktif hale geçtikleri bilinmektedir (Dapkevicius et al., 2000; Kim et al., 2004). Örneğin, laktik asit bakterileri biyojen aminleri degrade eden amino oksidaz enzimleri üretebilmektedir (Garcia-Ruiz et al., 2011). Soğuk depolama ve tuz eklenmesi işlemlerinin de biyojen amin oluşumunu yavaşlattığı belirtilmiş, ancak degrade olması hakkında bir bilgi verilmemiştir (Li et al., 2021; Roseiro et al., 2006). Bununla birlikte, ortamın pH değeri 4.5'in altına düştüğünde, biyojen amin oluşumuna önemli ölçüde katkı sağlayan Gram-negatif bakterilerin çoğalması engellenmektedir (Dapkevicius et al., 2000). Kefir örneklerinin depolanması süresince pH değerinin 4.5'in altına düşmesi de biyojen amin miktarının sabit kalması veya azalmasında rol oynamış olabilir.

Tablo 4.15'teki verilere bakıldığında, yumuşak parçacıkları içeren kefir örneklerinde ortalama biyojen amin konsantrasyonu, yoğun parçacıkları içeren kefir örneklerinden daha fazladır. PAS proteini parçacıklarının metabolize edilmesindeki hız farkı bu duruma neden olabilir. Laktik asit bakterileri gibi, dekarboksilaz-pozitif mikroorganizmalar, kefirdeki proteinleri metabolize etmektedir (Guzel-Seydim et al., 2011b), ancak farklı protein yapıları metabolizasyon hızını değiştirmektedir. Örneğin denatüre olmuş proteinler, enzimlerle bağlanabilen bölgeleri daha fazla açığa çıktığından, ham proteinlere göre daha hızlı hidrolize olmaktadır (Guo et al., 1995; Singh et al., 2014). Önceki



bir çalışmada, farklı pH değerlerinde hazırlanan beta-laktoglobulin jellerinin hidrolize karşı dirençleri incelenmiş ve proteinlerin izoelektrik noktasına yakın olan jellerdeki hidrolizinin diğerlerine göre daha az olduğu tespit edilmiştir (Rahaman et al., 2017). Aynı durumun, pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıkları için de geçerli olduğu düşünülmektedir. pH 5.5'te üretilen parçacıkların metabolizasyon hızları diğerine göre daha yavaş olduğundan, tespit edilen biyojen amin konsantrasyonları da daha düşük bulunmuştur.

Önceki çalışmalarda biyojen amin birikiminin, kuru madde miktarı, protein konsantrasyonu, pH, TA ve TSAA ile ayrı ayrı korelasyonları tespit edilmiştir (Akan and Özdestan Ocak, 2021; Erol and Özdestan Ocak, 2020). Kefirdeki biyojen aminlerle ilgili yapılan önceki çalışmada da TA ve TSAA değerlerinin biyojen amin konsantrasyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Özdestan and Üren, 2010a). Ancak, PAS proteini parçacığı eklenmiş kefir örneklerinde böyle bir korelasyon tespit edilememiştir. Protein parçacıklarının hem kompleks bir yapıya sahip olmaları hem de metabolizasyon hızlarının farklı olması, biyojen amin birikimi ile ilişkilerin tespitini zorlaştırmaktadır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Peynir altı suyu (PAS) proteinleri, peynir endüstrisindeki bir yan ürün olarak çıkan, besinsel ve teknolojik değeri oldukça yüksek proteinlerdir. Küresel yapıdadır ve sütte serum fazında bulunurlar. Hasta ve sporcu beslenmesi gibi özel beslenme gerektiren grupların tüketiminde geniş yer tutmaktadır. Dolayısıyla, bir çeşit atık olarak çıkan bu proteinler, gıda endüstrisinde en verimli şekilde kullanılmalıdır.

Gıda endüstrisinde özellikle süt ürünlerinin işlenmesi sırasında ısıl işlemler oldukça yaygın kullanılmakta, ancak PAS proteinleri de 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda denatüre olmaktadır. Bu durum, PAS proteinlerinin işleme ve depolanması sırasında bazı olumsuzluklara yol açmakta ya da işlenmesini düşük sıcaklıklarla kısıtlı tutmaktadır. Isıtılma sonucu denatüre olan PAS proteinlerinde besinsel açıdan bir değişim olduğu gözlemlenmemiştir, ancak tekno-fonksiyonel özellikleri değişmektedir. Örneğin, PAS proteini konsantrasyonunun yaklaşık %8'den az olduğu sistemlerde mikrometre boyutlarına kadar ulaşabilen agregat oluşumları gözlemlenmektedir. Bu da sistemdeki berraklığı etkileyerek bulanık bir görüntüye neden olmaktadır. Ayrıca, agregat oluşumu sistemin viskozitesini de arttırarak işleme sırasında zorluklara yol açabilmektedir. PAS proteini konsantrasyonunun %8'den fazla olduğu sistemlerde ise yine viskozite artışı veya jelleşme durumları gözlemlenebilmektedir. PAS proteinlerinin ısıl işlemlere karşı duyarlılığını azaltmak ve kullanım alanlarını genişletebilmek için kontrollü denatürasyon yöntemi önerilmiştir.

Bu tez kapsamında kontrollü denatürasyon yöntemi, iki aşamalı emülsifikasyon adı verilen bir yönteme göre uygulanmıştır. İki aşamalı emülsifikasyon yönteminde, bir yağ fazının içinde, protein çözeltisi damlacıklar haline getirilip, daha sonra bu damlacıkların jelleşmesi sağlanmaktadır. PAS proteinlerinin jelleşmesi, ısıtılarak sağlanmıştır. Kullanılan bu yöntem, üretilen parçacıkların pH değeri, boyutu, konsantrasyonu gibi özelliklerinin ayarlanabilmesine olanak sağladığından, oldukça esnek bir yöntemdir. Yöntemin esnekliğinden faydalanılarak farklı boyutlarda, konsantrasyonlarda ve pH değerlerinde PAS proteini parçacıkları üretilmiştir. Bu parçacıklar,

fizikokimyasal özelliklerinin net olarak belirlenebilmesi için öncelikle dispersiyonlarda kullanılmış, daha sonra model bir gıda olarak seçilen kefire eklenmiştir. Böylece, protein miktarı arttırılmış fonksiyonel kefir üretimi gerçekleştirilmiştir.

PAS proteini parçacıklarının temel fizikokimyasal özelliklerinin dışında 3 farklı özelliği de incelenmiştir. Bunlar, parçacıkların tuz iyonlarıyla etkileşimleri, ısı stabilitesi ve yüzey aktif özellikleridir.

Tezin 1. aşamasında, PAS proteini parçacıklarının tuz iyonlarıyla etkileşimlerinin incelenmesinden elde edilen temel bulgular şunlardır:

- PAS proteini parçacıklarının koloidal parçacıklar gibi davrandıkları tespit edilmiştir.

- PAS proteini parçacıkları, NaCl gibi tek değerlikli iyonların varlığında DLVO teorisine uyum sağlamaktadır. Bu teori, sulu sistemlerde elektriksel yüke sahip parçacıkların koagüle oluşturma potansiyellerini sayısal olarak açıklamaktadır ve yalnızca van der Waals çekme ve elektrostatik itme kuvvetlerinin varlığını kabul etmektedir.

- PAS proteini parçacıklarının davranışları, MgCl<sub>2</sub> ve AlCl<sub>3</sub> gibi çok değerlikli iyonların bulunduğu ortamlarda DLVO teorisinden sapmalar göstermiştir. Çok değerlikli iyonların varlığında, spesifik iyon etkisi gözlemlenmiştir.

- Kritik koagülasyon konsantrasyonu, iyonların değerlikleri arttıkça azalmıştır.

- Spesifik iyon etkisinin varlığına rağmen, PAS proteini parçacıkları DLVO teorisinden türetilen Schulze-Hardy kuralına uyum sağlamıştır. Schulze-Hardy kuralı, ortamdaki koloidal parçacıklara zıt yüklü iyonların, koloidal sistemi kararsızlaştırması için gereken en düşük konsantrasyonunun iyonların değerliklerinin tersiyle (1/z) orantılı olduğunu söylemektedir.

Tezin 2. aşamasında, PAS proteini parçacıklarının saf su, ham PAS proteini, dekstran ve Arap zankı çözeltilerindeki dispersiyonlarının 90°C'de 30 dakika süreyle ısıtılmaları sonucu davranışlarındaki farklılıklar incelenmiştir. PAS proteini parçacıklarının ısıtılması sonucu gösterdikleri davranış, parçacıkların boyutlarındaki artıştır. Bu durum, pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacıkları için kararsızlık teşkil etmektedir. Isıtılma sonucu gerçekleşen bu olayın, tam mekanizması bilinmemekle beraber elde edilen bulgular, olası mekanizma hakkında bilgi sağlamaktadır. PAS proteini parçacıklarının farklı ortamlardaki ısı stabiliteleriyle ilgili elde edilen temel bulgular şunlardır:

- PAS proteini parçacıkları ısıtılma sonucu, hem şişme özelliği hem de koagüle olma durumu gösterebilir.
- PAS proteini parçacıkları, yalnızca Arap zankının bulunduğu ortamda ısıya karşı dayanıklı hale gelmiştir.
- Arap zankının, PAS proteini parçacıklarını sterik olarak stabilize ettiği düşünülmektedir.
- PAS proteini parçacıklarının moleküler kalabalık etkisiyle ısı stabiliteyi artırılabilmektedir.
- Arap zankının bulunduğu PAS proteini dispersiyonları hariç, dispersiyonlar ısıtılma sonrasında kayma kalınlaşması göstermişlerdir. Serum fazının konsantrasyonuna bağlı olarak, kayma kalınlaşmasının görülmeye başlandığı kayma hızları, dekstran ve ham PAS proteinlerinde zıt eğilimdedir. Ham PAS proteinin artan konsantrasyonlarında, kayma kalınlaşması daha yüksek kayma hızlarında görülmeye başlanmıştır; ancak bu durum dekstran için tam tersidir.

Tezin 3. aşamasında, PAS proteini parçacıklarının yüzey aktif özellikleri köpük sistemleri üzerinden incelenmiştir. Elde edilen temel bulgular şunlardır:

- PAS proteini parçacıklarının zeta potansiyel değerlerindeki değişimin, yüzey aktif özelliklerini etkileyen en önemli faktör olduğu bulunmuştur.

- PAS proteini parçacıklarının, izoelektrik noktasından uzak olduğu durumlarda dağılımları, köpük oluşumunu ve köpük stabilitesini arttırmıştır.

- Elektriksel yük yoğunluğunun yüksek olduğu durumlarda, PAS proteini parçacıklarının köpüklenme özellikleri artmıştır.

- PAS proteini parçacığı dispersiyonları ve ham PAS proteini çözeltileri, farklı pH değerlerinde yüksek köpük stabilitesi göstermişlerdir. PAS proteini dispersiyonları proteinlerin izoelektrik noktasından uzak değerlerde, PAS çözeltileri ise proteinlerin izoelektrik noktasına yakın değerlerde yüksek köpük stabilitesi göstermiştir.

- PAS proteini parçacıklarının oluşturduğu köpük stabilitesi, ham PAS proteinlerinin oluşturduğu köpük stabilitesinden daha yüksek bulunmuştur; bu nedenle PAS proteini parçacıklarının yüzey aktif özelliklerinin ham proteinlere göre daha yüksek olduğu söylenebilir. PAS proteini parçacıkları Pickering köpük sistemi oluşturmuştur.

Tezin 4. ve son aşamasında ise üretilen PAS proteini parçacıkları, proteini arttırılmış fonksiyonel kefir üretiminde kullanılmıştır ve elde edilen sonuçlar şunlardır:

- pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıkları, kefirdeki protein oranını, kefirin duysal ve tekstürel özellikleri değiştirmeden, iki katına kadar çıkartabilmiştir.

- Kefirde istenmeyen bir özellik olan serum ayrılması, pH 6.8'de üretilen parçacıklarla azaltılabilmektedir.

- Mikro-yapıları farklı olan PAS proteini parçacıkları (pH 5.5 ve pH 6.8'de üretilen), kefirdeki fonksiyonelliği farklı şekillerde değiştirmiştir. Bu durum, PAS proteini parçacıklarında yapı-fonksiyon ilişkisine iyi bir örnek teşkil etmektedir.

- pH 5.5'te üretilen parçacıkları içeren kefirlerdeki duyu özellikler, pH 6.8'de üretilen parçacıkları içeren kefiirlere göre daha iyidir.

- Kefirin depolama süresince biyojen aminler oluşmuş ve kısmen degrade olmuştur.

PAS proteini parçacıklarının fiziksel ve kimyasal özelliklerinin model sistemlerde belirlenmesi, kompleks gıda ürünlerinde kullanımını daha kolay hale getirecektir. Bu parçacıkların kefire kattığı fonksiyonel özellikler belirlenmiştir. Parçacıkların özellikleri, iki aşamalı emülsifikasyon yöntemiyle kolaylıkla belirlenebilmekte ve ayarlanabilmektedir. Bu aşama tamamlandıktan sonra endüstriyel kullanım için, daha büyük kesikli proses sistemleri ya da sürekli proses kullanılabilirse, parçacık üretimi ekonomik olarak daha avantajlı hale gelebilir. Örneğin, süper kritik CO<sub>2</sub> ekstraksiyon sistemi kullanılarak PAS proteini parçacığı üretimi gerçekleştirilirse, üretim yönteminden yağ fazı çıkartılarak ekonomik olarak büyük oranda bir avantaj sağlanabilir. Çünkü gıda sistemleri için kullanılan yağda ısıtılma sonrası oluşan trans yağ asitleri, bu yağın sınırlı kullanımına olanak vermektedir. Süper kritik CO<sub>2</sub> uygulamasında ise bu kısıtlama ortadan kalkacaktır. Ancak, parçacıkların yüzey özelliklerinin ayarlanması ve dispersiyon oluşturma potansiyelleri henüz süper kritik CO<sub>2</sub> uygulamasında düşük seviyededir. Bunlar geliştirilerek endüstriyel uygulamaların önü açılabilir.

PAS proteini parçacıkların fizikokimyasal özellikleri belirlenirken pH ve ısıya duyarlı oldukları bulunmuştur. pH değerine duyarlı olmaları, bu parçacıkların enkapsülasyon ve kontrollü salınım sistemlerinde kullanımını için büyük bir avantajdır. Parçacıkların ısı duyarlılıkları da viskozite artışının istendiği durumlarda teknolojik bir avantaja çevrilebilir. Gıda haricinde kozmetik ve farmasötik alanlarında da parçacıkların kullanımına olanak sağlayabilir.

PAS proteini parçacıkların kefirde kullanımında genel olarak tekno-fonksiyonel özellikleri incelenmiştir. Ancak duyusal özellikleri daha derinlemesine araştırılmalı, tadım denemeleri yapılmalıdır. İçeceklerde bulunan PAS proteinlerinin artan konsantrasyonlarda kumlu ve kötü bir tat bıraktığı bilinmektedir. Parçacık formları bu olumsuz özellikleri bir miktar engellese bile, gıda ürünlerinde tadım denemeleri yapılmalı, gerekli olduğu durumlarda da optimizasyon yapılmalıdır. Böylece parçacıkların, medikal içecekler ve sporcu beslenmesinde daha etkili bir şekilde yer alması sağlanabilir.

PAS proteini parçacıklarının farklı mikro-yapılarda üretilmesi halinde, farklı fonksiyonlara sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu iki parçacığın aynı sistemde birlikte kullanılması, sistemin fonksiyonel özelliklerini sinerjistik olarak arttırabilir. Örneğin, yüzey aktif özellikleri yumuşak PAS proteini parçacıklarıyla artarken; protein miktarı, viskozite dengelemesi gibi özellikler de yoğun PAS proteini parçacıklarıyla arttırılabilir.

Bu tez kapsamında, yüksek besinsel değere sahip PAS proteinlerinin tekno-fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi, ekonomik açıdan değerini arttıracak yeniliklerin önünü açmıştır. Gıda endüstrisi başta olmak üzere eczacılık, kozmetik, medikal içecekler gibi yenilikçi ve yüksek katma değerli ürünlerin üretilmesi için temel veriler elde edilmiştir. Bu veriler, yüksek protein içerikli gıda ürünlerinin geliştirilmesi için büyük bir potansiyel barındırmaktadır.

**KAYNAKLAR DİZİNİ**

- Adamczyk, Z. and Weronki, P.**, 1999, Application of the DLVO theory for particle deposition problems, *Advances in Colloid and Interface Science*, 83:137-226pp.
- Adelmann, H., Binks, B.P. and Mezzenga, R.**, 2012, Oil powders and gels from particle-stabilized emulsions, *Langmuir*, 28:1694-1697pp.
- Agarwal, P.P.K.**, 2017, Comparative study of the homogeneous and Janus particles at fluid-fluid interface, *International Journal of Innovative and Emerging Research in Engineering*, 4:12-24pp.
- Ahmed, E.M.**, 2015, Hydrogel: preparation, characterization, and applications: a review, *Journal of Advance Research*, 6:105–121pp.
- Akal, C., Türkmen, N. ve Koçak, C.**, 2016, Kefir üretiminde peyniraltı suyu kullanımı, *Gıda*, 41(5):351-357s.
- Akan, S. and Özdeştan Ocak, Ö.**, 2021, Influence of grape seed extract on suppression of biogenic amine accumulation, chemical and color traits of wet tarhana during fermentation, *Food Bioscience*, 42:101065p.
- Akdan, C., Kınık, Ö. ve İçier, F.**, 2020, Manda sütü ve diğer süt karışımlarıyla üretilen kefirlerin bazı özelliklerinin belirlenmesi, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, Özel Sayı:39-50s.
- Akin, Z. and Ozcan, T.**, 2017, Functional properties of fermented milk produced with plant proteins, *LWT-Food Science and Technology*, 86:25-30pp.
- van den Akker, C.C., Schlegler, M., Bonn, M. and Koenderink, G.H.**, 2014, Structural basis for the polymorphism of  $\beta$ -lactoglobulin amyloid-like fibrils (Chapter 31). Bio-nanoimaging, Protein Misfolding and Aggregation, 333-343pp.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Alting, A.C., de Jongh, H.H., Visschers, R.W. and Simons, J.W.**, 2002, Physical and chemical interactions in cold gelation of food proteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:4682-4689pp.
- Amorim, H.V., Basso, L.C., Crocomo, O.J. and Teixeira, A.A.**, 1977, Polyamines in green and roasted coffee, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25:957-958pp.
- Anderson, G.H. and Moore, S.E.**, 2004, Dietary proteins in the regulation of food intake and body weight in humans, *The Journal of Nutrition*, 134:974-979pp.
- Anema, S.G. and Li, Y.**, 2003, Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size, *Journal of Dairy Research*, 70:73-83pp.
- Anon.**, 2009., Türk Gıda Kodeksi, Fermente Süt Ürünleri Tebliği (Tebliğ No:2009/25), Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, T.C. Resmi Gazete, Sayı:27143.
- Ashokkumar, M., Lee, J., Zisu, B., Bhaskarcharya, R., Palmer, M. and Kentish, S.**, 2009, Hot topic: Sonication increases the heat stability of whey proteins, *Journal of Dairy Science*, 92:5353-5356pp.
- Baccouche, A., Ennouri, M., Felfoul, I. and Attia, H.**, 2013, A physical stability study of whey-based prickly pear beverages, *Food Hydrocolloids*, 33:234-244pp.
- Bardocz, S.**, 1995, Polyamines in food and their consequences for food quality and human health, *Trends in Food Science and Technology*, 6:341-346pp.
- Beelen, J., Vasse, E., Janssen, N., Janse, A., de Roos, N.M. and de Groot, L.C.P.G.M.**, 2018, Protein-enriched familiar foods and drinks improve protein intake of hospitalized older patients: A randomized controlled trial, *Clinical Nutrition*, 37(4):1186-1192pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Berezovets, V., Kytsya, A., Zavaliy, I. and Yattys, V.A.**, 2021, Kinetics and mechanism of  $MgH_2$  hydrolysis in  $MgCl_2$  solutions, *International Journal of Hydrogen Energy*, 10.1016/j.ijhydene.2021.09.249 (in press).
- Bertenshaw, E.J., Luch, A. and Yeomans, M.R.**, 2013, Perceived thickness and creaminess modulates the short-term satiating effects of high-protein drinks, *The British Journal of Nutrition*, 110(3):578-586pp.
- Bindal, S.K., Sethumadhavan, G., Nikolov, A.D., and Wasan, D.T.**, 2002, Foaming mechanisms in surfactant free particle suspensions, *American Institute of Chemical Engineers Journal*, 48:2307–2314pp.
- Binks, B.P. and Lumsdon, S.O.**, 2001, Pickering emulsions stabilized by monodisperse latex particles: effects of particle size, *Langmuir*, 17:4540-4547pp.
- Binks, B.P.**, 2002, Particles as surfactants – similarities and differences, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 7:21-41pp.
- Biologydictionary.net**                      **Editors**,                      2016,                      “Denature”,  
<https://biologydictionary.net/denature/> (Erişim tarihi: 16 Ekim 2021).
- Bird, R.B., Stewart, W.E. and Lightfoot, E.N.**, 2002, Transport Phenomena, 2<sup>nd</sup> Edition, John Wiley & Sons, Inc., United States, 58-61pp.
- Blazewicz, J., Likasiak, P. and Milostan, M.**, 2006, Some operations research methods for analyzing protein sequences and structures\*, *4OR*, 4:91-123pp.
- Blekas, G.A.**, 2016, Food Additives: Classification, Uses and Regulation, Encyclopedia of Food and Health, Academic Press, 731-736pp.
- Britten, M. and Lavoie, L.**, 1992, Foaming properties of proteins as affected by concentration, *Journal of Food Science*, 57:1219–1222pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Bjeldanes, L.F., Schutz, D.E. and Morris, M.M.**, 1978, On the aetiology of scombroid poisoning: Cadaverine potentiation of histamine toxicity in the guinea-pig, *Food and Cosmetics Toxicology*, 16:157–159pp.
- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Rosilio, V., Grossiord, J.L. and Agnely, F.**, 2012, Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field?, *International Journal of Pharmaceutics*, 436:359-378pp.
- Buchcic, C., Tromp, R.H., Meinders, M.B.J. and Cohen Stuart M.A.**, 2017, Harnessing the advantages of hard and soft colloids by the use of core-shell particles as interfacial stabilizers, *Soft Matter*, 13:1326–1334pp.
- Buran, İ., Akal, C., Ozturkoglu-Budak, S. and Yetişemiyen, A.**, 2021, Rheological, sensorial and volatile profiles of symbiotic kefir produced from cow and goat milk containing varied probiotics in combination with fructooligosaccharide, *LWT – Food Science and Technology*, 148:111591pp.
- Cao, T., Szilagyi, I., Oncsik T., Borkovec, M. and Trefalt, G.**, 2015, Aggregation of colloidal particles in the presence of multivalent co-ions: The inverse Schulze-Hardy rule, *Langmuir*, 31:6610–6614pp.
- Capozzi, V., Russo, P., Ladero, V., Fernandez, M., Fiocco, D., Alvarez, M.A., Grieco, F. and Spano, G.**, 2012, Biogenic amines degradation by *Lactobacillus plantarum*: toward a potential application in wine, *Frontiers in Microbiology*, 3:122-127pp.
- Cardellini, A., Fasano, M., Bigdeli, M.B., Chiavazzo, E. and Asinari, P.**, 2016, Thermal transport phenomena in nanoparticle suspensions, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 28:483003-17pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Carrasco F., Chornet E., Overend R.P. and Costa J.**, 1989, A generalized correlation for the viscosity of dextrans in aqueous solutions as a function of temperature, concentration, and molecular weight at low shear rates, *Journal of Applied Polymer Science*, 37:2087-2098pp.
- Chen, M., Bleeker, R., Sala, G., Meinders, M.B.J., van Valenberg, H.J.F., van Hooijdonk, A.C.M. and van der Linden, E.**, 2016, Particle size determines foam stability of casein micelle dispersions, *International Dairy Journal*, 56:151–158pp.
- Chevallier, M., Riaublanc, A., Lopez, C., Hamon, P., Rousseau, F., Thevenot, J. and Croguennec, T.**, 2018, Increasing heat stability of whey protein-rich emulsions by combining the functional role of WPM and caseins, *Food Hydrocolloids*, 76:164-172pp.
- Chungchunlam, S.M.S., Henare, S.J., Ganesh, S. and Moughan, P.J.**, 2017, Effects of whey protein and its two major protein components on satiety and food intake in normal-weight women, *Physiology and Behavior*, 175:113-118pp.
- Coisson, J.D., Cerutti, C., Travaglia, F. and Arlorio, M.**, 2004, Production of biogenic amines in "Salamini Italiani Alla Cacciatora PDO", *Meat Science*, 67:343-349pp.
- Corredig, M. and Dalgleish, D.G.**, 1996, Effect of temperature and pH on the interactions of whey proteins with casein micelles in skim milk, *Food Research International*, 29:49-55pp.
- Coutts, R.T., Baker, G.B. and Pasutto, F.M.**, 1986, Foodstuffs as sources of psychoactive amines and their precursors: Content, significance and identification, *Advances in Drug Research*, 15, 169-232pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Cueva, C., Garcia-Ruiz, A., Gonzalez-Rompinelli, E., Bartolome, B., Martin-Alvarez, P.J., Salazar, O., Vicente, M.F., Bills, G.F. and Moreno-Arribas, M.V.**, 2012, Degradation of biogenic amines by vineyard ecosystem fungi. Potential use in winemaking, *Journal of Applied Microbiology*, 112:672-682pp.
- Curtis, R.A. and Lue, L.**, 2006, A molecular approach to bioseparations: Protein–protein and protein–salt interactions, *Chemical Engineering Science*, 61:907–923pp.
- Custodio, F.B., Tavares, E. and Gloria, M.B.A.**, 2007, Extraction of bioactive amines from grated parmesan cheese using acid, alkaline and organic solvents, *Journal of Food Composition and Analysis*, 20:280-288pp.
- Dadakova, E., Krizek, M. and Pelikanova, T.**, 2009, Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC), *Food Chemistry*, 116:365–370pp.
- Damodaran, S.**, 2005, Protein stabilization of emulsion and foams, *Journal of Food Science*, 70:54–66pp.
- Dapkevicius, M.L.N.E., Nout, M.J.R., Rombouts, F.M., Houben, J.H. and Wymenga, W.**, 2000, Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms, *International Journal of Food Microbiology*, 57:107-114pp.
- Davis, B.A., Durden, D.A. and Boulton, A.A.**, 1986, Simultaneous analysis of twelve biogenic amine metabolites in plasma, cerebrospinal fluid and urine by capillary column gas chromatography – high-resolution mass spectrometry with selected-ion monitoring, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 374:227-238pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Davis, J.P. and Foegeding, E.A.**, 2004, Foaming and interfacial properties of polymerized whey protein isolate, *Journal of Food Science*, 69:404–410pp.
- Demircan, B. and Özdestan Ocak, Ö.**, 2021, The effects of ethyl lauroyl arginate and lemon essential oil added edible chitosan film coating on biogenic amines formation during storage in mackerel fillets, *Journal of Food Processing and Preservation*, 45:15454p.
- Destribats, M., Lapeyre, V., Wolfs, M., Sellier, E., Leal-Calderon, F., Ravaine, V. and Schmitt, V.**, 2011, Soft microgels as pickering emulsion stabilisers: role of particle deformability, *Soft Matter*, 7:7689–7698pp.
- Destribats, M., Rouvet, M., Gehin-Delval, C., Schmitt, C. and Binks, B.P.**, 2014, Emulsions stabilised by whey protein microgel particles: towards food-grade Pickering emulsions, *Soft Matter*, 10:6941-6954pp.
- Dickinson, E.**, 2009, Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers, *Food Hydrocolloids*, 23:1473-1482pp.
- Doan, C.D. and Ghosh, S.**, 2019, Formation and stability of pea proteins nanoparticles using ethanol-induced desolvation, *Nanomaterials*, 9(7):949-963.
- Dombrowski, J., Jöhler, F., Warncke, M. and Kulozik, U.**, 2016, Correlation between bulk characteristics of aggregated  $\beta$ -lactoglobulin and its surface and foaming properties, *Food Hydrocolloids*, 61:318–328pp.
- Dombrowski, J., Gschwendtner, M. and Kulozik, U.**, 2017 Evaluation of structural characteristics determining surface and foaming properties of  $\beta$ -lactoglobulin aggregates, *Colloids Surfaces A*, 516:286–295pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dordovic, V., Tosner, Z., Uchman, M., Zhigunov, A., Reza, M., Ruokolainen, J., Pramanik, G., Cigler, P., Kalikova, K., Gradzielski, M. and Matejicek, P.**, 2016, Stealth amphiphiles: self-assembly of polyhedral boron clusters, *Langmuir*, 32: 6713–6722pp.
- Drake, M.A., Chen, X.Q., Tamarapu, S. and Leenanon, B.**, 2000, Soy protein fortification affects sensory, chemical, and microbiological properties of dairy yogurts, *Journal of Food Science*, 65:1244-1247pp.
- Dumetz, A.C., Snellinger-O'brien, A.M., Kaler, E.W. and Lenhoff, A.M.**, 2007, Patterns of protein protein interactions in salt solutions and implications for protein crystallization, *Protein Science*, 16:1867–1877pp.
- Düz, M. ve Fidan, A.F.**, 2016, Biyojen aminler ve etkileri, *Kocatepe Veterinary Journal*, 9(2):114-121s.
- Elias, M., Laranjo, M., Agulheiro-Santos, A.C. and Potes, M.E.**, 2019, “The Role of Salt on Food and Human Health”, <https://www.intechopen.com/chapters/67709> (Erişim tarihi: 21 Ekim 2021).
- Ellis, R.J.**, 2001, Macromolecular crowding: obvious but underappreciated, *Trends in Biochemical Sciences*, 26(10):597-604pp.
- Elzoghby, A.O., Elgohary, M.M. and Kamel, N.M.**, 2015, Implications of protein- and peptide-based nanoparticles as potential vehicles for anticancer drugs (Chapter 6). *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 98:169-221pp.
- Ergin, F., Öz, G., Özmen, Ü., Erdal, Ş., Çanava, E. ve Küçükçetin, A.**, 2017, Sütün homojenizasyonunun kefirin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine etkisi, *Akademik Gıda*, 15(4):368-376s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Erol, T. and Özdestan Ocak, Ö.**, 2020, Influence of pomegranate seed extract on the formation of biogenic amines in a cereal based fermented food: Tarhana, *Journal of Food Science and Technology*, 57(12):4492-4500pp.
- Ersoy, M. ve Uysal, H.**, 2003, Süttozu, peyniraltı suyu tozu ve yayıkaltı karışımları ile üretilen kefirlerin özellikleri üzerine bir araştırma\* II. Bazı fiziksel ve duyuşal özellikler, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 40(1):79-86s.
- Fameau, A.L. and Salonen, A.**, 2014, Effect of particles and aggregated structures on the foam stability and aging, *Comptes Rendus Physique*, 15:748-760pp.
- Farrell, H.M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., Hicks, C.L., Hollar, C.M., Ng-Kwai-Hang, K.F. and Swaisgood, H.E.**, 2004, Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision, *Journal of Dairy Science*, 87:1641-1674pp.
- Fitzsimons, S.M., Mulvihill, D.M. and Morris, E.R.**, 2008, Large enhancements in thermogelation of whey protein isolate by incorporation of very low concentrations of guar gum, *Food Hydrocolloids*, 22:576–586pp.
- Foegeding, E.A., Luck, P.J. and Davis, J.P.**, 2006, Factors determining the physical properties of protein foams, *Food Hydrocolloids*, 20:284–292pp.
- Foegeding, E.A., Davis, J.P., Doucet, D. and McGuffey, M.K.**, 2002, Advances in modifying and understanding whey protein functionality, *Trends in Food Science and Technology*, 13:151-159pp.
- Folkertsma, B. and Fox, P.F.**, 1992, Use of the Cd-ninhydrin reagent to assess proteolysis in cheese during ripening, *Journal of Dairy Research*, 59:217–224pp.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Fringuelli, F., Pizzo, F. and Vaccaro, L.**, 2001, AlCl<sub>3</sub> as an efficient Lewis acid catalyst in water, *Tetrahedron Letters*, 42:1131–1133pp.
- Gao, Z., Zhao, J., Huang, Y., Yao, X., Zhang, K., Fang, Y., Nishinari, K., Phillips, G.O., Jiang, F. and Yang, H.**, 2017, Edible Pickering emulsion stabilized by protein fibrils. Part 1: Effects of pH and fibrils concentration, *LWT – Food Science and Technology*, 76:1-8pp.
- Garcia-Ruiz, A., González-Rompinelli, E.M., Bartolomé, B. and Moreno-Arribas, M.V.**, 2011, Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines, *International Journal of Food Microbiology*, 148:115–120pp.
- Ge, S., Kojio, K., Takahara, A. and Kajiyama, T.**, 1998, Bovine serum albumin adsorption onto immobilized organotrichlorosilane surface: influence of the phase separation on protein adsorption patterns, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 9:131–50pp.
- Gezginç, Y., Akyol, I., Kuley, E. and Özoğul, F.**, 2013, Biogenic amines formation in *Streptococcus thermophilus* isolated from home-made natural yogurt, *Food Chemistry*, 138:655–662pp.
- Ginsburg, A. and Carroll, W.R.**, 1965, Some specific ion effects on the conformation and thermal stability of ribonuclease, *Biochemistry*, 4:2159–2174pp.
- Glahn, P.E.**, 1982, Hydrocolloid stabilization of protein suspensions at low pH, *Progress in Food and Nutrition Science*, 6:171-177pp.
- Gloria, M.B.A.**, 2003, B. Encyclopedia of Food Science and Nutrition. Amines Editor: Trugo, C.L. and Finglas. P., Academic Press, London, 176-181pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Gul, O., Atalar, I., Mortas, M. and Dervisoglu, M.,** 2018, Rheological, textural, colour and sensorial properties of kefir produced with buffalo milk using kefir grains and starter culture: A comparison with cows' milk kefir, *International Journal of Dairy Technology*, 71:73-80pp.
- Gulao, E.S., Souza, C.J.F., Andrade, C.T. and Garcia-Rojas, E.E.,** 2016, Complex coacervates obtained from peptide leucine and gum Arabic: Formation and characterization, *Food Chemistry*, 194:680-686pp.
- Guldbrand, L., Jönsson, B., Wennerström, H. and Linse, P.,** 1984, Electrical double layer forces. A Monte Carlo study, *The Journal of Chemical Physics*, 80:2221–2228pp.
- Guo, M.R., Fox, P.F., Flynn, A. and Kindstedt, P.S.,** 1995, Susceptibility of beta-lactoglobulin and sodium caseinate to proteolysis by pepsin and trypsin, *Journal of Dairy Science*, 78:2336-2344pp.
- Guo, M. and Wang, G.,** 2016, Whey protein polymerisation and its applications in environmentally safe adhesives, *International Journal of Dairy Technology*, 69:481-488pp.
- Gursoy, O., Kocatürk, K., Güler Dal, H.Ö., Yakalı, H.N. ve Yilmaz, Y.,** 2020, Physicochemical and rheological properties of commercial kefir drinks, *Akademik Gıda*, 18(4):375-381s.
- Guzel-Seydim, Z., Wyffels, J.T., Seydim, A.C., and Greene, A.K.,** 2005, Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscobic observation, *International Journal of Dairy Technology*, 58 (1):25-29pp.
- Guzel-Seydim, Z.B., Kok-Tas, T., Greene, A.K. and Seydim, A.C.,** 2011a, Review: Functional properties of kefir, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(3):261-268pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Guzel-Seydim, Z., Kok-Tas, T., Ertekin-Filiz, B. and Seydim, A.C.**, 2011b, Effect of different growth conditions on biomass increase in kefir, *Journal of Dairy Science*, 94:1239-1242pp.
- Ha, E. and Zemel, M.B.**, 2003, Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review), *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14: 251-258pp.
- Haines, B.M. and Mazzucato, A.L.**, 2011, A proof of Einstein's effective viscosity for a dilute suspension of spheres, *Journal on Mathematical Analysis*, 44(3), 10.1137/100810319.
- Halasz, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L. and Holzapfel, W.**, 1994, Biogenic amines and their production by microorganisms in food, *Trends in Food Science and Technology*, 5:42-49pp.
- Halton, T.L. and Hu, F.B.**, 2004, The effects of high protein diets on thermogenesis, satiety and weight loss: A critical review, *Journal of American College of Nutrition*, 23:373-385pp.
- Hertzler, S.R. and Clancy, S.M.**, 2003, Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion, *Journal of the American Dietetic Association*, 103(5):582-587pp.
- Hoffman, R.L.**, 1998, Explanations for the cause of shear thickening in concentrated colloidal suspensions, *Journal of Rheology*, 42:111–123pp.
- Hoffmann, M.A. and van Mill, P.J.J.M.**, 1999, Heat-induced aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin as function of pH, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:1898-1905pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Hoffmann, H. and Reger, M.**, 2014, Emulsions with unique properties from proteins as emulsifiers, *Advances in Colloid and Interface Science*, 205:94-104pp.
- Hofmeister, F.**, 1888, On the understanding of the effects of salts, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 24:247-260pp.
- Hornero-Mendez, D. and Garrido-Fernandez, A.**, 1994, Biogenic amines in table olives: Analysis by High-Performance Liquid Chromatography, *Analyst*, 119:2037-2041pp.
- Hsu, J.P. and Kuo, Y.C.**, 1995, An extension of the Schulze-Hardy rule to asymmetric electrolytes, *Journal of Colloid and Interface Science*, 171:254–255pp.
- Hsu, J.P. and Liu, B.T.**, 1998, Effect of particle size on critical coagulation concentration, *Journal of Colloid and Interface Science*, 198:186–189pp.
- Huppertz, T.**, 2010, Foaming properties of milk: a review of the influence of composition and processing, *International Journal of Dairy Technology*, 63:477-488pp.
- Ikeda, S. and Foegeding, E.A.**, 1999, Dynamic viscoelastic properties of thermally induced whey protein isolate gels with added lecithin, *Food Hydrocolloids*, 13(3):245– 254pp.
- Innocente, N., Biasutti, M., Padovese, M. and Moret, S.**, 2007, Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract, *Food Chemistry*, 101:1285-1289pp.
- Inoue, M., Hashizaki, K., Tahuchi, H. and Satio, Y.**, 2008, Emulsion preparation using  $\beta$ -cyclodextrin and its derivatives acting as an emulsifier, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56(9):1335-1337pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- İdris, O.H.M., Williams, P.A. and Philips, G.O.**, 1998, Characterization of gum from Acacia senegal trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography, *Food Hydrocolloids*, 12:379-388pp.
- İnce Coşkun, A.E., Sağlam, D., Venema, P., van der Linden, E. and Scholten, E.**, 2015, Preparation, structure and stability of sodium caseinate and gelatin micro-particles, *Food Hydrocolloids*, 45:291-300pp.
- İnce Coşkun, A.E.**, 2020, Phase separation behaviour of whey protein isolate particle dispersions in the presence of xanthan, *Turkish Journal of Chemistry*, 44:1314-1326pp.
- İnce Coşkun, A.E. and Özdestan Ocak, Ö.**, 2020, Effects of salt ions and heating on the behaviour of whey protein particle dispersions, *Food Hydrocolloids*, 101:105433pp.
- İnce Coşkun, A.E. and Özdestan Ocak, Ö.**, 2021a, Foaming properties of different forms of caseins in aqueous systems, *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15:2275-2284pp.
- İnce Coşkun, A.E. and Özdestan Ocak, Ö.**, 2021b, Foaming behavior of colloidal whey protein isolate micro-particle dispersions, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 609:125660pp.
- Irigoyen, A., Arana, I., Castiella, M., Torre, P. and Ibanez, F.C.**, 2005, Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage, *Food Chemistry*, 90:613-620pp.
- Jain, K., Chauhan, K. and Bhatnagar, V.**, 2014, Development and quality evaluation of protein enriched fruit juices, *Food Science Research Journal*, 5(2):120-124pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Kang, J.S., Lim, J., Rho, W.Y., Kim, J., Moon, D.S., Jeong, J., Jung, D., Choi, J.W., Lee, J.K. and Sung, Y.E.**, 2016, Wrinkled silica/titania nanoparticles with tunable interwrinkle distances for efficient utilization of photons in dye-sensitized solar cells, *Scientific Reports*, 6:30929pp.

**Kang, B., Tang, H., Zhao, Z. and Song, S.**, 2020, Hofmeister series: Insight of ion specificity from amphiphilic assembly and interface property, *ACS Omega*, 5(12):6229-6239pp.

**Kao, Y.H., Fitch, C.A., Bhattacharya, S., Sarkisian, C.J., Lecomte, J.T.J. and Garcia- Moreno, E.B.**, 2000, Salt effects on ionization equilibria of histidines in myoglobin, *Biophysical Journal*, 79:1637-1654pp.

**Karpas, Z., Tilman, B., Gdalevsky, R. and Lorber, A.**, 2002, Determination of volatile biogenic amines in muscle food products by ion mobility spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 463:155-163pp.

**Kehoe, J.J. and Foegeding, A.**, 2011, Interaction between  $\beta$ -casein and whey proteins as a function of pH and salt concentration, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59:349-355pp.

**Kelly, P., Woonton, B.W. and Smithers, G.W.**, 2009, Improving the sensory quality, shelf-life and functionality of milk (Chapter 8). *Functional and Speciality Beverage Technology*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 170-231pp.

**Kim, J.H., Ahn, H.J., Jo, C., Park, H.J., Chung, Y.J. and Byun, M.W.**, 2004, Radiolysis of biogenic amines in model system by gamma irradiation, *Food Control*, 15:405-408pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Kirschbaum, J., Luckas, B. and Beinert, W.D.**, 1994, Pre-column derivatization of biogenic amines and amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and heptylamine, *Journal of Chromatography A*, 661:193-196pp.
- Klein, M., Aserin, A., Ishai, P.B. and Garti, N.**, 2010, Interactions between whey protein isolate and gum Arabic, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79:377–383pp.
- Kohonen, M.M., Karaman, M.E. and Pashley, R.M.**, 2000, Debye length in multivalent electrolyte solutions, *Langmuir*, 16:5749–5753pp.
- Koop, J., Merz, J. and Schembecker, G.**, 2021, Hydrophobicity, amphiphilicity, and flexibility: Relation between molecular protein properties and the macroscopic effects of surface activity, *Journal of Biotechnology*, 334:11-25pp.
- Kovacs, A., Simon-Sarkadi, L. and Ganzler, K.**, 1999, Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 863(2):305-313pp.
- de Kruif, C.G. and Tuinier, R.**, 2001, Polysaccharide protein interactions, *Food Hydrocolloids*, 15:555–563pp.
- de Kruif, C.G., Weinbreck, F. and de Vries, R.**, 2004, Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 9:340–349pp.
- de Kruif, C.G.**, 2012, Milk nanotubes: technology and potential applications (Chapter 14). *Nanotechnology in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 398-412pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Lam, S., Velikov, K.P. and Velev, O.D.**, 2014, Pickering stabilization of foams and emulsions with particles of biological origin, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 19:490–500pp.
- Lapa-Guimaraes, J. and Pickova, J.**, 2004, New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid, *Journal of Chromatography A*, 1045:223-232pp.
- Latner, J.D. and Schwartz, M.**, 1999, The effects of a high-carbohydrate, high-protein or balanced lunch upon later food intake and hunger ratings, *Appetite*, 33(1):119-128pp.
- Lazidis, A., Hancocks, R.D., Spyropoulos, F., Kreuß, M., Berrocal, R. and Norton, I.T.**, 2016, Whey protein fluid gels for the stabilisation of foams, *Food Hydrocolloids*, 53:209-217pp.
- Lee, W.J. and Lucey, J.A.**, 2004, Structure and physical properties of yogurt gels: Effect of inoculation rate and incubation temperature, *Journal of Dairy Science*, 87:3153-3164pp.
- Lee, R., Stack, K., Richardson, D., Lewis, T. and Garnier, G.**, 2012, Multi-salt coagulation of soft pitch colloids, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 409:74–80pp.
- van Leeuwen, Y.M., Velikov, K.P. and Kegel, W.K.**, 2012, Stabilization through precipitation in a system of colloidal iron(III) pyrophosphate salts, *Journal of Colloidal and Interface Science*, 381:43-47pp.
- Leite, F.L., Bueno, C.C., Da Roz, A.L., Ziemath, E.C. and Olivera, O.N.Jr.**, 2012, Theoretical models for surface forces and adhesion and their measurement using atomic force microscopy, *International Journal of Molecular Sciences*, 13:12773–12856pp.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Leng, P.Q., Zhao, F.L., Yin, B.C. and Ye, B.C.**, 2015, A novel, colorimetric method for biogenic amine detection based on arylalkylamine N-acetyltransferase, *Chemical Communications*, 51:8712-8714pp.
- Li, X., Meng, J., Zeng, Q., Xiong, X., Ren, X. and Kong, Q.**, 2021, Biogenic amines content changes during storage and establishment of shelf life prediction model of red bean curd, *Journal of Food Safety*, 41:12885-12895pp.
- Linke, C. and Drusch, S.**, 2018, Pickering emulsions in foods – opportunities and limitations, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58:1971-1985pp.
- Longworth, L.G. and Jacobsen, C.F.**, 1949, An electrophoretic study of the binding of salt ions by  $\beta$ -Lactoglobulin and bovine serum albumin, *The Journal of Physical and Colloid Chemistry*, 53:126–134pp.
- Lopez, M.J. and Mohiuddin, S.S.**, 2021, “Biochemistry, Essential Amino Acids”, StatPearls Publishing, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557845/> (Erişim tarihi: 25 Ekim 2021).
- Lu K.W., Pérez-Gil J. and Tausch H.W.**, 2009, Kinematic viscosity of therapeutic pulmonary surfactants with added polymers, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788:632-637pp.
- Lucey, J.A., Tamehana, M., Singh, H. and Munro, P.A.**, 1999, Stability of model acid milk beverage: Effect of pectin concentration, storage temperature and milk heat treatment, *Journal of Texture Studies*, 30:305-318pp.
- Lyklema, J.**, 2014, Coagulation by simple multivalent counterions, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 460:468-472pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Mafra, I., Herbert, P., Santos, L., Barros, P., Alves, A.,** 1999, Evaluation of biogenic amines in some Portuguese quality wines by HPLC fluorescence detection of OPA derivatives, *American Journal of Enology and Viticulture*, 50:128-132pp.
- Maindarkar, S.N., Bongers, P. and Henson, M.A.,** 2013, Predicting the effects of surfactant coverage on drop size distributions of homogenized emulsions, *Chemical Engineering Science*, 89(15):102-114.
- Maphosa, Y. and Jideani, V.A.,** 2018, “*Factors Affecting the Stability of Emulsions Stabilised by Biopolymers*”, <https://www.intechopen.com/chapters/60140> (Erişim tarihi: 17 Ekim 2021).
- Maranzano, B.J. and Wagner, N.J.,** 2001, The effects of interparticle interactions and particle size on reversible shear thickening: Hard-sphere colloidal dispersions, *Journal of Rheology*, 45:1205–1222pp.
- Marco, C. and Rosell, C.M.,** 2008a, Functional and rheological properties of protein enriched gluten free composite flours, *Journal of Food Engineering*, 88(1): 97-103pp.
- Marco, C. and Rosell, C.M.,** 2008b, Breadmaking performance of protein enriched, gluten-free breads, *European Food Research and Technology*, 227:1205-1213pp.
- Marinova, K.G., Basheva, E.S., Nenova, B., Temelska, M., Mirarefi, A.Y., Campbell, B. and Ivanov, I.B.,** 2009, Physico-chemical factors controlling the foamability and foamstability of milk proteins: sodium caseinate and whey protein concentrates, *Food Hydrocolloids*, 23:1864–1876pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Marks Rupp, H.S. and Anderson, C.R.**, 2005, Determination of putrescine and cadaverine in seafood (finfish and shellfish) by liquid chromatography using pyrene excimer fluorescence, *Journal of Chromatography A*, 1094:60–69pp.
- Martini, D., Brusamolino, A., Bo, C.D., Laureati, M., Porrini, M. and Riso, P.**, 2018, Effect of fiber and protein-enriched pasta formulations on satiety-related sensations and afternoon snacking in Italian healthy female subjects, *Physiology and Behaviour*, 185:61-69pp.
- Martuscelli, M., Gardini, F., Torriani, S., Mastrocola, D., Serio, A., Chaves-Lopez, C., Schirone, M. and Suzzi, G.**, 2005, Production of biogenic amines during the ripening of pecorino Abruzzese cheese, *International Dairy Journal*, 15:571-578pp.
- Masutani, E.M., Kinoshita, C.K., Tanaka, T.T., Ellison, A.K.D. and Yoza, B.A.**, 2014, Increasing thermal stability of gelatin by UV-induced cross-linking with glucose, *International Journal of Biomaterials*, 979636-9pp.
- Matsumiya, K. and Murray, B.S.**, 2016, Soybean protein isolate gel particles as foaming and emulsifying agents, *Food Hydrocolloids*, 60:206-215pp.
- Maubois, J.L. and Lorient, D.**, 2016, Dairy proteins and soy proteins in infant foods nitrogen-to-protein conversion factors, *Dairy Science and Technology*, 96(1):15-25pp.
- Mayr, C.M. and Schieberle, P.**, 2012, Development of stable isotope dilution assays for the simultaneous quantitation of biogenic amines and polyamines in foods by LC-MS/ MS, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 60:3026–3032pp.
- McClements, D.J.**, 2015, Emulsion stability. Food emulsions, principles, practices, and techniques, Boca Raton: CRC press, 289–382pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Mehalebi, S., Nicolai, T. and Durand, D.**, 2008, Light scattering study of heat-denatured globular protein aggregates, *International Journal of Biological Macromolecules*, 43:129-135pp.
- Mennah-Govela, Y.A., Singh, R.P. and Bornhort, G.M.**, 2019, Buffering capacity of protein-based model food systems in the context of gastric digestion, *Food & Function*, 10:6074-6087pp.
- Metcalf, I.M. and Healy, T.W.**, 1990, Charge-regulation modelling of the Schulze-Hardy rule and related coagulation effects, *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 90:335–344pp.
- Metin, C., Bonnecaze, R., Lake, L., Miranda, C. and Nguyen, Q.**, 2014, Aggregation kinetics and shear rheology of aqueous silica suspensions, *Applied Nanoscience*, 4:169–178pp.
- Miao, J., Liu, G., Ke, C., Fan, W., Li, C., Chen, Y., Dixon, W., Song, M., Cao, Y. and Xiao, H.**, 2016, Inhibitory effects of a novel antimicrobial peptide from kefir against *Escherichia coli*, *Food Control*, 65:63-72pp.
- Moro, A., Baez, G.D., Busti, P.A., Ballerini, G.A. and Delorenzi, N.J.**, 2011, Effect of heat-treated  $\beta$ -lactoglobulin and its aggregates on foaming properties, *Food Hydrocolloids*, 25:1009-1015pp.
- Mounsey, J.S. and O'Kennedy, B.T.**, 2010, Heat-stabilisation of  $\beta$ -lactoglobulin through interaction with sodium caseinate, *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 65(1):79– 83pp.
- Moura, A.C.T., Martins, A.D.O., Martins, E.M.F., Silva, V.R.O., Silva, R.R. and Cruz, W.F.**, 2021, *In vitro* resistance of lactic acid bacteria carried in kefir appetizer enriched with agroindustrial by-products, *LWT- Food Science and Technology*, 139:110519p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Murray, B.S. and Ettelaie, R.**, 2004, Foam stability: proteins and nanoparticles, *Current Opinion in Colloids and Interface Science*, 9:314-320pp.
- Nazir, M., Arif, S., Khan, R.S., Nazir, W., Khalid, N. and Maqsood, A.**, 2019, Opportunities and challenges for functional and medicinal beverages: Current and future trends, *Trends in Food Science and Technology*, 88:513-526pp.
- Neu, B. and Meiselman, H.J.**, 2006, Depletion interactions in polymer solutions promote red blood cell adhesion to albumin-coated surfaces, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- General Subjects*, 1760(12):1772-1779pp.
- Nichols, G., Byard, S., Bloxham, M.J., Botterill, J., Dawson, N.J., Dennis, A., Diart, V., North, N.C. and Sherwood, J.D.**, 2002, A review of the terms agglomerate and aggregate with a recommendation for nomenclature used in powder and particle characterization, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(10):2103-2109pp.
- Nicolai, T. and Durand, D.**, 2013, Controlled food protein aggregation for new functionality, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 18:249-256pp.
- Nivala, O., Mäkinen, O.E., Kruus, K., Nordlund, E. and Ercili-Cura, D.**, 2017, Structuring colloidal oat and faba bean protein particles via enzymatic modification, *Food Chemistry*, 231:87-95pp.
- Oppermann, A.K.L., Rensen, M., Schuch, A., Stieger, M. and Scholten, E.**, 2015, Effect of gelation of inner dispersed phase on stability of (w1/o/w2) multiple emulsions, *Food Hydrocolloids*, 48:17-26pp.
- Overbeek, J.T.G.**, 1980, The rule of Schulze and Hardy, *Pure and Applied Chemistry*, 52:1151-1161pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Önal, A.**, 2007, A Review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods, *Food Chemistry*, 103:1475-1486pp.
- Özdemir, S. ve Bodur, A.E.**, 1994, Yoğurt üretimi sırasında oluşan fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal olaylar, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25:479-487s.
- Özdestan, Ö., Alpözen, E., Güven, G. and Üren, A.**, 2012, Monitoring of biogenic amines in kumru: A traditional fermented cereal food, *International Journal of Food Properties*, 15:972-981pp.
- Özdestan, Ö. and Üren, A.**, 2010a. Biogenic amine content of kefir: a fermented dairy product, *European Food Research and Technology*, 231:101-107pp.
- Özdestan, Ö. and Üren, A.**, 2010b. Biogenic amine content of shalgam (şalgam): A traditional lactic acid fermented Turkish beverage, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58:2602-2608pp.
- Özdestan, Ö. and Üren, A.**, 2009, A method for benzoyl chloride derivatization of biogenic amines for high performance liquid chromatography, *Talanta*, 78:1321-1326pp.
- Pace, C.N., Grimsley, G.R. and Scholtz, J.M.**, 2009, Protein ionizable groups: pK values and their contribution to protein stability and solubility, *Journal of Biological Chemistry*, 284:13285-13289pp.
- Pal, R.**, 2016, Fundamental rheology of disperse systems based on single-particle mechanics, *Fluids*, 1(4):40-88pp.
- Palumbo, G., Kollbek, K., Wirecka, R., Bernasik, A. and Gorny, M.**, 2020, Effect of CO<sub>2</sub> partial pressure on the corrosion inhibition of N80 carbon steel by gum Arabic in a CO<sub>2</sub>-water saline environment for shale oil and gas industry, *Materials*, 13:4245-4568pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Parente, E., Martuscelli, M., Gadrini, F., Grieco, S., Crudele, M.A. and Suzzi, G.**, 2001, Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in southern Italy, *Journal of Applied Microbiology*, 90:882-891pp.
- Parola, A. and Reatto, L.**, 2015, Depletion interaction between spheres of unequal size and demixing in binary mixtures of colloids, *Molecular Physics*, 113(17-18):2571-2582pp.
- Pena-Gallego, A., Hernandez-Orte, P., Cacho, J. and Ferreira, V.**, 2009, Biogenic amine determination in wines using solid-phase extraction: A comparative study, *Journal of Chromatography A*, 1216:3398-3401pp.
- Picard, C., Garrigue, P., Tatry, M.C., Lapeyre, V., Ravaine, S., Schmitt, V. and Ravaine, V.**, 2017, Organization of microgels at the air-water interface under compression: role of electrostatics and cross-linking density, *Langmuir*, 33:7968-7981pp.
- Pickering, S.U.**, 1907, Emulsions, *Journal of the Chemical Society*, 91:2001-2021pp.
- Plakidi, E.S., Maragou, N.C., Dasenaki, M.E., Megoulas, N.C., Koupparis, M.A. and Thomaidis, N.S.**, 2020, Liquid chromatographic determination of biogenic amines in fish based on pyrene sulfonyl chloride pre-column derivatization, *Foods*, 9:609-628pp.
- Poggi, E. and Gohy, J.F.**, 2017, Janus particles: from synthesis to application, *Colloid and Polymer Science*, 295:2083-2108pp.
- Poon, W.C., Weeks, E.R. and Royall, C.P.**, 2012, On measuring colloidal volume fractions, *Soft Matter*, 8:21-30pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Poppitt, S.D., Proctor, J., McGill, A.T., Wiessing, K.R., Falk, S., Xin, L., Budgett, S.C., Darragh, A. and Hall, R.S.**, 2011, Low-dose whey protein-enriched water beverages alter satiety in a study of overweight women, *Appetite*, 56(2):456-464pp.
- Proestos, C., Loukatos, P. and Komaitis, M.**, 2008, Determination of biogenic amines in wines by HPLC with precolumn dansylation and fluorimetric detection, *Food Chemistry*, 106:1218-1224pp.
- Rabie, M.A., Elsaïdy, S., el-Badawy, A.A., Siliha, H. and Malcata, X.**, 2011, Biogenic amine contents in selected Egyptian fermented foods as determined by ion-exchange chromatography, *Journal of Food Protection*, 74(4):681-685.
- Rahaman, T., Vasiljevic, T. and Ramchandran, L.**, 2017, Digestibility and antigenicity of  $\beta$ -lactoglobulin as affected by heat, pH and applied shear, *Food Chemistry*, 217:517-523pp.
- Rayner, M., Marku, D., Eriksson, M., Sjöo, M., Dejmeck, P. and Wahlgren, M.**, 2014, Biomass-based particles for the formulation of Pickering type emulsions in food and topical applications, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 458:48-62pp.
- Remeuf, F., Mohammed, S., Sodini, I. and Tissier, J.P.**, 2003, Preliminary observations on the effects of milk fortification and heating on microstructure and physical properties of stirred yogurt, *International Dairy Journal*, 13:773-782pp.
- Reis, S.A., Conceição, L.L., Dias, M.M., Siqueira, N.P., Rosa, D.D., Oliveira, L.L., Matta, S.L.P. and Peluzio, M.C.G.**, 2019, Kefir reduces the incidence of pre-neoplastic lesions in an animal model for colorectal cancer, *Journal of Functional Foods*, 53:1-6pp.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Regnier, F.E.**, 1987, The role of protein structure in chromatographic behavior, *Science*, 238:319-323pp.
- Rich, L.M. and Foegeding, E.A.**, 2000, Effects of sugars on whey protein isolate gelation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10):5046– 52pp.
- Roosen-Runge, F., Heck, B.S., Zhang, F., Kohlbacher, O. and Schreiber, F.**, 2013, Interplay of pH and binding of multivalent metal ions: Charge inversion and reentrant condensation in protein solutions, *Journal of Physical Chemistry B*, 117:5777–5787pp.
- Roseiro, C., Santos, C., Sol, M., Silva, L. and Fernandes, I.**, 2006, Prevalence of biogenic amines during ripening of a traditional dry fermented pork sausage and its relation to the amount of sodium chloride added, *Meat Science*, 74:557-563pp.
- Roth, C.M., Neal, B.L. and Lenhoff, A.M.**, 1996, Van der Waals interactions involving proteins, *Biophysical Journal*, 70:977–987pp.
- Roy, S., Javid, N., Sefcik, J., Halling, P. and Ulijn, R.**, 2012, Salt-induced control of supramolecular order in biocatalytic hydrogelation, *Langmuir*, 28:16664–16670pp.
- Rullier, B., Novales, B. and Axelos, M.A.V.**, 2008, Effect of protein aggregates on foaming properties of  $\beta$ -lactoglobulin, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 330:96–102pp.
- Ruis, H.G.M., Venema, P. and van der Linden, E.**, 2007, Relation between pH-induced stickiness and gelation behaviour of sodium caseinate aggregates as determined by light scattering and rheology, *Food Hydrocolloids*, 21:545-554pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Ruiz-Capillas, C. and Herrero, M.**, 2019, Impact of biogenic amines on food quality and safety, *Foods*, 8:62-77pp.
- Sady, M., Domagala, J., Najgebauer-Lejko, D. and Grega, T.**, 2009, Effect of whey protein concentrate addition on texture and rheological properties of kefir produced from skimmed milk, *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25(5-6):763-771pp.
- Sagis, L.M.C. and Scholten, E.**, 2014, Complex interfaces in food: Structure and mechanical properties, *Trends in Food Science and Technology*, 37:59-71pp.
- Sağlam, D., Venema, P., de Vries, R., Sagis, L.M.C. and van der Linden, E.**, 2011, Preparation of high protein micro-particles using two-step emulsification, *Food Hydrocolloids*, 25:1139-1148pp.
- Sağlam, D.**, 2012, Design and Functionality of Dense Protein Particles, PhD Thesis, Wageningen University, 3p.
- Sağlam, D., Venema P., de Vries R., van Aelst, A. and van der Linden, E.**, 2012, Relation between gelation conditions and the physical properties of whey protein particles, *Langmuir*, 28:6551-6560pp.
- Sağlam, D., Venema, P., de Vries, R., Shi, J. and van der Linden, E.**, 2013a, Concentrated whey protein particle dispersions: Heat stability and rheological properties, *Food Hydrocolloids*, 30:100-109pp.
- Sağlam, D., Venema, P., de Vries, R. and van der Linden, E.**, 2013b, The influence of pH and ionic strength on the swelling of dense protein particles, *Soft Matter*, 9:4598-4606pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Saha, D. and Bhattacharya, S.**, 2010, Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review, *Journal of Food Science and Technology*, 47(6):587-597pp.
- Saint-Jalmes, A., Peugeot, M.L., Ferraz, H. and Langevin, D.**, 2005, Differences between protein and surfactant foams: microscopic properties, stability and coarsening, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 263:219–225pp.
- Saka, E.E. ve Güler, C.**, 2006, The effects of electrolyte concentration, ion species and pH on the zeta potential and electrokinetic charge density of montmorillonite, *Clay Minerals*, 41:853–861pp.
- San-Miguel, A. and Behrens, S.H.**, 2012, Influence of nanoscale particle roughness on the stability of Pickering emulsions, *Langmuir*, 28:12038-12043pp.
- Sano, M., Kamino, A. and Shinkai, S.**, 2000, Critical coagulation of Langmuir monolayers: 2D Schulze-Hardy rule, *The Journal of Physical Chemistry B*, 104:10339–10347pp.
- Sarıca, E., Filizkiran, G., Canbek, D., Ertürk, B., Coşkun M. ve Mustuloğlu, Ş.**, 2021, Keçiyoynuzu gamının keçi sütünden üretilen kefirin fizikokimyasal ve duyuşsal özellikleri üzerine etkisi, *Akademik Gıda*, 19(1):28-37s.
- Sauer, A. and Moraru, C.I.**, 2012, Heat stability of micellar casein concentrates as affected by temperature and pH, *Journal of Dairy Science*, 95:6339-6350pp.
- Schmidt, I., Novales, B., Boue, F. and Axelos, M.A.V.**, 2010, Foaming properties of protein/pectin electrostatic complexes and foam structure at nanoscale, *Journal of Colloid and Interface Science*, 345:316–324pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Schwenzfeier, A., Lech, F., Wierenga, P.A., Eppink, M.H.M. and Gruppen, H.**, 2013, Foam properties of algae soluble protein isolate: effect of pH and ionic strength, *Food Hydrocolloids*, 33:111–117pp.
- Serfert, Y., Lamprecht, C., Tan, C.P., Keppler, J.K., Appel, E., Rossier-Miranda, F. J., Schroen, K., Boom, R.M., Gorb, S., Selhuber-Unkel, C., Drusch, S. and Schwarz, K.**, 2014, Characterisation and use of  $\beta$ -lactoglobulin fibrils for microencapsulation of lipophilic ingredients and oxidative stability thereof, *Journal of Food Engineering*, 143:53-61pp.
- Setyawardani, T., Sumarmono, J. and Widayaka, K.**, 2020, Physical and microstructural characteristics of kefir made of milk and colostrum, *Bulletin of Animal Science*, 44(1):43-49pp.
- Sezer, Ç.**, 2003, Kefirdeki Laktik Asit Bakterilerinin Tür Düzeyinde Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 19-20s.
- Shah, F.H., Sharif, M.K., Butt, M.S. and Shahid, M.**, 2017, Development of protein, dietary fiber, and micronutrient enriched extruded corn snacks, *Journal of Texture Studies*, 48:221-230pp.
- Shalaby, A.R.**, 1996, Significance of biogenic amines to food safety and human health, *Food Research International*, 29:675-690pp.
- da Silva Ghizi, A.C., de Almeida Silva, M., de Andrade Moraes, F.S., da Silva, C.L., Endringer, D.C., Scherer, R., Lenz, D., de Lima, E.M., Brasil, G.A., Maia, J. F., Bissoli, N.S. and de Andrade, T.U.**, 2021, Kefir improves blood parameters and reduces cardiovascular risks in patients with metabolic syndrome, *PharmaNutrition*, 16:100266p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Singh, A.K. and Nath, N.**, 2004, Development and evaluation of whey protein enriched bael fruit (*Aegle marmelos*) beverage, *Journal of Food Science and Technology*, 41:432-436pp.
- Singh, T.K., Oiseth, S.K., Lundin, L. and Day, L.**, 2014, Influence of heat and shear induced protein aggregation on the in vitro digestion rate of whey proteins, *Food & Function*, 5:2689-2698pp.
- Skopinska-Wisniewska, J., Tuszyńska, M. and Olewnik-Kruszkowska, E.**, 2021, Comparative study of gelatin hydrogels modified by various cross-linking agents, *Materials*, 14:396-410pp.
- Spotti, M.J., Perduca, M.J., Piagentini, A., Santiago, L.G., Rubiolo, A.C. and Carrara, C.R.**, 2013, Gel mechanical properties of milk whey protein-dextran conjugates obtained by Maillard reaction, *Food Hydrocolloids*, 31:26-32pp.
- Spotti, M.J., Martinez, M.J., Pilosof, A.M.R., Candiotti, M., Rubiolo, A.C. and Carrara, C.R.**, 2014, Rheological properties of whey protein and dextran conjugates at different reaction times, *Food Hydrocolloids*, 38:76-84pp.
- Squire, J.M. and Parry, D.A.D.**, 2017, Fibrous Protein Structures: Hierarchy, History and Heros, In Parry, D.A.D and Squire, J.M (Eds), *Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms, Subcellular Biochemistry*, Springer, Cham, 82: 1-33pp.
- Stagg, L., Zhang, S.Q., Cheung, M.S. and Wittung-Stafshede, P.**, 2007, Molecular crowding enhances native structure and stability of  $\alpha/\beta$  protein flavodoxin, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104:18976–18981pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Stratton, J.E., Hutkins, R.W. and Taylors, S.L.**, 1991, Biogenic amines in cheese and other fermented foods: A review, *Journal of Food Protection*, 54:460-470pp.
- Stüber, A.S., Lesmes, U., Heinz, V., Rauh, C., Shpigelman, A. and Aganovic, K.**, 2019, Digestibility, antioxidative activity and stability of plant protein-rich products after processing and formulation with polyphenol-rich juices: kale and kale-strawberry as a model, *European Food Research and Technology*, 245:2499-2514pp.
- Style, R.W., Isa, L. and Dufresne, E.R.**, 2015, Adsorption of soft particles at fluid interfaces, *Soft Matter*, 11:7412-7419pp.
- Sullivan, S.T., Khan, S.A. and Eissa, A.S.**, 2009, Whey proteins: functionality and foaming under acidic conditions, In Onwulata, C.I. and Huth, P.J. (Eds.), *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 99–132pp.
- Sunde, M. and Blake, C.C.F.**, 1998, From the globular to the fibrous state: protein structure and structural conversion in amyloid formation, *Reviews of Biophysics*, 31:1-39pp.
- Swann, J., Bras, W., Topham, P., Howse, J. and Ryan, A.**, 2010, Effect of the Hofmeister anions upon the swelling of a self-assembled pH-responsive hydrogel, *Langmuir*, 26:10191–10197pp.
- Szilagyi, I., Polomska, A., Citherlet, D., Sadeghpour, A. and Borkovec, M.**, 2013, Charging and aggregation of negatively charged colloidal latex particles in the presence of multivalent oligoamine cations, *Journal of Colloid and Interface Science*, 392:34–41pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Szilagyi, I., Szabo, T., Desert, A., Trefalt, G., Oncsik, T. and Borkovec, M.,** 2014, Particle aggregation mechanisms in ionic liquids, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16:9515–9524pp.
- Şimşek, Ş., El, S.N., Kancabaş Kılınc, A. and Karakaya, S.,** 2014, Vegetable and fermented vegetable juices containing germinated seeds and sprouts of lentil and cowpea, *Food Chemistry*, 156:289-298pp.
- Tan, Y., Xu, K., Liu, C., Li, Y., Lu, C. and Wang, P,** 2012, Fabrication of starch-based nanospheres to stabilize Pickering emulsion, *Carbohydrate Polymer*, 88:1358-1363pp.
- Tavernier, I., Wijaya, W., van der Meeren, P., Dewettinck, K. and Patel, A.R.,** 2016, Food-grade particles for emulsion stabilization, *Trends in Food Science and Technology*, 50:159-174pp.
- Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L.J. and Huis In't Veld, J.H.J.,** 1990, Occurrence and formation of biologically active amines in foods, *International Journal of Food Microbiology*, 11:73-84pp.
- Tim, H.,** 2002, Sodium Technological functions of salt in the manufacturing of food and drink products, *British Food Journal*, 104:126–152pp.
- Trefalt, G.,** 2016, Derivation of the inverse Schulze-Hardy rule, *Physical Review E*, 93:032612pp.
- Trefalt, G., Szilagyi, I., Tellez, G. and Borkovec, M.,** 2017, Colloidal stability in asymmetric electrolytes: Modifications of the Schulze-Hardy rule, *Langmuir*, 33:1695–1704pp.
- Tsai, Y.H., Lin, C.Y., Chang, S.C., Chen, H.C., Kung, H.S., Wei, C.I. and Hwang, D.F.,** 2005a, Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in salted mackerel in Taiwan, *Food Microbiology*, 22:461-467pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Tsai, Y.H., Kung, H.F., Lee, T.M., Chen, H.W., Chou, S.S., Wei, C.I. and Hwang, D.F.**, 2005b, Determination of histamine in canned mackerel implicated in food borne poisoning, *Food Control*, 16:579-585pp.
- Turan, D., Gibis, M., Gunes, G., Baier, S.K. and Weiss, J.**, 2018, The impact of the molecular weight of dextran on formation of whey protein isolate (WPI)-dextran conjugates in fibers produced by needleless electrospinning after annealing, *Food & Function*, 9:2193-2200pp.
- Tzoumaki, M.V., Karefyllakis, D., Moschakis, T., Biliaderis, C.G. and Scholten, E.**, 2015, Aqueous foams stabilized by chitin nanocrystals, *Soft Matter*, 11:6245–6253pp.
- Ünal, F.G.**, 2013, Kuru Madde Oranları Farklı Sütlerden Starter Kültür ve Dane ile Üretilen Set Tipi Kefirlerin Duyusal, Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 36-40s.
- Velev, O.D., Campbell, B.E. and Borwankar, R.P.**, 1998, Effect of calcium ions and environmental conditions on the properties of  $\beta$ -casein stabilized films and emulsions, *Langmuir*, 14:4122-4130pp.
- Velikov, K.P., Durst, F. and Velev, O.D.**, 1998, Direct observation of the dynamics of latex particles confined inside thinning water-air films, *Langmuir*, 14:1148-1155pp.
- Verwey, E.J.W.**, 1947, Theory of the stability of lyophobic colloids, *The Journal of Physical and Colloid Chemistry*, 51:631-636pp.
- Vignati, E., Piazza, R. and Lockhart, T.P.**, 2003, Pickering emulsions: Interfacial tension, colloidal layer morphology, and trapped-particle motion, *Langmuir*, 19:6650-6656pp.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Vlachy, N., Jagoda-Cwiklik, B., Vacha, R., Touraud, D., Jungwirth, P. and Kunz, W.**, 2009, Hofmeister series and specific interactions of charged headgroups with aqueous ions, *Advances in Colloid and Interface Science*, 146:42–47pp.
- Wang, J., Navicha, W.B., Na, X., Ma, W., Xu, X., Wu, C. and Du, M.**, 2021a, Preheat-induced soy protein particles with tunable heat stability, *Food Chemistry*, 336:127624p.
- Wang, H., Wang, C. and Guo, M.**, 2021b, Impact of polymerized whey protein/pectin thickening (PP) system on physical properties and volatile compounds of goat milk kefir mild and kefir, *Journal of Food Science*, 86 (3):1014-1021pp.
- Westerterp-Plantenga, M.S., Lemmens, S.G. and Westerterp, K.R.**, 2012, Dietary protein – its role in satiety, energetics, weight loss and health, *British Journal of Nutrition*, 108:105-112pp.
- Wei, Z., Wang, C., Zou, S., Liu, H. and Tong, Z.**, 2012, Chitosan nanoparticles as particular emulsifier for preparation of novel pH-responsive Pickering emulsions and PLGA microcapsules, *Polymer*, 53:1229-1235pp.
- Weinbreck, F., de Vries, R., Schrooyen, P. and de Kruif, C.G.**, 2003, Complex coacervation of whey proteins and gum Arabic, *Biomacromolecules*, 4:293–303pp.
- Weinbreck, F., Tromp, R.H. and de Kruif, C.G.** 2004a, Composition and structure of whey protein/gum Arabic coacervates, *Biomacromolecules*, 5:1437–1445pp.
- Weinbreck, F., Minor, M. and de Kruif, C.G.**, 2004b, Microencapsulation of oils using whey protein/gum Arabic coacervates, *Journal of Microencapsulation*, 21:667-679pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Wen, H., Hao, J. and Li, S.K.**, 2013, Characterization of human sclera barrier properties for transscleral delivery of bevacizumab and ranibizumab, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(3):892-903pp.
- Wijayanti, H.B., Bansal, N. and Deeth, H.C.**, 2014, Stability of whey proteins during thermal processing: A review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13:1235-1251pp.
- Wilding, P., Lillford, P.J. and Regenstein, J.M.**, 1984, Functional properties of proteins in foods, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 34B:182-189pp.
- Witz, J., Timasheff, S.N. and Luzzati, V.**, 1963, Molecular interactions in  $\beta$ -lactoglobulin. VIII. Small-angle X-ray scattering investigation of the geometry of  $\beta$ -lactoglobulin a tetramerization, *Journal of the American Chemical Society*, 86:168-173pp.
- Wu, G.**, 2021, Amino Acids Biochemistry and Nutrition, CRC Press, Boca Raton, 1-66s.
- Yadav, M.P., Igartuburu, J.M., Yan, Y. and Nothnagel, E.A.**, 2007, Chemical investigation of the structural basis of the emulsifying activity of gum Arabic, *Food Hydrocolloids*, 21:297–308pp.
- Yeğin, S. and Üren, A.**, 2008, Biogenic amine content of boza: a traditional cereal-based, fermented Turkish beverage, *Food Chemistry*, 111:983–987pp.
- Yıldırım, H.K., Üren, A. and Yücel, U.**, 2007, Evaluation of biogenic amines in organic and non-organic wines by HPLC OPA derivatization, *Food Technology and Biotechnology*, 45:62-68pp.
- Yücel, U. and Üren, A.**, 2008, Biogenic amines in Turkish type pickled cabbage: Effects of salt and citric acid concentration, *Acta Alimentaria*, 37:115–122pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Zakhartsev, M. and Reuss, M.**, 2018, Cell size and morphological properties of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in relation to growth temperature, *FEMS Yeast Research*, 18:52-67pp.
- Zhang, W. and Zhong, Q.**, 2009, Microemulsions as nanoreactors to produce whey protein nanoparticles with enhanced heat stability by sequential enzymatic cross-linking and thermal pretreatment, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:9181-9189pp.
- Zhang, W. and Zhong, Q.**, 2010, Microemulsions as nanoreactors to produce whey protein nanoparticles with enhanced heat stability by thermal pretreatment, *Food Chemistry*, 119:1318-1325pp.
- Zhang, S., Zhang, Z. and Vardhanabhuti, B.**, 2014, Effect of charge density of polysaccharides on self-assembled intragastric gelation of whey protein/polysaccharide under simulated gastric conditions, *Food & Function*, 5:1829-1838pp.
- Zhong, Q.X., Wang, W., Hu, Z.X. and Ikeda, S.**, 2013, Sequential preheating and transglutaminase pretreatments improve stability of whey protein isolate at pH 7.0 during thermal sterilization, *Food Hydrocolloids*, 31(2):306– 316pp.
- Zhu, D., Damodaran, S. and Lucey, J.A.**, 2008a, Formation of whey protein isolate (WPI)-dextran conjugates in aqueous solutions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:7113-7118pp.
- Zhu, J., He, H. and Li, S.**, 2008b, Macromolecular crowding enhances thermal stability of rabbit muscle creatine kinase, *Tsinghua Science and Technology*, 13:454–459pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Zhu, D., Damodaran, S. and Lucey, J.A.**, 2010, Physicochemical and emulsifying properties of whey protein isolate (WPI)-dextran conjugates produced in aqueous solution, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5):2988–2994pp.

**Ziarno, M., Hasalliu, R. and Cwalina, A.**, 2021, Effect of the addition of milk protein preparations on selected quality parameters and nutritional characteristics of kefir, *Applied Sciences*, 11, 966-978pp.



## TEŞEKKÜR

Doktora çalışmamın tamamlanmasında büyük katkısı olan, tüm sorularım ve sorunlarımla her zaman içtenlikle ilgilenen danışman hocam Prof. Dr. Özgül Özdehan Ocak'a, bilgilerini benimle paylaşan ve her zaman beni destekleyen Prof. Dr. Semih Ötleş ve Doç. Dr. Sibel Uzuner'e,

Laboratuvarlarının kapılarını tüm içtenlikleriyle bana açan ODTÜ Gıda Mühendisliği ailesinden Prof. Dr. Serpil Şahin, Prof. Dr. Gülüm Şumnu ve Doç. Dr. Mecit Öztop'a,

Laboratuvarlarında yaptığım çalışmalardan ötürü Wageningen Üniversitesi'ne (The author, A.I., acknowledges her stay at the Laboratory of Physics and Physical Chemistry at Wageningen University),

Bu süreçte yanımda olan arkadaşım Melek Çalış'a, desteğini hiç bir zaman esirgemeyen aileme, annem Tevhide İnce'ye, babam Ali İnce'ye, sevgili eşim Alper Coşkun'a ve oğluşum Ali Mete Coşkun'a sabırlarından ve daha bir çok şeyden dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışması için gerekli maddi desteği sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (FDK-2020-21646) ve doktora süresince TÜBİTAK 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Programı kapsamında destek veren Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na teşekkürlerimi sunarım.

10 / 2 / 2022

Alev Emine İNCE COŞKUN

## ÖZGEÇMİŞ

İlkokulu Namık Kemal İlköğretim Okulu'nda, ortaokulu Atatürk Lisesi'nde ve liseyi de Ankara Fen Lisesi'nde okumuştur. 2003 yılında girdiği Orta Doğu Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nün lisans eğitiminden 2008 yılında mezun olmuş, aynı sene aynı bölümde yüksek lisans ve araştırma görevliliğine başlamıştır. 2011 yılında yüksek lisansı tamamladıktan sonra Wageningen Üniversitesi (Hollanda)'nde çalışmaya başlamış, 2016 yılına kadar bu üniversitede kalmıştır. 2008-2016 yılları arasında gıda kimyası, reoloji, gıda fiziği ve proteinler hakkında yurt içinde ve yurt dışında çeşitli eğitimler almış ve akademik çalışmalar yapmıştır. İyi derecede İngilizce bilmektedir. Evli ve bir çocuk annesidir.

### Makaleler:

**İnce Coşkun, A.E.**, Özdestan Ocak Ö., 2022, Effect of whey protein isolate microparticle addition on some physical and chemical properties of kefir, *Chemical Papers*, doi: 10.1007/s11696-022-02097-0. (accepted)

**İnce Coşkun, A.E.**, Özdestan Ocak Ö., 2021, Foaming properties of different forms of caseins in aqueous systems, *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15:2275-2284.

**İnce Coşkun, A.E.**, Özdestan Ocak Ö., 2021, Foaming behaviour of colloidal whey protein isolate micro-particle dispersions, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 609:125660.

**İnce Coşkun, A.E.**, 2020, Phase separation behaviour of whey protein isolate particle dispersions in the presence of xanthan, *Turkish Journal of Chemistry*, 44:1314-1326.

**İnce Coşkun, A.E.**, Özdestan Ocak, Ö., 2020, Effects of salt ions and heating on the behaviour of whey protein particle dispersions, *Food Hydrocolloids*, 101:105433.

**İnce Coşkun, A.E.**, Ötleş, S., 2020, Interactions of native and denatured whey proteins with caseins and polysaccharides, *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(1):180-189.

**İnce Coşkun, A.E.**, Özdehan Ocak, Ö., Ocak, B., Ötleş, S., 2020, pH-dependent behavior and stability of protein-based in aqueous media, *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 16(1):95-102.

Naserifar, F., Özer, Ö., **İnce Coşkun, A.E.**, 2019, Protein based encapsulation of antioxidants: Methods, functionality of components, and applications, *Uluslararası Doğu Anadolu Fen Mühendislik ve Tasarım Dergisi*, 1(2):154-163.

**İnce Coşkun, A.E.**, Ötleş, S., 2019, Preparation, properties and behaviour of protein microparticles in salt containing dispersions, *Integrative Food, Nutrition and Metabolism*, 6(1):1-5.

Ötleş, S., **İnce Coşkun, A.E.**, 2019, Preparation of food-grade particles and their Pickering stabilization mechanisms, *Recent Advances in Food Safety*, 2(1):172-180.

**İnce Coşkun, A.E.**, Sağlam, D., Venema, P., van der Linden, E., Scholten, E., 2015, Preparation, structure and stability of sodium-caseinate and gelatin micro-particles, *Food Hydrocolloids*, 45:291-300.

**İnce, A.E.**, Şahin, S., Şumnu, G., 2014, Comparison of microwave and ultrasound-assisted extraction techniques for leaching of phenolic compounds from nettle, *Journal of Food Science and Technology*, 51(10):2776-2782.

**İnce, A.E.**, Şahin, S., Şumnu, S.G., 2013, Extraction of phenolic compounds from Melissa using microwave and ultrasound, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37(1):69-75.

**Bildiriler:**

Uluslararası Mühendislik ve Fen Bilimleri Kongresi, Sözlü Sunum: Foaming properties of casein-based aqueous systems, Ankara, Mayıs 2021.

5. Uluslararası Kolloid Konferansı, Poster sunumu: Coagulation behaviour of colloidal particles: Effect of salt type, Amsterdam, Hollanda, Haziran 2015.

Uluslararası Gıda Kongresi-Gıda Endüstrisinde Yeni Yaklaşımlar (NAFI), Sözlü sunum: Swelling behaviour of sodium caseinate and gelatin particles, İzmir, Mayıs 2014.

15. Gıda Kolloidleri Konferansı, Poster sunumu: Temperature and pH stability of sodium caseinate and gelatin particles, Karlsruhe, Almanya, Nisan 2014.

14. Avrupa Öğrenci Kolloid Konferansı, Poster Sunumu: Behavior of protein particles in the presence of a depletion agent, Potsdam-Golm, Almanya, Haziran 2013.

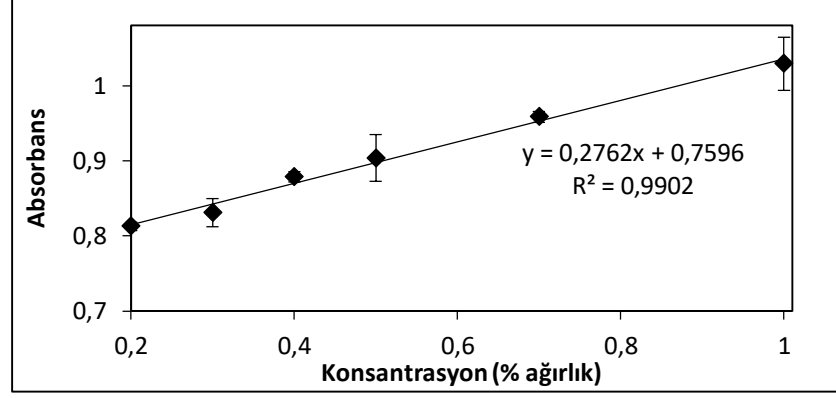
Türkiye 13. Gıda Kongresi, Sözlü Sunum: Isıtmanın dekstran ve Arap zıkkı varlığında peynir altı suyu mikro parçacıklarına etkisi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Ekim 2020.



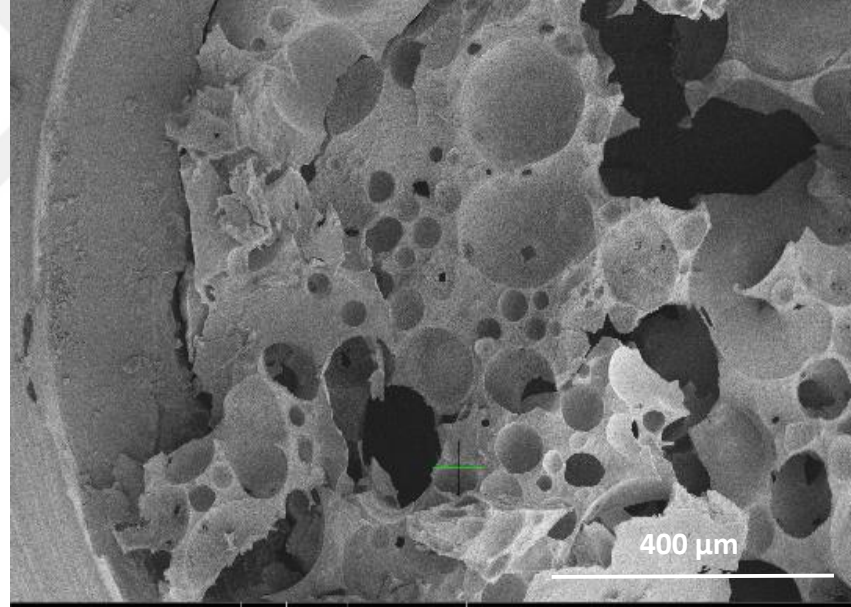


## EKLER

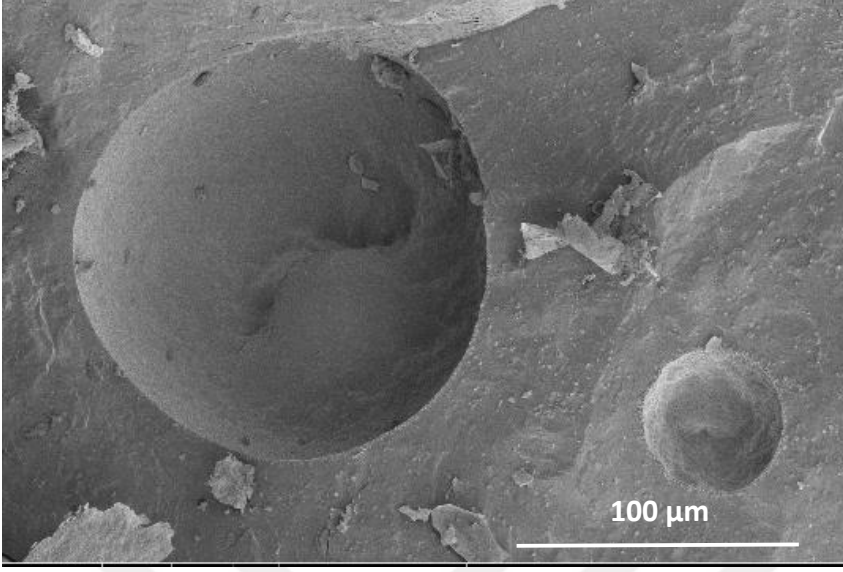
Ek 1. Farklı konsantrasyonlardaki ham PAS proteini çözeltilerinin 250 nm'de ölçülen absorbans değerleriyle elde edilen kalibrasyon grafiği



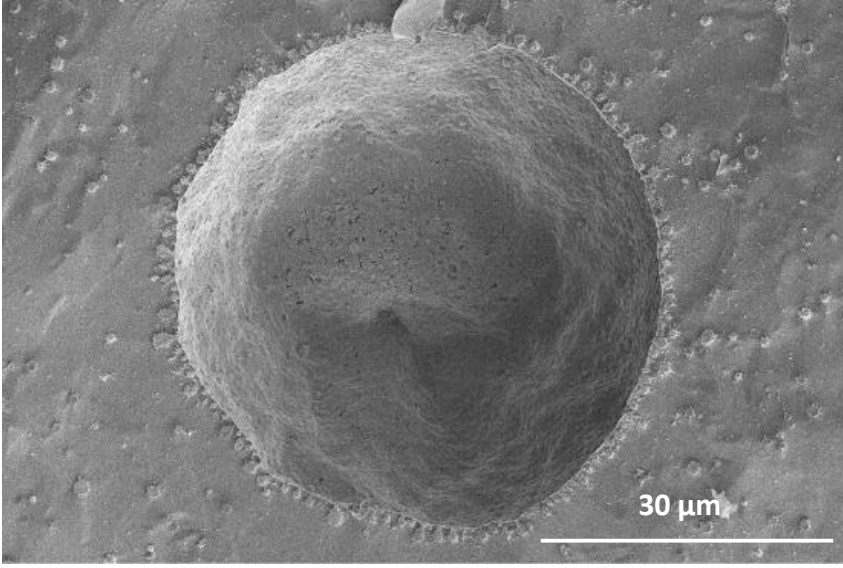
Ek 2. PAS proteini parçacığı dispersiyonundan elde edilen köpük örneğinin krayo-SEM görüntüsü



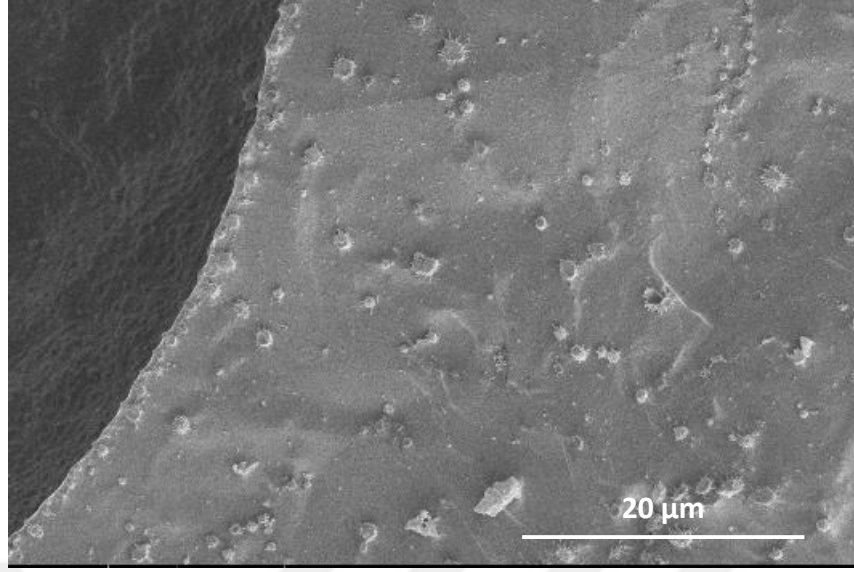
Ek 3. PAS proteini parçacığı dispersiyonundan elde edilen köpük örneğinin krayo-SEM görüntüsü



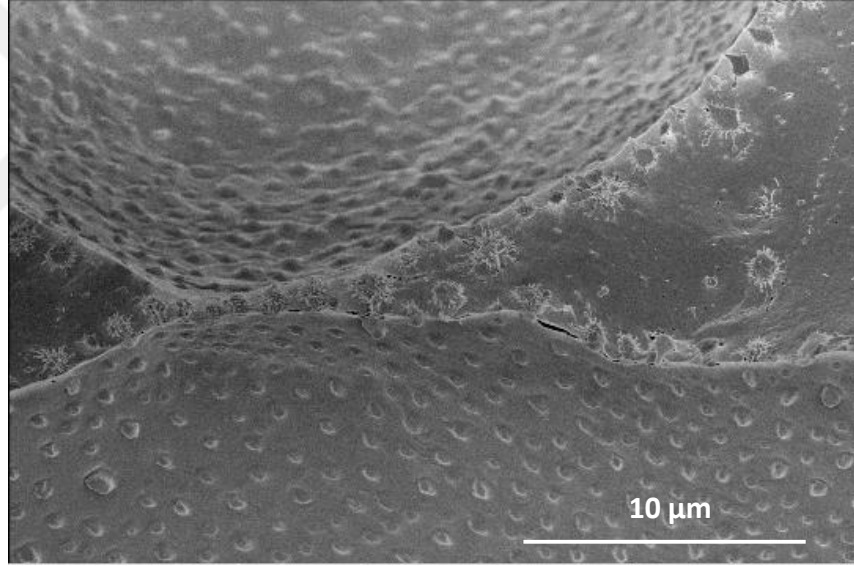
Ek 4. Köpük ara yüzeyinde bulunan PAS proteini parçacıklarının krayo-SEM görüntüsü



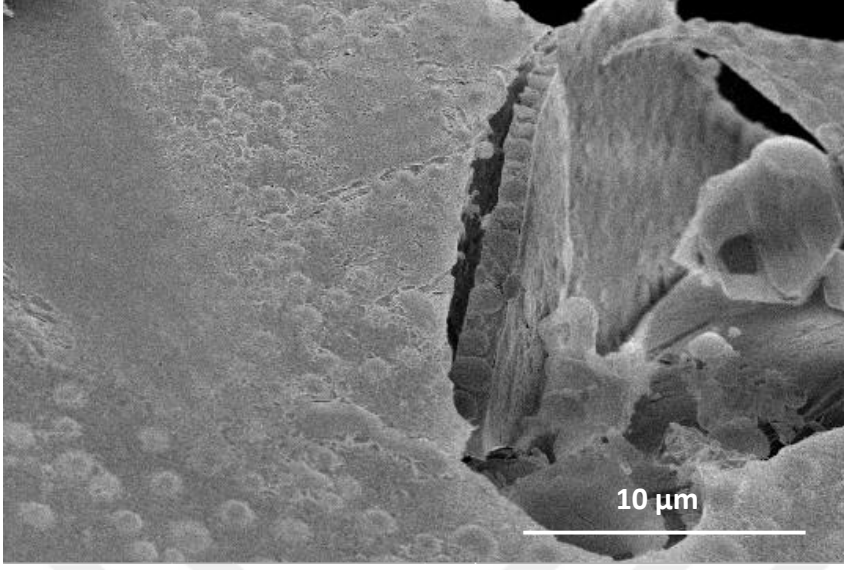
Ek 5. Köpük ara yüzeyinden bulunan PAS proteini parçacıklarının krayo-SEM görüntüsü



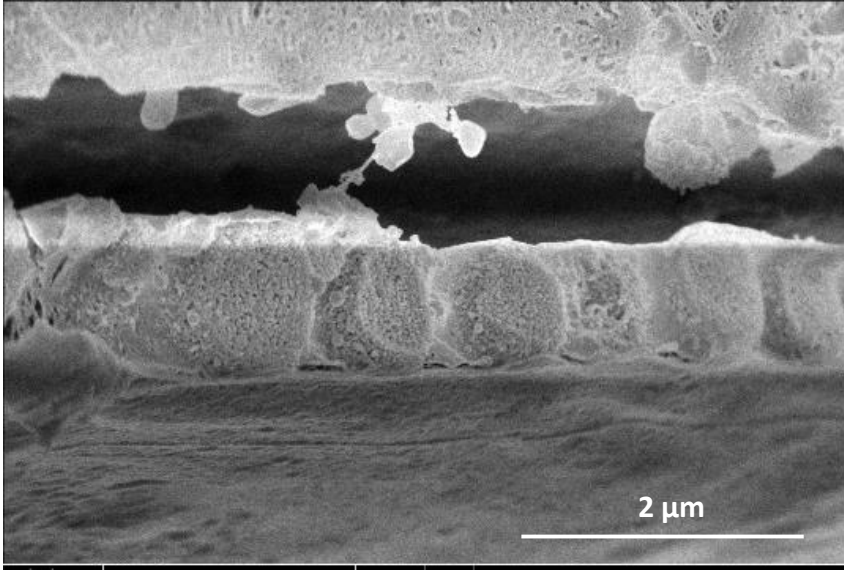
Ek 6. Köpük ara yüzeyinden bulunan PAS proteini parçacıklarının krayo-SEM görüntüsü



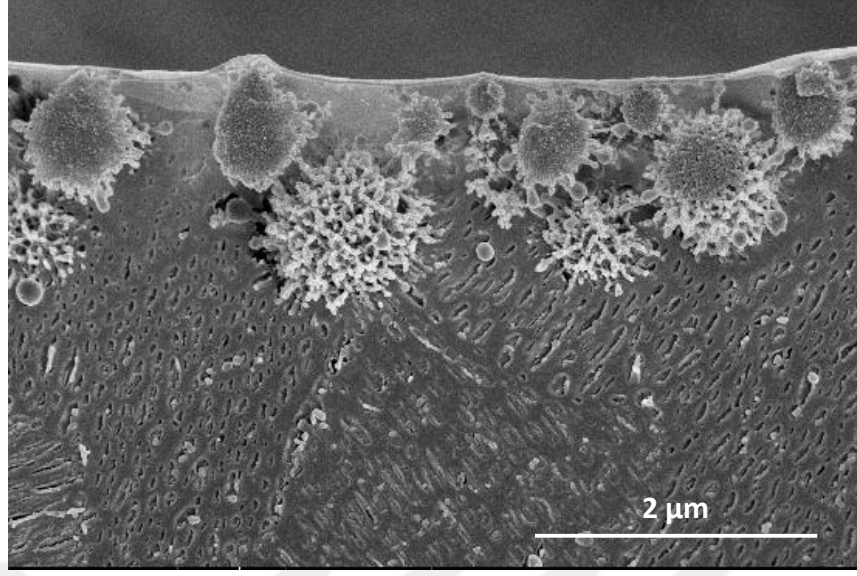
Ek 7. Köpük ara yüzeyinden bulunan PAS proteini parçacıklarının krayo-SEM görüntüsü



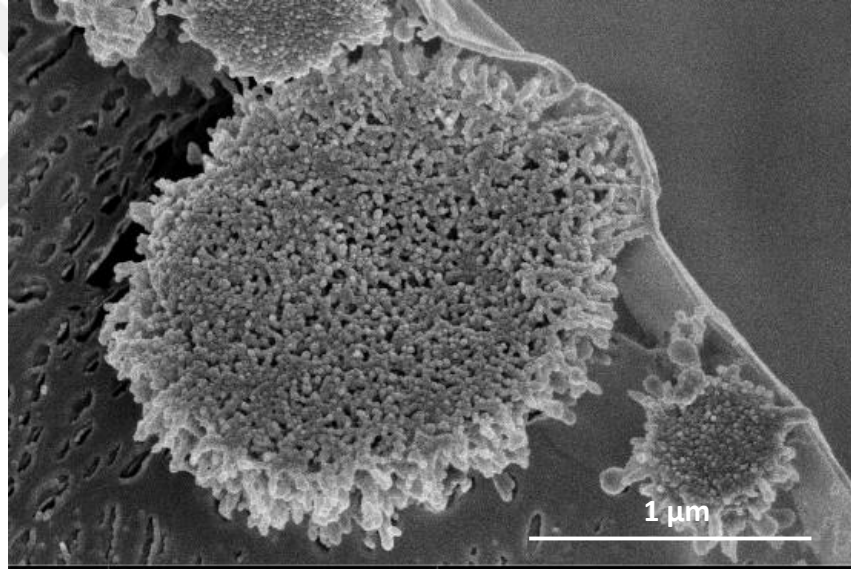
Ek 8. Köpük ara yüzeyinden bulunan PAS proteini parçacıklarının krayo-SEM görüntüsü



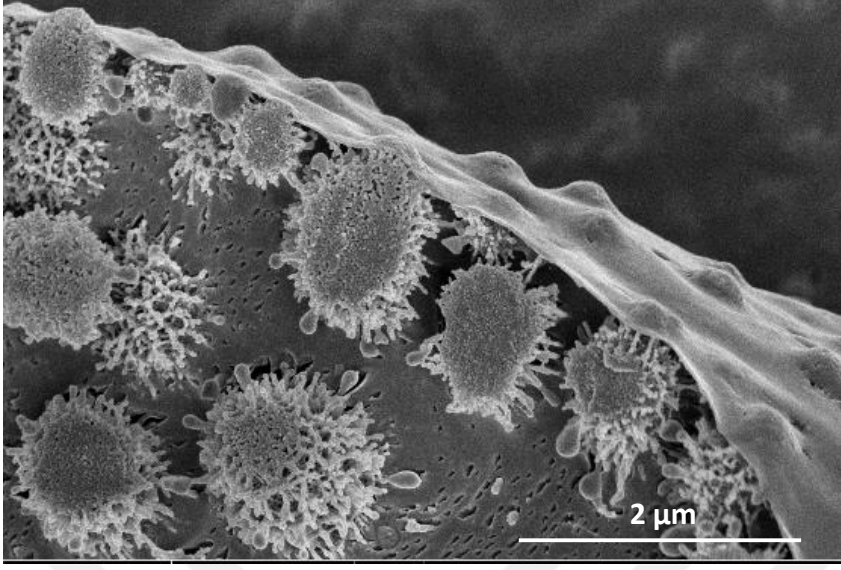
Ek 9. Köpük ara yüzeyinden bulunan PAS proteini parçacıklarının krayo-SEM görüntüsü



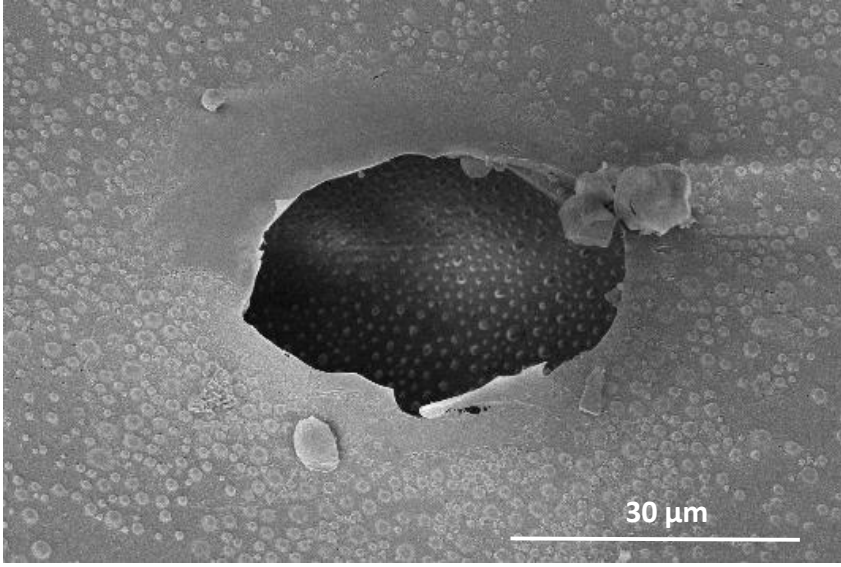
Ek 10. Köpük ara yüzeyinden bulunan PAS proteini parçacıklarının krayo-SEM görüntüsü



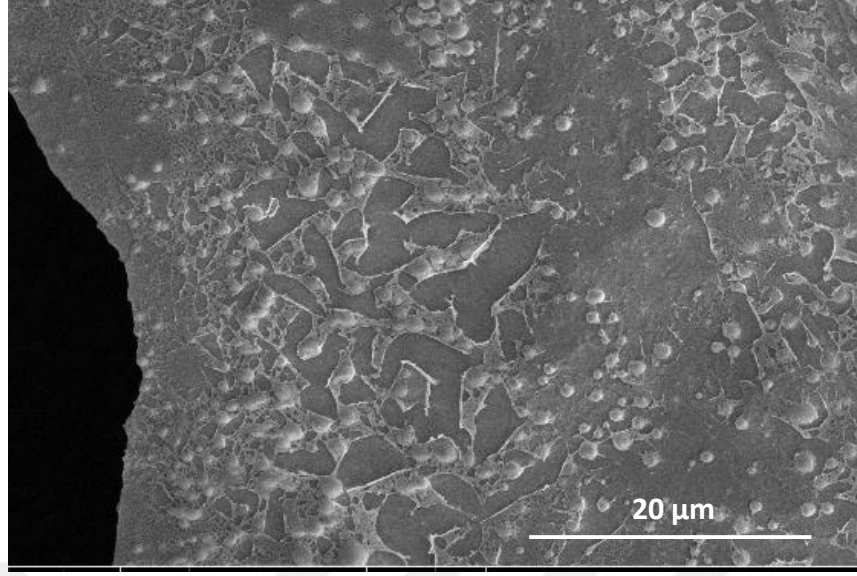
Ek 11. Köpük ara yüzeyinden bulunan PAS proteini parçacıklarının krayo-SEM görüntüsü



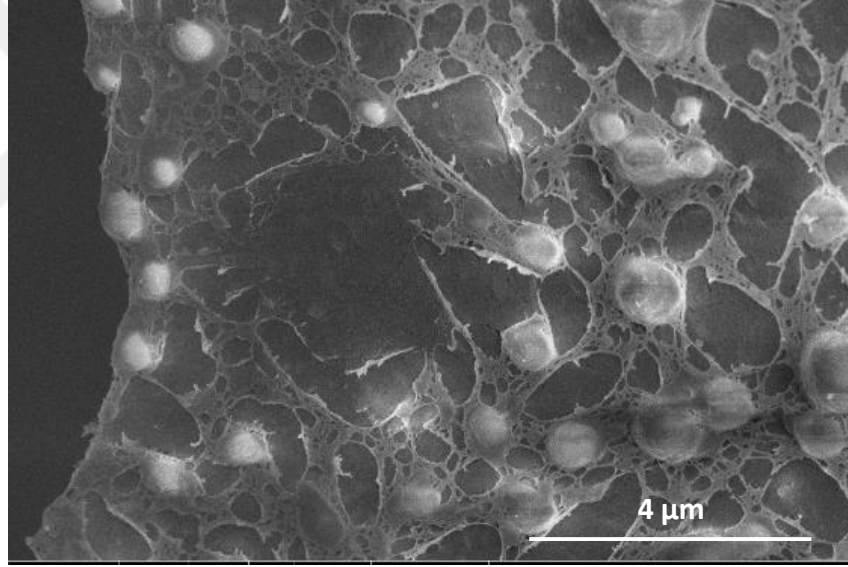
Ek 12. Köpük ara yüzeyinden bulunan PAS proteini parçacıklarının krayo-SEM görüntüsü



Ek 13. Köpük ara yüzeyinden bulunan PAS proteini parçacıklarının krayo-SEM görüntüsü

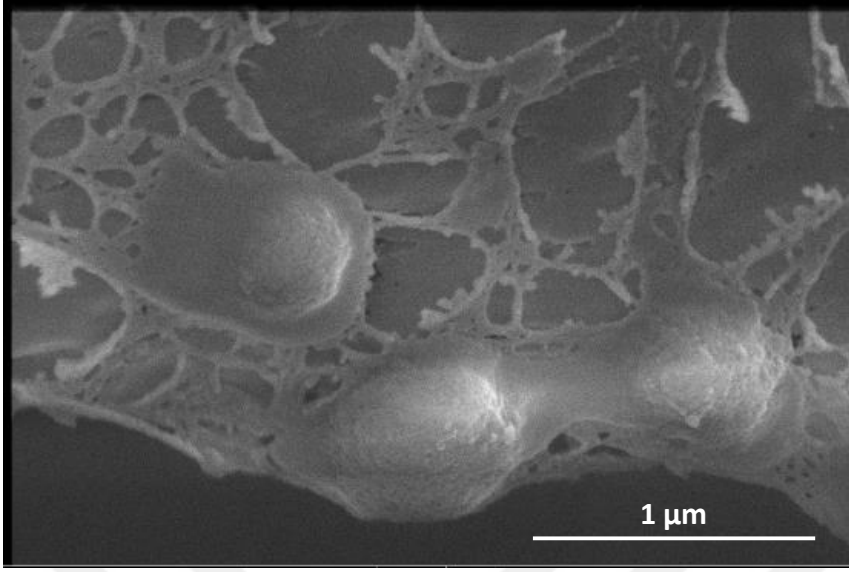


Ek 14. Köpük ara yüzeyinden bulunan PAS proteini parçacıklarının krayo-SEM görüntüsü





Ek 15. Köpük ara yüzeyinden bulunan PAS proteini parçacıklarının krayo-SEM görüntüsü

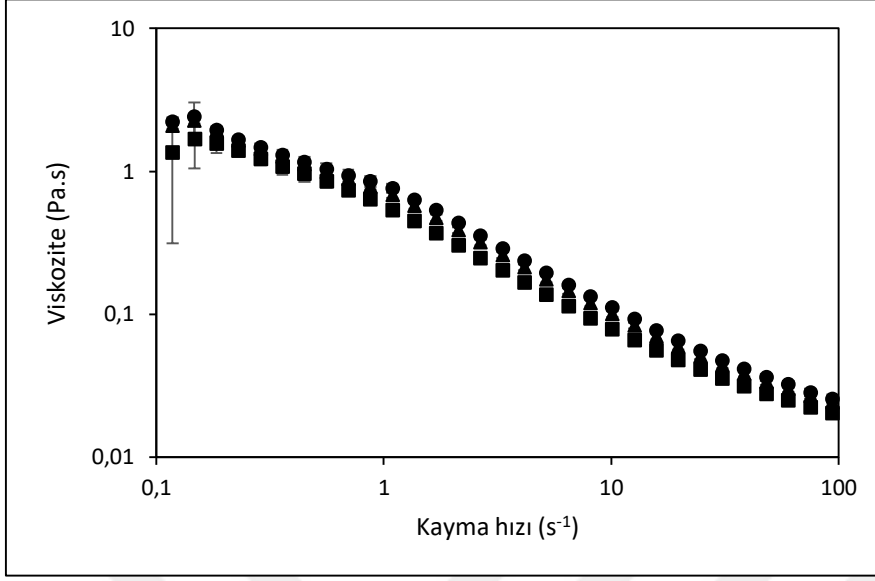


Ek 16. Farklı kefir örneklerinin 0. ve 2. haftalardaki duyuusal analiz testi sonuçları.

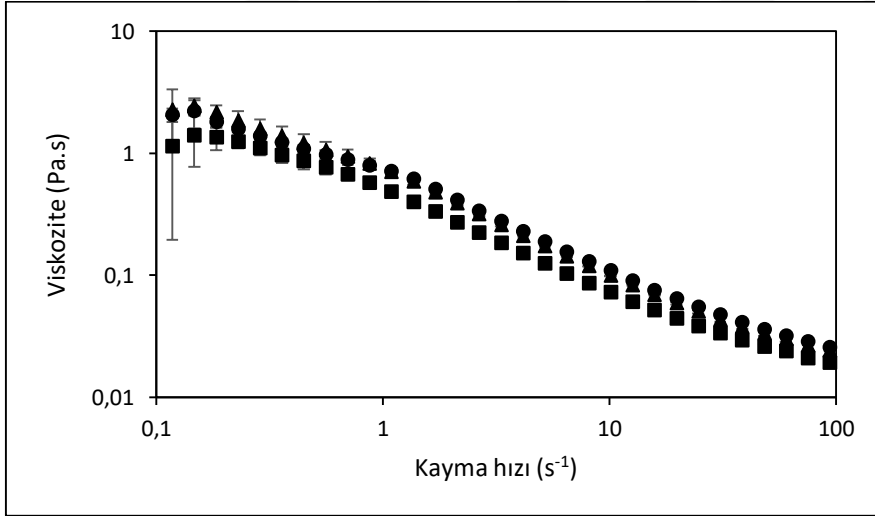
Kalite kriteri	Kefir örnekleri	Hafta: 0 skorları	Hafta: 2 skorları
Renk	Sade kefir	4.75 <sup>Aa</sup> ± 0.46	4.25 <sup>Ab</sup> ± 0.46
	pH 6.8 PAS proteini parçacığı	4.63 <sup>Aa</sup> ± 0.52	4.25 <sup>Aa</sup> ± 0.46
	pH 5.5 PAS proteini parçacığı	4.50 <sup>Aa</sup> ± 0.53	4.13 <sup>Aa</sup> ± 0.64
	Ham PAS proteini	3.75 <sup>Ba</sup> ± 0.46	4.00 <sup>Aa</sup> ± 0.53
Koku	Sade kefir	3.00 <sup>Aa</sup> ± 0.76	2.50 <sup>ABa</sup> ± 0.53
	pH 6.8 PAS proteini parçacığı	3.88 <sup>Aa</sup> ± 0.99	2.38 <sup>Bb</sup> ± 0.74
	pH 5.5 PAS proteini parçacığı	3.75 <sup>Aa</sup> ± 0.71	3.25 <sup>Aa</sup> ± 0.71
	Ham PAS proteini	1.88 <sup>Ba</sup> ± 0.64	1.38 <sup>Ca</sup> ± 0.52
Görsel kıvam	Sade kefir	3.13 <sup>Aa</sup> ± 0.83	3.25 <sup>Aa</sup> ± 0.89
	pH 6.8 PAS proteini parçacığı	3.63 <sup>Aa</sup> ± 0.92	3.13 <sup>Aa</sup> ± 0.64
	pH 5.5 PAS proteini parçacığı	4.00 <sup>Aa</sup> ± 0.76	3.75 <sup>Aa</sup> ± 0.46
	Ham PAS proteini	3.88 <sup>Aa</sup> ± 0.35	3.00 <sup>Ab</sup> ± 0.93
Tüm izlenim	Sade kefir	3.82 <sup>Aa</sup> ± 0.52	3.50 <sup>ABa</sup> ± 0.76
	pH 6.8 PAS proteini parçacığı	3.81 <sup>Aa</sup> ± 0.65	3.38 <sup>ABa</sup> ± 0.52
	pH 5.5 PAS proteini parçacığı	3.88 <sup>Aa</sup> ± 0.83	4.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00
	Ham PAS proteini	3.13 <sup>Aa</sup> ± 0.64	2.88 <sup>Ba</sup> ± 0.64

Büyük harfler aynı kriterde, aynı haftada bulunan farklı örnekler arasındaki farkı (aynı sütun), küçük harfler ise aynı örneğin haftalar arasındaki farkını (aynı sıra) göstermektedir (p < 0.05).

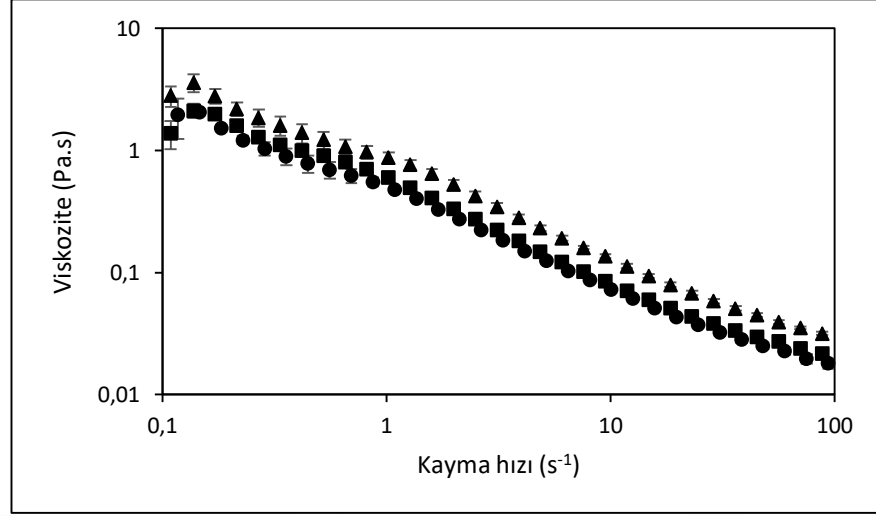
Ek 17. Hacimsel oranı  $\Phi \sim 0.03$  olan ve pH 6.8 PAS proteini parçacığı içeren kefirin (●) 1., (▲) 7. ve (■) 14. günlerdeki kayma viskozitesi değerleri



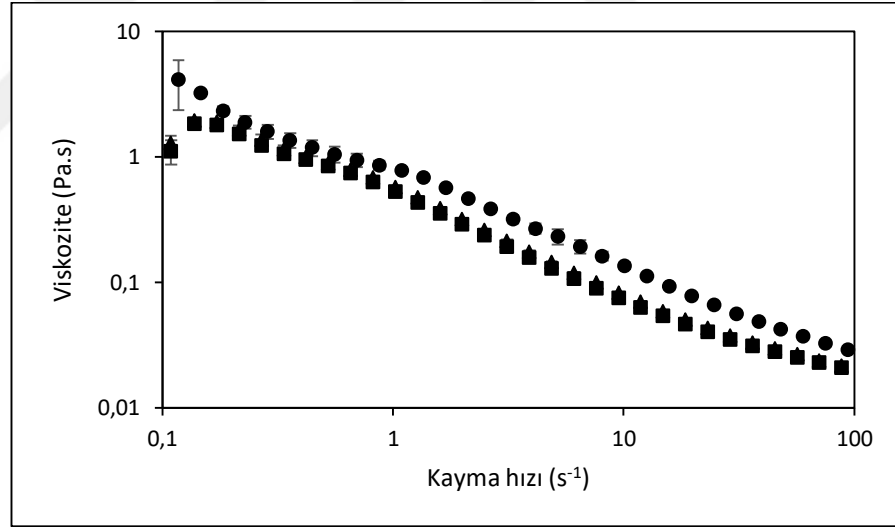
Ek 18. Hacimsel oranı  $\Phi \sim 0.06$  olan ve pH 6.8 PAS proteini parçacığı içeren kefirin (●) 1., (▲) 7. ve (■) 14. günlerdeki kayma viskozitesi değerleri



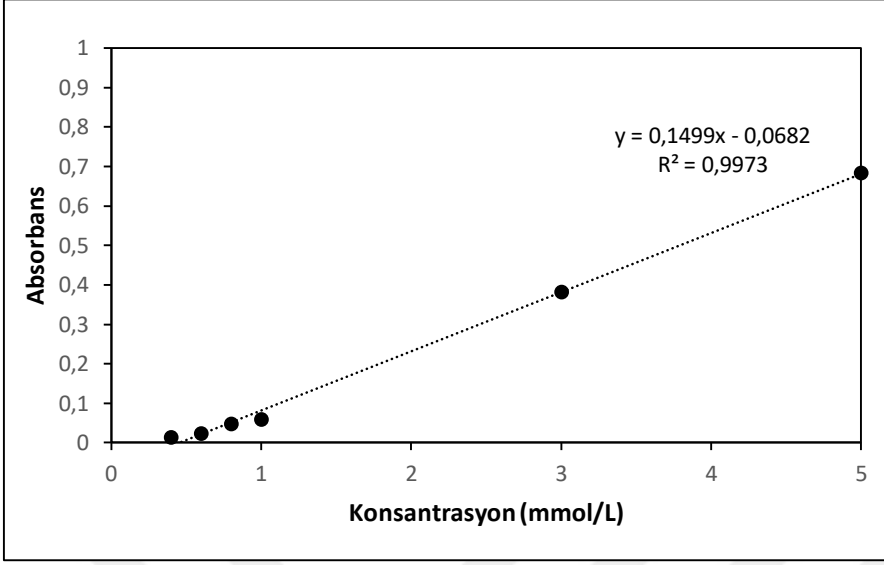
Ek 19. Hacimsel oranı  $\Phi \sim 0.03$  olan ve pH 5.5 PAS proteini parçacığı içeren kefirin (●) 1., (▲) 7. ve (■) 14. günlerdeki kayma viskozitesi değerleri



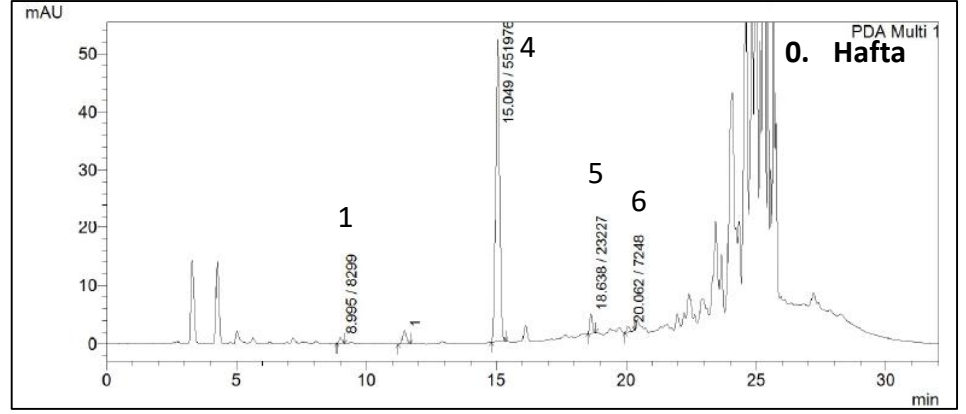
Ek 20. Hacimsel oranı  $\Phi \sim 0.06$  olan ve pH 5.5 PAS proteini parçacığı içeren kefirin (●) 1., (▲) 7. ve (■) 14. günlerdeki kayma viskozitesi değerleri



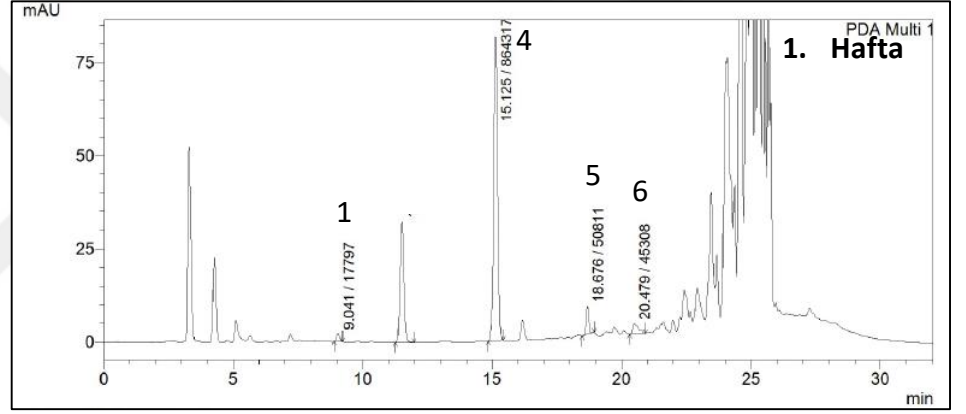
Ek 21. L-lösin çözeltisinin 507 nm'deki absorbans değerleriyle elde edilen toplam serbest amino asit kalibrasyon grafiği



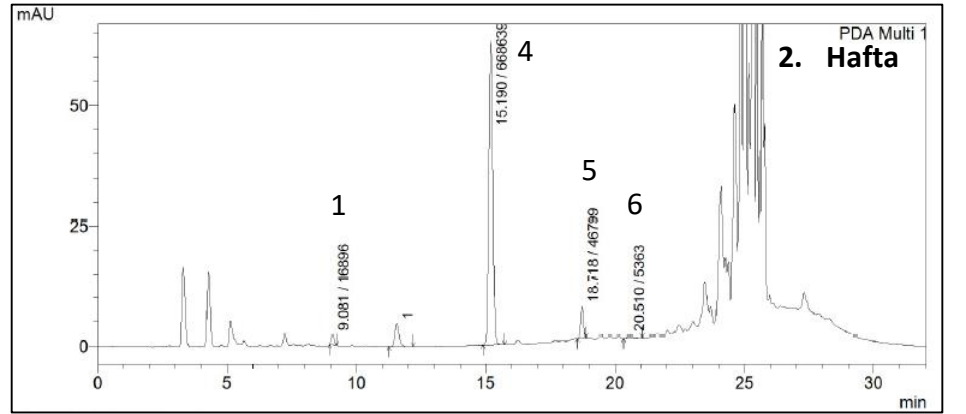
Ek 22. Sade kefirin 0. haftadaki HPLC kromatogramı. Ek 21-44 arasındaki pikler (1) putresin, (2) kadaverin, (3) spermidin, (4) 1,7-diaminoheptan (iç standart), (5) histamin ve (6) tiramin standartlarını göstermektedir.



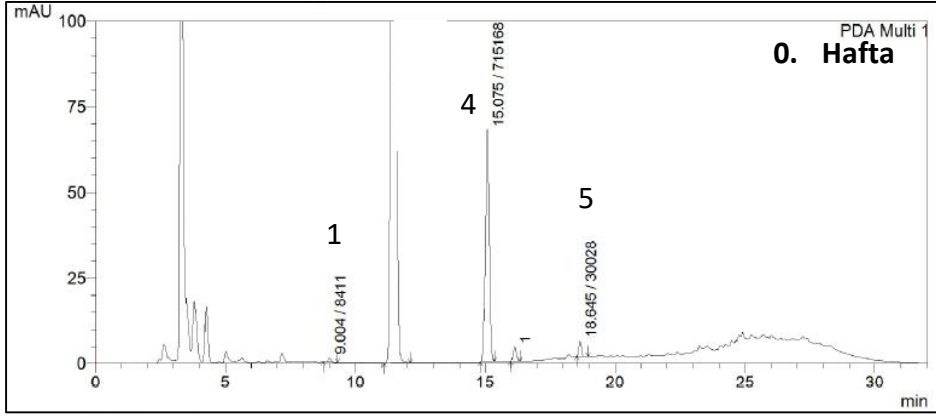
Ek 23. Sade kefirin 1. haftadaki HPLC kromatogramı



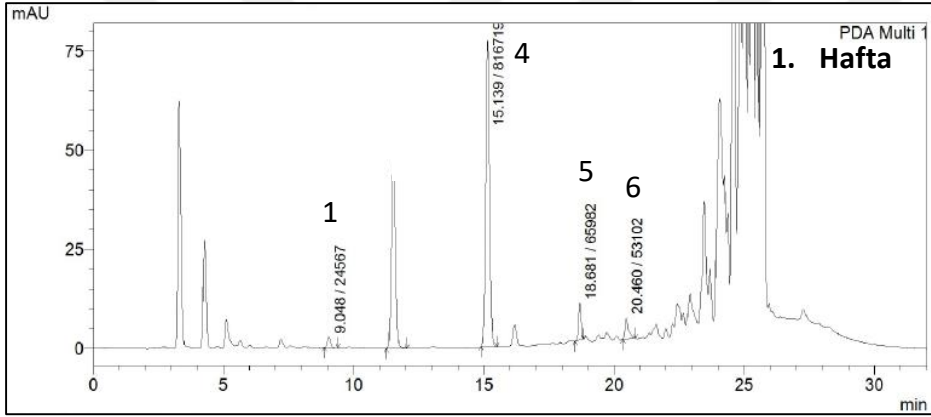
Ek 24. Sade kefirin 2. haftadaki HPLC kromatogramı



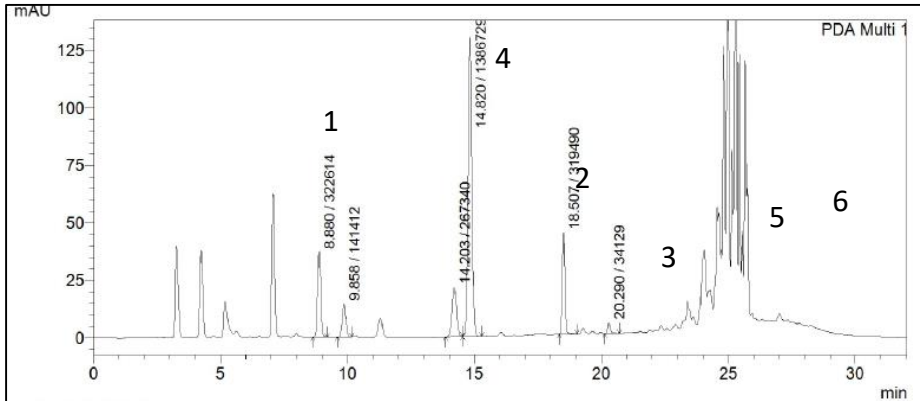
Ek 25. pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacıklarını  $\Phi \sim 0.03$  oranında içeren kefir örneğinin 0. haftadaki HPLC kromatogramı



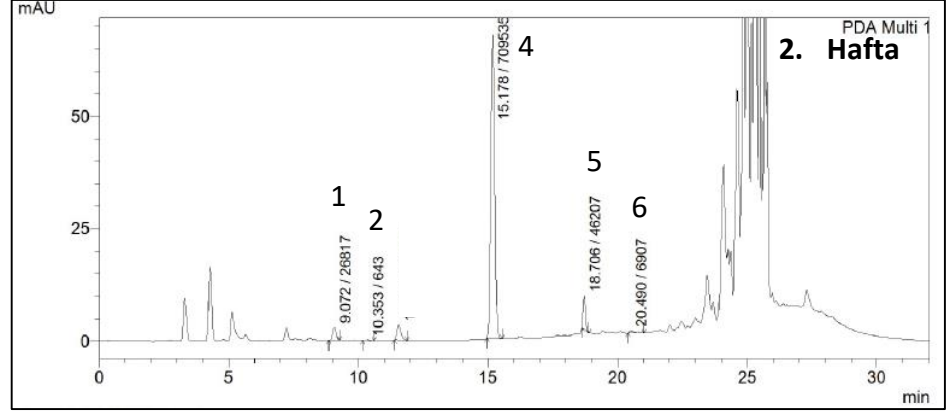
Ek 26. pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacıklarını  $\Phi \sim 0.03$  oranında içeren kefir örneğinin 1. haftadaki HPLC kromatogramı



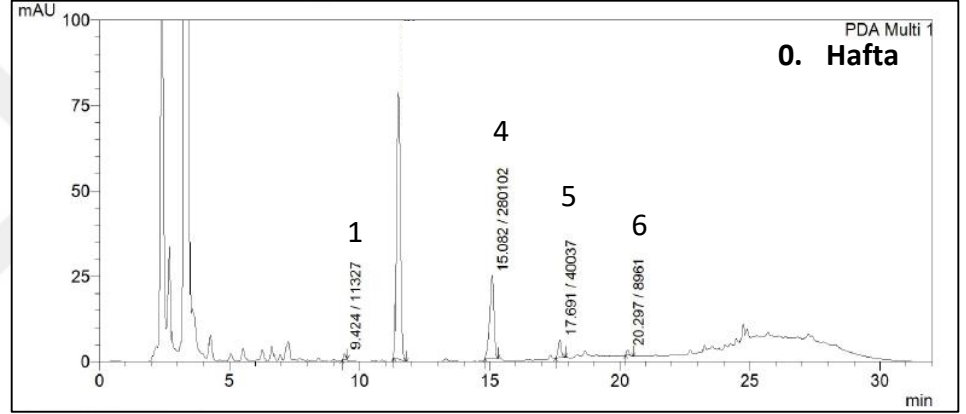
Ek 27. pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacıklarını  $\Phi \sim 0.03$  oranında içeren kefir örneğinin 1. haftadaki standart katılmış HPLC kromatogramı



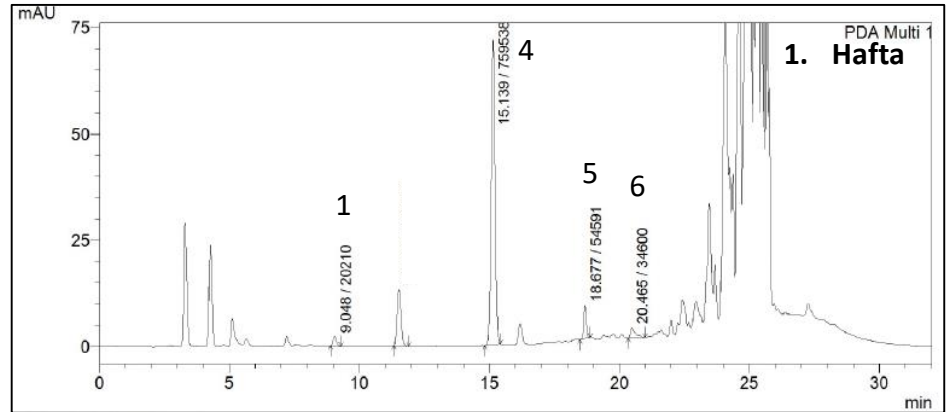
Ek 28. pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacıklarını  $\Phi \sim 0.03$  oranında içeren kefir örneğinin 2. haftadaki HPLC kromatogramı



Ek 29. pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacıklarını  $\Phi \sim 0.06$  oranında içeren kefir örneğinin 0. haftadaki HPLC kromatogramı

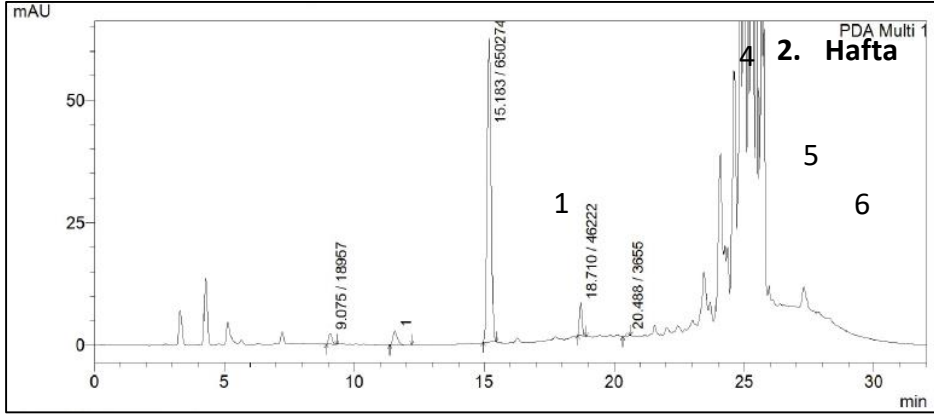


Ek 30. pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacıklarını  $\Phi \sim 0.06$  oranında içeren kefir örneğinin 1. haftadaki HPLC kromatogramı

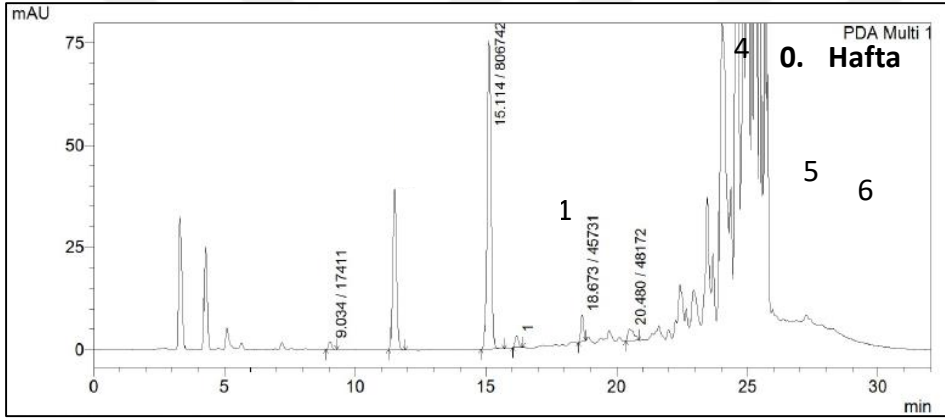




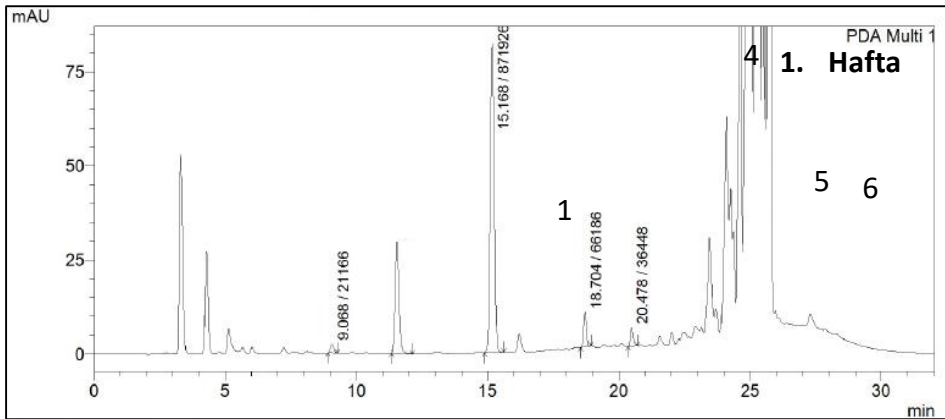
Ek 31. pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacıklarını  $\Phi \sim 0.06$  oranında içeren kefir örneğinin 2. haftadaki HPLC kromatogramı



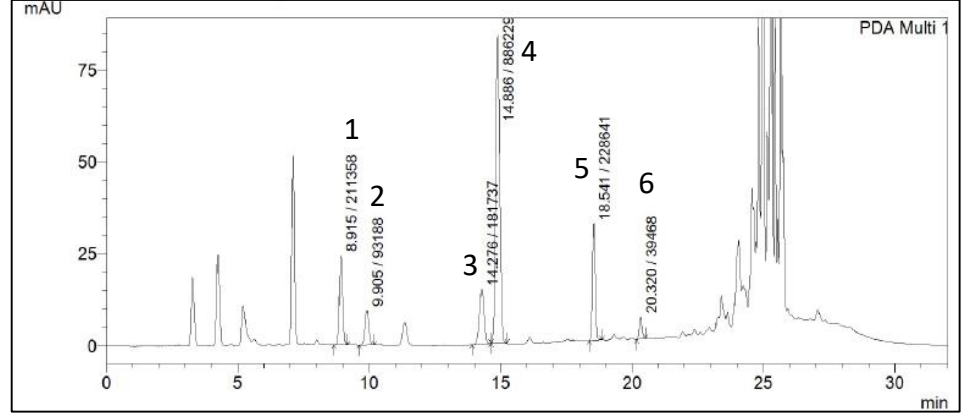
Ek 32. pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacıklarını  $\Phi \sim 0.12$  oranında içeren kefir örneğinin 0. haftadaki HPLC kromatogramı



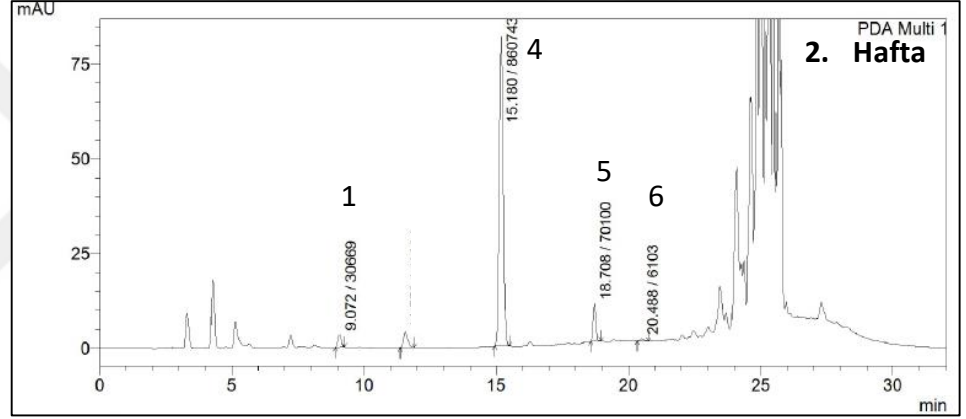
Ek 33. pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacıklarını  $\Phi \sim 0.12$  oranında içeren kefir örneğinin 1. haftadaki HPLC kromatogramı



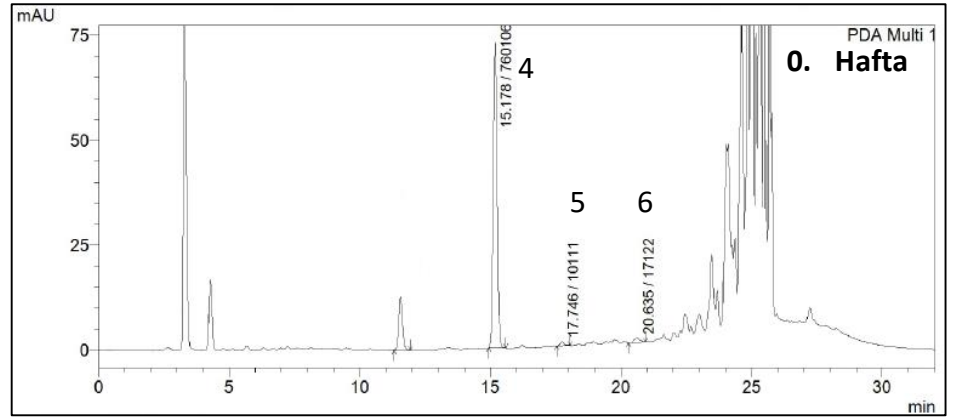
Ek 34. pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacıklarının  $\Phi \sim 0.12$  oranında içeren kefir örneğinin 1. haftadaki standart katılmış HPLC kromatogramı



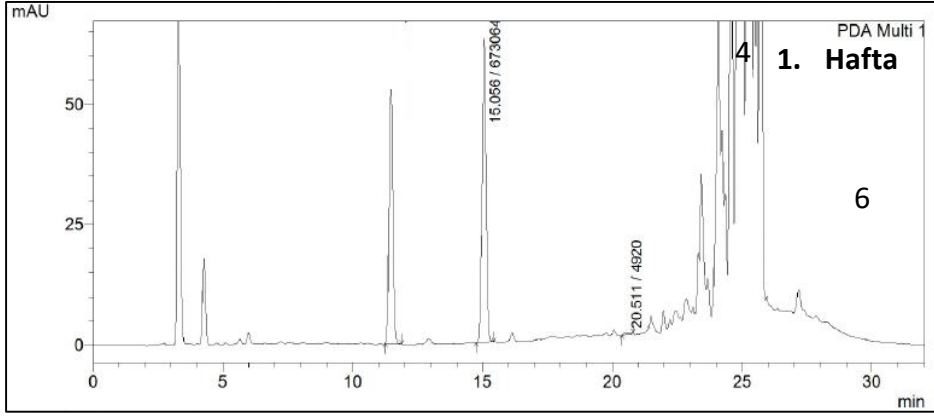
Ek 35. pH 6.8'de üretilen PAS proteini parçacıklarının  $\Phi \sim 0.12$  oranında içeren kefir örneğinin 2. haftadaki HPLC kromatogramı



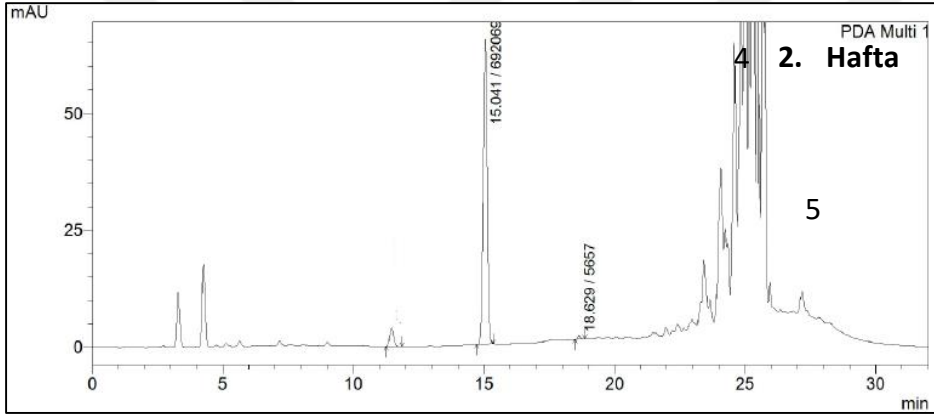
Ek 36. pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıklarının  $\Phi \sim 0.03$  oranında içeren kefir örneğinin 0. haftadaki HPLC kromatogramı



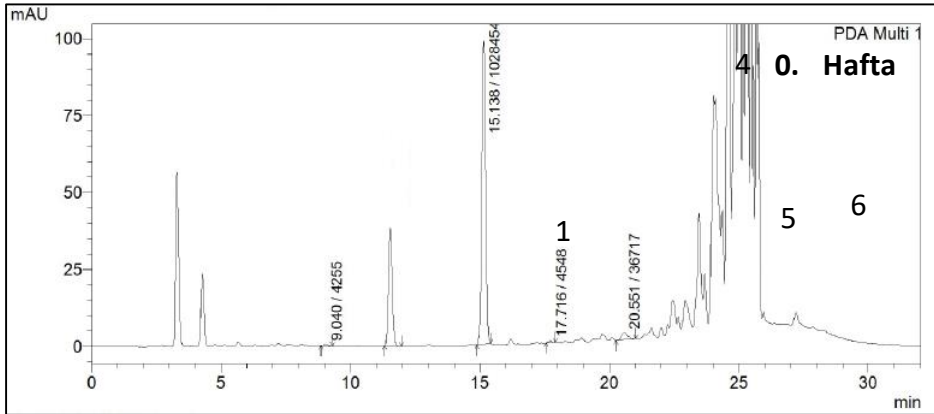
Ek 37. pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıklarını  $\Phi \sim 0.03$  oranında içeren kefir örneğinin 1. haftadaki HPLC kromatogramı



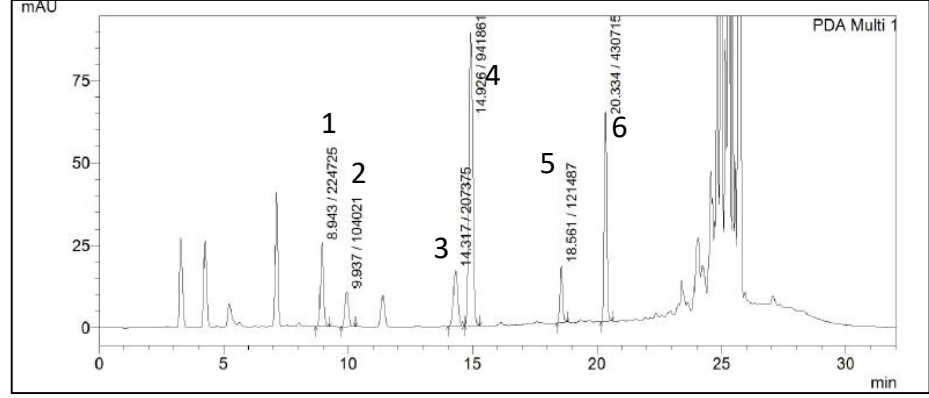
Ek 38. pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıklarını  $\Phi \sim 0.03$  oranında içeren kefir örneğinin 2. haftadaki HPLC kromatogramı



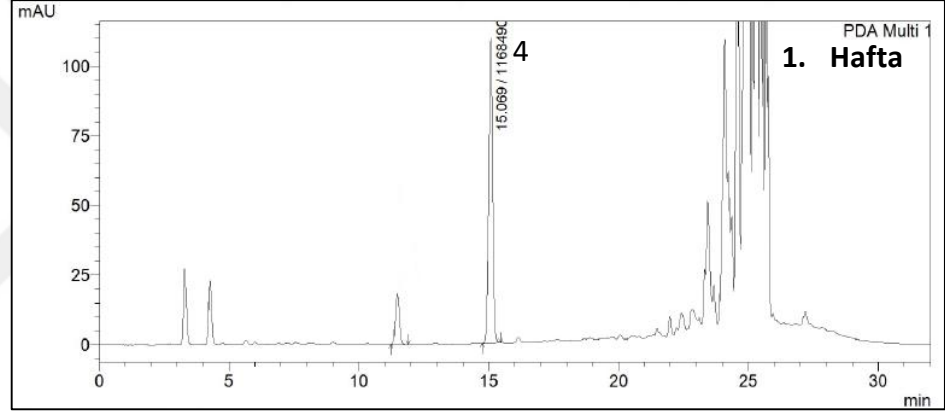
Ek 39. pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıklarını  $\Phi \sim 0.06$  oranında içeren kefir örneğinin 0. haftadaki HPLC kromatogramı



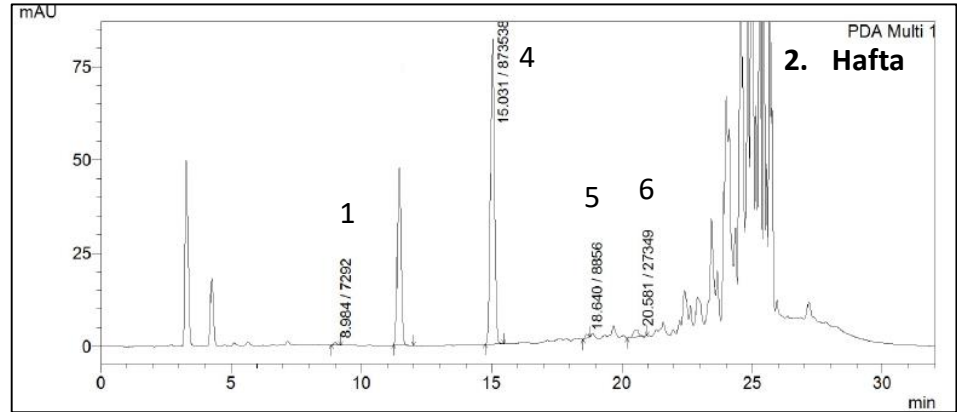
Ek 40. pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıklarını  $\Phi \sim 0.06$  oranında içeren kefir örneğinin 0. haftadaki standart katılmış HPLC kromatogramı



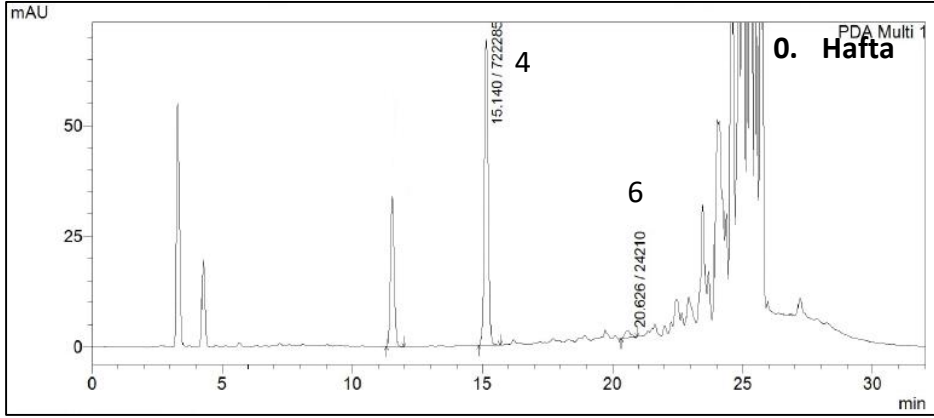
Ek 41. pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıklarını  $\Phi \sim 0.06$  oranında içeren kefir örneğinin 1. haftadaki HPLC kromatogramı



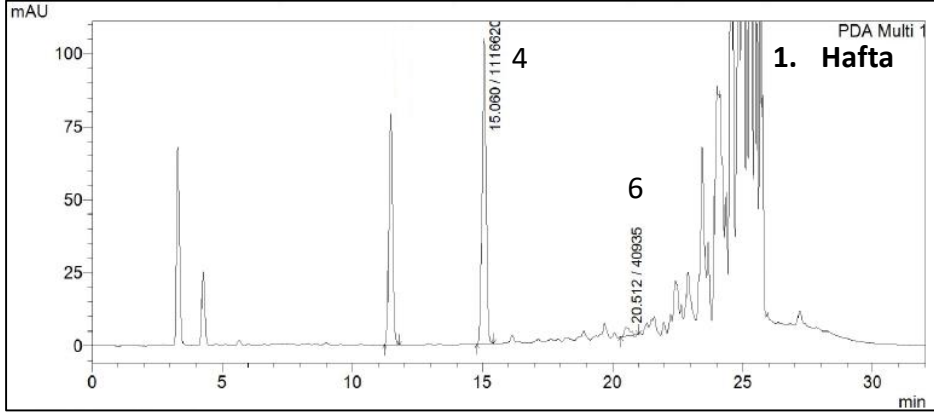
Ek 42. pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıklarını  $\Phi \sim 0.06$  oranında içeren kefir örneğinin 2. haftadaki HPLC kromatogramı



Ek 43. pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıklarını  $\Phi \sim 0.12$  oranında içeren kefir örneğinin 0. haftadaki HPLC kromatogramı



Ek 44. pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıklarını  $\Phi \sim 0.12$  oranında içeren kefir örneğinin 1. haftadaki HPLC kromatogramı



Ek 45. pH 5.5'te üretilen PAS proteini parçacıklarını  $\Phi \sim 0.12$  oranında içeren kefir örneğinin 2. haftadaki HPLC kromatogramı

