

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PEYNİRALTI SUYUNDAN ULTRAFİLTRASYON YÖNTEMİ
İLE α -LAKTOALBUMİN ELDESİ

Tuğba DEDEBAŞ

Danışman: Doç. Dr. Zübeyde ÖNER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ISPARTA - 2009

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	2
2.1. Peyniraltı Suyu (PAS).....	2
2.2. Peyniraltı Suyu Proteinleri	4
2.2.1. α -Laktoalbumin (α -LA)	4
2.2.1.1. α -La'nın Sağlık Açısından Önemi	5
2.2.2. β -Laktoglobulin (β -Lg)	6
2.2.2.1. β -Lg'nin Sağlık Açısından Önemi	8
2.2.3. Serum Albumini	8
2.2.4. İmmunoglobulinler.....	9
2.2.5. Proteoz-peptonlar	9
2.3. PAS'un Çevre Kirliliği Açısından Önemi.....	11
2.4. PAS'nun Değerlendirme Yöntemleri.....	13
2.5. Membran Ayırma Teknikleri	15
2.5.1. Membranların Tarihçesi	15
2.5.2. Membran Filtrasyon	16
2.5.1. Ultrafiltrasyon	17
2.5.2. Diyafiltrasyon.....	18
2.5.3. Mikrofiltrasyon	18
2.5.4. Nanofiltrasyon.....	19
2.5.3. Üretildikleri Materyallere Göre Membran Özellikleri.....	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Materyal	21

3.2. Yöntem.....	22
3.2.1. Kimyasal Analizler	22
3.2.1.1. Asit Tayini (SH cinsinde).....	22
3.2.1.2. pH Tayini	22
3.2.1.3. Kuru madde Tayini	22
3.2.1.4. Kül Tayini	22
3.2.1.5. Yağ Tayini.....	23
3.2.1.6. Protein Tayini.....	23
3.2.1.7. Protein Olmayan Azot (NPN).....	24
3.3. İstatiksel Değerlendirmeler	24
3.4. PAS`da Bulunan β -Lg`nin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi	24
3.4.1. β -Lg Standardının Hazırlanması	25
3.5. PAS`da Bulunan α -LA`nin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile Belirlenmesi	25
3.5.1. Örneklerin Hazırlanması	25
3.5.2. HPLC	25
3.5.2.1. HPLC Çalışma Şartları.....	26
3.5.2.2. HPLC Çalışma Programı	26
3.5.2.3. HPLC`de Standart Kurvelerin Çizimi.....	26
3.6. Ultrafiltrasyon (UF)	27
3.6.1. UF İşlemi için Örneklerin Hazırlanması.....	27
3.6.2. 30 KDa ve 50 KDa Santrifüj Tipi Membranlar için Örnek Hazırlama.....	28
3.6.3. Farklı pH Değerlerinin UF Uygulaması.....	29
3.6.4. Diafiltrasyon İşleminin UF Uygulaması	29
3.6.5. Kademeli Ultrafiltrasyon Uygulaması	29
3.6.6. Tripsin Hidrolizi.....	30
3.7. UF`den Geçirilen PAS`nın Protein Profillerinin (SDS-PAGE) Belirlenmesi.....	30
3.7.1. SDS-PAGE Uygulaması	30
3.7.2. Örnek Hazırlanması	30
3.7.3. Jel Hazırlanması	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	32
4.1. Kimyasal Analizler	32

4.2. PAS`da Bulunan β -Lg`nin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi.....	35
4.2.1. β -Lg Standardının Hazırlanması	35
4.2.2. β -Lg Miktarının Belirlenmesi	35
4.3. UF Yöntemiyle Elde Edilen α -La`nin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile Belirlenmesi	38
4.3.1. Standart Kurve Çizimi	38
4.3.2. Ultrafiltrasyon	39
4.3.2.1. 10 kDa PES Membran ile UF İşlemi.....	40
4.3.2.2. 30 kDa PES Membran ile UF İşlemi.....	41
4.3.2.3. 30 kDa ve 50 kDa Santrifüj Tipi Membranlar	43
4.3.2.4. 100 kDa PES Membran ile UF İşlemi	44
4.3.2.5. pH Denemeleri	46
4.3.2.6. Diafiltrasyon İşleminin UF İşlemine Uygulaması	50
4.3.2.7. Kademeli UF Uygulaması.....	54
4.3.2.8. Tripsin Hidrolizi.....	55
4.3.2.9. 30 kDa Hydrosart Membran ile UF İşlemi	57
4.4 SDS-Page.....	61
5. SONUÇ	62
6.KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	69

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PEYNİRALTI SUYUNDAN ULTRAFİLTRASYON YÖNTEMİ İLE α -LAKTOALBUMİN ELDESİ

Tuğba DEDEBAŞ

**Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

Danışman: Doç. Dr. Zübeyde ÖNER

Peyniraltı suyu, peynir veya kazein üretiminde kazeinin çöktürülmesi sonucu elde edilen laktoz, mineral madde, vitamin, süt yağı ve çözünebilir proteinlerce zengin bir üründür. Bunların içinde serum proteinleri önemli bir kısmı oluşturmaktadır. Peyniraltı suyunda bulunan serum proteinleri süt proteinlerinin yaklaşık olarak %20'sini oluşturmaktadır. En önemli serum proteinleri β -laktoglobulin (β -LG), α -laktoalbumin (α -LA), serum albumini ve immunoglobulinlerdir

Bu çalışmada, Balıkesir ve Işparta il ve ilçelerinde faaliyet gösteren 8 adet süt işletmesinden alınan 15 adet peyniraltı suyunun kimyasal özellikleri belirlenmiş ve α -LA izolasyonu için ultrafiltrasyon işlemleri yapılmıştır. Ultrafiltrasyon(UF) işlemi için 10 kDa, 30 kDa, ve 100 kDa olan PES membran ve 30 kDa`luk Hidrosart membran kullanılmıştır. Membrandan geçirilen peyniraltı sularının α -LA miktarları ters faz yüksek basınçlı likit kromatografi (HPLC) cihazı ile belirlenmiştir. Filtratların protein profilleri SDS-PAGE ile doğrulanmıştır.

Örneklerin kimyasal analiz sonuçları kuru madde oranları % 3.673–13.795, pH 4.0–6.0, yağ % 0.1–1.6, kül %0.2-0.8, protein % 0.1-0.8 ve protein olmayan azot (NPN) 0.006-0.034 arasında değişim göstermiştir.

PES ve Hidrosart membranlar kullanılarak yapılan UF işleminde α -LA`nin ayrımı için en iyi membran tipinin Hidrosart membran olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Peyniraltı suyu, α -laktoalbumin, ultrafiltrasyon

2009, 80 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

SEPERATION OF α -LACTALBUMIN FROM WHEY USING ULTRAFILTRATION

Tuğba DEDEBAŞ

**Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Food Engineering Department**

Supervisor: Assoc. Prof.Dr. Zübeyde ÖNER

Whey is the liquid material rich in lactose, mineral component, vitamin, milk fat and soluble proteins which is derived by precipitating casein during the production of cheese or casein. whey proteins are constituted as an essential part of those soluble proteins. The whey proteins presented in whey forms approximately 20% of milk proteins itself. The most important whey proteins are β -lactoglobulin (β -LG), α -lactoalbumin (α -LA), bovine albumin and immunoglobulin.

In this study, the chemical properties of 15 whey samples which were taken from 8 different dairy factory plants operating in Balıkesir and Isparta were determined and ultrafiltration processes were held for α -LA isolation. For this ultrafiltration process, PES membrans with 10 kDa, 30 kDa and 100 kDa pore sizes and Hydrosart membran with 30 kDa pore size were used. The amount of α -LA of whey samples that were got through from membran were determined by using reversed phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC). The protein profiles of filtrates were verified with SDS-PAGE.

The results of the chemical analysis showed variations between these values of dry matter rates % 3.673–13.795, pH 4.0–6.0, fat % 0.1–1.6, ash %0.2-0.8, protein % 0.1-0.8 and non-protein-nitrogen (NPN) 0.006-0.034. Hydrosart membran was indicated as the most effective mebran type through the ultrafiltration process by using PES and Hydrosart membrans for isolation of α -LA.

Key Words: Whey, α -lactoalbumin, ultrafiltration

2009, 80 pages

TEŞEKKÜR

Yalnızca bu tez çalışmamda değil, ihtiyaç duyduğum her anda desteğini hissettiğim, güler yüzü ve anlayışı ile yanımda olan değerli Danışman Hocam Doç. Dr. Zübeyde ÖNER'e sonsuz teşekkürler.

Her zaman yol gösterici, her türlü sorunun çözümünde yardımcı olan, ilgisini hiç esirgemeyen değerli Hocam Prof. Dr. Aynur Gül KARAHAN'a çok teşekkür ederim.

Çalışmam sırasında laboratuvarını kullanmama izin verdiği için Prof. Dr. Şebnem Harsa hocamıza ve İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Merkezi Araştırma laboratuvarına teşekkür ederim.

Laboratuar çalışmalarım sırasında yardımcı olan ve ortak çalışmalar yapmaktan büyük keyif aldığım hocam Araş. Gör. Hatice ŞANLIDERE ALOĞLU'na ve arkadaşlarım Öğr. Gör. Taner SARIOĞLU'na, Zeynep ÖLMEZ'e, Seda GÜRE ALKAN'a, Ezgi DEMİR'e, Esra KAYA'ya, Çisem KOÇAK'a ve jel yapım sırasında yardımlarını esirgemeyen Meryem ATEŞ'e teşekkür ederim.

1688-YL-08 No'lu Proje ile tez çalışmama maddi destek sağlayan Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Beni bu yaşıma kadar her konuda destekleyen ve sevgileri ile her zaman yanımda olan sevgili annem ve babama, ayrıca ömrüm boyunca benim yanımda olacağına inandığım ablam ve enişteme çok teşekkür ederim.

Tuğba DEDEBAŞ
ISPARTA, 2009

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Peyniraltı suyu	2
Şekil 2.2. α -laktoalbumin yapısı (Permyakaov and Berliner, 2000).....	5
Şekil 2.3 β -laktoglobulin yapısı (Sakurai and Goto, 2002).....	7
Şekil 2.4. Filtrasyon sistemi	17
Şekil 3.1. Peyniraltı suyu	21
Şekil 3.2. Sartorius sedium marka vivaflow 200 PES	27
Şekil 3.3. Sartorius sedium marka sartocon slide 200 Hydrosart	28
Şekil 3.4. Watson marrow-300 prestaltik pompa	28
Şekil 3.5 Sartorius sedium marka vivaspın 20	28
Şekil 4.1. β -Lg standart kurvesi	35
Şekil 4.2. Peyniraltı suyunda bulunan β -Lg piki.....	37
Şekil 4.3. α -LA standart kurvesi ($R^2 = 0,9988682$)	38
Şekil 4.4. β -Lg standart kurvesi ($R^2= 0,9813273$)	39
Şekil 4.5. 4 nolu örneğin 10 kDa luk filtren geçen permeat ve retentant pikleri (Siyah pik; permeat, pembe pik; retentant).....	41
Şekil 4.6. 6 nolu örneğin 30 kDa` luk filtren geçen permeat ve retentant pikleri (Siyah pik; permeat, pembe pik; retentant, mavi pik; örnek).....	42
Şekil 4.7. Vivaspin 30 kDa membran filtrasyon sonucu elde edilen permeatta bulunan α -LA piki	43
Şekil 4.8. Vivaspin 50 kDa membran filtrasyon sonucu elde edilen permeatta bulunan α -LA ve β -Lg piki	44
Şekil 4.9. 4 nolu örneğin 100 kDa luk filtren geçen permeat ve retentant pikleri (Siyah pik; permeat, pembe pik; retentant).....	45
Şekil 4.10. Örnek pH=3,25 ayarlandıktan sonra 100 kDa filtreden geçen permeat ve retentant pikleri. (Siyah pik; permeat, pembe pik; retentant).....	47
Şekil 4.11. Örnek pH=4.27 ayarlandıktan sonra 100 kDa filtreden geçen permeat ve retentant pikleri. (Siyah pik; permeat, pembe pik; retentant).....	48
Şekil 4.12. Örnek pH=6.30 ayarlandıktan sonra 100 kDa filtreden geçen permeat ve retentant pikleri. (Siyah pik; permeat, pembe pik; retentant).....	49

Şekil4.13. Örnek pH=8.0 ayarlandıktan sonra 100 kDa filtreden geçen permeat ve retentant pikleri. (Siyah pik; permeat, pembe pik; retentant).....	50
Şekil.4.14. 8 nolu örneğe birinci tip diyafiltrasyon uygulanarak 100 kDa filtreden geçen permeat ve retentant pikleri. (Siyah pik; permeat, pembe pik; retentant)	52
Şekil.4.15. 8 nolu örneğe ikinci tip diyafiltrasyon uygulanarak 100 kDa filtreden geçen permeat ve retentant pikleri. (Siyah pik; permeat, pembe pik; retentant)	53
Şekil 4.16. Örnek 10 kDa luk filtren geçen retentant pikleri	54
Şekil 4.17. Örnek 10 kDa luk filtren geçirilen retentantın 30 kDa santrifüj tipi membrandan geçen permeat.....	55
Şekil 4.18. 0.002 gr.tripsin uygulanması sonucunda elde edilen kromatogram	56
Şekil 4.19. 0,0007 gr tripsin uygulanması sonucunda elde edilen kromatogram	56
Şekil 4.20. 7 nolu örneğin 30 kDa luk hydrosart filtren geçen permeat ve retentant pikleri (Siyah pik; permeat, pembe pik; retentant).....	59
Şekil 4.21. 7 nolu örnekte bulunan α -LA ve β -lg pikleri	60
Şekil 4.22 SDS-Page Jel.....	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Pıhtılaşma şeklinin peyniraltı suyu % bileşimi üzerine etkisi	3
Çizelge 2.2. Peyniraltı suyu proteinlerinin özellikleri (Zydney, 1998; Zydney and Cheang, 2003)	10
Çizelge 2.3. Süt proteinlerinin peyniraltı suyunda bulunma yüzdeleri ve biyolojik aktiviteleri (Madureira et.al., 2007)	10
Çizelge 3.1. Üst ve alt jellerin içeriği	31
Çizelge 4.1. Peyniraltı sularının kimyasal analiz sonuçları	34
Çizelge 4.2. β -Lg miktarları	36
Çizelge 4.3. 10 UF`lik işlemi sonrası permeat ve retantanta bulunan α -LA`in miktarları	40
Çizelge 4.4. 30 UF`lik işlemi sonrası permeat ve retantanta bulunan α -LA`in miktarları	42
Çizelge 4.5. 30 kDa ve 50 kDa` luk santrifüj tipi membran filtrasyon sonrası permeat bulunan α -LA`in miktarları	43
Çizelge 4.6. 100 UF`lik işlemi sonrası permeat ve retantanta bulunan α -LA`in miktarları	45
Çizelge 4.7. Farklı pH uygulamaları sonrası permeat ve retentanta bulunan α -LA`in miktarları	46
Çizelge 4.8. Diyafiltrasyon uygulaması ile elde edilen α -LA miktarları	51
Çizelge 4.9. Diyafiltrasyon uygulaması ile elde edilen α -LA miktarları	51
Çizelge 4.10. 30 kDa Hydrosart membranda toplanan permeat miktarı	57
Çizelge 4.11. 30 kDa`luk hydrosart membran filtrasyon işlemi sonrası permeat yıkama suyunda bulunan α -LA`in miktarları	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PAS	Peyniraltı Suyu
MPAS	Maya Peyniraltı Suyu
APAS	Asit Peyniraltı Suyu
α-LA	α -Laktoalbumin
β-Lg	β -Laktoglobulin
ACE	Angiotensin-converting Enzimi
BSA	Serum Albumini
BOI	Biyolojik Oksijen İhtiyacı
KOI	Kimyasal Oksijen İhtiyacı
İKE	İnsan Kirliliğine Eşdeğer
UF	Ultrafiltrasyon
MF	Mikrofiltrasyon
NF	Nanofiltrasyon
kDa	Kilodalton
Da	Dalton
SA	Selüloz Asetat
PA	Poliamid
PS	Polisülfon
PES	Polietersülfon
NPN	Protein Olmayan Azot
TCA	Triklorasetik Asit
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi
SDS-PAGE	Sodium Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektroferez

1. GİRİŞ

Peynir üretimi sırasında sütün pıhtılaştırılmasından sonra ayrılan yarı şeffaf yeşilimsi renkteki sıvıya peyniraltı suyu (PAS) denir. PAS; laktoz, mineral maddeler, vitaminler, süt yağı ve çözünebilir proteinlerce zengin bir üründür. PAS`ın en önemli kısmını serum proteinleri oluşturmaktadır (Smithers et.al., 1996).

Süt endüstrisinde PAS çevre kirliliğine sebep olan en önemli atıklardan birisidir. Türkiye`de bir atık olarak görülmesine rağmen, süt endüstrisi gelişmiş olan ülkelerde hem ekonomik açıdan hem de çevre sağlığı ve beslenme yönünden bileşimce zengin bir hammadde olarak değerlendirilmektedir (Özçelik vd., 1994 ; Kavas ve Karagözlü, 2000; Ayar vd., 2007).

Son zamanlarda, PAS`da bulunan protein parçalarının elde edilmesi gıda teknolojisi açısından önem kazanmıştır. Serum proteinlerinin bazı hastalıklarda koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle sütün serum proteinleriyle ilgili araştırmaların sayısı dikkat çekecek derecede artmıştır. Süt serum proteinlerinin önemli bir kısmını oluşturan α -laktoalbuminin (α -LA) antihipertansif, anti-kanser, hipokolesterolemik ve antimikrobiyal etkiler de dahil olmak üzere artan sayıda birçok biyolojik aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Bayram., 2007).

Serum proteinleri birçok gıda ürününde yapısal özellikleri iyileştirir, gıdaların terapatik ve besinsel değerini artırmasından dolayı gıda teknolojisinde kullanım alanı bulmuştur. Son yıllarda membran teknolojilerinde görülen gelişmeler PAS`dan protein fraksiyonlarının elde edilmesini sağlamıştır.

Bu çalışmada, peynir üretimi sırasında elde edilen PAS`da büyük bir öneme sahip olan ve özellikle bebek mamalarında kullanılan α -LA`i saflaştırmak için farklı membran gözenek çaplarına sahip filtrelerle ultrafiltrasyon teknikleri kullanılmış ve HPLC ile miktar tayini yapılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Peyniraltı Suyu

Sütün kendi kendine ekşitilmesi, asit katılarak veya maya enzimiyle pıhtılaştırılmasıyla elde edilen ürünlerden pıhtının alınmasından sonra yeşilimsisarı renkteki geri kalan sıvıya “ PAS” denir (Metin, 1983; <http://eng.ege.edu.tr/~otles>).



Şekil 2.1. Peyniraltı suyu

PAS iki değişik şekilde meydana gelmektedir :

1. Ekşitilmeyle veya asit katılarak yapılan ürünlerin artığı olan “asit peynir suyu” veya “ekşi peynir suyu” dur.
2. Maya enzimi ile pıhtılaştırılarak elde edilen “ maya peynir suyu” veya “tatlı peynir suyu” dur (<http://eng.ege.edu.tr/~otles>).

Peynir yapımı sırasında hammadde olarak kullanılan sütün bileşimi ve asitliği, peynirin çeşidi ve işleme tekniği, pıhtılaştırma sıcaklığı ve süresi, sütün yağ/ protein oranı, peynir randımanı ve sütün pıhtılaştırmada kullanılan maddenin maya veya asit oluşuna göre, elde edilen PAS`nun bileşiminde ve miktarında farklılık gözlenir. Genel olarak (Çizelge 2.1) asitle pıhtılaştırılmış PAS`nun maya peynir suyundan besin değeri açısından daha zengin olduğu görülür. Ancak PAS dendiği zaman akla gelen, maya enzimiyle pıhtılaştırılma sonucu arta kalan sıvıdır (Metin, 1983).

Çizelge 2.1. Pıhtılaşma şeklinin peyniraltı suyu % bileşimi üzerine etkisi

Bileşimi (%)	Yöney, 1962	Kosikowski, 1979		Körpe vd., 1997		Üçüncü, 2002	
		MPAS*	MPAS	APAS	MPAS	APAS	MPAS
Su	-	93,7	93,5	93,0	93,0	93–94	93,8–94,2
Kurumadde	-	6,35	6,5	7,0	7,0	6,0–7,0	5,8–6,2
Yağ	0,3	0,5	0,04	0,3	0,1	0,3–0,8	0,1
Laktoz	4,9	4,85	4,9	4,9	5,1	4,5–4,7	4,0–4,2
Protein	0,9	0,8	0,75	0,9	1,0	0,8–1,0	0,7–0,8
Mineral madde	0,6	0,5	0,8	0,6	0,7	0,5–0,7	0,75–0,85

MPAS: Maya Peyniraltı Suyu

APAS: Asit Peyniraltı Suyu

Peynir yapımı sırasında bir yan ürün olan PAS süt şekeri (laktoz), mineral maddeler, vitaminler, süt yağı ve çözünebilir proteinlerce zengin bir üründür. PAS bileşimi peynir yapım tekniklerine göre değişmekle birlikte genellikle sütün peynire işlenmesi sırasında suda çözünen proteinlerin büyük bir kısmı PAS`na geçmektedir (Tarakçı ve Küçüköner, 2006).

Peynir üretimi sırasında PAS`da kalan bu proteinlere “serum proteinleri” ve ya “peyniraltı suyu proteinleri” denir. PAS`da serum proteinlerinin yanı sıra peynir mayası tarafından parçalanmış glikomakropeptidler de bulunur (Üçüncü, 2005).

2.2. Peyniraltı Suyu Proteinleri

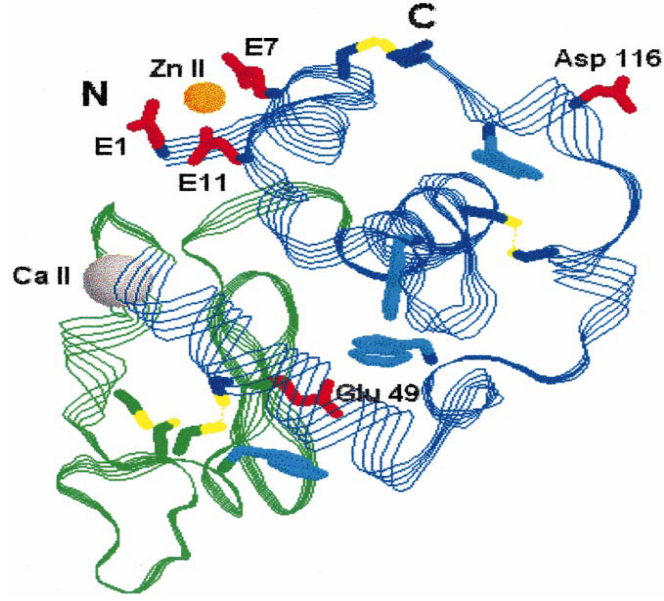
PAS `da bulunan en önemli serum proteinleri 5 grup altında toplanır. Bunlar :

1. α - Laktoalbumin (α - LA)
2. β - Laktoglobulin (β - Lg)
3. Serum Albumini
4. İmmunoglobulinler
5. Proteoz- Peptonlar (Muller et.al., 1999; Cheang and Zydney., 2003; Üçüncü, 2005).

2.2.1. α -Laktoalbumin (α - LA)

α -LA, 14.200 Da büyüklüğünde kuvvetli Ca bağlayan tek peptid zincirinde 67'si esansiyel olmak üzere 123 amino asit içeren oldukça küçük bir proteindir (Jovanović vd. 2005; Konrad ve Klenschmidt, 2008). α -LA, PAS proteinlerinde % 20–25 oranında bulunur. Özellikle lösin, lisin, sistin ve aspartik asit amino asitleri bakımından zengindir (Üçüncü, 2004).

Whitney et.al. (1976) α -LA molekülünün A ve B olmak üzere 2 farklı genetik formunu bulmuştur. Fox (1989) yılında α -LA molekülünün 3 farklı genetik formdan oluştuğunu belirtmiştir. Doğal α -LA, 2 kısımdan oluşmaktadır: α -sarmal kısmı daha büyük ve β tabaka kısmı ise daha küçüktür. Bu bölgeler birbirine Ca^{+2} ile bağlanmaktadır. α -sarmal bölgesi, 3 büyük α -sarmaldan (5-11, 23-24 ve 86-98 kalıntıları) ve 2 kısa 3_{10} sarmaldan (18-20 ve 115-118 kalıntıları) oluşmaktadır. Küçük bölge, bir seri bölümden oluşmaktadır; küçük 3 katlı antiparalel β -kırmalı tabaka (41-44, 47-50 ve 55-56 kalıntıları) ve kısa 3_{10} heliks (her dönüşte 3 kalıntı ve 10 atom içeren zincir içi hidrojen bağı bölümü; 77-80 kalıntıları) ki bölge aralarındaki derin yarıklık ile birbirinden ayrılmıştır. Aynı zamanda, iki bölge 73 ve 91 kalıntıları arasındaki sistein köprüsü ile Ca^{+2} bağlanma bölgesini oluşturarak bir arada tutulmaktadır. İkinci önemli disülfid bağı 61–77, iki bölgeyi birbirine bağlamaktadır. Sonuç olarak bu molekül 4 disülfid bağı içerir ve doğal hali kalsiyum bağlayıcı büyük bir α -helical ve küçük β -katlamalı bölgeden meydana gelir (Permyakov and Berliner, 2000).



Şekil 2.2. α -laktoalbumin yapısı (Permyakov and Berliner, 2000)

Şekil 2.2`de α - kısmı mavi, β kısmı yeşil ile gösterilmiştir. Trp kalıntısı mavi ile ve S-S disülfid bağları sarı ile gösterilmiştir. Zn^{+2} iyonu ile koordinasyona katılan kalıntılar kırmızı ile gösterilmiştir (Permyakov and Berliner, 2000).

α -LA molekülü suda çözünür özelliktedir. Süt serumunda kazeinden daha küçük kolloidal tanecikler meydana getirmiştir. Sütün hidrofilik özellik gösteren proteinlerindedir. Hidrofil özellikte olması nedeniyle kolayca pıhtılaşmaz. α -LA molekülü $100^{\circ}C$ `de 5 dk. Isı uygulaması sonucunda denatürasyona uğramaktadır . (Jovanović et.. al., 2005; Üçüncü, 2005).

2.2.1.1. α -LA`nin Sağlık Açısından Önemi

α -LA yeni doğan bebekler ve dengeli aminoasit dağılımı ile büyüyen çocuklar için, besinsel gereksinimlerine en uygun protein kaynağıdır. α -LA'nın bileşiminde yer alan triptofan, yeni doğan bebeklerde beyin gelişimi için gerekli serotonin ve melatoninin öncüsüdür. Bileşiminde bulunan sialik asit beyin gangliyonların yapısal ve işlevsel bileşenidir. Yüksek oranda sialik asit içeren anne sütü, beyin gelişiminin en hızlı olduğu yeni doğanların beslenmesinde çok önemlidir. Kalsiyum, çinko gibi

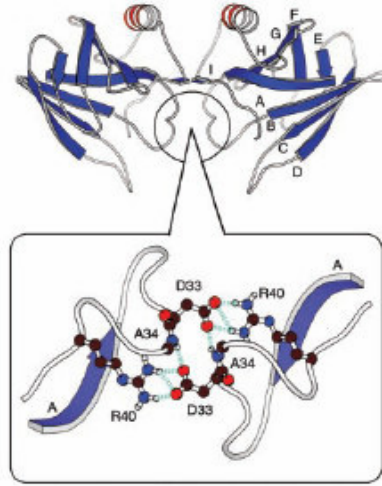
önemli minerallerin absorpsiyonunu sağlar (www.ulkerhero.com). Ayrıca α -LA immunitiyi arttırmakta ve bazı kanser türlerinin risklerini de azaltmaktadır. α -LA kısa zincirli aminoasitlerin iyi bir kaynağı olmasından dolayı aynı zamanda sporcu gıdalarında da kullanılmaktadır (de Wit, 1998; Harper, 2000; German et.al., 2001). Bunun yanı sıra bileşiminde bulunan tiriptofan, besinsel değeri ve yüksek toksisitesi sebebi ile ilaç sanayinde kullanım alanına sahiptir (Otani and Mizumoto, 1998). Matsumoto et.a.l., (2001), α -LA nin mukoza yaralarına karşı koruyucu özelliği olduğunu belirtmişlerdir.

Pelligrini et.a.l., α -LA'nin tripsin ve kimotripsin enzimleri yardımıyla proteolitik sindirimi sonucu oluşan polipeptidlerin çoğunlukla Gram (+) bakterilere karşı bakterisidal etkiye sahip olduğunu bulmuşlardır (Permyakov and Berliner, 2000).

Ayrıca α -LA, vücutta laktoz biyosentezinin son aşamasını katalize eder ve meme salgı bezlerindeki suyun taşınımını kontrol eder.

2.2.2 β - Laktoglobulin (β - Lg)

β - Lg peyniraltı suyu proteinlerinin en büyüğüdür ve toplam peyniraltı suyu proteinlerinin %50'sini, toplam süt proteinlerinin de yaklaşık % 10'nu oluşturur (Chatterton et.a.l., 2006). Yapısında 84 esansiyel olmak üzere 162 amino asit bulundurur ve 2 disülfid bağı ve 1 sülfüdril (Cys¹²¹) grubu içerir (Jovanović et.a.l., 2005). β -Lg molekülü 84–86 °C'de 5dk. içinde denatürasyona uğrar (Üçüncü, 2005). Şekil 2.2`de β - Lg yapısı görülmektedir.



Şekil 2.3. β -laktoglobulin yapısı (Sakurai and Goto., 2002)

PAS proteinlerinin en büyüğü olan globulin $\text{pH} < 3$ 'de monomer yapıdadır. Moleküler ağırlığı 18 kDa'dır ve suda çözünen globüler küçük bir proteindir. Fakat çedar peynirinden elde edilen peyniraltı suyunda, yani pH 3-7 arasında β -Lg molekülü dimer yapıdadır ve moleküler ağırlığı 36 kDa'dır (Chatterton et.a.l., 2006).

β -Lg retinole (provitamin A) bağlıdır ve esansiyel bir aminoasit olan sisteince zengindir. Bu aminoasit glutayoninin sentezinde önemli yer tutmaktadır. β -Lg'nin globüler yapısı, midedeki asitlere ve mevcut proteolitik enzimlere karşı oldukça stabildir. İnekten buzağıya retinolün taşınmasında β -Lg'nin biyolojik fonksiyonu vardır. Ancak bu biyolojik fonksiyonun bebekler için önemi azdır. Bu da insan sütünde β -Lg'nin neden az olduğunu açıklamaktadır (Karagözlü ve Bayarer., 2004).

β -Lg'nin besinsel ve fonksiyonel özelliklerinden dolayı gıda sanayinde farklı kullanım alanları bulmaktadır. Örneğin β -Lg mükemmel çırpılabilirlik özelliği gösterir. Bu özelliğinden dolayı kurabiye ve benzeri ürünler sanayinde yumurta beyazına alternatif olarak kullanılabilir (Chatterton et.a.l., 2006).

Ayrıca β - Lg içerdığı amino asit profiline bakıldığı zaman yüksek besinsel değere sahip olması açısından sporcu içeceklerinde ve meyve suyu gibi içeceklerde protein güçlendirici aktif ajan olarak kullanılırlar (Chatterton et.a.l., 2006).

2.2.2.1. β - Lg`nin sağlık açısından önemi

Angiotensin-converting enzimi (ACE), kan basıncının düzenlenmesinde yani hipertansiyonda büyük rol oynar. β - Lg`nin pepsin tripsin veya kimotripsin gibi enzimler kullanılarak proteolitik parçalanması sonucu elde edilen çeşitli peptidler ACE karşı engelleyici rol oynar (Chatterton et.a.l., 2006).

Tripsin enzimi ile β - Lg`nin parçalanması sonucu 4 peptid parçası oluşur. Yapılan birçok araştırmada oluşan peptid parçalarının Gram-pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterdikleri tespit edilmiştir (Chatterton et.a.l., 2006).

Fareler üzerinde yapılan birçok çalışmada süt proteinlerinden özellikle peyniraltı suyu proteinlerinin et ve soya gibi diğer diyet proteinlere göre genç farelerde kanser gelişimine karşı koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir (McIntosh et.a.l., 1995).

2.2.3. Serum Albumini (BSA)

Serum albümini (BSA), toplam süt serumu proteinlerinin yaklaşık % 10- 15`ini oluşturan büyük bir moleküldür (Marshall., 2004). 582 adet amino asit kalıntısı içerir ve moleküler ağırlığı 66.267 kDa`dur. Serum albumini 17 molekülerarası disülfid köprülerine ve bir thiol grubuna sahiptir (Madureira et.a.l., 2007).

SA`nın boyutu ve yapısının yüksek seviyesinden dolayı tat bileşenlerinin yanısıra serbest yağ asitlerine ve diğer lipidlere bağlanabilir (De Wit, 1998; Karagözlü ve Bayarer., 2004; Madureira et.a.l., 2007). Ayrıca SA yüksek sistein içeriğinden dolayı karaciğerde glutatyon üretiminde önemli bir kaynak olabilmektedir (Karagözlü ve Bayarer., 2004).

2.2.4. İmmunglobulinler

Süt proteinlerinin yaklaşık % 2'si ve serum proteinlerinin %10-15'i gibi önemli bir miktarı immünoglobülinleri içermektedir. İnek sütünden üretilen peynirlerin sularında ve ağız sütünde immunglobulinlerin IgA, IgG ve IgE fraksiyonlarını içerirken, insan sütünde ise IgD ve IgE fraksiyonları bulunmaktadır. İmmunglobulinler peynir mayası ve asite karşı dayanıklı, ısıya karşı ise çok hassastırlar. Peynir yapımı sırasında LA ile birlikte PAS'a geçerler (Metin, 2001). PAS'ın bu grubu, bebekler için pasif immunité sağlamakta iken yetişkinlerde bağışıklık sistemini desteklemektedir (Karagözlü ve Bayarer, 2004).

2.2.5. Proteoz-peptonlar

Süt proteinlerinin yaklaşık % 3'ü ve serum proteinlerinin de yaklaşık % 20'sini oluştururlar. Proteoz-peptonlar diğér serum proteinlerinin aksine ısıya karşı son derece dayanıklı olup 95–100 °C'de 30 dak. ısıtıldığı zaman çökmezler ve % 12'lik triklorasitte çözünürler. Proteinlerin sınırlı parçalanmaları sonucu meydana gelirler. Oldukça basit yapıdadırlar ve bünyelerinde glikoprotein ve fosfoprotein karışımı bulundururlar. Asit aracılığıyla kazein ve ısıl işlem aracılığıyla albumin ve globulin fraksiyonları uzaklaştırıldığı zaman, proteoz-peptonlar serum içerisinde kalırlar (Metin, 2001).

Serum proteinlerinin özellikleri ve PAS'da bulunma oranları ile biyolojik aktiviteleri Çizelge 2.2 ve 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. PAS proteinlerinin özellikleri (Zydney, 1998;Cheang and Zydney, 2003)

Protein	Konsantrasyon (g/L)	Moleküler Ağırlığı (Da)	İzoelektrik pH
α -Laktoalbumin	1.2	14.200	4.5–4.8
β - Laktoglobulin	2.7	18.362	5.2
Serum Albumini	0.4	69.000	4.7–4.9
İmmunglobulinler	0.65	150.000-1.000.000	5.5–8.3

Çizelge 2.3. Süt proteinlerinin PAS`da bulunma yüzdeleri ve biyolojik aktiviteleri (Madureira et.a.l., 2007)

Protein	Peyniraltı Suyunda Bulunma Yüzdeleri	Biyolojik Aktiviteleri
α -Laktoalbumin	% 20–25	Laktoz sentezi Ca taşıyıcı Antikarsinojenik Antimikrobiyal
β - Laktoglobulin	%50	Retinol taşıyıcı Yağ asidi bağlayıcı Antioksidan Antibakteriyal Antiviral
Serum Albumini	% 10- 15	Yag asidi bağlayıcı Antimutajenik
İmmunglobulinler	%10–15	İmmün koruma

2.3. PAS'ın Çevre Kirliliği Açısından Önemi

PAS içerdiği organik ve anorganik maddelerden dolayı, kanalizasyon sistemleri ve merkezi su kanalları için de son derece tehlikeli boyutlarda çevre kirliliğine neden olmaktadır. Genel anlamda değerlendirilmeyen ve dereye, kanala ya da denize dökülen PAS'ın, suya karışıklıklarında yapısında bulunabilen laktoz aerobik bakteriler tarafından parçalanmakta ve bunun neticesinde organik asitler meydana gelmektedir. Aynı şekilde söz konusu ürünün yapısında bulunan proteinlerin de anaerobik koşullarda faaliyet gösteren bakteriler tarafından bazı parçalanma ürünlerine dönüştürüldüğü tespit edilmiştir (Kavas vd., 2006).

Nitekim çevre kirliliğinin boyutunu belirlemek için biyolojik oksijen ihtiyacı (BOI) olarak ifade edilen ve biyokimyasal oksijen gereksinimini ifade eden bir değer kullanılır. Bu değer, kirli sulardaki organik maddeleri parçalamak için mikroorganizmaların kullandığı oksijen miktarını belirtir. Bir litre PAS için bu değer peynir yapım sürecine bağlı olarak 40-60 g/L olarak değişmektedir (Gavala et.al., 1999; Farizoğlu vd., 2004). Söz konusu bu ölçü birimine göre belirlenen bu değer, yaklaşık bir insanın 1 günlük kişisel artıklarının karşılığı olarak algılanmaktadır. Söz konusu değerın diğer bir anlatımını da şu şekilde yapabilmek mümkündür. Örneğin günde 10 ton süttten elde edilen PAS'ın, 5500 nüfusa sahip bir kasabanın yaptığı günlük çevre kirliliğine eş olduğu tespit edilmiştir (Kavas vd., 2006).

PAS'ın besin maddeleri içeriğinin az olmasına karşın, çeşitli oluşu nedeniyle süt endüstrisi gelişmiş topluluklarda peynir sularının kanalizasyonlara ve nehirlere akıtılması yasalar ile sınırlanmış ve ürünlere işlenmesi için yöntemler ve alt yapı olanakları sağlanmıştır. Ülkemizde yılda 400.000 ton dolayında peynir üretildiği ve bu peynirden elde edilen PAS'ın ortalama 800.000 ton olduğu tahmin edilmektedir. Bunlardan elde edilen artıkların çok az bir kısmı basit şekilde değerlendirilmekle beraber önemli bir bölümü işletmelerin dağılık oluşu, olanaksızlık ve bilgisizlikten değerlendirilememektedir. Bu nedenle PAS'ın dökülmesiyle ülkemizde 19 000 ton yağ, 18 000 ton protein, 96 000 ton laktoz, 12 000 ton mineral madde kaybı olabileceği hesaplanmıştır. Görüldüğü gibi son yıllara kadar atık gözüyle bakılan

sütçülük artıkları ülkemizin hayvansal protein gereksinimine büyük ölçüde katkıda bulunacak durumdadır. Böylesine değerli artıkların değerlendirilmesi ülke ekonomisi ve toplumun dengeli beslenmesi için mutlaka gereklidir (Kamer vd., 1997).

Toplam kurulu kapasitesi 3.500.000 ton/yıl olan süt işleme tesislerinde kullanılan su hammadde olan süttten işletmeye bağlı olarak 1,8 -12 kat daha fazla olabilmektedir. Temel kirleticiler çeşitli şekillerde kanala dökülen süt, PAS, konsantre yoğurt üretiminde çıkan yoğurt suyu, yayık altı, tereyağı yıkama suyu, salamura çözeltileri, temizleme sularıdır. Endüstriyel atık suyun kirliliği "İnsan Kirliliğine Eşdeğer" kirlilik (İKE) ile ölçülür. Türkiye'de süt endüstrisi tesislerinin yarattığı kirlilik 20 – 200 milyon İKE olarak tahmin edilmektedir.

Yapılan bir araştırmada haftada 8000 L PAS atan bir işletmede UF sistemleri kullanarak BOI'ni 40 000'den 90'a ve kimyasal oksijen ihtiyacı (KOI) ise 1800'den 62'ye düşürülmüş ve PAS'ı değerlendirerek çevreye zararsız hale getirilmiştir. Rektör ve Vatai (2004) yılında PAS'ı işlemek için kompleks membranlar kullanmışlar ve KOI ve BOI değerlerini düşürerek atılabilir ve sulama için kullanılabilir hale getirmişlerdir.

Gıda endüstrisi içinde üzerinde en çok çalışılmış konulardan birisi PAS'dır. Bunun hiç bir işlem görmeden doğrudan alıcı su kaynağına verilmesi ile yaklaşık 40.000 BOI düzeyinde bir kirlilik oluşmaktadır. 40.000 BOI sınır değer olup, anaerobik arıtım gerektirecek kadar yüksek bir kirliliği tanımlamaktadır. Yapılan hesaplamalara göre yayıkaltı suyu ve peyniraltı suyu ile birlikte 1984 yılında yaklaşık 23 bin ton yağ, 103 bin ton protein, 158 bin ton laktoz ve 15 bin ton mineral madde atılmıştır. Sadece atılan protein 1984 yılı nüfusu ile Türkiye'nin 1,5 - 2 aylık protein ihtiyacı anlamına gelmektedir. Yayıkaltı ve peyniraltı suyundaki tüm besin maddelerinin geri kazanılarak doğrudan beslenmede kullanılması beklenmektedir (Temiz ve Okumuş, 2005).

2.4. PAS`ın Değerlendirme Yöntemleri

İçerdiği besin öğeleri ve özellikle peynir üretiminde de fazla miktarda elde edilmesi PAS`ın değerlendirilmesinin önemini arttırmaktadır. Bu nedenle PAS`ın değerlendirilmesi amacıyla birçok alanda kullanım alanı bulmuştur.

PAS`ın kullanım alanları:

1- PAS protein konsantrelerinin elde edilmelerinde çeşitli yöntemler uygulanarak farklı özelliklerde ticari ürünler elde edilmektedir. Bunların başlıcaları; PAS tozu (% 13 oranında protein içerir), PAS proteini konsantratıdır (% 35, 50, 80 oranında protein) (Renyad and Whitehead, 1991; De la Fuente et.al., 2002; Karagözlü ve Bayarer, 2004).

2- Doğrudan tüketim: peynir suyundan yapılan peynirler, yağı alınmış ve/ veya proteince zenginleştirilmiş PAS.

3- Süt ürünlerine katma: peynire işlenecek süte veya taze peynire peynir suyu proteini katılması, eritme peynirlerine peynir suyu konsantratı eklenmesi

4- Çeşitli gıdalara katma: unlu mamullere peynir suyu konsantratı, tozu veya laktoz katılması, meyveli içeceklere peynir suyu konsantratı veya peynir suyu ilavesi

5- Diyetik amaçlarla: inek sütünün kadın sütüne benzetilmesi için süt şekeri ve peynir suyu proteini kullanımı, içme sütlerinin ve ekşi süt içeceklerinin proteince zenginleştirilmesi için peynir suyu proteinin katılması, peynir suyu kürü

6- Diğer amaçlarla: tıbbi preparatlara ekleme, laktoz, galaktoz, peynir suyu proteini, vitamin preparatları, tuz preparatları gibi; mikroorganizmalar için besi ortamı olarak peynir suyu proteini hidrolizatı, penisilin üretimi vb. gibi

7- PAS`daki proteinlerin en önemli özelliği ısıtıldıkları takdirde denatüre olmalarıdır. Bu işlem de lor yapımının en önemli özelliğini oluşturmaktadır.

8- Süt tozu tesisi bulunan süt fabrikalarında peynir suyu da toz haline getirilir. PAS`daki besin elementlerinin büyük çoğunluğu içerikte kaldığı için, besin değeri açısından zengin bir üründür. Bu şekilde PAS`ın kuru maddesini meydana getiren bütün maddelerden yararlanılmış olur.

9- PAS`ın içecek olarak, özellikle hastalıkları iyileştirme amacıyla kullanımı antik çağlara kadar uzanmaktadır (Kamer vd., 1997). PAS`dan çeşitli alkollü ve alkolsüz içecekler üretilebilir. Birçok araştırıcı, PAS`ın besleyici yumuşak içkilerin veya yüksek proteinli içkilerin formülünde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

10- Enerji kaynağı olarak, peynir suyundan biomas (tek hücre proteini) elde edilir. PAS alkol fermantasyonuna bırakılır ve destile edilir, buradaki destilasyon artıkları biomas üretiminde kullanılır (<http://eng.ege.edu.tr/~otles>).

11- PAS`ın ultrafiltrasyon artıklarının anaerob fermantasyonu ve alkol destilasyon artığından enerji ihtiyacı olarak biogaz üretilmektedir (Kavacık ve Topaloğlu, 2007).

12- B12 vitamini üretiminde kullanılmaktadır (Öztürk, 2007).

Yukarıda bahsedilen kullanım alanlarının yanında gelişen teknoloji sayesinde PAS`da bulunan aminoasitlerce zengin serum proteinlerinin geri kazanılması mümkün hale gelmektedir. Son yıllarda gelişen membran filtrasyon teknikleri PAS protein fraksiyonlarının elde edilmesi ve çeşitli ürünlerin yağ ve laktoz içeriğinin kontrolü için son derece kullanışlı bir yöntemdir (Zydney, 1998).

2.5. Membran Ayırma Teknikleri

2.5.1. Membranların Tarihçesi

Abbe Nolet, 1748'de, tuzlu suyla doldurulmuş bir kese su içine daldırıldığında, kesenin gerilimine rağmen genişlediğini gözlemlemiştir. Graham, 1854'te bir oyuncak balonun havasının boşalmasını gözlemlerken meraklanarak, farklı gazlarla deneyler yapmış ve bazı gazların balonu daha hızlı terk ettiğini farketmiştir. Bu, ozmotik basınca bağlı olarak gerçekleşmiştir (Howell et.al., 1993; Erdem, 2002).

Bu tür deneyler, konu üzerine ilgiyi ve araştırmaları arttırmıştır. Fick, 1855'te, nitroselülözden yapılmış ilk polimerik sentetik membranı geliştirmiştir. Daha sonra Traube ve Pfeffer de yapay membranlar hazırlamışlardır. Bunlar genellikle polimerin (nitroselülöz) uygun bir çözücü (alkol, eter veya asetik asit) ile çözündürülmesi ve çözeltinin düz bir plakaya döküldükten sonra çözücünün buharlaştırılmasıyla hazırlanmıştır. Difüzyon ve ozmotik basınçla ilgili ilk sayısal ölçümler bu membranlarla gerçekleştirilmiştir. Benchold, 1907'de buharlaştırma hızını kontrol ederek membranların gözenek büyüklüğünü kontrol etme metotları geliştirmiştir. Membranlar üzerine araştırma aktiviteleri 1870 ile 1920 yılları arasında hızla artmıştır. Özellikle, seyreltik çözeltilerle ilgili van't Hoff teorisi ve Gibbs'in ozmotik basınç ile diğer termodinamik özellikler arasındaki ilişkisi üzerine çalışmaları önemli olmuştur (Cheryan, 1998).

Bu çalışmaların ışığında, ilk ticari membran 1927'de üretilmiştir. Bu ticari membranlar, sıvı akıntılardan mikroorganizmaların ve partiküllerin uzaklaştırılmasında kullanılmışlardır. Samuel Yuster 1950'lerde Gibbs adsorpsiyon izotermini kullanarak tuzlu sudan içilebilir su üretmenin mümkün olabileceğini ileri sürmüştür. Daha ileri deneysel çalışmalar, tuzlu sudan içilebilir su elde etmenin mümkün olduğunu göstermiştir, ancak verim çok düşük olmuştur. Sourirajan, 1958 ile 1960 yılları arasında, membranı ısıtmaya çalışmıştır ve bunun gözeneklerin genişlemesine yol açacağını ve bu genişlemenin soğumadan sonra da kalacağını ileri sürmüştür. Bu genişlemenin daha yüksek bir akışa yol açacağını düşünmüştür. Fakat

aslında selülöz asetat ultrafiltrasyon membranları ısıtıldığında yüzeydeki gözenekler büzülerek membran boyunca asimetrik bir yapıya neden olmuştur. Fakat bu yeni membran, şaşırtıcı bir şekilde, daha yüksek bir akış sağlamış ve daha yüksek tuz ayrımı sağlamıştır. Bu, membran teknolojisinde bir kilometre taşıdır (Cheryan, 1998; Erdem, 2002)

Ultrafiltrasyon 1970'li yıllarda elektroboyamada ve süt endüstrisinde yaygın olarak kullanılmıştır. Farklı polimerlerden birkaç polimerik membran üretilmiştir. Membran araştırmalarına artan ilgiyi gösteren “The Journal of Membrane Science” dergisi 1973'te yayınlanmaya başlamıştır (Howell et.al .,1993; Erdem, 2002).

Diğer bir gelişme de endüstride 1940'lerden beri inceleme altında olan seramik membranların tanıtımı olmuştur. Enerji krizi, nükleer enerji tesislerine büyük bir ilgiye neden olmuştur. Bu tesisler yüksek konsantrasyonlarda (%3) ^{235}U 'ya ihtiyaç duyarlar. ^{235}U doğal olarak Uranyumda % 0.7 oranında bulunur. Konsantrasyonu, kütle spektroskopuyla arttırılmıştır ancak bu pahalı bir yöntemdir. Endüstrileşmiş ülkelerde, nükleer enerji tesislerinde seramik membranlarla gaz difüzyon konsantrasyonu işleminde aynı seramik membranları 20 yıl boyunca kullanılmıştır (Erdem, 2002).

Gaz ayrımı ve pervaporasyon birimleri 1980'lerde kullanıma geçmiştir (Howell vd., 1993, Cheryan, 1998, Erdem, 2002). 1990'larda, girişimci firmaların sayısındaki ve membran işlemleri için kullanılan ekipmanlarının çeşitliliğindeki artışla membran endüstrisinde büyük bir gelişim olmuştur (Howell et.al ., 1993).

2.5.2. Membran Filtrasyon

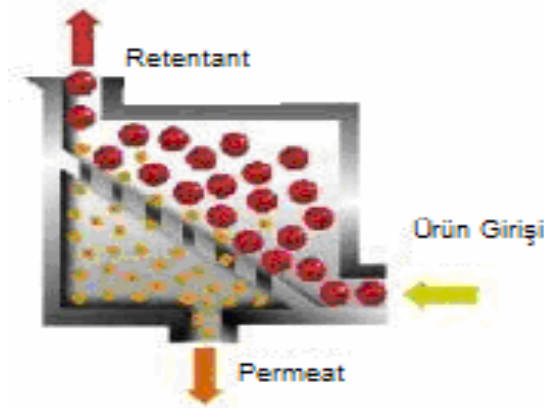
Gıda sanayinde farklı fazların birbirinden ayrılması amacıyla değişik filtrasyon teknikleri sıklıkla kullanılmaktadır. Filtrasyon bir akışkan sistemden boyut farkına dayanarak iki veya daha fazla bileşenin ayrılması olarak tanımlanır. Membran filtrasyon ise sıvı içinde çözünen katıların ve gaz karışımlarının ayrılmasında kullanılır (<http://www.forumalemi.net./membran-ayirma-teknikleri>).

Membran ayırma tekniği genel olarak;

1. Ultrafiltrasyon (UF),
2. Diyafiltrasyon
3. Mikrofiltrasyon (MF)
4. Nanofiltrasyon (NF)
5. Ters Osmoz olmak üzere gruplara ayrılır.

2.5.2.1. Ultrafiltrasyon (UF):

UF terimi 1907 yılında Bechhold tarafından kullanılmıştır. UF sistemleri yüksek moleköl ağırlıklı bileşenleri ısı uygulaması ve faz değişimine uğratmadan konsantre etme imkanı sunar. Ayrıca por çaplarına göre değil, membrandan geçemeyen küresel moleköl (Nominal Molecular Weight Cut-off, NMWC) ağırlığına göre tanımlanır. UF membranlarda NMWC 2000-300.000 arasında değişir (<http://www.forumalemi.net./membran-ayırma-teknikleri>).



Şekil 2.4. Filtrasyon sistemi

UF sistemlerinde genellikle 1-15 bar arasında basınç uygulanabilir. Gıda sanayinde protein ve nişasta gibi ısıya duyarlı moleküller için UF tekniğiyle ortam sıcaklığında yapılan konsantre etme işlemi bunların çözünübilirlik, köpük ve jel oluşturma kapasitesi, emülsifiye olma, su ve yağ bağlama gibi fonksiyonel özelliklerini olumsuz etkileyen ısıl reaksiyonları en aza indirger. Ayrıca UF sistemleri gıda işleme

ve süt ürünleri endüstrisinde yararlı bileşiklerin geri kazanmak amacıyla kullanılabilir. Ayrıca yağın, PAS proteininin, protein olmayan azotun, laktoz ve minerallerin ayrılmasında ve tutulmasında kullanılır. UF; %35-65 PAS konsantresi üretiminde ve %70-85 PAS konsantre üretiminde kullanılır. Hammaddenin özelliğine bağlı olarak MF ve UF'nun birlikte kullanılması daha ekonomik olmaktadır (<http://eng.ege.edu.tr/~otles>).

2.5.2.2. Diyafiltrasyon

Alıkonma faktörü düşük olan bileşenleri daha yoğun konsantrasyonda elde edebilmek için UF'ye ek olarak konsantre etme prosesinin belirli bir anında su eklenmesi işlemidir. Sürekli ve kesikli olmak üzere iki şekilde yapılır. Kesikli diyafiltrasyonda konsantre edilmiş ürün sulandırılarak tekrar filtre edilir. Sürekli diyafiltrasyonda ise uzaklaştırılan szntyle eşit hacimde su çözeltiye ilave edilir (<http://www.forumalemi.net./membran-ayırma-teknikleri>).

2.5.2.3. Mikrofiltrasyon (MF)

UF'de olduğu gibi MF de basınç önem taşımaktadır. Molekl ağırlığı 50 ile 500 kDa arasında olan moleküllerin karakterize edilmesi için kullanılan basınç destekli (< 2 bar) membran ayırma tekniğidir. PAS'daki büyük protein moleküllerinin küçük protein moleküllerinden ayrılmasında; yağların, protein olmayan azotun, laktozun ve düşük moleküllü minerallerin tutulmasında mikrofiltrasyon tekniği kullanılır. PAS'dan mekanik yolla yağın giderilmesindeki kısıtlamalar PAS konsantresinde yüksek oranda yağ kalmasına neden olmaktadır. PAS konsantresinde genelde %80–84 olan protein oranını sınırlamaktadır. PAS izolatında son ürün içindeki yağ oranı %0,5 den küçük olmalıdır. Bazı zel MF membranları ile bakteriler ve sporları tutabilirler (<http://eng.ege.edu.tr/~otles>).

2.5.2.4. Nanofiltrasyon (NF)

NF son zamanlarda kullanılmaya başlanmış ve moleküler ağırlık sınırı UF ile ters osmoz arasında (200 ila 2000 Da) olan bir membran ayırma yöntemidir. Genellikle bakterilerin, virüslerin, organik kalıntıların uzaklaştırılmasında kullanılır. Ayrılma işlemi organik yarı geçirgen membrandan oluşan seçici geçirgen bir tabaka üzerinde gerçekleşir. İşlemde itici güç membranın iki tarafındaki besleme ve süzüntü arasındaki basınç farkıdır. Membran seçiciliğinden dolayı su ve molekül ağırlığı 200 Da'dan küçük bileşenler yarı geçirgen ayırma tabakasından geçebilirken çözünmemiş karışımların bir veya birkaç bileşeni itici güce rağmen membran tarafından tutulur.

NF membranları, PAS'daki tek yüklü iyonlar haricinde bütün çözünenleri tutar. Membrandan geçen permeat içinde; su, tek iyonlu tuzlar ve suyun tetrahedral yapısını taklit eden bazı organik asitler bulunur. NF membranları ile; PAS'dan külün ayırımı ve UF permeatının konsantre edilmesi ancak %24 lük toplam katı oranına kadar gerçekleştirilebilir. Yapılan bir çalışmada NF'dan sonra kül oranı %30 azalmış ve özellikle Cl⁻, K⁺,Na⁺ gibi monovalent iyonların %70 oranında giderildiği görülmüştür (<http://eng.ege.edu.tr/~otles>).

2.5.3. Üretildikleri Materyallere Göre Membranların Özellikleri

Membranlar selüloz asetat (SA), poliamid (PA), polisülfon (PS), polietersülfon (PES), vs. gibi polimerlerden üretilebilir (Cheryan, 1998; Erdem, 2002).

Selüloz asetat, kirlenmeyi en aza indiren hidrofilik yapısı, geniş çeşitlilikte gözenek büyüklüğüne sahip membranların (MF, UF, RO için) üretimine olanak sağlaması, düşük maliyeti ve nisbeten kolay işlenebilirliği gibi bazı nedenlere bağlı olarak en yaygın kullanılan membran çeşitidir. Bu üstünlüklerin yanında çok önemli olumsuzlukları da vardır. İşlenme pH aralığı sadece 3-6 aralığında sınırlıdır. Endüstride temizlik ve sanitasyon için yaygın olarak kullanılan klorine çok duyarlıdır. Basınç, membranın sıkışmasına neden olur. İşleme sıcaklığının üst sınırı

30 °C'dir ve biyoçözünürdür .Tüm bu sakıncalarına rağmen, ters osmoz işleminde SA özellikle deniz suyundan içilebilir su eldesinde yaygın olarak kullanılır (Cheryan, 1998; Erdem, 2002)

PA membranlar – CONH – amid bandı içerir. İşleme pH aralığı 3-11 arasındadır, fakat klorin dirençleri daha düşüktür ve biyokirlenme SA membranlardakinden daha fazla olur (Cheryan, 1998).

PS ve PES membranlar bazı önemli avantajlara sahiptir. 1-13 pH aralığında ve 75 °C'ye kadar sıcaklıkta kullanılabilirler. Orta derecede klorin direncine sahiptir ve 0.2µm den 10 °A'ya kadar gözenek genişliğinde farklı konfigürasyonlarda membran hazırlamada kullanımı kolaydır, bunlarla MF ve UF gerçekleştirilebilir. Alifatik hidrokarbonlara, tamamen halojene olmuş hidrokarbonlara, alkollere ve asitlere karşı iyi kimyasal dirence sahiptir, fakat aromatik hidrokarbonlardan, ketonlardan, eterlerden ve esterlerden etkilenir. Diğer bir dezavantaj da, düşük işleme basıncı limitleridir (Cheryan, 1998).

SA ve PA karışımı membranlar bu teknikler kullanılarak daha geniş işleme pH, sıcaklık ve basınç aralığında, daha yüksek akışla üretilmiştir (Cheryan, 1998).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada, Balıkesir ve Isparta il ve ilçelerinde faaliyet gösteren 8 adet süt işletmesinden alınan 15 adet PAS analizlerde kullanılmıştır. Numuneler soğuk zincir altında labortuara getirilmiş analiz edilinceye kadar -25 °C`de saklanmıştır. PAS, çiğ süttten üretilen kaşar peyniri üretimi sonucundan elde edilmiştir.



Şekil 3.1. Peyniraltı suyu

3.2. Yöntem

3.2.1. Kimyasal Analizler

15 adet PAS'nun kimyasal bileşimini belirlemek amacıyla asitlik, pH, kuru madde, yağ, toplam protein, protein olmayan azot (NPN) ve kül tayinleri yapılmıştır.

3.2.1.1. Asit Tayini (SH cinsinden)

Homojen hale getirilmiş olan peyniraltı suyu örneklerinden 25 ml alınıp üzerine 2-3 damla fenolftalein damlatılarak 0.1 N NaOH ile hafif pembe renk elde edilinceye kadar titre edilmiştir (Metin., 2008).

3.2.1.2. pH Tayini

Peyniraltı sularının pH değerleri inoLab pH 720 marka pH metre ile belirlenmiştir.

3.2.1.3. Kuru Madde Tayini

Kuru ve temiz olan kurutma kapları kuru hava sterilizatöründe 105 °C'de 1 saat tutulmuştur. Kurutma kapları desikatörde soğutulduktan sonra darası alınmış yaklaşık 10 g örnek konularak tartılmıştır. Kuru hava sterilizatöründe 105 °C'de dört saat kurutulan örnekler, desikatörde yarım saatte soğutulup ve tartılmıştır. Tekrar etüvde bir saat tutulup, desikatörde soğutulup, tartılarak ağırlığın sabit hale gelip gelmediği kontrol edilmiştir. Sabit ağırlığı geldiğinde % kuru madde oranı hesaplanmıştır (IDF, 1987).

3.2.1.4. Kül Tayini

Örneklerin kül içeriğini belirlemek amacıyla porselen krozeler kullanılmıştır. Kuru ve temiz porselen krozeler alınarak, kuru hava sterilizatöründe 105 °C'de 1 saat

tutulmuştur. Porselen krezeller desikatörde soğutulduktan sonra darası alınmış ve yaklaşık 2 g örnek konularak, tartılmıştır. Suyunu uçurmak amacıyla 105 °C'de çalışan bir kuru hava sterilizatörüne konulmuştur. Kuru hava sterilizatöründe kurutulan örnekler kül fırınında 625 °C'de beyaz kül elde edilinceye kadar yakılmıştır. Daha sonra % kül miktarı hesaplanmıştır (AOAC, 1980).

3.2.1.5. Yağ Tayini

Yağ tayini Gerber metoduyla yapılmıştır. Süt bütirometresine 10 ml sülfirik asit (d 1,825 g/ml) ilave edilmiştir. Karıştırarak homojen hale gelen PAS` dan 11 ml alınarak yavaş yavaş asit üzerine boşaltılmıştır. Üzerine 1 ml amil alkol (d 0,811 g/ml) eklenmiştir. Bütirometreler alt üst edildikten sonra Gerber santrifüjünde 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Sonuçlar bütirometre skalasından okunmuştur (Metin., 2008).

3.2.1.6. Protein Tayini

Protein tayini Kjeldahl metoduyla yapılmıştır. Kjeldahl metodu ile protein tayini yakma, destilasyon ve titrasyon olmak üzere 3 aşamada gerçekleştirilmiştir. Yakma aşamasında örneklerden 5 ml yakma tüplerine alınarak üzerine 1 ml bakır sülfat (Merck), 15 g potasyum sülfat (Merck), 25 ml sülfirik asit (Fluka) ilave edilerek yakma işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra destilasyon işlemine tabi tutulur. Destilasyon işleminde metil red ve bromkresol green indikatörleri ile renklendirilmiş kırmızı renkli 50 ml borik asit yeşil renge dönüşür. Yeşil renge dönüşen borik asit (Sigma) 0.1 N HCl ile tekrar kırmızı renge dönüşünceye kadar titre edilmiştir.

$$\% \text{ Azot} = (1.4007 * (A - B) * N / W) \quad (3.1)$$

A=örnek titrasyonunda harcanan HCl (ml)

B=şahit titrasyonunda harcanan HCl (ml)

N=HCl nin normalitesi

W=örnek ağırlığı

% azot miktarının 6.38 faktörü ile çarpılmasıyla yüzde protein elde edilmiştir (IDF, 2001-20-2).

3.2.1.7 Protein Olmayan Azot (NPN)

10 ml peyniraltı suyu örneği alınarak üzerine % 15'lik triklorasetikasit (TCA) çözeltisinden 40 ml ilave edilmiş ve çökelmenin olması için 5 dak. bekletilmiştir. Daha sonra örnekler Whatman.1 filtre kağıdından süzülerek, süzüntüden 20 ml alınmış ve Kjeldahl metodu ile protein tayini yapılmıştır (IDF, 2001-20-4).

$$\text{NPN} = (1.4007 * (A-B) * N) / (m_f m_m / (m_t - 0,065 m_m)) \quad (3.2.)$$

A=örnek titrasyonunda harcanan HCl (ml)

B=şahit titrasyonunda harcanan HCl (ml)

N=HCl nin normalitesi

m_f =Filtratın 20 ml ağırlığı

m_m =Örnek ağırlığı

m_t =40 ml TCA ilavesinden sonra örnek ağırlığı

3.3 İstatiksel Değerlendirmeler

Örnekler üzerinde durulan özellikler bakımından (SH, pH,% Kuru madde, % Kül, % Yağ, %Protein,NPN) elde edilen gözlemler tek yönlü varyans analizi (One-Way-Anova) tekniği ile irdelenmiştir.

3.4 PAS`da Bulunan β -LG`nin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

PAS`da bulunan yabancı maddeler ve yağı ortamdan uzaklaştırmak için 3000xg 15°C`de 10 dak. santrifüj işlemi uygulanıp örnekler kaba filtre kağıdından süzülmüştür. Yabancı maddeler ve yağ ortamdan ayrıldıktan sonra PAS örneklerinden 1'er ml alınmış ve 1.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve 0.05 M NaH_2PO_4 içeren 3 ml tampon (pH 7) ile karıştırılmıştır. Üzerine 4 ml % 4' lük TCA ilave edip 500 rpm`de karıştırılmıştır.

Örnekleri 30 dk. oda sıcaklığında beklettikten sonra 3000xg 15°C'de 10 dak. santrifüj edilerek TCA' da çözülemeyen maddeler ayrılmıştır.

Süpernatant Econo-Pac 10 DG (Biorad) kolona yüklenerek tampon çözeltilerle dengelendikten sonra % 24 TCA'ya karşı spektrofotometrik olarak 280 nm de optik yoğunluk belirlenmiştir. β -Lg miktarları standart kurveden yararlanılarak hesaplanmıştır. (Lieske et.al., 1997).

3.4.1. β -Lg Standardının Hazırlanması

Stok β -Lg çözeltilisinin hazırlanması için 20 mg β -LG standardı (Sigma) 40 ml su içersinde çözüldürülmüştür (2mg/4ml). Çalışma sırasında bu stok solüsyondan 0,075-0,50 g / ml arasındaki oranlarda dilüsyonlar yapılmış ve % 24'lük TCA'ya karşı 280 nm'de Shimadzu UV-1601 spektrofotometrede okunmuştur.

3.5. PAS'da Bulunan α -LA'nin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile Belirlenmesi

3.5.1. Örneklerin Hazırlanması

PAS 'da bulunan yabancı maddeler ve yağı ortamdan uzaklaştırmak için 3000xg 15°C'de 10 dk santrifüj işlemi uygulanıp örnekler kaba filtre kağıdından süzölmüştür. Daha sonra HPLC yüklemek amacıyla süzölen örnekler 0,45 mikronluk şırınga ucu filtreden geçirilmiştir.

3.5.2. HPLC

α -LA miktarı ve saflık tayini kromatografik yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla Shimadzu marka HPLC LC-20AT cihazı kullanılmıştır.

3.5.2.1. HPLC Çalışma Şartları

Kolon: Zorbax 300SB-C18 (4.6 x 250mm)

Fırın Sıcaklığı: Oda sıcaklığı (25 °C)

Dedektör: DAD

Akış Hızı: 1 ml/dk

Çözücü A: % 0,1 TFA

Çözücü B: % 0,09 TFA, %90 Asetonitril (Sigma)

Enjeksiyon hacmi: 100 µl

Absorbansı:214 nm

Toplam analiz süresi: 35 dk.

3.5.2.2. HPLC Çalışma Programı

HPLC cihazında çalışma programı aşağıda belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

1-6 dakikada % 20-40 B

6-16 dakikada % 40-45 B

16-19 dakikada % 45-50 B

19-20 dakikada % 50 B

20-23 dakikada % 50-70 B

23-24 dakikada %70-100 B

24-25 dakikada %100 B

25-27 dakikada %20 B

27-35 dakikalar %20 B olarak ayarlanmıştır (Elgar vd., 2000).

3.5.2.3. HPLC Cihazı için Standardların Hazırlanması

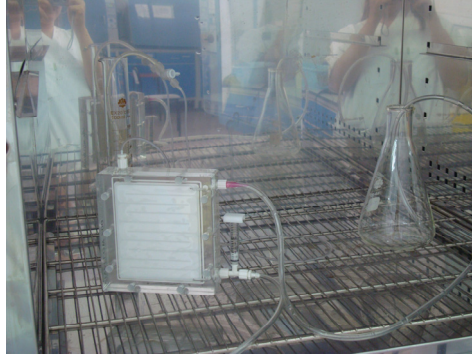
α -LA ve β -LG proteinlerinin standart stok çözeltisinin hazırlanması için 1 mg standart (Sigma) 1 ml saf suda çözündürülmüştür (1 mg/ml). Çalışma sırasında bu stok solüsyondan 50-250 µg/mL arasında bir dizi seyreltme yapılmıştır.

3.6. Ultrafiltrasyon

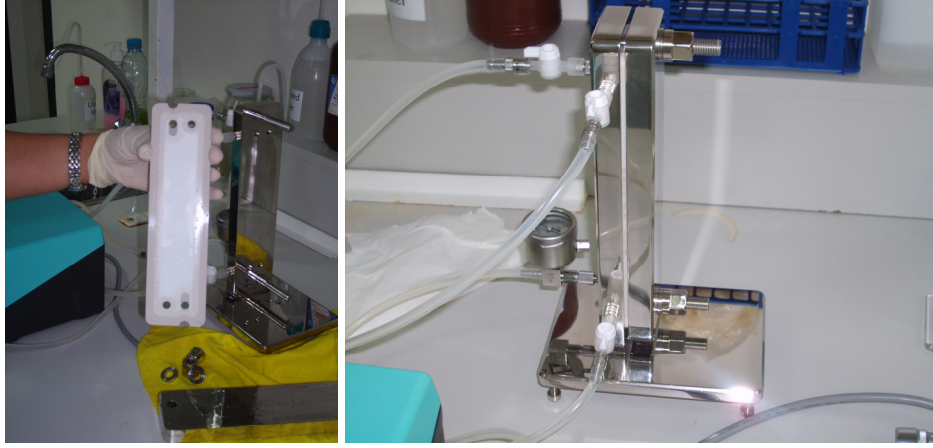
UF işlemi için Sartorius Sedium Marka Vivaflow 200 model 10 kDa, 30 kDa ve 100 kDa olan PES membranlar ve Sartorius Sedium Marka Sartocon Slice 200 model 30 kDa molekül ağırlığına sahip hydrosart membran kullanılmıştır. Ayrıca Vivaspin 20 model moleküler ağırlığı 30 kDa ve 50 kDa olan UF sistemi denenmiştir. UF düzeneğinde basınç ayarını sağlamak amacıyla Watson Marrow -300 serisi peristaltik pompa kullanılmıştır.

3.6.1. UF İşlemi için Örneklerin Hazırlanması

Peyniraltı suları 3000xg de 15°C de 10 dakika santrifüj edilerek yağ partikülleri peynir altı suyundan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra bu örnekler kaba filtre kâğıdından geçirilerek filtre edilmiştir. Filtratlar 42°C ye ısıtıldıktan sonra UF işlemi için kullanılmıştır. Bu sıcaklık mevcut proteinlerin denatürasyonunu önlemek için uygun olduğu için seçilmiştir. UF işlemleri için 2 bar basınç uygulanmıştır.



Şekil 3.2. Sartorius Sedium Marka Vivaflow 200 PES



Şekil 3.3. Sartorius Sedium Marka Sartocon Slice 200 Hidrosart



Şekil 3.4 Watson Marrow -300 Peristaltik pompa

3.6.2. 30 kDa ve 50 kDa Santrifüj Tipi Membranlar için Örnek Hazırlama



Şekil 3.5 Sartorius Sedium Marka Vivaspin 20

3.5.1.belirtildiği gibi örnekler UF işlemleri için hazırlandıktan sonra Vivaspin 20 santrifüj tipi 30 kDa ve 50 KDa moleküler ağırlığa sahip membran filtreler 40 °C`de 4500 rpm`de santrifüj edilmişlerdir. Elde edilen filtratlar 0,45 µm şırınga ucu filtrelerden geçirildikten sonra HPLC cihazında analize alınmıştır. Şekil 3.5 de Vivaspin 20 filtre sistemi görölmektedir.

3.6.3. pH`nın UF İşlemine Etkisinin Belirlenmesi

UF işlemine hazır hale getirilen örneklerin pH değerleri 3.25, 4.27, 6.30 ve 8 pH` ya ayarlanarak 100 kDa moleküler ağırlığa sahip membran filtreden geçirilmiştir. Elde edilen filtratlar 0,45 µm şırınga ucu filtrelerden geçirildikten sonra HPLC cihazında analize alınmıştır.

3.6.4. Diyafiltrasyon İşleminin UF Uygulanması

Bu çalışmada 2 farklı diyafiltrasyon yöntemi denenmiştir. 1. diyafiltrasyon işleminde örnek miktarı kadar sıcaklığı 42 °C`ye ayarlanmış su ilave edilerek her 5 turda bir toplanan permeat miktarı kadar su ilave edilmiştir. 2. diyafiltrasyon işleminde ise başlangıçta hiç su ilave etmeden örneklerin pH değerleri 6,60` a ayarlanarak UF işlemi sırasında her 5 turda bir toplanan permeat miktarı kadar örneğin başlangıç sıcaklığı ile aynı olan saf sudan ilave edilmiştir.

3.6.5 Kademeli UF İşlemi

Örnekler 10 kDa moleküler ağırlığa sahip membran filtreden geçirilmiştir. Bu işlemin ikinci kademesi olarak 10 kDa filtrasyon işleminden elde edilen retentant 30 kDa santrifüj tipi membrandan geçirilmiştir. Elde edilen filtrat 0,45 µm şırınga ucu filtrelerden geçirildikten sonra HPLC cihazında analize alınmıştır.

3.6.6. Tripsin Hidroliz Uygulanması

100 kDa ve 30 kDa membrandan geçirilerek elde edilen permeata, 42° C`de 2.0 M NaOH ile 7.7 pH `ya ayarlandıktan sonra enzim: substrat oranı 5 mAU/g olacak şekilde tripsin (0,0007–0,002 g) ile hidroliz edilmiştir. Hidroliz pH 6.0`ya ayarlandıktan sonra 65 °C`de 10 dakika ısıl işlem uygulanarak sonlandırılmıştır (Konrad ve Klenschmidt, 2008).

3.7. UF Geçirilen PAS`larının Protein Profillerinin (SDS-PAGE) ile Belirlenmesi

3.7.1. SDS-PAGE (Sodium Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez) Uygulaması

Proteinlerin negatif yüklü SDS molekülleri kaplandıktan sonra moleküler ağırlıklarına göre poliakrilamid jel ortamında elektrik alan içinde göç etmesi ve boya maddesi ile bantların görünür hale getirilmesi prensibine dayanır.

3.7.2. Örnek Hazırlanması

SDS-PAGE için 10 µl PAS örneğinden alınarak 20 µl örnek tamponu ile seyreltilmiştir ve 100° C`de 3 dak. kaynatılarak proteinlerin denatürasyonu sağlanmıştır (Liang vd., 2006).

3.7.3. Jel Hazırlanması

Jellerin hazırlanmasında %30 akrilamid karışımı, %10 SDS, %10 APS, 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) ve 1,0 M Tris-HCl (pH 6,8) kullanılmıştır. Çizelge 3.1`de alt ve üst jellerin içeriği verilmiştir (Laemli, 1970).

Jeller hazırlandıktan sonra oluşturulan kuyucuklara 5 µl örnek ve 7 µl standart yüklenmiştir. Elektrofrez tankı güç kaynağına bağlanarak 110 V sabit akımda yaklaşık 2 saat boyunca yürütülmüştür.

Çizelge 3.1. Üst ve alt jellerin içeriği

<p>%12 Akrilamid Alt Jel (10 ml)</p>	<p>3,3 ml destile su 4 ml %30 akrilamid karışımı 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) 0,1 ml % 10 SDS 0,1 ml % 10 APS 0,004 ml TEMED</p>
<p>% 5 Akrilamid Üst Jel (5 ml)</p>	<p>3,4 ml destile su 0,83 ml %30 akrilamid karışımı 0,63 ml 1 M Tris (pH 6,8) 0,05 ml % 10 SDS 0,05 ml % 10 APS 0,005 ml TEMED</p>

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Kimyasal Analiz

8 farklı işletmeden sağlanan 15 farklı örneğin kimyasal bileşimini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen asitlik, pH, % kuru madde, % yağ, % protein, protein olmayan azot (NPN) ve kül tayin sonuçları Çizelge 4.1.`de verilmiştir.

Yapılan analizlerde en düşük ve en yüksek kuru madde değerleri % 3,673–6,861 arasında bulunmuştur. Yapılan farklı çalışmalarda PAS`ın kuru madde değerleri; % 5,8-7,0 arasında tespit edilmiştir (Kosikowski, 1979; <http://eng.ege.edu.tr/~otles>; Üçüncü, 2002; Bayizit ve Yılsay, 2004; Lucena et.al., 2007). Örneklerden elde edilen değerler Üçüncü (2002) ile benzerlik göstermektedir. Fakat 3 nolu örneğin kuru madde değeri % 13,795 olarak bulunmuştur. Sütün kuru maddesi %12,60 iken PAS`nun süttten daha fazla kuru madde içermesi peynir yapım aşamasında içerisine bir katkı katıldığını düşündürmüştür. Aynı şekilde oldukça düşük değer veren 1 ve 2 nolu PAS`ında uygun olmadığı ve PAS`una su katıldığını ve numunenin tam doğru olmadığını göstermiştir.

Üçüncü (2002)`e göre asit peynir suyunun SH⁰ cinsinden değeri 20–25 arasında olması gerektiği belirtilmiştir. Örneklerin asitlik değerleri 12,2 – 23,4 SH arasında değiştiği gözlenmektedir. Çizelge 4.1.`de görüldüğü gibi 1, 8, 9 ve 11 nolu örneklerde asitlik değerleri kaşar peynirine işlenen sütün PAS değerlerine uygun görülmemektedir. Şahan ve Konar (1995) tarafından yapılan çalışmada beyaz peynir üretim sırasında elde edilen asitlik değerlerinin 6,19–7,04 SH olduğu belirtilmiştir. Bu da aldığımız PAS örneklerinin beyaz peynir üretim sonucunda elde edilmiş olduğunu düşündürmektedir.

Örneklerin pH değeri en düşük 4,42 en yüksek 6,38 olarak bulunmuştur. Üçüncü (2002)` e göre peyniraltı suyunun pH değeri 4.0–6,0 arasında değişmektedir.

Peynir yapımı sırasında peynir altı suyuna geçen mineral maddelerin miktarları % kül değeri olarak Çizelge 4.1.`de verilmiştir. Örneklerin % kül değerleri % 0,1 - % 0,8 arasında değişmektedir. Yapılan çalışmalarda kül değeri % 0,3–0,7 olarak tespit edilmiştir. (Alpkent ve Göncü 2003, Tarakçı ve Küçüköner 2003, Bayazit ve Yılsay 2004). Sonuçların birbirinden farklı olması peynir işleme sırasında uygun ve standart işlemlerin yapılmamasından kaynaklanmaktadır.

Örneklerin yağ oranları % 0,1–1,6 arasında değişmektedir. 12 nolu örnek hariç diğer örneklerde Üçüncü (2004)`ün elde ettiği sonuçlara benzerlik göstermiştir. PAS`a geçen madde miktarı üzerine pıhtı kesim süresi, pıhtı kesim büyüklüğü, baskıda kalma süresi vb birçok faktör etkilidir. 12 nolu örneğin yüksek ve farklı olması peynir işleme tekniğinin uygun olmamasından kaynaklanmıştır.

Örneklerin protein miktarlarına bakıldığı zaman % 0,1-0,8 arasında değişen değerler elde edilmiştir. Yapılan çalışmalarda PAS`larda protein oranı %0,7-0,8 olduğu görülmektedir. 2, 4, 6, 7 ve 11 nolu örnekler bu değerlere benzerlik göstermiştir. PAS larına geçen protein miktarı üzerine uygulanan sıcaklık, kalsiyum, enzim miktarı gibi birçok faktör etki etmektedir. (Üçüncü, 2002; Bayazit ve Yılsay, 2004).

Yapılan çalışmada peyniraltı suyunun protein olmayan azot (NPN) miktarı 0,006 - 0.034 arasında bulunmuştur. İlgili literatüre göre NPN miktarı % protein miktarının % 6 olması gerekmektedir. Elde edilen sonuçlar bu değere yakındır. (<http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/chem.html>).

Örneklerin kimyasal analiz sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucunda yapılan varyans analizinde ortalamalar arasındaki istatistik bakımından önemli bir fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$).

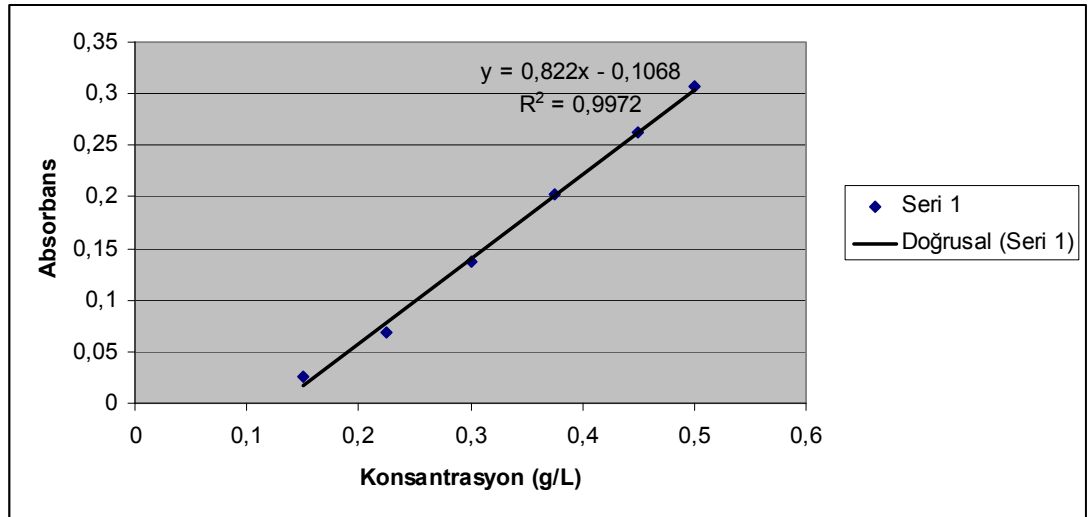
Çizelge 4.1. Peyniraltı sularının kimyasal analiz sonuçları

Örnekler	Asitlik (SH)	pH	% Kuru madde	% Kül	% Yağ	% Protein	Protein Olmayan Azot (NPN)
1	7,7 ± 0,141	5,51 ± 0,021	3,673 ± 0,092	0,219 ± 0,007	0,55 ± 0,070	0,428 ± 0,025	0,016 ± 0,004
2	16,1 ± 0,424	4,59 ± 0,014	6,226 ± 0,009	0,881 ± 0,001	0,45 ± 0,070	0,804 ± 0,0252	0,009 ± 0,004
3	22,2 ± 0,282	4,75 ± 0,007	13,795 ± 0,092	0,191 ± 0,004	0,2 ± 0,000	0,214 ± 0,252	0,02 ± 0,000
4	13,8 ± 0,282	5,19 ± 0,007	6,649 ± 0,077	0,625 ± 0,001	0,75 ± 0,070	0,84 ± 0,025	0,02 ± 0,000
5	16,6 ± 0,282	4,58 ± 0,007	5,807 ± 0,023	0,374 ± 0,006	0,35 ± 0,070	0,616 ± 0,012	0,016 ± 0,004
6	23,4 ± 0,848	4,42 ± 0,014	4,938 ± 0,002	0,395 ± 0,002	0,9 ± 0,000	0,8847 ± 0,037	0,006 ± 0,000
7	13,6 ± 0,565	6,13 ± 0,007	6,861 ± 0,047	0,473 ± 0,000	0,35 ± 0,070	0,857 ± 0,000	0,030 ± 0,004
8	6,2 ± 0,282	6,25 ± 0,035	6,746 ± 0,031	0,768 ± 0,001	0,85 ± 0,070	0,411 ± 0,000	0,009 ± 0,004
9	8,8 ± 1,131	6,38 ± 0,049	5,695 ± 0,083	0,556 ± 0,006	0,75 ± 0,070	0,428 ± 0,050	0,027 ± 0,000
10	22,8 ± 0,565	4,48 ± 0,007	5,308 ± 0,059	0,515 ± 0,003	0,45 ± 0,070	0,339 ± 0,025	0,034 ± 0,000
11	10,4 ± 0,565	5,40 ± 0,007	5,923 ± 0,011	0,688 ± 0,016	0,2 ± 0,141	0,839 ± 0,050	0,030 ± 0,004
12	12,2 ± 0,282	4,99 ± 0,035	5,412 ± 0,077	0,328 ± 0,005	1,6 ± 0,141	0,125 ± 0,025	0,009 ± 0,004
13	22,2 ± 0,282	4,69 ± 0,007	6,214 ± 0,036	0,407 ± 0,005	0,5 ± 0,000	0,473 ± 0,012	0,009 ± 0,004
14	17 ± 0,282	5,03 ± 0,007	6,18 ± 0,056	0,469 ± 0,007	0,4 ± 0,000	0,482 ± 0,025	0,023 ± 0,004
15	20,2 ± 0,282	4,67 ± 0,007	6,026 ± 0,282	0,492 ± 0,007	0,5 ± 0,007	0,536 ± 0,025	0,006 ± 0,000

4.2. Peyniraltı Sularında Bulunan β -Lg spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

4.2.1 β -Lg Standardının Hazırlanması

PAS`da bulunan β -Lg`nin miktarını belirlemek amacıyla standart kurve çizilmiştir. Kurve çiziminde, stok β -Lg çözeltisinin hazırlanması için 20 mg β -Lg standardı (Sigma) 40 ml su içersinde çözündürülmüştür. Çalışma sırasında bu stok solüsyondan 0,075–0,50 g / l arasındaki oranlarda dilüsyonlar yapılmış ve % 24`lük TCA`ya karşı spektrofotometrede 280 nm`de okunmuş ve Şekil 4.1.`de görülen denklem elde edilmiştir.



Şekil 4.1. β -Lg`nin Standart kurvesi

4.2.2. β -Lg Miktarının Belirlenmesi

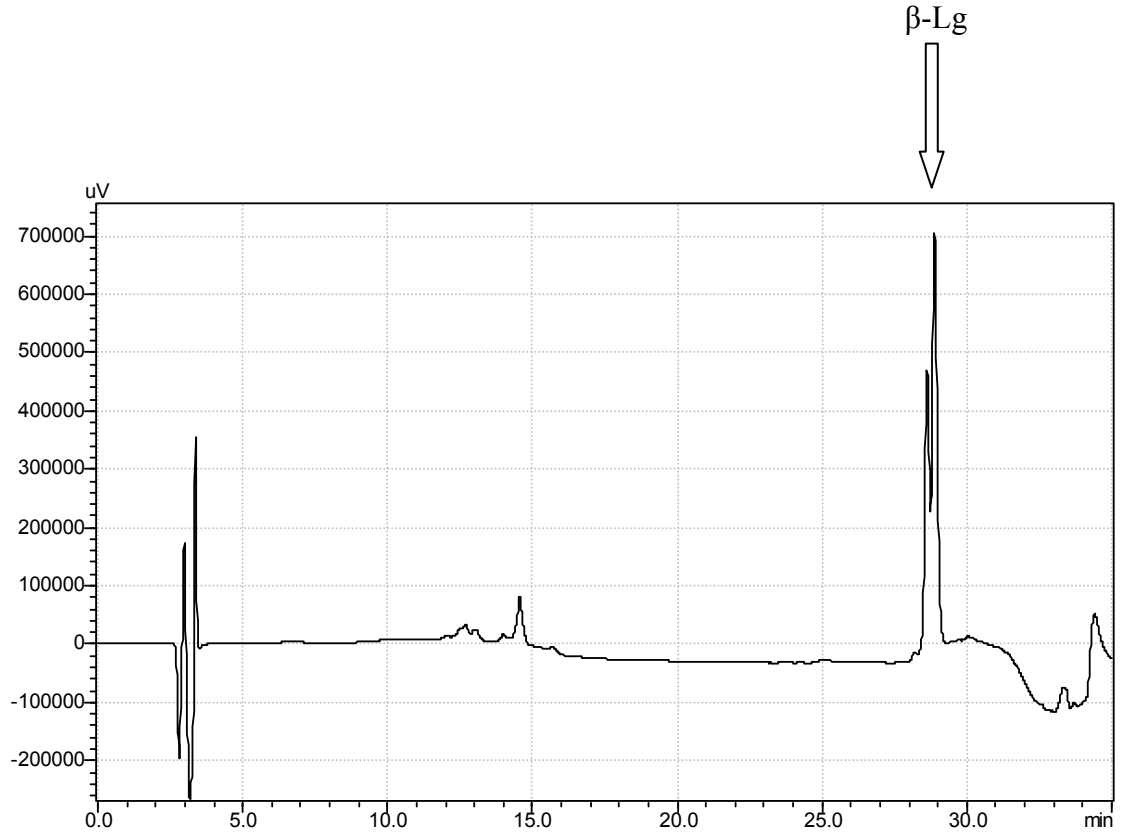
Örnekler santrifüj edildikten sonra süpernatant Biorad marka Econo-Pac 10 DG kolona yüklenerek tampon çözeltilerle dengelendikten sonra filtrat sırayla 3 ml, 4 ml ve 6 ml'lik kısımlar halinde toplanmıştır. Toplanmış filtratlar ayrı ayrı, % 24 TCA`ya karşı spektrofotometrede 280 nm`de okunmuştur. Elde edilen absorbans değerlerine göre ilk toplanan 3 ml'lik ve son toplanan 6 ml'lik filtratlarda absorbans elde

edilmemiştir. 4 ml'lik filtrattan elde edilen absorbans değeri, daha önce oluşturulan kurveye göre değerlendirilerek her örneğin β -Lg içerikleri Çizelge 4.2.' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. β -Lg miktarları

ÖRNEKLER	β -laktoglobulin miktarı (g/l)
1	0,1761
2	0,3318
3	0,0260
4	0,4596
5	0,2795
6	0,2520
7	0,2790
8	0,3400
9	0,3060
10	0,1871
11	0,1180
12	0,3647
13	0,3343
14	0,2320
15	0,2508

Spektrofotometrik yöntemle elde edilen miktarların doğruluğunu test etmek için ayrılmış olan 3 farklı filtrat HPLC cihazına verilerek β -Lg içeren filtrat tespit edilmiştir. 4 ml'lik filtratlarda yüksek pik verdikleri HPLC cihazında belirlenmiştir. Şekil 4.2 de elde edilen β -Lg piki görülmektedir.



Şekil 4.2. PAS bulunan β -Lg piki

β -Lg serum protein fraksiyonlarının ana bileşenidir. Serum proteinin % 50'den fazlasını oluşturur. Oda sıcaklığında monomerik moleküller kovalent olmayan bağla bağlanarak dimer yapıda bulunur. Sıcaklık arttığı zaman dimer yapı monomer yapıya dönüşür. Her bir monomer iki disülfid bağı ve bir tek tiol grubu içerir.

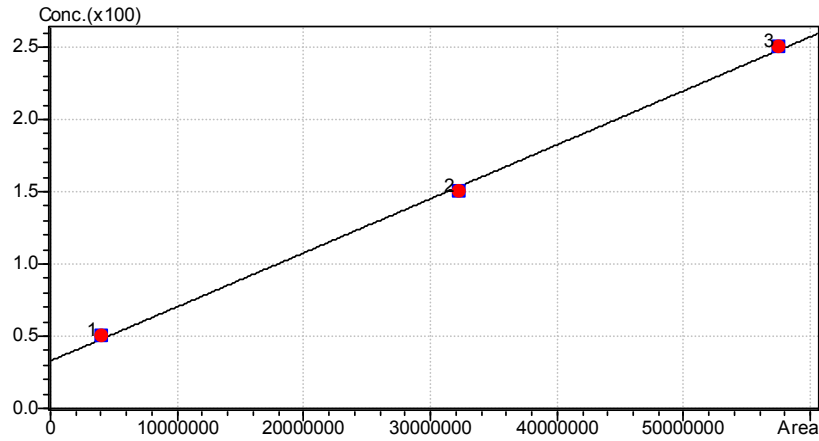
Konrad et.al., (2000) membran proseslerini içeren bazı metodları kullanarak doğal β -Lg'in izolasyonu üzerinde çalışmışlardır. Bu çalışmada pepsin enziminin β -Lg üzerine etkisi araştırılmış ve enzim uygulamaları ile birlikte membran teknolojisinin kullanımı sonucu yüksek verim elde edilmiştir. Proteinin tespiti için Kjeldahl metodunu, SDS-Page (sodyum dodesilsülfat- poliakrilamid jel elektroforezi), FPLC (hızlı protein sıvı kromatografisi) yöntemlerini kullanmışlardır.

4.3. Ultrafiltrasyon Yöntemiyle Elde Edilen α -LA'nin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile Belirlenmesi

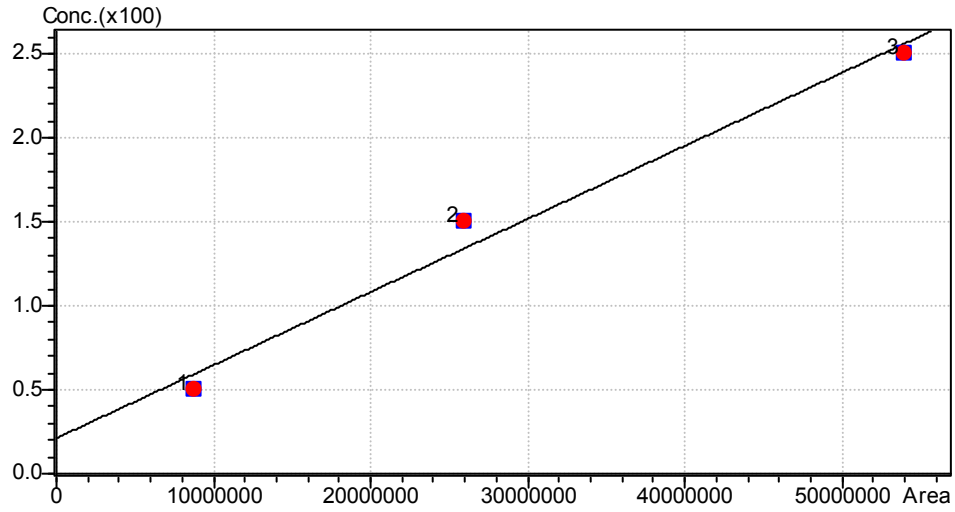
α -LA oldukça küçük molekül ağırlığına sahip (14,200Da), Ca^{+2} bağlayan, dört adet disülfid bağı içeren tek peptid zincirinde 123 amino asit içeren bir moleküldür. α -LA izolasyonu için bugüne kadar birçok ayırma şekli tanımlanmıştır, ancak bunlardan çoğu pratik değildir ve sadece laboratuvar amaçlı kullanıma uygundur. α -LA'nin seçici termal stabilliği, iyon değiştirme kromatografi teknikleri ve kromatografik ayırımlar şimdiye kadar yapılmış çalışmalardır. UF sistemi ile α -LA izolasyonu için pH, sıcaklık, farklı membran büyüklükleri ve diyafiltrasyon çalışmaları yapılarak elde edilen retentant ve permeatta bulunan α -LA'nin miktar tayini HPLC cihazında yapılmıştır.

4.3.1. Standart Kurve Çizimi

3.4.2.3 belirtildiği gibi α -LA ve β -Lg'nin standart kurveleri HPLC'de çizilmiştir. Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de standart kurveleri ve R^2 değerleri verilmiştir.



Şekil 4.3. α -LA standart kurvesi ($R^2 = 0.9988682$)



Şekil 4.4. β -Ig standart kurvesi ($R^2 = 0.9813273$)

4.3.2. Ultrafiltrasyon

Ultrafiltrat membranlar; por çaplarına göre değil, membrandan geçemeyen küresel molekül (Nominal Molecular Weight Cut-off, NMWC) ağırlığına göre tanımlanır. Günümüzde, ultrafiltrasyon membranlarla hidrostatik basınç ve santrifüj gibi transmembran kuvvetlerin etkisiyle ~300 μ l örneklerde dahi protein, peptid, polisakkarit, DNA ve RNA fraksiyonlanarak konsantre edilebilmektedir (de Fillipi ve Goldsmith, 1970; Lonsdale, 1982; Pusch ve Walch, 1982; McGregor, 1986; Haris, 1989). Molekülün şekli, porlardan membran transportunu etkilemektedir. Molekül ağırlığı 100,000 olan globüler protein 100,000 NMWC olan bir membrandan geçemezken, doğrusal moleküller geçebilirler. Membrandaki por büyüklüğü ortalama bir değerde dağılım gösterirler. Bu özellik membran yapımında uygulanan yöntem ve üretici firmaya göre değişmektedir. Por büyüklüğünde 10 katlık bir değişim NMWC’de 100 katlık bir farklılaşmayla sonuçlanır. Bu nedenle, membranın NMWC’si protein molekül ağırlığından %20 oranında daha az olmalıdır. NMWC’deki azalmayla membran akış hızı azalır. Bu durumda, daha uzun işlem süresine veya daha yüksek transmembran basıncına ihtiyaç olur (Tarhan, 1996; Bayram, 2007).

UF işlemi için iki farklı özellikte membran kullanılmıştır. Bunlardan PES membran polimer bir membrandır. Asimetrik delik yapısına sahiptir. Biyoteknoloji ve ilaç

sanayinde kullanılır. Geniş pH aralığında çalışan stabil yapısı vardır. Geniş sıcaklık aralığında kullanılabilir o nedenle sterilize edilebilir.

PES membranın kullanım alanları IgG, kan faktörleri, enzimler ve peptidlerin izlenmesi için kullanılır. (www.sartorius.com/.../Data_PESU_Ultrafilt_SPC2023-e.pdf)

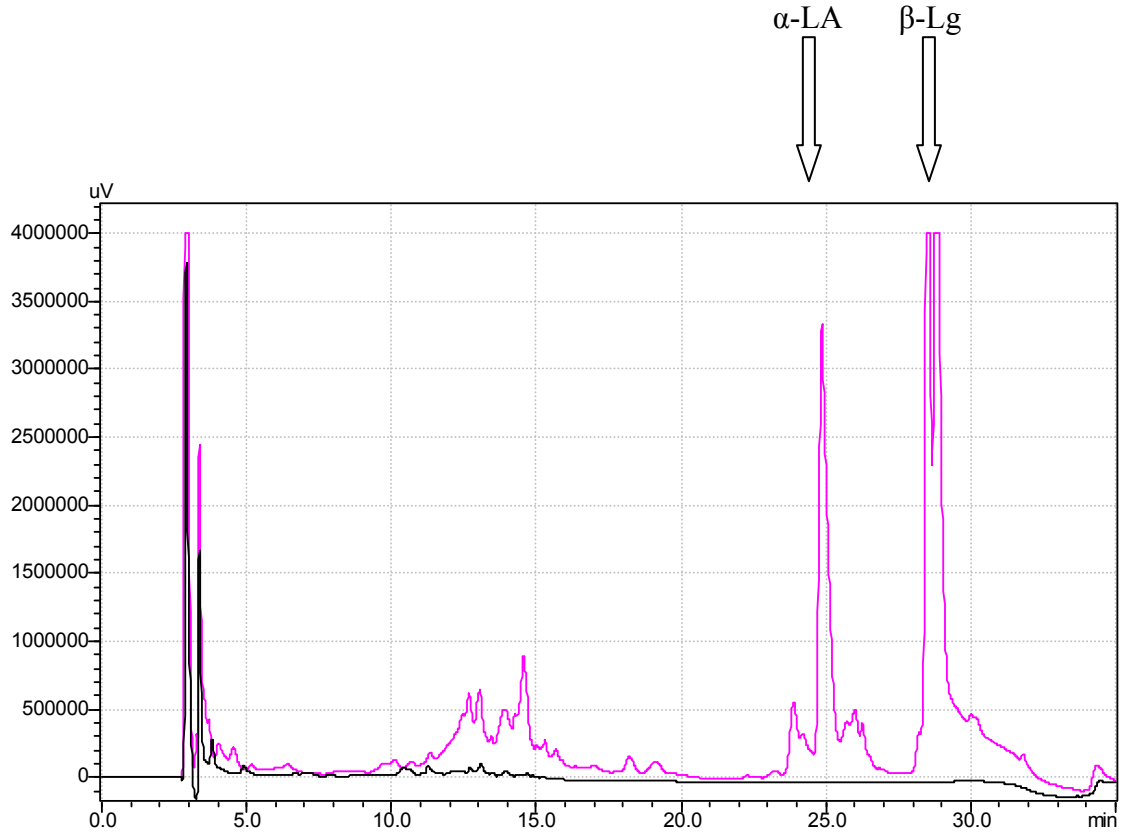
Hidrosart membran ise selüloz bazlı membrandır. Biyoteknoloji ve eczacılık çalışmalarında kullanılır. Geniş pH aralığında çalışan stabil yapısı vardır. Hidrofilik özelliğindedir ve protein bağlamaz, yüksek akışa sahiptir. Uygulama alanları oligonükleotid, protein, albumin hemoglobin, monoklonal antibiyo gibi maddelerin eldesinde kullanılır (www.sartorius.com/.../Data_Hydrosart_Ultrafilt_SPC2027-e.pdf).

4.3.2.1. 10 kDa PES membran ile UF işlemi

3.5.1. belirtildiği gibi örnekler UF işlemi için hazırlandıktan sonra 10 kDa' luk membran kullanılarak örnekler UF cihazından geçirilmiştir. Permeat ve retentant HPLC cihazına verilerek 3.4.2.1 ve 3.4.2.2 de belirtilen çalışma koşullarında analiz edilmiştir.

Çizelge 4.3. 10 kDa UF'lik işlemi sonrası permeat ve retantanta bulunan α -LA miktarları

Numune	Örnekte bulunan α -LA (μ g/ml)	Permeatta bulunan α -LA (μ g/ml)	Retentant ta bulunan α -LA (μ g/ml)	Permeatta bulunan α -LA (%)	Retentantta bulunan α -LA(%)
4 nolu 10 UF PES	466.12	32.97	112.87	7.07	24.21



Şekil 4.5. 4 nolu örneğin 10 kDa luk filtren geçen permeat ve retentant pikleri (Siyah pik; permeat, pembe pik; retentant)

Şekil 4.5. de görüldüğü gibi 10 kDa luk filtrasyon işleminde permeata hiçbir serum proteini geçmeyip tümü retentant da kalmıştır. 10 kDa luk filtrenin bu işlem için uygun olmadığını söylemek mümkündür.

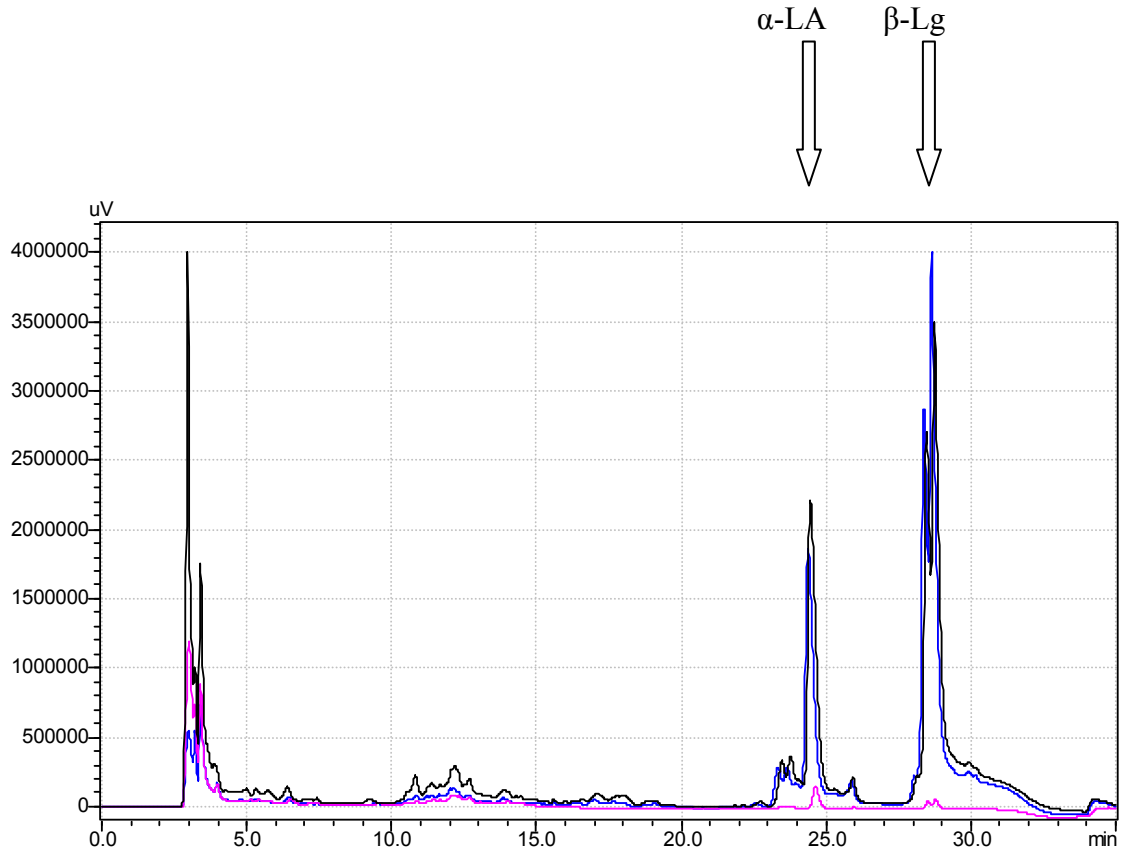
4.3.2.2. 30 kDa UF sisteminde PES membran ile UF işlemi

3.5.1. belirtildiği gibi örnekler UF işlemi için hazırlandıktan sonra 30 kDa 'luk membran kullanılarak örnekler UF cihazından geçirilmiştir. Elde edilen permeat ve retentant HPLC cihazında analiz edilmiştir.

α -LA nin molekül ağırlığı 14.200 olduğundan dolayı ve 10 kDa 'luk filtreden geçişte proteinlerin tümü retentanta kaldığı için 30 kDa 'luk filtrenin uygun olacağı düşünülmüş ve bu nedenle 30 kDa ' luk pes membran denenmiştir.

Çizelge 4.4. 30 UF'lik işlemi sonrası permeat ve retantanta bulunan α -LA'nin miktarları

Numune	Örnekte bulunan α -LA (μ g/ml)	Permeatta bulunan α -LA (μ g/ml)	Retentant ta bulunan α -LA (μ g/ml)	Permeatta bulunan α -LA (%)	Retentantta bulunan α -LA(%)
6 nolu 30 UF PES	278.66	44.56	245.21	15.99	87.99



Şekil:4.6. 6 nolu örneğin 30 kDa` luk filtren geçen permeat ve retentant pikleri (Siyah pik; permeat, pembe pik; retentant, mavi pik; örnek)

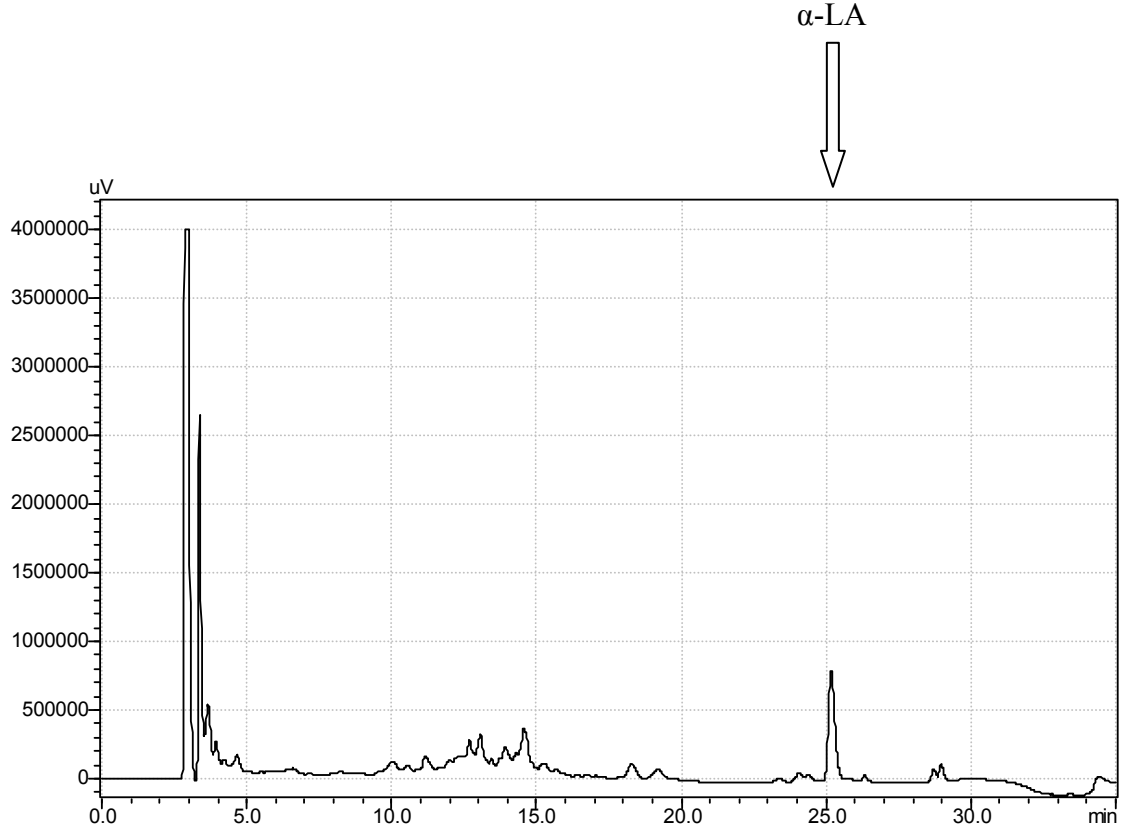
Ancak α -LA nin tümünü permeata geçirmek mümkün olmamıştır. Piklerden görüldüğü gibi örnekte bulunan α -LA`nin bir kısmı permeatta bir kısmı retentanta kaldığı için numunede bulunan α -LA miktarı daha yüksek olduğu görülmüştür.

4.3.2.3. 30 kDa ve 50 kDa Santrifüj Tipi Membranlar

İzolasyon sırasında karşılaşılan zorluklar nedeniyle α -LA izolasyonu için 30 kDa ve 50 kDa' luk santrifüj tipi membran filtreler de denenmiştir. Ancak Şekil 4.7 ve 4.8 de görüldüğü gibi bu filtrelerden de beklenen sonuç alınamamıştır.

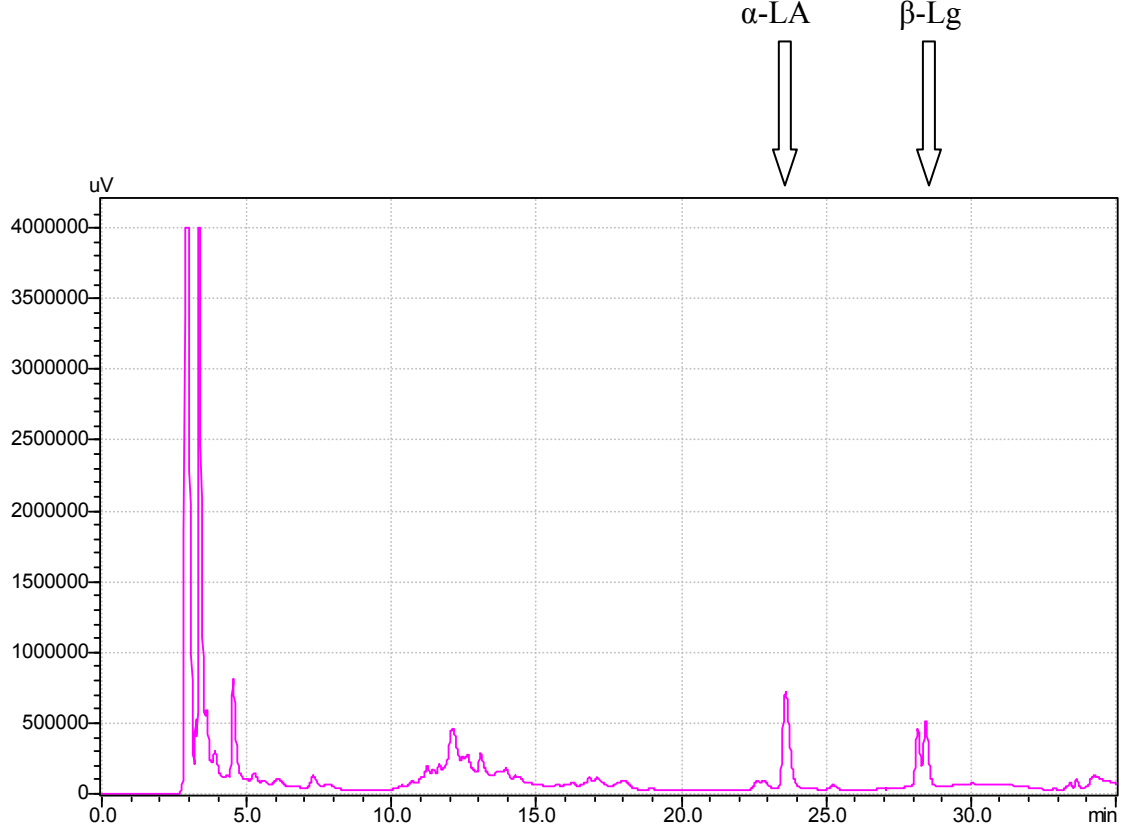
Çizelge 4.5. 30 kDa ve 50 kDa' luk santrifüj tipi membran filtrasyon sonrası permeatta bulunan α -LA'ın miktarları

Numune	Örnekte bulunan α -LA ($\mu\text{g/mL}$)	Permeatta bulunan α -LA ($\mu\text{g/mL}$)	Permeatta bulunan α -LA (%)
4 nolu 30 viva spin	466.12232	45.18707	9.69
6 nolu 50 viva spin	278.66363	86.42379	31.01



Şekil;4.7. Vivaspin 30 kDa membran filtrasyon sonucu elde edilen permeatta bulunan α -LA piki

Şekil 4.7 görüldüğü gibi 30 kDa santrifüj tipi membran filtrede örnekte bulunan α -LA miktarında azalma meydana gelirken β -Lg `de ise tamamen kayıp meydana gelmiştir.



Şekil.4.8. Vivaspın 50 kDa membran filtrasyon sonucu elde edilen permeatta bulunan α -LA ve β -Lg piki

Elde edilen kromotogramlara göre; santrifüj tipi ultrafiltrasyon sistemlerinde membranın tıkanması nedeniyle etkili bir ayırma sağlanamamıştır. Ultrafiltrasyon yöntemiyle süt serumu proteinlerini elde etmek amacıyla, santrifüj yerine basıncın kullanıldığı membran filtrelerin uygun olduğu görülmektedir.

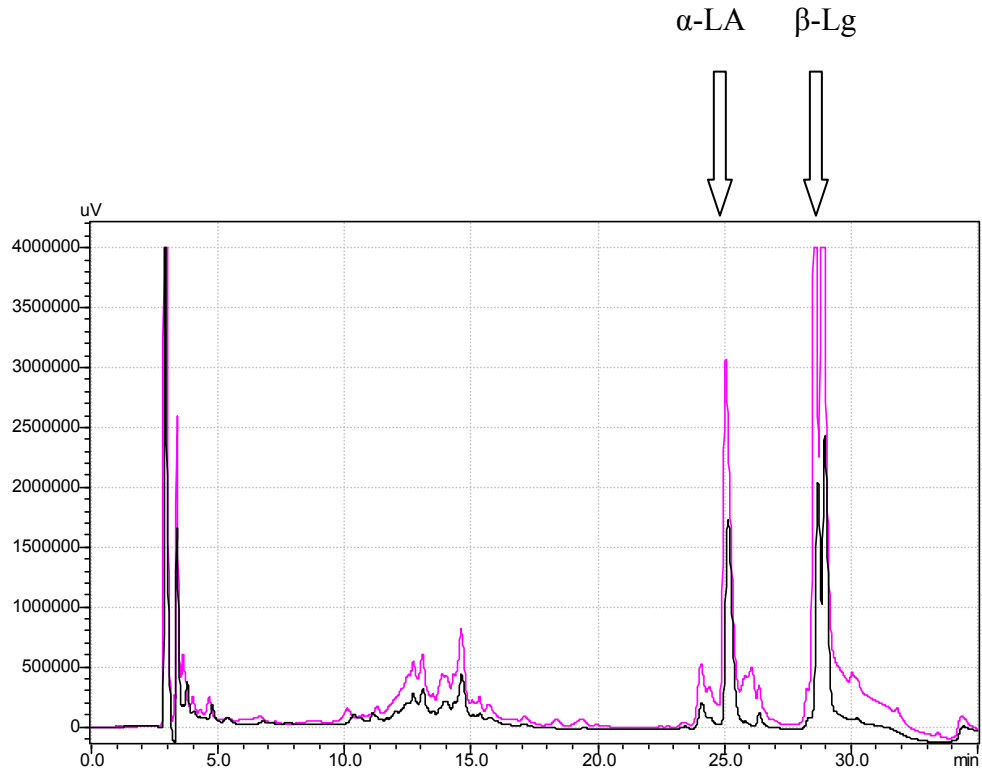
4.3.2.4. 100 kDa PES Membran ile UF İşlemi

3.5.1.belirtildiği gibi örnekler UF işlemi için hazırlandıktan sonra 42°C'ye ısıtılan örnekler 100 kDa UF sisteminden geçirilmiştir. Elde edilen permeat ve retantant 0,45`lik şırınga ucu filtreden geçirilerek HPLC`ye verilmiştir. 3 adet peyniraltı

suyundan elde edilen α -LA miktarları Çizelge 4.6.`da görülmektedir. 7 numaralı örnek de α -LA miktarı retentant da daha fazla bulunmaktadır.

Çizelge 4.6. 100 UF`lik işlemi sonrası permeat ve retantanta bulunan α -LA`ın miktarları

Numune	Örnekte bulunan α -LA (μ g/ml)	Permeatta bulunan α -LA (μ g/ml)	Retentant ta bulunan α -LA (μ g/ml)	Permeatta bulunan α -LA (%)	Retentantta bulunan α -LA(%)
4 nolu 100 UF PES	466.12	120.32	109.87	25.81	23.57
7 nolu 100 UF PES	284.85	100.13	375.11	35.15	131.68
5 nolu 100 UF PES	523.29	224.77	350.20	42.95	66.92



Şekil 4.9. 4 nolu örneğin 100 kDa luk filtren geçen permeat ve retentant pikleri (Siyah pik; permeat, pembe pik; retentant)

Mehra and Donnelly (1993)`da pH 8`de 100 kDa membran kullanarak yaptıkları çalışmada α -LA miktarını artırmışlar ancak saf halde elde edememişlerdir. α -LA

miktarını artırabilmek amacıyla diyaliz yaparak yüksek molekül ağırlıklı proteinleri retentanta, düşük molekül ağırlıklı proteinleri (α -LA, β -Lg) permeatta zenginleştirebilmişlerdir.

Bottemley (1991) 100 kDa 'luk filtre ile 2 kademeli membran teknolojisi kullanarak α -LA'nin konsantrasyonunu artırabilmiş ve α -LA: β -Lg oranını 3:1 olmasını sağlamıştır.

4.3.2.4. pH Denemeleri

3.5.1.belirtildiği gibi örnekler UF işlemi için hazırlandıktan sonra örneklerin pH değerleri 3.25, 4.27, 6.30 ve 8 pH' ya ayarlanarak 100 kDa moleküler ağırlığa sahip membran filtreden geçirilmiştir. Çizelge 4.7`de görüldüğü gibi pH 6.3`e ayarlanan örnekte permeatta % 63,90 oranında α -LA miktarı artarken retentta kalan miktar %134,05 olarak bulunmuştur.4 farklı pH denemesinde permeatta bulunan miktar retentantdan daha fazla olmamıştır.

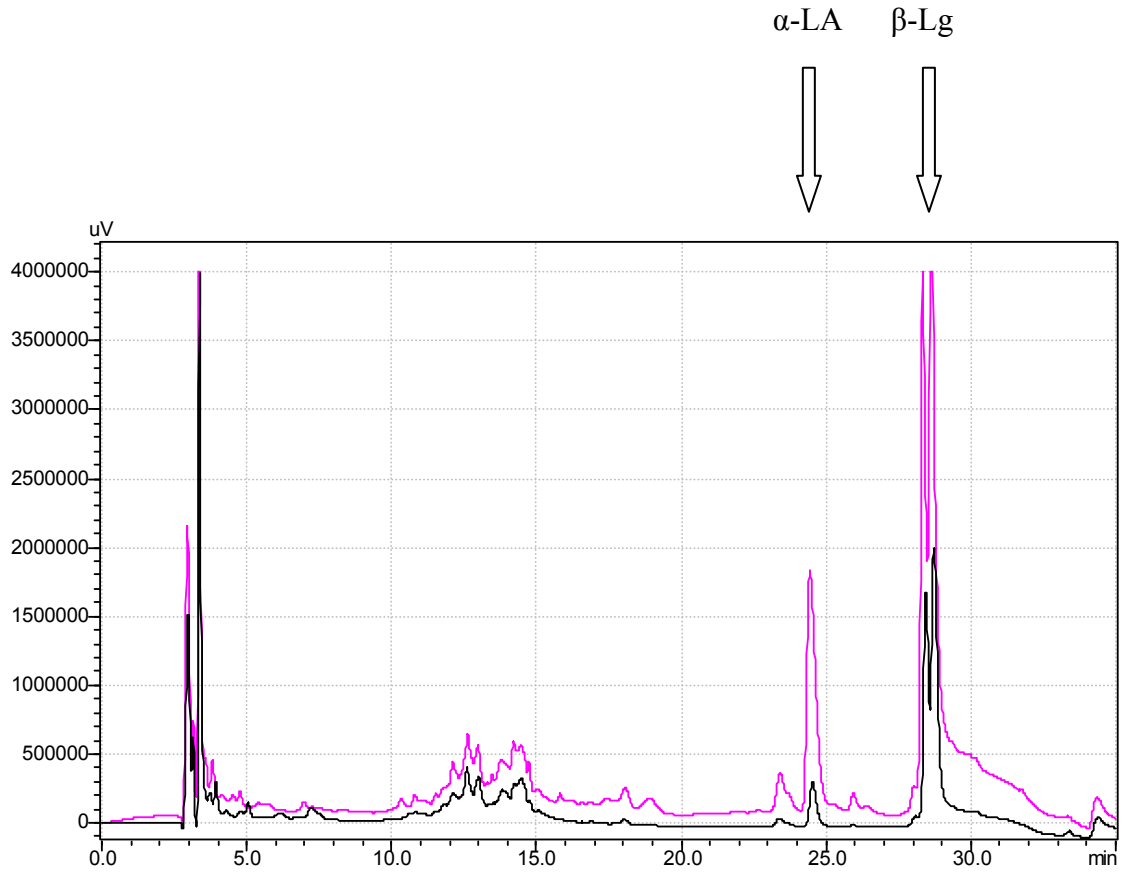
Çizelge 4.7. Farklı pH uygulamaları sonrası permeat ve retentanta bulunan α -LA`in miktarları

Numune	Örnekte bulunan α -LA (μ g/ml)	Permeatta bulunan α -LA (μ g/ml)	Retentantta bulunan α -LA (μ g/ml)	Permeatta bulunan α -LA (%)	Retentantta bulunan α -LA(%)
4 nolu 100 3,25	466.12	102.85	287.83	22.06	61.75
4 nolu 100 4,27	466.12	157.79	333.41	33.85	71.52
8 nolu 100 6.30	305.12	194.99232	409.03	63.90	134.05
8 nolu 100 8	305.12	160.54261	360.16	52.61	118.03

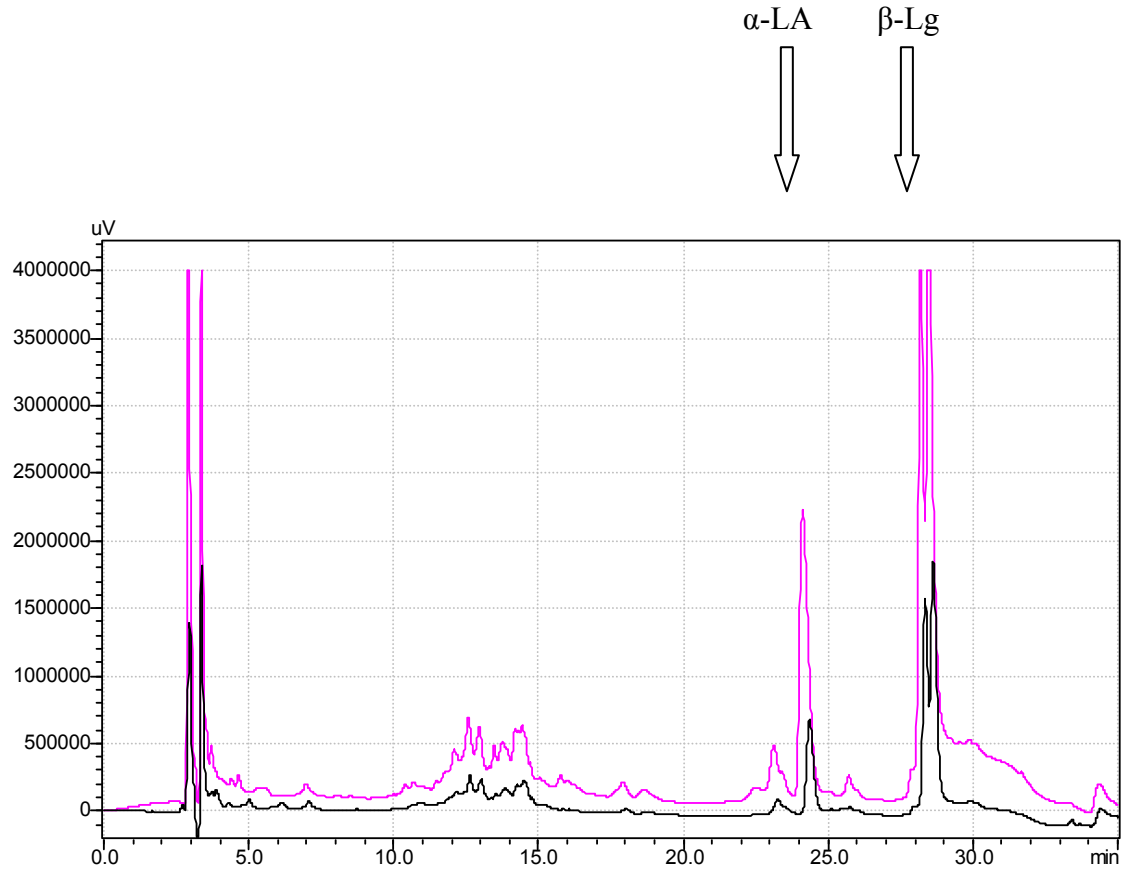
Uchida et.al., (1996) Gouda peyniraltı suyunda α -LA eldesini pH`da ısıl işlem uygulayarak β -Lg denatüre ettikten sonra α -LA`ni permeatta toplamışlardır. Almecija vd., (2007) pH ve diyafiltrasyon işlemini birlikte uygulayarak α -LA ve β -Lg izolasyonunu gerçekleştirmeye çalışmışlar ve bu çalışmada 3 farklı durum

gözlemlemişlerdir. pH 4 ve 5`de α -LA`nin çok düşük miktarını permeatta toplamışlar ve tamamı ise retentantta kalmıştır. 3, 6 ve 10 pH`larda retentanttaki α -LA miktarının % 60 daha azaldığını, pH 7,8 ve 9`da en yüksek α -LA`nü tespit etmişlerdir.

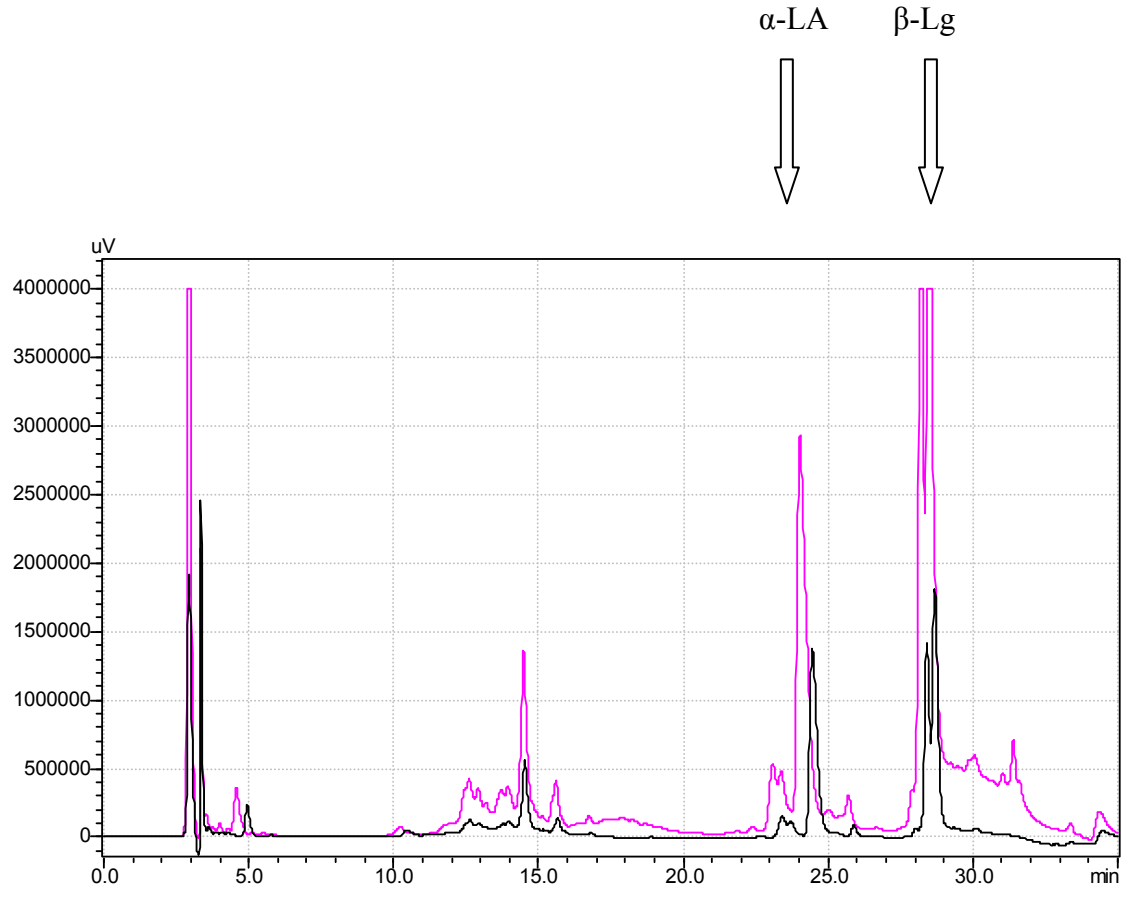
Konrad and Klenschmeidt (2008) ise kullandıkları pH aralığının α -LA`nin fiziksel özelliğinden dolayı sınırlı kaldığını belirtmişler ve 6.7`nin üzerindeki pH`larda α -LA`nin çözünmez forma dönüştüğünü belirtmişlerdir ve bu araştırmacılar pH 6,7`de en iyi sonuç aldıklarını açıklamışlardır.



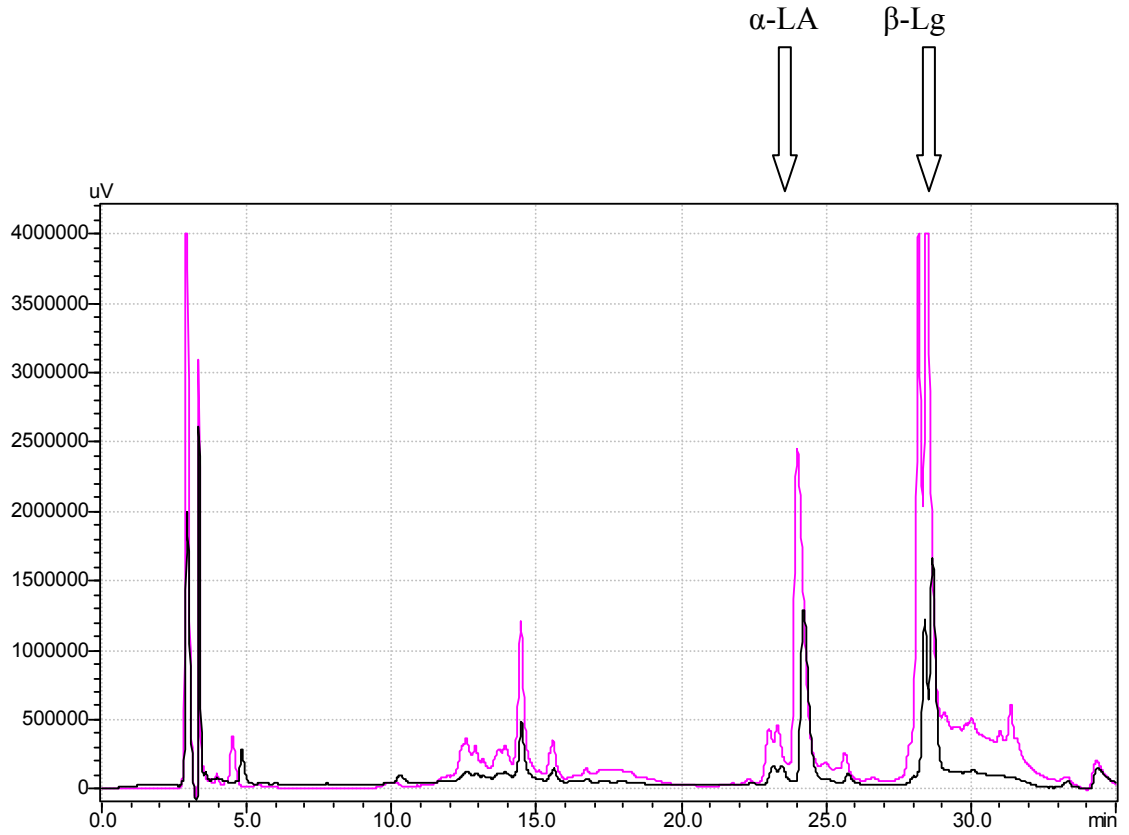
Şekil 4.10 4 nolu örnek pH=3,25 ayarlandıktan sonra 100 kDa filtreden geçen permeat ve retentant pikleri. (Siyah pik; permeat, pembe pik; retentant)



Şekil 4.11. 4 nolu örnek pH=4.27 ayarlandıktan sonra 100 kDa filtreden geçen permeat ve retentant pikleri. (Siyah pik; permeat, pembe pik; retentant)



Şekil 4.12. 8 nolu. örnek pH=6.30 ayarlandıktan sonra 100 kDa filtreden geçen permeat ve retentant pikleri. (Siyah pik; permeat, pembe pik; retentant)



Şekil 4.13. 8 nolu örnek pH=8.0 ayarlandıktan sonra 100 kDa filtreden geçen permeat ve retentant pikleri. (Siyah pik; permeat, pembe pik;retentant)

4.3.2.6. Diyafiltrasyon İşleminin UF İşlemine Uygulanması

3.5.3 de belirtildiği gibi hazırlanan örnekler ikinci tip diyafiltrasyon uygulanarak 100 kDa luk pes membran kullanılarak filtre edilmiştir. Çizelge 4.8. de filtrasyon sırasında, Çizelge 4.9.de başlangıç aşamasında su katılarak HPLC yöntemi ile permeat ve retentantta bulunan α -LA miktarları görülmektedir.

Çizelge 4.8. 2.Diafiltrasyon uygulaması ile elde edilen α -LA miktarları

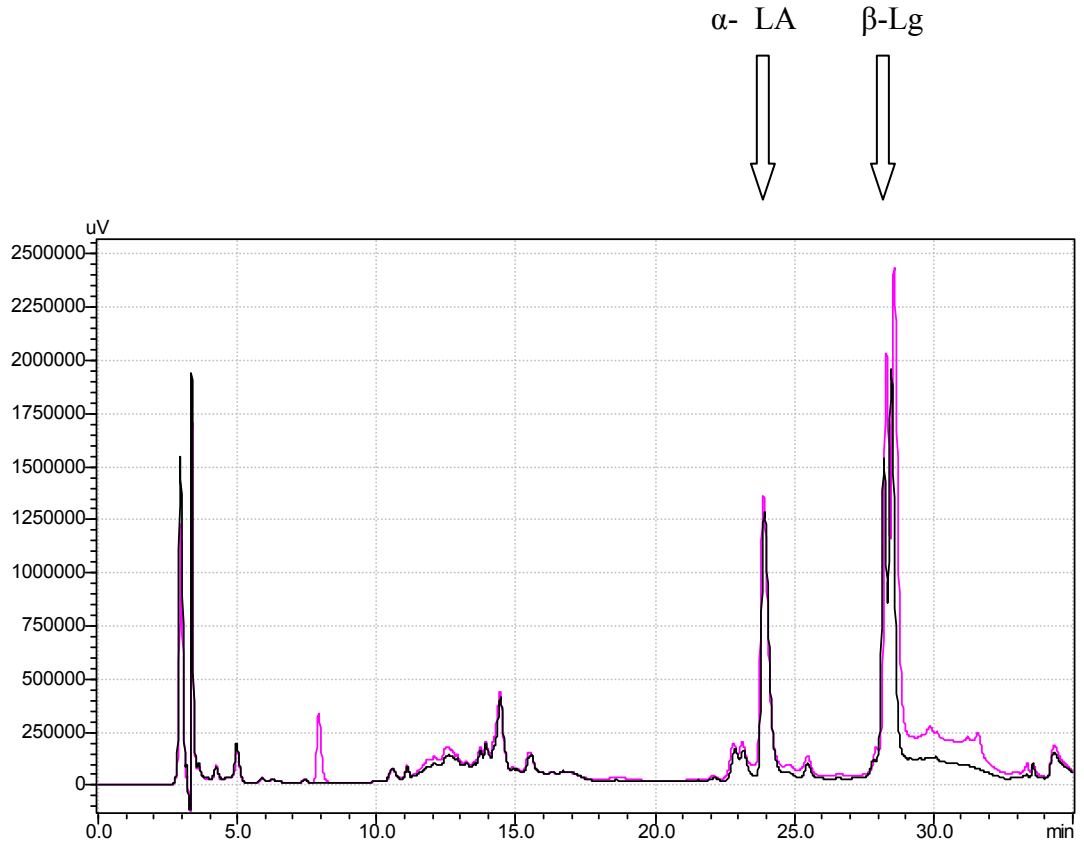
Numune	Örnekte bulunan α -LA ($\mu\text{g/ml}$)	Permeatta bulunan α -LA ($\mu\text{g/ml}$)	Retenantta bulunan α -LA ($\mu\text{g/ml}$)	Permeatta bulunan α -LA (%)	Retenantta bulunan α -LA (%)
1 nolu 100KDa UF	307.05	105.32	168.72	34,30	54.94
2 nolu 100KDa UF	662.71	148.58	203.34	22.42	30.68
3 nolu 100 kDa UF	76.28	82.44	74.17	108.06	97.22
6 nolu 100 kDa UF	278.66	113.09	106.08	40.58	38.06
8 nolu 100 kDa UF	305.12	261.68	321.51	85.76	105.37
9 nolu 100 kDa UF	438.01	38.36	114.04	8.75	26.03
10 nolu 100 kDa UF	330.72	192.74	213.03	58.27	64.41
11 nolu 100 kDa UF	179.79	248.32	138.98	138.11	77.30
12 nolu 100 kDa UF	376.28	196.21	340.73	52.14	90.55
13 nolu 100 kDa UF	445.35	69.96	268.71	7.8	30.16
14 nolu 100 kDa UF	155.37	231.89	274.12	149.24	176.42
15 nolu 100 kDa UF	147.54	216.63	295.16	146.83	200.05

Çizelge 4.9. 1.diyafiltrasyon uygulaması ile elde edilen α -LA miktarları

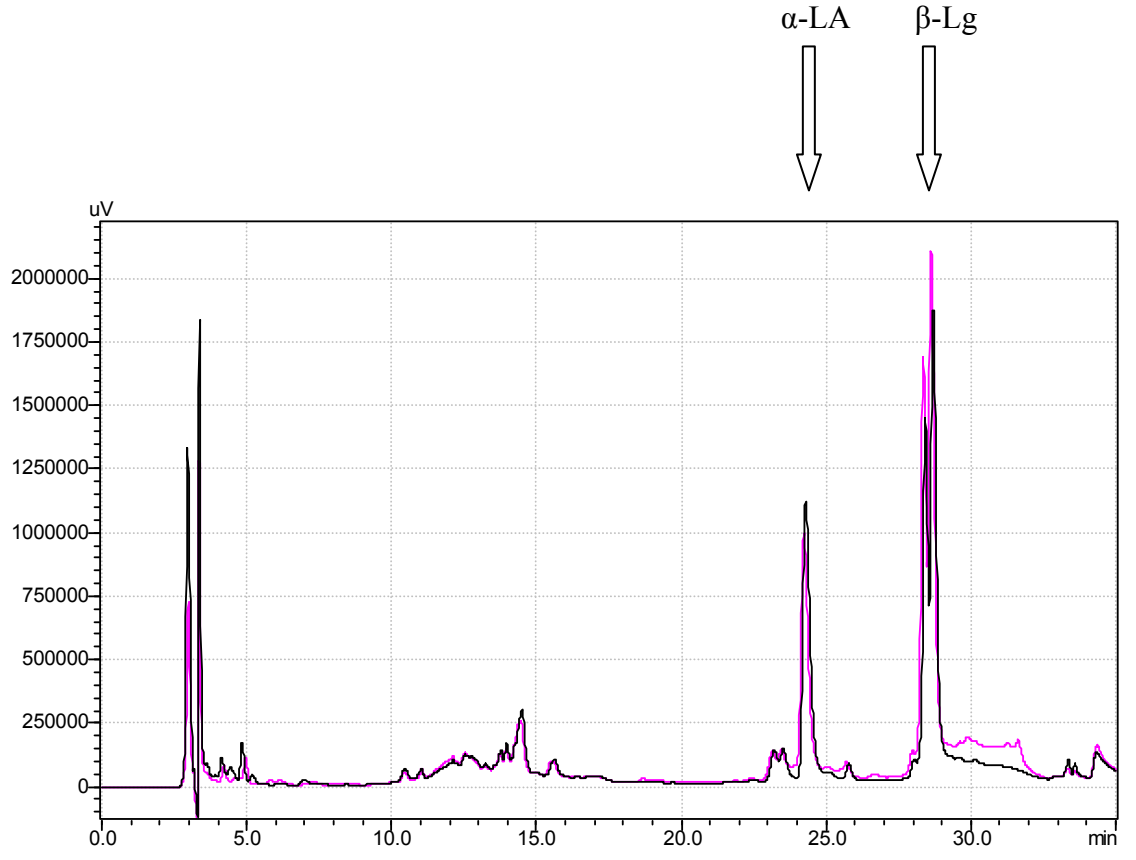
Numune	Örnekte bulunan α -LA ($\mu\text{g/ml}$)	Permeatta bulunan α -LA ($\mu\text{g/ml}$)	Retenantta bulunan α -LA ($\mu\text{g/ml}$)	Permeatta bulunan α -LA (%)	Retenantta bulunan α -LA (%)
5 nolu 100 kDa	523.29	150.44	188.89	28.75	36.09
8 nolu 100 kDa	305.12	170.19	182.54	55.77	59.82

Çizelge 4.8 de ve Çizelge 4.9 de görüldüğü gibi her iki diyafiltrasyon işleminde de tam olarak α -LA ayırımı sağlanamamış ve örnekteki miktarın bir kısmı permeatta bir kısmı ise retentantta kalmıştır. Konrad and Kleinschmidt (2008) α -LA ayırımı için triptik hidroliz ile birlikte diyafiltrasyon uygulamış α -LA`in konsantrasyonunda % 1.7–4.9 arasında kayıp olduğunu belirlemişlerdir. α -LA`in izolasyonu sırasındaki kayıpları azaltmak için diyafiltrasyon sırasında daha düşük sıcaklığa ve daha düşük gözenek çaplı membranlar ile bu kayıpların azaltılabileceği tespit etmişlerdir. Muller vd. (1999) ultrafiltrasyon ve diyafiltrasyon işlemlerini birlikte kullanmışlar ve son permeatta α -LA`nin sadece % 50 saflaştırabildiklerini belirtmişlerdir.

Cheng and Zydney (2003)`te diafiltrasyon ile pH 7`de 30 kDa`luk filtreler kullanarak α -LA`ni 10 kat saflaştırmışlardır.



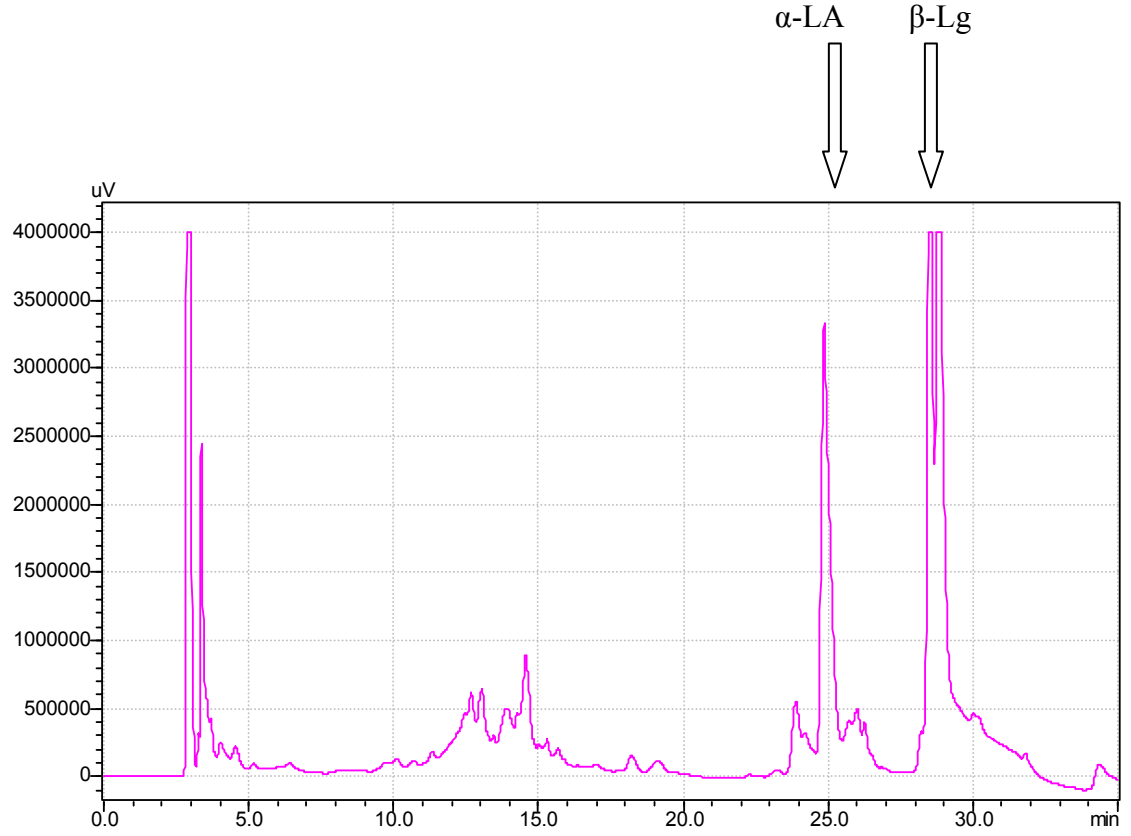
Şekil.4.14. 8 nolu örneğe birinci tip diyafiltrasyon uygulanarak 100 kDa filtreden geçen permeat ve retentant pikleri. (Siyah pik; permeat, pembe pik;retentant)



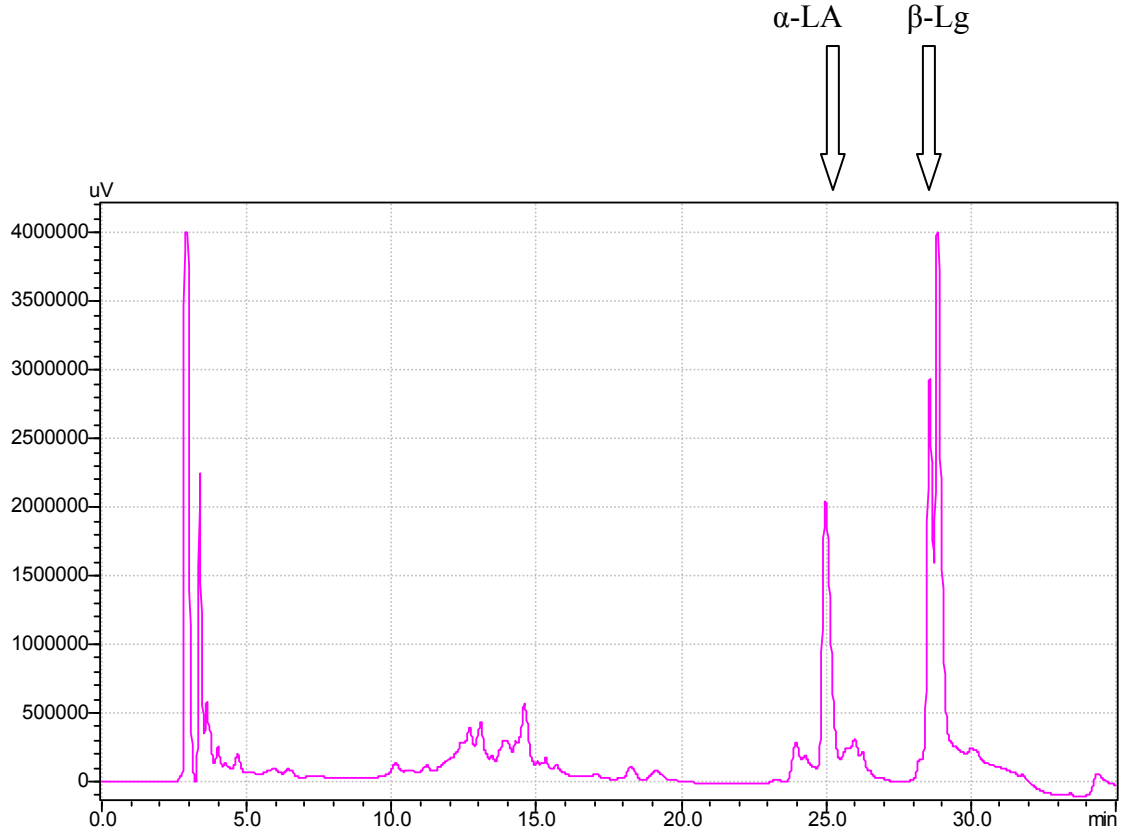
Şekil.4.15. 8 nolu örneğe ikinci tip diyafiltrasyon uygulanarak 100 kDa filtreden geçen permeat ve retentant pikleri. (Siyah pik; permeat, pembe pik;retentant)

4.3.2.7. Kademeli UF Uygulaması

3.5.5 belirtildiği gibi örneğe iki kademeli filtrasyon uygulanması sonucu Şekil 4.16 ve Şekil 4.17 görüldüğü gibi kromotogramlar elde edilmiştir.



Şekil 4.16. Örnek 10 kDa luk filtren geçen retentant pikleri

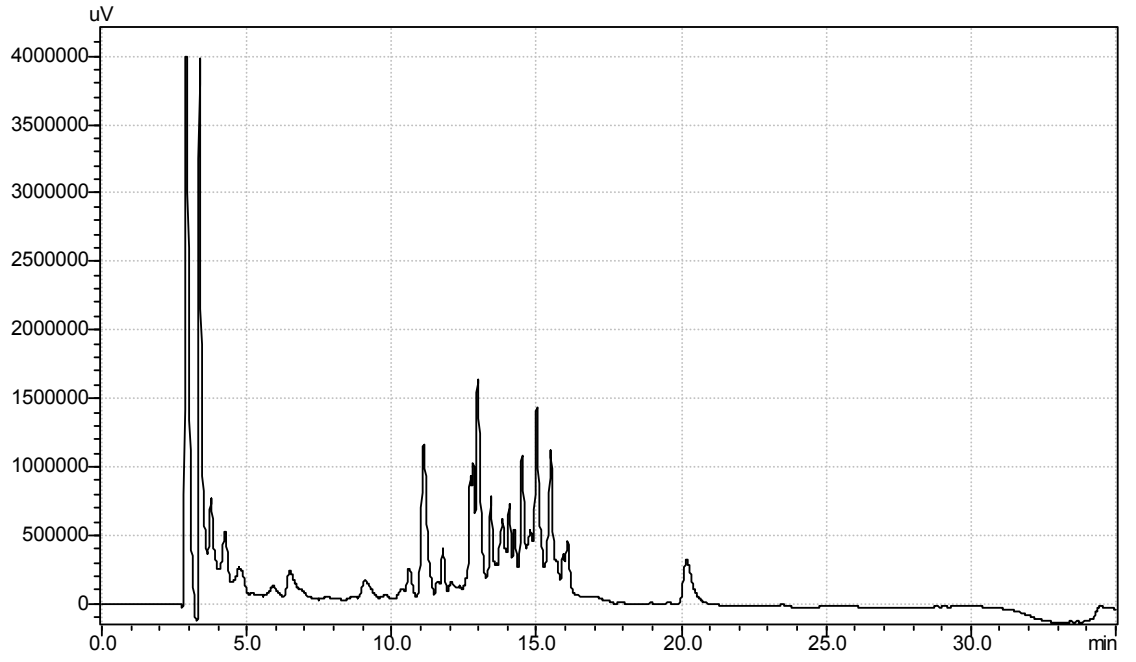


Şekil 4.17. Örnek 10 kDa luk filtren geçirilen retentantın 30 kDa santrifüj tipi membrandan geçen permeat

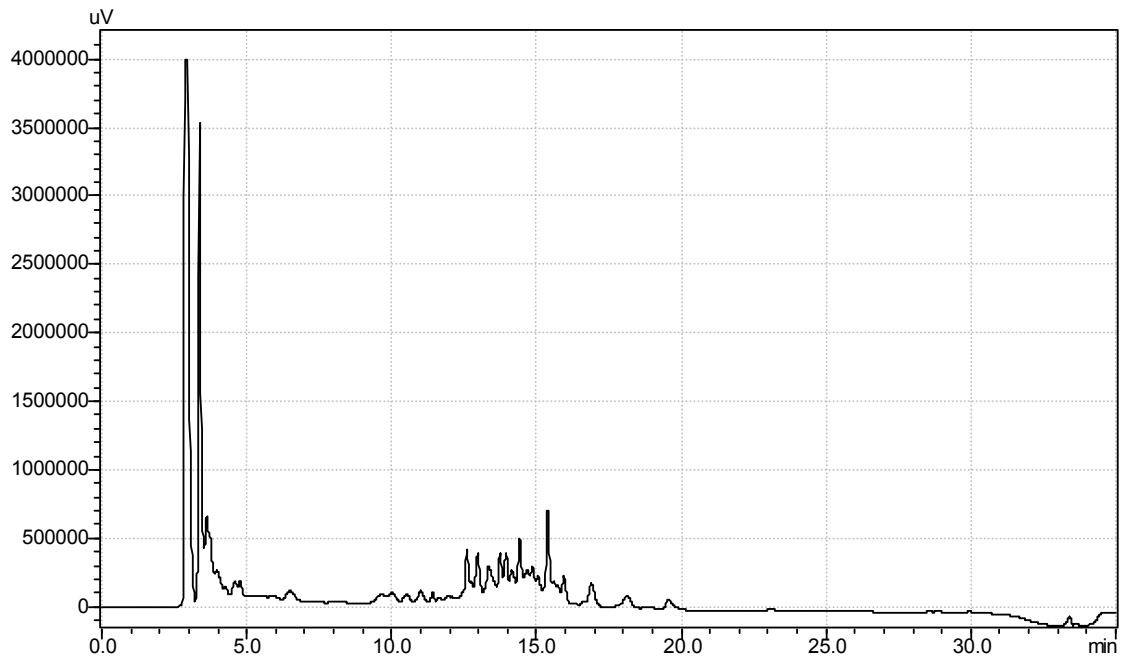
Şekil 4.16 ve Şekil 4.17`da görüldüğü başlangıçta retentatta bulunan α -LA miktarımız çok yüksek seviyelerde bulunurken, 30 kDa santrifüj tipi membranlardan geçirilmesi sonucu α -LA miktarında bir azalma meydana gelmiştir.

4.3.2.8. Tripsin Hidroliz Uygulanması

3.5.6 belirtildiği gibi örneğe tripsin uygulanması sonucu Şekil 4.18 ve 4.19`de görüldüğü gibi kromatogramlar elde edilmiştir. UF işlemleri sonucunda elde edilen filtratlara farklı miktarda enzim ilavesine rağmen, her iki enzim konsantrasyonundada şekilde 4.18 ve 4.19`de görüldüğü gibi α -LA ve β -Lg piki elde edilememiştir.



Şekil 4.18. 0.002 gr.tripsin uygulanması sonucunda elde edilen kromatogram



Şekil 4.19. 0,0007 gr tripsin uygulanması sonucunda elde edilen kromatogram

Konrad and Klenschmidt (2008) tripsin enzimi ile muamele sonucunda β -Lg'nin tümünü hidrolize etmiş. Ancak serum albumini triptik hidrolize karşı direnç göstermiştir. α -LA'ne tripsin ile muamele edildiği zaman iyi kontrol edilemez ise α -LA miktarında kayıp meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Bu nedenle PAS'da α -LA izolasyonunda hidroliz aşamasının kontrolünün önemli olduğunu belirlemişlerdir.

4.3.2.9. 30 KDa Hydrosart Membran ile UF İşlemi

Çizelge 4.10. 30 kDa Hydrosart membranda toplanan permeat miktarı

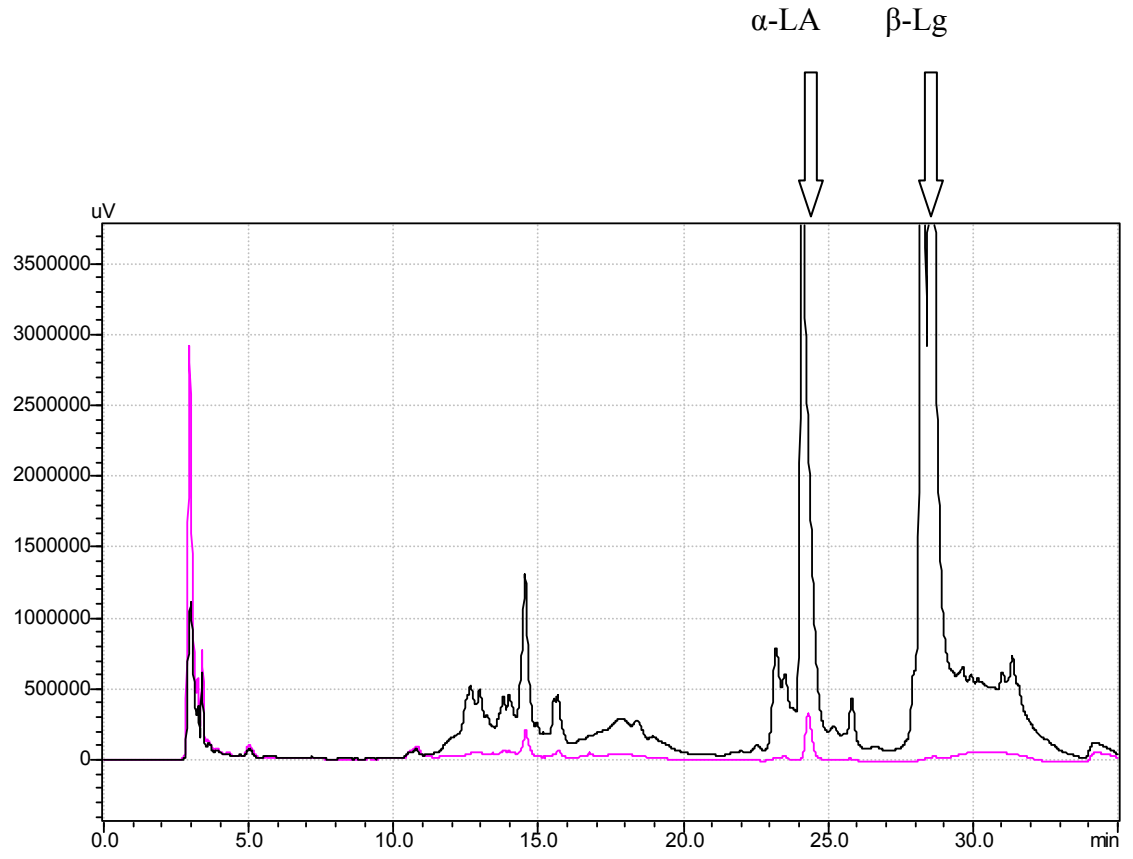
		Süresi	Toplanan Permeat Miktarı
Toplam Örnek Hacmi	550 ml		
1.geçiş		10 dk.	100 ml
2.geçiş		5 dk	42,5 ml
3.geçiş		5 dk.	45 ml
4.geçiş		5 dk	42,5 ml
5.geçiş		5 dk	30 ml
6.geçiş		5 dk.	30 ml
7.geçiş		2 dk	27,5 ml
8.geçiş		2 dk	25 ml
9.geçiş		2 dk	20 ml
10.geçiş		2 dk	17,5 ml
11.geçiş		2 dk	15 ml
12.geçiş		2 dk	15 ml
13.geçiş		2 dk	12,5 ml

Membranlarda konsantrasyon polarizasyonu membran yüzeyinde moleküler birikimle oluşur (Blatt, 1970; Vilker et.al., 1981; Ofsthun and Colton, 1987). Oluşan bu jel tabakası, membran yüzeyinde ikinci bir ultrafiltrasyon tabakası gibi davranır ve membran akış hızını azaltır. Çözelti ortamındaki parçacıkların veya makromoleküllerin membranda adsorblanması veya fiziksel olarak porlarda birikmeleriyle kirlenmeler oluşur ve dolayısıyla ultrafiltrasyon performansı düşer (Baker et.al., 1985; Fane and Fell., 1987; Suki et.al., 1984; Bayram 2007).

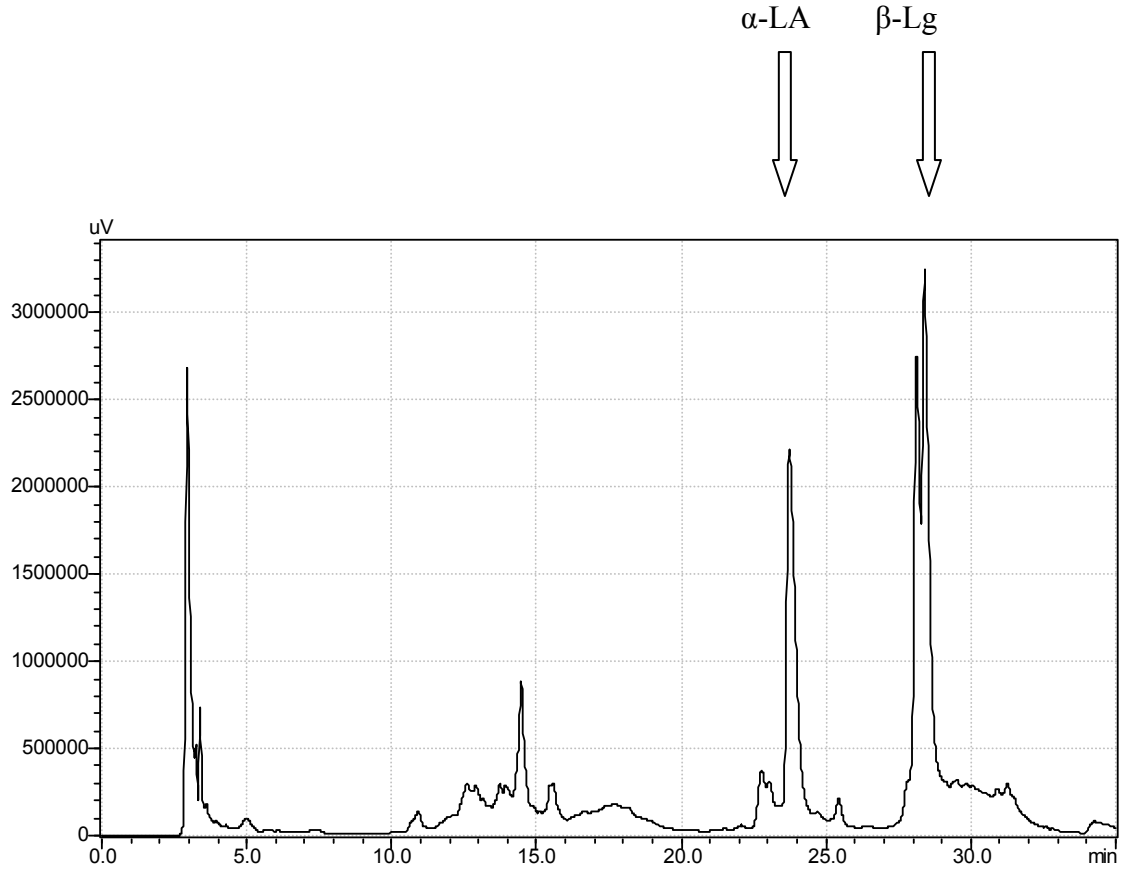
Çizelge 4.10 görüldüğü gibi selüloz bazlı bir membran olan hidrosart membran ile yapılan filtrasyon işleminde 13 kez sirkülasyon yapılmış ve ilk geçişte 550 ml'lik PAS'dan 100 ml permeat toplanırken filtrelerde meydana gelen tıkanmalara bağlı olarak toplanan permeat miktarı 13 geçişte 12,5 ml olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.11. 30 kDa'luk hydrosart membran filtrasyon işlemi sonrası permeat yıkama suyunda bulunan α -LA'nin miktarları

Numune	Örnekte bulunan α -LA ($\mu\text{g/ml}$)	Permeatta bulunan α -LA ($\mu\text{g/ml}$)	Retenant ta bulunan α -LA ($\mu\text{g/ml}$)	Permeatta bulunan α -LA (%)	Retenantta bulunan α -LA (%)
7 nolu hydrosart	284.85	58.15	522.32	%20	%183
7 nolu yıkama suyu	284.85	141.98	-	%49.84	-



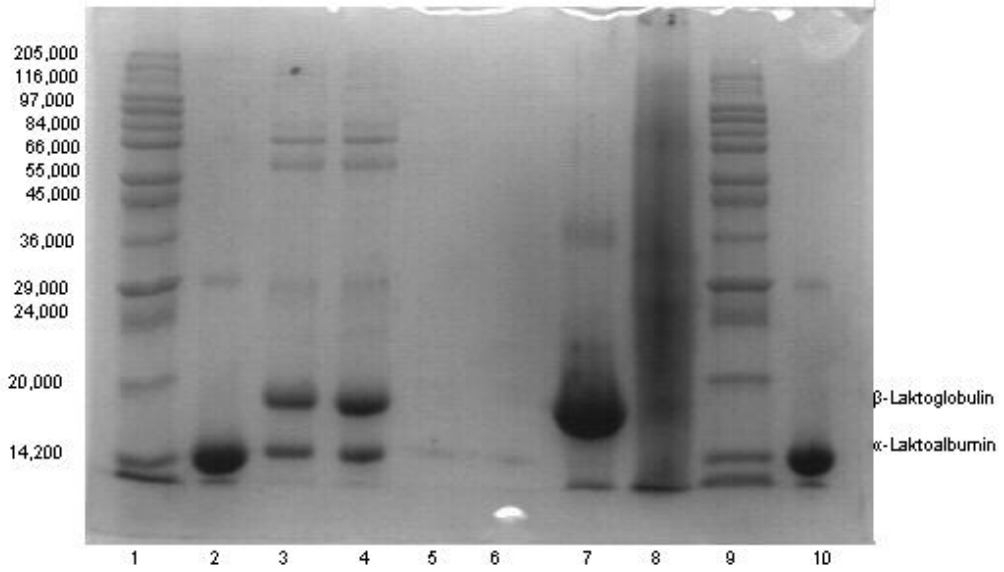
Şekil 4.20. 7 nolu örneğin 30 kDa luk hydrosart filtren geçen permeat ve retentant pikleri (Siyah pik; permeat, pembe pik; retentant)



Şekil 4.21 7 nolu örnekte bulunan α -LA ve β -lg pikleri

Çizelge 4.11.'de belirtildiği gibi başlangıç anında PAS'da bulunan α -LA miktarı 284.85 $\mu\text{g/ml}$ iken 13 tur filtrasyon işlemi sonunda permeatta 58.15 $\mu\text{g/ml}$ (%20), retentta ise 522.32 $\mu\text{g/ml}$ (%183) oranlarında tespit edilmiştir. Filtrasyonun temizlik aşamasında ise yıkama suyunda kalan α -LA miktarı ise 141.98 $\mu\text{g/ml}$ bulunmuştur. PES membranlarda farklı pH ve diafiltrasyon işlemlerine rağmen retentantta bu konsantrasyona ulaşılamamıştır.

4.4. SDS-PAGE



Şekil 4.22.(1) Marker, (2) α -LA standardı ,(3) 7 nolu Örnek, (4) 7 nolu Örnek Retentantı, (5) 7 nolu Örnek Permeatı,(6) Yıkama Suyu, (7) β - Lg Standardı, (8) Kappa Kazein Standardı, (9) Marker,(10) α -LA standardı

Sekil 4.22'de görüldüğü 4. ve 5. kuyucuklarda 30 kDa filtrasyon işlemi sonucunda elde edilen permeat ve retentantda bulunan protein bantları görülmektedir.5. kuyucukta bulunan permeatta α -LA ve β - Lg bantları bulunmazken 4. kuyucukta α -LA ve β - Lg'nin bantlarının 3 kuyucukta bulunan örneğe göre daha yoğun olduğu görülmektedir.

5. SONUÇ

Kullanılan farklı saflaştırma yöntemlerinde görülen olumsuzluklar nedeni ile ultrafiltrasyon yöntemi ile protein fraksiyonlarının ayrılması günümüzde önem kazanmıştır. Bu bağlamda yapılan bu çalışmada şu sonuçlar elde edilmiştir.

- Yapılan kimyasal analiz sonucunda PAS'da pH 4,42-6,38, SH 12,2-23.4, kurumadde % 3,67- 6,86 kül %0,1-0,8 yağ oranı % 0,1-1,6, protein %0,1-0,8, protein olmayan azot 0,006-0,034 arasında bulunmuştur.
- Peyniraltı sularında tesbit edilen β - Lg miktarları 0,026-0,459g/l arasında spektrofotometrik olarak tesbit edilmiştir.
- Yapılan UF işleminde 10, 30, 100 kDa 'luk PES membran ve 30 kDa luk Hidrosart membran filtreler kullanılmıştır. 10kDa luk filtreden geçen peyniraltı suyunun α -LA permeata ve retentanta dağılarak başlangıç örnek konsantrasyonuna göre düşük bulunmuştur. α -LA filtrede absorbe olarak yeteri kadar permeat ve retentanta geçişi sağlanamamıştır.
- Yapılan pH çalışmalarında en yüksek α -LA miktarı pH 6,30 'da retentant da 8 nolu örnekte tespit edilmiştir.
- 100kDa`luk filtre ile yapılan diyafiltrasyon işlemi sonucu 8 ve 12 nolu örnekte α -LA miktarı sırasıyla permeatta %85,76, %52,14, retentantta ise %105,37, % 90,55 oranında artırılmıştır.
- 30 kDa luk PES membran ve hidrosart membran filtrasyonları aynı örneğe uygulanmıştır. Bunun sonucunda hidrosart membranda retentantda α -La miktarı % 183 oranında artarken PES membranda konsantrasyon artışı %87,99 oranında artmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda PES membranların α -La`in saflaştırılması için uygun olmadığı tespit edilmiştir. Elde elimizde farklı çaplarda Hidrosart membran bulunmadığı için permeattaki miktarı artırmak mümkün olmamıştır. İlerde yapılacak çalışmalarda farklı gözenek çaplı hidrosart membranlar ile permeatta bulunan α -LA miktarının artırılabilceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- AOAC 1980. Official methods of analysis. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists
- Almecija, C.M., Ibanez, R., Guadix, A., Guadix, E.M., 2007. Effect of pH on the fractionation of whey proteins with a ceramic ultrafiltration membrane. *Journal of Membrane Science*. 288, 28–35.
- Alpkent, Z., Göncü, A., 2003, Peynir suyu ve peynir suyu proteinlerinin gıda, kozmetik ve tıp alanlarında kullanımı, TMMOB GMO Gıda Mühendisliği Dergisi, Sayı: 15
- Ayar, A., Sert, D., Öztürk, G., 2007. Fonksiyonel gıda katkı maddesi olarak peyniraltı suyu proteinleri. 5. Gıda Mühendisliği Kongresi Kitabı, 569–574, Ankara.
- Baker, R.J., Fane A.G., Fell, C.J.D., Yoo, B.H., 1985. Factors affecting flux in crossflow filtration. *Desalination*, 53: 81-93,
- Blatt, W.F., Dravid, A., Michaels, A.S., Nelsen, L., 1970. *Membrane Science and Technology* Ed: Flinn J.E., s. 47-97, Plenum Press, New York
- Bayazit, A.A., Yılsay, Ö.T., 2004. Peyniraltı suyundan mikrobiyel yağ üretimi. *Akademik Gıda Dergisi*, 10 (2), 15-17.
- Bayram, T., 2007. Süt serum proteinlerinin peyniraltı suyundan elde edilmesi. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek lisans tezi, 72p. İSTANBUL.
- Bottomley, 1991. US Patent 5,008,376.
- Chatterton, D.E.W., Smithers, G., Roupas, P., Brodtkorb, A., 2006. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin-Technological implications for processing. *International Dairy Journal*, 16, 1229-1240.
- Cheryan, M., 1998. *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*, Technomic Publishing Company, Inc., 1-527.
- Cheang, B., Zydney, A.L., 2003. Separation of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin Using Membrane Ultrafiltration. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.83, No. 2, 201-209.
- De la Fuente, M.A., Hemar, Y., Tamehana, M., Munro, P.A., Singh, H., 2002. Process – Induced changes in whey proteins during the manufacture of whey protein concentrates. *International Dairy Journal*. 12, 361- 369.

- de Fillipi, R.P., Goldsmith, R.L., 1970. Membrane Science and Technology. Ed: Flinn J.E., s. 33-46, Plenum Press, New York.
- de Wit, J.N., 1998. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*, 81, 59–608.
- Elgar, D.F., Norris, C.S., Ayers, J.S., Pritchard, M., Otter, D.E., Palmano, K.P., 2000. Simultaneous separation and quantitation of the major bovine whey proteins including proteose peptone and caseinomacropeptide by reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene. *Journal of Chromatography A*, 878, 183–196.
- Erdem, İ., 2002. Preparation of Ultrafiltration / Microfiltration Ceramic Composite Membranes for Biotechnology Applications. İzmir Institute of Technology, M.Sc. Thesis, 54p, İzmir.
- Fane, A.G., Fell, C.J.D., 1987. A review of fouling and fouling control in ultrafiltration. *Desalination*, 62: 117-125.
- Farizoğlu, B., Keskinler, B., Yıldız, E., Çakıcı, A., 2004. Peyniraltı sularının arıtıldığı jet loop membran biyoreaktörün membran filtrasyonu özelliklerinin araştırılması. *SKKD*, 14 cilt, sayı 2, 1-8.
- Fox, P.F., 1989. The milk protein system in developments in dairy chemistry-4. Functional milk proteins. Elsevier Applied Science Publishers Ltd, 1-53. New York.
- Gavala, H.N., Kopsinis, H., Skiadas, I.V., Stamatelatou, K., Lyberatos, G., 1999. Treatment of dairy wastewater using an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *J. Agric. Engng Res.*, 73, 59-63.
- German, J.B., Dillard, C.J., Walzem., R.L., 2001. U.S. Whey Products and Dairy Ingredients for Health: A Review. May 2000. U.S. Dairy Export Council.
- Haris, E.L.V., 1989. Protein Purification Methods- A Practical Approach. Ed: Harris E.L.V. and Angal S. s. 125-174, IRL Pres Oxford, New York.
- Harper, W.J., 2000. Biological properties of whey components. A Review. Chicago, IL: The American Dairy Products Institute.
- Howell, J. A., Sanchez, V., Field, R. W, Blackie, 1993. Membranes in Bioprocessing: Theory and Applications, Academic Professional, Chapman & Hall
- IDF., 1987. Determination of total solids content. IDF standard 21B. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- IDF., 2001. Determination of nitrogen content. IDF standard 20-1. Brussels, Belgium: International Dairy Federation

- IDF., 2001. Determination of nitrogen content. IDF standard 20-4. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- Jovanović, S., Barać, M., Maćej, O., 2005. Whey proteins- Properties and Possibility of Application. *Mljekarsivo*, 55 (3), 215-233.
- Karagözlü, C., Bayarer, M., 2004. Peyniraltı suyu proteinlerinin fonksiyonel özellikleri ve sağlık üzerine etkileri. *Ege Üniv. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 41 (2), 197-2007.
- Kamer, İ., Aksoy, E., Tatlıdil, T., 1997. Peyniraltı suyunun önemi ve değerlendirme yolları, Proje çalışması, Ege Üniversitesi Ege Meslek Yüksekokulu Gıda Teknolojisi Bölümü, Bornova-İzmir.
- Kavacık, B., Topaloğlu, B., 2007. Peyniraltı suyu ve Gübre karışımından biogaz üretimi. 7. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi, 443-450.
- Kavas, G., Karagözlü, C., 2000. Peynir suyu artık mı? Atık mı? Yoksa.... *Gıda Dergisi Dünya Yayınları*, 7, 14-15.
- Kavas, G., Çelikel, N., Kınık, Ö., Uysal, H., 2006. Peyniraltı suyunun bebek beslenmesinde kullanımında elektrodializ yöntemi uygulamaları. *Akademik Gıda Dergisi*, 19(4), 41-42.
- Konrad, G., Lieske, B., Faber, W., 2000. A large-scale isolation of native β -lactoglobulin: characterization of physicochemical properties and comparison with other methods. *International Dairy Journal*, 10, 713-721.
- Konrad, G., Klenschmidt, T., 2008. A new method for isolation of native α -lactalbumin from sweet whey. *International Dairy Journal*, 18, 47-54.
- Kosikowski, F.V., 1979. Whey Utilization and Whey Products. *J Dairy Sci* 62:1149-1160.
- Körpe, Ö., Kızek, E., Ağlayan, K., Dere, C., 1997. Sütçülük atıkları ve sanitasyonu, Proje çalışması, Ege Üniversitesi Ege Meslek Yüksekokulu Gıda Teknolojisi Programı, Bornova-İzmir.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Liang, M., Chen, V.Y.T., Chen, H., Chen, W., 2006. A simple and direct isolation of whey components from raw milk by gel filtration chromatography and structural characterization by Fourier transform Raman spectroscopy. *Talanta*, 69, 1269-1277.
- Lieske, B., Konrad, G., Faber, W., 1997. A new spectrophotometric assay for native β -lactoglobulin in raw and processed bovine milk. *International Dairy Journal*, 7, 805-812.

- Lonsdale, H.K., 1982. The growth of membrane technology. *J. Membr. Sci.*, 10: 81-181.
- Lucena, M.E., Alvarez, S., Menéndez, C., Riera, F.A., Alvarez, R., 2007. α -Lactalbumin precipitation from commercial whey protein concentrates. *Separation and Purification Technology*, 52, 446-453.
- Madereira, A.R., Pereira, C.I., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E., Malcata, F.X., 2007. Bovine whey proteins- Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40, 1197-1211.
- Marshall, K., 2004. Therapeutic applications of whey protein. *Altern. Med., Review*, Vol. 9, No. 2.
- Matsumoto, H., Shimokawa, Y., Ushida, Y., Toida, T., Hayasawa, H., 2001. New biological function of bovine α -lactalbumin: Protective effect against ethanol- and stress-induced gastric mucosal injury in rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65, 1104-1111.
- McGregor, W.C., 1986. *Membrane Separations in Biotechnology*. Ed: McGregor W.C. Vol. 1, s. 1-87, New York and Basel, Marcel Dekker Inc.
- McIntosh, G.H., Regester, G.O., Le Leu, R.K., Royle, P.J., Smithers, G.W., 1995. Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal cancers in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 125 (4), 809-816.
- Mehra, R.K., Donnelly, W.J., 1993. Fractions of whey protein components through a large pore size, hydrophilic cellulose membrane. *Journal of Dairy Research*, 60, 89-97.
- Metin, M., 1983. Süt Sanayinde Peynir Suyunun Değerlendirilmesi. *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Dergisi*, 1 (1), 151-169.
- Metin, M., 2001. Süt Teknolojisi Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları*, Ege Üniversitesi Basımevi, No:33, 802s. İZMİR.
- Metin, M., 2008. Süt ve Mamülleri Analiz Yöntemleri. *Ege Üniversitesi Basımevi*, 3. basım, No:24, 439 s. İZMİR.
- Muller, A., Daufin, G., Chaufer, B., 1999. Ultrafiltration modes of operation for the separation of α -Lactalbumin from acid casein whey. *Journal of Membrane Science*, 153, 9-21.
- Ofsthun N.J., Colton C.K., 1987. Visual evidence of concentration polarization in crossflow membrane plasmapheresis. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 33: 510-517.

- Otani, H., Mizumoto, G., 1998. Suppressive effect of lysozymes and α -lactalbumins on mitogen-induced proliferative responses of Mouse lymphocytes. *Animal Science Technology*, 11, 1029–1039.
- Özçelik, F., Molavi, S.S., Balk, M., 1994. Peyniraltı suyundan etilalkol üretiminde laktoz, konsantrasyonun fermantasyon üzerine etkisi. *Gıda Teknolojisi Derneği Dergisi*, 19(1), 45-48.
- Öztürk, E., 2007. Peyniraltı Suyunun Anaerobik Arıtma Çamur Reaktöründe Arıtımında En Uygun Koşulların Belirlenmesi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 113s.
- Permyakov E.A., Berliner L.J., 2000. α -lactalbumin: structure and function. *Febs Letters*; 473: 269-274.
- Pusch, W., Walch, A., 1982. Synthetic membranes-preparation, structure and application. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 21: 660-685.
- Rektor, A., Vatai, G., 2004. Membrane filtration of mozeralla whey. *Desalination*, 162, 279–286.
- Renyard, S.J., Whitehead, P.D., 1991. Milk Concentrates. *The Technology of Dairy Products*. (ED. By. R. Early), 147 –166.
- Sakurai, K., Goto, Y., 2002: Manipulating monomer-dimer equilibrium of bovine β -lactoglobulin by amino acid substitution. *J. Biol. Chem.*, Vol. 277, No. 28: 25735-25740.
- Smithers, G.W., Ballard, F.J., Copeland, A.D., De Silva, K.J., Dionysius, D.A., Francis, G.L., Goddard, C., Grieve, P.A., McIntosh, G.H., Mitchell, I.R., Pearce, R.J., Regester, G.O., 1996. New Opportunities From The Isolation and Utilization of Whey Proteins. *Journal of Dairy Science* 79 (8) 1454–1459.
- Suki, A., Fane, A.G., Fell, C.J.D., 1984. Flux decline in protein ultrafiltration. *J. Memb. Sci.*, 21: 269-283.
- Şahan, N., Konar A. 1995. Peynir işlenecek süte uygulanan farklı işlemlerin peynir suyu niteliğine etkisi. *Gıda dergisi*, 20 (3), 143-147.
- Tarakçı, Z., Küçüköner, E., 2003. Peyniraltı suyu proteinlerinin fonksiyonel özellikleri ve gıdalarda kullanımı. *Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu*, P32, 329-334.
- Tarakçı, Z., Küçüköner, E., 2006. Farklı Çeşit Peynirlerin Üretiminde Peyniraltı Suyu ve Konsantrelerinin Kullanımı. *Hasad Gıda*, Sayı: 254, 26–33.
- Tarhan, L., 1996. Ekstraktın Deristirilmesi. Ed: Telefoncu A., Protein Saflastırılması ve Karakterizasyonu. Böl. 6, s. 78-108, *Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu*, İzmir.

- Temiz, H., Okumuş, E., 2005. Peyniraltı suyunun değerlendirilmesinde kullanılan yöntemler. 4. Gıda Mühendisliği Kongre Kitabı, 11, 159–171.
- Uchida, Y., Shimatani, M., Mitsuhashi, T., Koutake, M., 1996. Process for preparing a fraction having a high content of α -lactalbumin from whey and nutritional compositions containing such fractions.
- Üçüncü, M., 2002. Süt Teknolojisi 2. Bölüm. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Ege Meslek Yüksekokulu Basımevi, No:32, 208 s. İzmir.
- Üçüncü, M., 2004. A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi 2. Ege Üniversitesi Müh. Fakültesi Gıda Müh. Bölümü, Meta Basım, 1236s. İzmir.
- Üçüncü, 2005. Süt ve Mamülleri Teknolojisi. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Ege Meslek Yüksekokulu Basımevi, 571 syf. İzmir.
- Vilker, V.L., Colton, C.K., Smith, K.A., 1981. The osmotic pressure of concentrated protein solutions: Effect of concentration and pH in saline solutions of bovine serum albumin. J. Coll. Interf. Sci., 79: 548-552.
- Yöney, Z., 1962. Sütçülük Atıklarımız ve Değerlendirme İmkanları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No:193,122, Ankara
- Zydney, A.L., 1998. Protein separations using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation. International Dairy, 18, 243-250.
- Whitney, R.M., Brunner, J.R., Ebner, K.E., Farrell, H.M.JR., Josephson, R.V., Morr, C.V., Swaisgood, H.E., 1976. Nomenclature of the proteins of cow's milk: fourth revision. Journal Dairy Science, 59(5), 795-815.
- <http://www.ulkerhero.com/urunler>. 12 Kas 2009 17:04:33 GMT.
- Ötleş, S., 2009. <http://eng.ege.edu.tr/~otles/foodwaste-milk.tripod.com/default.htm>. Erişim Tarihi : 28 Ekim 2009 07:02:03 GMT.
- <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/chem.html>. Erişim Tarihi: 16 Kas 2009 09:35:03 GMT.
- <http://www.forumalemi.net./membran-ayırma-teknikleri>. Erişim Tarihi: 16 Eki 2009 09:47:20 GMT.
- Sartorius, 2009. www.sartorius.com/.../Data_Hydrosart_Ultrafilt_SPC2027-e.pdf. Erişim Tarihi : 28 Kasım 2009:00.34
- Sartorius, 2009. www.sartorius.com/.../Data_PESU_Ultrafilt_SPC2023-e.pdf. Erişim Tarihi: 28 Kasım 2009: 00.34.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Tuğba DEDEBAŞ



Doğum Yeri ve Yılı: Sakarya, 1983

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Balıkesir Muharrem Hasbi Koray Lisesi, 1997-2001

Lisans :Süleyman Demirel Üniversitesi, 2002-2007

Yüksek Lisans : Süleyman Demirel Üniversitesi, 2007-2009

Yayınları :

- 1- Öner, Z., Şanlıdere Aloğlu, H., Ölmez, Z., **Dedebaş, T.**, Transglutaminaz Enziminin Süt Proteinlerine ve Proteinlerin Fonksiyonları Üzerine Etkisi. 5. Gıda Mühendisliği Kongresi 08-10 Kasım Ankara, 2007.
- 2- **Dedebaş, T.**,Öner, Z. 2009 Sfingolipitlerin sağlık üzerine etkileri Pamukkale Üniversitesi Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu .
- 3- Öner Z.,Aloğlu H.,Sağiroğlu,T.,**Dedebaş,T.** 2009. Yalvaçta üretilen kaymakların özelliklerinin belirlenmesi Pamukkale Üniversitesi Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu .
- 4- **Dedebaş T.**Şanlıdere H.Öner Z 2009 Farklı Sütlerin Antioksidan Özellikleri XVI.Biyoteknoloji Kongresi .