

**YEŞİL ÇAY POLİFENOLLERİNİN KAZEİN İLE ̢-
LAKTOGLOBULİN ETKİLEŞİMLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**EFFECT OF GREEN TEA POLYPHENOLS ON CASEIN
AND ̢- LACTOGLOBULIN INTERACTIONS**

SERAL KÖSEOĞLU ASLANDAĞ

PROF. DR HALİL VURAL

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Prof. Dr. Yaşar Kemal Erdem'in anısına

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

10 / 09 / 2021

SERAL KÖSEOĞLU ASLANDAĞ

YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

10 /09 /2021

(İmza)

SERAL KÖSEOĞLU ASLANDAĞ

ÖZET

YEŞİL ÇAY POLİFENOLLERİNİN KAZEİN İLE β - LAKTOGLOBULİN ETKİLEŞİMLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Seral KÖSEOĞLU ASLANDAĞ

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Halil VURAL

EYLÜL 2021; 59 sayfa

Yapılan tez kapsamında, farklı ısı işlem normlarında farklı derecelerde denatürasyonu hedeflenen Betalaktoglobulin (BLG) ile Kappakazein (KCN) etkileşimleri ve bu etkileşimlerin polifenol-protein etkileşimlerinden hangi yönde etkileneceği belirlenmeye çalışılmıştır. Bu anlamda, 65 °C/30dk ısı işlem görmüş, 85 °C/30dk ısı işlem görmüş ve çiğ süttten elde edilen rennet jellerinde yeşil çay polifenollerinin koagülasyon sürecine etkisi ve bu etkinin ısı işlem ile ilişkisi değerlendirilmiştir.

Yeşil çay ekstraktı (YÇE) ilavesinin süttün rennet ile koagülasyon sürecine etkisi analizi sonucunda rennet ile koagülasyon sürecinin toplam süresinin YÇE ilavesi ile arttığı, yani süreçlerin YÇE ilavesi ile yavaşladığı gözlemlenmiştir. YÇE ilavesinin kazeinomakropeptit (KMP) oluşumuna etkisi incelendiğinde KMP denemelerinde görülmemiş ancak BLG ile KCN etkileşimlerinin özellikle 85°C/30 dk ısı işlem görmüş sütt örneklerindeki KMP oluşum hızının yavaşlamasında etkili olduğu düşünülmüştür.

Dairesel dikroizm spektroskopisi ile yapılan deneme sonuçlarında 85 °C 'de BLG yapısı denatüre olarak farklı ikincil yapı sayılarında artış görülmüştür. YÇE ile etkileşimin açıkça ortaya koyduğu farklılık özellikle 85°C'de BLG-KCN etkileşimleri varlığında yakın görünür bölge çalışmalarında gözlemlenmiş ve YÇE etkisinin her iki ısı işlem formunda da üçüncül yapı değişikliklerine neden olduğu gözlemlenebilmiştir.

Native- PAGE çalışmasında YÇE fenoliklerinin BLG ve BLG-KCN kompleksi ile etkileşiminin BLG'nin artan denatürasyon derecesi ile arttığı belirlenmiştir. Denatüre BLG ile fenolik etkileşimlerinin BLG'nin ısıtma işlemi ile indüklenen polimerleşmesine YÇE'nin önemli oranda etki ettiğini göstermektedir.

Tekstür analizinde oluşturulan jel ile yapılan ölçümlerde YÇE ilavesinin çiğ süt ve 65°C ısıtma işlemi görmüş jelin sertliği azalmış olup. Çiğ Süt ve 65 °C/30dk ısıtma işlemi görmüş sütle yapılan jellerde ise sertliğin azalmasını etkileyen parametre YÇE ilavesi değil değil ısıtma işlemi olmuştur. Tekstür analizinde yapılan çıkarımdan yola çıkılarak YÇE'nin su tutma kapasitesine etkisinin bu denemede ısıtma işlemi tarafından maskelendiği düşünülmüştür.

Tez kapsamındaki tüm analiz sonuçları gözden geçirildiğinde yapılan analizlerde ısıtma işleminin bir sonucu olarak ortaya çıkan BLG- KCN etkileşimleri üzerine YÇE ilavesinin etkisi olduğu açık bir şekilde ortaya konmuştur. Bu etki BLG denatürasyonu ile beraber BLG-KCN etkileşimlerinin kimozinin substratına ulaşmasını zorlaştırabileceği ile paralel olarak YÇE ilavesi ile de kazeinle (CN) fenoliklerin etkileşime girerek kimozinin substratına ulaşmasını zorlaştıracak şekilde olmuştur. BLG denatürasyonunu YÇE etkisi belirginleştirmiştir. Native PAGE analizlerinde ısıtma işlemi ile oluşan büyük agregatların YÇE varlığında oluşmadığı görülmüş ve YÇE'nin protein-protein etkileşimlerine bu yönde etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Isıtma işlemi ve YÇE ilavesinin özellikle BLG'ün denatüre olduğu sıcaklık normlarında peynir jellerinin özelliklerini değiştireceği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: polifenoller, yeşil çay, rennet, koagülasyon, denatürasyon, protein-protein etkileşimleri, fonksiyonel gıda

ABSTRACT

EFFECT OF GREEN TEA POLYPHENOLS ON KAZEIN AND β - LACTOGLOBULIN INTERACTIONS

Seral KÖSEOĞLU ASLANDAĞ

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Halil VURAL

SEPTEMBER 2021, 59 pages

Within the scope of the thesis, it has been tried to determine the interactions of Betalactoglobulin (BLG) and Kappacasein (KCN), which are aimed at different degrees of denaturation at different heat treatment norms, and in which direction these interactions will be affected by polyphenol-protein interactions. In this sense, the effect of green tea polyphenols on the coagulation process and the relationship of this effect with heat treatment were evaluated in rennet gels obtained from raw milk, which were heat treated at 65 °C/30 min, heat treated at 85 °C/30 min.

As a result of the analysis of the effect of green tea extract (GTE) addition on the rennet coagulation process of milk, it was observed that the total duration of the rennet coagulation process increased with the addition of GTE, that is, the processes slowed down with the addition of GTE. When the effect of the addition of YÇE on the formation of caseinomacropetide (CMP) was examined, it was not seen in CMP experiments, but it was thought that the interactions of BLG and KCN were effective in slowing the rate of CMP formation, especially in milk samples that were heat treated at 85°C/30 min.

In the results of the trial performed with circular dichroism (CD) spectroscopy, the BLG structure was denatured at 85 °C and an increase in the number of different secondary structures was observed. The difference clearly revealed by the interaction with GTE was observed in near-visible region studies, especially in the presence of BLG-KCN interactions at 85°C, and it was observed that the GTE effect caused tertiary structure changes in both forms of heat treatment.

In the Native-PAGE study, it was determined that the interaction of GTE phenolics with BLG and BLG-KCN complex increased with increasing degree of denaturation of BLG.

In the measurements made with the gel formed in the texture analysis, the hardness of the raw milk and 65°C heat-treated gel with the addition of GTE decreased. In gels made with raw milk and milk that was heat treated at 65°C/30 min, the parameter affecting the reduction of hardness was heat treatment, not the addition of GTE. Based on the inference made in the texture analysis, it was thought that the effect of GTE on the water holding capacity was masked by the heat treatment in this experiment.

When all the analysis results within the scope of the thesis are reviewed, it has been clearly demonstrated that the addition of GTE has an effect on the BLG-KCN interactions that occur as a result of the heat treatment. This effect was such that with BLG denaturation, BLG-KCN interactions could make it difficult to reach the chymosin substrate, and in parallel with the addition of GTE, casein (CN) and phenolics interacted and made it difficult for chymosin to reach the substrate. The denaturation of BLG was marked by the effect of GTE. In Native PAGE analyzes, it was observed that large aggregates formed by heat treatment did not form in the presence of GTE, and it was observed that GTE had an effect on protein-protein interactions in this direction. It has been concluded that the addition of heat treatment and GTE will change the properties of cheese gels, especially at temperature norms where BLG is denatured.

Keywords: polyphenols, green tea, rennet, coagulation, denaturation, protein-protein interactions, functional food

TEŞEKKÜR

Bu yola beraber başladığım, bu yola o olduğu için çıktığım, ancak bir süre sonra yollarımızın ayrıldığı, şu an bizimle beraber olamasa da varlığını desteğini her zaman kalbimde hissedebildiğim, her öğrencisine olduğu gibi düşünceleri ve duruşu ile benim de hayatıma dokunan, onun öğrencisi olduğum için kendimi daima şanslı hissedeceğim değerli hocam sayın Prof. Dr. Yaşar Kemal Erdem'e sonsuz teşekkürler, ışıklar içinde uyusun.

Tüm lisans ve lisansüstü dönemimde desteğini her daim hissettiğim, ne zaman başım sıkışsa danışabileceğimi bildiğim, kapısı tüm öğrencilerine daima açık olan, hayatımın geri kalanında hep saygıyla anacağım, danışman hocam sayın Prof. Dr. Halil Vural'a yardımları ve destekleri için çok teşekkür ederim.

Lisans ve lisansüstü dönemimde ne zaman sıkışmış, ne zaman kaybolmuş hissetsem desteğiyle beni ayakta tutan, gece gündüz ne zaman olursa olsun hep yardımına koşan, bu süreçte sabırlarını sonuna kadar sınıadığım ama asla beni yalnız bırakmayan, her koşulda arkamda duran, bu tezin ortaya çıkmasında ve her kelimesinde emeği olan bu yolda elimden tutan değerli hocam sayın Dr. Seda Yıldırım Elikoğlu'na ne kadar az olacağını bilsem de sonsuz teşekkür ederim. O olmasaydı asla başaramazdım !

Deneysel çalışmalarına katkılarından ve desteklerinden dolayı beni asla geri çevirmeyen sevgili hocam sayın Uzm. Yelda Zencir' e teşekkür ederim. Tez çalışmalarım boyunca, çekinmeden yardım isteyebildiğim beni asla geri çevirmeyen sayın Doç. Dr. Ceyda Dudak Şeker başta olmak üzere tüm öğrencilerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tezin önemli bir bölümünde bilgilerine başvurduğum her danıştığında güleryüz ve sevecenliğiyle yardımına koşan Nurdan Ersöz'e çok teşekkür ederim.

Tüm öğrencilik hayatım başta olmak üzere bu yolda ve tüm hayatımda beni her zaman motive eden ve bırakmama asla müsaade etmeyen hayatımın her güzel anında ve her dara düştüğümde orada olduğunu bildiğim Fatma Çambay Kuban, Anıl Kuban, Leyla Elif Ataç ve Esra Nazlı'ya varlıkları için sonsuz teşekkürler.

Benimle birlikte adeta bir yüksek lisans bitiren, her dara düştüğümde orada olan elim gözüm kulağım ayağım olan desteklerini hep hissettiğim yüreğimin yürekleriyle bir

çarptığı, onların çocukları olduğum için şanslı hissettiğim anneme ve babama, ablası olmaktan gurur duyduğum kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yanımda, yanımda ne zaman istesem orada olan, hayatımın anlamı, en karanlık günlerde bana ışık tutan elimi asla bırakmayan, gerektiğinde benimle yürüyen, benimle sabahlayan, ben olan ve biz olduğumuz günlere şükür ettiğim, her zaman iyi ki dediğim hayattaki en büyük mucizem değerli eşim Ahmet Aslandağ'a sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Süt Proteinleri	3
2.1.1. Kazein.....	3
2.1.2. β -Lactoglobulin (BLG).....	5
2.2. Sütte Rennet Mekanizması.....	5
2.3. Isıl İşlemin Süt Proteinleri ve Rennet Mekanizmasına Etkileri	7
2.3.1. Isıl İşlemin Kazein Üzerine Etkisi.....	7
2.3.2. Isıl İşlemin β -Laktoglobulin Üzerine Etkisi.....	8
2.3.3. Isıl İşlemin Süt Proteinlerinin Etkileşimi ve Rennet Mekanizması Üzerine Etkisi.....	8
2.4. Polifenoller.....	10
2.4.1. Flavanoidler	10
Çizelge 2.2. Flavonoidlerin Alt Sınıfları ve Bazı Temsili Örnekler	11
2.4.2. Yeşil Çay Polifenolleri.....	14
2.5. Polifenoller İle Proteinlerinin Etkileşimleri	17
2.5.1. Yeşil Çay Polifenolleri İle Süt Proteinlerinin Etkileşimleri	18
2.5.2 Yeşil Çay Polifenolleri İle Süt Proteinlerinin Etkileşimlerinin Rennetlenme Sürecine Olan Etkileri	19
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	21

3.1. MATERYAL.....	21
3.2. METOT.....	21
3.2.1. Koagülasyon Denemeleri	21
3.2.4. Bradford Yöntemi.....	22
3.2.5. KMP (Kazeinomakropeptit) Analizi	22
3.2.6. Dairesel Dikroizm (CD) Spektrofotometresi.....	23
3.2.7. Poliakrilamid Jel Elektroforez(Native-PAGE).....	24
3.2.8. Tekstür Parametre Belirleme Çalışmaları.....	24
3.2.9. Su Tutma Kapasitesi Analizleri.....	25
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	26
4.1. YÇE ilavesinin sütün rennet ile koagülasyon sürecine etkisi.....	26
4.2. YÇE ilavesinin Kazeinomakropeptit (KMP) oluşumuna etkisi.....	28
4.3. Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi	31
4.4. Poliakrilamid Jel Elektroforezi Analizi (Native Page).....	37
4.4.1. Süt Örneklerinin Native Page Analizi	37
4.5. Tekstür Analizi	42
4.6. Su Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi.....	44
5. YORUM.....	47
6. KAYNAKLAR	50
EKLER.....	56
EK 1 –Kullanılan Süt örneklerinin Genel Bileşimi.....	56
EK 2 –Kullanılan Yeşil Çay Ekstraktının Fenolik İçeriği (1000 ppm derişimde hazırlanan YÇE’de bulunan flavonoid derişimleri).....	56
EK 3 – Etik Kurul İzin Belgesi.....	Error! Bookmark not defined.
EK 6 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	57
ÖZGEÇMİŞ	Error! Bookmark not defined.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil: 2.1. Kazeinin misel yapısı.....	4
Şekil 2.2. Sütün rennet ile pıhtılaşmasında kazein misel yapısının değişimi.....	6
Şekil 2.3. Isıl işlemin etkisiyle kazein miselleri ve BLG arasındaki interaksiyonun şematik gösterimi.....	9
Şekil: 2.4. Flavanooidlerin genel kimyasal yapısı.....	11
Şekil: 2.5. Flavonollerin genel kimyasal yapısı.....	12
Şekil: 2.6. Flavonların genel kimyasal yapısı.....	13
Şekil: 2.7. İzoflavonların genel kimyasal yapısı.....	13
Şekil: 2.8. Flavononların genel kimyasal yapısı.....	14
Şekil:2.9. Antosiyanidinlerin genel kimyasal yapısı.....	14
Şekil: 2.10. Flavanollerin genel kimyasal yapısı.....	15
Şekil: 2.11. Kateşinlerin genel kimyasal yapısı.....	15
Şekil: 2.12. (+) Kateşin.....	16
Şekil: 2.13. (-) Epikateşin.....	16
Şekil: 2.14. (-) Epigallokateşin.....	16
Şekil: 2.15. (-) Epikateşin Gallat.....	17
Şekil: 2.16. (-) Epigallokateşin Gallat.....	17
Şekil 4.1. Çiğ süt için koagülasyon süreci boyunca protein miktarındaki (mg/ml) değişim.....	28
Şekil 4.2. 65 °C/30 dk ısıl işlem uygulanmış süt için koagülasyon süreci boyunca protein miktarındaki (mg/ml) değişim.....	28
Şekil 4 3. 85 °C/30dk ısıl işlem uygulanmış süt için koagülasyon süreci boyunca protein miktarındaki (mg/ml) değişim.....	29
Şekil 4.4. Çiğ süt örnekleri için süreye bağlı KMP oluşum miktarı.....	31

Şekil 4.5. 65 °C’de ısıt işlem uygulanmış süt örnekleri için süreye bağlı KMP oluşum miktarı.....	31
Şekil 4.6. 85 °C’de ısıt işlem uygulanmış süt örnekleri için süreye bağlı KMP oluşum miktarı.....	32
Şekil 4.7: Farklı ısıt işlem normları uygulanmış (ısıt işlem uygulanmamış, 65C/30Dk, 85C/30 dk) BLG (10µM)’e ait uzak görünür bölge CD-spektrumları.....	34
Şekil 4.8: Farklı ısıt işlem normları uygulanmış (ısıt işlem uygulanmamış, 65C/30Dk, 85C/30 dk) BLG(10µM)-YÇE(10 ppm) kompleksine ait uzak görünür bölge CD-spektrumlar.....	34
Şekil 4.9: Farklı ısıt işlem normları uygulanmış (ısıt işlem uygulanmamış, 65C/30Dk, 85C/30 dk) BLG (10µM)-YÇE(50 ppm) kompleksine ait uzak görünür bölge CD spektrumları.....	35
Şekil 4.10: Farklı ısıt işlem normları uygulanmış (ısıt işlem uygulanmamış, 65C/30Dk, 85C/30 dk) BLG(100µM)’e ait yakın görünür bölge CD spektrumları.....	37
Şekil 4.11: Farklı ısıt işlem normları uygulanmış (ısıt işlem uygulanmamış, 65C/30Dk, 85C/30 dk) BLG(100µM)-YÇE(100ppm) kompleksine ait yakın görünür bölge CD spektrumları	37
Şekil 4.12: Farklı ısıt işlem normları uygulanmış (ısıt işlem uygulanmamış, 65C/30Dk, 85C/30 dk) BLG50µM)-KCN(50µM) kompleksine ait yakın görünür bölge CD spektrumları	37
Şekil 4.13: Farklı ısıt işlem normları uygulanmış (ısıt işlem uygulanmamış, 65C/30Dk, 85C/30 dk) BLG50µM)-KCN(50µM)-YÇE(100ppm) kompleksine ait yakın görünür bölge CD spektrumları	38
Şekil 4.14. Süt örneklerine ait Native-PAGE görüntüsü.....	40
Şekil 4.15. Model Sistemlerde BLG ‘e ait Native Page Görüntüsü.....	42
Şekil 4.16. Model Sistemlerde BLG-KCN kompleksine ait Native Page görüntüsü.....	43
Şekil 4.17. Süt örneklerinden hazırlanan rennet jellerinin sertlik (hardness) değerleri....	45

Şekil 4.18. Süt örneklerinden hazırlanan rennet jellerinin su tutma kapasiteleri.....47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Sütte bulunan temel kazein fraksiyonları.....	3
Çizelge 2.2. Flavonoidlerin alt sınıfları ve bazı temsili örnekler.....	12
Çizelge 4.1. Süt örneklerine ait koagülasyon süreleri.....	30
Çizelge 4.3. Beta laktoglobüline ait ikincil yapı elementlerinin miktarları.....	35

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

YÇE	Yeşil çay ekstraktı
BLG	Betalaktoglobulin
CN	Kazein
KCN	Kappakazein
KMP	Kazeinomakropeptid
RC	Çiğ süt kontrol örneği
RY	Yeşil çay ilaveli çiğ süt örneği
65C	65 °C'de 30 dk ısı işlem uygulanmış süt kontrol örneği
65Y	65 °C'de 30 dk ısı işlem uygulanmış yeşil çay ilaveli süt örneği
85C	85 °C'de 30 dk ısı işlem uygulanmış süt kontrol örneği
85Y	85 °C'de 30 dk ısı işlem uygulanmış yeşil çay ilaveli süt örneği
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi

1. GİRİŞ

Fenolik bileşikler yaklaşık 4000 yıldır insan diyetinde yer almaya devam etmektedir ve insan sağlığı üzerine olumlu etkileri nedeni artan bir ilgi ile araştırılmaya devam edilmektedir. Gıda polifenollerinin sağlık üzerine etkilerinin; nörodejeneratif, kalp-damar hastalıkları ve kanseri de içeren yaygın kronik hastalıkların kökeniyle ilişkilendirilen serbest radikallerin oluşumu ve oksidasyonun önüne geçen, radikal sönmöndirici ve antioksidan karakterlerinden kaynaklandığı ortaya konulmaktadır. Fenolik bileşiklerin, fonksiyonel gıda üretiminde kullanılması ya da taşıyıcı ajanlar vasıtası ile vücuda alımı konusunda çalışmalar giderek yoğunlaşmaktadır. Polifenollerin insan vücudundaki metabolizması, biyoyararlanımı ve insan sağlığı üzerine etkilerinin giderek artan bir merakla incelenmesinin yanısıra, gıda teknolojisi açısından değerlendirildiğinde, bu bileşiklerin kompleks gıda matrisi içindeki etkileşimlerinin değerlendirilmesi de önem taşımaktadır. Bu anlamda, gerek besleyici nitelikleri ile gerekse de yüksek miktarda tüketilmesi nedeniyle süt ürünlerinin, fenolik bileşikler ile zenginleştirilerek üretimi konusunda yapılan çalışmalar önem kazanmaktadır. Bu çalışmaların çoğu, polifenol ilavesi ile artan antioksidatif özelliklerin belirlenmesi konusunda yoğunlaşmış durumdadır. Ancak bilindiği gibi, polifenollerin başta proteinler olmak üzere diğer gıda bileşenleri ile etkileşimi, gıdanın fizikokimyasal, tekstürel ve fonksiyonel özelliklerinde değişime yol açabilmektedir.

Sütte bulunan proteinlerin kolloidal kararlılığını yitirmesi peynir ve süt ürünleri üretiminin esas basamağı olarak bilinmektedir. Fenolik bileşikler ile zenginleştirilmiş peynir üretiminde proses parametreleri ve son ürün özelliklerini belirlemek için bu bileşiklerin koagülasyon sürecine etkisinin bilinmesinin önemli olduğu düşünülmektedir. Isıl işlem sonucu denatüre olan serum proteinlerinin kazeinler ile etkileşimleri, sütün rennet ile koagülasyon sürecini yavaşlattığı ve jel özelliklerini zayıflattığı da bilinmektedir.

Bu tez kapsamında fonksiyonel peynir üretimi amacıyla ham maddeye eklenecek olan yeşil çay ekstraktının, polifenol-protein etkileşimleri üzerine yoğunlaşarak, sütün rennetle koagülasyon sürecine ve ısıl işlem ile indüklenen kazein-serum protein interaksiyonlarına, serum proteinlerin denatürasyon derecesine bağlı olarak hangi düzeyde etki ettiği belirlenmeye çalışılmıştır.

Yapılan alışma ile hem fenolik bileşiklerin peynir üretiminin temeli olan koagülasyon aşamasına etkisinin belirlenip fonksiyonel peynir üretimi için karşılaşılabilecek sonuçların değerlendirilerek literatürdeki bu eksikliğin giderilmeye çalışılması, hem de ısıl işlem ve serum proteinlerin denatürasyon düzeyinin protein-fenolik etkileşimleri ve dolaylı olarak protein-protein interaksiyonlarına etkisi konusunda literatüre katkıda bulunulması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Süt Proteinleri

Süt, dişi memeli hayvanlar tarafından yeni doğanın besleme gereksinimini karşılamak için salgılanan bir sıvıdır [1]. Süt içeriği yüzdesel olarak şu şekilde gösterilebilir; %87 su, %4 yağ %3,5 protein ve % 4,7 laktoz. Sütte bulunan proteinler 2 ana gruptan oluşur; kazeinler (α_1 , α_2 , β ve κ -kazeinler,) ve serum proteinleri.(β -laktoglobulin (BLG) ve α -laktalbumin) [2].

2.1.1. Kazein

Kazeinler (CN), doğada bulunan globüler ve fibroz yapılarına benzemeyen, serin kalıntıları ile esterleşmiş fosfoproteinlerdir. Sütte ortalama 100 nm çapındaki koloidal partiküller şeklinde bulunurlar.[3]. Kazeinler aynı zamanda yoğurt peynir gibi süttten elde edilen fermente ürünlerin oluşmasında önemli rol oynamaktadır.

Çizelge 2.1. Sütte bulunan temel kazein fraksiyonları

Fraksiyon	% (toplam proteinler içindeki % değerleri)
α_{s1} –kazein	37
α_{s2} –kazein	10
β -kazein	35
κ -kazein	12

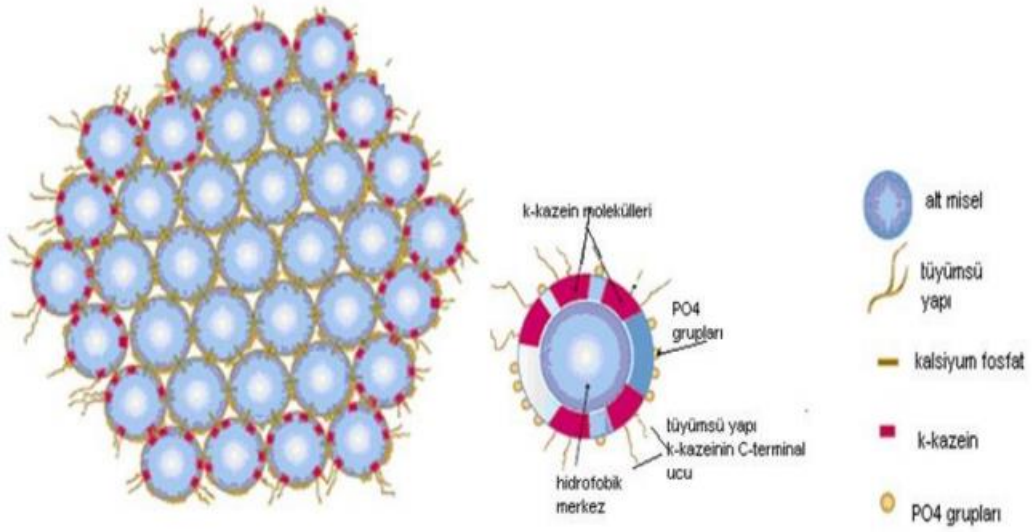
Yapısında üç tane hidrofobik alan bulunmaktadır. α_{s2} -kazein karboksil-ucundaki pozitif yükler ve amin-ucundaki negatif yükler sebebi ile dipolardır. α_{s2} -kazein en hidrofilik olan kazein grubudur. Yüksek fosforilasyon içeriğine ve düşük prolin aminoasiti miktarına sahip olup diğerlerine nazaran pH ve iyonik dirence oldukça duyarlıdır. β -kazein, toplam kazeinin %30-35'ini oluşturmakla beraber en hidrofobik kazein grubudur. β -kazeinin yapısındaki prolin kalıntıları, α -heliks yapının oluşumunu önler. κ -kazein (KCN), koloidal misel yapının korunmasından sorumludur ve sistein içeren tek kazein grubudur. Karboksil ucunda karbonhidrat kalıntısı içerdiğinden diğer kazeinlerden farklıdır [4].

Kazeinler , koloidal sütte yaklaşık 20-600 nm çapında koloidal olarak stabil yapılar olan kazein miselleri formunda bulunurlar [2]. Kazein miselleri, kazein alt miselleri (sub-miseller) olarak adlandırılan alt yapılardan oluşmaktadır ve bunlarının boyutlarını birden çok etkene bağlı olarak değiştirebildiği rapor edilmiştir (protein derişimi, pH, iyonik kuvvet ve sıcaklık) [5].

α - ve β -kazeinler esas olarak miselin hidrofobik iç kısmında yoğunlaşırken, KCN yüzeyde baskındır. KCN üçte ikisi olan azot ucu hidrofobik iken, üçte biri olan karbon

ucu güçlü derecede hidrofildir. Bu özelliği kazein stabilitesine etkili olup süt ürünlerinin tekstür tat gibi duyu özelliklerine katkıda bulunur.

Misel oluşumunda; Kolloidal kalsiyum fosfat demetiyle submiseller toplanarak kazein misellerini oluştururlar. Submiseller kalsiyum-fosfat bağları ile hidrofobik ve hidrojen bağlarının sayesinde birarada bulunmaktadır. Kazein misel yapısı sabit değil, dinamikdir. Yani, kazein miseli ve bileşenleri ortam, sıcaklık, pH ve basınçtaki değişimlere cevap verir ve bu değişimler oldukça belirgindir [6].



Şekil: 2.1. Kazeinin misel yapısı [5]

Kazein ısıya karşı stabildir. Kazeinin ısı stabilitesinde; α -heliks bağlarının az olması, sistein aminoasidinin bulunmaması ve sistin aminoasidinin az bulunması rol oynar.

Kazeinin karakteristik özelliği, agregasyon yeteneğidir. Kazein moleküllerinin karmaşık doğası ve misellerin varlığı nedeniyle gerçekleşebilen agregasyon birçok farklı ajandan kaynaklanabilir.

Izo-elektrik nokta kazeinlerin çözünebilirliğinin en düşük olduğu ve pH'ın 4.2-4.7 aralığında olduğu noktadır. Misel yapısındaki bu değişiklik misellerin yaklaşarak bir araya gelmesine ve az ya da çok yoğun pıhtılar oluşturmaya sebep olur [6].

Ortama yüksek miktarda bazik olan sodyum hidroksit eklenirse, asitle çöktürülen kazein proteini yeniden çözünür. Meydana gelen sodyum kazeinat çoğunlukla emülgatör özelliğinden dolayı gıda bileşeni olarak kullanılır. Ancak ilk etapda doğal olarak var olan misel yapısı hidroksit eklenerek tekrardan sağlanamaz. [6].

2.1.2. β -Lactoglobulin (BLG)

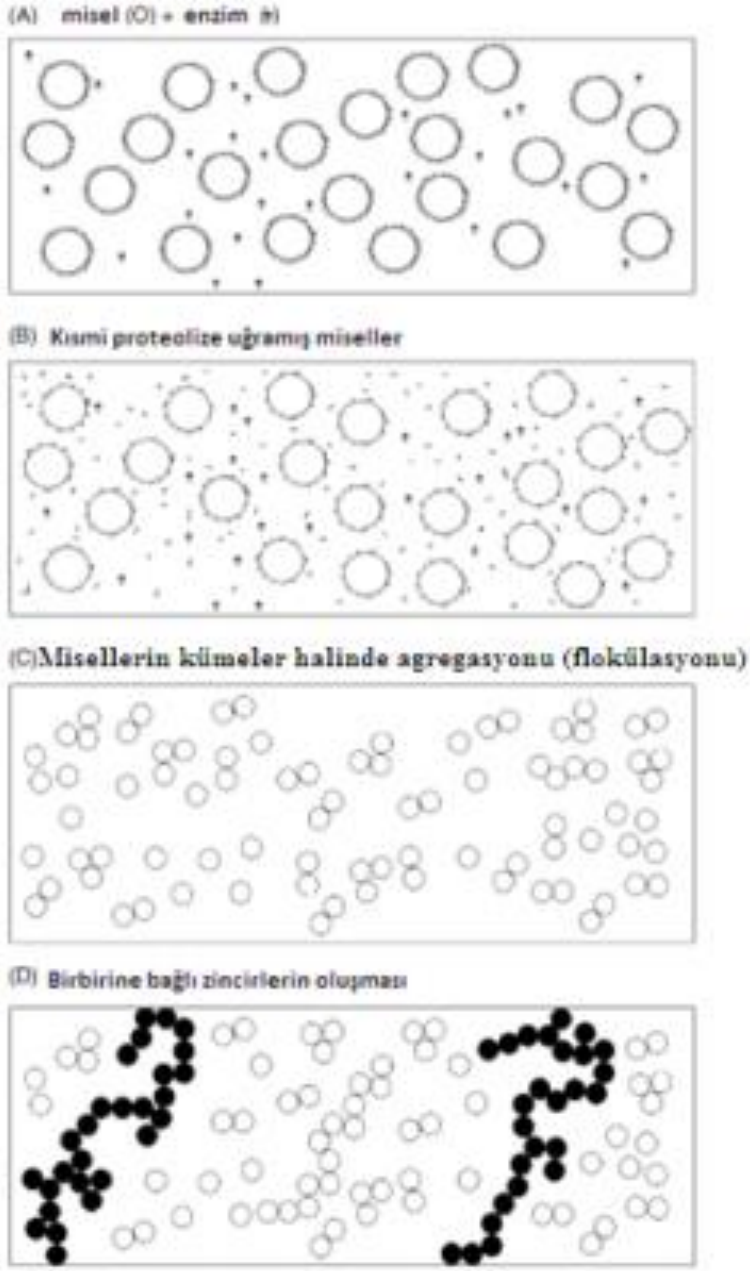
Serum proteinleri, β -laktoglobülin (BLG; dominant peynir altı suyu proteini fraksiyonu, ~ 50 g / 100 g toplam protein), α -laktalbümin (α -lak; 20 g / 100 g toplam protein), sığır serumalbümin (BSA; ~ 6 g / 100 g toplam protein), immünoglobulinler (Ig; ~ 3 g / 100 g toplam protein) ve diğer çeşitli proteinlerden oluşmaktadır [1].

BLG 162 amino asitten oluşan bir globular proteindir ve molekül ağırlığı 18 kDA 'dur. Yapısında birincil, ikincil, üçüncül ve kuaterner yapılar bulunur. BLG 'nin üçüncül yapısı BLG denatürasyonunun tersine çevrilebilirliğinde önemli bir rol oynar. Bu yapı iki disülfür bağıyla (Cys66 – Cys160 ve Cys106 – Cys119) güçlü bir şekilde stabilize edilir [7].

BLG; 162 aminoasit kalıntısı ile katlanmış bir yapıya sahiptir. Bu yapı dış yüzeyde alfa helixle çevrili bir beta pilili şeklindedir. Bu yapısından dolayı yapıda merkezi bir boşluk bulunur. Merkezi olan bu boşluk bir kalikstir. BLG hidrofobik moleküller için iki bağlanma yerine sahiptir, biri kaliksin içinde ve diğeri dimer arayüzünde yer alır [8]. BLG; vitaminler, yağ asitleri ve diğer birkaç ligandı bağlama kapasitesi nedeniyle gıda ve ilaç endüstrilerinde oldukça kullanılmaktadır

2.2. Sütte Rennet Mekanizması

Sütün enzimle, yani rennet ile pıhtılaşması iki bölümde gerçekleşir. Bunlar; enzimatik aşama ve agregasyon (kümeleşme veya flokülasyon) aşamasıdır.



Şekil 2.2. Sütün rennet ile pıhtılaşmasında kazein misel yapısının değişimi [9]

Enzimatik kısımda KCN, asit proteazlar (rennin) tarafından gerçekleştirilen proteoliz işlemi ile Phe₁₀₅-Met₁₀₆ bağından koparak para- κ -kazein ve kazeinomakropeptit (KMP) (glikomakropeptit) olarak ayrılır.. Bunlardan para- κ -kazein oldukça hidrofobik olup miseller üzerinde tutulur. Kazeinomakropeptit (KMP) ise, hidrofilik olup, misellerden ayrılarak seruma geçer. Bu durum, KCN'in misel stabilitesi üzerindeki koruyucu etkisinin kaybolmasına ve pıhtılaşma için bir zeminin oluşmasına neden olur [10].

Misellerdeki KCN enzimle parçalandıktan sonra, stabiliteleri bozmuş kazein miselleri, kalsiyum varlığında, birbirleriyle birleşerek gözle görülebilir flokülleler oluştururlar. Bu bir agregasyon (kümeleşme) olayıdır. Bu reaksiyon, yani agregasyon aşaması süte uygulanan ısı işleme çok bağımlıdır. Süte uygulanan ısı işlem de serum proteinlerinin denatürasyonuna, sütün kolloidal yapısındaki değişmelere neden olduğu için, misellerin agregasyonunda etkili olmaktadır [11].

BLG, KCN interaksiyonuna neden olacak seviyedeki ısı işlem, enzim bağlanmasını güçleştirmektedir. [11]. Kümeleşen kazein miselleri birleşmeye devam ederek daha büyük partikülleri bir başka deyişle protein jelini oluşturur. Bu aşamaya agregasyon (kümeleşme) aşaması denir.

Kazein misellerinin agregasyonunda hidrofobik etkileşimler, van der Waals etkileşimleri, elektrostatik etkileşimler ile özellikle para -κ -kazein misellerinin bir araya gelmesi durumu büyük rol oynamaktadır [11].

Kazein misellerinin agregasyonu; enzim (kimozin) derişimi, kazein derişimi, ortamın pH'ı, sıcaklık ve kalsiyum iyonu (Ca⁺⁺)derişimine bağılıdır.

2.3. Isıl İşlemin Süt Proteinleri ve Rennet Mekanizmasına Etkileri

2.3.1. Isıl İşlemin Kazein Üzerine Etkisi

Kazein ve serum proteinlerinin ısıya karşı gösterdikleri duyarlılık birbirinden farklıdır. Kazeinler ısıya karşı oldukça dirençlidirler. Bunun nedeni yapısında yer alan prolin aminoasidinin protein agregasyonu için gerekli olan hidrojen bağlarının oluşumunu önlemesidir. Kazeindeki değişimler 100 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda meydana gelmektedir.

Kazeinin ikincil ve üçüncül yapılarının yeterli düzeyde olmaması nedeniyle kazein normal pastörizasyon koşullarında (62-65 °C'de 30 dk: LTLT, 71-74 °C'de 40-45 sn HTST, 85-90 °C'de 8-15 sn) değişime uğramamaktadır. Sütün 80-150 °C arasındaki sıcaklıklarda ısıtılmasıyla kazeinde meydana gelen değişimler şu şekilde sıralanabilir [1];

- Kazein misellerinin agregasyonu ve disosiasyonu nedeniyle misel boyutlarının değişmesi.
- Misellerin zeta potansiyelinin ve hidrasyon düzeyinin değişmesi

- Kazeinin defosforilasyonu
- Kazeinin proteolizi
- Polimerizasyon

2.3.2. Isıl İşlemin β -Laktoglobulin Üzerine Etkisi

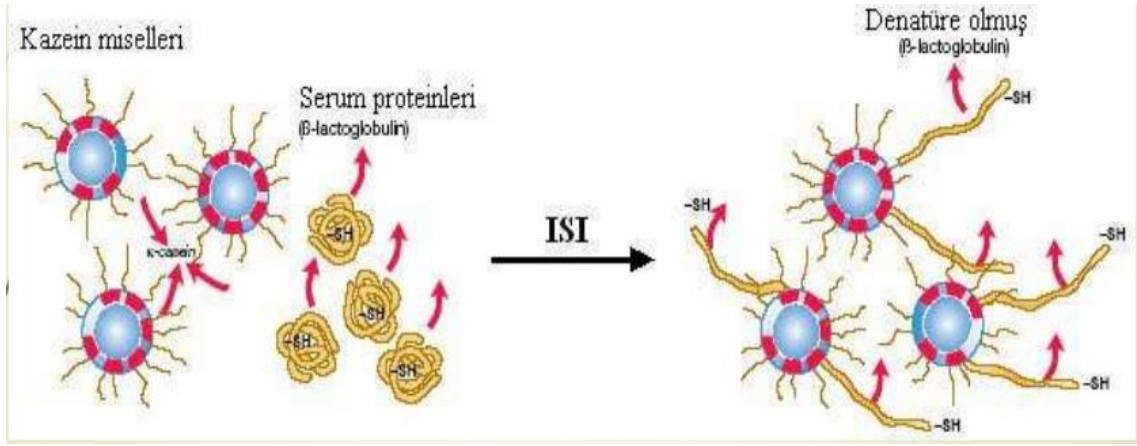
Serum proteinleri kazeinlere göre nispeten daha ısıya duyarlı proteinlerdir. Isıl işlemin şiddetine bağlı olarak değişen düzeylerde denatürasyona uğrarlar. Bunun nedeni; fosfor içermemeleri, kazeine kıyasla daha düşük prolin içermeleri, daha yüksek düzeyde sistin ve metiyonin aminoasiti bulundurmalarıdır. BLG'in yapısında serbest -SH grupları ve sistein de yüksek düzeyde bulunmaktadır [1].

BLG ısı ile denatürasyonu genellikle pH değerine bağlı bir değişim gösterir. BLG çoğunlukla pH değerindeki artışla birlikte düşük sıcaklık derecelerinde de denatürasyona uğrar. Serum proteinlerinin denatürasyon oranı uygulanan ısıl işlemin şiddetine bağlı değişim gösterir [12]. Örneğin; termizasyon (65 °C/15 saniye) gibi orta şiddetli ısıl işlem uygulamaları serum proteinlerinde herhangi bir denaturasyona yol açmamaktadır.

Denatürasyon ve agregasyon iki aşamalı bir süreçte ortaya çıkar; ilk aşamada denatürasyon 65 ° C'de globüler protein yığılmasını sağlarken, agregasyon (yani ikinci aşama), kompleksleri oluşturmak için denatüre edilmiş / katlanmamış moleküllerin bir araya gelmesine sebep olur. 70 ° C'yi aşan sıcaklıklarda, geri dönüşümsüz- kümelenme iki farklı tipte agregatın oluşumu ile ortaya çıkan, sülfidril (-SH) grup etkileşimi ve/ veya disülfid ara değişiminden kaynaklanan küçük agregatlar ve -SH gruplarını içermeyen, spesifik olmayan etkileşimlerinden oluşan büyük agregatlar meydana gelir [13].

2.3.3. Isıl İşlemin Süt Proteinlerinin Etkileşimi ve Rennet Mekanizması Üzerine Etkisi

80°C'nin üzerinde ısıl işlem uygulanan sütte denatüre serum proteinleri kazein miselleri ile kompleks oluşturabilir. Kompleks oluşumu esas olarak BLG ile KCN arasında gerçekleşmektedir. Kompleks oluşumu tiyol bloklama reaktifleri yani sülfhidril ve disülfür değişimleri sayesinde oluşur. Bu kompleks oluşumu pH, protein konsantrasyonu, ısı ve süt tuzlarının konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterebilir [12]. Ayrıca, UHT sterilizasyon işleminden sonra α s₂-kazeinin de BLG ile kompleks oluşturduğu belirlenmiştir. Denatüre serum proteinlerinin KCN ile kompleks oluşturmaları UHT yöntemiyle sterilizasyon sırasında sütün ısıl işleme karşı stabilitesinde artış sağlamaktadır [14].



Şekil 2.3. Isıl işlemin etkisiyle kazein miselleri ve BLG arasındaki interaksiyonun şematik gösterimi

Denatüre serum proteinleri ile kazein miselleri arasındaki interaksiyonun düzeyi ısı işlemin siddetine ve sütün iyonik bileşimine göre değişmektedir. Kalsiyum iyonları varlığında da kazein miselleri ile interaksiyona giren serum proteini oranı artmaktadır [5].

Süte uygulanan ısı işlemin peynir yapımında önemli rolü olan rennet mekanizmasına olan etkisiyle ilgili bir çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda elde edilen bulgular 70 ° C'yi aşan sıcaklıklarda denatüre olan serum proteinin rennet mekanizmasında önemli rolü olan kazein miselleri ile olan etkileşiminden kaynaklı peynirin bir çok özelliğinde farklılıklar meydana getirdiğini göstermiştir [5].

Yapılan bir çalışmada çiğ, pastörize edilmiş, sütlerin, beyaz peynir yapılması sırasında oluşan peynir sularında fiziksel ve kimyasal analizler yapılmıştır. Peynir suyu örneklerinin pH, titrasyon asitliği, özgül ağırlık ve yağ değerlerini, yağsız kuru madde değerini değiştirirken kuru madde, laktoz ve protein oranlarını değiştirmedeği saptanmıştır [15].

Bir başka araştırmada, inek sütü, koyun sütü bunların karışımlarına uygulanan farklı ısı işlemlerin, bu sütlerden elde edilen peynir mayası ile pıhtılaşma yetenekleri üzerine etkisi incelenmiştir. Bütün örneklerde, 72 ° C, 75 ° C ve 80 ° C uygulanan ısı işlemlerin sütlerin pıhtılaşma sürelerinde bariz uzamalara neden olduğu saptanmıştır. 65 ° C /30 dk. ile 70 ° C/10 dk.'lık ısı işlemlerin etkisi çok belirgin olmadığı görülmüştür. Bu sonucun, denatüre olmuş serum proteinlerinden kaynaklı olabileceği belirtilmiştir [16].

Denatüre serum proteinleri ile kazein miselleri arasındaki interaksiyonun süt teknolojisi açısından önemli rolü bulunmaktadır. Sütün rennetle pıhtılaşma yeteneğini ve pıhtı sıklığını etkileyen en önemli faktör; yüzeyi serum proteini ile kaplanan yeni kazein

misellerinin oluşumudur. Isıl işlem şiddetindeki artışla birlikte rennetle pıhtılaşma süresi uzamaktadır. Genellikle, pıhtılaşmanın flokulasyon fazının enzimatik faza göre ısıl işlemde daha çok etkilendiği kabul edilmektedir [11]. Kazein misellerinin yüzeyindeki denatüre serum proteinleri, rennetin etkilediği misellerin agregasyonunu geciktirmekte ve böylece maya ile pıhtılaşma süresini uzatmaktadır. Denatüre serum proteinlerinin kazein misellerine tutunması, ağ şeklindeki jelin bütünlüğünü parçalayarak pıhtı sıkılığını da azaltabilmektedir. Denatüre serum proteinleri kazein misellerinin birbirlerine yaklaşmasını ve birbirleriyle temasını önleyerek çapraz bağların oluşumunu azalttığından gevşek bir ağ yapısı oluşmaktadır [11].

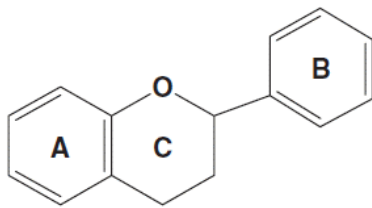
2.4. Polifenoller

Polifenoller, en az bir fenol grubuna sahip olan, bitkiye rengini veren, ikincil metabolitlerdir. Kimyasal yapılarına bağlı olarak polifenoller, fenolik asitler, flavonoidler, tanninler, kumarinler, lignanlar, kinonlar, stilbenler ve kurkuminoidler gibi farklı alt gruplara ayrılabilir [17].

Polifenoller temel olarak bitki aleminde ya serbest ya da bağlı bir biçimde bulunur. Serbest polifenollerin çoğu, bitkilerin hücre içi endoplazmik retikulumunda sentezlenir ve kofullarda depolanır. Bununla birlikte, bağlı fenolik bileşikler, çözünabilir polifenollerin hücre duvarına taşınmasıyla oluşurlar, bunlar daha sonra selüloz ve protein gibi hücre duvarı makromolekülleri ile ester ve glikozidik bağlar yoluyla konjuge edilir ve böylece hücre duvarı oluşumuna katkıda bulunur [18].

2.4.1. Flavonoidler

Flavonoidler, flavan çekirdeği ile karakterize edilen ve meyveler, sebzeler ve bitkilerden türetilmiş içeceklerde en yaygın bileşik sınıflarından birini temsil eden, doğal olarak oluşan polifenolik bileşikler grubudur. Flavonoid yapısına sahip 8000'den fazla bileşik tanımlanmıştır ve bunların çoğu çiçeklerin, meyvelerin ve yaprakların renklerinin oluşmasında görev alır [19].



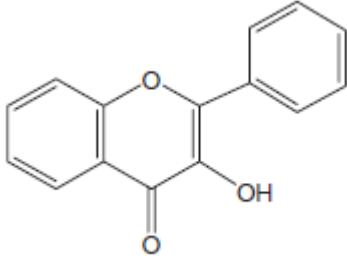
Şekil: 2.4. Flavonoidlerin Genel Kimyasal Yapısı

Flavonoidler, fenolik ve piron halkalarından oluşan benzo-piron türevleridir ve bu halkaların buldukları yere göre sınıflandırılır. Flavonoidlerin çoğunda ortak olan yapısal bileşenler, bazik flavonoid iskeleti ve çok sayıda hidroksil ve metoksil grubunun çeşitli kombinasyonlarını içerir. Flavonoidler, hidroksil, metoksil ve glikozidik yan grupların düzenlemelerinde ve A- ve B- halkaları arasındaki konjugasyonda farklılık gösterir. Spesifik yapısal farklılıklara dayanarak, flavonoidler altı ana sınıfa ayrılır: flavonoller, flavonlar, flavanonlar, flavanoller, antosiyanidinler ve izoflavonlar [20].

Çizelge 2.2. Flavonoidlerin Alt Sınıfları ve Bazı Temsili Örnekler

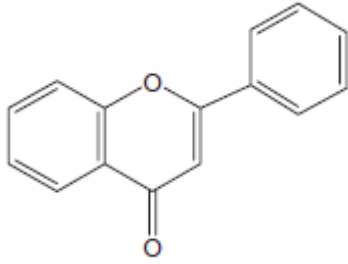
Flavonlar (Örn: kırmızı biber, tahıllar)	Flavonoller (Örn: siyah çay, üzüm)	Flavanonlar (Örn:Narenciye,nane)	Flavanoller (Örn: Yeşil çay, kakao)	Antosiyanidin (Örn:vişne, kiraz, çilek)	İzoflavonlar (Örnbakla vb. taneler)
Chryisin	Quersetin	Naringenin	Kateşin	Siyanidin	Genistein
Apigenin	Rutin	Eriodiktol	Epikateşin	Delfinidin	Daidzein
Luteolin	Kaempferol	Hesperidin	Epikateşin Gallat	Peonidin	Glisitein
	Rhamnetin		Epigallokateşin	Malvidin	
			Epigallokateşin Gallat		

Flavonoller: Flavonoller, mantarlar ve algler hariç, bitkilerde yaygın olarak bulunurlar. En yaygın flavonoller, kaempferol, kersetin, isorhamnetin ve mirisetin, tipik olarak 5, 7, 3, 4, 4' ve 5 pozisyonlarında oluşan konjugasyonlu glikozitler olarak bulunur. Yaygın olarak tüketilen meyvelerin, sebzelerin ve içeceklerin, muhtemelen yerel yetiştirme koşulları, mevsimsel değişimler ve çeşitlilik farklılıklarına bağlı olarak, benzer şekilde benzer ürünlerde bulunan miktarlarda büyük farklılıklar içeren flavonol içerikleri vardır. Sarı ve kırmızı soğanlar, özellikle yüksek konsantrasyonlarda kuersetin-4'-O-glukozit ve kuersetin-3,4'-O-diglukozit içeren zengin flavonol kaynağıdır. Disakkarit kuersetin-3-O-rutinosid yaygın bir diyet bileşenidir [21].



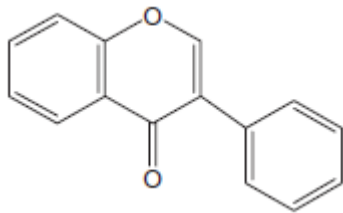
Şekil: 2.5. Flavonollerin Genel Kimyasal Yapısı

Flavonlar: Maydonoz gibi bazı bitkilerde önemli miktarlarda tespit edilmelerine rağmen, yayın olarak bulunan flavonoidlerden değildir. Apigenin, luteolin, baicelein ve wogonin gibi flavonlar, 3. karbondaki oksijeni dışında flavonollerle benzer kimyasal yapıdadırlar [21].



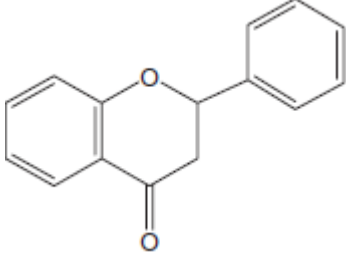
Şekil: 2.6. Flavonların Genel Kimyasal Yapısı

İzoflavonlar: İzoflavonlar , önemli miktarlarda baklagillerde bulunurlar. Fermente soya ürünleri, glikozitlerin hidrolizi sonucu izoflavonlar bakımından zengin olabilirken, soya sütü ve tofu gibi ısıt işlem gören ürünler az miktarda içerirler. Östrojene olan yapısal benzerlikleri nedeniyle, izoflavonlar, esas olarak tahıl taneleri içinde yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıkan farklı bir grup bileşik olan nonflavonoid liganlar gibi fitoöstrojenler olarak sınıflandırılır [21].



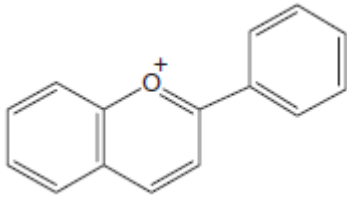
Şekil: 2.7. İzoflavonların Genel Kimyasal Yapısı

Flavononlar: Naringenin ve hesperetin gibi flavanonlar, $\Delta^{2,3}$ çift bağı eksikliği ve C-2'de kiral bir merkezin varlığı ile karakterize edilir. Flavanonlar hidroksillenmiş, glikozile ve O- metillenmiş türevler olarak ortaya çıkar. Turunçgillerde yüksek miktarlarda bulunurlar [21].



Şekil: 2.8. Flavononların Genel Kimyasal Yapısı

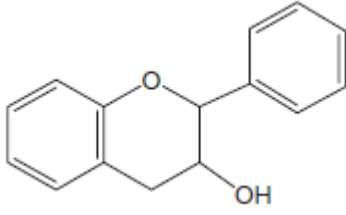
Antosiyanidinler: En yaygın antosiyanidinlere, şeker ve organik asitlerle konjugat oluşturan, kırmızıdan maviye renk aralıklarında bulunan pelargodin, siyanidin, delfinidin, peonidin, petunidin ve malvinidin örnek verilebilir. Meyve ve çiçeklerde yaygın olarak bulunurlar [21].



Şekil: 2.9. Antosiyanidinlerin Genel Kimyasal Yapısı

Flavanoller: Bunlar, basit monomerlerden, yoğunlaştırılmış tanenler olarak da bilinen oligomerik ve polimerik proantosiyanidinlere kadar uzanan, flavonoidlerin en karmaşık alt sınıfıdır. Monomerik flavan-3-ol'ün C2 ve C3'teki iki kiral merkez, (+) kateşin ve (-) epikateşin olmak üzere her bir B-halkalı hidroksilasyon seviyesi için dört izomer üretir. (-) epiafzelechin gibi diğerleri daha sınırlı bir dağılıma sahipken, doğada yaygındır. Yeşil çay (*Camellia sinensis*) ana bileşenleri (-) epigallocatechin, (-) epigallocatechin-3-O-gallate ve (-) epicatechin-3-O-gallate olan çok yüksek seviyelerde flavan-3-ol monomerleri içerir. Bu flavan-3-ol'ların seviyeleri, yeşil yaprakların fermantasyonu

sırasında, polifenol oksidaz enziminin etkisiyle siyah çayın üretilmesi sırasında azalmaktadır [21].

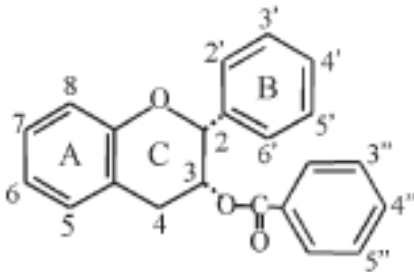


Şekil: 2.10. Flavanollerin Genel Kimyasal Yapısı

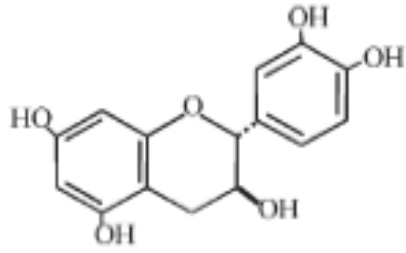
2.4.2. Yeşil Çay Polifenolleri

Camellia sinensis bitkisinin kurutulmuş yaprakları olan çay, dünya çapında tüketilen popüler bir içecektir. Oksidasyon seviyesine bağlı olarak yeşil çay (oksidlenmemiş), oolong çayı (kısmen oksitlenmiş) ve siyah çay (oksidlenmiş) olmak üzere üç türe ayrılabilir. Yeşil çay, kateşinlerin enzimatik oksidasyonunu önlemek için taze yapraklarda bulunan polifenol oksidaz enziminin hem halka şeklinde hem de buharla inaktive edilmesiyle üretilmiştir.

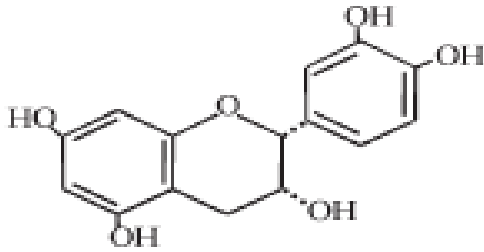
Yeşil çay, yeşil çay kateşinleri olarak bilinen bir polifenol antioksidan kaynağıdır. Yeşil çayın önemli kateşinleri (-) epikateşin (EC), (-) epikateşin-3-galat (ECG), (-) epigallokateşin (EGC) ve (-) epigallokateşin-3-gallattır (EGCG). Yeşil çayda, kateşinler toplam flavonoidlerin % 80-90'ını ve flavonollerin % 10'unu temsil eder [19].



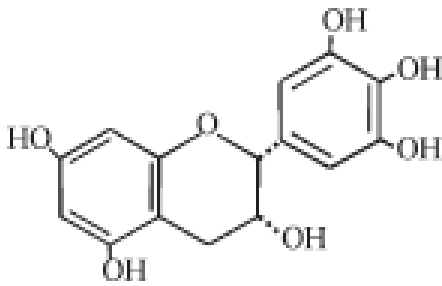
Şekil: 2.11. Kateşinlerin Genel Kimyasal Yapısı



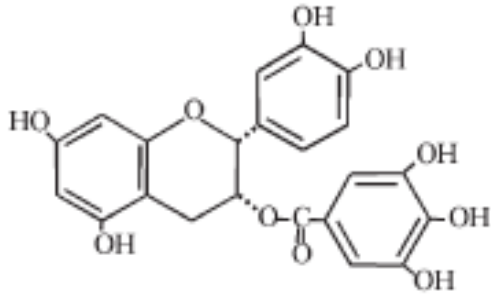
Şekil: 2.12. (+) Kateşin



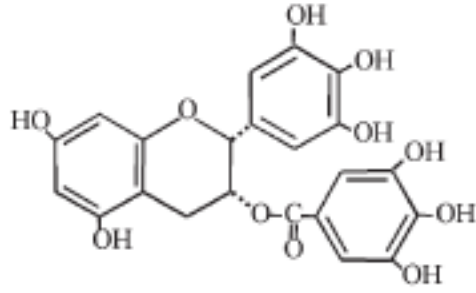
Şekil: 2.13. (-) Epikateşin



Şekil: 2.14. (-) Epigallokateşin



Şekil: 2.15. (-) Epikateşin Gallat



Şekil: 2.16. (-) Epigallokateşin Gallat

Biyomoleküller oksidatif hasar, kardiyovasküler hastalıklar, kanserler ve nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere bir dizi kronik hastalığın patolojisinde rol oynamaktadır. Yeşil çaydaki kateşinlerin ve diğer polifenolik bileşiklerin bilinen in vitro antioksidan özellikleri, yeşil çay tüketiminin potansiyel sağlık yararlarına büyük ilgi uyandırmıştır. Çok sayıda epidemiyolojik çalışma, yeşil çay tüketimi ile insanlarda kardiyovasküler hastalıklar ve kanser arasındaki ilişkileri ele almıştır.

Yeşil çay kateşinlerinin antioksidan özelliklerini kanıtlayan pek çok çalışma mevcuttur. Bunlardan birinde Yeşil çay kateşinleri ve polifenollerin bir dizi in vitro sistemde serbest radikallerin etkili temizleyicileri olduğu bulunmuştur. Bir bileşiğin bir serbest radikal süpürücü olarak hareket etme yeteneği, kısmen, hidrojen veya elektron vericileri olarak antioksidanların reaktivitesinin bir ölçüsü olan tek elektron indirgeme potansiyeli ile

ilgilidir. Daha düşük bir indirgeme potansiyeli, hidrojen veya elektron bağı için daha düşük enerji gerektiğini ve antioksidan aktiviteyi belirlemede bir faktör olduğunu gösterir. EGCG ve EGC, E vitamininden daha düşük indirgeme potansiyeline sahiptir bu da E vitamininden daha üstün elektron vericileri olduklarını düşündürmektedir [22].

2.5. Polifenoller İle Proteinlerinin Etkileşimleri

Polifenollerin bağlanma ve afinitesi birkaç faktöre bağlı olsa da, olası mekanizmalar, tersinir (kovalent olmayan) veya tersinmez (kovalent) bağlanmaya yol açan etkileşimleri içerir. Hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler ve van der Waals ilgi alanları gibi kovalent olmayan etkileşimler, görece daha sık görülen tersinir protein-polifenol bağlanmasında rol oynar [23].

Geri dönüşümsüz etkileşimler, nükleofilik gruplar olarak $-NH_2$ ve $-SH$ gibi gruplar ile reaksiyona giren, o-kinonların enzimatik ya da termal oksidasyon ile spesifik koşullar altında oluşan kovalent bağları kapsamaktadır. Hidrojen bağları, azot veya oksijenin elektronegatif atomları, özellikle proteinlerin amino ($-NH_2$) ve hidroksil ($-OH$) grupları ve komşu polifenol moleküllerinin pozitif yüklü hidrojen atomu arasında, proteinlerin ve polar olmayan aromatik amino asitlerin arasında oluşur.

Polifenollerin aromatik halkaları, hidrofobik etkileşimler yoluyla etkileşebilmektedir. Kovalent bağlarla karşılaştırıldığında daha yaygın olan kovalent olmayan protein-polifenol etkileşimleri, genellikle farklı tür etkileşimlerin kombinasyonundan kaynaklanırken, bazı durumlarda, bir tür çekim, bağlama reaksiyonunu domine eder [23].

Polifenollerin esnekliği de belirleyici faktördür; daha az esnek polifenoller bazı proteinlere daha güçlü ve diğerlerine daha zayıf bağlanırken, daha esnek polifenoller çeşitli proteinlere eşit şekilde bağlanır [24].

Yapılan bir araştırmada bir polifenol olan resveratrol ile BLG arasındaki interaksiyona bakılmış ve polifenolün proteinin ikincil yapısına etki göstermediği, ancak üçüncül yapısında yer yer etkileşimler oluşturarak BLG ile kompleks haline geldiği belirtilmiştir [25].

Başka bir çalışmada serum albüminleri ile resveratrol bileşiminin hidrofobik ya da hidrofilik olarak olmuş olabileceği sekonder yapıda değişime neden olabileceği ve katlanmalara (folding) sebep olduğu belirtilmiştir [26].

Serum albüminleri gibi polifenoller ile bağ oluşturabilen kazeinlerin; kazein-polifenol ve/veya kazein-polifenol-kazein bağlanmaları ile , peynir jeli veya yoğurt gibi süt ürünlerinin su tutma kapasitesini etkileyebileceği öne sürülmüştür [27].

Polifenoller, etkileşime girdikleri proteinlerin yapısını ve çeşitli özelliklerini etkileyebilir. Amino asitlerle etkileşime giren polifenoller protein yapısında değişikliklere neden olabilir ve işlevlerini etkileyebilir. Dahası, polifenoller proteinlere esansiyel amino asitleri bloke edecek şekilde bağlanabilir ve böylece biyoyararlanımlarını azaltabilir. [24].

Yeşil çay flavanoidleri başta olmak üzere polifenollerin diğer tür moleküllerle etkileşim halinde oldukları bilinmektedir ve bu konuda bir çok araştırma yapılmaktadır. Proteinler ve lipidler gibi insan vücudunda bulunan bazı biyomoleküller ile polifenollerin arasında etkileşimler bulunur [28]. Fakat protein ve polifenol etkileşiminin tam olarak anlaşılması hala eksiktir. Yeşil çay polifenollerinin sığır ve insan kaynaklı serum albümini de dahil olmak üzere farklı proteinlerle etkileşime girdiği bildirilmiştir [29]. Pirinç gluteninin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG) ile etkileşime girdiği ve glutenin fizikokimyasal özelliklerini önemli ölçüde etkileyebilecek kompleksler oluşturduğu raporlanmıştır [30]. Protein ve polifenol etkileşimi, fizyolojik koşullar altında konformasyonel değişikliklere neden olan mevcut polifenol bilgilerine katkı sağlamaktadır. Bu araştırmalar polifenollerin gıda teknolojisinde kullanılabilmesi hakkında fikir vermektedir.

2.5.1. Yeşil Çay Polifenolleri İle Süt Proteinlerinin Etkileşimleri

Süt proteinleri, insan beslenmesindeki önemi ve sütlü çay veya kahve içmek gibi bazı beslenme alışkanlıkları nedeniyle polifenol bağlama çalışmalarında özel ilgi kazanmıştır. Bir dizi çalışma, süt proteinleri ile fenolik bileşikler arasındaki etkileşimlerin proteinlerin yapısını, stabilitesini, sindirilebilirliğini ve fonksiyonel özelliklerini ve fenoliklerin antioksidatif özelliklerini ve biyoyararlanımını değiştirebileceğini ortaya koymaktadır [30].

Yapılan bir çalışma [31], olgunlaşma sırasında en önemli ve karmaşık biyokimyasal olay olan proteolizin, peynir sütüne GTE eklenmesinden olumsuz etkilendiğini belirtmiştir. Bu bulgular, fenolik bileşiklerden etkilenen sütün enzimatik pıhtılaşması ve peynirin olgunlaşması sırasında değişen proteolitik aktivitenin ürün özelliklerinde değişikliklere yol açabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan bir çalışmada kazeinlerle çay flavonoidlerinin etkileşiminde , hidrojen bağlarının oluşmasıyla birlikte ikincil yapıya sahip proteinlerin yapısında değişimler gözlemlendiği rapor edilmiştir [32].

Kanakis ve ark. [33] yeşilçay kateşinleri ile yaptıkları çalışmada BLG ile etkileşimde bulunan kateşinlerin bu etkileşime hidrofilik ve hidrofobik etkilerle dahil olduğunu bağlanma seviyesinin yapıdaki –OH grubu sayıca artınca arttığını belirtmiştir.

Serum albuminleri ile yapılan bir çalışmada yeşilçay polifenollerini ile etkileşimin, BLG'deki α -heliks yapıyı kuvvetlendirdiği, ancak β -pilili yapıların ise kararlılığını azalttığı rapor edilmiştir [34].

Antioksidan aktivite ile ilgili bir çalışmada süt proteinleri ile yeşil çay kateşinleri arasındaki etkileşimin antioksidan aktiviteyi artırdığı belirtilmiştir [35].

Stodajinovic ve ark. [36] ise yeşil çay, kahve ve kakao fenolikleri ile yaptığı çalışmada serum albüminleri ile olan etkileşimin, proteinin sindirimle parçalanabilirliğini azalttığını belirtmiştir.

2.5.2 Yeşil Çay Polifenollerini İle Süt Proteinlerinin Etkileşimlerinin Rennetlenme Sürecine Olan Etkileri

Peynir yapımı sürecinin ilk adımı olan enzim ile etkileşim , özellikle süt işlenmesinde önemli bir enzimatik pıhtılaşma aşamasını sağlar. Enzim jelasyonu , kısmen birbiri ile örtüşen iki aşamadan oluşur. İlk aşamada, rennet (kimozi) enzimatik etkisi, kazein misellerini destabilize ederken, ikinci aşamada, kazein miselleri kalsiyum varlığında bir araya gelerek protein ağı oluştururlar [37]. Yapılan bu çalışma, epigallokateşin gallat (EGCG) moleküllerinin, miselin formunda mevcut olduğu zaman kazein proteinleri ile kompleksler oluşturduğunu doğrulamıştır. Sonuçlar ayrıca, ilk kez, çay polifenollerinin varlığının, misellerin jelleşme özelliklerinde bir değişikliğe neden olduğunu göstermiştir. EGCG'nin konsantrasyonu arttıkça ve kazeinlerin doygunluğuna ulaşıldıkça, sütün yeniden rennetleme özelliklerinde daha önemli bir etki görülür. Yapılan çalışmada, EGCG'nin, k-kazein ile spesifik olarak etkileştiği ve kimozi substrat (kazein) maddesine erişimini sınırladığı varsayılmıştır. Bu veriler, çay polifenollerini gibi biyoaktif moleküllerin süt matrisine eklenmesinin kazeinlerin işleyiş ve fonksiyonlarını kuvvetle etkileyebileceğini açıkça göstermiştir [37].

Bir başka çalışma da yeşil çay, siyah çay, kakao ve hazır kahvenin dondurularak kurutulmuş ekstraktlarının eklenmesi yağsız sütün peynir mayası ile pıhtılaşma süresini ve özellikle CaCl_2 ile desteklenmeyen sulandırılmış düşük ısılı süt tozunun pıhtılaşma süresini artırdığı gözlenmiştir. Tüm ekstraktların, yüksek derecede reaktif olan ve gelişmiş kazein misel stabilitesinden sorumlu olabilecek yüksek konsantrasyonda polifenol ve ilgili bileşikler içerdiği belirtilmiştir [38].

Üzüm çekirdeği ekstraktını, fonksiyonel peynir üretmek için kullanımını araştıran bir çalışmada, üzüm çekirdeği ekstraktlarının süt pıhtılaşma kinetiği, süt jeli dokusu ve sineresis üzerine etkisi belirlenmiştir. Süte eklendiğinde, üzüm çekirdeği ekstraktlarının enzimatik pıhtılaşma süresini artırdığı ve pıhtılaşma oranını düşürdüğü gözlenmiştir. İlave edilen üzüm ekstraktlarının artan konsantrasyonları ile, oluşan rennet jellerinin tekstürel özellikleri incelendiğinde kırılabilirlik düzeyinde artma ve sertlik düzeyinde azalmaya yol açtığı rapor edilmiştir [39].

Kateşinlerin ilave edildiği peynirlerde süt proteinlerinin pıhtılaşma özellikleri, esas olarak pH düşüşünden veya süt proteini-fenol etkileşimlerinden kaynaklanabilen fenoliklerin eklenmesinden etkilendiği belirtilmiştir. Ayrıca, kateşin ilavesi ile elde edilen, fenolikçe zenginleştirilmiş peynir örneklerinin antioksidan aktivitesinin fenolik eklenmemiş peynirlere kıyasla daha yüksek olduğu bulunmuştur [23].

Han ve ark. [40] yaptığı çalışmada, çeşitli polifenolik bileşiklerin dahil edilmesine dayalı olarak geliştirilen yeni bir peynir ürünü, doku özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Peynir yapımında fonksiyonel katkıları olarak kateşin, epigallokateşin gallat (EGCG), tannik asit, homovanillik asit, hesperetin ve flavon gibi doğal fenolik bileşikler ile üzüm çekirdeği ekstraktı, yeşil çay ekstraktı ve kıvılcık tozu gibi fenolik bileşikler eklenmiştir. Polifenolik bileşikler içeren peynir pıhtısının nem içeriğinin azaldığını göstermiştir. Polifenolik bileşiklerin peynire eklendiğinde peynir pıhtısında yapısal farklılıklar gözlenmiş büyük ve granüler pıhtı yapılarına yol açmıştır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. MATERYAL

Denemelerde kullanılan çiğ inek sütü Yapılcan Çiftliği' nden sağlanmıştır. Temin edilen çiğ süt örnekleri 6°C'de 3000xg 'de 10 dk santrifüj edilerek (Sigma 3-30K, Almanya) yağı ayrılmıştır. Elde edilen yağsız çiğ süt örneklerine %0.1 oranında sodyum azide ilave edilmiş ve böylelikle mikrobiyel gelişimin önlenmesi hedeflenmiştir. Yağsız çiğ süt örnekleri -80 °C de saklanmıştır.

Süt örnekleri aş ısıt işlem görmemiş ve 2 farklı normda ısıt işlem görmüş (65 °C'de 30 dk ile 85 °C de 30 dk) şekilde 3 grup olarak kullanılmıştır.

Süt örneklerinin isimlendirmesi; çiğ süt kontrol : RC, çiğ süt yeşil çay ilaveli : RY, 65 °C'de 30 dk ısıt işlem uygulanmış kontrol : 65C, 65 °C'de 30 dk ısıt işlem uygulanmış yeşil çay ilaveli : 65Y, 85 °C'de 30 dk ısıt işlem uygulanmış kontrol : 85C, 85 °C'de 30 dk ısıt işlem uygulanmış yeşil çay ilaveli : 85Y şeklindedir.

Denemelerde kafein icermeyen yeşil çay ekstraktı (GreenselectR, Indena, İtalya) kullanılmıştır.

Ayrıca, BLG A ve KCN Sigma-Aldrich 'den temin edilmiştir.

HPLC analizlerinde kullanılan kimyasallardan asetonitril (Merck, 1.13358, Almanya), trifloroasetikasit (Merck, 8.08260, Almanya) ve örnek hazırlamada kullanılan diğer kimyasallar HPLC saflığındadır.

Kullanılan süt içeriği EK-1'de ve yeşil çay içerikleri EK-2 'de gösterilmiştir.

3.2. METOT

3.2.1. Koagülasyon Denemeleri

İki farklı ısıt işlem normu ile ısıt işleme maruz bırakılmamış toplamda 1 set kontrol grubu ve 1 set yeşil çay ilaveli örnekler ile rennet ile koagülasyon denemeleri yürütülmüştür. Yeşil çay içerecek örnekler ısıt işlem öncesinde 0,1 g yeşil çay ekstraktı ilave edilmiş 100 ml süt örneğinden alınmıştır.

100 ml olan set örnekleri (kontrol ve YÇE eklenmiş) her bir denemeden önce çiğ olarak ve 65 °C 30 dk, 85 °C 30 dk ısıt işleme maruz bırakılmıştır.

Rennet ile koagülasyon denemelerinde, her bir set kontrol ve yeşil çay içeren süt örneklerinden 100'er ml buz banyosuna yerleştirilmiştir. Ardından erlen içeriğine 200 µl CaCl₂ 120 µl 1% Rennet (Maxiren) çözeltisi ilave edilmiş ve hızla karıştırılarak yine buz banyosunda bulunan deney tüplerine 5'er ml aliquotlar alınmıştır. Deney tüpleri 32°C'de sıcak su banyosuna alınmış ve belirli zaman aralıklarında (0.dk, 5.dk, 10.dk, 20.dk, 30.dk, 45.dk, 60.dk, 90.dk,120 dk,150dk) su banyosundan alınarak buz banyosuna koyulmuş ve reaksiyonun durdurulması sağlanmıştır. Herbir tüp içeriği santrifüj edilerek (10000xg, 4°C, 20 dk), elde edilen presipitatlar üzerinden protein içeriği ve profillerinin belirlenmesi çalışmaları yürütülmüştür. Santrifüj sonucu elde edilen presipitatlara, uzaklaştırılan supernatant hacmi kadar 8M üre çözeltisi ilave edilmiş ve yoğun ultrasonik banyo ve vortex yardımı ile presipitatların çözünmesi sağlanmıştır. 10°C'de bir gece bekletilmiştir. Bu işlemler ısı işlem görmemiş örnekler ve iki farklı ısı işlem normuna maruz bırakılan örnekler için ayrı ayrı yürütülmüştür.

3.2.2. Bradford Yöntemi

Koagülasyon denemesi sonucu elde edilen presipitat örnekleri, gerekli oranda saf su ile seyreltilerek protein içeriğinin belirlenmesi amacıyla Bradford (1976) yöntemine göre analiz edilmiştir. Presipitatların yanısıra, çiğ süt ve ısı işlem görmüş süt örneklerinin protein miktarları da aynı metot ile belirlenmiştir.

Standart eğri oluşturmak amacı ile farklı dilüsyonlarda teknik kazein çözeltileri hazırlanmış ve örneklerdeki protein miktarları, standart eğriden elde edilen formül ile hesaplanmıştır.

3.2.3. KMP (Kazeinomakropeptit) Analizi

Yeşil çay ilavesinin enzimatik fazda açığa çıkan kazeinomakropeptit (KMP)'ye etkisi ile enzimatik fazda meydana gelebilecek değişikliklerin belirlenmesi amacı ile KMP analizi RP-HPLC ile yürütülmüştür .

100 ml olan set örnekleri (kontrol ve YÇE eklenmiş) her bir denemeden önce çiğ olarak ve 65°C30 dk, 85°C 30 dk ısı işleme maruz bırakılmıştır.

Her bir set süt ve yeşil çay örneğinden 100'er ml erlenlere alınarak hazırlanmıştır. Ardından erlen içeriğine 500 µl CaCl₂, 220 µl 1% Rennet (Maxiren) çözeltisi ilave edilmiş ve hızla karıştırılarak deney tüplerine 5'er ml aliquotlar alınmıştır. Deney tüpleri

32°C’de sıcak su banyosuna alınmış ve belirli zaman aralıklarında (0.dk, 2.dk, 7.dk, 12.dk, 17.dk, 22.dk, 32.dk, 42.dk, 62 dk) su banyosundan alınarak içeriğine 1250 µl %15’lik Perklorik asit (PCA) eklenerek reaksiyonun durdurulması sağlanmıştır. Daha sonra örnekler 6000 ref 15 dk 20°C’de santrifüjden geçirilerek supernatant kısmı 0,45mm nylon filreden geçirilerek viallere alınmıştır ve Thoma 2006 [45] yöntemine göre RP-HPLC ile örneklerin KMP içeriği belirlenmiştir. Tüm örneklerdeki KMP miktarı (%), YÇE içermeyen kontrol örneklerindeki maksimum pik alanı %100 kabul edilerek hesaplanmıştır.

CMP analizi için silika bazlı C-18 RP-HPLC kolonu (250 mm uzunluk x 4.6 mm i.d., Agilent Zorbax 300SB-C18, partikül büyüklüğü 5 µm, por çapı 30 nm) kullanılmıştır. Tüm çözeltiler nylon filtreden (47 mm, 0.45 µm, EG0492-1) geçirilmiştir. CMP analizinde uygulanan kromatografik koşullar;

Mobil faz A: suda %0.1 Trifloroasetik asit (TFA)

B: Asetonitril:deiyozie su: TFA (800:200:0.555; (v,v,v)

Toplam 30 dakikalık analiz süresince kolon sıcaklığı 40°C, akış hızı 1.0 mL dk-1, dalga boyu 226 nm olarak ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 20 µL olarak belirlenmiştir. % 10 mobil faz A ile başlayıp, analiz sonunda % 49 B olacak şekilde bir gradient programı uygulanmıştır.

3.2.4. Dairesel Dikroizm (CD) Spektrofotometresi

Tez çalışması kapsamında öncelikli olarak, farklı ısıl işlem normları ve YÇE ilavesinin BLG konformasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi amacı ile uzak UV bölgede CD ölçümleri Jasco J815 CD spektrofotometre (Tokyo, Japonya) kullanılarak alınmıştır.

Bu amaçla 1mm genişliğe sahip küvet kullanılmış ve tüm ölçümler 25°C’de alınmıştır. 195-250 nm arasındaki far- UV spektrumu alınan 3 ölçümün ortalaması olarak kaydedilmiştir. Enstrümantal parametreler şu şekildedir; 50 nm/dk tarama hızı, 1 nm bant genişliği, 100 mdeg sensitivite, ve 4 s cevap verme süresi. Model sistem denemelerinde 50mM fosfat tamponunda (pH 6.8) hazırlanan BLG (10 µM) kullanılmıştır. Bu amaçla ısıl işlem görmemiş (BLG RC ve BLG RY), 65°C/30dk ısıl işlem görmüş (BLG 65C ve BLG 65Y) ve 85°C/30dk (BLG 85C ve BLG 85Y) ısıl işlem görmüş BLG örnekleri, YÇE ilavesi olmadan ve ısıl işlem öncesi son derişimi 10 ppm ve 50 ppm olacak şekilde YÇE ilavesi ile hazırlanmıştır. Sonuçlar mdeg birimi olarak verilmiştir. BLG örneklerine ait

ikincil yapı elementleri ise elde edilen CD datalarının Bestsel yazılımı kullanılarak analiz edilmesi sonucu hesaplanmıştır.

YÇE ilavesinin uygulanan ısı işlem normlarına bağlı olarak KCN-BLG etkileşimlerine etkisini belirlemek amacı ile proteinlerin üçüncül yapısı ile ilgili bilgi veren yakın görünür bölge CD analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, sadece BLG ve BLG-KCN kompleksi içeren örneklere yukarıda belirtilen işlemler uygulanmış ve bu örneklerin yakın UV bölge spektrumları da yapılan ölçümlerle elde edilmiştir. Bu amaçla far UV ölçümleri için belirtilen parametrelere sadık kalınmış olup, ölçümler 250 nm- 350 nm aralığında alınmıştır. Yakın görünür bölgede çalışılırken daha yüksek protein konsantrasyonu ile çalışılması gerekmektedir. Bu nedenle BLG ve YÇE oranı sabit kalmakla birlikte son derişimleri far UV analizleri için hazırlanan örnek derişimlerinin 10 katı olacak şekilde düzenlenmiştir.

3.2.5. Poliakrilamid Jel Elektroferez(Native-PAGE)

Isıl işlem sonucu olasılıkla oluşabilecek serum protein denatürasyonu ve agregatları ile KCN etkileşimlerinin oluşturduğu komplekslere, yeşil çay fenoliklerinin etkisini belirlemek amacı ile hem model sistemlerde hem de süt örnekleri ile elektroferez uygulamaları yürütülmüştür. Model sistem çalışmaları için hem sadece BLG (4 mg/ml ph 6.8 fosfat tamponunda hazırlanmış) hem de BLG - KCN (1:1) (son protein konsantrasyon 4 mg/mL olacak şekilde) karışımı içeren çözeltiler ile bunların yeşil çay ilaveli (son derişim 500 ppm ve 1000 ppm olacak şekilde) ve ilave edilmeyen örneklerinin ısı işlem görmeden ve 65°C/30 dk ile 85°C/30 dk ısı işlemlere maruz bırakılmış halleri native (alkaline)-PAGE ile Manderson 1998'e [46] göre yürütülmüştür. Model sistem denemelerinden sonra süt örnekleri de aynı miktardaki YÇE ilavesi ve ısı işlem normları uygulanarak analiz edilmiştir. Native-PAGE uygulanmasında %3,9'luk sıralama jeli ve % 15'lik yürütme jelleri kullanılmış ve örnekler 30 mA sabit akımda yürütülmüştür. Boyama prosedürünün ardından jeller 'Agfa Fotolook' yazılımı ile taranmıştır.

3.2.6. Tekstür Parametre Belirleme Çalışmaları

Peynir jeli örneklerinin tekstür analizleri konik prob ile Yüksel ve Erdem (2009)'a [47] göre yürütülmüştür. 2 cm uzunluğundaki konik prob (60°) silindirik kapların içindeki peynir jeli örneğine daldırılmıştır.

Konik prob tek dalış ile 1 mm.s⁻¹ parametresinde uygulanmıştır. Örnek derinliği 40 mm'dir. Kuvvet-zaman grafiklerinden Nexygen 2.0 (Lloyd, İngiltere) yazılımı kullanılmış ve tekstür parametreleri incelenmiştir.

3.2.7. Su Tutma Kapasitesi Analizleri

Örneklerde rennet jellerinin su tutma kapasitesi Yüksel ve Erdem (2009)'a göre analiz edilmiştir [47]. Deney tüplerinde hazırlanan yaklaşık 10 ml, net ağırlığı belirlenen rennet jeli örnekleri 3000xg 'de 10 °C'de 15 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant uzaklaştırdıktan sonra presipitat miktarı belirlenmiştir. Ardından örneklere ait su tutma kapasitesi (WHC) değerleri aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır;

$$\%WHC = (\text{presipitat ağırlığı}/\text{örnek ağırlığı}) * 100$$

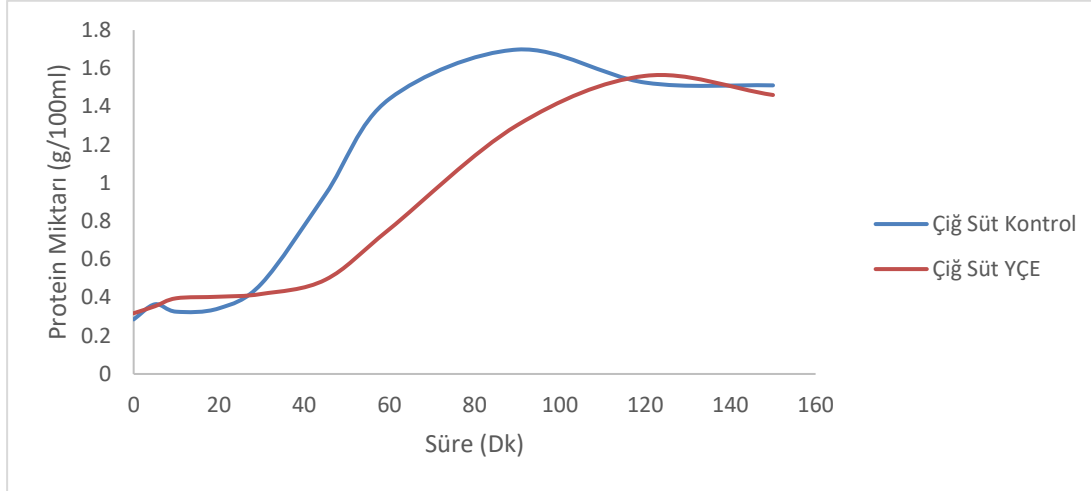
3.2.8. İstatistiksel analiz

Tüm denemeler üç tekrarlı ve iki paralel yürütölmüştür ve elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS ® 15.0 for Windows yazılımı kullanılmıştır. Varyanslar arasındaki farklılığın önem kontrolü çok yönlü varyans analizi (MANOVA) ile geręekleřtirilmiřtir.

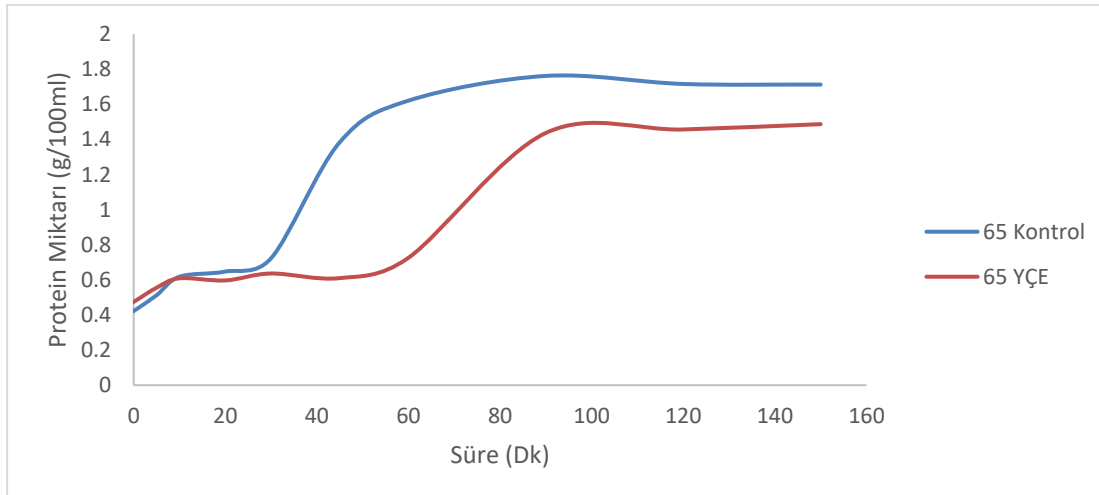
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. YÇE ilavesinin sütün rennet ile koagülasyon sürecine etkisi

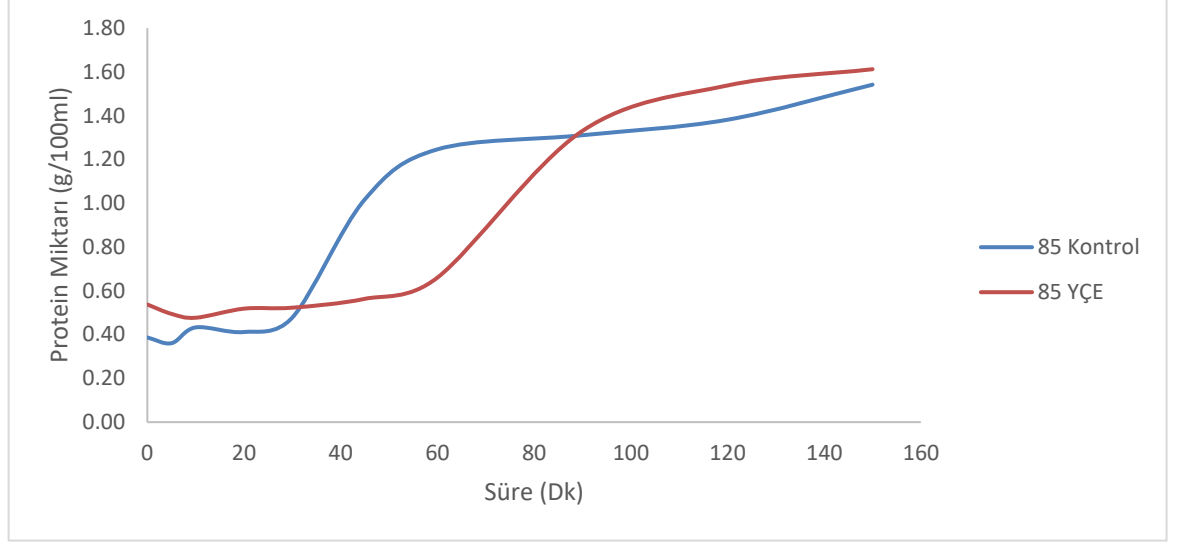
Koagülasyon denemelerinde amaç farklı ısıl işlem normları uygulanmış örneklerin koagülasyon süreci boyunca protein miktarlarına bakılarak koagülasyon fazlarını incelemektir. Yeşil çay fenoliklerinin ve ısıl işlem derecelerinin koagülasyon sürecine nasıl etki ettiği incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda koagülasyon süreci boyunca Bradford yöntemi kullanılarak elde edilen protein miktarı Şekil 4.1 Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te verilmiştir. Grafiklerde protein miktarının önemli oranda değişmediği ilk bölüm enzimatik fazı, protein miktarının hızla arttığı bölüm flokülasyon fazını temsil etmektedir. Koagülasyon grafiklerinden elde edilen tahmini enzimatik faz ve flokülasyon fazı süreleri ise Çizelge 4.1'de gösterilmektedir.



Şekil 4.1. Çiğ süt için koagülasyon süreci boyunca protein miktarındaki (mg/ml) değişim



Şekil 4.2. 65 °C/30 dk ısıt işlem uygulanmış süt için koagülasyon süreci boyunca protein miktarındaki (mg/ml) değişim



Şekil 4.3. 85 °C/30 dk 'de ısıt işlem uygulanmış süt için koagülasyon süreci boyunca protein miktarındaki (mg/ml) değişim

Isıt işlem uygulanmamış ve 65°C ısıt işlem uygulanmış süt örneklerinde örneklerin tümünde kontrol gruplarının aksine yeşil çay ilave edilmiş süt örneklerinde koagülasyonun tamamlanmasının daha uzun zaman aldığı ve bir süre sonra sabit protein miktarına ulaştığı çiğ süt ve açıkça görülmektedir. 85°C ısıt işlem uygulanmış süt örneklerinde ise 150. dakikada henüz koagülasyonun tamamlanmadığı, protein konsantrasyonunun artmaya devam ettiği yani kazein misellerinin flokülasyonunun devam ettiği görülmüştür.

Yapılan bir çalışmada inek sütü ile peynir yapımı ve olgunlaştırma sürecinde yapılan denemelerde yeşil çay ekstraktı ilavesi ile kullanılan koagülasyon denemelerinde koagülasyon hızının yavaşladığı dinamik ışık salınımı spektrofotometresi ile belirlenmiştir [31]. Bu tez kapsamında yapılan koagülasyon denemeleri bu sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Süte yeşil çay fenolikleri ilavesinin incelendiği çalışmalarda enzimatik fazda KMP oluşum hızının düştüğü ve flokülasyon fazının yavaşladığı rapor edilmiştir [31]. Mevcut çalışma kapsamında da rennet ile koagülasyon sürecinde enzimatik fazın süresinin YÇE ilavesi ile arttığı gözlemlenmiştir. 85°C ısıt işlem uygulanmış süt örneklerinde fark daha belirgin olarak gözlemlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Örnekler için koagülasyon süreleri

Örnekler	Enzimatik Faz (dk)	Flokülasyon Fazı (dk)
Çiğ Süt Kontrol	27 ± 1	52 ± 3
Çiğ Süt YÇE	40 ± 2	58 ± 4
65 Kontrol	30 ± 2	49 ± 1
65 YÇE	50 ± 3	50 ± 1
85 Kontrol	30 ± 2	gözlemlenmedi
85 YÇE	50 ± 4	gözlemlenmedi

Çiğ süt örnekleri karşılaştırıldığında hem enzimatik faz hem de flokülasyon fazı süreleri YÇE ilaveli örneklerde kontrol örneklerine göre daha uzun olduğu gözlemlenmiştir. 85°C/30 dk ısıtma işlemi uygulanan örnekler karşılaştırılınca çiğ süt örneklerine benzer olarak enzimatik fazın YÇE ilavesi ile uzadığı ancak flokülasyon fazının deneme süreci boyunca devam etmesi sebebiyle süre farkının tam olarak gözlemlenemediği ancak kontrol örneklerine göre uzadığı belirtilmiştir. 65°C/30 dk ısıtma işlemi uygulanmış süt örneklerinde enzimatik faz süresi diğer örneklerde olduğu gibi YÇE ilaveli örnekte kontrol örneğine göre uzamış fakat flokülasyon fazı süresinde istatistiksel olarak önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir ($p>0.05$).

80°C'nin üzerinde ısıtma işlemi uygulanan sütte denatüre olan serum proteinleri kazein miselleri ile kompleks oluşturabilir. Kompleks oluşumu esas olarak BLG ile KCN arasında gerçekleşmektedir. Kompleks oluşumu tiyol bloklama reaktifleri yani sülfidril ve disülfür değişim reaksiyonları sayesinde oluşur [12].

Tez çalışması kapsamında çiğ süt, 65°C'de ve 85°C'de ısıtma işlemi görmüş süt örnekleri incelendiğinde yeşil çay ilaveli örneklerde enzimatik faz süresinde artışa yol açtığı belirlenmiştir.

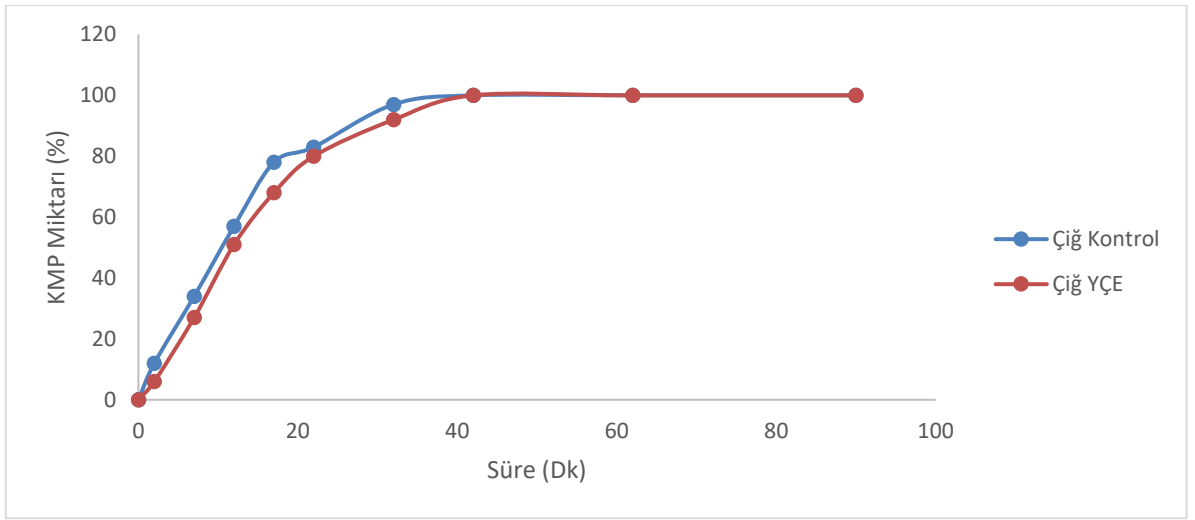
YÇE ve ısıtma işleminin kombine etkisine bakıldığında ısıtma işleminin tek başına faz sürelerini önemli ölçüde etkilemediği ancak faz sürelerindeki değişimin YÇE ilavesine bağlı olduğu düşünülmüştür. Kombine etkinin daha net ortaya konulabilmesi için KMP analizinin sonuçlarını incelemek gerekmektedir.

4.2. YÇE ilavesinin Kazeinomakropeptit (KMP) oluşumuna etkisi

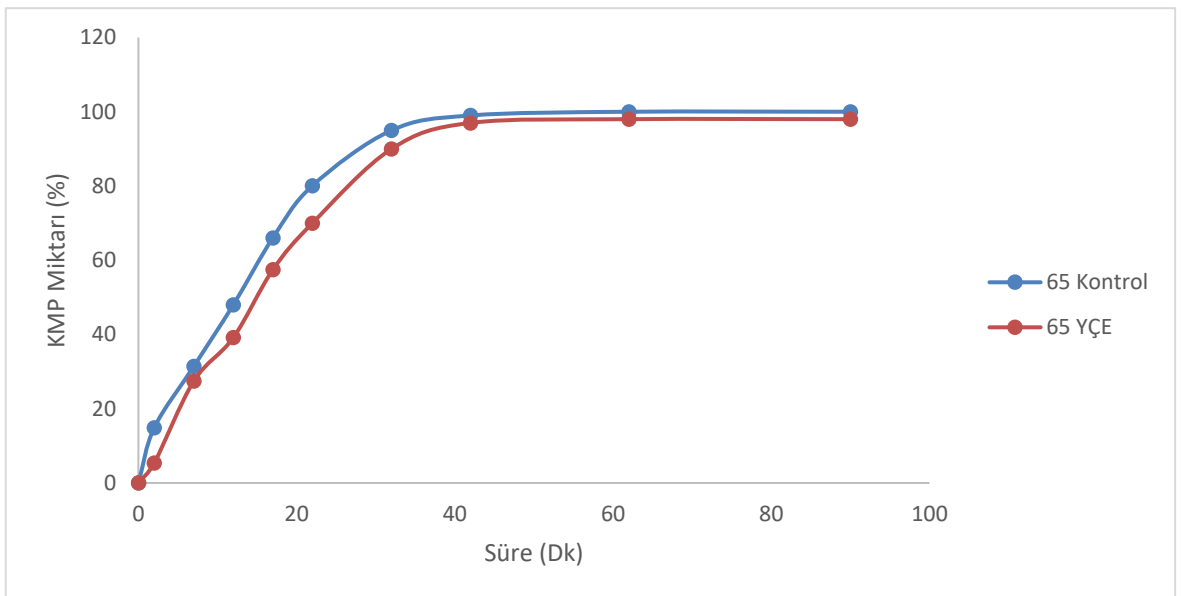
Kazeinler koloidal yapıları sayesinde bir çok süt ürününün oluşmasında baş rol oynarlar. Peynir yapımında kullanılan kimozen, KCN Phe₁₀₅-Met₁₀₆ aminoasitleri arasındaki peptid

bağına spesifik bir enzimdir. Peynir jeli oluşumu sürecinde ilk aşama olan enzimatik fazda kimozinin KCN'i proteolize uğratması sonucu para-kappa-kazein ile kazainomakropeptid (KMP) adı verilen peptitler açığa çıkarır. Bu reaksiyondan sonra kolloidal yapı kararlılığını yitirerek flokülasyon olayı başlar [10]. Bu reaksiyonun sonucunda ortaya çıkan KMP'nin oluşum hızından yola çıkarak süte yeşil çay ekstraktı ilavesi ile birlikte ısı işlemin etkisi incelenmiştir.

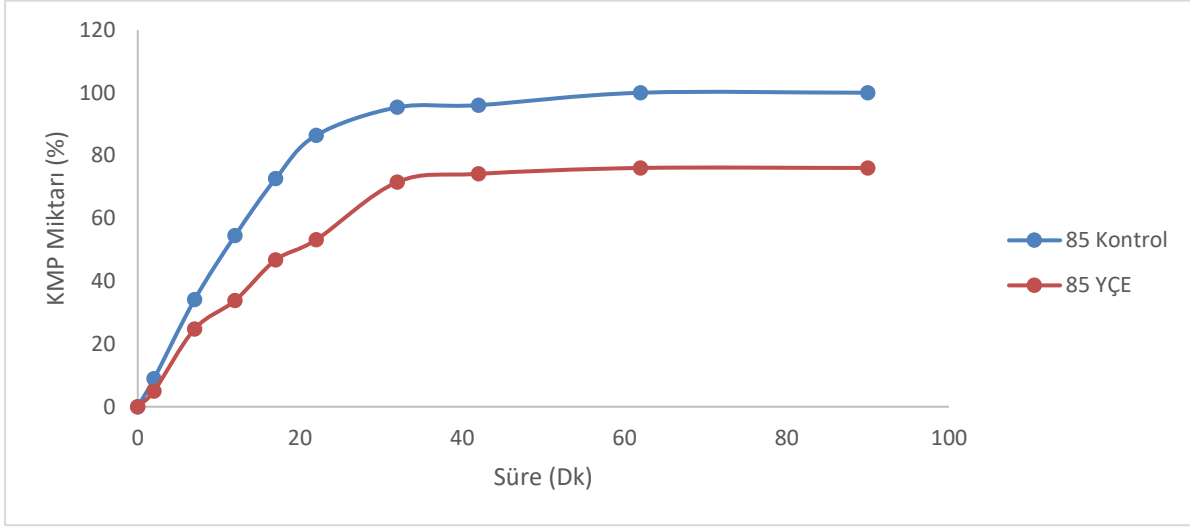
Koagülasyon sürecinde oluşan KMP miktarlarını gösteren veriler Şekil 4.4, Şekil 4.5 , Şekil 4.6 'da verilmiştir.



Şekil 4.4. Çiğ süt örnekleri için süreye bağlı KMP oluşum miktarı



Şekil 4.5. 65 °C’de ısıl işlem uygulanmış süt örnekleri için süreye bağlı KMP oluşum miktarı



Şekil 4.6. 85 °C’de ısıl işlem uygulanmış süt örnekleri için süreye bağlı KMP oluşum miktarı

KMP miktarında daha fazla artışın görülmediği ve eğrinin platoya eriştiği noktada enzimatik fazın tamamlandığı ve KMP miktarının %100’e ulaştığı kabul edilmiştir. Isıl işlem görmüş ve YÇE ilave edilmiş örnekler için oluşan % KMP değerleri ısıl işlem görmemiş kontrol süt örneğine göre normalize edilmiştir. Çiğ süt için, yeşil çay ilave edilen ve edilmeyen örnekler arasında KMP oluşum hızı açısından önemli bir fark gözlenmemiştir. 65C ve 65Y örnekleri kıyaslandığında ise, KMP oluşum hızının YÇE ilaveli süt örnekleri için çok belirgin olmasa da daha yavaş olduğu belirlenmiştir. 85C ve 85Y örnekleri kıyaslandığında KMP oluşum hızında gerçekleşen belirgin azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.6). Isıl ilemin KMP oluşum hızına etkisi sadece 85 °C’deki örnekler için gözlemlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, YÇE ilavesinin , KMP oluşum hızına olan yavaşlatıcı etkisinin ısıl işlem derecesi arttıkça arttığı yorumu yapılabilmektedir.

Yeşil çay ilavesinin KMP oluşum hızı üzerine etkisi incelendiğinde fenolik bileşiklerin KMP oluşumunu kontrol örnekleri ile kıyaslandığında çiğ süt ve 65°C/30 dk ısıl işlem uygulanmış örneklerde bariz bir değişiklik görülememişken 85 °C ısıl işlem uygulanmış örneklerde yavaşlattığı görülmüştür.

Koagülasyon denemelerinde KMP oluşum sürecinde yani enzimatik fazda sürenin kontrol ve yeşil çay ilaveli her örnek kıyaslandığında yeşil çay etkisiyle uzadığı gözlemlenebilmişken, KMP oluşum hızının incelendiği denemelerde bu etki sadece 85°C/30 dk ısı işlem uygulanmış örneklerde gözlemlenebilmiştir. KMP analizi daha kontrollü bir analiz olup koagülasyon denemesine göre sonuçlarının doğruluğunun daha yüksek olduğu düşünülmüştür. Flavanoidler ve kazein miselleri arasındaki bağlanmanın karakterizasyonuna ilişkin yapılan çalışmada, bu bağlanmanın hidrofobik karakterde olduğuna dair bulgular elde edilmiştir.[55] Bu sonuç ile uyumlu bir şekilde KMP denemesindeki bulgular da, flavanoidlerin kazein misellerinin yüzeyinde yer alan κ -kazeinin KMP kısmı (105 (Met)-...) ile değil, hidrofobik karakterdeki para- κ -kazein (1...-105 (Met)) ile etkileşime gireceği bu nedenle KMP oluşum hızını etkilemeyeceği düşünülmüştür.

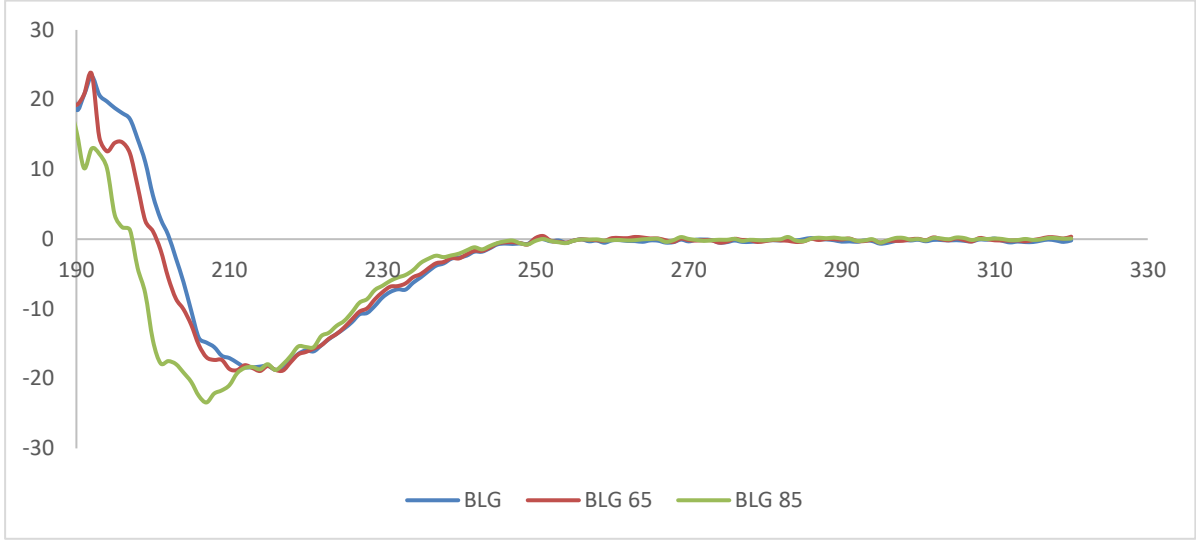
Koagülasyon denemelerinde YÇE ilavesi ile CN'le fenoliklerin etkileşime girerek kimozinin substratına ulaşmasını zorlaştırabileceği düşünülmüşken bu etki KMP denemelerinde görülmemiş ancak BLG ile KCN etkileşimlerinin özellikle 85°C/30 dk ısı işlem görmüş süt örneklerindeki KMP oluşum hızının yavaşlamasında etkili olduğu düşünülmüştür.

4.3. Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi

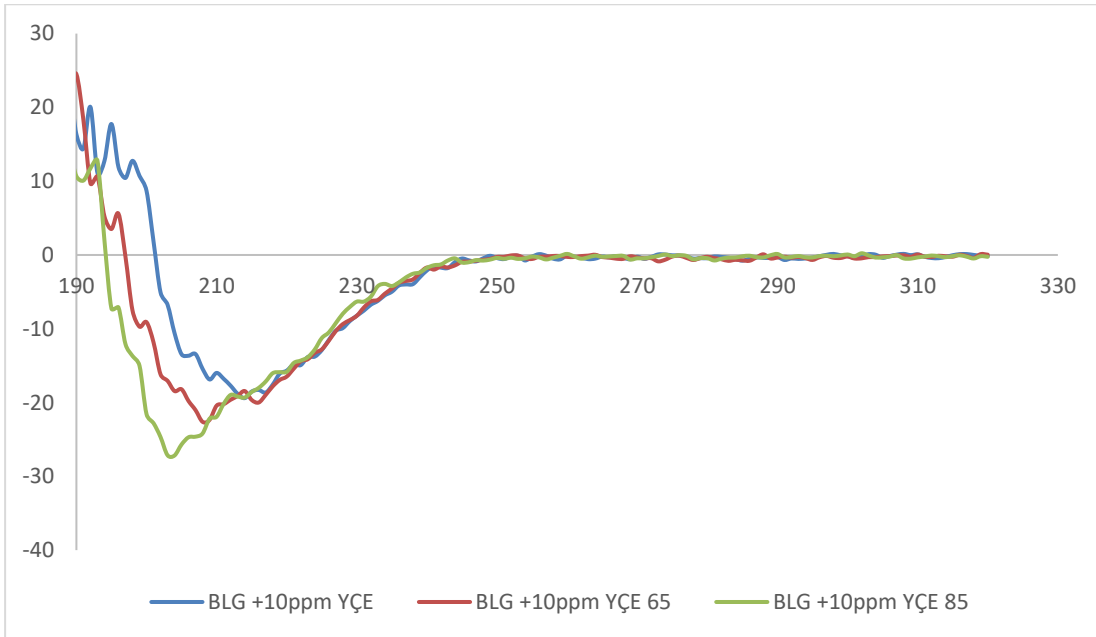
Tez çalışması kapsamında model sistemlerde ısı işlem ve beraberindeki YÇE ilavesinin BLG ve BLG-KCN kompleksi üzerine moleküler düzeydeki etkilerini incelemek amacı ile uzak (far-UV) ve yakın (near-UV) görünür bölgede alınan CD spektrumları incelenmiştir. Proteinlerin ikincil yapıları uzak UV spektral bölgesinde (190-250 nm) gözlemlenirken, yakın UV bölge (200-380 nm) ölçümleri ise proteinlerin üçüncül yapıları hakkında çıkarımlar yapılmasını sağlamaktadır [49].

Örnek isimleri sırasıyla ; BLG ısı işlem uygulanmamış, BLG 65 65°C/30 dk ısı işlem uygulanmış , BLG 85 85°C/30 dk ısı işlem uygulanmış , BLG +YÇE yeşil çay ekstraktı eklenmiş ısı işlem uygulanmamış, BLG +YÇE 65 yeşil çay ekstraktı eklenmiş 65°C/30 dk ısı işlem uygulanmış , BLG +YÇE 85 yeşil çay ekstraktı eklenmiş 85°C/30 dk ısı işlem uygulanmış , BLG + KCN ısı işlem uygulanmamış, BLG+ KCN 65 65°C/30 dk ısı işlem uygulanmış , BLG+ KCN 85 85°C/30 dk ısı işlem uygulanmış , BLG +KCN + YÇE yeşil çay ekstraktı eklenmiş ısı işlem uygulanmamış, BLG +KCN +YÇE 65 yeşil

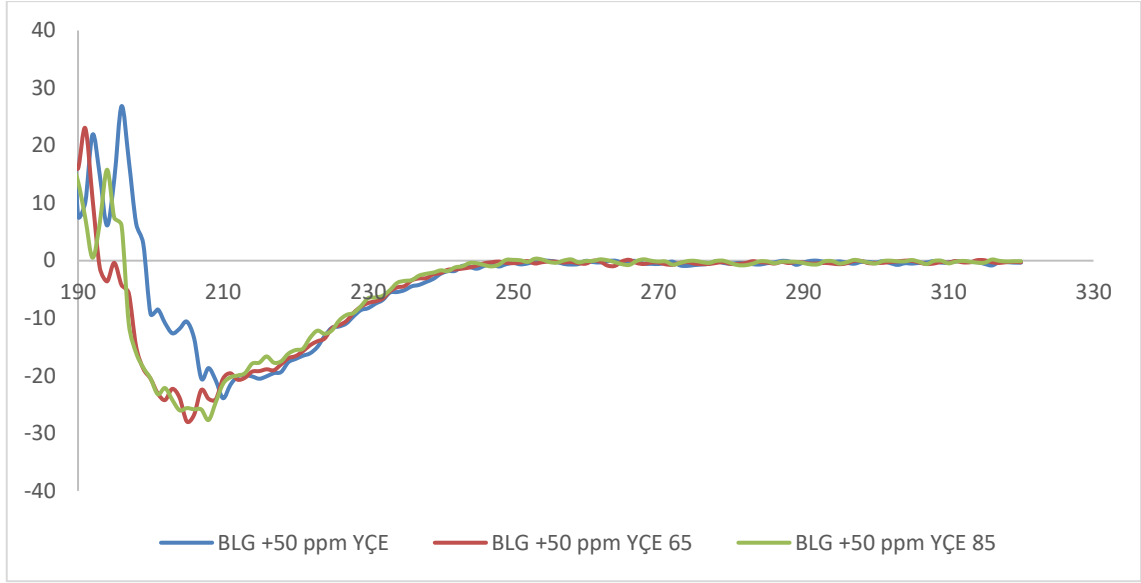
ay ekstraktı eklenmiş 65°C/30 dk ısıı işlem uygulanmış , BLG+KCN +YE 85 yeşil çay ekstraktı eklenmiş 85°C/30 dk ısıı işlem uygulanmış şeklindeyir.



şekil 4.7. Farklı ısıı işlem normları uygulanmış (ısıı ilem uygulanmamış, 65°C/30Dk, 85°C/30 dk) BLG (10μM)'e ait uzak görünür bölge CD-spektrumları



şekil 4.8. Farklı ısıı işlem normları uygulanmış (ısıı ilem uygulanmamış, 65°C/30Dk, 85°C/30 dk) BLG(10μM)-YE(10 ppm) kompleksine ait uzak yrnr bölge CD-spektrumları



Şekil 4.9. Farklı ısıl işlem normları uygulanmış (ısıl işlem uygulanmamış, 65°C/30Dk, 85°C/30 dk) BLG (10μM)-YÇE(50 ppm) kompleksine ait uzak yörünür bölge CD spektrumları

Çizelge 4.3. Beta laktoglobuline ait ikincil yapı elementlerinin miktarları

Örnek	İkincil yapı elementleri			
	α -Heliks(%)	β - zincir (%)	Döngü (%)	Rastgele sarmal (%)
BLG	14,7	27,7	14	43,5
BLG 65	15,2	26,6	12,9	42,5
BLG 85	16,9	18,4	13,2	51,5
BLG+10 ppm YÇE	14,9	27,6	13,8	43,7
BLG+50 ppm YÇE	16,4	28,7	10,3	44,7
BLG+10ppm YÇE 65	15,3	26,4	12,6	45,6
BLG+50 ppm YÇE 65	15,8	26,4	11,3	46,6
BLG+10ppm YÇE 85	20,2	24	11,9	43,9
BLG+50 ppm YÇE 85	24,7	20,9	12,9	41,5

85 °C’de ısıl işlem gören BLG ikincil yapı sayılarında artış görülmüştür. Bu durumun YÇE ilavesi, denatürasyon ile birlikte bu artışı destekleyici yönde etkilediği

düşünülmüştür. Hem artan ısı işlem hem de artan YÇE konsantrasyonu benzer etkiler yapıp bozunmayı destekleyecek yönde etkide bulunmuştur. Aynı durum 65 °C ve ısı işlem uygulanmamış örneklerinde net olarak görülememiştir. Ancak sonuçlar gözden geçirildiğinde ikincil yapı elementlerinin YÇE ilavesi ile çok önemli ölçüde değişmediği gözlemlenmiştir. Literatürde Farklı sıcaklık ve farklı sürelerde BLG üzerine uygulanan ısı işlemlerle uzak görünür bölge çalışmaları yapılmış ve literatür sonuçları tez kapsamında yapılan çalışma sonuçlarıyla paralellik göstermiştir.

Yapılan bir çalışmada serum proteinlerinin seyreltik çözeltileri, 40 ila 94 °C arasındaki sıcaklıklarda 10 dakika boyunca fosfat tamponunda ısıtılmış, soğutulmuş ve uzak UV dairesel dikroizm (CD) kullanılarak analiz edilmiştir. Uzak UV sonuçları, ısı işleminin bir sonucu olarak bazı küçük değişiklikler göstermiştir. Bu sonuçlar, serum proteinlerinin (doğal benzeri monomerden katlanmamış monomere) ısıyla indüklenen agregasyonundaki ilk tersinmez aşamanın, Trp19 ortamının kiralitesini değiştirdiğini ve proteinin ikincil yapısını değiştirdiğini göstermiştir [46].

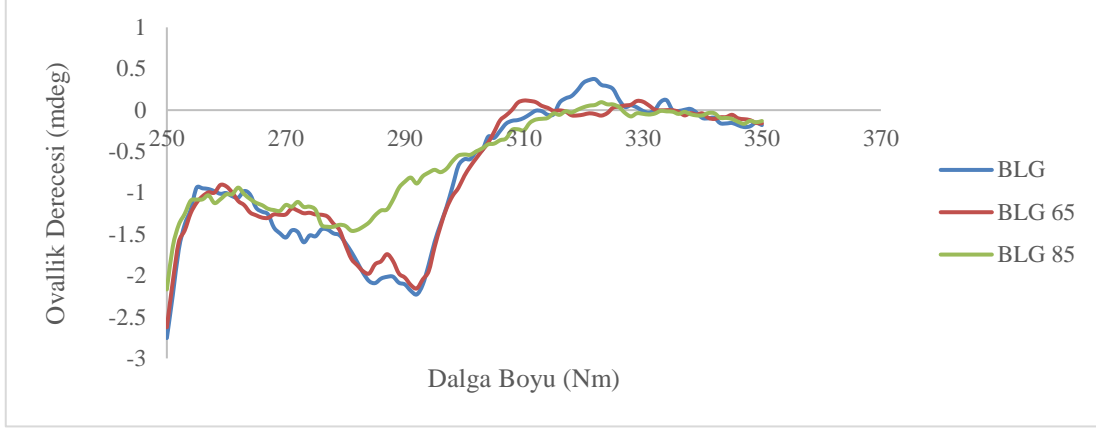
Yapılan başka bir çalışmada konsantre BLG çözeltilerinin (55 mg mL⁻¹, pH 6.8) 85 °C'de 1 ila 15 dakika ısıtılmasıyla oluşturulan agregaların köpürme özellikleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Yapısal özellikler (boyut ve moleküler konformasyon), hidrofobiklik ve protein agregatlarının oranı incelenmiştir. BLG çözeltilerinin 85 °C'de ısıtmanın uzak görünür bölge spektrumları üzerindeki etkileri incelenmiş ve CD spektrumlarının analizi yapılmıştır. α -heliks ve β -zincir bir azalma ve ısıtma süresi ile rastgele sarmal yapı konformasyonunda bir artış göstermiştir [53].

Yapılan bir başka çalışmada da epigallokateşin gallat (EGCG) ve β -laktoglobulin (BLG) arasındaki 25-121 °C'de ısı işlemler altında etkileşim ve antioksidan kapasite araştırılmıştır. α -Heliks ve β -Tabaka içeriğinde önemli azalmalar ve döngülerde ve rastgele sarmal yapılarıdaki artış, BLG'nin ısı kaynaklı açılmasına bağlanmıştır [48].

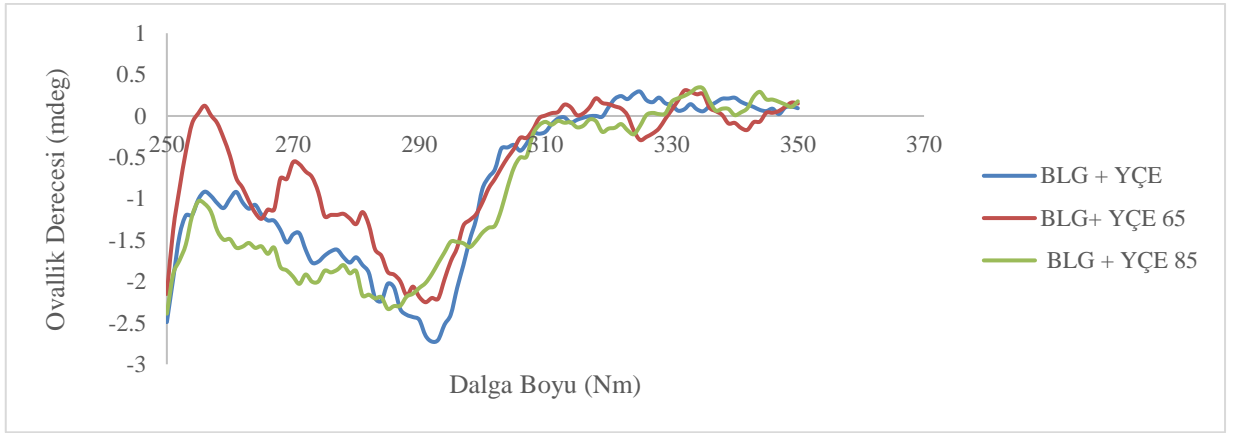
BLG-KCN etkileşiminin daha iyi analiz edilebilmesi için yakın görünür bölge analizleri yorumlanmasının daha doğru olabileceği düşünülmüştür.

Bir proteinin yakın görünür bölge spektrumu aromatik amino asitler Phe, Tyr ve Trp'nin rijiditesini (esnek olmama) izlemek için kullanılabilir ve bu nedenle proteinin üçüncül yapısını temsil eder. [49] BLG için, 293 nm tepe noktasının Trp kalıntılarına ait olduğu, 285 nm'nin Tyr'e ve Trp katkısına ve 270 nm'nin altındaki tepe noktalarının Phe'ye ait olduğu ortaya konmuştur [50]. BLG'de iki Trp, 4 Tyr ve 4 Phe bulunur [51] ve ayırt edici

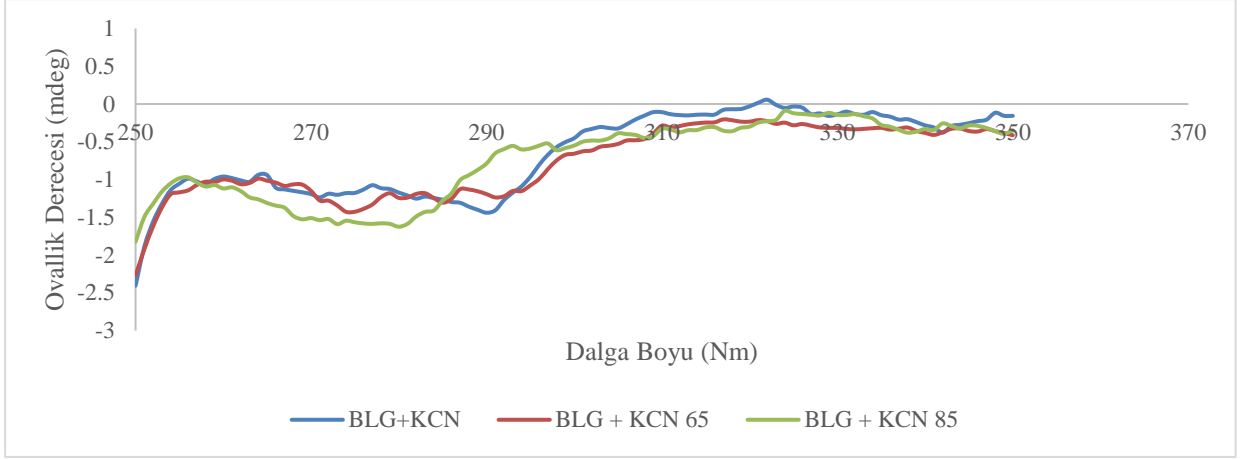
UV bantları Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15’ de verilmiştir. Örneklerdeki yüksek fenolik derişimi ölçümlerde problem yarattığından yakın görünür bölge için, 500 ppm YÇE içeren örneklere ait sonuçlar grafiğe yansıtılamamıştır.



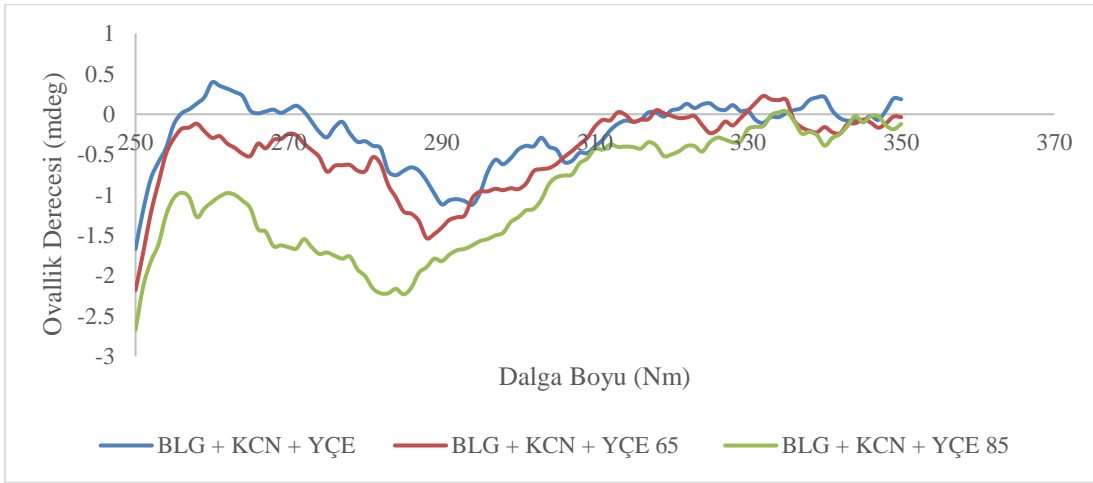
Şekil 4.10. Farklı ısı işlem normları uygulanmış (ısı işlem uygulanmamış, 65°C/30Dk, 85°C/30 dk) BLG(100µM)’e ait yakın görünür bölge CD spektrumları



Şekil 4.11. Farklı ısı işlem normları uygulanmış (ısı işlem uygulanmamış, 65°C/30Dk, 85°C/30 dk) BLG(100µM)-YÇE(100ppm) kompleksine ait yakın görünür bölge CD spektrumları



Şekil 4.12. Farklı ısıl işlem normları uygulanmış (ısıl işlem uygulanmamış, 65°C/30Dk, 85°C/30 dk) BLG(50µM)-KCN(50µM) kompleksine ait yakın görünür bölge CD spektrumları



Şekil 4.13. Farklı ısıl işlem normları uygulanmış (ısıl işlem uygulanmamış, 65°C/30Dk, 85°C/30 dk) BLG(50µM)-KCN(50µM)-YÇE(100ppm) kompleksine ait yakın görünür bölge CD spektrumları

Ölçüm sonuçlarına bakıldığında üçüncül yapı değişiklikleri için Trp19 bölgesindeki negatif tepeleri dikkate alınmıştır. Trp19 absorbansı ile üçüncül yapıdaki değişikliğin en fazla gözlemlendiği alan hem sıcaklık hem YÇE etkisi ile 85°C ile çalışılan örnek olup daha sonra sırasıyla 65°C ve ısıl işlem uygulanmamış süt örnekleri olmuştur.

BLG'in KCN ilavesi ile yakın görünür bölgede spektrumu 85°C' de sıcaklığın da etkisiyle değişmiş ve Cys121'deki serbest sülfidril kalıntısının açığa çıktığı düşünülmüştür. Bu durumun, moleküller arası disülfid bağı yoluyla BLG moleküllerini

polimerize edecek olan moleküller arası disülfid/sülfhidril değişim reaksiyonlarını tetiklemiş olabileceği düşünülmektedir [52].

Yakın UV CD spektrumlarının analizi, esas olarak aromatik amino asitlerin ortamındaki kısıtlı asimetri nedeniyle proteinlerin üçüncül yapısını karakterize etmek için kullanılmıştır. BLG'nin CD spektrumundaki 285 ve 290 nm'de eliptikliğin iki negatif tepe noktası esas olarak Trp19 absorbansından kaynaklanmaktadır. Bu iki negatif tepe, Trp19'un BLG molekülünün kaliksindeki yapısal değişiklikleri yansıtan 85°C' de ısıtma işlemi ile yoğunluklarını azaltmıştır.

BLG çözeltilerinin protein agregatlarının mevcudiyeti nedeniyle 15 dakikadan daha uzun ısıtma süreleri için bulanık hale geldiği literatürdeki çalışmalarla belirlenmiştir. Tez kapsamında yapılan denemelerde 30 dakika ısıtma işlemi uygulandığından spektrofotometrik olarak yapıların belirlenmesinin güç olduğu düşünülmüştür [53].

Yakın UV spektrum ile yapılan bir çalışmada BLG 85°C' de farklı ısıtma süreleri uygulanarak köpürme özellikleri incelenmiştir. 85°C' de ısıtma işlemi özellikle 3 dakika ile 5 dakika ısıtma arasında majör bir değişiklik fark edilmiştir.

Protein agregatlarının mevcudiyeti nedeniyle BLG çözeltilerinin 15 dakikadan daha uzun ısıtma süreleri için bulanık hale geldiği not edilmiştir. Bu koşullarda, spektrofotometrik belirlemelerde zorluklar yaşanabileceği belirtilmiştir [53].

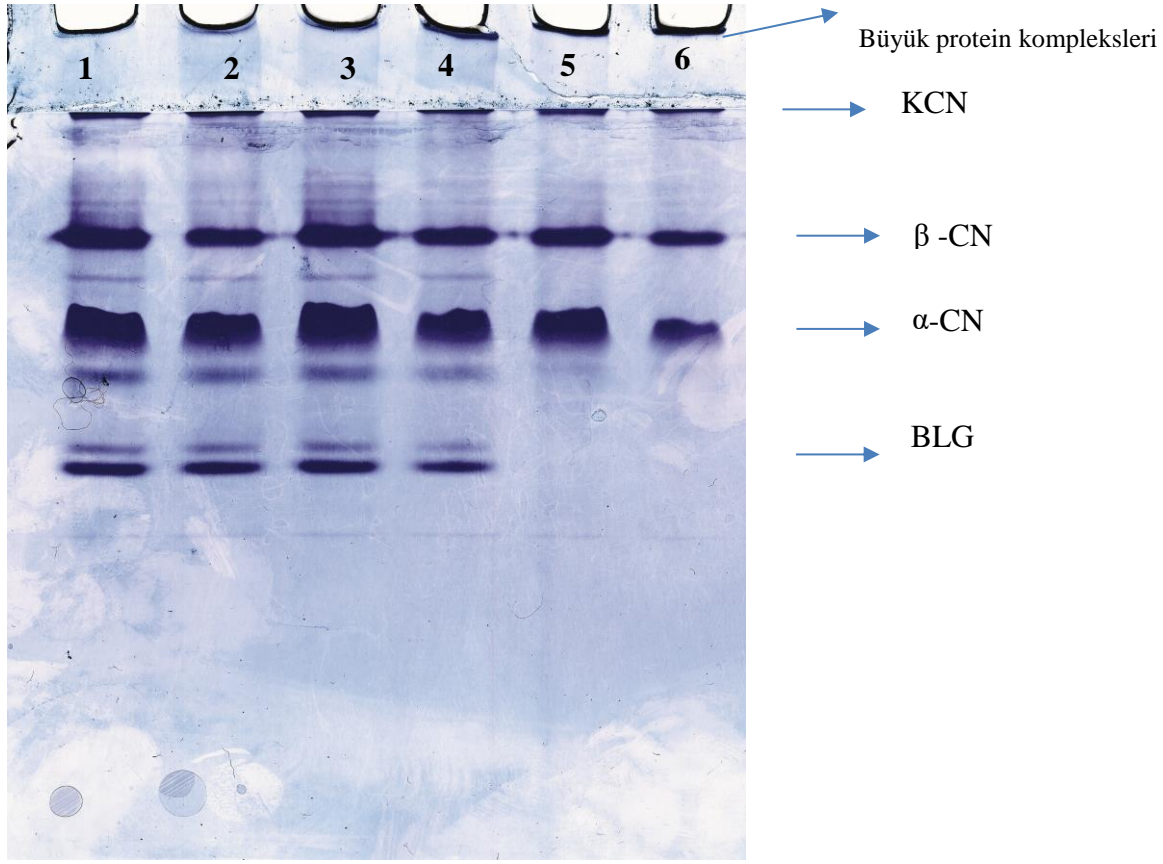
Her iki çalışma sonucunda da özellikle 85°C'de uygulanan ısıtma işleminin hem ikincil hem üçüncül yapı değişiklikleri üzerine etkisi gözlemlenebilmiştir. YÇE ile etkileşimin açıkça ortaya koyduğu farklılık özellikle 85°C'de BLG-KCN etkileşimleri varlığında yakın görünür bölge çalışmalarında gözlemlenmiş ve YÇE etkisinin her iki ısıtma işlemi formunda da üçüncül yapı değişikliklerine neden olduğu gözlemlenebilmiştir.

4.4. Poliakrilamid Jel Elektrofrez Analizi (Native Page)

Isıtma işlemi sonucu olasılıkla oluşabilecek BLG denatürasyonu ve agregatları ile KCN etkileşimlerinin oluşturduğu oluşumlara, yeşil çay fenoliklerinin etkisini belirlemek amacıyla native page analizi yapılmıştır.

4.4.1. Süt Örneklerinin Native Page Analizi

Çiğ süt, 65°C/30dk ısıtma işlemi uygulanmış süt ve 85 °C/30dk ısıtma işlemi uygulanmış süt örnekleri YÇE ilavesi olmadan ve 1000 ppm YÇE ilavesinin ardından Native-PAGE ile analiz edilmiştir.



Şekil 4.14. Süt Örneklerinin Native PAGE görüntüsü (1: RC, 2: RY, 3: 65C 4: 65Y, 5: 85C , 6: 85Y)

70 °C ve üzeri sıcaklıklarda minimum 30 dakika ısıl işlem uygulandığı durumda BLG denatüre olur ve KCN ile etkileşim içine girer [13]. Isıl işlemin süt proteinleri arasındaki bu etkileşimlere etkisi Şekil 4.16'da ısıl işlem görmüş örneklerde kuyudan giremeyen büyük protein komplekslerinin varlığı ile gözlemlenebilmiştir. Bu komplekslerin büyük olasılıkla CN-BLG etkileşimleri sonucu oluşan büyük yapılar olduğu düşünülmektedir. Çiğ süt için, YÇE ilavesinin CN fraksiyonlarının bant yoğunluğuna önemli bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Ancak YÇE ilavesinin ardından ısıl işlem uygulanmış süt örneklerinde KCN bant genişliğinin kontrol örneklere göre bir miktar azaldığı görülmektedir. KCN'e benzer şekilde, α-CN ve β-CN bant yoğunluklarının da ısıl işlem görmüş örneklerde daha düşük seviyede olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, özellikle 85°C /30 dk ısıl işlem görmüş örneklerde YÇE fenoliklerinin varlığının, büyük protein komplekslerinin oluşumunu artırabileceği, örnek kuyusundan giremeyen büyük yapıların artmış olması nedeni ile düşünülmektedir. 85C ve 85Y örneklerinde sütte bulunan temel serum protein olan BLG'in tamamen denatüre olduğu da gözlemlenebilmektedir. 65C ve 65Y örnekleri incelendiğinde BLG bantlarının gözlemlenmesi bu sıcaklıkta

denatürasyonun önemli seviyede olmadığını göstermektedir. Ancak 65Y örneklerinde gözlemlenen native BLG bant yoğunluğunun 65C örneğine kıyasla daha düşük seviyede olması, YÇE fenolikleri ile BLG'nin etkileşime girip daha büyük yapılar oluşturabileceğini düşündürmektedir.

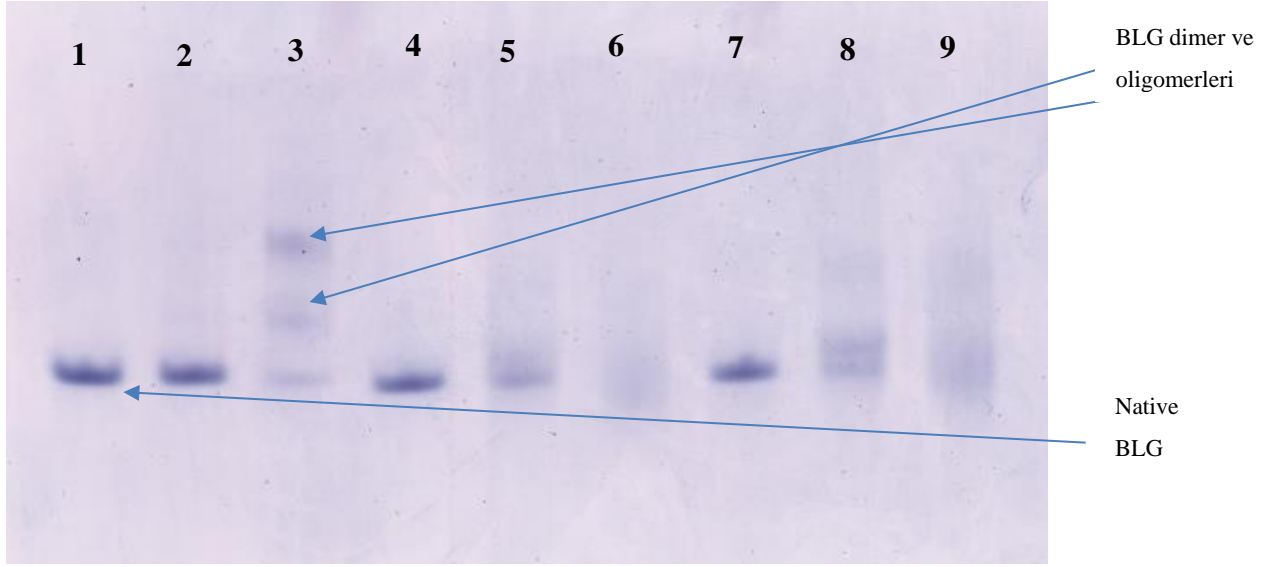
Literatürde, ısı işlem derecesi arttıkça BLG'de gerçekleşen konformasyonel değişimler ile, YÇE fenoliklerinin BLG'ye bağlanma affinitesinin arttığını rapor eden çalışmalar mevcuttur [48]. Mevcut çalışma kapsamında da YÇE fenoliklerinin BLG ve BLG-KCN kompleksi ile etkileşiminin BLG'nin artan denatürasyon derecesi ile arttığı belirlenmiştir.

4.4.2. Model Sistemlerde BLG ve KCN etkileşimlerinin Native Page ile Belirlenmesi

Süt örneklerinde YÇE ilavesi ve ısı işlem etkisi ile görülen değişimleri açıklayabilmek adına, süt örneklerinin ardından model sistemlerde elektroforez uygulamaları yürütülmüştür. Öncelikle sadece BLG içeren model sistemlerde analizler gerçekleştirilmiş, ardından BLG-KCN karışımı içeren model sistemler kullanılarak ısı işlem ve YÇE ilavesinin bu iki protein arasındaki etkileşimlere etkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

Analizlerde kullanılan örneklerdeki son BLG derişimi 1 mg/ml iken YÇE derişimi ise 250 ppm olacak şekilde ayarlanmıştır. BLG-KCN komplekslerinde ise BLG:KCN oranı 1:1 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Isı işlem uygulanmamış BLG, 65°C/30dk ısı işlem uygulanmış BLG ve 85 °C/30dk ısı işlem uygulanmış BLG ve bunların ısı işlem öncesinde YÇE eklenmiş halleri (500 ve 1000 ppm için ayrı ayrı) ile analiz yapılmıştır ve Şekil 4.15' deki görüntü elde edilmiştir.



Şekil 4.15. Model Sistemlerde BLG'e ait Native PAGE görüntüsü

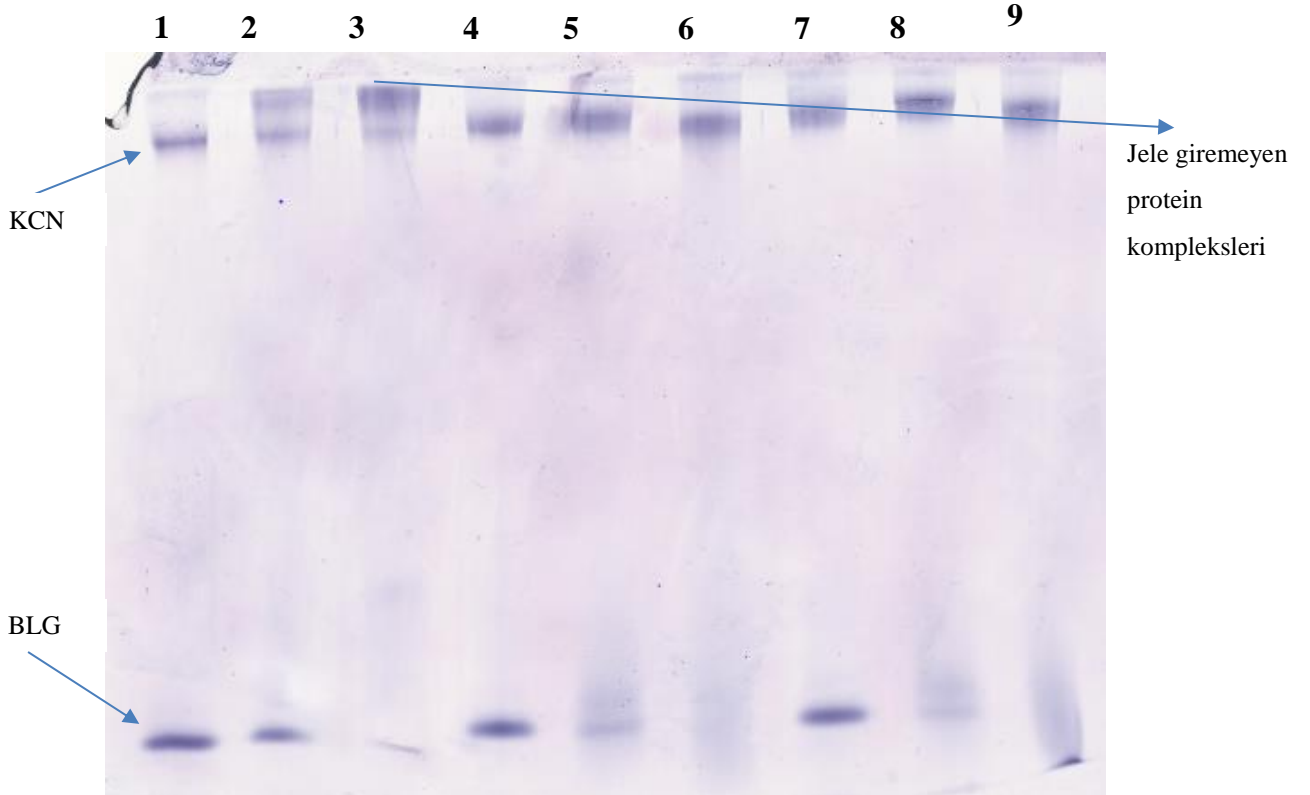
(1: Native BLG , 2: 65°C BLG, 3: 85 °C BLG, 4: Native BLG + 500ppm YÇE, 5: 65°C BLG+ 500ppm YÇE, 6: 65 °C BLG + 500ppm YÇE, 7: Native BLG + 1000ppm YÇE, 8: 65 °C BLG + 1000ppm YÇE, 9: 85 °C BLG + 1000ppm YÇE)

Native-PAGE analizinin yürüdüğü pH değeri olan pH 8.9'da BLG'nin normalde dimer olan yapısının monomerlerine ayrıldığı belirtilmiştir [12]. Bu nedenle elektroforetogramda ısı işlem görmemiş BLG için gözlemlenen bant görüntüsü BLG monomerine ait görüntüdür. Model BLG sistemlerine ısıl işlemin etkisi incelendiğinde, 65°C'de 30 dk ısıl işleme maruz bırakılan örneklerdeki BLG bant görüntüsünün, ısıl işlem görmemiş BLG ile aynı olduğu görülmektedir. Böylelikle, belirtilen ısıl işlem normunun BLG üzerinde önemli bir denatürasyona neden olmadığı gösterilmiştir. Bu durumun aksine 85°C'de 30 dk ısıl işlem görmüş BLG örneklerinde native BLG bandının neredeyse kaybolduğu ve daha büyük molekül ağırlığına sahip dimer ve oligomerlerin oluştuğu gözlemlenmiştir. Bu veriler literatürde yapılan BLG'in model sistem çalışması ile uyum içindedir. Yapılan çalışmada BLG'nin 70 °C sıcaklığın üzerinde denatürasyona uğradığı belirtilmiştir [12]. Ayrıca bu sonuçlar tez çalışması kapsamında yapılan süt örnekleri ile yapılan Native-PAGE uygulaması ile de paralellik göstermektedir.

YÇE ilavesinin ısıl işlem görmemiş BLG örneklerinde önemli bir etki göstermediği, gözlemlenen benzer bant yoğunlukları nedeni ile düşünülmektedir. Buna karşın, 65°C'de 30 dk ısıl işlem uygulanan BLG örneklerinin bant profilinde önemli değişimler gözlemlenmiştir. 500 ppm YÇE ilavesi sonrası 65°C'de 30 dk ve 85°C'de 30 dk uygulanan ısıl işlem sonucunda native BLG monomeri bant genişliğinde önemli bir

azalma gözlemlenmiştir. Sözü edilen örneklerde monomer bant genişliğinin azalmasına karşın daha bulanık ve geniş bir alana yayılan bant görüntüsünün, BLG ile YÇE fenoliklerinin oluşturduğu komplekslerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Isıl işlem görmüş örneklerde YÇE derişimi de bant profilini etkilemiş olmasına rağmen, bağlanma karakteristiklerini yorumlamak bu yöntemle mümkün olmamakta ve ileri analizler gerektirmektedir. 85°C’de 30 dk ısıl işlem uygulanmış YÇE içermeyen örneklerde gözlemlenen dimer ve oligomer oluşumlarının, 500 ppm ve 1000 ppm YÇE ilavesi ile kaybolduğu, bunun yerine daha geniş bir alanda daha silik bir şekilde dağıldığı görülmektedir. Bu durum denatüre BLG ile fenolik etkileşimlerinin BLG’nin ısıl işlem ile indüklenen polimerleşmesine YÇE’nin önemli oranda etki ettiğini göstermektedir. Sıcaklık arttıkça denatürasyona bağlı olarak BLG’e ait dimerler ve oligomerlerin oluştuğu literatürde belirtilmiştir [13], bu etki jel görüntüsünde de görülebilmektedir

BLG ve KCN arasındaki ısıl işlem kaynaklı etkileşimlere YÇE fenoliklerinin belirlenebilmesi amacı ile yürütülen Native-PAGE sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.16’de görülmektedir. Bu amaçla mode BLG denemelerindeki aynı sıcaklık uygulamaları ve YÇE ilavesi BLG-KCN kompleksi için uygulanmıştır.



Şekil 4.16. Model Sistemlerde BLG ve KCN kompleksine ait Native PAGE görüntüsü

(1: ısıtıl işlem uygulanmamış BLG +KCN, 2: 65°C ısıtıl işlem uygulanmış BLG +KCN, 3: 85 °C ısıtıl işlem uygulanmış BLG +KCN, 4: ısıtıl işlem uygulanmamış BLG +KCN + 500ppm YÇE, 5: 65°C ısıtıl işlem uygulanmış BLG +KCN + 500ppm YÇE, 6: 65 °C ısıtıl işlem uygulanmış BLG +KCN + 500ppm YÇE, 7: ısıtıl işlem uygulanmamış BLG +KCN 1000ppm YÇE, 8: 65°C ısıtıl işlem uygulanmış BLG +KCN + 1000ppm YÇE, 9: 85 °C ısıtıl işlem uygulanmış BLG +KCN 1000ppm YÇE)

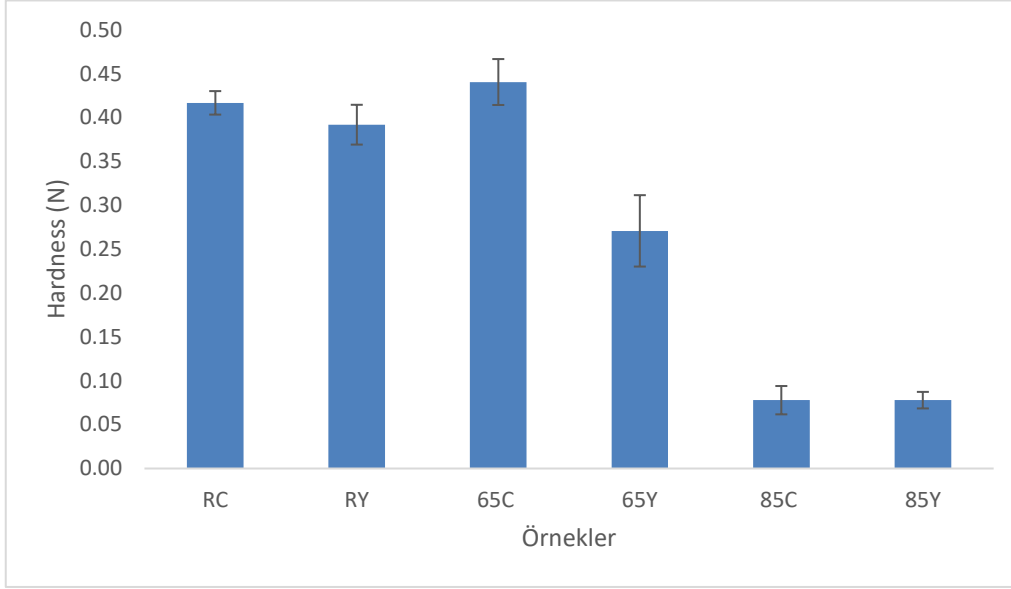
BLG-KCN model sistemlerde ısıtıl işleminin BLG üzerine etkisi saf BLG model sistemler ile benzer olduğu görülmüştür. 85°C'de uygulanan ısıtıl işlem sonrasında native BLG monomerleri neredeyse tamamen denatüre olmuş ve daha kompleks yapıların oluşumuna yol açmıştır. BLG ve KCN arasındaki etkileşimler sonucu olasılıkla oluşan BLG-KCN yapıları, örnek kuyularından jelle girmekte zorlanan ve jelin en üstünde bulunan bant görüntüleri olarak değerlendirilmiştir. Bu komplekslerin 65°C'de uygulanan ısıtıl işlem ile de varlığının gözlemlenebildiği, ancak daha belirgin olarak 85°C'de uygulanan ısıtıl işlem sonrası olduğu gözlemlenebilmektedir. Her iki proteinin de (KCN ve BLG) bant genişliğindeki azalmaya paralel olarak jelin üst kısmında bu iki proteinin etkileşimi ile oluşan bantların varlığı ısıtıl işlem ile indüklenen BLG-KCN interaksiyonlarını işaret etmektedir. Benzer sonuçlar Cho ve ark [12] tarafından da rapor edilmiş ve artan ısıtıl işlem ile BLG-KCN kompleksine ait büyük protein yapılarının oluşumunun da arttığı belirtilmiştir. Isıtıl işlem görmemiş örneklerde BLG bant profili ve yoğunluğu benzer gözlemlenmişken, KCN'e ait bantlarda bir miktar silikleşme ve daha geniş bir alana yayılma olduğu gözlenmektedir. Bu durumun YÇE fenolikleri ile etkileşim sonucu KCN'de meydana gelen yapısal değişimleri işaret ettiği düşünülmektedir. YÇE ilavesinin ardından 65°C ve 85°C'de 30 dk ısıtıl işlem görmüş örneklerde, BLG monomerine ait bantın kaybolduğu ancak aynı bölgede daha silik ve sürüntülü bir bant yoğunluğu olduğu görülmektedir. YÇE ilave edilmemiş örneklerde ısıtıl işlem ile ortaya çıkan BLG-KCN komplekslerinin, YÇE ilave edilmiş örneklerde görülmemesi ya da çok düşük yoğunlukta görülmesi, fenolik bileşiklerin süt proteinleri ve de özellikle BLG ile etkileşiminin BLG-KCN kompleks oluşumunu maskeleydiği düşüncesini doğurmuştur.

4.5. Tekstür Analizi

Mevcut tez çalışması kapsamında hazırlanan rennet jellerine ait Sertlik(Hardness) parametresi değerleri Tekstür Profil Analizi (TPA) cihazı ile belirlenmiştir. Sertlik değeri

üründe belli bir deformasyon yaratmak üzere uygulanan kuvvet (N) şeklinde gösterilmektedir.

Mevcut tez çalışması kapsamında rennet ile farklı ısıl işlem normları ve YÇE ilavesi ile elde edilen süt örneklerinden rennet ile koagülasyon sonucu peynir jelleri hazırlanmıştır. Elde edilen peynir jelleri TPA cihazı ile analiz edilerek Hardness (sertlik) parametresi özelinde incelenmiş ve değerler Şekil 4.17’de belirtilmiştir.



Şekil 4.17: Süt Örneklerinden hazırlanan rennet jellerinin sertlik (hardness) değerleri

Hazırlanan peynir jelleri ile yapılan ölçümlerde YÇE ilavesinin çığ süt ve 65°C ısıl işlem görmüş jelin sertliği azalmış olup 85°C ısıl işlem görmüş süt ile oluşan jelimsi yapı düzgün bir jel yapısı olmamıştır.

Resveratrol ilave edilmiş yoğurt jeli ile yapılan bir çalışmada yoğurdun depolama süreci boyunca yapılan tekstür analizinde sertlik kuvvetleri ölçülmüştür ($p>0,05$). Resveratrolün, pıhtının kırılması için gereken enerjiyi yükselttiği bulunmuştur. Bu durum bağlanma sonucu jelin flexibilitate kazandığı algısı uyandırmış ancak bu sonuç açık bir biçimde kanıtlanamamıştır [54].

Kuru maddesi arttırılmış yoğurt örnekleri ile yeşil çay flavanoidleri ile yapılan bir çalışmada ise, ısıl işlem öncesi ve sonrası flavanoid eklenmesini karşılaştırmak üzere depolama süreleri boyunca sertlik parametresi incelenmek üzere tekstür analizi yapılmıştır. Kuru madde artışına bağlı protein miktarındaki artış, ürünü daha sıkı bir ağ yapıya götürmektedir. Ancak ısıl işlem öncesi eklenen flavanoid bulunan örneğin hardness değerlerinin, ısıl işlem sonrası eklenen flavanoid örneğinkinden daha yüksek

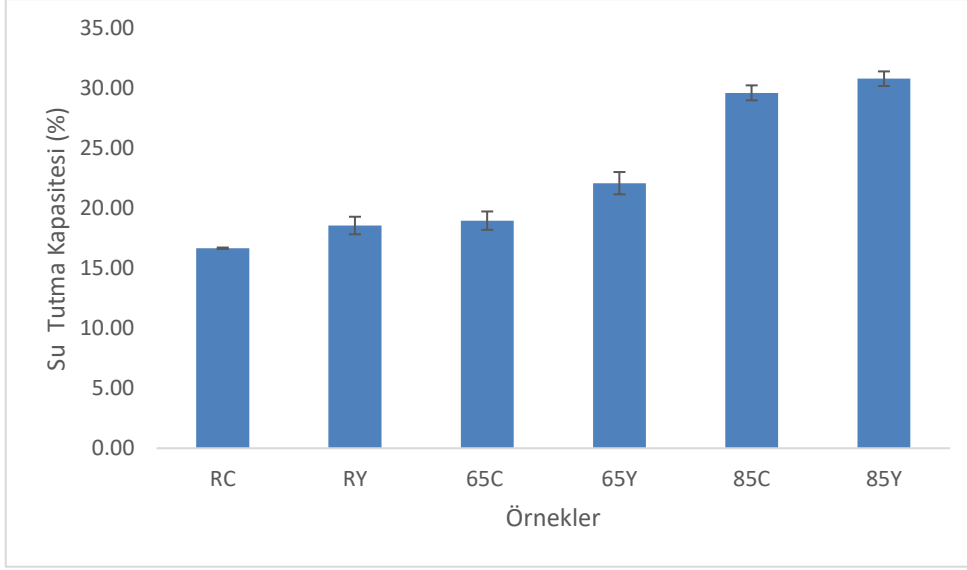
olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeninin, ısı işlem sonrası eklenen flavanoidlerin, önce eklenmesindeki gibi düzenli ve yüksek miktarda bir bağlanma sağlayamaması olduğu düşünülmüş Isıl işlem ile proteinlerde meydana gelen değişimler sonucu bağlanmadaki değişimin net olarak açıklanamaması verilerdeki bu sapmaların açıklanmasına da olanak vermemiştir [55].

Yapılan bir başka çalışmada 77°C, 82°C veya 87°C'de 26 saniye pastörize edilmiş sütte üretilmiş ve 360 gün olgunlaşma süresi olan peynir olgunlaşma süresi boyunca analiz edilmiştir. Artan pastörizasyon sıcaklığı, peynirlerin kırılma stresini, kırılma gerilmesini ve sertliğini önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir [56].

Bu tez kapsamında yapılan çalışmada diğer çalışmalardan farklı olarak. değişen parametrelerden biri olan ısı işlemin farkı ortaya konmaktadır. Native Page analizinde YÇE ilave edilmemiş örneklerde ısı işlem ile ortaya çıkan BLG-KCN komplekslerinin, YÇE ilave edilmiş örneklerde görülmemesi ya da çok düşük yoğunlukta görülmesi, fenolik bileşiklerin süt proteinleri ve de özellikle BLG ile etkileşiminin BLG-KCN kompleks oluşumunu maskeleydiği düşünülmüştür. Literatürdeki bazı çalışmalar [55] [54] fenolik bileşiklerin pıhtı sertliğini arttırdığı yönünde sonuçlara ulaşmıştır ancak bu tez kapsamında ortaya çıkan sonuçlarda YÇE'nin bu etkisi görülememiştir. Bunun sebebinin ısı işlemin pıhtı sertliğini azaltması yönündeki etkisi olduğu düşünülmüştür. Özetle BLG-KCN görüntüsü Native Pagede YÇE tarafından maskelenirken, YÇE'nin pıhtı sertliğine etkisi bu denemede ısı işlem tarafından maskelenmiştir. Bu sonuç yine ısı işlem kullanılarak yapılan çalışma ile de paralellik göstermiştir [56].

4.6. Su Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi

Sırasıyla ısı işlem uygulanmamış sütte elde edilmiş peynir jeli, 65°C/30dk ısı işlem uygulanmış sütte elde edilmiş peynir jeli ve 85 °C/30dk ısı işlem uygulanmış sütte elde edilmiş peynir jeli ve bunların YÇE eklenmiş halleri ile sütte elde edilmiş peynir jeli ile su tutma analizleri yapılmıştır ve sonuçlar Şekil 4.18'de belirtilmiştir.



Şekil 4.18. Süt Örneklerinden hazırlanan rennet jellerinin su tutma kapasiteleri

Su tutma kapasitesi oluşan jelin zayıflığı ile birebir ilintili bir parametredir. Su tutma kapasitesi fazla olan jel yapısal olarak daha zayıf ve yumuşak olur [55].

85°C ısı işlem uygulanmış süt ile hazırlanan jel örneklerinin diğer örneklere göre oldukça yüksek su tutma kapasitesi olduğu görülmüştür. Isıl işlem ile gözlenen bu fark benzer olarak her bir örnek için YÇE ilavesi olan örneklerde de görülmüştür ($p < 0,05$). YÇE ilaveli örnekler su tutma kapasitesi yüksek olan jel oluşumuna neden olmuştur.

Resveratrol ilave edilmiş yoğurt jeli ile yapılan çalışmada resveratrol eklenmesinin, proteinlerle olan etkileşimleriyle güçlü bir yapı oluşturarak su tutma kapasitesini arttıracığı düşünülmüştür. Ancak önemli düzeyde değiştirmedeği gözlenmiştir [54].

Kuru maddesi arttırılmış yoğurt örnekleri ile yeşil çay flavanoidleri ile yapılan bir çalışmada, ısı işlem öncesi ve sonrası flavanoid eklenmesini karşılaştırmak üzere depolama süreleri boyunca su tutma kapasitesi incelenmiştir. Flavanoid eklenmesinin, proteinlerle olan etkileşimleriyle güçlü bir yapı oluşturarak su tutma kapasitesini arttıracığı düşünülmüştür. Analiz sonuçları bunun doğruluğunu ortaya koymuştur. Su tutma kapasitesi açısından her kuru madde içeriğinde ısı işlem sonrası flavanoid eklenen örnekler ile kontrol örnekleri arasında önemli olmamakla birlikte az bir farklılık olduğu gözlenmiştir [55].

Literatürde yapılan sonuçları çelişen bu iki farklı çalışmaya destek olacağı düşünülen bu tez kapsamında hem ısı işlemin su tutma kapasitesine direkt etki eden parametre olduğu söylenebilmektedir. Tekstür analizinde yapılan çıkarımdan yola çıkılarak YÇE'nin su

tutma kapasitesine etkisinin bu denemede ısı işlem tarafından maskelendiği düşünölmüştür.

5. YORUM

Yapılan tez kapsamında, farklı ısıl işlem normlarında farklı derecelerde denatürasyonu hedeflenen BLG ile KCN etkileşimleri ve bu etkileşimlerin polifenol-protein etkileşimlerinden hangi yönde etkileneceği belirlenmeye çalışılmıştır. Bu anlamda, ısıl işlem görmüş ve çiğ süttten elde edilen rennet jellerinde yeşil çay polifenollerinin koagülasyon sürecine etkisi ve bu etkinin ısıl işlem ile ilişkisi değerlendirilmiştir.

YÇE ilavesinin süttün rennet ile koagülasyon sürecine etkisi analizi sonucunda rennet ile koagülasyon sürecinin toplam süresinin YÇE ilavesi ile arttığı, yani süreçlerin YÇE ilavesi ile yavaşladığı gözlemlenmiştir. YÇE ve ısıl işlemin kombine etkisine bakıldığında ısıl işlemin tek başına faz sürelerini önemli ölçüde etkilemediği ancak faz sürelerindeki değişikliğin YÇE ilavesine bağlı olduğu düşünülmüştür

YÇE ilavesinin kazeinomakropeptit (KMP) oluşumuna etkisi incelendiğinde ise koagülasyon denemelerinde YÇE ilavesi ile CN'le fenoliklerin etkileşime girerek kimozinin substratına ulaşmasını zorlaştırabileceği düşünülmüşken bu etki KMP denemelerinde görülmemiş ancak BLG ile KCN etkileşimlerinin özellikle 85°C/30 dk ısıl işlem görmüş süt örneklerindeki KMP oluşum hızının yavaşlamasında etkili olduğu düşünülmüştür.

Dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi ile yapılan deneme sonuçlarında 85 °C 'de BLG yapısı dentüre olarak farklı ikincil yapı sayılarında artış görülmüştür. Hem artan ısıl işlem hem de artan YÇE konsantrasyonu benzer etkiler yarattığı görülmüştür. Uzak görünür bölge gerçekleştirilen CD ölçümleri sonucu elde edilen veriler, ikincil yapı elementlerinin YÇE ilavesi ile çok önemli ölçüde değiştirmedeğini göstermiştir. BLG-KCN sistemlerinde değişikliğin en fazla gözlemlendiği alan hem sıcaklık hem YÇE etkisi ile 85°C/30 dk ısıl işlem uygulanmış örnek olup diğer iki örnekte (65°C/30 dk ısıl işlem uygulanmış ve ısıl işlem uygulanmamış süt örnekleri) önemli bir fark gözlemlenmemiştir. ($p>0,05$). Yakın görünür bölge ölçüm sonuçlarına bakıldığında üçüncül yapı değişiklikleri için Trp19 bölgesindeki negatif tepeleri dikkate alınmıştır. Trp19 absorbansı ile üçüncül yapıdaki değişikliğin en fazla gözlemlendiği alan hem sıcaklık hem YÇE etkisi ile 85°C ile çalışılan örnek olup daha sonra sırasıyla 65°C ve ısıl işlem uygulanmamış süt örnekleri olmuştur. YÇE ile etkileşimin açıkça ortaya koyduğu farklılık özellikle 85°C'de BLG-KCN etkileşimleri varlığında yakın görünür bölge

çalışmalarında gözlemlenmiş ve YÇE etkisinin her iki ısı işlem formunda da üçüncül yapı değişikliklerine neden olduğu gözlemlenebilmiştir.

Native- PAGE çalışmasında YÇE fenoliklerinin BLG ve BLG-KCN kompleksi ile etkileşiminin BLG'nin artan denatürasyon derecesi ile arttığı belirlenmiştir.

Denatüre BLG ile fenolik etkileşimlerinin BLG'nin ısı işlem ile indüklenen polimerleşmesine YÇE'nin önemli oranda etki ettiğini göstermektedir.

BLG-KCN model sistemlerde ısı işleminin BLG üzerine etkisi saf BLG model sistemler ile benzer olduğu görülmüştür. YÇE ilavesinin ardından 65°C 30 dk ve 85°C'de 30 dk ısı işlem görmüş örneklerde, BLG monomerine ait bandın kaybolduğu ancak aynı bölgede daha silik ve sürüntülü bir bant yoğunluğu olduğu görülmektedir.

Tekstür analizinde oluşturulan jel ile yapılan ölçümlerde YÇE ilavesinin çiğ süt ve 65°C ısı işlem görmüş jelin sertliği azalmış olup 85 °C ısı işlem görmüş süt ile oluşan jelimsi yapıda rennet jeli sıklığına ulaşamamıştır bu sebeple yorumlanması doğru olmayacaktır. Çiğ Süt ve 65 °C/30dk ısı işlem görmüş sütle yapılan jellerde ise sertliğin azalmasını etkileyen parametre YÇE ilavesi değil değil ısı işlem olmuştur. Tekstür analizinde yapılan çıkarımdan yola çıkılarak YÇE'nin su tutma kapasitesine etkisinin bu denemede ısı işlem tarafından maskelendiği düşünülmüştür.

Tez kapsamındaki tüm analiz sonuçları gözden geçirildiğinde yapılan analizlerde ısı işleminin bir sonucu olarak ortaya çıkan BLG- KCN etkileşimleri üzerine YÇE ilavesinin etkisi olduğu açık bir şekilde ortaya konmuştur. Bu etki BLG denatürasyonu ile beraber BLG-KCN etkileşimlerinin kimozinin substratına ulaşmasını zorlaştırabileceği ile paralel olarak YÇE ilavesi ile de CN'le fenoliklerin etkileşime girerek kimozinin substratına ulaşmasını zorlaştıracak şekilde olmuştur. BLG denatürasyonunu YÇE etkisi belirginleştirmiştir. Native PAGE analizlerinde ısı işlem ile oluşan büyük agregatların YÇE varlığında oluşmadığı görülmüş ve YÇE'nin protein-protein etkileşimlerine bu yönde etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Isı işlem ve YÇE ilavesinin özellikle BLG'ün denatüre olduğu sıcaklık normlarında peynir jellerinin özelliklerini değiştireceği kanısına varılmıştır.

Gıdaların protein bileşeninin biyoaktif bileşenlerin taşıyıcı olarak kullanımı, herhangi bir duyuşsal olumsuzluğa yol açmaksızın, bu bileşiklerin bağırsaklara taşınımını hedefleyen fonksiyonel gıdaların üretimi gündemdedir. Bu anlamda, süt ürünleri hem yüksek

besleyici değeri hem de tüketime miktarları dikkate alındığında önem taşımaktadır. Çeşitli süt ürünlerinin fenolik bileşikler ya da ekstraktlar ile zenginleştirilerek üretilmesi konusunda çeşitli çalışmalar literatürde yer almaktadır. Ancak bu çalışmaların çoğunun, elde edilen fonksiyonel üründe fenolik bileşiklerin biyolojik aktiviteleri üzerine yoğunlaştığı görülmektedir. Proses sırasında karşılaşılabilecek problemleri önceden görmek ve proses şartlarını optimize etmek amacı ile süreç boyunca fenolik bileşiklerin gıdalardaki makromoleküller ile etkileşiminin belirlenmesi elzemdir. Bu tez çalışması ile fenolik bileşiklerin, ısıl işlem ile indüklenen protein-protein etkileşimlerini nasıl yönlendirdiği belirlenmiş ve fonksiyonel peynir üretiminde optimize edilmesi gereken işlem basamaklarının belirlenebileceği düşünülmüştür.

Tez çalışması sonucu elde edilen verilerin, yoğun olarak çalışılan protein-fenolik etkileşimleri ve fonksiyonel süt ürünleri üretiminde karşılaşılabilecek sonuçlara dair literatüre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir. Literatür katkısının yanı sıra yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bulguların özellikle ısıl işlem uygulanacak fonksiyonel süt ürünleri üretimine önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bunun sebebi özellikle süte ilave edilen polifenollerin süte uygulanacak olan ısıl işlemlerle etkisinin ne yönde olacağı bu tez kapsamında ortaya konmuştur. Ürün tasarımında özellikle ısıl işlem normlarına karar verirken polifenol-protein ya da protein-protein etkileşimlerinin son üründe hangi sonuçlara yol açabileceğine ışık tutan bu çalışmanın yeni ürün tasarım çalışmalarına katkıda bulunması düşünülmektedir.

Bu çalışma sonrasında özellikle farklı sıcaklık normlarında farklı polifenoller ve süt proteinleri ile yapılan çalışmalar çeşitlendirilebilir. Özellikle bağlanma karakteristiklerinin ısıl işlem ile ne şekilde değiştiği matematiksel çalışmalarla sayısal bir şekilde ortaya konması önerilmektedir. Aynı zamanda YÇE ilavesinin antioksidan aktiviteyi ısıl işlem varlığında ne yönde değiştireceği araştırılmalı ve net sonuçlarla ortaya konulmalıdır. Bu çalışmalar sonucunda fonksiyonel süt ürünleri üretiminde polifenolün eklenmesinin olumlu yanları ortaya koyulmalıdır.

6. KAYNAKLAR

- [1] Fox, P F., McSweeney, P.L.H Dairy Chemistry and Biochemistry, No. 637 F6, Blackie Academic & Professional Inc, London, **1998**.
- [2] Walstra, P., and Jenness. R., *Dairy chemistry & Physics*. John Wiley & Sons Inc, New York, **1984**.
- [3] Payens, T. A. J. "Stable and unstable casein micelles." *Journal of dairy science*, 65.10, 1863-1873, **1982**.
- [4] Yıldırım S., Farklı Orijinden Sütlerin Rennetlenme Kinetiklerinin Yüzey Hidrofobisitesi Yaklaşımıyla İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2014**.
- [5] Hayaloğlu, A.A., Özer. B., *Peynir Biliminin Temelleri*, Sidaş Inc, İzmir, **2011**.
- [6] Bylund, G., Dairy Processing Handbook, Tetra Pak Processing Systems AB, Sweden, **1995**.
- [7] Thomas, M. E. C., J. Scher, and S. Desobry."Lactose/ β -lactoglobulin interaction during storage of model whey powders." *Journal of dairy science* 87.5, 1158-1166, **2004**.
- [8] Al-Shabib, N. A., Khan, J. M., Malik, A., Rehman, M. T., AlAjmi, M. F., Husain, F. M., & Altwajry, N."Molecular interaction of tea catechin with bovine β -lactoglobulin: A spectroscopic and in silico studies." *Saudi Pharmaceutical Journal* 28.3,238-245, **2020**.
- [9] Fox, F.P., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P., *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology Volume 1: Geneal Aspects*, 2.Edition, Aspen Publishers Inc., Maryland, **1999**.
- [10] Sandra, S., Marcela Alexander, and Douglas G. Dalgleish. "The rennet coagulation mechanism of skim milk as observed by transmission diffusing wave spectroscopy." *Journal of Colloid and Interface Scienc,e* 308.2,364-373, **2007**.
- [11] Horne,D S., and Lucey, J A. , *Cheese*, Academic Press Inc, **2017**.
- [12] Cho, Y., Singh, H., & Creamer, L. K., "Heat-induced interactions of [Beta]-lactoglobulin A and [kappa]-casein B in a model system." *The Journal of dairy research*, 70(1), 61 , **2003**.

- [13] Mulvihill, D., M. ve Donovan, M., Whey Proteins and their Thermal Denaturation - A Review, Department of Food Chemistry, University College, Cork, *Irish Journal of Food Science and Technology* 11: 43-75, **1987**.
- [14] Gündoğdu, E., Yıldız, H., & Çakmakçı, S. "Süt Bileşenleri Üzerine Isıl İşlemin Etkileri ve Besin Değeri Konusunda Değerlendirmeler." *International Journal of Agricultural and Natural Sciences*, 5(1), 162-165., **2012**.
- [15] Şahan, N., & Konar, A., "Peynir işlenecek süte uygulanan farklı işlemlerin peynir suyu niteliğine etkisi." *Gıda*, 20(3), **1995**.
- [16] Koçak, C., & Devrim, H., "Isıl işlemin inek ve koyun sütlerinin peynir mayası ile pıhtılaşma yeteneği üzerine etkisi". *Gıda*, 14(1), **1989**.
- [17] Gan, R. Y., Chan, C. L., Yang, Q. Q., Li, H. B., Zhang, D., Ge, Y. Y., & Corke, H. "Bioactive compounds and beneficial functions of sprouted grains." AACC International Press Inc; **2019**.
- [18] Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. "Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance.", *Plant science*, 196, 67-76., **2012**.
- [19] Babu, P. V. A., & Liu, D., *Complementary and Alternative Therapies and the Aging Population*, Academic Press Inc, **2009**.
- [20] Beecher, G. R., Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *The Journal of nutrition*, 133(10), 3248S-3254S, **2003**.
- [21] Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A., Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & redox signaling*, 18(14), 1818-1892., **2013**.
- [22] Higdon, J. V., & Frei, B., "Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions.", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43:1, 89-143, **2003**.
- [23] Yildirim-Elikoglu, S., & Erdem, Y. K. "Interactions between milk proteins and polyphenols: Binding mechanisms, related changes, and the future trends in the dairy industry.", *Food reviews international*, 34(7), 665-697., **2018**.

- [24] Kardum, N., & Glibetic, M., *Advances in food and nutrition research* (Vol. 84) Academic Press Inc, **2018**.
- [25] Liang L., Tajmir-Riahi, H. A., Subirade M., Interaction of β -lactoglobulin with resveratrol and its biological implications, *Biomacromolecules*, 9 , 50–56, **2008**.
- [26] Bourassa, P., Kanakis, C.D., Tarantilis, P., Pollissiou, M.G., Tajmir-Riahi, H.A., Resveratrol, Genistein, and Curcumin bind Bovine Serum Albumin, *Journal of Physical Chemistry*, 114, 3348-3354, **2010**.
- [27] Yüksel, Z., and Erdem, Y.K., The influence of transglutaminase treatment on functional properties of set yogurt, *International Journal of Dairy Technology*, 63, 86-97, **2010**.
- [28] Nozaki, A., Hori, M., Kimura, T., Ito, H., & Hatano, T., “Interaction of polyphenols with proteins: binding of (–)-epigallocatechin gallate to serum albumin, estimated by induced circular dichroism.”, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 57(2), 224-228 , **2009**.
- [29] Dufour, C., & Dangles, O., “Flavonoid–serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy.”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1721(1-3), 164-173., **2005**.
- [30] Huang, Y. W., Zhu, Q. Q., Yang, X. Y., Xu, H. H., Sun, B., Wang, X. J., & Sheng, J. “Wound healing can be improved by (—)-epigallocatechin gallate through targeting Notch in streptozotocin-induced diabetic mice”. *The FASEB Journal*, 33(1), 953-964, **2019**.
- [31] Yildirim-Elikoglu, S., Vural, H., & Erdem, Y. K., “Effect of phenolic compounds on the activity of proteolytic enzymes during rennet induced coagulation of milk and ripening of miniature cheese.” *LWT*, 136, 110337, **2021**.
- [32] I. Hasni, P. Bourassa, S. Hamdani, G. Samson, R. Carpentier, H.A. Tajmir-Riahi, Interaction of milk α - and β -caseins with tea polyphenols, *Food Chemistry*, 126:630-639, **2011**.
- [33] C.D. Kanakis, I. Hasni, P. Bourassa, P.A. Trantilis, M.G. Polissiou, H.A. Tajmir-Riahi, Milk beta-lactoglobulin complexes with tea polyphenols, *Food Chemistry*, 127, 1046-1055, **2011**.

- [34] L. Fu, Y. Sun, L. Ding, Y. Wang, Z. Gao, Z. Wu, Z. Wang, W. Li, Y. Bi, Mechanism evaluation of the interactions between flavonoids and bovine serum albumin based on multispectroscopy, molecular docking and Q-TOF HR-MS analysis, *Food Chemistry*, 203:150-157, **2016**.
- [35] M.P. Almajano, M.E. Delgado, M.H. Gordon, Changes in the antioxidant properties of protein solutions in the presence of epigallocatechin gallate, *Food Chemistry*, 101,126-130, **2007**.
- [36] M. Stojadinovic, J. Radosavljevic, J. Ognjenovic, J. Vesic, I. Prodic, D. Stanic-Vucinic, T. Cirkovic- Velickovic, Binding affinity between dietary polyphenols and β -lactoglobulin negatively correlates with the protein susceptibility to digestion and total antioxidant activity of complexes formed, *Food Chemistry* 136,1263-1271, **2013**.
- [37] Haratifar, S., Corredig, M. ,”Interactions between tea catechins and casein micelles and their impact on renneting functionality” , *Food Chemistry*, 143, 15 , 27-32, **2014**.
- [38] O’connell, J. E., Fox, P. D., Tan-Kintia, R., & Fox, P. F. ,”Effects of tea, coffee and cocoa extracts on the colloidal stability of milk and concentrated milk.” *International Dairy Journal*, 8(8), 689-693, **1998**.
- [39] da Silva, D. F., Matumoto-Pintro, P. T., Bazinet, L., Couillard, C., & Britten, M., “Effect of commercial grape extracts on the cheese-making properties of milk.” *Journal of dairy science*, 98(3), 1552-1562., **2015**.
- [40] Han, J., Britten, M., St-Gelais, D., Champagne, C., Fustier, P., Salmieri, S., Lacroix, M. , “Effect of polyphenolic ingredients on physical characteristics of cheese”, *Food Research Intrnational*, 44, 1, 494-497, **2011**.
- [41] IDF, International Dairy Federation, Milk, cream and evaporated milk - Determination of total solids content (Reference method). IDF Standard 21B, *International Dairy Federation*, Brussels, Belgium, **1987**.
- [42] IDF, International Dairy Federation, Determination of fat contents, gerber butyrometers. IDF Standard 105, *International Dairy Federation*, Brussels, Belgium, **1981**.

- [43] IDF, International Dairy Federation, Dried milk- determination of titratable acidity (routine method), IDF Standard 81, *International Dairy Federation*, Brussels, Belgium, **1977**.
- [44] Baumann, D., Adler, S., Hamburger, M., A simple isolation method for the major catechins in gree tea using high-speed countercurrent choromotography, *Journal of Natural Products*, 64, 353-355.,**2001**.
- [45] C. Thomä, I. Krause, U. Kulozik, Precipitation behaviour of caseinomacropetides and their simultaneous determination with whey proteins by RP-HPLC, *International Dairy Journal*, 16,285–293, **2006**.
- [46] Manderson, G. A., Hardman, M. J., & Creamer, L. K,Effect of heat treatment on the conformation and aggregation of β -lactoglobulin A, B, and C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 5052-5061., **1998**.
- [47] Yüksel, Z., Erdem, Y.K., Modification of Bovine Milk Protein System Caused By Transglutaminase, *The Journal of Food*, 34, 345-350, **2009**.
- [48] Qie, X., Chen, Y., Quan, W., Wang, Z., Zeng, M., Qin, F., ... & He, Z. Analysis of β -lactoglobulin–epigallocatechin gallate interactions: the antioxidant capacity and effects of polyphenols under different heating conditions in polyphenolic–protein interactions. *Food & Function*, 11(5), 3867-3878, **2020**.
- [49] Kelly, S. M., and N. C. Price. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr. Protein Pept. Sci.* 1:349–384, **2000**.
- [50] Townend, R., T. F. Kumosinski, and S. N. Timasheff. 1967. The cir-culation dichroism of variants of β -lactoglobulin. *J. Biol. Chem.* 242:4538–4545, **1967**.
- [51] Qi, P. X., Ren, D., Xiao, Y., & Tomasula, P. M. Effect of homogenization and pasteurization on the structure and stability of whey protein in milk. *Journal of Dairy Science*, 98(5), 2884-2897., **2015**.
- [52] Wada, R., Fujita, Y., & Kitabatake, N. Effects of heating at neutral and acid pH on the structure of β -lactoglobulin A revealed by differential scanning calorimetry and circular dichroism spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1760(6), 841-847.,**2006**.

- [53] Moro, A., Báez, G. D., Busti, P. A., Ballerini, G. A., & Delorenzi, N. JEffects of heat-treated β -lactoglobulin and its aggregates on foaming properties. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1009-1015.,**2011**.
- [54] H. Emirdağı, Resveratrolün Yoğurtta Tekstürel Nitelikleri Geliştirme Olanakları, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2014**.
- [55] E. Avcı, Yeşil Çay Polifenolleri İle Süt Proteinleri Arasındaki Etkileşimlerin Ve Süt Ürünlerinde Neden Olabileceği İşlevsel Değişimlerin Tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2010**.
- [56] Rynne, N. M., Beresford, T. P., Kelly, A. L., & Guinee, T. P. Effect of milk pasteurization temperature and in situ whey protein denaturation on the composition, texture and heat-induced functionality of half-fat Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 14(11), 989-1001, **2004**

EKLER

EK 1 –Kullanılan Süt örneklerinin Genel Bileşimi

	pH	SH	Protein (g/L)	yağ	Yağsız kuru madde (%)
Çiğ süt	6.48±0.04	6.96±0.32	34.6±2.8	3.7±0.1	8.46±0.32
65C/30 dk ısıtılmış işlem görmüş süt	6.52±0.04	6.52±0.20	33.6±3.2	3.5±0.2	8.32±0.26
85C/30 dk ısıtılmış işlem görmüş süt	6.58±0.05	6.40±0.28	32.8±1.8	3.4±0.2	8.28±0.45

EK 2 –Kullanılan Yeşil Çay Ekstraktının Fenolik İçeriği (1000 ppm derişimde hazırlanan YÇE’de bulunan flavonoid derişimleri)

Flavonoid	C	EC	ECG	EGC	CG	EGCG	GCG	TOPLAM
Derişim (mg/L)	20.3	82.2	68.0	49.6	10.2	203.5	5.9	439.7
% Flavonoid	4.6	18.7	15.5	11.3	2.3	46.3	1.3	100

EK 6 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu

