



**ISIL İŞLEM VE HOMOJENİZASYONUN UHT  
SÜTLERDE PROTEİN YAPISI ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF THE EFFECES OF HEAT  
TREATMENT AND HOMOGENIZATION ON PROTEIN  
STRUCTURE IN UHT MILK**

**DİLEK KELGÖKMEN**

**PROF. DR. ALİ TOPCU**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Gıda Mühendisliğı Anabilim Dalı için Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2022





## ÖZET

# ISIL İŞLEM VE HOMOJENİZASYONUN UHT SÜTLERDE PROTEİN YAPISI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

**Dilek KELGÖKMEN**

**Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ali TOPCU**

**Eş Danışman: Prof. Dr. Barbaros ÖZER**

**Nisan 2022, 109 sayfa**

Süte uygulanan ısı işlem süresince şiddetine bağlı olarak, serum proteinlerinin denatürasyonu,  $\kappa$ -kazein/ $\beta$ -laktoglobulin kompleks oluşumu, kalsiyum fosfat presipitasyonu, Maillard reaksiyonu gibi fizikokimyasal değişimler meydana gelebilmektedir. Bu çalışmanın amacı farklı üretim teknolojileri kullanılarak üretilen UHT sütlerde (direkt enjeksiyon ve indirekt tubular ısı işlem), UHT yönteminin ve homojenizasyon sırasının (ısı işlem öncesi ya da sonrası) proteinler üzerine olası etkilerinin incelenmesidir. Araştırma sonucunda farklı hedef gruplar için geliştirilecek süt bazlı sıvı ürünlerin üretiminde kullanılacak teknolojilere karar verme sürecinde belirleyici olacağı düşünülmektedir. Yerel bir süt firmasında belirtilen amaçlar doğrultusunda UHT süt üretimleri yapılmıştır. Kontrol grubu olarak çiğ süt ve kaynatılmış (100 °C, 10 dk) süt örnekleri kullanılmıştır.

Çiğ sütün ve ısıtılmış sütlerin pH sı 4.6 ya getirilerek izoelektrik kazein elde edilmiştir. Aynı zamanda tüm süt örneklerinden ultrasantrifüj işlemi kullanılarak (135000xg, 60 dk, 20 °C) koloidal kazein de elde edilmiştir. Santrifüj işlemi ile ayrılan serum ve pellet dondurularak muhafaza edilmiş, daha sonra ise liyofilizasyon işlemine tabi tutularak dondurularak kurutulmuştur. Örnekler titreşimsel (vibrasyonel) yöntemlerle incelenerek ısıtılmış süt yönteminin ve homojenizasyon sırasının süt protein konformasyonundaki olası etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, Azaltılmış Toplam Yansımali Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) ve Raman spektroskopisi (1064 nm lazer kaynağı) kullanılmıştır. Bu sayede amit (A, B, I-VII) bağları ve diğer konformasyonel bağların varlığına bağlı olarak proteinlerin  $\alpha$ -heliks,  $\beta$ -sheet (tabakalı) yapılar ve değişimleri hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. Genel olarak; çiğ sütle karşılaştırıldığında UHT uygulaması ve homojenizasyon kombinasyonunun süt proteinlerinin serum fazındaki dağılımını farklılaştırdığını ve protein konformasyonunda değişimlere neden olduğu vibrasyonel analiz yöntemleri ile ortaya konmuştur.

Süt örneklerinin ATR-FTIR ve Raman spektrumları ele alındığında, UHT süt üretiminde kullanılan teknolojilerin (direkt veya indirekt) ve homojenizasyon uygulamalarının protein konformasyonları üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Genel olarak örneklere ait Raman spektrumları arasında pik profilleri bakımından belirgin farklılıklar görülmemekle birlikte, pik yoğunluklarının UHT uygulama modeline göre değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Ölçümlerin değerlendirilmesinde kemometrik yöntemlerden temel bileşen analizi (PCA) kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda süte uygulanan homojenizasyon sırası ve ısıtılmış süt yöntemi değişikçe, özellikle proteinlerin ikincil yapısını belirlemede kullanılan amit-I 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$  bölgesinde ve proteinler hakkında genel bilgi veren amit-II 1600-1500  $\text{cm}^{-1}$  bölgesinde farklılıklar gözlemlenmiştir. Sonuç olarak dipol-moment değişimleri, hidrojen bağları,  $\alpha$ -heliks,  $\beta$ -tabakalı ve  $\beta$ -turns (sarmal) yapılarındaki geometrik yönlendirmeden faydalanılarak sıcaklığın etkisi ile süt proteinlerinin ikincil yapısındaki değişimler vibrasyonel yöntemler ile kolay ve hızlıca belirlenebilir, UHT süt üretim modifikasyonları dizayn edilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** UHT Süt, ATR-FTIR, Raman, süt proteinleri, ısıtılmış süt, homojenizasyon

## **ABSTRACT**

# **INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF HEAT TREATMENT AND HOMOGENIZATION ON PROTEIN STRUCTURE IN UHT MILK**

**Dilek KELGÖKMEN**

**Master of Science Department of Food Engineering**

**Supervisor: Prof. Dr. Ali TOPCU**

**Co-Supervisor: Prof. Dr. Barbaros ÖZER**

**April 2022, 109 pages**

Depending on the severity of the heat treatment applied to milk, physicochemical changes such as denaturation of serum proteins,  $\kappa$ -casein/ $\beta$ -lactoglobulin complex formation, calcium phosphate precipitation, Maillard reaction may occur. The aim of this study is to examine the possible effects of UHT method and homogenization sequence (before or after heat treatment) on proteins in UHT milk produced using different production technologies (direct injection and indirect tubular heat treatment). As a result of the research, it is thought that the technologies to be used in the production of milk-based liquid products to be developed for different target groups will be decisive in the decision-making process. UHT milk samples were produced in a local dairy company according to the stated purposes. Raw milk and boiled (100 °C, 10 min) milk samples were used as a control group.

Isoelectric casein was obtained by bringing the pH of raw milk and heat-treated milk to 4.6. At the same time, colloidal casein was obtained from all milk samples using ultracentrifugation (135000xg, 60 min, 20 °C). Serum and pellet separated by centrifugation were preserved by freezing and then freeze-dried. The possible effects of the heat treatment method and homogenization order on milk protein conformation were investigated by analysis the samples with vibrational methods. For this purpose, Attenuated Total Reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) and Raman spectroscopy (1064 nm laser source) were used. In this way, important information was obtained about the  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet structures, and changes in proteins depending on amide (A, B, I-VII) bonds and other conformational bonds. Generally, compared with raw milk, it was demonstrated by vibrational analysis methods that the combination of UHT application and homogenization differentiated the distribution of milk proteins in the serum phase and caused changes in protein conformation.

According to ATR-FTIR or Raman spectra of milk samples, it was determined that the technologies (direct or indirect) used in UHT milk production and homogenization applications were effective on protein conformations. Although there are no significant differences in peak profiles between the Raman spectra of the samples in general, it has been determined that the peak intensities vary according to the UHT application model. Principal component analysis (PCA), one of the chemometric methods, was used in the evaluation of the measurements. As a result of the studies, as the homogenization order and heat treatment method applied to milk changed, differences were observed especially in the Amid-I 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$  region, which is used to determine the secondary structure of proteins, and in the Amid-II 1600-1500  $\text{cm}^{-1}$  region, which gives general information about proteins. As a result, the changes in the secondary structure of milk proteins with the effect of temperature can be determined easily and quickly by using the geometric orientation in the structures of dipole-moment changes, hydrogen bonds,  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheets and  $\beta$ -turns, and UHT milk production modifications can be designed.

**Keywords:** UHT Milk, ATR-FTIR, Raman, milk proteins, heat treatment, homogenization



## TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmalarım boyunca desteğini, yardım ve bilgisini benden esirgemeyen, yalnızca akademik hayatımda değil her daim desteğini hissettiğim, her anlamda örnek aldığım, değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ali TOPCU'ya,

Tez çalışmam süresi boyunca bilgi ve tecrübesi, yapıcı ve yönlendirici yaklaşımı ile çalışmama katkı sağlayan değerli hocam ve eş danışmanım Sayın Prof. Dr. Barbaros ÖZER'e,

Tez çalışmamın gerçekleşmesi için gerekli cihazları kullanmama olanak sunan, tecrübesi ile çalışmama destek sağlayan Sayın Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI'ya,

Onlarla çalıştığım için kendimi hep şanslı hissettiğim, bana benden çok inanan, cesaretlendiren sevgili hocam Araş. Gör. Tuğba BULAT ve sevgili hocam Araş. Gör. Nur YAZGAN'a,

Yüksek lisansım boyunca çalışma arkadaşı ve grup arkadaşı olmaktan öte bir aile olduğumuzu hissettiren, bu dönemi keyifli kılan Ece KONURALP, Çiğdem ESMERTAŞ, Fuat GÖKBEL, Sattar EGHBALIAN, Esra ÜNVER, Melisa YALÇIN ve tüm dairy research group ekibine,

Bu çalışmayı, "2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Tez Bursu" ve "1170949 numaralı proje ile TÜbitak 1001 Bilimsel Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı" kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a,

Araştırma materyalleri Panagro Entegre Et-Süt İşletmesi A.Ş. (Torku, Konya) endüstriyel üretim hatları ve pilot UHT/homojenizasyon hattı kullanılarak üretilmiştir. Bu olanakları sağlayan Panagro Entegre Et-Süt İşletmesi A.Ş'ye

Her kararımda olduğu gibi yüksek lisans çalışmalarım boyunca beni destekleyen, her koşulda yanımda olduklarını bildiğim, beni bugünlere getiren canım babam Dilaver KELGÖKMEN, canım annem Kezban KELGÖKMEN ve hayat enerjisiyle bana hep motivasyon veren, umutsuzluğa kapıldığım anda tekrar inanmamı sağlayan canım kardeşim Duygu KELGÖKMEN'e,

Son olarak desteği, sabrı ve anlayışı ile yanımda olduğunu her daim hissettiren sevgili Özal GÜLEÇ'e teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Süt Bileşenleri .....	4
2.2. Süt Proteinleri.....	5
2.2.1. Serum Proteinleri.....	6
2.2.2. Kazein.....	8
2.3. Süt Üretimi İçin Uygulanan Isıl İşlem Yöntemleri .....	12
2.3.1. Direkt Isıl İşlem.....	13
2.3.2. İndirekt Isıl İşlem .....	15
2.4. UHT Sütte Isıl İşlem Sonucu Meydana Gelen Değişimler .....	18
2.4.1. Fiziksel Değişimler .....	18
2.4.2. Kimyasal Değişimler.....	19
2.5. Homojenizasyon.....	25
2.6. Protein Yapılarının Tespitinde Kullanılan Analiz Metotları.....	28
2.6.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) .....	28
2.6.2. Elektroforez.....	29
2.6.3. Vibrasyonel (Titreşimsel) Yöntemler.....	30
2.7. FT-Raman ve FTIR Spektroskopisinin Süt Proteinlerinin Belirlenmesinde Kullanımı.....	37
2.8. Temel Bileşen Analizi (Principal Component Analysis, PCA) .....	39

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	43
3.1. Materyal .....	43
3.2. Metot .....	44
3.2.1. Kimyasallar ve Malzemeler .....	44
3.2.2. Temel Bileşim Analizleri.....	44
3.2.3. Süt Proteinlerinin Ayırımı .....	45
3.2.4. RP-HPLC ile Peptit Profilinin Belirlenmesi .....	47
3.2.5. ATR-FTIR Analizi.....	48
3.2.6. FT-Raman Analizi .....	48
3.2.7. Temel Bileşen Analizi (PCA).....	50
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	51
4.1. Temel Bileşim Analizi Sonuçları.....	51
4.2. RP-HPLC Analizi Sonuçları.....	51
4.3. Vibrasyonel Analizlerin Değerlendirmesi .....	58
4.3.1. Süt Örneklerinde ATR-FTIR Analiz Sonuçları .....	62
4.3.2. Süt Örneklerinde FT-Raman Analiz Sonuçları.....	65
4.3.3. pH4.6-çözünmeyen Fraksiyonda ATR-FTIR Analiz Sonuçları .....	67
4.3.4. pH4.6-çözünmeyen Fraksiyonda FT-Raman analiz sonuçları.....	70
4.3.5. Ultrasantrifüj-pelet ATR-FTIR Analiz Sonuçları.....	71
4.3.6. Ultrasantrifüj-pelet FT-Raman Analiz Sonuçları .....	75
4.3.7. pH4.6-çözünen Fraksiyonda ATR-FTIR Analiz Sonuçları .....	77
4.3.8. pH4.6-çözünen Fraksiyonda FT-Raman Analiz Sonuçları.....	79
5. YORUM.....	82
6. KAYNAKLAR .....	87
EKLER.....	99
EK 1.1. Süt tozu örneğine ait ATR-FTIR sonuçlarının temel bileşim analizi loading grafikleri.....	99
EK 1.2. Süt tozu örneğine ait FT-Raman sonuçlarının temel bileşim analizi loading grafikleri.....	100
EK 1.3. Süt örneklerinin pH4.6-çözünmeyen fraksiyonuna ait ATR-FTIR sonuçlarının temel bileşim analizi loading grafikleri.....	101

EK 1.4. Süt örneklerinin pH4.6-çözünmeyen fraksiyonuna ait FT-Raman sonuçlarının temel bileşim analizi loading grafikleri .....	102
EK 1.5. Süt örneklerinin ultrasantrifüjü sonucu oluşan pelete ait ATR-FTIR sonuçlarının temel bileşim analizi loading grafikleri .....	103
EK 1.6. Süt örneklerinin ultrasantrifüjü sonucu oluşan pelete ait FT-Raman sonuçlarının temel bileşim analizi loading grafikleri .....	104
EK 1.7. Süt örneklerinin pH4.6-çözünen fraksiyonuna ait ATR-FTIR sonuçlarının temel bileşim analizi loading grafikleri .....	105
EK 1.8. Süt örneklerinin pH4.6-çözünen fraksiyonuna ait FT-Raman sonuçlarının temel bileşim analizi loading grafikleri .....	106
EK 2. Tez Çalışması Orjinallik Raporu .....	107
ÖZGEÇMİŞ .....	109

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. UHT Süt Üretimi için Isıl İşlem Yöntemleri.....	12
Şekil 2.2. Direkt ısıtım yönteminin uygulamada kullanımı (Kelleher ve ark., 2018)'den uyarlanmıştır. ....	13
Şekil 2.3. Direkt UHT infüzyon yöntemi ile süt üretim akış şeması .....	14
Şekil 2.4. Direkt UHT enjeksiyon yöntemi ile süt üretim akış şeması .....	14
Şekil 2.5. Plakalı ısı değiştirici ile UHT süt üretimi yapılan fabrikalarda üretim akış planı .....	16
Şekil 2.6. Borulu ısı değiştirici ile UHT süt üretimi yapılan fabrikalarda üretim akış planı .....	16
Şekil 2.7. Sıyırıcı yüzeyli ısı değiştirici.....	17
Şekil 2.9. Serum proteini, kazein ve yağ globüllerinin yapısı .....	26
Şekil 2.10. IR spektrumunda gözlemlenebilen titreşim modları. ....	30
Şekil 2.11. FTIR spektroskopisi . ....	32
Şekil 2.12. FTIR spektroskopisi çalışma prensibi . ....	33
Şekil 2.13. Raman saçılması ve Rayleigh saçılması gösterimi. ....	36
Şekil 2.14. İki boyutlu PCA'in geometrik olarak gösterimi .....	40
Şekil 3.1. 2N HCl ile pH' sı 4.6' ya ayarlanan süt örneği. ....	45
Şekil 3.2. pH4.6'da santrifüj sonrası kazein (presipitat), serum ve yağ fazı (en üst tabaka) .....	46
Şekil 3.3. Santrifüj sonrası pH4.6-çözünmeyen fraksiyonun (presipitat) liyofilizasyonu .....	46
Şekil 3.4. Ultrasantrifüj sonrası faz ayrımları ve peletin görünümü .....	46
Şekil 3.5. ATR kristali üzerine koyulmuş liyofilize örnek. ....	48
Şekil 3.6. Raman spektroskopisi toz örnekler için uygun olan modül. ....	49
Şekil 3.7. FT-Raman spektroskopisi.....	49
Şekil 4.1. pH4.6-çözünen fraksiyonlara ait HPLC kromatogramları (280 nm ve 214 nm; 1:α-LA; 2: β-LG-B; 3: β-LG-A; PA: çiğ süt pH4.6-çözünen fraksiyon; PB: kaynatılmış süt pH4.6-çözünen fraksiyon ).....	52

<b>Şekil 4.2.</b> pH4.6-çözünen fraksiyonlara ait HPLC kromatogramları (280 nm ve 214 nm; 1:α-LA; 2: β-LG-B; 3: β-LG-A; PA: çiğ süt pH4.6-çözünen fraksiyon; PE: indirekt UHT (Homj. önce) pH4.6-çözünen fraksiyon; PD: indirekt UHT (Homj. sonra) pH4.6-çözünen fraksiyon).....	53
<b>Şekil 4.3.</b> pH4.6-çözünen fraksiyonlara ait HPLC kromatogramları (280 nm ve 214 nm; 1:α-LA; 2: β-LG-B; 3: β-LG-A; PA: çiğ süt pH4.6-çözünen fraksiyon; PC: indirekt UHT (Homj. yok) pH4.6-çözünen fraksiyon; PF: direkt UHT (Homj. sonra) pH4.6-çözünen fraksiyon). .....	54
<b>Şekil 4.4.</b> UHT süt örneklerinde, pH4.6-çözünen fraksiyonun HPLC sonuçlarına (214 nm) ait temel bileşen analizi .....	56
<b>Şekil 4.5.</b> UHT süt örneklerinde, ultrasantrifüj süpernetant'ın HPLC sonuçlarına (214 nm) ait temel bileşen analizi .....	57
<b>Şekil 4.6.</b> UHT süt örneklerinde, pH4.6-çözünen HPLC sonuçlarına (280 nm) ait temel bileşen analizi ..	57
<b>Şekil 4.7.</b> UHT süt örneklerinde, ultrasantrifüj süpernetant'ın HPLC sonuçlarına (280 nm) ait temel bileşen analizi ..	58
<b>Şekil 4.8.</b> Liyofilize süt tozu örneklerine ait ATR-FTIR spektrumları.....	63
<b>Şekil 4.9.</b> Liyofilize süt tozu örneklerine ait ATR-FTIR spektrumlarının temel bileşim analizi.....	64
<b>Şekil 4.10.</b> Liyofilize süt tozu örneklerine ait FT-Raman spektrumları. ....	65
<b>Şekil 4.11.</b> Liyofilize süt tozu örneklerine ait FT-Raman spektrumlarının temel bileşim analizi.....	66
<b>Şekil 4.12.</b> Süt örneklerinin pH4.6-çözünmeyen faza ait ATR-FTIR grafikleri.....	67
<b>Şekil 4.13.</b> Süt örneklerinin pH4.6-çözünmeyen faza ait ATR-FTIR sonuçlarının temel bileşim analizi.....	69
<b>Şekil 4.14.</b> Süt örneklerinin pH4.6-çözünmeyen faza ait FT-Raman grafikleri. ....	70
<b>Şekil 4.15.</b> Süt örneklerinin pH4.6-çözünmeyen faza ait FT-Raman sonuçlarının temel bileşim analizi.....	71
<b>Şekil 4.16.</b> Süt örneklerinin ultrasantrifüjü sonucu elde edilen pelete ait ATR-FTIR grafiği.....	73
<b>Şekil 4.17.</b> Süt örneklerinin ultrasantrifüjü sonucu elde edilen pelete ait ATR-FTIR sonuçlarının temel bileşim analizi .....	74

<b>Şekil 4.18.</b> Süt örneklerinin ultrasantrifüj sonucu elde edilen pelete ait FT-Raman grafiği. ....	75
<b>Şekil 4.19.</b> Süt örneklerinin ultrasantrifüj sonucu elde edilen pelete ait FT-Raman sonuçlarının temel bileşim analizi. ....	76
<b>Şekil 4.20.</b> Süt örneklerinin pH4.6-çözünen fraksiyonuna ait ATR-FTIR grafiği.....	77
<b>Şekil 4.21.</b> Süt örneklerinin pH4.6-çözünen fraksiyonuna ait ATR-FTIR sonuçlarının temel bileşim analizi.....	78
<b>Şekil 4.22.</b> Süt örneklerinin pH4.6-çözünen fraksiyonuna ait FT-Raman grafikleri .....	79
<b>Şekil 4.23.</b> Süt örneklerinin pH4.6-çözünen fraksiyonuna ait FT-Raman sonuçlarının temel bileşim analizi.....	81

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kazeinlerin ve serum proteinlerinin genel özellikleri (Fox, 2003).....	6
Çizelge 3.1. Deneme deseni ve örnek kodları.....	43
Çizelge 4.1. Süt örneklerine ait temel bileşim analiz ortalama sonuçları (n=3).....	51
Çizelge 4.2. pH4.6 da elde edilen serumlara ait HPLC analiz sonucu. ....	55
Çizelge 4.3. Ultrasantrifüj sonrası elde edilen serumlara ait HPLC analiz sonucu. ....	55
Çizelge 4.5. IR spektroskopisi dalgasayıları ve karşılık gelen fonksiyonel gruplar. ....	59
Çizelge 4.6. Raman spektroskopisi dalgasayıları ve karşılık gelen fonksiyonel gruplar. .....	61
Çizelge 4.6. Raman spektroskopisi dalgasayıları ve karşılık gelen fonksiyonel gruplar (devam).....	62



## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

kDa	kilodalton
M	molarite
Nm	nanometre
$\mu$ L	mikrolitre
mL	mililitre
g	gram
a/h	Hacimce ağırlık
h/h	hacimce çözelti
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\text{cm}^{-1}$	1/Santimetre

### Kısaltmalar

Ala	Alanin
Asp	Aspartat
ATR	Attenuated Total Reflectance (Zayıflatılmış Toplam Yansıtma)
CCD	Charge Couple Device (Yük Eşleşmiş Cihaz)
CN	kazein
Cys	Sistein
Da	Dalton
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
FT-Raman	Fourier Dönüşümlü Raman Spektroskopisi
Ge	Germenyum

Gly	Glisin
GMP	Glikomakropeptid
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HTST	Yüksek Sıcaklık Kısa Sürede Isıl İşlem
IR	Kızılötesi
KBr	Potasyum bromür
kDa	kiloDalton
LC	Sıvı Kromatografisi
Leu	Lösin
LTLT	Düşük Sıcaklık Uzun Sürede Isıl İşlem
Lys	Lizin
Met	Metiyonin
MGFM	Süt Yağ Globül Membranı
NIR	Yakın Kızılötesi Spektroskopisi
PCA	Temel Bileşen analizi
PMT	Fotomultipler tüp dedektör
Phe	Fenilalanin
PHE	Plate Heat Exchanger (Plakalı ısı değiştirici)
SDS-PAGE	Sodium Dedosülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
Ser	Serin
Si	Silisyum
TCA	Trikloroasetik asit
TFA	Trifloroasetik asit
Thr	Treonin
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin

UHT	Ultra-High Temperature (Ultra Yüksek Sıcaklık?)
UV	Ultraviyole (Morötesi)
Üre-PAGE	Üre Poliakrilamid Jel Elektoroforezi
Val	Valine, Valin
ZnSe	Çinko selenid
ZnS	Çinko sülfid
$\alpha$ -LA	$\alpha$ -laktalbumin
$\beta$ -LG	$\beta$ -laktoglobulin



# 1. GİRİŞ

Yüksek sıcaklıkta kısa süreli ısıtma işlemi uygulaması (UHT) tüm dünyada içme sütü üretiminde en yaygın kullanılan teknolojidir. Ülkemizde de UHT süt, süt sektörünün en büyük payını oluşturmaktadır. UHT uygulaması, sütün yüksek sıcaklıkta (135-140 °C) kısa süreli (1-4 s) ısıtma işlemine tabi tutulması ile gerçekleştirilmektedir (Fox ve Kelly, 2012).

UHT uygulaması süt endüstrisinde indirekt ve direkt olmak üzere iki farklı şekilde uygulanabilmektedir. Direkt UHT uygulaması ile sterilizasyon, buharın süte pülverizasyonu (injection) ya da sütün buhara pülverizasyonu (infusion) yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir. İndirekt UHT uygulamasında ise süt ile ısı kaynağı temas etmeden sterilizasyon gerçekleştirilmektedir. Bu teknoloji plakalı ısı değiştiriciler, sıyrılcı yüzeyli ısı değiştiriciler ya da tubuler holder sistemi ile olmak üzere üç farklı şekilde uygulanabilmektedir (Datta ve ark., 2002). Süt üretiminde kullanılan ısıtma işleminin hangi yöntemle yapıldığı süt bileşenlerini özellikle proteinleri etkileyebilmektedir. Aynı zamanda UHT süt üretiminde kullanılan teknoloji (indirekt-direkt) ve ısıtma-süre normu da sütün besin değeri üzerinde etkili olduğu gibi süt makro-bileşenlerinin (özellikle proteinlerin) yapısal özelliklerinde de değişimlere neden olabilmektedir. Bu değişimler ağırlıklı olarak serum proteinlerinin sekonder ve tersiyer yapılarını stabilize eden kimyasal bağların kırılması ve denatürasyon olarak değerlendirilmekte ve primer yapıya sahip kazeinlerin de yapısal değişimlere uğrayabileceği öngörülmektedir (Wada ve Lönnerdal, 2014).

Homojenizasyon yağ globüllerinin boyutunu küçülterek sütlerde üst kısımda kaymak oluşmasını engellediği için; UHT süt üretiminde uygulanması zorunlu bir işlem basamağıdır. Homojenizasyon ısıtma işlemi öncesi (non-aseptik) veya ısıtma işlemi sonrası (aseptik) uygulanabilmektedir. Homojenizasyon koşulları kazeinin moleküler düzeyde primer konformasyonunda değişim meydana getirmemesine karşın proteolize duyarlılığını etkileyebilmektedir. UHT süt üretimi sırasında homojenizasyon iki farklı şekilde gerçekleştirilmektedir. Homojenizasyonun ısıtma işlemi öncesi uygulanması durumunda proteinlerin ısı stabilitesinde azalma meydana gelebilmektedir; ancak homojenizasyon ısıtma işlemi sonrası uygulandığında bu etki görülmemektedir (van Boekel ve ark., 1989). Bunun başlıca nedeni, ısıtma işlemi öncesi homojenizasyon sonrası oluşan

yağ globül ara yüzeyine kazeinin (özellikle  $\beta$ -kazeinin) adsorpsiyonu ve oluşan yağ-kazein kompleksinin denatüre serum proteinleri ile interaksyonu sonucu ısı koagülasyon stabilitesinin azalması olabileceği bildirilmiştir (Garcia-Risco ve ark., 2002). Homojenizasyonun ısı işlem sonrası uygulanması durumunda ise kısmen bozulmadan kalan (semi-intact) kazein miselleri ve misel fragmentleri yağ damlacığının ara yüzeyini kaplamakta; denatüre serum proteinleri doğal süt yağ globül membran (MFGM) proteinlerine ve disülfid köprüleri aracılığı ile kazeinlere bağlanmaktadır.

Tez kapsamında, **titreşim (vibrasyonel) spektroskopik** (Kızılötesi ve Raman spektroskopisi) yöntemler kullanılarak ısı işlem ve homojenizasyonun sırasının değiştirilmesinin proteinlerin konformasyonunda etkisi incelenmiştir. Kızılötesi spektroskopisi (IR) ve Raman spektroskopisi birbirini tamamlayan vibrasyonel yöntemlerdir. Bu yöntemler ile molekülün farklı bölgelerinde maddeyi oluşturan atomların arasındaki bağların gerilme ve esnemesi ile oluşan titreşimsel enerji seviyeleri ölçülmektedir. Ancak IR için dipol moment değişimi gerekli iken Raman saçılması ayrıca polarizetedeği değişimlere de bağlıdır. Dipol-moment değişimleri, hidrojen bağları,  $\alpha$ -helices,  $\beta$ -sheets ve  $\beta$  turns yapılarındaki geometrik yönlendirilmeden faydalanılarak proteinlerin ikincil yapısındaki değişimler belirlenebilmektedir. Vibrasyonel yöntemler, amit (A, B, I-VII) bağları ve diğer konformasyonel bağların varlığına bağlı olarak proteinlerin  $\alpha$ -heliks,  $\beta$ -tabakalı yapılar ve değişimleri hakkında önemli bilgiler vermektedir (Li-Chan ve ark., 1994a). Amit-I 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$  bölgesinde C=O esnemesinden ve N-H bağının bükülmesi sonucu amit grubunun oluşturduğu titreşimler ile oluşmaktadır. Amit-II bant 1600-1500  $\text{cm}^{-1}$  bölgesinde N-H bükülmesi ve C-N bağının esnemesi sonucu oluşmaktadır (Barth, 2007). Amit-I bandı proteinlerin ikincil yapısının belirlenmesinde kullanılırken amit-II bandı proteinlerin genel yapısı hakkında bilgi vermektedir (Luinge ve ark., 1993; Etzion ve ark., 2004; Moore ve ark., 2010; Aernouts ve ark., 2011).

Polar gruplar (C=O, N-H, O-H, vb.) IR spektroskopisi ile daha güçlü spektrumlar verirken, polar olmayan gruplar (C=C, C-C, S-S, vb.) ise Raman bantlarında daha daha güçlüdür. IR ile Raman spektroskopisi arasındaki en büyük fark sulu çözeltiler için IR spektroskopisinin kullanılmamasıdır. IR spektroskopisinde HOH bükülmesi güçlü bir absorbanansa neden olmaktadır. Bu sebeple sulu çözeltiler için Raman spektroskopisi daha

uygundur (Schwaighofer ve ark., 2018). Aralarındaki farklara rağmen IR spektroskopisi ve Raman spektroskopisi birbirini tamamlayıcı vibrasyonel yöntemlerdir ve protein yapısını belirlemede ikisi birlikte kullanılmaktadır (Li-Chan, 2007).

IR spektroskopisi ile oluşan spektrum moleküler absorpsiyon ve iletilen radyasyonu temsil etmekte ve böylece maddenin parmak izi elde edilebilmektedir. Raman spektroskopisinde ışıkla örneğin etkileşimi sırasında fotonların farklı enerji düzeyinde saçılması prensibine dayanmakta ve bu enerji farklılıkları molekülün titreşim enerji düzeyi farkından kaynaklanmaktadır. Raman spektroskopisi süt endüstrisinde sıklıkla kullanılan bir yöntem olup, sütlerde hem kalite kontrol yapılabilen hem de kantitatif analiz yapmak mümkün olmaktadır. Ayrıca protein-yağ etkileşimlerini, peptid-fosfolipit etkileşimlerini, proteinlerin ikincil yapısını belirlemek için de kullanılabilir (Ikeda, 2003). Raman spektroskopisinin sulu örneklerde de ölçüm alabilmesi bu anlamda bir avantaj oluşturmaktadır. Isıl işlem ve homojenizasyon UHT süt prosesinde uygulanması zorunlu işlemlerdir ve endüstride bu iki prosesin sırası farklı şekillerde uygulanabilmektedir. Bu işlemler tekstür, aroma, renk, beslenme değeri gibi özelliklerde değişime neden olduğu gibi proteinler ve yağ-protein interaksiyonlarında da bazı değişimlere neden olabilmektedir.

Bu çalışmanın amacı; UHT süt üretiminde kullanılan farklı ısıl işlem yöntemlerin (indirekt-direkt) ve zorunlu bir proses olan homojenizasyonun uygulanma sırasının süt proteinlerinin konformasyonel yapısındaki değişimlerin belirlenmesi, protein-yağ interaksiyonlarının değişim gösterip göstermediğinin araştırılmasıdır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Süt Bileşenleri

Süt, insanların gelişmesi için gerekli neredeyse tüm bileşenleri içeren ve aynı zamanda enerji sağlayan tek gıdadır (Belitz, H.-D., Grosch, W. & Schieberle, 2009). Ülkemizde tüketimi yaygın olan inek sütü protein, yağ ve karbonhidrat içeriği bakımından oldukça zengindir. İnek sütü yaklaşık %4.5-5 laktoz, %3.5-5 yağ, %2.8-3.5 protein ve %0.7 kül içermektedir (Griffiths, 2010). Ayrıca süt insan beslenmesi için gerekli vitaminler, mineraller ve mikro-bileşenide içermektedir.

Bir molekül galaktoz ve bir molekül glukozun birleşmesi ile meydana gelen laktoz yalnızca sütte bulunan temel karbonhidrattır. Laktoz dışında eser miktarda glukoz, fruktoz, glukozamin, galaktozamin ve nöraminik asit de sütte bulunan diğer karbonhidratlardandır (Asakuma ve ark., 2011). Laktoz miktarı ise türler arasında değişim gösterdiği gibi, laktasyon periyodunda azalma göstermesi sebebi ile aynı türler arasında da değişim gösterebilmektedir ve inek sütünde genellikle %3.6-5.5 bulunmaktadır (Bylund, 1995). Ayrıca laktasyon süresince değişim göstermesine rağmen laktoz sütte bulunan protein ve yağ bileşenlerine göre daha stabil kalan bileşendir (Grimley ve ark., 2009; Heck ve ark., 2009).

Türler arasında oranı en fazla değişim gösteren diğer bir süt bileşeni süt yağıdır. İnek sütünde ortalama %3.5-5.0 yağ bulunmasına rağmen Holstein ve Jersey türüne sahip ineklerde bu oran %6-7 ye kadar artmaktadır. İnek sütlerindeki yağ miktarı hayvanın beslenmesine, yaşına, laktasyon aşamasına, sağım arasındaki süreye de bağlı olarak değişebilmektedir (Fox ve ark., 2017). Süt yağı çoğunlukla trigliseridlerden oluşmakta ve digliseridleri, monogliseridleri, serbest yağ asitlerini, A, D, E, K vitaminlerini içermektedir. Süt yağı, bir membran ile çevrelenmiş olarak küçük küreler veya damlacıklar halinde süt serumunda dağılmış halde bulunur. Süt yağ globül membranı (MFGM) fosfolipit, protein/lipoprotein, nötral gliseritler, serebrositler, kolesterol gibi bileşenleri içermektedir. Süt yağının globüler çapı 0.1-20 µm arasında değişmekte olup ortalama 3-5 µm dur (Fox ve ark., 2017).

Toplam konsantrasyonu %1' den az olsa da süt; kalsiyum, sodyum, magnezyum, fosfor, potasyum ve kükürt gibi birçok minerali içermektedir. Süt ve süt ürünleri günlük almamız



gereken kalsiyum miktarının %59 unu, fosforun %27 sinin, kalsiyum ve magnezyumun ise % 10'unu karşılamaktadır (Lombardi-Bocchia ve ark., 2003). Mineraller kazeinin içerisinde çözülmüş şekilde sütte bulunmakta olup, bu da süt pıhtılaşma sürecini ve peynir üretimindeki verimi doğrudan etkilemektedir (Lucey ve Fox, 1993; Malacarne ve ark., 2014). Özellikle kalsiyum/kolloidal kalsiyum süt proteinlerinin özellikle kazeinin konformasyonel ve teknolojik özelliklerini etkilemektedir. Kazinin ve kimi serum proteinlerinin ısıl dayanımı kalsiyum varlığı ile de ilişkilendirilmektedir (Fox ve ark., 2015). Süt bileşenleri içinde bir diğer ana bileşen süt proteinleri olup aşağıda detaylandırılmıştır.

## **2.2. Süt Proteinleri**

Genel olarak proteinler bir amino grup (-NH<sub>2</sub>) ve bir karboksil (-COOH) grup ve o aminoasite özgü spesifik bir grup (hidrofobobik-hidrofilik, negatif-pozitif, polar-nonpolar) içeren aminoasitlerin birleşmesi sonucu oluşan organik maddelerdir. Protein yapıları birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül olmak üzere 4 farklı seviyede açıklanabilmektedir. Proteinlerin spesifik diziliş sırası birincil yapı olarak açıklanmaktadır. Aminoasit zincirlerinin omurgası olarak bilinen atomların diğerleri ile hidrojen bağları ile etkileşime girmesi sonucu oluşan kararlı yapılar ise ikincil yapı olarak tanımlanmaktadır. En bilinenleri  $\alpha$ -heliks ve  $\beta$ -tabakalı yapılardır.  $\alpha$ -heliks -NH grubunun bir C=O grubu ile 4 rezidü uzakta hidrojen bağı oluşturması ile ortaya çıkan sarmal bir yapıdır.  $\beta$ -tabakası ise bir iplik gibi -NH grubu ile C=O grubu hidrojen bağı ile birbirine bağlıdır. Üçüncül yapı monomerik bir proteinin üç boyutlu yapısını temsil ederken, dördüncül yapı birden fazla alt birimden oluşan proteinlerin tanımlanması için kullanılmaktadır (Li, 2016).

Süt proteinleri vücudumuz için gerekli temel amino asitlerin birçoğunu içermektedir. Asıl fonksiyonu vücudumuz için gerekli esansiyel aminoasitleri ve mineralleri sağlamak olan süt aynı zamanda dokuların ve kasların gelişmesi için de hayati öneme sahiptir (Fox, 2016). Sütte bulunan proteinler hem esansiyel amino asitler bakımından zengin olup hemde biyoyararlılığı oldukça yüksek proteinlerdir. Süt proteinlerin biyoyararlılığının yüksek olması bitkilerde bulunan proteinelere kıyasla sindirilebilirliğin fazla olmasından kaynaklanmaktadır ve farklı şekillerde üretilebilir (Schaafsma, 2012). Sütte bulunan proteinler fiziksel, kimyasal ve biyolojik fonksiyonlarına göre birçok farklı şekilde gruplandırılabilir. En sık tercih edilen gruplama ise eskiden beri bilinen sıcaklığa

gösterdikleri hassasiyete göre kazein ve serum proteinleri olarak ayrılmasıdır. Süt proteinlerin %75-80 ini oluşturan kazeinler pH4.6'da çözünmeyen pelet şeklinde bulunurken, serum proteinleri ise aynı koşullarda çözünmektedir (Walstra, 1999). (Walstra, 1999) Çizelge 2.1'de temel süt proteinlerinin genel özellikleri verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Kazeinlerin ve serum proteinlerinin genel özellikleri (Fox, 2003).

Protein	Molekül ağırlığı (Da)	Amino asit kalıntıları			Fosfat grubu sayısı	Kons. (g/L)
		Toplam	Prolin	Sistein		
$\alpha_{s1}$ -kazein	23164	199	17	0	8	10.0
$\alpha_{s2}$ -kazein	25388	207	10	2	10-13	2.6
$\beta$ -kazein	23983	209	35	0	5	9.3
$\kappa$ -kazein	19038	169	20	2	1	3.3
$\beta$ -laktoglobulin	18227	162	8	5	0	3.2
$\alpha$ -laktalbumin	14175	123	2	8	0	1.2

### 2.2.1. Serum Proteinleri

Kazein asitle veya enzim ile çöktürülerek diğer proteinlerden ayrılabilir, bu şekilde çöktürme işlemi yapıldıktan sonra sütte kalan proteiner serum proteinleri olarak adlandırılmaktadır.  $\beta$ -laktoglobulin ( $\beta$ -LG),  $\alpha$ -laktalbumin ( $\alpha$ -LA), serum albumin, immunoglobulinler, ve proteaz-pepton fraksiyonu serum proteini olarak bilinen başlıca proteinlerdir (Farrell ve ark., 2004). Sıcaklığa karşı hassas olan serum proteinleri  $Ca^{+2}$  ye karşı kazeinler gibi hassas değildir (Fox ve ark., 2000). Süt ısıtıldığında serum proteinleri denatüre olmaktadır ve kazeinler ile veya kendi aralarında kompleks bir yapı oluşturabilmektedir. Süt 60 °C nin üzerindeki sıcaklıklara ısıtıldığında sütte bulunan majör serum proteini olan  $\beta$ -LG denaturasyonu başlamaktadır. Denaturasyon  $\beta$ -LG'de sülfür aminoasidinin olduğu yerde başlamaktadır ve  $\beta$ -LG ile  $\kappa$ -kazein arasında,  $\beta$ -LG ile  $\alpha$ -LA arasında sülfür köprüleri oluşmaktadır (Bylund, 1995). Bu yapının oluşması özellikle süütün rennet ile pıhtılaşma özelliğini bozmakta ve fermente süt ürünlerinin reolojik özelliklerini değiştirebilmektedir.

Serum proteinlerin ikincil ve dördüncül yapıya sahip globuler yapısı disülfid bağlarından, hidrofobik etkileşimlerden, hidrojen bağlarından van der Waals etkileşimlerinden kaynaklanmaktadır (Singh ve Havea, 2003). Globuler yapının yüzeyinde bulunan

hidrofilik kalıntılardan dolayı çok fazla disülfit bağı içermesinden dolayı sütte bulunan serum proteinleri geniş bir pH aralığında çözünür formda bulunmaktadır (Dissanayake ve Vasiljevic, 2009). Ayrıca serum proteinlerinin globuler yapısı diğer moleküllere karşı bir protein bariyeri oluşturarak proteolize karşı dayanıklı hale getirmektedir (De Wit, 1998).

$\beta$ -LG sütte bulunan ana serum proteinidir ve serum proteinlerinin %50'sini toplam proteinin ise %12'sini oluşturmaktadır.  $\beta$ -LG A, B ve C varyantlarına sahiptir ancak A ve B varyantı yapısal kararlılıkta farklılık göstermektedir.  $\beta$ -LG toplam molekül ağırlığı yaklaşık 36.6 kDa'dır (Fox, 2003). Bunun 18,362 kDa 166 aminoasitten varyant A ve 18,276 kDa 162 aminoasitten oluşan varyant B oluşturmaktadır. Bu iki varyant birbirinden 64. ve 118. aminoasit kalıntısı bakımından ayrılmaktadır. Varyant A Asp (64) Val (118) içerirken, varyant B de bunların yerine Gly (64) ve Ala (118) nin gelmektedir (Alexander et al., 1989). Varyant B, varyant A dan daha az ısıya stabil olduğu için varyant A, B ye göre daha küçük agregatlar oluşturur (Jakob ve Puhon, 1992). Genetik polimorfizme bağlı olarak inek sütleri AA, BB veya AB varyant kombinasyonlarını içerebilmektedir.

$\beta$ -LG'nin her monomeri 5 adet sistein kalıntısı içermektedir. Sistein formlarının intramoleküler disülfit bağları Cys66-Cys160 ve Cys106-Cys119 arasında oluşmaktadır. Doğal yapı içinde gömülü olan Cys121 ise intramoleküler disülfit bağı içermemektedir (Kontopidis ve ark., 2004).

$\beta$ -LG proteinlerin taşınmasında rol oynamaktadır.  $\beta$ -LG midede asitlere ve proteolize dirençli olduğu için anneden, yeni doğana retinolün taşınmasından sorumludur (Miranda ve Pelissier, 1983). Palmitat da Vitamin A gibi  $\beta$ -LG bağlanmaktadır, bu sebepten ötürü sütün içerisinde ki  $\beta$ -LG sütün yağ asidi metabolizması ile de ilişkilendirilmektedir (Perez ve Calvo, 1995).

İnek sütü yaklaşık 1.2-1.5 g/L  $\alpha$ -LA içermekte yani serum proteinlerinin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır. 14 kDa ağırlığında olan  $\alpha$ -LA 123 aminoasitten oluşmaktadır. Esansiyel aminoasitler bakımından da oldukça zengin olan  $\alpha$ -LA Trp, Phe, Tyr, Leu, Ile, Thr, Met, Cys, Lys, ve Val aminoasitlerini içermektedir. Bu temel aminoasitlerde toplam amino asit kompozisyonunun %63.2'sini oluşturmaktadır (Brew ve ark., 1970).

Laktoz sentezleme enzim sistemini düzenleyen protein  $\alpha$ -LA olduğundan sütteki laktoz konsantrasyonu doğrudan  $\alpha$ -LA konsantrasyonu ile ilgilidir (Caffin ve ark., 1985). Laktoz sentezinde sınırlayıcı olan glukozu tutarak N-asetil-glukozaminin  $\beta$ -1,4 galaktosil transferaza bağlanmasını engelleyerek glukozun galaktosil transferaza bağlanmasını artırır. Sütteki ozmotik basıncın korunmasından sorumlu olan bileşen laktozdur, buda dolayısı ile  $\alpha$ -LA fizyolojik rolü ile sağlanmaktadır (Brew, 2003).

$\alpha$ -LA ayrıca kalsiyum metalloprotein olarak tanımlanmaktadır. Kalsiyum, çinko ve diğer metaller  $\alpha$ -LA bağlanmaktadır. Bunun en iyi kanıtı ise kalsiyumun uygun şekilde katlanması ve native protein formunda disülfid bağlarının oluşum formlarıdır (Chrysin ve ark., 2000).  $Ca^{+2}$  nin bağlanmasının önemi ise  $\alpha$ -LA'nin ısı stabilitesini artırmasıdır.

### **2.2.2. Kazein**

Süte uygulanan asitleştirme sonucu pH'nın 4.6 ye düşürülmesi ile oluşan, çözünmeyen kısım kazein olarak adlandırılmakta ve inek sütündeki proteinlerin yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır. Bu gruptaki proteinler birincil yapıların homolojisine göre  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - ve  $\kappa$ -kazein olarak sınıflandırılmaktadır. Sırasıyla toplam kazeinin %40, %10, %40 ve %10'unu oluşturmaktadır (Wong ve ark., 1996).

Kazein yüksek miktarda prolin içermesi, az miktarda sistein içermesi ve hidrofobik olması gibi bazı özellikleri ile diğer proteinlerden ayrılmaktadır. Kısa uzunlukta  $\alpha$ - heliks sarmalı haricinde başka bir yapı oluşturmazlar ve yalnızca az miktarda üçüncül yapıya sahiptirler. Kazeinin bu az miktarda ikincil ve üçüncül yapıya sahip olmasından ötürü kazein molekülün denatüre olması da oldukça zordur. Ayrıca kazeinin ikincil yapıya sahip olmaması ona daha esnek bir yapı kazandırır ve bu açık yapı aminoasit zincirindeki hidrofobik kısımlara maruz kalır. Kazein yapısında ki bu açık yapı kazeinin, pepsin gibi bazı enzimler tarafından proteolizine neden olmaktadır (Swaisgood, 2003).

Kazeinler laktojenik hormonlara cevap olarak meme bezinde büyük koloidal agregatlar olarak sentezlenen fosfoproteinlerdir. Serin aminoasidine bağlı olarak bulunan bu fosfat gruplarının negatif yükünden dolayı kazeinler iyonları özellikle de  $Ca^{+2}$  iyonunu bağlayabilmektedir. Sütteki kalsiyum miktarının artmasıyla kazeinlerin de çökme eğilimi

artmaktadır. Fakat kazeinin tüm fraksiyonları  $Ca^{+2}$  ye karşı aynı hassasiyete sahip olmayıp en fazla hassas olan  $\alpha_{s2}$ - ve an az hassasiyete sahip olan  $\kappa$ -kazeindir (Ginger ve Grigor, 1999).

İnek sütündeki toplam proteinin yaklaşık %40'ını  $\alpha_{s1}$ -kazein oluşturmaktadır. 199 aminoasit kalıntısından oluşan bu protein, Ser 45, Ser 47, Ser 64, Ser 66, Ser 67, Ser 68, Ser 75 ve Ser 115 gibi 8 ile 16 arasında Ser kalıntısına sahiptir (Huppertz, 2013). Aminoasit dizilimi de göz önüne alındığında yaklaşık molekül ağırlığı 23 kDa dur.

Negatif yüke sahip olan  $\alpha_{s1}$ -kazein aynı zamanda yüksek fosfat içeriğine sahiptir.  $\alpha_{s1}$ -kazein pH 6.6'da ve 0.05 M iyonik güçte iki adımda birleşmektedir. Daha yüksek pH ve daha yüksek iyon molaritesi değerlerinde kazein konsantrasyonu ve iyon gücü yüksek olmasına rağmen birleşme azalır ve hatta zamanla kaybolabilir (Walstra ve ark., 2006).

$\alpha_{s1}$ -kazeinin ikincil yapısı birçok çalışmada incelenmiştir. Byler ve Susi (Byler ve Susi, 1986) yaptığı bir çalışmada proteinlerin ikincil yapısını Fourier dönüşüm infrared (FTIR) spektroskopisi ile incelemiş ve  $\alpha_{s1}$ -kazeinin ikincil yapısının olmadığını belirlemiştir. Fakat bu çalışmanın aksini iddia eden çalışmalarda literatürde mevcut olup; Herskovits (Herskovits, 1966)  $\alpha_{s1}$ -kazeinin yapısında  $\alpha$ -heliksin %5-15, Byler (Byler, 1988) %8-13 ve Malin (Malin, 2005) ise %13-15 arasında olduğunu bulmuştur.  $\beta$ -tabakalı yapı ise  $\alpha_{s1}$ -kazeinin yapısında Byler (Byler, 1988) 'e göre %17-20, Malin (Malin, 2005) 'e göre ise %13-15 arasında bulunmaktadır.

$\alpha_{s1}$ -kazein, kalsiyuma hassas bir proteindir, 3-8 mM  $CaCl_2$  eklendiğinde çökmektedir (Bigham ve ark., 1972). pH'nın 7.0'nin altına düşmesiyle  $\alpha_{s1}$ -kazeine kalsiyumun bağlanma ihtimali düşmektedir, aynı zamanda pH'daki azalma ile  $\alpha_{s1}$ -kazeinin çökmesi için gerekli kalsiyum miktarı da artmaktadır (Dalgleish ve Parker, 1980).

Toplam kazeinin %10'unu oluşturan  $\alpha_{s2}$ -kazein, moleküller arası ve moleküller içi bağlarla oluşmuş Cys36 ve Cys40 olmak üzere iki adet sistein kalıntısı içermektedir. 171 aminoasitten oluşan  $\alpha_{s2}$ -kazeinin yaklaşık molekül ağırlığı 24.3 kDa dur.  $\alpha_{s2}$ -kazein 5 farklı bölgeye ayrılmaktadır; 1-41 ve 42-80 bölgesi yüksek yüke düşük hidrofobikliğe sahip fosfopeptid bölgesi, 81-125 yüksek hidrofobikliğe sahip pozitif yükle yüklenmiş

bölge, 126-170 düşük fosfat içeriğine sahip negatif yüklü bölge ve 171-207 yüksek hidrofobikliğe sahip ve yüksek yüke sahip bölgedir (Farrell ve ark., 2009).

İkincil yapıyı inceleyen birçok çalışma literatürde mevcut olup çalışmalar arasında farklılıklar mevcuttur. Garnier ve ark. (Grewal ve ark., 1978),  $\alpha_{s2}$ - kazeinin ikincil yapısının %54  $\alpha$ -heliks, %15  $\beta$ -tabakalı (sheet), %19  $\beta$ -sarmal (turns) yapı ve %13 spesifik olmayan yapıdan oluştuğunu belirtmişlerdir. Fakat yapılan başka bir çalışmada da Farrell ve ark. (Farrell ve ark., 2009) ise %46  $\alpha$ -heliks, %9  $\beta$ -tabakalı, %12  $\beta$ -sarmal, %7 poliprolin II, %19 kesintili  $\alpha$ -heliks veya  $\beta$ -tabakası ve %7 spesifik olmayan ikincil yapı olduğunu göstermiştir.

$\alpha_{s2}$ -kazein 2 mM dan daha az kalsiyumla bile etkileşime girdiğinde çökme gerçekleşebilmektedir, bu da  $Ca^{+2}$  ye karşı en hassas kazein olduğunu desteklemektedir (Walstra ve ark., 2006).

İnek sütünün yaklaşık %35'ini oluşturan  $\beta$ -kazein 209 aminoasit kalıntısı içermektedir (Mercier ve ark., 1971). Bu 209 aminoasidin molekül ağırlığı 23.6 kDa'dur, 5 Ser kalıntısının fosforilasyonu sonucu molekül ağırlığı 24.0 kDa olmaktadır.  $\beta$ -kazeinin 1-40 aminoasitleri düşük hidrofobikliğe sahiptir ve bu kısım toplamda 2 adet Pro kalıntısı ve 5 adet fosforilasyona uğramış Ser (Ser15, Ser17, Ser18, Ser19 and Ser35) kalıntısı içermektedir (De Kruif ve Holt, 2003).

$\beta$ -kazein sabun molekülü gibi bir polar bir başa ve apolar uzun bir zincire sahip olduğundan etkileşimi de sabun molekülüne benzer şekilde meydana gelmekte, miseller oluşmaktadır ve bu miseller 20-30 molekül içermektedir (Walstra ve ark., 2006).  $\beta$ -kazeindeki farklı polarlık ve hidrofobik etkileşimler yüksek sıcaklıklarda kendi kendine etkileşime girebileceğini açıkça gösterebilmektedir. 0-4 °C sıcaklıklarda  $\beta$ -kazeinin monomer yapısı gözlemlenirken, bu sıcaklıkların altına düşüldüğünde polimer yapılar bile neredeyse tamamen yok olmaktadır. Yani  $\beta$ -kazein +4 °C nin altında yapıdan ayrılmaktadır, buda sütün viskoziteni artırmaktadır. Fakat gerçekleşen bu olay geri dönüşümlüdür, sıcaklık 4-5 °C nin üzerine çıkarıldığında kendi kendine birleşim yaparak büyük polimerler oluşmaktadır (Walstra ve ark., 2006).

$\beta$ -kazein,  $\alpha_{s1}$ -kazein ve  $\alpha_{s2}$ -kazeinleri ile karşılaştırıldığında kalsiyuma karşı daha düşük hassasiyete sahiptir,  $\alpha_{s1}$ -kazein 3-8 mM  $Ca^{+2}$  ve  $\alpha_{s2}$ -kazein 2 mM  $Ca^{+2}$  den daha az miktarda kalsiyumla etkileşime girdiğinde,  $\beta$ -kazein ise 37°C de 8-15 mM  $Ca^{+2}$  varlığında çökebilmektedir (Dalglish ve Parker, 1980).

$\beta$ -kazeinin ikincil yapısı için literatürdeki çalışmalar incelendiğinde %7-25  $\alpha$ -heliks (Qi ve ark., 2004), %15-33  $\beta$ -tabakası, %20-30  $\beta$ -sarmalı (Creamer ve ark., 1981) ve %20-25 poliprolin II (Syme ve ark., 2002) yapısının mevcut olduğu görülmektedir.

İnek sütündeki toplam kazeinin %10 unu oluşturan  $\kappa$ -kazein düşük fosforilasyona ve düşük kalsiyum hassasiyetine sahip olmasından sebebiyle glikolize form oluşturabilen tek kazein fraksiyonu olmasından dolayı diğer kazein fraksiyonlarından ayrılmaktadır. Kazein fraksiyonları arasında post-translasyon sonucu glikozilasyona uğrayan tek protein  $\kappa$ -kazeindir (Vreeman ve ark., 1986).

$\kappa$ -kazein 169 aminoasitten oluşmaktadır ve rennet enzimi Phe105-Met106 bağına etki ederek  $\kappa$ -kazeini burdan bölmektedir, bu kısma kadar olan hidrofilik bölüm glikomakropeptid (GMP) veya kazeinomakropeptid olarak adlandırılmaktadır, hidrofobik olan diğer kısım ise para  $\kappa$ -kazein olarak bilinmektedir. Bu bağın ayrılması süt endüstrisinde pıhtılaşmayı sağlayan ilk adım olduğundan önemli bir aşamadır (Wong ve ark., 1996; Farrell ve ark., 2004).

Sütte bulunan  $\kappa$ -kazeinler Cys11 ve Cys88 iki adet sistein kalıntısı içerdiğinden moleküller arası çapraz disülfid bağları oluşmaktadır (Swaisgood et al., 1964). Rastgele disülfid bağları ile oluşan bu kompleks Cys11 ile Cys88, Cys11 ile Cys11, Cys88 ile Cys11 ve Cys88 ile Cys88 arasında oluşmaktadır.

Byler ve Susi (Byler ve Susi, 1986) proteinlerin ikincil yapısı ile ilgili yaptığı bir çalışmada  $\kappa$ -kazeinin %10-20  $\alpha$ -heliks, %20-30  $\beta$ -tabakası ve %15-25  $\beta$ -sarmal yapıya sahip olduğunu belirlemiştir. Farrell ve ark. (Farrell ve ark., 2003)' nın yaptığı başka bir çalışmada ise 10-70 °C arasında sıcaklık arttıkça  $\alpha$ -heliks yapının arttığı,  $\beta$ -tabakası ve  $\beta$ -sarmal yapısı ise sıcaklık artışı ile azaldığı gözlemlenmiştir.

Kalsiyum hassasiyeti ise diğer kazein fraksiyonlarına oranla oldukça düşüktür. Ayrıca kalsiyumla bağlanan karboksil grupları  $Ca^{+2}$  nin 3 mM konsantrasyona kadar artmakta ve bu değerden sonra düşmektedir. Bu sebeple  $\kappa$ -kazeinin  $Ca^{+2}$  ye duyarlı olduğu açıkça görülmektedir (Ono ve ark., 1980).

### 2.3. Süt Üretimi İçin Uygulanan Isıl İşlem Yöntemleri

Isıl işlem, süt teknolojisinde sterilizasyonun sağlanması amacıyla uygulanması zorunlu bir işlemdir. Sütte sterilizasyonu sağlamak amacıyla farklı yöntemler uygulanabilmektedir. Bunlardan ilki daha düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilen patojen mikroorganizmaların sayısını azaltmayı amaçlayan pastörizasyondur. Pastörizasyon işlemi için ise yüksek sıcaklık (72-80 °C) ve az zamanda (15-30 sn) yapılan HTST veya düşük sıcaklık (63°C) uzun süre (30 dk) uygulaması ile halen endüstride kullanılan LTLT olmak üzere farklı yöntemler uygulanabilmektedir (Lewis ve Deeth, 2008). Süt endüstrisinde daha yaygın kullanılan diğer bir ısıl işlem yöntemi ise UHT (ultra high temperature) ısıtmadır. 135-150 °C sıcaklıkta 1-10 saniye uygulanan UHT yönteminde sütte bulunan bütün bakteriler, sporlar ve hatta birçok enzim inaktif edilmektedir (Fox ve Kelly, 2012).



Şekil 2.1. UHT Süt Üretimi için Isıl İşlem Yöntemleri.

Pastörizasyon işlemi ile sütte bulunan tüm bakteriler inaktif hale getirilmekte ve aynı zamanda bazı proteolitik ve lipolitik enzimler ise aktifliğini korumaktadır. Bu sebeplerden dolayı UHT süt daha güvenilir ve daha uzun ömürlü olan süttür. Literatürde UHT süt üretimleri de farklılık göstermektedir; 110 °C de 30 saniye, 130 °C 30 saniye veya 145° C de 1 saniye şeklinde uygulanabilmektedir. Ancak 110 °C de 30 saniye

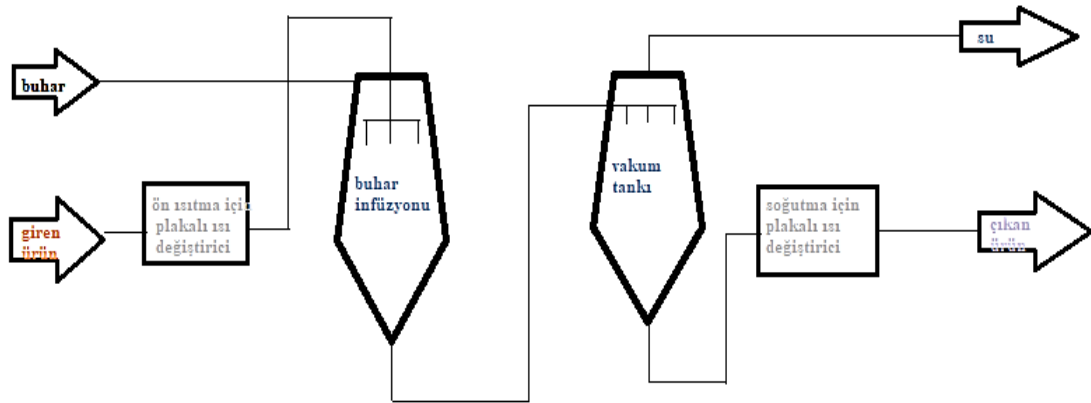


uygulama bütün enzimler inaktif hale getirebilmekte fakat bütün bakteriyel lipaz ve proteazları inaktif edememektedir. Bunun sonucunda da sütte Mailard reaksiyonu, lizin kaybı, vitamin ve minerallerde kayıplar ve pH de düşme gözlemlenebilmektedir. Daha yüksek sıcaklıklarda yapılan 145°C de 1 saniye yapılan ısıl işlem de ise tüm enzimler inaktif edilemez özellikle de plazmin, bakteriyel lipaz ve proteazlar etkilenmeden kalır ve yalnızca pişmiş tat gelişir. Bu sebeplerden ötürü ideal UHT işlemi normu 130°C de 30 saniye olarak belirlenmiştir (Walstra ve ark., 2006).

Süt endüstrisinde direkt ve indirekt olmak üzere iki farklı yöntem kullanılarak UHT süt üretimi gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.1). Genellikle UHT süt indirekt sistemler için fabrikalarda plakalı ısı değiştiriciler veya tubular ısı değiştiriciler kullanılarak, direkt sistemler için ise enjeksiyon yöntemi kullanılarak üretilmektedir.

### 2.3.1. Direkt Isıl İşlem

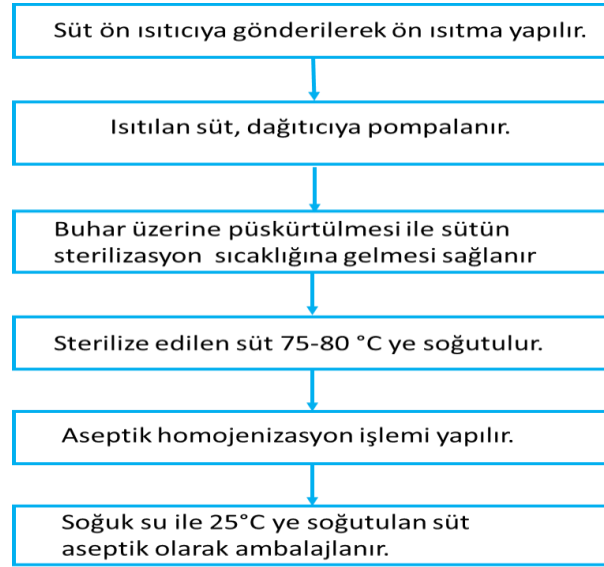
Enjeksiyon veya infüzyon olmak üzere süt endüstrisinde iki farklı şekilde kullanılmaktadır. Enjeksiyon işlemi sütün içerisine ısı kaynağı olarak buhar verilmesi ile gerçekleşmektedir. Bu yöntemde buhar doğrudan süte enjekte edilir .



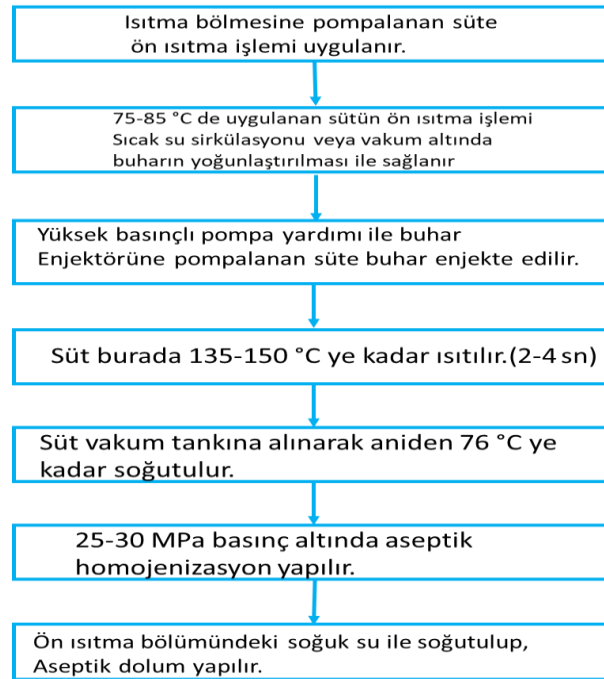
**Şekil 2.2.** Direkt ısıl işlem yönteminin uygulamada kullanımı (Kelleher ve ark., 2018)'den uyarlanmıştır.

Direkt ısıl işlem de asıl kullanılan diğer bir yöntem ise buharın içine sütün püskürtülmesi ile gerçekleştirilen infüzyon yöntemidir (Şekil 2.2). Buhardan süte enerji transferi sırasında ısı kaybı daha az olduğundan ve daha homojen bir ısıtma sağladığı için bu

yöntem daha kullanışlı bir yöntemdir (Campell, 2013). Direkt ısıtma işlemi (infüzyon, enjeksiyon) üretilen UHT süt akım basit şeması Şekil 2.3 ve 2.4’de verilmiştir.



Şekil 2.3. Direk UHT infüzyon yöntemi ile süt üretim akış şeması (Burton,1988).



Şekil 2.4. Direk UHT enjeksiyon yöntemi ile süt üretim akış şeması (Burton, 1988).

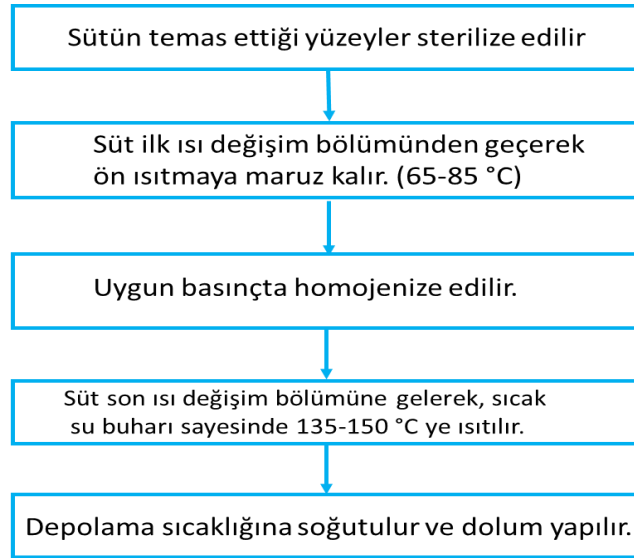
İndirekt ısı işlem yöntemleri ile karşılaştırıldığında, direkt ısı işlem yöntemlerin her ikisi de daha az kimyasal değişime ve daha az protein denatürasyonuna sebep olmaktadır (Oldfield ve ark., 1998; Lorenzen ve ark., 2011).

### **2.3.2. İndirekt Isıl İşlem**

Günümüzde işletmelerde direkt yönteme göre daha fazla kullanılmakta olan indirekt ısı işlem yönteminde sıcak sütün gelen soğuk sütü ısıtması prensibi ile %80-95 oranında enerji geri dönüşümü sağlanabilmektedir. İndirekt sistemlerde ısınacak olan süt ısınan ortamın tersi yönde akmaktadır. Bu da iki akış arasındaki sıcaklık farkını minimum düzeye indirerek ısı değiştirici yüzeyindeki kirlenmeyi azaltmakta ve daha iyi kalitede ürün elde etmemizi sağlamaktadır (Deeth ve Datta, 2011). İndirekt ısı işlem amacı ile değişik sistemler kullanılmakta olup bunlar aşağıda özetlenmiştir.

#### *Plakalı Isı Değiştiriciler*

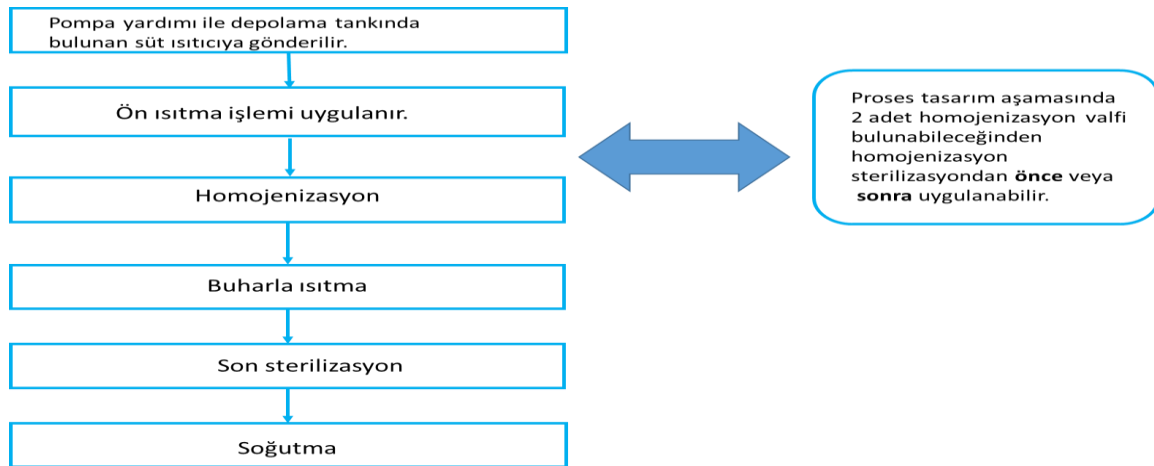
Plakalı ısı değiştiriciler (PHE) rejenerasyon, ısıtma, tutma ve soğutma bölümü olmak üzere 4 bölümden oluşmaktadır. Isı değiştiriciye gelen süt ısınırken bir taraftan da soğuk süt geçmektedir. Daha sonra sıcak su ile iyice ısınan süt bekleme tüpüne gelerek burada sterilizasyon aşaması gerçekleştirilir (Şekil 2.5). Isınan ve soğutulan süt daima ters akışlıdır ve iki plaka arasında ki sıcaklık sabittir. Plakalı ısı değiştirici ile yapılan ısıtma işleminde birçok birbirine paralel plaka bulunmaktadır, bu nedenle plakalar arasından sütün geçişi düzgün bir şekilde ve yüksek hızda olmaktadır. Ayrıca plakaların yüzeylerinin dalgalı olması sayesinde türbülans akış ile ısı transferi artmaktadır (Gutierrez ve ark., 2011). Plakalı ısı değiştirici ile yapılan ısıtma sistemlerinde ki sınırlayıcı etki maksimum basıncın 20.4 bar ve maksimum sıcaklığın 150 °C olmasıdır (Abu-Khader, 2012). Plakalı ısı değiştirici ile yapılan ısı işlem birim başına büyük alana sahiptir. Bu nedenle genel ısı aktarım hızı yüksek ve ısı kaybı düşüktür. Ancak süt plakalar arasından geçerek ısındığından sistem kirlenmeye meyillidir ve plakaların yüzeyinde birikmeler oluşabilmektedir (Velez-Ruiz, 2009).



**Şekil 2.5.** Plakalı ısı değiştirici ile UHT süt üretimi yapılan fabrikalarda üretim akış planı (Burton, 1988).

### *Borulu (Tubular) Isı Değiştiriciler*

Plakalı ısı değiştiricilere göre birim hacim başına daha az alana sahiptir ve ısıtılan ürün ile ısıtmada kullanılan ajan arasındaki sıcaklık çok fazladır. Kirlenmeyi engellemek ve ısı transferini artırmak amacı ile yüksek akış hızı ve dolayısıyla yüksek basınçlar kullanılmaktadır (Deeth ve Datta, 2011).



**Şekil 2.6.** Borulu ısı değiştirici ile UHT süt üretimi yapılan fabrikalarda üretim akış planı (Burton, 1988).

Süt silindirik bir tüp (boru) içerisinde tutulurken, ısınmayı sağlayan buhar veya sıcak su tüpün dışından akmaktadır ve iki akışkan arasındaki ısı transferi ısı iletim ve ısı taşınım

ile gerçekleşmektedir. Plakalı ısı değiştirici ve direkt sistem ile karşılaştırıldığında daha küçük yzey alanına sahip olması ve akışkanın daha bzyk bir yarıçapta akması sebebi trbzlanın daha az oluşmasını sağlar ve dolayısıyla genel ısı aktarım hızı daha dūřktür (Richardson, 2001). Borulu ısı değiştirici kullanılan durumlarda plaka yerine borular kullanıldığından ve bu sebeple geometrik olarak kolayca değiştirilebildiğinden yksek basınç ve yksek sıcaklıklara çıkmakta sorun olmamaktadır (Walstra ve ark., 2006)

### *Sıyırıcılı Isı Değiştiriciler*

Sıyırıcılı ısı değiştiriciler viskoz, yapışkan ve topaklı rznlerin ısıtılması ve soğutulması işlemi için kullanılmaktadır. Bir sıyırıcı ısı değiştirici silindir, 50-130 mm'ye kadar yarıçapı değiştirilebilir rotor ve çeşitli bıçaklardan oluşmaktadır. Kkzk yarıçaptaki rotorlar bzyk partikrllerin geçmesine izin verirken, bzyk yarıçaptaki rotorlar ise kalma sresini azaltmakta ve daha iyi bir termal proses sağlamaktadır (Bylund, 1995).

Bu sistemde rzn sisteme aşağıdan girmekte ve yukarıya doğru pompalanmaktadır. Rzne eşit miktarda ısı transferi sağlanması için dnen bıçaklar rzn'n silindir duvarından tamamen uzaklaşmasını sağlamaktadır. Aynı zamanda dnen bıçaklar sayesinde yzeyde kalıntılardan temizlenmiş olur ve birikme engellenmektedir. Bu sistemde rzn'n akış hızı, rotor yarıçapı ve rotor hızı rzn'n ozelliklerine gze ayarlanabilmektedir. Bu nedenle sıyırıcı ısı değiştiriciler reel, tatlı, çikolata gibi viskoz rznler için uygundur. Ayrıca yağların kristalizasyonu içinde kullanılmaktadır ancak srt endstirisinde çok tercih edilen bir ısıtma yontemi değildir.



**şekil 2.7.** Sıyırıcılı yzeyli ısı değiştirici (Bylund, 1995).

## **2.4. UHT Sütte Isıl İşlem Sonucu Meydana Gelen Değişimler**

Isıl işlem asıl amacı mikroorganizmaları öldürerek sütü güvenli hale getirmek olsada sütte fiziksel ve kimyasal değişimlere sebep olmaktadır. Renk ve aroma gibi tüketicilerin direk anlayabileceği özellikleri etkilediği gibi aynı zamanda beslenme değerinde kayıp, serum denaturasyonu, enzim inaktivasyonu, amino asit zincirlerindeki kimyasal değişimler, maillard reaksiyonu gibi kimyasal değişimlere de sebep olmaktadır (Fox ve ark., 2015).

### **2.4.1. Fiziksel Değişimler**

Isıl işlemin renk üzerine çeşitli etkileri mevcuttur. 50 °C'ye kadar geri dönüşümlü bir reaksiyon gerçekleşmekte ve sıcaklık ile birlikte beyaz renk oranı artmaktadır. Bu değişimin tüketiciler tarafından gözlemlenmesi zor olsada laboratuvar koşullarında spektrofotometre ile belirlenebilmektedir. Sıcaklıkla rengin bu şekilde değişmesi ise kalsiyumun yapıdan ayrılarak misel yapısına göçü ile açıklanabilmektedir (Burton, 1988).

60 °C üzeri sıcaklıklara çıkıldığında ise geri dönüşümsüz olarak süt renginde fark edilebilir beyazlaşma gerçekleşir. Sütteki bu değişimin sebebi ise serum proteinlerin denatüre olarak kazein miseli ile kompleks oluşturmasıdır (Burton, 1988). Bilindiği üzere ısıl işlem dozu daha da arttıkça sütte oluşan maillard reaksiyonu sonucu kahverengileşme meydana gelir. Maillard reaksiyonu süt proteinleri ile özellikle lizin ile süt şekeri olan laktoz arasında meydana gelen bir reaksiyondur. Maillard reaksiyonu sonucu oluşan ürünler melonoidlere dönüşerek kahverengi renk oluşumuna neden olmaktadır (Burton, 1988).

Tat ve koku olarak iki farklı duyu ile algılanabilen her ürüne özgü spesifik lezzetini veren algılanan lezzete aroma denilmektedir. Çiğ sütte uçucu ve uçucu olmayan birçok aroma bileşeni bulunmaktadır. Uçucu olmayan aroma bileşenleri laktoz ve çözünmüş tuzlardır. Sütte bulunan çözünmüş tuzlar ve miseller kazein sayesinde tatlılık azalsada yinede sütte baskın bir tattır. Uçucu bileşenlerden olan dimetil sülfid, diasetil 2-metilbütanol ve aldehitler ise taze çiğ sütün karakteristik tadını vermektedir (Walstra ve ark., 2006). UHT sütün aromasında ısıl işlem sonucu değişikliğe sebep olan bileşiklerden birisi  $\beta$ -LG yapısında bulunan sülfidril (-SH) gruplarıdır. Süt 70°C üzerinde ısıl işleme maruz

birakıldığında  $\beta$ -LG denature olmakta ve denature olan  $\beta$ -LG ayrılan sülfidril grupları serbest hale geçerek süte 'pişmiş tat' aromasını kazandırmaktadır (Burton, 1988).

Sütün daha yüksek sıcaklıklarda (115 °C ve üzeri) ısı işleme maruz bırakılması ile oluşan olay da 'sterilizasyon tadı' olarak adlandırılmaktadır. Laktozun maillard reaksiyonuna uğraması sonucu bozunması ile meydana gelen bileşiklerden bazıları diasetil, laktonlar, maltol, isomaltol ve benzaldehittir. Maltol, isomaltol ve furanonlar kötü tattan sorumluyken oluşan diğer aroma bileşenleri ise yağ asitlerinin parçalanmasından sorumludur (Walstra ve ark., 2006). Sonuç olarak UHT sütün ısı işlem sonucu karakteristik lezzetini etkileyen en önemli bileşikler sülfidril grupları ile ketonlar ve laktonlardır.

## **2.4.2. Kimyasal Değişimler**

### **2.4.2.1. Serum Proteinleri Denatürasyonu**

Denatürasyon peptit bağlarının açılması yani başka bir deyişle peptit grupları arasında yada gruplar içinde reaksiyon oluşarak orijinal yapısındaki katlanmayı engellenmesi ve doğal yapının bozulmasıdır. Proteinler denatürasyona uğradıktan sonra biyolojik aktivitesini kaybetmekte ve çözünürlükleri azalmaktadır (Walstra ve ark., 2006).

Sütte bulunan serum proteinleri;  $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin, serum albümin ve immunoglobulin 60°C üzeri ısı işleme uğradığında denatürasyonları başlamaktadır. Sıcaklık ve süreye bağlı olarak denatürasyon oranı artabilmektedir. Serum proteinlerin denatürasyonu sıcaklığa bağlı olduğu gibi, pH ve  $Ca^{+2}$ 'ye bağımlı bir karakter de göstermektedir (Law ve Leaver, 2000; Özer, 2001; Özer ve ark., 2002)

UHT uygulamasında başta denatürasyona uğrayan proteinler serum proteinleridir. Kazeinler yalnızca kovalent bağlar ile stabilize edilen primer yapıya sahip olmalarından dolayı yüksek ısı uygulamalara karşı (140 °C'de 1-2 saat ısı uygulaması vb.) dirençli kabul edilirken globüler yapıya sahip serum proteinleri ısı etkisi ile denatüre olmaktadır. Sıcaklığın etkisi ile sekonder ve tersiyer yapılarında değişim meydana gelen serum proteinlerinden özellikle  $\beta$ -LG etkilenmektedir.

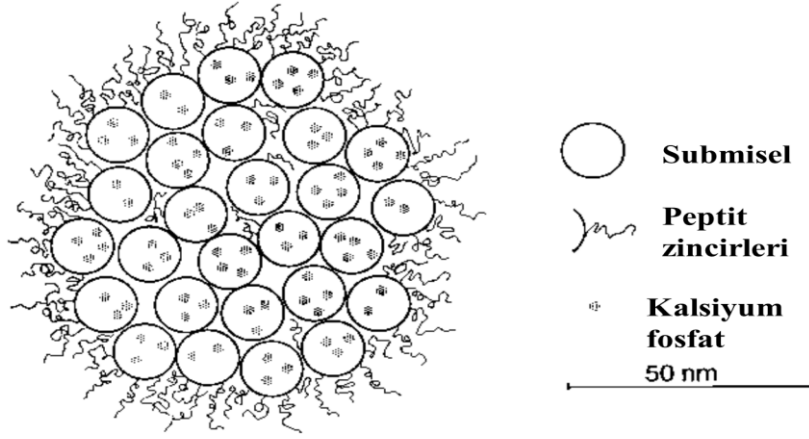
Denatüre olan  $\beta$ -LG ile  $\kappa$ -kazein arasında tiyol-disülfit köprüleri üzerinden etkileşimler oluşmaktadır (Wada ve Lönnerdal, 2014). Tiyol grupları okside olmadıkça ve disülfit bağlarının pozisyonu değişmedikçe serum proteini denatürasyonu tersinir karakter taşımaktadır. 70-90 °C arasındaki sıcaklıklarda küçük molekül ağırlıklı  $\beta$ -LG molekülleri birleşerek büyük agregatlar oluşturmaktadır. Bu oluşum birkaç basamaklı bir işlemdir ve ilk aşamada tiyol-disülfit grupları interaksyonu aracılığı ile  $\beta$ -laktoglobulin molekülleri bir araya gelmektedir (Manderson, 1999; Schokker ve ark., 1999; Havea ve ark., 2001). İkinci basamakta, kalsiyum köprüleri, hidrojen ve hidrofobik bağlar da devreye girmekte ve serum proteini kompleksinin stabilitesi artmaktadır. Son olarak, oluşan serum proteini agregatları ile  $\kappa$ -kazein arasında tersinmez karakterli bir interaksyon oluşmaktadır (Ozer ve ark., 1997). Agregasyon oranı  $\kappa$ -kazein ve  $\beta$ -LG interaksyonu ağırlıklı olarak  $\beta$ -LG varyantlarından etkilenmektedir (Robitaille ve Ayers, 1995; Cho ve ark., 2003).  $\beta$ -LG BB genel olarak ısıya duyarlı iken, AA ve CC varyantları kısmen ısıya daha dayanıklıdır (Özer ve ark., 1997; Bikker ve ark., 2000).

Yukarıda belirtildiği üzere, süt ısıtıldığı zaman  $\beta$ -LG, kazein miselinin dışında bulunan  $\kappa$ -kazein ile etkileşime girmekte ve böylece kazein miseli denatüre  $\beta$ -LG ile çevrilmiş olmaktadır. pH 6.9 nun üzerinde olması durumunda  $\kappa$ -kazein/ $\beta$ -LG kompleksi ısıtma sırasında miselden ayrılır, pH 6.5-6.7 aralığında ise  $\kappa$ -kazein/ $\beta$ -LG kompleksi miselde kalır ve miseli stabilize ederek miselin çözünürlüğünü azalmaktadır (Singh ve Fox, 1987). Sıcaklığın 90 °C üzerine çıkması pH'nın 5.8-7.3 arasında olması durumunda yapısı açılan proteinleri sınırlayıcı etki yapmasından dolayı, sıcaklık artasada denatürasyon oranındaki artış çok küçük miktarda olabilmektedir (Tolkach ve Kulozik, 2005). Denatürasyon sonucu  $\beta$ -LG ve  $\kappa$ -kazein arasında misel yüzeyinde oluşan bu etkileşim sıcaklık artışı ile  $\alpha_s$ - ve  $\beta$ -kazein'in ayrışmasını engellemektedir (Liu ve ark., 2019).

#### **2.4.2.2. Kazein Misel Yapısındaki Değişimler**

Kazeinlerin çoğu taze sütte küresel geometride 40-300 nm çapında bulunmaktadır. Partiküller yaklaşık  $10^4$  kazein molekülü içermektedir. Bu kazein miselleri aynı zamanda başka bileşenler de içermektedir, yaklaşık 8 g/100 g kazein olacak şekilde kalsiyum fosfat ve proteaz-pepton bunlardan bazılarıdır. Miseller, yüzeylerinde su tutarlar ve hafif negatif yüke sahiptirler.





**Şekil 2.8.** Kazein miselinin sistematik modellenmesi (van Bookel ve Walstra, 1989).

Kazeinler, serum proteinlerinin aksine ısıya oldukça dayanıklıdır. Ancak süt ısıtıldığı zaman kazein miseli agregasyona uğrayabilmektedir. Bu tür bir agregasyon iyonik kalsiyum konsantrasyonundan etkilenen hidrofobik bağlanma bölgelerine maruz kalması ile meydana gelmektedir. İyonik kalsiyum konsantrasyonunun azalması başlangıçta ki agregasyonu da azalmaktadır (Fox ve ark., 2015).

Yüksek fosforilasyon seviyesi sebebi ile  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - ve  $\beta$  kazeinler kalsiyumu güçlü bir şekilde bağlayabilmektedir ve bu da kazeinlerin agregasyonuna ve presipitasyonuna neden olabilmekte ve bu nedenle ısıya karşı kararlılığı değişebilmektedir. Normal şartlarda kazeinler ısıya karşı hassas değildir, örneğin sodyum kazeinatın denatüre olabilmesi için 140°C de 1 saat ısıtılması gerekmektedir. Fakat bazı durumlarda ısıl işlemin şiddetine bağlı olarak sütte bulunan kazeinlerde moleküler arası disülfid bağlarının veya moleküler arası izopeptid bağlarının açılması sonucu defosforilasyon ve dolayısı ile agregasyon gözlemlenebilmektedir (Fox ve ark., 2015; Anema, 2021).

Hosttetler ve arkadaşları (Hosttetler ve ark., 1965) elektron mikroskobu ile yaptığı bir çalışmada pastörizasyon sıcaklığından daha şiddetli ısıl işlemin kazein misel boyutunu arttırdığını göstermişlerdir. Bunun sebebinin ise serum proteini denatürasyonu ile kazein miselinin agregasyonun artması veya kalsiyum fosfatın yer değiştirmesi ile misel boyutunun artmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Misel çapındaki artışa ek olarak küçük partiküllerinde sayısı da artmaktadır. Serum proteinleri olmadığında süt 90-150 °C ısıl işleme maruz bırakıldığında kazein çözünür forma geçmektedir ve bu küçük

partiküllerin ısıtma sırasında kazein miselinden ayrılan çözünür kazeini temsil ettiği düşünülmektedir (Burton, 1988; Anema, 2021).

#### **2.4.2.3. Tiyol Gruplarının Reaksiyonları**

Sisteinde bulunan SH- grupları oldukça reaktiftir ve pH 6.1, 6.4 ve 6.7 de sırasıyla %0.04, %0.08 ve %0.16 oranında bulunmaktadır. Isıtma işlemi sonucu serum proteinlerinin denatürasyonu ile reaktif tiyol grupları artmaktadır ve ısıtma işlemi ile –S-S bağlarının pozisyonu değişmektedir. Disülfid gruplarındaki değişimler protein molekülünün konformasyonunu etkileyebilmektedir.

-S-S ve SH- gruplarının çoğunluğu sütte fazla konsantrasyonda bulunan ve serbest tiyol grubu içeren  $\beta$ -LG'den kaynaklanmaktadır. Isıtma sırasında tiyol grupları çok reaktif olurlar ve geri dönüşümsüz reaksiyonlar meydana gelmektedir. Aslında hidrojen sülfür yağ globül membran proteininin bir parçasıdır ve bu yüzden yağsız süttün ısıtılması sonucu neredeyse hiç hidrojen sülfür üretilmezken kremanın ısıtılması sonucu çok daha fazla hidrojen sülfür açığa çıkabilmektedir (Walstra ve ark., 2006).

#### **2.4.2.4. Maillard Reaksiyonu**

Maillard reaksiyonu ısıtma uygulamaları ile ortaya çıkan reaksiyonlardan biridir ve proteinlerin serbest amino grupları ile indirgen şekerlerin serbest aldehit grubu arasında meydana gelmektedir. UHT sütte ise süt şekeri olan laktoz ve esansiyel aminoasitlerden olan lisin arasında bir reaksiyon sonucu olarak başlangıçta Schiff bazı oluşmakta ve daha sonra laktulosillisin oluşmaktadır. Maillard reaksiyonu başlangıç, ileri ve son aşama olmak üzere 3 aşamada oluşmaktadır. UHT sütte ısıtma işlemine bağlı meydana gelen maillard reaksiyonunun ileri aşamasında furfural, hidroksimetilfurfural, asetol, diasetil, aldoller, aldehitler ve azot içermeyen polimerler oluşmaktadır. Son aşamaya ise tüketiciler tarafından da gözlemlenebilen kahverengi rengin oluştuğu yani oluşan bu ürünlerin kahverengi azotlu polimerlere ve melanoidlere dönüşümünün gerçekleştiği aşamadır (Urgu ve ark., 2017).

Maillard reaksiyonunun UHT sütlede bilinen en önemli etkisi esansiyel bir aminoasit olan lisinin biyolojik olarak kullanılmasını engellemesidir. Protein polimerizasyonu, lezzet

bileşenleri ve mutajenik, antioksidatif ve antikarsinojenik bileşenler ve HMF oluşumu da diğer önemli etkilerindedir.

Morales ve ark. (Morales ve ark., 2000) tarafından yapılan bir çalışmada ısı işlem ile HMF arasında ki ilişki incelenmiştir. Isıl işlem yoğunluğunun artmasıyla birlikte HMF değerlerinin yükseldiği tespit edilmiştir. HMF değerleri, düşükten yükseğe sırasıyla pastörizasyon, direkt UHT işlemi, indirekt UHT işlemi ve klasik sterilizasyon işlemi uygulanan sütler olarak belirlenmiştir. Sütte ısı işleme bağlı oluşan Maillard reaksiyonunu, ısı işlem derecesinin yanı sıra reaksiyona giren şeker konsantrasyonu ve kompozisyonunu da etkilemektedir. Monosakkaritler ve indirgen disakkaritler reaksiyona girmektedir ancak monosakkaritlerin disakkaritlere kıyasla daha hızlı reaksiyona girdiği belirlenmiştir. Laktozsuz süt ile yapılan bir çalışmada oluşan HMF miktarının şaşırtıcı şekilde daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bunun sebebini laktozun enzimatik hidrolize uğrayarak glikoz ve galaktoza dönüşmesi, aminlerle (proteine bağlı lizin ve diğer NH-uçları) daha yüksek reaktivite göstermesine yol açarak Maillard reaksiyonu için daha uygun bir ortam oluşturmasıdır. Buna ek olarak, laktozsuz sütlere ilave edilen laktaz enziminin de proteolitik aktiviteler gibi istenmeyen uç aktiviteler ile serbest aminoasit miktarında artışa neden olarak reaksiyonu etkilediği belirlenmiştir (Urgu ve ark., 2017).

#### **2.4.2.5. Proteinazlar ve Proteoliz**

Sütte doğal olarak alkalın proteinaz ve plazmin enzimleri bulunmaktadır. Çiğ süt yaklaşık 0.3 mg/L plazmin ve 2.7 mg/L plazminojen içermektedir. Aktif endojen veya ekzojen plazminojen aktivatörlerinin etkisi ile plazminojen depolama sırasında plazmine dönüşebilmekte ve plazmin miktarı artmaktadır. Plazminin proteolizi sonucunda ise UHT sütlerin depolanmasında en çok karşılaşılan kusur olan jelleşme gözlemlenebilmektedir (Datta ve ark., 2002).

Plazmin ve plazminojen depolama sırasında sorunlara neden olabildiği gibi ısı işleme karşı oldukça dirençli olmalarına rağmen ısı işleminden de etkilenebilmektedirler. İndirekt ısı işlem ile yapılan proseslere karşı hassasiyetleri direk ısı işlem yöntemine göre daha fazladır. Manji ve ark. (Manji ve ark., 1986)'nın yaptığı bir çalışmada indirekt ısı işlem (145 °C, 3 sn) uygulanan sütlerde hiç kalıntı plazmin aktivitesi tespit edilmemiş fakat %19 orijinal plazminojen olduğunu belirtmiştir. İnfüzyon yöntemi ile yapılan direk ısı

işlem(142 °C, 5 sn) uygulanan sütlerde ise %19 plazmin aktivitesi ve %37 plazminojen olduğu gösterilmiştir. Plazmin aktivasyonunda UHT prosesinde ısı işlemin şiddetinden daha çok sterilizasyon sıcaklığına getirilip sütün bu sıcaklıkta kalma süresinin daha önemli olduğu vurgulanmıştır. Sonuç olarak proteolizin genellikle direkt ısı işlem yönteminde indirekt ısı işleme göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun sebebinin ise proteinazların indirekt yöntemde daha fazla inaktive edildiğinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Anema, 2019).

#### **2.4.2.6. Vitamin Kayıpları**

Süt vitaminler açısından oldukça zengin bir gıdadır. Özellikle yağda çözünen A, D vitamini ve suda çözünen B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> ve C vitaminleri için iyi bir kaynaktır (Bylund, 1995). C Vitamini, folasin, B<sub>12</sub>, riboflavin ve tiaminde UHT prosesi sırasında pastörize süttten daha fazla kayıp vardır. UHT süt için oksijenin miktarı C vitamini stabilitesini en çok etkileyen faktördür. C vitamini kaybı sadece ısı işleminden değil, ısı işleminden önce de oksidasyondan kaynaklanmaktadır. C vitamininin toplam kaybı, okside olmuş formun, dehidroaskorbik asidin ısıl kararsızlığına bağlanabilir (Barraquio, 2014a; Kılıç-Akyılmaz ve ark., 2022).

C vitamini stabilitesini olumsuz etkileyen en önemli parametre oksijen varlığı ve kullanılabilirliğidir. Genellikle süt işleme tesislerinde özellikle de indirekt sistem kullanılanlarda yüksek oksijen içeriğine sahip olan sütler işlenmektedir. Eğer süt oksijen ile doyurulursa, askorbik asit ve folik asit birkaç dakika içerisinde kaybolabilmektedir (Barraquio, 2014b).

Depolama sırasında da UHT süt ve pastörize sütte vitamin kayıplarına rastlanabilmektedir. Sütün depolama sırasında ışığa maruz kalması riboflavin ve dolayısıyla Vitamin A kayıpları için temel etkidir (Barraquio, 2014b).

**Çizelge 2.2.** Pastörize ve UHT sütte %vitamin ve mineral kayıpları (Burton, 1988; Barraquio, 2014a; Kılıç-Akyılmaz ve ark., 2022).

<b>Besin Öğeleri</b>	<b>Pastörize Süt</b>	<b>UHT Süt</b>
<i>Suda Çözünen Vitaminler</i>		
Askorbik asit (C)	% 10-25	% 15-25 (Direkt) % 31.6 (İndirekt)
Folik asit (B <sub>9</sub> )	% 0-12	% 10-20
Kobalamin (B <sub>12</sub> )	% 0-10	% 0-30
Piridoksin (B <sub>6</sub> )	% 0-10	% 0-10
Riboflavin (B <sub>2</sub> )	% 0-1	% 0-10
Tiamin (B <sub>1</sub> )	% 0-10	% 0-18
Niasin (B <sub>3</sub> )	Anlamli Kayıp yok	Anlamli Kayıp yok
Pantotenik asit (B <sub>5</sub> )	Anlamli Kayıp yok	Anlamli Kayıp yok
Biotin (B <sub>7</sub> )	Anlamli Kayıp yok	Anlamli Kayıp yok
<i>Yağda Çözünen Vitaminler</i>		
A, D, E Vitamini	Anlamli kayıp yok	Anlamli kayıp yok
Mineral ve İz elementler	Anlamli kayıp yok	Sınırlı kayıp (İndirekt)

## **2.5. Homojenizasyon**

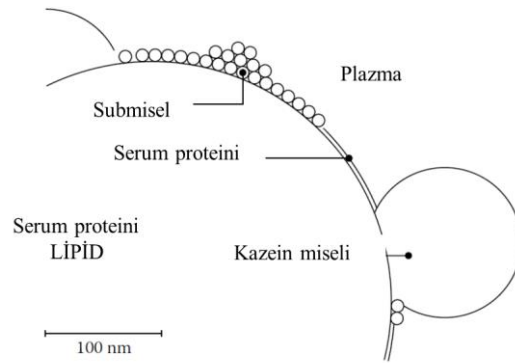
Homojenizasyon, UHT süt üretiminde uygulanması gereken bir işlemdir ve süt endüstrisinde genellikle iki kademeli olarak uygulanmaktadır (1.basamak 125-150 bar; 2.basamak 50-75 bar). UHT süt proseslerinde kullanılan homojenizatörler genellikle yüksek basınçlı bir pompadan oluşmaktadır ve sıvı halde olan sütün homojenizasyon kanalı olarak adlandırılan dar bir kanaldan geçmesini sağlamaktadırlar. Homojenizasyon sırasında vananın üst kısmında bulunan sıvı yüksek bir enerjiye sahiptir. Sıvı valfe girdiğinde bu enerji kinetik enerjiye dönüşmektedir ve çok yüksek hıza sahip olan sıvının dar bir kanaldan geçmesi sonucu burada türbülansa neden olmakta, böylece sıvının kinetik enerjisi kaybolmakta ve termal enerjiye dönüşmektedir.

Homojenizasyonun UHT işlemlerinde uygulanmasının asıl amacı yağ globüllerinin boyutunu küçültmek ve krema oluşumunu önlemektir. Büyük yağ globülleri daha küçük

globüller haline gelirler ve bu şekilde yüzey alanlarında artış meydana gelmektedir. Proteinler tarafından absorblanan yeni oluşan yağ damlacıkları birbiri ile çarpışırlar ve protein yüzeyel yükü küçük ise yeniden birleşme eğilimi gösterirler. Yeterli protein absorbe edilmemiş ise çarpışma etkisi yok olmaktadır. Valfin geçiti esnasında çarpışma en az elli kez meydana gelmektedir. Yağ damlaları bozulmasında bu esnada adım adım olmakta yağ damlacıkları birden fazla küçük damlacıklara ayrılmaktadır. Böylece yüzey yükü birkaç kez azalır ve tekrar artar.

Homojenizasyon sırasında veya homojenizasyondan sonra yağ globüllerinin boyutu değişmektedir. Yağ globüllerinin boyutunun belirlenmesinde homojenizatörün tipi, homojenizasyon basıncı, homojenizasyon kaç adımda tamamlandığı (tek aşamalı veya iki aşamalı olması durumu), protein yağ oranı ve sıcaklık faktörleri etkili olmaktadır.

Süt homojenize edildiğinde doğal globül membran yüzeyi zarar görmektedir ve doğal bileşenlerinin %10-30' unu içeren membran zarar görmekte ve yeni formlar oluşmaktadır. Yeni oluşan yüzey tabakası miseller kazein ve bir miktar da serum proteini içermektedir. Yüzeyde oluşan bazı miseller hiç absorpsiyona uğramadan değişmeden kalırken çoğu misel yağ-su ara yüzeyine yayılmaktadır (Şekil 2.9).



**Şekil 2.9.** Serum proteini, kazein ve yağ globüllerinin yapısı (Walstra ve ark., 2006).

Homojenize yağ globüllerinin yüzeyi çoğunlukla kazein tarafından kaplanmakta ve yağ globülleri büyük kazein miselleri gibi davranmaktadır. Kazein misel yapısında agregasyona sebep olan rennet eklenmesi, ısıl işlem gibi her reaksiyon homojenize yağ globüllerinin de agregasyonuna neden olabilmektedir (Walstra ve ark., 2006).

Homojenizasyon yağ globüllerini parçalayarak yağların yüzey alanını artırmaktadır. Özellikle kazein miselleri ve submiselleri gibi yüzey aktif maddelerin adsorbsiyonu sonucu yeni partiküllerin yerine geçmektedir. Homojenize edilmiş süt ısıtılma maruz bırakılırsa serum proteinleri adsorblanan miselle bağlanır ve bu da misellerin kendilerini yeniden düzenlemesine neden olmaktadır. Ancak süt homojenize edilmeden önce ısıtılma işlemi uygulanırsa serum proteinleri denatüre olur ve kazein miselleri ile etkileşime girmektedir. Homojenizasyon ve ısıtılmanın sırası farklı protein interaksiyonlarına ve farklı dağılımlarına neden olmakta ve bu nedenle protein stabilitesi ve proteinlerin fonksiyonel özellikleri etkilenmektedir. Proteinlerin fonksiyonel özelliklerinden rennetle pıhtılaşma süresi özelliği en çok etkilenen özelliklerdendir. Homojenize olmayan süte göre homojenizasyon işlemi uygulanmış sütlerde daha düşük rennet pıhtılaşma süresi görülmektedir.  $\kappa$ -kazeinin homojenizasyon işlemi uygulanmış sütlerde daha geniş bir alana yayılması ve daha az stabilite göstermesi, daha kolay hidrolize olması rennet ile pıhtılaşma süresini kısaltmaktadır. Sütün ısıtılma işleminden sonra homojenize edildiği durumlarda bu etki daha fazla gözlemlenmektedir.

UHT süt proseslerinde süt ilk olarak homojenize edilip daha sonra ısıtılma işlemi uygulandığında sütün ısıtılma stabilitesi azalmaktayken ısıtılma işleminden sonra homojenize edildiğinde bu etki görülmemektedir. Bunun sebebi ısıtılma işleminden kaynaklı serum proteinlerinin yağ globül yüzeyinde adsorblanmış kazein miselleri ile etkileşmesi sonucu koagülasyon meydana gelmesidir (Garcia-Risco ve ark., 2002).

Sharma ve ark. (Sharma ve ark., 1994)'nın ısıtılma işlemi ve homojenizasyonun süt proteinleri üzerine yaptığı bir çalışmada ısıtılma işleminden önce uygulanan homojenizasyon işleminde serum proteinlerin kazein miseline bağlanma bölgelerinin daha aktif olduğu ve yağ yüzeyine daha fazla yayıldığı bu nedenle membrana katılma eğiliminin fazla olduğuna değinilmiştir. Serum proteinlerinin kazein miseline ve yağ globüllerine oligomer olarak değil monomer olarak bağlandığı sonucuna ulaşılmıştır.

Isıtılma işlemi homojenizasyondan önce uygulandığı durumda ise serum proteinlerinin etkisiz hale getirilmesi ise sadece kompozisyonu değil aynı zamanda yağ globül membranının yapısını da etkilemektedir. Isıtılma işlemi homojenizasyondan sonra uygulanması ile karşılaştırıldığında yağ globül membranına bağlanan serum proteini miktarının daha az olduğu görülmüştür. Yine aynı çalışmada denatüre serum proteinlerinin yağ globül

membranına disülfid bağları ile  $\kappa$ - kazein ile bağlandığı bilindiğinden homojenize sütte yağ globül membranına bağlanan proteinlerden  $\beta$ -LG/ $\kappa$ -kazein oranı ölçülmüştür. Sonuç olarak yağ globül membranında ki kalıntı  $\kappa$ -kazein miktarının ısıtma ya da ısıtma işlem ve homojenizasyon sırasının değiştirilmesine bağlı olmadığı, yalnızca homojenizasyona bağlı olduğu belirtilmiştir. Yağ globül membranında bulunan  $\beta$ -LG/ $\kappa$ -kazein oranı ilk olarak homojenize edilen daha sonra ısıtma maruz bırakılan sütte, önce 10 dk ön ısıtma yapıp sonra homojenize edilen süte göre daha yüksektir. Isıtma işleminden önce homojenize edilen sütlerde  $\kappa$ -kazein molekülü başına birden fazla  $\beta$ -LG bağlayabilmektedir (Sharma ve Dalgleish, 1994).

## **2.6. Protein Yapılarının Tespitinde Kullanılan Analiz Metotları**

Proteinlerin yapısal analizinde kullanılan birçok yöntem vardır. Bunlar; kromatografik teknikler (RP-HPLC, İyon değişim, Jel filtrasyon, affinite, LC-MS, TOFF-MS vb), elektroforetik teknikler (Kapiler elektroforez, SDS-PAGE, Üre-PAGE vb), Vibrasyonel ve spektroskopik yöntemler (FTIR, Raman, NMR spektroskopisi vb), X-ışını kristalografisi ve kriyo-elektron mikroskop analizleri olarak sıralanabilir. Bu tez kapsamında ve tezin parçası olduğu proje kapsamında kullanılan analiz yöntemleri göz önüne alınarak aşağıdaki analiz metotları açıklanmıştır.

### **2.6.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)**

Kromatografi genel bir karışımdaki bileşenlerin birbirinden ayrılması için kullanılan kalitatif ve kantitatif analizlerin yapılmasının mümkün olduğu bir yöntemdir. Sıvı kromatografisi (LC) ise hareketli faz olarak sıvı fazı kullanan, bileşenleri büyüklüğüne, moleküler ağırlığına, hidrofobikliğine veya biyolojik fonksiyonuna göre ayıran kromatografik yöntemlerden biridir. HPLC sistemlerinde yağ asitleri, proteinler, karbonhidratlar ve amino asitler ayırt edilebilmektedir. Bu nedenle süt ve süt ürünleri analizlerinde özellikle protein analizlerinde sıklıkla kullanılan yöntemlerdendir.

Ters faz (RP) HPLC, hidrofobisite özelliğine göre proteinlerin ayrılmasında kullanılan en hızlı yöntemlerden birisidir. Normal LC sistemlerin tersine RP-HPLC sistemlerinde hidrofobik ve polar olmayan sabit faz ve polar mobil faz kullanılmaktadır. Örnek karışımındaki moleküller hidrofobik ve non-polar ise sabit faza bağlanabilmektedir. Hidrofobik gruplara ve daha uzun alkil zincirlerine sahip moleküller, durağan faza



yapılarında polar gruplara sahip moleküllerden daha güçlü bağlanmaktadır. Ayrıca polar moleküller kolona aynı derecede bağlanamazlar ve kolonu erken terk ederler. Yani farklı hidrofobikliğe sahip moleküller farklı zamanda kolona bağlanmaktadır ve böylece moleküller birbirinden ayrılabilir. Proteinlerin tespit edilmesinde 214 nm de UV dedektör veya aromatik kalıntıları tespit etmede 280 nm kullanılmaktadır. Analiz sonunda bir kromatogram elde edilmektedir. Kromatogramda analiz yapılan absorbansa karşı alıkonma süresi yer almaktadır. Alıkonma süresi (RT); bir parçanın analiz başlangıcından dedektör tarafından yapılan maksimum tespitine kadar geçen süreyi temsil etmektedir. Kromatogramda tespit edilen her pikin alanı başka bir maddeyi belirlemektedir.

Süt proteinlerinin RP-HPLC ile analizinde hem kazeinin hem serum proteinlerinin çeşitli varyasyonları ayırt edilebilmektedir. Ancak yapısal izomerler aynı hidrofobisiteye sahip olduğundan onları HPLC ile ayırt etmek mümkün olmamaktadır. Isıl işlem sonucu denatüre olmuş proteinleri de doğal formdaki protein miktarının belirlenmesinden sonra karşılaştırma yapılarak belirlenmesi mümkündür (Akkerman, 2014).

### **2.6.2. Elektroforez**

Proteinlerin elektriksel alandaki hareketine göre ayırım prensibine dayanan elektroforez de proteinlerin ayrılmasında, proteoliz ve denatürasyon durumun belirlenmesinde sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir. Elektroforezin temel prensibi akrilamid ve bisakrilamid arasındaki polimerizasyona bağlıdır, polimerizasyon sonucu bunların arasında çapraz bağlar oluşmakta ve çapraz bağlar arasında gözenekler oluşmaktadır. Akrilamid bisakrilamid konsantrasyonu oranı değiştirilerek jelin gözenek boyutu değiştirilebilmektedir. Jeldeki akrilamid oranı arttıkça gözenek boyutu küçülmektedir (Akkerman, 2014).

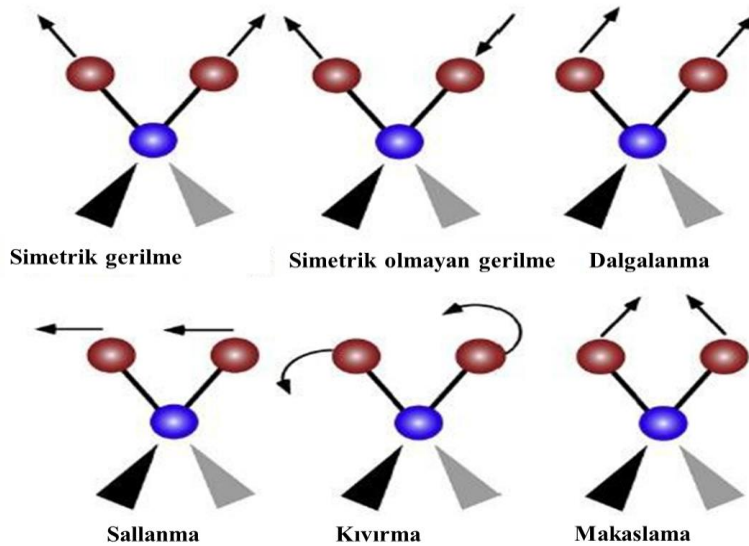
Süt ve süt ürünlerinde proteinleri ayırmak için sıklıkla kullanılan SDS (sodium dedosülfat) poliakrilamid jel elektroforezi ve URE-PAGE kullanılmaktadır. Üre-PAGE de proteinler, molekül büyüklüğü ve elektriksel yük oranına göre ayrılırken SDS-PAGE de tüm proteinlerde, disülfid olmayan ikincil ve üçüncül yapı denatüre edilerek proteinler, protein zinciri uzunluğundaki negatif yüklerle kaplanır ve yalnızca moleküler büyüklüğüne

göre ayrılmaktadır. Bu ayırım tekniği moleküllerin konformasyonel yapılarından ziyade, moleküler büyüklükleri hakkında bilgi almak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır.

### 2.6.3. Vibrasyonel (Titreşimsel) Yöntemler

Elektromanyetik dalgaların materyal ile etkileşimi sonucu oluşan titreşimler olarak tanımlanmaktadır. Elektromanyetik dalgalar birçok farklı şekilde materyal ile etkileşime girebilmektedir. Dalgaların materyali geçebilir, yüzeyden yansiyabilir veya dalga enerjisinin bir kısmı materyal tarafından absorblanabilir. Dalgaların materyali geçmesi iletim (transmission) yüzeyden yansması ise yansıma (reflection) olarak adlandırılmaktadır. Molekül tarafından absorblanan enerji molekülün dönmesine veya molekül içindeki spesifik bir grubun titreşimine veya moleküldeki bazı elektronların uyarılmasına neden olabilmektedir (Subramanian ve ark., 2011).

Her molekülde bulunan atomlar her zaman birbirine göre hareket halindedirler ve bu nedenle atomların düzlemsel konumları, bağ uzunlukları değişebilmektedir. Bu kinetik varyasyonların toplamına moleküler titreşim adı verilmektedir (Gök, 2013). Bu farklı titreşimler aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Şekil 2.10. IR spektrumunda gözlemlenebilen titreşim modları.

Vibrasyonel spektroskopik yöntemleri elektromanyetik spektrumun dalga boyuna göre üçe ayrılmaktadır. Buna göre elektromanyetik spektrumun  $0.78\mu\text{m} - 1\text{mm}$  arası kızılötesi (Infrared, IR) alandır. Bu bölgenin  $0.78-2.5\mu\text{m}$  arasında kalan kısmı **yakın-IR** (NIR, dalga sayısı cinsinden ifade edilirse;  $14000-4000\text{ cm}^{-1}$ ),  $2.5-15\mu\text{m}$  arasında kalan bölge organik

kimyada yararlanılan **orta-IR** (MIR, dalga sayısı cinsinden ifade edilirse;  $4000-400\text{cm}^{-1}$ ) bölgesi ve  $15-1000\ \mu$  (1 mm) arasındaki bölge ise **uzak-IR** (FIR, dalga sayısı cinsinden ifade edilirse;  $400-4\ \text{cm}^{-1}$ ) olarak bilinmektedir (Subramanian ve ark., 2011). MIR spektroskopisi, NIR spektroskopisinden daha fazla spektral bilgi içerir ve emme bantları daha iyi çözünürlük gösterir. Genellikle, NIR bölgesinin absorpsiyon yoğunluğu MIR bölgesine göre daha düşük olduğu için hassas tespitleri zorlaştırır. NIR spektroskopisi, MIR kadar duyarlı değildir. Çünkü absorpsiyon bantları çok daha geniştir ve üst üste binmişlerdir. Bu nedenle protein gibi yapıların analizinde daha çok MIR bölge tercih edilir (örn, FTIR,ATR-FTIR).

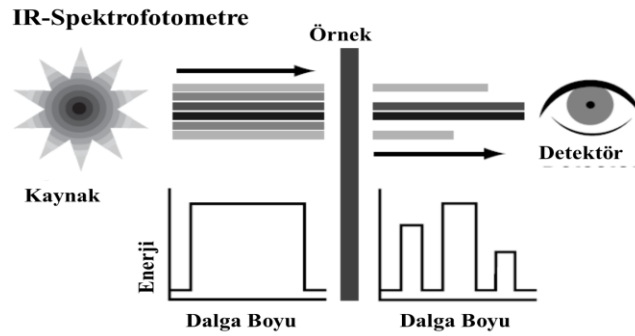
Her molekülün farklı şekilde titreşimleri mevcuttur. Bazı bağlar gerilme hareketi ile titreşim yaparken bazıları ise bükülme hareketi ile titreşime neden olmaktadır. Gerilme hareketi atomların aynı yönde hareket ettiği (simetrik) ve atomların zıt yönde hareket ettiği (asimetrik) olmak üzere iki farklı şekilde meydana gelir. Bükülme titreşimleri ise gerilmeden çok daha farklıdır. Örneğin makaslama, sallanma, kıvrılma veya dalgalanma gibi değişik geometrilere oluşabilmektedir. Bu titreşimlerin uyarılması için radyasyon enerjisinin molekülün zemin durumu ve uyarılmış hali arasındaki enerji değişimi ile tam olarak eşleşmesi ve molekülün dipol momenti mutlaka değişmelidir. Bu iki koşul polarize olmayan ışık için rezonans koşulları olarak adlandırılmaktadır (Subramanian ve ark., 2011).

Infrared spektroskopisi ve Raman spektroskopisi birbirini tamamlayan vibrasyonel spektroskopisi yöntemlerindedir. Proteinlerin sulu çözeltilerinde protein yapısı hakkında bilgi verebildikleri gibi film, toz, jel veya kristal gibi çeşitli fiziksel durumlarda proteinlerin yapısı hakkında bilgi elde edilebilmektedir. Infrared spektroskopisinde örnek kızılötesi bölgede elektromanyetik radyasyonu absorbalayarak molekülün farklı bölgelerinde farklı titreşimsel geçişlere neden olmaktadır. Raman spektroskopisinde ise örnek ultraviyole, görünür veya yakın kızılötesi bölgede bir lazer tarafından uyarılır, fotonun emisyonu ile önce daha düşük enerjili duruma dönüşür. Raman saçılmasının sonuçları lazer ile uyarıldığındaki ışınım sonucu ortaya çıkan enerjiden farklıdır. Raman spektroskopisi de infrared spektroskopisi de bağların gerilme yada esnemesi oluşan titreşimsel enerji seviyesi ile ilişkilidir. Ancak infrared(kızılötesi) absorpsiyon yapı içerisinde dipol moment değişimi gerektirirken Raman saçılması ise polarizitede ki

değişimlere bağlıdır. Polar fonksiyonel gruplar infrared spektroskopisi de daha güçlü spektrumlar verirken, polar olmayan gruplar ise Raman bantlarında daha yoğundur. Örneğin C=O, N-H ve O-H gibi polar gruplar güçlü IR spektrumunu verirken, C=C, C-C ve S-S gibi apolar gruplar yoğun Raman bantları oluşturmaktadır. Bu nedenle bu iki vibrasyonel yöntem birbirinin tamamlayıcısı olarak bilinmekte ve beraber kullanıldıklarında daha derin bilgilere ulaşılabilmektedir. Ayrıca su infrared bölgede güçlü bir absorpsiyona sahipken Raman da zayıf bir sinyal vermektedir. Bu sebeple sulu örnekler de Raman spektroskopisi ile çalışmak büyük bir avantaj olabilmektedir (Li-Chan, 2007).

### *FTIR (Fourier dönüşümlü kızılötesi) spektroskopisi*

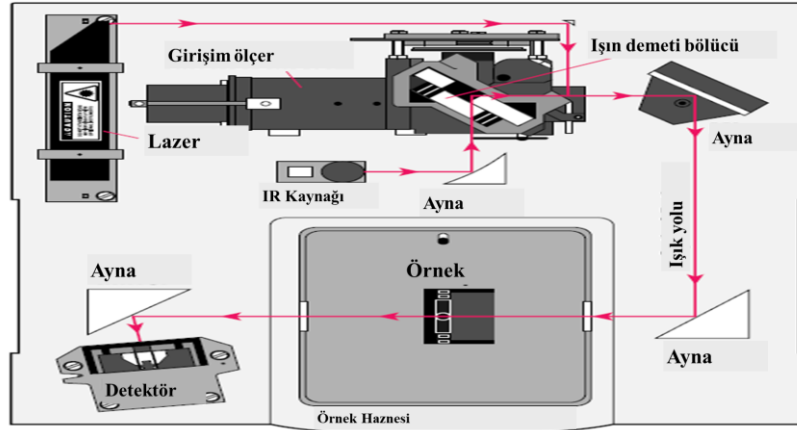
IR spektroskopide kızılötesi radyasyon örneğin içinden geçerek kızılötesi radyasyonun bir kısmı örnek tarafından absorblanmakta, kalan kısmı ise iletilmektedir. Sonuçta oluşan spektrum moleküler absorpsiyonu ve iletilen radyasyonu temsil etmekte ve böylece maddenin parmak izi çıkarılabilmektedir (Şekil 2.11). Her madde farklı spektrumlar ürettiği için her maddenin parmak izi de farklıdır. Bu sayede FTIR ile birçok maddenin tanımlanmasını yapmak, kalitesini belirlemek veya bir karışım içindeki bileşimi belirlemek mümkündür



**Şekil 2.11.** FTIR spektroskopisi (Nicolet ve All, 2001).

Bir maddenin kızılötesi spektrumu maddeyi oluşturan atomların bağları arasındaki titreşim frekanslarına karşılık gelen piklerinden oluşmaktadır. Her madde farklı atomlardan oluşmaktadır bu sebeple her madde farklı spektrumlar vermektedir.

İnfrared spektroskopisinde ki asıl problem kızılötesi frekansların ayrı ayrı taranmaması, hepsinin aynı anda taranması gerekliliğiydi. Bu sebeple interferometre geliştirilmiş ve interferometrede kodlanmış kızılötesi spektrumların sinyalleri oluşturulmuştur. Bu sinyaller kolayca ve bir saniyeden daha kısa süre içerisinde hızlıca alınabilmektedir. Böylece örnek başına geçen zaman azalmaktadır. Çoğu interferometre beamsplitter (ışın ayırıcı) gelen kızılötesi ışını almakta ve optik ışına bölmektedir. Bir ışın sabitlenmiş bir aynadan yansır. Diğer ışın ise beamsplitterdan kısa mesafe uzaklıkta bulunan hareketli aynadan yansıtılmaktadır. Bu iki optik ışın beamsplitter da tekrar buluşurlar. Çünkü bir ışın demetinin yolu sabittir, diğeri ise aynası hareket ettikçe hareket etmektedir. İnterferometrede oluşan sinyal bu iki ışının çakıştığı anda ortaya çıkan sonucu göstermektedir. Ancak interferometreden elde edilen sinyaller direkt olarak yorumlanamamaktadır. Bu sebeple frekansları koda dönüştüren bir matematik modelleme olan Fourier transformation (fourier dönüşümü, FT) kullanılmaktadır. Bu dönüşüm bilgisayarda yapılmakta bize direkt spektrum verilmektedir (Nicolet ve All, 2001).



**Şekil 2.12.** FTIR spektroskopisi çalışma prensibi (Nicolet ve All, 2001).

FTIR analizlerindeki sistemlerde en önemli kısım interferometredir. Genellikle Michelson interferometresi kullanılmakta ve şekilde görüldüğü gibi 2 ayna içermektedir (Şekil 2.12). Aynalardan birisi sabit hızda hareket halinde iken diğeri durgundur. İki ayna arasında da germenyum kaplı KBr den oluşan beam splitter (ışın ayırıcı) yer almaktadır. Beam splitter gelen ışını iki yeni ışına ayırır, ışınlardan biri hareketli aynadan yansırken diğeri sabit aynadan yansımaktadır. Bu ayrılan iki ışın aynalardan geri yansıtılarak tekrar beam splitter da buluşurlar. Burada birleşen ışın örnekleme yapılan alana girerek örnekle

etkileşime girer. Yayılmış ya da yansımış olarak iletilen ışık buradan detektöre geçmekte ve kosinüs dalgalarının toplamını oluşturan bir çıkış sinyali vermektedir. Burada hareketli aynanın pozisyonuna bağlı olarak ölçülen enerjiden kaynaklı interferogram oluşmaktadır. İnterferogramdan frekanslar hakkında temel bilgiler elde edilebilmektedir ancak direkt yorumlanamamaktadır. Bu sebeple matematiksel bir dönüşün olan Fourier dönüşümünü bilgisayar yardımı ile kullanılmakta infrared spektrumları alınabilmektedir (Sun, 2008).

FTIR spektroskopisi ile yapılan çalışmalarda en sık kullanılan yansıtma tekniklerinden biri zayıflatılmış toplam yansıtma (ATR) sistemidir. ATR kullanılan FTIR' da örnek kırılma indisi yüksek ZnSe, Ge, ZnS, Si veya elmaştan yapılan bir kristal ile temas halindedir. ATR sistemi kızılötesi ışın örnekle karşılaştığında tamamen yansıma ile oluşan değişimleri ölçmektedir. Her yansıma bölümü için evanescence dalgası üretilmektedir. Evanescence dalgaları kaynaktan uzaklaştıkça yoğunluğu azalan elektromanyetik alanlara nüfuz etmektedir. Daha sonra örneğe nüfuz eden evanescence dalgaları örnekle etkileşim kurarak spektrum üretmektedir (Sun, 2008).

ATR-FTIR tekniği çok yönlü ve güçlü bir tekniktir. İletim için çok kalın veya çok opak olan örnekler için bile ATR yöntemi kullanışlı bir yöntemdir. Numune hazırlığın kolay olması hatta hiç hazırlık yapmadan direk ölçüm kolaylığı sağlaması, hızlı örnekleme yapılabilmesi ve kısa sürede sonuç alınabilmesi gibi sebeplerden dolayı ATR-FTIR uygulaması süt sektöründe sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Süt proteinlerin değişimini gözlemlemek için yapılan geleneksel yöntemler zaman alması, pahalı olması dolayısıyla yerini daha hızlı teknik olan vibrasyonel yöntemlere bırakmıştır.

### *Raman Spektroskopisi*

Raman spektroskopisi ışığın örnekle etkileşimi sırasında ışığı oluşturan fotonların saçılması prensibine dayanmaktadır. Ancak ışığın saçılması esnasında saçılan ışığın enerjisinin büyük bir kısmı örnek ile etkileşime giren ışığın enerjisi eşit olur ve bu elastik saçılma Rayleigh saçılması olarak adlandırılmaktadır. Saçılan ışığın enerjisi ve örnek ile etkileşime giren ışığın enerjisinin farklı olduğu durumlardaki saçılma ise Raman saçılmasıdır. İşte bu enerji farklılıkları molekülün titreşim enerji düzeyi farklardan kaynaklanmakta ve Raman saçılmasının spektroskopik yöntemlerle incelenmesi sonucu titreşim enerji düzeyleri gözlemlenebilmektedir.

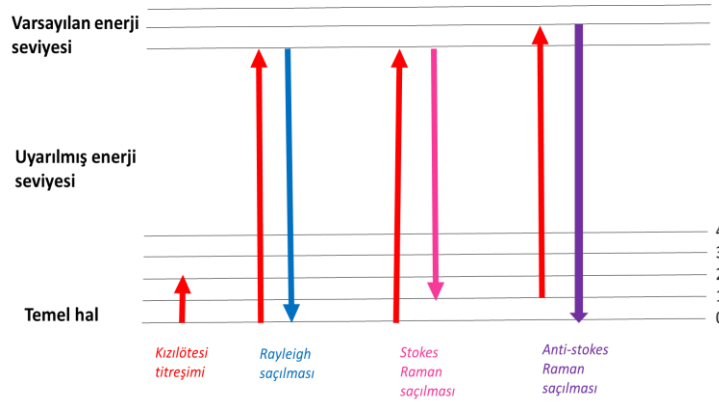
Raman spektroskopisi temel olarak uyarma kaynağı olarak kullanılan lazer, aydınlatma sistemi ve ışık toplama optiği, spektrofotometre ve detektörden oluşmaktadır. Örnek UV, görünür ışık veya kızılötesi lazer kaynağı ile uyarılmaktadır. Saçılan ışık bir kaynaktan toplanır ve Raman spektrumu elde etmek için bir interference filtresi veya spektrofotometreye gönderilir. Raman spektroskopisinin en büyük zorluklarından biri Rayleigh saçılmasından ayırmaktır. Burada ki asıl sorun Rayleigh saçılması değil Rayleigh saçılmasından kaynaklanan ışığın yoğunluğunun Raman sinyalinin yoğunluğunu aşmasıdır. Çoğu zaman bu sorun belirgin etkiye sahip lazer çizgisine en yakın spektral aralığı keserek çözülmektedir.

Raman spektroskopisinin yaygınlaşmaya başladığı ilk zamanlarda dedektör olarak tek noktalı PMT (photomultiplier Tubes) dedektörler kullanılırdı. Ancak günümüzde PDA fotodiyot dizileri gibi çok kanallı dedektörler veya CCD (Charge Couple Device/Yük Eşleşmiş Cihaz) dedektörler yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Hassasiyeti ve performansı sebebi ile Raman sinyallerinin tespitinde en çok tercih edilen CCD dedektörlerdir.

Raman spektroskopisini dispersive (dağılıtılı) ve non- dispersive (FT-Raman) olarak iki gruba ayırmak mümkündür. Gıda için hangisinin daha etkin olduğu hala tartışılabilir da FT-Raman uygulamalarının gıda ürünlerinde daha fazla ve daha etkin kullanımı görülmektedir. Dispersif Raman spektroskopileri sanayide yaygın olarak mevcut olan sistemler olup, bir monokromatör, bir CCD dedektörü ve 200-800 nm arasında değişen lazer kaynağından oluşmaktadır. Gıda maddelerinin Raman spektrumunu elde etmek için önemli olan uygun lazer kaynağı ile uyarılmasıdır. Son yirmi yılda lazer kaynağı olarak UV ve görünür ışık yayan argon ve kripton iyon lazerler kullanılmaktaydı. Ancak günümüzde Raman spektroskopisi laboratuvarlarında daha hassas olan He-Ne lazerler kullanılmaktadır.

FT-Raman spektroskopisinin dispersif Raman spektroskopisine göre birçok avantajı bulunmaktadır. FT-Raman spektroskopisi örneği uyarılmak için daha uzun dalga boyunda lazer ışığı kullanarak daha az enerji sağlamak ve bu durumda Raman sinyallerini maskeleyen floresans etkileşimlerini azaltmaktadır. FT- Raman spektroskopisi de FTIR gibi Raman saçılmasından elde edilen sinyalleri kodlayan interferometre kullanılmaktadır.

İnterferometre NIR (yakın kızılötesi) için geliştirilmiş bir beam-splitter (ışın ayırıcı) kullanmaktadır. Ayrıca örneğin uyarılmasında da 1064 nm Nd:YAG lazer kullanılmaktadır. Aslında FT-Raman spektroskopisinde Raman saçılması zayıftır ve bu yüzden görünür bölgedekinden daha zor tespit edilebilir. Ancak floresanstaki azalma daha fazla gıda örneği ile çalışmaya imkan sağlamaktadır.



**Şekil 2.13.** Raman saçılması ve Rayleigh saçılması gösterimi.

Rayleigh saçılmasında verilen enerji aynı enerji ile geri dönerken, Raman saçılmasında ışık gönderdiğimizde Stokes-Raman saçılmasında olduğu gibi enerji kaybedilir ya da anti-stokes Raman saçılmasında olduğu gibi küçük enerjili foton verilir büyük enerjili foton alınarak fazla enerji kazanılmaktadır. Bu enerji değişimleri moleküle bağlı olarak değişmekte ve bu enerji değişimleri sonucunda örneğin spektrumu elde edilebilmektedir. Raman spektroskopisinde o bölgeye karşılık gelen ışığın dalga boyundaki azalma veya artma okunmaktadır. Raman spektroskopisinde simetrik geçişlerde incelenebilirken, FTIR' da simetrik geçişleri görmek mümkün değildir.

Şekilde 2.13'teki gibi bir Raman saçılması olayında bir foton ile molekül etkileştiğinde saçılmadan önce bazı fotonların enerjilerinin bir kısmı moleküllere ve moleküllerden de fotona az miktarda enerji aktarılmaktadır. Bu enerji aktarımı sayesinde moleküller farklı titreşim enerji düzeylerinde bulunmaktadırlar. Bir başka deyişle moleküllerin farklı titreşim enerji düzeylerinde bulunmaları için molekül ve foton etkileştiği sırada fotonun elektrik alanı tarafından periyodik ve fotonun frekansı ile aynı frekanslı olacak şekilde polarlanabilmesi, dipol moment oluşturması gerekmektedir. Raman hatlarının şiddeti,



titreşen molekülün fotonla etkileşirken oluşan polarlanabilme değişim hızının karesi ile orantılıdır.

Raman spektroskopisi süt endüstrisinde sıklıkla kullanılan bir yöntem olmasının yanı sıra süt proteinlerinin ikincil yapısını belirlemede en etkin yöntemlerden biri olarak da bilinmektedir.  $\alpha$ s-kazein,  $\beta$ -kazein,  $\kappa$ -kazein,  $\beta$ -LG ve  $\alpha$ -LA gibi süt proteinleri FT-Raman spektroskopisi ile de detaylı incelenebilmektedir. Sütler de hem kalite kontrol yapılabilmekte hem de kantitatif analiz yapmak mümkün olmaktadır. Raman spektroskopisinin sulu örneklerde de ölçüm alabilmesi bu anlamda bir avantaj oluştururken kuvvetli bir lazer tarafından uyarılması da örnek de doku kaybına neden olabilmekte bu da Raman spektroskopisinin önemli bir dezavantajı olarak bilinmektedir.

## **2.7. FT-Raman ve FTIR Spektroskopisinin Süt Proteinlerinin Belirlenmesinde Kullanımı**

Isıl işlem gıda proseslerinde sıklıkla olup, özellikle süt endüstrisinde uygulanması zorunlu bir basamaktır. Isıl işlem UHT sütlerde tekstür, aroma, renk, beslenme değeri gibi özelliklerde değişime neden olduğu gibi proteinlerde de bazı değişimlere neden olmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında farklı ısıl işlem uygulama yöntemleri ve farklı homojenizasyon parametreleri uygulama sırasının (ısıl işlem öncesi ve ısıl işlem sonrası) UHT sütlerde ki süt proteinlerine etkisi incelenmiştir. Proteinlerin ikincil yapısının belirlenmesinde Raman spektroskopisi, mid-infrared spektroskopisi ve near-infrared spektroskopisi son zamanlarda sıklıkla kullanılan hızlı ve uygulanması kolay vibrasyonel yöntemlerdendir.

Vibrasyonel spektroskopi günümüzde sıklıkla proteinleri ve proteinlerin ikincil yapısının belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden biridir. Aminoasit yan zincirlerindeki titreşimsel geçişler, sistein ve sistindeki S-H, S-S grupları, triptofan, trozin, fenilalanin gibi aromatik aminoasitlerin aromatik halkaları, alifatik aminoasitlerin C-H bağları, aspartik ve glutamik asit gibi asidik aminoasitlerin COO<sup>-</sup> ve COOH grupları ve histidinde ki imidazol halkası Raman ve IR spektroskopisinde farklı titreşimlere neden olarak farklı bölgelerde spektrum vermektedirler. Amino asitler arası peptit bağı (amit bağı) bölgeleri, amit-I (C=O gerilme, 1700-1600 cm<sup>-1</sup>), amit-II (C-N gerilme ve N-H bükülmesi, 1575-1480 cm<sup>-1</sup>) ve amit-III (C-N gerilme ve N-H bükülmesi, 1300-1200 cm<sup>-1</sup>) bölgesi

proteinlerin iskelet yapısını belirleyerek protein veya polipeptidlerin ikincil yapısındaki değişimler hakkında bilgi vermektedir (Barth, 2007; Li-Chan, 2007; Nucara ve Carbonaro, 2010).

Disülfid ve sülfidril grupları,  $500-550\text{ cm}^{-1}$  de ki S-S ve  $2550-2580\text{ cm}^{-1}$  de ki S-H gerilmelerinin tespiti ile belirlenebilmektedir. Aromatik aminoasit zincirleri karakteristik Raman bantları oluşturmaktadır. Özellikle bu bantlar mikro ortamın polarlığının belirlenmesinde ve hidrojen bağına katılımın gözlemlenmesinde rol oynamaktadır. Triptofan ve tirozin aminoasitlerinden farklı olarak fenilalanin bant yoğunluğu konformasyonla ve ya mikro çevreyle ilişkili değildir. Ancak  $1006\text{ cm}^{-1}$  de ki keskin bant proteinlerin Raman bantlarının standartlaştırılması için iç referans olarak kullanılmaktadır. Alifatik aminoasit kalıntıları ise  $2800-3000\text{ cm}^{-1}$  de C-H gerilmesi ve  $1440-1465\text{ cm}^{-1}$  de C-H bükülmesi göstermektedir. Yüklü aminoasit kalıntılarının fonksiyonel grupları genellikle IR spektroskopisinde Raman ile kıyasla daha güçlü bantlar görülmektedir. Ancak yinede Raman spektroskopisinde de bu bantlar gözlemlendiğinde iyonizasyon hakkında bilgiler vermektedir (Li-Chan, 1996).

Proteinlerin ikincil yapısı hakkında bilgi veren asıl bantlar amit-I ve amit-III bantlarıdır. Proteinlerin amit-I bölgesindeki bant spektrumları ve çeşitli yan zincir titreşimleri amit-III bölgesindeki bantlara katkı sağlamaktadır. Yani proteinlerin IR bölgede veya Raman' da ikincil yapısının yorumlanması amit-I ve amit-III bölgesinin eş zamanlı değerlendirilmesi ile mümkün olmaktadır. Bu bölgelerin değerlendirilmesinde temel bileşen analizi (PCA) veya küçük kareler yöntemi (least square analysis) gibi istatistiksel yöntemlerden yararlanılmaktadır (Li-Chan, 1996; Granato ve ark., 2018).

Tez kapsamında hem ısıtma işlem yöntemi hem homojenizasyon işleminin sırası değiştirilerek ısıtma işlem ve homojenizasyonun süt proteinlerine etkisi incelenmiştir. Isıtma işleminin proteinler üzerine etkisi uzun yıllardan beri araştırılan bir konudur. Bu konu ile ilgili yapılan bir çalışmada farklı toplam kuru madde içeren yağ çığ süt örneklerinin  $75, 85, 95, 100, 110$  ve  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  de ısıtılması sonucu protein değişimleri incelenmiştir (Markoska ve ark., 2019). Fakat bu çalışmada yalnızca ısıtma işleminin etkisi incelenmesinin yanı sıra FTIR kullanılarak amit-I ( $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ ) bölgesinde ölçüm alınmıştır. Konu ile ilgili yapılan bir diğer çalışmada homojenizasyon ve pastörizasyon etkisi birlikte

incelenmiş olup, kazein yapısı üzerinde durulmamış yalnızca serum proteinlerinde değişimlere odaklanılmıştır (Qi ve ark., 2015).

Ye, Cui ve ark. (Ye, Cui ve ark., 2017) yaptığı bir çalışmada ısıtma işlemi sonucu süt proteinlerinin sindirime etkisi incelenmiş olup, proteinlerin ikincil yapısı üzerinde durulmadığı gözlemlenmiştir. Yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada ise yağsız süt örnekleri 55, 65, 75, 85 ve 95 °C de ısıtılarak ısıtma işleminin sülfidril içeriğine etkisi, yüzey hidrofobitesi ve proteinlerin ikincil yapısı incelenmiştir. Yine yapılan bu çalışmada yalnızca FTIR kullanılmış olup, UHT sıcaklıklarındaki etki incelenmemiştir (Li ve ark., 2021). Aynı zamanda homojenizasyonun proteinler üzerine etkisi protein-yag globüllerinin değişimini gözlemlenmemiştir.

Raman spektroskopisi yöntemi kullanılarak protein ve yağ bileşenlerin incelendiği bir çalışmada farklı yağ oranlarına ve farklı laktoz miktarlarına sahip süt örnekleri pastörizasyon, ESL ve UHT yöntemleri ile ısıtma işlemine tabi tutulmuş ve daha sonrasında Raman spektroskopisinde ölçümleri alınmıştır. Bu çalışmada yazarlar süütün köpük oluşturma özelliğini incelemiş olup, yağ ve proteinlerin miktar olarak belirlenmesi konusunda Raman spektroskopisinden yararlanmıştır. Proteinlerin ikincil yapısı ve yağ homojenizasyonunun protein-yag interaksiyonuna etkisi incelenmemiştir (Reiner ve ark., 2020).

## **2.8. Temel Bileşen Analizi (Principal Component Analysis, PCA)**

Temel bileşen analizi birçok alanda kullanılan çok değişkenli istatistiksel bir yöntemdir. Temel bileşen analizi denetimsiz boyut küçültme olarak tanımlanmaktadır. Burada boyut küçültme verilerinin doğrusal olarak aktarılması ve bunun sonucunda ana bileşen adı verilen yeni parametre setinin ortaya çıkmasıdır (Peng ve ark., 2020). Temel PCA modeli;  $X=TP^T+E$  ile tanımlanmıştır (Eriksson ve ark., 2013).

Burada;

X: giriş matrisidir ( $n \times p$ ), orijinal verileri temsil etmektedir.

P: yükleme matrisidir ( $p \times k$ ), orijinal parametrelerin katkısını temsil etmektedir.

T: skor matrisidir ( $n \times k$ ), orijinal parametrelerin ilişkisini temsil etmektedir.

E: kalıntı matrisi ( $n \times p$ ), yakalanmamış varyansı temsil etmektedir.

n: zaman adımı sayısı

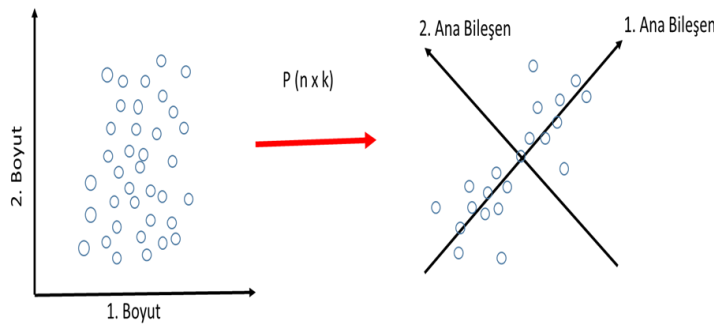
p: orijinal parametre sayısı

k: ana bileşen sayısı

PCA modelinde amaç PC leri inşa eden k ana bileşenin bulunmasıdır.

$$PC_1 = a_{11} \times P + a_{21} \times P + a_{31} \times P + a_{41} \times P + \dots + a_{p1} \times P$$

Temel bileşen analizinin prensibi değişkenlerden oluşan bir veri kümesinin varyans-kovaryans yapısını, bu değişkenlerin doğrusal birleşimleri yardımıyla açıklayarak boyut indirgemesi ve yorumlanmasına dayanmaktadır. Temel bileşen analizinin temeli büyük boyutlu birbiri ile ilişkili olan vektörleri, birbiri ile ilişkili olmayan daha küçük vektörlere bölmektir.



Şekil 2.14. İki boyutlu PCA'nın geometrik olarak gösterimi (Ionita ve Schiopu, 2010).

Temel bileşen analizi, çok sayıda değişkenden oluşan veri setlerinin mümkün olduğunca veri setindeki değişimler kaybolmadan daha küçük boyuta indirgenmesi ile oluşan bir dönüşümdür. Amaç daha az değişken ile verileri en iyi şekilde ifade etmektir. Analiz sonrasında elde edilen değişkenler temel bileşenler olarak adlandırılmakta ve varyans değerlerine göre sıralanmaktadır. En büyük varyansa sahip olan ilk temel bileşen olup diğerlerinin sırası da varyans değerine göre belirlenmektedir (Yazar ve ark.,2009).

Vibrasyonel analizler ile örneklerin spektral parmak izleri ortaya konmaktadır. Spektral parmak izlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi oldukça kompleks bir algoritma gerektirir ve birçok ön işlem uygulanabilmektedir. Uygun formata ve istenilen verilere ulaşmak için spesifik ön işlem metotları gerekmektedir. Yapılan ön işlemlerin genel

amacı enstrümental ve deneysel hatalardan kaynaklanan varyasyonların uzaklaştırılması ve verilerin hazır hale getirilmesidir. Ön işlemlerin belirlenmesi için kesin olarak belirlenmiş kural bulunmamaktadır. Ancak ön işlemin seçimi veri özelliklerine ve amaca uygun seçilmelidir. Aynı zamanda ön işlemin doğru gerçekleştirilmediğinde veri setinde istenmeyen varyanslar oluştuğu unutulmamalıdır. Bazı ön işlemler ve amaçları ile ilgili bilgi aşağıda yer almaktadır (Temiz, 2019).

*Derivative (Türev):* Türev işlemi PCA analizinde, değişken sayısı (indeks) veya diğer ilgili eksen ölçeğine göre ölçülen cevapların türevini alarak önemsiz baseline sinyallerini örnekten uzaklaştıran ve yaygın kullanılan bir pre-process methodudur. Bu method yalnızca birbiriyle güçlü bir ilişki içinde olan değişkenler olduğunda ve benzer ilişkili sinyal içeren bileşik değişkenler olduğunda kullanılır. Birinci türev; bir örnekteki her değişkenin komşu değişkenden çıkarıldığı nokta farkı olarak tanımlanır. İkinci türev ise daha yüksek frekans özelliklerini vurgulayarak proses tekrarlanarak hesaplanır (Anonymous, 2020). Birinci türevi alınması ile spektrumdan sabit baseline offset çıkarılmakta ve ikinci türev alınmasıyla ise baseline offset ve baseline slope çıkarılmaktadır (Temiz, 2019).

*Mean centering (ortalama merkezleme):* Sıklıkla kullanılan bu ön işlemin temeli her bir değişkenin ortalama değerinin hesaplanması ve bu ortalama değerlerin değişkenlerden çıkarılmasına dayanmaktadır (Alexandris ve ark., 2017).

*Autoscale (Oto-ölçekleme):* Boyutlandırma amacı ile yapılan bu ön işlem her bir değişkenin o değişkene ait boyutlandırma faktörüne yani standart sapma değerine bölünmesidir. Değişkenlerin sayısal değerlerinin farklılık olduğu durumlarda model yüksek değerlere odaklanmaktadır ancak tüm değişkenlerin modele katılması gerektiğinden autoscale ön işleminin uygulanması gereklidir (Temiz, 2019)

*Detrend (Eğilimsizleştirme):* Sabit, linear veya eğri bir kayma olduğunda kullanılmaktadır (Eigenvector, n.d.). Yani bu ön işlemdeki amaç baseline düzeltmesi yapmaktır. Sabit bir polinomun spektruma fit edilmesi ve bu polinomun spektrumdan çıkarılması ile uygulanmaktadır (Temiz, 2019).

*Smoothing*: Birçok spektroskopik analizde mevcut olan gürültüyü uzaklaştırmak için kullanılmaktadır (Temiz, 2019).

*Scaling (Yumuşatma)*: Standardizasyon olarak da adlandırılmakta ve bu ön işlem noktaların aralığını değiştirerek değişkenlerin eşit büyüklükte olmasını sağlamaktadır. Değişkenler farklı birimde olduğunda bu işlem kullanılmaktadır (Alexandris ve ark., 2017).

Vibrasyonel spektroskopi ile yapılan çoğu çalışmada elde edilen verilerin daha açıklanabilir olması açısından temel bileşen analizinden veya küçük kareler metotundan faydalanarak, analiz edilen örnekler gruplandırılabilen, farklılıklar belirlenebilen ve farkın neden kaynaklandığı gözlemlenebilmektedir. Bu tez çalışması kapsamında da birçok avantajı olan temel bileşen analizi yöntemi kullanılmıştır.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Materyal

Tez kapsamında denemeleri gerçekleştirilmiş olan homojenize UHT sütlerin üretimi Torku Pilot ve Endüstriyel Süt İşletmesi'nde gerçekleştirilmiştir. UHT süt üretimi direkt enjeksiyon ve indirekt (tubular holder aracılığı ile) yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Firmanın çiğ süt kabul kriterleri esas alınmıştır. Bu kriterler: çiğ süt işletme kabul sıcaklığı 4 °C, ortalama toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı <100000 kob/mL, β-lactam testi negatif, pH 6.6 olarak kaydedilmiştir. Sütler, aynı süt toplama merkezinden ardışık günlerde temin edilmiş ve prosese alınmıştır. Süt kaynağı aynı ve işleme zaman aralığı ise 3 gün olduğundan tekrarlar arasında süt kaynaklı bir farklılık beklenmemektedir. Üretimler 3 tekrarlı yapılmış olup deneme deseni aşağıda verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Deneme deseni ve örnek kodları

<b>Örnek kodları ve tanımları</b>	<b>pH4.6- İzoelektrik Kazein veya Serum</b>	<b>Ultrasantrifüj-Kolloidal Kazein veya Serum</b>
<b>A-</b> Çiğ süt Homojenizasyon YOK	PA	UA
<b>B-</b> Kaynatılmış süt ( ~100 °C/ 10 dk), Homj. YOK	PB	UB
<b>C-</b> UHT (143 °C/ 6 s), İndirekt yöntem (Tubular) Homj. YOK	PC	UC
<b>D-</b> UHT (143 °C/ 6 s) İndirekt yöntem (Tubular) Isıl işlem sonrası homj. VAR	PD	UD
<b>E-</b> UHT (143 °C/ 6 s) İndirekt yöntem (Tubular) Isıl işlem öncesi homj. VAR	PE	UE
<b>F-</b> UHT (143 °C/ 6 s) Direkt yöntem (Enjeksiyon) Isıl işlem sonrası homj. VAR	PF	UF

Her iki üretimde de süt çift kademeli olarak homojenize edilmiştir. Homojenizasyonun 1. kademesi 65 °C'de 150 bar ve ikinci kademesi aynı sıcaklıkta 70 bar olarak uygulanmıştır. UHT sıcaklığı ise 143 °C'de 6s olarak belirlenmiştir. Protein konformasyonu üzerine ısıl işlem şiddetinin etkilerinin karşılaştırılabilmesi amacıyla aynı parti üretime ait çiğ süt ve

kaynamış süt (~ 95-100 °C, 10 dk) örnekleri de hazırlanmıştır. Isıl işlem görmüş örnekler aseptik dolun makinesinde standart Tetra-Pak ambalajlara doldurulmuş ve oda sıcaklığında analiz anına kadar saklanmıştır.

## **3.2. Metot**

### **3.2.1. Kimyasallar ve Malzemeler**

Hidroklorik asit (2N), sodyum hidroksit (0.1N), amil alkol, asetik asit (%100), sodyum dodesil sülfat, borik asit ve sülfirik asit (%95-97), %24'lük trikloroasetik asit (TCA) Merck, Almanya dan temin edilmiştir. Dikrometan, akrilamid (%99), N,N-Methylenebisacrylamide  $\geq$ 98%, Amonyum persülfat, 2-merkaptioethanol, bromfenol mavisi, TEMED ve glisin (min %99) Sigma firmasından temin edilmiştir. Sodyum asetat trihidrat PRS firmasından, trifluoroasetik asit (TFA, %99.5) Acros firmasından temin edilmiştir. Tüm analizlerde ultra saf su (MiliQ sistemi, Milipore, Bedford, MA, ABD) kullanılmıştır. Ultrasantrifüj işlemi için ODTÜ merkez laboratuvarında bulunan Hitachi himac-CP100WX marka ultrasantrifüj cihazı kullanılmıştır

ATR-FTIR ölçümleri Thermo Nicolet iS50, single-bounce elmas kristal ve deuterated triglycine sulphate (DTGS) deketöre sahip FTIR (Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, MA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. XT-KBr beamsplitter olarak kullanılmıştır. FT-Raman spektrumlarının elde edilmesinde ise Nicolet iS50 spektrometresinin numune bölmesine monte edilmiş bir Raman modülü kullanılarak kaydedilmiştir.

### **3.2.2. Temel Bileşim Analizleri**

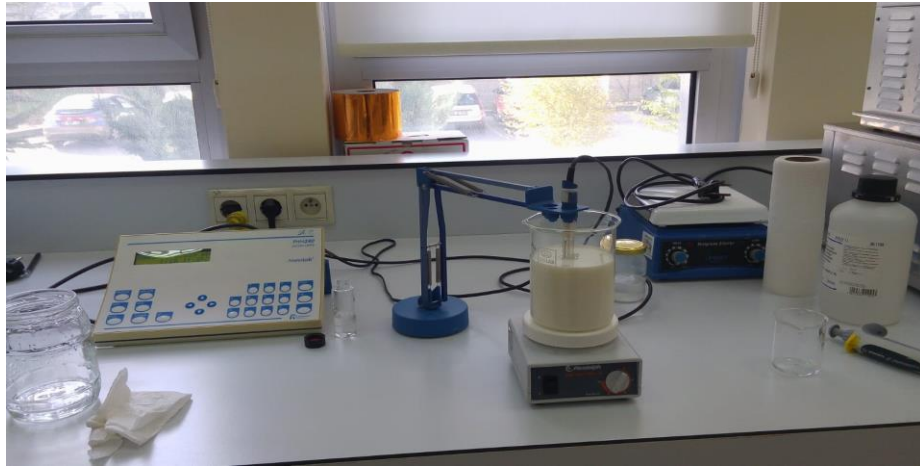
UHT süt örneklerinde toplam kurumadde miktarı gravimetrik olarak 103 °C'de yapılmıştır (Bradley ve ark., 1992; TSE, 2001). UHT sütte pH ölçümleri, HANNA 8521 marka dijital pH-metre ve kombine cam elektrot kullanılarak doğrudan yapılmıştır. UHT sütte elektrot, direkt batırılmış ve sabit değere ulaştıktan sonra okuma yapılmıştır. Titrasyon asitliği, SH (soxhelet Henkel) cinsinden TS 1018'e Süt Standart'ında verilen yonteme uygun olarak yapılmıştır (Bradley ve ark. 1992; TSE, 1994). Yağ analizi, Van Gulik butirometresi kullanılarak Gerber yöntemi ile belirlenmiştir (Bradley ve ark., 1992; Ardö and Polychroniadou, 1999). Toplam azot içeriği IDF (1993)'de belirtilen Kjeldahl



metodu ile belirlenmiş ve 6.38 faktörü ile çarpılarak toplam protein sonuçları elde edilmiştir.

### 3.2.3. Süt Proteinlerinin Ayırımı

Bu tez çalışması için tüm örneklerden hem izoelektrik kazein hem de koloidal kazein elde edilmiştir. İzoelektrik kazein sütün 2 M HCl aracılığı ile pH'sının 4.6'ya ayarlanması ve ardından 5 °C'de 4500 g'de 15 dakika süre ile santrifüjlenmesi ile elde edilmiştir (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1.** 2N HCl ile pH' sı 4.6' ya ayarlanan süt örneği.

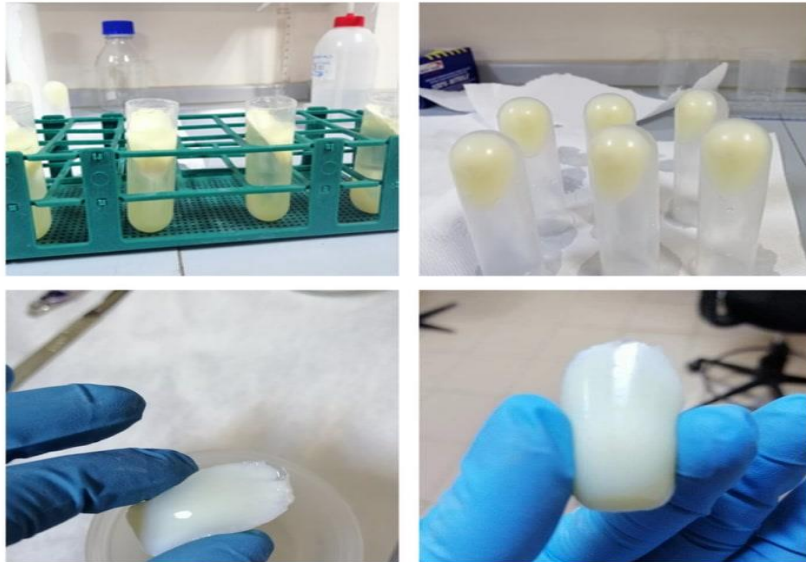
Bu şekilde elde edilen kazein presipitatu üç kez tampon çözelti ile (1 M sodyum asetat ve 100 mL/L asetik asit, pH 4.6), iki kez de 1:1 oranında tampon:dichloromethane karışımı ile yıkanmıştır. Her bir yıkama aşamasından sonra santrifüjleme işlemi gerçekleştirilmiştir (4500 g, 5 °C, 15 dk). Yıkama işlemlerinin sonunda elde edilen presipitat (Şekil 3.2, 3.3) liyofilize edilmiştir. pH4.6-çözünen fraksiyonlar ise Whatman 40 filtre kağıdından geçirilmiş, bir kısmı liyofilize edilerek toz halde ve bir kısmı da analiz anına kadar dondurularak saklanmıştır.



**Şekil 3.2.** pH4.6'da santrifüj sonrası kazein (presipitat), serum ve yağ fazı (en üst tabaka)



**Şekil 3.3.** Santrifüj sonrası pH4.6-çözünmeyen fraksiyonun (presipitat) liyofilizasyonu



**Şekil 3.4.** Ultrasantrifüj sonrası faz ayrımları ve peletin görünümü

Kolloidal kazein ise ultrasantrifüj aracılığı ile (20 °C’de 135.000 g, 1 saat) elde edilmiştir (Şekil 3.4). Ultrasantrifüjleme sonunda elde edilen pelet izoelektrik kazein eldesinde olduğu gibi yıkama işlemine tabi tutulmuştur ve ardından liyofilize edilmiştir. Ultrasantrifüj süpernatantı ise Whatman 40 filtre kağıdından süzülükten sonra, bir kısmı liyofilize edilerek toz halde ve bir kısmı da analiz anına kadar dondurularak saklanmıştır.

#### **3.2.4. RP-HPLC ile Peptit Profilinin Belirlenmesi**

Çalışmada ısıl işlemin süt serum proteinlerine olası etkisi ters faz-HPLC aracılığı ile analiz edilmiştir (Kelly ve Foley, 1997; IDF, 1999). Analiz için pH4.6-çözünen ve ultrasantrifüj sonucu elde edilen serum fazları 1:1 oranında deiyonize suda hazırlanmış %0.2 TFA (trifloroasetik asit, h/h) ile karıştırılmıştır. Örnekler 0.20 mikron filtreden geçirilerek HPLC viyallerine alınmıştır.

Bu tez çalışmasındaki örnekler için, ThermoFinnigan SpectraSystem HPLC sistemi (ThermoFinnigan Inc., CA, USA) kullanılmıştır. Sistem; AS3000 model otosampler (örnek enjeksiyon miktarı 100 µL, kolon sıcaklığı 30 °C), SCM 1000 degazer, P4000 gradyent pompa, UV 6000LP DAD dedektörden oluşmaktadır. Kromatografik ayırım için Phenomenex Jupiter C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm, 300 Å) RP-HPLC kolonu kullanılmıştır. Mobil faz A olarak, % 0.1 TFA içeren deiyonize su ve mobil faz B olarak, % 0.1 TFA içeren far UV grade asetonitril (Merck) kullanılmıştır. Ölçümler 214 ve 280 nm’de yapılmıştır. Veriler ChromQuest 5.0 yazılımı ile değerlendirilmiştir. Elüsyon, gradyent olarak gerçekleştirilmiştir. Gradient program aşağıda verilmiştir.

<b>Süre (dak.)</b>	<b>Mobil faz A</b>	<b>Mobil faz B</b>	<b>Akış hızı (ml/dk)</b>
0	80	20	0.8
10	80	20	0.8
60	50	50	0.8
65	40	60	0.8
70	40	60	0.8

### 3.2.5. ATR-FTIR Analizi

Tüm örnekler vibrasyonel analizler için liyofilize edilmiş, ezilerek ve elekten geçirilerek partikül boyutu açısından standartlık sağlanmıştır. Örnek olarak pH4.6-çözünen, pH4.6-çözünmeyen, ultrasantrifüj-pelet, ultrasantrifüj serum ve süt örnekleri kullanılmıştır. ATR-FTIR ölçümleri Thermo Nicolet iS50 FTIR (Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, MA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5). Örnekler ATR kristalinin üzerine koyulmadan önce havaya karşı background alınmıştır. Daha sonra toz örnekler ATR kristalinin üzerine direk koyularak ölçüm alınmıştır. Örneklerin FTIR spektrumları 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  aralığında 4  $\text{cm}^{-1}$  rezolusyon ile elde edilmiştir. Her spektrum, absorbans modunda 16 scande toplanmıştır. Her örnekten 4 ölçüm alınmış ve bu ölçümlerin ortalaması alınarak grafikleri çizilmiştir. Örneklerin değerlendirilmesinde kemometrik yöntemlerden temel bileşim analizinden (PCA) yararlanılmıştır.



Şekil 3.5. ATR kristali üzerine koyulmuş liyofilize örnek.

### 3.2.6. FT-Raman Analizi

FT-Raman ölçümleri için de FTIR da olduğu gibi liyofilize edilip, ezilmiş örnekler kullanılmıştır. FT-Raman spektrumlarının elde edilmesinde, Nicolet iS50 spektrometresinin numune bölmesine monte edilmiş bir Raman modülü kullanılarak kaydedilmiştir (Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, MA, USA). Kuyucuklara koyulan örneklerden farklı bölgelerden ölçümler toplanmıştır (Şekil 3.6-3.7). FT-Raman da uyarma kaynağı, bir InGaA dedektörü ile donatılmış yaklaşık 50 mikron spot büyüklüğünde 1064 nm diyot lazerdir. Bütün örneklere ait Raman spektrumları oda sıcaklığında elde edilmiştir. Numune üzerindeki lazer gücü 500 mW olarak ayarlanmıştır. Spektrumlar OMNIC™ Atplus yazılımı (Thermo Electron Corporation, Madison, WI, USA) kullanılarak analiz edilmiştir. Örneklerin Raman spektrumları, her ölçüm

noktasında  $16 \text{ cm}^{-1}$  rezolüsyonda ve 100 scande elde edilmiştir. Örneklerin Raman spektral verileri  $3700\text{-}200 \text{ cm}^{-1}$  aralığında toplanmıştır. İntensitenin düşük olması nedeniyle bir örnek için iki ölçüm toplamı verilmiştir. Raman intensitesi, saçılma prosesinde fotonlar tarafından kaybedilen enerji olarak tanımlanan Raman kaymasının bir fonksiyonu olarak elde edilmiştir. Örneklerin yorumlanması açısından yine PCA analizi kullanılmış, örnek ayırımları incelenmiştir.



**Şekil 3.6.** Raman spektroskopisi toz örnekler için uygun olan modül.



**Şekil 3.7.** FT-Raman spektroskopisi.

### 3.2.7. Temel Bileşen Analizi (PCA)

FT-Raman ve FTIR kullanılarak ölçümleri alınan liyofilize örneklerde farklılıkların belirlenmesi ve farklılıkların hangi bantlardan kaynaklandığını açıklamak için temel bileşen analizi (PCA) kullanılmıştır. Enstrümental veya deneysel varyasyonları ortadan kaldırmak için uygun ön işleme (pre-processing) teknikleri kullanılmıştır. Bu amaçla “mean center ve 1.türev” kullanılmıştır. Örnekler arasındaki farklılıklar temel bileşen analizi (principal component analysis, PCA) ile ortaya konmuştur. PCA, Solo 8.1 (Eigenvector Research, Inc.) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Örneklere ait pH4.6-çözünen ve ultrasantrifüj-süpernetant fraksiyonlarının RP-HPLC kromatogramlarından elde edilen verilere de temel bileşen analizi (Principal Component Analysis, PCA) uygulanmıştır. Bu amaçla, uygulanan sayısal modifikasyon Piraino ve ark. (2004)'na göre gerçekleştirilmiştir. Kısaca, HPLC kromatogramları (piklerin yüksekliği ve alıkonma süresi) 1'er dakikalık 48 sınıfa ayrılmıştır. Yaklaşık 5 ile 50. dakikalar arası kromatogramlar değerlendirmeye alınmıştır. Sınıf genişliği 1 dakika olarak belirlenmiştir. Şekilsel parametre 129.8 olarak ayarlanmıştır. PCA analiz kovaryans matrisi olarak hesaplanmıştır.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Temel Bileşim Analizi Sonuçları

Çiğ ve ısıtılmış işlem uygulanmış süt örneklerine ait temel bileşim analiz sonuçları sırasıyla Çizelge 4.1’de sunulmaktadır. İlgili sonuçlar incelendiğinde UHT proses işlemleri sırasında uygulanan standardizasyon işlemleri nedeniyle proses edilmemiş ( A ve B kodlu örnekler) ve proses edilmiş örnekler arası bileşimsel farklılıklar bulunmaktadır. Bununla beraber UHT süt numuneleri arasındaki farklılıklar anlamlı düzeyde değildir. Örneklerin ölçümlerinde liyofilizasyon ve yağ uzaklaştırılması işlemi yapıldığı için bu farklılıkların analiz sonuçlarına yansımaları olası görülmemektedir.

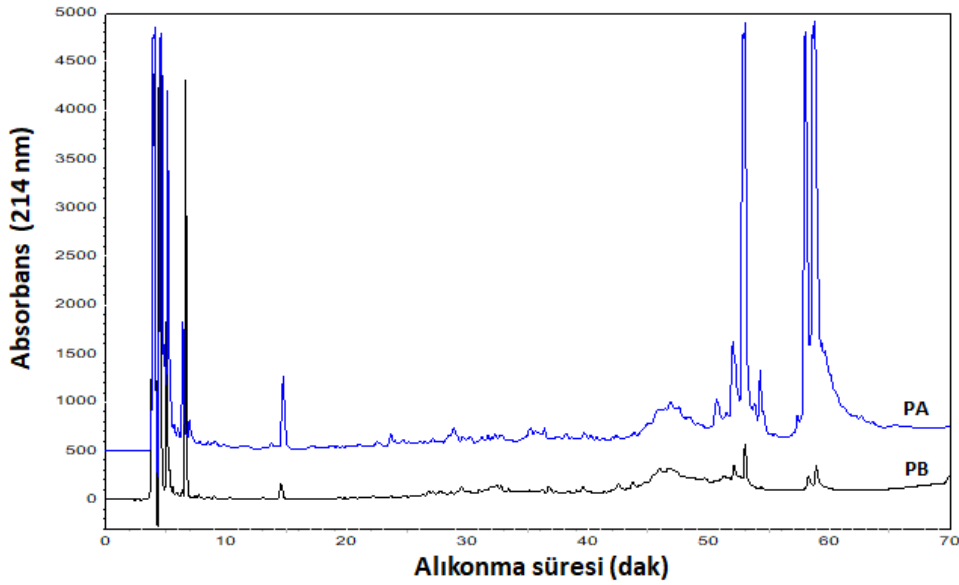
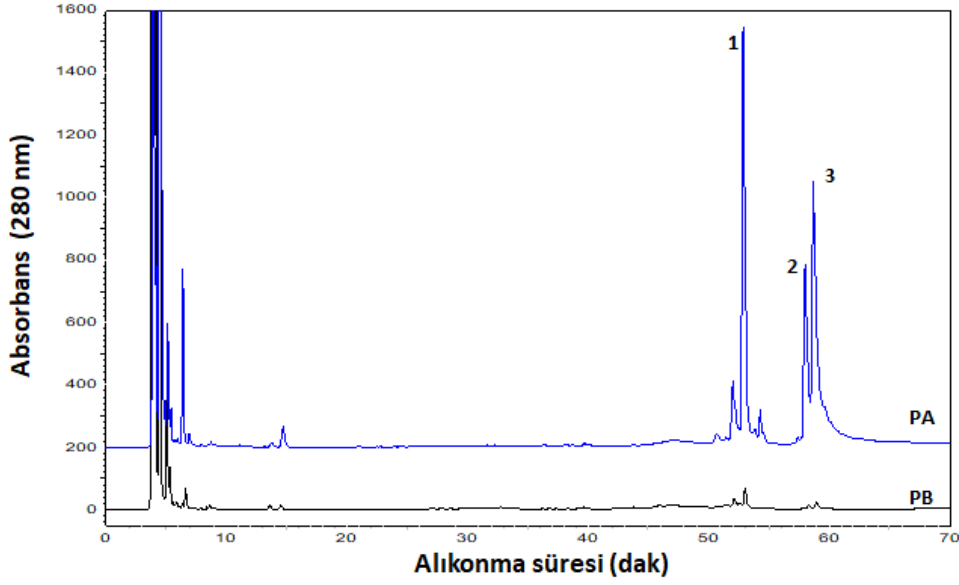
**Çizelge 4.1.** Süt örneklerine ait temel bileşim analiz ortalama sonuçları (n=3)

<b>Bileşen</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>
%Toplam Kurumadde	12.04	12.24	11.35	11.70	11.45	11.40
% yağ	3.65	3.76	3.35	3.35	3.30	3.30
% Protein	3.20	3.24	2.98	3.05	3.00	3.03
pH	6.68	6.66	6.81	6.63	6.64	6.65
SH	6.42	6.49	6.00	6.30	6.10	6.10

Numunelere ait kod açıklamaları için Çizelge 3.1’e bakınız.

### 4.2. RP-HPLC Analizi Sonuçları

pH4.6’da çözünen protein fraksiyonlarına ait HPLC kromatogramları Şekil 4.1’de sunulmaktadır. Çiğ süt (PA) ile karşılaştırıldığında, şiddetli ısıtılmış işlem uygulanan kaynamış süt (PB) örneğinde yüksek düzeyde serum proteini denatürasyonuna bağlı olarak serum fazında protein içeriğinde azalma kaydedilmiştir (Şekil 4.1). Benzer bir sonuç indirekt UHT (homojenizasyon sonra, PD) süt örneğinde de gözlenirken, homojenizasyonun UHT işlemi öncesi uygulandığı örnekte (PE) serum proteinlerini temsil eden pik gözlenmemiştir (Şekil 4.2). UHT işlemi sonrası uygulanan homojenizasyonda serum proteini denatürasyon oranının ve/veya kazein ile interaksiyonunun kısmen de olsa azaldığı görülmektedir.

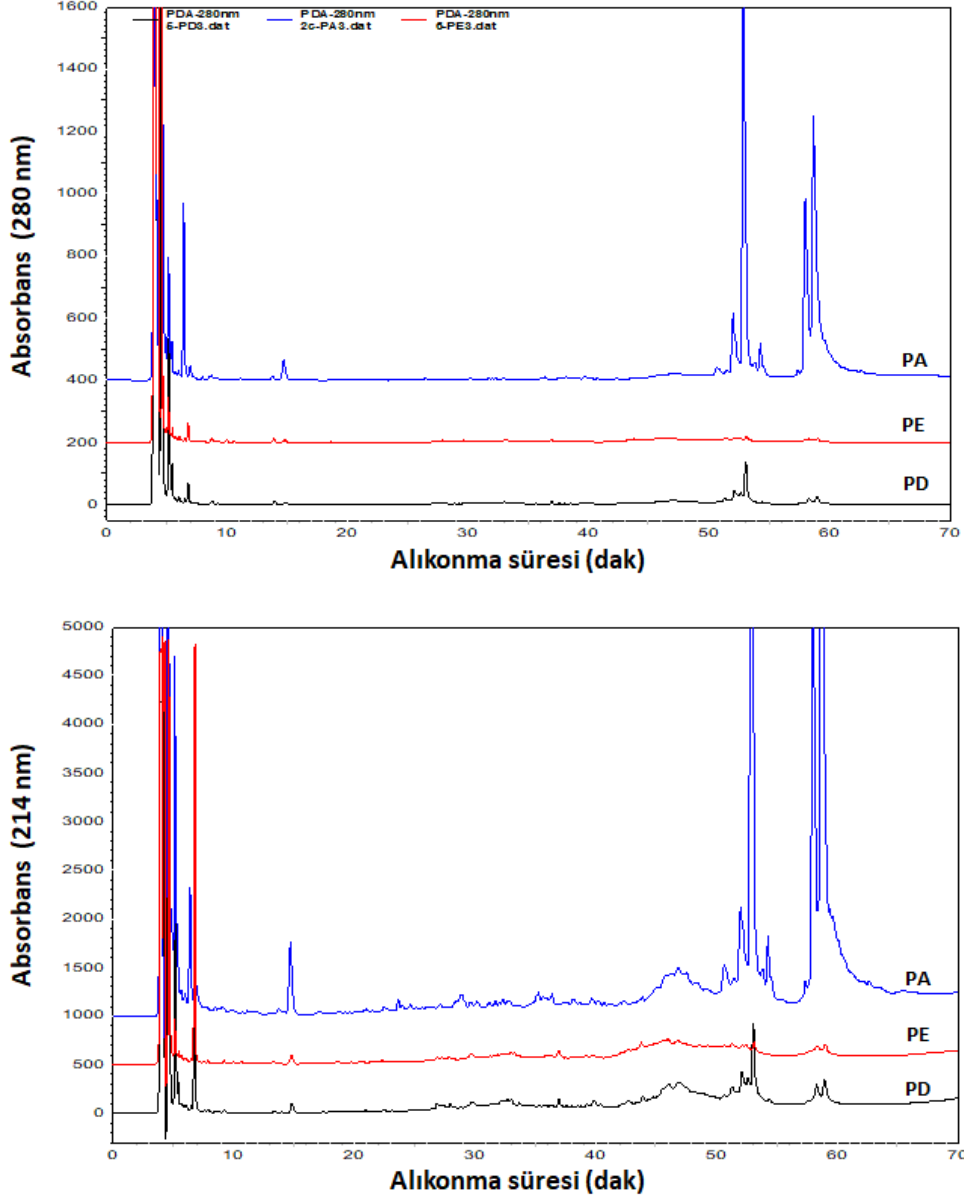


**Şekil 4.1.** pH4.6-çözünen fraksiyonlara ait HPLC kromatogramları (280 nm ve 214 nm; 1: $\alpha$ -LA; 2:  $\beta$ -LG-B; 3:  $\beta$ -LG-A; PA: çiğ süt pH4.6-çözünen fraksiyon; PB: kaynatılmış süt pH4.6-çözünen fraksiyon ).

İndirekt UHT uygulaması öncesinde homojenizasyon uygulandığı takdirde serum fazında  $\alpha$ -LA ve  $\beta$ -LG konsantrasyonunun azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.2). Bu durum direkt yöntemle üretilen UHT süt örneğinde (PF) daha sınırlı bulunmuştur. UHT işlemi sonrası uygulanan homojenizasyonda serum proteini denatürasyon oranının ve/veya kazein ile interaksiyonunun kısmen de olsa azaldığı görülmektedir.

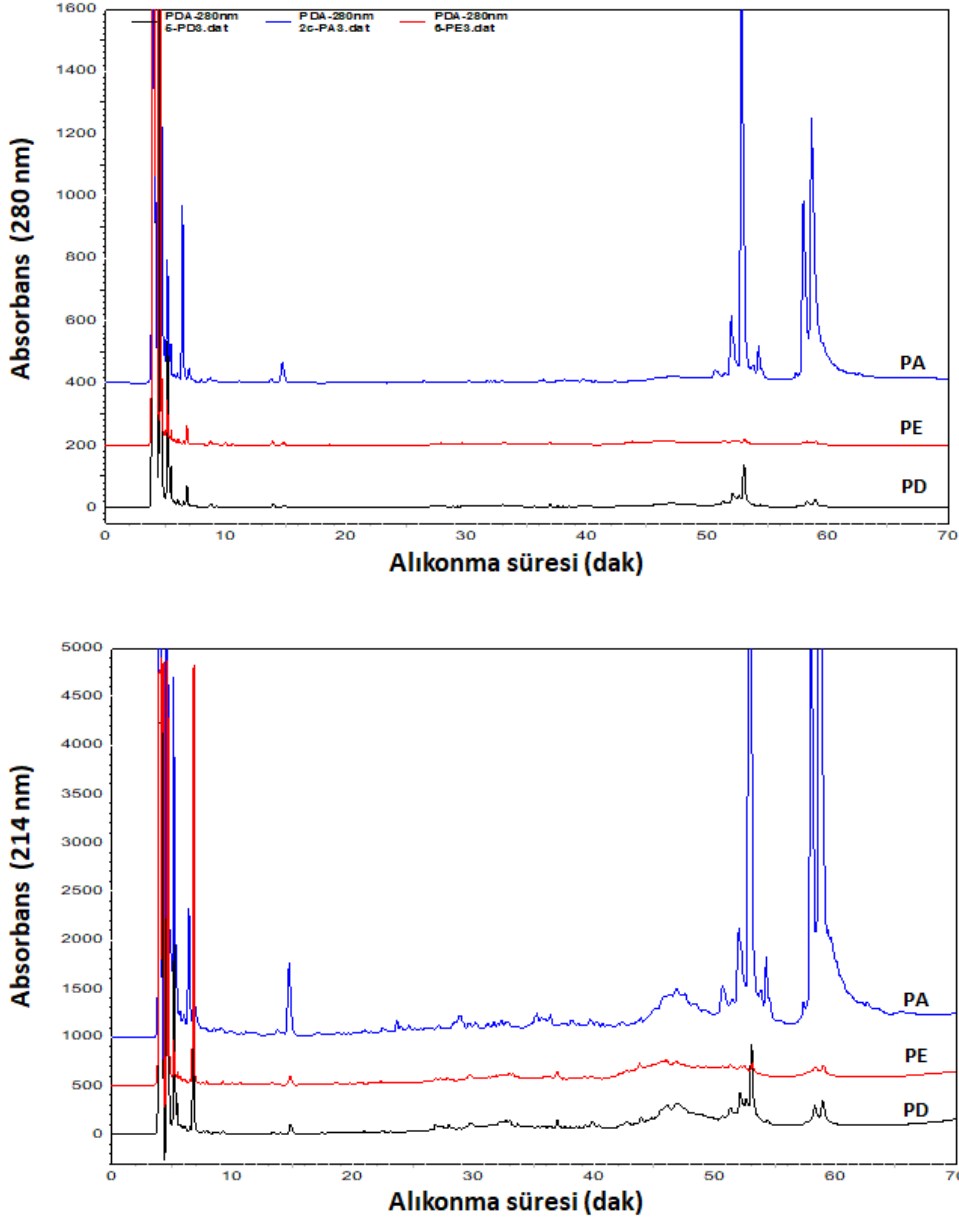


İndirekt UHT (homojenizasyon sonra, PD) süt örneğinde kaynatılmış süte oranla daha fazla  $\alpha$ -LA varlığı saptanmıştır. Bununla birlikte; indirekt UHT uygulanan (homojenizasyon yok, PC ve direkt UHT homojenizasyon sonra, PF) süt örneklerinde özellikle  $\alpha$ -LA pikinin varlığı net olarak görülmektedir (Şekil 4.3).



**Şekil 4.2.** pH4.6-çözünen fraksiyonlara ait HPLC kromatogramları (280 nm ve 214 nm; 1: $\alpha$ -LA; 2:  $\beta$ -LG-B; 3:  $\beta$ -LG-A; PA: çiğ süt pH4.6-çözünen fraksiyon; PE: indirekt UHT (Homj. önce) pH4.6-çözünen fraksiyon; PD: indirekt UHT (Homj. sonra) pH4.6-çözünen fraksiyon)

İndirekt UHT uygulaması öncesinde homojenizasyon uygulandığı takdirde serum fazında  $\alpha$ -LA ve  $\beta$ -LG konsantrasyonunun azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.2). Bu durum direkt yöntemle üretilen UHT süt örneğinde (PF) daha sınırlı bulunmuştur. UHT işlemi sonrası uygulanan homojenizasyonda serum proteini denatürasyon oranının ve/veya kazein ile interaksiyonunun kısmen de olsa azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.3. pH4.6-çözünen fraksiyonlara ait HPLC kromatogramları (280 nm ve 214 nm); 1: $\alpha$ -LA; 2:  $\beta$ -LG-B; 3:  $\beta$ -LG-A; PA: çiğ süt pH4.6-çözünen fraksiyon; PC: indirekt UHT (Homj. yok) pH4.6-çözünen fraksiyon; PF: direkt UHT (Homj. sonra) pH4.6-çözünen fraksiyon).

İndirekt UHT (homojenizasyon sonra, PD) süt örneğinde kaynatılmış süte oranla daha fazla  $\alpha$ -LA varlığı saptanmıştır. Bununla birlikte; indirekt UHT uygulanan (homojenizasyon yok, PC ve direkt UHT homojenizasyon sonra, PF) süt örneklerinde özellikle  $\alpha$ -LA pikinin varlığı net olarak görülmektedir (Şekil 4.3). UHT süt örneklerinin 280 nm’de pH4.6-çözünen serum proteini fraksiyonlarına ait pik alanları Çizelge 4.2’de verilmektedir. UHT süt örneklerinin 135.000 g’de (20 °C’de 1 saat) ultrasantrifüjlenmesi sonunda elde edilen serum fazında (süpernatant) gerçekleştirilen serum proteini dağılımları da benzer bir eğilim göstermiştir (Çizelge 4.3).

**Çizelge 4.2.** pH4.6 da elde edilen serumlara ait HPLC analiz sonucu.

Örnek Kodu	$\alpha$ -lactalbumin	$\beta$ -laktoglobulin B	$\beta$ -laktoglobulin A
PA	160.3245	68.0568	124.2635
PB	5.6251	0.7229	1.4419
PC	34.5116	3.3017	4.8713
PF	41.0134	4.4157	8.1415
PE	1.2443	0.5887	0.567
PD	11.6774	1.1763	2.1118

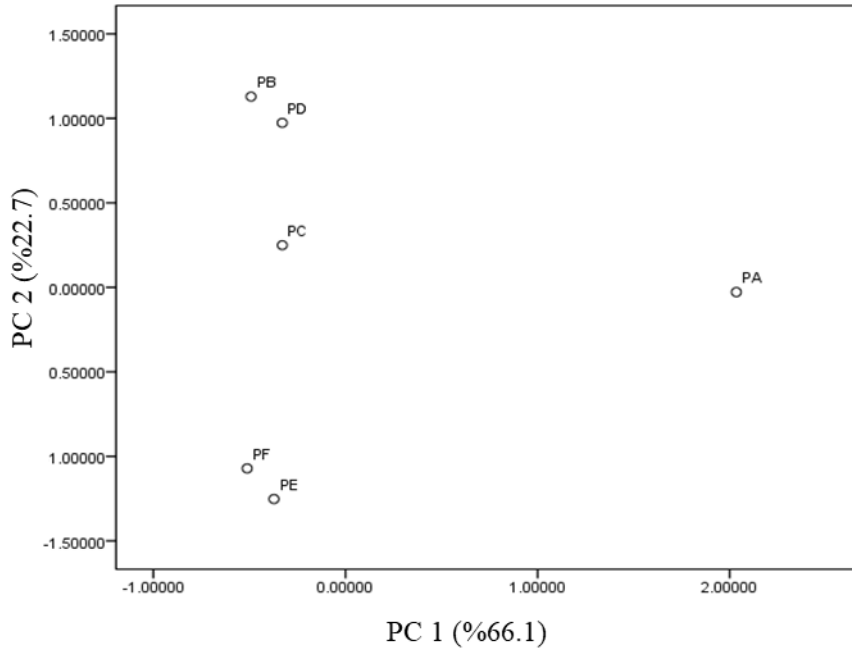
**Çizelge 4.3.** Ultrasantrifüj sonrası elde edilen serumlara ait HPLC analiz sonucu.

Örnek Kodu	$\alpha$ -lactalbumin	$\beta$ -laktoglobulin B	$\beta$ -laktoglobulin A
UA	150.1741	63.9443	126.6574
UB	9.0765	0.2343	0.7266
UC	38.7912	3.4054	5.2165
UF	58.107	3.7661	7.0539
UE	2.3556	0.9333	0.4627
UD	12.2622	1.4374	2.0055

UHT süt örneklerinin pH4.6-çözünen serum fazı protein fraksiyonları ile ultrasantrifügasyon ile elde edilen süpernatanta ait protein fraksiyonlarının HPLC kromatogramlarının daha net bir değerlendirmesinin yapılabilmesi amacıyla PCA tekniği ile gruplandırmaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.4 - 4.7). UHT uygulanmış süt örneklerine ait pH4.6’da çözünen serum proteini fraksiyonlarının 280 nm dalga boyundaki HPLC

kromatogramları birbirlerine yakın bir PCA grubu oluştururken çiğ ve kaynamış sütler, UHT uygulanmış sütlerden ve birbirlerinden farklı PCA grupları oluşturmuştur. Bununla birlikte; ultrasantrifüj sonunda elde edilen süpernatantta yer alan serum proteini fraksiyonları farklı bir gruplama oluşturmuştur. Homojenizasyonun ısıl işlem sonrası uygulandığı örneklerde (UD ve UF) serum protein fraksiyonları tek bir PCA grubu oluştururken şaşırtıcı şekilde homojenize edilmemiş kaynamış sütler de aynı PCA grubu içerisinde yer almıştır. Bunun nedeni PCA için data prosesinde serum proteinleri hariç tüm kromatografik verilerin esas alınmış olması olabilir (Bkz.3.2.7).

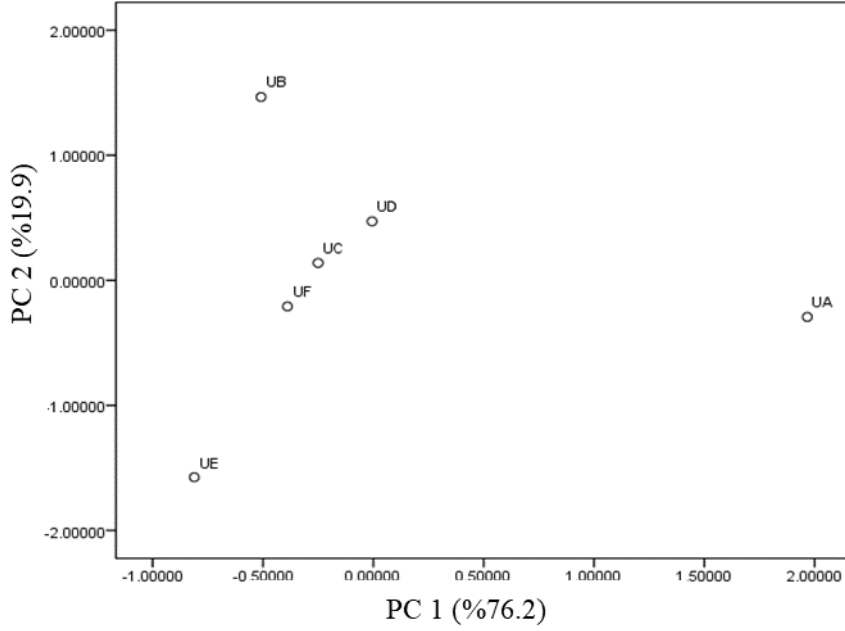
İlgili şekillerden de görüleceği üzere çiğ süt (PA, UA) örnekleri belirgin olarak diğer örneklerden ayrılmaktadır. Ayrıca UHT işlemi (direkt ve indirekt) ve uygulanan homojenizasyon işleminin çözünen protein fraksiyonları üzerine belirgin etkilerinin olduğu görülmektedir. Bu sonuç süte uygulanan proses süreçlerinin ve sırasının protein interaksiyonlarına olası etkilerine işaret etmektedir.



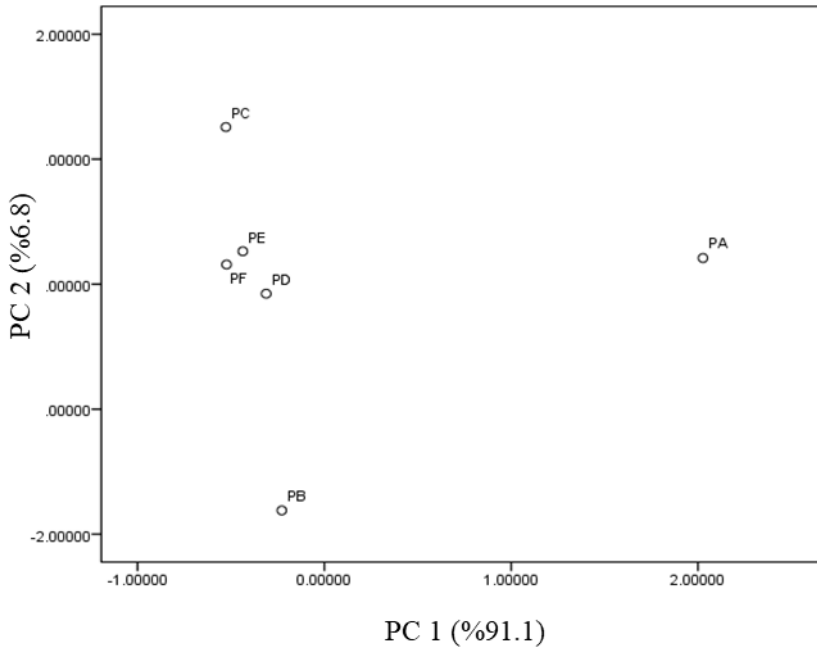
**Şekil 4.4.** UHT süt örneklerinde, pH4.6-çözünen fraksiyonun HPLC sonuçlarına (214 nm) ait temel bileşen analizi (numune kodları Çizelge 3.1’de verilmiştir).

280 nm elde edilen HPLC kromatogramlarına da PCA uygulanmıştır (Şekil 4.5-4.6). Gürültü seviyesinin az olması ve aromatik amino asitlerin ve bunların türevlerinin ve

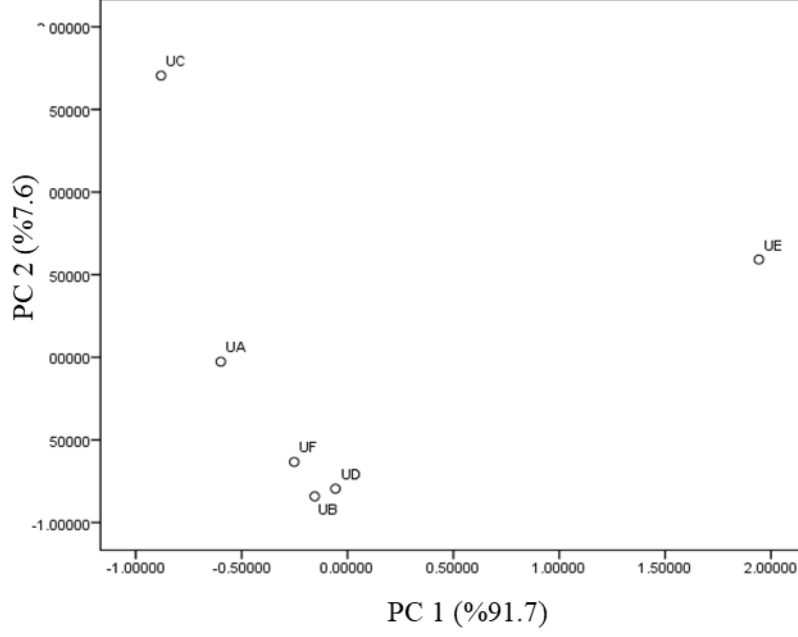
aromatik amino asitleri içeren peptitlerin belirlenmesi için 280 nm tercih edilmiştir. Özellikle pH4,6 da çözünen fraksiyonda ısıl işlemin olası etkilerinin daha belirgin olduğu görülmektedir.



**Şekil 4.5.** UHT süt örneklerinde, ultrasantrifüj süpernetant'ın HPLC sonuçlarına (214 nm) ait temel bileşen analizi (numune kodları Çizgelge 3.1'de verilmiştir).



**Şekil 4.6.** UHT süt örneklerinde, pH4.6-çözünen HPLC sonuçlarına (280 nm) ait temel bileşen analizi (numune kodları Çizgelge 3.1'de verilmiştir).



**Şekil 4.7.** UHT süt örneklerinde, ultrasantrifüj süpernetant'ın HPLC sonuçlarına (280 nm) ait temel bileşen analizi (numune kodları Çizelge 3.1'de verilmiştir).

Sonuç olarak; (i) Isıl işlem sonucunda serum fazında protein düzeyi azalmaktadır, (ii) Isıl işlem süresi arttıkça homojenizasyondan bağımsız olarak daha fazla serum proteini koloidal faza geçmektedir, (iii) Homojenizasyon işleminin varlığında direkt UHT uygulaması sonucunda serum fazında protein konsantrasyonu indirekt UHT uygulamasına göre daha fazla bulunmuştur, (iv) Isıl işlem ve homojenizasyon uygulamalarının serum proteininin çözünür fazdan koloidal faza taşınma profiline etkileri hem pH4.6'da çözünen protein grubu hem de ultrasantrifüj ile ayrılan serum protein grubu için benzer bulunmuştur.

### 4.3. Vibrasyonel Analizlerin Değerlendirmesi

ATR-FTIR ölçümleri her örnekten 4'er tekrar olacak şekilde alınmış ve bunların ortalamaları alınarak ATR-FTIR grafikleri çizilmiştir. FT-Raman ölçümleri için ise her liyofilize örnek iki farklı kuyucuğa koyulmuş ve buradan toplam 2 ölçüm alınmıştır. Grafik için intensitenin düşük olması nedeni ile bu ölçümlerin toplamı şeklinde verilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında çiğ süt, kaynatılmış süt, indirekt UHT homojenizasyon yok, homojenizasyon önce ve sonra, direkt UHT homojenizasyon sonra olmak üzere 6 farklı grup için 3'er tekerrür bulunmaktadır ve bu tekerrürlerin ATR-FTIR ve FT-Raman grafiklerinin istatistiksel değerlendirmesinde PCA analizi kullanılmıştır. Çizelge 4.5 ve 4.6'da sırasıyla IR ve Raman Fonksiyonel grup bölgelerinde dalga sayısı karşılıkları ve alındığı kaynaklar tablo halinde verilmiştir.

**Çizelge 4.5.** IR spektroskopisi dalgasayıları ve karşılık gelen fonksiyonel gruplar.

Dalga sayısı (cm-1) ve Dalga sayısı aralığı (cm-1)	Fonksiyonel grup bölgesi	Kaynaklar
3280	H-O gerilmesi	(İñón ve ark, 2004)
3700-2800 (Bölge I)	3594 cm <sup>-1</sup> ve 3193-3194 cm <sup>-1</sup> : O-H gerilmesi	(Choperena ve Painter, 2009)
	2911 cm <sup>-1</sup> : Süt lipitlerindeki açıl zincirlerdeki CH <sub>2</sub> grubunun asimetric gerilmesi	(Dufour ve ark, 2000)
	2851 cm <sup>-1</sup> : Triglicerid ve fosfolipitlerin lipitlerindeki CH <sub>2</sub> grubuna ait simetric gerilmeler	(Dufour ve ark., 2000)
1800-1700 (Bölge II)	1743 cm <sup>-1</sup> : Trigliceridlerdeki ester bağlarına ait C=O gerilmesi titreşimi	(Karoui ve ark., 2003)
	1720 cm <sup>-1</sup> : ester bağlarındaki karbonil grupların hidrojen bağı titreşimi	(Dufour ve Riaublanc, 1997)
	1720 and 1715 cm <sup>-1</sup> : aldehit ve ketonların C=O gerilmesi	(Harty-Major, 1997)
1730-1600 cm <sup>-1</sup>	H-O-H bükülmesi titreşimi	(İñón ve ark., 2004)
1700-1500 (Bölge III) Amit-I (1700-1600 cm <sup>-1</sup> ): 80% C=O gerilmesi, 10% C-N gerilmesi and 10% N-H bükülmesi	1632 cm <sup>-1</sup> : moleküller arası β-tabaka titreşimi	(Mendelsohn ve Flach, 2002; Ngarize ve ark., 2004; Mendelsohn ve ark., 2010;)
	1645 cm <sup>-1</sup> : düzensiz protein yapıları (random coil)	(Sankaram ve Marsh, 1993)
	1676 cm <sup>-1</sup> : sarmal (turns) yapılar	(Sankaram ve Marsh, 1993)

**Çizelge 4.5.** IR spektroskopisi dalgasayıları ve karşılık gelen fonksiyonel gruplar (devam).

<b>Dalga sayısı (cm<sup>-1</sup>) ve Dalga sayısı aralığı (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Fonksiyonel grup bölgesi</b>	<b>Kaynaklar</b>
1700-1500 (Bölge III)  Amit-II (1600-1500 cm <sup>-1</sup> ): N-H bükülmesi ile birlikte C-N gerilme titreşimleri	1575 cm <sup>-1</sup> : laktatlar	(Mazerolles ve ark., 2001)
	1571 cm <sup>-1</sup> : Asp ve Glu aminoasitlerine ait COO-bağlarının asimetrik gerilmesi	(Holland ve ark., 2011)
	1514 cm <sup>-1</sup> : tirozin kalıntılarının halka germe titreşiminindeki değişiklikler	(Curley ve ark., 1998)
	1578-1555, 1555-1543 ve 1542-1525 cm <sup>-1</sup> region: β-sarmal yapılar, β-tabakalar ve α- heliks yapılarıdaki değişimler	(Curley ve ark., 1998)
1500-1200 (Bölge IV) 30% C–N gerilme, 30% N–H bükülme, 10% C=O gerilme ve 10% O=C=N bükülme), Proteinlere ait titreşimler	1328- 1289 cm <sup>-1</sup> α-heliks 1288- 1256 cm <sup>-1</sup> - rastgele (unordered) yapılar 1255- 1224 cm <sup>-1</sup> β-tabakaları	(Qi ve ark., 1997; Murphy ve ark., 2014)
1200-900 (Bölge V)	1162 cm <sup>-1</sup> : süt yağındaki C-O titreşimi	(Zhou ve ark., 2006)
	800 and 1250 cm <sup>-1</sup> : karbonhidratlardaki, özellikle laktozdaki C–O titreşimi	(Zhou ve ark., 2006)
	995 and 987 cm <sup>-1</sup> : serin-fosfat kalıntısındaki –PO <sub>3</sub> <sup>-2</sup> gerilmesine ait titreşimler	(Gebhardt ve ark., 2011)



**Çizelge 4.6.** Raman spektroskopisi dalgasayıları ve karşılık gelen fonksiyonel gruplar.

Dalga sayısı (cm <sup>-1</sup> )	Fonksiyonel grup bölgesi	Kaynaklar
3060	Aromatik aminoasitlere ait C-H bağının gerilmesi sonucu oluşan titreşimler	(Howell ve ark., 1999)
2930	Aromatic ve alifatik amino asitlere ait CH gerilmesi	(Howell ve ark., 1999)
2880	Alifatik amino asitlere ait CH <sub>3</sub> ve R <sub>3</sub> C-H gerilmesi	(Howell ve ark., 1999)
1453	CH <sub>2</sub> bükülmesi	(Howell ve ark., 1999)
1400-1430	COO- ait C=O gerilmesi	(Uapanese vr ark.,1996)
1450, 1465	C-H bükülmesi	(Uapanese ve ak., 1996)
1658	Amit-I	(Li-Chan, Nakai ve Hirotsuka, 1994)
1655±5	Amit bağının C=O gerilmesi , N-H sallanması (α-heliks)	(Lin ve Koenig, 1976; Krimm ve Bandekar, 1986)
1670±3	Amit bağına ait C=O gerilmesi, N-H sallanması (β-tabaka)	(Yu, Lippert ve Peticolas, 1973; Krimm ve Bandekar, 1986)
1665±3	Amit bağına ait C=O gerilmesi , N-H sallanması (düzensiz yapı – hidrojen bağlı olan)	(Yu ve ark., 1973)
1685	Amit bağına ait C=O esnemesi, N-H sallanması (düzensiz yapı- hidrojen bağlı olmayan )	(Uapanese ve ark., 1996)
>1275 (amit-III bölgede)	N-H bükülmesi, C-N esnemesi (α-heliks)	(Yu ve ark., 1973; Uapanese ve ark., 1996)

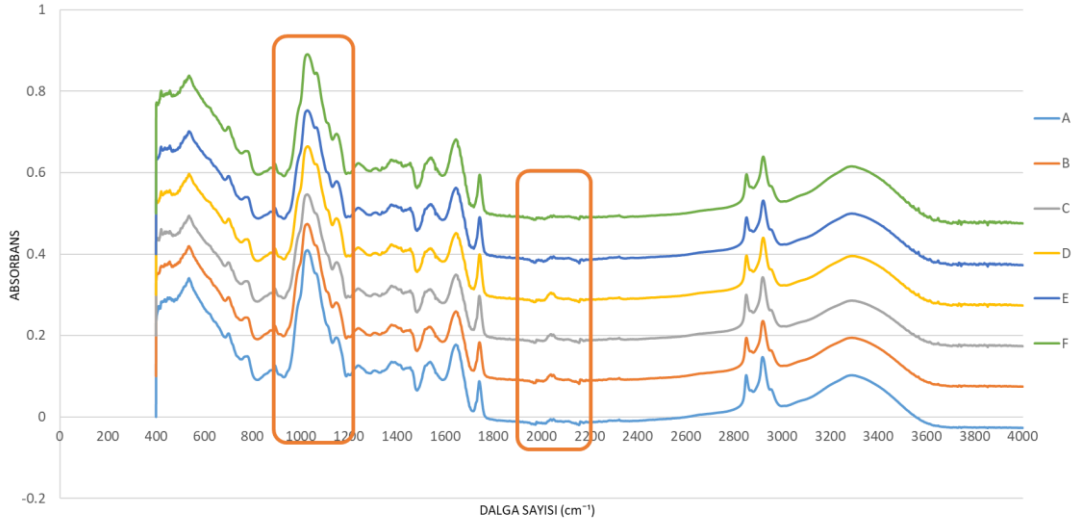
**Çizelge 4.6.** Raman spektroskopisi dalgasayıları ve karşılık gelen fonksiyonel gruplar (devam).

1235±5	N-H bükülmesi, C-N gerilmesi (antiparalel- $\beta$ -tabakası)	((Yu ve ark., 1973; Uapanese ve ark., 1996)
1245±4	N-H bükülmesi, C-N gerilmesi (düzensiz yapı)	(Yu ve ark., 1973; Uapanese ve ark., 1996)
1235	N-H bükülmesi, C-N gerilmesi (Düzensiz yapı- Hidrojen olmayan bağ) Amit-III	(Yu ve ark., 1973; Uapanese ve ark., 1996)  (Eunice ve Li-Chan, 2007)
1006	Halka esnemesi (fenilalanin)	(Spiro ve Gaber, 1977)
938	$\alpha$ -heliks	(Lin ve Koenig, 1976)
860-830	Tirozin ikilisi	(Nonaka, Li-Chan, Nakai, 1993)
761	Triptofan	(Nonaka ve ark., 1993)
508	S-S gerilmesi	(Nonaka ve ark., 1993)

#### 4.3.1. Süt Örneklerinde ATR-FTIR Analiz Sonuçları

Isıl işlemin, homojenizasyonun ve ısıl işlem ile homojenizasyonun farklı sıralama ile uygulanması sonucu sütte bulunan kazeine, serum proteinlerine ve protein-yağ interaksiyonlarına etkisinin incelenmesi amacı ile UHT sütlerde farklı kombinasyonlar denenmiştir. Çiğ süt örneği (A) 10 dk kaynatılarak (B) kaynatmanın etkisi, direkt UHT sistem ve indirekt UHT sistem kullanılarak farklı ısıl işlem yöntemlerinin etkisi ve son olarak homojenizasyonun ısıl işlemde önce ve ısıl işlemde sonra uygulanması ile de homojenizasyon sırasının etkisi araştırılmıştır. Bu kapsamda şekil 4.8'de görülen sütlerin liyofilize edilip kurutulması sonucu ATR-FTIR'da ölçümler alınmıştır. FTIR da amit-I (1700-1600  $\text{cm}^{-1}$ ), amit-II (1600-1500  $\text{cm}^{-1}$ ) ve amit-III (1500-1200  $\text{cm}^{-1}$ ) bölgesi proteinler hakkında bilgi vermektedir. Özellikle amit-I ve amit-III bölgesi proteinlerin ikincil yapısı hakkında bilgi vermektedir (Grewal ve ark., 2017).

#### ATR-FTIR SÜT



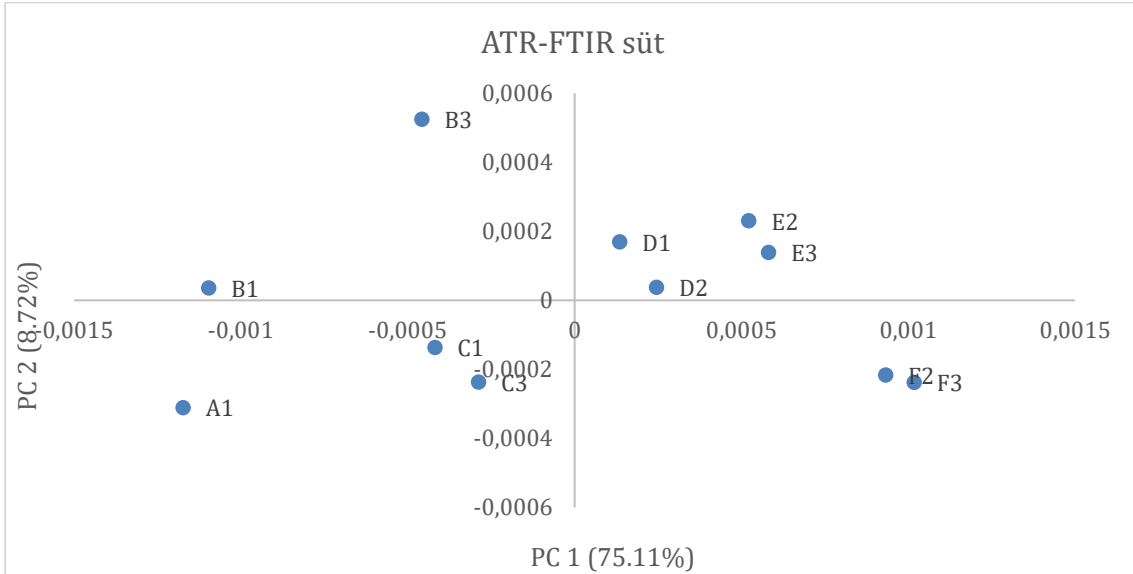
**Şekil 4.8.** Liyofilize süt tozu örneklerine ait ATR-FTIR spektrumları (tüm şekillerdeki örnek kodları için Çizelge 3.1'e bakınız).

Şekil 4.8'de belirgin olarak görülen  $1021\text{ cm}^{-1}$  spektrum çiğ süt örneğinde (A) en yüksek iken indirekt UHT homojenizasyon uygulanmayan örnekte (C) ve indirekt uht hmojenizasyon önce (E) örneklerinde en düşük, indirekt UHT homojenizasyon sonra ve kaynatılmış süt örneklerinde birbirine yakın ve çiğ süte en yakın direkt UHT yöntemi ile üretilmiş homojenizasyonun sonra olduğu örnektir.  $800\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$  de meydana gelen değişimler daha önceki çalışmalarda da belirlendiği üzere sütteki karbonhidratlarda meydana gelen farklılıklardan oluşmaktadır. Özellikle laktoz bu piklerde değişim görülmesine neden olabilmektedir (Zhou ve ark., 2006).

Grafikte görülen diğer önemli bir değişim ise  $1145\text{-}1148\text{ cm}^{-1}$  de ve  $1741\text{-}1743\text{ cm}^{-1}$  spektrumdan ortaya çıkmaktadır. Burada D ve F örneklerinde daha yüksek intensiteye sahip olan bu spektrum süt yağlarındaki C=O titreşimi sonucu oluşmaktadır. Homojenizasyonun daha sonra uygulandığı indirekt UHT ve direkt UHT yöntemi ile üretilen sütlerde bu spektrumun intensitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Literatüre göre trigliseridlerdeki ester bağları lipolize bağlı olarak kırılmakta ve yağ asidi ve gliserid veya gliserole parçalanmaktadır. Trigliseridlerdeki azalmaya bağlı olarak

1745  $\text{cm}^{-1}$  meydana gelen ester bağlarındaki C=O titreşiminde azalmaktadır (Reiner ve ark., 2020). Bu durumda olası lipoliz düzeyinin artması ve serbest yağ asidi miktarının artması 1745  $\text{cm}^{-1}$  civarında oluşan spektrumun intensitesinin azalmasına neden olmaktadır. 1639 ve 1536  $\text{cm}^{-1}$  de görülen spektrum amit-I ve amit-II bölgesini temsil etmektedir. Proteinler hakkında asıl bilgi veren bölgedir. Burada yine en yüksek intensiteye sahip olan örneğin F örneği ve en düşük C örneği olduğu belirlenmiş diğer örnekler arasında ciddi farklar bulunmamaktadır. pH4.6-çözünmeyen ve ultrasantrifüj ile elde edilen peletlerde bu bölgedeki değişimler daha net görülebilmektedir.

Trigliseridlerin ve fosfolipitlerin açıl zincirlerindeki  $\text{CH}_2$  gruplarının simetrik gerilmesi sonucu meydana gelen 2849  $\text{cm}^{-1}$  de ve süt lipitlerinin açıl zincirlerindeki  $\text{CH}_2$  gruplarının asimetrik gerilmesi sonucu meydana gelen 2920  $\text{cm}^{-1}$  spektrumlarında örnekler arası önemli derecede bir fark olmadığı görülmektedir (Dufour ve ark., 2000). 3193-3195  $\text{cm}^{-1}$  hidrojen bağı ile bağlanmış O-H gerilmesi ile oluşmaktadır. F örneğinde diğerlerinden yüksek olduğu gözlemlenirken B,D ve C örneklerinde en düşüktür.



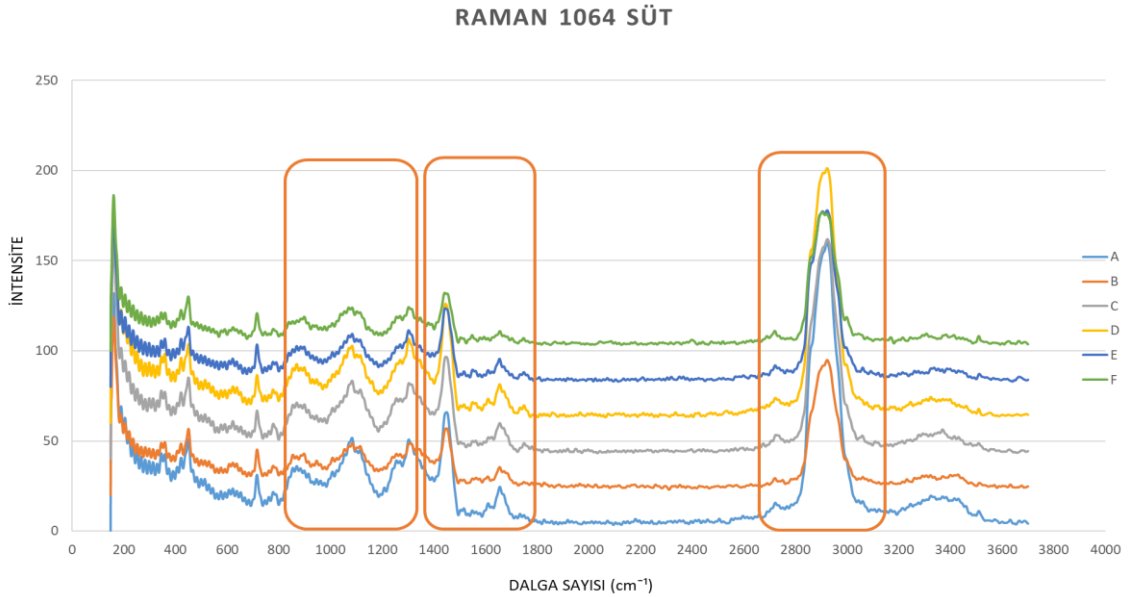
**Şekil 4.9.** Liyofilize süt tozu örneklerine ait ATR-FTIR spektrumlarının temel bileşim analizi.

Örneklere uygulanan temel bileşen analizi sonucunda PC1 %75.11 ve PC2 %8.72 şeklinde ayrımı açıklamaktadır. Şekilde görüldüğü gibi y-eksenin sol tarafında kalan yani 1. Komponentle açıklanan kısım homojenizasyona bağlı olduğu düşünülmektedir. A (çiğ

süt), B (kaynatılmış süt) ve C (indirekt UHT homojenizasyon yok) örneği aynı bölgede toplanırken; D (indirekt UHT homojenizasyon sonra), E (indirekt UHT homojenizasyon önce) ve F (direkt UHT homojenizasyon önce) örnekleri homojenizasyon prosesinin uygulandığı örnekler olup aynı kısımda toplanmıştır. Aynı zamanda ısı işlem yöntemine göre de ayırım net bir şekilde görülmektedir. İndirekt UHT yöntemi ile üretilen D ve E örnekleri bir arada bulunurken direkt UHT yöntemi ile üretilen F örneğinin bunlardan ayrıldığı görülmektedir.

#### 4.3.2. Süt Örneklerinde FT-Raman Analiz Sonuçları

ATR FTIR ölçümlerinde olduğu gibi FT-Raman sonuçlarına bakıldığında da literatürle uyumlu olarak amit-I ( 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$ ), amit-II (1600-1500  $\text{cm}^{-1}$ ), amit-III ( 1500-1200  $\text{cm}^{-1}$ ) ve 1200-900  $\text{cm}^{-1}$  bölgelerinde değişimler grafikte görülmektedir (Şekil 4.10).

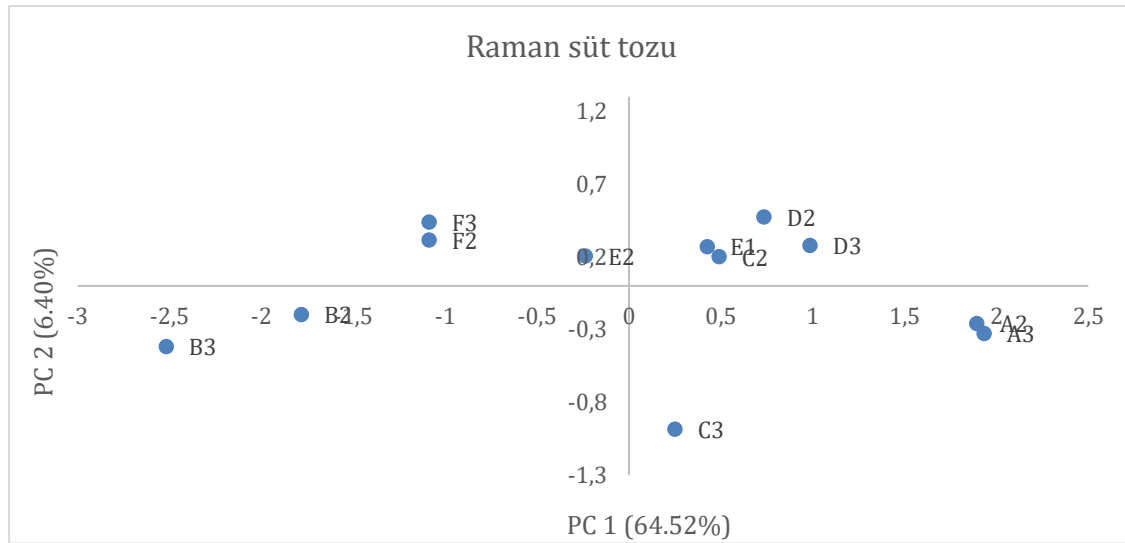


**Şekil 4.10.** Liyofilize süt tozu örneklerine ait FT-Raman spektrumları.

358-462  $\text{cm}^{-1}$ , 886-867  $\text{cm}^{-1}$ , 1071-1083  $\text{cm}^{-1}$ , 1301  $\text{cm}^{-1}$ , 1442  $\text{cm}^{-1}$ , 1652-1654  $\text{cm}^{-1}$  ve 2923-2919  $\text{cm}^{-1}$  bölgelerinde instensite oluşan farklılıklar örnekler arası farktan ileri gelmektedir ve tüm bu bölgelerde B (kaynatılmış süt) örneği diğerlerinden rahatça ayrılmakta en düşük intensiteye sahip olduğu görülmektedir. Kaynatmanın proteinler üzerine etkisinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Buna ek olarak B örneğinden sonra

en düşük intensiteye sahip örneğin F (direkt UHT homojenizasyon sonra) olduğu görülmektedir. 2923-2919  $\text{cm}^{-1}$  civarındaki spektrum C-O bağının esnemesi sonucu ortaya çıkmıştır. Bu spekturumun proteinlerle değil yağlarla ilgili olduğu çalışmalarda gösterilmiştir, yağlarda bulunan  $\text{CH}_2$  molekülünün simetrik esnemesi ile ilişkili olacağı açıkça belirtilmiştir. En yüksek D örneğinde iken en düşük yine kaynatılmış süt örneği olan B örneğinde olduğu görülmüştür.

1652-1654  $\text{cm}^{-1}$  civarında meydana gelen pik amit-I bölgesini temsil etmekte ve direkt proteinlerdeki değişimlerle ilişkilendirilmektedir. B ve F örneğinde oldukça düşük intensiteye sahip olmasının yanı sıra A örneğine yani çiğ süt örneğine en yakın D örneğinin intensitesi olduğu görülmektedir. Isıl işleme bağlı olarak kaynatılmış sütte azalmış, direkt ısıl işlem yönetmi ile üretilen sütte de azaldığı belirlenmiştir.



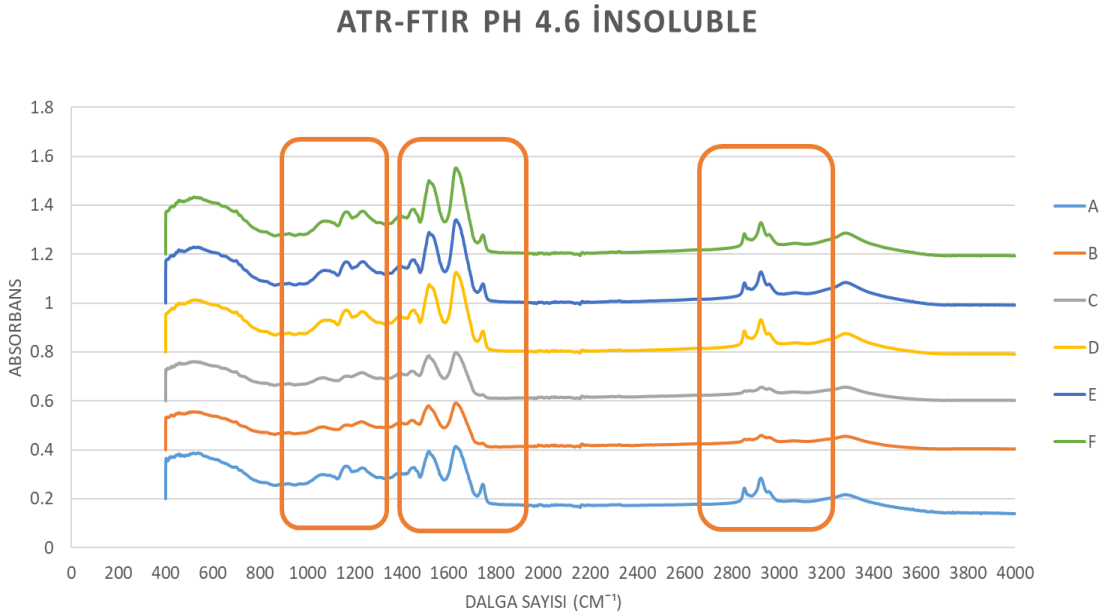
**Şekil 4.11.** Liyofilize süt tozu örneklerine ait FT-Raman spektrumlarının temel bileşim analizi.

ATR-FTIR ölçümlerinde olduğu gibi Raman bantları da temel bileşen analizine tabi tutulmuş ve sonuçlar gruplandırma yapılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.11). Raman süt örneklerinin temel bileşen analizi yapılırken örneklere birçok pre-processing işlemi denenmiş olup, en uygun mean center ve first derivative olarak seçilmiştir. Analizi en iyi açıklayan PC1 ve PC2 komponenti olup birinci komponent %64.52 oranında analizi açıklarken ikinci komponentte bu değer %6.40 olarak belirlenmiştir. Kaynatılmış süt

örnekleri aynı grupta yer alırken diğer örneklerden kolayca ayrılmıştır. Çiğ süt örnekleri de aynı şekilde ısıl işlem görmüş bütün örneklerden ayrılmıştır. Direkt UHT homojenizasyon işleminin sonra uygulandığı örneklerde bir arada toplanırken indirekt yöntem ile ısıl işleme maruz kalan örnekler orjin etrafında bir grup oluşturmuşlardır. Fakat burada homojenizasyon işlemine göre bir ayırım görmek mümkün olmamakta, temel bileşen analizinde ortaya çıkan ayırım yalnızca ısıl işlem yöntemine göre gerçekleşmiştir.

#### 4.3.3. pH4.6-çözünmeyen Fraksiyonda ATR-FTIR Analiz Sonuçları

Şekil 4.12'de belirgin olarak gözlenen  $2911\text{ cm}^{-1}$  spektrumu süt lipidlerinin açıl zincirlerindeki  $\text{CH}_2$  moleküllerinin asimetrik olarak gerilmesini,  $2951\text{ cm}^{-1}$  spektrumu ise trigliserid ve fosfolipitlerin açıl zincirlerindeki  $\text{CH}_2$  moleküllerinin simetrik olarak gerilmesinin sonucu oluşmaktadır (Dufour ve ark., 2000). Homojenizasyon işlemi uygulanmayan B ve C örneklerinde bu iki spektrumun intensitesi homojenizasyon işlemi uygulanmış olan D, E ve F örnekleri ile kıyaslandığında daha düşüktür. Neredeyse B ve C örneklerinde bunun tamamen kaybolduğu gözlemlenmiştir.



**Şekil 4.12.** Süt örneklerinin pH4.6-çözünmeyen faza ait ATR-FTIR grafikleri.

$1743\text{ cm}^{-1}$  da meydana gelen spektrum trigliseridlerdeki ester bağlarında oluşan  $\text{C}=\text{O}$  gerilmesini göstermektedir (Karoui ve ark., 2003). B ve C örnekleri D, E ve F ye oranla

daha düşük intensiteye sahiptir. RP-HPLC ile serum proteinleri analizinde de gözlemlendiği üzere indirekt UHT homojenizasyonun uygulanmadığı (PC) örnek serum protein deseni açısından kaynatılmış süte yakınlık göstermektedir.

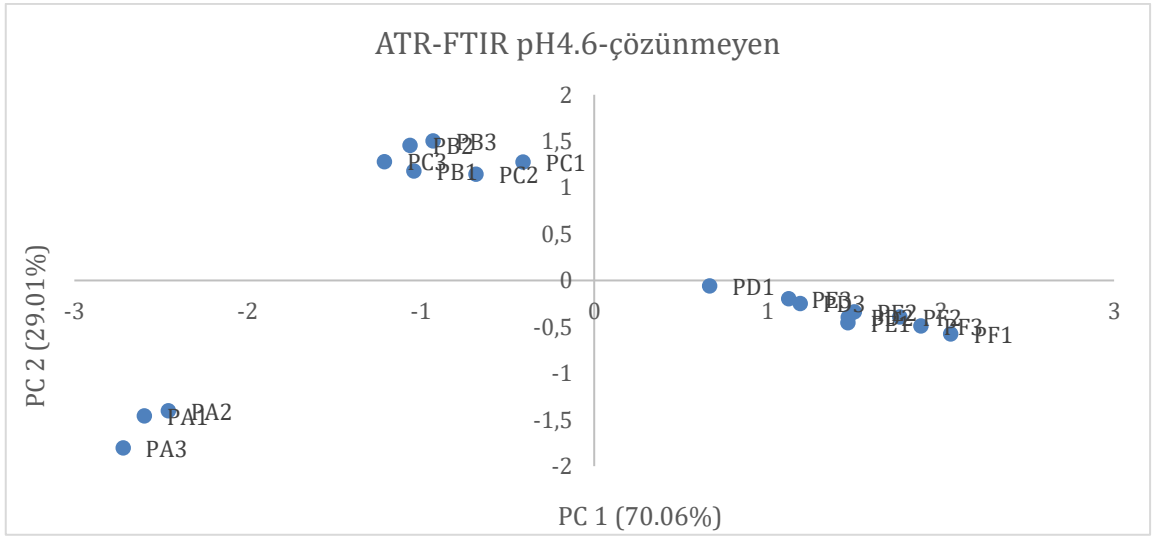
Amit-I bölgesi olarak adlandırılan  $1600-1700\text{ cm}^{-1}$  peptid bağlarındaki C=O gerilmesi sonucu oluşan titreşimleri göstermektedir ve proteinlerin ikincil yapısı hakkında bilgi vermektedir. Amit-II bölgesini ise  $1500-1600\text{ cm}^{-1}$  de oluşan N-H gerilmesi göstermekte ve proteinler hakkında genel bilgi vermektedir (Kher ve ark., 2007). D, E ve F örnekleri amit-I bölgesinde bulunan ( $1697\text{ cm}^{-1}$ ,  $1686\text{ cm}^{-1}$  ve  $1618\text{ cm}^{-1}$ ) spektrumu bakımından B ve C örneklerinden ayrılmaktadır, intensiteleri arasındaki fark açıkça gözlemlenebilmektedir. Isıl işlem görmüş olan UHT sütlerde bu farkın temel sebebi intramoleküler  $\beta$ -tabakalarının agregasyonudur. Ayrıca, çiğ süt örneğinde olduğu gibi D, E ve F örneklerinde de  $1500-1600\text{ cm}^{-1}$  spektral aralıkta 3 pik tespit edilmiş olup, B ve C örneklerinde aynı spektral aralıkta 2 pik varlığı gözlenmiştir. pH4.6-çözünmeyen faza ait FTIR bantlarındaki bu farklılığın protein denatürasyonundan çok deamidasyon ve/veya defosforilasyon düzeyi farklılığından kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

$1200-1500\text{ cm}^{-1}$  (Amit-III) bölgesi de proteinlerin ikincil yapısını belirlemede kullanılmaktadır. Bu bölgedeki spektrumlar N-H bağlarındaki kırılma (Jaiswal ve ark., 2015) ve C-H bağlarındaki gerilme titreşimleri sonucu oluşmaktadır. Ayrıca  $1490-1500\text{ cm}^{-1}$  açıl yağ asidi zincirlerinin  $\text{CH}_2$  grubunda meydana gelen makaslama hareketi sonucu da oluşmaktadır (Mendelsohn ve ark., 2010). Amit-III bölgesinde bulunan  $1441\text{ cm}^{-1}$  de bütün örneklerdeki farklılıklar açıkça görülmekte ve B ve C örneklerinde oldukça düşüktür.  $1288-1256\text{ cm}^{-1}$  (unordered structure) ve  $1255-1224\text{ cm}^{-1}$  ( $\beta$ -tabakaları) de ki intensiteler kıyaslandığında B ve C örneği A, D, E ve F örneklerinde daha yüksektir. Bunun sebebi  $\beta$ -tabakasının stres altında kalması ve protein agregasyonuna büyük çoğunlukla kazeinin katılmasının olduğu düşünülmektedir.

$1054-1063\text{ cm}^{-1}$  bölgesi CO esnemesi sonucu oluşmakta ve daha çok sütte bulunan bir şeker olan laktoz ile ilgilidir.  $1025-1363\text{ cm}^{-1}$  spektral aralık ise süt mineralleri, süt yağı ve laktoz parmak izi bölgesi ( $900-1200\text{ cm}^{-1}$ ) (Kaur ve ark., 2017; Kher ve ark., 2007) ve amit-III bölgesini ( $1200-1500\text{ cm}^{-1}$  farklı protein ve süt bileşen interaksiyon parmak



izi bölgesi) (Zhou ve ark, 2006; Gebhardt ve ark., 2011) temsil etmektedir. Çiğ süt (A örneği), indirekt UHT uygulanan örnekler (D ve E örnekleri) ile homojenizasyonun UHT işlemi sonrası uygulandığı direkt UHT örneğinde (F örneği) 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  spektral aralıkta gözlenen pikler kaynamış (B örneği) ve direkt UHT uygulanmış ve ısıl işlem öncesi homojenize edilen örnekte (C örneği) gözlenmemiştir. Bu durum homojenizasyon sonucu serum proteinleri, kazeinler ve yağ globül membran proteinleri arasında ısı ve homojenizasyon ile tetiklenen kovalent interaksyonlar ile açıklanmaktadır.

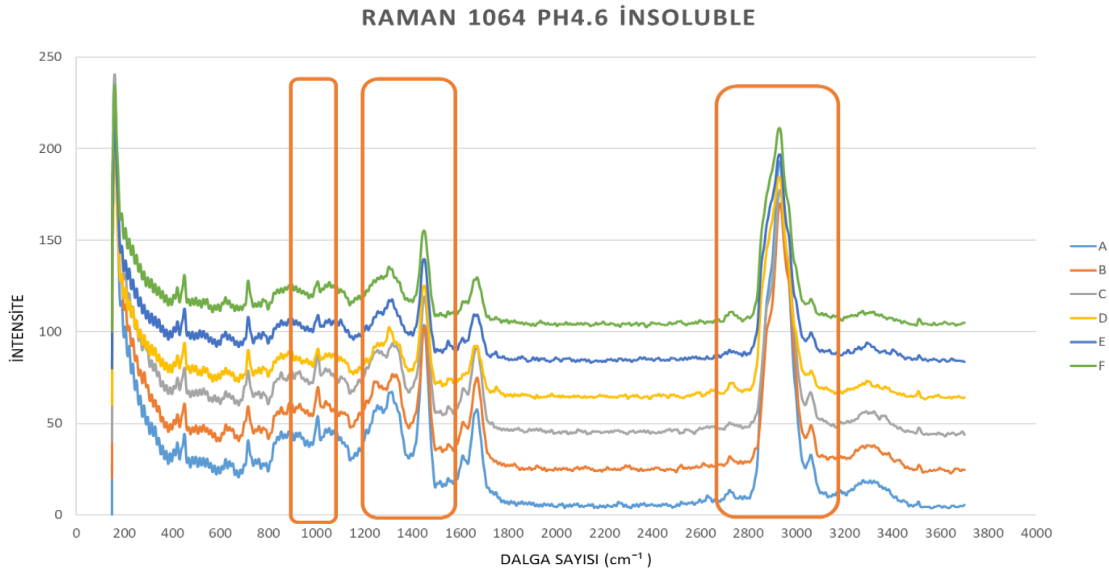


**Şekil 4.13.** Süt örneklerinin pH4.6-çözünmeyen faza ait ATR-FTIR sonuçlarının temel bileşim analizi.

pH4.6-çözünmeyen fraksiyonuna ait örneklerin ATR-FTIR spektrumlarında temel bileşen analizi uygulanarak değerlendirilmiş olup, pre-processing işlemlerinden denemeler sonucunda mean centering uygun görülmüştür. PC1 %70.06, PC2 %29.01 oranında ayrımı açıklamaktadır. Şekil 4.13’de görüldüğü üzere pH4.6-çözünmeyen örnekleri homojenizasyon işleminin yapıp yapılmamasına göre net bir şekilde ayrılmıştır. Bunun dışında hiç bir işlem uygulanmamış olan çiğ süte ait çözünmeyen fraksiyonlarda diğerlerinden ayrı bir grup oluşturmuştur. Yine beklendiği üzere kaynatılmış süt (PB) ve indirekt UHT homojenizasyon olmayan (PC) aynı grupta yer almaktadır. PD, PE ve PF örnekleri bir grup oluştururken burada ısıl işlem yöntemine göre veya homojenizasyon sırasına göre başarılı bir ayırım elde edilmemiştir.

#### 4.3.4. pH4.6-çözünmeyen Fraksiyonda FT-Raman analiz sonuçları

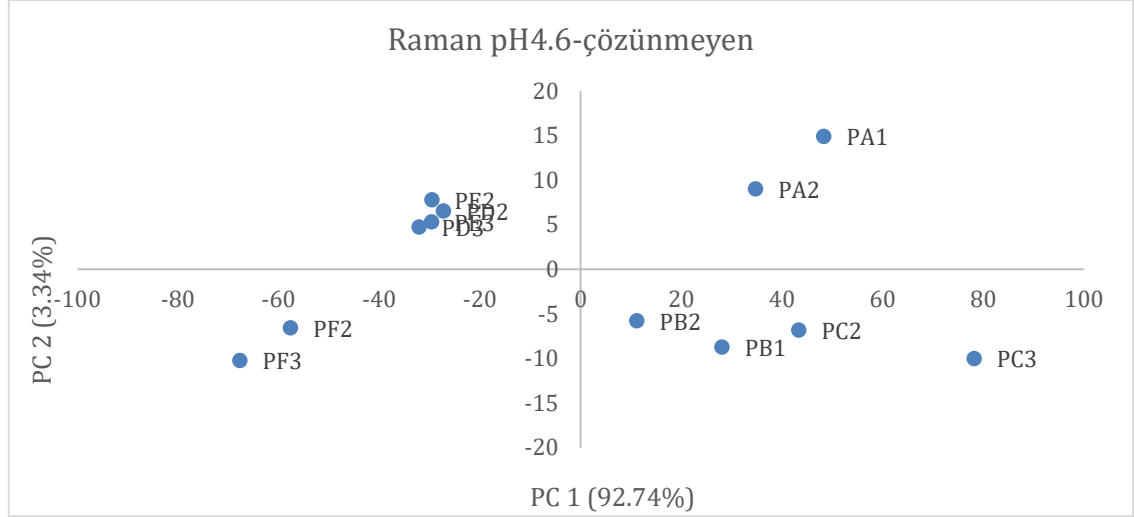
UHT sütlerin pH4.6'ya getirilerek çöktürülmesi sonucu elde edilen peletlerde de diğer örneklerde olduğu gibi liyofilizasyon işlemi sonrası Raman ölçümleri alınmış ve FTIR ölçümlerine benzer şekilde sonuç elde edilmiştir. 3058-3060  $\text{cm}^{-1}$  ve 2927-2930  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısında görülen spektrumlar aromatik ve alfatik aminoasitlerden kaynaklanan C-H esnemesi ile ilişkilendirilmektedir (Howell ve ark., 1999). Homojenizasyon işlemi uygulanmayan A, B ve C örneklerinde bu spektrumun intensitesinin daha yüksek olduğu görülürken, homojenizasyon uygulanan D, E ve F örneklerinde daha düşük olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.14). En düşük ise direkt ısıl işlem yöntemi ile üretilen F örneğinde olduğu görülmektedir.



Şekil 4.14. Süt örneklerinin pH4.6-çözünmeyen faza ait FT-Raman grafikleri.

UHT süt örneklerinde de gözlemlenen 1745  $\text{cm}^{-1}$  civarında görülen pik belirtildiği gibi lipoliz esnasında oluşmakta ve ester bağlarındaki C=O esnemesi sonucu oluşan bir titreşimdir. Şekil de D ve E örneklerinde intensitesi düşük olsada bu spektrum görülmekteyken diğer örneklerde olmadığı gözlemlenmektedir. Özellikle, UHT uygulanan ve homojenize edilen örneklerde bu bantların yoğunluğunun azalması yağ globül boyutundaki azalma ile ilişkilendirilmiştir.

Amit-I ( $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ ) bölgesini temsil eden  $1669\text{ cm}^{-1}$  ,  $1607\text{ cm}^{-1}$  dalga boyunda ve amit-II (  $1600-1500\text{ cm}^{-1}$ ) bölgesini temsil eden  $1548\text{ cm}^{-1}$  dalga boyundaki spektrumlar arasında literatürle uyumlu olarak belirgin farklar bulunmaktadır.



**Şekil 4.15.** Süt örneklerinin pH4.6-çözünmeyen faza ait FT-Raman sonuçlarının temel bileşim analizi.

pH4.6-çözünmeyen örneklerinin raman spektrumlarında temel bileşen analizi uygulanarak değerlendirilmiş olup, pre-processing işlemlerinden denemeler sonucunda mean center uygun görülmüştür. PC1 %92.74, PC2 %3.34 oranında ayrımı açıklamaktadır (Şekil 4.15). Şekilde görüleceği üzere ATR-FTIR ölçümlerinden farklı olarak hem ısı işlem yöntemine göre hem de homojenizasyon sırasına göre bir ayrım elde edilmiştir. Hiçbir işlem uygulanmayan çiğ süt örnekleri diğerlerinden belirgin şekilde ayrılırken benzer çıkması beklenen ısı işleme maruz kalan fakat homojenizasyon işlemi olmayan B ve C örnekleri bir grupta toplanmıştır. İndirekt ısı işlem yöntemi ile üretilen D ve E örnekleri de yine aynı grupta bulunurken direkt ısı işlem uygulanmış olan F örneği bunlardan ayrılmıştır. Bu yöntemde ATR-FTIR a göre daha başarılı bir ayrım elde edilmiştir.

#### 4.3.5. Ultrasantrifüj-pelet ATR-FTIR Analiz Sonuçları

Süt birçok proteinden oluşmuş kompleks bir yapı olsada, süt proteinleri temel olarak kazeinler ve serum proteinleri olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Süt proteinlerinin ön fraksiyonlama metotları kimozin ile ayırma, izoelektrik çöktürme ve ultrasantrifüj ile

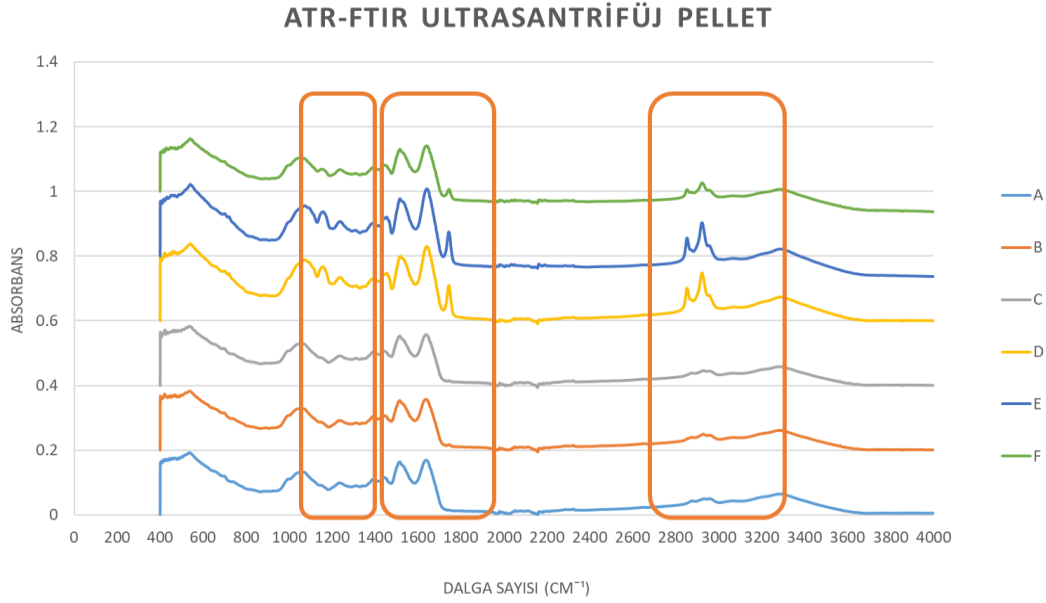
gerçekleştirilmektedir. Kimozin ile fraksiyonlama daha çok peynir üretiminde kullanılmakta ve bu işlem sonucunda rennet kazein ve peynir altı suyu elde edilmektedir. Kimozin  $\kappa$ -kazeinde ki Phe105–Met106 bağına özgüdür, bu bağı kırarak  $\kappa$ -kazeini hidrofobik para- $\kappa$ -kazeine ve hidrofilik olan kazeinomakropeptide ayırmaktadır. Bu proteoliz kazeinlerin yapısında parçalanmaya neden olur ve böylece pıhtı oluşur.

Bu tez kapsamında uygulanan metotlardan biri olan izoelektrik çöktürme sonucunda ise asit kazein ve serum olarak proteinler ayrılmaktadır. Süt pH'sı normalde 6-7 arasındadır ve kazein miselleri net negatif yüke sahiptir, bu pH süte asit eklenmesi ile izoelektrik nokta olan 4.6 ya düşmesi sağlanır. Böylece misellerin dış yüzeyi nötrlenerek bir agregasyon meydana gelmektedir. Sütün pH sınırın 4.6'ya düşmesinden sonra kolayca düşük hızdaki santrifüjde kolayca ayrılabilir.

Çalışmada kullanılan ikinci metot ise sıklıkla kullanılan ultrasantrifüj ile proteinlerin ayrılması işlemidir. Ultrasantrifüj, yüksek hızda santrifüj ile ayırma metotudur ve merkezci ivmenin sedimentasyon prensibine dayanmaktadır. Kazeinler radyal yönde ayrılarak pelet haline gelmektedir. Kazein haricindeki diğer proteinlerde serum proteinleri olarak adlandırılmaktadır. Ultrasantrifüjün en önemli olumlu özelliği misel yapısının zarar görmemesidir. Orijinal misel yapısındaki özelliklere benzer olacak şekilde bu işlem geri dönüştürülebilir. Diğer yandan ultrasantrifüj ile fraksiyonlama metotunda dikkat edilmesi gereken husus çok küçük kazein misellerinin çökeltilmesi zor olduğundan bu kazein kalıntılarında serum proteini olarak tanımlanmaktadır. Diğer önemli nokta ise ultrasantrifüj serumda  $\beta$ -kazein miktarının yüksek olmasıdır.  $\beta$ -kazein düşük sıcaklıklarda yapıdan ayrıldığından ve ultrasantrifüj işlemide genellikle +4 derecede uygulandığından  $\beta$ -kazein kazein miselinden ayrılarak sıcaklığın etkisi ile serum faza geçebilmektedir (Jensen ve ark., 2012).

Ultrasantrifüj işlemi tüm bunlar dikkate alınarak 135000 g de 20 °C de 1 saat de gerçekleştirilmiştir. Ultrasantrifüj sonucunda elde edilen örnekler pH4.6 örneklerinde olduğu gibi pelet ve serum fazı olarak ayrı olarak liyofilize edilmiş ölçüm anına kadar saklanmıştır.

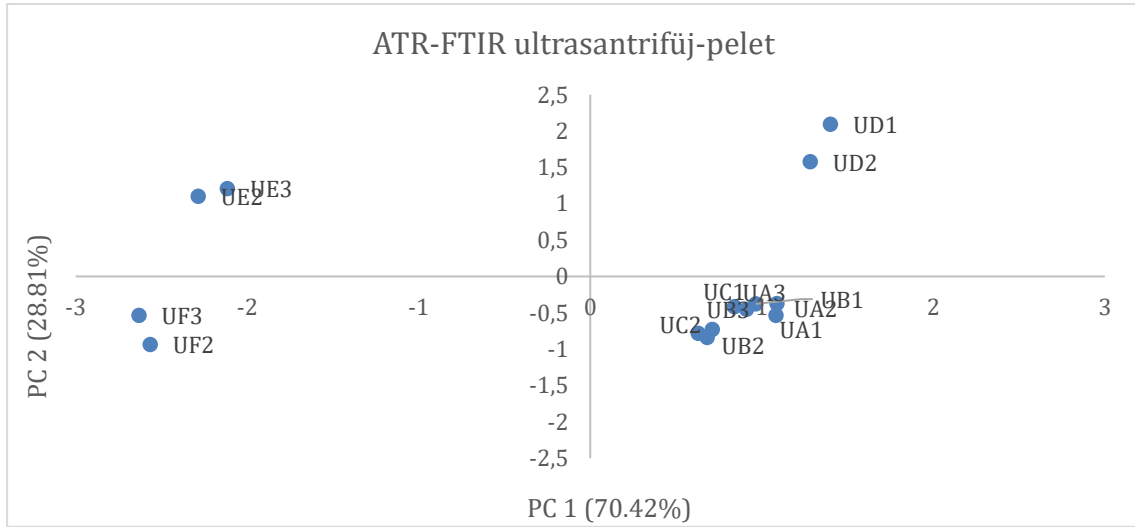
Şekil 4.16'da görülen ultrasantrifüj-pelete ait ATR-FTIR grafiğinde örnekler arası farklılıklar meydana gelen bölgeler belirlenmiştir. 2921  $\text{cm}^{-1}$  ve 2850  $\text{cm}^{-1}$  de, 1742  $\text{cm}^{-1}$  ve 1233  $\text{cm}^{-1}$  bantlarındaki farklılıklar açıkça görülmekle birlikte, 3292, 1640, 1515, 1452, 1386, 1303, 1554-1556, 1069 ve 539  $\text{cm}^{-1}$  bantlarındada önemli farklılıklar olduğu saptanmıştır.



**Şekil 4.16.** Süt örneklerinin ultrasantrifüjü sonucu elde edilen pelete ait ATR-FTIR grafiği.

2921  $\text{cm}^{-1}$  bandı süt yağının açıl zincirlerindeki  $\text{CH}_2$  grubundaki asimetrik gerilmeler sonucu oluştuğu, 2850  $\text{cm}^{-1}$  de ise trigliseridlerin ve fosfolipitlerin yapısındaki  $\text{CH}_2$  grubundaki simetrik gerilmeler sonucu oluştuğu bilinmektedir. Bu iki bantta indirek UHT homojenizasyon sonra ( D ) uygulanan örnekte yüksek olup, onu takiben indirekt UHT homojenizasyon önce ( E ) ve az da olsa ( F ) direkt UHT homojenizasyon sonra örneğinde saptanmıştır. Homojenizasyon işlemi bulunmayan A, B ve C örneğinde bu bantların intensitesi sınırlıdır. Bir diğer yağlarla ilgili olan 1742  $\text{cm}^{-1}$  de gözlemlenen bant triaçilgliserollerde bulunan ester bağlarındaki  $\text{C}=\text{O}$  bağlarının esnemesi ile ilişkilendirilmiştir. Literatürde ester bağlarının esnemesi protein-yağ interaksyonları ile ilgili olabileceği gibi yağların fiziksel halinin değişmesi sonucu da ortaya çıkabileceği belirtilmiştir.

1450-1765  $\text{cm}^{-1}$  spektral aralıkta pH4.6-çözünmeyen fazda gözlenen farklılıkların örneklerin ultrasantrifüj-pelet profilleri için de geçerli olduğu bulunmuştur (Şekil 4.16). D, E ve F örneklerinde 1600  $\text{cm}^{-1}$  spektral bölgede diğer örneklerden farklı olarak 3. bir pikin varlığı belirlenmiştir. İndirekt yöntemle üretilen UHT süt örneklerinde (D ve E örnekleri) daha belirgin olan bu pikin hem  $\beta$ -LG/ $\alpha$ -LA ile  $\kappa$ -CN interaksiyonları hem de serum proteinleri ve kazeinlerin-homojenize süt yağ globül membran proteinleri interaksiyonu sonucu oluştuğu düşünülmektedir.

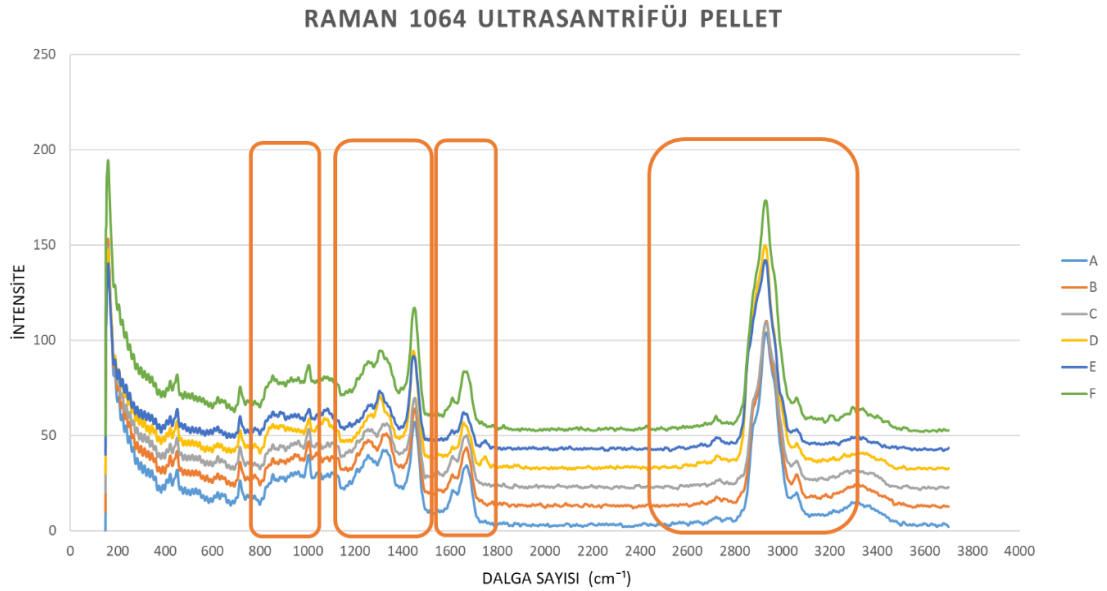


**Şekil 4.17.** Süt örneklerinin ultrasantrifüjü sonucu elde edilen pelete ait ATR-FTIR sonuçlarının temel bileşim analizi

Ultrasantrifüj-pelet örneklerinin ATR-FTIR datalarına temel bileşen analizi uygulanmıştır. En iyi ayrımı görebilmek amacı ile analize uygun pre-processing işlemleri denenmiş ve sonuç olarak mean centering işlemi uygun görülmüştür. Yapılan temel bileşim analizi sonucunda birinci komponent PC1 %70.42, ikinci komponent PC2 ise %28.81 oranında ayrımı açıklamaktadır (Şekil 4.17). Homojenizasyon işleminin uygulandığı ısı işlem yöntemlerinin farklı olduğu D, E ve F örneğinde ayrım oldukça başarılı iken çiğ süt (A), kaynatılmış süt (B) ve homojenizasyon uygulanmayan indirekt UHT (C) örneği aynı yerde toplanmıştır. Yani homojenizasyon uygulanmayan örnekler kendi içlerinde ısı işleme göre ayrılmazken homojenizasyon işlemi uygulanan örnekler hem ısı işlem yöntemine göre hemde homojenizasyonun önce veya sonra uygulanması durumuna göre başarılı bir şekilde ayrılmıştır.

#### 4.3.6. Ultrasantrifüj-pelet FT-Raman Analiz Sonuçları

2929  $\text{cm}^{-1}$  ve 2720  $\text{cm}^{-1}$  spektrumları sütteki lipit bileşenin verdiği spektrumlardır. Şekil 4.18'de süt örneklerinin ultrasantrifüjlenmesi sonucu oluşan peletlerin ATR-FTIR spektrumları incelendiğinde 2720  $\text{cm}^{-1}$  spektrumu çiğ süt, kaynatılmış süt ve UHT işlemi uygulanmış süt örneklerinin hepsinde birbirine yakın olduğu gözlemlenmiştir. 2929  $\text{cm}^{-1}$  spektrumu için ise homojenizasyon işlemi uygulanan UF, UD ve UE örneklerinde çiğ sütle yakın, UB ve UC örneklerinde ise bunlardan daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. 2929  $\text{cm}^{-1}$  spektrumu literatürde  $\text{CH}_3$  molekülünün asimetrik esnemesi sonucu oluşan yağlarla ve protein-yağ etkileşimleriyle ilişkilendirilmiştir.

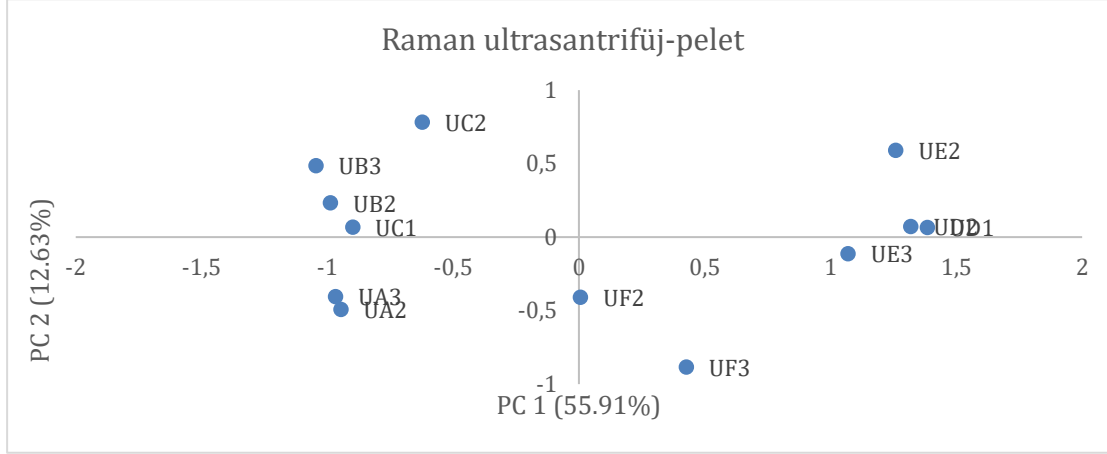


Şekil 4.18. Süt örneklerinin ultrasantrifüj sonucu elde edilen pelete ait FT-Raman grafiği.

1500-1700  $\text{cm}^{-1}$  (amit-I ve amit-II) bölgesinde 1658  $\text{cm}^{-1}$ , 1607-1611  $\text{cm}^{-1}$  ve 1447  $\text{cm}^{-1}$  olmak üzere üç farklı pik tespit edilmiştir. Bu bölgede ki pikler değerlendirildiğinde en yüksek UA ve UF örneğinin intensitesi iken bunu UB ve UC izlerken en düşük UD ve UE örneklerinde olduğu gözlemlenmiştir.

1303 ve 1318  $\text{cm}^{-1}$  spektrumları  $\alpha$ -heliks yapıyı temsil ederken, 1255  $\text{cm}^{-1}$  spektrumu ise unordered yapıyı göstermektedir. Yine amit-I ve amit-II bölgesinde olduğu gibi direkt ısıtım işlem yöntemi ile üretilen homojenizasyonun sonra uygulandığı UF örneğinde en yüksek

bulunmuşken, indirekt yöntemle üretilen UD ve UE örneklerinde en düşük olduğu saptanmıştır. 1200-900  $\text{cm}^{-1}$  spektrumları arasında olan V. Bölge olarak adlandırılan bölgede 1075  $\text{cm}^{-1}$  ve 1004  $\text{cm}^{-1}$  olmak üzere iki farklı pik tespit edilmiş ve UA, UF örneklerinde gözlemlenirken en düşük UD ve UE örneklerinde olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 4.19.** Süt örneklerinin ultrasantrifüj sonucu elde edilen pelete ait FT-Raman sonuçlarının temel bileşim analizi.

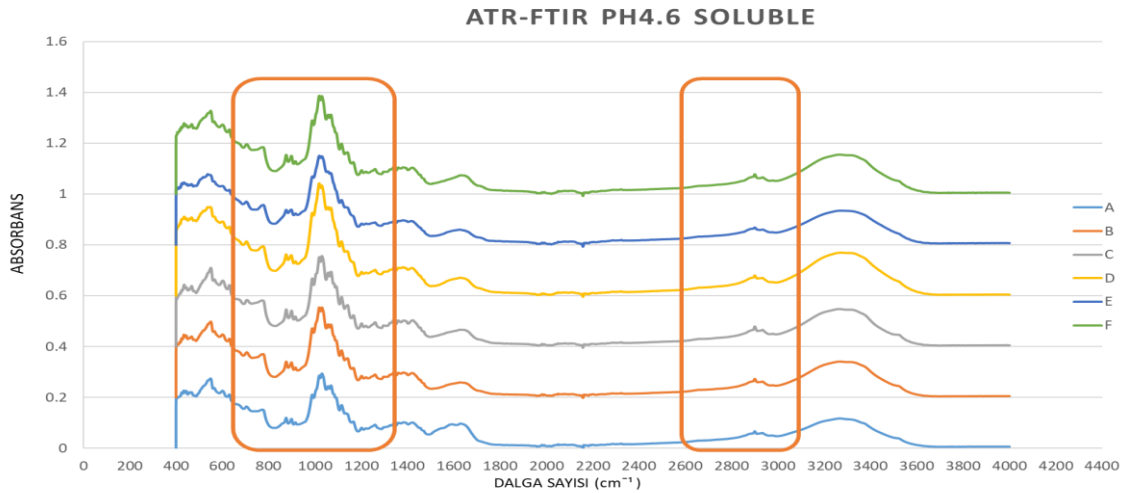
Ultrasantrifüj-pelet örneklerinin FT-Raman datalarına temel bileşim analizi uygulanmıştır. En iyi ayrımı görebilmek amacı ile analize uygun pre-processing işlemleri denenmiş ve sonuç olarak mean centering ve first derivative işlemi uygun görülmüştür. Yapılan temel bileşim analizi sonucunda birinci komponent PC1 %55.91, ikinci komponent PC2 ise %12.63 oranında ayrımı açıklamaktadır (Şekil 4.19). Homojenizasyon uygulanan çiğ süt (UA), kaynatılmış süt (UB) ve indirekt yöntemle üretilen homojenizasyon uygulanmayan (UC) sütlere ait ultrasantrifüj-pelet örneklerinin FT-Raman spektrumları y-eksenin sol tarafında toplanırken, homojenizasyon uygulanan indirekt yöntemle üretilen homojenizasyonun sonra uygulandığı (UD), indirekt yöntemle üretilen homojenizasyonun önce uygulandığı (UE) ve direkt ısı işlem yöntemi ile üretilen homojenizasyonun sonra uygulandığı (UF) örnekleri y ekseninin sağ tarafında toplanmıştır. Homojenizasyon işleminin yapıp yapılmamasına göre net bir ayrım elde edilmiştir. Ayrım netliğinin verilerin ön işlem proseslerini değiştirerek/tekrarlarla daha da iyileşeceği düşünülmektedir. Ancak, bu tez kapsamında fazlaca irdelenmemiştir.



Çiğ süt örnekleri de ( UA ), kaynatılmış süt ( UB ) ve indirekt homojenizasyon olmayan ( UC ) örneklerinden başarılı bir şekilde ayrılmıştır. Yine homojenizasyon işlemine tabi tutulan UD, UE ve UF ise ısıl işlem yöntemine göre ayrılmış, UD ve UE örnekleri bir arada toplanırken direkt ısıl işlem yöntemi ile üretilmiş olan UF örnekleri bunlardan ayrı bir bölümdedir. Homojenizasyon işleminin önce ya da sonra olmasına göre bir ayırım gözlemlenmemiştir.

#### 4.3.7. pH4.6-çözünen Fraksiyonda ATR-FTIR Analiz Sonuçları

UHT sütlerdeki kazein kısmının pH4.6'da çöktürülmesi ile edilen serum fazı liyofilize edildikten sonra ATR-FTIR ile analiz edilmiştir. Şekil 4.20'de görüldüğü gibi 3292, 2868, 1624, 1416,1380, 1258, 1120, 1038, 1017, 875-898, 775, 704, 536  $\text{cm}^{-1}$  spektrumlarında örnekler arası farklılıklar bulunmaktadır.



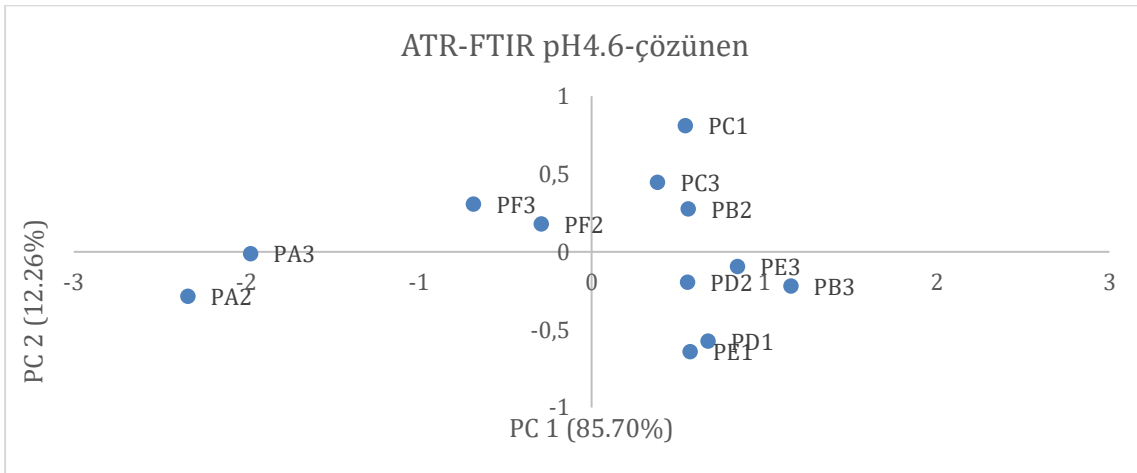
**Şekil 4.20.** Süt örneklerinin pH4.6-çözünen fraksiyonuna ait ATR-FTIR grafiği.

3292  $\text{cm}^{-1}$  de görülen spektrum H-O gerilmesi sonucu, 2868  $\text{cm}^{-1}$  ve 2925  $\text{cm}^{-1}$  de görülen spektrumlar ise sırasıyla trigliseridlerin ve fosfolipitlerin açıl zincirlerinde bulunan CH<sub>2</sub> molekülün simetrik ve asimetric gerilmesi ile oluşmuştur. Bu bölgede beklendiği gibi örnekler arası dikkate alınacak bir fark bulunmamıştır.

Amit-I bölgesini temsil eden spektrum 1624  $\text{cm}^{-1}$  de meydana gelmiş olup, çiğ süt örneğinde yüksek olup diğer örnekler arasında belirgin fark gözlemlenmemiştir. Amit-I bölgesinde oluşan spektrumlar C-O gerilmesi ile oluşan titreşimlerle ilgili olup, 1700  $\text{cm}^{-1}$  ve 1660  $\text{cm}^{-1}$  arasında görülen absorpsiyon bantları  $\beta$ -sarmal (turn) yapıya,

1660-1650  $\text{cm}^{-1}$  arasında gözlemlenen bantlar  $\alpha$ -heliks yapıya, 1640-1618  $\text{cm}^{-1}$  de görülenler ise  $\beta$ -sheet tabakası ile ilişkilidir (Wang ve ark., 2011). Özellikle 1624  $\text{cm}^{-1}$  de görülen spektrum incelendiğinde çiğ süt örneğine en yakın indirekt yöntemle üretilen homojenizasyon sonra uygulanan PD ve direkt ısıtma işlem yöntemi ile üretilen homojenizasyonun sonra uygulandığı PF örnekleri bulunmuştur. Kaynatılmış süt (PB), indirekt homojenizasyon uygulanmayan örnekler (PC) ve indirekt homojenizasyonun önce uygulandığı örnekler (PE) bulunmuştur.

Proteinlerin parmak izi bölgesi olan Amide-I (1600-1300  $\text{cm}^{-1}$ ) bölgesine ait 1380  $\text{cm}^{-1}$  ve 1258  $\text{cm}^{-1}$  de bulunan iki farklı spektrumlar gözlemlenmiştir. Bu bölgede gözlemlenen spektrumlar proteinlerin alpha helix, B sheets ve random yapıları ile ilgilidir. 1380  $\text{cm}^{-1}$  ve 1258  $\text{cm}^{-1}$  spektrumlarının ikisinde benzer şekilde çiğ süt örneğinde en yüksek olup F ve D örneğinde yakın B ve C örneğinde daha az yoğunlukta olup, E örneğinde en düşük olarak gözlemlenmiştir. 800-1250  $\text{cm}^{-1}$  bölgesinde kalan 1120, 1038, 1017, 875-898  $\text{cm}^{-1}$  spektrumları çoğunlukla karbonhidratlar özellikle de laktoz ile ilgili olup, örnekler arası büyük farklar olmamakla birlikte yine homojenizasyon işleminin sonra uygulanması ile üretilen direkt (F) ve indirekt (E) kullanılan örneklerde diğerlerinden daha yüksek intensiteye sahip olduğu görülmüştür.

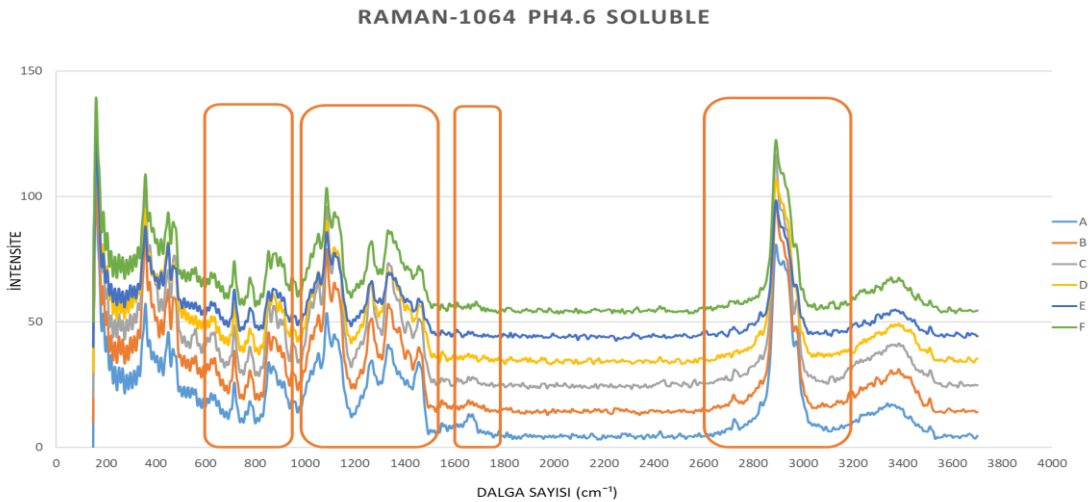


**Şekil 4.21.** Süt örneklerinin pH4.6-çözünen fraksiyonuna ait ATR-FTIR sonuçlarının temel bileşim analizi.

Süt örneklerinin pH4.6-çözünen fraksiyonlarına ait ATR-FTIR ölçümlerinde temel bileşen analizi uygulanmıştır. Analiz için örnekler pre-processing işlemine tabi tutulmuş olup ayrımı en iyi açıklayan mean center işlemi uygulanmıştır. Ayrımı açıklanan komponentlerden PC1 %85.70 iken PC2 %12.26 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.21). pH4.6-çözünmeyen fraksiyon örneklerine benzer şekilde A (çiğ süt) örneği kendi arasında bir grup olup diğerlerinden belirgin bir şekilde ayrılırken, homojenizasyon işlemi uygulanmayan fakat ısıl işleme tabi tutulan B (kaynatılmış süt) ve C (indirekt UHT homojenizasyon yok) örnekleri aynı bölgede toplanmıştır. İndirekt ısıl işlem yöntemi ile üretilen homojenizasyonun ısıl işlemden önce uygulandığı (E) ve homojenizasyonun ısıl işlemden sonra uygulandığı (D) örneği ise aynı grupta yer alırken, yine homojenizasyonun sonra uygulandığı fakat direkt ısıl işlem yöntemi ile sterilize edilen (F) örnek diğer örneklerden ayrılmıştır. Burada açıkça görülen ATR-FTIR işlemi sonucunda pH4.6-çözünen fraksiyonlara ait örneklerin spektrumları da pH4.6-çözünmeyen fraksiyonlara ait örneklerde olduğu gibi temel bileşen analizi ile gruplandırılmıştır. Homojenizasyon işleminin yapılıp yapılmaması gruplandırmada etkili olurken önce veya sonra uygulanması ise ısıl işlem yöntemi kadar etkili olmamıştır.

#### 4.3.8. pH4.6-çözünen Fraksiyonda FT-Raman Analiz Sonuçları

Şekil 4.22'de pH4.6-çözünen fraksiyonuna ait FT-Raman grafikleri topluca görülmektedir.

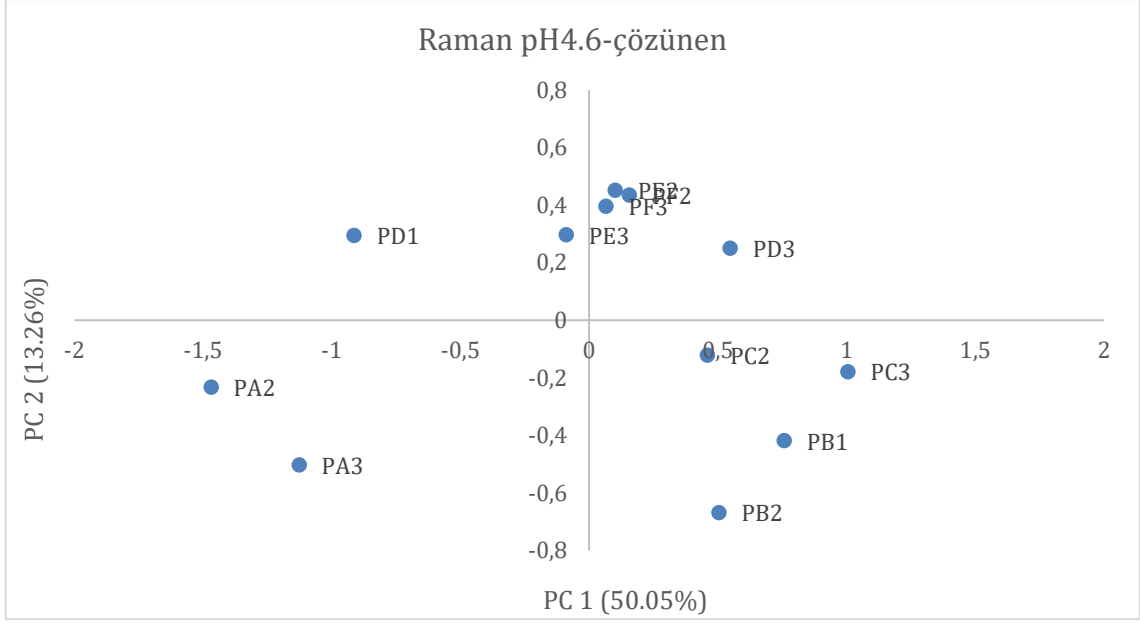


Şekil 4.22. Süt örneklerinin pH4.6-çözünen fraksiyonuna ait FT-Raman grafikleri.

Süt tipik olarak Raman spektroskopisinde 355-445  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı dolaylarında iki pik vermektedir ve bu pikler laktozu temsil etmektedir (Kirk ve ark., 2007; McGoverin ve ark., 2010). Çalışmamızda bu spektral aralıkta tüm örneklerde (pH4.6-çözünen fraksiyonlarında) iki pik varlığı tespit edilmiştir ancak pik yoğunluklarının UHT uygulanmış süt örneklerinde daha zayıf olduğu görülmüştür (Şekil 4.25). Tüm süt örneklerinin pH4.6'da çözünen fraksiyonlarında amit-III spektral bölgede (1235-1270  $\text{cm}^{-1}$ ) piklerin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.22). Özellikle çiğ sütte daha belirgin olan pikler serum proteinlerinin (özellikle  $\beta$ -LG'nin)  $\beta$ -tabaka yapısı hakkında bilgi vermektedir. Isıl işlem uygulanmış örneklerde  $\beta$ -pilili yapıda kısmi zayıflamalar tespit edilmiştir. Bu zayıflamaların moleküller arası hidrojen bağlarının kırılması ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir. 936  $\text{cm}^{-1}$  spektral dalga sayısı proteinlerde  $\alpha$ -heliks yapı hakkında bilgi vermektedir.

Çiğ süt (A) bu spektral dalda sayısında ısıl işlem uygulanmış örneklere oranla daha yoğun bir bant varlığına sahip bulunmuştur. Gerek 936  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı gerekse amit-III bölgesi ısı etkisi ile serum proteinlerinin hem  $\beta$ -tabaka hem de  $\alpha$ -heliks yapılarında değişimler (zayıflamalar) meydana geldiğini göstermektedir -ki bu durum serum proteinlerinin ısıl denatürasyonu ile açıklanmaktadır. Benzer bir profil C-H temsil bantları için de bulunmuştur (1453  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı). Tüm ısıl işlem görmüş süt örneklerinde C-H temsil piklerinin yoğunluğunun birbirleri ile benzer ancak çiğ süttten daha zayıf olduğu görülmüştür. A, B ve C örneklerinde -C-H ya da =C-H gerilme bölgelerinde (2880-2930  $\text{cm}^{-1}$ ) görülen piklerin UHT uygulanan ve homojenize edilen D, E ve F örneklerine oranla daha büyük olduğu tespit edilmiştir.

Süt örneklerinin pH4.6-çözünen fraksiyonlarına ait FT-Raman ölçümleride temel bileşen analizi uygulanmıştır. Analiz için örnekler pre-processing işlemine tabi tutulmuş olup ayrımı en iyi açıklayan mean centering ve first derivative işlemi uygulanmıştır. Ayrımı açıklanan komponentlerden PC1 %50.05 iken PC2 %13.26 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.23). Diğer örneklerde olduğu pH4.6-çözünen fraksiyon örneklerinde de çiğ süt (P) diğerlerinden açıkça ayrılmıştır.



**Şekil 4.23.** Süt örneklerinin pH4.6-çözünen fraksiyonuna ait FT-Raman sonuçlarının temel bileşim analizi.

Homojenizasyon işlemi uygulanmayan fakat ısıtılma tabi tutulan PB (kaynatılmış süt) ve PC (indirekt UHT homojenizasyon yok) örnekleri ise aynı bölgede toplanmıştır. İndirekt ısıtılma yöntemi ile üretilen homojenizasyonun ısıtılma işleminden önce uygulandığı (P) ve homojenizasyonun ısıtılma işleminden sonra uygulandığı (PD) ve direkt ısıtılma yöntemi ile üretilen homojenizasyonun ısıtılma işleminden sonra uygulandığı (PF) örnekleri ama net bir şekilde ayrılmamıştır. Homojenizasyon işlemi uygulanan UHT sütlerin hepsi birarada toplanmıştır. Homojenizasyon işleminin yapıp yapılmamasına göre net bir ayırım elde edilirken ısıtılma yöntemine ve ya homojenizasyonun ısıtılma işleminden önce yada sonra uygulanmasına göre bir ayırım yapılamamıştır. Bununla birlikte tüm liyofilize ve sıvı örnekler -80 °C’de muhafaza edilmekte olup olası tekrarlar ve değerlendirmeler için kullanılabilir.

## 5. YORUM

Çiğ süt, mikrobiyel açıdan insan sağlığını tehdit eden birçok patojen mikroorganizma için uygun bir gelişim ortamı olması nedeniyle ısıtılma tabii tutularak tüketilmektedir. Endüstriyel düzeyde iki farklı ısıtılma işlemi yaygın olarak kullanılmaktadır: pastörizasyon ve UHT uygulaması. Bu iki yaygın uygulama dışında son yıllarda Yüksek Sıcaklıkta Pastörizasyon (Ultra High Pasteurization-UHP) uygulaması da süt endüstrisinin geliştiği ülkelerde kısmen kullanılmaya başlanmıştır. Hangi teknoloji kullanılırsa kullanılsın ısıtılma işlemi sütün duyuşsal ve fiziko-kimyasal özellikleri ile beslenme değeri etkilemektedir. Sütün temel nitelikleri üzerine ısıtılma işleminin etkilerini minimize edebilmek amacıyla ısıtılma işleminin sıcaklık-süre normlarının ve uygulama yöntemlerinin dikkatli seçilmesi gerekmektedir. UHT süt dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de yaygın içme sütü formu durumundadır. ABD ve ülkemizde dahil olmak üzere AB ve AB aday ülkelerinde UHT süt tüketimi (İngiltere, İrlanda, Hollanda, Danimarka ve Avusturya hariç) toplam içme sütü pazarına hakim durumdadır. Dolayısıyla, UHT süt üretim teknolojilerinin doğru uygulanması sütün hem besin değeri kayıplarının en aza indirilmesi hem de sindirim etkinliğinin mümkün olduğunca yüksek tutulması açısından önem taşımaktadır.

Tez kapsamında farklı UHT süt işleme teknolojilerinin süt proteinlerinin moleküler konformasyonuna olası etkileri araştırılmıştır. Uygulamaların protein konformasyonu üzerine etkileri Raman ve ATR-FTIR spektroskopileri ile irdelenmiştir. RP-HPLC yöntemi ile serum protein denatürasyon oranları izlenmiştir. Analitik çalışmalar hem pH4.6'da çözünen ve çözünmeyen fraksiyonlar hem de kolloidal kazein fazı (ultrasantrifüj-pelet) ve ultrasantrifüjasyon süpernatantı ile yürütülmüştür. Beklenildiği üzere, ısıtılma işlemi uygulanmış tüm örneklerde gerek pH4.6-çözünen ve gerekse ultrasantrifüj-serum fazında serum proteini düzeylerinde azalma kaydedilmiştir. İndirekt UHT yöntemiyle proses edilen ve homojenizasyonun ısıtılma işlemi öncesi uygulandığı örnek (E örneği) kaynamış süt ile benzer serum proteini denatürasyon profiline sahip olduğu görülmüştür ( Şekil 4.1 ve Şekil 4.2 ).

Özellikle tez kapsamında farklı koşullarda üretilmiş olan süt örneklerinde proteinlerin değışimi, protein-yağ etkileşimlerini incelenmiştir. Bu kapsamda hızlı bir yöntem olan ATR-FTIR ve FT-Raman spektroskopisinden faydalanılmış ve hızlı sonuç elde

edilmiştir. RP-HPLC ile genelde proteinlerin serum fazındaki oransal değişimleri incelenebilirken, PAGE analizleri de uzun süren bir analiz olduğundan FTIR ve Raman kullanılarak farkları gözlemlemek amaçlanmıştır.

Süt örneklerinin ATR-FTIR spektrumları ele alındığında, gerek amit-I (1700-1600  $\text{cm}^{-1}$ ) ve amit-II (1600-1500  $\text{cm}^{-1}$ ) bölgelerindeki protein komponentleri profilleri gerekse lipit bölgesindeki (2800-3000  $\text{cm}^{-1}$ ) pikler incelendiğinde UHT süt üretiminde kullanılan teknolojilerin (direkt ya da indirekt) ve homojenizasyon uygulamalarının protein konformasyonları üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Pik yoğunluklarının UHT uygulama modeline göre değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir.

pH4.6-çözünmeyen fazlarına ait ATR-FTIR grafikleri Şekil 4.12’de verilmiştir. Homojenizasyon uygulanan sütlerin pH4.6-çözünmeyen fraksiyonlarının benzer spektruma sahip olduğu, homojenizasyon uygulanmayan sütlerin spektrumlarının bunlardan farklılık gösterdiği saptanmıştır. Majör farklılıkların 1025-1360  $\text{cm}^{-1}$ , 1450-1765  $\text{cm}^{-1}$  ve 2810-3031  $\text{cm}^{-1}$  bantlarından kaynaklandığı ilgili şekillerde görülmektedir. 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$  spektraları amit-I bölgesine karşılık gelmektedir ve ağırlıklı olarak peptid bağlarındaki C=O gerilme vibrasyonları hakkında bilgi sağlamaktadır. 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$  spektral aralık ise amit-II bölgesi olarak tanımlanmaktadır ve hem C=N gerilme vibrasyonları hem de N-H eğilmeleri (bending) hakkında bilgi sağlamaktadır (Curley ve ark., 1998; Kher ve ark., 2007). Çiğ süt örneğinde olduğu gibi D, E ve F örneklerinde de 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$  spektral aralıkta 3 pik tespit edilmiş olup, B ve C örneklerinde aynı spektral aralıkta 2 pik varlığı gözlenmiştir.

2810-3031  $\text{cm}^{-1}$  spektral aralığı ağırlıklı olarak süt lipit fraksiyonunu temsil etmektedir. 1025-1363  $\text{cm}^{-1}$  spektral aralık ise süt mineralleri, süt yağı ve laktoz parmak izi bölgesi (900- 1200  $\text{cm}^{-1}$ ) (Anderle ve Mendhelson, 1987; Kher ve ark., 2007) ve amit-III bölgesini (1200- 1500  $\text{cm}^{-1}$  farklı protein ve süt bileşen interaksiyon parmak izi bölgesi) (Zhou ve ark., 2006) temsil etmektedir. Çiğ süt (A örneği), indirekt UHT uygulanan örnekler (D ve E örnekleri) ile homojenizasyonun UHT işlemi sonrası uygulandığı direkt UHT örneğinde (F örneği) 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  spektral aralıkta gözlenen pikler kaynamış (B örneği) ve direkt UHT uygulanmış ve ısı işlem öncesi homojenize edilen örnekte (C

örneği) gözlenmemiştir. Bu durum homojenizasyon sonucu serum proteinleri, kazeinler ve yağ globül membran proteinleri arasında ısı ve homojenizasyon ile tetiklenen kovalent interaksyonlar ile açıklanmaktadır. C örneğinde 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  spektral aralıkta pik gözlenmemesine ait bir yorum geliştirilememiştir. D, E ve F örneklerinde amit-III bölgesinde (farklı süt bileşen ve protein interaksyonları bölgesi; 1025-1363  $\text{cm}^{-1}$  spektral aralık) oluşan pik profilleri A, B ve C örneklerinden farklı bulunmuştur. pH4.6'da çözünmeyen faza ait ATR-FTIR verilerine uygulanan PCA analizi sonucunda homojenizasyon uygulanmayan kaynatılmış süt örnekleri (PB) ve homojenizasyon uygulanmayan (PC) örnekleri bir arada toplanırken, çiğ süt bunlardan ayrılmaktadır. Homojenizasyon işleminin uygulandığı diğer UHT sütler ise bir grup oluşturmaktadır.

1450-1765  $\text{cm}^{-1}$  spektral aralıkta pH4.6-çözünmeyen fazda gözlenen farklılıkların örneklerin ultrasantrifüj-pelet profilleri için de geçerli olduğu bulunmuştur (Şekil 4.16). D, E ve F örneklerinde 1600  $\text{cm}^{-1}$  spektral bölgede diğer örneklerden farklı olarak 3. bir pikin varlığı belirlenmiştir. İndirekt yöntemle üretilen UHT süt örneklerinde (D ve E örnekleri) daha belirgin olan bu pikin hem  $\beta$ -LG/ $\alpha$ -LA ile  $\kappa$ -CN interaksyonları hem de serum proteinleri ve kazeinlerin-homojenize süt yağ globül membran proteinleri interaksyonu sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Homojenizasyon işleminin protein interaksyonları üzerinde bir etkisi olmasaydı özellikle B örneği ile benzer pik profillerinin elde edilmesi gerekirdi. Deneme örnekleri arasındaki FTIR profilleri ayrımı PCA analizi ile daha net ortaya konulmuştur (Şekil 4.17). Gerek amit-I ve amit-II bölgelerindeki protein komponentleri profilleri gerekse lipit bölgesindeki (2800-3000  $\text{cm}^{-1}$ ) pikler incelendiğinde indirekt UHT uygulaması ile direkt UHT uygulaması arasında da farklılıkların olduğu görülmektedir. D ve F örnekleri ısı işlem sonrası homojenize edilen UHT süt örneklerini temsil etmektedir.

Bu iki örnek arasında hem 1600  $\text{cm}^{-1}$  hem de 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  spektral aralıkta gözlenen farklılıklar, ısı işlem uygulama modelinin süt bileşen interaksyonları için belirleyici olduğunu işaret etmektedir. Raman spektroskopisi moleküller arası (intermoleküler) ya da moleküller içi (intramoleküler) bağlarda deformasyona (stretching ya da bending) bağlı olarak ortaya çıkan vibrasyonel enerjinin ölçümüne dayalı hassas bir analitik yöntemdir (Li-Chan, 2007). Bu teknik, moleküllerin vibrasyonel parmak izinin



deformatif olmayan bir şekilde izlenmesine olanak veren bir tekniktir. Farklı UHT süt işleme teknolojilerinin ve homojenizasyon uygulama sıralarının UHT süt örnekleri üzerindeki olası etkileri Raman spektroskopisi tekniği ile takip edilmiştir. Süt tipik olarak Raman spektroskopisinde  $355-445\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısı dolaylarında laktozu temsil eden iki ana spektrum oluşturmaktadır (Mendes ve ark., 2016). Tez kapsamında bu spektral aralıkta çalışılan tüm örneklerde (pH4.6- çözünen fraksiyonlarında) iki pik varlığı tespit edilmiştir ancak pik yoğunluklarının UHT uygulanmış süt örneklerinde daha zayıf olduğu görülmüştür. Tüm süt örneklerinin pH4.6-çözünen fraksiyonlarında amit-II spektral bölgede ( $1235-1270\text{ cm}^{-1}$ ) piklerin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.20). Özellikle çiğ sütte daha belirgin olan pikler serum proteinlerinin (özellikle  $\beta$ -LG'nin)  $\beta$ -tabaka yapısı hakkında bilgi vermektedir. Isıl işlem uygulanmış örneklerde  $\beta$ -pilili yapıda kısmi zayıflamalar tespit edilmiştir. Bu zayıflamaların moleküller arası hidrojen bağlarının kırılması ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir.  $936\text{ cm}^{-1}$  spektral dalga sayısı proteinlerde  $\alpha$ -heliks yapı hakkında bilgi vermektedir. Çiğ süt (A) bu spektral dalda sayısında ısıl işlem uygulanmış örneklere oranla daha yoğun bir bant varlığına sahip bulunmuştur. Gerek  $936\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısı gerekse amit-III bölgesi ısı etkisi ile serum proteinlerinin hem  $\beta$ -pilili hem de  $\alpha$ -heliks yapılarında değişimler (zayıflamalar) meydana geldiğini göstermektedir ve bu durum serum proteinlerinin ısıl denatürasyonu ile açıklanmaktadır. Benzer bir profil C-H temsil bantları için de bulunmuştur ( $1453\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısı).

Tüm ısıl işlem görmüş süt örneklerinde C-H temsil piklerinin yoğunluğunun birbirleri ile benzer ancak çiğ süttten daha zayıf olduğu görülmüştür. A, B ve C örneklerinde  $-C-H$  ya da  $=C-H$  gerilme bölgelerinde ( $2880-2930\text{ cm}^{-1}$ ) görülen piklerin UHT uygulanan ve homojenize edilen D, E ve F örneklerine oranla daha büyük olduğu tespit edilmiştir. Taze süt örneklerinin pH4.6-çözünmeyen fraksiyonlarında ise  $1400-1500\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında (C-H eğilme ya da C-O gerilme) E örneğinde daha az olmakla birlikte tüm örneklerde pik yoğunluğunun olduğu görülmüştür  $1700-1750\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında tüm örneklerde pik varlığı tespit edilmiştir. Bu spektral aralık ester yapısındaki  $\nu(C=O)$  gerilmesini temsil etmektedir. Özellikle, UHT uygulanan ve homojenize edilen örneklerde bu bantların yoğunluğunun azalması yağ globül boyutundaki azalma ile ilişkilendirilmiştir.  $-C-H$  ya da  $=C-H$  gerilme bölgelerinde ( $2880-2930\text{ cm}^{-1}$ ) E örneği en düşük, B örneği ise en yüksek pik yoğunluğuna sahip örnekler olarak belirlenmiştir.

2857 ve 2899  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı yakınlarındaki bantlar sırasıyla simetrik ve asimetrik  $\nu(\text{C}-\text{H})$  gerilme vibrasyonunu temsil etmektedir (Mendes ve ark., 2016). Genel olarak örnekler arasında pik profilleri bakımından farklılıklar görülmemekle birlikte, pik yoğunluklarının ısı işlem uygulama modeline göre değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak tez kapsamında indirekt ısı işlem veya direkt ısı işlem yöntemlerinin proteinler üzerine etkisi, homojenizasyonun uygulanmasının veya ısı işleminden sonra ya da önce uygulanması durumunun proteinler üzerine etkisi, protein-yağ interaksiyonlarına etkisi incelenmiş olup, ATR-FTIR ve Raman spektroskopisi kullanılarak değerlendirilmesi sağlanmıştır. Homojenizasyonun uygulanıp uygulanmaması proteinler üzerine etki sağlarken, homojenizasyonun sırasının çok önemi olmadığı belirlenmiştir. Buna ek olarak homojenizasyon sırasından çok ısı işlem yönteminin proteinlerin ikincil yapısı üzerine etkisinin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca vibrasyonel (titreşimsel) yöntemler hızlı ve detaylı bilgi vermesi nedeniyle, ısı işlem proseslerinin ve diğer proses işlemlerin sütün yapısal değişimlerine olası etkilerinin izlenmesi/incelenmesi adına etkili olduğu ortaya konmuştur. Liyofilize halde toz/sıvı numuneler  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmakta olup. Gerek duyulduğunda tekrarlar/ölçümler alınabilecektir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abu-Khader, M.M.S, Plate Heat Exchangers, Recent advances, *Renew Sustain Energy Rev*, 16 (2012) 1883-91.
- Aernouts B., Polshin E., Saeys W., Lammertyn J., Mid Infrared Spectrometry of Milk of Dairy Metabolomics: A Comparison of Two Sampling Techniques and Effect of Homogenization, *Analytica Chimica Acta*, 705 (2011) 88-97.
- Akkerman, M., The Effect of Heating Processes on Milk Whey Protein Denaturation and Rennet Coagulation Properties, *Yüksek Lisans Tezi, Gıda Bilimleri Bölümü, Aarhus*, 2014.
- Alexander, L.J., Hayes, G, Pearse, M.J., Beattie, C.W., Stewart, A.F., Willis, I.M., Complete Sequence of the Bovine Beta-lactoglobulin cDNA, *Nucleic Acids Research*, 17 (1989) 6739.
- Alexandris, N., Gupta, S., Koutsias, N., Remote Sensing of Burned Areas via PCA, Part 1; Centering, Scaling and EVD vs SVD, *Open Geospatial Data Software and Standards*, 2 (2017) 17.
- Andrews, A.L., Atkinson, D., Elvans, M.T.A., Finer, E.G., Green, J.P., Philips, M.C., Robertson, R.N., Conformation and Aggregation of Bovine Beta- Casein-A.1. Molecular Aspects of Thermal Aggregation, *Biopolymers*, 18 (1979) 1105-1121.
- Anema S.,G., Heat-Induced Changes in Caseins and Casein Micelles, Including Interactions with Denatured Whey Proteins, *International Dairy Journal*, 122 (2021) 105136.
- Anema, S.G., Age Gelation, Sedimentation and Creaming in UHT Milk: A review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18 (2019) 140-66.
- Anonim, Advanced Preprocessing: Noise, Offset, and Baseline Filtering - Eigenvector Research Documentation  
[http://wiki.eigenvector.com/index.php?title=Advanced\\_Preprocessing:\\_Noise,\\_Offset,\\_and\\_Baseline\\_Filtering](http://wiki.eigenvector.com/index.php?title=Advanced_Preprocessing:_Noise,_Offset,_and_Baseline_Filtering) (Erişim Tarihi: 10 Nisan 2020).
- Anonim, Eigenvector Research Incorporated, <https://eigenvector.com/software/solo/> (Erişim Tarihi: 15 Ağustos 2020).
- AOAC, Official Methods of Analysis, 15th Ed.; Association of Official, 1990.
- Ardö, Y., Evaluating proteolysis by analysing the N content of cheese fractions, *Bulletin* 337, International Dairy Federation, Brussel, 4-9, 1999.
- Asakuma, S., Hatakeyma, E., Urashima, T., Yoshida, E., Katayama, T., Yamamoto, K., Physiology of Consumption of Human Milk Oligosaccharides by Infant Gut-associated Bifidobacteria, *Journal of Biological Chemistry*, 286 (2011) 34583-92.
- Barraquio, V.L., Which Milk is Fresh?, *International Journal of Dairy Processing & Research*, 1 (2014a) 1-6.

- Barth, A., Infrared Spectroscopy of Proteins, *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1767 (2007) 1073-101.
- Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P., Milk and dairy products, Food Chemistry, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Chapter 10, 2009.
- Bikker, J.F., Anema, S.G., Li, Y., Hill, J.P., Rheological Properties of Acid Gels Prepared From Heated Milk Fortified With Whey Protein Mixtures Containing the A, B and C Variants of  $\beta$ -lactoglobulin, *International Dairy Journal*, 10 (2000) 723-32.
- Bingham, E.,W., Farrell, H.M., Carroll, R.J., Properties of Dephosphorylated  $\alpha$ s1 – Casein: Precipitation by Calcium Ions and Micelle Formation, *Biochemistry*, 11 (1972) 2450-4.
- Boekel V.M., Niuwenhuijse, J.A., Walstra, P., The Heat Coagulation of Milk, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 43 (1989) 97-128.
- Bradley, R.L., Arnold, E., Barbano, D.M., Semerad, R.G., Smith, D.E., Vines, B.K., Chemical and physical methods, in: Marshall, T. (Ed.), *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, 16th ed. American Public Health Association, Washington, DC, 433–531, 1992.
- Brew, K., Castellino, F.J., Vanaman, T.C., Hill, R.L., The Complete Amino Acid Sequence of Bovine Alpha-lactalbumin, *Journal of Biological Chemistry*, 245 (1970) 4570-82.
- Brew, K.,  $\alpha$ -Lactalbumin, Proteins, *Advanced Dairy Chemistry*, MA: Springer US, Chapter 8, Boston, 387-419, 2003.
- Burton, H., Colour Changes in Heated and Unheated Milk:IV The Teoretical Background to The Reflectance Changes in Seperated Milk, *Journal of Dairy Research*, 22 (1955) 200-4.
- Burton, H., *Ultra High Temperature Processing of Milk*, NY: Springer Science Busines Media, New York, 1988.
- Byler, D.M., Susi, H., Examination of The Secondary Structure of Proteins By Deconvolved FTIR Spectra, *Biopolymers*, 25 (1986) 469-87.
- Bylund, G., *Dairy Processing Handbook*, Tetra Pak Process, Lund, 29-30, 1995.
- Caffin, J.P., Poutrel, B., Rainad, P., Physiological and Pathological Factors Influencing Bovine  $\alpha$ -Lactalbumin and  $\beta$ -Lactoglobulin Concentrations in Milk, *Journal of Dairy Science*, 68 (1985) 1087-94.
- Campell, M., *Heating Methods for Ultra-High Temperature Pasteurization*, Pick Heaters INC, 2013.
- Cho, Y., Singh, H., Creamer, L.K., Heat Induced Interactions of  $\beta$ -lactoglobulin A and  $\kappa$ -casein B in a Model System, *Journal of Dairy Research*, 70 (2003) 61-71.
- Choperena, A., Painter, P., Hdyrogen Bonding in Polymers: Effect of Temperature on the OH Streching Bands of Poly(vinlphenol), *Macromolecules*, 42 (2009) 6159-65.

- Chrysin, E.D., Brew, K., Acharya, K.R., Crystal Structures of Apo- and Holo-bovine  $\alpha$ -Lactalbumin at 2.2-Å Resolution Reveal an Effect of Calcium on Inter-lobe Interactions, *Journal of Biological Chemistry*, 275, (2000) 37021–9.
- Creamer, L.K., Richardson, T., Parry, D.A.D., Secondary Structure of Bovine  $\alpha$ S1- and  $\beta$ -Casein in Solution, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 211 (1981) 689-96.
- Curley, D.M., Kumosinski, T.F., Unruh, J.J., Farrell, H.M., Changes in the Secondary Structure of Bovine Casein by Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Effects of Calcium and Temperature, *Journal of Dairy Science*, 81 (1998) 3154–62.
- Dagleish, D.G., Parker, T.G., Binding of Calcium Ions to Bovine  $\alpha$ s1 -casein and Precipitability of The Protein–Calcium Ion Complexes, *Journal of Dairy Research*, 47 (1980) 113–22.
- Datta, N., Perkins, M., Deeth, H.C., Ultra-high-temperature (UHT) Treatment of Milk: Comparison of Direct and Indirect Modes of Heating, *Australian Journal of Dairy Technology*, 57 (2002) 211.
- De Kruif, C.G., Holt, C., Casein micelle structure, functions and interactions, *Advanced Dairy Chemistry; Proteins*, Boston, MA: Springer US, 233–76, 2003.
- de Wit, J.N., Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products, *Journal of Dairy Science*, 81 (1998) 597-608.
- Deeth, H.C., Datta, N., Ultra-high temperature treatment (UHT): heating systems, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Elsevier, 2011.
- Dissanayake, M., Vasiljevic, T., Functional Properties of Whey Proteins Affected by Heat Treatment and Hydrodynamic High-Pressure Shearing, *Journal of Dairy Science*, 92 (2009) 1387–97.
- Doi, H., Tokuyama, T., Kuo, F.H., Ibuki, F., Kanamori, M., Heat-induced Complex Formation Between  $\kappa$ -casein and  $\alpha$ -lactalbumin, *Agricultural and Biological Chemistry*, 47 (1983) 2817–24.
- Dufour, E., Mazerolles, G., Devaux, M., Duboz, G., Duployer, M., Mouhous Riou, N., Phase Transition of Triglycerides During Semi-Hard Cheese Ripening, *International Dairy Journal*, 10 (2000) 81–93.
- Dufour, E., Riaublanc, A., Potentiality of Spectroscopic Methods For The Characterisation of Dairy Products II. Mid Infrared Study of The Melting Temperature of Cream Triacylglycerols and Of The Solid Fat Content In Cream, *Lait*, 77 (1997) 671–81.
- Eriksson, L., Byrne, T., Johansson, E., Trygg, J., Vikström, C., Multi- and Megavariate Data Analysis : Basic Principles and Applications, Second Revised, Umetrics Academy, 2013.

- Etzion, Y., Linker, R., Cogan, U., Shmulevich, I., Determination Of Protein Concentration in Raw Milk by Mid-Infrared Fourier Transform Infrared/Attenuated Total Reflectance Spectroscopy, *Journal of Dairy Science*, 87 (2004) 2779–88.
- Evans, M.T.A., Phillips, M.C., Jones, M.N., The Conformation and Aggregation Of bovine  $\beta$ -casein A. II. Thermodynamics of Thermal Association and the Effects of Changes in Polar and Apolar Interactions on Micellization, *Biopolymers*, 18 (1979) 1123–40.
- Farrell, H.M., Cooke, P.H., Wickham, E.D.P., Hoagland, P.D., Environmental Influences of Bovine  $\kappa$ -casein: Reduction and Conversion to Fibrillar (amyloid) Structures, *Journal of Protein Chemistry*, 22 (2003) 259–73.
- Farrell, H.M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision, *Journal of Dairy Science*, 87 (2004) 1641–74.
- Farrell, H.M., Malin, E.L., Brown, E.M., Mora-Gutierrez, A., Review of the Chemistry of  $\alpha$ S2-Casein and The Generation of a Homologous Molecular Model to Explain Its Properties, *Journal of Dairy Science*, 92 (2009) 1338–53.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P.L.H., *Fundamentals of Cheese Science*, Second Edition, Springer, New York, 2000.
- Fox, P.F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P.L.H., O'Mahony, J.A., *Dairy Chemistry and Biochemistry*, Second Edition, Springer, 2016.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., Chemistry of milk constituents, *Fundamentals of Cheese Science*, Boston, MA: Springer US, 71–104, 2017.
- Fox, P.F., Kelly, A.L., Chemistry and biochemistry of milk constituents, *Food Biochemistry Food Process*, Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 442–64, 2012.
- Fox, P.F., Milk Proteins: General and historical aspects, *Advanced Dairy Chemistry: Proteins*, Boston, MA: Springer US, 1–48, 2003.
- Fox, P.F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P.L.H., O'Mahony, J.A., Fox, P.F., Uniacke-Lowe, T., Heat-induced changes in milk, *Dairy Chemistry Biochemistry*, Springer International Publishing, 345–75, 2015.
- García-Risco, M.R., Ramos, M., López-Fandio, R., Modifications in Milk Proteins Induced by Heat Treatment and Homogenization And Their Influence on Susceptibility to Proteolysis, *International Dairy Journal*, 12 (2002) 679–88.
- Garnier, J., Osguthorpe, D.J., Robson, B., Analysis Of The Accuracy and Implications Of Simple Methods For Predicting The Secondary Structure Of Globular Proteins, *Journal of Molecular Biology*, 120 (1978) 97–120.
- Gebhardt, R., Takeda, N., Kulozik, U., Doster, W., Structure and Stabilizing Interactions of Casein Micelles Probed by High-Pressure Light Scattering and FTIR, *Journal of Physical Chemistry B*, 115 (2011) 2349–59.

- Ginger, M.R., Grigor, M.R., Comparative Aspects Of Milk Caseins, *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 124 (1999) 133–45.
- Gök, S., Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy Of Fluid System: Case Study Application To Diagnosis And Screening In Biomedical And Food Areas, *Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara*, 2013.
- Granato, D., Santos, J.S., Escher, G.B., Ferreira, B.L., Maggio, R.M., Use of Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) for Multivariate Association Between Bioactive Compounds and Functional Properties in foods: A Critical Perspective, *Trends in Food Science and Technology*, 72 (2018) 83-90.
- Grewal, M.K., Chandrapala, J., Donkor, O., Apostolopoulos, V., Stojanovska, L., Vasiljevic, T., Fourier Transform Infrared Spectroscopy Analysis of Physicochemical Changes in UHT Milk During Accelerated Storage, *International Dairy Journal*, 66 (2017) 99–107.
- Griffiths, M.W., *Milk Production and Processing*, CRC Press, 2010.
- Grimley, H., Grandison, A., Lewis, M., Changes In Milk Composition and Processing Properties During The Spring Flush Period, *Dairy Science Technology*, 89 (2009) 405–16.
- Gutierrez, C.G.C.C., Dias, E.F.T.S., Gut, J.A.W., Investigation Of The Residence Time Distribution in a Plate Heat Exchanger With Series and Parallel Arrangements Using a Non-ideal Tracer Detection Technique, *Applied Thermal Engineering*, 31 (2011) 1725–33.
- Harty-Major, S., Investigation Of The Chemistry of 1-hydroxyacetone By Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Yüksek Lisans Tezi, Gıda Bilimi ve Tarım Kimyası Bölümü, Kanada*, 1997.
- Havea, P., Singh, H., Creamer, L.K., Characterization Of Heat-induced Aggregates of  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin and Bovine Serum Albumin in a Whey Protein Concentrate Environment, *Journal of Dairy Research*, 68 (2001) 483–97.
- Heck, J.M.L., van Valenberg, H.J.F., Dijkstra, J., van Hooijdonk, A.C.M., Seasonal Variation in the Dutch Bovine Raw Milk Composition, *Journal of Dairy Science*, 92 (2009) 4745–55.
- Herskovits, T.T., On the Conformation of Caseins. Optical Rotatory Properties, *Biochemistry*, 5 (1966) 1018–26.
- Holland, J.W., Gupta, R., Deeth, H.C., Alewood, P.F., Proteomic Analysis of Temperature-Dependent Changes in Stored UHT Milk, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 59 (2011) 1837–46.
- Hollar, C.M., Parris, N., Hsieh, A., Cockley, K.D., Factors Affecting the Denaturation and Aggregation of Whey Proteins in Heated Whey Protein Concentrate Mixtures, *Journal of Dairy Science*, 78 (1995) 260–7.

- Hostettler, H., Lang, K., Czok, G., Fricker, A., Griem, W., Imhof, K., über den Einfluß der Wärmebehandlung auf die Eiweißstoffe der Milch, mit Besonderer Berücksichtigung der bei der Uperisation® Angewandten Thermik, Zeitschrift für Ernährungswissenschaft., Journal of nutritional sciences, 6 (1965) 25–35.
- Howell, N.K., Arteaga, G., Nakai, S., Li-Chan, E.C., Raman Spectral Analysis in The C-H Stretching Region of Proteins and Amino Acids For Investigation of Hydrophobic Interactions, Journal of Agricultural Food Chemistry, 47 (1999) 924–33.
- Huppertz, T., Chemistry of the caseins, Advanced Dairy Chemistry, Boston, MA: Springer US, 135–60, 2013.
- Ikeda, S., Heat-induced Gelation Of Whey Proteins Observed By Rheology Atomic Force Microscopy and Raman Scattering Spectroscopy, Food Hydrocoll, 17 (2003) 399–406.
- Iñón, F.A., Garrigues, S., de la Guardia, M., Nutritional Parameters of Commercially Available Milk Samples by FTIR and Chemometric Techniques, Analytica Chimica Acta, 516 (2004) 401–12.
- IDF, Milk: Determination of the nitrogen (Kjeldahl method) and calculation of the crude protein content, IDF Standard 20B, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, 1993.
- IDF, Milk and heat-treated milk: Determination of acid soluble  $\beta$ -lactoglobulin, Reversed-phase HPLC method, IDF Standard 178A, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, 1999.
- Ionita, I., Schiopu, D., Using Principal Component Analysis in Loan Granting, Bull PG University Ploiesti, 62 (2010) 88-96.
- Jakob, E., Puhan, Z., Technological Properties Of Milk As Influenced By Genetic Polymorphism Of Milk Proteins — A review, International Dairy Journal, 2 (1992) 157–78.
- Jensen, H.B., Poulsen, N.A., Møller, H.S., Stensballe, A., Larsen, L.B., Comparative Proteomic Analysis Of Casein and Whey As Prepared By Chymosin-induced Separation, Isoelectric Precipitation or Ultracentrifugation. Journal of Dairy Research, 79 (2012) 451–8.
- Karoui, R., Mazerolles, G., Dufour, É., Spectroscopic Techniques Coupled With Chemometric Tools For Structure and Texture Determinations in Dairy Products, International Dairy Journal, 13 (2003) 607–20.
- Kaur, M., Chandrapala, J., Donkor, O., Apostolopoulos, V., Fourier Transform Infrared Spectroscopy Analysis of Physicochemical Changes in UHT Milk During Accelerated Storage, International Dairy Journal, 66 (2017) 99–107.
- Kelly, A. L., Foley, J., Proteolysis and Storage Stability of UHT Milk as Influenced by Milk Plasmin Activity, Plasmin/beta-lactoglobulin Complexation, Plasminogen Activation and Somatic Cell Count, International Dairy Journal, 7 (1997) 411-420.



- Kelleher, C.M., O'Mahony, J.A., Kelly, A.L., O'Callaghan, D.J., Kilcawley, K.N., McCarthy, N.A., The Effect Of Direct and Indirect Heat Treatment On The Attributes Of Whey Protein Beverages, *International Dairy Journal*, 85 (2018) 144–52.
- Kher, A., Udabage, P., McKinnon, I., McNaughton, D., Augustin, M.A., FTIR Investigation of Spray-Dried Milk Protein Concentrate Powders, *Vibrational Spectroscopy*, 44 (2007) 375–81.
- Kilic-Akyilmaz, M., Ozer, B., Bulat, T., Topcu, A., Effect Of Heat Treatment On Micronutrients, Fatty Acids and Some Bioactive Components Of Milk, *International Dairy Journal*, 126 (2022) 105231.
- Kontopidis, G., Holt, C., Sawyer, L., Invited Review:  $\beta$ -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function, *Journal of Dairy Science* , 87 (2004) 785–96.
- Krimm, S., Bandekar, J., Vibrational Spectroscopy and Conformation Of Peptides, Polypeptides and Proteins, *Advanced Protein Chemistry*, 38 (1986) 181–364.
- Law, A.J.R., Leaver, J., Effect of pH on the Thermal Denaturation of Whey Proteins in Milk, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (2000) 672–9.
- Lewis, M.J., Deeth, H.C., Heat Treatment of Milk, *Milk Process*, Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 168–204, 2008.
- Li H., Li H., Yu, J., Effect of Heat Treatment on the Property, Structure, and Aggregation of Skim Milk Proteins, *Frontiers in Nutrition*, 8 (2021) 1–8.
- Li, C., *Infrared Spectroscopy : A Tool For Protein Characterization*, Yüksek Lisans Tezi, Biokimya ve Biofizik Bölümü, Stokholm, 2016.
- Li-Chan, E., Nakai, S., Hirotzuka, M., Raman spectroscopy as a probe of protein structure in food systems, *Protein Struct Relationships Foods*, Boston, MA: Springer US, 163–97, 1994.
- Li-Chan, E.C.Y., *Vibrational Spectroscopy Applied To The Study Of Milk Proteins*, *Lait*, 87 (2007) 443–58.
- Li-Chan, E.Y.C., *Raman Spectroscopy In Food Science*, *Trends Food Science Technology*, 71 (1996) 361–70.
- Lin, V.J.C., Koenig, J.L., Raman Studies of Bovine Serum Albumin, *Biopolymers*, 15 (1976) 203–18.
- Linklater, P.M., Hall, R.J., Effect Of Heat Induced Interaction Between  $\beta$ -Lactoglobulin and k-Casein On Syneresis, *Journal of Dairy Research*, 52 (1985) 159–65.
- Liu, H., Grosvenor, A.J., Li, X., Wang, X.,lu, Ma, Y., Clerens, S., Changes in Milk Protein Interactions and Associated Molecular Modification Resulting from Thermal Treatments and Storage, *Journal of Food Science*, 84 (2019) 1737–45.

- Lombardi-Boccia, G., Aguzzi, A., Cappelloni, M., Di Lullo, G., Lucarini, M., Total-Diet Study: Dietary Intakes of Macro Elements and Trace Elements in Italy, *British Journal of Nutrition*, 90 (2003) 1117–21.
- Lorenzen, P.C., Clawin- Radecker, I., Einhoff, K., Hsmmer, P., Hartmann, R., Hoffmann, W., A Survey of the Quality of Extended Shelf Life (ESL) Milk in Relation to HTST and UHT Milk, *International Journal Dairy Technology*, 64 (2011) 166–78.
- Lucey, J.A., Fox, P.F., Importance of Calcium and Phosphate in Cheese Manufacture: A Review, *Journal of Dairy Science*, 76 (1993) 1714–24.
- Luinge, H.J., Hop, E., Lutz, E.T.G., van Hemert, J.A., de Jong, E.A.M., Determination Of The Fat, Protein and Lactose Content Of Milk Using Fourier Transform Infrared Spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 284 (1993) 419–33.
- Malacarne, M., Franceschi, P., Formaggioni, P., Sandri, S., Mariani, P., Summer, A., Influence Of Micellar Calcium and Phosphorus On Rennet Coagulation Properties of Cows Milk, *Jorunal of Dairy Research*, 81 (2014) 129–36.
- Malin, E.L., Brown, E.M., Wickham, E.D., Farrell, H.M., Contributions of Terminal Peptides to the Associative Behavior of  $\alpha$ s1-Casein, *Jorunal of Dairy Science*, 88 (2005) 2318–28.
- Manderson, G.A., Hardman, M.J., Creamer, L.K., Effect Of Heat Treatment On Bovine Beta-lactoglobulin A, B, and C Explored Using Thiol Availability and Fluorescence, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (1999) 3617–27.
- Manji, B., Kakuda, Y., Arnott, D.R., Effect Of Storage Temperature on Age Gelation of Ultra-High Temperature Milk Processed by Direct and Indirect Heating Systems, *Jorunal of Dairy Science*, 69 (1986) 2994–3001.
- Markoska, T., Huppertz, T., Grewal, M.K., Vasiljevic, T., Structural Changes of Milk Proteins During Heating of Concentrated Skim Milk Determined Using FTIR, *International Dairy Journal*, 89 (2019) 21–30.
- Mazerolles, G., Devaux, M.F., Duboz, G., Duployer, M.H., Mouhous Riou, N., Infrared and Fluorescence Spectroscopy For Monitoring Protein Structure and Interaction Changes During Cheese Ripening, *Lait*, 81 (2001) 509–27.
- Mendelsohn, R., Flach, C.R., Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy of Lipids, Peptides, and Proteins in Aqueous Monolayers, *Current Topics in Membranes*, 52 (2002) 57–88.
- Mendelsohn, R., Mao, G., Flach, C.R., Infrared Reflection–Absorption Spectroscopy: Principles and Applications To Lipid–Protein Interaction in Langmuir Films, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1798 (2010) 788–800.
- Mendes, T.O., Junqueira, G.M.A., Porto, B.L.S., Brito, C.D., Sato, F., de Oliveira, M.A.L., Vibrational Spectroscopy For Milk Fat Quantification: Line Shape Analysis of the Raman and Infrared Spectra, *Jorunal of Raman Spectroscopy*, 47 (2016) 692–8.

- Mercier, J.C., Grosclaude, F., Ribadeau-Dumas, B., Structure Primaire de la Caseine Alphas<sub>1</sub>-bovine, Sequence Complete, *European Journal of Biochemistry*, 23 (1971) 41–51.
- Michael-Byler, D., Farrell, H.M., Susi, H., Raman Spectroscopic Study of Casein Structure, *Journal of Dairy Science*, 71 (1988) 2622–9.
- Miranda, G., Pelissier, J.P., Kinetic Studies of In Vivo Digestion of Bovine Unheated Skim-milk Proteins In The Rat Stomach, *Journal Dairy Research*, 50 (1983) 27–36.
- Moore, J.C., DeVries, J.W., Lipp, M., Griffiths, J.C., Abernethy, D.R., Total Protein Methods and Their Potential Utility to Reduce the Risk of Food Protein Adulteration, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9 (2010) 330–57.
- Morales, F.J., Romero, C., Jiménez-Pérez, S., Characterization Of Industrial Processed Milk By Analysis Of Heat-induced Changes, *International Journal of Food Science & Technology*, 35 (2000) 193–200.
- Murphy, E.G., Fenelon, M.A., Roos, Y.H., Hogan, S.A., Decoupling Macronutrient Interactions During Heating of Model Infant Milk Formulas, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (2014) 10585–93.
- Ngarize, S., Herman, H., Adams, A., Howell, N., Comparison of Changes in the Secondary Structure of Unheated, Heated, and High-Pressure-Treated  $\beta$ -Lactoglobulin and Ovalbumin Proteins Using Fourier Transform Raman Spectroscopy and Self-Deconvolution, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (2004) 6470–7.
- Nicolet, T., All, C., Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry, Thermo Nicolet Corporation, 2001.
- Oldfield, D.J., Singh, H., Taylor, M.W., Pearce, K.N., Kinetics of Denaturation and Aggregation of Whey Proteins in Skim Milk Heated in an Ultra-high Temperature (UHT) Pilot Plant, *International Dairy Journal*, 8 (1998) 311–8.
- Ono, T., Yahagi, M., Odagiri, S., The Binding Of Calcium To  $\kappa$ -casein and Para -  $\kappa$  - casein, *Agricultural and Biological Chemistry*, 44 (1980) 1499–503.
- Ozer, B., Atasoy, F., Akin, S., Some Properties of Urfa Cheese (A Traditional White-Brined Turkish Cheese) Produced From Bovine and Ovine Milks, *International Journal of Dairy Technology*, 55 (2002) 94–9.
- Ozer, B.H., Robinson, R.K., Grandison, A.S., Bell, A.E., Comparison Of Techniques For Measuring The Rheological Properties Of Labneh (Concentrated Yogurt), *International Journal of Dairy Technology*, 50 (1997) 129–33.
- Özer, B., Konsantre Yoğurt Jeli Oluşumunda Etkili Faktörler, I. SH/S-S Tiol/Disülfit Aradeğişim Reaksiyonlarının Rolü, *Gıda*, 26 (2001) 353–8.
- Patton, S., Browning and Associated Changes in Milk and Its Products: A Review, *Journal of Dairy Science*, 38 (1955) 457–78.

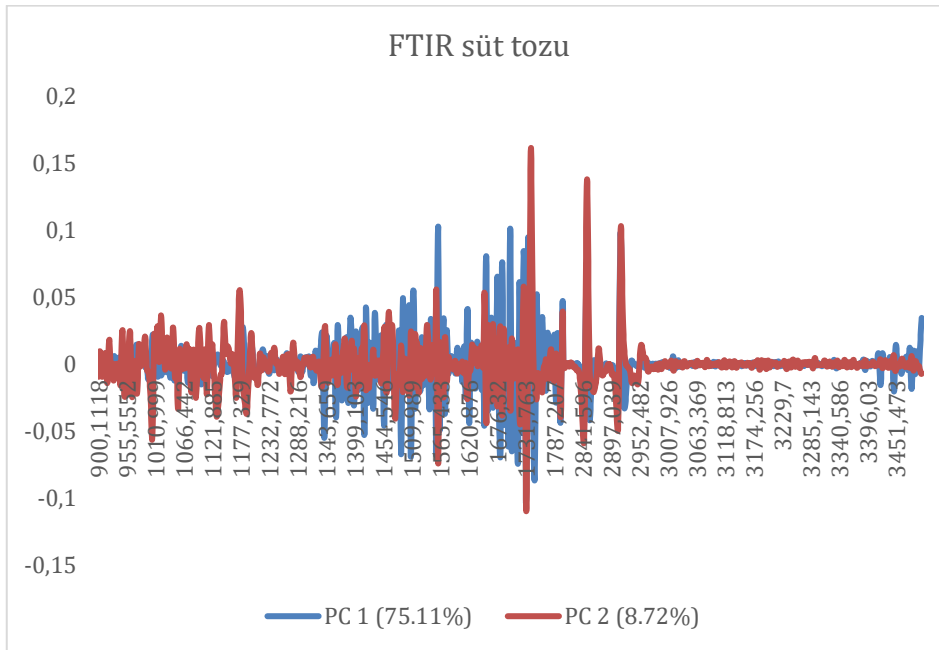
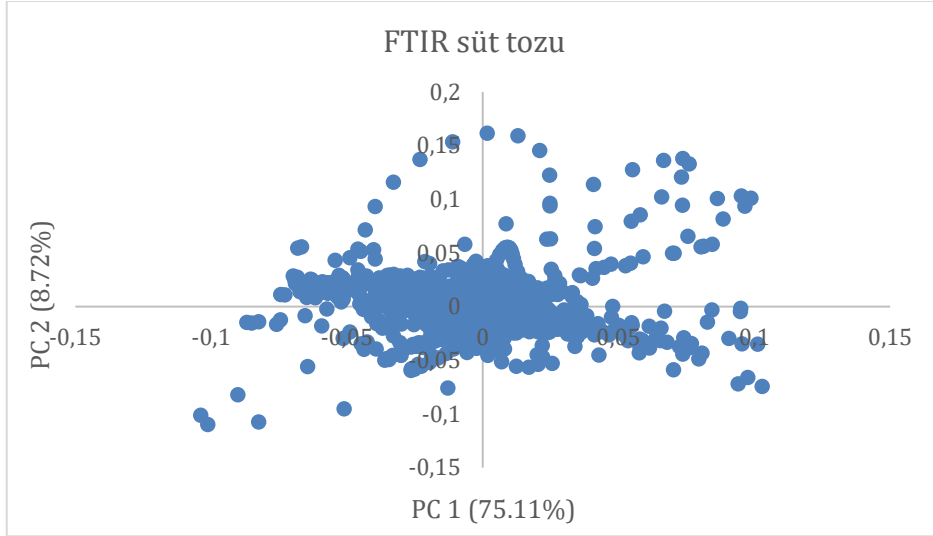
- Payens, T.A., Van Markwijk, B., Some Features Of the Association of  $\beta$ -casein, *Biochimica et Biophysica Acta*, 71 (1963) 517–30.
- Peng, L., Han, G., Landjobo Pagou, A., Shu, J., Electric Submersible Pump Broken Shaft Fault Diagnosis Based On Principal Component Analysis, *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 191 (2020) 107154.
- Pérez, M.D., Calvo, M., Interaction of  $\beta$ -Lactoglobulin with Retinol and Fatty Acids and Its Role as a Possible Biological Function for This Protein: A Review, *Journal of Dairy Science*, 78 (1995) 978–88.
- Piraino, P., Parente, E., McSweeney, P.L.H., Processing of Chromatographic Data for Chemometric Analysis of Peptides Profiles From Cheese Extracts: A novel Approach., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (2004) 6904–691.
- 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 (2015) 2884–97.
- Qi, P.X., Wickham, E.D., Farrell Jr, H.M., Thermal and Alkaline Denaturation of Bovine  $\beta$ -Casein, *The Protein Journal*, 23 (2004) 389–402.
- Qi, X.L., Holt, C., McNulty, D., Clarke, D.T., Brownlow, S., Jones, G.R., Effect of Temperature on the Secondary Structure of Beta-lactoglobulin at pH 6.7, as Determined by CD and IR Spectroscopy: A Test of the Molten Globule Hypothesis, *Biochemical Journal*, 324 (1997) 341–6.
- Reiner, J., Protte, K., Hinrichs, J., Investigation of the Applicability of Raman Spectroscopy as Online Process Control During Consumer Milk Production, *Chemical Engineering*, 4 (2020) 1–16.
- Richardson, P., Philip, S., *Thermal Technologies in Food Processing*, CRC Press, Woodhead Publishing Ltd, New York, 2001
- Robitaille, G., Ayers, C., Effects of  $\kappa$ -casein Glycosylation on Heat Stability of Milk, *Food Research International*, 28 (1995) 17–21.
- Sankaram, M.B., Marsh, D., Protein-lipid Interactions With Peripheral Membrane Proteins, *New Comprehensive Biochemistry*, 25 (1993) 127–62.
- Schaafsma, G., Advantages and Limitations of the Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score (PDCAAS) as a Method for Evaluating Protein Quality in Human Diets, *British Journal of Nutrition*, 108 (2012) 333–6.
- Schokker, E.P., Singh, H., Pinder, D.N., Norris, G.E., Creamer, L.K., Characterization of Intermediates Formed During Heat-Induced Aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin AB at Neutral pH, *International Dairy Journal*, 9 (1999) 791–800.
- Schwaighofer, A., Alcaráz, M.R., Kuligowski, J., Lendl, B., Recent Advancements of EC-QCL Based Mid-IR Transmission Spectroscopy of Proteins and Application to Analysis of Bovine Milk1, *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, 7 (2018) 35–45.

- Sharma, S.K., Dalgleish, D.G., Effect of Heat Treatments on the Incorporation of Milk Serum Proteins Into the Fat Globule Membrane of Homogenized Milk, *Journal of Dairy Research*, 61 (1994) 375–84.
- Shimada, K., Cheftel, J.C., Sulfhydryl Group/Disulfide Bond Interchange Reactions During Heat-Induced Gelation of Whey Protein Isolate, *Journal Agricultural Food Chemistry*, 37 (1989) 161-8
- Singh, H., Fox, P.F., Heat Stability of Milk: Role of  $\beta$ -lactoglobulin in the pH-Dependent Dissociation of Micellar K-casein, *Journal of Dairy Research*, 54 (1987) 509–21.
- Singh, H., Havea, P., Thermal denaturation, aggregation and gelation of whey proteins, *Advanced Dairy Chemistry-Proteins*, MA: Springer US, Boston, 1261-87, 2003.
- Spiro, T.G., Gaber, B.P., Laser Raman Scattering as a Probe of Protein Structure, *Annual Review of Biochemistry*, 46 (1977) 553–70.
- Subramanian, A., Prabhakar, V., Rodriguez-Saona, L., Analytical Methods: Infrared Spectroscopy in Dairy Analysis, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Second Edition, 115-24, 2011.
- Sun, D., *Modern Techniques for Food Authentication*, Elsevier, 2008.
- Swaigood, H.E., Brunner, J.R., Lillevik, H.A., Physical Parameters of K -Casein from Cow's Milk, *Biochemistry* 3 (1964) 1616–23.
- Swaigood, H.E., Chemistry of the caseins, *Advanced Dairy Chemistry-Proteins*, MA: Springer US, Boston, 139-201, 2003.
- Syme, C.D., Blanch, E.W., Holt, C., Jakes, R., Goedert, M., Hecht, L., A Raman Optical Activity Study of Rheomorphism in Caseins, Synucleins and tau, *European Journal of Biochemistry*, 269 (2002) 148–56.
- Temiz, H.T., *Kemometrik Yaklaşımlarla Gıda Tağışlarının Belirlenmesinde Spektroskopik Yöntemlerin Kullanılması*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2019.
- Tolkach, A., Kulozik, U., Effect of pH and Temperature on the Reaction Kinetic Parameters of the Thermal Denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin, *Milchwissenschaft*, 60 (2005) 249-252.
- Toma, S.J., Nakai, S., Calcium Sensitivity and Molecular Weight of  $\alpha$ s5-Casein, *Journal of Dairy Science*, 56 (1973) 1559–62.
- TSE, Çiğ süt standardı (TS-1018), Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, 1994.
- TSE, Uzun ömürlü süt standardı (TS-1192), Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, 2001.
- Uapanese, A., Reviews, T., Microflora, B., Lacto-neotrehalose, N., *Raman Spectroscopy in Food Science*, 7 (1996) 216–21.
- Urgu, M., Saatli, T.E., Türk, A., Koca, N., Isıl İşlem Görmüş İçme Sütlerinde (Pastörize, UHT ve Laktozsuz UHT Süt) Hidroksimetilfurfural İçeriğinin Belirlenmesi, *Akad Gıda*, 15 (2017) 249–55.

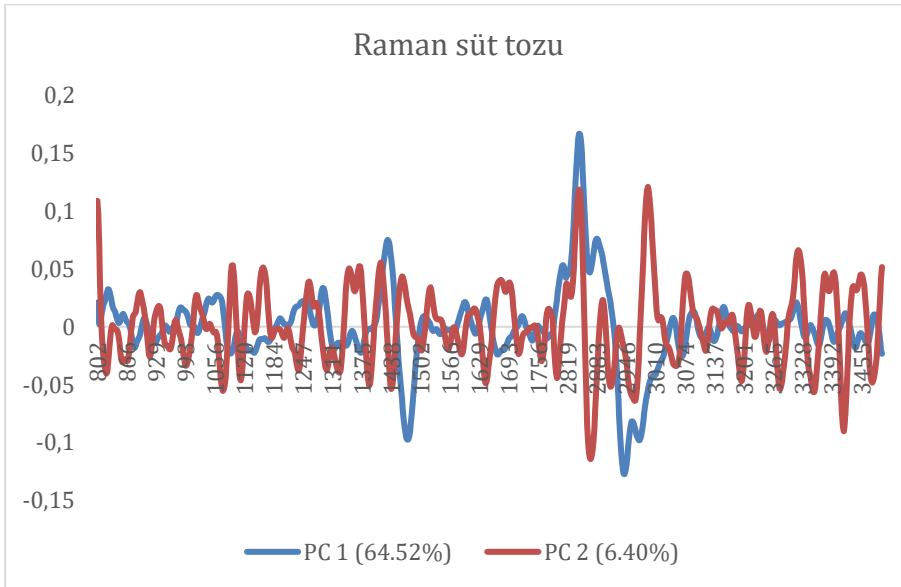
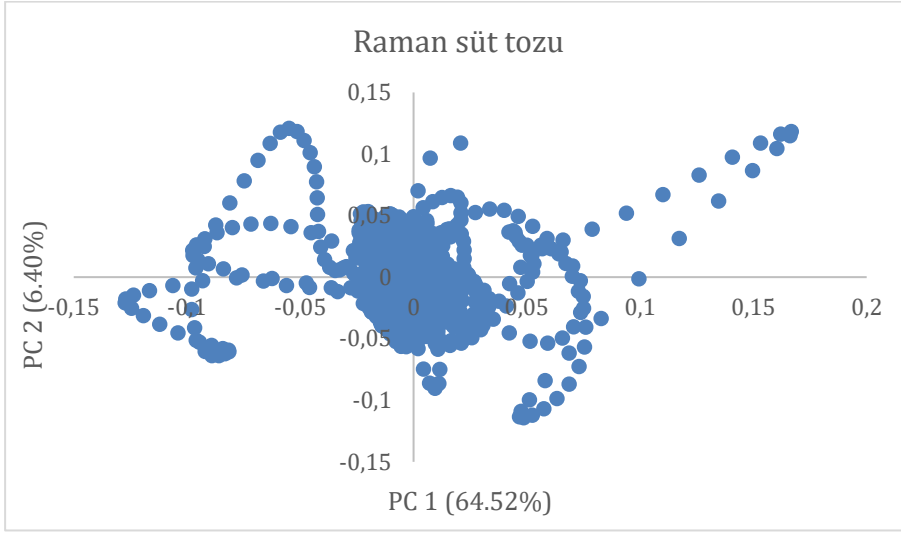
- Van-Boekel, M.A.J., Walstra, P., Stability of Oil in Water Emulsions of Oil-in-Water Emulsions With Crystals In The Disperse Phase, *Colloidals Surface*, 3 (1981) 109-118.
- Vélez-Ruiz, J.F., Fouling of Heat Exchangers in the Food Industry, *Journal of Food Process Engineering*, 1777 (2009) 155–78.
- Vreeman, H.J., Visser, S., Slangen, C.J., Van Riel, J.A., Characterization of Bovine  $\kappa$ -casein Fractions and the Kinetics of Chymosin-Induced Macropeptide Release From Carbohydrate-free and Carbohydrate-Containing Fractions Determined by High-Performance Gel-Permeation Chromatography, *Biochemical Journal*, 240 (1986) 87-97.
- Wada, Y., Lönnnerdal, B., Effects of Different Industrial Heating Processes of Milk on Site-Specific Protein Modifications and Their Relationship to in Vitro and in Vivo Digestibility, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 62 (2014) 4175–85.
- Walstra, P., Casein Sub-micelles: Do They Exist?, *International Dairy Journal*, 9 (1999) 189–92.
- Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J., *Dairy Science and Technology*, CRC/Taylor & Francis, 2006.
- Wang, F., Liu, A.P., Ren, F.Z., Zhang, X.Y., Clark, S., Zhang, L.D., FTIR Analysis of Protein Secondary Structure in Cheddar Cheese During Ripening, *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi/Spectroscopy and Spectral Analysis*, 31 (2011) 1786–9.
- Wong, D.W.S., Camirand, W.M., Pavlath, A.E., Parris, N., Friedman, M., Structures and Functionalities of Milk Proteins, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36 (1996) 807.
- Xiong, Y.L., Influence of pH and Ionic Environment on Thermal Aggregation of Whey Proteins, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 40 (1992) 380–4.
- Yazar, I., Yavuz, H.S., Çay, M.A., Temel Bileşen Analizi Yönteminin ve Bazı Klasik ve Robust Uyarlamalarının Yüz Tanıma Uygulamaları, *Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Mühendislik Mimar Fakültesi Dergisi*, 22 (2009).
- Ye, A., Cui, J., Dalgleish, D., Singh, H., Effect of Homogenization and Heat Treatment on the Behavior of Protein and Fat Globules During Gastric Digestion of Milk, *Journal of Dairy Science*, 100 (2017) 36–47.
- Yu, T.J., Lippert, J.L., Peticolas, W.L., Laser Raman Studies of Conformational Variations of Poly-L-lysine, *Biopolymers*, 12 (1973) 2161–76.
- Zhou, Q., Sun, S.Q., Yu, L., Xu, C.H., Zhang, X.R., Sequential Changes of Main Components in Different Kinds of Milk Powders Using Two-Dimensional Infrared Correlation Analysis, *Journal of Molecular Structure*, 799 (2006) 77–84.

## EKLER

**EK 1.1.** Süt tozu örneğine ait ATR-FTIR sonuçlarının temel bileşim analizi loading grafikleri

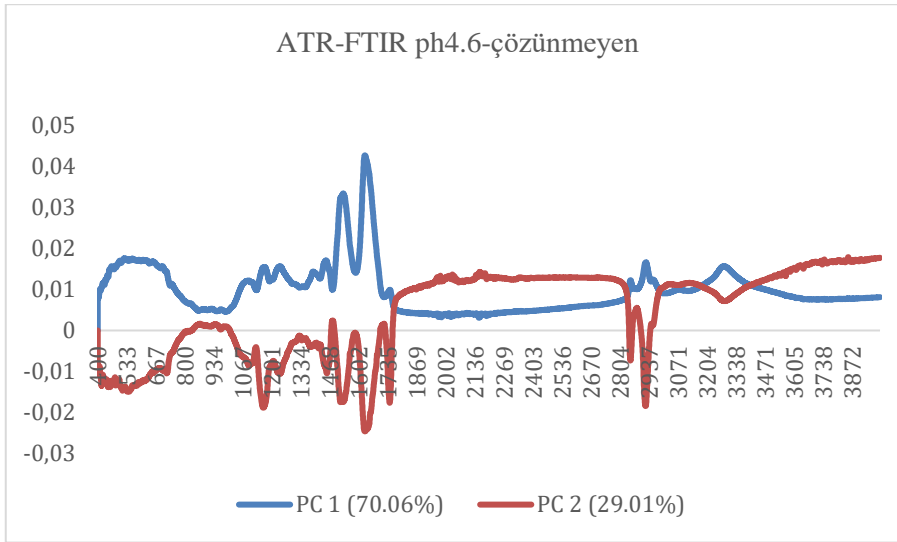
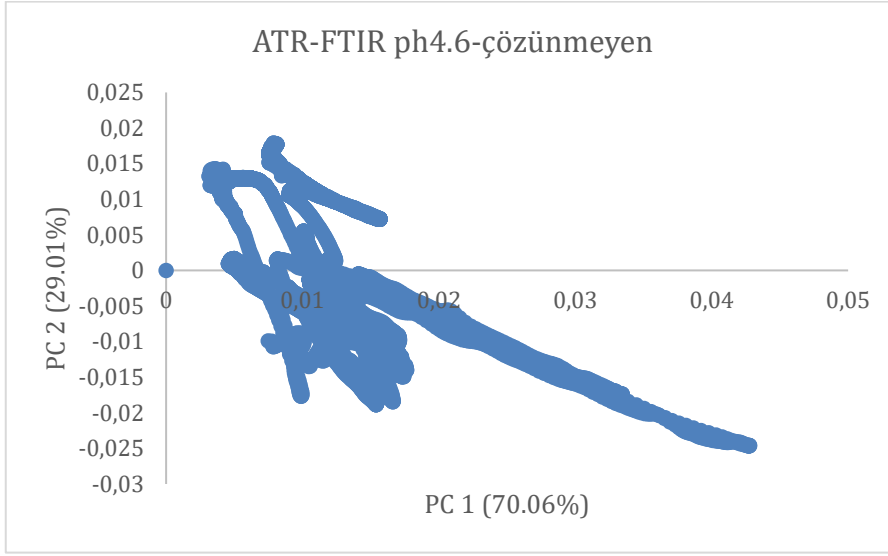


**EK 1.2.** Süt tozu örneğine ait FT-Raman sonuçlarının temel bileşim analizi loading grafikleri

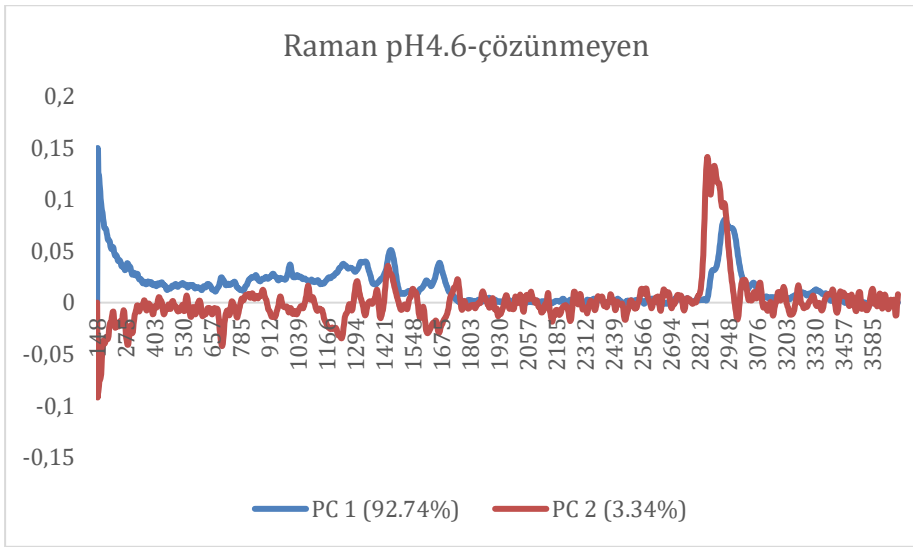
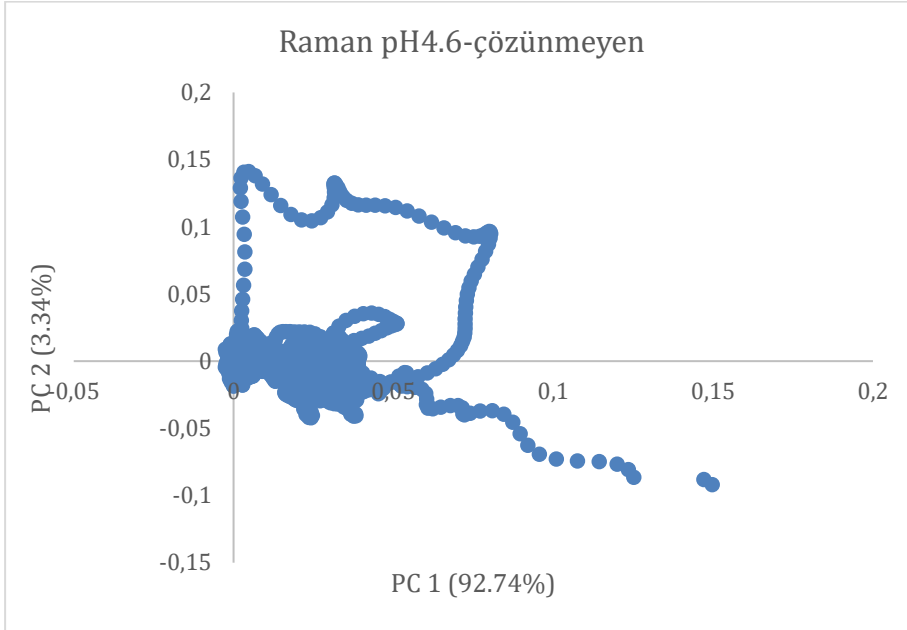




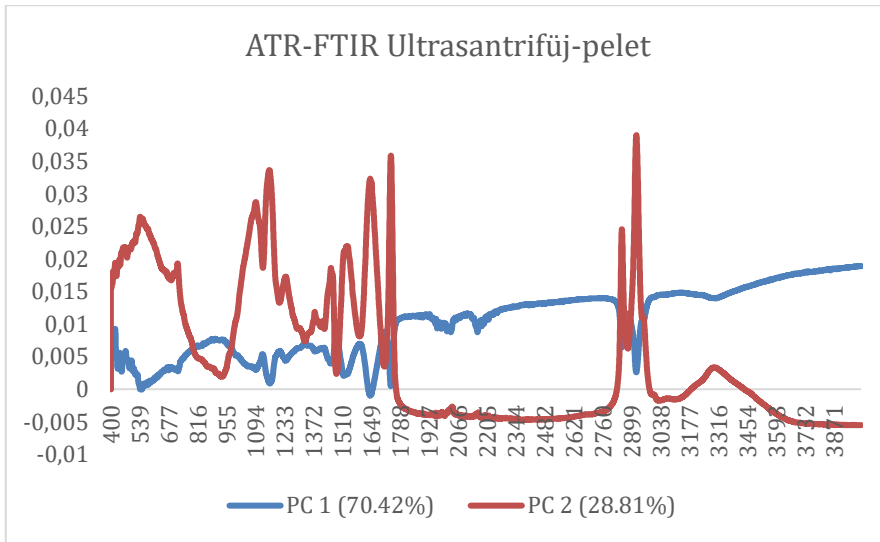
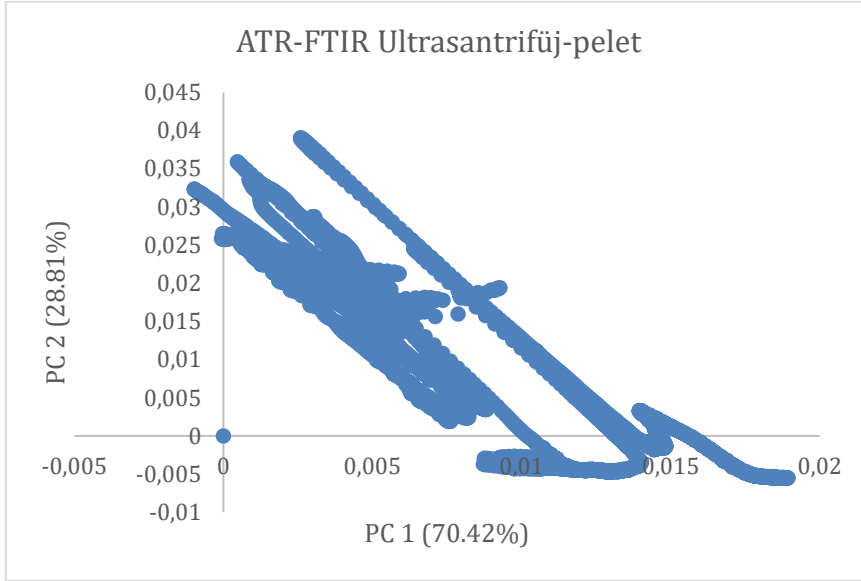
**EK 1.3.** Süt örneklerinin pH4.6-çözünmeyen fraksiyonuna ait ATR-FTIR sonuçlarının temel bileşim analizi loading grafikleri



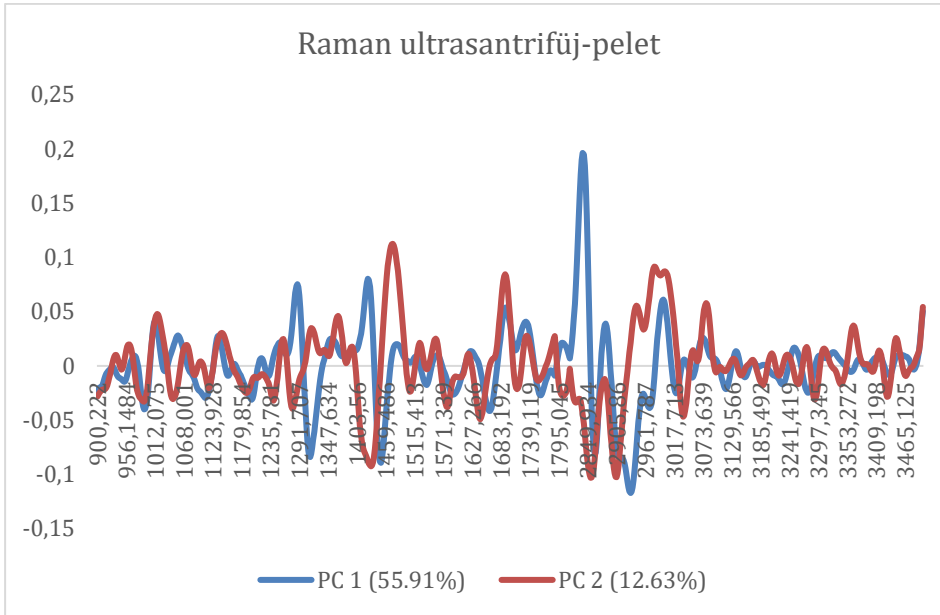
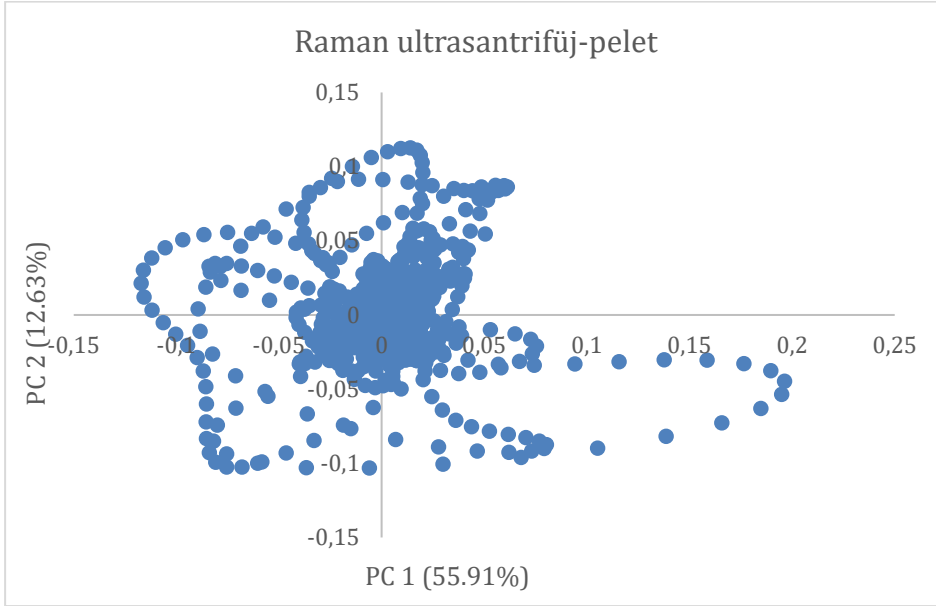
**EK 1.4.** Süt örneklerinin pH4.6-çözünmeyen fraksiyonuna ait FT-Raman sonuçlarının temel bileşim analizi loading grafikleri



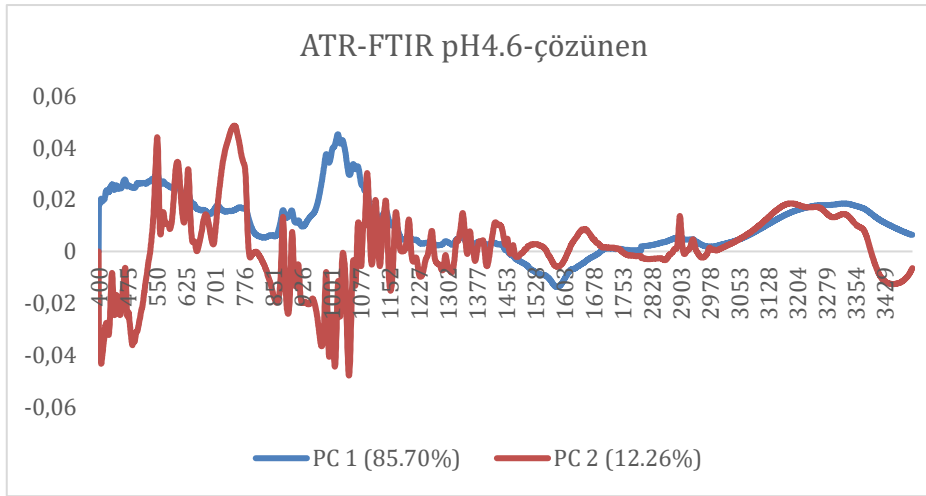
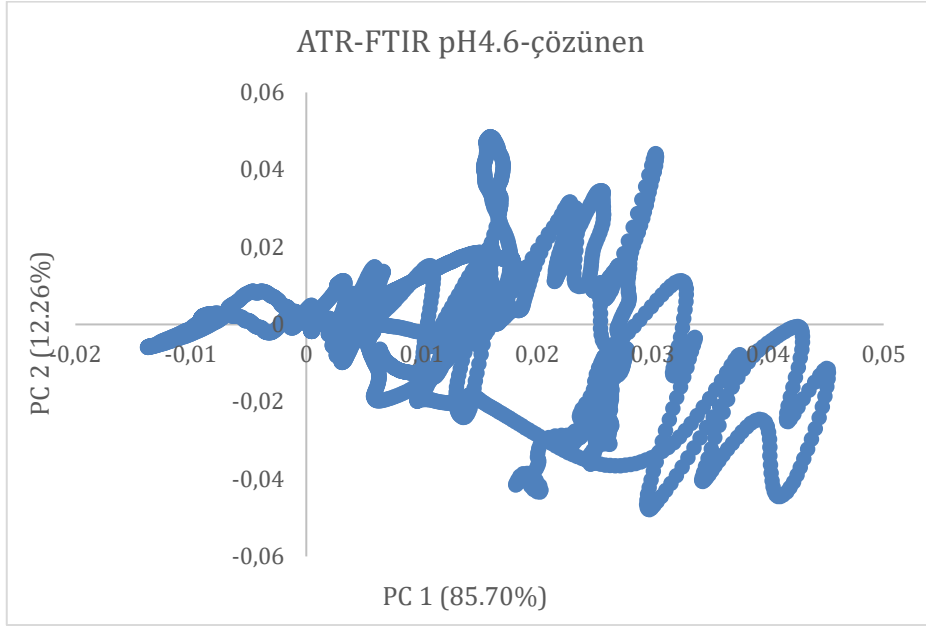
**EK 1.5.** Süt örneklerinin ultrasantrifüjü sonucu oluşan pelete ait ATR-FTIR sonuçlarının temel bileşim analizi loading grafikleri



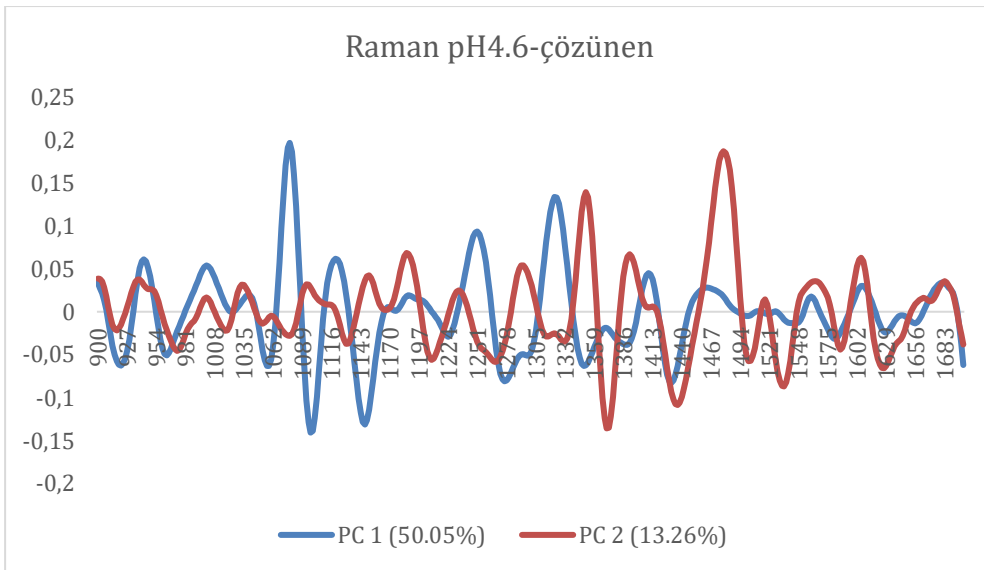
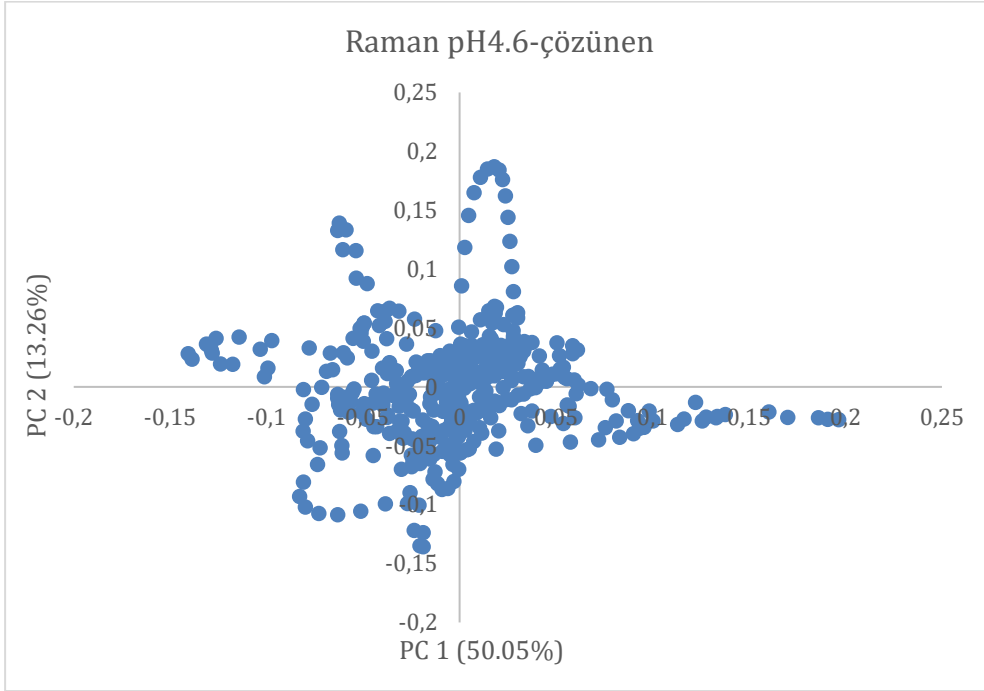
**EK 1.6.** Süt örneklerinin ultrasantrifüjü sonucu oluşan pelete ait FT-Raman sonuçlarının temel bileşim analizi loading grafikleri



**EK 1.7.** Süt örneklerinin pH4.6-çözünen fraksiyonuna ait ATR-FTIR sonuçlarının temel bileşim analizi loading grafikleri



**EK 1.8.** Süt örneklerinin pH4.6-çözünen fraksiyonuna ait FT-Raman sonuçlarının temel bileşim analizi loading grafikleri



## **EK 2. Tez Çalışması Orjinallik Raporu**

Şablona uygun olarak hazırlanan “Orjinallik Raporu”nun imzalı hali bu bölümde verilmelidir.







