

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİKRODALGA VE ULTRASES UYGULAMALARININ PEYNİRDE
BULUNAN AZOTLU MADDELERİN EKSTRAKSİYONU ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pınar Özge ASLAN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Didem ŞAHİNGİL

OCAK 2025

**T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİKRODALGA VE ULTRASES UYGULAMALARININ PEYNİRDE
BULUNAN AZOTLU MADDELERİN EKSTRAKSİYONU ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Pınar Özge ASLAN
(36203620007)**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Didem ŞAHİNGİL

OCAK 2025

TEŞEKKÜRLER VE ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının her aşamasında yardım, öneri, bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgemedi beni her konuda yönlendiren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Didem ŞAHİNGİL'e,

Tezimi değerlendirerek olumlu katkılarda bulunan jüri üyesi hocalarım Prof. Dr. A. Adnan HAYALOĞLU'na ve Dr. Öğretim Üyesi Nurullah DEMİR'e,

Analizlerim süresince desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Şerife FİDAN'a, Melike VURMAZ'a, Öğr. Gör. Sevil ERGÜL'e, Dr. Yasemin GÖKÇE'ye,

Tez yazım sürecinde göstermiş oldukları anlayış ve desteklerinden dolayı Malatya İl Tarım Müdürlüğü'nde görevli mesai arkadaşlarım Burçin AYDOĞAN, Turan Uğur İNCE, Meral CANBAY, Uğur BARAN, Gökhan ÖZDUMAN ile şube müdürüm Şevket YİĞİT'e,

Katkı ve desteklerinden dolayı değerli arkadaşım Hüseyin GÖK'e,

Çalışmalarım boyunca desteklerini her zaman yanımda hissettiğim bana gösterdikleri sabır ve anlayış için annem Pervin ATEŞOĞLU ile eşim Sercan Melik ASLAN ve kızım Deva ASLAN'a,

Tezin uygulama aşamasında FYL-2023-3178 no'lu proje ile maddi destek veren İnönü Üniversitesi BAP birimine ve çalışanlarına

teşekkür ederim.

ONUR SÖZÜ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Mikrodalga ve Ultrases Uygulamalarının Peynirde Bulunan Azotlu Maddelerin Ekstraksiyonu Üzerine Etkisinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığına ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Pınar Özge ASLAN



İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Peynirde Olgunlaşmanın Önemi	4
2.2 Peynirde Olgunlaşma Analizlerinde Azotlu Maddelerin Ekstraksiyonu	5
2.3 Ultrases Destekli Sıvı Ekstraksiyon Tekniği	8
2.3.1 Ultrases teknolojisinin kullanım alanları	10
2.3.2 Ultrases teknolojisinin avantajları	11
2.3.3 Ultrases teknolojisinin dezavantajları	11
2.4 Mikrodalga-Destekli Ekstraksiyon Tekniği	12
2.4.1 Mikrodalga teknolojisinin kullanım alanları	13
2.4.2 Mikrodalga teknolojisinin avantajları	13
2.4.3 Mikrodalga teknolojisinin dezavantajları	14
2.5 Ultrases ve Mikrodalga Tekniklerinin Ekstraksiyon Süreçlerine Etkisine İlişkin Yapılmış Çalışmalar	14
2.6 Ultrases ve Mikrodalga Uygulamalarının Süt Proteinleri Üzerine Etkisi	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1 Materyal	21
3.2 Yöntem	21
3.2.1 Suda çözünen azot oranlarının belirlenmesi	21
3.2.2 pH 4.6'da çözünen azot oranlarının belirlenmesi	22
3.2.3 %12'lik TCA'da çözünen azot oranlarının belirlenmesi	23
3.2.4 Toplam serbest aminoasit miktarı belirleme	24
3.2.5 Peynirde peptit profilinin RP-HPLC ile belirlenmesi	25
3.2.6 Poliakrilamid Jel Elektrophoretiz ile protein fraksiyonlarının belirlenmesi	26
3.2.7 İstatistiksel analiz	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	29
4.1 Suda Çözünen Azot Oranı	29
4.2 pH 4.6 da Çözünen Azot Oranı	33
4.3 %12'lik Trikloroasetik Asitte Çözünen Azot Oranı Analizi	36
4.4 Toplam Serbest Aminoasit Miktarı	39
4.5 HPLC ile Peptit Profilinin Belirlenmesi	42
4.6 Elektrophoretik Yöntemle (Üre-PAGE) Protein Profili	47
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
6. KAYNAKLAR	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Peynirdeki azotlu madde fraksiyonlarının elde edilme teknikleri	7
Şekil 2.2: Ultrasesin 3 temel aşaması.	9
Şekil 2.3: Magnetron yapısı	13
Şekil 3.1: Leu standardına ait kalibrasyon eğrisi.	25
Şekil 4.1: Mikrodalga destekli ekstraksiyon uygulamasına ait SÇA oranı.	30
Şekil 4.2: Ultrases destekli ekstraksiyon uygulamasına ait SÇA oranı.	32
Şekil 4.3: Mikrodalga destekli ekstraksiyon uygulamasına ait pH 4.6-ÇA oranı.....	33
Şekil 4.4: Ultrases destekli ekstraksiyon uygulamasına ait pH 4.6-ÇA oranı.	35
Şekil 4.5: Mikrodalga destekli ekstraksiyon uygulamasına ait %12 TCA-ÇA oranı.....	37
Şekil 4.6: Ultrases destekli ekstraksiyon uygulamasına ait % TCA-ÇA oranı.....	38
Şekil 4.7: Mikrodalga uygulamasının toplam serbest aminoasit miktarına etkisi.	39
Şekil 4.8: Ultrases uygulamasının toplam serbest aminoasit miktarına etkisi.	40
Şekil 4.9: 30 sn (a) ve 40 sn (b) mikrodalga uygulamasının peptit profiline etkisini gösteren HPLC kromatogramları.	43
Şekil 4.10: 50 sn (a) ve 60 sn (b) mikrodalga uygulamasının peptit profiline etkisini gösteren HPLC kromatogramları.	44
Şekil 4.11: 1 dk (a) ve 5 dk (b) ultrases uygulamasının peptit profiline etkisini gösteren HPLC kromatogramları.	45
Şekil 4.12: 10 dk (a) ve 15 dk (b) ultrases uygulamasının peptit profiline etkisini gösteren HPLC kromatogramları.	46
Şekil 4.13: Mikrodalga ve ultrases uygulamalarının peptit profiline etkisini gösteren HPLC kromatogramı	47
Şekil 4.14: Üre-PAGE yöntemi ile kazein fraksiyonlarının elektroforetik görünümü (a) ve dendogram görüntüsü (b).....	48

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2.1: TKG olgunlaşma durumu ve yöntemine göre peynirlerin sınıflandırılması.	3
Çizelge 2.2: TKG sertlik derecesine göre peynirlerin sınıflandırılması.	3
Çizelge 2.3: TKG süt yağı miktarlarına göre peynirlerin sınıflandırılması.	4
Çizelge 2.4: Ultrases sistemlerinin karşılaştırılması.	10
Çizelge 3.1: Beyaz peynirin genel bileşim özellikleri.	21
Çizelge 3.2: Mikrodalga destekli ekstraksiyon uygulama parametreleri.	22
Çizelge 3.3: Ultrases destekli ekstraksiyon uygulama parametreleri.	22
Çizelge 4.1: Uygulanan üç farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen SÇA oranı.	32
Çizelge 4.2: Uygulanan üç farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen pH 4.6-ÇA oranı.	35
Çizelge 4.3: Uygulanan üç farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen % 12 TCA-ÇA oranı.	38
Çizelge 4.4: Uygulanan üç farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen toplam serbest aminoasit (mg Leu/kg peynir).	41
Çizelge 4.5: Mikrodalga uygulaması ile elde edilen proteoliz değerleri.	41
Çizelge 4.6: Ultrases uygulaması ile elde edilen proteoliz değerleri.	42

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

A	:Amplitude
dk	:Dakika
g	:Gram
HPLC	: High-Performance Liquid Chromatography
kg	:Kilogram
Leu	:Lösin
MD	:Mikrodalga
MDE	:Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon
ml	:Mililitre
pH 4.6 ÇA	:pH 4.6’da Çözünen Azot
sn	:Saniye
SÇA	:Suda Çözünen Azot
US	: Ultrases
USE	:Ultrases Destekli Ekstraksiyon
TCA	: Trikloroasetik Asit
TCA-ÇN	: Trikloroasetik Asitte Çözünen Azot
TGK	:Türk Gıda Kodeksi
Üre PAGE	: Üre Poliakrilamid Jel Elektroforez
W	:Watt
α	:Alfa
β:	:Beta
γ	:Gama
κ	:Kappa
μL	:Mikrolitre

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MİKRODALGA VE ULTRASES UYGULAMALARININ PEYNİRDE BULUNAN AZOTLU MADDELERİN EKSTRAKSİYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

PINAR ÖZGE ASLAN

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

59+VIII sayfa

2025

Danışman: Doç. Dr. Didem ŞAHİNGİL

Peynir, üretiminden itibaren olgunlaşma ile fiziksel, duyuşsal ve biyokimyasal ve mikrobiyolojik değişimlere uğramaktadır. Peynirin olgunlaşmasını belirlemede genellikle azotlu maddelerdeki değişimler esas alınmaktadır. Söz konusu azotlu maddelerin ekstraksiyon işlemleri temel olarak pH 4.6/4.4 ya da suda gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmada peynirde bulunan azotlu maddelerin ekstraksiyonu sırasında kullanılan klasik yöntemlere alternatif olarak inovatif tekniklerden ultrases destekli ekstraksiyon (USE) ve mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE) yöntemlerin uygulanabilirliği araştırılmıştır. MDE için 90 W gücünde, ekstraksiyon süresi 30, 40, 50 ve 60 sn; ve USE için 60 amplitud (A) ve 52 W gücü sabit tutularak 1, 5, 10 ve 15 dk olarak seçilmiştir. Klasik ekstraksiyon metodunda azotlu organik maddelerin ekstraksiyonu için su banyosunda 1 saat süreyle bekletilmesi gerekmektedir. Bu nedenle mikrodalga ve ultrases destekli ekstraksiyon ile bu sürenin kısılması ve aynı zamanda azotlu maddelerin ekstraksiyon veriminin korunması ve/veya artırılması amaçlanmıştır. Çalışmada örnek olarak piyasadan temin edilen olgunlaştırılmış beyaz peynir kullanılmıştır. Ultrason ve mikrodalga güçleri uygulanan örneklerin suda, pH 4.6'da ve %12'lik TCA'da çözünen azot oranları belirlenmiş olup bunun yanı sıra, Üre-PAGE elektroforetik özellikleri ve yüksek performans sıvı kromatografisinde (HPLC) peptit profilleri ile spektrofotometrik yöntemle toplam serbest aminoasit miktarları değerlendirilmiştir. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda 50 saniyelik uygulamada kontrol grubuna kıyasla %98.67 verim sağlamış, ancak bu süre 60 saniyeye çıktığında verim %97.12'ye düşmüştür. Ultrases yönteminde 1 dakikalık uygulama %93.25 verim sunarken, 15 dakikada verim %70.91'e gerilemiştir. Sonuç olarak, her iki yönteminde klasik ekstraksiyon yöntemine kıyasla ekstraksiyon süresinin kısılmasında etkili olduğu ancak mikrodalga yönteminin ultrason yöntemine kıyasla daha verimli olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Mikrodalga, Ultrases, Ekstraksiyon, Proteoliz

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF MICROWAVE AND ULTRASOUND APPLICATIONS ON THE EXTRACTION OF NITROGENOUS SUBSTANCES IN CHEESE

Pınar Özge Aslan

Inonu University
Graduate School of Nature and Applied Sciences
Department of Food Engineering

59+VIII sayfa

2025

Supervisor: Doç. Dr Didem Şahingil

Cheese undergoes physical, sensory, biochemical, and microbiological changes during ripening. The determination of cheese ripening is generally based on changes in nitrogenous compounds, which are typically extracted using pH 4.6/4.4 or water-based methods. This study investigates the applicability of innovative techniques such as ultrasound-assisted extraction (UAE) and microwave-assisted extraction (MAE) as alternatives to conventional methods for extracting nitrogenous compounds in cheese. MAE was performed at 90 W power with extraction times of 30, 40, 50, and 60 seconds, while UAE was conducted at a constant 60 amplitude (A) and 52 W power for 1, 5, 10, and 15 minutes. Conventional extraction requires a water bath for 1 hour; therefore, this study aimed to reduce extraction time while maintaining or improving extraction efficiency. Aged white cheese obtained from the market was used as a sample. The nitrogen content soluble in water, pH 4.6 buffer, and 12% TCA was determined, alongside peptide profiles analyzed by Urea-PAGE electrophoresis and high-performance liquid chromatography (HPLC), and total free amino acid content measured spectrophotometrically. MAE at 50 seconds achieved a 98.67% yield compared to the control, but efficiency decreased to 97.12% at 60 seconds. UAE provided a 93.25% yield at 1 minute but dropped to 70.91% at 15 minutes. In conclusion, both methods effectively reduced extraction time compared to conventional techniques; however, MAE proved to be more efficient than UAE.

Keywords: Microwave, Ultrasound, Extraction, Proteolysis

1. GİRİŞ

Süt ve süt ürünleri, sağlıklı bir metabolizmanın sürdürülmesi açısından insan beslenmesi ve sağlığı için gerekli temel besin maddelerinin önemli kaynaklarıdır (Pereira ve Vicente, 2017). Bu süt ürünlerden birisi de insanların yemekten keyif aldığı, her yaştaki tüketiciye hitap eden ve her öğünde tüketilebilen peynirdir. Peynir yapımının temel amacı sütün temel bileşenlerini korumaktır (Tekin ve Hayaloğlu, 2023). Farklı süt türleri (inek, koyun, keçi, manda) ve üretim yöntemleri, peynirin çeşidini ve özelliklerini belirleyen temel faktörlerdendir (Akarca ve diğ, 2013). Peynir, içerdiği yüksek protein, kalsiyum ve esansiyel yağ asitleri nedeniyle besleyici bir gıda maddesi olup, dünya genelinde yaygın olarak tüketilmektedir (Fox ve diğ, 2017).

Peynir; sütün enzimler veya organik asitler eklenerek pıhtılaştırılması, telemenin ayrılması, şekillendirilmesi ve tuzlanması ile yapılır. Pıhtılaştırma, süzme ve olgunlaştırma, sütü peynire dönüştüren üç temel işlemdir (Karabıyıklı ve Erdoğmuş, 2019). Peynirin lezzet, doku ve aromasının gelişimini sağlayan en önemli süreç ise olgunlaşmadır. Peynir olgunlaşması, peynirin üretim aşamasını takip eden ve karakteristik tat, doku ve aroma özelliklerinin geliştiği biyokimyasal bir süreçtir. Bu süreç, pıhtının oluşumunu takiben başlar ve peynir çeşidine bağlı olarak birkaç hafta ile birkaç yıl arasında sürebilir. Peynir olgunlaşması, mikroorganizmalardan ve enzimatik aktivitelerden kaynaklanan kompleks bir dizi biyokimyasal reaksiyonu içerir (Fox ve diğ, 1996; McSweeney, 2004). Olgunlaşma süresince; laktik asit bakterileri laktozu fermente ederek laktik asit oluşur, bu da pH'ı düşürerek peynirin mikrobiyolojik stabilitesini artırır ve dokusunu etkiler (Fox ve diğ, 2000). Olgunlaşma sırasında kullanılan starter kültürlerin yanı sıra doğal mikroflora da sürece katkıda bulunur. Bu mikroorganizmalar, tat ve aromanın gelişiminde kritik bir rol oynar (Beresford ve diğ, 2001). Lipaz enzimlerinin etkisiyle süt yağları serbest yağ asitlerine ve aromatik bileşiklere parçalanır. Bu reaksiyonlar, özellikle aroma gelişimi üzerinde etkilidir (Collins ve diğ, 2003). Peynirde bulunan kazein, başlıca proteolitik enzimlerin (örneğin, rennet ve mikroorganizmaların salgıladığı enzimler) etkisiyle parçalanır. Bu süreç, peynirin aromatik bileşiklerinin oluşumunda önemli bir rol oynar ve peynirin yapısal değişimlerine katkıda bulunur (McSweeney, 2004; Fox ve diğ, 2017). Dolayısıyla peynirde bulunan azotlu organik maddelerin ekstraksiyonu, gıda bilimi açısından olgunlaşma sürecinin belirlenmesi,

kalite kriterlerinin oluşturulması ve besin değerlerinin değerlendirilmesi bakımından büyük bir öneme sahiptir (Fox ve McSweeney, 2017). Azotlu bileşikler, proteinlerin, peptitlerin ve serbest amino asitlerin çözünür hale gelmesiyle analiz edilebilir. Bu tür analizler, peynirin kimyasal özelliklerinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlarken, aynı zamanda endüstriyel uygulamalar için kalite standartlarının belirlenmesinde temel bir rol oynamaktadır.

Geleneksel ekstraksiyon yöntemleri azotlu organik bileşenlerin etkili bir şekilde değerlendirilmesini sağlamaktadır. Ancak zaman tasarrufu sağlamak ve ekstraksiyon verimini artırmak gibi amaçlarla geleneksel yöntemlerde güncelleştirme ve alternatif yöntem arayışına girilmiştir. Yapılan araştırmalar neticesinde mikrodalga enerji kullanımının gıdalardaki moleküler hareketi hızlandırarak çözünme ve reaksiyon süreçlerini desteklediği; ultrases uygulamalarının ise akustik kavitasyon yoluyla hücre duvarlarının parçalanmasını kolaylaştırarak hedef bileşiklerin daha etkin bir şekilde salınımını sağladığı görülmüştür (Chemat ve diğ, 2011).

Bu çalışmanın amacı, mikrodalga ve ultrases destekli uygulamalarının peynirdeki azotlu maddelerin ekstraksiyonu üzerindeki etkilerini incelemektir. Mikrodalga ve ultrases gibi modern teknolojilerin ekstraksiyon süreçlerine entegrasyonuna dair yeni bilgiler sunarak mevcut analiz yöntemlerinin daha verimli hale getirilmesine katkı sağlamak hedeflenmektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Peynir; sütün pıhtılaştırıcı bir enzimle veya asitle pıhtılaştırılmasının ardından pıhtıdan suyun uzaklaştırılması ve pıhtı işleme aşamalarını kapsamaktadır. (Hayaloğlu ve Özer, 2021). Türk Gıda Kodeksi tarafından peynirler olgunlaşma durum ve yöntemlerine göre, sertlik derecelerine göre ve içerdikleri süt yağı miktarlarına göre Çizelge 2.1, Çizelge 2.2 ve Çizelge 2.3'te belirtilen şekilde sınıflandırılmıştır. Peynir, protein içeriği açısından %4 ile %40 arasında değişen değerler göstermektedir. Proteinler, peynirin besin değeri, fizikokimyasal özellikleri, fonksiyonel nitelikleri ve duyuşsal karakteristiklerinden sorumlu temel bileşenler arasında yer almaktadır. Bununla birlikte, peynirin olgunlaşma süreci, peynir mayası, sütte doğal olarak bulunan ve çeşitli mikroorganizmalardan kaynaklanan enzimlerin etkisiyle proteinlerin kademeli olarak amino asitlere ve peptitlere parçalanmasını içermektedir (Hayaloğlu ve McSweeney, 2014). Bu süreç, peynir proteinlerinin neredeyse %100 oranında sindirilebilir olmasını sağlamaktadır. Ayrıca, Maillard reaksiyonlarının gerçekleşmemesi sonucu peynirde yüksek biyoyararlılığa sahip başlıca amino asitlerden biri olan lizin, önemli miktarlarda bulunabilmektedir (Ardö ve diğ, 2017).

Çizelge 2.1: TKG olgunlaşma durumu ve yöntemine göre peynirlerin sınıflandırılması.

Olgunlaşma		En Az Olgunlaşma Süresi (Gün)	
Olgunlaşma Yöntemi	Olgunlaşma Durumu	Ağırlık>1,5 kg	Ağırlık≤1,5 kg
Olgunlaştırılmamış	Taze	-	-
Küf Kültürleri ile Olgunlaştırılmış	Olgunlaştırılmış	90	45
Salamura ile Olgunlaştırılmış	Olgunlaştırılmış	90	90
Küf ve Salamura Yöntemleri dışındaki Yöntemler ile Olgunlaştırılmış	Olgunlaştırılmış	90	45

Çizelge 2.2: TKG sertlik derecesine göre peynirlerin sınıflandırılması.

Sertlik Derecesi	(PYKN) Yağsız Peynir Kitlesindeki Nem Oranı (%)	Tolerans
Ekstra Sert	PYKN<49	±2
Sert	49≤PYKN<57	
Yarı Sert	57≤PYKN<64	
Yarı Yumuşak	64≤PYKN<70	
Yumuşak	PYKN≥70	

Çizelge 2.3: TKG süt yağı miktarlarına göre peynirlerin sınıflandırılması.

Sınıfı	Kuru Maddede Süt Yağı (%)
Tam Yağlı	$45 \leq \text{süt yağı}$
Yarım Yağlı	$25 \leq \text{süt yağı} < 45$
Az Yağlı	$10 \leq \text{süt yağı} < 25$
Yağsız	$10 > \text{süt yağı}$

2.1 Peynirde Olgunlaşmanın Önemi

Peynirin olgunlaşma sürecinde başta proteoliz olmak üzere gerçekleşen glikoliz ve lipoliz gibi biyokimyasal reaksiyonlar neticesinde peynirin kendine özgü lezzet ve dokusu oluşur (Akgün ve diğ., 2022). Proteinlerin olgunlaşma sürecindeki değişimleri peynir kalitesini belirlemede ana unsurdur. Peynirdeki proteolitik aktivitenin takibi ve proteolitik aktivitenin değerlendirilmesi peynir olgunlaşması sürecinde en önemli biyokimyasal süreçlerden biri olarak kabul edilir ve peynirin lezzet, aroma, tekstür ve olgunlaşma kalitesini doğrudan etkiler (El-Aidie ve diğ., 2024). Peynir üretiminde kullanılan pıhtılaştırıcının türü ve proteolitik gücü, proteoliz oranı etkileyebilir (Gümüş ve Hayaloğlu, 2019). Proteoliz sonucu oluşan kısa zincirli peptit ve aminoasitler peynirin karakteristik tat ve aromasının oluşmasında da büyük öneme sahiptir (McSweeney, 2004). Ala, Gly, Pro, Ser ve Thr aminoasitleri tatlı; Asp, Glu ve His ekşi; Arg, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr ve Val ise acı tat vermektedir (McSweeney, 2004; Vítová ve diğ., 2006). Proteolitik aktivite, peynirin duyuşal ve fizikokimyasal özelliklerini etkileyen üç temel aşamada gerçekleşir;

Primer Proteoliz: Peynirin olgunlaşma sürecinde gerçekleşen birincil proteoliz, peynir dokusunun, tadının ve aromasının oluşumunda temel bir rol oynamaktadır. Bu süreç peynir proteini olan kazeinin peynir mayası ile pıhtılaştırılmasıyla başlamaktadır. Kimozin ve plazmin gibi enzimler, kazeinleri hidroliz ederek orta büyüklükte peptitlerin oluşmasını sağlar (Atallah ve diğ., 2022). Bu peptitler, sekonder proteoliz aşamasında daha küçük bileşenlere ayrılarak peynirin aroma bileşiklerinin gelişimine katkıda bulunur (Dervişoğlu ve diğ., 2007). Primer proteoliz, peynirin başlangıçtaki sert yapısının, olgunlaşma süreci boyunca yumuşak ve kremsi bir dokuya dönüşümünü sağlamaktadır. Bu süreçte oluşan peptitler, su tutma kapasitesini artırarak peynirin daha homojen bir yapıya kavuşmasına katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, primer proteoliz sonucunda ortaya çıkan peptitler, sekonder proteoliz için gerekli substratları sağlayarak aroma bileşiklerinin oluşumuna ve peynirin karakteristik duyuşal özelliklerinin gelişimine zemin hazırlamaktadır.

Sekonder Proteoliz: Primer proteoliz ile oluşan peptitlerin aminoasitlere ve daha küçük bileşenlere ayrıldığı ve peynirin tat, aroma ve doku özelliklerinin gelişimini sağlayan biyokimyasal bir süreçtir (Upadhyay ve diğ, 2018). Starter ve non-starter mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler, uzun peptitleri parçalayarak serbest amino asitler ve uçucu aroma bileşikleri oluşturur (Fox ve diğ, 2017). Bu bileşikler, peynirin kendine özgü duyuşal özelliklerini belirlerken, süreç aynı zamanda peynirin dokusunun yumuşamasına da katkı sağlamaktadır (Sousa ve diğ, 2001). Sekonder proteolizin etkinliğı, sıcaklık, pH, mikroflora yapısı ve tuz içeriğı gibi çeşitli faktörlere bağıdır.

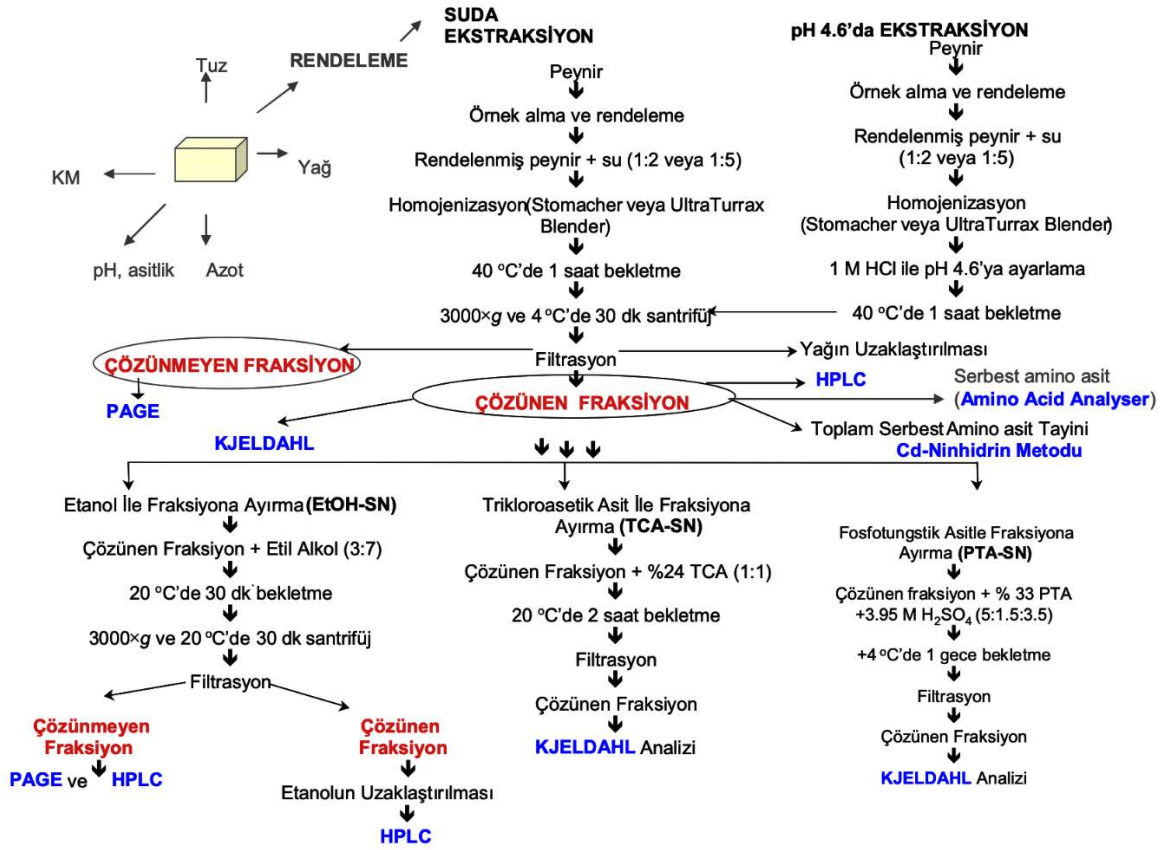
Aroma ve Tat Bileşenleri: Primer ve sekonder proteoliz sonucu ortaya çıkan peptitler ve amino asitler, çeşitli katabolik reaksiyonlar için kritik substratlar olarak işlev görür ve peynirin kendine özgü lezzet ve aromasını belirleyen aminler, aldehitler, alkoller, asitler, fenoller ve kükürt bileşikleri gibi uçucu bileşiklerin oluşumuna katkıda bulunur (Zheng ve diğ, 2021).

Proteolitik aktivite, peynir kalitesini çeşitli yönlerden etkilemektedir. Kazein parçalanması sonucu oluşan peptitler ve amino asitler, peynirin tat profiline katkı sağlar. Örneğın, Cheddar ve Parmesan peynirlerinde proteoliz sonucu yoğun aromalar oluşur (Collins ve diğ, 2003). Proteolitik yıkım, peynirin elastikiyetini, sertliğini ve kesilebilirliğini etkiler. Yüksek proteoliz, peynirde daha yumuşak bir yapı oluştururken düşük proteoliz sert bir dokuya neden olabilir. Proteolitik aktivite, peynirin olgunlaşma hızını belirler. Optimal proteoliz, kısa sürede yüksek kaliteli bir peynir elde edilmesini sağlar. Optimum proteolitik aktivite, peynirin duyuşal kalitesini artırırken, aşırı veya yetersiz proteoliz istenmeyen sonuçlara yol açabilir (Singh ve diğ, 2003). Bu nedenle, peynir üretiminde proteolitik süreçlerin kontrolü, besin değerin belirlenmesi, gıda güvenliğı ve standartlara uygun yüksek kaliteli ürünlerin elde edilmesi için kritik öneme sahiptir.

2.2 Peynirde Olgunlaşma Analizlerinde Azotlu Maddelerin Ekstraksiyonu

Peynir başta protein ve esansiyel aminoasitler olmak üzere birçok bileşen açısından oldukça zengin bir üründür. Peynirin besin değerin ve besin kalitesinin belirlenmesinde azotlu bileşiklerin analizlerinden faydalanılır. Olgunlaşma sürecinde miktarı artan serbest aminoasitlerin ve kısa zincirli peptitlerin miktarı ekstraksiyon yöntemleri ile tayin edilebilir. Bu bileşiklerin yüksek miktarı daha kolay sindirilebilirlik dolayısıyla daha yüksek biyoyararlılık sunmaktadır (Haug ve diğ, 2007). Azotlu bileşikler insan vücudunda sentezi olmayan ve dışardan almak zorunda olduğumuz esansiyel aminoasitler açısından da

zengindir. Bunlardan lösin, izölösün ve valin gibi kas ve protein sentezinde önemli olan (Walstra ve diğ, 2005) dallı zincirli aminoasitlerin varlığı ve miktarı ekstraksiyon yöntemleri ile belirlenebilmektedir. Ekstraksiyon yöntemleri ile edilen peptitler, antihipertansif, antioksidan ve antimikrobiyal özellikler gibi sağlık yararları sunabilmekte ve bu peptitlerden başta gıda sanayi olmak üzere farmakoloji ve tıp gibi sektörlerde faydalanılmaktadır (FitzGerald ve Meisel, 2000). Azotlu organik maddelerin ekstraksiyonu endüstriyel boyutta üretimde peynirin kalite standartlarına uygunluğunu belirlemek ve üretim sürecini optimize etmek için kullanılır (Singh, 2006). Peynirde bulunan azotlu maddeler gıda bilimi açısından olgunlaşmanın belirlenmesi, kalite kriteri ve besin değerlerinin değerlendirilmesi açısından oldukça önemli bir yere sahiptir. Azotlu bileşikler, proteinlerin, peptitlerin ve serbest amino asitlerin çözünür hale gelmesiyle elde edilebilir. Peynirin kimyasal özelliklerinin anlaşılmasında ve endüstriyel uygulamalar için kalite standartlarının belirlenmesinde bu bileşiklerin ekstraksiyonu temel bir rol oynar. Chemat ve diğ, (2011) yaptığı çalışmalar sonucunda azotlu organik bileşiklerin doğru ekstraksiyonu, mikrobiyal faaliyetler ve istenmeyen enzimatik reaksiyonlar nedeni ile oluşabilecek bozulmaların erken tespit edilmesini sağlayabileceğini bildirmişlerdir. Dolayısıyla proteolitik aktivitenin ekstraksiyon yöntemleriyle kontrol edilmesi peynirin raf ömrünün belirlenmesinde belirleyici olmaktadır. Peynirdeki azotlu maddelerin ekstraksiyon işlemleri temel olarak pH 4.6, pH 4.4 ya da suda gerçekleştirilmektedir. Bunun dışında Harwalkar ve Elliott yöntemi olarak bilinen metanol-kloroform karışımının çözücü olarak kullanıldığı yöntemde kullanılabilmektedir. pH değeri ve stabilitesi, kurumadde, yağ ve % tuz oranı gibi peynirin karakteristik özellikleri ve peynirin çeşidi ekstraksiyon metodunun seçiminde etkilidir. Su ile ekstraksiyonda proteinler (kazeinlerin büyük bir kısmı hariç), peptitler, amino asitler, aminler, üre ve amonyak gibi küçük molekül ağırlığına sahip azotlu bileşikler elde edilir.



Şekil 2.1: Peynirdeki azotlu madde fraksiyonlarının elde edilme teknikleri (Hayaloğlu ve diğ., 2011).

Şekil 2.1. de peynirde azotlu maddelerin ekstraksiyonunda ve alt fraksiyonlar ayrılmasında kullanılan başlıca yöntemler verilmiş (Hayaloğlu ve diğ., 2011) olup şekilde görüldüğü üzere uygun örnek alma metodları ile alınan peynir örneği üzerine uygun miktarda su (1:2 veya 1:5) eklendikten sonra homojenize edilir ve 40 °C de 1 saat süre ile bekletilir. Ardından santrifüj işlemine tabi tutulur. Santrifüj sonrası yağ uzaklaştırılarak filtrasyon yapılır. Bu filtrasyon işlemi sonrası çözünen fraksiyon kullanılarak suda, pH 4.6'da, %12'lik trikloroasetikasitte, etanolde ve fosfotungstik asitte çözünen azot oranı analizleri, toplam serbest aminoasit tayini ve HPLC analizleri yapılırken çözünmeyen fraksiyondan ise PAGE analizleri gerçekleştirilir. Suda ve pH 4.6'da yapılan ekstraksiyon işlemi sırasında, kazeinler hariç olmak üzere proteinler, kısa zincirli peptitler, amino asitler, aminler, üre ve amonyak gibi düşük moleküler ağırlığa sahip azotlu bileşikler elde edilir. %12'lik TCA ve etanol çözeltisinde çözünür fraksiyon analizinde ise orta ve küçük boyutlu peptitler, amino asitler, aminler, üre ve amonyak gibi bileşiklerin ekstraksiyonuna olanak sağlanır. Fosfotungstik asitte çözünür fraksiyon, çok küçük peptitler, amino asitler ve amonyak dışındaki daha düşük

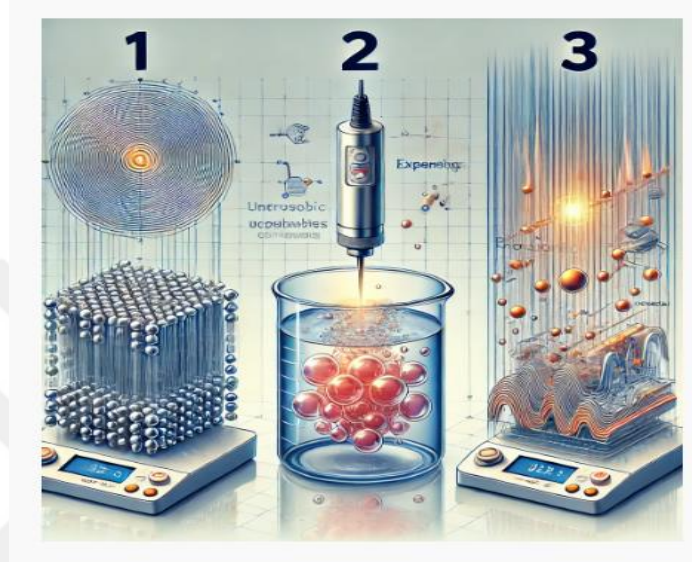
moleküler ağırlıklı azotlu bileşiklerin belirlenmesinde kullanılır. HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) analizleri, çeşitli azotlu bileşiklerin hassas ve spesifik tespiti için yaygın olarak kullanılır. Kullanılan kolona, dedektöre (UV, DAD, MS, vs.) ve mobil faza bağlı olarak farklı azotlu fraksiyonlar ayrıştırılabilir ve analiz edilebilir. PAGE (Poliakrilamid Jel Elektroforez) analizlerinde ise tespit edilebilen azotlu madde fraksiyonları, kullanılan yöntemin türüne (örneğin, SDS-PAGE veya Üre-PAGE) ve spesifik analiz amacına bağlıdır. Genel olarak, PAGE analizleri protein ve azotlu bileşiklerin moleküler ağırlıklarına ve yapısal özelliklerine göre ayrıştırılmasını sağlar.

Yukarıda bahsetmiş olduğumuz klasik yöntemler dışında son yıllarda kullanılan modern yöntemlerden bazıları şunlardır: süperkritik akışkan ekstraksiyonu, mikrodalga ekstraksiyonu, basınçlı solvent ekstraksiyonu, katı-faz mikroekstraksiyonu, ultrases destekli ve enzim destekli ekstraksiyon (Handa, 2008; Dahmoune ve diğ, 2014; Gligor ve diğ, 2019). Her bir yöntemin kendine göre avantaj ve dezavantajları vardır. Ekstraksiyon işleminin temel amacı, hedef bileşiği en yüksek miktar ve biyolojik aktivitede elde etmektir (Truong ve diğ, 2019). Ayrıca klasik teknikler; uzun ekstraksiyon süreleri, fazla miktarda çözen ihtiyacı, düşük ekstraksiyon seçiciliği, yüksek maliyet gibi olumsuz özelliklere de sahiptir. Bu nedenle, etkin şekilde hedef bileşiğin kazanımı için yeşil ve yeni ekstraksiyon teknikleri geliştirilmektedir (Oroian ve diğ, 2020; Bitwell ve diğ, 2023). Günümüzde ekstraksiyon işleminde yaygın olarak kullanılan ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyon, işlem süresini kısaltmakla birlikte daha yüksek saflıkta ürün eldesi sağlar, enerji sarfiyatını azaltır ve çözen kullanımını azaltarak çevreci bir teknoloji olarak karşımıza çıkmaktadır (Chemat ve diğ, 2017; Oroian ve diğ, 2020; Martins ve diğ, 2023).

2.3 Ultrases Destekli Sıvı Ekstraksiyon Tekniği

Ultrases, insan kulağının işitemeyeceği, 20 kHz üzerindeki yüksek frekanslı ses dalgalarını ifade etmektedir. Ultrasonik dalgaların yayılımı bir enerji oluşturur ve bu enerji fiziksel ve kimyasal değişimlere yol açar (Marić ve diğ, 2018; Picot-Allain ve diğ, 2022). Ultrases teknolojisi gıda bilimi ve teknolojisinde düşük veya yüksek güçlü uygulamalarıyla geniş bir kullanım alanına sahiptir (Chemat ve diğ, 2011). Analitik ölçümler, mikrobiyolojik testler ve kalite kontrol tespit analizlerinde düşük güçlü ultrases ($\leq 1 \text{ W/cm}^2$) tercih edilirken, gıda işleme, ekstraksiyon, emülsiyon stabilizasyonu ve mikroorganizma inaktivasyonu gibi işlemler için yüksek güçlü ultrases ($> 1 \text{ W/cm}^2$) tercih edilmesi daha uygundur (Arzeni ve diğ, 2012).

Şekil 2.2 de gösterilen üzere ultrases teknolojisinin temel mekanizması, yüksek frekanslı ses dalgalarının sıvı ya da yarı katı ortamlarda yayılarak meydana getirdiği akustik kavitasyon etkisidir. Bu akustik kavitasyon, sıvı içerisinde mikroskobik kabarcıkların oluşumu, büyümesi ve patlamasıdır. Bu süreç, yüksek sıcaklık, basınç ve yoğun enerji yayılımına neden olur, bu da kimyasal ve fiziksel değişimlere yol açar (Mason, 1998).



Şekil 2.2: Ultrasesin 3 temel aşaması.

Ultrases dalgaları sıvı ortam içerisinde basınç dalgaları oluşturur. Bu basınç dalgaları düşük ve yüksek olmak üzere 2 fazdan oluşur. Düşük basınç sırasında mikro kabarcıklar oluşur, yüksek basınç sırasında ise oluşan bu kabarcıklar hızla çökerler. Bu çöküş sırasında yüksek sıcaklık ve basınç ortaya çıkar. Kabarcıkların çöküşü sonucu ortaya çıkan yüksek kesme kuvveti ve şok dalgaları hücre membranının parçalanması, proteinlerin daha düşük molekül ağırlıklı peptit ve aminoasitlere parçalanması veya bileşiklerin serbest kalmasına neden olmaktadır (Chemat ve diğ, 2011).

Ultrases prosedürlerinde kullanım için çeşitli ultrasonik cihazlar tercih edilebilse de, ultrasonik banyo ve ultrasonik prob sistemleri genellikle en yaygın kullanılanlardır (Mason, 1998). Prob sistemleriyle karşılaştırıldığında, ultrasonik banyo sistemlerinin kullanımı daha kolay ve daha ucuzdur. Ultrasonik banyo sistemlerinde transdüser tankın altına yerleştirilir. Santos ve Capelo (2007) göre, çoğu ultrasonik banyo yaklaşık 40 kHz frekansında çalışır ve tipik olarak 1-5 W/cm² gibi düşük güç yoğunluklarına sahiptir. Kısa kimyasal reaksiyon tekrarlama süresi ve iletilen düşük enerji yoğunluğu nedeniyle, banyo sistemleri gıda işleme operasyonlarında daha az kullanılmaktadır (Wen ve diğ, 2018). Ultrases sistemlerinin

karşılaştırılması Çizelge 2.4 de verilmiştir. Ultrasonik problar ultrasonik banyolarla karşılaştırıldığında, daha yüksek yoğunlukta ultrases üretebilirler. Hem ultrasesin verilebileceği numune hacmi hem de sisteme uygulanan güç yoğunluğu problemlerin çaplarına bağlıdır.

Çizelge 2.4: Ultrases sistemlerinin karşılaştırılması.

Sistem	Frekans Aralığı	Kavitasyon Etkisi	Kullanım Alanları	Avantajlar	Dezavantajlar
Düşük Frekanslı Ultrases	20-100 kHz	Yüksek	Gıda işleme, hücre parçalanması	Güçlü mekanik etkiler	Hassas bileşikler zarar görebilir
Yüksek Frekanslı Ultrases	100 kHz- 1mHz	Düşük	Tıbbi analiz,hassas ekstraksiyon	Kontrollü enerji aktarımı	Daha kısıtlı mekanik etkinlik
Ultrasonik Banyo	20-40 kHz	Orta	Numune hazırlama, temizlik	Homojen enerji dağılımı	Düşük enerji verimliliği
Ultrasonik Prob	20-100 kHz	Yüksek	Gıda ekstraksiyonu, biyoteknoloji	Direkt enerji aktarımı	Lokal aşırı ısınma
Mikroakışkan Ultrasonik	20-50 kHz	Düşük/Orta	Nanoteknoloji, ilaç	Küçük ölçekli işlemlerde yüksek hassasiyet	Karmaşık ve maliyetli ekipman

2.3.1 Ultrases teknolojisinin kullanım alanları

Ultrason destekli ekstraksiyon (UAE), daha az çözücü tüketimi, daha kısa ekstraksiyon süresi ve daha düşük işlem sıcaklıklarında çalışma avantajlarıyla yüksek ekstraksiyon verimliliği sağlayan basit ve etkili bir tekniktir. Bu özellikleri nedeniyle UAE, kimya ve gıda endüstrilerinde geniş bir uygulama potansiyeline sahiptir (Chakraborty ve diğerleri, 2020). Gıda bilimi ve endüstrisinde bitki, meyve ve süt ürünlerinden biyoaktif bileşiklerin ve proteinlerin hızlı ve verimli şekilde çıkarılmasını sağlar (Chemat ve diğ, 2017). Salata sosu

vb ürünlerde daha stabil yağ-su emülsiyonu oluşturulmasında kullanılır. Mikroorganizma inaktivasyonu sağlayarak stabilite ve uzun ömrü sağlar (Zou ve diğ, 2018). Farmakoloji, tıp, kimya ve kozmetik endüstrisinde, ilaç yapımında kullanılacak etken maddelerin ekstrakte edilmesinde ve nanoparçacık oluşturmada ve ilaçların çözünürlüğünü artırmak için kullanılır (Mason, 1998). Tıbbi görüntülemelerde ve teröpatik uygulamalarda yararlanır. Kozmetik ürünlerin hammaddelerinin ekstraksiyonu ve yapının stabilitesinin sağlanması amacıyla kullanılır. Çevresel uygulamalarda ise, atık suların arıtılmasında organik atıkların parçalanması işleminde ve biyoyakıt üretiminde bitkisel ve hayvansal kaynakların işlenmesi süreçlerine dahil edilerek verimi artırmak amacıyla yararlanır.

2.3.2 Ultrases teknolojisinin avantajları

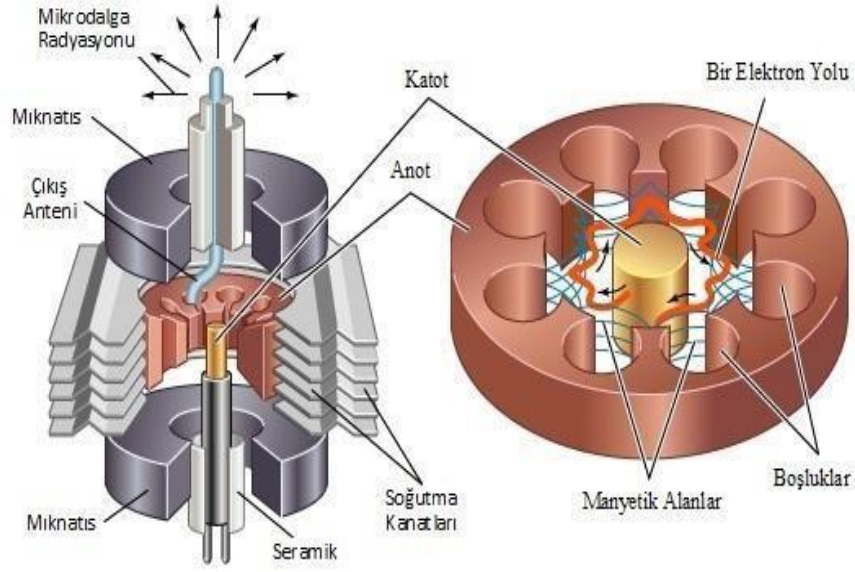
Kavitasyon etkisiyle hücre membranının parçalanması, partikül çapının azalması suretiyle katı ve sıvı kısımlar arasındaki yüzey alanı ve etkileşimin artması, çözücünün dokulara doğru olan dağılımını hızlandırmaktadır. Bunun sonucunda kimyasal reaksiyon süreci hızlanır ve ekstraksiyon verimliliği artmaktadır. Geleneksel yöntemlere kıyasla işlem süresinin azalmasına bağlı olarak enerji tasarrufu sağlanır. Daha az çözgen kullanımına olanak vermesi nedeniyle doğa dostu teknikler arasında kabul edilir. Gıda, farmakoloji ve çevre başta olmak üzere geniş bir kullanım alanı sunar. Ultrases teknolojisi, gıdalardan biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda verimi artırarak, bu bileşiklerin potansiyel sağlık yararlarını korur veya geliştirir (Rojas ve diğ, 2022).

2.3.3 Ultrases teknolojisinin dezavantajları

Ultrases ilk kurulum maliyeti nedeniyle geleneksel ekstraksiyon yöntemlere kıyasla maliyet açısından dezavantajlı durumdadır. Kavitasyon sırasında çıkan enerji nedeniyle yükselen sıcaklık ve basınç bazı proteinlerin denatürasyonuna neden olabilir (Chemat ve diğ, 2011). Laboratuvar ölçeğinde başarılı sonuçlar elde edilebilen ultrasonik süreçlerin endüstriyel ölçeklerde uygulanması sırasında teknik zorluklarla karşılaşılabilir (Zou ve diğ, 2018) Sonuç olarak ultrases teknolojisi, gıda işleme ve ekstraksiyon süreçlerinde önemli avantajları olan yeni bir yöntemdir. Kavitasyon etkisi sayesinde reaksiyonları hızlandırır, enerji ve maliyet tasarrufu sağlar. Ancak, yüksek cihaz maliyeti, kontrol zorlukları ve sıcaklık/basınç etkileri, bu teknolojinin optimize edilmesini zorlaştırabilir. Ultrases teknolojisinin sürekli gelişen yapısı, gelecekte daha geniş bir uygulama alanı ve daha düşük maliyetli çözümler sunmasını mümkün kılacaktır.

2.4 Mikrodalga-Destekli Ekstraksiyon Tekniği

Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE), sıvı moleküllerinin hareketini uyarmak için mikrodalga enerjisinden yararlanarak hedef bileşenlerin verimli bir şekilde çıkarılmasını sağlayan bir tekniktir. Geleneksel ekstraksiyon yöntemleriyle karşılaştırıldığında, MAE daha kısa ekstraksiyon süresi, daha düşük çözücü maliyetleri ve artan otomasyon gibi önemli avantajlar sunar. Ayrıca, hem çözücüyü hem de ekstrakte edilecek materyali eşit şekilde ısıtarak daha yüksek bileşik verimi elde edilmesini sağlar (López-Salazar ve diğ., 2023). Mikrodalga teknolojisi, elektromanyetik dalgaların (300 MHz ile 300 GHz arasında değişen miktarlarda) polar molekülleri hızla döndürdüğü ve bu dönme sırasında moleküller arasındaki sürtünme ile hızlı ve homojen bir ısı artışı sağlayan bir metottur. Dielektrik ısıtma prensibine göre çalışan bu sistem başta su gibi polar molekülleri hedef alarak hızlı ve eşit bir enerji transferi sağlar (Chemat ve diğ., 2011; Marić ve diğ., 2018). Özellikle gıda işleme süreçlerinde sıkça kullanılır ve biyoaktif bileşiklerin çıkarılmasında oldukça verimlidir (Zhang ve diğ., 2020). Mikrodalga ekstraksiyon işlemi temel olarak; çözücü ve çözünen maddenin fizikokimyasal ve taşınma özelliklerinin artmasına neden olur. Çözeltinin iyon göçüne direnciyle sürtünme meydana gelerek çözelti ısınmakta ve ısınmayla birlikte hücre içindeki nem buharlaşmakta ve hücre duvarına basınç uygulamaktadır. İşte bu yüksek basınç hücre duvarında yapısal hasara yol açarak istenilen bileşiklerin difüzyonun artmasını destekler ve kütle transfer katsayısını artırır (Marić ve diğ., 2018; Mirzadeh ve diğ., 2020). Şekil 2.3 de gösterildiği üzere bir magnetron, bir yükseltici transformatör, bir fırın boşluğu, bir dalga kılavuzu, bir aplikatör ve işlenecek numune bir mikrodalga sistemini oluşturur. Mikrodalga teknolojileri benzer bir temelde çalışır. Konut güç hattının 50-60 Hz alternatif akımı bir transformatör kullanılarak 2450 MHz'e yükseltilir. Magnetron, mikrodalga fırının ağırlığının yarısından fazlasını oluşturan yükseltici transformatör tarafından beslenir. Magnetron 4000 voltta elektrik enerjisini mikrodalga enerjisine dönüştürür. Magnetronun ürettiği mikrodalgalar, mikrodalga boşluğuna ulaşmadan önce bir dalga kılavuzundan geçer. Isıtılacak ürün, mikrodalga boşluğunun yansıtıcı duvarları tarafından yerinde tutulur ve bu da mikrodalga ısıtma verimliliğini optimize eder. Tipik bir ev mikrodalga fırını için mikrodalga aplikatörü dikdörtgen bir boşluk ile temsil edilir. Uygulamalar arasında gezici dalga cihazları, tek modlu cihazlar ve çok modlu cihazlar bulunur (Orsat ve diğ., 2017).



Şekil 2.3: Magnetron yapısı (Kuş, 2016).

2.4.1 Mikrodalga teknolojinin kullanım alanları

Gıda bilimi ve endüstrisinde mikrodalga sistemi kullanılarak protein, yağ ve fenolik maddeler gibi bileşiklerin daha kısa süre ve yüksek verimde ekstraksiyonu sağlanabilir (Wang ve Weller, 2006). Başta meyve ve sebzeler olmak üzere bir çok besinde kurutma işlemi için kullanılır. Yiyeceklerin daha hızlı ve kolay ısıtılması, pişirilmesi ve sterilizasyonu işlemlerinde kullanılır. Ambalaj dezenfeksiyonu sağlanmak suretiyle gıda paketlenme sektöründe faydalanılır. Kimya endüstrisinde, Mikrodalga enerjisinden kimyasal reaksiyonların hız ve verimliliğini yükseltmek için faydalanabilir (Eskilsson ve Björklund, 2000). İlaç hammaddesi olan bitkilerden bitki özleri ve aktif maddelerin elde edilmesi süreçlerinde yararlanılır. Çevresel uygulamalarda su arıtma sistemlerinde toksik maddelerin parçalanması amacıyla ve biyokütlenin işlenme hızını artırmak amacıyla mikrodalga enerjisinden yararlanarak biyoyakıt üretiminde avantaj sağlar (Zhang ve diğ, 2020). Nanoteknoloji alanında ise partikül boyutu kontrolünde etkin bir yöntem olan mikrodalga ile nanomalzemelerin sentezi ve opmizasyonu sağlanabilir.

2.4.2 Mikrodalga teknolojinin avantajları

Moleküler düzeyde ısıtma geleneksel yöntemlere kıyasla daha hızlı ve enerji verimliliği yüksek bir sistemdir. Ekstraksiyon süresini ve solvent tüketimini azalttığı, ekstraksiyon verimini ise arttırdığı bildirilmiştir (Švarc-Gajić ve diğ, 2013). Hedef bileşenlerin daha yüksek verimle ekstrakte edilmesine olanak sağlar. Homojen bir ısı dağılımı sağlayarak istenmeyen bölgesel aşırı ısınmaları önler (Wang ve Weller, 2006). Gıda ve kimya endüstrisi başta olmak üzere bir çok alanda kullanım olanağı sağlar.

2.4.3 Mikrodalga teknolojisinin dezavantajları

Yüksek cihaz maaliyeti geleneksel yöntemlerle kıyaslandığında başlangıç aşamasında daha maliyetlidir. Yağlar gibi polaritesi düşük maddeler üzerinde etkisi düşüktür. Sıcaklık ve güç kontrolü zor olduğundan optimize edilmesi zor bir metottur, optimizasyon sağlanamadığı takdirde üründe bozulmalara neden olabilir (Zhang ve diğ, 2020). Yüksek sıcaklıklar, proteinlerin ve enzimlerin denatürasyonuna neden olabilir. Bu durum, istenmeyen yan ürünlerin oluşmasına neden olabilir (Eskilsson ve Björklund, 2000).

2.5 Ultrases ve Mikrodalga Tekniklerinin Ekstraksiyon Süreçlerine Etkisine İlişkin Yapılmış Çalışmalar

Chemat ve diğ. (2011) ultrases destekli ekstraksiyonun etkinliğini incelemiştir. Ultrasesin kavitasyon etkisi nedeniyle oluşan fiziksel etkileri ve mikro parçacıkların çöküşü sırasında açığa çıkan sıcaklık ve basınç etkisinin neden olduğu kimyasal etkileri analiz edilmiştir. Özellikle fenolik bileşikler, vitaminler ve antioksidanlar gibi biyoaktif bileşiklerin daha hızlı ve verimli bir şekilde ekstrakte edilebileceğini tespit etmiş olup ultrasesin zaman, solvent ve enerji tasarrufu sağladığı vurgulanmıştır. Fenolik bileşiklerin ekstraksiyon süresi %50 kısalmış, solvent tüketimi %30 azalmış ve antioksidan aktivite korunarak hedef bileşikler elde edilmiştir.

Ultrases destekli ekstraksiyonun gıda maddesi içerisindeki protein ve diğer biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonundaki etkilerinin incelendiği bir diğer çalışmada örnek olarak başta süt ve süt ürünleri olmak üzere özellikle protein açısından zengin gıda maddeleri üzerinde çalışılmıştır. Kontrollü düşük sıcaklık değerleri ile orta ve yüksek güç seviyelerinde farklı sürelerde, 20 kHz ultrases frekansında uygulama yapılmıştır. Proteinlerin hidroliz oranları, toplam serbest aminoasit miktarları, elde edilen ürün verimi ve ultrases uygulama süreleri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak protein hidrolizinin ultrases etkisiyle %30-40 oranında arttığı, özellikle kısa süreli uygulamalarda serbest aminoasit miktarında artış olduğu görülmüş ancak uzun süreli uygulamaların proteinlerin denatüre olmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda ultrasesin çevre dostu, verimli ve ekonomik bir yöntem olarak kullanılabileceği, ultrases destekli ekstraksiyonun süt ve süt ürünleri gibi protein açısından zengin gıdaların işlenmesinde endüstriyel potansiyele sahip olabileceği değerlendirilmiştir (Zou ve diğ, 2018).

Ultrases destekli ekstraksiyon (UAE), akustik kavitasyon etkisi yoluyla matriste mikro-kanallar oluşturur ve bu durum hedef bileşiklerin çözücüler içine salınmasını kolaylaştırır.

Bu yöntem, düşük sıcaklık ve kısa ekstraksiyon süreleri ile biyolojik bileşiklerin yapısal bütünlüğünü korur. Chemat ve Vian (2014), fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda ultrases teknolojisinin etkinliğini inceleyen çalışmalarında, bu yöntemin hem ekstraksiyon verimini hem de süreç etkinliğini anlamlı ölçülerde arttırdığını belirtmiştir. Ayrıca, bu yöntemin enerji tüketimi açısından geleneksel yöntemlere göre daha avantajlı olduğu vurgulanmıştır.

Ultrasesin ‘Yeşil Ekstraksiyon’ yöntemi olarak belirtildiği ve çevre dostu bir uygulama olabileceğinin vurgulandığı bir başka çalışmada ise ultrasesin bitkisel yağlar, fenolik bileşikler ve protein ekstraksiyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Geleneksel yöntemlere kıyasla daha düşük sıcaklıklarda zeytin yapraklarından oleuropein çıkarılmasında %25 daha fazla verim elde edilmiştir. Chemat ve diğ. (2017), yeşil ekstraksiyon teknolojilerinin gelişimine önemli katkılar sağlamış olup özellikle gıda ve ilaç endüstrisinde, ultrasesin çevre dostu çözümler sunduğu ve geleneksel yöntemlerin yerini alabileceği vurgulanmıştır.

Wang ve Weller (2006) bitkisel kaynaklardan biyoaktif bileşiklerin daha kısa sürelerde daha az çözücü kullanımı ile ekstrakte edilmesi üzerine çalışmışlardır. Çalışmada soğuk pres, çözücü bazlı ekstraksiyon gibi geleneksel yöntemlerle ultrases yönteminin farklı frekans ve süreleri karşılaştırılmıştır. Yapılan değerlendirmede geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine kıyasla ultrases destekli ekstraksiyonda %20-50 daha fazla verim sağlamıştır. Üzüm kabuğu örneğinden fenollerin eldesinde ultrases kullanıldığında toplam fenolik bileşik miktarının önemli ölçüde arttığı görülmüştür.

Ultrases işlemi, kısa sürelerde dahi etkili sonuçlar sunabilen bir ekstraksiyon yöntemidir. Karki (2009), soya yapraklarından protein ekstraksiyonu için 2 dakika boyunca 475 W güç uyguladığında, geleneksel yöntemle kıyasla %34'lük bir ekstraksiyon artışı bildirmiştir. Bu çalışma, ultrases teknolojisini kullanırken optimum zaman ve genlik etkileşiminin doğru bir şekilde belirlenmesinin önemini vurgulamaktadır. Benzer şekilde, Zhang ve diğ. (2011), yağı alınmış yer fıstığı tozundan fıstık protein izolatının ekstraksiyonuna yardımcı olmak için alkali ekstraksiyon ve asit çökeltmesi ile birlikte ultrasonik dalga kullanmıştır. Bu çalışmada, 210 W güç ve 40 °C’de 30 dakika uygulama sonucunda ekstraksiyon veriminin %80.09’a ulaştığı rapor edilmiştir.

Akbağ (2024), susam küspesinden protein ekstraksiyonuna ultrasesin etkisini araştırdığı çalışmada ultrases ön işleminden sonra toplam protein veriminde yaklaşık %30'luk artış tespit etmiştir. Yapılan benzer bir çalışmada, pirinç kepeği proteinlerinin ultrases destekli ekstraksiyon sonrası antioksidan ve antiproliferatif özellikleri incelenmiştir. İşçimen ve Hayta (2018) tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada, 400 W güç kullanılarak 30 dakika

süreyle ultrases uygulanan örneklerden %39,85 toplam protein verimi elde edilmiştir. Bu sonuçlar, ultrases teknolojisinin protein ekstraksiyonunda etkili bir yöntem olduğunu ve ekstrakte edilen proteinlerin biyolojik özelliklerini koruyarak daha verimli bir işlem sunduğunu göstermektedir

Liu ve diğ, (2018) ultrasesin peyniraltı suyu proteinlerinin ekstraksiyonunda kullanımı üzerine yapılan bir çalışmada, 200 W gücünde ultrases uygulamasının protein çözünürlüğünü artırdığı ve biyoaktif peptit oluşumunu teşvik ettiği rapor edilmiştir. Bu çalışma, ultrasesin süt proteinlerinin biyolojik özelliklerini koruyarak ekstraksiyona olan katkısını vurgulamaktadır.

Ultrases uygulamasının süt proteinleri üzerine etkilerini inceleyen Arzeni ve diğ, (2012) ultrasesin protein moleküllerinin yüzey özelliklerini değiştirdiği ve emülsifikasyon kapasitesini artırdığı belirtilmiştir. Aynı zamanda süt proteinlerinin stabilitesini korurken daha yüksek verim elde edilmiştir. Benzer bir çalışmada Yanjun ve diğ, (2014) ultrases destekli süt protein konsantrelerinin işlenmesinde 20 kHz frekansta uygulanan ultrasesin protein ekstraksiyon verimini artırdığı ve proteinlerin sindirilebilirliğini geliştirdiği belirtmiştir.

Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE) ise, mikrodalga enerjisinin özellikle polar molekülleri hedef alarak hızlı bir şekilde ısıtma sağlaması esasına dayanır. Bu teknik, gıda matrisi içinde su moleküllerinin ve diğer polar bileşiklerin enerji soğurması ile ekstraksiyonu destekler (Eskilsson ve Björklund, 2000). Mikrodalga yönteminin kullanıldığı çalışmalar, bu yöntemin düşük sıcaklık aralıklarında bile etkili olduğunu ve hedef bileşiklerin yapısal stabilitesini koruduğunu göstermiştir. López-Salazar ve diğ, (2023) bitki kaynaklı biyoaktif bileşiklerin mikrodalga yöntemi ile ekstraksiyonunda elde edilen verim artışını rapor etmiştir.

Zhang ve diğ, (2018) mikrodalga yönteminin süt proteinlerinden β -laktoglobulin izolasyonuna olan etkilerini araştıran bir çalışmada, 700 W gücündeki mikrodalga uygulamasının ekstraksiyon süresini %50 oranında azalttığı ve protein verimini artırdığını rapor etmiştir.

Perino-Issartier ve diğ, (2012) tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise, mikrodalga destekli ekstraksiyonun süt proteinlerinin izolasyonu üzerindeki etkilerini detaylı bir şekilde incelenmiştir. Çalışmada özellikle mikrodalga enerjisinin, ekstraksiyon süreçlerini hızlandırmadaki potansiyeli ve proteinlerin fonksiyonel özelliklerini koruyarak verimliliği

artırması üzerine odaklanılmıştır. Sonuçlara bakıldığında toplam ekstraksiyon süresinin %50 kısaldığı, süt proteinlerinden kazein ve peyniraltı suyu proteinlerini izole etmede geleneksel yöntemlere kıyasla %20-40 arasında daha yüksek verim sağlandığı tespit edilmiştir.

Her iki yöntemin birleştirilerek kullanıldığı hibrit sistemler de son yıllarda önem kazanmıştır. Bu hibrit teknikler, ultrases ve mikrodalga enerjisinin birleşimiyle ekstraksiyon etkinliğini daha da artırabilmektedir. Dahham ve diğ, (2015) hibrit yaklaşımların özellikle antioksidan bileşiklerin ekstraksiyonunda umut vaat ettiğini göstermiştir. Bu modern yöntemlerin önemli bir avantajı, hem ekstraksiyon etkinliğinin artırılması hem de hedef bileşiklerin yapısal bütünlüğünün korunmasıdır. Ancak, bu teknolojilerin uygulanabilirliği, analiz edilecek bileşiklerin özelliklerine ve ekstraksiyon sırasında kullanılan parametrelere bağlı olarak değişebilmektedir. Bu nedenle, peynir gibi karmaşık gıda matrislerinde en uygun yöntemin seçilmesi büyük bir özen gerektirir (Barbosa-Cánovas ve diğ, 2020).

Liu ve diğ, (2020) ultrases ve mikrodalga yöntemlerinin birlikte kullandığı çalışmada, peyniraltı suyu proteinlerinin daha yüksek çözünürlük ve ekstraksiyon verimi sağladığını belirtmiştir. Ultrasesin kavitasyon etkisiyle proteinlerin parçalanmasını hızlandırdığı, mikrodalga'nın ise termal etkileri optimize ederek verimi artırdığı görülmüştür.

Mikrodalga ve ultrases teknolojilerinin etkililiği, çeşitli gıda bileşiklerinin ekstraksiyonunda detaylı olarak ele alınmıştır. Örnek olarak, Al-Dhabi ve diğ, (2017) tropikal meyvelerden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda mikrodalga ve ultrases tekniklerini karşılaştırmış ve her iki yöntemin geleneksel yöntemlere göre çok daha yüksek verim sağladığını rapor etmiştir. Benzer şekilde, Kallel ve diğ, (2014) zeytin yağı tortularından fenoliklerin ekstraksiyonunda ultrases yönteminin etkinliğini göstermiştir.

2.6 Ultrases ve Mikrodalga Uygulamalarının Süt Proteinleri Üzerine Etkisi

Ultrases dalgaları gıda proteinlerinde fiziksel, kimyasal, enzimatik veya bunların kombinasyon işlemleriyle yapısal değişiklikleri ve protein moleküler ağırlığının daha hızlı transferini teşvik edebilir (Cui ve diğ, 2020). Ultrasonun, fizikokimyasal özelliklerde ve besin kalitesinde herhangi bir kayıp veya bozulma olmaksızın süt ürünlerinin güvenliğini, işlevsel ve besinsel özelliklerini iyileştirmek için kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve olumlu etkileri vurgulanmıştır (Jeličić ve diğ, 2012; Jiang ve diğ, 2018). Ultrases ön işleminin yapısal proteinler üzerinde sıcaklık veya maruz kalma süresinin etkisinden daha büyük bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Abadía-García ve diğ, 2016). Bu etki, peynir altı suyu

proteinlerinde enzimlere karşı daha duyarlı hale getirebilecek pozitif yapısal değişikliklere neden olmasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, Ultrases biyoaktif peptit üretimini destekleyen bir araç olarak kullanılabilir (Abadía-García ve diğ., 2016). Ultrases uygulamasından sonra peynir altı suyunun işlevsel özelliklerindeki iyileşme, biyoaktif peptitlerin veya biyopeptitlerin salınmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Uluko ve diğ., 2013). Düşük frekanslı ve yüksek enerjili ultrasonikasyonun (20-100 kHz), süt proteinlerinin yapısal boyutunu ve şeklini değiştirmek için 20-25 kHz'de kullanılmasından daha etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca, uygun koşullar altında ultrasonikasyonun kullanılmasıyla, gıda bileşenleri arasındaki etkileşimlerin bileşenlerin temel yapısını değiştirmeden iyileştirilebileceği öne sürülmüştür. Yüksek basınçlı işleme (YG) ve mikrodalga (MW) işlemleriyle karşılaştırıldığında, ultrasonikasyonun esas olarak doğal kazein ve peynir altı suyu proteinlerinin yapısını etkileyen ek aktiviteleri vardır. Bu aktiviteler, yüksek güçlü, düşük frekanslı ultrasonikasyonun kesme etkisinden dolayı süspansiyonlardaki daha önce denatüre olmuş protein kümelerinin çözünmesini ve düşük güçlü yüksek frekanslı US tarafından oluşturulan radikallerin neden olduğu proteinlerin kimyasal yıkımını içerir. Ultrasonik teknoloji tarafından üretilen şok dalgaları ve mikro jetler nedeniyle süspansiyondaki agregaların daha fazla kuvvetle çarpıştığı iddia edilmiştir. Ultrasonikasyonun protein kümelerini bir arada tutan daha zayıf hidrofobik bağlantıları veya Van der Waals kuvvetlerini bozarak homojenize protein çözeltileri elde edildiğine inanılmaktadır. Hidrofobik etkileşimler, peynir altı suyundan yapılan peynir altı suyu protein konsantrelerinde (WPC) protein kümelerini bir arada tutar. Son çalışmalar, yeniden oluşturulmuş %5 (w/w) WPX çözeltisinin 20 kHz frekans ve 31 W güçte 60 dakika boyunca sonikasyonunun, ortalama parçacık boyutunu 200'den 125 nm'ye düşürebileceğini göstermektedir. Benzer şekilde, yeniden oluşturulmuş peynir altı suyu proteini izolatının bir süspansiyonunun 20 kHz frekans ve 34 W/cm² güçte iki dakika boyunca sonikasyonunun, agregat boyutunda %50'lik bir azalmaya yol açabileceği bulunmuştur (Mehra ve diğ., 2021). Daha ileri araştırmalar, sonikasyon uygulanmış süt proteini konsantresi, sodyum kazeinat ve denatüre kazein-peynir altı suyu proteini karışımı çözeltilerinin de 20 kHz frekans ve 300 W elektrik gücü veya 34 W/cm² güç yoğunluğunda ultrasonikasyonla işlendiğinde agregat boyutlarında benzer bir azalma yaşadığını göstermiştir. Bazı çalışmalarda banyo ultrasonikasyonunun (40 kHz, 1 W/cm²) ve prob ultrasonikasyonunun (20 kHz, 43-48 W/cm²) WPC' deki agregaları azaltmadaki etkisi incelenmiştir. Prob bazlı ultrasonikasyon daha yüksek kaviteasyon bölgesi ile sonuçlanır, enerji kayıplarını önler ve en iyi sonuçları verir (Mehra ve diğ., 2021). Ayrıca, daha yüksek radyasyon yoğunluklarındaki

ultrasonikasyon kazein misellerini bozarak ve misel boyutunu azaltarak süt proteinlerini değiştirebilir. Pugliese ve diğ, (2017), 10 dakika boyunca 22,5 kHz ve 50 W'da ultrasonikasyonla yağsız süt parçacıklarının boyutunun azaldığını bildirmiştir. Başka bir çalışma, kazein misellerini ayrıştırmak için daha iyi bir potansiyeli sürdürmek için ultrasonikasyonun kullanımını açıklamıştır (Murtaza ve diğ, 2023). Ayrıca, süt yüksek pH'ta 15 dakika boyunca 20 kHz ve 286 kJ/kg güçte sonikasyona tabi tutulmuş ve ardından nötralize edilmiştir. Kazein misellerinin, mekanik kuvvetlere karşı daha yüksek duyarlılık sağlayan elektrostatik itmeler nedeniyle daha yüksek pH'ta genişlediği bulundu (Corredig ve diğ, 2016). Kazeinlerin ultrasonikasyonu hala daha fazla araştırmaya ihtiyaç bulunmaktadır. Yapılan bir çalışma, peynir altı suyu proteinlerinin US'de çeşitli yapısal değişikliklere uğradığını, 20 kHz ve 31 W'daki sonik kaymanın peynir altı suyu proteinlerinin açılmasına neden olduğu bildirildi. Ancak, 10 dakikadan fazla ultrasonikasyonda sonuçlar peynir altı suyu proteinlerinin hidrofobik etkileşimler nedeniyle kümeler oluşturduğunu gösterdi (Munir ve diğ, 2019).

Ultras (US) teknolojisi, düşük frekanslı yüksek enerji uygulamasıyla protein yapılarını değiştirme ve enzimatik reaksiyonları hızlandırma potansiyeline sahiptir. Süte ultras uygulanması, raf ömrünü uzatmak, homojenizasyon, parçacık boyutunu küçültmek için yapılmaktadır. Süt proteini kazein (~%80) ve peynir altı suyu (~%20) fraksiyonlarından oluşur, ilki misel formunda ve ikincisi küresel formdadır. Chandrapala ve diğ, (2012), ultrasin kazein misel bütünlüğü üzerindeki etkisini incelemiştir. Araştırma sonuçları ultrasin kazein miselinin, misel olmayan kazeinin ve peynir altı suyu proteini agregatlarının daha küçük parçacıklara parçalanmasına yardımcı olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum doğal protein yapılarında gizli olan yeni protein hidrolizatları ve peptitler, ultrasonikasyon desteğiyle üretilbildiği bildirilmiştir.

Yapılan çeşitli çalışmalarda proteinlerin sindirim işlemine mikrodalga ve ultras desteği uygulanmıştır. Mikrodalga destekli sindirim işlemi ile, proteinin üç boyutlu yapısının bozulmasına neden olan bipolar moleküllerin dönmesiyle enzimatik parçalanmayı hızlandırabileceğini ve bu da daha önce proteolitik enzim için erişilemeyen bazı protein bölgelerini açığa çıkarabileceğini bildirmişlerdir (Chen ve diğ, 2014). Ultras destekli sindirimin ise işlem süresini kısaltmada yüksek verimlilik gösterdiği bildirilmiştir (Kadam ve diğ, 2015). Ultras desteğinin mekanizması tam olarak açıklanmamış olsa da kaviteasyon olayı ve ısıtmanın bir sonucu olarak difüzyon oranlarındaki artışla ilişkilendirilmiştir (Santos

ve diğ, 2007). Kavitasyonla ezilme, protein yapısının bozulmasına ve hidrofilik grupların açılmasına neden olan büyük mekanik kesme kuvvetleri üretir. Bu yapısal olgu, enzim-substrat (protein) etkileşimini kolaylaştıran protein çözünürlüğünü artırır (Kadam ve diğ, 2015).

Mikrodalga uygulaması, süt proteinlerini termal etkiler yoluyla değiştirir. Yüksek sıcaklık nedeniyle özellikle whey proteinleri (β -laktoglobulin, α -laktalbumin) denatüre olabilir ve bu durum proteinlerin çözünürlüğünü ve fonksiyonel özelliklerini etkileyebilir (Alikhani ve Fadavi, 2020). Mikrodalga ile ısıtma sırasında, whey proteinleri kazein miselleriyle etkileşime girerek çökmeye veya jel oluşumuna neden olabilir (Şahin ve diğ, 2018). Ayrıca, kazein miselleri mikrodalga enerjisiyle daha gevşek bir yapı kazanabilir ve agregasyon eğilimleri artabilir, bu da süt ürünlerinin viskozitesini değiştirebilir (Patel ve diğ, 2016). Köpüklenme ve emülsiyon stabilitesi de bu süreçten etkilenebilir (Dissanayake ve Vasiljevic, 2009). Geleneksel ısıl işlemlere kıyasla, mikrodalga pastörizasyonu daha kısa sürede gerçekleştiğinden proteinlerin besin değeri büyük ölçüde korunur ve aşırı ısıya maruz kalmadıkça amino asit kaybı minimal seviyede kalır (Huppertz ve Fox, 2019). Ayrıca, mikrodalga ısıtması sırasında Maillard reaksiyonu daha az meydana geldiğinden, istenmeyen renk ve tat değişiklikleri minimize edilir (Gul ve diğ, 2021). Ancak, kontrolsüz yüksek sıcaklıklarda süt proteinleri fazla denatüre olabilir ve agregasyon artarak protein-protein etkileşimleri kuvvetlenebilir (Guo ve Wang, 2017). Sonuç olarak, mikrodalga uygulaması süt proteinleri üzerinde denatürasyon, çökme ve fonksiyonel değişimlere yol açabilir ancak kontrollü kullanıldığında süt ürünlerinin işlenmesinde verimli ve besin değeri açısından avantajlı bir yöntem olabilir (Tomasula ve Kozempel, 2004).

Mikrodalga ve ultrases yöntemlerinin ekstraksiyon süreçlerine etkisini inceleyen çalışmalar, bu yöntemlerin etkinliğinin farklı bileşik grupları için optimize edilmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Sonuç olarak, peynirdeki azotlu organik maddelerin ekstraksiyonuna yönelik yöntemlerin geliştirilmesi hem bilimsel çalışmalar hem de endüstriyel uygulamalar için önemlidir. Mikrodalga ve ultrases gibi yenilikçi teknolojiler, bu alanda yeni kapılar açarak, peynirdeki azotlu maddelerin analizinde daha hassas ve hızlı çözümler sunacaktır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Bu çalışmada materyal olarak piyasadan temin edilen peynirin bileşim özellikleri Çizelge 3.1 de verilmiş olup en az 9 Ay olgunlaştırılmış ‘‘Klasik İnek Beyaz Peynir’’ kullanılmıştır.

Çizelge 3.1: Beyaz peynirin genel bileşim özellikleri.

Enerji ve Besin Öğeleri	100 g için
Enerji	1213 kj
Yağ	25 g
Karbonhidrat	1 g
Protein	17,2 g
Tuz	2,7 g

3.2 Yöntem

3.2.1 Suda çözünen azot oranlarının belirlenmesi

Suda çözünen azotlu maddelerin ayrılması için, 20 g beyaz peynir örneği tartılarak üzerine 40 °C’de 40 mL saf su eklenmiş ve Ultra Turrax (Janke & Kunkel KG, IKA, WERK; 14000 x rpm, 2 dk) blender kullanılarak homojenize edilmiştir. Kontrol grubu için örnekler 40 °C’deki su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. Mikrodalga ve Ultrases destekli ekstraksiyonda ise homojenize edilen peynir çözeltilisine Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3 de belirtilen parametreler uygulanmıştır.

Ardından karışım, 3000 × g’de, 4 °C’de ve 30 dakika süreyle santrifüj (Universal 320 R, Hettich, Germany) işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj işlemi sonrasında, üst kısımda oluşan yağ tabakası bir spatül yardımıyla uzaklaştırılmış ve sıvı faz, Whatman No.113 filtre kağıdından süzölmüştür. Elde edilen filtrat, mezür yardımıyla 100 mL’ye tamamlanmıştır. Filtrattan 10 mL alınarak, standart Kjeldahl metodu uygulanarak suda çözünen azot oranı hesaplanmıştır. Bunun için, 10 mL filtrat Kjeldahl tüplerine aktarılmış ve üzerine 1 g katalizör (30g K₂SO₄+ 1 g CuSO₄) ilave edilmiştir. Ardından, 10 mL %98’lik H₂SO₄ eklenerek tüp içeriği, açık yeşil bir renk oluşuncaya kadar 430 °C’de yakılmıştır.

Çizelge 3.2: Mikrodalga destekli ekstraksiyon uygulama parametreleri.

Örnek kodu	Mikrodalga Gücü (W)Süre (sn)	Ekstraksiyon Süresi (sn)
MD 1	90 W	30 sn
MD 2	90 W	40 sn
MD 3	90 W	50 sn
MD 4	90 W	60 sn

Çizelge 3.3: Ultrases destekli ekstraksiyon uygulama parametreleri.

Örnek kodu	Ultrases Gücü (, Watt)	Ekstraksiyon Süresi Süre (=dk)
US 1	60 A, 52 W	1 dk
US 2	60 A, 52 W	5 dk
US 3	60 A, 52 W	10 dk
US 4	60 A, 52 W	15 dk

Soğutulan tüplerdeki distilat, 0.1 M HCl çözeltisi ile titre edilerek sonuçlar aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır. (IDF, 1993).

$$\% \text{ Suda çözünen azot} = \frac{[1,4 \times (V1 - V0) \times M \times F]}{m}$$

V1 :Örnek için harcanan HCl, mL

V0 :Kör örnek için harcanan HCl, mL

M :HCl çözeltisinin molaritesi

F :HCl çözeltisinin faktörü

m: Örnek miktarı, g

Olgunlaşma derecesi, suda çözünen azot miktarının toplam azota oranı olarak ifade edilmekte olup, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Hayaloğlu, 2003).

$$\text{Olgunlaşma Derecesi} = \frac{\% \text{ Suda Çözünen Azot}}{\% \text{ Toplam Azot}} \times 100$$

3.2.2 pH 4.6'da çözünen azot oranlarının belirlenmesi

Bölüm 3.2.1 de belirtilen homojenizatın pH'sı 1 M HCl ile 4.6' ya ayarlanmıştır. pH'sı ayarlanan örneklerden kontrol grubu 1 saat süreyle su banyosunda bekletilmiş diğer örneklere ise Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3 de belirtilen parametrelerde mikrodalga ve ultrases

işlemi uygulanmıştır. Ardından protein içeren ekstraktlar, 3000 × g'de, 4 °C'de ve 30 dakika süreyle santrifüj (Universal 320 R, Hettich, Germany) işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj işlemi sonrasında, üst kısımda oluşan yağ tabakası bir spatül yardımıyla uzaklaştırılmış ve sıvı faz, Whatman No.113 filtre kağıdından süzölmüştür. Elde edilen filtrat, mezür yardımıyla 100 mL'ye tamamlanmıştır. Bu filtrattan 10 mL alınarak Kjeldahl tüplerine aktarılmış ve üzerine 1 g katalizör (30 g K₂SO₄ + 1 g CuSO₄) ilave edilmiştir. Ardından, 10 mL %98'lik H₂SO₄ eklenerek tüp içeriği, açık yeşil bir renk oluşuncaya kadar 430 °C'de yakılmıştır. Soğutulan tüplerdeki distilat, 0.1 M HCl çözeltisi ile titre edilerek sonuçlar aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır. (IDF, 1993).

$$\% \text{ pH 4.6'da çözünen azot} = \frac{[1,4 \times (V_1 - V_0) \times M \times F]}{m}$$

V₁ :Örnek için harcanan HCl, mL

V₀ :Kör örnek için harcanan HCl, mL

M :HCl çözeltisinin molaritesi

F :HCl çözeltisinin faktörü

m: Örnek miktarı, g

Olgunlaşma derecesi, pH 4.6'da çözünen azot miktarının toplam azota oranı olarak ifade edilmekte olup, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Hayaloğlu, 2003).

$$\text{Olgunlaşma Derecesi} = \frac{\% \text{ pH 4.6'da Çözünen Azot}}{\% \text{ Toplam Azot}} \times 100$$

3.2.3 %12'lik TCA'da çözünen azot oranlarının belirlenmesi

Bölüm 3.2.1 de belirtilen suda çözünen azot analizi için elde edilen filtrattan 25 mL alınarak, eşit hacimde %24'lük (w/w) TCA çözeltisi ile karıştırılmış ve karışımın son TCA konsantrasyonu %12 olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan bu karışım, oda sıcaklığında oda sıcaklığında yaklaşık 2 saat süreyle bekletilmiştir. Bu sürenin ardından, karışım Whatman No.113 filtre kağıdından süzölür ve elde edilen filtrattan 10 mL alınarak standart Kjeldahl metodu ile TCA'da çözünür kısmın azot içeriği belirlenmiştir. Sonuçlar aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\%12'lik\ TCA'da\ \text{çözünen azot} = \frac{[1,4 \times (V_1 - V_0) \times M \times F]}{m}$$

V_1 :Örnek için harcanan HCl, mL

V_0 :Kör örnek için harcanan HCl, mL

M :HCl çözeltisinin molaritesi

F :HCl çözeltisinin faktörü

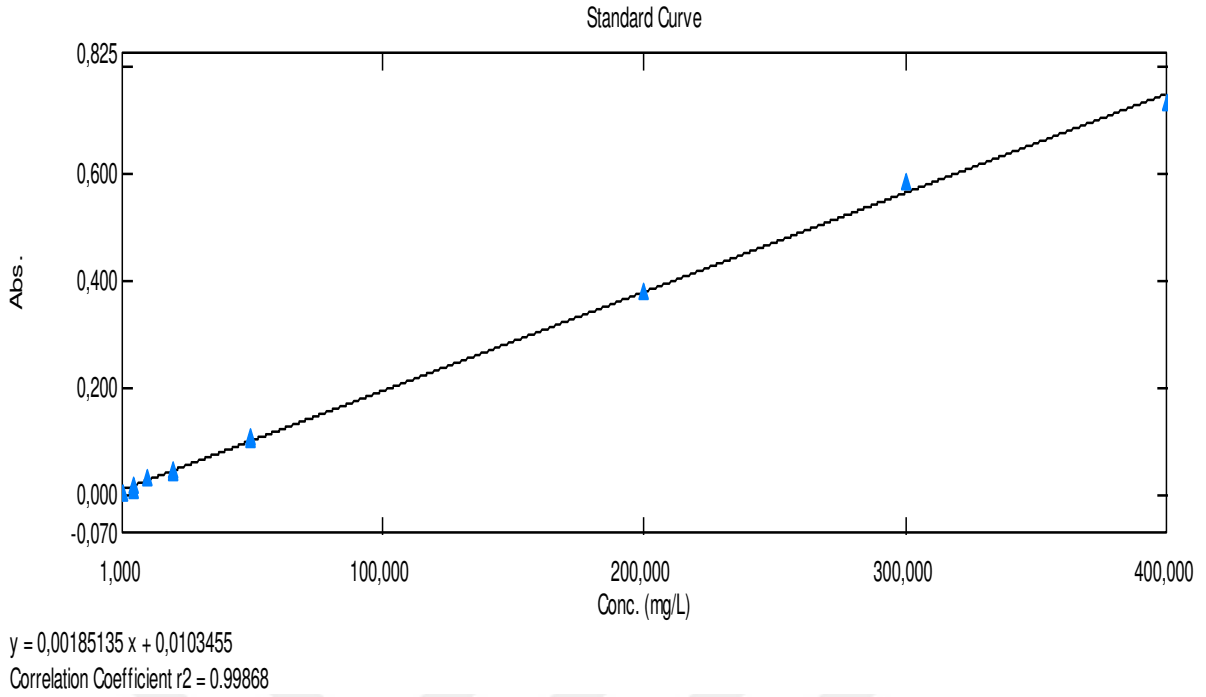
M : Örnek miktarı, g

Olgunlaşma derecesi, TCA'da çözünen azot miktarının toplam azota oranı olarak ifade edilmekte olup, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Hayaloğlu, 2003).

$$Olgunlaşma\ Derecesi = \frac{\% TCA'da\ \text{Çözünen Azot}}{\% Toplam Azot} \times 100$$

3.2.4 Toplam serbest aminoasit miktarı belirleme

Bu yöntemin prensibi, belirli reaktifler kullanılarak peptid bağlarının parçalanması sonucu bir amino grubunun serbest kalması ve bu grubun bir kromojenik madde ile reaksiyona girerek belli bir dalga boyunda verdiği absorbansın ölçülmesine dayanmaktadır. Bu amaçla, Kadmiyum-ninhidrin (Cd-Nr) reaktifi kullanılmıştır. Suda çözünen azot analizi için elde edilen filtrattan 10 µL alınarak saf su ile 1 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra, örneğe 2 mL Cd-ninhidrin çözeltisi ilave edilmiştir. (Cd-ninhidrin çözeltisi; 0.8 g ninhidrin, 80 mL etanol ve 10 mL asetik asit karışımında çözündürülerek hazırlanmış, ardından bu karışıma 1 mL suda çözünmüş 1.0 g CdCl₂ eklenmiştir) Hazırlanan bu karışım, 84 °C'de 5 dakika süreyle bekletilmiş ve sonrasında buzlu suda hızlıca soğutulmuştur. Elde edilen çözeltinin 507 nm'deki absorbans değeri, bir UV-spektrofotometre (Shimadzu, UV-1700, Kyoto, Japan) kullanılarak ölçülmüştür (Hayaloğlu, 2009). Sonuçlar lösin standardına göre hazırlanmış (0-400 mg/L) kalibrasyon eğrisi (Şekil 3.1) üzerinden hesaplanarak mg Leu/kg peynir olarak verilmiştir.



Şekil 3.1: Leu standardına ait kalibrasyon eğrisi.

3.2.5 Peynirde peptit profilinin RP-HPLC ile belirlenmesi

RP-HPLC, protein ve peptit ayırımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayırmada, gözenek boyutu 300 Å olan C4, C8 ve C18 kolonlar tercih edilmektedir. Gözenek boyutu 300 Å olan C18 kolonlar genelde molekül ağırlığı <5000 olan küçük peptitlerin ayırımında tercih edilmektedir. Suda çözünen fraksiyonların peptit analizleri, Shimadzu LC-20AD Prominence HPLC cihazı (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonya) kullanılarak ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Daha önce anlatılan (3.2.2) ve dondurularak kurutulmuş (Teknosem, Türkiye) olan, pH 4.6'da çözünür azot (pH 4.6-SN) fraksiyonundan 10 mg alınır ve 1 mL hareketli faz A (deiyonize su içerisinde %0.1 (v/v) TFA çözeltisi) içinde tamamen çözündürülür. Daha sonra 0.45 µm selüloz asetat filtreden (0,45 µm, Sterlitech Corp. WA, USA) geçirilir ve HPLC sistemine 80 µL enjekte edilmiştir (Hayaloğlu ve diğ, 2005). Ayırma işlemi, 250 × 4.6 mm, 5 µm, 300 Å gözenek boyutuna sahip Jupiter C18 kolon (Phenomenex Co., Torrance, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Peptit profillerinin değerlendirilmesi 214 nm dalga boyunda yapılmıştır.

Örnekler ilk olarak 5 dakika %100 A çözücüsü ile ardından 55 dakika boyunca %0-50 B (HPLC saflığında asetonitril içerisinde %0.1 (v/v) TFA çözeltisi) çözücüsünden

geçirilmiştir. Bunu takiben, örnekler 6 dakika %50 B çözücüsünde, daha sonra 4 dakika %50-60 B çözücüsünde, son olarak ise 3 dakika %60 B çözücüsünde tutulmuştur. Kolon, 5 dakika boyunca %95 B çözücüsü ile yıkanmış ve sonraki enjeksiyonlar için %100 A çözücüsü ile yeniden kalibre edilmiştir. Akış hızı 0.75 mL/dk olarak ayarlanmıştır.

3.2.6 Poliakrilamid Jel Elektrophorez ile protein fraksiyonlarının belirlenmesi

Poliakrilamid jel elektrophorezi (PAGE) süt proteinlerinin ve bu proteinlerin hidrolizi sonucu oluşan peptitlerin tespitinde veya tanımlanmasında sıklıkla kullanılan bir ayırma tekniğidir. Bunun için üre poliakrilamid jel elektrophorez (Üre-PAGE) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, proteinlerin moleküler büyüklüklerine ve yüklerine göre ayrılmasını sağlayan bir elektrophorez tekniğidir. Üre, denatüre edici bir ajan olarak kullanılarak proteinlerin doğal yapılarını bozar ve moleküler ağırlıklarına göre ayırma sağlanır. Bu çalışmada, elektrophorez işlemi PROTEAN II XI dikey slab-jel ünitesi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Jelin hazırlanışı ve elektrophorezin uygulanması aşağıda belirtildiği şekilde yapılmıştır.

Stok Çözeltinin Hazırlanışı

Akrilamid Çözeltisi; Saf suda %40 (w/v) konsantrasyonunda hazırlanmış şekilde kullanılmıştır (Merck, Darmstadt, Almanya).

Sıralama jel tamponu; 4.15 g tris (hydroxymethyl) aminomethane, 150 g üre ve 2.2 mL konsantre HCl, saf su içinde çözülerek toplam hacim 500 mL'ye tamamlanmıştır. Çözeltinin pH değeri, HCl ile 8.9 olarak ayarlanmıştır.

Ayırma jel tamponu; 32.15 g tris (hydroxymethyl) aminomethane, 192.85 g üre ve 2.86 mL konsantre HCl, saf su içinde çözülerek toplam hacim 500 mL'ye tamamlanmıştır. Çözeltinin pH değeri, HCl ile 8.9 olarak ayarlanmıştır.

Elektrot tamponu; 15 g tris (hydroxymethyl) aminomethane ve 73 g glisin, saf su içinde çözülerek toplam hacim 5 L'ye tamamlanmıştır.

Örnek tamponu; 0.75 g tris (hydroxymethyl) aminomethane, 49 g üre, 0.4 mL konsantre HCl, 0.7 mL 2-mercaptoethanol ve 0.15 g bromophenol blue, saf su içinde çözülerek toplam hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Amonyum persulfat; Saf suda %10 (w/v) konsantrasyonunda hazırlanmış çözeltiden 1'er mL, Eppendorf tüplerine aktarılmış ve daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

Boyama çözeltisi; Coomassie Brilliant Blue G250, %0.2 (w/v) konsantrasyonunda hazırlanmış ve eşit hacimde 1 M H₂SO₄ ile karıştırıldıktan sonra bir gece bekletilmiştir. Ardından, çözelti Whatman No. 1 filtre kağıdından süzölmüş ve 9:1 oranında 10 M KOH ile karıştırılmıştır. Daha sonra, çözeltiye %12 oranında trikloroasetik asit ilave edilmiştir.

Jel Çözeltilerinin Hazırlanışı

Yükleme jel çözeltisi; 5 mL akrilamid çözeltisi, 45 mL yükleme jel tamponu ve 0.1 g N,N,N',N'-metilen bisakrilamid karıştırılmış, ardından karışım Whatman No. 113 filtre kağıdından süzölmüştür. Elde edilen filtrata 25 µL N,N,N',N'-tetramethylethylene diamine (TEMED) ilave edilmiştir.

Ayırma jel Çözeltisi; 22.5 mL akrilamid çözeltisi, 52.5 mL ayırma jel tamponu ve 0.375 g N,N,N',N'-metilen bisakrilamid karıştırılmış, ardından karışım Whatman No. 113 filtre kağıdından süzölmüştür. Elde edilen filtrata 37.5 µL N,N,N',N'-tetrametiletillen diamin (TEMED) ilave edilmiştir.

Örneğin Hazırlanışı

Dondurularak kurutulmuş pH 4.6'da çözünmeyen azot fraksiyonundan 10 mg tartılmış ve 1 mL örnek tamponunda çözödürölmüştür.

Elektroforez Uygulaması

Elektroforez ünitesi (Bio-Rad Laboratories Ltd., Watford, UK), üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde kurulmuştur. Ayırma jel çözeltisine başlangıç polimerizasyonunu sağlamak amacıyla 282 µL amonyum persölfat eklenmiştir. Jel seviyesini ayarlamak için ayırma jel çözeltisi, her iki jel bölmesine dökölmüş ve jel taraklarının uçlarından yaklaşık 1 cm aşağıda olacak şekilde seviye belirlenmiştir. Üzerine saf su eklenmiş ve jel tamamen polimerize oluncaya kadar (~45 dakika) beklenmiştir. Daha sonra üst kısımda kalan su dikkatlice dökölmüştür.

Yükleme jel çözeltisine, 300 µL amonyum persölfat ilave edildikten sonra jel bölmesine dökölmüş ve taraklar uygun şekilde yerleştirilmiştir. Jel polimerizasyonunun tamamlanması

için yaklaşık 45-60 dakika beklenmiş, ardından taraklar dikkatlice çıkarılmıştır. Hazırlanan jeller, yeterli miktarda elektrot tamponu içeren elektroforez ünitesine yerleştirilmiştir

Elektroforez işlemi, jellere 30 dakika süreyle 280 V elektrik akımı uygulanarak başlatılmıştır. Na–kazeinat (standart, Sigma, St Louis, USA) ve protein içeren ekstraktlar Hamilton mikro şınga kullanılarak (10 µL) enjekte edilmiştir. Örnekler, önce yükleme jel tamponu boyunca 280 V'de, ardından ayırma jel tamponu boyunca 300 V'de yürütülmüştür. Boya izinin jel ünitesinin dip kısmına ulaşmasıyla örneklerin jelde yürütülmesi tamamlanmıştır. Analiz boyunca sistem, sürekli soğuk su sirkülasyonu ile soğutulmuştur.

Jelin boyanması

Elektroforez sisteminden çıkarılan jeller, hazırlanan jel boyama çözeltisinde bir gece bekletilmiştir. Bu işlem, jelde bulunan proteinlerin yoğunluklarına göre boya ile kompleks oluşturmalarını sağlamıştır. Boyanmış jeller, bantların dışında kalan kısımlardaki boyanın giderilmesi amacıyla saf su ile birkaç kez yıkanmıştır. Jellere ait denogram Phoretix 1D pro Tutorial v11.7 programı ile elde edilmiştir.

Jelin Değerlendirilmesi

Görüntülerin diğital olarak kaydedilmesi ve değerlendirilmesi amacıyla jeller HP Scanjet G4010 tarayıcı (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) kullanılarak bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Jellere ait denogram Phoretix 1D pro Tutorial v11.7 programı ile elde edilmiştir. Değerlendirmede, protein bantlarındaki densitometrik azalma ve/veya artma ile yeni protein bantlarının oluşumu dikkate alınmaktadır.

3.2.7 İstatiksel analiz

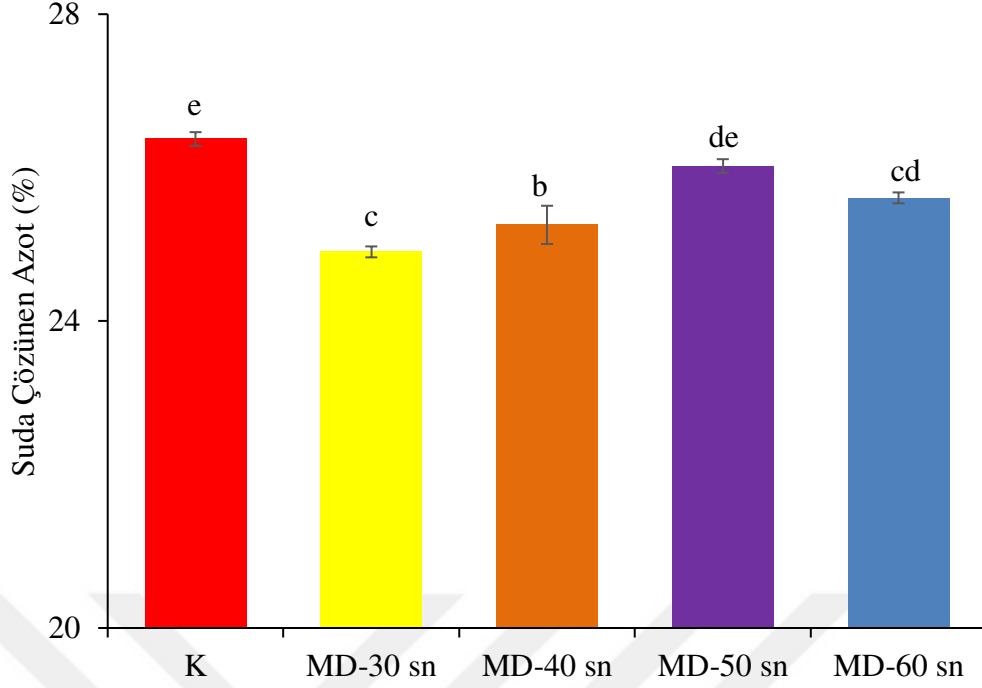
Elde edilen verilerin istatistik değerlendirilmesinde SPSS paket programı (versiyon 6.12) kullanılmıştır. Uygulanan ekstraksiyon yöntemleri arasındaki farkın önemi tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) yöntemiyle değerlendirilmiş ve gruplar arasındaki ortalamaların farklılıkları, Tukey oklu karşılaştırma testi ile analiz edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu bölümde mikrodalga ve ultrases uygulamalarının peynirde bulunan azotlu maddelerin ekstraksiyonuna etkisine dair yapılan analiz sonuçları verilmiş, bulunan sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve bu konularda yapılan başka çalışmalar ile karşılaştırılarak bulgular yorumlanmıştır.

4.1 Suda Çözünen Azot Oranı

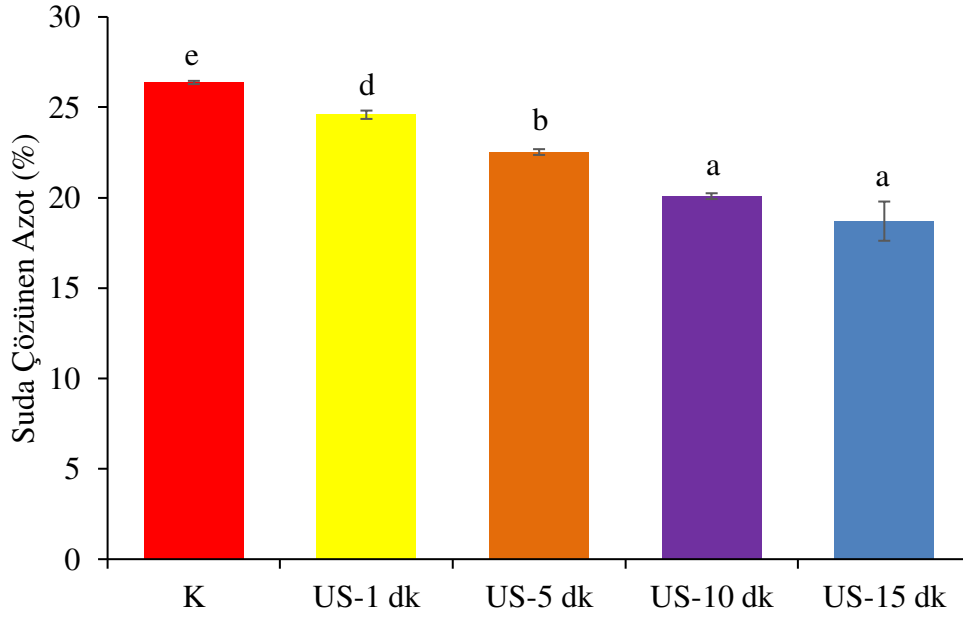
Farklı ekstraksiyon yöntemleri uygulanan protein izolatlarının suda çözünen azot oranları olgunlaşma indeksi üzerinden hesaplanarak değerlendirilmiştir. Mikrodalga uygulamasının suda çözünür azot oranlarına ait sonuçlar Şekil 4.1 ve Çizelge 4.5 'te verilmiştir. 40 °C'lik su banyosunda 1 saat bekletilen (Kontrol) örneklerinsuda çözünen azot oranının %26,37±0,08 olduğu belirlenmiştir. 30 sn'lik mikrodalga uygulamasında suda çözünen azot oranı %24,90±0,07, 40 sn'de %25,25±0,24, 50 sn' de %26,02±0,08 ve 60. sn'de %25,61±0,07 olduğu belirlenmiştir. Uygulanan ekstraksiyon süresinin suda çözünür azot oranına etkisi önemli bulunmuştur ($p<0,05$). 50 sn uygulanan mikrodalga uygulaması kontrol örnekleri ile benzer bulunmuştur. Proteinler ve peptitler yüksek dielektrik sabitine sahiptir ve mikrodalga uygulaması, proteinlerin aktivitesi ve yapısı üzerinde önemli bir etkiye sahip olmaktadır (Plagemann ve diğ, 2014). Bu nedenle uygulanan mikrodalga desteği ile 50 sn'lik sürede klasik ekstraksiyonla elde edilen suda çözünen azot oranına ulaşılmıştır. Yan ve diğ. (2014), araştırmasında mikrodalga uygulamasıyla 5 dakikalık işlem süresinin proteinin hızla parçalanarak azalabildiği ve protein alt fraksiyonlarının içeriğinin arttığı belirtilmiştir.



Şekil 4.1: Mikrodalga destekli ekstraksiyon uygulamasına ait SÇA oranı.

Benzer şekilde, Quitain ve diğ. (2006) proteinin amino asitlere bozunma hızını mikrodalga işlemiyle inceledikleri çalışmada geleneksel yöntemle kıyasla amino asit veriminde önemli bir artış olduğunu gösterilmiştir. Zhang ve diğ, (2018) mikrodalga yönteminin süt proteinlerinden beta-laktoglobulin ekstraksiyonuna olan etkilerini araştıran bir çalışmada, mikrodalga uygulamasının ekstraksiyon süresini %50 oranında azalttığı ve protein verimini artırdığını rapor etmiştir. Perino-Issartier ve diğ, (2012) tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise, mikrodalga destekli ekstraksiyonun toplam ekstraksiyon süresinin %50 kısaldığı, süt proteinlerinden kazein ve peyniraltı suyu proteinlerini izole etmede geleneksel yöntemlere kıyasla %20-40 arasında daha yüksek verim sağlandığı tespit edilmiştir. Ancak ekstraksiyon süresinin uzatılmasıyla (60sn) suda çözünen azot oranında bir azalma eğilimi görülmüştür ($p<0,05$). Yapılan literatür incelemesinde Chandini ve diğ, (2017) de yaptığı çalışmalar incelendiğinde mikrodalga yönteminin süt ve süt ürünlerindeki azotlu organik maddelerin çözünürlüğünü artırdığı ancak işlem süresinin kritik nokta olduğunu belirtmişlerdir. Mikrodalga grubunda 50 sn'lik sürede elde edilen verimin sürenin artmasıyla düşmesi bu görüşü desteklemektedir. 60 sn de protein oranının düşmesi Fox ve McSweeney (2004) de belirtmiş olduğu üzere sıcaklık artışının proteinlerin stabilitesini bozarak denatürasyona neden olmasıyla açıklanabilir.

Ultrases uygulamasının suda çözünür azot oranlarına ait sonuçlar Şekil 4.2 ve Çizelge 4.6 'da verilmiştir. 40' °C'lik su banyosunda 1 saat bekletilen (Kontrol) peynir örneklerin suda çözünen azot oranının $\%26,37 \pm 0,08$ olduğu belirlenmiştir. 1 dk'lık ultrases uygulamasında suda çözünen azot oranı $\%24,59 \pm 0,23$, 5 dk'de $\%22,53 \pm 0,16$, 10 dk' da $\%20,09 \pm 0,16$ ve 15 dk'da $\%18,70 \pm 1,08$ olduğu belirlenmiştir. Ultrasonikasyon sırasında kavitasyon kabarcıklarının oluşturulması, hücre duvarının lokalize olarak parçalanmasını ve hücrel bileşenlere daha fazla çözücünün nüfuz etmesini sağlayarak hücre içi ürünlerin salınmasına yol açar (Carpentieri ve diğ, 2021). Ek olarak, sonikasyon ısı üretir ve mekanik darbelerle eşleştirildiğinde süspansiyonda gözenek oluşumunu teşvik eder. Bu, ekstraksiyon işleminin verimini ve protein içeriğini artırmaktadır (Kingwascharapong ve diğ, 2021; Chalapud ve diğ, 2023). 1dk' lık US uygulaması ile $\%24,59 \pm 0,23$ suda çözünen oranına ulaşılmıştır. Liu ve diğ, (2020) ultrases ve mikrodalga yöntemlerinin birlikte kullandığı çalışmada, peyniraltı suyu proteinlerinin daha yüksek çözünürlük ve ekstraksiyon verimi sağladığını belirtilmiştir. Ultrasesin kavitasyon etkisiyle proteinlerin parçalanmasını hızlandırdığı, mikrodalga'nın ise termal etkileri optimize ederek verimi artırdığı görülmüştür. Ancak ultrases uygulama süresinin artmasının protein suda çözünürlüğü üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Ultrases uygulama süresinin artması protein yapısında denatürasyonun başladığını, özellikle 15 dakika gibi daha uzun süreli uygulamada, ultrasonik kavitasyonun protein yapısını bozarak çözünürlüğü önemli ölçüde azalttığı söylenebilir. Arzeni ve diğ, (2012) ultrasesin olumlu fizikokimyasal etkilerini olabileceğini ancak uzun süreli uygulamaların dezavantaj sağlayacağını savunmuştur. Uzatılmış süreye bağlı artan akustik kavitasyon, çözünür proteinlerin eş zamanlı yeniden agregasyonla denatüre olmasına ve böylece 15 dakikalık ekstraksiyon süresinde gözlemlendiği gibi daha düşük protein ekstraksiyon verimliliğine dolayısıyla daha düşük suda çözünen oranına neden olduğu bu bilgiye göre söylenebilir.



Şekil 4.2: Ultrases destekli ekstraksiyon uygulamasına ait SÇA oranı.

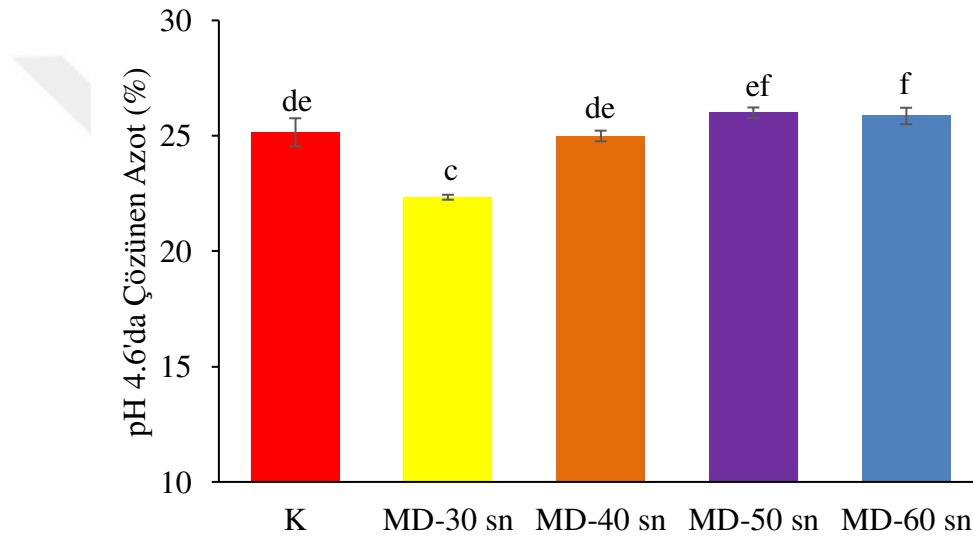
Mikrodalga ve ultrases ekstraksiyon yöntemleri kendi aralarında değerlendirildiğinde, (Çizelge 4.1) mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde özellikle 50 saniyede elde edilen %26,02±0,08 oranı, klasik ekstraksiyona oldukça yakın bir değer göstermektedir. Bu durum, mikrodalga yönteminin klasik yönteme alternatif olabilecek verimliliğe sahip olduğunu işaret etmektedir. Öte yandan, ultrases ekstraksiyon yöntemi süreye bağlı olarak azalan bir performans sergilemektedir. Süre arttıkça suda çözünen azot oranı belirgin bir şekilde düşmekte, 1 dakikalık sürede elde edilen %24,59±0,23 oranı en yüksek değer olarak görülmektedir. Ancak süre 15 dakikaya çıktığında oran %18,70±1,08 gibi oldukça düşük bir seviyeye inmiştir. Bu nedenle mikrodalga yöntemi, klasik ekstraksiyon değerlerine daha yakın sonuçlar sağladığı için genel anlamda daha avantajlı bir seçenek olarak görünmektedir.

Çizelge 4.1: Uygulanan üç farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen SÇA oranı.

Özellikler	Klasik Ekstraksiyon	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon		Ultrases Destekli Ekstraksiyon	
		Süre (saniye)		Süre (dakika)	
Suda Çözünen Azot (%)	26,37±0,08 ^e	30	24,90±0,07 ^c	1	24,59±0,23 ^d
		40	25,25±0,24 ^b	5	22,53±0,16 ^b
		50	26,02±0,08 ^{de}	10	20,09±0,16 ^a
		60	25,61±0,07 ^{cd}	15	18,70±1,08 ^a

4.2 pH 4.6 da Çözünen Azot Oranı

pH 4.6'da çözünür fraksiyonda da, suda çözünür azota benzer fraksiyonlar elde edilmektedir. pH 4.6'da, daha çok pıhtılaştırıcı enzim aktivitesi sonucu oluşan azot fraksiyonları ile proteoz-pepton azotu ve serum proteinleri bulunmaktadır. Farklı sürelerde uygulanan mikrodalganın pH 4.6'da çözünen azot oranlarına etkisi Şekil 4.3 de ve Çizelge 4.5'de görülmektedir. Klasik ekstraksiyon örneğinde pH 4.6'da çözünen azot oranının ($25,15 \pm 0,6$) MD-60sn örneği ile istatistiksel olarak fark olmadığı bulunmuştur ($25,86 \pm 0,36$) ($p > 0,05$). MD-40sn ($24,99 \pm 0,23$) ve MD-50sn ($26,00 \pm 0,23$) örneklerinin ise kontrol örneği ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

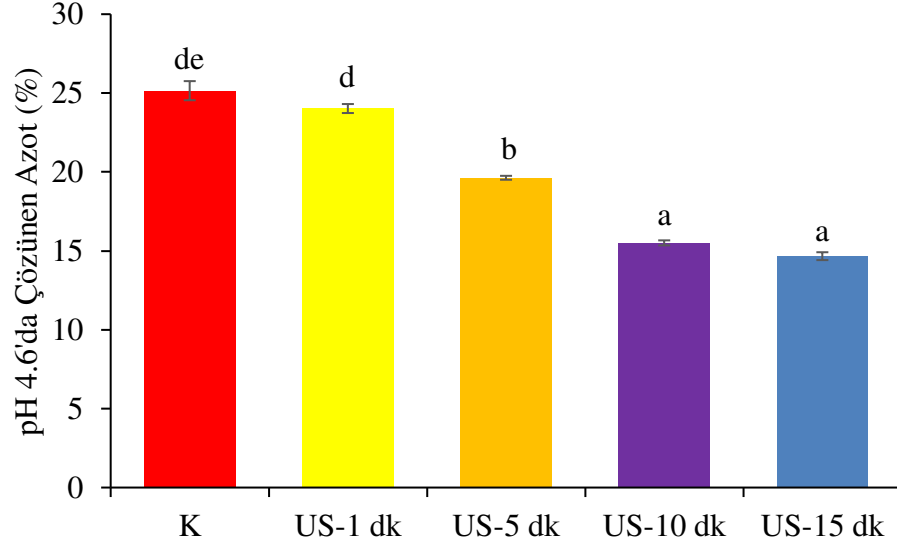


Şekil 4.3: Mikrodalga destekli ekstraksiyon uygulamasına ait pH 4.6-ÇA oranı

Bu azalma Zhang ve diğ. (2020) mikrodalga yönteminin sıcaklığı kısa sürede artırarak proteinlerin çözünürlüğünü artırmada etkili olduğunu ancak uzun süreli uygulamaların protein yapısında bozulmaya yani denatürasyona yol açacağını dolayısıyla çözünürlükte düşüş olacağını görüşüyle ilişkilendirilebilir. Jambrak ve diğ. (2008), peynir altı suyu proteinlerinin çözünürlüğünün ultrases uygulamasıyla (20 kHz) 15 ve 30 dakikada arttığını ve proteinlerin üçüncül yapısındaki değişikliklere atfedildiğini bildirdi. Başka bir çalışmada ise Barukčić ve diğ. (2015), pastörizasyon (30 dakikada 65 °C) veya 10 dakikada 60 W, 45 veya 55 °C'de ultrases (20 kHz) uygulandıktan sonra peynir altı suyunda farklı protein içerikleri buldular.

Ultrases işlem sürelerinin (1, 5, 10 ve 15 dakika) pH 4.6'da çözünen azot oranı (%) üzerindeki etkisi incelendiğinde (Şekil 4.4 ve Çizelge 4.6), klasik ekstraksiyon uygulanan

örnekte pH 4.6'da çözünen azot oranı $25,15 \pm 0,6$ ile en yüksek değerine sahipken bunu US-1 ($24,02 \pm 0,28$) örneği takip etmektedir ve klasik ekstraksiyonda belirtilen düzeye ulaşmıştır (Şekil 4.4). Proteinlerin moleküler yapısı sıcaklıkların yükselmesiyle daha esnek hale gelir ve su ile protein molekülleri arasındaki etkileşimleri kolaylaştırır (Dong ve diğ., 2019). Benzer olarak, Yang ve diğ. (2017) ultrason işleminin protein moleküllerinin açılmasına neden olabileceğini, böylece daha fazla proteinin açığa çıkmasına neden olarak yoğunluğunun artırdığını belirtmişlerdir. Bu nedenle, bu yaklaşım kullanılarak üretilen proteinler daha çözünürdür. Keçi sütü proteininin biyoaktivitesini değerlendirmek için ultrases ön işlemin ardından enzimatik hidrolizin etkisinin incelendiği bir çalışmada, ultrases işlemi, ultrasonikasyon süresi (20 dk) ve genlik (%80) değerlerinde elde edilen sonuçlar, ön işlemin optimum koşullar altında çözünür protein konsantrasyonunu $4,35 \pm 0,02$ mg/mL 'den $6,15 \pm 0,02$ mg/mL'ye çıkardığını gösterdi (Koirala ve diğ., 2021). Ancak, ekstraksiyon sıcaklığı belirli bir noktaya (60°C) yükseldiğinde kimyasal bağlar kırılmaya başlar. Bu moleküler yapının çökmesine ve çökmesine neden olarak ekstraksiyon verimini azaltır (Dong ve diğ., 2019). Bu nedenle, bu çalışmada protein ekstraksiyonu için ultrasonikasyonda süre, sıcaklığın 50°C yi geçmeyecek şekilde ayarlanmıştır. Yine de ultrases işlem süresinin artışı protein yapılarını olumsuz etkileyerek çözünürlüğün belirgin şekilde azalmasına ve buna bağlı olarak pH 4.6'da çözünen azot oranında önemli düzeyde azalmaya neden olmuştur ($p < 0.05$). Ultrasonik işlem sırasında, protein salınımı kaviteasyon kaynaklı fiziksel, mekanik ve kimyasal etkilerle sağlanır (Wen ve diğ., 2019). Ancak genişletilmiş ultrasonik maruziyet yani sürenin arttırılması kaviteasyon etkilerini artırabilir ve kütle transfer verimliliğini düşürebilir. Ayrıca, protein aktif bölgeleri açığa çıkabilir ve bozulabilir, bu da verimliliğini düşürebilir (Dong ve diğerleri, 2019). Chemat ve diğ., (2011) ultrasesin hücre duvarlarını parçalayarak proteinlerin biyolojik yapısını bozacağını, bu nedenle enerji miktarı ve süresine dikkat edilmesini önermektedirler. Çalışma sonuçlarımızı destekleyen literatür verileri de dikkate alındığında uzun süreli ultrases uygulamalarının proteinlerin yapısal bütünlüğünü bozarak çözünürlük üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu söylenebilir.



Şekil 4.4: Ultrases destekli ekstraksiyon uygulamasına ait pH 4.6-ÇA oranı.

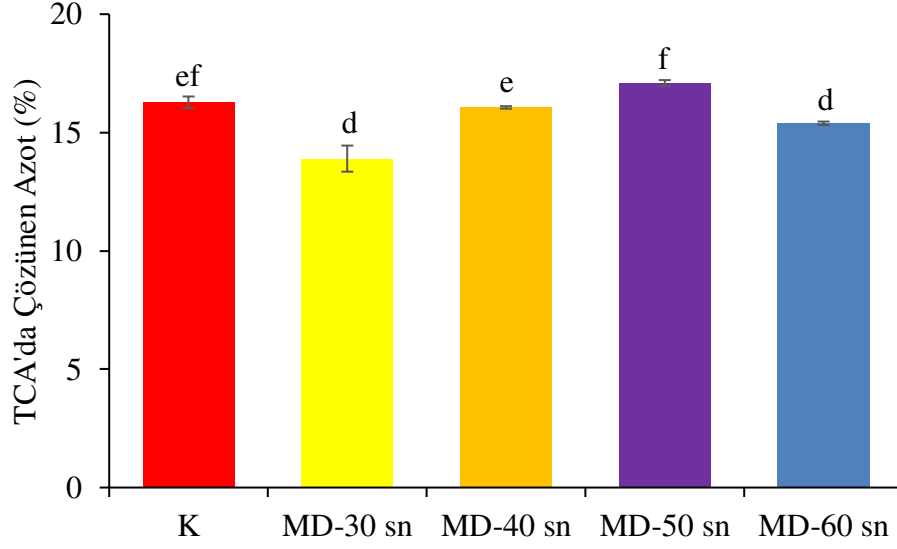
Çizelge 4.2' bakıldığında pH 4.6'da çözünen azot oranı açısından mikrodalga ve ultrases ekstraksiyon yöntemlerinin farklı değerlere sahip olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Üç farklı ekstraksiyon yöntemi arasında MD-50sn ($26,00\pm0,23$) en yüksek pH 4.6-ÇA oranına sahip örnek olduğu tespit edilmiştir. Klasik ekstraksiyon yönteminde pH 4.6-ÇA $25,15\pm0,6$ olduğu ve istatistiksel olarak MD-40 sn uygulama sonrası ($24,99\pm0,23$) pH 4.6-ÇA oranının klasik ekstraksiyon yöntemi ile aynı olduğu bulunmuştur. Ultrases yönteminde ise 1 dk'lık uygulama neticesinde ($24,02\pm0,28$) klasik ekstraksiyon yöntemine yakın sonuçlar elde edilmiştir. Uygun parametreler kullanıldığında her iki yönteminde klasik ekstraksiyona alternatif olarak kullanılabileceği görülmektedir.

Çizelge 4.2: Uygulanan üç farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen pH 4.6-ÇA oranı.

Özellikler	Klasik Ekstraksiyon	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon		Ultrases Destekli Ekstraksiyon	
		Süre (saniye)		Süre (dakika)	
pH 4.6'da Çözünen Azot (%)	25,15±0,6 ^{de}	30	22,34±0,11 ^c	1	24,02±0,28 ^d
		40	24,99±0,23 ^{de}	5	19,63±0,12 ^b
		50	26,00±0,23 ^{ef}	10	15,51±0,16 ^a
		60	25,86±0,36 ^f	15	14,66±0,25 ^a

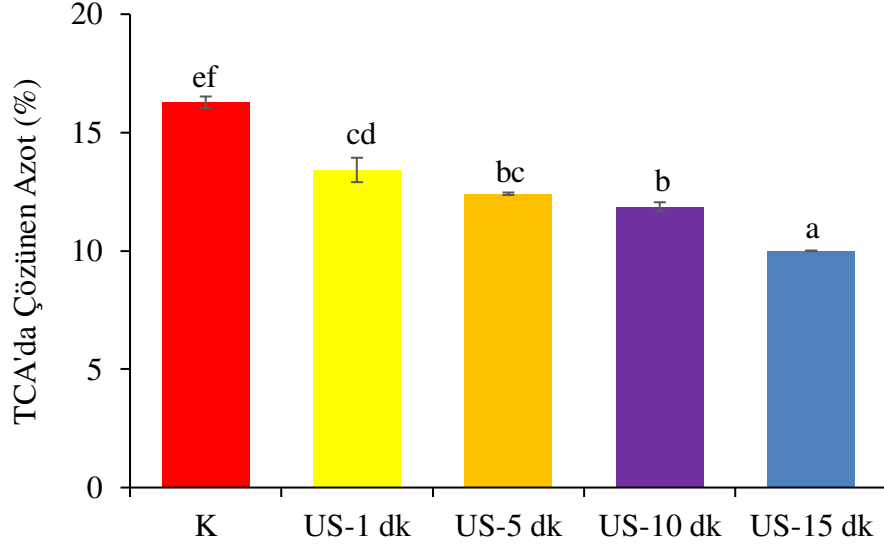
4.3 %12'lik Trikloroasetik Asitte Çözünen Azot Oranı Analizi

Trikloroasetik asit (TCA) çözünen azot analizi, peynirdeki proteoliz sürecinin belirlenmesi için yaygın olarak kullanılır. Bu analiz, özellikle küçük ve orta zincirli peptitler ve serbest amino asitler gibi düşük ağırlıklı, azotlu bileşiklerin belirlenmesine yöneliktir (Hayaloğlu 2003). TCA değişiklikleri azot fraksiyonları, proteoliz sonucu oluşan küçük peptitler ve serbest amino asitleri içerir (Ertekin 2007). Farklı sürelerde uygulanan mikrodalganın'nın %12 TCA'da çözünen azot oranlarına etkisi Şekil 4.5'te ve Çizelge 4.5'te görülmektedir. Klasik ekstraksiyon örneğinde TCA'da çözünen azot oranının ($16,27 \pm 0,24$) MD-40sn örneği ile istatistiksel olarak benzerlik gösterdiği ($16,06 \pm 0,05$) MD-50sn örneğin oranına göre ise daha düşük olduğu ($17,09 \pm 0,12$) belirlenmiştir. Perino-Issartier ve diğ, (2012) mikrodalga destekli ekstraksiyonun, ısının kontrollü kullanımıyla protein yapısını bozmadan verimi artırabileceğini ve bu yöntemin toplam ekstraksiyon süresini azalttığını belirtmiştir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yapılan izolatların 30. sn sonrası $13,90 \pm 0,55$ TCA'da çözünür azot oranı ile en düşük değerde olduğu, ekstraksiyon süresindeki artış ile TCA'da çözünür azot oranının önemli düzeyde yükseldiği belirlenmiştir. Zou ve diğ, (2018) mikrodalga destekli ekstraksiyonun protein hidrolizini hızlandırdığını, TCA'da çözünen azot oranını artırmada etkin bir yol olabileceğini tespit etmiştir. Özellikle kısa süreli uygulamalarda hem yüksek verim sağlaması hem de endüstriyel kullanıma uygun bir yöntem olması nedeniyle alternatif bir yol olabileceğini belirtmiştir. Ancak 60 sn'lik daha uzun süreli uygulamanın ise tam tersi etki yaparak TCA'da çözünen azot oranının $15,39 \pm 0,07$ seviyesine gerilemesine neden olmuştur. Bu azalma Zhang ve diğ, (2020) mikrodalga yönteminin sıcaklığı kısa sürede artırarak proteinlerin çözünürlüğünü artırmada etkili olduğunu ancak uzun süreli uygulamaların protein yapısında bozulmaya yani denatürasyona yol açacağını dolayısıyla çözünürlükte düşüş olacağını görüşüyle ilişkilendirilebilir.



Şekil 4.5: Mikrodalga destekli ekstraksiyon uygulamasına ait %12 TCA-ÇA oranı.

Ultrases işlem sürelerinin (1, 5, 10 ve 15 dakika) %12'lik TCA'da çözünen azot oranı (%) üzerindeki etkisine ilişkin değerler Şekil 4.6 ve Çizelge 4.6'te verilmiştir. Klasik ekstraksiyon örneğinde TCA'da çözünen azot oranının %16,27±0,24 ile en yüksek değer, ultrases ile 1 dakikalık uygulama sonrası elde edilen TCA'da çözünen azot oranının ise %13,42±0,52 olarak azalma gösterdiği ve uygulama süresinin arttırılmasıyla da önemli düzeyde düşüş olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). En düşük TCA'da çözünen azot oranı 15 dk süreyle uygulanan işlemde %10,00±0,20 olarak belirlenmiştir. Uzatılmış ultrasonik ekstraksiyon süresi (15 dk), 1 dakikalık işleme kıyasla daha düşük bir ekstraksiyon verimi göstermiştir. Uzatılmış süreye bağlı artan akustik kavitasyon, çözünür proteinlerin eş zamanlı yeniden agregasyonla denatüre olmasına ve böylece 15 dakikalık ekstraksiyon süresinde gözlemlendiği gibi daha düşük TCA'da çözünen azot oranına neden olabilir. Karki ve arkadaşları (2009), ultrases uygulamasının yağsız soya pulpasından elde edilen soya protein izolatlarının verimi ve fonksiyonel özellikleri üzerindeki etkilerini incelemiştir. Çalışma sonucunda, ultrases uygulamasının soya protein izolatlarının çözünürlüğünü artırdığı belirlenmiştir. Ancak, uzun süreli ultrases uygulamalarının proteinlerin doğal yapısını bozarak çözünürlükte azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar, ultrasesin verimli ve kontrollü bir şekilde kullanılabilmesi için uygulama koşullarının dikkatli bir şekilde seçilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.



Şekil 4.6: Ultrases destekli ekstraksiyon uygulamasına ait % TCA-ÇA oranı.

Çizelge 4.3'e bakıldığında %12'lik TCA'da çözünen azot oranı açısından mikrodalga ve ultrases ekstraksiyon yöntemlerinin farklı değerlere sahip olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Üç farklı ekstraksiyon yöntemi arasında MD-50 sn ($17,09\pm0,12$) en yüksek TCA'da çözüne azot oranına sahip örnek olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3: Uygulanan üç farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen % 12 TCA-ÇA oranı.

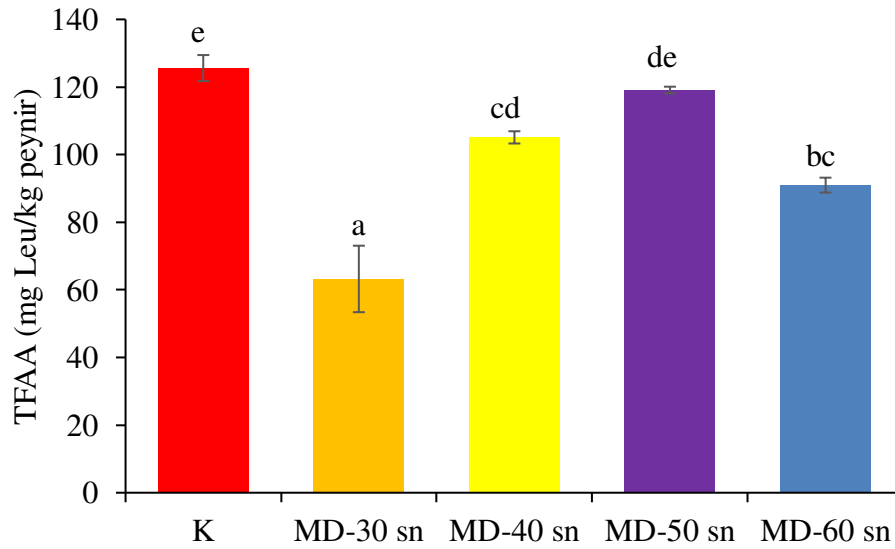
Özellikler	Klasik Ekstraksiyon	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	Ultrases Destekli Ekstraksiyon
		Süre (saniye)	Süre (dakika)
%12 TCA'da çözünen azot (%)	16,27±0,24 ^{ef}	30	13,90±0,55 ^d
		40	16,06±0,05 ^e
		50	17,09±0,12 ^f
		60	15,39±0,07 ^d
			1 13,42±0,52 ^{cd}
			5 12,41±0,05 ^{bc}
			10 11,86±0,20 ^b
			15 10,00±0,2 ^a

Klasik ekstraksiyon yönteminde ise bu oran $16,27\pm0,24$ olduğu ve istatistiksel olarak MD-40 sn ($16,06\pm0,05$) ve 50 sn ($17,09\pm0,12$) uygulama sonrası oranının klasik ekstraksiyon yöntemi ile benzerlik gösterdiği görülmektedir. Ultrases yönteminde ise 1 dk'lık uygulama neticesinde ($13,90\pm0,55$) MD-30sn uygulanan yöntemine benzer sonuç ($13,42\pm0,52$)

elde edilmiştir. Uygun parametreler kullanıldığında klasik ekstraksiyona alternatif olarak kullanılabileceği görülmektedir.

4.4 Toplam Serbest Aminoasit Miktarı

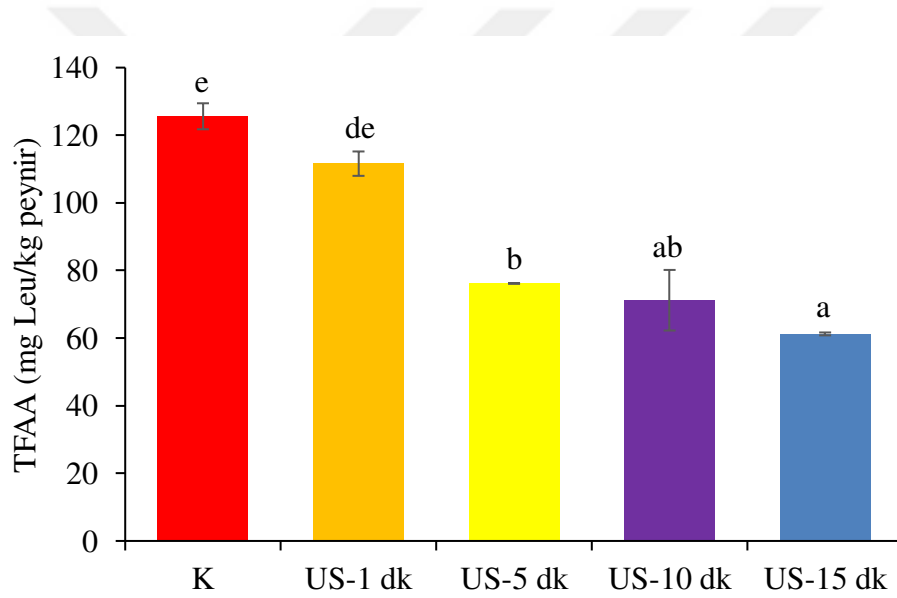
Mikrodalga destekli ekstraksiyona ilişkin toplam serbest aminoasit miktarlarındaki değişim Çizelge 4.5 ve Şekil 4.7’de verilmiştir. Uygulanan ekstraksiyon yöntemlerinin sonuçlarının farklı değerlere sahip olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Kontrol grubunun toplam serbest aminoasit değerinin $125,6\pm3,84$ mg Leu/kg peynir olarak mikrodalga 50sn uygulamasıyla istatistiksel olarak benzerlik gösterdiği ancak 30sn, 40sn ve 60sn uygulamasına göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Toplam serbest aminoasit miktarı açısından mikrodalga ekstraksiyon süresinin etkileri değerlendirildiğinde 30 sn mikrodalga uygulaması sonrasında toplam serbest aminoasit miktarı $63,23\pm9,83$ mg Leu/kg peynir ile en düşük seviyede kalmıştır. Süre 40 sn çıkarıldığında, konsantrasyon $105,10\pm1,81$ mg Leu/kg peynir düzeyine yükselmiş ve anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,05$). 50sn’de ise $119,09\pm0,99$ mg Leu/kg peynir ile en yüksek konsantrasyon değerine ulaşmıştır. Ancak, 60sn uygulama yapıldığında, konsantrasyon $90,98\pm2,19$ mg Leu/kg peynir seviyesine düşmüş ve uzun sürelerin sıcaklık artışına bağlı olarak serbest aminoasit miktarını olumsuz etkileyebileceğini göstermiştir.



Şekil 4.7: Mikrodalga uygulamasının toplam serbest aminoasit miktarına etkisi.

Bu sonuçlar, Chemat ve diğ. (2011) tarafından mikrodalga teknolojisinin kısa sürede etkili olduğunu, ancak aşırı sıcaklık artışı ile protein yapısını bozabileceğini ifade eden bulgularla uyumludur.

Ultrases destekli ekstraksiyona ilişkin toplam serbest aminoasit miktarlarındaki değişim Çizelge 4.6 ve Şekil 4.8’de verilmiştir. Uygulanan ekstraksiyon yöntemlerinin farklı değerlere sahip olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Toplam serbest aminoasit miktarı açısından farklı ultrases uygulama sürelerinin etkisi değerlendirildiğinde, süre arttıkça serbest aminoasit miktarında belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. 1 dk ultrases uygulaması ile toplam serbest aminoasit miktarı $111,59\pm3,61$ mg Leu/kg peynir olarak belirlenmiş ve en yüksek değer elde edilmiştir. Bu süre, ultrases yönteminin başlangıçta etkili olduğunu göstermektedir. Ancak süre uzadıkça; 5, 10 ve 15 dk’lık uygulamalar neticesinde sırasıyla $76,16\pm0,49$, $71,2\pm8,95$ ve $61,23\pm0,43$ mg Leu/kg peynir değerlerinde tespit edilmiş ve azalma meydana gelmiştir.



Şekil 4.8: Ultrases uygulamasının toplam serbest aminoasit miktarına etkisi.

Çizelge 4.4’e bakıldığında toplam serbest aminoasit miktarı açısından mikrodalga ve ultrases ekstraksiyon yöntemlerinin farklı değerlere sahip olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Üç farklı ekstraksiyon yöntemi arasında klasik ekstraksiyon ($125,60\pm3,84$ mg Leu/kg peynir) en yüksek toplam serbest aminoasit miktarına sahip örnek olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4: Uygulanan üç farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen toplam serbest aminoasit (mg Leu/kg peynir)

Özellikler	Klasik Ekstraksiyon	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	Ultrases Destekli Ekstraksiyon
		Süre (saniye)	Süre (dakika)
TFAA (mg Leu/kg peynir)	125,60±3,84 ^e	30 63,23±9,83 ^a 40 105,10±1,81 ^{cd} 50 119,09±0,99 ^{de} 60 90,98±2,19 ^{bc}	1 111,59±3,61 ^{de} 5 76,16±0,49 ^b 10 71,2±8,95 ^{ab} 15 61,23±0,43 ^a

MD-50sn ve US-1dk uygulanan yöntemlerinde ise bu değerin sırasıyla 119,09±0,99 ve 11,59±3,61 mg Leu/kg peynir olduğu ve istatistiksel olarak benzerlik gösterdiği görülmektedir. MD-30sn uygulanan yöntemde ise en düşük miktarda 62,23±9,83 mg Leu/kg peynir olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.5: Mikrodalga uygulaması ile elde edilen proteoliz değerleri.

	Klasik Ekstraksiyon	Ekstraksiyon Süresi (sn)	Mikrodalga Ekstraksiyon
Suda Çözünen Azot/TN (%)	26.37±0.08 ^d	30 24.90±0.07 ^a 40 25.25±0.24 ^b 50 26.02±0.08 ^d 60 25.61±0.07 ^c	
pH 4.6'da Çözünen Azot/TN (%)	25.15±0.6 ^{bc}	30 22.34±0.11 ^a 40 24.99±0.23 ^b 50 26.00±0.23 ^c 60 25.86±0.36 ^{bc}	
% 12 TCA'da Çözünen Azot/TN (%)	16.27±0.24 ^c	30 13.90±0.55 ^a 40 16.06±0.05 ^{bc} 50 17.09±0.12 ^d 60 15.39±0.07 ^b	
Toplam Serbest Aminoasit miktarı (mg L ⁻¹ Leu)	125,60±3,84 ^d	30 63,23±9,83 ^a 40 105,10±1,81 ^c 50 119,09±0,99 ^d 60 90,98±2,19 ^b	

Mikrodalga yöntemi, kısa sürede etkili sonuçlar sunarak serbest aminoasit miktarını ultrases yöntemine göre daha yüksek seviyelere çıkarabilmektedir. Ultrases yöntemi ise kısa süreli uygulamalarda etkili olmakla birlikte, uzun süreli kullanımlarda stabiliteyi koruyamamaktadır.

Çizelge 4.6: Ultrases uygulaması ile elde edilen proteoliz değerleri.

	Klasik Ekstraksiyon	Ekstraksiyon Süresi (dak.)	Ultrases Ekstraksiyon
Suda Çözünen Azot/TN (%)	26.37±0.08 ^e	1	24.59±0.23 ^d
		5	22.53±0.16 ^c
		10	20.09±0.16 ^b
		15	18.70±1.08 ^a
pH 4.6'da Çözünen Azot/TN (%)	25.15±0.6 ^d	1	24.02±0.28 ^c
		5	19.63±0.12 ^b
		10	15.51±0.16 ^a
		15	14.66±0.25 ^a
% 12 TCA'da Çözünen Azot/TN (%)	16.27±0.24 ^d	1	13.42±0.52 ^c
		5	12.41±0.05 ^b
		10	11.86±0.20 ^b
		15	10.00±0.20 ^a
Toplam Serbest Aminoasit miktarı (mg Leu/kg peynir)	125,60±3,84 ^b	1	111,59±3,61 ^b
		5	76,16±0.49 ^a
		10	71,2±8,95 ^a
		15	61,23±0.43 ^a

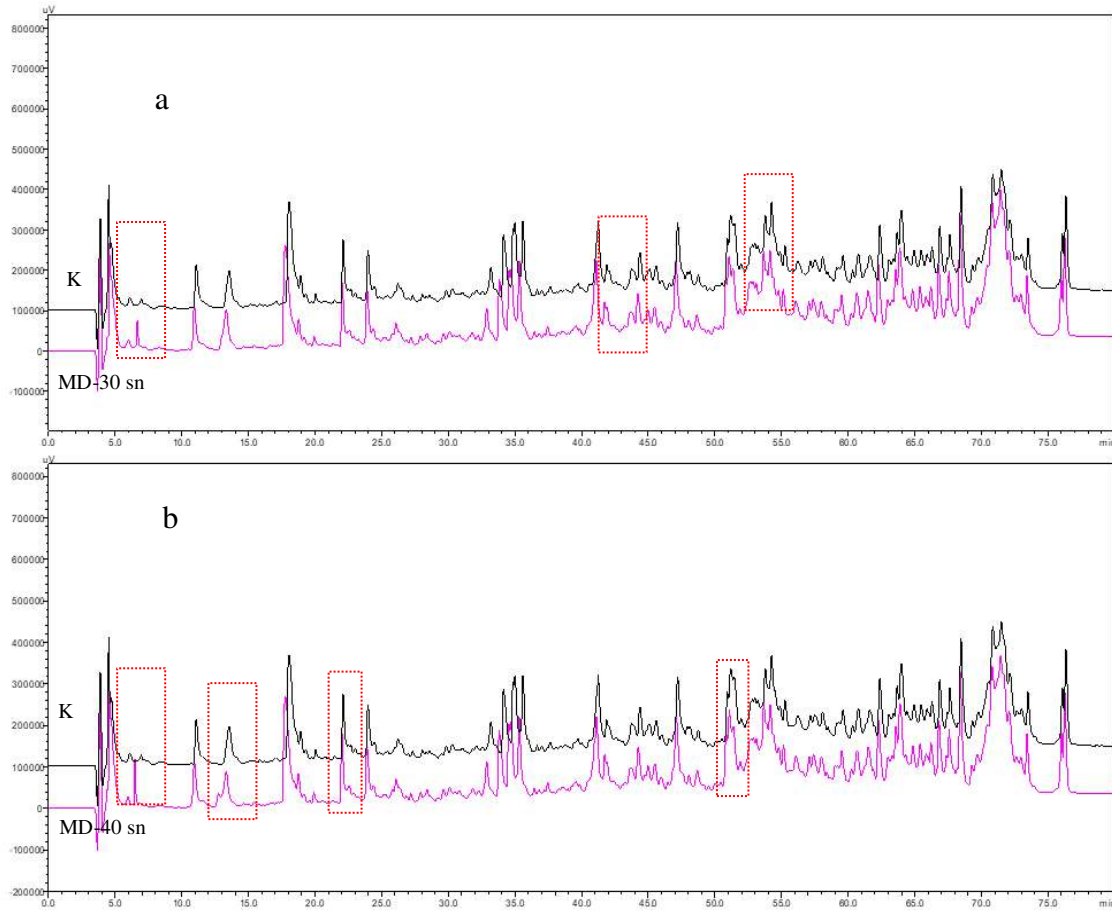
4.5 HPLC ile Peptit Profiline Belirlenmesi

HPLC yöntemi ile proteinlerin hidrolizi sonucu oluşan düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin ayrımı yüksek hassasiyetle yapılmaktadır. Genelde kromatogramlar hidrofobik bölge ve hidrofilik bölge olarak ayrılabilir. Bu bölgelerde oluşan peptit sayısı ve pik yüksekliği (veya pik alanı) değerlendirilerek yorumlar yapılır ve oluştuğu bölgeler peynirde proteoliz konusunda önemli bilgiler verir.

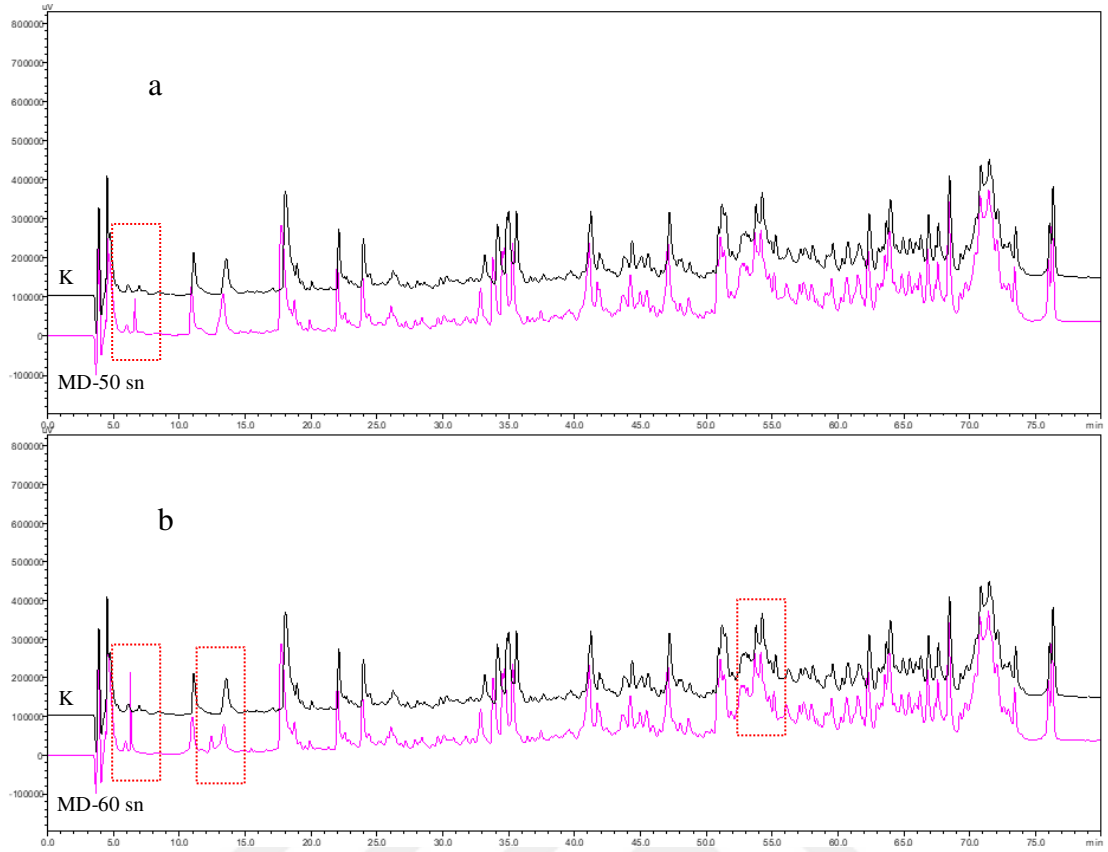
Mikrodalga uygulama sürelerinin ve klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen örneklerin HPLC kromatogram Şekil 4.9 ve 4.10'da verilmiştir. Kromatogram üzerinde yeni ve farklı

yükseklikleri sahip pikler işaretlenmiştir. Kontrol örneğine göre 12., 22., ve 43. alıkonma sürelerinde mikrodalga uygulamasıyla yeni pik oluşumu olduğu görülmüştür. Alıkonma süresinin 54. dk' da ise MD-60sn uygulanması sonrası ortaya çıkan yeni küçük pik varlığı olduğu ve diğer kromatogramlarda çıkmadığı görülmektedir.

Perino-Issartier ve diğ, (2012), mikrodalga destekli ekstraksiyonun protein yapısında çözünür küçük moleküllerin oluşumunu sağladığını ifade etmiştir. Artan mikrodalga süresiyle oluşan yeni pik bu görüş doğrultusunda değerlendirilebilir.



Şekil 4.9: 30 sn (a) ve 40 sn (b) mikrodalga uygulamasının peptit profiline etkisini gösteren HPLC kromatogramları.

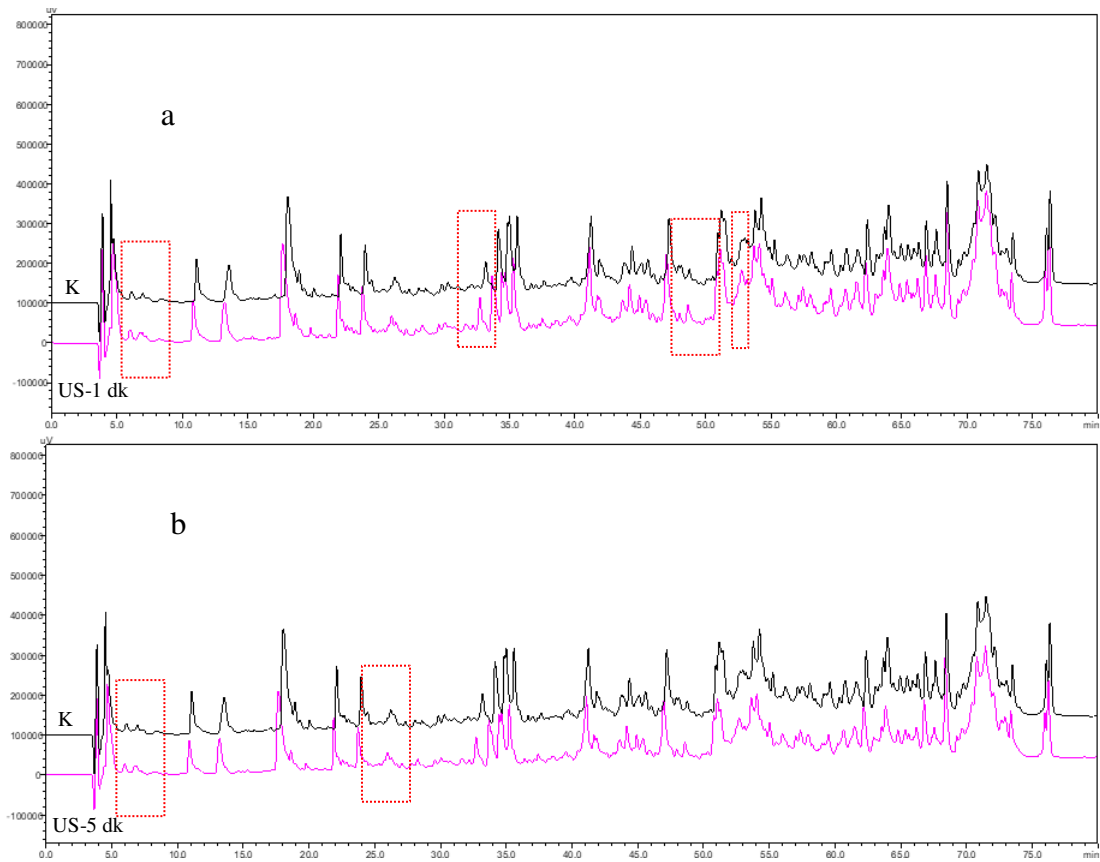


Şekil 4.10: 50 sn (a) ve 60 sn (b) mikrodalga uygulamasının peptit profiline etkisini gösteren HPLC kromatogramları.

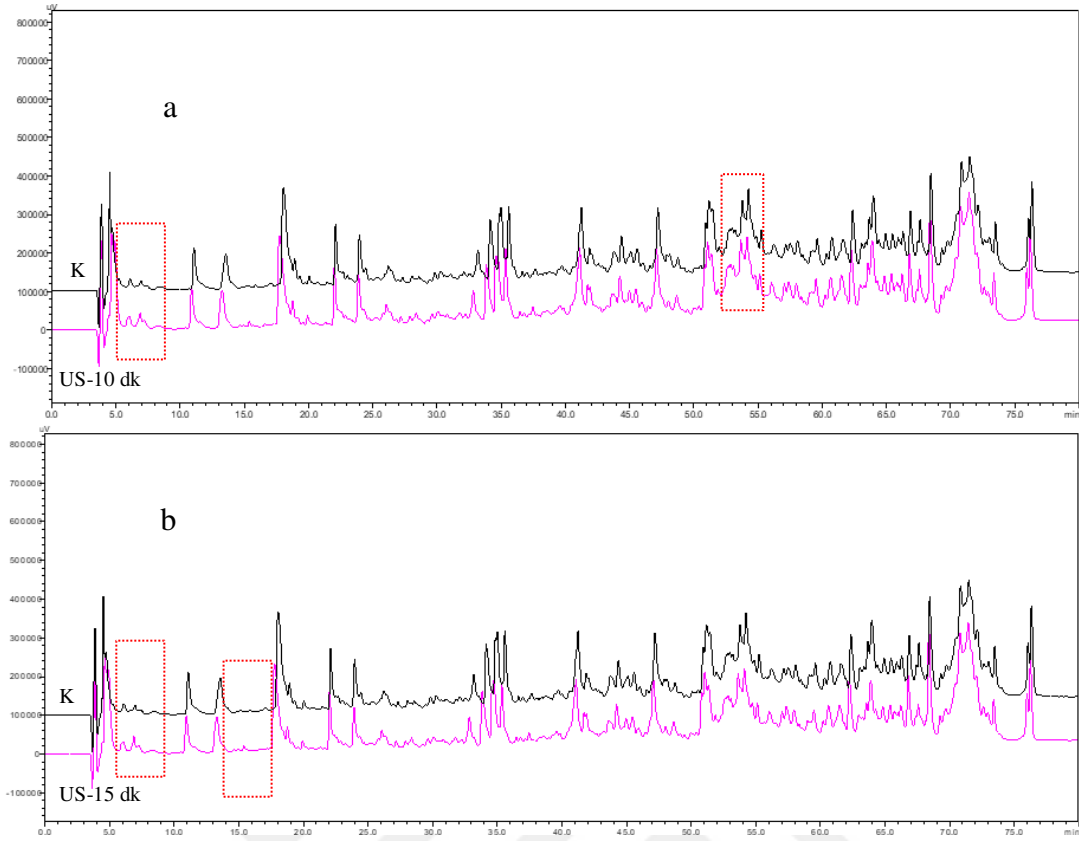
Ultrases uygulaması ve klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen izolatların HPLC kromatogramı Şekil 4.11 ve 4.12’de verilmiştir. Kromatogram üzerinde yeni ve farklı yüksekliklerine sahip pikler işaretlenmiştir. Pik profillerinde hem yükseklik hemde konsantrasyon bakımından farklı alıkonma sürelerinde değişiklikler gözlenmiştir. Özellikle US-1dk kontrol örneğine benzer bir profil gösterirken 5. dk ultrason uygulamasıyla profil değişmiştir. Peptit profilinde hem hidrofilik hem hidrofobik bölgede bulunan peptitlerin farklı profilde olduğu ilgi çekicidir. Ultrason, yüzey aşınması ve parçacık parçalanmasına neden olan kavitasyon adı verilen önemli bir kesme kuvveti ve mekanik enerji üretir (Nipornram ve diğ, 2018). Feng ve diğ, (2011) göre akustik kavitasyondan kaynaklanan kayma kuvvetleri, ekstrakttaki bazı protein moleküllerinin konformasyonunda değişime neden olabilir ve bu da protein yüzey hidrofobisitesini azaltıcı yönde değiştirir. Hidrofobisite, bir yüzeydeki açığa çıkan hidrofobik kısımların kapsamını ifade eder. Proteinlerin arayüz aktivitesiyle yakından iç içedir ve bu nedenle protein stabilitesi ve konformasyonunda önemli bir rol oynar ve nihayetinde protein işlevselliğini etkiler (Zhou ve Yang, 2019). Bununla beraber, ultrason destekli ekstraksiyonun (US-1dk) klasik

ekstraksiyon ile benzer profili göstermesi ekstraksiyon süresinin etkili bir şekilde azalttığının önemli bir kanıtıdır.

Ultrases uygulamasında sürenin artışı önceki bölümde belirtildiği gibi toplam serbest aminoasit değerlerinde önemli düzeyde düşüşe neden olmuş ve bu azalma peptit profiline yansımıştır. Ultrases uygulamalarında süre uzadıkça, kavitasyon etkisi sonucu oluşan mikro kabarcıkların patlaması protein yapısını mekanik olarak parçalar. Bu durum, başlangıçta protein çözünürlüğünü artırabilirken, uzun süreli uygulamalarda çözünür fraksiyonlarda azalmaya neden olabilir.

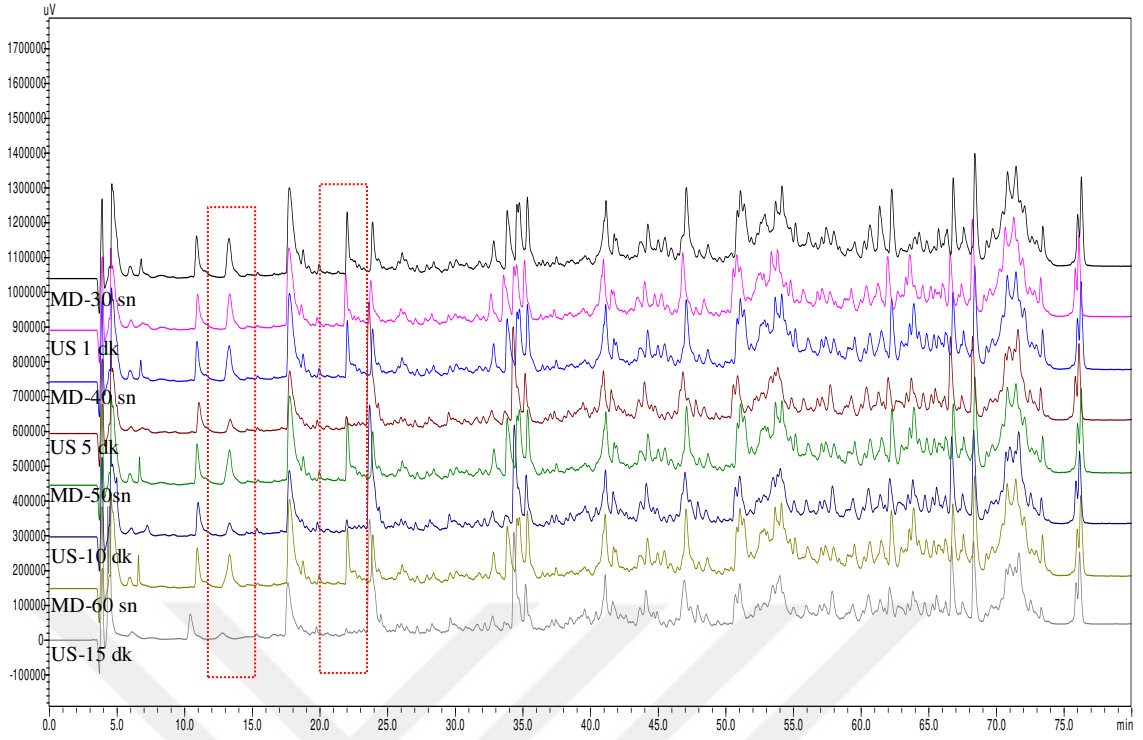


Şekil 4.11: 1 dk (a) ve 5 dk (b) ultrases uygulamasının peptit profiline etkisini gösteren HPLC kromatogramları.



Şekil 4.12: 10 dk (a) ve 15 dk (b) ultrases uygulamasının peptit profiline etkisini gösteren HPLC kromatogramları.

Şekil 4.13 de mikrodalga (MD) ve ultrases (US) uygulamalarının peptit profili üzerindeki etkileri gözlemlenmektedir. İşaretli alanlar, farklı yöntemlerin spesifik peptit bölgeleri üzerindeki yoğunluklarını karşılaştırmaktadır. İşaretli bölgelerde, mikrodalga uygulamalarında pik seviyelerinin birbirine yakın olduğu görülmektedir. Bu durum mikrodalga uygulamasının peptit profili üzerinde önemli bir değişime neden olmadığını göstermektedir. Buna karşılık, ultrases uygulamasında 1 dk'lık işlem sonrasında pik seviyelerinin belirgin şekilde daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu azalma, ultrases yönteminde ultrasesle muamele süresi uzadıkça peptit stabilitesinin önemli ölçüde bozulduğunu göstermektedir. Bu nedenle, peptit profili açısından mikrodalga yöntemi ultrases yöntemine göre daha etkili ve koruyucu bir yöntem olarak öne çıkmaktadır.

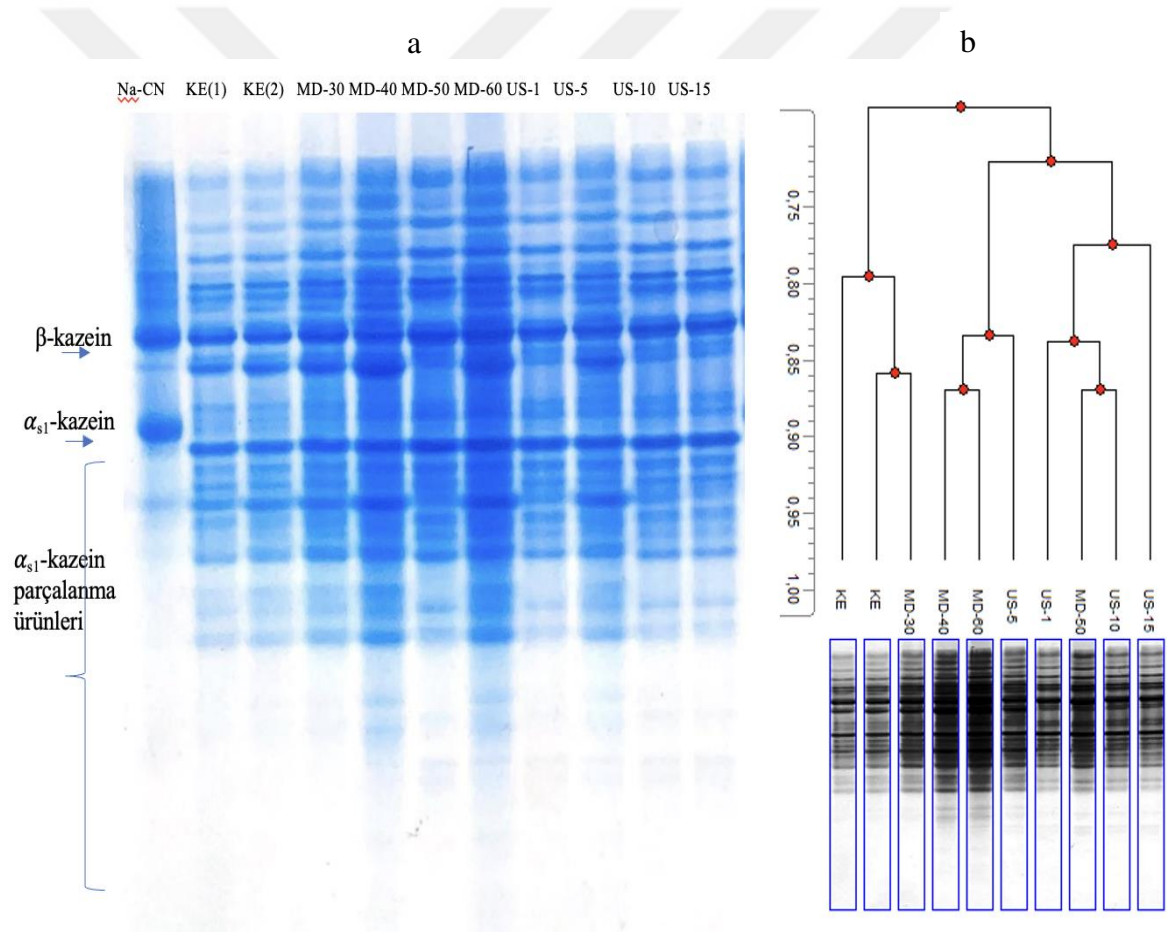


Şekil 4.13: Mikrodalga ve ultrases uygulamalarının peptit profiline etkisini gösteren HPLC kromatogramı.

4.6 Elektroforetik Yöntemle (Üre-PAGE) Protein Profili

Elektroforez, yüklü proteinlerin elektriksel alandaki hareketine dayanan bir ayırma tekniğidir. Elektroforezde molekülleri hareket ettiren güç elektrik potansiyelidir. Proteinlerin elektroforetik ayırımında, onların molekül boyutları ve net elektrik yüklerindeki farklılıklarından yararlanılmaktadır (Hayaloğlu ve Özer 2021). Ultrason ve mikrodalga desteği ile elde edilen protein ekstraktlarının birincil yapıları, Üre-PAGE'deki ayırımına göre kontrol örnekleri ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.14a). Peynir proteinleri, α , β , γ , κ , kazein olmak üzere kazein dört farklı fraksiyon içerir. Kontrol grubundaki bant yoğunluğu ve sayısının daha az olduğu görülmektedir. Dansimetrik analizinden elde edilen veriler (Şekil 14.4b) klasik ekstraksiyon uygulaması ile ultrases ve mikrodalga uygulamaları iki ayrı yerde kümелendiğini göstermiştir. Dendogram, MD-30sn uygulaması ile klasik ekstraksiyon uygulamasının benzer parçalanma ürünlerine sahip olduğunu ve MD-40sn ve MD-60sn bantların ise benzer parçalanma ürünlerine sahip olduğunu ve US-5dk ile aynı alt grupta yer aldığını göstermektedir. Özellikle β -CN ve α_{s1} -CN gibi proteinlerin parçalanmasıyla oluşan küçük moleküler ağırlıklı kazein alt fraksiyonlarının 40-60 sn'lik mikrodalga işlemi uygulanan örneklerin bulunduğu bantta yoğun olduğu ve uygulanan bu sürede daha yüksek

verim elde edildiği söylenebilir. Bu sonuç Zhang ve diğ, (2020) yaptıkları çalışmada mikrodalganın proteinlerin çözünürlüğünü artırdığını ve bunun daha net bant çizgilerine neden olacağını belirttikleri çalışmayla uyumludur. Bantlardaki belirsizlik ve dağınıklık, proteolitik aktivitenin etkisiyle küçük peptit parçalarının oluşumunu destekler. Süt proteinin peptitlere enzimatik hidrolizle ultrasonik ön işlemin hidrolize etkisini açıklamak için, hidrolizatlara SDS-PAGE gerçekleştirildiği bir çalışmada, enzim protein hidrolizatının ultrasonik ön işlem görmüş elektroforetik bantlarında 180 dakikalık hidrolizden sonra peynir altı suyu protein bantlarının tamamen kaybolduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni, küresel peynir altı suyu proteinlerinin bozulmasına neden olan ultrasonik dalgalar olduğu öne sürülmüştür (Liu ve diğ, 2014).



Şekil 4.14: Üre-PAGE yöntemi ile kazein fraksiyonlarının elektroforetik görünümü (a) ve dendrogram görüntüsü (b).

Altay ve diğ., (2025) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, ultrases uygulaması ve ohmik ısıtmanın Cheddar peyniri içerisindeki proteinlerin işlevselliği üzerindeki birleşik etkileri incelenmiştir. SDS-PAGE analizleri sonucunda, ultrases uygulanmış peynir örneklerinde protein yapı taşlarının farklılaştığı ve çözünürlüğün arttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, yüksek kavitasyon etkisinin süt bileşenlerinde mikro kabarcıklar oluşturarak fiziksel ve kimyasal değişimlere yol açtığı da rapor edilmiştir. Bu durum, alt kısımlardaki daha ince bantların oluşumunu açıklayabilir. Ultrases uygulamalarında sürenin uzamasıyla parçalanma ürünlerine ait bantların yoğunluğunda bir azalma gözlenmektedir. Bu durum, sonikasyon sırasında kayma gerilimi türbülanslarının peptit bağlarını kıramayacağı ve proteinlerin birincil yapılarını değiştiremeyeceği sonucu ile açıklanabilir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, mikrodalga ve ultrases destekli uygulamalar ile peynirdeki azotlu bileşikler ekstrakte edilmiş, sonuçlar klasik yöntemle ekstrakte edilen azotlu bileşik değerleriyle karşılaştırılmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonucunda;

Mikrodalga yöntemi, hızlı bir şekilde enerji aktarımı yaparak protein çözünürlüğünü artırma potansiyeline sahiptir. Yapılan analizler neticesinde 50 saniyelik uygulama süresi ile suda, pH 4.6 ve %12'lik TCA'da çözünür azot oranlarında klasik ekstraksiyon yöntemine en yakın azot oranları tespit edilmiştir. Benzer şekilde kontrol (klasik ekstraksiyon) grubunun toplam serbest aminoasit değerinin mikrodalga 50 sn uygulamasıyla istatistiksel olarak benzer olduğu tespit edilmiştir. Üre-PAGE analizinde elde edilen bantlarda özellikle β -CN ve α_{s1} -CN gibi proteinlerin parçalanmasıyla oluşan küçük moleküler ağırlıklı kazein alt fraksiyonları kontrol (klasik ekstraksiyon) grubu ile benzer bir görüntü oluşturmuştur. Ancak süre uzadıkça (örneğin 60 saniye) proteolitik niteliği temsil eden analiz parametrelerinin değerlerinde düşüş olduğu görülmektedir. HPLC ile yapılan peptit profili incelemesinde ortaya çıkan yeni küçük pik varlığı sıcaklık artışına bağlı olarak protein yapısında oluşan denatürasyonu göstermektedir. Mikrodalga yöntemi, süre ve sıcaklık kontrolü doğru bir şekilde yapıldığı takdirde etkili bir çözüm sunmaktadır ve özellikle hızlı sonuç elde edilmesi gereken durumlar için avantajlıdır.

Ultrases yöntemi ise düşük süre de kavitasyon etkisi ile protein çözünürlüğünü artırmada etkili olmuştur. Suda, pH 4.6 ve %12'lik TCA'da çözünür azot oranlarında klasik ekstraksiyon yöntemine en yakın azot oranları 1 dakikalık ultrases uygulaması sonrası tespit edilmiştir. Benzer şekilde ultrason destekli ekstraksiyonun 1 dakikalık uygulamasıyla klasik ekstraksiyon ile benzer bir peptit profili belirlenmiştir. Ancak sürenin uzamasıyla çözünür azot fraksiyonlarında ve toplam serbest aminoasit miktarında düşüş yaşanmış bu azalma peptit profiline de yansımıştır. Bu azalma, ultrases yönteminde ultrasesle muamele süresi uzadıkça kavitasyon etkisiyle peptit stabilitesinin önemli ölçüde bozulduğunu göstermektedir.

Elde edilen sonuçlara göre her iki yöntemde özellikle işlem süresi dikkate alındığında klasik ekstraksiyon yöntemine alternatif birer yöntem olarak kullanılabileceği görülmüştür. Ancak ultrases yöntemine kıyasla mikrodalga destekli ekstraksiyonun peptit profili açısından daha etkili ve koruyucu bir yöntem olarak öne çıktığı belirlenmiştir. Bu bulgular, literatürdeki çalışmalarla uyum içerisinde olup, modern teknolojilerin ekstraksiyon süreçlerine entegrasyonunu destekleyebilecek niteliktedir.

6. KAYNAKLAR

- Abadía-García, L., Castaño-Tostado, E., Ozimek, L., Romero-Gómez, S., Ozuna, C., & Amaya-Llano, S. L. (2016). Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 84-90.
- Akarca, G., Çağlar, A., & Tomar, O. (2013). Mozzarella peyniri: Tanımı, üretim yöntemleri ve kalite parametreleri. *Akademik Gıda*, 11(3-4), 91-95.
- Akbağ, A. (2024). *Susam küspesinden ultrason ve enzim destekli protein ekstraksiyonu* (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü.
- Alikhani, Z., & Fadavi, A. (2020). Effect of microwave heating on the denaturation of whey proteins in milk. *Journal of Dairy Science*, 103(5), 3897-3904.
- Altay, I., Kominami, Y., Queiroz, L. S., Huppertz, T., Sloth, J. J., & Mohammadifar, M. A. (2025). Combined effect of ultrasonication and ohmic heating on protein functionality of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 160, 106116.
- Akgün, H. A., & Kök Taş, T. (2022). Peynir teknolojisinde kullanılan hayvansal kaynaklı enzimler ile ilgili güncel araştırmalar. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi, Özel Sayı 36*, 61-66.
- Ardö, Y., McSweeney, P. L. H., Magboul, A. A. A., Upadhyay, V. K., & Fox, P. F. (2017). Biochemistry of Cheese Ripening: Proteolysis. In P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, & D. W. Everett (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics & Microbiology* (Fourth, p. 425). Academic Press.
- Arslaner, A., & Bakırcı, İ. (2016, September). *Proteolysis of tulum cheeses ripened in different packaging material* [Farklı ambalaj materyallerinde olgunlaştırılan tulum peynirlerinde proteoliz]. Conference paper.
- Arzeni, C., Martinez, K., Zema, D., Arias, A., & Perez, O. E. (2012). Influence of ultrasound processing on the functional properties of milk proteins. In *Dairy Science and Technology Advances, Proceedings of the 6th International Symposium on Dairy Technology*.
- Arzeni, C., Zema, P., López de Apodaca, E., & Castro, M. A. (2012). Influence of food matrix and process conditions on the antioxidant properties of whey protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, 26(2), 121-125.
- Atallah, A. A., Ismail, E. A., Yehia, H. M., Elkhadragey, M. F., & Khater, E. S. G. (2022). Proteolytic development and volatile compounds profile of Domiati cheese under modified atmosphere packaging. *Fermentation*, 8(8), 358
- Barbosa-Cánovas, G. V., Juliano, P., Tapia, M. S., & Zhang, H. Q. (2020). *Innovative food processing technologies*. Elsevier.
- Barukčić, I., Jakopović, K. L., Herceg, Z., Karlović, S., & Božanić, R. (2015). Influence of high intensity ultrasound on microbial reduction, physico-chemical characteristics and fermentation of sweet whey. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 94-101.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 259-274.

- Bitwell, C., Indra, S. S., Luke, C., & Kakoma, M. K.** (2023). A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African*, 19, e01585.
- Chakraborty, S., Uppaluri, R., and Das, C.** (2020). "Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) process for the recovery of bioactive compounds from bitter gourd using response surface methodology (RSM)," *Food and Bioproducts Processing*, 120, 114-122
- Chalapud, M. C., & Carrín, M. E.** (2023). Ultrasound-assisted extraction of oilseeds—Sustainability processes to obtain traditional and non-traditional food ingredients: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22, 2161–2196.
- Chandini, R. S., Inamdar, A. I., & Kumar, P.** (2017). Applications of microwave-assisted extraction for the food industry: An overview. In M. K. Gupta (Ed.), *Emerging Trends in Food Processing Technologies, Proceedings of the International Conference on Food Processing*.
- Chandrapala, J., Martin, G. J. O., Zisu, B., Kentish, S. E., & Ashokkumar, M.** (2012). The effect of ultrasound on casein micelle integrity. *Journal of dairy science*, 95(12), 6882-6890.
- Chemat, F., Abert-Vian, M., & Fabiano-Tixier, A. S.** (2017). *Green extraction of bioactive compounds: Theory and practice*. Springer International Publishing.
- Chemat, F., Rombaut, N., et al.** (2011). Green extraction of bioactive compounds using microwave-assisted processes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*.
- Chemat, F., & Vian, M. A.** (2014). Ultrasound-assisted extraction: green and sustainable techniques for bioactive compound recovery. *Modern Analytical Chemistry*, 6(2), 33-40.
- Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M. K.** (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation, and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*.
- Chen, Z., Li, Y., Lin, S., Wei, M., Du, F., & Ruan, G.** (2014). Development of continuous microwave-assisted protein digestion with immobilized enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 445(2), 491-496.
- Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H., & Wilkinson, M. G.** (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: A review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13(11), 841–866.
- Corredig, M., Nair, P. K., Li, Y., Eshpari, H., & Zhao, Z.** (2019). Invited review: Understanding the behavior of caseins in milk concentrates. *Journal of Dairy Science*, 102(6), 4772-4782.
- Cui, Q., Wang, G., Gao, D., Wang, L., Zhang, A., Wang, X., ... & Jiang, L.** (2020). Improving the gel properties of transgenic microbial transglutaminase cross-linked soybean-whey mixed protein by ultrasonic pretreatment. *Process Biochemistry*, 91, 104-112.
- Dahham, S. S., Ali, M. N., Tabassum, H., & Khan, M.** (2015). Studies on antioxidant activities of hibiscus species. *Journal of King Saud University - Science*, 27(3), 224–229.
- Dahmoune, F., Spigno, G., Moussi, K., Remini, H., Cherbal, A., & Madani, K.** (2014). Pistacia lentiscus leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted

- extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Industrial crops and products*, 61, 31-40.
- Dervişoğlu, M., Aydemir, O., & Yazıcı, F.** (2007). Peynir yapımında kullanılan pıhtılaştırıcı enzimler ve kazein fraksiyonları üzerine etkileri. *Gıda*, 32(5), 241-249
- Dissanayake, M., & Vasiljevic, T.** (2009). *Functional properties of whey proteins affected by heat treatment and hydrodynamic high-pressure shearing*. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1387-1397.
- Dong, Z. Y., Li, M. Y., Tian, G., Zhang, T. H., Ren, H., & Quek, S. Y.** (2019). Effects of ultrasonic pretreatment on the structure and functionality of chicken bone protein prepared by enzymatic method. *Food chemistry*, 299, 125103.
- El-Aidie, S. A. M., Castro-Muñoz, R., Abu-Jdayil, B., & El-Dieb, S. M.** (2024). The role of microbial coagulants on the physicochemical, proteolysis, microstructure and sensory properties of low-fat Edam cheese manufactured from ultrafiltered buffalo milk. *International Dairy Journal*, 137, 105995.
- Eskilsson, C. S., & Björklund, E.** (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227-250.
- Feng, H., Barbosa-Cánovas, G. V., & Weiss, J. (Eds.).** (2011). *Ultrasound technologies for food and bioprocessing* (Vol. 1, p. 599). New York: Springer.
- FitzGerald, R. J., & Meisel, H.** (2000). Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), S33-S37.
- Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H.** (1996). Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International*, 12(4), 457-509.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H.** (2000). *Fundamentals of cheese science*. Aspen Publishers.
- Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H.** (2004). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (3rd ed., Vols. 1 & 2).
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H.** (2017). *Fundamentals of cheese science* (2nd ed.). Springer.
- Gligor, O., Mocan, A., Moldovan, C., Locatelli, M., Crişan, G., & Ferreira, I. C.** (2019). Enzyme-assisted extractions of polyphenols—A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 302-315.
- Guo, Q., & Wang, P.** (2017). *Denaturation and aggregation of milk proteins induced by high-temperature short-time (HTST) and microwave heating*. *International Journal of Food Properties*, 20(sup1), S542-S554.
- Gül, O., Sarıcaoğlu, F. T., & Mortas, M.** (2021). *Influence of microwave heating on Maillard reaction and protein modifications in dairy products*. *Food Chemistry*, 343, 128439.
- Gumus, P., & Hayaloğlu, A. A.** (2019). Effects of blends of camel and calf chymosin on proteolysis, residual coagulant activity, microstructure, and sensory characteristics of Beyaz peynir. *Journal of Dairy Science*, 102(7), 5945–5956
- Handa, S. S.** (2008). An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*, 1(1), 21-40.

- Hayaloğlu, A. A.** (2003). *Starter Olarak Kullanılan Bazı Lactococcus Suşlarının Beyaz peynirlerin Özellikleri Üzerine Etkisi*. Doktora Tezi, Adana, 170 s.
- Hayaloğlu, A. A.** (2009). Cheese texture and microstructure. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2nd ed., pp. 754–762).
- Hayaloğlu, A. A., Güven, M., Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H.** (2005). Influence of starters on chemical, biochemical, and sensory changes in Turkish White-brined cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, 88(10), 3460–3474.
- Hayaloğlu, A. A., McSweeney, P. L. H.** (2014). Primary biochemical events during cheese ripening. *Dairy Microbiology and Biochemistry: Recent Developments*.
- Hayaloğlu, A. A., Özer, B.** (2021). *Peynir Biliminin Temelleri*. Nobel Yayıncılık.
- Hayaloğlu, A. A., Topçu, A., & Koca, N.** (2011). Peynir analizleri. Bölüm 17, *Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını*. İnönü Üniversitesi, Ege Üniversitesi ve Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakülteleri. ResearchGate.
- Haug, W., Düring, R.-A., & Wanner, U.** (2007). Changes in free amino acids and short-chain peptides during maturation of cheese and their implications for bioavailability and digestibility. *Journal of Dairy Science*, 90(7), 3290–3300.
- Huppertz, T., & Fox, P. F.** (2019). *Effects of high-pressure treatment on the microbiological and physicochemical properties of milk: A review*. *International Dairy Journal*, 99, 104558.
- IDF (International Dairy Federation).** (1993). Milk and milk products: *Determination of nitrogen content (Kjeldahl method)*. International Standard, 20B. International Dairy Federation, Brussels.
- İşçimen, A. A., & Hayta, M.** (2018). Effect of microwave and ultrasound treatments on the properties of wheat gluten. *Food Chemistry*, 240, 385–392.
- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Herceg, Z., & Herceg, I. L.** (2008). Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of food engineering*, 86(2), 281–287.
- Jeličić, I., Božanić, R., Brnčić, M., & Tripalo, B.** (2012). Influence and comparison of thermal, ultrasonic and thermo-sonic treatments on microbiological quality and sensory properties of rennet cheese whey. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, 62(3), 165–178.
- Jiang, Z., Yao, K., Yuan, X., Mu, Z., Gao, Z., Hou, J., & Jiang, L.** (2018). Effects of ultrasound treatment on physico-chemical, functional properties and antioxidant activity of whey protein isolate in the presence of calcium lactate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(4), 1522–1529.
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Álvarez, C., & O'Donnell, C. P.** (2015). Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 60–67.
- Kallel, F., Driss, D., Chaari, F., Belghith, L., Bouaziz, F., Ghorbel, R., & Chaabouni, S. E.** (2014). Garlic (*Allium sativum* L.) husk waste as a potential source of phenolic compounds: Influence of extracting solvents on its antimicrobial and antioxidant properties. *Industrial Crops and Products*, 62, 34–41.

- Kapoor, R. V., Butler, T. O., et al.** (2018). Microwave and ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from microalgae: A comparative study. *Bioresource Technology*, 270, 519-526.
- Karabiyikli, Ş., & Erdoğan, S.** (2019). Peynir üretiminde mikroorganizmaların rolü ve önemli mikroorganizma grupları. *Journal of New Results in Engineering and Natural Sciences*, (9), 35-45.
- Karki, B.** (2009). Enhancement of solubility of poorly water-soluble drugs by physical and chemical modifications
- Kingwascharapong, P., Chaijan, M., & Karnjanapratum, S.** (2021). Ultrasound-assisted extraction of protein from Bombay locusts and its impact on functional and antioxidative properties. *Scientific Reports*, 11(1), 17320.
- Koirala, S., Prathumpai, W., & Anal, A. K.** (2021). Effect of ultrasonication pretreatment followed by enzymatic hydrolysis of caprine milk proteins and on antioxidant and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity of peptides thus produced. *International Dairy Journal*, 118, 105026.
- Kuş, S.** (2016). *Mikroalga enerjisiyle ayva ve armut meyvesinin kuruma davranışı ve modellemesi* (Master's thesis, Namık Kemal Üniversitesi).
- Liu, Z., Juliano, P., Williams, R. P., Niere, J., & Augustin, M. A.** (2014). Ultrasound effects on the assembly of casein micelles in reconstituted skim milk. *Journal of Dairy Research*, 81(2), 146-155.
- Liu, B., Zhu, J., Zeng, Q., Wang, H., & Gu, Q.** (2018). Ultrasound-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides from purple sweet potato. *Journal of Food Science and Technology*, 55(10), 4021-4030.
- López-Expósito, I., Amigo, L., & Recio, I.** (2012). A mini-review on health and nutritional aspects of cheese with a focus on bioactive peptides. *Dairy Science and Technology*, 92(5), 419–438.
- López-Salazar, H., Camacho-Díaz, B. H., Arenas Ocampo, M. L., & Jiménez-Aparicio, A. R.** (2023). Microwave-assisted extraction of functional compounds from plants: A review. *BioResources*, 18(3), 6614–6638.
- Marić, M., Grassino, A. N., Zhu, Z., Barba, F. J., Brnčić, M., & Brnčić, S. R.** (2018). An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. *Trends in food science & technology*, 76, 28-37.
- Martins, R., Sales, H., Pontes, R., Nunes, J., & Gouveia, I.** (2023). Food wastes and microalgae as sources of bioactive compounds and pigments in a modern biorefinery: a review. *Antioxidants*, 12(2), 328.
- Mason, T. J.** (1998). Power ultrasound in food processing—the way forward. *Ultrasonics Sonochemistry*, 5(3), 165-172.
- McSweeney, P. L. H., & Fox, P. F.** (1997). Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Lait*, 77(1), 41–76.
- McSweeney, P. L. H.** (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 127-144.
- Mehra, R., Kumar, H., Kumar, N., Ranvir, S., Jana, A., Buttar, H. S., ... & Guiné, R. P.** (2021). Whey proteins processing and emergent derivatives: An insight perspective

- from constituents, bioactivities, functionalities to therapeutic applications. *Journal of Functional Foods*, 87, 104760.
- Mirzadeh, M., Arianejad, M. R., & Khedmat, L.** (2020). Antioxidant, antiradical, and antimicrobial activities of polysaccharides obtained by microwave-assisted extraction method: A review. *Carbohydrate polymers*, 229, 115421.
- Munir, M., Nadeem, M., Qureshi, T. M., Leong, T. S., Gamlath, C. J., Martin, G. J., & Ashokkumar, M.** (2019). Effects of high pressure, microwave and ultrasound processing on proteins and enzyme activity in dairy systems—A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 57, 102192.
- Murtaza, S., Shahbaz, M., Murtaza, A., Sameen, A., Farooq, U., Naeem, H., & Ansari, M. J.** (2023). Synergistic effects of microwaves and sonication in dairy industry. In *Ultrasound and Microwave for Food Processing* (pp. 105-137). Academic Press.
- Nipornram, S., Tochampa, W., Rattanatraiwong, P., & Singanusong, R.** (2018). Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampung) peel. *Food chemistry*, 241, 338-345.
- Oroian, M., Dranca, F., & Ursachi, F.** (2020). Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis. *Journal of food science and technology*, 57, 70-78.
- Park, Y. W., & Jin, Y. K.** (1998). Proteolytic patterns of Caciotta and Monterey Jack hard goat milk cheeses as evaluated by SDS-PAGE and densitometric analyses. *Small Ruminant Research*, 28(3), 263–272.
- Patel, H. A., Patel, R. P., & Singh, R. R. B.** (2016). *Effect of microwave heating on casein micelle structure and rennet coagulation properties of milk*. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 270-277.
- Pereira, P. C., & Vicente, F.** (2017). Milk nutritive role and potential benefits in human health. In *Nutrients in Dairy and Their Implications on Health and Disease* (pp. 161–176). Academic Press.
- Plagemann, R., von Langermann, J., & Kragl, U.** (2014). Microwave-assisted covalent immobilization of enzymes on inorganic surfaces. *Engineering in Life Sciences*, 14(5), 493-499.
- Perino-Issartier, S., Zill-e-Huma, & Chemat, F.** (2012). Sonopreparation of bioactive phenolic compounds from vegetal-based matrices: Extraction, analysis and environmental impact. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(5), 777-783.,
- Picot-Allain, M. C. N., Ramasawmy, B., & Emmambux, M. N.** (2022). Extraction, characterisation, and application of pectin from tropical and sub-tropical fruits: a review. *Food Reviews International*, 38(3), 282-312.
- Pugliese, A., Cabassi, G., Chiavaro, E., Paciulli, M., Carini, E., & Mucchetti, G.** (2017). Physical characterization of whole and skim dried milk powders. *Journal of food science and technology*, 54, 3433-3442.
- Quitain, A. T., Daimon, H., Fujie, K., Katoh, S., & Moriyoshi, T.** (2006). Microwave-assisted hydrothermal degradation of silk protein to amino acids. *Industrial & engineering chemistry research*, 45(13), 4471-4474.

- Rojas, M. L., Salazar-González, C., & Augusto, P. E. D.** (2022). Application of ultrasound technology in the extraction of bioactive compounds from food matrices: Recent advances and future perspectives. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 76, 102914.
- Santos, H. M., & Capelo, J. L.** (2007). Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. *Talanta*, 73(5), 795-802.
- Santos, H. M., Rial-Otero, R., Fernandes, L., Vale, G., Rivas, M. G., Moura, I., & Capelo, J. L.** (2007). Improving sample treatment for in-solution protein identification by peptide mass fingerprint using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 6(9), 3393-3399.
- Singh, T. K., Drake, M. A., & Cadwallader, K. R.** (2003). Flavor of cheddar cheese: A chemical and sensory perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(4), 139–162.
- Singh, H.** (2006). The milk protein system: Structure and stability. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry Volume 1: Proteins, Part A* (pp. 1–49). Springer.
- Sousa, M. J., Ardö, Y., & McSweeney, P. L. H.** (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 327-345.
- Švarc-Gajić, J., Stojanović, Z., Carretero, A. S., Román, D. A., Borrás, I., & Vasiljević, I.** (2013). Development of a microwave-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Food Engineering*, 119(3), 525-532.
- Şahin, S., Sumnu, G., & Öztop, M.** (2018). *Impact of microwave heating on dairy products: A review*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 58(9), 1498-1511.
- Tomasula, P. M., & Kozempel, M. F.** (2004). *Microwave heating in the dairy industry*. *Journal of Dairy Science*, 87(3), 597-608.
- Tekin, A., & Hayaloğlu, A. A.** (2023). Understanding the mechanism of ripening biochemistry and flavour development in brine ripened cheeses. *International Dairy Journal*, 137, 105508.
- Truong, D. H., Nguyen, D. H., Ta, N. T. A., Bui, A. V., Do, T. H., & Nguyen, H. C.** (2019). Evaluation of the use of different solvents for phytochemical constituents, antioxidants, and in vitro anti-inflammatory activities of *Severinia buxifolia*. *Journal of food quality*, 2019(1), 8178294.
- Uluko, H., Li, H., Cui, W., Zhang, S., Liu, L., Chen, J., ... & Lv, J.** (2013). Response surface optimization of angiotensin converting enzyme inhibition of milk protein concentrate hydrolysates in vitro after ultrasound pretreatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 133-139.
- Upadhyay, V. K., McSweeney, P. L. H., & Magboul, A. A. A.** (2018). Proteolysis in cheese during ripening. In P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, & D. W. Everett (Eds.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* (pp. 431–453). Academic Press.
- Vítová, E., Loupancová, B., Zemanová, J., Štoudková, H., Březina, P. and Babák, L.** (2006). Solid-phase microextraction for analysis of moulds cheese aroma. *Czech J. Food Sci.*, 24 (6). 268-274.

- Yan, X., Khan, N. A., Zhang, F., Yang, L., & Yu, P.** (2014). Microwave irradiation induced changes in protein molecular structures of barley grains: relationship to changes in protein chemical profile, protein subfractions, and digestion in dairy cows. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(28), 6546-6555.
- YanJun, S., Jianhang, C., Shuwen, Z., & Hui, W.** (2014). Effect of ultrasound-assisted extraction on the physicochemical and functional properties of proteins from walnut (*Juglans regia* L.). *Food Science and Technology*, 59(3), 630-636.
- Yang, X., Li, Y., Li, S., Oladejo, A. O., Wang, Y., Huang, S., Ye, X.** (2017). Effects of multi-frequency ultrasound pretreatment under low power density on the enzymolysis and the structure characterization of defatted wheat germ protein. *Ultrasonics sonochemistry*, 38, 410-420.
- Wang, L., & Weller, C. L.** (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.
- Walstra, P., Wouters, J. T., & Geurts, T. J.** (2005). *Dairy Science and Technology*. CRC Press.
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., Duan, Y., Luo, X.** (2018). Advances in ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from cash crops—A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, 538-549.
- Wen, C., Zhang, J., Yao, H., Zhou, J., Duan, Y., Zhang, H., & Ma, H.** (2019). Advances in renewable plant-derived protein source: The structure, physicochemical properties affected by ultrasonication. *Ultrasonics Sonochemistry*, 53, 83-98.
- Zhang, Z., Wang, L., Zuo, L., Wang, Y., & Wang, J.** (2018). Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Moringa oleifera* leaves: Extraction, characterization, and biological activities. *Journal of Food Science and Technology*, 55(8), 3084-3095.
- Zhang, X., Sun, Y., Liu, L., Liu, H., & Ma, C.** (2020). Ultrasound-assisted extraction and its effects on the functional properties of soy protein isolates. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(2), e14323.
- Zhang, Y., et al.** (2020). Microwave-assisted extraction of functional ingredients from food materials. *Food Chemistry*, 309, 125761.
- Zheng, X., Shi, X., & Wang, B.** (2021). A review on the general cheese processing technology, flavor biochemical pathways and the influence of yeasts in cheese. *Frontiers in Microbiology*, 12, 703284.
- Zou, Y., Xie, C., Fan, G., Gu, Z., & Han, Y.** (2018). Microwave-assisted extraction of polyphenolics from some selected medicinal herbs grown in Turkey. *Records of Natural Products*, 12 (1), 29–39.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad :Pınar Özge ASLAN

ÖĞRENİM DURUMU:

Lisans :2015, İnönü Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

Yüksek Lisans :2021-Devam, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

MESLEKİ DENEYİM:

2016-2017, BCC Catering Proje Sorumlusu

2017-Devam, Malatya İl Tarım ve Orman Müdürlüğü Resmi Kontrol Görevlisi

