



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ**  
**ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**  
**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ULTRASES İŞLEMİNİN ENZİM MODİFİYE PEYNİRİ**  
**ÜRETİMİNDE UYGULANMASI VE ÜRETİM OPTİMİZASYONU**

**EBRU YILMAZ**  
**YÜKSEK LİSANS**



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ**  
**ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**  
**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ULTRASES İŞLEMİNİN ENZİM MODİFİYE PEYNİRİ**  
**ÜRETİMİNDE UYGULANMASI VE ÜRETİM OPTİMİZASYONU**

**EBRU YILMAZ**  
**YÜKSEK LİSANS**

**DANIŞMAN**  
**DOÇ. DR. ZAFER ERBAY**

**ADANA 2022**

# ULTRASES İŞLEMİNİN ENZİM MODİFİYE PEYNİRİ ÜRETİMİNDE UYGULANMASI VE ÜRETİM OPTİMİZASYONU

Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Ebru YILMAZ tarafından tamamlanan Yüksek  
Lisans Tezi onaylanmıştır.

Doç. Dr. Ahmet BEYÇİOĞLU  
Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Haşım KELEBEK  
Anabilim Dalı Başkanı

Doç. Dr. Zafer ERBAY  
Danışman

**Tez Jürisi**

Doç. Dr. Zafer ERBAY  
Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Levent Yurdaer  
AYDEMİR  
Adana Alparslan Türkeş Bilim ve  
Teknoloji Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Mithat  
KURBAN  
Hakkari Üniversitesi

**Tez Savunma Tarihi**

17 / 08 / 2022



Bu tezde yer alan tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik davranışa uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, bu kuralların ve davranışların gerektirdiği şekilde bu çalışmaya özgün olmayan tüm bilgiler için atıf verdiğimi ve kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

[İmza]  
Ebru YILMAZ

# ÖZET

## ULTRASES İŞLEMİNİN ENZİM MODİFİYE PEYNİRİ ÜRETİMİNDE UYGULANMASI VE ÜRETİM OPTİMİZASYONU

Ebru YILMAZ

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Zafer ERBAY

Ağustos 2022, 60 sayfa

Gıda endüstrisinde mikroorganizma ve enzim inaktivasyonu amacıyla yaygın şekilde kullanılan ısıt işlemler, kimi olumsuz değişimlere neden olabildikleri için ısıt olmayan alternatif teknolojilere eğilim artmıştır. Bu kapsamda farklı kullanım alanlarına sahip olması ve endüstriyel uygulamalara uygunluğu açısından ultrases teknolojisi özel olarak öne çıkmaktadır. Ultrases uygulamasının yaratmış olduğu kavitasyon sonucu açığa çıkan enerji ve kuvvetlerin, süt bileşenleri üzerine olan çeşitli etkileri süt ve süt ürünlerinde verim artışı ve süt proteinlerinin fonksiyonel özelliklerinde iyileşmeler sağlamaktadır. Ultrasesin, düşük frekans-yüksek enerjili uygulaması kapsamında kontrollü şartlar oluşturulduğu zaman, protein ve enzim üzerinde yaratmış olduğu çeşitli mekanizmalar doğrultusunda, aktivasyon enerjisinin azaldığı bildirilmektedir. Böylelikle ultrases teknolojisi, uygulama koşullarına (güç, frekans, işlem süresi) bağlı olarak açığa çıkan kavitasyon mekanizmasının etkisiyle gıda endüstrisinde, ısıt işlemlere göre pek çok avantaj sağlamış ve kullanım alanı bulmaya başlamıştır. Özellikle uygulanan koşullar çerçevesinde oluşturmuş olduğu serbest radikal düzeyi düşük frekans-yüksek enerjili uygulamalarda minimum seviyededir. Bununla beraber, enzim inaktivasyonunun tersine kimi ultrases uygulamalarında enzim aktivasyonu sağlanabilmiş ve bu açıdan diğer pek çok işlemde ayrı ve özgün bir uygulamaya alan açılmıştır. Bu doğrultuda, ultrases teknolojisinin bu etkisinin enzim modifiye peynirlerinin (EMP) üretiminde etkin bir rol oynayabileceği düşünülmüş ve tez çalışmasında ultrases ön işlemleri uygulaması ile daha kısa üretim süresinde benzer kalite özelliklerine sahip EMP üretimi denenmiştir. Çalışmada ultrases gücü, işlem süresi ve proteoliz süresi işlem değişkenleri olarak alınmış ve 30-110 W güç aralığı, 5-30 dk ultrases işlem süresi aralığı ve 2-12 proteoliz süresi aralığı koşullarında

retimler gerçekleştirilmiştir. Üretim sürecinde OUI, OYI, SAI ve titrasyon asitliği yanıtları dikkate alınarak yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyon yapılmış ve US gücü 46,28 W, US n işlem süresi 9,8 dk ve proteoliz süresi 10,49 saat olarak optimum koşullar belirlenmiştir. Aynı zamanda, ek olarak yapılan kimi üretim çalışmaları ile işlem koşullarının etkisi tez kapsamında tartışılmış ve son ürünün karakterizasyonu yapılmıştır. alışmalar sonucunda EMP zelliklerinde US süresinin belirli bir etkisi olduğu fakat proteoliz süresinin daha baskın bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır. US gücünün ise etkili olmadığı grlmştir. Sonuç olarak, kontrol EMP örneklerine yakın özelliklerdeki örneklerin ultrases n işleminin desteğiyle 1,5 saat daha kısa bir sürede elde edilebileceği belirlenmiş ve US işleminin enzim aktivasyonunu hızlandırabileceği tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Ultrases, Enzim Modifiye Peynir, Enzim Aktivasyonu, Proteoliz

# **ABSTRACT**

## **APPLICATION OF ULTRASOUND ON ENZYME-MODIFIED CHEESE PRODUCTION AND OPTIMIZATION OF THE PRODUCTION**

Ebru YILMAZ

M.Sc., Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Zafer ERBAY

August 2022, 60 pages

Since heat treatments, which are widely used in the food industry for the inactivation of microorganisms and enzymes, can cause some negative changes, the tendency to alternative non-thermal technologies has increased. In this context, ultrasound technology stands out especially in terms of having different usage areas and suitability for industrial applications. There are various effects of the energy and forces occurred as a result of cavitation created by the ultrasound application on milk components may provide an increase in the yield and functionality of dairy products. It is reported that the activation energy decreases for proteins and enzymes as a result of the mechanisms created by low-frequency-high-energy applications of ultrasound at controlled conditions. Thus, with the effect of the cavitation mechanism that emerges depending on the application conditions (power, frequency, processing time), ultrasound technology has provided many advantages over heat treatments in the food industry and has started to find usage areas. In particular, the free radical level formed within the framework of the applied conditions is at a minimum level in low-frequency-high-energy applications. However, unlike enzyme inactivation, enzyme activation was achieved in some ultrasound applications, and in this respect, a separate and unique application area was opened from many other processes. In this direction, it was thought that this effect of ultrasound technology could play an active role in the production of enzyme modified cheeses (EMC). In this study, the production of EMC with similar quality characteristics in a shorter production time was tried with the application of ultrasound pretreatment. In the study, ultrasound power, ultrasound treatment time and proteolysis time were taken as process variables and productions were carried out in the range of 30-110 W for ultrasound power, 5-30 min for ultrasound

treatment time and 2-12 for proteolysis time. The response surface method was used in the optimization of production process by taking into account the proteolytic ripening indexes (REI, RDI, and FAAI) and titration acidity as responses. The optimum conditions were determined as ultrasound power 46.28 W, ultrasound pretreatment time 9.8 minutes and proteolysis time 10.49 hours. At the same time, some additional production studies and the effect of process conditions were discussed within the scope of the thesis and the final product was characterized. As a result of the studies, it was determined that the US processing had a significant effects on the EMC properties, but the proteolysis time dominated. US power had no significant effects on EMC properties. It was determined that samples with properties close to the control EMC samples could be obtained in 1.5 hours of shorter time with the ultrasound pretreatment. and US treatment could accelerate enzymatic reactions.

**Keywords:** Ultrasound, Enzyme-Modified Cheese, Enzyme Activation, Proteolysis

Tez çalışmamı başta Mustafa Kemal ATATÜRK'e ve aileme ithaf ediyorum...

*İthaf*

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgileriyle bana ışık tutan, yüreklendirici sözleriyle bana akademik yolda yürüme şevki kazandıran ve olaylara bakış açımı geliştirmemde katkısı olan öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım tez danışmanın Doç. Dr. Zafer ERBAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmada kullanılan ultrases cihazı konusunda yardımlarını esirgemeyen Çukurova Üniversitesin'de görev alan Araştırma Görevlisi Dr. Erdal AĞÇAM hocama;

Çalışmam sırasında bilgileri ve desteklerinden dolayı doktora öğrencisi Pelin SALUM'a ve Enise Betül BOLAT'a

Hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen ve haklarını asla ödeyemeyeceğim aileme teşekkür ederim.

Tez çalışmamda mali desteği dolayısıyla Hakkari Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü'ne (proje no: FM21BAP3) teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

|                                                                                    |      |
|------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>ÖZET</b> .....                                                                  | iv   |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                                              | vi   |
| <b>TEŞEKKÜR</b> .....                                                              | ix   |
| <b>İÇİNDEKİLER</b> .....                                                           | x    |
| <b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....                                                      | xii  |
| <b>TABLolar LİSTESİ</b> .....                                                      | xiii |
| <b>KISALTMALAR</b> .....                                                           | xiv  |
| <b>1. GİRİŞ</b> .....                                                              | 1    |
| <b>2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR</b> .....                                                   | 3    |
| 2.1. Ultrases ve Kavitasyon.....                                                   | 3    |
| 2.1.1. Ultrases Cihazı ve Ekipmanları.....                                         | 6    |
| 2.2. Düşük Frekanslı Ultrases Uygulamasının Süt Bileşenleri Üzerine Etkileri ..... | 7    |
| 2.2.1. Süt Yağı .....                                                              | 7    |
| 2.2.2. Süt Proteini .....                                                          | 8    |
| 2.2.3. Süt Bileşenlerinin Fiziko-kimyasal Özellikleri Üzerine Etkisi.....          | 10   |
| 2.2.4. Süt Ürünlerinde ve Prosesinde Ultrases Uygulaması .....                     | 11   |
| 2.2.5. Ultrases Uygulaması İle Enzim Aktivasyonunun Arttırılması .....             | 17   |
| 2.2.6. Enzim Aktivasyonunun Arttırılmasındaki Mekanizmalar .....                   | 18   |
| 2.2.7. Enzim Modifiye Peyniri (EMP).....                                           | 22   |
| 2.2.8. EMP İle İlgili Literatürdeki Çalışmalar .....                               | 24   |
| <b>3. MALZEME VE YÖNTEM</b> .....                                                  | 25   |
| 3.1. Malzemeler.....                                                               | 25   |
| 3.1.1 Ultrases Cihazı .....                                                        | 25   |
| 3.2. Yöntem.....                                                                   | 26   |
| 3.2.1 EMP Üretimi .....                                                            | 26   |
| 3.3. Analizler.....                                                                | 28   |
| 3.3.1. Bileşim Analizleri: .....                                                   | 28   |
| 3.3.2. Çözünür Azot Fraksiyonlarının Belirlenmesi .....                            | 29   |
| 3.3.3. Serbest Yağ Asidi Bileşiminin ve Miktarının Belirlenmesi.....               | 30   |
| 3.3.4. Uçucu Bileşiklerin Belirlenmesi .....                                       | 30   |

|                                                      |           |
|------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.5. İstatistiksel Analizler:.....                 | 31        |
| <b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>                 | <b>33</b> |
| 4.1. Çalışma Koşullarının Etkisinin Saptanması ..... | 33        |
| 4.2. Optimizasyon ve Doğrulama .....                 | 37        |
| <b>5. SONUÇLAR.....</b>                              | <b>49</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                                | <b>52</b> |
| <b>EKLER .....</b>                                   | <b>59</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>                                | <b>60</b> |



## ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2.1.** %5 (a/a) şeffaflığı, 20 kHz ve 31 W'da belirtilen sulandırılmış peynir altı suyu proteini konsantresi 80 çözeltileri: (a) su (A harfi arka planda açıkça görülebilir), (b) 0 dk'daki ultrases ve (c) 60 dk'lık ultrases (Ashokkumar ve diğerleri, 2009)..... 12
- Şekil 2.2.** Ultrasonikasyon gücünün *Lactobacillus acidophilus*'un yapısal hasarı üzerindeki etkisinin transmisyon elektron mikroskobu altındaki görüntüleri (Cameron ve diğerleri, 2008)..... 15
- Şekil 3.1.** Çalışmada kullanılan EMP Üretim tekniğinin ve yapılmış olan analizlerin akış diyagramı gösterimi ..... 27
- Şekil 4.1.** Ultrases gücü ile ultrases süresinin OUI (SÇA/TA) değeri üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği ..... 41

## TABLÖLAR LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 2.1.</b> Ultrasesin süt yağ globülü üzerine etkisi.....                                                                                                                                                                        | 8  |
| <b>Tablo 3.1.</b> Çalışma kapsamında kullanılan enzimlerin özellikleri ve oranları.....                                                                                                                                                 | 25 |
| <b>Tablo 3.2.</b> Ultrases İle Proteoliz İçin Merkezi Karma Dönel Tasarım (CCRD)<br>Deneme Deseni.....                                                                                                                                  | 26 |
| <b>Tablo 4.1.</b> US uygulanmış EMP'lerin çalışma koşullarının etkisi (ortalama $\pm$<br>standartma sapma). ....                                                                                                                        | 35 |
| <b>Tablo 4.2.</b> Enzim Modifiye Peynirlerin (EMP) proteolitik olgunlaşma değerleri .....                                                                                                                                               | 39 |
| <b>Tablo 4.3.</b> Enzim Modifiye Peynirlerin (EMP) proteolitik olgunlaşma değerleri<br>(katsayılar kodlanmış değerler için hesaplanmıştır).....                                                                                         | 40 |
| <b>Tablo 4.4.</b> Belirlenmiş olan teorik optimum işlem koşullarının deneysel verilerle<br>doğrulaması. ....                                                                                                                            | 42 |
| <b>Tablo 4.5.</b> Optimum ultrases ön işleme koşullarında üretilen EMP örnekleri ile<br>kontrol örneklerinin temel üretim aşamaları sonrasındaki (proteoliz ve<br>lipoliz) serbest yağ asidi bileşim ve miktarları (mg/100 g yağ). .... | 44 |
| <b>Tablo 4.6.</b> Optimum ultrases ön işleme koşulunda üretilen EMP ile kontrol<br>örneklerinin temel üretim aşamaları sonrasındaki (proteoliz ve lipoliz)<br>uçucu bileşik bileşim ve miktarları (mg/kg EMP).....                      | 47 |

## KISALTMALAR

|               |                                              |
|---------------|----------------------------------------------|
| <b>ANOVA</b>  | : Varyans Analizi                            |
| <b>US</b>     | : Ultrases                                   |
| <b>EMP</b>    | : Enzim Modifiye Peyniri                     |
| <b>US-EMP</b> | : Ultrases uygulanmış Enzim Modifiye Peyniri |
| <b>OÜİ</b>    | : Olgunlaşma Uzama İndeksi                   |
| <b>OYİ</b>    | : Olgunlaşma Yoğunluk İndeksi                |
| <b>SAİ</b>    | : Serbest Aminoasit İndeksi                  |
| <b>TA</b>     | : Toplam Azot                                |
| <b>SÇA</b>    | : Suda Çözünür Azot                          |
| <b>TCA-SN</b> | : Trikloroasetik Asitte Çözünür Azot         |
| <b>PTA</b>    | : Fosfotungustik Asitte Çözünür Azot         |
| <b>SPME</b>   | : Katı Faz Mikroekstraksiyonu                |

# 1. GİRİŞ

Gıda ürünlerinin depolanmaları sırasında fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik nedenlerden dolayı yapısal ve duyuşal özellikleri değişmektedir. Bu istenmeyen değişimler, genel olarak mikroorganizma gelişimi ve enzimatik reaksiyon kaynaklıdır. Dolayısıyla bunun önüne geçmek için mikrobiyal ve enzimatik inaktivasyonun sağlanması gerekir (Merterns ve diğerleri, 1992; Barbosa ve diğerleri, 1997). Bu amaçla ısıtma işlemi, kurutma, tuzlama ve dumanlama gibi işlemler yaygın olarak uygulanmaktadır. Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan ısıtma işlemleri, uygulama koşullarına bağlı olarak kimi olumsuz değişimlere neden olurlar (renk değişikliği, arzu edilmeyen aroma bileşikleri vb.) Bu olumsuz değişimlerin önüne geçmek, gıdaların raf ömrünü arttırmak, fonksiyonel özelliklerini iyileştirmek ve gıda bileşenlerinin özelliklerini geliştirmek amacıyla ısıtma olmayan alternatif teknolojilere eğilim artmıştır (Merterns ve diğerleri, 1992; Barbosa ve diğerleri, 1997). Bu kapsamda vurgulu elektrik alan, yüksek hidrostatik basınç, darbeli ışık, ışınlama, radyo frekans, ultrases vs. gibi yeni teknolojiler yer almaktadır. Bu teknolojiler arasında farklı kullanım alanlarına sahip olması ve endüstriyel uygulamalara uygunluğu açısından ultrases teknolojisi özel olarak öne çıkmaktadır. Ultrases teknolojisi, 20000 veya daha fazla titreşim gerçekleştirirken ses dalgaları ile enerji meydana getirmektedir. Kısaca ultrases teknolojisi bir ses dalgası uygulamasıdır. Ultrases teknolojisi, ana mekanizması olan kaviteasyondan yararlanarak gıda endüstrisinde mikrobiyal ve enzim inaktivasyonu, ekstraksiyon, kristalizasyon, dondurma/çözdürme, emülsifikasyon ve oksidasyon hızını artırma gibi çeşitli alanlarda ısıtma işlemlere göre pek çok avantaj sağlamış ve kullanım alanı bulmaya başlamıştır. Özellikle süt endüstrisinde yaygın olarak kullanılan yüksek ısıtma işleme kıyasla ultrases uygulaması, homojenizasyon verimini arttırmakta, jel kuvveti ve sıklığını iyileştirmekte, vizkozite ve su kapasitesini arttırabilmektedir (Akdeniz ve diğerleri, 2017). Bu iyileştirmeler ultrases uygulamasının sağladığı avantajların bir kısmıdır. Bununla birlikte kimi ultrases uygulamaları ile enzim inaktivasyonunun tersine, enzim aktivasyonunun arttırılması sağlanabilmiş ve bu açıdan diğer pek çok işlemle ayrı ve özgün bir uygulamaya alan açılmıştır. Henüz çalışma sayısı kısıtlı olmakla birlikte, ultrases uygulaması ile mikroorganizma membran geçirgenliğinin artışının, substratların enzimatik reaksiyonlara olan direncinin azalmasının ve/veya enzimlerin substratlara olan

maruziyetinin artmasının sağlanabildiği görülmüş; böylelikle enzimatik reaksiyonların hızlandırılabil­diği bildirilmiştir.

EMP olgunlaşma süresinin kısaltılması için peynirin enzim ile işlenmesi sonucu elde edilen bir üründür. EMP üretimin tamamı enzimatik reaksiyonlarla gerçekleştirilir ve bundan dolayı bu sürecin yönlendirilebilmesi, bu ürün için büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada enzim modifiye peynir üretiminde ultrases ön işlem uygulaması ile EMP  retim sürecinin kısaltılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, iki aşamalı EMP  retiminde, proteoliz öncesi ön işlem olarak farklı koşullarda ultrases uygulanmış ve ürün kalite özelliklerindeki değişim gözlemlenerek, işlem koşulları optimize edilmiştir.



## 2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Ultrases ve Kavitasyon

Ultrases, insanlar tarafından işitilebilen ses dalgalarının frekansından daha yüksek bir frekansa sahip ses dalgalarıdır. Başka bir ifadeyle ultrases, saniyede 20000 veya daha fazla titreşim gerçekleştirirken, ses dalgaları ile enerji meydana getirilmesi olarak da ifade edilmektedir. Ultrases varlığı ilk olarak dünya savaşları sırasında deniz altıları tarafından gönderilen ses dalgalarının, balıkların ölümüne sebep olması ile anlaşılmıştır (Moholkar ve diğerleri, 2003). Kavitasyon olgusu ise daha önce L. Euler tarafından 1754'teki su türbinleri teorisinde tahmin edilmiştir. Kavitasyon kelimesi aslen R. E. Froude tarafından yazılmış ve ilk önce 1895 yılında Barnaby ve Thornycroft tarafından alıntılanmıştır. Barnaby ve Parsons (1893), kavitasyon olayını keşfeden ve inceleyen ilk kişilerdir. Bu araştırmacılar, pervane kanatlarında buhar kabarcıkları oluşumunun, 1885 yılında İngiliz yüksek hızlı bir savaş gemisi olan HMS Daring'in denizdeki duruşunu olumsuz anlamda etkilediğini keşfetmişlerdir. Rayleigh, 1917'de büyük bir sıvı kütlesinde meydana gelen kabarcığın çökmesi sorununu çözerek kavitasyon çalışmalarının teorik temellerini atmıştır (Li ve diğerleri, 2015). 1960'larda da düşük frekanslı-yüksek enerjili ultrases endüstride kullanılmaya başlanmıştır.

Ultrases frekans aralığına göre üç grupta sınıflandırılmaktadır. Bunlar;

- Düşük Frekans- Yüksek Enerji Uygulaması:  $1 \text{ W/cm}^2$  üzerindeki yoğunluklarda 20 kHz ile 100 kHz arasındaki frekansları kullanan yüksek enerjili ultrases uygulamalarıdır.
- Yüksek Frekans- Düşük Enerji Uygulaması:  $1 \text{ W/cm}^2$  altındaki yoğunluklarda, 100 kHz ile 1 MHz arasındaki frekansları kullanan düşük enerjili ultrases uygulamalarıdır.
- Tanımlayıcı Ultrases Uygulaması: 1 MHz ile 10 MHz arasındaki frekansların kullanıldığı analitik tekniklerdir.

Yüksek frekanslı-düşük enerjili ultrases, gıdanın sertlik, asitlik, şeker içeriği, olgunluk, protein etkileşimleri gibi fiziko-kimyasal özelliklerini ölçmek amacıyla tahribatsız analitik

teknikte bir uygulama iken düşük frekans-yüksek enerjili ultrases, gıdanın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değiştirilmesinde etkili bir uygulamadır. Bununla birlikte mikroorganizma ve enzim inaktivasyonu amacıyla da kullanılır (Suteriya ve diğerleri, 2018).

Frekans aralığına göre belirlenen ultrases uygulamaları, çalışma kolaylığı sağlamanın yanı sıra işlem parametreleri (frekans, güç, uygulama süresi vb.) arasındaki en doğru ilişkinin yakalanmasındaki karmaşayı da azaltmaktadır. Bu uygulamanın ana mekanizması kavitasyona dayanmaktadır. Üretilen enerji saniyede 20000 titreşimle mekanik dalgalar halinde sıvıya gönderilir ve sıvı içerisindeki moleküller titreşmeye başlar. Bu titreşim komşu moleküllere aktararak ortamda bir enerji aktarımı sağlar. Bu süreçte rastgele noktalarda sıvının gaz forma dönüşmesi ile kabarcıklar oluşur. Devam eden enerji aktarımı ile kabarcıklar, sıkıştırma ve genişleme hareketlerinde bulunarak büyümeye başlarlar. Bu esnada kabarcığın iç kısmında  $N_2$  ve  $O_2$  gibi gaz molekülleri ve su buharı birikmeye başlar. Bu büyüme evresi kabarcık boyutu kritik boyuta ulaştığında, kabarcığın patlaması ile sonlanır. Bu patlama sonucunda ortamda yüksek bir enerji, türbülans ve kayma kuvvetleri oluşmaktadır. Bu olay “kavitasyon”dur. Burada açığa çıkan enerji ise “kavitasyon enerjisi” olarak adlandırılır. Uygulanan ultrases uygulamasına göre kavitasyon kabarcıkları iki farklı şekilde davranış gösterir (Yüksel ve diğerleri, 2013; Ashokkumar ve diğerleri, 2010).

Bu davranış biçimleri şu şekildedir:

**1- Kararlı Kavitasyon:** Genellikle yüksek frekans-düşük enerjili ultrases uygulamalarında görülür. Bu uygulamada, ortamdaki enerji aktarımının daha düzenli olması nedeniyle kabarcıklar denge boyutlarında salınmaktadır. Kabarcıkların bu davranışı kararlı kavitasyon olarak adlandırılır.

**2- Süreksiz Kavitasyon:** Genellikle düşük frekans-yüksek enerjili ultrases uygulamalarında görülür. Bu uygulamada da ortamdaki enerji yoğunluğundan dolayı kabarcıklar sürekli bir büyüme eğilimindedir ve daha hızlı bir salınım gösterir. Kabarcıktaki büyüme şiddeti, başlangıç boyutlarının en az iki katı olan bir yarı çapa ulaşmasıdır.

Gıda endüstrisinde esas olarak süreksiz kavitasyondan yararlanılmaktadır ve yaygın olarak süreksiz kavitasyonun yani düşük frekans-yüksek enerjili ultrases uygulamasının başlıca kullanılma nedenlerinden biri minimum düzeylerde serbest radikal oluşumunun yakalanabilmesidir. Kavitasyon bölgesi; sıvı, sıvı-gaz ara yüzeyi ve kabarcık boşluğu içindeki gazlı ortam olmak üzere üç farklı bölgeden oluşur. Kabarcıkların iç kısmı, daha öncede belirtildiği gibi su buharı, N<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub> gibi gaz molekülleri ile doldur (Gallo, 2018). Kabarcığın patlaması sırasında açığa çıkan bu su buharı ve gaz molekülleri yüksek sıcaklıklara maruz kaldıklarından dolayı endotermik kimyasal reaksiyonlara girerler ve çeşitli reaktif radikaller oluştururlar. Bununla birlikte suyun pirolizi sonucu da OH<sup>\*</sup> ve H<sup>\*</sup> radikalleri oluşmaktadır (Gallo, 2018). Bu süreç, uygulama koşullarına bağlı olarak aşağıdaki reaksiyon dizileri ile gerçekleşebilir.



(1) ve (3) numaralı reaksiyon dizileri, diğerlerine göre daha düşük enerji ile elde edilen tepkime yollarıdır. Dolayısıyla bu durum düşük sıcaklıklarda bile serbest radikal oluşumunu gösterir. Sonuç olarak çeşitli yollarla açığa çıkan radikaller, bir takım oksidasyon ve indirgeme reaksiyonlarına neden olurlar ve bu reaksiyonlar, gıdaların besin özelliklerini özellikle de lezzeti olumsuz yönde etkiler (Leong ve diğerleri, 2015).

Ortamdaki serbest radikal sayısı, aktif kabarcık sayısına ve kabarcık patlamasının yoğunluğuna bağlıdır. Bu iki olayın şiddetini, frekans belirlemektedir. Frekans arttıkça, düşük enerji salınımı ile daha küçük kabarcıklar oluşur ve böylelikle ortamdaki kabarcık sayısı artar. Frekans düştükçe de yüksek enerji salınımı ile daha büyük kabarcıklar oluşur ve ortamdaki kabarcık sayısı azalır (Juliano ve diğerleri, 2015). Büyük kabarcıklar daha yüksek bir enerji ile patlamalarına rağmen ortamdaki kabarcık sayısının daha az olması ve kabarcığın patlaması ile açığa çıkan su buharının hacimsel olarak daha az yer kaplamasından dolayı düşük frekans-yüksek enerjili ultrases uygulamalarında serbest radikal seviyesi minimum düzeylerde yakalanabilir (Juliano ve diğerleri, (2015). Bu durum işlem parametrelerinin aralarındaki ilişkinin önemini bir kez daha vurgular. Gıda

endüstrisinde ultrases uygulamaları sonucunda oluşan kavitasyonun, yarattığı etkiler çeşitli fiziksel ve kimyasal reaksiyonları uyarır. Bu da bir takım olumsuzluklara yol açabilir. Fakat bu süreçler, çeşitli aşamalarda kontrol edildiğinde stratejik bir avantaja da dönüştürülebilir. Bu, ultrasesin yeni uygulama alanlarındaki potansiyel etkisini gösterir.

### **2.1.1. Ultrases Cihazı ve Ekipmanları**

Ultrases cihazları kullanıldığı alanlara göre farklılık göstermekle birlikte, üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bunlar, elektrik jeneratörü, dönüştürücü ve verici bileşenleridir. Elektrik jeneratörü, dönüştürücüyü belirli bir frekansta çalıştırmak için gerekli elektrik enerjisini sağlar. Ultrases dönüştürücüsü ise, elektrik salınımlarını benzer frekanstaki mekanik titreşimlere dönüştürür. Son bileşen olan vericinin temel işlevi de mekanik dalgaları dönüştürücüden ortama iletmektir (Abesinghe, 2018).

Endüstride doğrudan (ultrases homojenizatörü) ve dolaylı (ultrases banyosu) olarak iki tip ultrases cihazı/uygulaması bulunmaktadır. Ultrases homojenizatörleri, mekanik dalgaları dönüştürücüden numuneye doğrudan aktarır iken ultrases banyosu, çeperlerine veya su banyosunun tabanına bağlı dönüştürücüden gelen mekanik dalgaları su aracılığıyla numuneye aktarır. Ultrases homojenizatörlerinde aktarılan enerji yoğunluğu, ultrases banyosuna kıyasla yaklaşık yüz kat daha yüksektir. Bu durum, düşük hacimler için yoğun bir kavitasyon enerjisi elde etmemizi sağlar. Bu da ultrases homojenizatörlerini laboratuvar ölçekli çalışmalar için daha uygun kılar (Abesinghe, 2018).

Ultrases uygulamaları, bazı sistemlerde tek başına yeterli olurken bazı sistemlerde de yeterli derecede inaktivasyon sağlamak, daha etkin sonuçlar elde etmek amacıyla ısı ve/veya basınç gibi işlemler ile kombine edilerek kullanılmaktadır. Bu kombine uygulamalar üç şekilde sınıflandırılır (Songül ve diğerleri, 2013). Bunlar;

- Termosonikasyon (Ultrases + Isıl İşlem)
- Manosonikasyon (Ultrases + Basınç)
- Termomanosonikasyon (Ultrases + Isıl İşlem + Basınç)

Kombine uygulamaların daha etkin sonuçlar vermesinin temel nedeni sinerjistik etki yaratmalarıdır. Özellikle ısıya dirençli enzimlerin ve mikroorganizmaların inaktivasyonunu kolaylıkla gerçekleştiren uygulamalardır.

## **2.2. Düşük Frekanslı Ultrases Uygulamasının Süt Bileşenleri Üzerine Etkileri**

Günümüze kadar gerçekleştirilmiş ultrases uygulamalarının süt ve süt ürünleri alanındaki çalışma sonuçları ele alındığında, süt yağı globülleri ve diğer süt bileşenlerinin ultrases işleminden olumlu veya olumsuz anlamda etkilendiği sonucuna varılmıştır. Düşük frekanslı ultrases uygulamaları kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları her bir süt bileşeni için ayrı ayrı ele alınmıştır.

### **2.2.1. Süt Yağı**

Villamiel ve Jong (2000) çalışmalarında ultrases ve termosonikasyon uygulamalarının süt yağı globülleri üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada sıcaklık dereceleri 70 °C ve 75,5 °C olan ısıtma işlemi ile ultrases birlikte kullanılmış ve yağ globüllerinin boyutlarında %81,5 oranına kadar bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak termosonikasyon uygulamaları, ultrases uygulaması ile kıyaslandığında daha iyi bir partikül dağılımı sergilediği bildirilmiştir.

Wu ve arkadaşları (2000), ultrases işleminin süt homojenizasyonu üzerindeki etkisini ve yağ globüllerinin boyut dağılımının mikroskopik fotoğraflarını incelemişler ve yüksek genlikli ultrasesin homojenizasyon etkisinin daha iyi olduğunu tespit etmişlerdir.

Yağ globüllerinin boyut dağılımını belirlemek için mikroskopik görüntüleme ve oküler mikrometre kullanarak sütün homojenleştirilmesi üzerindeki etkisini inceleyen Ertuğay ve Şengül (2004) tarafından da benzer sonuçlar bildirilmiştir. Gerçekleştirdikleri çalışmada, elde edilen en yüksek homojenizasyon verimine, 450 W'lık güç seviyesinde 10 dakika boyunca uygulanan ultrases sonucu ulaşılmıştır. Bu şartlar altında gerçekleştirilen uygulama sonunda en düşük yağ globül çapı 0,725 µm olarak kaydedilmiştir. Sonuç olarak, ultrases süresi ve güç seviyesi arttıkça homojenizasyon veriminde iyileşme olduğu görülmüştür.

Bahsedilen çalışmalar ile birlikte literatürde yer alan bazı çalışmalarda Tablo 2.1'de derlenmiştir.

**Tablo 2.1.** Ultrasesin süt yağ globülü üzerine etkisi

| Amaç                                                                                  | US Koşulları                                                   | Elde Edilen Bulguların Bir Kısımı                                          | Referans                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| US'in homojenizasyon üzerine etkisi                                                   | Güç: 450 W<br>Süre: 10 dk                                      | En küçük yağ globül çapı 0,725 $\mu$ m                                     | (Ergutay ve diğerleri, 2004)     |
| US ve termosonikasyon uygulamalarının kıyaslanması                                    | Sıcaklık: 70-75°C<br>Süre: 1,6 ve 10dk                         | Termosonikasyon sonucu yağ globül boyutlarında %81,5 oranına kadar azalma  | (Villamial ve diğerleri, 2000)   |
| US ile klasik homojenizasyon etkilerinin kıyaslanması                                 | Frekans: 20 kHz<br>Güç: 90-450 W                               | US, klasik homejenizasyona kıyasla daha iyi (özellikle 450 W)              | (Villamial ve diğerleri, 2000)   |
| US'in kazein miselleri üzerine olan etkisi                                            | Frekans: 20 kHz<br>Süre: 60 dk                                 | Yağ globül boyutu 10 nm'ye kadar azaltma                                   | (Wu ve diğerleri, 2001)          |
| Krem Peynir üretiminde termosonikasyon yağ globülleri üzerine etkisi                  | Frekans: 20 kHz<br>Güç: 0-100 W                                | Yağ globül boyutlarında 7 $\mu$ m'den 2 $\mu$ m'ye azalma                  | (Rubio ve diğerleri, 2016)       |
| Termosonikasyon uygulamasının krema üzerine etkisi                                    | Frekans: 20 kHz<br>Süre: 1-3 dk                                | Sürenin artmasıyla homojenizasyon etkinliğinde artma                       | (Vijayakumar ve diğerleri, 2015) |
| Isıl işlem uygulanan yoğurtlar ile termosonikasyon uygulanan yoğurtların kıyaslanması | Frekans: 24 kHz<br>Güç: 400 W<br>Frekans: 30 kHz<br>Güç: 100 W | Termosonikasyon sonucu yağ globül boyutları < 1 $\mu$ m                    | (Riener ve diğerleri, 2009)      |
| US'in koyun sütü üzerine etkisi                                                       | Süre: 2-15 dk                                                  | Süre ve güç arttıkça homojenizasyon etkisinde artma                        | (Bosiljkov ve diğerleri, 2012)   |
| Termosonikasyon ile yüksek sıcaklıkta klasik homojenizasyonun krema üzerine etkisi    | Sıcaklık: 10 °C<br>Frekans: 31 W/50 W                          | 50 °C'de elde edilen yağ globül boyutları US ile 10°C 'de elde edilmiştir. | (Chandrapala ve diğerleri, 2016) |

Özetle, yağ küreciklerinin ortalama büyüklük ve büyüklük dağılımı akustik kavitasyon sırasında üretilen fiziksel etkilere bağlı olmakla birlikte ultrases işlem gücüne ve süresine bağlı olarak yağ globüllerinin boyutunda küçültme etkisi oluşturmaktadır.

## 2.2.2. Süt Proteini

Süt proteinleri; süt ürünlerinde çeşitli fiziksel, kimyasal ve duyuşsal özellikleri etkiledikleri için ayrı bir önem taşımaktadırlar. Ultrases işleminin ana mekanizması olan kavitasyon proteinler üzerinde çeşitli etkiler meydana getirmektedir.

Chandrapala ve arkadaşları (2012) ultrases işleminin (60 dakika boyunca 20 kHz'de), taze yağsız süt ve sulandırılmış misel kazein numuneleri üzerine olan etkisini araştırmışlardır. 60 dakika süreyle ultrases işlemine tabi tutulan yağsız süt numunesi için kazein miselinin

boyutunda, serbest kazein içeriğinde ve çözülebilir kalsiyum konsantrasyonunda, çözünür peynir altı suyu proteininde küçük bir artış ve buna karşılık viskozitede bir azalma ve pH'da küçük fakat geçici bir azalma gözlemlediklerini bildirmişlerdir.

Liu ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada ise misellerden serum fazına bir protein salınımı olduğu ve sulandırılmış yağsız sütte (%10 a/a toplam katı madde, pH 6,7–8,0, sıcaklık <30 °C) ultrases işleminin (286 kJ/kg spesifik enerji girişinde 20, 400 veya 1,600 kHz) bir sonucu olarak kazein misellerinin bozulmaya uğradığı tespit edilmiştir. Bu çalışmadan ve diğer çalışmalardan yola çıkarak daha düşük pH koşullarında ve daha düşük frekanslarda kazein miselinin stabilitesinin bozulduğu sonucuna varılmaktadır. Bu durum bizlere misellerin büyüklüğünün değiştirilmesini sağlayıp misel ve serum fazları arasında kazeinlerin ayrışmasını sağlayarak yeni işlevsellikte bir süt ürününün geliştirilebileceğini gösterdiğini bildirmişlerdir. Kazein miselleri, özellikle yüksek pH'da ultrases işlemi ile kısmen parçalanabilmesi nedeniyle bu durumun maya ve asit jelasyonunun arttırılmasında da önemli bir rol alacağını bildirmişlerdir.

Madadlou ve arkadaşları (2009) ultrases gücü arttıkça (35 kHz frekansında) belirli bir pH değerindeki kazein çözeltisi için çözelti bulanıklığının ve partikül çapının azaldığını bildirmişlerdir. Ayrıca daha yüksek bir pH'da tekrar birleştirilen misellerin çaplarındaki azalmanın, arttığını gözlemlemişlerdir. Dolayısıyla bu durum ultrases ve pH arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır. Burada bahsedilmekte olan yeniden birleştirilen kazein misellerinin bozulması durumu ultrases işlemine bağlı kesme kuvvetinin etkisinden ve yüksek pH'da gevşek kazein misel yapısından kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Villamiel ve Jong (2000) sürekli akışlı yüksek yoğunluklu ultrases işleminin (ısı üretimi olan ve olmayan) peynir altı suyu proteinleri ( $\alpha$ -laktalbumin [ $\alpha$ -La] ve  $\beta$ -laktoglobulin [ $\beta$ -Lg]) üzerindeki etkisini incelemiş ve termosonikasyon işleminin (61, 70 ve 75,5 °C), ultrasese kıyasla peynir altı suyu proteinlerinde daha yüksek denatürasyonlara yol açtığını bildirmişlerdir. 15 dakikalık ultrases işleminin, maksimum  $\beta$  tabaka ve S --- S içeriğini oluştururken, 30 dakikalık uygulama sonucunda minimum düzeyde di-tirozin, karbonil ve antioksidan aktivite oluşturduğu sonucuna varılmıştır. Gerçekleştirilen bu çalışmada elde edilen verilerin ultrasesin  $\beta$ -Lg'nin antioksidan aktivitesini arttırma potansiyeline sahip olduğunu gösterdiğini bildirmişlerdir.

Benzer bir gözlem Taylor ve Richardson (1980) tarafından da bildirilmiştir. Bu araştırmacıların gerçekleştirdikleri çalışmalarında ultrases işleminin, yağsız sütün antioksidan aktivitesi üzerindeki bir linoleat emülsiyon sisteminde, prooksidant olarak hemoglobin kullanıp etkisini incelemişlerdir. İncelemelerinin sonucunda yağsız sütün ve kazein fraksiyonlarının antioksidan aktivitesinin arttığını gözlemlemişlerdir. Yağsız sütün antioksidan aktivitesindeki artış, kazein miselinin ultrases ile indüklenen olası bozulmasının bir sonucu olarak ortaya çıkan, kazeinin etkin konsantrasyonundaki artışla ilişkilendirmişlerdir.

Chandrapala ve ekibi (2012), 60 dk süreyle 20 kHz 'lık bir ultrases uygulamasının bir sonucu olarak saf  $\beta$ -laktoglobulin'in yüzey hidrofobikliği ve reaktif tiyol içeriğinde aşamalı bir artış ve  $\alpha$ -laktalbümin proteini yüzey hidrofobikliğinde ise önemli bir artış meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Sonuç olarak a-La proteinin, ultrasesden daha fazla etkilendiğini bildirmişlerdir.

Gerçekleştirilen bu çalışmalara göre kontrollü ultrases işlemi, kazein misellerinin doğal halini etkilemeden prosese bağlı protein agregasyonunu tersine çevirmek için faydalı bir şekilde uygulanabilecek bir teknik olarak kabul görülmektedir.

### **2.2.3. Süt Bileşenlerinin Fiziko-kimyasal Özellikleri Üzerine Etkisi**

Kresic ve arkadaşları, peynir altı suyu proteinlerinin reolojik ve termofiziksel özelliklerine olan (peynir altı suyu proteini konsantresi ve peynir altı suyu proteini izolatu) üzerinde yüksek basınçlı işleminin, ultrasesin ve tribomekanik aktivasyonun (parçacıklar arasında sürtünmeyi ve çarpışmayı indükleyen bir rotor sistemi)) etkisini incelemişler ve ultrases işlemi sonucunda peynir altı suyu proteini konsantresi ve peynir altı suyu proteini izolatu 'nın sudaki çözünürlüklerinde olumlu sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir (Kresic ve diğerleri, 2008).

Kresic ve ekibi tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada elde edilen sonuçların bir kısmı şu şekildedir:

- Ultrases uygulaması, peynir altı suyu proteinlerinin sudaki çözünürlüğünü yaklaşık %5-6 oranlarında arttırmıştır. Bu durum ultrases uygulamasıyla proteinin doğal yapısının açılması sonucu açığa çıkan hidrofilik grupların (amino ve karboksil grupları) suya maruz kalmasıyla açıklanabileceğini bildirmişlerdir.
- Ultrases işlemine bağlı olarak viskozite de daha ılımlı bir artış gözlemlenmiştir. Bu durum, hidrofilik kısımların suya maruz kalmasının bir sonucu olarak artan su tutma kapasitesinden kaynaklanabileceği fikrini ön plana çıkarabildiğini bildirmişlerdir..

Ayrıca gerçekleştirilen bu çalışmada ultrases işleminin bir sonucu olarak peynir altı suyu proteinlerinin başlangıçtaki donma ve çözünme sıcaklıkları 0,5-1°C'ye kadar düşüş gösterdiği bildirilmiştir. Bu sıcaklık değişimi ise fiziko-kimyasal özelliklere sahip olan küçük proteinlerin varlığı ile ilişkilendirmişlerdir.

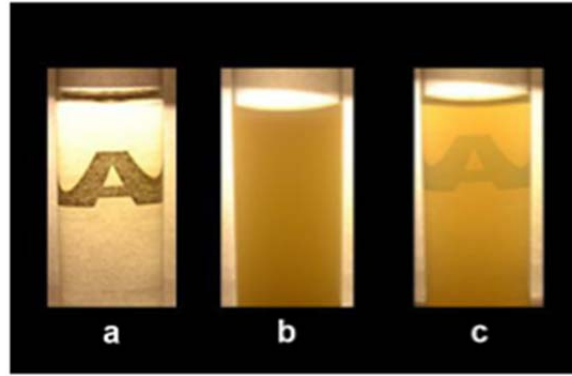
#### **2.2.4. Süt Ürünlerinde ve Prosesinde Ultrases Uygulaması**

Chandrapala, Zisu, Kentish ve Ashokkumar (2013), protein yüzeyi hidrofobikliğinde bir değişiklik olduğunu ve 7,6 mL tetra sodyum piro fosfat (TSPP) ilavesiyle oluşan misel kazein çözeltisi jellerine uygulanan ultrases işlemi sonucunda protein yüzey yükünde bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Tetra sodyum piro fosfat ilavesinden önce ultrases uygulandığında ince bir protein ağına sahip katı formda bir jel yapısı ve düşük sinerisis gözlenirken, Tetra sodyum piro fosfat ilavesinden sonra yapılan ultrases uygulaması sonucunda tutarsız zayıf jel benzeri bir yapı gözlemlenmiştir. Elde ettikleri sonuçlar, ultrases işleminin kazein sistemlerinin nihai jel özellikleri üzerinde önemli bir etkisi olabileceğini gösterdiğini bildirmişlerdir.

Leong ve arkadaşları (2018) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise kazein ve whey proteinlerini farklı oranlarda içeren süt sistemlerine, ultrases uygulanarak whey proteinleri ile kazein arasındaki fonksiyonel etkileşimler incelenmiştir. Leong ve arkadaşları (2018) tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada, ultrases işleminin (1 dakika boyunca 20,8 W

kalorimetrik güçte 20 kHz), jelleşmeyi iyileştirdiği ve viskoziteyi düşürdüğü gözlemlenmiştir. Bu durum, ısı ile indüklenen protein agregatlarının parçalanmasıyla ilişkilendirilmiştir. Buna karşılık ısıtılmış kontrol numunesi, peynir altı suyu proteinleri içermeyen kazein sistemi (% 9 a/a) için jelleşme fonksiyonunda azalma ve viskozitesinde artış görülmüştür.

Bu alanda yapılan son araştırmalar, peyniraltı suyu proteinleri konsantresinin sudaki çözünürlüğünü, partikül büyüklüğü dağılımını, jel kuvvetini ve vizkozitesini önemli ölçüde değiştirebileceğini göstermektedir (Ashokkumar ve diğerleri, 2010). %5'lik bir peynir altı suyu proteinleri konsantresi çözeltisine uygulanan 20 kHz'lik bir frekanstaki ultrases uygulaması, çözeltinin berraklığında gözle görülür şekilde iyileşmeler meydana getirmiştir. Bu çalışmaya ait görüntüler Şekil 2.1'de verilmektedir.



**Şekil 2.1.** %5 (a/a) şeffaflığı, 20 kHz ve 31 W'da belirtilen sulandırılmış peynir altı suyu proteini konsantresi 80 çözeltileri: (a) su (A harfi arka planda açıkça görülebilir), (b) 0 dk'daki ultrases ve (c) 60 dk'lık ultrases (Ashokkumar ve diğerleri, 2009)

Çözelti berraklığındaki bu gelişme, ultrasesin fiziksel etkilerinden kaynaklanan sulandırılmış peynir altı suyu protein konsantresinin çözünmeyen bileşeninin partikül boyutundaki küçülmesinden olduğu bildirilmiştir.

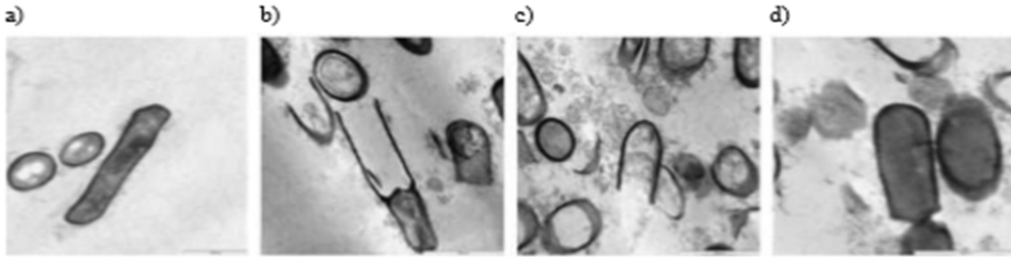
Emmental peyniri için su tutma kapasitelerinin artması ve mavi peynirler için yüksek lipolitik enzim aktivitesi, ultrases kullanılarak çiğ sütteki yağ globüllerinin boyutlarının azaltılmasıyla sağlanmıştır (Nguyen ve diğerleri, 2010). Krema, yumuşak veya yüksek yağlı sert peynirlerin üretilmesi için sütün yağ konsantrasyonunu arttırmak amacıyla

kullanılabilmektedir. Dokuyu iyileştirmek için ilave edilmeden önce bu kremayı homojenizasyon işlemine tabi tutmak yaygın bir uygulamadır. Bununla birlikte homojenizasyon yerine ultrases işlemine tabi tutulmuş kremanın peynir dokusunu nasıl etkilediği merak konusu olmuş ve Chandrapala ve diğerleri tarafından bu konu ele alınmıştır. Bu kapsamda gerçekleştirdikleri çalışmalarında standartlaştırılmış peynir sütünün eklenmesinden önce ultrases işlemine (1 dakika boyunca 50 W) veya homojenizasyona (80 bar) tabi tutulan yaklaşık % 40 yağ içeren krema sistemleri kullanılarak peynirin maya ve asit kaynaklı jelleşme özellikleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuç ise şu şekildedir; ultrases işlemine tabi tutulmuş kremanın ilavesi ile sütün pıhtılaşma süresinin yarı yarıya azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum  $\kappa$ -kazeinin büyük bir kısmının misel yüzeyinde yer alması gerçeğiyle açıklanabilmektedir. Kazein, yağ globüllerini içine alırken,  $\kappa$ -kazein seviyesi etkili bir şekilde azalır ve pıhtılaşmanın meydana gelebilmesi için belirli düzeyde  $\kappa$ -kazein hidrolizi gerçekleşmesi gerekir (Nguyen ve diğerleri, 2010). Ayrıca homojenizasyon, mevcut kazeinin yüzey alanını artırır ve Cymosin enziminin  $\kappa$ -kazeine etki etmesi için daha uygun bir ortam sağlar. Böylece peynir mayasının pıhtılaşma süresi azalmaktadır. Bununla birlikte jel mukavemetinin kaybı, pıhtıda daha fazla yağ dağılımına neden olmaktadır. Bu durum ise daha kuvvetli bir ağ oluşturmak için kazein partiküllerindeki mevcut azalmayla ilişkilendirilebileceği veya jel yapısının sürekliliğini bozması ve jelde zayıf merkezler olarak işlev görmesi nedeniyle jele sıkışan küçük yağ globülleri varlığından kaynaklanıyor olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca üreticilerin benzer boyutlandırmaları elde etmek amacıyla yüksek sıcaklık homojenizasyonu yerine, düşük sıcaklıkta ultrases kullanmaları, toplam enerji talebinin düşmesi gibi çeşitli avantajlar sağlayabileceklerini bildirmişlerdir.

Ultrases işleminin, kültür kullanılan süt ürünlerinin fermentasyon süresini azaltmada etkili bir rol aldığı bilinmektedir. Yoğurt için fermentasyon süresi, kültürlerin eklenme zamanı ile pH'nın 4,7'ye ulaştığı zaman arasındaki aralık olarak tanımlanır (Williams ve diğerleri, 2002). Fermentasyon süresinin azaltılması, üretim zamanını ve maliyetini azaltmaya yardımcı olmaktadır. Uygulamanın kolloidal kalsiyum çapraz bağlarının çözünmesi üzerine olan etkisi nedeniyle yoğurt jel ağı yapısındaki yeniden düzenlemelerin azaldığı rapor edilmiştir. Ayrıca mayalanma süresinin azaldığı bildirilmiştir. Bununla birlikte daha uzun fermentasyon sürelerine kıyasla sinerisisin ve büyük gözenek oluşumunun azaldığı gözlemlenmiştir (Peng, 2010). Sonuç olarak, peynir altı suyu ayrılması ve büyük

gözeneklerin oluşumu, daha uzun fermentasyon sürelerine kıyasla azalma göstermiştir (Peng, 2010). Ayrıca *Bifidobacterium sp.* inoküle edilen sulandırılmış yağsız süt (% 15, a h) 20 kHz'de ve 100 W'lık koşullar altında 15 dakika süreyle ultrases işlemine tabi tutulmuş ve ardından sıcaklığı 37°C olan fermentasyon çalışması sırasında fermentasyon süresinin %11-26 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Nuguyen, 2009). Buna benzer araştırmalar kapsamında birkaç araştırmacı, ultrases uygulamasının toplam fermentasyon süresini etkilemeden sütteki laktik asit bakterilerinin (LAB) büyüme eğrisindeki gecikme fazının azaldığını veya tamamen ortadan kalkmış olabileceğini bildirmişlerdir.

Ultrases uygulamasının, fermentasyon sürecini tetiklemedeki rolünü açıklamak için birkaç mekanizma öne sürülmekle birlikte daha çok Nguyen ve arkadaşları (2009) tarafından açıklanan mekanizma ön plana çıkmıştır. Nguyen ve arkadaşları (2009), fermentasyon uyarıcı etkisinin kompleks fotolitik sistemlerden, ultrases işlem altında parçalanmış bakteri hücrelerinden salgılanan bir takım büyüme faktörleri gibi hücresel içeriklerin sızmasından ve uygulamanın  $\beta$ -galaktosidaz enzimi üzerine olan etkisinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Mikroskopi kullanılarak, ultrases işlem gücünün laktik asit bakterilerinin sahip olduğu hücre duvarı geçirgenliği üzerindeki etkisi çeşitli araştırmacılar tarafından ele alınmıştır (Cameron ve diğerleri, 2008; Shershenkov ve diğerleri, 2015; Tabatabai ve diğerleri, 2008; Ewe ve diğerleri, 2012). Ultrases uygulamasına maruz kalan laktik asit bakterilerinde hem gözenek oluşumu hem de hücresel hasar görüldüğü bildirilmiştir (Ewe ve diğerleri, 2012). Uygulamanın, laktik asit bakterilerinin hücre zarlarında üç çeşit mikro-hasar meydana getirdiği tespit edilmiştir. Yani mikro-çatlaklar, mikro-boşluklar ve yırtılmalar açığa çıkmaktadır (Tabatabai ve diğerleri, 2008). Ultrases (20 KHz) gücünün, *Lb. acidophilus*'un yapısal hasarı üzerindeki etkisinin derinlemesine incelenmesi, Cameron ve arkadaşları (2008) tarafından transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada Şekil 2.2'de gösterildiği gibi görüntüler elde edilmiştir.



**Şekil 2.2.** Ultrasonikasyon gücünün *Lactobacillus acidophilus*'un yapısal hasarı üzerindeki etkisinin transmisyon elektron mikroskobu altındaki görüntüleri (Cameron ve diğerleri, 2008)

5 dakikalık bir ultrases uygulamasının, hücre yapısında hasar oluşturduğu ve hücrelerin içinde az sayıda lipozom benzeri keseciklerin açığa çıktığı tespit edilerek *Lb.acidophilus* üzerinde ultrases uygulamasının hem harici hem de dahili hücre hasarına neden olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca akış sitometrik analizi, ultrasesin laktikasit bakterilerinin hem membran geçirgenliğini hem de akışkanlığını arttırdığını ortaya koymaktadır (Ewe ve diğerleri, 2012). Bu değişiklikler, hücre içi kavitasyon veya ilgili hava kabarcıkları nedeniyle hücre zarı lipidlerinin emülsifikasyonundan (lipit peroksidasyonu) kaynaklandığını bildirmişlerdir. Bu nedenle, bakteriyel hücre zarlarında açığa çıkan gözenek oluşumu, hücre zarının geçirgenliğini ve metabolitlerin hücresel taşınmasını artırması nedeniyle sütün pıhtılaşma süresinin ultrases tarafından kısaltılabileceğinin açıkça ortaya koyduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, bakteriyel hücre zarı ile ilişkili değişiklikler artan uygulama genlikleri ve süreleri ile daha belirgin bir hal almaktadır (Ewe ve diğerleri, 2012). Bu nedenle, bu tip ultrases işlem parametreleri için optimum koşullar, fermente süt ürünlerine ultrases uygulanmadan önce dikkatlice belirlenmesi gerekmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda şu unutulmamalıdır ki; düşük frekanslı ultrases uygulaması ile hücre zarında elde edilen gözenekler ve bunun sonucunda açığa çıkan hücre atıklarının diğer hücrelerin yüzeyinde birikmesiyle hücre zarının deformasyonu, hücre içi içeriğinin sızmasına neden olarak sitoplazmik membrana zarar verebilir. Bu nedenle yaşayabilir hücre sayımı, raf ömrünün belirlenmesinde kritik bir parametre olduğu için ultrases işlem yoğunluğu ve süresi özellikle “probiyotikli ürünlerde” dikkatli bir şekilde belirlenmesi gerektiğini ön plana çıkardığını bildirmişleridir.

Literatürde düşük frekanslı ultrases uygulamasının, süt lipid oksidasyonunu teşvik etmesindeki etkisinin ele alındığı çalışmalar yer almaktadır (Reiner ve diğerleri, 2009; Chouliara ve diğerleri, 2010). Bunlardan bazıları şu şekildedir; Chouliara ve arkadaşları, çalışmalarında ultrases uygulanmış (US koşulları: 24 kHz frekans ve 15–25 °C sıcaklık, 187 kJ/kg civarındaki spesifik enerji) çiğ ve pastörize sütte açığa çıkan uçucu birleşiklerin oksidatif reaksiyonlardan kaynaklandığını tespit etmişlerdir. Bununla birlikte Reiner ve arkadaşları, 24 kHz ve 45 °C'de ticari olarak işlenen pastörize edilmiş homojenize sütte uçucu maddelerin varlığını, 240 kJ/kg gibi daha büyük spesifik enerjilerde (ya da 400 W ölçülen güçte 0,2 L sütün 2,5 dakikalık işlenmesi) elde ettiklerini bildirmişlerdir. Ultrases uygulaması sırasında sıcaklık 60 °C'nin üzerine çıkabileceğinden dolayı bu yüksek enerji giriş seviyeleri, herhangi bir endüstriyel alanda kullanım açısından çok yüksek seviyeler olarak kabul edilmektedir. Ultrases işlemi sırasında bir dizi sıkıştırma ve ses döngüsündeki basınç azalmasının neden olduğu lokalize basınç gradyanlarından kaynaklanan kavitasyon kabarcıklarının çökmesi, sıvıda sıcaklık artışına neden olmaktadır (Moholkar ve diğerleri, 2000; Ashokkumar ve diğerleri, 2007). Kavitasyonun yarattığı aşırı sıcaklık ve kayma koşulları ise lipid oksidasyonunu artırabilen hidroksil ve hidrojen radikallerinin açığa çıkmasına neden olur (Mason ve diğerleri, 2011). 20 kHz ve 400 W nominal güçte ultrases işlemi uygulanan çiğ sütte, benzer sonuçlar Marchesini ve arkadaşları tarafından da bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada yanma lezzetinin tespit edilmesinin yanı sıra ultrases uygulamasından önce CO<sub>2</sub> ilavesi yapıldığında, oksidasyon ürünlerinin oluşumunun azaldığı sonucuna varılmıştır. Sütten gaz arındırma işlemi için ihtiyaç duyulan düşük enerji gereksinimleri, çözeltide mevcut olan oksijen miktarını da azaltabilmektedir. Böylelikle düşük spesifik enerjilerde hidroksil radikal konsantrasyonu belirli düzeylerde elde edilebilmektedir. Uçucu birleşiklerin oluşumunu tetikleyen mekanizma, elde edilen sistem içerisinde düşük miktarlardaki serbest radikallerin varlığı ile oksidasyon reaksiyonlarının başlatılmasını teşvik eden büyük kavitasyon kabarcıklarının şiddetli çökmesi ile ilgili olabilme ihtimali çok yüksektir. Ayrıca hazne içerisinde akan süt, herhangi bir anda ultrases işlemine maruz bırakıldığında prob ucuna yakın olan bölgelerde oksidasyon reaksiyonu artış göstermektedir. Bu durum, prob ucunun yakınında çok yüksek yoğunluklu bölgelerin oluşmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir.

(Trujillo ve diğerleri, 2011). Bunun yanı sıra artan akışla birlikte artan sistem basıncı söz konusudur (Leong ve diğerleri, 2009). Bu nedenle süt endüstrisinde ultrases uygulaması

devreye gireceği zaman kısa işlem süreleri ve düşük spesifik enerjiler gibi uygulama şartlarının dikkate alınması gerekmektedir.

### **2.2.5. Ultrases Uygulaması İle Enzim Aktivasyonunun Arttırılması**

Enzimler, aktivasyon enerjisini düşürerek bir reaksiyonun hızını arttıran biyolojik katalizörlerdir. Sadece gıda endüstrisinde değil, çok çeşitli biyokimyasal reaksiyonları katalize ederler ve diğer prosedürlere (asit-baz, yüksek sıcaklık vb.) kıyasla yüksek verimlilik ve spesifiklik sunarlar. Bu avantajlarının yanı sıra enzimler yoğun koşullar altında düşük bir stabiliteye sahiptir ve ticari kullanımlar için pahalıdır (Bermejo ve diğerleri, 2004; McAuliffe ve diğerleri, 2007). Bu olumsuzlukların üstesinden gelmek amacıyla ısısal olmayan alternatif teknolojilere duyulan ilgi artmıştır. Enzimatik reaksiyonların maliyetlerinin azalması için ihtiyaç duyulan işlemlerden biri kullanılan enerjinin azalmasıdır. Enerjinin azalması için de gerekli koşullardan biri enzim aktivasyonunun arttırılmasıdır. Enzimatik reaksiyonlar boyunca üç hedef vardır. Bunlar; enzim, substrat ve kompleks nitelikte olan reaksiyon ortamıdır. Dolayısıyla enzim aktivasyonunun arttırılması, uygulama koşullarının yanı sıra temel olarak bu üç faktöre bağlılık gösterir. Bu da enzim aktivasyonunu arttırmak için temel olarak üç konuya odaklanılması gerekliliğini ortaya koyar. Bunlar; enzim modifikasyonu, substrat ön işlemi ve enzim-substrat kombinasyonunun güçlendirilmesidir (Feng ve diğerleri, 2010), Wang ve diğerleri, 2018). Bu kapsamda kimyasal, fiziksel ve biyolojik yöntemler ile bu tarz iyileşmeler sağlanabilir. Bu yöntemler arasında fiziksel bir uygulama olan ultrases uygulaması, gıda endüstrisinde sağlamış olduğu pek çok avantajla önemli bir yere sahiptir. Bununla birlikte oluşturmuş olduğu kaviteasyon ve serbest radikal etkileri nedeniyle ürün özelliklerinde değişikliklere yol açmasının yanı sıra bazı reaksiyonları hızlandırdıkları için endüstriyel işlemleri de kolaylaştırabileceği düşünülmektedir.

Ultrases ile aktivasyon artışı ya doğrudan ya da dolaylı yolla sağlanabilir. Doğrudan aktivasyon artışı, enzim modifikasyonlarıyla ve reaksiyon ortamına ultrases müdahalesi ile gerçekleşir. Dolaylı yolla aktivasyon artışı ise, substratın ultrases ile ön işleme tabi tutulması, enzim-substrat kombinasyonunun güçlendirilmesi ve hücre zarı geçirgenliğinin arttırılması ile aktivasyon enerjisinin düşürülmesi sonucu elde edilmektedir. Daha öncede bahsedildiği gibi bu alanda yapılan çalışmalar henüz kısıtlı olduğu için bunlar derinlemesine incelenen literatür taramaları sonucu bilinen mekanizmalardır.

### 2.2.6. Enzim Aktivasyonunun Arttırılmasındaki Mekanizmalar

Ultrases işlemi uygun frekanslarda ve enerji seviyelerinde kullanıldığında membran geçirgenliğinin arttırılması, substratların enzimatik reaksiyonlara olan direncinin azalması, substratın temas yüzey alanının arttırılması ve enzimlerin aktif bölgesindeki bir takım değişimler nedeniyle enzim aktivitesinin arttırılabileceği bildirilmiştir (Huang ve diğerleri, 2017). Enzim aktivasyonunun arttırılmasında rol alan bu mekanizmalar kavitasyon ile oluşan fiziksel etkilerin sonucudur.

Substrat ve enzim konsantrasyonu enzimatik reaksiyonların hızını etkileyen faktörler arasında yer alır. Enzim konsantrasyonu ve diğer faktörler sabit tutulduğu koşullarda artan substrat miktarına bağlı olarak enzimatik reaksiyon hızında belli bir artış görülür. Aynı şekilde substrat ve diğer faktörler sabit tutulduğu koşullarda da artan enzim konsantrasyonu ile enzimatik reaksiyon hızında belli bir seviyeye kadar artış görülmektedir (Gölge, 2007). Bu etki belirli koşullar ve süre içerisinde oluşacak olan enzim-substrat kompleksi miktarının arttırılmış olmasına dayanır. Bazı çalışmalar ultrases uygulanan ortamda oluşan kabarcıkların salınım hareketleri, kabarcık salınımları sırasında mikroorganizma membranının etrafındaki sıvının akışı gibi fiziksel etkilerin mikroorganizma membranında iyileşmeler sağlayarak hücre içi enzimlerin salınımının gerçekleştiğini bildirmişlerdir (Abesing ve diğerleri, 2018). Böylelikle ortamdaki enzim sayısı artarak enzim aktivitesinin arttırılabildiği görülmüştür. Bu kapsamda Wang ve arkadaşları (1997) tarafından yapılan çalışmada dört farklı *Lactobacillus* suşlarının inoküle edildiği süte, 20 kHz'lik frekansta ve 135 W'lık güçte farklı sürelerde (2,4,6,8 ve 12 saat) ultrases uygulanmış ve laktoz hidroliz dereceleri ile  $\beta$ -galaktosidaz enziminin aktivitesi incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda ultrases uygulanmış örneklerde ki laktoz hidroliz derecelerinin kontrol örneklerle kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda uygulanan süre arttıkça salınan  $\beta$ -galaktosidaz miktarının arttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte laktoz hidroliz derecelerindeki artışın, artan süre doğrultusunda salınan  $\beta$ -galaktosidaz miktarlarına karşılık geldiği bulunmuştur. Yani kültür ortamına salınan  $\beta$ -galaktosidaz miktarı arttıkça, daha yüksek derecede laktoz hidrolizi gerçekleşmiştir (Wang ve diğerleri, 1997). Wang ve arkadaşları (1997) tarafından yapılan bu çalışma, aslında Wang ve Sakakibara'nın 1994 yılında yaptıkları çalışmanın devamı niteliğinde sayılır. Bu çalışma kapsamında ultrases işlemi altında *L. delbrueckii* ile süt fermantasyonu süreci incelenmiş ve fermantasyon süresinin sonunda anlamlı derecede glikoz içeriğinin arttığı

bildirilmiştir. Sütte bulunan laktoz, ilk önce hücre içindeki  $\beta$ -galaktoridaz enzimi tarafından glikoz ve galaktoza hidrolize edilir, daha sonra glikoz sürekli metabolize edilirken, galaktoz hücreden atılır. Dolayısıyla kültür ortamındaki galaktoz içeriği fermentasyon sırasında kademeli olarak artarken glikoz içeriği çok azdır. Buradan yola çıkarak laktozun bir kısmının hücre yerine kültür ortamında hidrolize olduğunu düşünmüşler ve bunun da  $\beta$ -galaktoridazın hücre dışına salınmış olabileceğinden kaynaklandığını bildirmişlerdir (Wang ve diğerleri, 1994). Dolayısıyla yaptıkları bu çalışmada da (1997), bu teorilerini kanıtlamışlar ve ultrases işleminin lactobacillus suşlarının membranında iyileşmeler sağlayarak endoenzim olan  $\beta$ -galaktoridazın salınması sonucu enzimatik reaksiyon hızında artış olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca geleneksel fermentasyonda, sütte bulunan laktoz ilk önce hücre içindeki  $\beta$ -galaktoridaz enzimi tarafından glikoz ve galaktoza hidrolize edilir, daha sonra glikoz sürekli metobolize edilirken, galaktoz hücreden atılır. Yani endoenzim olan  $\beta$ -galaktosidaz ortama salınmaz (Wang ve diğerleri, 1994; Wang ve diğerleri, 1997). Dolayısıyla bu da uygulanan ultrases işleminin, lactobacillus suşlarının membranında iyileşmeler sağladığını desteklemektedir. Sonuç olarak endoenzim olan  $\beta$ -galaktosidazın hücre dışına salınması sonucu enzimatik reaksiyon hızında artış olduğu bildirilmiştir. Kimi substratlar yapısal özellikleri nedeniyle enzimatik reaksiyonlara karşı direnç gösterirler. Örneğin; globüler yapıdaki proteinler enzimatik reaksiyonlara karşı görece daha dirençlidir. Yani etki edeceği aktif bölge ( -SH veya tiyol grubu) globüler yapının iç kısmında olduğundan kolaylıkla enzim tarafından katalize edilemeyebilirler. Ultrases işlemi, proteinlerin (substrat) üç boyutlu ağ yapısının oluşmasında görev alan bağlara etki ederek aktif bölgelerin açığa çıkmasını sağlar. Böylelikle substratı, enzimatik reaksiyonlara karşı açık hale getirir. Yu ve arkadaşları (2016), kolajenaz tarafından katalize edilen jelatine, enzimatik reaksiyon öncesi 15 dk süreyle 40 kHz'lik frekansta ve 300 W'lık güçte ultrases işlemi uygulamışlar ve kolajenazın aktivitesinde artış olduğunu saptamışlardır. Aktivitedeki artışa neden olan olası mekanizmayı araştırmak için bir dizi analiz yapmışlar ve bu kapsamda atomik kuvvet mikroskopisi, parçacık boyutu analizörü, floresan spektroskopisi, protein çözünürlüğü testi ve Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi kullanarak ultrasesin, jelatinin yapısal özellikleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Yapılan araştırmalar sonucunda jelatinin  $\beta$ -katlanmış ve  $\alpha$ -helix yapılarında değişimler olduğunu saptamışlar ve ultrases işlemi sonucu jelatinin yapısal özelliklerindeki değişiklikler nedeniyle enzimatik hidrolizin hızlandığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte kolajenaz ile jelatin hidrolizinin kinetik

parametrelerini ve aktivasyon enerjisini hesaplamışlar ve reaksiyon hız sabitinin % 27,5 oranında arttığını, aktivasyon enerjisinin de % 36,3 oranında azaldığını bulmuşlardır (Yu ve diğerleri, 2016). Sonuç olarak elde edilen bulgular ve veriler, ultrasesin enzimatik hidrolizi hızlandırdığını açıkça göstermektedir. Dalagnol ve arkadaşları (2017) ise çalışmalarında ultrases işlemini (40 kHz, 220 W) hem substrata hem de enzime ayrı ayrı uygulayarak, enzim aktivitesini değerlendirmişlerdir. Yaptıkları değerlendirmeler sonucunda, ksilana uygulanan ultrases ön işleminin, ksilinaz aktivitesinde kontrole kıyasla %25 oranında artış olduğunu saptamışlardır. Bununla birlikte ksilanazın maksimum reaksiyon hızı ( $V_{max}$ ) değerinde %17.7 oranında, katalitik verimliliğinde ( $V_{max}/K_m$  (Michaelis sabit)) ise %16,8 oranında artış olduğunu da saptamışlardır.  $V_{max}$  değeri ksilan-ksilanaz kompleksinin bağlanma hızını gösterir.  $K_m$  değeri, maximum hızın yarısına erişilmesini sağlayan substrat konsantrasyonudur ve substratın enzime bağlanma affinitesinin bir ölçüsüdür.  $V_{max}/K_m$  değeri de reaksiyonun verimliliğini ifade eder (Wang ve diğerleri, 1994; Dalagnol ve diğerleri, 2017). Elde edilen kinetik parametrelerdeki bu değerler, ultrasesin enzim aktivitesinin arttırılmasında etkili olduğunu göstermektedir. Kinetik parametre değerlerindeki bu artışın, kavitasyon sonucu oluşan fiziksel etkiler nedeniyle ksilan yapısında değişimlerin meydana gelmesi ile ksilanazın, ksilana erişiminin kolaylaşmasının bir sonucu olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte reaksiyonun termodinamik parametrelerini de hesaplamışlar ve değerlerde anlamlı derecede değişiklik olduğunu saptamışlardır. Özellikle aktivasyon enerjisinde azalma olduğunu bildirmişlerdir (Dalagnol ve diğerleri, 2017). Aktivasyon enerjisi, reaksiyonun gerçekleşebilmesi için aşılması gereken enerji değeridir. Enzimatik reaksiyonlar için aktivite sıcaklıkla birlikte artar. Sıcaklıktaki artış, reaksiyonda gereken minimum aktivasyon enerjisinin üstesinden gelmek için daha fazla enerji eldesi sağlar (Dalagnol ve diğerleri, 2017). Böylelikle enzim ve substratın karşılaşmasını hızlandırır. Bu da başlangıç reaksiyon hızını arttırır. Dolayısıyla aktivasyon enerjisi değerinin düşük olması, reaksiyon hızının sıcaklıkla daha hızlı değişmiş olabileceğini düşündürmüş ve böylelikle ksilanazın (reaksiyonun), kavitasyon sonucu oluşan sıcaklıktan etkilenecek aktivasyon enerjisinin düştüğünü bildirmişlerdir (Dalagnol ve diğerleri, 2017). Dalagnol ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada dikkat çeken bir nokta da enzime ultrases ön işleminin uygulanması ve aktivitede artışın elde edilmesidir. Elde edilen bu sonucu, substratın ultrases ön işleminin sonucu elde edilen bulgulardan yola çıkarak benzer şekilde ultrasesin, enzimin aktif bölgesinde de bir takım değişimler oluşturmuş olabileceği düşüncesine

dayandırmışlardır. Dalagnol ve arkadaşlarının bu düşüncesi, Yu ve arkadaşları (2012) tarafından tirozinaz enzimi üzerinde, Wang ve arkadaşları (2012) tarafından ise selüloz enzimi üzerinde kanıtlanmıştır. Sonuçlar, çalışılan koşullar ve enzimin özellikleri nedeniyle farklılık göstermekle birlikte, her iki çalışmada da enzimlerin aktif bölgelerinde değişimler olduğu saptanarak ultrasesin enzim aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir. Wang ve arkadaşları (2012), selüloz enzimine 10 dk süreyle 24 kHz'lik frekansta, 15 W güçte ultrases uygulamışlar ve daha sonra selülozun aktivitesini, substrat olarak %0,51 (w/v) CMC-Na'yı kullanarak ölçmüşler ve enzim aktivitesinin kontrole kıyasla %18,17 oranında arttığını saptamışlardır. Aktivitedeki bu artışın olası mekanizmasını anlamak için, floresan ve CD spektrumlarını kullanarak ultrasesin, selüloz enzimi üzerine olan etkisini incelemişler ve selüloz yüzeyinde triptofan sayısının çok az bir şekilde arttığını, belirli sayıda  $\alpha$ -sarmal yapısının deformasyona uğradığını ve rastgele sarmal içeriğinin arttığını tespit etmişlerdir. Böylelikle substratın, selülozun aktif bölgesine daha erişilebilir durumda olduğunu bildirmişlerdir (Wang ve diğerleri, 2012). Yu ve arkadaşları (2012) ise tirozinaz çözeltisi üzerinde 40 kHz'lik frekansta, 100 W'lık güçte 2,5 saat çalışmışlar ve tirozinaz aktivitesinde %17,3 oranında artış olduğunu saptamışlardır. Benzer şekilde yapılan analizler doğrultusunda tirozinazda  $\alpha$ -sarmal yapının olmadığını gözlemleyerek ultrasesin sekonder yapıyı değiştirdiğini bildirmişlerdir (Yu ve diğerleri, 2012). Enzimler etkilerini substratın dış yüzeyinden başlayarak gerçekleştirdikleri için substrat temas yüzeyi arttıkça reaksiyon hızı da artar. Dolayısıyla ultrases işleminin süt ürünlerindeki uygulama alanları bölümünde bahsedilen emülsifikasyon etkisinin enzim aktivasyonunun arttırılmasında rol alan olası bir mekanizma olarak düşünebiliriz. Çünkü yağ damlacık boyutunun oluşan kavite etkisiyle küçülmesi sonucu yağ damlacık yüzey alanı artmakta ve böylelikle lipolitik enzimlerin yağ (substratı) ile karşılaşma olasılığı arttırılmış olmaktadır. Bu kapsamda Huang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada soya yağının çözücü içermeyen sistemde lipaz katalizli hidrolizi, karşılaştırmalı olarak çalkalama banyosunda ve ultrases banyosunda gerçekleştirilmiştir. Ultrases banyosunda daha fazla arayüzey alanı ve daha küçük damlacık boyutu elde edildiği bildirilmiştir.

Ultrases banyosunda 28 kHz frekansta, 1,20 W/cm<sup>2</sup> ile 1,64 W/cm<sup>2</sup> güç yoğunluğunda ve 0,1-1 arasında değişen çeşitli yağ hacmi fraksiyonlarında çalışmışlardır. Çalışmalarının sonucunda 1,20 W/cm<sup>2</sup> güç yoğunluğunda 0,1 ile 0,5 yağ hacmi fraksiyonu değerleri arasında, yağ-su karışımının birim hacmi başına arayüzey alanının kademeli olarak arttığı

saptanmıştır.  $1,64 \text{ W/cm}^2$  güç yoğunluğunda ise yağ-su karışımının birim hacmi başına arayüzey alanı, 0,1'den 0,3'e kadar olan yağ hacmi fraksiyonu değerlerinde kademeli olarak artarken yağ hacmi fraksiyonu değerinin 0,3'den 0,7'ye kadar hızlı bir şekilde arttığı daha sonra azaldığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte en yüksek ürün konsantrasyonu  $1,20 \text{ W/cm}^2$  yoğunluğunda çalışırken 0,5/0,6 yağ hacmi fraksiyonunda,  $1,64 \text{ W/cm}^2$  yoğunluğunda ise 0,7 yağ hacmi fraksiyonunda elde edildiği bildirilmiştir (Huang ve diğerleri, 2010). Ayrıca yayınladıkları veriler ürün miktarının azaldığı görülmektedir. Sonuç olarak yağ-su arayüzey alanının arttırması ile artan ürün konsantrasyonu değerlendirildiğinde çalkalama banyosunda (200 rpm) artan yağ hacmi fraksiyonu ile oluşan, ultrases işleminin lipaz katalizli soya yağı hidrolizini hızlandırdığını göstermektedir.

#### **2.2.7. Enzim Modifiye Peyniri (EMP)**

Olgunlaşma süresinin kısaltılması amacıyla çeşitli enzimler ile peynirin muamele edilmesi sonucu elde edilen ürüne enzim modifiye peyniri (EMP) denir. Kısaca EMP bir lezzet katkısıdır. EMP üretimi olgun ya da taze peynirlerin belirli eksojen enzimler veya mikroorganizmalarla inkübe edilmesi ve inkübasyonun pastörizasyonla sonlandırılması ile standardizasyon işlemlerinden oluşmaktadır. Öncelikle hammadde olarak kullanılan peynir, ısıtma ve eritme tuzlarından yararlanarak homojen yapıda görünen eritme peynirine dönüştürülür. Sonrasında elde edilen eritme peynirine proteolitik ve/veya lipolitik enzim ilavesi yapılır ve inkübasyona bırakılarak yukarıda bahsedilen basamaklar doğrultusunda süreç, ilerlenerek tamamlanır. EMP üretimi proteoliz ve lipoliz olmak üzere iki enzimatik süreci içermektedir. Bu süreçler ya eş zamanlı olarak gerçekleştirilebilirler ya da kontrollü koşullarda sırasıyla uygulanarak elde edilebilir. EMP üretiminde kritik nokta enzim ve enzimatik süreçtir. Çünkü son ürünün lezzeti üzerinde doğrudan etkisi söz konusudur. Proteoliz ve lipoliz, peynir olgunlaşması sırasında rol alan biyokimyasal reaksiyonlardır. Olgunlaşma süreci sırasında gerçekleşen primer reaksiyonları sonucunda oluşan serbest yağ asitleri, aminoasitler, olgunlaşma sürecinin devamında meydana gelen katabolik reaksiyonlar ile daha küçük yapıdaki uçucu ve uçucu olmayan lezzet bileşenlerine dönüşürler. Bahsedilen katabolik reaksiyonlardan biri proteolizdir. Proteoliz, proteinlerin aminoasit ve peptidlere hidrolize olmasıdır ve peynirin olgunlaşmasında kompleks bir dönüşüm sürecini tarif eder. Aromanın, lezzetin ve peynir tekstrünün gelişiminde önemli bir rol almaktadır. Proteinlerin parçalanmasında rol alan enzimler, çeşitli kaynaklardan

elde edilen proteolitik ve peptiolitik enzimlerdir. Peynirin pıhtılaşmasını sağlamak için kullanılan bu enzimler, rennet, plazmin, asit proteinazları, starter ve starter olmayan laktik asit bakterileri ve sekonder floradan kaynaklı enzimlerdir. Bununla birlikte olgunlaştırma sürecini hızlandırmak amacıyla çeşitli kaynaklardan sağlanan proteolitik ve peptiolitik enzimlerde kullanılmaktadır. Bu proteolitik ajanların aktiviteleri peynir bileşimine, pH değerine, tuz içeriğine ve olgunlaşma ortamı sıcaklığına vb. faktörlere bağlıdır. Dolayısıyla olgunlaşma derecesinin tespiti olarak değerlendirilebilmektedir. Bir diğer katabolik reaksiyon olan lipoliz ise trigiliseritlerin gliserol ile yağ asitleri arasındaki bağlarının lipolitik enzimler tarafından hidrolize olmasıdır. Burada görev alan başlıca enzimler lipaz ve esterazlardır. Lipoliz parçalanması sonucunda serbest yağ asitleri, mono, di-gliseritler ve gliserol açığa çıkmaktadır. Özellikle açığa çıkan orta ve kısa zincirli serbest yağ asitleri lezzet oluşumunda doğrudan rol alırlar. Özetle; EMP üretiminde hayvansal ya da mikrobiyal kökenli enzimler kullanılmaktadır (proteaz, peptidaz, lipaz ve esteraz enzimleri). Serbest yağ asitlerini ve trigliseritleri parçalamakta lipazlar ve esterazlar rol alırken peptit bağlarının parçalanmasında peptidaz ve proteazlar rol almaktadır. Peynir lezzeti üzerinde hammaddenin birleşimi, çeşidi etkili olmakla birlikte enzimin tipi, etki pozisyonu ve konsantrasyonu da etkili faktörler arasındadır. Örneğin; hayvansal kaynaklı enzimler trigliseritlerin sn-1 ve sn-3 bölgelerine etki ederek bütirik asit düzeyinin artışı sağlarlar (Erbay ve diğerleri, 2016). Proteoliz ve lipoliz reaksiyonları peynir lezzetinin oluşumunda doğrudan rol almakla birlikte burada enzimatik parçalanmanın ürünlerinin miktarları, zincir uzunluğu ve dengeli düzeyde bulunma durumu önem taşımaktadır (Erbay ve diğerleri, 2016). Örneğin lipolitik parçalanma sonucu oluşan serbest yağ asitlerinin kısa ve uzun zincirli olanlarının arasındaki oran peynir lezzetini etkiler. EMP’lerde peptit ve serbest aminoasit miktarı olgun peynirlerdeki kiyasla 4 kat daha fazladır (Erbay ve diğerleri, 2016). Ancak bilindiği üzere peynir olgunlaşması sırasında aşırı proteoliz sonucu oluşan 3-15 aminoasit içeren kısa peptitler acılığa sebep olmaktadır. Kısa peptitlerin hidrolizinin devam etmesi sonucu açığa daha küçük peptitler ve serbest aminoasitler oluşarak acılık azalır (Erbay ve diğerleri, 2016). EMP üretimi sırasında oluşan su-yag emülsiyonunun niteliği lipoliz reaksiyonunun etkinliğinde etkin bir rol almaktadır. Emülsiyon oluşumunda yağ yüzey alanının artması arayüzeyde bulunan trigiliseritlerin fazlaca mevcut olacağı anlamına gelir ve böylelikle reaksiyon hızında artış meydana gelecektir. Dolayısıyla EMP peynirinin olgunlaşması sırasında gerçekleşen bu olayları ve ultrasesin daha önce bahsetmiş olduğumuz enzim aktivasyonu üzerindeki etki mekanizmalarını

dikkate aldığımızda ultrases işlemini eritme peynirine enzim ilavesi yapılmadan önce uygulandığında işlevli olabileceği anlaşılmaktadır.

#### **2.2.8. EMP İle İlgili Literatürdeki Çalışmalar**

Kilcawley ve arkadaşları, ticari enzim modifiye peynirinin bileşimi ve temel proteolitik parametrelerini araştırmışlardır. Bu kapsamda 8 ayrı tedarikçiden ikisi toz formda olmakla birlikte toplamda 15 çeşit cheddar lezzetli EMP üzerinde çalışmışlardır. EMP'lerin değerlendirilen doğal cheddar peynirlerinden önemli ölçüde daha yüksek çözünür azot seviyelerine sahip olduklarını saptamışlardır (Kilcawley ve diğerleri, 2000). Aynı zamanda Kilcawley ve arkadaşlarının bir başka çalışmasında EMP'lerin duyuşal özellikleri incelenmiştir. Bu kapsamda bir önceki çalışmalarında kullandıkları cheddar lezzetli EMP'ler ile olgunlaşma süresi 7 gün olan cheddar peyniri kullanılarak eritme peynirleri hazırlamışlardır. Ürettikleri eritme cheddar peynirleri panelistler tarafından değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler sonucunda cheddar lezzetine yakın lezzette oldukları saptanmıştır (Kilcawley ve diğerleri, 2000). Kilcawley ve arkadaşlarının EMP üretimi için iki aşamalı yeni bir proses adlı çalışmaları kapsamında ise farklı enzimler kullanılarak 2 aşamada cheddar lezzetli EMP üretmişlerdir. Bu kapsamda çeşitli enzimlerle proteoliz gerçekleştirmişlerdir. Proteolize olan peynirler değerlendirilerek kontrol örneklerine en yakın olan enzim kombinasyonu ile elde edilen EMP, tespit edilerek çeşitli enzimlerle lipolize uğratılmıştır. Elde edilen son ürünün lipoliz düzeyi, kontrol örnek ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak kontrol örneklere yakın EMP üretilbildiği görülmüştür (Kilcawley ve diğerleri, 2006). Hannon ve arkadaşları, olgun cheddar üretiminde EMP kullanarak olgunlaşma sürecini değerlendirmişlerdir. Bu kapsamda ürettikleri cheddar peynirlerinin tuzlama aşamasında EMP ilavesini gerçekleştirmişler ve 6 aylık bir olgunlaşma sürecine tabi tutmuşlardır. Çalışmanın sonucunda 6 aylık olgunlaşma sonrası elde edilen olgun cheddar lezzetinin 4 aylık süreyle elde edilebildiği tespit edilmiştir (Hannon ve diğerleri, 2006).

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. Malzemeler

EMP üretimlerinde; inek sütü kullanılarak geleneksel yöntemle, starter kültür kullanılmaksızın olgunlaştırmak üzere üretilen beyaz peynir kullanılmıştır. EMP üretiminin ilk aşamasında hammadde olarak kullanılan beyaz peynirden belirlenen koşullar altında % 25 KM içeriğine sahip eritme peyniri elde edilmiştir. Bu üretim sırasında eritme tuzu olarak trisodyum sitrat (%2), trisodyum fosfat (%1) ve koruyucu olarak ise potasyum sorbat (% 0,2) kullanılmıştır. EMP üretiminde proteoliz ve lipoliz aşamaları yer almaktadır. Bu kapsamda proteolitik enzimlerden endopeptidaz olan Neutrase™ ve ekzopeptidaz niteliğinde olan Flavorpro™ 937MDP kullanılmıştır. Lipoliz enzimlerinden ise Lipomod™ 801MDP kullanılmıştır. Belirtilen bu enzimlerin özellikleri ve çalışma kapsamında kullanılmış olan oranlar Tablo 3.1’de belirtilmiştir.

**Tablo 3.1.** Çalışma kapsamında kullanılan enzimlerin özellikleri ve oranları

| Enzim             | Opt. pH aralığı | Opt.sıcaklık aralığı | Enzim Aktivitesi                     | Kullanım Oranı | Kaynak                            |
|-------------------|-----------------|----------------------|--------------------------------------|----------------|-----------------------------------|
| Neutrase™         | pH 7.0          | 40-50 °C             | 0.8 AU                               | % 0.01 v/w     | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> |
| Flavorpro™ 937MDP | pH 5-7          | 45-55 °C             | Leunice aminopeptidaz 350 U/g        | % 0.05 w/w     | <i>Aspergillus oryzae</i>         |
| Lipomod™ 801MDP   | pH 5-7          | 40-50 °C             | Esterase 3900 Ug<br>Protease 5.5 U/g | % 0.10 w/w     | Karışık mikrobiyal                |

##### 3.1.1 Ultrases Cihazı

Tez çalışmasında, numuneye doğrudan ultrases uygulayan bir ultrases homojenizatörü kullanılmıştır (UP200S-Hielscher, Almanya). Cihazın genel özellikleri şu şekildedir; prob çapı 1-40 mm’dir. Hacim aralığı 0.1-2000 mL’dir. Max güç ise 200 W’dır. Çalışma kapsamında 24 kHz frekans, UPS sonotrot S14 prob ve max 110 W kullanılmıştır. Deneme planı ise aşağıda verilen Tablo 3.2’de belirtilmiştir.

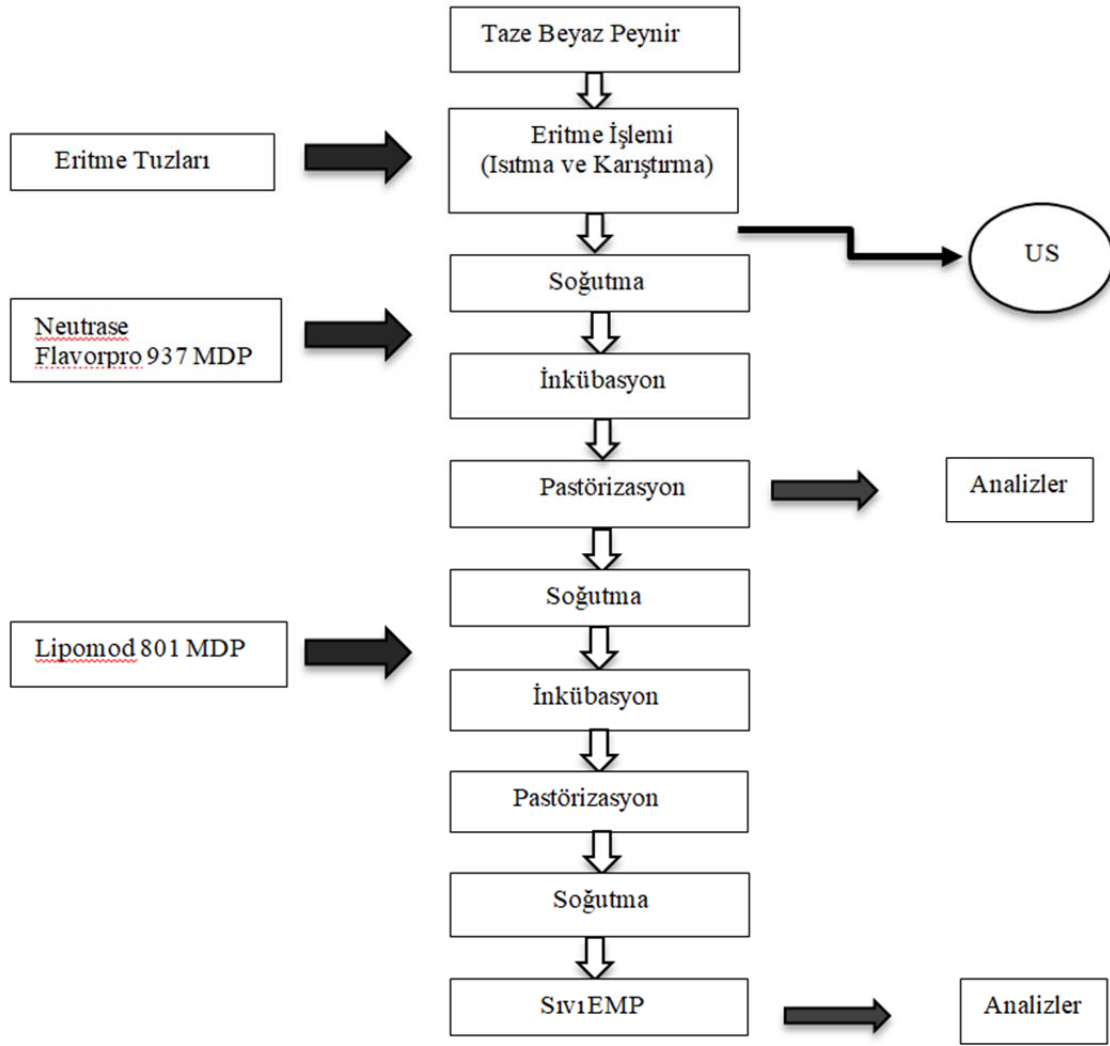
**Tablo 3.2.** Ultrases İle Proteoliz İçin Merkezi Karma Dönel Tasarım (CCRD) Deneme Deseni

| Deneme No | Proteoliz Süresi (dk) | US Gücü (W) | US Süresi (dk) |
|-----------|-----------------------|-------------|----------------|
| 1         | 7                     | 30          | 17,5           |
| 2         | 7                     | 70          | 17,5           |
| 3         | 7                     | 70          | 17,5           |
| 4         | 12                    | 70          | 17,5           |
| 5         | 2                     | 70          | 17,5           |
| 6         | 7                     | 70          | 5              |
| 7         | 7                     | 110         | 17,5           |
| 8         | 7                     | 70          | 17,5           |
| 9         | 10                    | 46          | 25             |
| 10        | 10                    | 94          | 10             |
| 11        | 4                     | 94          | 10             |
| 12        | 10                    | 94          | 25             |
| 13        | 7                     | 70          | 17,5           |
| 14        | 7                     | 70          | 30             |
| 15        | 4                     | 46          | 25             |
| 16        | 7                     | 70          | 17,5           |
| 17        | 10                    | 46          | 10             |
| 18        | 4                     | 46          | 10             |
| 19        | 4                     | 94          | 25             |
| 20        | 7                     | 70          | 17,5           |
| 21        | 7                     | 110         | 17,5           |
| 22        | 7                     | 30          | 17,5           |
| 23        | 7                     | 70          | 5              |
| 24        | 7                     | 70          | 30             |
| 25        | 2                     | 70          | 17,5           |
| 26        | 12                    | 70          | 17,5           |
| 27        | 2                     | 70          | 17,5           |
| 28        | 12                    | 70          | 17,5           |
| 29        | 7                     | 70          | 5              |
| 30        | 7                     | 70          | 30             |
| 31        | 7                     | 110         | 17,5           |
| 32        | 7                     | 30          | 17,5           |

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1 EMP Üretimi

Çalışma kapsamında elde edilmiş olan EMP, Şekil 3.1’de gösterilen akış şeması doğrultusunda üretilmiştir. Üretim sonunda elde edilen EMP’ler sıvı formdadır. Ultrases işlemi, substratı enzimatik reaksiyonlara açık hale getirmek ve enzim inaktivasyonunun önüne geçebilmek amacıyla pastörizasyon işleminden önce uygulanmıştır.



**Şekil 3.1.** Çalışmada kullanılan EMP Üretim tekniğinin ve yapılmış olan analizlerin akış diyagramı gösterimi

Öncelikle peynir kuru maddesi dikkate alınıp karıştırılmış peynir ve su miktarı belirlenerek, çalkalamalı inkübatörde 45 °C’de, 48 saat boyunca stabilitesini kaybetmeyen, %25 KM içeriğine sahip eritme peyniri elde edilmiştir. Eritme işlemi için Thermomix TM31 (Vorwerk, Wuppertal, Almanya) cihazı kullanılmıştır. Eritme işlemi sırasında kullanılacak eritme tuzları, peynir bazında %2 trisodyum sitrat, %1 trisodyum fosfat ile %0.2 potasyum sorbattır. Üretim aşamasında ise önce belirlenmiş miktardaki beyaz peynir küçük parçalara ayrılarak Thermomix cihazına konulmuştur. Daha sonra 4000 rpm’de 45 saniye ve ardından 7000 rpm’de 105 saniye karıştırılmıştır. Buradan elde edilen homojen yapının üzerine, 80 °C’de saf suda çözündürülmüş eritme tuzları ilave edilerek Thermomix cihazı 4000 rpm’de çalıştırılmış ve bulamacın sıcaklığı 80 °C’ye ulaştıktan sonra

karıştırma hızı 7000 rpm'e yükseltilerek 10 dakika süreyle karıştırma işlemine devam edilmiştir. Elde edilen eriyik, akan su altında hızlı bir şekilde 45 °C'ye soğutularak borosilikat şişelere alınmış olup Tablo 3.2'de verilen deneme planı doğrultusunda US işlemi uygulanmıştır. Daha sonrasında US işlemi uygulanmış örnekler içerisine belirlenmiş ticari proteolitik enzimler daha öncesinde belirlenen miktarlarda ilave edilmiştir (Neutrase<sup>TM</sup> enzimi peynir bazında %0,01 ile Flavorpro<sup>TM</sup> 937 MDP enzimi peynir bazında % 0,05 ilave edilecektir). Sonrasında çalkalamalı inkübatörde 45 °C'de, 250 rpm'de 12 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 12 saatin sonunda örnekler otoklava alınarak ve 80 °C'de 15 dakika pastörize edilerek proteoliz amaçlı inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonrasında örnekler akan su altında hızlı bir şekilde 45 °C'ye soğutularak içerisine belirlenmiş olan ticari lipolitik enzimden daha öncesinde belirlenen miktarda ilave edilmiştir. (Lipomod<sup>TM</sup> 801MDP enzimi peynir bazında %0.1 oranında ilave edilmiştir). Sonrasında çalkalamalı inkübatörde 45 °C'de, 250 rpm'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 48 saatin sonunda örnekler son kez otoklava alınarak 80 °C'de 15 dakikalık bir ısıl işlemle pastörize edilmiştir. Böylelikle enzim aktiviteleri durdurulmuş olup sıvı EMP'ler elde edilmiştir. Deneme planımız doğrultusunda elde edilen örnekler 3.3.analizler bölümünde belirtilen analizler yapılmış olup sonuçlar değerlendirilmiştir ve optimizasyon noktası belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullar altında (46 W, 9,30 dk, 10,30 saat proteoliz süresi) üretim tekrarlanmış olup 2 ayrı örnek olacak şekilde proteolitik ve lipolitik enzim ilavesi yapılmıştır. Proteolize olan örnekler titrasyon asitliği, azot tayini ve çözünür azot fraksiyonları analizleri, lipolize örnekler ise bunlara ek olarak uçucu bileşik analizi ve serbest yağ asiti tayini uygulanmış olup sonuçlar değerlendirilmiştir.

### **3.3. Analizler**

Çalışma kapsamında elde edilen tüm örnekler bileşim analizleri, uçucu bileşik analizi uygulanmıştır. Proteoliz aşaması sonrası elde edilen EMP'lerin çözünür azot fraksiyonları hesaplanmıştır. Bununla birlikte lipolize olan EMP örneklerinde serbest yağ asitliği ve uçucu birleşim analizi de yapılmıştır.

#### **3.3.1. Bileşim Analizleri:**

Bu kapsamda nem tayini, protein tayini, titrasyon asitliği ve pH analizleri yapılmıştır.

**Nem Tayini:** Hammadde olarak kullanılacak taze beyaz peynirde, üretilecek olan ara ürünlerde ve sıvı EMP'lerde nem oranı gravimetrik yöntem ile belirlenmiştir (AOAC, 2012a).

**Protein Tayini (Toplam Azot Tayini):** Hammadde olarak kullanılacak beyaz peynirde, üretilecek olan ara ürünlerde ve sıvı EMP'lerde protein oranının belirlenmesi için toplam azot (TA) miktarının tayini Kjeldahl yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (AOAC, 2012c).

**Titrasyon Asitliği:** Hammadde olarak kullanılacak beyaz peynirde, üretilecek olan ara ürünlerde ve sıvı EMP'lerde % laktik asit cinsinden saptanmıştır (AOAC, 2012c).

**pH Ölçümü:** Hammadde olarak kullanılacak beyaz peynirin, üretilecek olan ara ürünlerin ve sıvı EMP'lerin pH değerleri pH/İyon metre (Mettler Toledo Seven Compact) cihazı ile belirlenmiştir.

### **3.3.2. Çözünür Azot Fraksiyonlarının Belirlenmesi**

Peynirde olgunlaşma düzeyinin belirlenmesinde önemli bir ölçü, proteinlerin hidroliz oranıdır. Hidroliz sürecinde proteinler peptitlere ve aminoasitlere parçalanırken, parçalanmanın düzeyi örneklerdeki çözünür azot fraksiyonlarının oranlarının belirlenmesi ile saptanabilir. Bu düzeyin belirlenmesi amacıyla peynir örneklerindeki toplam azot (TA) miktarının yanı sıra, suda çözünür azot (SÇA), %12'lik trikloroasetik asitte (TCA) çözünür azot (TCA-ÇA) ve %5'lik fosfotungustik asitte (PTA) çözünür azot (PTA-ÇA) miktarları belirlenir. Kazein pek çok çözgünde çözünmezken, kazeinin hidroliz ürünleri molekül boyutuna bağlı olarak çeşitli çözgenlerde çözünmektedir (McSweeney ve diğerleri, 1997). SÇA, TCA-ÇA ve PTA-ÇA miktarlarının belirlenmesinde Bütikofer vd. (1993)'te açıklanan yöntemden yararlanılmıştır ve kimi modifikasyonlar yapılmıştır.

**SÇA Tayini:** 20 g örnek ile 40 °C'de 20 mL saf su bir behere alınıp ve karışım önce Ultra-Turrax ile 10000 rpm'de 1 dakika homojenize edilip, sonrasında 1 dakika serbest halde bırakılıp, aynı koşullarda 1 dakika daha Ultra-Turrax ile karıştırılmıştır. Homojenat 1 saat boyunca 40 °C'de tutulup ve örnekler 4 °C'de, 3000 g'de, 30 dakika santrifüj edilecektir. Santrifüj sonrası üstte biriken yağ tabakası bir spatül ile alınarak, kalan sıvı kısım cam

yününden geçirilip, Whatman No.113 filtre kağıdı ile filtre edilmiştir. Filtre edilen kısımda (SÇA) Kjeldahl yöntemi ile azot tayini yapılmıştır.

**TCA-ÇA Tayini:** 5 mL SÇA ekstraktı ile 5 mL % 24'lük TCA karıştırılmış ve bu şekilde % 12'lik TCA hazırlanmıştır. Sonrasında süspansiyon karıştırılacak, oda sıcaklığında 2 saat bekletilecek ve Whatman No.540 filtreden süzölmüştür. Süzöntünün içeriğindeki toplam azot miktarı yine Kjeldahl yöntemi ile belirlenmiştir.

**PTA-ÇA Tayini:** 5 mL SÇA ekstraktı, 3.5 mL 3.95 mol/L'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi ile ve 1.5 mL 330 g/L'lik PTA çözeltisi ile karıştırılmıştır. Karışım gece boyunca 4 °C'de bekletilerek, sonrasında Whatman No.542 filtreden süzölmüştür. Süzöntünün toplam azot içeriği Kjeldahl yöntemi ile belirlenmiştir. Proteolitik olgunlaşma düzeylerinin belirlenmesi için OUI ( SÇA/TA), OYİ (TCA-ÇA/TA) ve SAI (PTA-ÇA/TA) oranı hesaplanmıştır.

### **3.3.3. Serbest Yağ Asidi Bileşiminin ve Miktarının Belirlenmesi**

Süt yağındaki değişimlerin ile lezzet özelliklerinin belirlenmesinde, serbest yağ asidi (SYA) bileşimi önemlidir. Peynirlerin olgunlaşmasında da lipoliz önemli bir yer tutar ve lipoliz ürünlerinin başında SYA'leri gelmektedir. Çalışma kapsamında hammadde olarak kullanılacak taze beyaz peynirlerin, üretilecek ara ürünlerin ve EMP'lerin SYA analizleri gaz kromatografisi ile De Jong ve Badings (1990) ve Deeth vd. (1983) tarafından açıklanmış olan yöntem esas alınarak belirlenmiştir (Jong ve diğerleri, 1990; Deeth ve diğerleri, 1983). Analizlerde alev iyonizasyon dedektörlü (FID) gaz kromatografi (GC-FID) cihazı (7890A, Agilent Technologies, Santa Clara, ABD) kullanılmıştır. Öncelikle SYA'leri katı faz ekstraksiyonu yöntemi kullanılarak ekstrakte edilerek ve daha sonra ekstraktlar GC'ye enjekte edilerek analiz edilmiştir. Analizlerde miktar hesaplamasında ise iç ve dış standart yöntemleri birlikte kullanılmıştır.

### **3.3.4. Uçucu Bileşiklerin Belirlenmesi**

Uçucu bileşiklerin ekstraksiyon/izolasyonunda çeşitli yöntemler kullanılmaktadır ve bu yöntemlerin çeşitli avantaj ve dezavantajları vardır. Bu yöntemler içerisinde katı faz mikroekstraksiyon (solid phase microextraction, SPME) tekniği, çözgen kullanılmaksızın, uçucu bileşiklerin kaynaşmış silika faz kaplamalı fibere adsorpsiyonuna dayanmaktadır.

SPME yöntemi hızlı, kolaylıkla otomatikleştirilebilen, tekrarlanabilir sonuçlar veren, kullanımı kolay ve kullanım masrafları düşük bir yöntem olduğundan peynirlerdeki uçucuların saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak SPME yönteminin seçiciliği, hassasiyeti ve verimliliği çeşitli parametrelere bağlı olarak değişmektedir (Nongonierma ve diğerleri, 2006). Örnek matriksinin özellikleri, fiberin niteliği (fiber tipi, kaplama materyalleri, film kalınlığı vb) ile ekstraksiyon işlem koşulları (karıştırma hızı, karıştırma süresi, ekstraksiyon/desorpsiyon süresi ve sıcaklığı) SPME işlemi üzerinde ciddi etkilere sahiptir. Tüm bu parametreler birbirleri ile etkileşim halindedir ve genellikle aralarındaki ilişki lineer denklemlerle açıklanamamaktadır. Çalışma kapsamında, tüm örneklerdeki uçucu bileşiklerin analizinde SPME tekniği kullanılmıştır. Analiz yöntemi olarak, daha önce olgun beyaz peynir örneklerinin analizi için yapılmış olan optimizasyondan yararlanılmıştır (Salum ve diğerleri, 2017). Buna göre, SPME tekniği ile uçucu bileşiklerin ekstraksiyonunda etkili olan işlem değişkenlerinden ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı ile karıştırma hızının seçilerek optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada CAR/PDMS fiberi kullanılmıştır. Kullanılan fiberin seçimi daha önce olgun beyaz peynir ile yapılan çalışma doğrultusunda belirlenmiştir. Uçucu bileşiklerin miktarı ve tanımlanması GC-FID’de (7890B, Agilent Technologies, Santa Clara, ABD) ve buna bağlı kütle spektrometresinde (MS) (5977A MSD, Agilent Technologies, Santa Clara, ABD) gerçekleştirilmiştir.

### **3.3.5. İstatistiksel Analizler:**

Üretim akış şemasında belirtilen noktalarda alınacak örneklere Tablo 3.2’de belirtilen deneme planı doğrultusunda ultrases işlemi uygulanmıştır. Bu kapsamda ultrases süresi, gücü, proteoliz süresi ve lipoliz sürelerinin önemli olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle bu faktörlerin etkileri gözlemlenmiştir. Bununla birlikte oluşturulan deneme planı “Merkezi Karma Dönel Tasarım” yöntemiyle hazırlanmıştır. Bu yöntemle elde edilen veriler çoklu regresyon analiziyle değerlendirilmiş olup her bir yanıt için faktörlere bağlı ikinci dereceden polinomial denklemler oluşturulmuştur. Oluşturulan modellerin deneysel verilerle uyumu için varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Bu analiz ile her bir faktörün yanıtlar üzerindeki doğrusal, ikinci dereceden ve interaksiyon etkilerinin önemi %95’lik *F*-testi (Fischer testi) uygulanarak belirlenmiştir ve istatistiksel olarak önemli olmayan etkiler modelin dışında bırakılmıştır.

Elde edilen modelin deneysel verilerle uyumluluğuna, “*lack of fit*”, model regrasyon katsayısı ( $R^2$ ), düzeltilmiş regresyon katsayısı (Adj-  $R^2$ ), tahminlenmiş hata kareler toplamı (PRESS), tahminlenmiş çoklu regrasyon katsayısı (Pre- $R^2$ ) ve yeterli kesinlik (Adeq.Precision) değęlerine bakılarak karar verilmiştir (*lack of fit* > 0.1;  $R^2$  > 0.9; | Adj-  $R^2$  - Pre-  $R^2$  | < 0.2; max.PRESS ; Pre- $R^2$  > 0.7; Adeq.Precision > 4). Bu testler sonucunda her bir yanıt için belirlenen modeller “istenilirlik (desirability) fonksiyonu” metodu kullanılarak yanıtlar için belirlenmiş olan kriterleri sağlayacak şekilde belirlenmiştir.

Optimizasyonda izohips ve yanıt yüzey eğrileri çizilmiştir. Optimizasyon ve bu amaçla yapılan istatiksel analizlerde Design Expert Ver. 7.0.0 (Stat-Ease, 2005) kullanılmıştır.



## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Tez çalışmasında US ön işleminin EMP üretiminin proteoliz sürecindeki etkilerinin belirlenmesi ve optimum işlem koşullarının ortaya konulması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda yanıt yüzey yöntemi, merkezi karma dönel tasarım ile hazırlanmış deneme planı doğrultusunda optimizasyon üretimleri yapılmıştır. 3 faktör ve 5 düzeyli hazırlanan bu deneme planına (ilk 20 üretim) ek olarak yapılan 12 üretimle beraber de işlem koşullarının etkileri ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Çalışma kapsamında elde edilen veriler 2 aşamada değerlendirilmiştir. Değerlendirmede ilk olarak, belirlenen çalışma koşullarına bağlı olarak US işleminin EMP üretiminde proteoliz süreci üzerine olan etkisini belirlemek amacıyla yapılmış analiz sonuçları tartışılmıştır. Daha sonrasında hazırlanmış olan deneme deseni doğrultusunda US işlem koşullarının optimizasyonu yapılmış ve saptanan optimum noktalar doğrultusunda doğrulama amacıyla tekrardan üretilen EMP'lerin analiz sonuçları değerlendirilmiş, son ürünün karakterizasyonu yapılmıştır.

### 4.1. Çalışma Koşullarının Etkisinin Saptanması

Ultrases işleminin EMP üretimindeki proteoliz süreci üzerine olan etkilerinin saptanabilmesi için seçilmiş olan 3 faktör ile 3 farklı düzeyde olmak üzere belirlenmiş olan 7 farklı işlem koşulunda üçer paralel (merkez noktada 6 paralel) üretim ve analizler gerçekleştirilmiştir. Üretimi yapılan US uygulanmış 24 EMP örneğinin proteolitik süreçleri analiz edilmiş ve çalışma koşullarının (US gücü (W), US süresi (dk), Proteoliz süresi (saat)) etkileri tartışılmıştır.

Bu aşamada üretilen proteolize peynirlerin kimyasal özellikleri ile azot fraksiyonları incelenmiştir. US ön işlemi görmüş tüm proteolize peynir örneklerinin tüm üretim koşullarındaki tüm kimyasal özellikleri Tablo Ek 1.'de toplu olarak verilmiştir.

Farklı koşullarda US ön işlemi uygulanmış peynirlerin proteolizi ile elde edilen örneklerin toplam azot, suda çözünür azot (SÇA), trikloroasetik asitte (TCA-ÇA) çözünür azot, fosfotungustik asitte (PTA-ÇA) çözünür azot değerleri analiz edilmiş ve proteolitik

olgunlaşma indeksleri (OUI, OYİ ve SAI) hesaplanmıştır. Bununla birlikte US'nin etkisinin olup/olmadığını desteklemek adına pH, titrasyon asitliği ve kurumadde değerleri belirlenmiştir. Sonrasında çalışma koşullarının proteolize peynir örneklerinin özellikleri üzerine etkileri istatistiksel olarak incelenmiştir (Tablo 4.1). Çalışılan işlem koşullarına bağlı olarak Tablo 4.1'deki özellikler tek tek değerlendirildiğinde US gücü ve süresi ile toplam azot değerlerinde değişim gözlenmez iken, proteoliz süresindeki değişim ile toplam azot değerlerinde bir dalgalanma saptanmıştır. Ancak, bu değişim istatistiksel olarak anlamlı görünse de ortalama değerler ve standart sapmalarına baktığımızda bu değişimin pratikte önemli olmadığı anlaşılmaktadır. SÇA değerleri, US gücü ile değişmez iken, artan US süresi ve proteoliz süresi ile anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür. Bu değişimi şu bilgiler ışığında açıklamak mümkündür. Çözünür azot fraksiyonları, proteolizin temeli olan kazein hidrolizi ile açığa çıkmaktadır. Burada hatırlanılması gereken önemli hususlardan biri de proteinleri ve temel süt proteini olarak kazeinin pek çok çözgünde iyi çözünmemesidir. Fakat kazein hidroliz ürünleri molekül boyutlarına bağlı olarak pek çok çözgünde çözünür (McSweeney ve diğerleri, 1997). Bu da bize peynirin olgunlaşma düzeyi hakkında fikir veren önemli bir ölçüttür. SÇA fraksiyonları ise düşük molekül ağırlıklı proteinler, aminoasitler ve peptitleri içermektedir. Özetle, artan proteoliz süresi ile suda çözünür azot fraksiyonlarındaki anlamlı artış kazein hidrolizi ile açıklanabilir.

pH ve titrasyon asitliği değerlerinde US gücü ve sürelerindeki artışla birlikte anlamlı bir değişim gözlemlenmez iken 2, 7 ve 12 saatlik proteoliz süresi uygulamalarında titrasyon asitliği değerinde anlamlı bir artış görülmekle birlikte bunun doğrultusunda pH değerinde de azalma saptanmıştır. Bu durum proteinlerin hidrolizasyon ile açığa çıkan iyonik gruplar nedeniyle pH'ın açığa çıkması ile ilişkilendirilmiştir.

**Tablo 4.1.** US uygulanmış EMP'lerin çalışma koşullarının etkisi (ortalama  $\pm$  standartma sapma).

| * Özellikler | US Gücü (W)                   |                               |                               | US Süresi (dk)                |                               |                               | Proteoliz (saat)              |                               |                               |
|--------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|              | 30                            | 70                            | 110                           | 5                             | 17,5                          | 30                            | 2                             | 7                             | 12                            |
| TA           | 1,53 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>  | 1,58 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>  | 1,53 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>  | 1,58 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>  | 1,58 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>  | 1,52 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>  | 1,48 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>  | 1,58 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>  | 1,55 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>  |
| SÇA          | 0,75 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>  | 0,78 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>  | 0,78 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>  | 0,75 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>  | 0,78 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup> | 0,79 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>  | 0,66 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>  | 0,78 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>  | 0,87 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>  |
| TCA-ÇA       | 0,07 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>  | 0,72 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>  | 0,74 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>  | 0,70 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>  | 0,72 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>  | 0,72 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>  | 0,48 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>  | 0,72 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>  | 0,84 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>  |
| PTA-ÇA       | 0,08 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>  | 0,09 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>  | 0,09 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>  | 0,08 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>  | 0,09 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>  | 0,09 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>  | 0,04 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>  | 0,09 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>  | 0,12 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>  |
| OUI          | 49,26 $\pm$ 2,50 <sup>a</sup> | 49,29 $\pm$ 1,70 <sup>a</sup> | 50,88 $\pm$ 1,40 <sup>a</sup> | 47,61 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup> | 49,29 $\pm$ 1,70 <sup>a</sup> | 51,96 $\pm$ 1,90 <sup>b</sup> | 44,47 $\pm$ 1,10 <sup>a</sup> | 49,29 $\pm$ 1,70 <sup>b</sup> | 56,53 $\pm$ 4,10 <sup>c</sup> |
| OYİ          | 46,57 $\pm$ 2,40 <sup>a</sup> | 45,44 $\pm$ 2,30 <sup>a</sup> | 48,17 $\pm$ 1,90 <sup>a</sup> | 44,33 $\pm$ 1,10 <sup>a</sup> | 45,44 $\pm$ 2,30 <sup>a</sup> | 47,56 $\pm$ 2,20 <sup>a</sup> | 32,39 $\pm$ 1,70 <sup>a</sup> | 45,44 $\pm$ 2,30 <sup>b</sup> | 53,98 $\pm$ 1,30 <sup>c</sup> |
| SAİ          | 5,75 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>  | 5,67 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>  | 5,91 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>  | 5,50 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>  | 5,67 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>  | 5,83 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>  | 2,54 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>  | 5,67 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>  | 7,83 $\pm$ 0,30 <sup>c</sup>  |
| pH           | 6,10 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>  | 6,11 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>  | 6,09 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>  | 6,11 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>  | 6,11 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>  | 6,13 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>  | 6,04 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>  | 6,11 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>  | 5,99 $\pm$ 0,20 <sup>c</sup>  |
| Tit.Asitliği | 0,78 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>  | 0,75 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>  | 0,78 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>  | 0,75 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>  | 0,75 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>  | 0,77 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>  | 0,63 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>  | 0,75 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>  | 0,88 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>  |
| Kuru Madde   | 26,39 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup> | 26,80 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup> | 26,69 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup> | 26,20 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup> | 26,80 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup> | 27,05 $\pm$ 0,40 <sup>b</sup> | 26,60 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup> | 26,80 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup> | 26,43 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup> |

<sup>a-c</sup>: Her bir sütundaki farklı üst indisler istatistiksel farklılığı göstermektedir. \*TA: Toplam Azot. \*SÇA: Suda Çözünür Azot. \*TCA-ÇA: Trikloroasetik Asitte Çözünür Azot. \*PTA-ÇA: Fosfotungustik Asitte Çözünür Azot. \* OUI: Olgunlaşma Uzama İndeksi. \*OYİ: Olgunlaşma Yoğunluk İndeksi. \*SAİ: Serbest Aminoasit İndeksi. \*Tit. Asitliği: (laktik asit cinsinden)

Kuru madde miktarında ise US gücü ve proteoliz sürelerindeki artışlarda bir değişim gözlenmezken US süresi 5 dk'dan 30 dk'ya arttırıldığında değerlerde sırasıyla 26,2'den 27,1 şeklinde anlamlı bir artış olduğu görülmüştür. Bu artış çalışma sıcaklığına (45°C) ve kullanılan sistemin yapısı gereği zamanla örnekten suyun uçmasıyla ilişkilendirilebilir.

OUI (SÇA/TA) ve OYİ (TCA-ÇA/TA) değerleri incelendiğinde, US süresinin arttırılmasıyla OYİ değerinde anlamlı bir değişim gözlenmez iken OUI değerinde ise 17,5 dk'dan 30 dk'ya US süresi arttırıldığında değerlerde sırasıyla 49,29'dan 51,96'ya anlamlı bir artış saptanmıştır. Bu durum kaviteasyon ile proteinin konformasyonel yapısındaki etkileşimlerin değişime uğramasından kaynaklanabilir (Yu ve diğerleri,2016). TCA-ÇA miktarı peynir lezzetinde acılık ile ilişkilendirilmektedir. Bu acılık ise  $\beta$ -kazeinden türetilen amino asit miktarı 3-15 arası olan hidrofobik peptitlerden kaynaklanmaktadır (Baş ve diğerleri, 2019; Lemieux ve Simard, 1992). TCA-ÇA/TA çözünür azot fraksiyonları daha kısa peptitlerin açığa çıktığını göstermesinden yola çıkarak ve OUI ile OYİ değerleri incelendiğinde de bu yapısal değişimlerin, proteinlerin üçüncül ve dördüncül yapılarında olduğu anlaşılmaktadır ki OYİ (TCA-ÇA/TA) değerinde değişim olmadığı görülmektedir.

Artan proteoliz süresi (2 saat, 7 saat ve 12 saat) ile OUI ve OYİ değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır. OUI değerlerinin 44,47-56,53 arasında, OYİ değerlerinin ise 32,39-53,98 arasında arttığı hesaplanmıştır. Bu artış da olgunlaşmaya bağlı olarak proteinlerin parçalanması ile düşük molekül ağırlıklı peptitlerin ve serbest amino asitlerin açığa çıkması ile ilişkilendirilebilmektedir. Bu durum SAI (PTA/TA) değerlerinde de görülmektedir. US gücünün ise OUI, OYİ ve SAI değerlerinde bir etkisi olmadığı görülmüştür.

Özetle; istatistiksel değerlerdeki değişimler ve bunların standart sapmaları incelendiğinde US ön işleminin örneklerin özellikleri üzerinde US gücünün etkili olmadığı görülürken US işlem süresinin belirli bir etkisinin olduğu ancak proteoliz süresinin değişimi domine ettiği görülmektedir. Buradaki etkinin kaynağını ise kazein hidrolizi ile açıklanabilmektedir. Buradaki proteinlerin bir başka ifadeyle enzimlerin bağlanacağı substratların konformasyonel değişimi üzerindeki etki ise US'nin ana mekanizması olan kaviteasyon ile ilişkilendirilmektedir. Bu ilişki kaviteasyonun proteindeki hidrofobik ve Van der Waals

etkileşimleri başta olmak üzere iyonik bağlar, tuz köprüleri, hidrojen bağları ve disülfid bağları üzerinde etkili olmasından kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla kavitasyon sonucu açığa çıkan fiziksel etkiler (türbülans, kayma ve karıştırma) ile enzimatik reaksiyonlara dirençli proteinlerdeki (örn: globüler protein) aktif bölgelerin (-SH ve tiyol grupları) açığa çıkmasını sağlamaktadır (Yu ve diğerleri, 2016). Proteoliz süresince meydana gelen özellikle de OUI, OYİ, SAI, SÇA ve titrasyon asitliğindeki değişimler proteinin globüler yapısındaki etkileşimlerin bozulması ya da değişmesiyle açıklanabilmektedir. Bu etkinin Yu ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan çalışmada da elde edildiği görülmektedir. Çalışmaları kapsamında kolajenaz ile katalize edilen jelatine, enzimatik reaksiyon öncesi 15 dk süreyle 40 kHz'lik frekansta ve 300 W'lık güçte ultrases işlemi uygulayarak kolajenazın aktivitesinde artış olduğunu bildirmişlerdir. Aktivitedeki artışa neden olan olası mekanizmayı araştırmak için bir dizi analiz yapmışlar ve bu kapsamda jelatinin  $\beta$  - katlanmış ve  $\alpha$ -helix yapılarında değişimler olduğunu saptayarak ultrases işlemi sonucu jelatinin üzerindeki yapısal değişiklikler nedeniyle enzimatik hidrolizin hızlandığını saptamışlardır. Benzer bir çalışma ise Dalagnol ve arkadaşları (2017) tarafından yapılmıştır. Çalışmaları kapsamında ultrases işlemi (40 kHz, 220 W) hem substratlara hem de enzimlere ayrı ayrı uygulayarak, enzim aktivitesini değerlendirmişlerdir. Yaptıkları değerlendirmeler sonucunda, ksilana uygulanan ultrases ön işleminin, ksilinaz aktivitesinde kontrole kıyasla %25 oranında artış olduğunu saptamışlardır. Bununla birlikte kinetik parametrelerinde inceleyerek anlamlı artışlar saptamışlar ve bu bulgunun kavitasyon sonucu oluşan fiziksel etkiler ile ksilan yapısında değişimlerin meydana gelmesi ile ksilanazın, ksilana erişiminin kolaylaşmasıyla açıklanabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmadan da anlaşılmaktadır ki sadece proteinlerde değil, farklı kaynaklı substratlarda da (ksilan =hemiselüloz) yapıdaki bağları etkileyerek US ön işleminin enzim etkinliğini arttırabildiği görülmektedir.

#### **4.2. Optimizasyon ve Doğrulama**

US uygulanmış ve proteoliz ile lipolize uğratılmış EMP'lerin analiz sonuçları doğrultusunda, optimizasyon çalışmasında yanıt olarak OUI (SÇA/TA), OYİ (TCA-ÇA/TA), SAI (PTA-ÇA/TA) ve titrasyon asitliği değerleri seçilmiştir. Deneysel veriler çoklu regresyon analiziyle değerlendirilmiş ve her bir yanıt için çalışma koşullarının değişkenlerine bağlı ikinci dereceden denklemler oluşturulmuştur. Bu modellerin varyans analizi sonuçları Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Oluşturulan bu modellerde önemli olmayan terimler model hiyerarşisini bozmayacak şekilde modellerden çıkartılmış ve modellerin deneysel verilerle uyumu için varyans analizi yapılmıştır (Tablo 4.3). Elde edilen modelin deneysel verilerle uyumluluğuna, “lack of fit”, model regresyon katsayısı ( $R^2$ ), düzeltilmiş regresyon katsayısı (Adj- $R^2$ ), tahminlenmiş çoklu regresyon katsayısı (Pre- $R^2$ ) ve yeterli kesinlik (Adeq.Precision) değerlerine bakılarak karar verilmiştir (lack of fit > 0.1;  $R^2$  > 0.9; (Adj- $R^2$  - Pre- $R^2$ ) < 0.2; Pre- $R^2$  > 0.7; Adeq.Precision > 4). ANOVA analizi sonucu elde edilen modellerden hareketle, seçilen 4 yanıt için kontrol üretimlere (US uygulanmamış proteolize peynir) yakın değerlerin elde edilmesi hedeflenmiştir. Belirlenen 4 yanıt ise çalışmamızın EMP üretim süresinin kısaltılmasını amaçlaması doğrultusunda enzim-substrat ilişkisinden doğabilecek fraksiyonlar yani proteolizin yol göstermesi sebebiyle seçilmiştir. Bu kapsamda hedeflenen değerlerimiz Erbay ve diğerleri (2017) tarafından yapılan çalışmalarından elde edilen kontrol örneklerinin optimizasyonu sonucu OUI için 59,30, OYİ için 50,31, SAI için 7,81 ve titrasyon asitliği için ise 0,860 olarak belirlenmiştir. Bu kriterleri sağlayan modeller ve model katsayıları, her bir yanıt için belirlenen modellerin eş zamanlı çözümüne dayanan, “istenilirlik (desirability) fonksiyonu” yöntemi ile oluşturulmuştur.

Tablo 4.2 ve 4.3 incelendiğinde, US süresi ve gücü arttıkça OUI değerlerinde artış saptandığı ve OYİ değerlerindeki etkilerin ise lineer bir etki olduğu görülmekle birlikte 3 çalışma koşulunun da etkili olduğu saptanmıştır. Çalışma koşulları arasında proteoliz süresinin daha etkili olduğu açıkça görülmektedir. SAI değerlerine baktığımızda, proteoliz süresinin anlamlı etkisi olduğu görülmektedir (<0,0001) ve SAI’deki tüm değişim sadece proteoliz süresinin doğrusal değişimi ile açıklanabilmektedir. Bu çalışmamızda US işleminin PTA’da çözünür azotun üzerinde bir etkisi olmadığını göstermektedir. Buradaki etki ekzopeptidaz faaliyetten kaynaklanabilmektedir. Titrasyon asitliğinde de SAI’ye benzer şekilde proteoliz süresinin istatistiksel olarak etkili olduğu ve tek başına doğrusal değişimi ile titrasyon asitliğindeki değişimi açıkladığı görülmektedir.

**Tablo 4.2.** Enzim Modifiye Peynirlerin (EMP) proteolitik olgunlaşma değerleri

|                               | *DF | OUİ     |                  | OYİ     |                  | SAİ     |                  | Tit.Asitliği |                  |
|-------------------------------|-----|---------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|--------------|------------------|
|                               |     | Kareler | <i>p</i> -değeri | Kareler | <i>p</i> -değeri | Kareler | <i>p</i> -değeri | Kareler      | <i>p</i> -değeri |
|                               |     | Toplamı |                  | Toplamı |                  | Toplamı |                  | Toplamı      |                  |
| Model                         | 9   | 482,84  | <0,0001          | 607,97  | <0,0001          | 37,28   | <0,0001          | 0,110        | 0,0002           |
| x <sub>1</sub>                | 1   | 51,50   | 0,0032           | 40,64   | 0,0117           | 0,33    | 0,2483           | 0,418        | 0,5072           |
| x <sub>2</sub>                | 1   | 46,05   | 0,0046           | 28,90   | 0,0267           | 0,13    | 0,4519           | 0,314        | 0,5643           |
| x <sub>3</sub>                | 1   | 292,34  | <0,0001          | 521,50  | <0,0001          | 35,93   | <0,0001          | 0,100        | <0,0001          |
| x <sub>1</sub> x <sub>2</sub> | 1   | 27,69   | 0,0182           | 1,08    | 0,6261           | 0,012   | 0,8178           | 0,102        | 0,7412           |
| x <sub>1</sub> x <sub>3</sub> | 1   | 0,003   | 0,9773           | 0,021   | 0,9451           | 0,13    | 0,4516           | 0,034        | 0,8483           |
| x <sub>2</sub> x <sub>3</sub> | 1   | 0,61    | 0,6834           | 2,34    | 0,4769           | 0,052   | 0,6381           | 0,106        | 0,7368           |
| x <sub>1</sub> <sup>2</sup>   | 1   | 4,94    | 0,2610           | 9,19    | 0,1739           | 0,40    | 0,2050           | 0,546        | 0,4500           |
| x <sub>2</sub> <sup>2</sup>   | 1   | 10,46   | 0,1138           | 4,82    | 0,3140           | 0,29    | 0,2772           | 0,179        | 0,6619           |
| x <sub>3</sub> <sup>2</sup>   | 1   | 56,29   | 0,0024           | 0,0098  | 0,8829           | 0,11    | 0,5042           | 0,635        | 0,4163           |
| Kalıntı                       | 10  | 34,83   |                  | 42,88   |                  | 2,19    |                  | 0,009        |                  |
| Lack of fit                   | 5   | 21,17   | 0,3210           | 15,44   | 0,7284           | 1,73    | 0,0855           | 0,002        | 0,8407           |
| Saf Hata                      | 5   | 13,66   |                  | 27,44   |                  | 0,46    |                  | 0,006        |                  |
| Toplam                        | 19  | 517,67  |                  | 650,85  |                  | 39,48   |                  | 0,120        |                  |
| R <sup>2</sup>                |     | 0,9327  |                  | 0,9341  |                  | 0,9444  |                  | 0,9232       |                  |
| Adj-R <sup>2</sup>            |     | 0,8722  |                  | 0,8748  |                  | 0,8944  |                  | 0,8541       |                  |
| Pre-R <sup>2</sup>            |     | 0,6527  |                  | 0,7297  |                  | 0,6526  |                  | 0,7464       |                  |
| Adeq.Precision                |     | 13,232  |                  | 14,120  |                  | 16,386  |                  | 13,882       |                  |
| PRESS                         |     | 179,81  |                  | 175,92  |                  | 13,71   |                  | 0,029        |                  |
| C.V                           |     | 3,62    |                  | 4,47    |                  | 7,92    |                  | 3,92         |                  |

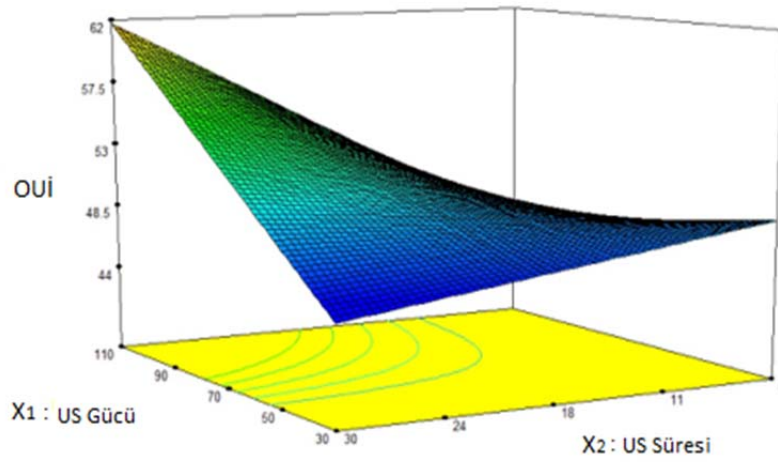
\*OUİ: olgunlaşma uzama indeksi. \*OYİ: olgunlaşma yoğunluk indeksi. \*SAİ:serbest aminoasit indeksi \*x<sub>1</sub>: US gücü. \*x<sub>2</sub>: US süresi. \*x<sub>3</sub>: Proteoliz süresi. R<sup>2</sup> : model regresyon katsayısı

**Tablo 4.3.** Enzim Modifiye Peynirlerin (EMP) proteolitik olgunlaşma değerleri (katsayılar kodlanmış değerler için hesaplanmıştır)

| *Kaynak                       | OUİ     |          | OYİ     |          | SAİ     |          | Tit.Asitliği |          |
|-------------------------------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|--------------|----------|
|                               | Katsayı | p-değeri | Katsayı | p-değeri | Katsayı | p-değeri | Katsayı      | p-değeri |
| Model                         | 50,27   | <0,0001  | 46,32   | <0,0001  | 5,91    | <0,0001  | 0,76         | <0,0001  |
| x <sub>1</sub>                | 1,93    | 0,0019   | 1,72    | 0,0045   | -       | -        | -            | -        |
| x <sub>2</sub>                | 1,83    | 0,0029   | 1,45    | 0,0134   | -       | -        | -            | -        |
| x <sub>3</sub>                | 4,60    | <0,0001  | 6,15    | <0,0001  | 1,61    | <0,0001  | 0,087        | <0,0001  |
| x <sub>1</sub> x <sub>2</sub> | 1,83    | 0,0144   | -       | -        | -       | -        | -            | -        |
| x <sub>1</sub> x <sub>3</sub> | -       | -        | -       | -        | -       | -        | -            | -        |
| x <sub>2</sub> x <sub>3</sub> | -       | -        | -       | -        | -       | -        | -            | -        |
| x <sub>1</sub> <sup>2</sup>   | -       | -        | -       | -        | -       | -        | -            | -        |
| x <sub>2</sub> <sup>2</sup>   | -       | -        | -       | -        | -       | -        | -            | -        |
| x <sub>3</sub> <sup>2</sup>   | 1,85    | 0,0021   | -       | -        | -       | -        | -            | -        |
| Lack of fit                   | 0,3518  |          | 0,8195  |          | 0,1510  |          | 0,9663       |          |
| R <sup>2</sup>                | 0,9041  |          | 0,9081  |          | 0,9102  |          | 0,9027       |          |
| Adj-R <sup>2</sup>            | 0,8698  |          | 0,8909  |          | 0,9052  |          | 0,8972       |          |
| Pre-R <sup>2</sup>            | 0,7593  |          | 0,8662  |          | 0,8837  |          | 0,8869       |          |
| Adeq.Precision                | 17,154  |          | 23,913  |          | 38,672  |          | 36,988       |          |
| PRESS                         | 124,62  |          | 87,09   |          | 4,59    |          | 0,013        |          |
| C.V                           | 3,65    |          | 4,17    |          | 7,51    |          | 3,29         |          |

\*OUİ:olgunlaşma uzama indeksi. \*OYİ: olgunlaşma yoğunluk indeksi. \*SAİ:serbest aminoasit indeksi \*x<sub>1</sub>: US gücü. \*x<sub>2</sub>: US süresi. \*x<sub>3</sub>: Proteoliz süresi. R<sup>2</sup> : model regresyon katsayısı.

US uygulanmış EMP'lerin optimizasyonu sonucu elde edilen modelde yanıtlar üzerinde interaksiyon etkisi istatistiksel olarak US gücü ile US süresinin OUI değeri üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Şekil 4.1.'de, US gücü ile US süresinin interaksiyon etkisinin OUI (SÇA/TA) değeri üzerindeki değişimini gösteren yanıt yüzey grafiği verilmiştir. Bu grafiğe göre, US uygulanmış EMP üretiminde US gücü arttıkça OUI değerinin arttığı görülürken US süresi arttıkça da düşük US gücünde görülmektedir. Orta düzey US güçlerinde ise US süresinin artışıyla birlikte OUI önce arttığı daha sonraları ise azaldığı görülmektedir.



**Şekil 4.1.** Ultrases gücü ile ultrases süresinin OUI (SÇA/TA) değeri üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği

Sonuç olarak elde edilen optimum çalışma koşulları %91,50 istenilirlik oranında belirlenmiştir. Optimizasyon sonucunda; optimum çalışma koşulları 46,28 W US gücü, 9,8 dk US ön işlem süresi, 10,49 saat proteoliz süresi olarak hesaplanmıştır. Belirlenen optimum koşullarda çalışılması durumunda seçilen dört yanıtla dair tahmin edilmiş olan değerler Tablo 4.4.'de verilmiştir.

Optimizasyon çalışmasının sonunda, tahmini değerler ile elde edilen teorik sonucun deneysel veriler ile doğrulaması yapılmıştır. Doğrulama amacıyla optimum çalışma koşullarında, US ön işlemi sonrası proteolize edilmiş peynir ve bunun kontrolü olarak US uygulanmadan doğrudan proteolize edilmiş peynir (kontrol), US ön işlemi sonrası gerçekleştirilen proteoliz+lipoliz sonucu üretilen EMP ve bunun kontrolü olarak herhangi bir US ön işlemi uygulanmadan doğrudan proteoliz+lipoliz ile üretilen EMP (kontrol)

olmak üzere 4 adet örnek (2 adet proteolize peynir ve 2 adet EMP) üretimi gerçekleştirilmiştir. Doğrulamada, optimizasyona dahil edilen 4 yanıtı dair deneysel veriler incelenmiştir. Elde edilen deneysel veriler ve bu sonuçların istatistiksel analizi Tablo 4.4’de verilmiştir. Ayrıca, doğrulama amacıyla üretilen 4 örneğin proteolitik olgunlaşma düzeyi, lipolitik olgunlaşma düzeyi ve uçucu bileşenleri analizlerinin gerçekleştirilmesi ile karakterizasyonları da yapılmıştır.

**Tablo 4.4.** Belirlenmiş olan teorik optimum işlem koşullarının deneysel verilerle doğrulaması.

| Yanıt        | Deneysel | Teorik | SH    | Fark  | % Hata* | p-Değeri | Std.Sapma |
|--------------|----------|--------|-------|-------|---------|----------|-----------|
| OUI          | 58,35    | 56,30  | 0,97  | 2,05  | 3,5     | 0,169    | 1,69      |
| OYİ          | 51,61    | 50,31  | 0,59  | 1,30  | 2,5     | 0,159    | 1,03      |
| SAİ          | 8,19     | 7,81   | 0,21  | 0,38  | 4,6     | 0,210    | 0,36      |
| Tit.Asitliği | 0,868    | 0,860  | 0,025 | 0,008 | 1,0     | 0,760    | 0,043     |

\* %Hata:  $\left| \frac{y_{\text{deneysel}} - y_{\text{tahmin edilen}}}{y_{\text{deneysel}}} \right| * 100$

Buna göre, doğrulama üretimleri ile yapılan analizlerden elde edilen ortalama değerler sırasıyla, OUI 58,35, OYİ 51,61, SAİ 8,19 ve Tit.Asitliği 0,868 olarak belirlenmiştir. Bu değerlerin, tahmin edilen değerlere yakın değerler olduğu görülmüştür. Tablo 4.4.’de görüleceği üzere, tüm yanıtlar için doğrulama analizlerinden elde edilen deneysel veriler ile modelden tahmin edilen değerler arasında, istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığı ( $P>0,05$ ) saptanmıştır. En düşük  $p$ -değeri 0,159 ve en yüksek % hata değeri ise %4,6 olarak hesaplanmıştır.

Çalışmamızın 2. aşaması olarak gerçekleştirdiğimiz belirlenen optimum çalışma koşullarında üretilen US ön işlemi uygulanmış eritme peyniri proteolize ve lipolize uğratılmıştır. Elde edilen EMP’lerin serbest yağ asidi analizinin istatistiksel sonuçları Tablo 4.5’de verilmiştir. Burada kısa zincirli, orta ve uzun zincirli yağ asitleri değerleri mg/100g süt yağı olarak belirtilmiştir. Aynı zamanda her biri için toplam serbest yağ asidindeki yüzde oranları da parantez içerisinde belirtilmiştir. Sonuç olarak, US ön işlemi sonrası proteoliz gerçekleştirilerek elde edilen proteolize peynirlerde kontrol örneklerine kıyasla anlamlı bir değişim olmadığı görülmüştür. Toplam serbest yağ asidi miktarına göre her bir

SYA miktarının % oran değişimi değerlendirilmiştir. Bununla birlikte kısa zincirli yağ asitleri miktarındaki değişim bütirik asit haricindeki diğer kısa zincirli yağ asitlerinde (kaproik, kaprolik ve kaprik asitler) kontrol EMP örneğine kıyasla lipolize gruplar arasında sırasıyla %0,34, %0,28, %0,36 oranında anlamlı bir şekilde azaldığı saptanmıştır. Bütirik asit miktarında ise anlamlı bir değişim olmadığı görülmüştür. Orta ve uzun zincirli yağ asitleri kapsamında ise elde edilen değişimler şu şekildedir. Palmitik, oleik, linoleik ve linolenik asitlerde kontrol EMP örneğine kıyasla lipolize gruplar arasında sırasıyla %1,2, %0,3, %0,17 ve %0,09 oranında anlamlı bir şekilde artış saptanırken laurik, miristik ve stearik asitlerde ise sırasıyla %0,46, %1, %0,55 oranında anlamlı şekilde azalma olduğu saptanmıştır. Özetle; TSYA kapsamında kontrol EMP'lere kıyasla %0,3 oranında USYA'larında anlamlı artış olduğu %0,3 oranında da OUZYA'larında anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır.

SYA'ları trigliseritlerden çeşitli yollarla yağın hidrolize olması ile açığa çıkmaktadır. SYA'ları aromayı doğrudan etkilemeleriyle birlikte ester, metil keton, alkol ve laktonların açığa çıkmasında da rol alan önemli bileşiklerdir. SYA'ları bir karboksil (-COOH) ve bir de alkil (-R) grubundan meydana gelir. Karboksil haricindeki zincir üzerinde çeşitli reaksiyonlar oluşabilmektedir. Ayrıca yapılarında çift bağ varlığına göre doymuş ve doymamış yağ asitleri olarak iki grupta sınıflandırılırlar. Doymuş yağ asitlerinin yapısında karboksil haricinde çift bağ ve hidrojen haricinde fonksiyonel grup bulunmamaktadır. Bununla birlikte doymuşluk ifadesi karboksil grubu haricindeki karbonlara olabildikçe hidrojen bağlanmış anlamına gelmektedir (Milli eğitim bakanlığı, 2011). Doymamış yağ asitlerinin yapısında ise alkil grubundaki C atomları arasında bir ya da daha fazla çift bağ (çoklu doymamış yağ asitleri) bulunmaktadır. Çoklu doymamış yağ asitlerinin düşük seviyesi süt yağını oksidatif ransidiyete karşı oldukça dirençli kılar (Akın, 2010). Bununla birlikte yapılarındaki karbon sayısına bağlı olarak kısa, orta ve uzun zincirli yağ asitleri olarak gruplandırılmaktadırlar. Kısa ve orta zincirli yağ asitleri peynir lezzeti üzerinde doğrudan etkilidirler. Ayrıca SYA metil keton, lakton, ester, alkan ve sekonder alkol gibi lezzet ve aroma bileşenlerinin üretiminde prekürsör molekül olarak rol almaktadır (Erdogan ve diğerleri, 2012). Kısa zincirli yağ asitlerinin düşük algı eşik değerlerine sahip olması sebebiyle peynir lezzetinde karakteristik olarak görev alırlar. Fakat burada bilinmesi gereken önemli hususlardan biri lezzet bileşiklerinin belirli bir dengede olmasıdır. Uzun zincirli asitlerinin algı eşik değerleri çok yüksek olduğundan peynir lezzetinde çok az rol almaktadırlar.

Sonuç olarak elde edilen SYA'larındaki azalma özellikle de lezzet üzerinde etkin rol alan kısa zincirli yağ asitlerindeki azalma dikkat çekmektedir. Elde edilen bu bulgunun önemi daha kısa sürede kontrol örneğe kıyasla aroma açısından uygun bir ürün elde edebildiğimizi göstermektedir.

**Tablo 4.5.** Optimum ultrases ön işlemleri koşullarında üretilen EMP örnekleri ile kontrol örneklerinin temel üretim aşamaları sonrasındaki (proteoliz ve lipoliz) serbest yağ asidi bileşim ve miktarları (mg/100 g yağ).

| Özellikler*                         | Kontrol                              |                                      | Ultrases Ön İşlemi                   |                                      |
|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
|                                     | Proteolize Peynir                    | EMP                                  | Proteolize Peynir                    | EMP                                  |
| Bütirik asit (C <sub>4:0</sub> )    | 31,9 ± 2,5 <sup>a</sup><br>(%2,57)   | 443,2 ± 41,2 <sup>b</sup><br>(%2,98) | 30,3 ± 3,3 <sup>a</sup><br>(%2,82)   | 369,9 ± 90,9 <sup>b</sup><br>(%3,28) |
| Kaproik asit (C <sub>6:0</sub> )    | 8,4 ± 0,7 <sup>a</sup><br>(%0,68)    | 369,0 ± 27,7 <sup>c</sup><br>(%2,48) | 5,6 ± 0,4 <sup>a</sup><br>(%0,53)    | 259,0 ± 8,5 <sup>b</sup><br>(%2,14)  |
| Kaprilik asit (C <sub>8:0</sub> )   | 8,0 ± 1,0 <sup>a</sup><br>(%0,64)    | 349,0 ± 4,3 <sup>c</sup><br>(%2,35)  | 6,5 ± 0,1 <sup>a</sup><br>(%0,60)    | 250,7 ± 12,8 <sup>b</sup><br>(%2,07) |
| Kaprik asit (C <sub>10:0</sub> )    | 14,4 ± 1,0 <sup>a</sup><br>(%1,16)   | 618,1 ± 3,4 <sup>c</sup><br>(%4,16)  | 10,8 ± 0,1 <sup>a</sup><br>(%1,01)   | 459,9 ± 24,4 <sup>b</sup><br>(%3,80) |
| Laurik asit (C <sub>12:0</sub> )    | 25,9 ± 0,3 <sup>a</sup><br>(%2,09)   | 769,4 ± 8,7 <sup>c</sup><br>(%5,18)  | 20,7 ± 1,0 <sup>a</sup><br>(%1,93)   | 571,2 ± 28,4 <sup>b</sup><br>(%4,72) |
| Miristik asit (C <sub>14:0</sub> )  | 101,5 ± 10,6 <sup>a</sup><br>(%8,18) | 2148 ± 23 <sup>c</sup><br>(%14,5)    | 89,5 ± 3,8 <sup>a</sup><br>(%8,33)   | 1631 ± 121 <sup>b</sup><br>(%13,5)   |
| Palmitik asit (C <sub>16:0</sub> )  | 467,7 ± 19,2 <sup>a</sup><br>(%37,7) | 4997 ± 167 <sup>c</sup><br>(%33,6)   | 400,7 ± 16,7 <sup>a</sup><br>(%37,3) | 4220 ± 191 <sup>b</sup><br>(%34,8)   |
| Stearik asit (C <sub>18:0</sub> )   | 172,8 ± 9,1 <sup>a</sup><br>(%13,9)  | 1273 ± 66 <sup>c</sup><br>(%8,57)    | 154,1 ± 9,8 <sup>a</sup><br>(%14,3)  | 971,4 ± 40,3 <sup>b</sup><br>(%8,02) |
| Oleik asit (C <sub>18:1</sub> )     | 378,1 ± 27,0 <sup>a</sup><br>(%30,5) | 3644 ± 254 <sup>c</sup><br>(%24,5)   | 332,6 ± 28,9 <sup>a</sup><br>(%31,0) | 3008 ± 61 <sup>b</sup><br>(%24,8)    |
| Linoleik asit (C <sub>18:2</sub> )  | 21,5 ± 2,0 <sup>a</sup><br>(%1,73)   | 284,9 ± 13,2 <sup>c</sup><br>(%1,92) | 18,1 ± 1,5 <sup>a</sup><br>(%1,69)   | 252,7 ± 8,1 <sup>b</sup><br>(%2,09)  |
| Linolenik asit (C <sub>18:3</sub> ) | 11,0 ± 1,1 <sup>a</sup><br>(%0,89)   | 102,2 ± 11,0 <sup>b</sup><br>(%0,69) | 4,9 ± 0,1 <sup>a</sup><br>(%0,46)    | 94,0 ± 10,5 <sup>b</sup><br>(%0,78)  |
| USYA                                | 62,4 ± 2,5 <sup>a</sup><br>(%5,03)   | 1632 ± 242 <sup>c</sup><br>(%11,0)   | 53,2 ± 3,8 <sup>a</sup><br>(%4,96)   | 1367 ± 75 <sup>b</sup><br>(%11,3)    |
| OUZSYA                              | 1178 ± 5 <sup>a</sup><br>(%95,0)     | 13218 ± 462 <sup>c</sup><br>(%89,0)  | 1021 ± 19 <sup>a</sup><br>(%95,0)    | 10749 ± 321 <sup>b</sup><br>(%88,7)  |
| TSYA                                | 1241 ± 13 <sup>a</sup>               | 14850 ± 582 <sup>c</sup>             | 1074 ± 23 <sup>a</sup>               | 12115 ± 382 <sup>b</sup>             |

<sup>a-c</sup> Aynı harfler örnekler arasında farkın önemli olmadığını göstermektedir (p>0.05).

\* Parantez içerisinde %oran değerleri verilmiştir. USYA: Uçucu serbest yağ asitleri (C<sub>4:0</sub>- C<sub>10:0</sub>); OUZSYA: Orta ve uzun zincirli serbest yağ asitleri (C<sub>12:0</sub>- C<sub>18:3</sub>); TSYA: Toplam serbest yağ asidi; EMP: Enzim modifiye peynir

Uçucu bileşikler aminoasit katabolizması, lipidlerin parçalanması ve laktoz ve sitrat metabolizması sonucu açığa çıkmaktadırlar. Çalışmamız kapsamında EMP üretimlerinde pastörizasyon işlemi ve koruyucu ilavesi yapıldığından dolayı örneklerde tespit edilen bileşikler US uygulamasının oluşturabileceği etkiler ile birlikte aminoasit katabolizması ve lipidlerin parçalanması reaksiyonları temel alınarak değerlendirilmiştir. EMP örneklerinde 3 aldehit, 12 asit, 4 keton, 1 lakton, 1 terpen, 1 fenol, 4 ester, 5 alkol olmak üzere toplam 31 farklı uçucu bileşik tanımlanmıştır. Aldehitler, Strecker degradasyonu, transaminasyon ve amino asitlerin katabolizması ile açığa çıkmaktadırlar (Barbaros Özer ve diğerleri, 2011). Ayrıca bunlar geçici bileşiklerdir. Bununla birlikte düz zincirli aldehitler (bütanal, pentanal, hekzanal ve oktanal) ise doymamış yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyonu ile meydana gelirler (Barbaros Özer ve diğerleri, 2011). Ketonların oluşum kökeni ise yağlardır. Alkoller, biyokimyasal yolla yani proteoliz, lipoliz ve glikoliz ile oluşmaktadırlar. Bu kapsamda amino asit katabolizması (genellikle aldehitlerin parçalanması ile açığa çıkarlar) ve doymamış yağ asitlerinin (linoleik ve linoleik asit) parçalanması ile açığa çıkmaktadırlar (Barbaros Özer ve diğerleri, 2011) Esterler, daha kompleks tepkimelerle oluşan aroma bileşikleridir. Aminoasit katabolizması ve eşit molar hacimde asit ve alkolün esterleşme tepkimesi sonucu açığa çıkmaktadırlar (Barbaros Özer ve diğerleri, 2011). Hidroksiasitlerin molekül içi esterleşmesi sonucu ise laktonlar meydana gelmektedir. Terpenlerin varlığı enzimatik veya kimyasal tepkimeler ile değil sağmal hayvanın beslenmesiyle süte geçmektedir. Sütten de ürünlere geçiş yaparlar. Fenoller ise terpenler gibi bitki orjinli olmakla birlikte aminoasit katabolizması ile de açığa çıkabilmektedirler (Barbaros Özer ve diğerleri, 2011).

Çalışmamız kapsamında tanımlanan uçucu bileşikleri ve miktarları Tablo 4.6.'da verilmiştir. Tablo 4.6.'da belirtilen kontrol grubundaki proteolize peynir (proteolize olmuş US ön işlemi uygulanmamış örnek), EMP ise (proteolize ve lipolize olmuş US ön işlemi uygulanmamış örnek) US ön işlemi uygulanmış gruptakilerde aynı koşullarda proteolize (proteolize peynir) ve lipolize (EMP) olmuş US ön işlemi uygulanmış örnek sonuçlarını içermektedir. Örnek grupları arasındaki değişim toplam uçucu miktarı içindeki yüzde miktarları arasındaki fark şeklinde değerlendirilmiştir. Keton grubundaki bileşikler değerlendirildiğinde (toplam uçucu miktarına göre) kontrol EMP örneğine kıyasla 2-Heptanon miktarında proteolize grupları arasında anlamlı bir değişim gözlenmez iken lipolize grupları arasında %0,07 oranında anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır. 2-

Tridecanon bileşiği ise proteolize gruplarda saptanamamıştır. 2-Nonanon kontrol EMP örneğine kıyasla proteolize gruplar arasında anlamlı bir değişim görölmez iken lipolize gruplar arasında %0,11 oranında anlamlı bir şekilde arttığı görölmüştür. 2-Undekanon miktarı ise kontrol EMP örneğine kıyasla proteolize gruplar arasında değişim görölmez iken lipolize gruplar arasında %0,03 oranında azaldığı saptanmıştır. Aldehit grubundaki bileşikler değerlendirildiğinde hekzanal proteolize gruplarda saptanırken lipolize gruplarda saptanamamıştır. Oktanal miktarında kontrol EMP örneğine kıyasla proteolize gruplarda anlamlı bir değişim görölmez iken lipolize gruplar arasında %0,003 oranında anlamlı bir artış görölmüştür. Benzaldehit ise kontrol EMP örneğine kıyasla proteolize gruplar arasında %4,43 oranında anlamlı bir şekilde arttığı görölürken lipolize gruplar arasında ise anlamlı bir değişimin olmadığı görölmüştür. Ester grubundaki bileşikler arasında etil hekzanoat bileşiği dışındaki tanımlanan diğer bileşikler (etil oktanoat, metil dekanıat, etil dekanıat) saptanmamışlardır. Etil hekzanoat miktarında ise kontrol EMP örneğine kıyasla proteolize gruplar arasında anlamlı bir değişim görölmez iken lipolize gruplar arasında %0,017 oranında anlamlı bir şekilde arttığı görölmüştür. Alkol grubundaki tanımlanan bileşiklerin (1-pentanol, 2-heptanol, 1-okten-3-ol, 2-nonen-1-ol, 2-etil -1-hekzanol ) hepsi saptanamamışlardır.

**Tablo 4.6.** Optimum ultrases ön işleme koşulunda üretilen EMP ile kontrol örneklerinin temel üretim aşamaları sonrasındaki (proteoliz ve lipoliz) uçucu bileşik bileşim ve miktarları (mg/kg EMP).

| RT*    | Özellikler        | Kimyasal Grup | Kontrol                   |                            | Ultrases Ön İşlemi        |                            |
|--------|-------------------|---------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
|        |                   |               | Proteolize Peynir         | EMP                        | Proteolize Peynir         | EMP                        |
| 5,580  | Hekzanal          | Aldehit       | 38,0 ± 1,8                | ND                         | 39,2 ± 2,5                | ND                         |
| 8,084  | 2-Heptanon        | Keton         | 446,6 ± 29,8 <sup>a</sup> | 674,4 ± 43,8 <sup>b</sup>  | 400,9 ± 24,5 <sup>a</sup> | 721,7 ± 35,8 <sup>b</sup>  |
| 8,205  | Limonen           | Terpen        | 113,5 ± 11,2 <sup>a</sup> | 212,6 ± 15,7 <sup>b</sup>  | 108,0 ± 11,7 <sup>a</sup> | 356,0 ± 3,3 <sup>c</sup>   |
| 9,633  | Etil Hekzanoat    | Ester         | 35,3 ± 1,3 <sup>a</sup>   | 86,2 ± 2,5 <sup>b</sup>    | 34,0 ± 2,3 <sup>a</sup>   | 103,7 ± 6,2 <sup>c</sup>   |
| 10,296 | 1-Pentanol        | Alkol         | 19,0 ± 2,1                | ND                         | 14,3 ± 1,4                | ND                         |
| 11,065 | Oktanal           | Aldehit       | 16,9 ± 1,4 <sup>a</sup>   | 25,2 ± 1,8 <sup>b</sup>    | 16,7 ± 1,1 <sup>a</sup>   | 28,0 ± 1,4 <sup>c</sup>    |
| 11,993 | 2-Heptanol        | Alkol         | 57,8 ± 5,5                | ND                         | 63,2 ± 4,5                | ND                         |
| 13,290 | 2-Nonanon         | Keton         | 115,2 ± 5,3 <sup>a</sup>  | 681,3 ± 56,4 <sup>b</sup>  | 130,4 ± 9,5 <sup>a</sup>  | 788,4 ± 35,3 <sup>c</sup>  |
| 14,097 | Etil Oktanoat     | Ester         | ND                        | 515,4 ± 40,2               | ND                        | 550,0 ± 42,3               |
| 14,330 | Asetik Asit       | Asit          | 56,2 ± 3,7 <sup>a</sup>   | 375,3 ± 24,4 <sup>b</sup>  | 54,1 ± 1,9 <sup>a</sup>   | 1222 ± 93 <sup>c</sup>     |
| 14,421 | 1-Okten-3-ol      | Alkol         | 12,0 ± 0,6                | ND                         | 10,5 ± 0,8                | ND                         |
| 14,542 | 2-Nonen-1-ol      | Alkol         | 5,7 ± 0,4                 | ND                         | 8,2 ± 0,2                 | ND                         |
| 15,089 | 2-Etil-1-Hekzanol | Alkol         | 35,3 ± 5,0                | ND                         | 34,7 ± 5,7                | ND                         |
| 15,510 | Benzaldehit       | Aldehit       | 226,9 ± 11,6 <sup>a</sup> | 1386 ± 90 <sup>c</sup>     | 465,9 ± 30,3 <sup>b</sup> | 1483 ± 58 <sup>c</sup>     |
| 15,752 | Propanoik Asit    | Asit          | 47,4 ± 3,9 <sup>a</sup>   | 112,8 ± 12,0 <sup>b</sup>  | 40,5 ± 3,1 <sup>a</sup>   | 134,5 ± 4,1 <sup>c</sup>   |
| 16,642 | Metil Dekanoat    | Ester         | ND                        | 35,7 ± 3,9                 | ND                        | 40,0 ± 4,1                 |
| 16,733 | 2-Undekanon       | Keton         | 47,0 ± 3,4 <sup>a</sup>   | 559,3 ± 44,2 <sup>c</sup>  | 44,1 ± 2,4 <sup>a</sup>   | 497,0 ± 27,2 <sup>b</sup>  |
| 17,053 | Bütanoik Asit     | Asit          | 810,2 ± 63,4 <sup>a</sup> | 9063 ± 727 <sup>b</sup>    | 789,2 ± 42,9 <sup>a</sup> | 9991 ± 567 <sup>c</sup>    |
| 17,265 | Etil Dekanoat     | Ester         | ND                        | 436,1 ± 49,6               | ND                        | 417,7 ± 4,6                |
| 18,513 | Pentanoik Asit    | Asit          | ND                        | 474,0 ± 51,5               | ND                        | 499,3 ± 32,2               |
| 19,524 | 2-Tridecanon      | Keton         | ND                        | 178,6 ± 20,3               | ND                        | 155,9 ± 11,1               |
| 19,834 | Hekzanoik Asit    | Asit          | 887,7 ± 54,9 <sup>a</sup> | 29209 ± 2653 <sup>b</sup>  | 852,1 ± 77,3 <sup>a</sup> | 30716 ± 2077 <sup>b</sup>  |
| 21,057 | Heptanoik Asit    | Asit          | 39,0 ± 3,9 <sup>a</sup>   | 1559 ± 90 <sup>c</sup>     | 35,7 ± 2,3 <sup>a</sup>   | 1411 ± 45 <sup>b</sup>     |
| 21,628 | Fenol             | Fenol         | 77,1 ± 3,8 <sup>a</sup>   | 370,0 ± 33,8 <sup>b</sup>  | 77,2 ± 8,9 <sup>a</sup>   | 354,5 ± 30,1 <sup>b</sup>  |
| 22,242 | Oktanoik Asit     | Asit          | 1149 ± 71 <sup>a</sup>    | 42947 ± 3412 <sup>b</sup>  | 1228 ± 85 <sup>a</sup>    | 40275 ± 2879 <sup>b</sup>  |
| 23,335 | Nonanoik Asit     | Asit          | ND                        | 1091 ± 105                 | ND                        | 866,1 ± 35,4               |
| 23,901 | Delta Dekalakton  | Lakton        | 66,2 ± 4,9 <sup>a</sup>   | 137,9 ± 7,2 <sup>c</sup>   | 59,7 ± 5,8 <sup>a</sup>   | 120,7 ± 9,1 <sup>b</sup>   |
| 24,404 | Dekanoik Asit     | Asit          | 654,1 ± 72,2 <sup>a</sup> | 29697 ± 2298 <sup>c</sup>  | 657,9 ± 64,5 <sup>a</sup> | 25912 ± 1164 <sup>b</sup>  |
| 24,985 | 9-Desenoik Asit   | Asit          | ND                        | 3801 ± 393                 | ND                        | 3061 ± 150                 |
| 25,406 | Undekanoik Asit   | Asit          | ND                        | 346,6 ± 43,2               | ND                        | 251,9 ± 12,1               |
| 26,392 | Dodekanoik Asit   | Asit          | ND                        | 7593 ± 663                 | ND                        | 4440 ± 288                 |
| -      | Toplam Uçucu      | -             | 4986 ± 173 <sup>a</sup>   | 131565 ± 8774 <sup>b</sup> | 5187 ± 244 <sup>a</sup>   | 124396 ± 6647 <sup>c</sup> |

<sup>a-c</sup> Aynı harfler örnekler arasında farkın önemli olmadığını göstermektedir (p>0.05). \* RT: kolonda alıkonma süresi (retention time); EMP: Enzim modifiye peynir.

Tanımlanan fenol bileşiği kontrol EMP örneğine kıyasla proteolize gruplar ve lipolize gruplar arasında anlamlı bir değişim olmadığı görülmüştür. Lakton grubundaki bileşik miktarında ise kontrol EMP örneğine kıyasla proteolize gruplar arasında anlamlı bir değişim görülmez iken lipolize gruplar arasında % 0,008 oranında anlamlı bir şekilde azalmıştır. Asit grubundaki bileşiklerin miktarları ise asetik asit, propanoik asit, bütanoik asit, hekzanoik asit ve heptanoik asit miktarlarında kontrol EMP örneğine kıyasla proteolize gruplar arasında anlamlı bir değişimin olmadığı, lipolize gruplar arasında ise

sırasıyla % 0,69, % 0,022, % 1,14, % 2,49 oranlarında anlamlı bir şekilde artış saptanırken heptanoik asit ve dekanolik asit miktarlarında sırasıyla % 0,051 ve % 1,74 oranında azalma saptanmıştır. Sonuç olarak toplam uçucu bileşik miktarında kontrol EMP örneklerle kıyasla lipolize gruplar arasında %5,45 oranında azalma saptanırken proteolize gruplar arasında anlamlı bir değişim olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte asit grubundaki uçucu bileşik miktarlarındaki ciddi değişimler dikkat çekmektedir.

Pablo Juliano ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan ultrases işleminden sonra sütte bulunmayan lipit oksidasyon uçucuları adlı çalışmalarında 5 farklı grupta çalışmışlardır. Gruplardan birinin çalışma koşulları şu şekildedir; 4 ve 45 °C sıcaklıklarda homojenize edilmemiş süt ve yağsız süte 20, 400 ve 1000 kHz'de 5 ve 20 dk ultrases işlemi uygulamışlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda hem çiğ süt hem de 4 °C'de 20 dk'da yağsız sütün 1000 kHz'lik ultrases işleminden sonra eşik koku değerlerini aştığı saptanmıştır. Benzer bir artış 1000 kHz'de 45 °C'de işlenen sütte ve 400 kHz'de 45 °C'de işlenen sütlerde de gözlemlendiği bildirilmiştir. Bununla birlikte kontrol ve 20 kHz numunelerde hem 4 hem de 45 °C'de ki işlemlerden sonra koku eşiği değerlerinin altında kaldığı bildirilmiştir. Yağsız süt örneklerinde ise 45 °C'deki muameleden sonra işlenmemiş süt ile ilgili 3-5 kat artmış nonanal konsantrasyon artışı olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca, yağsız süt, potansiyel olarak mekanik ayırma ve pompalama işlemleri sırasında kaymadan oluşan serbest yağa sahip olabileceğini ve serbest radikallerle reaksiyona girebilecek hafif yükseltilmiş polar lipit bileşenlerine sahip olabileceklerini bildirmişlerdir.

## 5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında geleneksel yöntemle, stater kültür kullanılmaksızın olgunlaştırmak üzere üretilen beyaz peynir kullanılarak elde edilen eritme peynirine US ön işlemi uygulanıp enzim ilavesi yapılarak belirli koşullar altında EMP elde edilmiştir. Burada US ön işleminin EMP üretiminin proteoliz sürecindeki etkilerinin belirlenmesi ve optimum işlem koşullarının ortaya konulması hedeflenmiştir.

US ön işleminin proteinin konformasyonel yapısı üzerindeki etkileri gibi enzim aktivasyonunu uyaran etkisi dikkatimizi çekmiş ve bu kapsamda US gücü, süresi ve proteoliz süresi parametreleri doğrultusunda yanıt yüzey yöntemi, merkezi karma dönel tasarım ile hazırlanmış deneme planı oluşturulmuştur ve optimizasyon üretimleri yapılmıştır. Ultrases ön işleminin EMP'lerdeki proteoliz sürecine olan etkilerinin saptanabilmesi için belirlenen 3 faktör ile 3 farklı düzeyde oluşturulmuş 7 farklı işlem koşulunda üçer paralel (merkez noktada 6 paralel) üretim gerçekleştirilmiş ve US uygulanmış 24 EMP örneğinin analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar şu şekildedir:

- US gücü suda çözünür azot miktarı üzerinde etkili değil iken proteoliz ve US sürelerinin etkili olduğu saptanmıştır.
- US gücü ve süresinin TCA-ÇA ve PTA-ÇA miktarları üzerinde etkili olmadığı ancak proteoliz süresi ile arttığı saptanmıştır.
- US gücü ve süresinin pH ve titrasyon asitliği üzerinde etkili olmadığı görülürken proteoliz süresinin artışıyla birlikte titrasyon asitliği miktarında artış pH değerinde ise azalma olduğu saptanmıştır.
- US gücü ve proteoliz süresinin artışıyla birlikte kuru madde miktarında artış olduğu saptanmıştır.
- US süresi, OYİ üzerinde etkili değil iken OUI değerinde sürenin artışıyla arttığı saptanmıştır. Proteoliz süresinin artışıyla birlikte de hem OUI hem de OYİ değerlerinde artış olduğu görülmüştür.

Özetle; US gücünün etkisi görülmez iken US süresinin etkili olduğu görülmüştür. Bununla birlikte proteoliz süresinin baskın olduğu dikkat çekmiştir.

Optimum koşullar 46,28 W US gücü, 9,8 dk US ön işlem süresi, 10,49 saat proteoliz süresi olarak hesaplanmıştır. US uygulanmış EMP'lerin optimizasyonu sonucu elde edilen modelde yanıtlar üzerinde interaksiyon etkisi istatistiksel olarak şu şekilde elde edilmiştir:

- US gücü arttıkça OUI değerinin arttığı US süresi arttıkça da düşük US gücünde görülmektedir. Orta düzey US güçlerinde ise US süresinin artışıyla birlikte OUI önce arttığı daha sonraları ise azaldığı saptanmıştır.

Optimizasyon çalışmasının sonunda, tahmini değerler ile elde edilen teorik sonucun deneysel veriler ile doğrulaması yapılmıştır. Doğrulama amacıyla optimum çalışma koşullarında, US ön işlemi sonrası proteolize edilmiş peynir ve bunun kontrolü olarak US uygulanmadan doğrudan proteolize edilmiş peynir (kontrol), US ön işlemi sonrası gerçekleştirilen proteoliz+lipoliz sonucu üretilen EMP ve bunun kontrolü olarak herhangi bir US ön işlemi uygulanmadan doğrudan proteoliz+lipoliz ile üretilen EMP (kontrol) olmak üzere 4 adet örnek (2 adet proteolize peynir ve 2 adet EMP) üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ortalama değerler ise şu şekildedir:

- Erbay ve arkadaşları (2017) tarafından yaptıkları çalışmalarından elde edilen kontrol örneklerinin optimizasyonu sonucu OUI 58,35, OYİ 51,61, SAI 8,19 ve titrasyon asitliği 0,868 olarak hedef değerler belirlenmiştir. Bu değerlerin, tahmin edilen değerlere yakın değerler olduğu saptanmıştır.
- Tüm yanıtlar için doğrulama analizlerinden elde edilen deneysel veriler ile modelden tahmin edilen değerler arasında, istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığı ( $P>0,05$ ) saptanmıştır. En düşük  $p$ -değeri 0,159 ve en yüksek % hata değeri ise % 4,6 olarak hesaplanmıştır.
- Bütirik asit miktarında kontrol EMP örneklerine kıyasla proteolize gruplar arasında değişim gözlemlenmez iken lipolize gruplar arasında kaproik, kaprolik ve kaprik asitlerin miktarlarında sırasıyla % 0,34, % 0,28, % 0,36 oranında anlamlı bir şekilde azaldığı saptanmıştır.

- Palmitik, oleik, linoleik ve linolenik asitlerde kontrol EMP örneklerine kıyasla lipolize gruplar arasında sırasıyla % 1,2, % 0,3, % 0,17 ve % 0,09 oranında anlamlı bir şekilde artış saptanırken laurik, miristik ve stearik asitlerde ise sırasıyla % 0,46, % 1, % 0,55 oranında anlamlı şekilde azalma olduğu saptanmıştır. Proteolize gruplar arasında ise anlamlı bir değişimin olmadığı görülmüştür.
- Asetik asit, propanoik asit, bütanoik asit, hekzanoik asit miktarlarında kontrol EMP örneklerine kıyasla lipolize gruplar arasında sırasıyla %0,7, %0,025, %1,15, %2,49 oranlarında anlamlı bir şekilde artış saptanırken heptanoik asit ve dekanolik asit miktarlarında sırasıyla %0,05 ve %1,74 oranında azalma saptanmıştır. Proteolize gruplar arasında anlamlı bir değişimin olmadığı görülmüştür.
- 2-Nonanon kontrol EMP örneğine kıyasla lipolize gruplar arasında %0,11 oranında anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür. Proteolize gruplar arasında anlamlı bir değişimin olmadığı görülmüştür.
- Asit grubundaki bileşiklerin miktarları ise asetik asit, propanoik asit, bütanoik asit, hekzanoik asit ve heptanoik asit miktarlarında kontrol EMP örneğine kıyasla proteolize gruplar arasında anlamlı bir değişimin olmadığı, lipolize gruplar arasında ise sırasıyla % 0,69, % 0,022, % 1,14, % 2,49 oranlarında anlamlı bir şekilde artış saptanırken heptanoik asit ve dekanolik asit miktarlarında sırasıyla % 0,051 ve % 1,74 oranında azalma saptanmıştır.

Sonuç olarak toplam uçucu bileşik miktarında kontrol EMP örneklerle kıyasla lipolize gruplar arasında %5,45 oranında azalma saptanırken proteolize gruplar arasında anlamlı bir değişim olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte asit grubundaki uçucu bileşik miktarlarındaki ciddi değişimler dikkat çekmektedir.

Yapılan bu çalışma enzimatik reaksiyonun hızlandırılarak, EMP üretiminin süresinin kısaltılmasını hedeflemiştir. Elde edilen sonuçlar ile hedefimiz yakalanılmış, üretim süresinin 1,5 saat daha kısaltılabileceği tespit edilmiştir. US parametrelerinde US süresinin etkisi az olmakla birlikte sürecin etkisinin daha baskın olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, kontrol EMP örneklerine yakın EMP üretiminin 1,5 saat daha kısa bir sürede elde edilebileceği belirlenmiş ve US işleminin enzim aktivasyonunu hızlandırabileceği tespit edilmiştir. Bununla birlikte US işleminin enzim aktivasyonu üzerine etkisi üzerine olan çalışma literatürde az olmakla birlikte çalışmamızın literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Akdeniz, V., & Akalın, A. S. (2017). Ultrason uygulamasının süt ürünlerinde homojenizasyon, jel yapısı, viskozite ve su tutma kapasitesi üzerine etkisi. *Gıda* 42 (6): 743-753
- Ashokkumar, M., Bhaskaracharya, R., Kentish, S., Lee, J., Palmer, M., Zisu, B., (2010). The ultrasonic processing of dairy products - An overview. *Dairy Science Technology*, EDP sciences/Springer, pp.147-168
- Abesinghe, A.M.N.L., Islam, N., Vidanarachchi, J.K., Prakash, S., Silva, K.F.S.T., Karim, M.A., (2018). Effects of ultrasound on the fermentation profile of fermented milk products incorporated with lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, pp.1-53
- Almanza-Rubio, J.L., Gutiérrez-Méndez, N., Leal-Ramos, M.Y., Sepulveda, D., Salmeron, I. (2016). "Modification of the textural and rheological properties of cream cheese using thermosonicated milk", *J. Food Eng.*, 168: 223– 230, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2015.08.002.
- Ashokkumar, M., Grieser, F., (2007). The effect of surface active solutes on bubbles in an acoustic field, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9, pp. 5631–5643
- AOAC International. 2012a. "Loss on Drying (Moisture) in Cheese". Official Method 926.08. Official Methods of Analysis of AOAC International (19. Basım). Editör: Latimer Jr., G.W. Gaithersburg, MA: AOAC International.
- AOAC International. 2012c. "Acidity of Milk, Titrimetric Method". Official Method 947.05. Official Methods of Analysis of AOAC International (19. Basım). Editör: Latimer Jr., G.W. Gaithersburg, MA: AOAC International.
- Barbaros Ö., Hayaoğlu A.A., (2011). *Peynir Biliminin Temelleri*. Pp. 264-284.
- Bermejo, P., Capelo, J.L., Mota, A., Madrid, Y., Cámara, C., (2004). Enzymatic digestion and ultrasonication: a powerful combination in analytical chemistry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 23(9), pp. 654-663
- Barbosa-Canovas GV, Palou E, Pothakamury, UR, &Swanson BG. (1997). Application of light pulses in the sterilization of foods and packaging materials. *Nonthermal Preservation of Foods*, Marcel Dekker Inc. New York, pp. 139-161.

- Bosiljkov, T., Tripalo, B., Ježek, D., Brnčić, M., Karlović, S., Dujmić, F. (2012). "Influence of High Intensity Ultrasound Treatments on Physical Properties of Sheep Milk", *Croat. J. Food Tech. Biotech. Nutr.*, pp.44-48.
- Bütikofer, U., Rüegg, M., Ardö, Y. 1993. "Determination of nitrogen fractions in cheese: Evaluation of a collaborative study", *Food Science and Technology – Lebensmittel – Wissenschaft & Technologie*, 26(3), 271-275.
- Chouliara, E., Georgogianni, K.G., Kanellopoulou, N., Kontominas, M.G., (2010). Effect of ultrasonication on microbiological, chemical and sensory properties of raw, thermized and pasteurized milk, *Int. Dairy J.* 20, pp.307–313.
- 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. doi:10.3168/jds.2012-5318
- 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* Vol. 95 No. 12, pp. 6882-6890.
- Chandrapala, J., Ong, L., Zisu, B., Gras, S.L., Ashokkumar, M., Kentish, S.E. (2016). "The effect of sonication and high pressure homogenisation on the properties of pure cream", *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 33, pp. 298– 307, doi: 10.1016/j.ifset.2015.11.023
- Cameron, M., McMaster, L. D., & Britz, T. J. (2008). Electron microscopic analysis of dairy microbes inactivated by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15 pp. 960–964.
- De Jong, C., Badings, H. T., (1990). "Determination of free fatty acids in milk and cheese procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis", *Journal of High Resolution Chromatography*, 13, pp. 94-8.
- Deeth, H. C., Gerald, F., Snow, J. (1983). "A gas chromatographic method for the quantitative determination of free fatty acids in milk and milk products", *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 18, pp. 13-20.
- Dalagnol, Luíza M.G.; Silveira, Vitória C.C.; da Silva, Halisson Baron; Manfroí, Vitor; Rodrigues, Rafael C. (2017). Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: Effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters, pp. 1-42.

- Ewe, J., Abdullah, W.W., Bhat, R., Karim, A., & Liong, M. (2012). Enhanced growth of lactobacilli and bioconversion of isoflavones in biotin-supplemented soymilk upon ultrasound-treatment. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19, pp. 160–173.
- Ergutay, Şengül and Şengül, (2004). Effect of Ultrasound Treatment on Milk Homogenisation and Particle Size Distribution of FatTurk J Vet Anim Sci 28pp, 303-308
- Erbay, Z., Salum, P. & Gvce, G. (2017). Türkiye’de üretilen enzim modifiye st ürünlerinin lipolitik ve proteolitik olgunlaşma dzeylerinin incelenmesi. Pamukkale University Journal of Engineering Sciences, 23(7), 919-925. doi:10.5505/pajes.2016.48830.
- Erdogan A., Baran A., Atasever M.,(2012). Peynirde Mikrobiyal Lipolizin Oluşumu ve Lezzet Bileşimine Katkısı. Atatrk Üniversitesi Vet. Bil. Derg. 7(3): 211-219
- Feng, H., Barbosa-Canovas, G.V., Weiss, J., (2010). Ultrasound technologies for food and bioprocessing, in: R. Mawson, M. Gamage, N.S. Terefe, K. Knoerzer (Eds.).Ultrasound in enzyme activation and inactivation, Springer, New York, pp. 369-404.
- Gallo, M., Ferrara, L., Naviglio, D., (2018). Application of Ultrasound in Food Science and Technology: A Perspective. *Foods*, pp. 164
- Hulin-Bertaud, S., Kilcawley, K.N., Wilkinson, M.G., Delahunty, C.M., (2000). Sensory and compositional relationships between commercial Cheddar-flavored enzyme-modified cheeses and natural Cheddar. *Journal of Food Science* 65(6): 1076-1082.
- Hannon, J.A., Kilcawley, K.N., Wilkinson, M.G., Delahunty, C.M., Beresford, T.P., (2006). Production of ingredient-type Cheddar cheese with accelerated flavor development by addition of enzyme-modified cheese powder. *Journal of Dairy Science* 89: 3749-3762
- Huang, G., Chen, S., Dai, C., Sun, L., Sun, W., Tang, Y., Xiong, F., He, R., (2017). Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. *Ultrasonics sonochemistry*, pp. 144-149
- Huang, J., Liu, Y., Song, Z., Jin, Q., Liu, Y., Wang, X., (2010). Kinetic study on the effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil: Study of the interfacial area and the initial rates, *Ultrasonics sonochemistry* 17(3), pp. 521-5

- Juliano, P., Torkamani, A., Leong, T., Kolb, V., Watkins, P., Ajlouni, S., Singh, T., (2014). Lipid oxidation volatiles absent in milk after selected ultrasound processing ,*Ultrason.Sonochem*, pp.2165-2175.
- Kresic G., Lelas V., Jambrak A.R., Herceg Z., Brncic S.R., (2008). Influence of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins, *J. Food Eng.* 87, pp. 64–73.
- Kilcawley, K.N., Wilkinson, M.G., Fox, P.F., (2000). A survey of the composition and proteolytic indices of commercial enzyme-modified Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 10: 181-190.
- Kilcawley, K.N., Wilkinson, M.G., Fox, P.F., (2006). A novel two-stage process for the production of enzyme-modified cheese. *Food Research International* 39: 619-627
- Leong, T., Wooster, T.J., Kentish, S.E., Ashokkumar, M., (2009). Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification, *Ultrason. Sonochem.* pp. 721–727.
- Li, S., Brennen, C. E., & Matsumoto, Y. (2015). Introduction for amazing (cavitation) bubbles. *Interface Focus*, 5 (5). doi:10.1098/rsfs.2015.0059
- Lemieux, L. & Simard, R. E. (1992). Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition. *Lait*, 72, 335–382.
- Leong,, T., Juliano, P., (2015). The effect of megasonic separation on the nutritional and physical properties of food - an overview. *Nutr Health Food Eng*, pp. 228–231.
- Mertens, B., & Knorr D. (1992). Developments of nonthermal processes of food preservation. *Food Tech*, 46: 124-133
- Moholkar, V.S., Nierstrasz, V.A., & Warmoeskersen, M.M.C.G. (2003). Intensification of Mass Transfer in Wet Textile Process by Power Ultrasound Hollanda.
- McSweeney, P. L. H., Fox, P. F. 1997. “Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening”, *Lait*, 77, 41-76.
- McAuliffe, J.C., Aehle, W., Whited, G.M., Ward, D.E., (2007). Industrial Enzymes and Biocatalysis, in: J.A.K. Ph.D. (Ed.), *Kent and Riegel's Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*, Springer US, NewYork, US, pp. 1375-1420
- Moholkar, V.S., Rekveld, S., Warmoeskerken, M.M.C.G., (2000). Modeling of the acoustic pressure fields and the distribution of the cavitation phenomena in a dual frequency sonic processor, *Ultrasonics* 38, pp.666–670

- Mason, T.J., Cobley, A.J., Graves, J.E., Morgan, D., (2011). New evidence for the inverse dependence of mechanical and chemical effects on the frequency of ultrasound, *Ultrason. Sonochem.* pp. 226–230.
- Mili eğitim Bakanlığı, Gıda teknolojisi, Lipitler. Ankara, (2011). pp. 6-20.
- Nguyen, N.H.A. and Anema S.G. (2010). Effect of ultrasonication on the properties of skim milk used in the formation of acid gels. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11:pp. 616–622
- Puvanenthiran, A., Williams, R., & Augustin, M. (2002). Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*, 12, pp. 383–391.
- Peng, Y. (2010). Impact of altering the gelation conditions on the physical properties of yogurt. PhD thesis. Madison, WI, USA: University of Wisconsin-Madison.
- Reiner, R., Noci, F., Denis, A., Morgan, D., Lyng, J., (2009). Characterization of volatile compounds generated in milk by high intensity ultrasound, *Int. Dairy J.* 19, pp.269–272.
- Riener, J., Noci, F., Cronin, D. A., Morgan, D. J., Lyng, J. G. (2009). “The effect of thermosonication of milk on selected physicochemical and microstructural properties of yoghurt gels during fermentation”, *Food Chem.*, 114, pp.905–911, doi:10.1016/j.foodchem.2008.10.037
- Sutariya, S., Sunkesul, V., Kumar, R., & Şah, K., (2018). Emerging applications of ultrasonication and cavitation in dairy industry: a review. *Cogent Food & Agriculture*, volume:4
- Songül Şahin Ercan and Çiğdem Soysal., (2013). Use of ultrasound in food preservation. *Vol.5, No.8A2*, 5-13
- Shershenkov, B., & Suchkova, E. (2015). Upgrading the technology of functional dairy products by means of fermentation process ultrasonic intensification. *Agronomy Research*, 13, pp. 1074–1085.
- Sakakibara, M., Wang, D., Ikeda K., Suzuki. K., (1994). Effect of ultrasonic irradiation on production of fermented milk with *Lactobacillus delbrueckii*, *Ultrasonics Sonochemistry*. Vol 1 No 2

- Salum, P., Erbay, Z., Kelebek, H., Selli, S., (2017). "Optimization of headspace solid-phase microextraction with different fibers for the analysis of volatile compounds of white- brined cheese by using response surface methodology", *Food Analytical Methods*, 10, 1956-1964.
- Tabatabaie, F., & Mortazavi, A. (2008). Studying the effects of ultrasound shock on cell wall eability and survival of some LAB in milk. *World Applied Sciences Journal*, 3, pp.119–121.
- Trujillo, F.J., Knoerzer, K., (2011). A computational modeling approach of the jet-like acoustic streaming and heat generation induced by low frequency high power ultrasonic horn reactors, *Ultrason. Sonochem.* pp. 1263–1273.
- Villamial, Jong. 2000. Influence of High-Intensity Ultrasound and Heat Treatment in Continuous Flow on Fat, Proteins, and Native Enzymes of Milk. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 472–478
- Vijayakumar, S., Grewell, D., Annandarajah, C., Benner, L., Clark, S. (2015). "Quality characteristics and plasmin activity of thermosonicated skim milk and cream", *J. Dairy Sci.*, 98, pp. 6678–6691, doi: 10.3168/jds.2015-9429
- Yu et al., (2016). Effect of ultrasonic pretreatment on kinetics of gelatin hydrolysis by collagenase and it mechanism. *Ultrasonics Sonochemistry* 29, 495–501.
- Yüksel, F., *Gıda Teknolojisinde Ultrases Uygulamaları* (2013). *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*,. pp. 29-38.
- Yu, Z-L., Zeng, W-C., Zhang. W-H., Liao. X-P., Shi, B., (2016). Effect of ultrasonic pretreatment on kinetics of gelatin hydrolysis by collagenase and it mechanism, *Ultrasonics Sonochemistry*. pp. 495–501
- Wu, H., Hulbert, G.J., Mount, J.R. (2001). "Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter", *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 1, pp. 211-218.
- Wang, Danli; Yan, Lufeng; Ma, Xiaobin; Wang, Wenjun; Zou, Mingming; Zhong, Jianjun; Ding, Tian; Ye, Xingqian; Liu, Donghong (2018). Ultrasound promotes enzymatic reactions by acting on different targets: Enzymes, substrates and enzymatic reaction systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, pp.1-34
- Wang, D., Sakakibara. M., (1997). Lactose hydrolysis and 13-galactosidase activity in sonicated fermentation with *Lactobacillus* strains, *Ultrasonics Sonochemistry* 4. pp. 255 261

Wang, Z., LìN, X., Li, P., Zhang, J., Wang, S., Ma, H., (2012). Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment, *Bioresource Technology* 117, pp. 222–227, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.015>



## EKLER

**Tablo EK-1:** US uygulanmış enzim modifiye peynir (EMP) örneklerinin kimyasal özellikleri.

|         | TA    | SÇA   | TCA-SN | PTA-SN | Oİ   | Oİ   | SAİ | pH   | Tit.Asitliği | Kuru Madde |
|---------|-------|-------|--------|--------|------|------|-----|------|--------------|------------|
| 1       | 1,582 | 0,751 | 0,714  | 0,087  | 47,5 | 45,1 | 5,5 | 6,10 | 0,761        | 26,7       |
| 2       | 1,597 | 0,774 | 0,743  | 0,082  | 48,5 | 46,5 | 5,1 | 6,11 | 0,776        | 26,8       |
| 3       | 1,602 | 0,768 | 0,733  | 0,095  | 47,9 | 45,8 | 5,9 | 6,10 | 0,733        | 26,9       |
| 4       | 1,519 | 0,930 | 0,843  | 0,125  | 61,2 | 55,5 | 8,2 | 5,97 | 0,900        | 26,8       |
| 5       | 1,437 | 0,658 | 0,494  | 0,039  | 45,8 | 34,4 | 2,7 | 6,01 | 0,621        | 27,0       |
| 6       | 1,572 | 0,746 | 0,685  | 0,087  | 47,5 | 43,5 | 5,5 | 6,10 | 0,717        | 26,5       |
| 7       | 1,535 | 0,793 | 0,763  | 0,090  | 51,7 | 49,7 | 5,9 | 6,09 | 0,758        | 27,2       |
| 8       | 1,508 | 0,773 | 0,737  | 0,090  | 51,3 | 48,9 | 6,0 | 6,10 | 0,748        | 26,6       |
| 9       | 1,601 | 0,895 | 0,812  | 0,123  | 55,9 | 50,7 | 7,7 | 5,97 | 0,862        | 26,5       |
| 10      | 1,512 | 0,852 | 0,811  | 0,124  | 56,3 | 53,7 | 8,2 | 6,01 | 0,867        | 26,9       |
| 11      | 1,483 | 0,713 | 0,632  | 0,066  | 48,1 | 42,6 | 4,5 | 5,96 | 0,678        | 26,5       |
| 12      | 1,490 | 0,967 | 0,841  | 0,124  | 64,9 | 56,4 | 8,3 | 5,98 | 0,865        | 27,5       |
| 13      | 1,607 | 0,767 | 0,690  | 0,093  | 47,7 | 42,9 | 5,8 | 6,10 | 0,813        | 26,6       |
| 14      | 1,445 | 0,769 | 0,724  | 0,083  | 53,2 | 50,1 | 5,7 | 6,11 | 0,747        | 27,4       |
| 15      | 1,506 | 0,699 | 0,634  | 0,072  | 46,5 | 42,1 | 4,8 | 5,95 | 0,650        | 26,5       |
| 16      | 1,590 | 0,818 | 0,678  | 0,090  | 51,5 | 42,6 | 5,6 | 6,14 | 0,719        | 26,9       |
| 17      | 1,483 | 0,825 | 0,759  | 0,112  | 55,7 | 51,2 | 7,6 | 5,99 | 0,838        | 26,2       |
| 18      | 1,530 | 0,710 | 0,546  | 0,069  | 46,4 | 35,7 | 4,5 | 5,90 | 0,681        | 26,2       |
| 19      | 1,515 | 0,827 | 0,649  | 0,077  | 54,6 | 42,8 | 5,1 | 6,05 | 0,702        | 27,4       |
| 20      | 1,584 | 0,775 | 0,728  | 0,088  | 48,9 | 46,0 | 5,6 | 6,12 | 0,727        | 27,0       |
| 21      | 1,593 | 0,785 | 0,734  | 0,097  | 49,3 | 46,1 | 6,1 | 6,08 | 0,808        | 26,4       |
| 22      | 1,596 | 0,769 | 0,723  | 0,093  | 48,2 | 45,3 | 5,8 | 6,12 | 0,785        | 26,1       |
| 23      | 1,579 | 0,760 | 0,720  | 0,088  | 48,2 | 45,6 | 5,6 | 6,11 | 0,760        | 26,5       |
| 24      | 1,580 | 0,837 | 0,728  | 0,092  | 52,9 | 46,1 | 5,8 | 6,14 | 0,792        | 27,2       |
| 25      | 1,485 | 0,650 | 0,463  | 0,034  | 43,8 | 31,2 | 2,3 | 6,06 | 0,623        | 26,2       |
| 26      | 1,588 | 0,870 | 0,843  | 0,120  | 54,8 | 53,1 | 7,5 | 6,01 | 0,880        | 26,4       |
| 27      | 1,507 | 0,660 | 0,476  | 0,039  | 43,8 | 31,6 | 2,6 | 6,06 | 0,641        | 26,6       |
| 28      | 1,545 | 0,829 | 0,824  | 0,120  | 53,6 | 53,3 | 7,7 | 6,01 | 0,883        | 26,2       |
| 29      | 1,581 | 0,747 | 0,693  | 0,085  | 47,2 | 43,8 | 5,4 | 6,12 | 0,787        | 25,9       |
| 30      | 1,551 | 0,772 | 0,722  | 0,093  | 49,8 | 46,5 | 6,0 | 6,13 | 0,789        | 26,6       |
| 31      | 1,471 | 0,760 | 0,716  | 0,085  | 51,7 | 48,7 | 5,8 | 6,11 | 0,771        | 26,5       |
| 32      | 1,415 | 0,737 | 0,698  | 0,084  | 52,1 | 49,3 | 5,9 | 6,11 | 0,806        | 26,4       |
| Kontrol | 1,407 | 0,830 | 0,708  | 0,110  | 59,0 | 50,3 | 7,8 | 6,06 | 0,891        | 25,8       |