

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI



**WHEY PROTEİN İZOLATI-DÜŞÜK METOKSİLLİ PEKTİN
KOMPLEKSLERİ KULLANILARAK STABİLİZE EDİLMİŞ SU
İÇİNDE YAĞ (S/Y) EMÜLSİYONLARININ HAZIRLANMASI
VE KARAKTERİZASYONU: BİYOPOLİMER ORANI VE ISIL
İŞLEMİN KOMPLEKSLERİN OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEVDE TURAN

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. M. Şamil Kök

BOLU, ARALIK - 2021

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sevde TURAN tarafından hazırlanan “**Whey Protein İzolatı-Düşük Metoksilli Pektin kompleksleri kullanılarak stabilize edilmiş su içinde yağ (S/Y) emülsiyonlarının hazırlanması ve karakterizasyonu: Biyopolimer oranı ve ısıl işlemin komplekslerin oluşumu üzerine etkisi**” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans olarak oy birliği ile kabul edilmiştir. 1/12/2021

Jüri Üyeleri

Danışman

Prof. Dr. M. Şamil KÖK
Abant İzzet Baysal Üniversitesi

İmza

Üye

Prof. Dr. Mehmet ÖZTÜRK
Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Filiz ALTAY
İstanbul Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir,

aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin 10/08/2021 tarihinde Turnitin adlı intihal tespit programından enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 4 olarak tespit edilmiştir.

.....

SEVDE TURAN

ÖZET

**WHEY PROTEİN İZOLATI-DÜŞÜK METOKSİLLİ PEKTİN
KOMPLEKSLERİ KULLANILARAK STABİLİZE EDİLMİŞ SU İÇİNDE
YAĞ (S/Y) EMÜLSİYONLARININ HAZIRLANMASI VE
KARAKTERİZASYONU: BİYOPOLİMER ORANI VE ISIL İŞLEMİN
KOMPLEKSLERİN OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

SEVDE TURAN

**BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. M. ŞAMİL KÖK)
BOLU, ARALIK - 2021
XI + 46**

Bu çalışmada, farklı oranlarda (2:0, 2:1, 1:1, 1:2) oluşturulmuş, ısıtma işlemi uygulanmış ve uygulanmamış WPI-DMP kompleksleriyle stabilize edilmiş su içinde yağ emülsiyonları hazırlanmıştır. Emülsiyonlar Ultra-Turrax kullanılarak önceden karıştırılmış ve WPI-DMP komplekslerinin yağ-su arayüzünde dağıtılması için sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Isıtma işlemi uygulanmış ve uygulanmamış haldeki WPI-DMP komplekslerinin Z-average çapı, ζ -potansiyel, viskozite gibi fiziko-kimyasal özellikleri ölçümlerle belirlenmiştir. Kompleksler tarafından stabilize edilen emülsiyonların; morfolojileri, ortalama damlacık boyutu, viskozitesi ve analitik santrifüj kullanılarak stabilitesi karakterize edilmiştir. Aynı zamanda komplekslerin adsorpsiyon becerileri QCM-D deneyleri ile test edilmiş, simülasyonları yapılmış ve komplekslerin hidrofobik olarak modifiye edilmiş altın plakalara, proteine kıyasla sadece düşük pH'larda daha iyi tutunduğu gözlemlenmiştir. İlginç bir şekilde, emülsiyonlar pH nötre yakın ayarlandıkları zamanlarda, pH'ya duyarlı bir davranış göstermiştir. Biopolimer oranları emülsiyon stabilitesini etkilemiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: WPI:DMP kompleksleri, QCM-D, emülsiyon stabilitesi, Pickering emülsiyonlar, yüzey adsorpsiyonu, nanopartiküller

ABSTRACT

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF O/W EMULSIONS STABILIZED BY WHEY PROTEIN ISOLATE-LOW METHOXYL PECTIN COMPLEXES: EFFECT OF BIOPOLYMER RATIO AND HEAT TREATMENT ON THE COMPLEXES FORMATION

MSC THESIS

SEVDE TURAN

BOLU ABANT IZZET BAYSAL UNIVERSITY

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING

(SUPERVISOR: PROF. DR. M. ŞAMİL. KÖK)

BOLU, JULY 2020

XI + 46

In this study, we prepared O/W emulsions stabilized by unheated and pre-heated WPI-LMP complexes at different ratios (2:0, 2:1, 1:1, 1:2). Emulsions were prepared by pre-mixing using Ultra-Turrax, followed by sonication to distribute the WPI-LMP complexes in the oil-water interface. The physico-chemical properties of unheated and pre-heated WPI-LMP complexes were characterized, i.e their Z-average diameter, ζ -potential, viscosity were measured. The emulsions stabilized by the complexes were characterized for their morphology, average droplet size, viscosity, as well as stability using analytical centrifuge. We also simulated the adsorption of the complexes using QCM-D experiments that showed that the complexes were well-adsorbed onto hydrophobically modified gold surfaces compared to the protein only at low pH. Interestingly, the emulsions showed a pH-responsive behaviour when adjusted to a pH close to neutral. Biopolymer ratio affected the stability of emulsions.

KEYWORDS: WPI:LMP complexes, QCM-D, emulsion stability, Pickering emulsions, surface adsorption, nanoparticles

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
ETİK BEYAN.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ	ix
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	x
TEŞEKKÜR	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR TARAMASI	4
2.1 Biopolimerlerin Elektrostatik Kompleksasyonları	4
2.2 Biopolimer Elektrostatik İnteraksiyonlarını Etkileyen Fizikokimyasal Faktörler	4
2.2.1 pH	5
2.2.2 İyonik Güç	5
2.2.3 Biopolimerlerin Yük Yoğunluğu.....	6
2.2.4 Biopolimer Molekül Ağırlığı.....	6
2.2.5 Biopolimer Oranı ve Konsantrasyonu	7
2.2.6 Fiziksel ve Mekanik Faktörler	7
2.3 Yenilebilir Emülsiyon Teknolojisi: Emülsiyon Oluşturma Metodu.....	9
2.4 Protein-Polisakkarit Komplekslerinin Gıda Endüstrisindeki Uygulamaları	9
2.5 Protein-Polisakkarit Kompleksleri Tarafından Stabilize Edilmiş Y/S Emülsiyonları: Pickering Stabilizasyonu	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM	13
3.1 Materyal	13
3.2 Yöntem	13
3.2.1 Elektriksel Yük (Charge) Titrasyonu	13
3.2.2 Stok Çözeltilerin Hazırlanması.....	15
3.2.3 WPI:DMP Komplekslerinin Hazırlanması.....	15
3.2.4 Emülsiyonların Hazırlanması	15
3.2.5 Kompleks Parçacıklarının Karakterizasyonu	16
3.2.6 Emülsiyonların Karakterizasyonu	17
3.2.7 Data Analizi	22
3.3 Komplekslerin Karakterizasyonu	22
3.3.1 Elektriksel Yük Yoğunluğu	22
3.3.2 Z-Average Çapı	24
3.3.3 ζ -Potansiyeli	26

3.4 Emülsiyonların Karakterizasyonu	27
3.4.1 Optik Mikroskopi	27
3.4.2 Yağ Damlacık Boyutu	28
3.4.3 Viskozite.....	29
3.4.4 Hızlandırılmış Kremalaşma Stabilitesi.....	30
3.4.5 QCM-D Deneyi	31
3.4.6 Krema Fazındaki Protein Konsantrasyonu	32
3.4.7 Krema Fazındaki Pektin Konsantrasyonu	34
3.4.8 pH Stabilitesi	34
4. TARTIŞMA	36
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	38
6. KAYNAKLAR.....	39
7. EKLER.....	44



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. WPI konsantrasyon serisinin standart eğrisi.....	19
Şekil 2. DMP konsantrasyon serilerinin standart eğrisi.....	21
Şekil 3. pH'ın bir fonksiyonu olarak 10 mM sodyum asetat tamponunun içindeki %0.5'lik WPI'nin yük yoğunluğu.....	23
Şekil 4. pH'nın bir fonksiyonu olarak 10 mM sodyum asetat tamponunda %0.5 DMP'nin yük yoğunluğu.....	24
Şekil 5. 30 s sonikasyondan sonra, farklı WPI:DMP oranlarındaki ısıtılmış ve ısıtılmamış WPI:DMP komplekslerinin Z-average çapı. Partikül boyut dağılımı sonikasyondan sonra önemli bir değişiklik göstermemiştir.	25
Şekil 6. 4.5 pH'da, 10 mM sodyum asetat tamponu içinde farklı WPI:DMP oranlarında ısıtılmış ve ısıtılmamış WPI:DMP komplekslerinin ζ -Potansiyeli.....	26
Şekil 7. Farklı WPI:DMP oranlarında, 10 mM sodyum asetat tamponu (pH 4.5) içinde ısıtılmamış WPI:DMP kompleksleri tarafından stabilize edilen %10 Y/S emülsiyonlarının optik mikroskopi resimleri (ölçek çubuğu=20 μ m).....	27
Şekil 8. Farklı WPI:DMP oranlarında, 10 mM sodyum asetat tamponu (pH 4.5) içinde ısıtılmış WPI:DMP kompleksleri tarafından stabilize edilen %10 Y/S emülsiyonlarının optik mikroskopi resimleri (ölçek çubuğu=20 μ m).....	27
Şekil 9. 10. mM sodyum asetat tamponu içinde (pH 4.5) ısıtılmış ve ısıtılmamış farklı oranlarda WPI:DMP kompleksleri tarafından stabilize edilen %10'luk Y/S emülsiyonlarının D[4,3]'si.....	29
Şekil 10. Farklı WPI:DMP oranlarında, 10 mM asetat tamponu içinde (pH 4.5) ısıtılmış ve ısıtılmamış WPI:DMP kompleksleri tarafından stabilize edilmiş %10'luk Y/S emülsiyonlarının viskozitesi (mPa.s).....	29
Şekil 11. Farklı WPI:LMP oranlarında 10 mM sodyum asetat tamponu (pH 4.5) içindeki ısıtılmamış WPI:LMP kompleksleri tarafından stabilize edilmiş %10'luk Y/S emülsiyonlarının integral transmisyonu.....	30
Şekil 12. Farklı WPI:DMP oranlarında 10 mM sodyum asetat tamponu (pH 4.5) içindeki ısıtılmış WPI:DMP kompleksleri tarafından stabilize edilmiş %10'luk Y/S emülsiyonlarının integral transmisyonu.....	31
Şekil 13. Farklı WPI:LMP oranlarında pH 4.5'te oluşturulmuş ısıtılmış (B,D) ve ısıtılmamış (A, C) WPI:LMP komplekslerinin frekans ve yayılımı (overtone 7). pH 4.5'te zamana karşı adsorbsiyonu, yine pH 4.5'te 10 mM Na-asetat tamponuyla durulama izlemiştir.....	32
Şekil 14. Isıtılmamış ve ısıtılmış WPI tarafından stabilize edilmiş Y/S emülsiyonlarının hazırlandıktan birkaç saat sonraki hali.....	33
Şekil 15. pH 4.5 te oluşturulmuş farklı oranlarda WPI:DMP komplekslerinin krema fazındaki protein konsantrasyonları.....	33
Şekil 16. pH 4.5'te hazırlanmış farklı oranlardaki WPI:DMP komplekslerinin krema fazındaki LMP konsantrasyonu.....	34
Şekil 17. WPI:DMP kompleksleri tarafından stabilize edilen Y/S emülsiyonlarının pH değişiklikleri altında kremalaşma stabilitesi. Fotoğraflar örneklerin hazırlanmasından 1 gün sonra çekilmiştir.....	35

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1. WPI konsantrasyon serileri ve UV-VIS spektrofotometre ile elde edilmiş absorbens değerleri.....	19
Tablo 2. DMP konsantrasyon serileri ve UV-VIS spektrofotometre tarafından belirlenmiş absorbens değerleri.....	21
Tablo 3. Farklı pH değerlerinde PDADMAC ve PAA ile titre edilmiş WPI'nin yük yoğunluk değerleri.....	23
Tablo 4. Farklı pH seviyelerinde PDADMAC ile titre edilmiş DMP'nin yük yoğunluğu değerleri.....	24
Tablo 5. Farklı oranlardaki ısıtılmış ve ısıtılmamış WPI:DMP komplekslerinin Z-average çapları (pH 4.5)	25

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

Y/S	: Su içinde yağ
WPI	: Whey Protein İzolatı
DMP	: Düşük Metoksilli Pektin
β-Lg	: β -lactoglobulin
pI	: İzoelektrik noktası
EEP	: Electrical Equivalence pH
Ma	: Moleküler ağırlık
SSA	: Sığır Serum Albumin
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
K-kompleksleri	: Karışım kompleksleri
T-kompleksleri	: Titrasyon kompleksleri
DLS	: Dinamik Işık Saçılımı
PolyDADMAC	: Poly(diallyldimethylammonium chloride)

TEŞEKKÜR

Öncelikle çalışmalarımın en baş destekçisi ve ana danışmanım Prof. Dr. Mehmet Şamil Kök'e her zaman yanımda olup, sonsuz bilgisini benimle paylaştığı için, ardından Ghent Üniversitesi'ndeki danışmanım Prof. Dr. Paul Van der Meeren'e bana Parçacık ve Arayüz Teknoloji Laboratuvarı'nda çalışma şansı verdiği, her konuda anlayışı ve desteği için teşekkür ve şükranlarımı sunuyorum. Böylesi engin bilgilere sahip iki profesörle çalışmanın ne büyük bir nimet olduğunun farkındayım ve mutluluğumu yaşıyorum.

Aynı zamanda bana her daim klavuzluk eden Wahyu Wijaya'ya da teşekkür etmek istiyorum. Kendisi hayatımda gördüğüm en sorumluluk sahibi ve en çalışkan insanlardan biri olmasının yanında, bana bilim ve çalışma etiği hakkında çok şey öğretmiştir.

Son olarak da sevgili aileme beni maddi manevi sonuna kadar destekleyip bu günlere getirdikleri için sonsuz teşekkür ve minneti borç bilirim. Sizi her şeyden çok seviyorum.

1. GİRİŞ

Epidemiyolojik kanıtlar ve hayvanlar üzerindeki çalışmalar, sentetik emülgatörlerin intestinal inflamasyon, metabolik sendrom, bağırsak florasının bozulması gibi çeşitli bağırsak rahatsızlıkları ile ilişkisini ortaya koymuştur. Özellikle karboksimetilselüloz ve polisorbata 80, intestinal mikrobiyotayı etkileyerek bağırsak inflamasyonunu tetiklemektedir (Naimi et al., 2021).

Tüketicinin gıda ürünlerinde doğal içerik talebi, sentetik içerikler yerine doğal alternatiflerinin geliştirilmesi konusunda çalışmaları hızlandırmıştır (Mohan et al., 2016). Bu talep sentetik içeriklerin doğal eşdeğerleri ile değiştirilerek karşılanmaya çalışılmaktadır. Bunun bir örneği de doğal biopolimerlerin emülgatör olarak uygulamalarıdır. Protein ve karbonhidrat gibi biopolimerler ya da bunların kompleksleri gıdalarda farklı mekanizmalara sahiptir. Polipeptitler emülgatör olarak kullanılırken, polisakkaritler ortamın viskozitesini arttırmada görev yapmaktadır. Polisakkarit ve polipeptitler bir arada her bir damlacığı sararak kümelenmeyi engellemekte ve ağırlaştırıcı ajan olarak görev yapmaktadır (Maphosa & Jideani, 2018) .

Biopolimerler doğal olarak gıda sistemlerinde kullanılmakta ve gıda yapı ve stabilitesinde de büyük bir rol oynamaktadır (Gao et al., 2017). Emülsiyon sistemlerinde çeşitli yollarla davranış göstermektedirler. Bunlar: sürekli fazın viskozitesini arttırarak damlacık hareketini yavaşlatmak (Kerkhofs et al., 2011), her bir yağ damlacığının etrafında bir film tabakası oluşturarak kümelenmeye engel olmak ve damlacık yoğunluğunu arttırmak ve bunu sulu fazına mümkün olduğunca yakınlaştırmak ve bu sayede kremalaşma oranını azaltmak. Tüm bu mekanizmalar emülsiyon sistemlerinin stabilitesini arttırmakta ve raf ömrünü uzatmaktadır. Bu kompleksler gıda sektöründe büyük yer bulmaktadır çünkü sürdürülebilirlik, non-toksisite, immun sistemde uyarı meydana getirmeme, kararlılık, besinsel değerler, biyoçözünürlük gibi çeşitli özelliklere sahiptir. GRAS statüsüne sahip olmaları ve ürüne “içeriği temiz” etiketi kazandırmaları da pozitif özelliklerinden biridir (Mohan S. et al., 2016)

Günümüzde, yenilebilir emülsiyonların gıda-sınıfı sürfaktan ya da emülsifiye edici olarak kullanılmasıyla ilgili sıkı düzenlemeler bulunmaktadır. Gıda polimerleri olarak da bilinen proteinlerin emülsifiye edici özellikleri ispatlanmıştır (Wilde et al., 2004). Polisakkarit ve protein komplekslerinin oluşma mekanizmalarını çeşitli açılardan inceleyen birçok çalışma mevcuttur: Termodinamik (de Kruif et al., 2004; Turgeon et al., 2007), oluşum kinetikleri (Schmitt & Turgeon, 2011), komplekslerin fonksiyonel özellikleri (Zhang, Zhong, & Vardhanabhuti, 2014; Norton, Espinosa, Watson, Spyropoulos, & Norton, 2015), enkapsülasyon uygulamaları (Weinbreck, Kruif, & Schrooyen, 2003a; Mellema, 2004; Zhang & Mutlangi, 2013) birçok çalışmada ele alınmıştır.

Geleneksel olarak whey, peynir üreticileri tarafından ticari değeri olmayan ya da çok az olan bir ürün olarak değerlendirilmiştir. Uzun bir süre hayvan beslenmesinde kullanılmış ya da doğrudan atılmıştır (Walzen, Dillard, & German, 2002). Whey proteini, bileşenlerinin bioaktif ve fonksiyonel özelliklerinin keşfinden sonra ve maliyetinin oldukça düşük olması sebebiyle ürün geliştirilmesinde kullanılan bir hammadde haline gelmiştir. (Marshall, 2004; Urista et al., 2011).

Fakat proteinler, doğası bakımından, özellikle pH'ya duyarlı yapısal değişimleri sebebiyle doğal emülgatör olarak kullanıldıklarında bir takım dezavantajlar doğurmaktadır. Bu kısıtlama, anyonik ya da katyonik polisakkaritler gibi ters olarak yüklenmiş polimerlerin kompleksasyonu ile birbirine eşit olmayan yüzey yüküne sahip protein-polisakkarit kompleksleri üretilerek aşılabilmektedir. Bu yüksek elektrik yüklü komplekslerin emülsiyon stabilizörleri olarak başarılı uygulamaları ispatlanmış durumdadır (Harnsilawat, Pongsawatmanit & McClemets, 2006).

Bu çalışmada, su içinde yağ emülsiyonları, yağ fazının, su içine dağıtılmış kompleks karışımıyla bir araya getirilmesiyle elde edilmiştir. Protein ve polisakkarit kompleksleri, protein ve polisakkarit dispersiyonların karıştırılmasıyla oluşturulmuş, ardından pH'ları 4.5'ye ayarlanmıştır. Isıl işlem uygulanmış kompleksler protein polisakkarit dispersiyon karışımlarının ısıtılmasıyla meydana getirilmiştir.

Bu çalışmada, ısıtılmış ve ısıtılmamış whey protein izolatı (WPI) ve düşük metoksilli pektin (DMP) kullanılarak emülsiyon stabilizasyonu gösterilmiştir. WPI yüksek saflıkta bir protein formudur, %97'si proteindir ve β -lactoglobulin tarafından domine edilmektedir. DMP, esterifikasyonu %50'den az olan anyonik bir polisakkarittir. Önceden oluşturulmuş ısıtılmış ve ısıtılmamış WPI-DMP kompleksleri tarafından stabilize edilmiş su içinde yağ emülsiyonları, Ultra-Turrax ve Sonifier kullanılarak hazırlanacaktır. Komplekslerin ve emülsiyonların, viskozite, mikroyapı, z-average çapı, D[4,3] gibi karakterizasyon analizleri yapılacaktır. Komplekslerin adsorbsiyonları QCM-D görüntüleme yöntemiyle simüle edilecektir. Sıcaklık ve pH'ın kompleks ve emülsiyon oluşumu üzerindeki etkileri analiz edilecektir.

Bu yüksek lisans tezi, “Giriş” bölümü dahil 5 bölümden oluşmaktadır. Bölüm 1 “Literatür Taraması” içermekte ve biopolimer elektrostatik kompleksasyonu, bu interaksiyonları etkileyen fizikokimyasal faktörler, emülsiyon oluşturma yöntemleri, bu komplekslerin gıda endüstrisinde uygulamaları ve Pickering stabilizasyon gibi konuları açıklamaktadır. İkinci bölüm olan “Materyal ve Metot” bu çalışmada kullanılan materyal ve metotların detaylı bir açıklamasıdır. Bölüm 3 “Sonuçlar ve Tartışma”, yapılan analizin sonuçlarını ve hakkındaki tartışmayı içerir. Bölüm 4 “Sonuçlar” çalışmanın sonuçları, elde edilenler ve gelecekteki çalışmalara yardımcı olabilecek yorumların bir özeti.

2. LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Biopolimerlerin Elektrostatik Kompleksasyonları

Biopolimer kompleksasyonları, eğer her bir polimerin zıt olarak yüklenmiş yan gruplarının arasında elektrostatik bir interaksiyon varsa gerçekleşir. İnteraksiyonun gücü, biopolimerlerin net zıt yüküne, şekline, büyüklüğüne, esnekliğine ve aynı zamanda yan zincir gruplarının reaktivitesine bağlıdır. Anyonik polisakkaritlerin net yükü, pozitif yüklü protein gruplarının bağlanmasıyla düşer ve birtakım doğrudan ve dolaylı değişikliklere yol açar. Bunlar: i) hidrofilik ve düşük çözünürlüklü bir son ürün, ii) proteinin izoelektrik noktasının daha düşük olması, iii) elektrostatik olmayan interaksiyonlardan dolayı yeni ürünün reolojik özelliklerinde değişimler şeklindedir (Benichou, Aserin & Garti, 2002).

Elektrostatik interaksiyonlar iki çeşit kompleksle sonuçlanabilir ve bunlar; çözünebilir kompleksler (eğer net yük yeterince yüksek ve sıfıra eşit değilse) ve çözünemeyen komplekslerdir (eğer net yük sıfıra eşitse) (Tolstoguzov, 1997; Xia & Dubin, 1994; Mattison, Brittain & Dubin, 1995; Ye, 2008). Protein-polisakkarit komplekslerinin çözünmeleri aynı zamanda, hidrofobik interaksiyonlar, Van der Waals interaksiyonları ve hidrojen bağlanması gibi elektrostatik olmayan interaksiyonlar tarafından da etkilenmektedir (Stainsby, 1980; Antonov et al., 1996).

Diğer faktörler ise komplekslerin oluşumuyla ilgilidir, örneğin protein-polisakkarit oranı, pH, protein ve polisakkaritin yük yoğunluğu (charge density), süre ve sıcaklıktır. (Ye, 2008).

2.2 Biopolimer Elektrostatik İnteraksiyonlarını Etkileyen Fizikokimyasal Faktörler

Protein-polisakkarit komplekslerinin oluşumu; pH, iyonik güç, biopolimerlerin yük yoğunluğu, biopolimer molekül ağırlığı, biopolimer oranı ve konsantrasyonu gibi bir takım önemli faktörler tarafından gerçekleşmektedir. Bazı

diğer fiziksel ve mekanik faktörler de elektrostatik interaksionları etkilemektedir (Xia & Dubin, 1994).

2.2.1 pH

pH, biopolimerlerin fonksiyonel yan gruplarının iyonizasyon derecesini etkilediği için komplekslerin oluşumunu etkiler. Bu sebeple, anyonik bir protein-polisakkarit kompleksinin maksimum koaservasyon verimine, net toplam yük sıfıra eşit olduğunda ulaşılabilir (Xia & Dubin, 1994).

Proteinin pH ve pI'sı arasındaki ilişki ile ilgili çeşitli durumlar mevcuttur: i) eğer ortamın pH'sı proteinin izoelektrik noktasından düşükse, pozitif yüklü protein negatif yüklü polisakkaritle kararlı bir elektrostatik kompleks oluşturacaktır; ii) eğer ortamın pH'sı proteinin pI'sından yüksek ise, negatif yüklü protein pozitif yüklü polisakkaritle bir kompleks oluşturmaktadır (Xia & Dubin, 1994; Dickinson, 2008; Turgeon, Schmitt & Sanchez, 2007); iii) eğer ortamın pH'sı proteinin izoelektrik noktasına neredeyse eşitse, proteinin o pH'daki yüzey yükü sıfır olduğu için güçlü elektrostatik çekimler meydana gelmektedir; iv) pH'nın proteinin pI'sından yüksek ve yüksek iyonik güç (yüksek konsantrasyon) olduğu durumda, benzer yüklerle yüklenmiş biopolimerler birbirini itmekte ve yüzey yük itmesi sebebiyle termodinamik bir uyumsuzlığa sebep olmakta; bu da faz ayrılması olarak gözlemlenmektedir. Böylelikle kararsız bir sistem meydana gelmektedir (Grinberg & Tolstoguzov, 1997).

2.2.2 İyonik Güç

İyonik güç kompleks koaservasyonu üzerinde büyük etkisi olan önemli bir faktördür. Biopolimer solüsyonunda bulunan makroiyonların sayısı, kompleksin yükünü nötürleyebileceğinden, kompleks koaservasyonunu da etkilemektedir. İyonik gücün etkilerinin gözlenebileceği iki durum mevcuttur: i) eğer iyonik güç düşükse, elektrostatik kompleksasyon etkilenmeyecektir, ii) eğer yeterince yüksekse, biopolimerler arasındaki elektrostatik interaksionları azalttığı gibi biopolimerlerin net yükünü de düşürecektir (Xia & Dubin, 1994).

2.2.3 Biopolimerlerin Yük Yoğunluğu

Molekül kütle birim başına biopolimerin üzerindeki yük sayısı biopolimer yük yoğunluğu olarak tanımlanır. Koaservasyon yalnızca belli bir kritik yük yoğunluğunun üzerinde gözlenmektedir. Bu yüzden bu faktör koaservasyon fenomeni açısından önemlidir (Ghosh & Bandyopadhyay, 2012). SSA (pI= 3.9) ve anyonik sentetik bir polimer olan poli(vinil alkol)ün, proteinin pI'sının üstündeki pH değerlerinde koaservat oluşturduğu bildirilmiştir (Park, Muhoberac, Dubin & Xia, 1992). Aynı durum albüminin anyonik bir polisakkaritle proteinin pI'sının üzerindeki pH'larda kompleksasyon oluşturduğu diğer çalışmalarda da gözlenmiştir (Noguchi, 1956; Noguchi, 1959). Kompleks koaservasyonu, proteinin lokal pozitif yüklü bölümlerinin varlığından dolayı iki polimerin de net yük taşıdığı durumda görülmüştür. Çünkü proteinin bu bölümleri negatif olarak yüklenmiş proteinler ve polianyonlar arasındaki itmenin üstesinden gelmektedir.

Genellikle koaservasyon daha düşük yük yoğunluklarında (karboksilik yan gruplar) gözlenirken, daha yüksek yük yoğunluğu (sülfat yan grupları), çökmeye (presipitasyon) sonuçlanmaktadır (Pathak, Priyadarshini, Rawat & Bohidar, 2017). Düşük metoksilli pektin, daha fazla yüklü karboksilik gruplara sahip olmasından dolayı, β -Lactoglobuline yüksek metoksilli pektinden daha güçlü bir şekilde bağlanmaktadır (Chodanowski & Stoll, 2001). Başka bir çalışma ise ι -karragenanın daha fazla sülfat gruplarına sahip olması sebebiyle, kazeinle κ -carrageenandan daha güçlü bir kompleks oluşturduğunu göstermiştir (Girard, Turgeon & Gauthier, 2002).

2.2.4 Biopolimer Molekül Ağırlığı

Polimerin moleküler ağırlığı arttıkça karışımın kombinasyonel entropisi düştüğü için, biopolimer uyumluluğu azalır. Biopolimer moleküler ağırlığı (M_w) arttıkça koaservasyonda da artış meydana gelir (Overbeek & Voorn, 1957). Çünkü polisakkaritin moleküler ağırlığı arttıkça, polisakkaritle interaksyona giren proteinlerin de sayısı artacaktır (Schmitt et al., 2009). Anyonik surfaktan miselleri ve polyDADMAC arasında gerçekleşen bir koaservasyon çalışmasında, misellerin moleküler ağırlığının koaservasyon verimi ile doğru orantılı olduğu gösterilmiştir. Çünkü yük yoğunluğu için gereksinim daha az olmaktadır (Wang et al., 2000).

2.2.5 Biopolimer Oranı ve Konsantrasyonu

Maksimum koaservasyon verimi elde etmek için belirli bir protein-polisakkarit oranı gerekmektedir. Eğer biopolimerlerden biri daha fazlaysa, nötralize edilmemiş yükler ortaya çıkacak, bu yüzden de çözünebilir kompleksler elde edilecektir. Eğer solüsyon çok yoğun ise, yüksek yoğunluğun yüksek itme etkisi meydana getirmesi sebebiyle koaservasyon gerçekleşemez. Eğer biopolimerlerin konsantrasyonları çok yüksekse, makromoleküller arasında bir yarış meydana gelecek ve termodinamik uyumsuzluk ortaya çıkacaktır, bu da sistemde faz ayrılmasıyla sonuçlanmaktadır (Tolstoguzov, 1986; Tolstoguzov, 1997).

2.2.6 Fiziksel ve Mekanik Faktörler

Yukarıda açıklanan kimsayal faktörlerin yanında; sıcaklık, kesme oranı (shearing rate), süre, basınç gibi bazı mekanik ve fiziksel faktörler de protein polisakkarit komplekslerinin oluşumunu etkilemektedir (Ghosh & Bandyopadhyay, 2012).

Sıcaklık

Sıcaklık biopolimer komplekslerinin oluşumunu çeşitli şekillerde etkiler. Sıcaklık düşerse, Flory-Hugging etkileşimsel parametrelerinin yoğunluğu artar, bu da biopolimer interaksiyonları üzerinde pozitif bir etkiye sahiptir. Sıcaklık, coulombic (elektiriksel) olmayan interaksiyonları da etkiler. Düşük sıcaklık hidrojen bağ oluşumunu sağlarken, yüksek sıcaklık ise hidrofobik interaksiyonlar ve kovalent bağları arttırmaktadır (Kelly et al., 1994).

Kesme oranı ve zaman

Jelatin ve akasya sakızının mikrokapsül oluşturması için kompleks koaservasyonu üzerine yapılan bir çalışmada kayma hızının etkileri incelenmiştir (Tirkkonen, Turakka & Paronen, 1994). Çalışmada, parçacıkların ortalama çapının kayma hızıyla orantılı olduğunu gözlenmiştir. Akasya sakızı ve albümin kullanılarak mikro parçacıkların üretildiği başka bir çalışmada, kayma hızının etkisi gözlenmemiştir (Daniels & Mittermaier, 1995). Sanchez (1997) β -lactoglobulin (β -

Lg) ve akasya sakızının kompleks koaservasyonu üzerine çalışmıştır. Çalışma, kesme zamanı kontrol edilerek farklı sayı ve boyutta koaservat elde edilebileceğini göstermiştir. Kısa kesme zamanı (1-5 s) birkaç küçük koaservatla sonuçlanırken, uzun (20-60 s) kesme zamanı daha büyük ve sayıca daha fazla koaservat vermiştir. Fakat kayma zamanının kompleks koaservasyon üzerindeki etkilerini belirlemek ve anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Basınç

Biopolimerlerin kompleks koaservasyonu üzerine basıncın etkisiyle ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır. Biopolimer solüsyonlarıyla ilgili iki tür yüksek basınçlı uygulama mevcuttur. Bunlar: i) yüksek hidrostatik basınç uygulaması ii) türbülanslı yüksek basınç, kavitasyon ve kayma gerilimini kombine eden mikrosivileştirme çalışmasıdır (Chen et al., 1989).

Dickinson and Pawlowsky (1996), sığır serum albümini (SSA)-dekstran sülfat (DS) kombinasyonu üzerinde hidrostatik yüksek basıncın etkilerini, n-tetradecane/su emülsiyonunda çalışmıştır. 300 MPa uygulanan SSA içeren dispersiyonun kesme viskozitesinde hiçbir etki gözlenmezken, 500 MPa uygulanan solüsyonlar artan DS konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak kesme viskozitesinde bir artış göstermiştir (kesme viskozitesi: 45 mPa.s SSA solüsyonuna 0.24 wt% DS eklenmiş, kesme viskozitesi: 100 mPa.s 0.4wt% DS eklenmiştir), (Dickinson and Pawlowsky, 1996). Meydana gelen akışa karşı direniş SSA denatürasyonunun bir sonucu olarak değerlendirilmiş, protein ve polisakkaritler arasında güçlü bir elektrostatik interaksiyonla sonuçlanmıştır. Emülsiyonların artan kompleks viskoelastik katsayısı G^* (sürekli fazın viskoelastisitesinin daha yüksek oluşu) bu sonucu desteklemektedir.

Galazka ve Ledward, SSA'nın, DS varlığında 800 MPa'da yüksek basınç uygulamasına daha az duyarlı olduğu, bunun da güçlü protein-polisakkarit kompleks oluşumu anlamına geldiğini göstermiştir (Galazka & Ledward, 1996).

2.3 Yenilebilir Emülsiyon Teknolojisi: Emülsiyon Oluşturma Metodu

Günümüzde çeşitli emülsiyon hazırlama prosedürleri mevcuttur. Bunlardan bazıları borudan akış (düşük agitasyon enerjisi), statik karıştırıcılar ve genel maksatlı karıştırıcılar (düşük enerjiden yükseğe), Ultraturrax (orta) gibi yüksek hızlı karıştırıcılar, kolloit değirmen ve yüksek basınçlı homojenizatörler (yüksek enerji): ultrasound jeneratörler (ortadan yükseğe).

Hazırlama metotları aynı zamanda sürekliliğe bağlı olarak sınıflandırılabilir: sürekli ya da kesikli (yığın) sistemler. Boru akışı ve statik karıştırıcılar sürekli, karıştırıcılar (stirrer) ve Ultraturrax sürekli ve kesikli (yığın) sistemler, kolloit değirmen ve yüksek basınç homojenizatörleri sürekli, ultrasound sürekli ve kesikli (yığın) sistemlerdir (Tadros, 2013).

Ultrasound'un ilk uygulamalarından biri emülsifikasyondur (Abismail et al., 1999). Ultrasound'un etkisi kavitasyon (kabarcık) oluşumu ile açıklanmıştır (Jayasooriya et al., 2004). Kavitasyon bir sıvının içinde buhar kavitelerinin oluşmasıdır. Bu kabarcıklar, sıvının bulunduğu sıcaklığındaki buhar basıncının ötesindeki basınç değerlerine düşürülmesi sonucu oluşmaktadır. Bu basınç velosite (hız) yükseldiğinde düşürülür. Bu kavitasyonlar oluşuktan sonra sönmekte, yüksek miktarda enerji salınımı yapmakta ve solüsyonda şok dalgaları oluşturmaktadır (Jafari, He & Bhandari, 2006). Ultrasound emülsifikasyonu iki adımda gerçekleşir: i) arayüz dalgaları ve kararsızlık, dağılan faz damlacıklarının sürekli fazın içine dağılmasıyla (patlamasıyla) sonuçlanan, ii) damlacıkların kavitasyon yoluyla arayüze yakın bir yerde dağılması şeklinde olan (Canselier et al., 2002).

2.4 Protein-Polisakkarit Komplekslerinin Gıda Endüstrisindeki Uygulamaları

Biopolimer kompleksleri gıda, kozmetik, ilaç (eczacılık), biyoteknoloji gibi çeşitli endüstrilerde kullanılmaktadır (Benichou, Aserin, & Garti, 2002). Bu komplekslerin en yaygın uygulamaları:

Mikroenkapsülasyon/Nanoenkapsülasyon

Protein polisakkarit kompleksleri enkapsüle edilmesi istenen ürünü içeren emülsiyon damlacıklarının etrafında bir film oluşturma özelliğine sahiptir (Benichou, Aserin, & Garti, 2002).

Yeni bir bileşen olarak gıda formülasyonlarında doğrudan ya da gıdaların korunması ve paketlenmesi için biyomateryal olarak kullanım

Protein-polisakkarit kompleksleri ürünlerin tekstürünü ve yapısını, hidrasyon, jelasyon, agregasyon ya da arayüz stabilizasyonu gibi birtakım kendine has özellikler yoluyla etkileyebilir ya da değiştirebilir. Bu polimerlerin patentli gıda uygulamalarına bazı örnekler şunlardır: Et ikamesi olarak pektin ve aljinatlarla kazein, süt tozu, soya ve maya proteinleri (Soucie et al., 1988); yağ ikamesi olarak karboksimetil selülozla yumurta, soya, whey proteinleri, kazein (Chen & Soucie, 1985); et ikamesi olarak ksantan sakızı ile whey proteinleri (Tolstoguzov et al., 1974); katı yağ ikamesi olarak akasya sakızı ile jelatin (Zolper, 1995); katı yağ ikamesi olarak tohum proteinleri ile nişasta (Krochta & De Mulder-Johnston, 1997); krema ikamesi olarak aljinat, pektin, jellan ile whey proteini, soya proteini, kazein, albümin (McArdle, 1997); koruyucu olarak guar, akasya sakızı, pektin ile arpa ve buğday proteini şeklindedir (Soucie & Chen, 1986).

Makromoleküllerin saflaştırılması

Kompleks koaservasyon, basit ve ucuz bir yöntem olması sebebiyle biyopolimerlerin saflaştırılması için sıkça kullanılmaktadır. Bu metodun amacı ve prensibi, prosesi etkileyen pI ve iyonik güç gibi parametreleri kontrol ederek maksimum kompleks koaservasyonu elde etmektir (Benichou, Aserin, & Garti, 2002).

2.5 Protein-Polisakkarit Kompleksleri Tarafından Stabilize Edilmiş Y/S Emülsiyonları: Pickering Stabilizasyonu

Pickering emülsiyonlar, yağ-su arayüzünde sterik ve elektrostatik mekanizma ile kümeleşmeye karşı koruma sağlayan sıkı bir katman olarak adsorbe edilen dağılmış kompleks parçacıklarını içeren emülsiyonlardır. Bu mekanizma, yağ-su arayüzündeki gerilimi düşürerek emülsiyonları stabilize eden sürfaktanlardan farklı seyretmektedir. Eğer arayüz katmanının parçacıkları iyi bir sıkıştırma (packing) yeteneğine sahip ve bunları arayüzden ayırmak zor ise, bu pickering stabilizasyon tarafından sağlanan koruma daha güçlü olacaktır. Eğer adsorbe edilmiş parçacıklar daha çok sürekli faz ile temas halinde ise, bu aynı zamanda damlacıkların dış yüzeyinde oldukları anlamına gelir ki bu durumda sterik bariyer daha etkili olacaktır. Düzgün bir pickering stabilizasyonu için; adsorbe edilmiş partiküllerin boyu, emülsiyonun damlacık boyutundan en az bir büyüklük düzeyinden (order of magnitude) küçük olmalıdır (Dickinson, 2012; Hunter et al., 2008).

Pickering stabilizasyon değişik mekanizmalar yoluyla gerçekleşebilir: i) komşu emülsiyon damlacıklarını ayıran iki yoğun istiflenmiş tek katmanlar/tabaka şeklindeki, ki en ideali budur ii) bir tane yoğun biçimde istiflenmiş tek katman şeklinde iii) veya kümelenmiş parçacıkların oluşturduğu düzensiz düşük yoğunluklu ağ tabakası şeklinde. İlk ikisi sterik bir bariyer sağlarlarken, üçüncüsü parçacıklar arası kuvvetleri teşvik ederek düzensiz bir yapıda bir arada durmaktadır (Dickinson, 2012).

Pickering parçacıklar yağ-su arayüzünden ayrılmak için yüksek miktarda serbest enerjiye ihtiyaç duymaktadırlar; bu yüzden parçacıklar emülsiyon damlacıkları çevresinde sağlam bir arayüz filmi oluşturmaktadır (Tambe & Sharma, 1994). Arayüzde parçacık adsorbsiyonu güçlüdür ve dolayısıyla bu yüksek enerji sebebiyle geri dönüşümsüzdür. Bu da sürfaktanlarla stabilize edilmiş emülsiyonlara göre olağanüstü derecede kararlı emülsiyonlar meydana getirmektedir. Sürfaktan molekülleri, sıvı arayüzleri ve sürekli faz arasında seri dinamik bir şekilde dengede durmaktadır ve ayrılma enerjisi oldukça düşüktür. Sürfaktanlar hidrofilik ve hidrofobik bölümlerden oluşan amfifil moleküllerdir, yağ ve su arayüzünde durarak yüzey gerilimini azaltırlar. Sıvı arayüzünde spontane bir adsorbsiyon gösterirler ve

dinamik bir dengede dururlar. Damlacık sarsıntıya uğradığı zaman ekstra adsorbe olmuş sürfaktan sürekli faza tekrar geçiş yapar.

Bu sebeple, parçacıklar kullanılarak stabilize edilmiş emülsiyonlar, sürfaktanlar kullanılarak stabilize edilmiş olanlara göre daha kararlı sayılmaktadır (Binks & Lumsdon, 1999; Aveyard, Binks & Clint, 2003).

Yağ içinde su pickering emülsiyonları, suyun hacmi arttırılarak kolaylıkla su içinde yağ emülsiyonlarına dönüştürülebilmektedir. Bu da sürfaktanlarla stabilize edilen emülsiyonlardan daha uyumlu olduklarını göstermektedir. Eğer emülsiyon dengeli ıslatılabilirlik noktasına yakınsa, arayüzdeki etkileşim açısı 90° ise, bu emülsiyonlar en kararlılarıdır ve sürfaktanla stabilize edilmiş emülsiyonlar için ıslatılabilirlik söz konusu olduğunda bu durum tam tersidir (Hunter et al., 2008).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Minimal derecede ısıtılmış işlem uygulanmış, β -laktoglobulinde (yaklaşık %85 total protein) zenginleştirilmiş whey protein izolatı (WPI, %92,6 protein oranı), Davisco Foods International'dan temin edilmiştir (Le Sueur, MN, ABD). DE (esterleşme derecesi) %33-38 arasında olan Unipektine OB700 – düşük metoksilli pektin, Cargill R&D Vilvoorde, Belçika'dan temin edilmiştir. Üreticinin belirttiği üzere DMP'e %5 sukroz eklenmiştir. Sodyum azid, sodyum klorid ve HCl Sigma Aldrich ABD'den temin edilmiştir. Sodyum asetat trihidrat ve NaOH VWR Chemicals, ABD'den, rafine Ayçiçek yağı ise yerli bir süpermarketten satın alınmıştır. Çalışma boyunca Milli-Q suyu kullanılmıştır. Tüm materyaller daha ileri bir saflaştırma ya da modifikasyon olmadan kullanılmış, tüm örnekler ağırlık bazında (g/g) formüle ve rapor edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Elektriksel Yük (Charge) Titrasyonu

WPI'nın yüzey yükü: pH 3.0-7.0 arasında olan WPI çözeltisinin yüzey yük yoğunluğu polielektrolit solüsyonu ile belirlenmiştir, örneğin PAA (negatif olarak yüklenmiş polielektrolit, MA= 240.000 g/mol, %25 kons.) ve PDADMAC (pozitif olarak yüklenmiş elektrolit MA = 240.000 g/mol, % 25 kons.) Kısaca, %0.5 WPI 10 mM sodyum asetatın 50 mL'sinde çözündürülmüş ve 10 mM sodyum asetat tampon çözeltisindeki %0.5'lik PAA ya da PDADMAC ile titre edilmiştir. PAA'nın yüzey yük yoğunluğu PDADMAC titrasyonu ile belirlenmiştir; PDADMAC'ın yüzey yük yoğunluğu 6.2 meq/g olarak bilinmektedir (Christensena et al., 2009).

DMP'nin yüzey yükü: DMP'nin (50 mL 10 mM sodyum asetat tamponunda %0.5'lik) pH 4.0, 4.5 ve 5.0'da PDADMAC titrasyonu ile belirlenmiştir.

Yüzey Yük Yoğunluğu Formülü

PAA Yük Yoğunluğu (pH 3.0, 4.0, 4.5)

$$\sigma_{PAA} = \sigma_{PDADMAC} \times V_{PDADMAC} \times C_{PDADMAC} \times \rho_{PDADMAC}$$

WPI Yük Yoğunluğu (pH 3.0, 4.0, 4.5)

$$\sigma_{WPI} = [\sigma_{PAA} / V_{WPI} \times V_{PAA}] / M_{WPI} \times V_{WPI} = meq/g \text{ bipro}$$

WPI Yük Yoğunluğu (pH 5.0, 6.0, 7.0)

$$\sigma_{WPI} = [\sigma_{PDADMAC} \times V_{PDADMAC} \times M_{PDADMAC} \times 1.04] / M_{WPI} \times V_{WPI}$$

DMP Yük Yoğunluğu (pH 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.0)

$$\sigma_{LMP} = [\sigma_{PDADMAC} \times V_{PDADMAC} \times M_{PDADMAC} \times \rho_{PDADMAC}] / M_{LMP} \times V_{LMP}$$

Birimlerin açılımları:

σ_{PAA}	PAA'nın yük yoğunluğu (meq/g),
$\sigma_{PDADMAC}$	PDADMAC'ın yük yoğunluğu (meq/g),
σ_{WPI}	WPI'nin yük yoğunluğu (meq/g),
σ_{DMP}	DMP'nin yük yoğunluğu (meq/g)
$V_{PDADMAC}$	Titre edilen PDADMAC'ın ortalama hacmi (ml)
V_{WPI}	WPI'nin hacmi (ml)
V_{PAA}	Titre edilen PAA'nın hacmi (ml)
V_{DMP}	DMP'nin hacmi (ml)
$\rho_{PDADMAC}$	PDADMAC'ın yoğunluğu (1.4 g/ml)
$C_{PDADMAC}$	PDADMAC'ın konsantrasyonu (0.5%)(mM)
M_{WPI}	WPI'nin konsantrasyonu (0.5%) (mM)
$M_{PDADMAC}$	PDADMAC'ın konsantrasyonu (mM)
M_{DMP}	DMP'nin konsantrasyonu (mM)

3.2.2 Stok Çözeltilerin Hazırlanması

WPI ve DMP tozları ayrı beherlerde, sırasıyla %1 ve %2 oranlarında, 0.04% sodyum azid içeren 10 mM sodyum asetat trihidrat çözeltisine tartılmıştır. Bu dispersiyonlar daha sonra, tam bir çözünme elde edilene kadar oda sıcaklığında (22-25 °C) sürekli olarak karıştırılmıştır. Biopolimerlerin tam olarak hidrasyonunun sağlanması için solüsyonlar 5 °C’de bir gece bekletilmiştir.

3.2.3 WPI:DMP Komplekslerinin Hazırlanması

WPI ve DMP stok solüsyonları seyreltilmiş ve, 2:0,2:1,1:1,1:2 (WPI’nın konsantrasyonu sabit 0.5%) gibi çeşitli oranlar elde etmek için sulu fazda (20Ml) karıştırılmıştır. Ardından, solüsyonların pH ‘ları, 1 ve 0.1 N hidroklorik asitle 4.5’e ayarlanmıştır. Isıl işlem uygulanmış WPI:DMP kompleksleriyle kıyaslama için, yine aynı oranlar ve 4.5 pH’daki WPI:DMP kompleksleri 15 dakika boyunca 80 °C’de ısıtılmış ve daha ileriki analizler için hızla soğuk banyoya (10-15 °C) konulmuştur.

3.2.4 Emülsiyonların Hazırlanması

Y/S emülsiyonları, %10 konsantrasyonda ay çiçeği yağı ve 4.5 pH’da, farklı oranlarda (2:1, 1:1, 1:2, 2:0) hazırlanmış kolloidal kompleks içeren %90 sıvı fazın homojenizasyonu ile oluşturulmuştur. Tüm emülsiyonlar, S25KV-25G rotoru ile donatılmış UltraTurrax IKA® T25 Basic (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Germany) kullanılarak 30 s boyunca 13500 rpm’de homojenize edilmiştir. Buna ek olarak emülsiyonlar, 6.5 mm çapında sonifier uç kullanılarak, 30 sn boyunca “output:3” ve “duty cycle: %50” parametrelerinde Sonifier 250 (Branson Ultrasonics, US) ile muamele edilmiştir. Sonifikasyondan sonra Z-average sonuçları göstermiştir ki, sonifikasyonun partikül boyutunu önemli ölçüde etkilememektedir. Elde edilen son emülsiyonlar bir sonraki gün yapılacak analizler için 5 °C’de dolapta bekletilmiştir.

3.2.5 Kompleks Parçacıklarının Karakterizasyonu

3.2.5.1 Z-Average Çapı

Partikül boyut dağılımı için ölçümler, 15 mW He-He lazer, ve K7032 multi 8-bit korelatör ekipmanlı (Malvern Instruments, Malvern, UK) Spectrometer 100 SM (Malvern Instruments, Malvern, UK) ile foton korelasyon spektroskopisi (PCS) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler 25 ° C’de 150 ° dağılma açısında, 50 ya da 100 µm açıklık ile yapılmıştır. Z-Average ortalama çapı kümülan analizi ile elde edilmiştir.

3.2.5.2 ζ-Potansiyeli

pH 4.5’te, 10mM asetat tamponunda hazırlanan kompleks dispersiyonlarının ζ-potansiyeli, 25 °C’de elektroforetik ışık dağılması yoluyla Zetasizer IIC (Malvern Instruments, Malvern, UK) kullanılarak ölçülmüştür. Ortalama ζ-potansiyeli değerleri direkt olarak cihazın programında hesaplanmıştır.

3.2.5.3 QCM-D Deneyi

Hidrofobik altın yüzeylerin hazırlanması

4.95 Hz temel frekanslı altın sensörler kullanılmıştır. Altın sensörler ‘‘Piranha’’ solüsyonu (5:1:1 oranla Milli-Q suyu, %25 amonyak ve %30 hidrojen peroksit) ile 75 °C’de 10 dakika boyunca temizlenmiş ve sıcak Milli-Q suyu ile durulanmıştır. Sensörler sprey hava (air spray) ile kurulanmış ve UV/ozon haznesinde 15 dakika boyunca bekletilmiştir. Sensörlerin temizlenmesi ve kurutulmasından sonra, altın yüzey, Lebec et al. (2013) and Mivehi, Bordes, and Holmberg (2013) raporuna uygun olarak kendiliğinden oluşan tek katman (SAM: self assembled monolayer) uygulanarak hidrofobik hale getirilmiştir. Kısaca, temizlenen altın yüzey etanol içinde 2 mM heksadekanetiol solüsyonu içinde bir gece bekletilmiş ve ardından adsorbe edilmemiş heksadekanetiolün uzaklaştırılması için etanolla durulanmıştır. Modifiye edilen sensör yüzeyinin temas açısı ölçülmüştür ($\theta \approx 89^\circ$).

WPI:LMP komplekslerinin adsorbsiyonu

2:0, 2:1, 1:1, 1:2 (sabit protein konsantrasyonu %0.5) oranlarında WPI:DMP kompleks dispersiyonları 4.5 pH'da 10 mM asetat tamponunda hazırlanmıştır. SAM hidrofobik yüzeylerindeki kompleks adsorbsiyonları peristaltik pompa ve ısı kontrollü ölçüm haznesi bulunan QCM-D sistemi (Q-Sense E4 system, Q-Sense, Sweden) ile gerçekleştirilmiştir. Her bir QCM-D deneyi, WPI:DMP dispersiyonları eklenmeden önce bir sinyal referans hattı elde etmek için, pH 4.5 10 mM sodyum asetat tamponu ile ön dengeleme yapılarak başlamıştır. Daha sonra test solüsyonları, akış oranı 0.1ml/dk olacak şekilde SAM hidrofobik QCM-D sensörlerine besleme yapılmıştır. Tüm deneyler 22 ± 2 °C'de gerçekleştirilmiştir. Deneyler, kararlı frekans ve dağılım sinyalleri elde edildiğinde durdurulmuştur. Tam olarak ya da hiç adsorbe edilmemiş WPI:DMP kompleksleri 10mM sodyum asetat tamponu ile aynı pH'da durulanmıştır.

3.2.6 Emülsiyonların Karakterizasyonu

3.2.6.1 Mikroyapı

Örneklerin mikroyapıları, optik mikroskopi teknikleri ile çalışılmıştır. Optik mikroskopi, Leica DM2500 mikroskop (Leica Microsystems, Belgium) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.2 Damlacık Boyut Dağılımı

Emülsiyonların hacim ağırlıklı ortalama damlacık boyutları ($D[4,3]$) ıslak örnek dispersiyon ünitesi (Malvern Hydro MV, UK) ekipmanlı MasterSizer 3000 (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK) ile belirlenmiştir. Örnek bölmesinde, örnekler mQ suyu içinde 1500 rpmde, %2-6% bir kararma(obscuration) elde edilene kadar dispers edilmiştir. Arkaplan ve örnek integrasyon zamanları sırayla 20 ve 10 saniye uygulanmıştır. Optik özellikler, normal cihaz hesaplama hassasiyeti ve genel amaçlı krüesel parçacık şekli ile

refraktif indeks 1.47 (ay çiçeği yağı), 1.330 (dispersant su) ve adsorpsiyon indeksi 0.01 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, partikül boyut dağılımı ve hacim ağırlıklı damlacık boyutunu (D4,3) elde etmek için Mastersizer Version 5.54 software (Malvern, UK) ile hesaplanmıştır.

3.2.6.3 ζ -Potansiyel

4.5 pH'ta oluşturulmuş kompleks dispersiyonları ve emülsiyonlarının ζ -potansiyeli, 25 °C'de Zetasizer IIC (Malvern Instruments, Malvern, UK) kullanılarak elektroforetik ışık dağılımı yoluyla ölçülmüştür. İdeal ölçüm yoğunluğuna ulaşmak için Y/S örnekleri 20 kez seyreltilmiştir. Ortalama ζ -potansiyeli değerleri cihazın yazılımı tarafından direkt olarak hesaplanmıştır.

3.2.6.4 Viskozite

Y/S dispersiyon ve emülsiyonlarının viskozitesi programlanabilir LV-DV-II Viskometre (Brookfield, USA) ile ölçülmüştür. Ölçüme başlamadan önce, uygun ölçüm probu (spindle) ve hız, deneme yanılma yöntemiyle belirlenmiştir. Viskometre kadranı (tork %) %10 ile 100 arasındadır. Eğer okunan tork %10'un altındaysa, daha yüksek bir hız seçilmiş ve bu şekilde deneme yanılmaya devam edilmiştir. Dispersiyon ve seyreltik emülsiyonlar için, rotasyonel hız 180-200 rpm ile ölçüm probu (spindle) SC4-18 uygulanmıştır. Emülsiyonlar (8mL) örnek haznesine aktarılmış ve iş mili (spindle) silindirik örneğin merkezine batırılmıştır. Ölçümler 22 °C'de 6 tekrar olarak gerçekleştirilmiştir. Veriler cihazın ekranından alınmıştır. Sonuçlar mPa.s olarak raporlanmıştır. Cihazdan elde edilen dinamik viskozite verileri (birim centipose) viskoziteyle doğru orantılıdır.

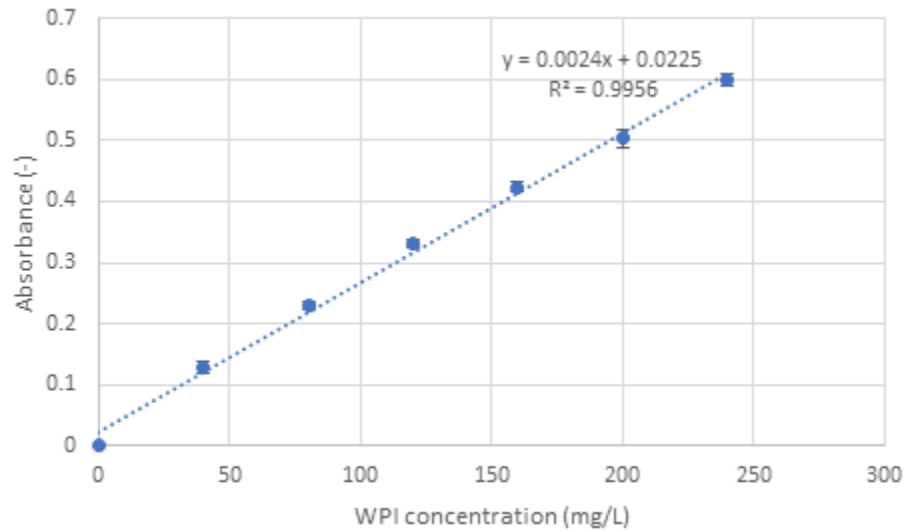
3.2.6.5 Yüzey Protein Yükü

Yağ yüzeyine adsorbe olmuş protein miktarını hesaplamak için, ısıl işlem görmüş ve görmemiş emülsiyonlar 5°C, 40000 rpm'de 105 dakika boyunca SW 40 Ti rotor kullanılarak Beckmann L7-55 ultrasantrifüj ile muamele edilmiştir. İğne uçlu özel bir şırınga serum katmanını ayırmak için kullanılmıştır. Bu yüzden, kremi katmandan hiçbir parça alınmamıştır. Serum, basitleştirilmiş bir Lowry

metodu olan Schacterle and Pollack (1973) metodu kullanılarak protein analizi için kullanılmıştır. Serum katmanının protein konsantrasyonu; proteinin konsantrasyon serisinden (0-240 mg/L) elde edilen regresyon ($y = 0.0024x + 0.0177$, $R^2 = 0.9969$) ile tayin edilmiştir.

Tablo 1. WPI konsantrasyon serileri ve UV-VIS spektrofotometre ile elde edilmiş absorbens değerleri

WPI konsantrasyonu (mg/L)	Absorbans			Ortalama $\pm$ SD
	I	II	III	
0	0	0	0	0
40	0.118	0.137	0.128	0.128 $\pm$ 0.01
80	0.223	0.237	0.228	0.229 $\pm$ 0.007
120	0.324	0.334	0.334	0.331 $\pm$ 0.006
160	0.415	0.427	0.429	0.424 $\pm$ 0.008
200	0.501	0.519	0.49	0.503 $\pm$ 0.015
240	0.591	0.61	0.594	0.598 $\pm$ 0.01



Şekil 1. WPI konsantrasyon serisinin standart eğrisi

Standart solüsyonda ihtiyaç duyulan WPI miktarını hesaplariken, WPI içindeki protein içeriği için bir düzeltme yapılmalıdır. Kısacası, standart eğrinin aralığına uyması için 0.4 mL ayrılmış serum katmanı, 4.5 pH'daki 10 mL sodyum asetat tamponu içinde seyreltilmiştir. Ardından 1 mL örnek 1 mL alkalin Cu-ayracı ile bir test tüpünde karıştırılmıştır. Bu aşamayı vorteks ile karıştırma ve sonrasında

solüsyonları 10 dakika dinlendirme takip etmiştir. Ardından solüsyon bir su banyosunun içinde 55°C’de 5 dakika ısıtılmış ve hemen arkasından tüpler buzlu su içine koyulmuştur. Son olarak, solüsyonların absorbansları kör çözeltiliye karşı 650 nm’de bir spektrofotometre (VWR, UV-1600 PC) ile okunmuştur. Adsorbe edilen protein miktarı, serum katmanındaki protein ve kullanılan total proteinin arasındaki farktan hesaplanmıştır.

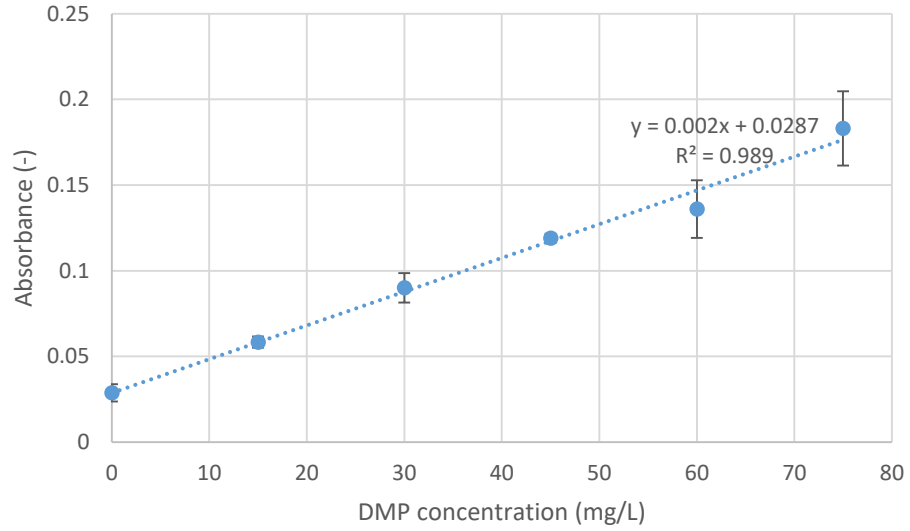
3.2.6.6 Pektin Yüğü

Serbest pektin, Kintner ve Buren (1982) metoduna bağılı kalınarak fakat Thibault (1979) tarafından tanımlanan küçük bir modifikasyon ile belirlenmiştir. Kısaca, emülsiyonlar ultrasantrifüj ile muamele edilmiş ve serum katmanı yukarıda bahsedilen metotla ayrılmıştır. Serum katmanı ayrıldıktan sonra, örneğin 0.4 mL’si 4.5 pH’ta 10 mL 10 mM sodyum asetat tamponunda seyreltilmiştir. Ardından, seyreltilen örneğin 1 mL’si pipetle 16 x 150 mm’lik test tüplerine aktarılmış ve buzlu soğuk suyun içinde soğuması için 5 dakika bekletilmiştir. Soğuma gerçekleşikten sonra, 6 ml H₂SO₄ solüsyonu buzlu su içindeki her bir tüpe eklenmiş ve hepsi Vortex karıştırıcı kullanılarak ortalama hızda dikkatle karıştırılmıştır. Uronik asitlerin varlığında kırmızı bir kromojen oluşmaktadır. Sülfürik asit/tetraborat içinde ısıtıldığında karbonhidratlar da kırmızımsı bir kromojen oluşturduğu için, kör örnek m-hidroksidifenil ayırıcı yerine % 0.5’lik sodyum hidroksitin 0.1 ml’si kullanılarak işleme sokulmuş ve diğer tüm eklemeler ve uygulamalar aynı tutulmuştur. M-hidroksidifenil yüzünden oluşan absorbansı elde etmek için kör örnek absorbansı daha sonra toplam absorbanstan çıkarılmıştır. Daha sonra, tüpler 90°C su banyosunda yaklaşık 6 dakika boyunca ısıtılmış ve hemen ardından oda sıcaklığına ulaşana kadar (5-10 dk) buzlu suda bekletilmiştir. Renk değişimi için %0.15 M-hidroksidifenilin 0.1 ml alikuotu (temsili miktar) örneklerle eklenmiştir. M-hidroksidifenil ya da sodyum hidroksit eklendikten sonra, tüpler tek tek düzgünce vortekslenmiş ve 13 x 100 mm’lik uyumlu küvetlere boşaltılmıştır. Absorbans 520 nm dalga boyunda okunmuştur. 4.5 pH(0 µg/ml) 1 ml 10 mM sodyum asetat tamponu, 6 ml sülfürik asit/tetraborat solüsyonu ve 0.1 ml %0.5’lik sodyum hidroksit içeren kör ayraç deneyleri sıfırlamak için kullanılmıştır. Serum katmanındaki pektin, pektinin konsantrasyon serilerinden (0-

240 mg/L) elde edilen regresyon ($y = 0.0018x + 0.0278$, $R^2 = 0.9866$) tarafından belirlenmiştir.

Tablo 2. DMP konsantrasyon serileri ve UV-VIS spektrofotometre tarafından belirlenmiş absorbans değerleri

DMP konsantrasyon (mg/L)	Absorbans			Ortalama $\pm$ SD
	I	II	III	
0	0.024	0.034	0.028	0.029 $\pm$ 0.005
15	0.057	0.056	0.062	0.058 $\pm$ 0.003
30	0.081	0.098	0.091	0.09 $\pm$ 0.009
45	0.12	0.121	0.116	0.119 $\pm$ 0.003
60	0.13	0.123	0.155	0.136 $\pm$ 0.017
75	0.163	0.18	0.206	0.183 $\pm$ 0.022



Şekil 2. DMP konsantrasyon serilerinin standart eğrisi

3.2.6.7 Hızlandırılmış Kremalaşma

Y/S emülsiyonlarının kremalaşma kararlılığı, analitik foto-santrifüj ile (LUMiFuge 116, L. U. M. GmbH, Germany) uygulanan santrifüj kuvvetinin altında meydana gelen Y/S faz ayrılmasının ölçülmesiyle tespit edilmiştir. Bu çalışmada, analiz tüpünün içindeki 0.4 mL örnek 2000 rpm'de 1 saat boyunca 25 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj süresince, yakın-kızılötesi sensör örnek hücrelerini toplam uzunluk boyunca taramıştır. Yük bağımlı aygıt (Charge Coupled Device: CCD), çizgi sensörü, örnek boyunca iletilen ışığı almıştır, bu da örneğin verilen

zamana karşı bir emisyon profilini veren radyal pozisyonun bir fonksiyonu olarak bir ışık akış modeli göstermiştir. Kremalaşma, sedimentasyon, ve koalesans gibi emülsiyon kararlılığı bu yolla belirlenir. Kantitatif veri, rotasyon merkezinden 94.5-114.5 mm radyal pozisyonların aralığındaki emisyon profillerinin integrasyonu tarafından elde edilmiştir. Toplam entegre edilen alanın santrifüj zamanına karşı grafiği çıkarılmıştır. Grafiğin eğimi ayrılma oranını ve haliyle kremalaşma kararlılığını ifade etmek için kullanılmıştır ve düşük veri daha iyi bir kremalaşma kararlılığına işaret etmektedir. Eğri, plato noktasına ulaşılmadan önceki (0-3600 s arası) emisyonun dik yükselişinin ilk periyodu boyunca meydana gelen lineer regresyonun hesaplanmasıyla, direkt olarak SEPView 4.0 Lumifuge yazılımından elde edilmiştir.

3.2.6.8 Emülsiyonların pH Kararlılıkları

pH 4.5 da ısıtılmış ve ısıtılmamış WPI:DMP komplekslerinden meydana getirilen emülsiyonlar, 2.0-8.0 arası farklı pH değerlerine ayarlanmıştır. Emülsiyonlar oda sıcaklığından bırakılmış ve ertesi gün gözlemlenmiştir. Emülsiyonların pH'ya bağlı davranışını gözlemlemek için, emülsiyonların partikül boyutları, pH değişiminden sonra, pH 2.0 ve 8.0'a ayarlanmasından sonra ve tekrar pH 4.5'e getirildikten sonra (D4,3) Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) ile ölçülmüştür.

3.2.7 Data Analizi

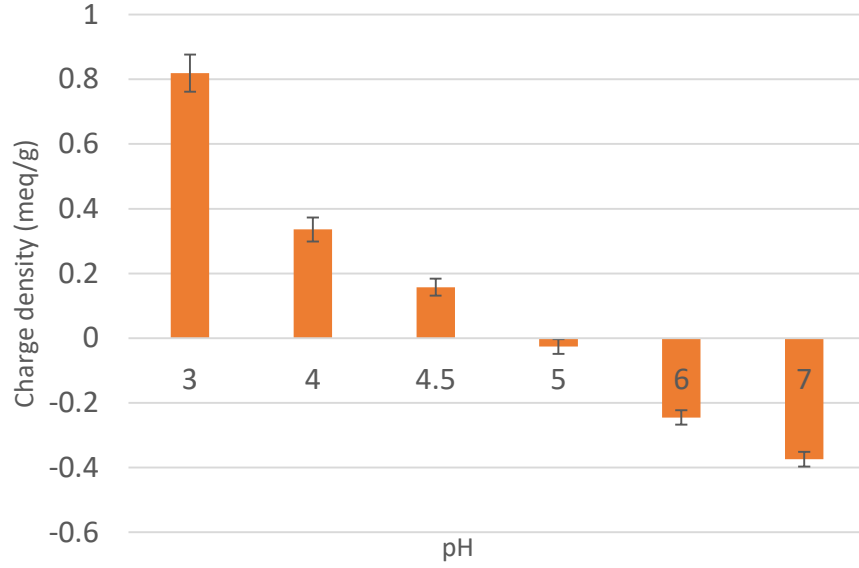
Tüm deneyler en az iki kez tekrar edilerek gerçekleştirilmiştir. Standart hata, hata çubukları şeklinde grafiklerde gösterilmiştir.

3.3 Komplekslerin Karakterizasyonu

3.3.1 Elektriksel Yük Yoğunluğu

Biyopolimerlerin e. yük yoğunluğu, protein-polisakkarit oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır, zira bu kompleksler elektrostatik interaksyonlar tarafından domine edilirler (Ganzevles et al., 2007). Bu sebeple, biyopolimerlerin

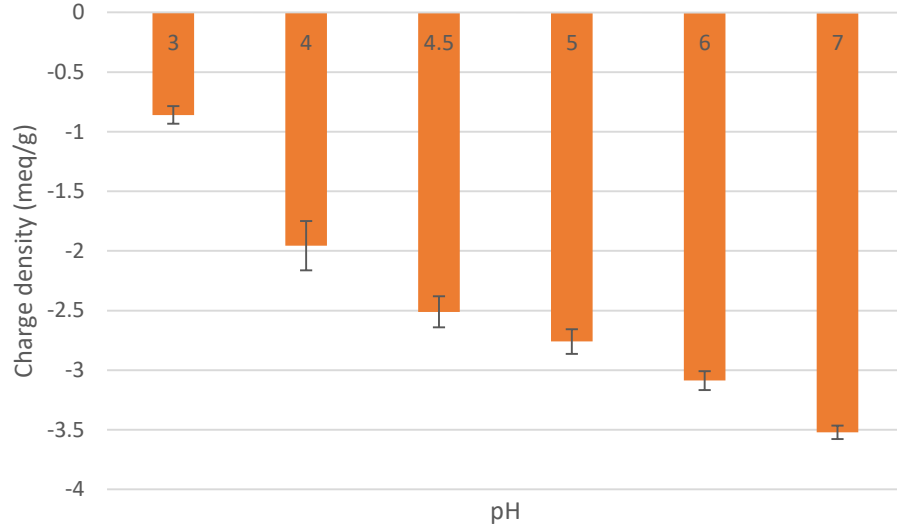
negatif ya da pozitif olarak yüklendiği pH seviyeleri gözlenmiştir. DMP'nin yük yoğunluğu pH ile artarken (Şekil 4, Tablo 4), WPI'n yük yoğunluğu pH 5 ve üstünde daha çok negatif, pH 4.5 altında ise daha pozitif yüklenmiştir (Şekil 3, Tablo 3). Wijaya ve ark. (2018) göre, WPI'nin pI'sı 4.8 civarındadır. Bu yüzden, WPI bu pH'nın üstünde negatif, altında ise pozitif yüklenmiştir. Pektin anyonik bir polisakkarittir ve çözünmüş pektin nötr pH'nın üstünde negatif olarak yüklenmiştir; pKa değeri yaklaşık 3.5 dolaylarında elektriksel yük düşerek sıfıra yaklaşmaktadır.



Şekil 3. pH'ın bir fonksiyonu olarak 10 mM sodyum asetat tamponunun içindeki %0.5'lik WPI'n yük yoğunluğu

Tablo 3. Farklı pH değerlerinde PDADMAC ve PAA ile titre edilmiş WPI'n yük yoğunluk değerleri

WPI					
pH	titrant	Volume (ml)			Average ± SD
		I	II	III	
3.0	PAA	28.7	30.5	30.1	29.767±0.945
4.0		7.9	7.3	7.1	7.433±0.416
4.5		2.2	3.2	2.7	2.7±0.5
5.0	PDADMAC	0.4	0.1	0.1	0.2±0.173
6.0		1.8	1.8	2.1	1.9±0.173
7.0		2.7	3	3	2.9±0.173



Şekil 4. pH'nın bir fonksiyonu olarak 10 mM sodyum asetat tamponunda %0.5 DMP'nin yük yoğunluğu

Tablo 4. Farklı pH seviyelerinde PDADMAC ile titre edilmiş DMP'nin yük yoğunluğu değerleri

DMP					
pH	titrant	Volume (ml)			Average $\pm$ SD
		I	II	III	
3.0	PDADMAC	7	7	6	6.667 $\pm$ 0.577
4.0		17	14	14.5	15.167 $\pm$ 1.607
4.5		18.7	19.1	20.6	19.467 $\pm$ 1.002
5.0		22	20.5	21.7	21.4 $\pm$ 0.794
6.0		23.4	23.8	24.6	23.933 $\pm$ 0.611
7.0		27.6	26.8	27.5	27.3 $\pm$ 0.436

3.3.2 Z-Average Çapı

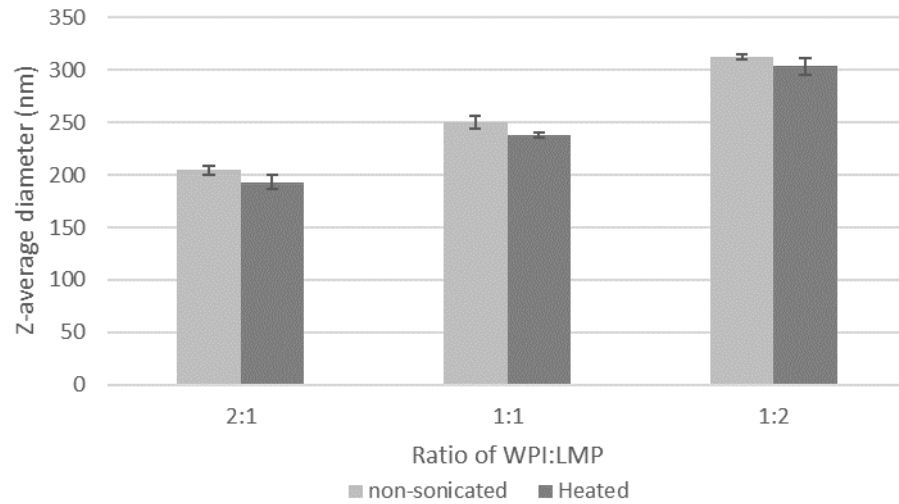
WPI:DMP dispersiyonları farklı oranlarda karıştırılmış ve pH'ları 4.5'e ayarlanmıştır. pH'nın 4.5'e ayarlanmasından sonra, karışım dispersiyonları 80 °C'de 15 dk boyunca ısıtılmıştır. Tablo 5 farklı WPI:DMP oranlarındaki ısıtılmış ve ısıtılmamış WPI:DMP komplekslerinin Z-average çaplarını göstermektedir. Proteinin pektine oranı azaldıkça, WPI:DMP komplekslerinin hem ısıtılmış hem de ısıtılmamış her iki örnek grubu için de Z-average çapı artmıştır. Isıtılmış WPI:DMP komplekslerinin Z-average çapları ısıtılmamış olanlardan kısmen daha küçüktür. LMP içermeyen kontrol WPI (2:0) kümelenme davranışı göstermiştir ve oldukça büyük partikül boyutları oluşturmuştur, bu da WPI'nın pI'sının 4.5 dolaylarında

olması ve bu aralıktaki pH'da, WPI'nin çözünübilirliğinin düşmesi sebebiyle kaynaklanmaktadır (Guimarães and Gasparetto, 2005).

Tablo 5. Farklı oranlardaki ısıtılmış ve ısıtılmamış WPI:DMP komplekslerinin Z-average çapları (pH 4.5)

WPI:LMP ratio	Unheated complexes(nm)	Heated complexes (nm)
2:0	24556.27±2747.03	9022.77±4719.38
2:1	226.5±33.65	150.13±2.23
1:1	214.1±16.32	188.43±8.41
1:2	293.47±5.86	236.7±9.55

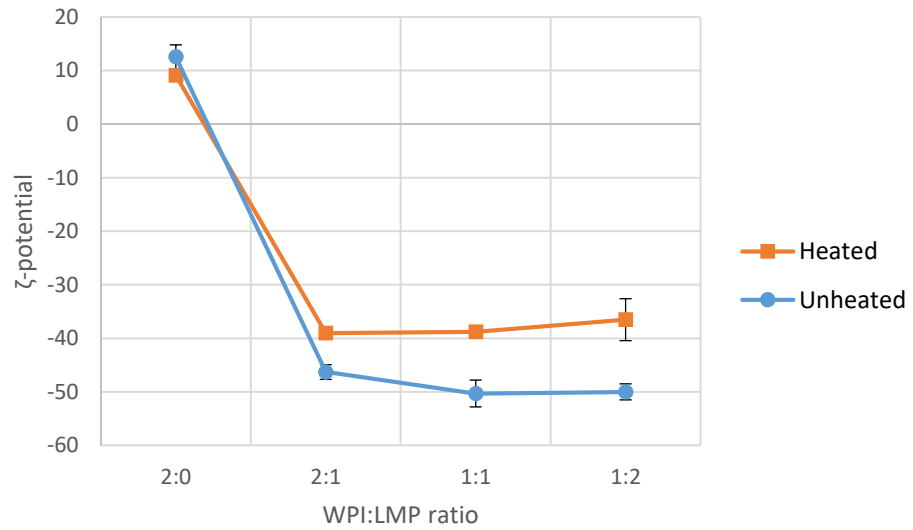
Protein:polisakkarit kompleksleri tarafından stabilize edilen Y/S emülsiyonlarının, sonikasyon yoluyla emülsifiye edilmesi prosesindeki önemli bir sorun, kompleks dispersiyonlarında meydana gelen faz ayrılması olmuştur. Bu sebeple, Z-average çapı sonikasyondan önce ve sonra gözlemlenmiştir (Şekil 5). Hiçbir faz ayrılması gözlenmemiş ve Z-average çapı, dikkate alınacak kadar etkilenmemiştir.



Şekil 5. 30 s sonikasyondan sonra, farklı WPI:DMP oranlarındaki ısıtılmış ve ısıtılmamış WPI:DMP komplekslerinin Z-average çapı. Partikül boyut dağılımı sonikasyondan sonra önemli bir değişiklik göstermemiştir.

3.3.3 ζ -Potansiyeli

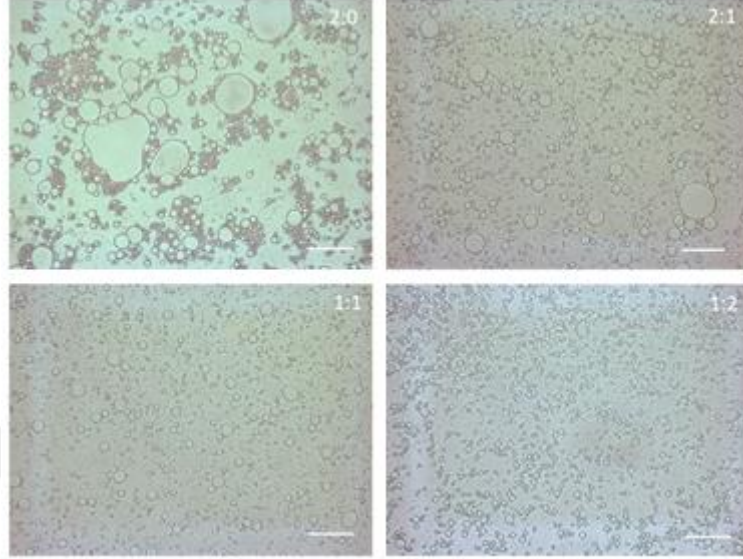
ζ -potansiyeli koloidal sistemlerdeki elektrokinetik potansiyeldir. Bu potansiyel, hareketli dispersiyon ortamı ve dispers olmuş partiküle bağlı dispersiyon ortamının sabit katmanı arasındaki potansiyel fark olarak tanımlanmaktadır. Emülsiyonlar yüksek negatif ya da yüksek pozitif ζ -potansiyeline sahip olduklarında, partiküller birbirlerini itecek ve çekici durumdaki güçler giderilebilecektir. Bu sebeple, düşük ζ -potansiyel koagülasyon ya da flokülasyon işaret ederken, yüksek değerlerde süspansiyon elektriksel yük olarak kararlı durumda olacaktır (Lu & Gao, 2010). Isıtılmış WPI:DMP kompleksleri, kontrol WPI hariç, tüm WPI:DMP oranları için ısıtılmamış komplekslere göre daha yüksek ζ -potansiyeline sahiptir (Şekil 6). Isıl işleminden sonra meydana gelen daha yüksek negatif yük, daha küçük z-average çapından ileri gelmiş olabilir, bu da nanokomplekslerin ortamda daha iyi dispers olduğunu işaret etmektedir. Isıtılan kompleksler tarafından stabilize edilen emülsiyonlar, yağ damlacıklarının agregasyonu sebebiyle daha düşük negatif ζ -potansiyel göstermiştir.



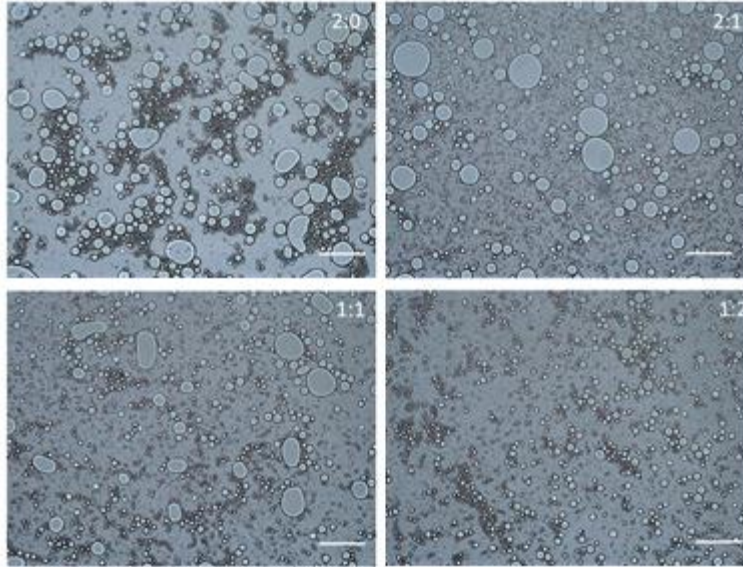
Şekil 6. 4.5 pH'da, 10 mM sodyum asetat tamponu içinde farklı WPI:DMP oranlarında ısıtılmış ve ısıtılmamış WPI:DMP komplekslerinin ζ -Potansiyeli

3.4 Emülsiyonların Karakterizasyonu

3.4.1 Optik Mikroskopi



Şekil 7. Farklı WPI:DMP oranlarında, 10 mM sodyum asetat tamponu (pH 4.5) içinde ısıtılmamış WPI:DMP kompleksleri tarafından stabilize edilen %10 Y/S emülsiyonlarının optik mikroskopi resimleri (ölçek çubuğu=20µm)

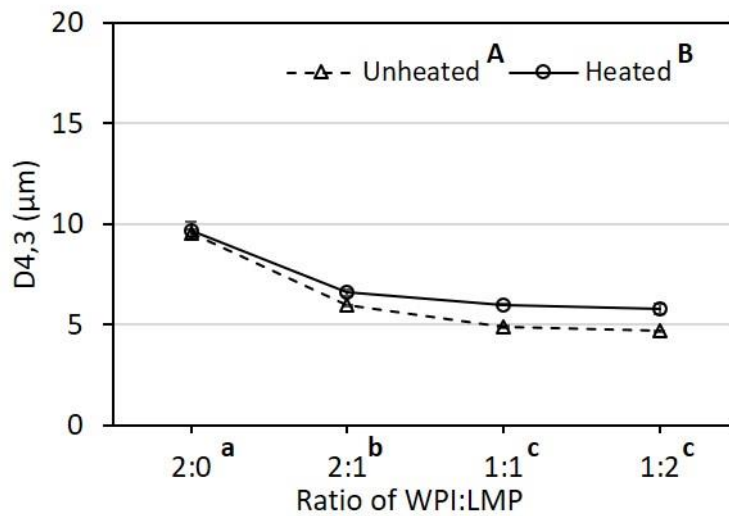


Şekil 8. Farklı WPI:DMP oranlarında, 10 mM sodyum asetat tamponu (pH 4.5) içinde ısıtılmış WPI:DMP kompleksleri tarafından stabilize edilen %10 Y/S emülsiyonlarının optik mikroskopi resimleri (ölçek çubuğu=20µm)

Isıtılmış WPI:DMP kompleksleri tarafından stabilize edilmiş Y/S emülsiyonları, ısıtılmayan WPI:DMP kompleksleri (Şekil 7) tarafından stabilize edilmiş emülsiyonlara kıyasla, kısmen daha büyük damlacık boyutu ve agregasyona sahiptir (Şekil 8). Isıtılmış emülsiyonlarının daha büyük damlacık boyutuna sahip olmaları, ısıl işlemle birlikte emülsiyon bozulmasına işaret eden yağ damlacık agregasyonuna bağlanmıştır.

3.4.2 Yağ Damlacık Boyutu

De Brouckere Ortalama Çapı (De Brouckere Mean Diameter) olarak da bilinen hacimsel moment ortalama; örnek hacminin esas kısmını oluşturan büyük partiküllerin boyutu olarak tanımlanmaktadır (Malvern Instruments, 2015). Mastersizer 3000, materyallerin partikül boyutu ve partikül boyut dağılımını ölçmek için lazer kırınım tekniğini kullanır. Bu işlemi, dağılmış partikül örneğinden geçen lazer ışını şeklinde saçılan ışığın yoğunluğunu ölçerek gerçekleştirir. Daha sonra bu veri, saçılma modeli meydana getirmiş partiküllerin boyutlarını ölçmek için kullanır. WPI'ın DMP'ye oranı düştükçe, ısıtılmış ve ısıtılmamış WPI:DMP kompleksleri tarafından stabilize edilen her iki emülsiyon için de D[4,3] düşme gösterme eğilimindedir. Isıtılmamış WPI:DMP tarafından stabilize edilen emülsiyonlara kıyasla, ısıtılmış olanlar kısmen daha büyük D[4,3]'e sahiptir (Şekil 9).

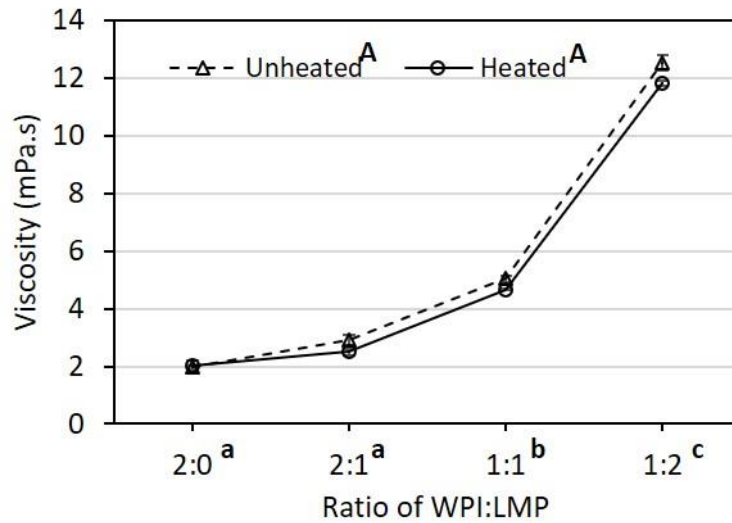


Şekil 9. 10. mM sodyum asetat tamponu içinde (pH 4.5) ısıtılmış ve ısıtılmamış farklı oranlarda WPI:DMP kompleksleri tarafından stabilize edilen %10'luk Y/S emülsiyonlarının D[4,3]'si.

Farklı büyük ve küçük harfler iki yönlü ANOVA'ya göre belirgin farkı ($p < 0.05$) göstermektedir.

3.4.3 Viskozite

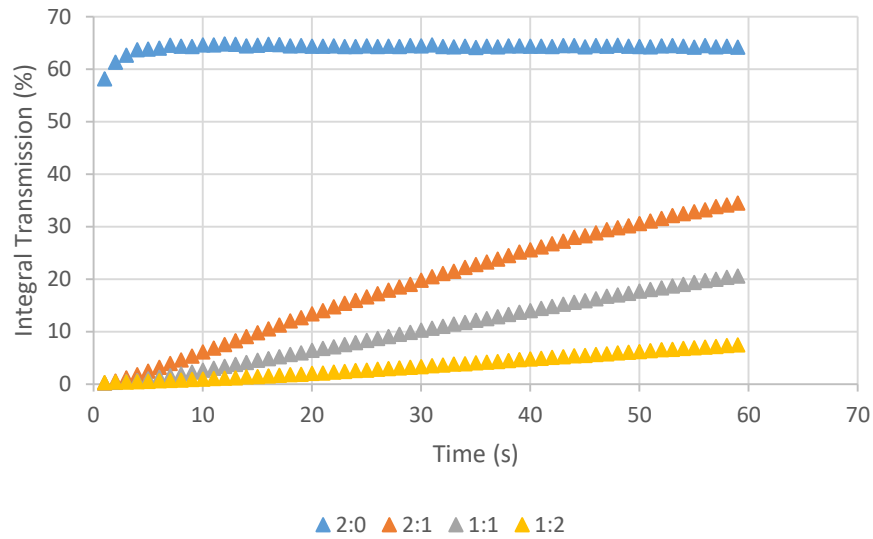
Isıtılmış WPI:DMP kompleksleri tarafından stabilize edilmiş emülsiyonlar, ölçülen dinamik viskozitede tüm karışım oranları için kısmen bir düşüş göstermiştir (Şekil 10). Isıtmadan sonra viskozitenin düşmesinin sebebi; pektinin, proteinle güçlü bir şekilde interaksiyona girerek daha büyük partiküller oluşturması ve bunun da dispersiyonun viskozitesini düşürmesidir. Pektin molekülleri protein partiküllerini sarabilir ve üzerlerinde birikinti oluşturabilir, bu sebeple daha önceden büyük pektin molekülleri tarafından işgal edilmiş sıvı fazda bazı boşluklar bırakırlar.



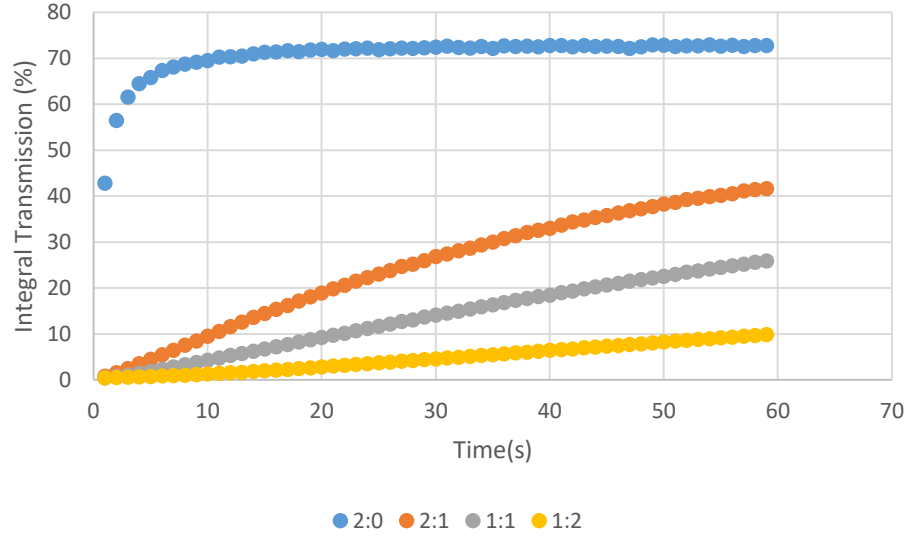
Şekil 10. Farklı WPI:DMP oranlarında, 10 mM asetat tamponu içinde (pH 4.5) ısıtılmış ve ısıtılmamış WPI:DMP kompleksleri tarafından stabilize edilmiş %10'luk Y/S emülsiyonlarının viskozitesi (mPa.s).

3.4.4 Hızlandırılmış Kremalaşma Stabilitesi

Yalnızca WPI tarafından stabilize edilmiş emülsiyonlar stabil kalamamışlar ve 10 dakikalık santrifüj sonunda hızla kararlılığını kaybetmişlerdir. Şekil 11 ve 12’de gösterildiği üzere ısıtılmamış WPI:DMP kompleksleri tarafından stabilize edilmiş Y/S emülsiyonları, ısıtılmış WPI:DMP kompleksleri tarafından stabilize edilenlere göre daha iyi bir stabilite göstermiştir. Bu sonuca; ısıtılmış kompleksler tarafından stabilize edilmiş Y/S emülsiyonlarının % integral transmisyonunun santrifüj işleminden sonra daha yüksek olmasının gözlemlenmesine dayanılarak varılmıştır.



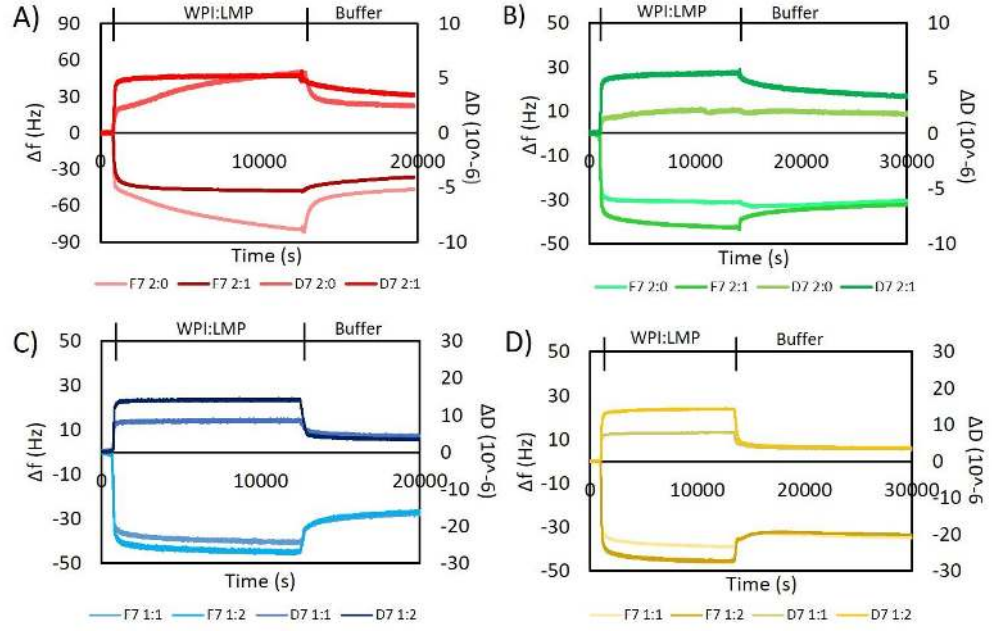
Şekil 11. Farklı WPI:LMP oranlarında 10 mM sodyum asetat tamponu (pH 4.5) içindeki ısıtılmamış WPI:LMP kompleksleri tarafından stabilize edilmiş %10'luk Y/S emülsiyonlarının integral transmisyonu



Şekil 12. Farklı WPI:DMP oranlarında 10 mM sodyum asetat tamponu (pH 4.5) içindeki ısıtılmış WPI:DMP kompleksleri tarafından stabilize edilmiş %10'luk Y/S emülsiyonlarının integral transmisyonu

3.4.5 QCM-D Deneyi

Isıtılmış ve ısıtılmamış her iki kompleksin adsorbsiyonu için WPI'nın DMP'ye oranı düşüktüğü (2:1 den 1:2'ye) frekansın da düştüğü gözlenmiştir (Şekil 13). Durulamadan önce ve sonraki frekans değişiklikleri, frekans konusunda en yüksek düşüşü; 1:2 oranında göstermektedir, bu da komplekslerin adsorbe olan katmanının kalınlığı ile açıklanmaktadır. Isıtılmamış WPI tuhaf bir adsorbsiyon davranışı göstermiştir. Bunun sebebi, daha büyük parçacıkların oluşması sebebiyle (agregasyon) meydana gelen zayıf adsorbsiyon olabilir. Bu durum ısıtılmış WPI'da gözlenmemiştir. Benzer kümelenme sistemlerine sahip olmalarına rağmen, ısıtmanın hidrofobik olarak kaplanmış altın yüzey ve WPI arasındaki hidrofobik bağlanmayı artırması sebebiyle, WPI'nın adsorbsiyon kapasitesini artırması beklenmektedir.



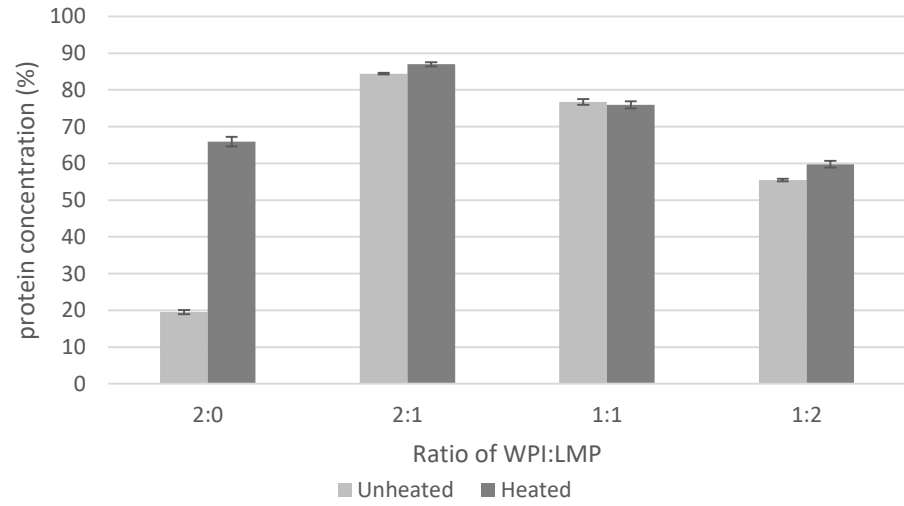
Şekil 13. Farklı WPI:LMP oranlarında pH 4.5'te oluşturulmuş ısıtılmış (B,D) ve ısıtılmamış (A, C) WPI:LMP komplekslerinin frekans ve yayılımı (overtone 7). pH 4.5'te zamana karşı adsorbsiyonu, yine pH 4.5'te 10 mM Na-asetat tamponuyla durulama izlemiştir.

3.4.6 Krema Fazındaki Protein Konsantrasyonu

Genel olarak, WPI:DMP oranı düştükçe protein adsorbsiyonu da düşmüştür. Kayda değer bir değişim yalnızca WPI tarafından stabilize edilen emülsiyonlarda görülmektedir. Isıl işlem uygulanmamış kompleksler daha zayıf bir adsorbsiyon göstermiştir. Bu yüzden, hazırlandıktan birkaç saat sonra emülsiyonda faz ayrılması gözlenmiştir (Şekil 14, sol). Diğer yandan, ısıtılmış kompleksler daha iyi bir stabilite göstermiş ve bu da nispeten daha yüksek bir protein adsorbsiyonunun varlığına işaret etmektedir. Isıl işlemin proteinin yüzey hidrofobitesini arttırdığı ve yağ damlacık yüzeyine daha iyi bir bağlanma sağlamış olduğu düşünülmektedir. Isıtma işlemi uygulanmış komplekslerin diğer WPI:LMP kompleksleriyle karşılaştırılabilecek düzeyde adsorbsiyon gösterdiği bu fenomen, QCM-D verilerince (Şekil 13) desteklenmiştir.

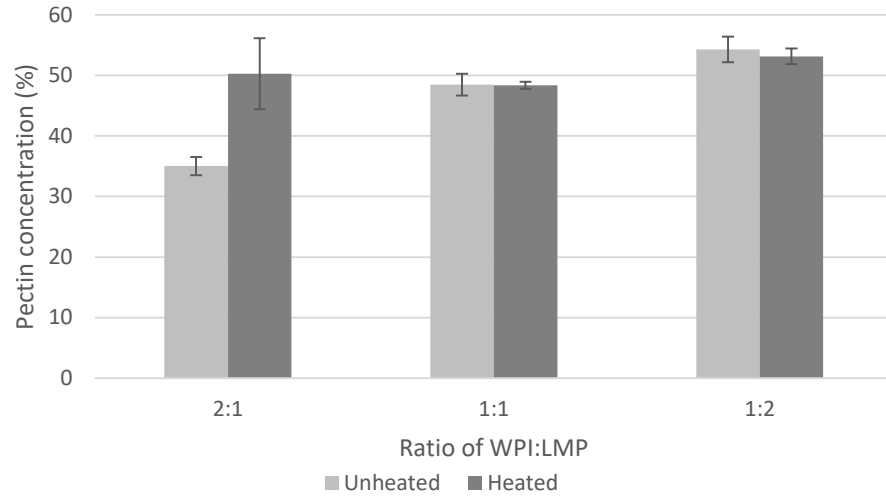


Şekil 14. Isıtılmamış ve ısıtılmış WPI tarafından stabilize edilmiş Y/S emülsiyonlarının hazırlandıktan birkaç saat sonraki hali



Şekil 15. pH 4.5 te oluşturulmuş farklı oranlarda WPI:DMP komplekslerinin krema fazındaki protein konsantrasyonları

3.4.7 Krema Fazındaki Pektin Konsantrasyonu



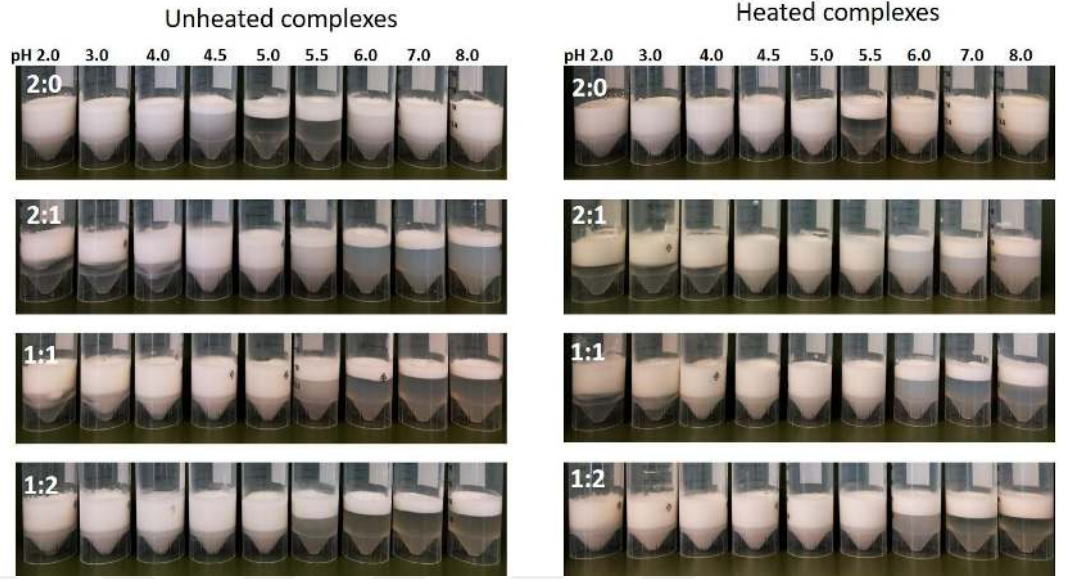
Şekil 16. pH 4.5'te hazırlanmış farklı oranlardaki WPI:DMP komplekslerinin krema fazındaki LMP konsantrasyonu

Genelde, Şekil 16'da da gösterildiği üzere, WPI:DMP oranı düştükçe yüzey pektin yükü artmıştır. Kullanılabilir pektin oranının daha fazla olması, yağ damlacıklarının yüzeyinde pektin katmanının oluşumuna olanak sağlamakta ve bu da protein molekülleriyle büyük bir interaksiyona işaret etmektedir. Bu yüzden yüzey pektin yükünde artış beklenmiştir. Pektin β -laktoglobulin ile interaksiyona girebilir ve negatif olarak yüklenmiş grupları sayesinde doyma noktasına kadar kaplanmış bir katman olarak birikebilir (Ron et al., 2010).

3.4.8 pH Stabilitesi

Emülsiyonlar hazırlandıktan hemen sonra pH 4.5'te oluşturulan, ısıtılmış ve ısıtılmamış kompleksler tarafından stabilize edilmiş emülsiyonların pH'sı 2.0-8.0'a ayarlanmıştır. Ertesi gün, Şekil 17'de gösterildiği üzere örneklerin fotoğrafları çekilmiştir. Örneklerin pH-tepkisel davranışını daha iyi anlamak için, ilk oluşturulan (pH 4.5) emülsiyonların D4,3'ü gözlemlenmiştir. Sonra, emülsiyonların pH'ları seçilen pH'lar olan 2.0 ve 8.0'a ayarlanmıştır. En sonunda, pH 2.0 ve 8.0'dan 4.5'e ayarlanmıştır. Isıtılmış ve ısıtılmamış farklı oranlardaki WPI:DMP kompleksleri tarafından stabilize edilmiş tüm emülsiyonlar benzer

davranışlar sergilemiştir. Bu benzersiz davranış, emülsiyon-bazlı aktarım sistemi şeklinde enteresan uygulamalara imkân verebilir.



Şekil 17. WPI:DMP kompleksleri tarafından stabilize edilen Y/S emülsiyonlarının pH değişiklikleri altında kremalaşma stabilitesi. Fotoğraflar örneklerin hazırlanmasından 1 gün sonra çekilmişti

4. TARTIŞMA

WPI'nin elektriksel yük yoğunluğu pH 5'in üzerinde daha fazla negatif yüke doğru artmış, pH 4.5 altında daha çok pozitif yüke doğru azalmıştır. WPI'nin izoelektrik noktası 4.8 civarındadır. Whey proteini ve biopolimerlerin elektrostatik kompleksasyonları proteinin izoelektrik noktası altında en iyi sonucu verir. DMP'nin yük yoğunluğu ise pH arttıkça artmıştır. Yüksek (pozitif ya da negatif) ζ -potansiyel emülsiyonlar için yüksek fiziksel kararlılığa işaret ederken, düşük değerler kararsızlığı gösterir. Isıtılmış WPI:DMP dispersiyonlarında DMP oranı yüksek olanlar daha yüksek ζ -potansiyel sonuçları vermiştir, bu da oluşan komplekslerin yüksek kararlılığa sahip olduğunu göstermektedir. Optik mikroskop analizleri ısıtılmış WPI:DMP kompleksleri tarafından stabilize edilmiş Y/S emülsiyonlarının, ısıtılmamış WPI:DMP kompleksleriyle stabilize edilenlere kıyasla kısmen daha büyük damlacık boyutları ve agregasyon meydana getirdiğini göstermiştir. WPI:DMP komplekslerinin damlacık boyutu, yalnızca WPI ile stabilize edilenlere göre daha küçüktür.

WPI'nin DMP'ye oranı düştükçe, ısıtılmış ve ısıtılmamış WPI:DMP kompleksleri tarafından stabilize edilmiş her iki emülsiyon için de hacim-ağırlıklı ortalama damlacık boyutu düşmüştür. Isıtılmış WPI:DMP tarafından stabilize edilmiş emülsiyonlar, ısıtılmamış olanlara göre kısmen daha büyük D[4,3] rakamları göstermiştir. Isıtılmış ve ısıtılmamış WPI:DMP komplekslerinin her ikisi de verilen tüm oranlar için benzer viskozite değerleri göstermiştir. WPI:DMP oranı azaldıkça viskozite artmıştır. Hızlandırılmış Kremalaşma Analizleri, yalnızca WPI (2:0) tarafından stabilize edilmiş emülsiyonların stabil olmadığını ve hızlı bir şekilde santrifüj işleminin daha 10 dakikası içerisinde kararsızlaştığını göstermiştir. Isıtılmamış WPI:DMP kompleksleri tarafından stabilize edilmiş Y/S emülsiyonları, ısıtılmış WPI:DMP kompleksleri tarafından stabilize edilenlere göre daha iyi bir kremalaşma stabilitesi göstermiş; ısıtılmış kompleksler tarafından stabilize edilmiş Y/S emülsiyonlarının santrifüjden önce ve sonraki yüksek % integral transmisyonları da bunu desteklemiştir.

QCM-D sonuçları DMP oranı arttıkça, frekansın daha yüksek olduğunu ve bu yüzden de her iki ısıtılmış ve ısıtılmamış örnekler için elde edilen adsorbe

edilmiş katmanın daha kalın olduğunu göstermiştir. Genel olarak, WPI tarafından stabilize edilen emülsiyonlarda görüldüğü üzere, WPI:DMP oranı düştükçe, adsorbsiyon oranı artmıştır. Isıtılmamış kompleksler zayıf bir adsorbsiyon göstermiştir. Isıtılmış kompleksler daha iyi bir stabilite göstermiş; bu da göreceli olarak daha yüksek protein adsorbsiyonuna işaret etmektedir. Bu durum, ısıl işlemin proteinin hidrofobisitesini arttırması ve yağ damlacıklarının yüzeylerine daha iyi bir şekilde tutunmasına olanak vermesine bağlanmaktadır.

pH stabilite analizlerinde, pH'nın emülsiyonların stabilitesini etkilediği görülmüş ve emülsiyonlar 4.5 pH'da iyi bir fiziksel stabilite göstermiştir. Dahası, bu pH değerinin ötesinde, emülsiyonlarda faz ayrılması görülmüştür. Faz ayrılması pH 4.5'e getirildiği zaman tersinir karakter göstermektedir. Bu eşsiz davranış emülsiyon-bazlı aktarma sistemleri üzerinde ilginç uygulamalara olanak verebilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Whey proteinleri besinsel, fonksiyonel ve teknolojik değeri yüksek, aktif bileşenlerin enkapsülasyonu, iletim sistemleri ve emülsiyon stabilizasyonu gibi alanlarda kullanılabilecek iyi bir alternatiftir. Diğer biopolimerler ile kompleks koaservasyonu oluşturabilir, pickering stabilizasyon ile emülsiyonları stabilize edebilirler. Whey proteinleri ve biopolimerler arasındaki etkileşimler çoğunlukla elektrostatik olarak gerçekleşir ve bunu etkileyen pH, iyonik güç, yük yoğunluğu, biopolimer oranı gibi faktörler mevcuttur. Bu çalışmada bunların etkileri incelenmiş, arayüz çalışmalarına yoğunlaşmış ve ileriki çalışmalar için birtakım sonuçlar elde edilmiştir. Bundan sonraki çalışmalar protein-polisakkarit komplekslerinin iletim sistemleri, enkapsülasyon ve emülsiyon sistemlerinin daha ileri karakterizasyonu ve reolojik özellikleri üzerine yoğunlaşabilir. Bu çalışma komplekslerin emülsiyon içindeki fizikokimyasal özelliklerini araştırmak açısından yol gösterici olmuştur.

6. KAYNAKLAR

(Bu tez çalışmasında APA atıf sistemi kullanılmıştır.)

- Abismail, B., Canselier, J.P., Wilhelm, A.M., Delmas, H., Gourdon, C., Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1999, 6 (1–2), 75–83.
- Antonov, Y. A., Lashko, N. P., Glotova, Y. K., Malovikova, A., and Markovich, O., Effect of the structural features of pectins and alginates on their thermodynamic compatibility with gelatin in aqueous media, *Food Hydrocoll.*, 1996; 10(1): 1–9.
- Aveyard, R., Binks, B.P., and Clint, J.H., Emulsions stabilised solely by colloidal particles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2003, 100–102, 503–546.
- Benichou, A., Aserin, A. & Garti, N., Protein-Polysaccharide Interactions for Stabilization of Food Emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2002, 23:1-3, 93-123.
- Binks, B.P. and Lumsdon, S.O., Stability of oil-in-water emulsions stabilised by silica particles. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 1999, 1, 3007–3016.
- Canselier, J.R.; Delmas, H.; Wilhelm, A.M.; Abismail, B. Ultrasound emulsification – An overview. *Journal of Dispersion Science and Technology* 2002, 23 (1–3), 333–349.
- Chen, W. S., Henry, G. A., Gaud, S. M., Miller, M. S., Kaiser, J. M., Balmadeca, E. A., Morgan, R. G., Baer, C. C., Borwankar, R. P., Hellgeth, L. C., Strandholm, J. J., Hasenheuttl, G. L., Kerwin, P. J., Chen, C. C., Kratochvil, J. F., and Lloyd, W. L., Microfragmented ionic polysaccharide/protein complex dispersions, European Patent Application 0,340,035, Kraft, Inc., 1989.
- Chen, W. S., Soucie, W.G., Edible Fibrous Serum Milk Protein/Xanthan Gum Complexes. US Patent 4.559,233, 1985.
- Chodanowski P., Stoll S., Polyelectrolyte adsorption on charged particles in the Debye-Hückel approximation. A Monte Carlo approach. *Macromolecules* 2001; 34:2320–2328.
- Christensena, M. L., Hjorth, M. & Keiding, K., Characterization of pig slurry with reference to flocculation and separation. *Water Research*, 2009, 43, 773U783.
- Daniels, R. & Mittermaier, E. M., Influence of pH adjustment on microcapsules obtained from complex coacervation of gelatin and acacia. *J. Microencapsul.*, 1995; 12(6): 591–599.
- de Kruif, C. G., Weinbreck, F., & de Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9, 340–349.
- Dickinson, E. & Pawlowsky, K., Effect of high-pressure treatment of protein on the rheology of flocculated emulsions containing protein and polysaccharide. *J. Agric. Food Chem.*, 1996; 44(10): 2992–3000.
- Dickinson, E., Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein–polysaccharide interactions. *Soft Matter*, 2008, 932–942.
- Dickinson, E., Food emulsions and foams: Stabilization by particles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2010, 15, 40–49.
- Dickinson, E., Use of nanoparticles and microparticles in the formation and stabilization of food emulsions. *Trends in Food Science & Technology*. 2012, 24 (1), 4(9).
- French, D.J., Taylor, P., Fowler, J., Clegg, P.S., Liu, X., Dedinaite, A., Nylander, T., Dabkowska,

- A., Skoda, M., and Makuska, R., Making and breaking bridges in a pickering emulsion. *Journal of colloid and interface science*, 2015, 441, 30-38.
- Galazka, V. B. and Ledward, D. A., Effects of high pressure on protein-polysaccharide interactions. In: Parris, N., Kato, A., Creamer, L. K., and Pearce, J., Eds. *Macromolecular Interactions in Food Technology*. Washington DC: ACS Symposium Series 650, 1996, 178–195.
- Galus, S. & Kadzińska, J., Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends in Food Science & Technology*. 2015, 45, 273-283
- Ganzevles R.A., Kusters H., Vliet Tv., Stuart M.A., de Jongh H.H., Polysaccharide charge density regulating protein adsorption to air/water interfaces by protein/polysaccharide complex formation. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2007, 111(45):12969-12976.
- Gao Z, Fang Y, Cao Y, Liao H, Nishinari K, Phillips GO. Hydrocolloid-food component interactions. *Food Hydrocolloids*. 2017;68:149-156.
- Ghosh, A. K., & Bandyopadhyay, P., Polysaccharide-Protein Interactions and Their Relevance in Food Colloids, *The Complex World of Polysaccharides*, Dr. Desiree Nedra Karunaratne (Ed.), InTech, 2012, DOI: 10.5772/50561.
- Girard M., Turgeon S.L., Gauthier S.F., Interbiopolymer complexing between β -lactoglobulin and low-and high-methylated pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration. *Food Hydrocolloids*, 2002;16:585–91.
- Grinberg, V. Y. & Tolstoguzov, V. B. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*, 1997, 145-158.
- Harnsilawat T., Pongsawatmanit R., McClements D.J., Stabilization of model beverage cloud emulsions using protein-polysaccharide electrostatic complexes formed at the oil-water interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(15):5540-5547
- Hunter, T.N., Pugh, R.J., Franks, G.V., and Jameson, G.J., The role of particles in stabilising foams and emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2008, 137, 57-81.
- Jafari S., M., He, Y. & Bhandari, B., Nano-Emulsion Production by Sonication and Microfluidization—A Comparison. *International Journal of Food Properties*, 2006, 9:3, 475-485.
- Jayasooriya, S.D.; Bhandari, B.R.; Torley, P.; D'Arcy, B.R. Effect of High Power Ultrasound Waves on Properties of Meat: A Review. *International Journal of Food Properties* 2004, 7 (2), 301–319.
- Kelly, R., Gudo, E. S., Mitchell, J. R., and Harding, S. E., Some observations on the nature of heated mixtures of bovine serum albumin with an alginate and a pectin, *Carbohydrate Polymers*, 1994; 23: 115–120.
- Kerkhofs S, Lipkens H, Velghe F, Verlooy P, Martens JA. Mayonnaise production in batch and continuous process exploiting magnetohydrodynamic force. *Journal of Food Engineering*. 2011;106(1):35-39.
- Krochta, J.M.; De Mulder-Johnston, C. Edible and Biodegradable Polymer Films: Challenges and Opportunities. *Food Technology*, 1997, 51 (2), 6-1-74.
- Lu, G. W. & Gao, P., Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*, 2010. 59-94. 10.1016/B978-0-8155-2025-2.10003-4.
- Malvern Instruments, A basic guide to particle characterization. 2015. Retrieved from https://www.cif.iastate.edu/sites/default/files/uploads/Other_Inst/Particle%20Size/Particle%20Characterization%20Guide.pdf
- Marshall, K. (2004). Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review*, 9,

- Mattison, W., Brittain, I. J., and Dubin, P. L., Protein-polyelectrolyte phase boundaries. *Biotechnol. Prog.*, 1995; 11(6): 632–637.
- McArdle, B., Protein-Polysaccharide Complex, Composition and Method of Use. US Patent 5,645,880, 1997.
- Mellema, M. (2004). Complex coacervate encapsulate comprising lipophilic core. Google Patents.
- Mohan S, Oluwafemi OS, Kalarikkal N, Thomas S, Songca SP. Biopolymers-application in nanoscience and nanotechnology. In: Perveen FK, editor. Recent Advances in Biopolymers. Croatia: InTech; 2016. pp. 47-72.
- Naimi, S., Viennois, E., Gewirtz, A.T. et al. Direct impact of commonly used dietary emulsifiers on human gut microbiota. *Microbiome* 9, 66 (2021).
- Noguchi, H., Interactions of proteins with polymeric materials. *Biochim. Biophys. Acta*, 1956; 22: 459–462.
- Noguchi, H., Interactions of serum albumin and synthetic polyelectrolytes in various buffer systems. *Journal of Physical Chemistry*, 1959; 64: 185–187.
- Norton, J. E., Espinosa, Y. G., Watson, R. L., Spyropoulos, F., & Norton, I. T. (2015). Functional food microstructures for macronutrient release and delivery. *Food & Function*, 6, 663–678.
- Opanasopit P., Apirakaramwong A., Ngawhirunpat T., Rojanarata T., Ruktanonchai U., Development and Characterization of Pectinate Micro/Nanoparticles for Gene Delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2008;9(1):67-74. doi:10.1208/s12249-007-9007-7.
- Overbeek, J. T. J. & Voorn, M. J., Phase separation in polyelectrolyte solutions. Theory of complex coacervation. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1957; 49(S1): 7.
- Park, J. M., Muhoberac, B. B., Dubin, P. L., and Xia, J., Effects of protein charge heterogeneity in protein-polyelectrolyte complexation, *Macromolecules*, 1992; 25(1): 290–295.
- Pathak, J., Priyadarshini, E., Rawat, K3., Bohidar, H. B., Complex coacervation in charge complementary biopolymers: Electrostatic versus surface patch binding. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2017, 250. 10.1016/j.cis.2017.10.006.
- Pelegrine D.H., Gasparetto C.A., Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *LWT-Food Science and Technology*. 2005, 1;38(1):77-80.
- Ron N., Zimet P., Bargarum J., Livney Y.D., Beta-lactoglobulin–polysaccharide complexes as nanovehicles for hydrophobic nutraceuticals in non-fat foods and clear beverages. *International Dairy Journal*, 2010, 1;20(10):686-93
- Schmidt, K. A & Smith, D. E., Rheological Properties of Gum and Milk Protein Interactions. *Journal of Dairy Science*, 1992, 36-42
- Schorsch, C., Jones, M. G. & Norton, I. T., Thermodynamic incompatibility and microstructure of milk protein/locust bean gum/sucrose systems. *Food Hydrocolloids*, 1999, 89-99
- Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., & Hardy, J., Structure and Technofunctional Properties of Protein-Polysaccharide Complexes: A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1998, 38:8, 689-753
- Schmitt, C., Aberkane, L., & Sanchez, C., Protein-polysaccharide complexes and coacervates. In G. O. Phillips, & P. A. Williams (Eds.), *Handbook of hydrocolloids*, 2009, 2nd edition, pp. 420-476. Florida: CRC Press.
- Schmitt, C., & Turgeon, S. L. (2011). Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167, 63–70.

- Soucie, W.G., Chen, W.S., Edible Xanthan Gum-Protein Fibrous Complexes. US Patent 4,563,360, 1986.
- Soucie, W. G., Chen, W. S.; Witte, V.C., Henry, G.A., Drehkoff, W.D., Shelf Stable Acid Food Dressings Containing Fibrous Protein Complexes. US Patent 4, 762, 726, 1988.
- Stainsby, G., Proteinaceous gelling systems and their complexes with polysaccharides. *Food Chem.*, 1980; 6: 3–14.
- Tadros T.F., Emulsion Formation, Stability, and Rheology, In: *Emulsion Formation and Stability*, Wiley, Weinheim, Germany, 2013, pp. 1–75.
- Tambe, D.E. & Sharma, M.M., The effect of colloidal particles on fluid-fluid interfacial properties and emulsion stability. *Advances in Colloid and Interface Science*, 1994, 52, 1-63.
- Tirkkonen, S., Turakka, L., and Paronen, P., Microencapsulation of indomethacin by gelatin-acacia complex coacervation in presence of surfactants. *J. Microencapsul.*, 1994; 11(6):615–626.
- Tolstoguzov, V. B.; Izjumov, D.B.; Grinberg, vv., Marusova, A.N.; Chekhovskaya, V.T. Method of Making Protein-Containing Food stuffs Resembling Minced Meat. US Patent 3,829,587, 1974.
- Tolstoguzov, V. A., Grinberg, V., and Gulov, A., Some physicochemical approaches to the problem of protein texturization. *J. Agric. Food Chem.*, 1985; 33: 151.
- Tolstoguzov, V. B., Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. In: Mitchell, J. R. and Ledward, D. A., Eds. *Functional Properties of Macromolecules*. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986, 385–415.
- Tolstoguzov, V. B., Protein-polysaccharide interactions. In: Damodaran, S. and Paraf, A., Eds. *Food Proteins and Their Applications*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997, 171– 198.
- Turgeon, S. L., Schmitt, C., & Sanchez, C., Protein–polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2007, 12, 166-178.
- Walzem, R. L., Dillard, C. J., & German, J. B. (2002). Whey components: Millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: What we know and what we may be overlooking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 353–375.
- Wang, Y., Kimura, K., Dubin, P. L., & Jaeger, W., Polyelectrolyte-micelle coacervation: effect of micelle surface charge density, polymer molecular weight, and polymer/surfactant ratio. *Macromolecules*, 2000, 33, 3324–3331.
- Weinbreck, F. C. J., Kruif, C. G., & Schrooyen, P. (2003a). Complex coacervates containing whey proteins. Patents WO03106014 and EP1371410.
- Wijaya W., Van der Meeren P., Wijaya C. H., Patel A.R., High internal phase emulsions stabilized solely by whey protein isolate-low methoxyl pectin complexes: effect of pH and polymer concentration. *Food & Function*. 2017;8(2):584-94.
- Wilde P., Mackie A., Husband F., Gunning P., Morris V., Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Advances in colloid and interface Science*, 2004, 20;108:63-71
- Xia, J. and Dubin, P. L., Protein-polyelectrolyte complexes. In: Dubin, P. L., Bock, J., Davis, R., Schulz, D. N., and Thies, C., Eds. *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*. Berlin: Springer-Verlag, 1994, 247-271.
- Urista, M. C., Álvarez, F. R., Riera, R. F., Cuenca, A. A., & Téllez, J. A. (2011). Review: Production and functionality of active peptides from milk. *Food Science and Technology*, 4, 293–317.
- Ye, A., Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: Principles and applications - A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 2008, 43, 406 - 415. 10.1111/j.1365-2621.2006.01454.x.

- Yvonne Maphosa and Victoria A. Jideani (August 22nd 2018). Factors Affecting the Stability of Emulsions Stabilised by Biopolymers, Science and Technology Behind Nanoemulsions, Selcan Karakuş, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.75308
- Zhang, N., & Mutilangi, W. (2013). Complex coacervates, methods and food products. US patent 20130004640 A1.
- Zhang, S., Zhong, Z., & Vardhanabhuti, B. (2014). Effect of charge density of polysaccharides on self-assembled intragastric gelation of whey protein/polysaccharide under simulated gastric conditions. *Food & Function*, 5, 1829–1838.
- Zolper, J.T., Fat Substitutes Based on Carrageenan Gels, Processes for Producing the Same and Food Products Containing the Fat Substitutes. US Patent 5,458,90 4, 1995.Çelik, F. (2007). Vangölü Havzası kuşburnu genetik kaynaklarının seleksiyonu ve mevcut biyolojik çeşitliliğin tespiti. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı* Doktora Tezi, Van.
- Jayaprakasha, G. K., Selvi, T., & Sakariah, K. K. (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape seed extracts. *Food research international*, 36(2), 117-122.
- Keller, M. (2020). *The science of grapevines*. Academic Press.
- Kutbay, H. G., & Coşgun, M. (1996). Kuşburnu (*Rosa L.*) türlerinin taksonomik özellikleri ve Türkiye'deki yayılışı. *Kuşburnu sempozyumu*, 5-6 Eylül 1996, Gümüşhane, Türkiye, s.75-83.
- Llobera, A., & Canellas, J. (2007). Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape: pomace and stem. *Food chemistry*, 101(2), 659-666.

7. EKLER

EK 1 Açıklama

Regression values and their significance value from two-way ANOVA and multiple comparisons using Tukey test for D4.3 of O/W emulsions stabilized by WPI and WPI:LMP complexes

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: D4,3

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	77.959 ^a	7	11.137	255.632	.000
Intercept	1060.542	1	1060.542	24342.972	.000
ratio	73.708	3	24.569	563.944	.000
treatment	3.315	1	3.315	76.096	.000
ratio * treatment	.937	3	.312	7.166	.003
Error	.697	16	.044		
Total	1139.199	24			
Corrected Total	78.656	23			

a. R Squared = .991 (Adjusted R Squared = .987)

Multiple comparisons

Dependent Variable: D4,3

Tukey HSD

(I) ratio	(J) ratio	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	Upper Bound
2:0	2:1	3.3200*	.12051	.000	2.9752	3.6648
	1:1	4.1533*	.12051	.000	3.8086	4.4981
	1:2	4.3633*	.12051	.000	4.0186	4.7081
2:1	2:0	-3.3200*	.12051	.000	-3.6648	-2.9752
	1:1	.8333*	.12051	.000	.4886	1.1781
	1:2	1.0433*	.12051	.000	.6986	1.3881
1:1	2:0	-4.1533*	.12051	.000	-4.4981	-3.8086
	2:1	-.8333*	.12051	.000	-1.1781	-.4886
	1:2	.2100	.12051	.335	-.1348	.5548
1:2	2:0	-4.3633*	.12051	.000	-4.7081	-4.0186
	2:1	-1.0433*	.12051	.000	-1.3881	-.6986
	1:1	-.2100	.12051	.335	-.5548	.1348

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .044.

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



EK 2 Açıklama

Regression values and their significance value from two-way ANOVA and multiple comparisons using Tukey test for viscosity of O/W emulsions stabilized by WPI and WPI:LMP complexes

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Viscosity

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	129.961 ^a	4	32.490	596.381	.000
Intercept	235.554	1	235.554	4323.736	.000
ratio	129.706	3	43.235	793.611	.000
treatment	.256	1	.256	4.692	.119
Error	.163	3	.054		
Total	365.678	8			
Corrected Total	130.125	7			

a. R Squared = .999 (Adjusted R Squared = .997)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Viscosity

Tukey HSD

(I) ratio	(J) ratio	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	Upper Bound
2:0	2:1	-.7000	.23341	.161	-1.8263	.4263
	1:1	-2.8450*	.23341	.004	-3.9713	-1.7187
	1:2	-10.1600*	.23341	.000	-11.2863	-9.0337
2:1	2:0	.7000	.23341	.161	-.4263	1.8263
	1:1	-2.1450*	.23341	.008	-3.2713	-1.0187
	1:2	-9.4600*	.23341	.000	-10.5863	-8.3337
1:1	2:0	2.8450*	.23341	.004	1.7187	3.9713
	2:1	2.1450*	.23341	.008	1.0187	3.2713
	1:2	-7.3150*	.23341	.000	-8.4413	-6.1887
1:2	2:0	10.1600*	.23341	.000	9.0337	11.2863
	2:1	9.4600*	.23341	.000	8.3337	10.5863
	1:1	7.3150*	.23341	.000	6.1887	8.4413

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .054.

*, The mean difference is significant at the 0.05 level.