

**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BEYAZ PEYNİRLERDE KİMYASAL KOMPOZİSYONUN MİKRO ÖLÇEKTE  
DAĞILIMININ MİKRO-FTİR İLE BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Nur ÇEBİ  
(506091051)**

**Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Kimya Mühendisliği Programı**

**Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ramazan KIZIL**

**OCAK 2012**



İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506091051 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Nur ÇEBİ**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı **“BEYAZ PEYNİRLERDE KİMYASAL KOMPOZİSYONUN MİKRO ÖLÇEKTE DAĞILIMININ Mikro-FTIR İLE BELİRLENMESİ”** başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :**     **Yrd. Doç. Dr. Ramazan KIZIL**     .....

İstanbul Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :**     **Prof. Dr. Beraat Özçelik**     .....

İstanbul Teknik Üniversitesi

**Prof. Dr. Selma Türkay**     .....

İstanbul Teknik Üniversitesi

**Teslim Tarihi :**     **19 Aralık 2011**

**Savunma Tarihi :**     **25 Ocak 2012**



## ÖNSÖZ

Öncelikle, benim için eşsiz olan tez çalışmamı gerçekleştirmem süresince, değerli desteği ve rehberliği için ayrıca sağlamış olduğu sınırsız laboratuvar imkanları ve özverisi için tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Ramazan Kızıl'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım süresince yardım ve desteğini esirgemeyen İTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Beraat Özçelik'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Araştırmalarımız süresince yapmış olduğu teknik yardımları ve desteğinden ötürü Perkin Elmer Teknik Destek Mühendisi Gürsel Ulutuncel'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman, her koşulda yanımda olan, bana maddi, manevi sınırsız destek sağlayan sevgili anneme ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aralık 2011

Nur Çebi  
Kimya Mühendisi



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

|                                                                       |      |
|-----------------------------------------------------------------------|------|
| ÖNSÖZ.....                                                            | v    |
| İÇİNDEKİLER .....                                                     | vii  |
| KISALTMALAR .....                                                     | ix   |
| ÇİZELGE LİSTESİ.....                                                  | xi   |
| ŞEKİL LİSTESİ.....                                                    | xiii |
| ÖZET .....                                                            | xv   |
| SUMMARY .....                                                         | xvii |
| 1. GİRİŞ ve AMAÇ .....                                                | 1    |
| 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI .....                                        | 3    |
| 2.1 Peynir .....                                                      | 3    |
| 2.1.1 Ezine peyniri .....                                             | 3    |
| 2.1.1.1 Ezine peyniri üretimi.....                                    | 4    |
| 2.1.2 Peynirin mikro yapısı .....                                     | 5    |
| 2.1.2.1 Mikroyapı analizi için kullanılan yöntemler .....             | 5    |
| 2.2 Infrared Spektroskopisi .....                                     | 9    |
| 2.2.1 Fourier transform IR mikrospektroskopisi.....                   | 14   |
| 2.2.2 Fourier transform IR mikrospektroskopisi uygulama alanları..... | 15   |
| 2.2.2.1 Polimer uygulamaları .....                                    | 15   |
| 2.2.2.2 Gıda uygulamaları.....                                        | 16   |
| 2.2.2.3 Farmasötik uygulamalar .....                                  | 17   |
| 2.2.2.4 Biyomedikal uygulamalar .....                                 | 18   |
| 2.2.3 Mikro-FTIR çalışma prensibi .....                               | 19   |
| 2.2.4 Işın kaynağı .....                                              | 20   |
| 2.2.5 Interferometre .....                                            | 21   |
| 2.2.5.1 Sürekli tarama modu .....                                     | 22   |
| 2.2.5.2 Adım tarama modu .....                                        | 23   |
| 2.2.6 Mikro-FTIR optiği .....                                         | 24   |
| 2.2.6.1 Mercekler .....                                               | 24   |
| 2.2.6.2 Cassegrain optik.....                                         | 25   |
| 2.2.6.3 Aralıklar .....                                               | 26   |
| 2.2.7 Visible görüntü sistemi .....                                   | 26   |
| 2.2.8 Sample stage .....                                              | 27   |
| 2.2.9 Dedektörler .....                                               | 27   |
| 2.2.9.1 Doğrusal MCT dizi kullanımı .....                             | 27   |
| 2.2.10 Uygulamalar ve örnekleme şekilleri .....                       | 28   |
| 2.2.10.1 Transmisyon mikrospektroskopisi .....                        | 28   |
| 2.2.10.2 ATR görüntüleme tekniği .....                                | 29   |
| 3. DENEYSEL ÇALIŞMA .....                                             | 33   |
| 3.1 Deneysel Çalışmanın Amacı .....                                   | 33   |
| 3.2 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar .....                          | 33   |
| 3.3 Örnek Hazırlama ve Mikro-FTIR Deneyleri.....                      | 33   |

|                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....</b>                                          | <b>35</b> |
| 4.1 Dört Farklı Çeşit Ezine Peynirinin İncelenmesine Ait Sonuçlar .....      | 35        |
| 4.1.1 Spektral bilgi kullanılarak mikroyapının kimyasal görüntülenmesi ..... | 35        |
| 4.1.1.1 I. peynir .....                                                      | 37        |
| 4.1.1.2 II. peynir .....                                                     | 40        |
| 4.1.1.3 III. peynir .....                                                    | 43        |
| 4.1.1.4 IV. peynir .....                                                     | 46        |
| 4.1.2 Ezine peynir örneklerinin mikroyapılarının karşılaştırılması.....      | 49        |
| 4.2 Tartışma .....                                                           | 54        |
| <b>5.VARGILAR VE DEĞERLENDİRME .....</b>                                     | <b>59</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                                       | <b>61</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                                                         | <b>67</b> |

## **KISALTMALAR**

|              |                                      |
|--------------|--------------------------------------|
| <b>FT-IR</b> | : Fourier Transform Infrared         |
| <b>ATR</b>   | : Attenuated Total Reflectance       |
| <b>IR</b>    | : Infrared                           |
| <b>SEM</b>   | : Scanning Electron Microscopy       |
| <b>CLSM</b>  | : Confocal Laser Scanning Microscopy |
| <b>LM</b>    | : Light Microscopy                   |
| <b>LED</b>   | : Light Emitting Diode               |
| <b>USB</b>   | : Universal Serial Bus               |
| <b>MCT</b>   | : Mercury Cadmium Telluride          |
| <b>OPD</b>   | : Optical Path Difference            |
| <b>FWHH</b>  | : Full Width at the Half-Height      |



## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

|                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 2.1:</b> Önemli gıda bileşenlerinin orta infrared spektroskopisi ile kantitatif olarak analizlenmesinde yararlanılan absorpsiyon bandları ve spektral bölgeler .....  | 11 |
| <b>Çizelge 4.1:</b> Temel peynir bileşenlerinin orta infrared spektroskopisi ile kantitatif olarak analizlenmesinde yararlanılan absorpsiyon bandları ve spektral bölgeler ..... | 36 |
| <b>Çizelge 4.2:</b> Mikro-FTIR ile elde edilmiş I. Peynire ait mikroyapı görüntüleri .....                                                                                       | 50 |
| <b>Çizelge 4.3:</b> Mikro-FTIR ile elde edilmiş II. Peynire ait mikroyapı görüntüleri .....                                                                                      | 51 |
| <b>Çizelge 4.4:</b> Mikro-FTIR ile elde edilmiş III. Peynire ait mikroyapı görüntüleri ....                                                                                      | 52 |
| <b>Çizelge 4.5:</b> Mikro-FTIR ile elde edilmiş IV. Peynire ait mikroyapı görüntüleri .....                                                                                      | 53 |



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

|                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 2.1 :</b> Beyaz peynire ait mikroyapı görüntüleri. (a) SEM. (b) CLSM.....                                                                                                       | 9  |
| <b>Şekil 2.2 :</b> Klasik FTIR-ATR tekniği ile elde edilmiş peynir örneği FTIR spektrumu.....                                                                                            | 12 |
| <b>Şekil 2.3 :</b> Mikro-FTIR enstrümantasyonu.....                                                                                                                                      | 20 |
| <b>Şekil 2.4 :</b> Interferometrenin şematik gösterimi.....                                                                                                                              | 22 |
| <b>Şekil 2.5 :</b> Optik sistemde yer alan birincil ve ikincil ayna.....                                                                                                                 | 24 |
| <b>Şekil 4.1 :</b> I. peynir örneğine ait FTIR mikroyapı görüntüleri.<br>(A) Tarama görüntüsü. (B) Yağ bileşeni dağılımı. (C) Protein bileşeni dağılımı.....                             | 37 |
| <b>Şekil 4.2 :</b> I. peynir örneğine ait mikroyapı görüntülerinden alınmış spektrumlar.<br>(a) Bir noktasından. (b) İki noktasından.<br>(c) Üç noktasından. (d)Dört noktasından.....    | 39 |
| <b>Şekil 4.3 :</b> II. Peynir örneğine ait FTIR mikroyapı görüntüleri.<br>(A) Tarama görüntüsü. (B) Yağ bileşeni dağılımı. (C) Protein bileşeni dağılımı.....                            | 40 |
| <b>Şekil 4.4 :</b> II. peynir örneğine ait mikroyapı görüntülerinden alınmış spektrumlar.<br>(a) Bir noktasından. (b) İki noktasından.<br>(c) Üç noktasından. (d) Dört noktasından.....  | 42 |
| <b>Şekil 4.5 :</b> III. peynir örneğine ait FTIR mikroyapı görüntüleri.<br>(A) Tarama görüntüsü. (B) Yağ bileşeni dağılımı. (C) Protein bileşeni dağılımı.....                           | 43 |
| <b>Şekil 4.6 :</b> III. peynir örneğine ait mikroyapı görüntülerinden alınmış spektrumlar.<br>(a) Bir noktasından. (b) İki noktasından.<br>(c) Üç noktasından. (d) Dört noktasından..... | 45 |
| <b>Şekil 4.7 :</b> IV. peynir örneğine ait FTIR mikroyapı görüntüleri.<br>(A) Tarama görüntüsü. (B) Yağ bileşeni dağılımı. (C) Protein bileşeni dağılımı.....                            | 46 |
| <b>Şekil 4.8 :</b> IV. peynir örneğine ait mikroyapı görüntülerinden alınmış spektrumlar.<br>(a) Bir noktasından. (b) İki noktasından.<br>(c) Üç noktasından. (d) Dört noktasından.....  | 48 |
| <b>Şekil 4.9 :</b> Peynire ait mikroyapı görüntüleri. (a,c) Ezine peyniri FTIR mikroyapı görüntüleri. (b,d) Emmantel peynir CSLM mikroyapı görüntüleri.....                              | 54 |
| <b>Şekil 4.10 :</b> Peynire ait mikroyapı görüntüleri. (a,c) Ezine peyniri FTIR mikroyapı görüntüleri. (b,d) Çedar peyniri CSLM mikroyapı görüntüleri.....                               | 55 |
| <b>Şekil 4.11 :</b> Peynire ait mikroyapı görüntüleri. (a,c) Ezine peyniri FTIR mikroyapı görüntüsü. (b,d) İran beyaz peyniri SEM mikroyapı görüntüsü.....                               | 56 |
| <b>Şekil 4.12 :</b> Peynire ait mikroyapı görüntüleri. (a,c) Ezine peyniri FTIR mikroyapı görüntüleri. (b,d) İmitasyon peynir FTIR mikroyapı görüntüleri.....                            | 57 |



## **BEYAZ PEYNİRLERDE KİMYASAL KOMPOZİSYONUN MİKRO ÖLÇEKTE DAĞILIMININ MİKRO-FTIR İLE BELİRLENMESİ**

### **ÖZET**

Fourier Transform Infrared (FTIR) spektroskopisi, gıda kalitesi ve gıda bileşenlerinin analizinde giderek önem kazanmaktadır. Bu spektroskopik teknik hızlı ve tahribatsız olması, çok az veya hiç ön örnek hazırlama işlemi gerektirmemesi sebebi ile hem kalitatif hemde kantitatif gıda analizleri için ilgi çekici olmaktadır.

Klasik FTIR deneyleri gıdanın kimyasal kompozisyonu ve yapısını açıklamaktadır ve örnek bileşenlerinin konsantrasyonlarını göreceli olarak belirlemek için kullanılabilir. Ancak birçok gıda ürünü heterojen bir yapıya sahip olduğundan yapı ve konsantrasyon incelemeleri için geleneksel FTIR spektroskopisi yetersiz kalır. Gıdaların dinamik bir sistem olması ve bölgesel olarak kompozisyon farklılıkları göstermesi sebebi ile, gerçekçi bir bileşen analizi için mikro-ölçekte tanımlanmış bir bölge taranarak sonuçlar elde etmek daha açıklayıcı olacaktır. Son yıllarda optik bir mikroskop ile lineer tarayıcı ve düzlemsel odaklı dizin dedektörler içeren geleneksel FTIR spektrometrenin bir araya getirilmesi ile, mikro-ölçekte analizler yapabilecek mikro-FTIR olarak adlandırılan enstrümantasyon geliştirilmiştir.

Bu tez çalışması beyaz peynir gibi protein ve yağın değişik kompozisyonda ve geometride dağılım gösterdiği bir gıda sisteminin mikro-FTIR ile kimyasal görüntülenmesinin gerçekleştirilmesi üzerinedir. Peynirin mikroyapısı dokuyu ve fonksiyonel özellikleri belirleyen önemli bir faktördür ve ürünün kalitesini doğrudan şekillendiren parametrelerdendir. Peynirin mikroyapısı 200X200 mikron alan üzerinden her 6.25 mikronda bir sonuç elde edilecek şekilde incelenmiştir. Deneysel çalışmalarda dört farklı ticari firmadan elde edilen Ezine tipi beyaz peynirlerin her biri için beş örnek ile çalışılmış ve toplam 20 görüntü elde edilmiştir. Yağ bölgelerini temsilen IR spektrumun C-H ve C=O bölgeleri, protein için amid I ve amid II bölgeleri seçilmiştir. Taralı bölgede bu IR absorpsiyon bantlarının alan oranlaması ile kimyasal görüntüler elde edilmiş ve yağ ve protein dağılım haritası oluşturulmuştur.

Mikro-FTIR ile peynirdeki bileşenlerin boyutsal dağılımı ayrıntılı şekilde incelenebilmiş ve literatür ile karşılaştırıldığında, peynirin mikroyapısının protein matriksi içerisinde dağılmış farklı büyüklük ve şekillerdeki yağ globüllerinden oluşan bir yapı olduğu gösterilmiştir. Dört farklı ticari firmadan elde edilmiş Ezine peynirlerinin mikroyapıları incelenmiş ve karşılaştırılmıştır.



## **DETERMINATION OF CHEMICAL COMPOSITION DISTRIBUTION AT MICRO-SCALE IN WHITE CHEESES BY MICRO-FTIR**

### **SUMMARY**

Cheese is the generic name for a group of fermented milk-based food products, which is produced in a wide range of flavours and forms throughout the world. Ezine cheese is a class of white cheese which is produced and consumed in large amounts in our country. It has own unique characteristic properties due to the quality of the milk obtained from grazing animals in Ezine region near Dardanelles.

Microstructure is one of the main controlling factors of texture (firmness, softness, cohesiveness, rubberiness, elasticity, pastiness, crumbliness) and functional properties of cheese. For this reason, it is inevitable that food microstructure effects the product quality and macromolecular properties. The microstructure of cheese significantly affects processing characteristics, flavour properties and the texture. As texture and functional properties are significant quality requirements for consumers, microstructure analysis play an important role in the quality evaluation and manipulation of the cheese.

Cheese microstructure is the spatial arrangement of the casein particles that join together into clusters and chains thus forming a protein matrix where water, fat globules with different sizes and shapes, microorganisms and minerals dispersed in.

Cheese microstructure, has long been an interest to researcher and food industry, studied extensively using various microscopic techniques such as scanning electron microscopy, cryo-scanning electron microscopy, confocal laser scanning microscopy and fluorescence microscopy.

Cheese microstructure examination by scanning electron microscopy (SEM) allows high-resolution imaging of components such as fat globules, but SEM sample preparation procedures such as sectioning, fat extraction, chemical fixation are laborious and may produce artefacts. Cryo-SEM, involving freezing the sample in liquid nitrogen, has also been employed to imaging of cheese samples. This technique does not require chemical fixation or fat extraction, hence examination of high moisture samples becomes readily available. When confocal laser scanning microscopy was used, laser light penetrates to the surface of the sample without disturbing the internal structure so this technique can be used for imaging of very thin optical cross-sections at high resolution. Fluorescence microscopy utilizes very sensitive and specific fluorescent probes to elucidate chemical and structural data at relatively high resolution. This technique requires minimal sample preparation, which makes the technique an attractive tool, but fluorescence microscopy has one serious drawback; it is sensitive to environmental factors such as temperature, pH, and ionic strength. Quality characteristics of these techniques can be obtained only by carefully controlling these environmental factors.

FT-IR imaging is a recently conceptualized and developed approach that combines the image analysis ability of light microscopy and powerful chemical analysis by FT-IR spectroscopy. This combination of light microscopy and IR spectroscopy is called Micro-FTIR imaging system. The base of the system, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), increasingly gains importance in food quality and food component analysis, providing information at the molecular level. This spectroscopic technic is non-destructive, achieve analysis in a short time and requires little or no sample prepare. As the result of these properties it becomes interesting for both qualitative and quantitative food analyses. Conventional FTIR experiments reveal the chemical structure and composition of the food that can be used to predict concentration of species present in food.

However most of the food products have heterogeneous nature; therefore, it is difficult to conduct an exact structure and concentration analysis using a conventional FTIR spectroscopy system. IR spectroscopic imaging is the complete combination of IR spectroscopy with the optical sample visualization and greatly enhances the capabilities of the conventional IR spectroscopy. Spectral data can be presented as a picture or map, presenting chemical information simultaneously from thousands of pixels at a defined resolution (1.65 or 6.25 micron).

FTIR spectroscopic imaging is a powerful analytical technique and applicable to analysis a broad range of materials. It's possible to employ this technique in different scientific areas such as polymer applications, pharmaceutical applications, biomedical applications and food applications. In the field of polymer research, FTIR spectroscopic imaging is well suited to elucidate chemical functionality and the molecular conformation of polymers.

In pharmaceutical applications, by using FTIR imaging it's possible to get spectra from many different locations in the sample. Drugs exhibit polymorphic changes upon contact with the dissolution thus FTIR imaging is becoming a unique method for analyzing the distribution of a drug and its molecular structure as a function of time during dissolution.

In the biomedical area, FTIR spectroscopic imaging is particularly well suited to examining biomedical samples, this technique has the potential to provide significantly more information than standard protocols, samples do not need be stained or fixed, the technique is nondestructive and the method provides spatial localization of tissue components with high sensivity.

In the food science and technology area, vibrational spectroscopy has great importance for analyse of food and food components. Foods are naturally heterogeneous substances, however by homegenization and repeated point measurements make the conventional technique work for these samples. Nonetheless, using the IR imaging technique, there is a opportunity to work with heterogenous food systems.

The aim of this study is to investigate chemical structure of valuable Ezine cheese samples by using micro-FTIR, which is capable of obtaining chemical imaging of the sample in which protein and fat is dispersed in different composition and geometry. The microstructure of cheese is an important factor that determines functional and textural properties so the microstructure is one of the most important parameters that define the product quality directly.

In this thesis study, the microstructures of four different type Ezine cheeses were examined by using micro-FTIR imaging system. With the chemical images collected from the spectroscopic imaging system, dispersion of the main components of cheese such as protein and fat, throughout cheese microstructure was evaluated. The experiments were performed by using Perkin Elmer Spectrum 100 FTIR spectrometer equipped with a spotlight 400 chemical imaging system. This imaging system incorporates a high quality, intrinsically pure mercury cadmium telluride (MCT) detector system arranged as 16 individual, gold-wired infrared linear array fashions. All experiments performed at Attenuated Total Reflectance (ATR) mode utilizing an ATR imaging accessory with a germanium crystal.

Ezine white cheese samples obtained from four different commercial cheese manufacturers and for each of them five different samples were analysed. In the experimental part, cheese samples were sectioned in thin lines before all measurements. Data was collected over an area of 200 x 200 micron cross-section at 6.25 micron resolution. For the fat component, C-H and C=O and for the protein component amide I and amide II regions of the IR spectra were chosen for the representation of lipid and protein in cheese structure. Along the scanned region of sample, applying band area ratio technique to the selected IR absorption bands chemical images mapping the fat and protein dispersion was obtained. For imaging fat dispersion, C-H and C=O functional groups associated bands observed in the 1735-1739  $\text{cm}^{-1}$  and 2965-2854  $\text{cm}^{-1}$  region were utilized, for imaging protein dispersion, amide I and amide II functional groups associated bands observed in the 1654-1632  $\text{cm}^{-1}$  and 1545-1532  $\text{cm}^{-1}$  region were utilized. The same strategy was applied for all twenty samples and results were provided in detail.

A mapping result as shown in figure 4.1 shows first image A, scanning image related to the scanned region of the sample cross-section without any data treatment, second image B, fat dispersion in the microstructure and finally image C, protein dispersion in the microstructure. When fat dispersion was analyzed, red regions (strong band related region) within the image B, represents the parts of the cheese microstructure where fat exists and the violet regions represent the parts of the cheese microstructure where fat doesn't exist. Similarly, when protein dispersion was analyzed, red regions within the image C, represents the parts of the cheese microstructure where protein exists and the violet regions represent the parts of the cheese microstructure where protein is not present. Comparing these two images mapped against fat and protein, it has been seen that two images are obviously complementary with each other.

In conclusion, it is found that the cheese microstructure is a structure that is composed of fat globules with different size and shapes dispersed in protein matrix (table 4.2, 4.3, 4.4, 4.5). When we compare all four types of Ezine cheese, for the first type, fat clusters in small sizes in protein matrix with different dispersing characteristic and lacks in uniformity. For the second and third types of Ezine cheeses, relatively larger fat clusters are dispersed in protein matrix and with a better uniformity. For the fourth type of Ezine cheese, more larger fat clusters were observed in protein matrix with poor uniformity.

.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Peynir, dünya genelinde, lezzet, doku ve biçim yönünden geniş çeşitlilikte üretilmekte olan fermente olmuş süt bazlı gıda ürünüdür. Peynirin faydalı bir besin niteliğine sahip olması, kullanımındaki uygunluk, esneklik, lezzet ve yapı açısından geniş çeşitliliğe sahip olması gibi birçok sebep peynir tüketiminde artış meydana getirmektedir [1].

Ezine peyniri ise beyaz peynir grubundan olup, üretiminin yapıldığı coğrafi bölgenin kazandırdığı karakteristik özellikler ile birlikte kendine özgü, özel bir tat ve aromaya sahiptir. Peynirin mikroyapısı, peynir dokusunu ve fonksiyonel özelliklerini belirleyici en önemli faktörlerden biridir. Dolayısıyla peynirin yapısal organizasyonu önemli bir faktördür ve nihai ürünün kalitesini belirleyici niteliktedir.

Vibrasyonel spektroskopinin gıda analizlerindeki başarısı genel özellikleri ile ilişkilidir. Bu özellikler tekniğin hızlı olması, çok az veya hiç örnek ön işleme gerektirmemesi, bir çok uygulamada hem kalitatif hem kantitatif bilgi elde edilebilmesidir. Mikro-FTIR spektroskopik görüntüleme tekniği kullanılarak çeşitli ezine peynir örneklerinin incelenmesi gerçekleştirilmiştir.

Mikro-FTIR analizleri ile peynirin yapısındaki başlıca bileşenlerinin boyutsal dağılımının incelenmesinde öncelikle tarama görüntüsü elde edilmiştir. Peynirin başlıca bileşenleri olan protein ve yağın mikroyapı içerisindeki dağılımı görüntülenirken, yağ bileşeni için C-H ve C=O gruplarından yararlanılmış, protein bileşeni için amid I ve amid II gruplarından yararlanılmıştır. Grupların absorpsiyon yaptığı aralıklar tarama görüntüleri üzerinde işaretlenerek, mikroyapı içerisinde peynir bileşenlerinin dağılımı incelenebilmiştir.



## **2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI**

### **2.1 Peynir**

Peynir, dünya genelinde, lezzet, doku ve biçim yönünden geniş çeşitlilikte üretilmekte olan fermente olmuş süt bazlı gıda ürünleri grubunun jenerik ismidir. Peynirin dünya genelinde üretimi yılda yaklaşık olarak  $15 \times 10^6$  tondur (toplam süt üretiminin %35 kadarı) ve son 30 yıl içerisinde ortalama yıllık artış hızı %4 civarındadır. Peynirin faydalı besin niteliğine sahip olması, kullanımındaki uygunluk, esneklik, lezzet ve yapı açısından geniş çeşitliliğe sahip olması gibi birçok sebep peynir tüketimindeki artışı meydana getirmektedir [1].

Peynir süt ürünlerinin en çok çeşitlilik içeren ve muhtemelen akademik olarak en ilginç ve zor olan grubudur. Birçok süt ürünü uygun şekilde üretilip muhafaza edildiği sürece biyolojik, biyokimyasal ve kimyasal olarak değişim göstermezken peynirler bunun tersine, biyolojik ve biyokimyasal olarak aktiftirler ve dolayısıyla depolanma süresince lezzet, doku, ve fonksiyonellik açısından değişimlere uğrarlar [2]. Olgunlaşma süresince oluşan peynir lezzeti tüketici tarafından değerlendirilen en önemli karakteristiklerden birisidir ve peynirin kalite ve kabul edilebilirliği yönünden önemli bir role sahiptir [3]. Ürünün kalite ve başarısı duyu kalite ile esaslı bir şekilde ilişkilidir [4].

#### **2.1.1 Ezine peyniri**

Ezine peyniri tam yağlı, salamurada olgunlaştırılan peynirler grubundan olup beyaz peynir standardına uygun olarak üretilmektedir [5]. Ezine peyniri Kaz Dağlarının kuzey ve batı kesimlerinde yer alan Ezine, Bayramiç ve Ayvacık ilçelerinin tamamı ile Çan ve Merkez ilçeye bağlı bazı köyleri kapsayan yörede üretilmektedir. Ezine peyniri, belirtilen bu coğrafyanın doğal bitki örtüsü ve su kaynaklarıyla beslenen keçi, koyun ve ineklerden elde edilen sütlerin mevsime göre belirli oranlarda karıştırılmasıyla elde edilmektedir. Bu oran keçi sütü için en az % 40, koyun sütü için % 45–55 ve inek sütü için de en fazla % 15 olmaktadır [6].

Duyusal özellikleri yönünden değerlendirildiğinde ezine peyniri, beyaza dönük açık sarı renkte olup orta sertlikte ve kırılgan olmayan bir yapıdadır. Az sayıda ve küçük çaplı gözeneklere sahiptir. Ezine peyniri, koyun, inek ve keçi sütleri olmak üzere her üç tür sütünde mevsimine göre belirli oranlarda karıştırılmasıyla üretilmektedir. Üretimin yapıldığı bölge hem bitki örtüsü hemde iklim yönünden Kaz Dağlarından etkilenmektedir. Kaz Dağları bölgeye bol yağış , zengin bir bitki örtüsü ve bol oksijen sağlamaktadır. Bitki örtüsü mercanköşk, güveyi otu, adaçayı, tüylü nane, oğul otu, ve kekik başta olmak üzere yüzlerce kokulu bitkiyi içermektedir. Süt hayvanlarının tümü doğal olarak beslenmektedir. Hayvanların yediği yem doğrudan sütün tadını ve aromasını etkilemektedir dolayısıyla bu durum ezine peynirine çok özel ve kendine özgü bir tat ve aroma kazandırmaktadır [6].

#### **2.1.1.1 Ezine peyniri üretimi**

Koyun, keçi ve inek sütlerini içeren karışım 67<sup>0</sup> C’ de 30 dk pastörize edilmektedir. Pastörize edilmiş süt karışımı, buzağuların midesinden elde edilmiş olan şirden enzimi ile mayalanmaktadır. Mayalanma sonucu oluşan pıhtı kitlesi peynir suyunun ayrılması için kesilir ve süzölmek üzere içinde özel bir bez serili olan kalıplara yerleştirilir. Süzme işleminin hızlandırılması amacı ile kalıpların üzerine basınç uygulanır. Bu işlemle birlikte oluşan pıhtı kendi içerisinde kaynaşır ve teleme oluşumu gerçekleşir. Oluşan teleme kalıplar halinde kesildikten sonra istenen tat ve aromanın kazandırılması amacıyla deniz tuzundan hazırlanmış olan salamurada bekletilmektedir. Salamuradan çıkarılan peynir kalıpları tenekelere dizilir, üzerlerine kuru tuz serpilir ve 10-12 saat dinlenmeye bırakılır. Bu işlem sonucunda ayrılan tuz ortamdan uzaklaştırılır, tenekeler dolana kadar peynir dizilir ve üzerine salamura ilave edilerek tenekeler kapatılır son olarak hava almayacak şekilde lehimlenir. Peynirin istenen karakteristik, tat ve aromayı kazanması amacıyla peynir tenekeleri 2-4<sup>0</sup> C sıcaklıktaki soğuk hava depolarında en az sekiz ay süreyle olgunlaştırılır [6]. Ezine peynirinin üretiminde keçi, koyun ve inek sütü karışımının kullanılması, başlatıcı kültür kullanılmaması ve üretiminin geleneksel yöntemle gerçekleştirilmesi Ezine peynirini ayrıcalıklı kılan özellikleridir [7].

### **2.1.2 Peynirin mikroyapısı**

Mikroyapı, peynir dokusunu (sertlik, yumuşaklık, yapışkanlık, elastiklik, macunsuluk, ufalanabilirlik) ve fonksiyonel özelliklerini belirleyici en önemli faktörlerden biridir. Ayrıca fizikokimyasal, taşınımsal ve besinsel peynir özelliklerini de etkilemektedir [8].

Mayalanma ile üretilmiş peynir, temel olarak kısmen birleşmiş para-kazein topraklarına ilişkin iplikçiklerin çapraz bağlanması veya üst üste gelerek birleşmesi ile oluşmuş bir  $\text{CaPO}_4$ - para kazein matriksidir. Matriks gözenekleri içerisinde, yağ globülleri (değişen birleşme derecelerinde), nem, çözülmüş maddeler (mineraller, laktik asit, peptidler ve aminoasitler) ve enzimler (örneğin, artan maya ve proteinaz) sıkıca tutulmaktadır [9]. Protein matriksinin görünümü, protein matriksi içerisinde dağılmış halde bulunan değişken büyüklük ve şekillerdeki çok sayıda yağ globüllerini içeren sünger benzeri bir yapı olarak gözlemlenmiştir [10]. Peynirin yapısal organizasyonu önemli bir faktördür ve nihai ürünün kalitesini belirleyici niteliktedir [11].

Kısaca, peynirin mikro yapısı kazein misellerinin kümeler halinde bir araya gelerek, zincirlenmesi sonucu vizko elastik bir protein ağına oluşumu ile meydana gelir. Bu protein ağı içerisinde dağılmış bir şekilde nem, yağ globülleri, mineraller ve bakteriler bulunmaktadır [12].

#### **2.1.2.1 Mikroyapı analizi için kullanılan yöntemler**

Peynirin mikroyapı incelemelerinin gerçekleştirilmesi amacı ile çeşitli mikroskopik teknikler kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan teknikler elektron mikroskopisi ve optik mikroskopisidir. Elektron mikroskopisi, taramalı elektron mikroskopi (SEM), transmisyon elektron mikroskopi (TEM) ve cryo-scanning elektron mikroskopisi tekniklerini kapsamaktadır. Optik mikroskopisi ise, konfokal lazer tarama mikroskopisi (CLSM) ve floresan mikroskopisi tekniklerini kapsamaktadır [13,14].

FTIR görüntüleme tekniği ise son zamanlarda gelişmekte olan bir tekniktir, bu teknikte optik mikroskopinin görüntü analizi ile FT-IR spektroskopinin kimyasal analizi birleşmektedir dolayısıyla FTIR görüntüleme tekniği belirli bileşenleri ve bu bileşenlerin örnek içerisindeki lokalizasyonlarını tespit etmek amacı ile başarılı bir şekilde kullanılabilir [14].

Peynirin mikroyapısı daha çok, taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile incelenmiştir. Bu teknik yağ globülleri gibi bileşenleri yüksek çözünürlükte görüntüleme imkanı sağlamaktadır. Fakat SEM, zahmetli bir tekniktir çünkü örnek hazırlama prosedürleri yağ ekstraksiyonu, kimyasal sabitleme gibi işlemleri içermektedir. Ayrıca bu tekniğin kullanıldığı durumlarda protein, yağ ve nişasta gibi çeşitli katkıların kesin bir şekilde belirlenmesi her zaman mümkün olmayabilir. Bu teknik kullanılarak çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir [13,14]. Karami ve arkadaşları ultra-filtrelenmiş beyaz peynirin hızlandırılmış olgunlaştırılması süresince mikroyapısal özelliklerindeki değişimleri incelemişlerdir, elde edilen SEM görüntülerinde, üç günlük olgunluğa sahip beyaz peynirde, kazein ağının porlu yapısı ve bu ağ tarafından yağ globüllerinin çevrelendiği gözlemlenmiştir. Bu görüntülerden yola çıkarak peynirin yapısındaki yağ globüllerinin farklı büyüklük ve şekillerde bulunduğu kanısına varılmıştır. Enzim eklendiği durumda ise yağ globüllerinin sayısının ve dağılım alanlarının azaldığı gözlemlenmiştir bu durum ise lipaz enziminin etkisiyle lipolizin hızlanması ve yağ globüllerinin hidrolizlenmesi ile ilişkilendirilmiştir [15]. Madadlou ve arkadaşları farklı konsantrasyonlarda maya kullanılarak yapılmış olan az yağlı İran peynirinin mikroyapısını SEM ile incelemiştir, elde edilen görüntülerde, tam yağlı peynirin yağ globülleri tarafından kaplanan boşlukları sebebi ile daha açık protein matriksine sahip olduğu, az yağlı peynirdeki yağ globülü sayısının daha az olduğu ve daha sıkı bir protein matriksinin olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca az yağlı peynir için, kullanılan maya konsantrasyonun iki katına çıkarılması durumunda duysal ve dokusal özelliklerde gelişme, eriyebilirlik özelliğinde ise artma gözlemlenmiştir bu durum ise proteoliz hızındaki artış ile ilişkilendirilmiştir [16]. Lobato- Calleros ve arkadaşları, Panela tipi beyaz peynire süt yağı yerine kullanılabilecek katkı maddelerinin ilave edilmesi durumunda mikroyapısal ve dokusal olarak meydana gelebilecek değişimleri gözlemlemişlerdir, hem kanola yağı hem düşük metoksilli pektin kullanıldığı durumda daha sıkı protein ağı, daha küçük gözenek büyüklükleri gözlemlenmiş, az yağlı peynir ile benzer mikroyapı görüntüleri elde edilmiştir [17]. Alvarez ve arkadaşları SEM görüntüleme tekniğini kullanarak nişasta ve lesitin ilave edilerek yapılmış beyaz peynirin yapısal, fizikokimyasal ve duysal özelliklerini incelemişlerdir, mikroyapısal olarak, az yağlı ve yağı azaltılmış, az yağlı olup hem nişasta hemde lesitin ile modifiye edilmiş beyaz peynirlerde büyük protein agregatları gözlemlenmiştir bu durum yağın azaltılması sonucu kazein misellerinin

daha fazla birleşmesi ile ilişkilendirilmiştir, nişasta SEM görüntülerinde gözlemlenememiştir, bu durum ise nişastanın protein matrisi içerine gömülmüş olması ile ilişkilendirilmiştir, benzer şekilde lesitinde mikroyapı içerisinde görüntülenememiştir [18].

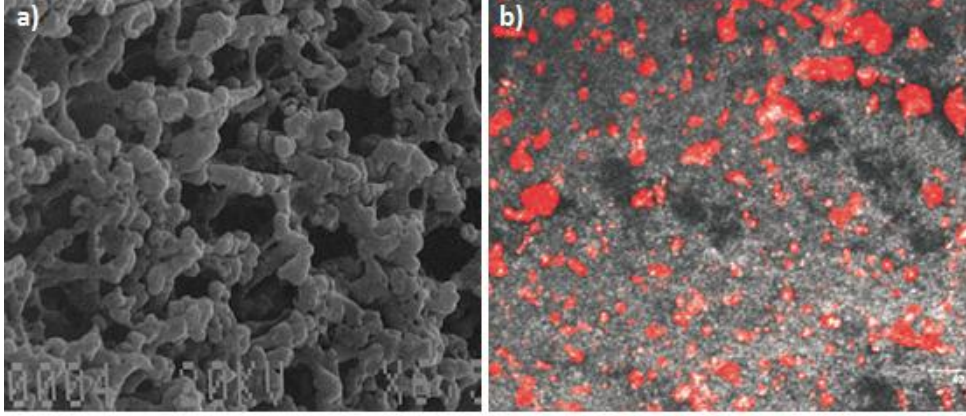
Cryo-tarama elektron mikroskopisi SEM ile çalışılırken meydana gelebilecek sorunlara çözüm sağlayabilmektedir. Bu teknik ile, nemli örnekler ani dondurularak stabilize edilmektedir, kimyasal sabitleme veya yağ ekstraksiyonu gerekmemektedir, dolayısıyla cryo-SEM için hazırlanmış olan örnekler sadece kısmı olarak su kaybederler. Şartlar daha kontrollü olduğundan, yüksek nem içeren bileşenlerin incelendiği durumlarda daha doğru bilgi elde edilebilmektedir. Bu teknik kullanılarak çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir [13,14]. Hassan ve arkadaşları süt ürünlerinde bakteriyel egzopolisakkariti (EPS) cryo-SEM tekniğini kullanarak incelemiştir. EPS üreten ve üretmeyen kültürler kullanılarak Karish peynirleri yapılmıştır. Bu peynir türünde EPS protein ağından ayrılmış geniş porlar içerisinde lif kütleleri olarak gözlemlenmiştir. EPS üretmeyen kültür kullanılarak beyaz peynir yapılmış, protein ağı içerisinde tutulmuş yağ globülleri gözlemlenmiştir. EPS üreten kültür kullanılarak yapılan beyaz peynir, geniş porlara sahip açık bir yapı olarak gözlemlenmiş ayrıca gözeneklerde kısmen veya tamamen ağ yapıda donmuş su gözlenmiştir. EPS üreten kültürler kullanılmadan yapılan peynirlerin mikroyapıları geniş porlar içermemekte ve sıkı bir görünüm sergilemektedir. Ayrıca kazein misel agregatları daha birleşik yapıda, yağ globülleri ise daha az miktarda gözlemlenmiştir [19].

Optik mikroskopisi (LM) gıda ürünlerinin mikroyapılarını değerlendirmek amacı ile laboratuarlarda sıklıkla kullanılmaktadır, LM, globüller veya lifler gibi yapısal ayrıntıların hızlıca tanımlanmasına ve seçici boyama prosedürleri gibi işlemlerle protein ve yağ gibi bileşenlerin tanımlanmasına imkan sağlamaktadır fakat LM görüntülerinin çözünürlüğü SEM ile kıyaslandığında düşüktür. Konfokal lazer tarama mikroskopisi optik mikroskopi tekniğidir, gıda örneğinin iç yapısı bozulmadan, yüzeyine penetrasyon sağlanarak ince optik kesitlerin yüksek çözünürlükte görüntülenmesi sağlanır [13,14]. Peynirin mikroyapısının görüntülenmesi amacı ile bu teknik kullanılarak çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Hassan ve arkadaşları konfokal lazer tarama mikroskopisi tekniği ile farklı kültürler kullanılarak yapılan beyaz peynirlerin mikroyapılarını incelemişlerdir, ilave edilen

kültür türünün hem yağ globüllerinin hem porların büyüklük ve dağılımlarını etkilediğini gözlemlemişlerdir, egzopolisakkarit üreten kültürün ilave edildiği durumda büyük porların, yağ globüllerinin ve büyük protein agregatlarının olduğu gözlemlenmiştir [20]. Ding ve Gunasekaran, Çedar peynirinde yağ globüllerinin üç boyutlu özelliklerini incelemişlerdir. Az yağlı peynirdeki yağ globüllerinin, çok az yağlı peynirdekine göre daha büyük olduğu fakat çok az yağlı peynirde daha fazla sayıda yağ globülü olduğu saptanmıştır. Globüllerin daireselliğinin ise yağ bileşiminin azalması ile arttığı gözlemlenmiştir. Tam yağlı peynirin daha büyük, daha az dairesel ve küresel yağ globüllerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Az yağlı peynirlerde ise protein matriksi yapıda baskın olarak gözlemlenmiş ve yağ globüllerinin daha sıkı tutulduğu ve hem şekil hemde büyüklük olarak değişime uğramalarının engellendiği düşünülmüştür [21]. Lopez ve arkadaşları konfokal lazer tarama mikroskopisi tekniğini kullanarak Emmental peynir üretimi ve olgunlaşması süresince sütün mikroyapısındaki değişimleri gözlemlemişlerdir Emmental peynirdeki yağın temel halleri, süt yağının globül zarı ile çevrilmiş küçük yağ globülleri, yağ globülü kümeleri ve protein matriksi içerisindeki boşluklar içerisindeki serbest yağ havuzları olarak gözlemlenmiştir [22]. Roger ve arkadaşları farklı yağ bileşimlerinde yapılmış olan çedar peynirlerinin reolojik özelliklerini ve mikroyapılarını incelemişlerdir [23].

Floresan mikroskopi tekniğinde, kimyasal ve yapısal bilgiyi elde etmek amacı ile çok hassas ve spesifik floresan problemleri kullanmaktadır, yüksek çözünürlük sağlanmakta ve minimum örnek hazırlığı gerektirmektedir, dolayısıyla uyumlu ve etkin bir tekniktir. Dezavantajları ise sıcaklık, pH, iyonik gerilim gibi çevresel faktörlere hassas olmasıdır ve örnek içerisindeki bileşenlerin belirlenebilmesi için boyama işlemi gerçekleştirilmelidir [24]. Bu teknik kullanılarak peynirin mikroyapısının incelendiği çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Sutheerawattananonda ve arkadaşları floresan mikroskopiyi kullanarak  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  ve  $\text{NaCl}$  kullanılarak üretilen peynirin floresan görüntü analizini gerçekleştirmişlerdir.  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  ve  $\text{NaCl}$  kullanıldığı durumda, yağ globülü büyüklüğü ve şekillerinde meydana gelen değişimler gözlemlenmiştir.  $\text{NaCl}$  kullanıldığı durumda yağ globüllerinde daha düşük dairesellik ve pişirme süresince değişmeyen büyüklük gözlemlenmiştir,  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  kullanıldığı durumda ise yağ globülleri daha dairesel olarak gözlemlenmiş ve pişirme süresince büyüklükleri azalmıştır [24].

Şekil 2.1’ de beyaz peynirin mikroyapı görüntüleri verilmiştir. Şekildeki a görüntüsü elektron tarama mikroskopisi, b ise konfokal lazer tarama mikroskopisi tekniği ile elde edilmiştir.



**Şekil 2.1** Beyaz peynire ait mikroyapı görüntüleri. (a) SEM. (b) CSLM [18,20].

## 2.2 Infrared Spektroskopisi

IR spektroskopisi katı sıvı veya buhar halindeki bir maddeden kalitatif ve kantitatif bilgi elde edilmesi amacı ile kullanılmakta olan analitik bir tekniktir. IR spektroskopisi, madde ile infrared radyasyonunun, foton frekansının bir fonksiyonu olarak etkileşmesi sonucu meydana gelen bir çalışmadır. Bu etkileşim absorpsiyon, emisyon, refleksiyon formlarını alabilmektedir. Spektrumun infrared bölgesindeki elektromanyetik ışımının, moleküler olarak soğurumu sonucunda en düşük (temel) elektronik enerji seviyesindeki rotasyonel ve vibrasyonel enerji seviyeleri arasındaki geçişler artmaktadır. Bu vibrasyonel modlar arasındaki geçişlerin IR radyasyonu ile arttırılabilmesi için vibrasyonel hareket süresince moleküler elektriksel dipol momentte değişim meydana gelmelidir [25,26].

IR bölgesi üç kısma ayrılabilir. Bu kısımlar uzak IR bölgesi, orta IR bölgesi ve yakın IR bölgesi olarak bilinmektedir. Uzak IR bölge  $20-400\text{ cm}^{-1}$  aralığını kapsamaktadır. Bu bölge C, N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> ve F ile daha ağır atomların doymamış sistemlerdeki ilave eğilme vibrasyonlarını içermektedir. Bu bölge izomerlerin organometaliklerin ve atomları ağır ve bağları zayıf olan organik bileşenlerin çalışılması için elverişlidir.

Özellikle,  $400-4000\text{ cm}^{-1}$  aralığı, kimyasal analizler açısından en çok ilgi çeken bölgedir. Bir maddenin orta IR spektrumu etkin olarak eşsiz bir parmak izidir böylece referans bir spektrumla kıyaslama yoluyla maddenin belirlenmesi amacıyla kullanılabilir. Orta IR bölge bir vibrasyonel modun en düşük enerji halinden ilk uyarılmış hale geçtiği temel geçişlere tekabül etmektedir. Bu bölge organik bileşenlerin hemen hemen tüm kimyasal gruplarının temel vibrasyonlarına karşılık gelen frekansları içermektedir. Spektrumlar dar ve keskindir bu durum spesifik özelliğe karşılık gelen bir bandın belirlenmesini ve görüntülenmesini mümkün kılmaktadır. Sonuç olarak orta IR aralıkta gerçekleştirilen kantitatif kalibrasyonlar genellikle açık ve güçlüdür [25,26].

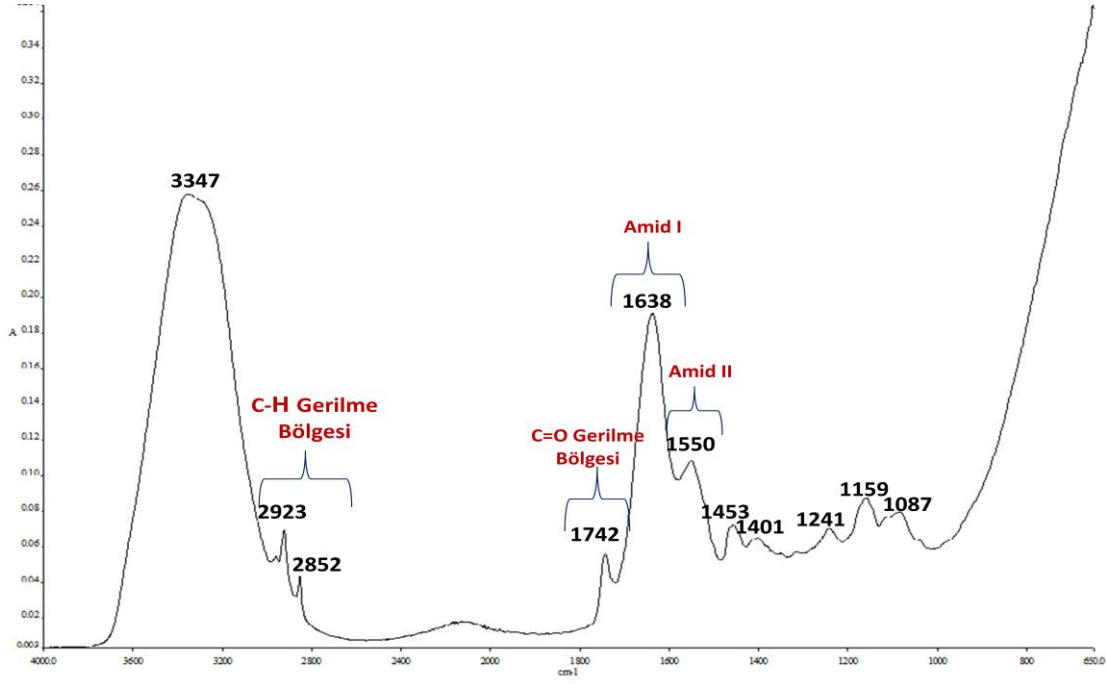
Bir örneğin infrared spektrumundaki absorpsiyon bandları, örnekteki moleküllerin vibrasyonel modlarının uyarılmasını ifade eder böylece moleküllerdeki birçok kimyasal bağ ve fonksiyonel grupla ilişkilendirilmektedir [26].

Triaçilgliseroller ve proteinler gibi gıda bileşenleri dikkate alındığında, yağ asitlerinin açıl zinciri başlıca  $3000-2800\text{ cm}^{-1}$  aralığındaki absorpsiyondan sorumludur, oysaki peptidik bağ  $-C(=O)NH-$  başlıca  $1700-1500\text{ cm}^{-1}$  aralığında gerçekleşen absorpsiyondan sorumludur. Orta IR bölgedeki absorpsiyon bantlarının çoğu belirlenmiştir ve kimyasal gruplarla ilişkilendirilmiştir. Triaçilgliserol ester bağı  $C-O$  ( $\sim 1175\text{ cm}^{-1}$ ),  $C=O$  ( $\sim 1750\text{ cm}^{-1}$ ) grubu ve açıl zinciri  $C-H$  ( $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ ) dalgaboyları genel olarak yağı belirlemek için kullanılmaktadır.  $3000-2800\text{ cm}^{-1}$  bölgesinde görülen infrared bantları özellikle faydalıdır çünkü fosfolipid açıl zincirlerinin konformasyon ve düzenlenişine hassastırlar. Fourier transform infrared spektroskopisinin gelişimi protein yapısı, protein- protein, protein-lipid etkileşimleri hakkında eşsiz bilgi elde edilmesi olanağını desteklemektedir. Amid I, II ve III bantlarının ( $1700-1500\text{ cm}^{-1}$ ) proteinin tamamen sahip olduğu konformasyona hassas olduğu bilinmektedir. Amid I bandı  $\sim 1655\text{ cm}^{-1}$ , amid II bandı  $\sim 1560\text{ cm}^{-1}$ , amid III bandı  $\sim 1300\text{ cm}^{-1}$  frekanslarında gözlemlenmektedir. Su  $3360\text{ cm}^{-1}$  ( $H-O$  gerilme bandı) de merkezlenmiş,  $2130\text{ cm}^{-1}$  (su asosiasyon bandı) ve  $1640\text{ cm}^{-1}$  ( $H-O-H$  eğilme vibrasyonu) belirgin bantlarla çok güçlü bir infrared absorblayıcıdır. Karbonhidratlar da gıdalarda bulunan diğer önemli molekülerdir. Karbonhidratların orta IR spektrumları dört ana absorbands bölgesi göstermektedir.  $3220\text{ cm}^{-1}$  civarında glukozun  $O-H$  bağı geriliminden kaynaklanan yoğun bir bant gözlenmektedir.  $C-H$  bağı  $1470\text{ cm}^{-1}$  ve  $1380\text{ cm}^{-1}$  de asimetric ve simetric eğilme bantları göstermektedir.

C-C ve C-O titreşimlerine tekabül eden bantlar  $1100\text{ cm}^{-1}$ ’ de gözlemlenmektedir.  $920\text{ cm}^{-1}$ ’ e yakın olan bölgede ise C-O-C asimetrik gerilim vibrasyonları gözlemlenmektedir [26]. Yakın IR bölge ise elektromanyetik spektrumun görünür ve orta IR bölgeleri arasında yer almaktadır. Dalgaboyu aralığı  $4000\text{--}14500\text{ cm}^{-1}$  ‘dir. Bu bölge bir fotonun temel haldeki normal bir titreşim modunu uyarması ile, ikinci veya daha yüksek uyarılmış vibrasyonel hal geçişlerinin, ve bir fotonun simultane olarak iki veya daha fazla vibrasyonel modları ( örneğin kombinasyon bantları) uyarması ile oluşan geçişlerin meydana geldiği aralıktır. Bu bölge genellikle, O-H, N-H ve C-H sistemleri halinde hidrojen atomları ile ilişkilidir. Kısa dalgaboyu ve yüksek enerjiye sahip olması sebebiyle yüksek penetrasyon gücüne sahiptir ve bölge, biyolojik örnekler için çok elverişlidir [26]. Çizelge 2.1’ de gıdaların infrared spektroskopisi ile orta infrared bölgede kantitatif olarak analizinde bazı önemli bileşenlerin absorpsiyon bantları tablo halinde verilmektedir. Şekil 2.2’ de ise klasik FTIR-ATR tekniği ile elde edilmiş ezine peynir örneğinin FTIR spektrumu verilmiştir.

**Çizelge 2.1:** Önemli gıda bileşenlerinin orta infrared spektroskopisi ile kantitatif olarak analizlenmesinde yararlanılan absorpsiyon bandları ve spektral bölgeler [62].

| Bileşen Türü      | Absorpsiyon Frekansı( $\text{cm}^{-1}$ ) | Bağ Türü                |
|-------------------|------------------------------------------|-------------------------|
| Su                | 3600-3200                                | O-H Gerilme             |
| Yağ               | 3007-3012                                | C-H Gerilme             |
| Yağ, Karbonhidrat | 2980-2800                                | C-H Gerilme             |
| Yağ               | 1745-1725                                | C=O Gerilme(ester bağı) |
| Protein           | 1700-1600                                | Amid I                  |
| Su                | 1650                                     | H-O-H                   |
| Protein           | 1565-1520                                | Amid II                 |
| Yağ               | 967                                      | C=C-H bandı             |



**Şekil 2.2 :** Klasik FTIR-ATR tekniği ile elde edilmiş peynir örneği FTIR spektrumu.

Peynir kompozisyonun belirlenmesine yönelik mevcut metodlar vakit alan, pahalı, zararlı organik çözücülerin kullanımını gerektiren metodlardır. Infrared spektroskopisi hızlı ve masrafsızdır ayrıca gıda bileşenlerinin yüksek işlem hacmi ile analizlenmesine elverişli olan hassas bir teknolojiye sahiptir [3]. Bu nedenle peynir konusunda infrared spektroskopisi kullanılarak geniş çeşitlilikte çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çalışmaların çoğunda FTIR-ATR tekniği kullanılmıştır.

Çeşitli peynir üreticilerinden elde edilen Gravyer peynirleri ATR tekniği ile incelenmiş, elde edilen spektral bilgiler ile istatistiksel bir sınıflandırma modeli kullanılarak, peynir örnekleri duyusal özellikleri, üretici ve üretim bölgesi yönünden ayırd edilebilmiştir [3]. Gravyer peynirinin olgunlaşması süresince yardımcı kültürlerin etkilerinin incelenmesi amacı ile infrared spektroskopisinden yararlanılmıştır, yardımcı kültür olarak *L.casei* kullanıldığı durumda, olgunlaşma sürecinde daha belirgin kompozisyonel farklılıkların oluştuğu gözlemlenmiştir [27]. Onaltı farklı çedar peynir örneği üreticilerden temin edilmiş 67 gün boyunca olgunlaştırılmış, ATR-FTIR tekniği kullanılarak incelenmiş ve elde edilen spektral bilgiler kompozisyon ve lezzet ile ilişkilendirilmiştir ayrıca peynirin yağ, tuz, nem ve pH gibi kalite skorları 20 dk'dan kısa bir süre içerisinde tahmin edilebilmiştir [28]. Kamembert tipi küfle olgunlaşmış yumuşak peynirler, olgunlaşma olgusunun orta-infrared spektroskopisi ile incelenme potansiyelinin değerlendirilmesi için ATR-

FTIR tekniği kullanılarak incelenmiştir, istatistiksel yöntemler ile elde edilmiş tahmin modelleri ile peynirin olgunlaşma süresi yaklaşık bir günlük hata ile tahmin edilebilmiştir. [29]. Hızlı ve kolay, çözücü ekstraksiyon metodunun ATR-Fourier transform infrared spektroskopisi ile kombine edilmesiyle edar peynir örnekleri lezzet yönünden, ekşi, fermente, kirli gibi spesifik lezzet notalarına göre değerlendirilebilmiştir [30]. 12 farklı edar peynir rneği 73 gün olgunlaştırılmış ve örnekler 7, 15, 32, 46 ve 73. günlerde ATR-FTIR tekniği kullanılarak incelenmiştir, 20 aminoasit, 3 organik asit, yaş ve olgunlaşma süresince meydana gelen biyokimyasal değişimler gözlemlenebilmiştir [31]. Tam yağlı edar peyniri ve çeşitli oranlarda yağı azaltılmış edar peynirinin spektrumları yağ ve protein bileşenlerinin belirlenmesi amacı ile olgunlaşma sürecinde infrared spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir, peynir örneklerinin yağ ve protein bileşimi belirlenmiştir [32]. Peynirde lezzet yönünden önemli lezzet kaynağı olan kısa zincirli yağ asidi bileşiminin belirlenmesi amacı ile gravyer peyniri Fourier transform infrared spektroskopisi ve kemometri kullanılarak, incelenmiştir ve peynirin suda çözünen fraksiyonunda kısa zincirli yağ asidi bileşimi doğru bir şekilde tahmin edilmiştir [33]. İşlem görmüş deneysel peynir örneklerinin dokusal özelliklerini değerlendirmek üzere yakın-IR spektroskopisinden yararlanılmıştır, spektral bilgi peynir örneklerinin duysal ve dokusal özellikleri ile ilişkilendirilmiştir [34]. Emmental peynirin coğrafik kökeninin belirlenmesi amacı ile dört farklı ülkeden seçilen peynir örnekleri infrared spektroskopisi ile analizlenmiş, istatistiksel programlar kullanılmış ve İsviçre Peyniri, orta-IR transmisyon spektrumlarının kullanıldığı durumda %100 doğruluğa sahip bir sınıflandırma ile diğer peynir türlerinden ayırd edilmiştir [35].

IR lmleri için iki farklı türde ticari ölçüm cihazı mevcuttur. Bunlar dağıtıcı/ filtre bazlı ve Fourier Transform spektrometreleridir.

Dağıtıcı spektrometreler; 1940'dan beri yakın-IR ve orta-IR bölgede ölçüm yapabilmektedir. bir spektrometre ışın kaynağı, monokromatör ve bir dedektörden oluşmaktadır. Dağıtıcı ışın kaynağı birçok spektrometrede bir global lambadır, orta IR bölge için SiC'den, yakın IR bölge için ise tungsten halojen lambadan yapılmıştır. Monokromatör olarak ise NaCl, KBr gibi maddelerden yapılmış bir prizma kullanılmaktadır. Prizmanın amacı ise radyasyonu bileşen dalgaboylarına

ayırımıdır. Dedektör orta-IR bölge için deuterated triglycine sulfate (DTGS) ve yakın-IR bölge için silikon ve PbS' dir.

Fourier Transform Infrared Spektrometresi; üç temel komponente sahiptir, bunlar bir ışın kaynağı, bir dedektör ve bir Michelson interferometredir. FTIR' da kullanılan ışın kaynağı IR bölge için seramik bir element ve SiC çubuktur her ikisi de yaklaşık 1100°C de çalışır. Çoğu FTIR spektrometrelerde ışın kaynağı olarak SiC element bulunmaktadır. Yakın-IR bölge için sıklıkla tungsten halojen lamba kullanılmaktadır, temel olarak iki farklı türde dedektör kullanılmaktadır, orta-IR bölgede DTGS gibi termal bir dedektör ve HgCdTe dedektör kullanılmaktadır. Yakın IR bölgede kullanılan dedektör ise silikon ve PbS'dir.

FTIR spektrometrenin dağıtıcı olana göre temel avantajı yüksek sinyal/gürültü oranıdır. Bunu sebebi tüm radyasyon frekanslarının dedektöre aynı zamanda ulaşması ve bütün dalgaboyu elementlerinin şiddetlerinin simultane olarak analizlenmesidir. Diğer bir avantaj ise daha kısa sürede spektrum kaydedilmesidir [11].

### **2.2.1 Fourier transform IR mikrospektroskopisi**

1980'nin başlarında IR mikro analizinin başarılı bir şekilde yeniden doğuşu Fourier transform infrared (FT-IR) spektrometrelerinin IR mikroskopi ile birleştirilmesinin sonucunda meydana gelmiştir. Bu zamandan beri IR mikro spektroskopisi izole olmuş kirliliklerin veya daha büyük örneklerin lokalize alanlarının analizi yönünden kalitatif bir araç olarak hızlı bir şekilde kapsamlı olarak kabul görmüştür. Moleküler bilgi ve böylece doğrudan tanımlama sağlıyor olması en önemli faydalarından biridir. Saniyeler içerisinde yaklaşık 20 mikron büyüklüğündeki bir örnek bölgesinden yüksek kalitede, binlerce piksel içeren ve her görüntü pikselinin tam alanlı bir IR spektrumuna sahip olduğu IR görüntüleri elde edilebilmektedir. Böylece spektral bilgi binlerce pikselden oluşan bir resim olarak sunulabilmektedir. Mikroskopların ilk versiyonları transmisyon ölçümleri için optimize edilmiş olsa da, bugünkü versiyonlar refleksiyon-absorbsiyon (absorption), dağınık refleksiyon(reflection), azaltılmış tam yansıma(Attenuated Total Reflectance) gibi tüm ölçümleri makro örnekleme aksesuarları birlikteliğinde gerçekleştirme kapasitesine sahiptir [36].

### 2.2.2 Fourier Transform IR mikrospektroskopisi uygulama alanları

Klasik infrared spektrumlarından elde edilen bilgi kimyasal kompozisyonu ve yapıyı açıklasa da boyutsal ve spektral bilginin vibrasyonel görüntüleme bilgi setlerinde birleşmesi veri analizlerinde yeni imkanlar sunmaktadır. Klasik infrared spektroskopisi örnek bileşenlerinin konsantrasyonlarını göreceli olarak belirlemek için kullanılabilir. Oysaki FTIR görüntüleme, bu bilgilerin görsel olarak sunulmasına imkan sağlamaktadır. Kompleks maddeler içerisinde komponentlerin boyutsal olarak dağılımı maddelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini güçlü bir şekilde etkilemektedir. Üretilmiş olan maddeler hem boyutsal hemde kimyasal olarak heterojen dağılım gösterdiğinden, bu maddelerin incelenmesinde kimyasal görüntüleme ideal bir yöntemdir [36].

#### 2.2.2.1 Polimer uygulamaları

Klasik infrared spektroskopisinin temel uygulamaları polimerlerin kimyasal fonksiyonelliği ve moleküler oryantasyonu üzerinedir. Polimerlerin kimyasal karakterinin anlaşılması dayanıklılık, sağlamlık, madde hatalarının sebepleri gibi kütle özellikleri hakkında bilgi elde edilmesini sağlamaktadır. Kopolimerlerin fiziksel özelliklerinde hem boyutsal hemde spektral karışıklık hakim olduğundan, ek bilgi, görüntüleme yöntemleri ile elde edilebilmektedir. FTIR spektroskopik görüntüleme, bu özellikleri incelemek için çok uygundur çünkü bir polimerik sistemi oluşturan çeşitli bileşenlerin boyutsal özelliklerini görüntüleme imkanı sağlamaktadır. Polimerlerin incelenmesi yönünden FTIR görüntüleme uygulamasını kullanarak çeşitli araştırmalar gerçekleştirmiştir [37].

Vogel ve arkadaşları yaptıkları çalışmada FTIR görüntüleme spektroskopisini kullanarak polihidroksibütirat (  $(C_4H_6O_2)_n$  ) ile polilaktik asit ve polikaprolakton karışımlarındaki faz ayrışmasını inceleyerek FTIR görüntüleme spektroskopisi sayesinde faz ayrışma olgusunu kompozisyonun bir fonksiyonu olarak incelemişlerdir [38]. Hartwig ve arkadaşları FTIR görüntüleme tekniğini kullanarak polihidroksibütirat ve izotaktik polipropilenoksit jeollerinin doğrusal dikroik davranışını doğrusal polarize ışık kullanarak incelemiş ve klasik infrared spektroskopisi ile elde edilen bilgilerin yanında katı polimer filmlerine ilişkin yapı hakkında bilgi elde edilmiştir [39]. Wang ve arkadaşları poliester üretilen multiblok kopolimerler çalışılarak, FTIR görüntüleme ile boyutsal ve spektral bilgi toplanmış

morfoloji ve kimyasal kompozisyon incelenmiş hem kristalin hemde amorf bölgeler için moleküler zincir oryantasyonu incelenmiştir [40]. Koenig ve arkadaşları çözücü karışımları ile polimer bozundurulmasını FTIR görüntüleme spektroskopisi ile incelemişlerdir, elde edilen görüntülerde polimerlerin polimer-çözücü arayüzeyinde homojen bir şekilde bozunmadığı, çatlamların ve pürüzlenmelerin meydana geldiği görülmüştür [41]. Kazarian ve arkadaşları yüksek basınçlı karbondioksit altında polimer maddelerdeki faz ayrışmasını FTIR spektroskopisi ile görüntülemişlerdir [42]. Fredericks ve arkadaşları mikro-ATR FTIR görüntüleme tekniğini kullanarak heterojen polimer oksidasyonunu incelenmiştir. Çalışmada  $TiO_2$  içeren bir model polimer sistemi fotookside olmuş ve polimerdeki oksitlenmiş bölge gelişimi ATR-FTIR spektroskopisi kullanılarak görüntülenmiştir [43]. Koenig ve arkadaşları çalışmalarında, FTIR görüntüleme tekniğinin, bir polimer filmdeki çapraz bağ yoğunluğunun görüntülenmesi için etkin bir araç olduğunu kanıtlamıştır [44].

#### **2.2.2.2 Gıda uygulamaları**

Vibrasyonel spektroskopi gıda ve gıda bileşenlerinin analizenmesi yönünden büyük önem taşımaktadır. Vibrasyonel spektroskopinin gıda analizlerindeki başarısı genel özellikleri ile ilişkilidir. Bu özellikler tekniğin hızlı olması, çok az veya hiç örnek ön işlemleri gerektirmemesi, bir çok uygulamada hem kalitatif hem kantitatif bilgi elde edilebilmesidir. Gıdalar doğası gereği, genel olarak heterojendirler. Örneğin homojenize edilmesi ve nokta ölçümlerinin tekrarlanması gibi yöntemler kullanılarak bu durumun üstesinden gelinmeye çalışılmıştır fakat IR görüntüleme tekniğinin gelişimi ile birlikte heterojen gıda örneklerinin karakterizasyonunda sürekli bir gelişim sağlanmaktadır. Infrared görüntüleme tekniği kullanılarak çeşitli gıda analiz çalışmaları gerçekleştirilmiştir [45].

Wetzel ve arkadaşları FTIR spektroskopik görüntüleme yöntemini kullanarak endosperme ilişkin aleurone hücrelerini ve pericarp yapısını görüntülenmişlerdir. Aleurone hücrelerinin proteince zengin, pericarpın ise lipid yönünden zengin olduğu elde edilen görüntülerle gösterilmiştir [46]. Wetzel ve Koç synchrotron infrared görüntüleme tekniğini kullanarak buğdaydaki çimlenme prosesi süresince lokalize olmuş protein ve yağ dağılımında meydana gelen değişimleri incelemiştir [47]. Barron ve arkadaşları FTIR görüntüleme tekniğini kullanarak olgunlaşmış bir tanenin hücre duvarındaki heterojenliği incelemek üzere endosperm kepeğinden merkeze

kadar olan bölgeyi görüntülemiştir [48]. Himmelsbach ve arkadaşları FTIR mikrospektroskopik haritalama ile çeşitli enzimlerin keten ıslatma prosesindeki etkilerini mikro spektroskopik olarak görüntüleyerek incelemiştir [49]. Cremer ve Kaletunç mısır ve yulaf unu temelli ekstrüzyon ürünlerinden alınan ince kesitlerde nişasta, protein ve yağ bölgelerinin boyutsal dağılımı FTIR mikrospektroskopik haritalama deneyleri ile incelemiştir. Tüm tahıl temelli ekstrüzyon ürünlerinde nişastanın sürekli bir faz oluşturduğu, yağın nişastaya göre daha az, proteinin ise en az dağılım gösteren bileşen olduğunu saptamışlardır [50]. Noronha ve arkadaşları nişasta içeren imitasyon peynirlerin mikroyapılarının araştırılmasında çeşitli mikroskopi yöntemlerini karşılaştırmış, özellikle FTIR ile net bir şekilde tanımlama sağlanmıştır [14]. Kohler ve arkadaşları çalışmalarında sığır eti örneklerine ısı işlem uygulanarak farklı sıcaklıklardaki ve işlem uygulanmadığı durumdaki denatürasyona ilişkin kimyasal yapı görüntülerini elde etmiştir [51]. Kohler ve arkadaşları olgunlaştırılmış inek kas dokusunun FTIR mikrospektroskopisi ile görüntülerini elde etmiş ve çok değişkenli görüntü analizi gerçekleştirmişlerdir [52]. Dokken ve Davis synchrotron infrared mikrospektroskopi tekniği ile ayçiçeği ve mısır kökünün anatomisini incelemiştir [53]. Wetzel ve arkadaşları ısı işlem süresince globüler proteinin sekonder yapısında meydana gelen değişimleri FTIR mikrospektrometre ile yansıtma absorpsiyon modda gözlemleyerek mikroyapıya ilişkin görüntüleri elde etmişlerdir [54].

### **2.2.2.3 Farmasötik uygulamalar**

FTIR görüntüleme tekniği, örneğin bir çok farklı noktasından simultane olarak spektrum elde etme imkanı sağlamaktadır. Elde edilen FTIR spektrumları belirli bir bileşenin konsantrasyonu, kimyasal yapısı ve morfolojisi hakkında bilgi sağlamaktadır. Bu durum özellikle ilaçlar açısından önem taşımaktadır çünkü ilaçlar kompleks bir morfolojiye sahip olabilmekte ve çözelti ortamı ile temas halinde polimorfik değişimler gösterebilmektedirler. Bu sebeple, FTIR görüntüleme, bir ilacın dağılımının ve moleküler yapısının çözünme süresince zamanın bir fonksiyonu olarak analizlenmesi yönünden eşsiz bir metoddur [55].

Kazarian ve arkadaşları, kontrollü nem koşulları altında FTIR görüntüleme ile farmasötik bir formülasyonda su emiliminin heterojen şekilde ilerlediğini göstermişlerdir. FTIR görüntüleme tekniğinin spesifikliğinden yararlanarak örneğin

farklı bölgelerindeki su emilimini belirleyebilmişlerdir [56]. Kazarian ve arkadaşları polietilenglikoldeki katı bir nifedipin dispersiyonunun çözünmesini FTIR Spektroskopik görüntüleme ile incelemişlerdir. İlaç su ile etkileşim halindeyken morfolojik yapısındaki değişimler farklılandırılmış ayrıca hem ilaçta hemde polimerde zamanın bir fonksiyonu olarak boyutsal yapıdaki değişimlerin analizlenmesi sağlanmıştır [55]. Koenig ve arkadaşları ilaç dağılım sistemlerinin analizi için FTIR görüntüleme tekniğini kullanmıştır. Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar, FTIR tekniğinin ilaç dağılımı alanındaki uygulanabilirliğini kanıtlamıştır [57]. Kazarian ve arkadaşları ATR-IR görüntüleme yaklaşımı ile hem polimer hem de ilaç su ile etkileşim halindeyken zamanın bir fonksiyonu olarak boyutsal dağılımı incelemişlerdir. Suda çözünen polimerlerin içerisinde bulunan ilaçların katı dağılımları gözlemlenmiştir [58]. Koenig ve arkadaşları kontrollü ilaç salınım uygulamalarının karakterizasyonu için FTIR görüntüleme tekniğini kullanmıştır [59].

#### **2.2.2.4 Biyomedikal uygulamalar**

FTIR spektroskopik görüntüleme özellikle biyomedikal örneklerin incelenmesi için uygundur çünkü var olan patolojik ve histokimyasal protokoller yoğun bir şekilde örneğin görüntülenmesine dayanmaktadır. Dolayısıyla FTIR görüntüleme rahatlıkla söz konusu metodlarla birleştirilebilir. Teknik, belirgin şekilde standart protokollerden daha fazla bilgi sağlamaktadır çünkü örnek morfolojisi, spesifik biyokimyasal sınırları ve değişimleri vurgulayan kantitatif spektroskopik parametreler tarafından sorgulanabilmektedir. Ayrıca karşılaştırma içseldir sadece vibrasyonel absorpsiyon bandının varlığı veya yokluğu ile ilgilidir dolayısıyla örnekler boyanmayı veya hazırlanmayı gerektirmemektedir. IR radyasyonun nispeten düşük enerjisi sebebi ile de yıkıcı olmayan bir tekniktir ve böylece örnek bütünlüğü korunmaktadır. Metod hem yüksek hassasiyette doku komponentlerinin boyutsal lokalizasyonunun belirlenmesi yönünden hem de kantitatif sonuçlar kimyasal analizlerle elde edilenlerle kıyaslanabilir olduğundan bir çok biyomedikal uygulama için güçlü bir araçtır. Bu sebeble teknik birçok araştırmada kullanılmıştır [37]. Fabian ve arkadaşları göğüs tümör dokusunu orta infrared spektroskopisi ile incelemiştir. Yüksek hassasiyetteki IR yaklaşımı ile doku biyokimyasındaki değişimler göğüs dokusunun yapısındaki farklılaşma hakkında bilgi elde edilmiştir [60]. Lasch ve arkadaşları koleraktal kötü huylu böbrek tümörünü FTIR mikrospektroskopisini kullanarak incelemiş ve küme analizi uygulamıştır [61].

Pezzei ve arkadaşları normal ve kötü huylu prostat dokusunu FTIR mikrospektroskopisi ile karakterize etmiştir [62]. Lash, kolerahtal tümör incelemelerinde FTIR mikrospektroskopisinin tanı potansiyelini incelemiştir. Doku yapılarının hızlı ve güvenilir bir şekilde gözlemlenmesinde orta-IR tekniği ve mikrospektroskopisinin büyük bir potansiyele sahip olduğu gözlemlenmiştir [63]. Tosi ve arkadaşları patolojik göğüs dokularındaki normal ve kötü huylu tümörler arasındaki farklılık gözlemlenmiştir [64]. Tosi ve arkadaşları kireçleşmiş ateromatöz karotid plaklarını mikro-FTIR görüntüleme spektroskopisi ile incelemiştir [65]. Bhargava ve arkadaşları insan derisi çalışmaları için domuz derisini model olarak kullanmış ve infrared spektroskopik görüntüleme yöntemini kullanarak sınıflandırmıştır [66]. Fabian ve arkadaşları IR mikrospektroskopisini kullanarak göğüs dokusundaki iyi huylu ve kötü huylu lezyonları teşhis etmiştir [67]. Astassopoulou ve arkadaşları göğüs dokusunu mikro spektroskopik olarak incelemiş ve kanser dokusunun normal dokundan belirgin şekilde farklı olduğunu gözlemlenmişlerdir [68]. Piot ve arkadaşları parafine gömülmüş deri örneklerinde FTIR mikrospektroskopisini kullanarak nevus ve melanomun ayırd edilmesini sağlamışlardır [69].

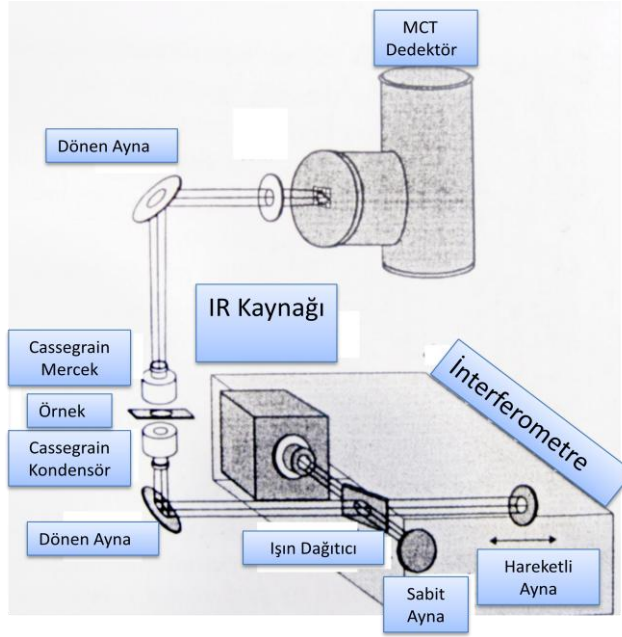
### 2.2.3 Mikro-FTIR çalışma prensibi

FTIR spektrometrelerinin bir IR mikroskobu ile birleştirilmesi sonucunda FTIR görüntüleme sistemleri meydana getirilmiştir. Genel olarak, tüm mikroskopların sahip olduğu komponent ve fonksiyonlar benzerdir. IR mikroskoplarının farklı olarak sahip olduğu özellikler ise;

- Interferometreden IR radyasyonu kullanmaları,
- Yansıtıcı optikleri kullanmaları,
- Örnek tanımlaması için birincil görüntü düzleminde bir aralık kullanmaları,
- Infrared duyarlı bir dedektör kullanmalarıdır.

Bu farklılıkların dışında IR mikroskobunun çalışma prensibi optik mikroskoplar ile birebir benzerdir. En önemlisi de, IR mikroskopları, analistin örneği işlemesine ve yüksek büyüklükte görüntülenmesine olanak sağlamak amacı ile optik yollarında beyaz ışık mikroskop ile birleştirilmiştir. Dolayısıyla Mikro-FTIR kullanılarak hem görünür hem de IR dalga boylarında örneğin görüntülenmesi mümkündür. Şekil 2.3' de Mikro-FTIR enstrümantasyonu gösterilmektedir. Mikro-FTIR görüntüleme

sistemi, klasik FTIR spektrometrelerde olduğu gibi interferometre prensibine göre çalışmaktadır. IR kaynağından gönderilen IR ışını, ışın dağıtıcıdan geçerek uygun flip(dönen) ve dikroik aynalara yönlendirilmekte, cassegrain kondensör (odaklayıcı optik) kullanılarak örnek üzerine odaklanmaktadır. Örnek içerisinden iletilen IR ışını seçici olarak soğurulduktan sonra cassegrain mercek kullanılarak toplanır ve MCT(HgCdTe) dedektör tarafından algılanır. IR görüntü toplama modunda spektrometreden ayarlanmış IR ışığı örneği yukarıdan veya aşağıdan aydınlatabilir. (örneğin reflektans veya transmisyon işlemi). Transmisyon modunda enerji genellikle ayarlanabilir olan odaklayıcı optik kullanılarak örnek üzerine odaklanır. Refleksiyon modunda cassegrain sistem kullanıldığında ışın mercek Cassegrain' ın yarısından örnek üzerine odaklanır ve sistemin diğer yarısı kullanılarak toplanır [36,37,70].



Şekil 2.3: Mikro-FTIR Enstrümantasyonu [37].

#### 2.2.4 Işın kaynağı

Sürekli infrared radyasyonunun kaynağı çoğunlukla 1100-1400 K civarında işlem gören dirençsel ısıtılmış SiC veya seramik elementtir. Sinyal-gürültü oranı IR görüntüleme sistemlerinin anahtar bir performans faktörüdür. Bir cihazda diğer her şey aynı iken kaynak yoğunluğunun artırılmasının sinyal-gürültü seviyesini arttırmaktadır [70].

### 2.2.5 İnterferometre

Bir interferometre, girişim modellerinin veya interferogramların kontrollü olarak üretimlerine olanak sağlayan optik bir sistemdir. İnterferometre bir ışın kaynağı, ışın dağıtıcı, sabit bir ayna ve hareketli bir aynadan oluşmaktadır. Işın kaynağı içinden elektrik geçmesi halinde IR bölgesinde ışın yaymaktadır, ışın dağıtıcı ise söz konusu infrared ışınını ikiye bölmektedir. Aynaların diziliş şekli ayrılmış olan dalgaların dağıtıcıda tekrar kombine olmasına izin verecek bir yönde ışın dalgalarının yansıtılmasına olanak sağlamaktadır. Hareketli ayna ışın dağıtıcıya doğru ve ışın dağıtıcıdan uzağa doğru olmak üzere eksen boyunca hareket etme özelliğine sahiptir. Işığın bir yarısı ışın dağıtıcının içerisinden geçmekte ve sabit ayna tarafından ışın dağıtıcıya geri yansıtılmaktadır. Işığın diğer yarısı ise hareketli aynaya yansıtılmakta ve buradan tekrar ışın dağıtıcıya geri yansımaktadır. Aynalardan yansımış olan iki ışında ışın dağıtıcıda tekrar kombine olmaktadır. İki ışın demeti tarafından kat edilen mesafedeki farklılık, aynanın hareketi sonucunda oluşmuştur bu durum optik yol farkı veya optik retardasyon olarak adlandırılmaktadır. Optik yol farkının sonucunda yapıcı ve yıkıcı girişim modelleri oluşmaktadır. Tekrar birleşmiş ışınlar örneğin içerisinden geçmekte ve son olarak dedektör tarafından algılanmaktadır [26]. Şekil 2.4' te interferometrenin şematik gösterimi verilmiştir.

IR ışığı seçici olarak örnek tarafından absorblandıktan sonra, dedektöre ulaşan enerjinin yoğunluğundaki dalgalanmalar gerçek zamanda sayısallaştırılır ve interferogram oluşur. Interferogram örneğin infrared spektrumunu oluşturmak için gerekli olan tüm bilgiyi içermektedir fakat bu bilgi zaman alanındadır. Yorumlanabilir bilgiyi elde etmek için interferogram, Fourier dönüşümleri ile frekans alanına dönüştürülmelidir. FTIR spektroskopisinde interferogram genellikle sabit ve hareketli ayna arasındaki yol farkının bir fonksiyonu olarak şiddetin grafiğidir. Retardasyon ise  $t$ (zaman) ile orantılıdır çünkü hareketli ayna sabit  $v$  hızı ile hareket eder burada retardasyon  $\delta$ , hız  $v$ , zaman ise  $t$  ile gösterilmiştir (2.1).

$$\delta = 2vt \quad (2.1)$$

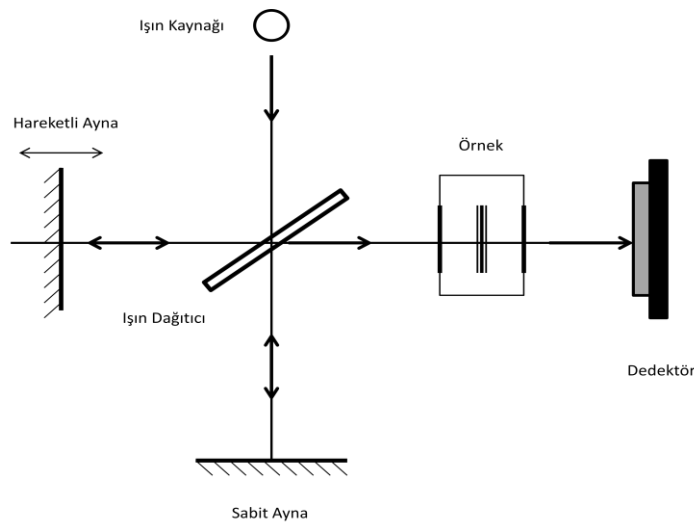
$I(\delta)$  interferogramının Fourier dönüşümü,  $x$  ekseninde dalga boyunun( $\text{cm}^{-1}$ ) bulunduğu  $I(\gamma)$  spektrumu ile eşitlikteki ilişki ile uyumlu olarak ifade edilir (2.2).

$$I(\delta) = 0.5H(\gamma) I(\gamma)\cos 2\pi \gamma \delta \quad (2.2)$$

Burada  $H(\gamma)$ , enstrümental karakteristikler için hesaba katılan tek dalgaboyu bağımlı düzeltme faktörüdür. Cooley-Tukey hızlı Fourier Dönüşüm algoritmasını kullanarak

bu operasyonu gerçekleştiren bir bilgisayar tüm FTIR enstrümanlarının bir integral parçasıdır.

FTIR enstrümantasyonun üstünlüğünün en büyük sebebi interferometrelerin getirdiği önemli avantajlardır. Bunlar, sinyal-gürültü oranında önemli gelişmeler, tarama süresindeki belirgin azalma ve yüksek çözünürlüktür. Veri işleme ve kantitatif uygulamalar yönünden diğer bir önemli avantaj ise iç referans lazer ışını kullanılmasıyla dalgaboyu doğruluğunun sürdürülmesi ve böylece dalgaboyu sapmalarının elimine edilmesidir [12].



**Şekil 2.4 :** Interferometrenin şematik gösterimi [26].

### 2.2.5.1 Sürekli tarama modu

Verilen bir dalgaboyunda ki sinyalin karakteristik frekansı optik yol farkının (OPD) üretildiği hızın( $v$ ) ve dalgaboyunun bir fonksiyonudur ve söz konusu dalgaboyuna karşılık gelen Fourier frekansı olarak bilinmektedir. Spektrumun çeşitli Fourier frekanslarında interferometre tarafından kodlandığı düşünülebilir.

İnterferometre tipik olarak 0.1 ve 5 cm/s arasındaki optik yol fark hızı ile tarama yapmaktadır böylece Fourier frekansları yaklaşık olarak akustik frekans bölgesine düşmektedir ve kolayca sayısallaştırılmaktadır. Modeller arasında nadiren değişiklik olursa da genel bir aynanın hızı 0.16 cm/s ve optik yol farkı hızı 0.32 cm/s olmakla birlikte 5kHz tarama hızı olarak da ifade edilebilir. Referans He-Ne lazerinin (633.5 nm) frekans ölçümü temel alınmıştır. Sürekli taramalı FTIR da, genel tek dedektör

sinyal örnekleme hızları, oda sıcaklığı dedektörler için 5 kHz, MCT dedektörler için 20 kHz ve bugün kinetik çalışmalar için 250 kHz kadar hızlıdır. Dedektörler genellikle en iyi şekilde belirli frekans aralıklarında çalışmaktadırlar ve interferometre hızının optimal dedektör işlem hızı ile eşleşmesi önemli bir performans faktörüdür [70].

#### **2.2.5.2 (Step Scan) Adım tarama modu**

Bir çok FTIR spektrometre adım tarama modunda çalışma özelliğine sahiptir. Adım tarama metodu 1990 ların başında daha popüler olmuştur bunun sebebi tekrarlanan durumların zaman gerektiren çalışmalarını ve deneylerin modülasyonunu kolaylaştırmaktır ve ilk görüntüleme sistemleri için çalışma imkanı sağladığı kanıtlanmıştır.

Adım tarama modunda optik yol farkı arttırılmış ve zamanın bir periyodu için tutulmuştur. 1 Hz adım hızı şunu ifade etmektedir; optik yol farkı her saniye adımlanmış sadece 1 sn altı için sabit bir optik yol farkı oluşmuştur bu durum ise kısa bir yatışma süresine imkan vermektedir. Bu adımda tutulmuş iken bir dizi dedektörden bir kare toplanmasını içeren zaman veya frekans bağımsız ölçümler elde edilebilir.

İnterferometrenin her iki kısmınında taranıyor olması bir avantaj olarak değerlendirilmektedir. Bir kısımdaki ayna, tıpkı sürekli tarama interferometrede olduğu gibi tüm optik yol farkı üzerinde sürekli olarak hareket etmekte, ikinci kısım ise aynı hızda daha kısa mesafeler üzerinde taramaktadır ve sonra hızlıca kısa taramayı tekrar başlatmak için dönmektedir, dedektör tarafından görülecek olan optik yol farkının etkin olarak adımlanmış hareketi üretilmek istenmektedir

Buradaki temel nokta, her bir noktada IR modülasyon frekanslarının bu şekilde optik yol fark hızından etkin olarak ayrıştırılabilir olmasıdır bu durum ise zaman hız bağımlılığını ortadan kaldırmaktadır.

Bu durum dedektörler için seçim ve işlem şartları açısından daha fazla esneklik ve istenilen şartlar altında daha hızlı kinetik çalışmalar gerçekleştirme potansiyeli oluşturmaktadır [70].

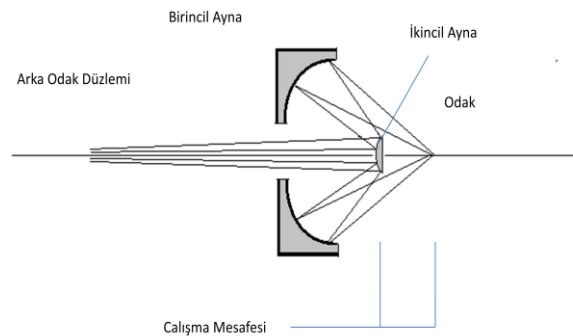
## 2.2.6 Mikro-FTIR optiği

### 2.2.6.1 Mercekler

Çoğu araştırma derecesindeki optik mikroskop sınırlı dalgaboyu aralığında çalışmaktadır( $\sim 0.5\mu\text{m}$ ) ve kromatik, küresel ve diğer sapma türlerine göre düzeltilmiştir. Bu mikroskoplarda ışığı odaklamak başlıca refraksiyon ile gerçekleşmektedir. Diğer bir yandan IR mikroskopları tüm sapmaların kırıcı optiklerin kullanılmasıyla düzeltilmesi için çok geniş olduğu  $12.5\ \mu\text{m}$  değeri üzerinde işlem görmelidir. Öyle ki tüm IR mikroskopları IR radyasyonunu yoğunlaştırmak ve toplamak için kavisli ayna yüzeylerini kullanmaktadır. Görüntü kalitesi yönünden endüstride standart olan mercek eksen üzerinde Schwarzschild mercektir. Bu merceklerde her iki yansıtıcı yüzeyde küresel geometriye sahiptir. Daha büyük çapı olan yüzey birincil ayna ve daha küçük çapı olan yüzey ikincil ayna olarak ifade edilmiştir [36,70].

Şekil 2.5’de optik sistemde yer alan birincil ve ikincil ayna birlikteliğinde gösterilmiş olan diğer bir parametre ise objektifin arka odak düzlemidir, büyütölmüş görüntünün olduğu z eksenı boyunca olan mesafedir. İkincil küçük ayna objektiften çapraz olarak geçen ışığın minimum açısını sınırlandırmaktadır. Meydana gelen kullanılmamış bölge ise eksen üzerindeki tüm yansıtıcı objektiflerin merkezi kararma karakteristikleri olarak ifade edilmektedir. Merkezi kararma, ikincil ayna tarafından engellenen ışık şiddetinin, ikincil aynanın olmadığı durumda birincil ayna tarafından alınacak olan ışık şiddetine oranıdır.

Çoğu objektifin merkezi kararma değeri %25 veya daha az bir değere sınırlanmıştır. Merkezi kararma etkisi, ışın orta kısmı içerisinde tutulan enerjiyi azaltmak ve bu enerjiyi daha geniş çapa sahip olan kısımlara dağıtmaktır [36,70].



Şekil 2.5 : Optik sistemde yer alan birincil ve ikincil ayna [36].

Çoğu üretici 0.6 sayısal aralık değerine sahip objektifleri tedarik etmektedir, bunlar elmas örs hücreleri ve sıvı hücreler gibi aksesuarların kullanılmasına imkan sağlamaktadır ve ılımlı bir işlem mesafesi gerektirmektedir. Bu sayısal aralık için tipik büyütme her iki 6x ve 15x değerlerini içermektedir. Üreticiler daha yüksek büyütme değerleri olan merceklerde (32x,0.65) tedarik etmektedirler. Bu objektifler daha küçük örnekleri görüntülemek için arttırılmış bir büyütmeyi sağlamaktadırlar fakat sayısal aralıkta ılımlı kazanç sağlamaktadırlar [36,70].

#### 2.2.6.2 Cassegrain optik

Çift küresel ayna sisteminden oluşan bu yapı yaygın olarak kullanılmaktadır. Cassegrain optiklerin en önemli özellikleri, sayısal aralık, büyütme ve işlem mesafesidir. Bu üç özelliğin doğru bir şekilde dengelenmesi iyi bir sistem tasarımı için çok önemlidir. Sayısal aralık, IR görüntüleme açısından önem taşımaktadır. Sayısal aralığın değeri, görüntü noktası ve sistemden geçen en uç ışın ile eksen arasındaki açının sinüsüdür. Bu durumda daha büyük sayısal aralık değeri daha büyük koni açısı veya objektifin daha büyük ışın toplama gücü demektir. İyi görüntüler elde etme konusunda görüntü bulanıklığından sakınmak amacıyla örnekteki her noktanın bir noktaya odaklanması gerekmektedir. Bulanıklık, doğrudan nokta dağılma fonksiyonu ile ilişkilidir, bir nokta kaynağı için yansıtılan spot büyüklüğünü belirlemek için kullanılmaktadır. Mükemmel optikler kullanılsa bile bir nokta kaynağı, ışığın dalga doğasından ötürü dağılmaya uğramaktadır. Aslında yansıtılan spot büyüklüğü koni açısı ile ters orantılıdır [70].

Dairesel bir optik için nokta dağılma fonksiyonu Airy Disk Fonksiyonu olarak bilinmektedir. Yarım yükseklikteki tam genişlik (FWHH) şu şekilde ifade edilmektedir (2.3).

$$FWHH=0.61\lambda n \sin\theta=0.61\lambda/NA \quad (2.3)$$

Birincil ve ikincil optiklerin doğru konumlandırılması sapmaları minimize eder ve yüksek büyütme durumlarında daha zor hale gelir. 6x ve 32x büyütme ve 0.6 civarında sayısal aralık mercekler için genel bir tercihtir. Daha fazla büyütme ve daha büyük sayısal aralığa sahip olan sistemlerin, daha küçük işlem mesafesi ve daha küçük görüntü alanları gibi dezavantajları vardır. Dikkate alınması gereken diğer bir parametre ise objektifin arka odak düzlemine olan mesafedir [70].

### 2.2.6.3 Apertures(Aralıklar)

IR mikroskopları, örnek alanının denetlenmesi amacıyla görüntü düzleminde yer alan bir aralığa sahiptirler. Aralık aslında, optik bakış açısı itibari ile alan kesicidir. Alan kesiciler görüntü düzleminde bulunurlar ve örnek görüntüsünün büyüklüğünü sınırlandırır. Öyle ki, yakın çevreden gelecek ışınların sınırlandırılarak sadece örnekten iletilen ışığın dedektöre ulaşmasını sağlarlar. İnterferometredeki alan kesiciler genel olarak j-stops olarak bilinmektedirler bunlar kaynağın büyüklüğünü ve spektrometreye giden ışığın açılarını sınırlarlar. Aralıklar görüntü düzlemi dışındaki her hangi bir bölgede de bulunabilirler. Pozisyonlarının sonucu olarak aralık kesiciler görüntünün büyüklüğünü değil görüntünün şiddetini sınırlandıracaklardır. Eğer hassas ölçüm yapılması isteniyorsa bu durumdan kaçınmak gerekmektedir.

Aralıkların fiziksel yapısı, dört tane birbirinden bağımsız ayarlanabilir bıçak kenarlardan meydana gelmektedir bu durum kare veya dikdörtgen alanların oluşturulmasını sağlamaktadır.

IR mikroskopisinde sistemin boyutsal çözünürlüğünün belirlenmesinde aralıkların büyük önemi vardır. Aralık kenarlarının hem kendilerinden kaynaklanan hem de cassegrain 'ın merkezi kararma bölgesinden kaynaklanan etkiler enerji dağılımının nokta dağılım fonksiyonun merkezinden uzağa itilmesine sebep olmaktadır bu durum ise elde edilebilir boyutsal çözünürlüğü azaltmaktadır [36,70].

### 2.2.7 Visible görüntü sistemi

IR görüntü toplama işlemi öncesi, örneğin doğru konumlandırılmasına yardımcı olmak için örnek genellikle görüntülenir, ve sistemin içindeki optik mikroskop ile doğru bir şekilde pozisyonlandırılır. Son yıllarda dijital görüntüleme kameralarının kullanılması dürbün görüntüleyicilerin kullanılmasına nispeten daha popüler olmuştur. FTIR görüntü sistemlerindeki uygulamaları açısından video kameraları gelişmiş kullanım kolaylığı ve üretkenlik potansiyeli ile görüntünün canlı görüntülenmesi açısından yeterli kaliteyi sağlamaktadır.

Modern USB kameraları arayüz olan video capture kartlarının bilgisayarda kullanılması ihtiyacını elimine ederek visible görüntü sistemini basitleştirmiştir. Bu tarz bir kamera kullanıldığında canlı visible görüntüleme için gerekli olan görüntü alanları 0.5-1.5 megapiksel civarındadır eğer gerekli boyutsal çözünürlükte daha

büyük görüntü alanları dedektöre yansıtılmak isteniyorsa bilgisayar kontrollü haritalama için “stage” kullanılabilir. Böylece örneğin adımlanmasıyla mozaik bir yapıda her kare birbirine birleştirilerek kompozit bir görüntü oluşturulabilir. Bu tarz bir işlem “mozaikleme” olarak ifade edilir. Başlangıçta örneklerden daha büyük visible survey oluşturmak için kullanılmıştır fakat şimdi daha geniş alan örneklemesinin gerekli olduğu durumlarda hem visible hem IR görüntüleri için kullanılmaktadır [70].

### **2.2.8 Sample stage**

Daha büyük görüntüler oluşturmak için “mozaikleme” tekniği daha fazla sistemde kullanılmaktadır. Teknik yaygın olarak benimsenmiş ve otomasyona talep artmıştır dolayısıyla bilgisayar kontrollü hassas stage IR görüntüleme sistemlerinde standart hale gelmiştir [70].

### **2.2.9 Dedektörler**

Dizi dedektörlerin kullanıldığı sistemlerin gelişmesi sonucunda uygulamalar daha erişilebilir hale gelmiş ve IR mikro analizlerine olan ilgi artmıştır. Bunun iki sebebi vardır; dedektör dizilerinin kullanılmasıyla bilgi toplanmasının paralel doğasına göre, görüntüler daha hızlı bir şekilde oluşturulabilmektedir. İkincisi, maskeleyici aralıkların ve bunların kırınım etkilerine katkılarının kaldırılması ile daha yüksek boyutsal doğruluk sağlanabilmektedir. Sonuç olarak daha hızlı bilgi toplanabilmesinin faydaları dizilerin kullanımını doğrulamaktadır [45].

IR mikroskoplarında kullanılan standart dedektör sıvı azot ile soğutulan civa kadmiyum tellür (HgCdTe) dedektördür. Bu cihazlar dar, orta ve geniş bant formatlarına sahiptirler. Aralarındaki fark düşük dalgaboyu kesme ve özgül (spesifik) algılama ( $D^*$ ) özelliğidir. MCT dedektörler için dalgaboyu kesme 7-14  $\mu\text{m}$  ( $\sim 1400\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ ) olarak tanımlanmıştır. [36,70].

#### **2.2.9.1 Doğrusal MCT dizi kullanımı**

Bir focal plane array kare veya dikdörtgen dedektör setidir. Bu dedektörlerin maliyet, güvenilirlik ve performans gibi özellikleri yönünden alternatif bir yaklaşım olarak doğrusal MCT dedektörler geliştirilmiştir. On altı öğeli doğrusal diziliimli MCT dedektör Perkin Elmer Spotlight tarafından FTIR görüntüleme amacı ile yapılandırılmıştır. En iyi kalitedeki saf, MCT(civa kadmiyum tellür) malzemeden

üretimiştir. Tüm onaltı kanal otuz iki kHz değerinde işlem görmektedir, bireysel olarak integre olmuş devreler kullanılmaktadır ve tüm onaltı kanal zamanın yüzde yüz etkinlik değerinde fotonları okuma kapasitesine sahiptir. Bunun sonucu olarak ise daha yüksek sinyal kalitesi elde edilmektedir dolayısıyla son derece hızlı kareleme yapılabilidiği için çok iyi kalitede IR görüntülerinin elde edilmesi sağlanmıştır. Spektroskopik olarak etkileyici bir sinyal/gürültü performansının sağlanması yanında fotoiletken MCT doğrusal diziliminin kullanılması daha geniş dalga boyu aralığına ulaşılmasını sağlamaktadır. Örneğin focal plane array dedektör  $1000\text{ cm}^{-1}$  ötesinde yanıt vermezken MCT dedektörler rahatlıkla  $720\text{ cm}^{-1}$  civarındaki dalgaboyuna ulaşabilmektedirler [36,70].

## **2.2.10 Uygulamalar ve örnekleme şekilleri**

### **2.2.10.1 Transmisyon mikrospektroskopisi**

Transmisyon IR mikrospektroskopisi, diğer IR mikroanaliz metodları ile kıyaslandığında şüphesiz en yüksek kalitedeki bilgiyi elde etmektedir. Fakat fotometrik olarak doğru spektrumların elde edilebilmesi için diğer metodlara nispeten daha iyi örnek hazırlığı gerektirmektedir. Temel gereklilik, örneğin yeteri kadar ince ve ışın saçılmalarını önleyici özellikte olmasıdır böylece 0.8' den k  k olan absorbands değerleri elde edilebilecektir. Birçok  rnek türü genel olarak göz önünde bulundurulduğunda istenilen örnek kalınlığı  $10\text{ }\mu\text{m}$  civarında olmalıdır [36,70].

 rnek için uygun kalınlığın elde edilmesi büyük  l de örneğin fiziksel özelliklerine bağlıdır. Örneğin, toz şeklindeki maddeler de istenilen kalınlıkta mikro pellet haline getirilip analizlenebilmektedir. Kristal bir yapı sergilemeyen izole partiküllerden oluşmuş bir örnek kolayca d zleştirilebilir, elastomerler gibi daha zor bir örnekle çalışıldığında ise elmas  rs hücreleri kullanılabilir ancak IR mikrospektroskopi alanındaki birçok çalışmada elmas  rs hücreleri çok uç durumlarda kullanılmaktadır. Bazı durumlarda ise örnek bütünlüğünün sürdürülmesi gerekmektedir, oryante olmuş polimer filmleri analizleri veya polimerizasyon ölçümlerinin gerekli olduğu analizler buna örnektir. Böyle durumlarda örnek mikrotom kullanılarak istenilen kalınlığa getirilebilir.  rnek uygun kalınlığa getirildikten sonra ise genellikle hem IR hem de görünür ışık için şeffaf olan bir yapı üzerine yerleştirilir. Genel olarak kullanılan malzemeler NaCl ve KBr pencerelerdir.

Bunlar 13 mm çapında ve 2 mm kalınlığındadırlar ve 40000-600 cm<sup>-1</sup> spektral aralığına sahiptirler. Diğer bir alternatif ise KCl kullanılmasıdır. Bu madde buğulanmadan kullanılabilir ve metanol ve suyun 50/50 çözeltisi kullanılarak kolayca temizlenebilir. Sulu özelti veya doku kesitleri için ise aralığı 50000-740 cm<sup>-1</sup> olan BaF<sub>2</sub> pencereler tercih edilebilir. Analizlenecek olan yapıya uygun olan örnek hazırlama yöntemi seçildikten sonra iki husus donanıma göre değişmektedir. Örnekler IR ışını iletirir pencereler üzerine veya sıkıştırma hücreleri gibi ekipmanlara yerleştirildikten sonra refraksiyon etkilerinin bir sonucu olarak dedektör üzerindeki odağı kaydırma eğilimi göstermektedirler. Bu kayma örnek, substrate ve hücre pencerelerine göre değişmektedir fakat yüzlerce mikron olabilir. Kondensatör ve dedektör sistemlerinde nispeten hızlı optikler kullanılmaktadır dolayısıyla dedektördeki sinyal şiddetinde önemli miktarda etki oluşabilir. Bu durumun telafi edilmesi için genellikle odağın pozisyonun, kondansatörün pozisyonu veya odağının uzaklığının ayarlanması ile de sağlanır. İkinci bir durum ise transmisyon görüntüleme elde edilebilecek çözünürlüğün belirlenmesinde örneğin kendisi büyük bir faktördür olabilir. Bu durum şöyle açıklanabilir; Gerçek sistemlerde, ışık örneğin yüzeyine çeşitli açılarla gelmektedir. Bu ışınlar homojen olmayan bir örnekteki farklı komponentler arasındaki yüzeylere çarpmakta, (rneğin bir kaplamadaki farklı kırılma indisine sahip iki polimer) ve bulundukları yere göre çeşitli şekillerde tekrar yönlendirilmektedirler örneğin, iletilirir ardından kırılabilirler veya sınırda tamamen içsel olarak kırılma uğrayabilirler. Bu sebeplerden dolayı bir sistemin boyutsal çözünürlüğü gerçek bir örnek kullanılarak değil bıçak kenarı gibi fiziksel bir sınır boyunca alınacak yanıt denenerek değerlendirilmektedir [36,70].

#### 2.2.10.2 ATR görüntüleme tekniği

Azaltılmış tam yansıma tekniği 1960'ların başlarında Fahrenfort ve Harrick Tarafından bağımsız olarak geliştirilmiştir. Işık yüksek kırılma indisine sahip ortamda ilerlerken bu ortam ile daha düşük kırılma indisine sahip olan ortam arasındaki yüzeye çarpar, kısmen iletilir ve kısmen yansıtılır. Yalnız kritik açı olarak ifade edilen Qc geliş açısında ve Qc üzerindeki açı değerlerlerinde ışığın hiçbir kısmı ikinci ortama iletilmez ve tam içsel yansıma meydana gelir. Snell yasası temel alınarak kritik açı ifade edilebilmektedir (2.3). Qc kritik açı değerini n<sub>2</sub> düşük kırılma indisini n<sub>1</sub> ise değeri 4 olan büyük kırılma indisini ifade etmektedir.

$$Qc = \sin^{-1}(n_2/n_1) \quad (2.3)$$

Kırılma indisi düşük olan ortamda tam içsel yansıma durumunda ara yüzeye olan mesafe ile ilişkili olarak üssel bir şekilde şiddeti zayıflayan, yavaş yavaş kaybolan bir dalga meydana gelir. Kırılma indisi düşük olan ortamda absorpsiyon gerçekleştiğinde bunun yavaş yavaş kaybolan dalga ile etkileşimi tam içsel yansıyan ışıdan enerji çekilmesi ile sonuçlanır. Tam içsel yansıyan ışıdaki azalmanın bir dalgaboyu fonksiyonu olarak ölçülmesi kırılma indisi düşük olan ortamdaki türlerin absorpsiyon spektrumlarının elde edilmesini sağlar. ATR reflektans tekniklerinden en başarılı olanıdır. İç yansıma elemanı ve örnek arasında yeterli temas sağlandığı sürece birçok örneğe uygulanabilmektedir daha kolay örnek hazırlığı gerektirmesi ve yüksek absorblayıcı örnekler için azalmış yol uzunluğu faydalarını sağlamaktadır. Mikroskop konfigürasyonunda ise ek olarak üç yarar sağlamaktadır bunlar, tek bir yansıma geometrisi, sınırlı temas alanı ve transmisyon ölçümlerine nispeten boyutsal çözünürlükteki artıştır. Tek yansıma ve sınırlı yüzey alanının kombinasyonu mikrokonfigürasyon yönünden değişmezlik ve daha yüksek temas basıncı sağlamaktadır. ATR mikroskoplarının aksesuarları için genel olarak temas alanı  $10^{-3}$ - $10^{-1}$  mm<sup>2</sup> aralığında değişmektedir. Azalmış alan ayrıca daha sabit basınç sağlamaktadır, daha geniş iç yansıtma elemanı üzerinde homojen olarak dağılmayan basınç sebebi ile meydana gelen baseline bozulmalarını böylece elimine etmektedir. Sayısal aralık örneğin ölçüldüğü ortamın kırılma indisi ile objektife giren en uç ışının optik eksene göre sinüsünün çarpımıdır. Eşit örnek büyüklüğü için ATR konfigürasyonu uzak aralık büyüklükleri (transmisyon moda göre n kere büyük alan) çalışma olasılığı sağlamaktadır ve aynı zamanda boyutsal bütünlük korunmaktadır. Dolayısıyla ATR ölçümleri aynı büyüklükteki örnekte sinyal kaybı olmaksızın gerçekleştirilebilmektedir [36,70].

ATR ölçümlerinin IR mikroskop ile uygulanması bir silikon veya germanyum yarım küre kullanılarak sağlanmaktadır. Bu içsel yansıma elemanları yüksek kırılma indisine sahiptir Genel olarak tercih edilen germanyumun yüksek kırılma indisi yaklaşık olarak dört kat daha iyi çözünürlük elde edilmesini sağlamaktadır. Yüksek kırılma indisine ATR ölçümlerinde gerekli olan kritik açıyı sağlamak üzere ihtiyaç duyulmaktadır. Görüntüleme sisteminin merceğinden geçen IR ışını optimize olmuş germanyum kristale yönlendirilir. Düz örnek yüzeyine yatay bir açı ile çarpar ışın toplam iç yansıma sonucu yüksek bir etkinlik ile dedektöre geri yansıtılır. Bu tam içsel yansıma örnekleme yüzeyinin birkaç mikron aşağısında kaybolan bir dalga

oluşturur. Buraya yerleştirilen örnek bileşenlerine göre enerji absorblamaktadır böylece bir IR spektrumu oluşacaktır. ATR görüntüleri örneğin son derece yüksek duyarlık ve doğrulukta taranması ile oluşturulmaktadır [36,70].

Elde edilen bilginin spektral bütünlüğü ve kalitesi sürdürülürken ATR kristali maksimum örnekleme alanı sağlamaktadır. ATR görüntüleme ve taramanın eşsiz kombinasyonu Spotlight 400 sistemi ile geniş görüntüleme alanları ve görüntü büyüklüğünde maksimum esneklik sağlamaktadır. Perkin Elmer'in optimize edilmiş germanyum kristali bilgi kalitesinden ödün verilmeden en yüksek çözünürlüğün elde edilmesini sağlamaktadır. Reflektans ve transmitans gibi yöntemlerle görüntülenmesi zor olan örneklerle daha kolay çalışılması sağlanmaktadır. Uygulama alanında artış 1.56µ piksel büyüklüğü ile daha küçük özellikler ve komponentlerin ölçülebilmesini sağlar. Transmisyon ölçümlerinde olduğu gibi ince örnek hazırlığı gerekmemektedir. Bu yönden avantaj sağlamaktadır. Örneğin iç yansıma elemanın içerisine gömülmesi sonucu kırılma indisinin etkisi ile çözünürlük iyileşmektedir [36,70].



### **3. DENEYSEL ÇALIŞMA**

#### **3.1 Deneysel Çalışmanın Amacı**

Deneysel çalışmada mikro-FTIR infrared spektroskopi tekniği kullanılarak dört farklı ticari firmadan sağlanmış, Ezine peynirinin mikroyapılarının görüntülenmesi, peynirin bileşiminde bulunan yağ ve protein gibi başlıca komponentlerinin boyutsal dağılımının ve bu komponentler arasındaki etkileşimlerdeki farklılıkların gözlemlenmesi ve değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

#### **3.2 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar**

Deneysel çalışmada incelenen örnekler tam yağlı Ezine peynirlerinden oluşmaktadır. Peynir örneklerinin ölçüm yapılan yüzeyden temizlenmesi için hekzan ve etanol kullanılmıştır. Peynir örneklerinin mikroyapılarını görüntülemek aynı zamanda görüntülere ilişkin spektrumları elde etmek amacıyla Perkin Elmer Spektrum 100 FTIR spektrometresinin bir optik mikroskop ve motor kontrollü stage ünitesine bağlanması ile oluşmuş Perkin Elmer Spotlight 400 FTIR sistemi kullanılmıştır. Ölçümler attenuated total reflectance modunda elde edilmiş ve bunun için Ge kristale sahip bir ATR aksesuarı kullanılmıştır.

#### **3.3 Örnek Hazırlama ve Mikro-FTIR Deneyleri**

Dört farklı ticari firmadan elde edilmiş Ezine peyniri ile çalışılmıştır, incelenecek olan peynir kesitleri, 4 °C sıcaklığındaki peynirlerin farklı bölgelerinden her peynir türü için 5 adet olmak üzere, bir neşter kullanılarak mümkün olduğunca ince bir şekilde kesilmiş ve herhangi bir deformasyona uğramadan çelik dairesel satırların üzerine aktarılarak incelenmiştir. Deneyler oda sıcaklığında ve aynı gün içerisinde gerçekleştirilmiştir. Spektral bilgiler, Perkin Elmer Spektrum 100 spektrometre birlikteliğinde Spotlight 400 Micro-FTIR kimyasal görüntüleme sistemi kullanılarak elde edilmiştir. Görüntüleme sistemi, sıvı azot sıcaklığında işlem gören, 4000-700 cm<sup>-1</sup> aralığındaki tüm spektral bölgeyi kapsayan, on altı ögeli doğrusal dizilimli

MCT (Civa Kadmiyum Tellür) dedektöre sahiptir. Ölçümler ATR Imaging operasyon modu kullanılarak gerçekleştirilmiş ve Germanyum kristale sahip olan bir ATR aksesuarı kullanılmıştır. Peynir kesiti üzerindeki 200 µm X 200 µm büyüklüğündeki bir bölgede tarama gerçekleştirilmiştir. Spektral çözünürlük, 16 cm<sup>-1</sup> değerindedir. Küçük bir alan üzerinde daha detaylı bilgi elde etmek amacı ile boyutsal piksel büyüklüğü 6.25 µm olarak tercih edilmiştir. 4000-744 cm<sup>-1</sup> infrared aralığında çalışılmış ve bu aralık üzerinde her piksel için gerçekleştirilen 2 taramanın ortalaması alınmıştır. Her spektrum 128 taramanın sonucunda elde edilmiştir. Kimyasal yapıya ilişkin görüntüler 7.5 dakikada elde edilmiştir. Background spektrumları ise örneğin bulunmadığı durumda tarama gerçekleştirilerek elde edilmiştir.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Dört Farklı Çeşit Ezine Peynirinin İncelenmesine Ait Sonuçlar

Mikro-FTIR spektroskopik görüntüleme tekniğini kullanarak, peynirin yapısındaki yağ ve protein gibi başlıca iki ana bileşenin boyutsal dağılımlarının belirlenmesi orta-IR bölgede  $400-4000\text{ cm}^{-1}$  aralığında moleküler absorpsiyon bandlarının toplanması ile başlar. Orta-IR bölgesinden elde edilen tüm absorpsiyon bandları dedektör tarafından tespit edilmiş olan band şiddetine karşı x ve y düzlemlerinde sergilenerek tarama görüntüsü elde edilmektedir. Tarama sonuçları her 6.25 mikron mesafeden bir IR ( $650-4000\text{ cm}^{-1}$ ) spektrumu almaya müsaade etmektedir. Tarama verilerinin işlenmesi, peynirin yağ ve protein bileşenlerinin bu spektrumlarda nasıl temsil edildiğini anlayabilmek için kilit önem taşımaktadır. Taranan bölgelerden rastgele noktalar seçilip bunların spektrumlarına bakıldığında çizelge 4.1’ de verilmiş olan karakteristik bandlar kullanılarak yağ ve proteine ilişkin gerekli atıflama yapılabilmektedir.

#### 4.1.1 Spektral bilgi kullanılarak mikroyapının kimyasal görüntülenmesi

ATR aksesuarı ile Mikro-FTIR taramalarından elde edilen veriler bölgesel olarak değişim göstren bir şekilde, ayrı ayrı protein ve yağı bulundurduğundan, bu bölgelerden alınan piklerin alan veya şiddet oranlaması, taralı alanda bu moleküllerin dağılım şeklini gösterecektir. Elde edilen tarama görüntüsünde yağ bileşenin dağılımını gözlemleyebilmek için C=O ve C-H gruplarının absorpsiyon yaptığı bölgelerden yararlanılmıştır. Sadece yağ bileşeni ile ilişkili olan, protein bileşenine dair hiçbir bilgi taşımayan, C=O (ester) grubunun absorpsiyon yaptığı  $1735-1739\text{ cm}^{-1}$  bölgesi  $1700-1800\text{ cm}^{-1}$  aralığında seçilmiş ve bandın uç noktalarından düzeltme yapılarak yağları temsil edecek şekilde alan şiddetine göre taralı bölgelerde işaretlenmesi gerçekleştirilmiştir. Uç noktaların düzeltilmesindeki amaç ilgili bölgedeki spektral verilerin dış optik etki veya dedektör davranışından etkilenmiyor olmasıdır. Aynı şekilde yağ bileşeni ile ilişkili olan, C-H grubunun absorpsiyon

yaptığı 2965-2854  $\text{cm}^{-1}$  bölgesi 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  aralığında seçilmiş ve bandın uç noktalarından düzeltme yapılarak yağları temsil edecek şekilde alan şiddetine göre taralı bölgelerde işaretlenmesi gerçekleştirilmiştir. Tarama görüntüsünde protein bileşeninin dağılımını gözlemleyebilmek için ise, sadece protein bileşeni ile ilişkili olan yağ bileşenine dair hiçbir bilgi taşımayan amid I grubunun absorpsiyon yaptığı 1654-1632  $\text{cm}^{-1}$  bölgesi ve amid II grubunun absorpsiyon yaptığı 1545-1532  $\text{cm}^{-1}$  bölgesi 1480  $\text{cm}^{-1}$  ve 1700  $\text{cm}^{-1}$  aralığında seçilmiş ve bandın uç noktalarından düzeltme yapılarak proteini temsil edecek şekilde alan şiddetine göre taranmış olan bölgede, incelenen yapının işaretlenmesi gerçekleştirilmiştir.

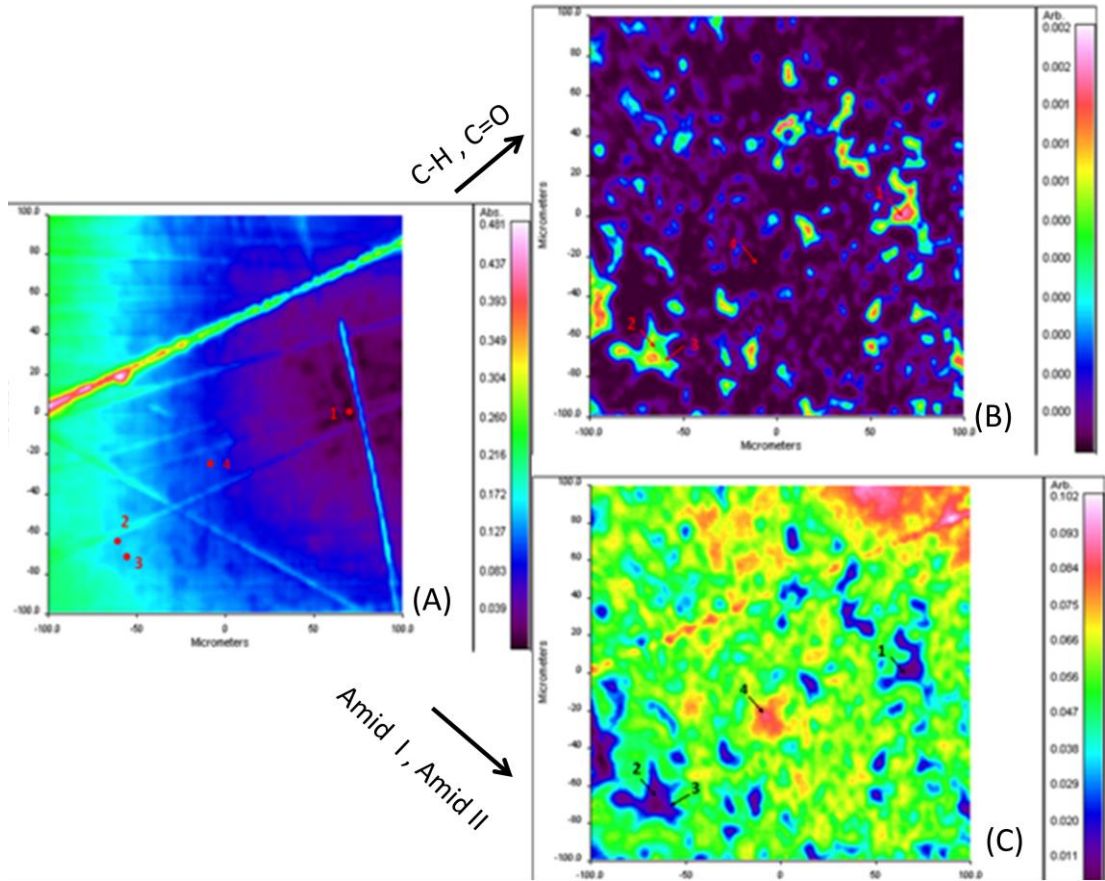
Böylelikle mikro-FTIR tarama görüntülerinin hem yağa hemde proteine göre ayrı ayrı kimyasal dağılım haritaları çıkartılabilmektedir. Protein ve yağa göre görüntüleme yapıldığında, ikili sistem kabulü yapıldığından bir bileşenin kuvvetli olarak gözlemlendiği bölgede diğerrinin zayıf bir şekilde gözlemlenmesi ve birbirini tamamlayan bir yapı sergilemesi gerekmektedir. Bu durumun tespiti ileri bölümde görüntüler üzerinde incelenmiştir.

**Çizelge 4.1** Temel peynir bileşenlerinin orta infrared spektroskopisi ile kantitatif olarak analizlenmesinde yararlanılan absorpsiyon bandları ve spektral bölgeler [71,72].

| Bileşen Türü     | Absorpsiyon<br>Frekansı ( $\text{cm}^{-1}$ ) | Bağ Türü                                             |
|------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Su               | 3600-3200                                    | O-H Gerilme                                          |
| Yağ,Karbonhidrat | 2965-2854                                    | C-H Gerilme                                          |
| Yağ              | 1735-1739                                    | C=O Gerilme(ester bağı)                              |
| Protein          | 1654-1632                                    | Amid I (peptidlerin C-O gerilme<br>vibrasyonları)    |
| Protein          | 1545-1532                                    | Amid II (N-H eğilme ve C-N gerilme<br>vibrasyonları) |
| Karbonhidrat     | 1165-1160                                    | C-O Gerilme                                          |

#### 4.1.1.1 I. peynir

Şekil 4.1’ de birinci çeşit Ezine peynir örneğinden elde edilmiş tarama görüntüsü verilmektedir. Şekil 4.1’ de tarama görüntüsü A ile simgelenmiştir. B görüntüsünde, yağ asitlerinde bulunan C=O ve C-H fonksiyonel grupları ile ilişkili olan sırasıyla  $1735-1739\text{ cm}^{-1}$  ve  $2965-2854\text{ cm}^{-1}$  bölgelerindeki absorpsiyon bantlarından yararlanılmıştır. Bu bölgelerdeki bantların altında kalan alanların büyüklüğüne göre (mavi en zayıf, kırmızı en güçlü) skala hazırlanarak, taranan bölgede yağ moleküllerinin dağılımı belirlenmiştir. Şekil 4.1’ de verilmiş olan B görüntüsünde yağ bileşeni dağılımı pembeden mora doğru değişen bir renk skalası ile gözlemlenmektedir, yağ bileşenin yoğun olduğu bölgeler pembe ve kırmızı renkte gözlemlenirken yağ moleküllerinin bulunmadığı bölgeler ise mor renkte gözlemlenmiştir.



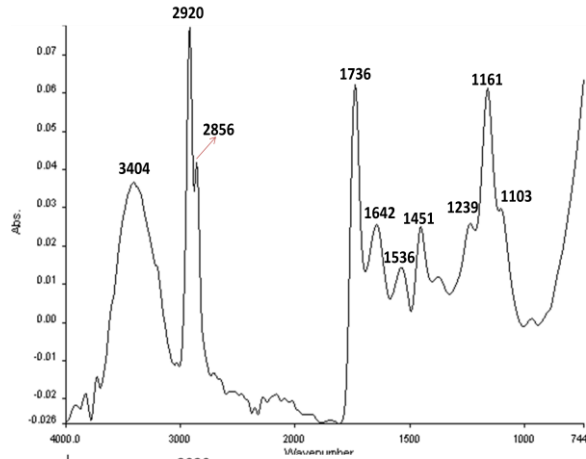
**Şekil 4.1 :** I. peynir örneğine ait FTIR mikroyapı görüntüleri. (A) Tarama görüntüsü. (B) Yağ bileşeni dağılımı. (C) Protein bileşeni dağılımı.

C görüntüsünde ise amid I ve amid II grupları ile ilişkili olan sırasıyla  $1654-1632\text{ cm}^{-1}$  ve  $1545-1532\text{ cm}^{-1}$  bölgelerindeki absorpsiyon bantlarından yararlanılarak

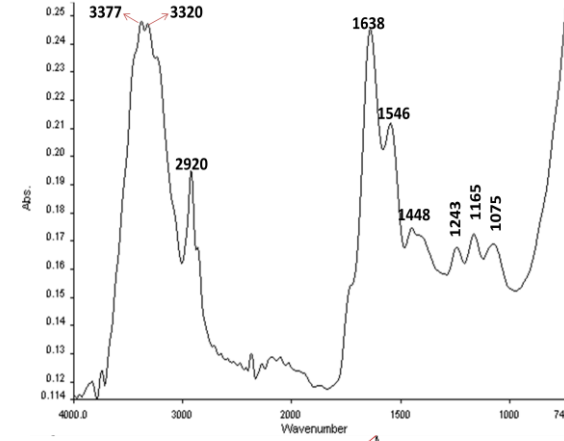
tarama görüntüsünde protein bileşenleri işaretlenmiş, protein dağılımı gözlemlenmiştir. C görüntüsünde protein bileşeni dağılımı pembeden mora doğru değişen bir renk skalası ile gözlemlenmektedir, protein bileşenin yoğun olduğu bölgeler pembe ve kırmızı renkte gözlemlenirken protein bileşenin bulunmadığı bölgeler ise mor renkte gözlemlenmiştir.

Şekil 4.1' de A görüntüsü üzerinde kırmızı noktalar ile seçilmiş olan bölgeler, aynı koordinatlarda, B görüntüsünde kırmızı ok ucu ile, C görüntüsünde ise siyah ok ucu ile gösterilmektedir. Gösterilen dört bölgeden dört farklı spektrum alınmıştır. Şekil 4.2' de görüntüler üzerindeki 1, 2, 3 ve 4 bölgelerinden alınmış olan spektrumlar sırasıyla a, b, c, d spektrumları olarak gösterilmektedir. Bu spektrumlardan a, yağ bileşeninin yoğun olarak gözlemlendiği 1 noktasından, d spektrumu ise protein bileşeninin yoğun olarak gözlemlendiği 4 noktasından alınmıştır. Mikroyapı görüntüleri ile uyumlu olarak 1 noktasından alınan spektrumda C-H ve C=O grupları absorpsiyonu gözlemlenirken, 4 noktasından alınan spektrumda amid I ve amid II gruplarının absorpsiyonu baskın olarak gözlemlenmektedir.

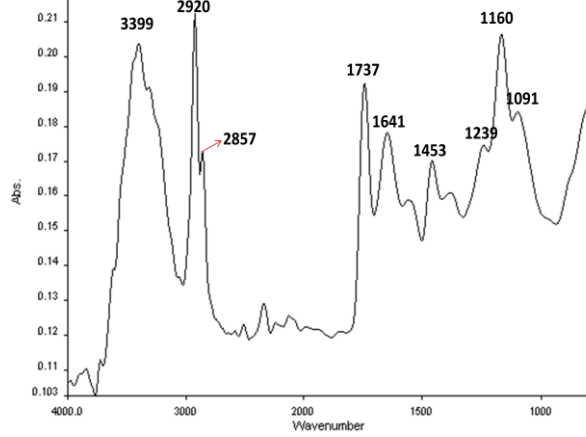
Diğer spektrumlar incelendiğinde ise, b spektrumunda C-H, amid I ve amid II, c spektrumunda ise C-H, C=O ve amid I gruplarından kaynaklanan absorpsiyon bandları baskın olarak gözlemlenmiştir.



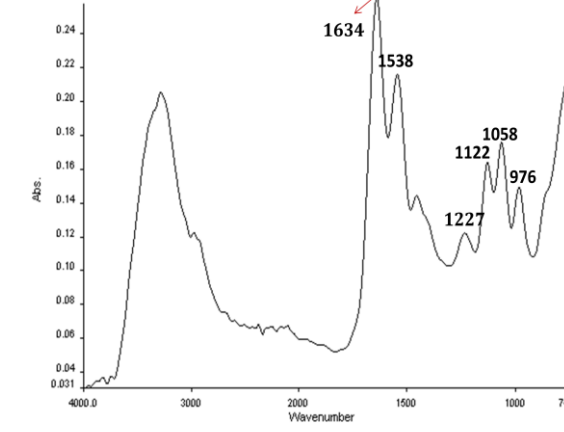
(a)



(b)



(c)

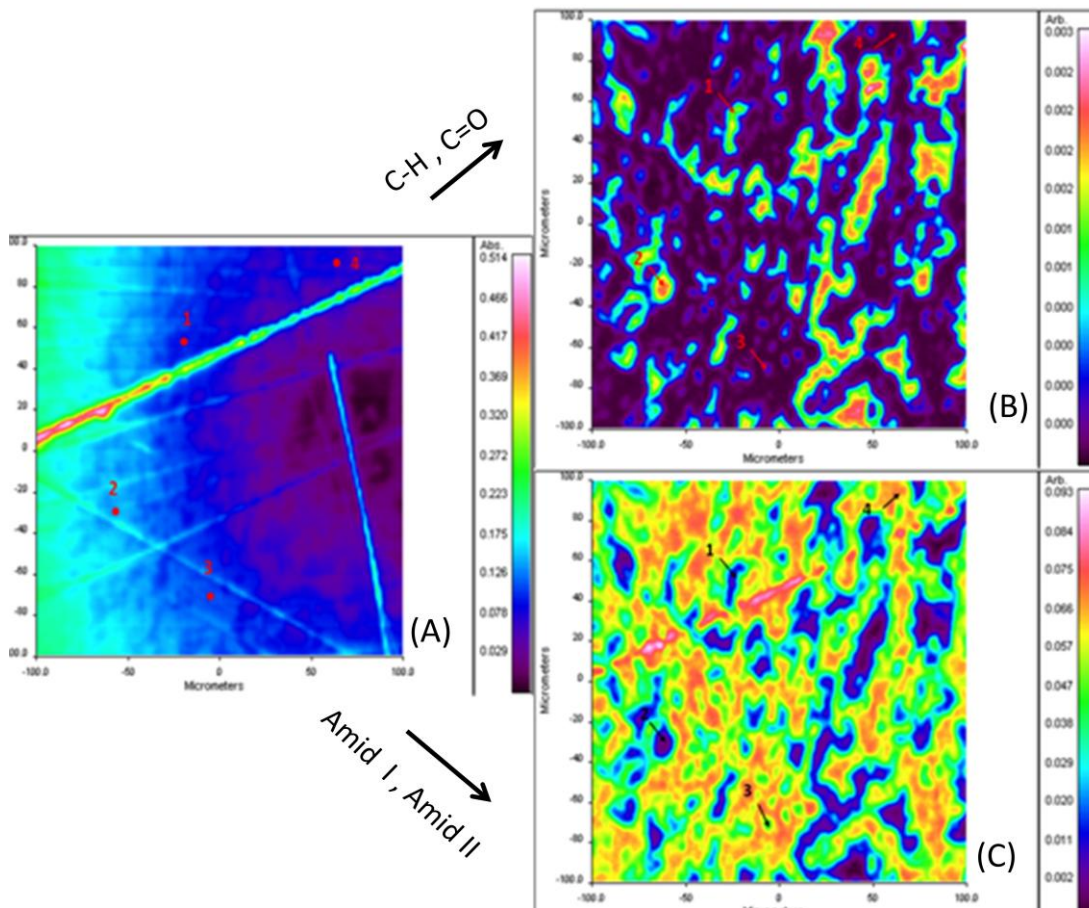


(d)

**Şekil 4.2 :** I. peynir örneğine ait FTIR mikroyapı görüntülerinden alınmış spektrumlar. (a) Bir noktasından. (b) İki noktasından. (c) Üç noktasından. (d) Dört noktasından.

#### 4.1.1.2 II. peynir

İkinci çeşit Ezine peynir örneği için yukarıda anlatıldığı gibi spektral bilgilerden yararlanılarak tarama görüntüsü işaretlenmiş, yağ ve protein dağılımı incelenmiştir. Şekil 4.3' teki B görüntüsünde yağ bileşeni dağılımı pembeden mora doğru değişen bir renk skalası ile gözlemlenmektedir, yağ bileşenin yoğun olduğu bölgeler pembe ve kırmızı renkte gözlemlenirken yağ bileşenin bulunmadığı bölgeler ise mor renkte gözlemlenmiştir.



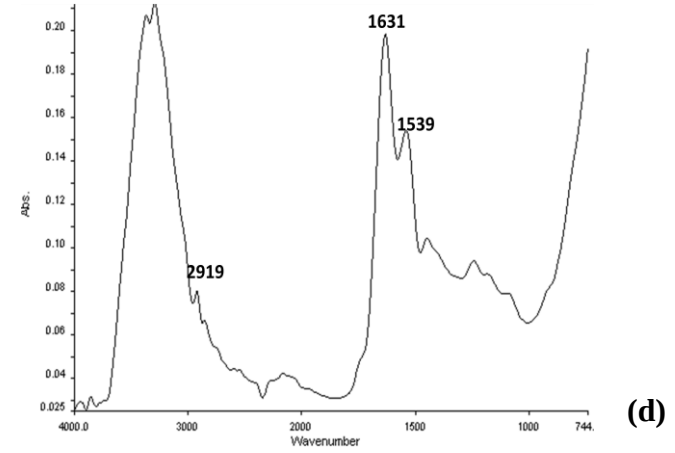
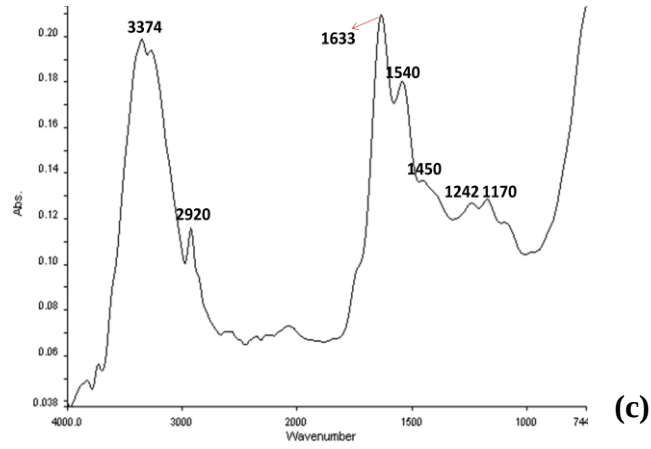
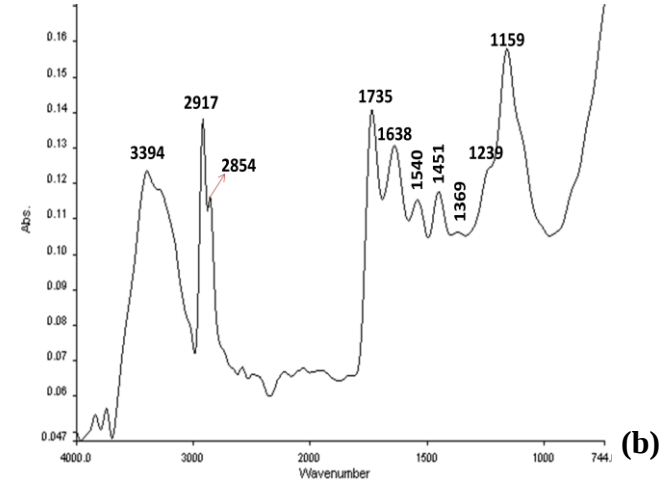
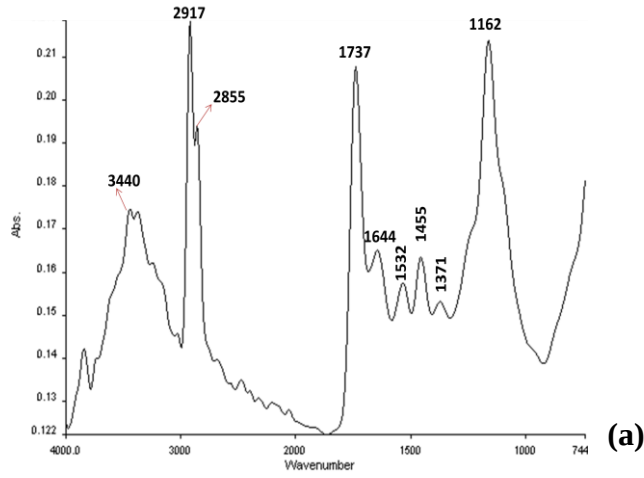
**Şekil 4.3 :** II. peynir örneğine ait FTIR mikroyapı görüntüleri. (A) Tarama Görüntüsü. (B) Yağ bileşeni dağılımı. (C) Protein bileşeni dağılımı.

Şekil 4.3' teki C görüntüsünde ise protein dağılımı gözlemlenmiştir. C görüntüsünde protein bileşeni dağılımı pembeden mora doğru değişen bir renk skalası ile gözlemlenmektedir, protein bileşenin yoğun olduğu bölgeler pembe ve kırmızı renkte gözlemlenirken protein bileşenin bulunmadığı bölgeler ise mor renkte gözlemlenmiştir.

Şekil 4.3'te A görüntüsü üzerinde kırmızı noktalar ile seçilmiş olan bölgeler, aynı koordinatlarda, B görüntüsünde kırmızı ok ucu ile C görüntüsünde ise siyah ok ucu

ile gösterilmektedir. Gösterilen dört bölgeden dört farklı spektrum alınmıştır. Şekil 4.4' de görüntüler üzerindeki 1, 2, 3 ve 4 bölgelerinden alınmış olan spektrumlar sırasıyla a, b, c, d spektrumları olarak gösterilmektedir. Bu spektrumlardan b yağ bileşeninin yoğun olarak gözlemlendiği 2 noktasından, d spektrumu ise protein bileşeninin yoğun olarak gözlemlendiği 4 noktasından alınmıştır. Mikroyapı görüntüleri ile uyumlu olarak 2 noktasından alınan spektrumda C-H ve C=O grupları absorpsiyonu gözlemlenirken, 4 noktasından alınan spektrumda amid I ve amid II gruplarının absorpsiyonu baskın olarak gözlemlenmektedir.

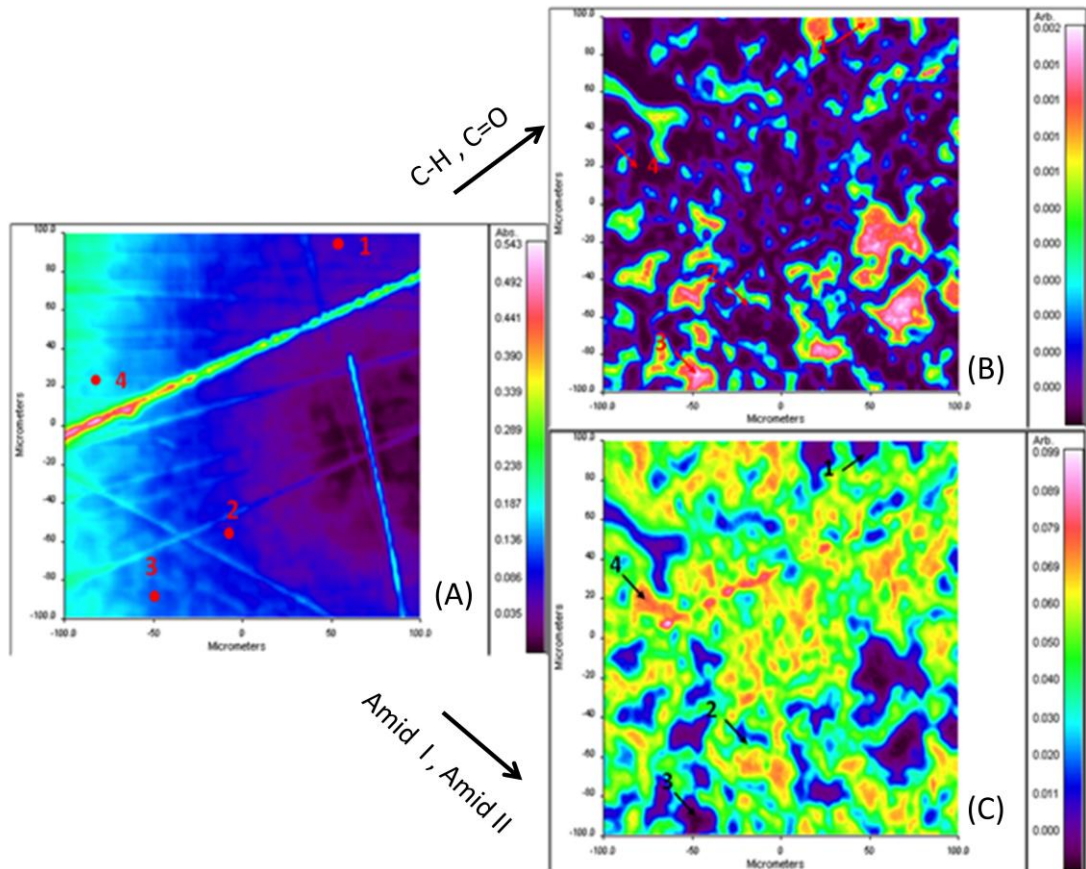
Diğer spektrumlar incelendiğinde ise, a spektrumunda C-H, C=O, amid I ve amid II, c spektrumunda ise C-H, amid I ve amid II gruplarından kaynaklanan absorpsiyon bandları gözlemlenmiştir.



**Şekil 4.4 :** II. peynir örneğine ait FTIR mikroyapı görüntülerinden alınmış spektrumlar. (a) Bir noktasından. (b) İki noktasından. (c) Üç noktasından. (d) Dört noktasından.

#### 4.1.1.3 III. peynir

Üçüncü çeşit Ezine peynir örneği için, I. peynir incelenirken detaylı olarak anlatıldığı şekilde spektral bilgilerden yararlanılarak tarama görüntüsü işaretlenmiş, yağ ve protein dağılımı incelenmiştir. Şekil 4.5' teki B görüntüsünde yağ bileşeni dağılımı pembeden mora doğru değişen bir renk skalası ile gözlemlenmektedir, yağ bileşenin yoğun olduğu bölgeler pembe ve kırmızı renkte gözlemlenirken yağ bileşenin bulunmadığı bölgeler ise mor renkte gözlemlenmiştir.

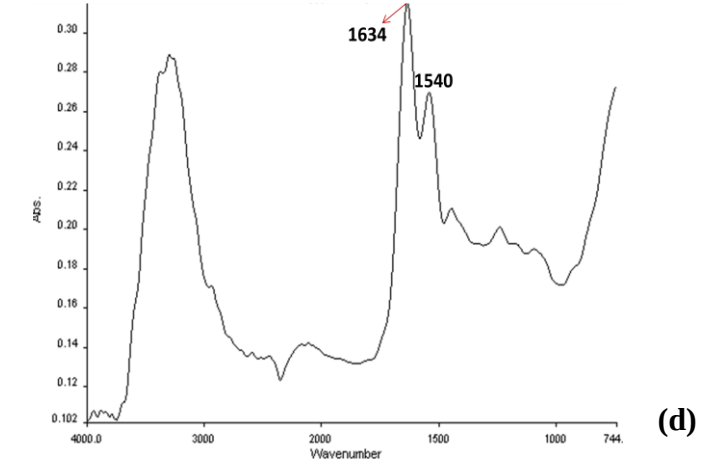
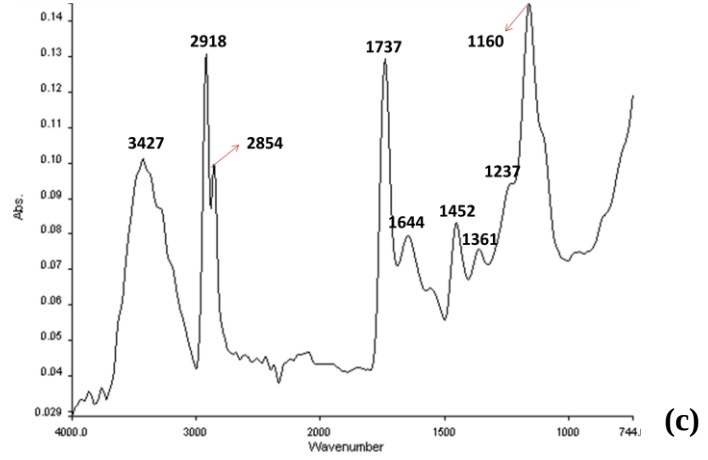
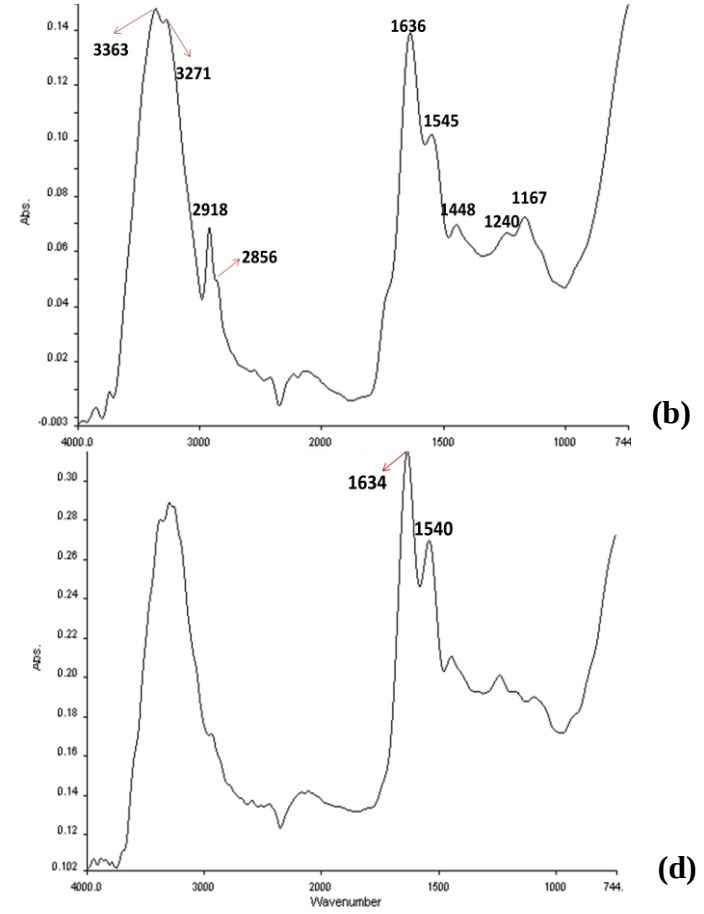
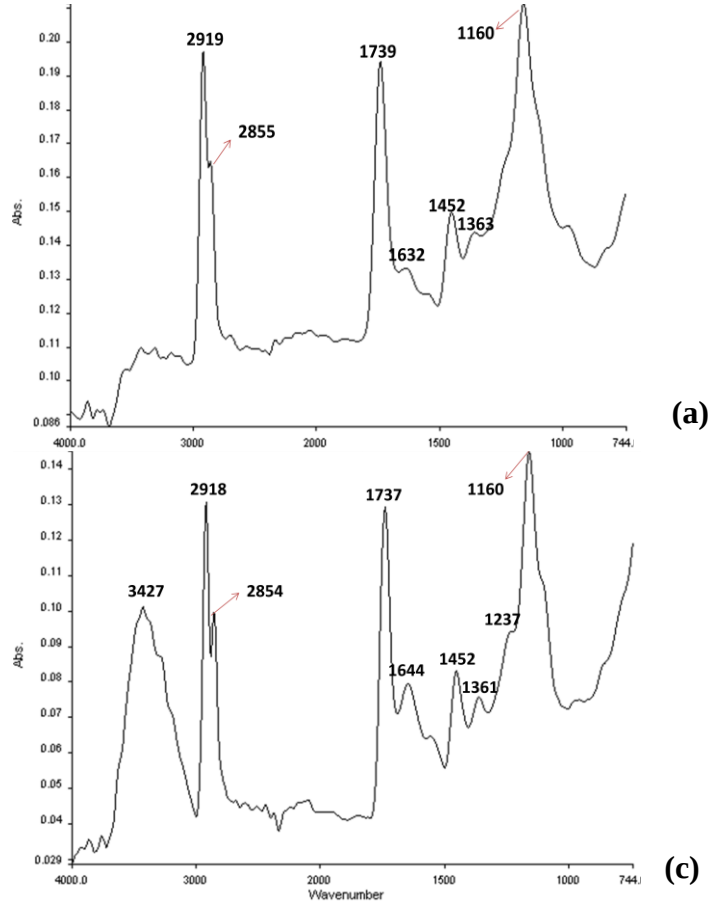


**Şekil 4.5 :** III. peynir örneğine ait FTIR mikroyapı görüntüleri. (A) Tarama görüntüsü. (B) Yağ bileşeni dağılımı. (C) Protein bileşeni dağılımı.

Şekil 4.5' teki C görüntüsünde ise protein dağılımı gözlemlenmiştir. C görüntüsünde protein bileşeni dağılımı pembeden mora doğru değişen bir renk skalası ile gözlemlenmektedir, protein bileşenin yoğun olduğu bölgeler pembe ve kırmızı renkte gözlemlenirken protein bileşenin bulunmadığı bölgeler ise mor renkte gözlemlenmiştir. Şekil 4.5' te A görüntüsü üzerinde kırmızı noktalar ile seçilmiş olan bölgeler, aynı koordinatlarda, B görüntüsünde kırmızı ok ucu ile C görüntüsünde ise siyah ok ucu ile gösterilmektedir. Gösterilen dört bölgeden dört farklı spektrum

alınmıştır. Şekil 4.6' da görüntüler üzerindeki 1, 2, 3 ve 4 bölgelerinden alınmış olan spektrumlar sırasıyla a, b, c, d spektrumları olarak gösterilmektedir. Bu spektrumlardan c yağ bileşeninin yoğun olarak gözlemlendiği 3 noktasından, d spektrumu ise protein bileşeninin yoğun olarak gözlemlendiği 4 noktasından alınmıştır. Mikroyapı görüntüleri ile uyumlu olarak 3 noktasından alınan spektrumda C-H ve C=O grupları absorpsiyonu gözlemlenirken, 4 noktasından alınan spektrumda amid I ve amid II gruplarının absorpsiyonu baskın olarak gözlemlenmektedir.

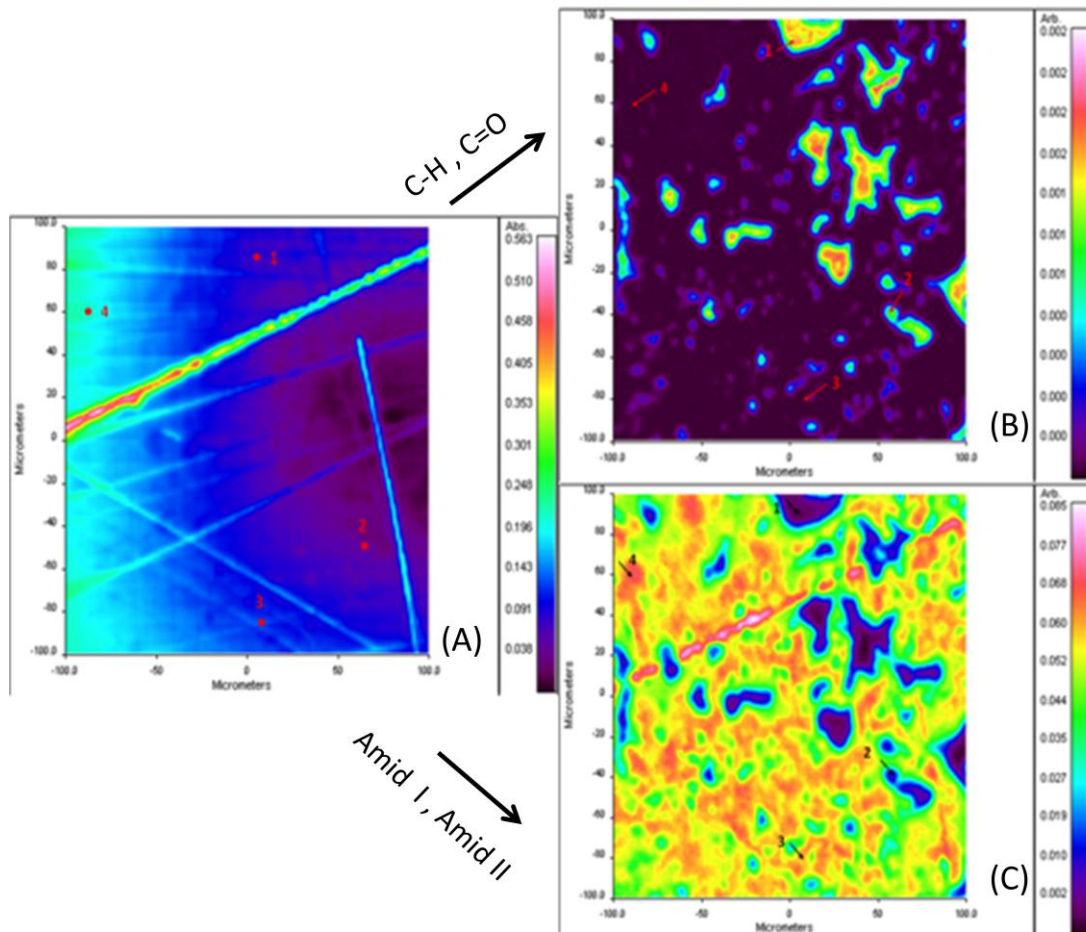
Diğer spektrumlar incelendiğinde ise, a spektrumunda C-H, C=O, b spektrumunda ise C-H, amid I ve amid II gruplarından kaynaklanan absorpsiyon bandları gözlemlenmiştir.



**Şekil 4.6 :** III. peynir örneğine ait FTIR mikroyapı görüntülerinden alınmış spektrumlar. (a) Bir noktasından. (b) İki noktasından. (c) Üç noktasından. (d) Dört noktasından.

#### 4.1.1.4 IV. peynir

Dördüncü çeşit Ezine peynir örneği için, I. peynir incelenirken detaylı olarak anlatıldığı şekilde spektral bilgilerden yararlanılarak tarama görüntüsü işaretlenmiş, yağ ve protein dağılımı incelenmiştir. Şekil 4.7’ deki B görüntüsünde yağ bileşeni dağılımı pembeden mora doğru değişen bir renk skalası ile gözlemlenmektedir, yağ bileşenin yoğun olduğu bölgeler pembe ve kırmızı renkte gözlemlenirken yağ bileşenin bulunmadığı bölgeler ise mor renkte gözlemlenmiştir

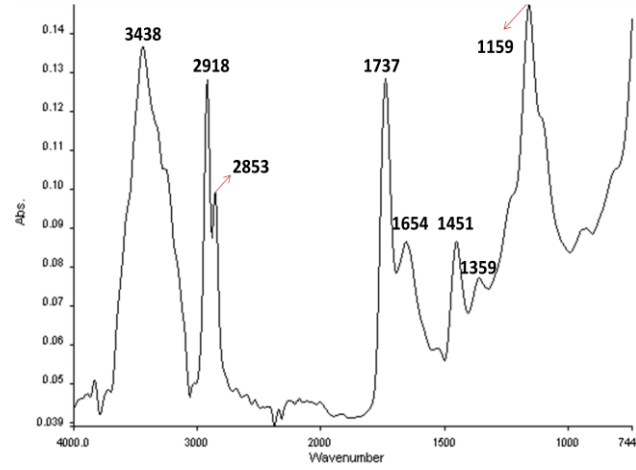


**Şekil 4.7 :** IV. peynir örneğine ait FTIR mikroyapı görüntüleri. (A) Tarama görüntüsü. (B) Yağ bileşeni dağılımı. (C) Protein bileşeni dağılımı.

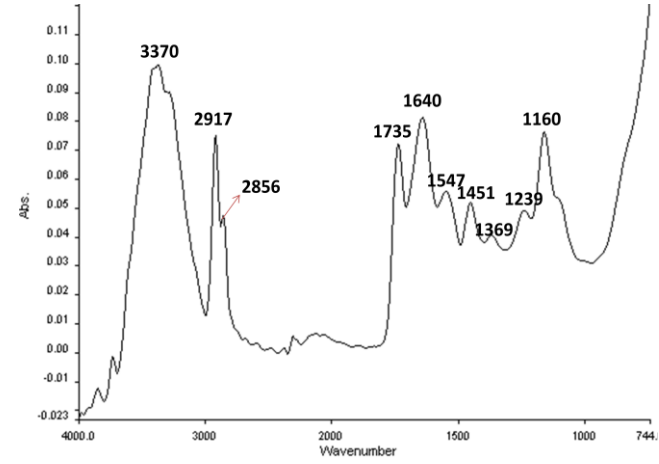
Şekil 4.7’ deki C görüntüsünde ise protein dağılımı gözlemlenmiştir. C görüntüsünde protein bileşeni dağılımı pembeden mora doğru değişen bir renk skalası ile gözlemlenmektedir, protein bileşenin yoğun olduğu bölgeler pembe renkte gözlemlenirken protein bileşenin bulunmadığı bölgeler ise mor renkte gözlemlenmiştir. Şekil 4.7’ deki A görüntüsü üzerinde kırmızı noktalar ile seçilmiş olan bölgeler, aynı koordinatlarda, B görüntüsünde kırmızı ok ucu ile C

görüntüsünde ise siyah ok ucu ile gösterilmektedir. Gösterilen dört bölgeden dört farklı spektrum alınmıştır. Şekil 4.8’ de görüntüler üzerindeki 1, 2, 3 ve 4 bölgelerinden alınmış olan spektrumlar sırasıyla a, b, c, d spektrumları olarak gösterilmektedir. Bu spektrumlardan a yağ bileşeninin yoğun olarak gözlemlendiği 1 noktasından, d spektrumu ise protein bileşeninin yoğun olarak gözlemlendiği 4 noktasından alınmıştır. Mikroyapı görüntüleri ile uyumlu olarak 1 noktasından alınan spektrumda C-H ve C=O grupları absorpsiyonu gözlemlenirken, 4 noktasından alınan spektrumda amid I ve amid II gruplarının absorpsiyonu baskın olarak gözlemlenmektedir.

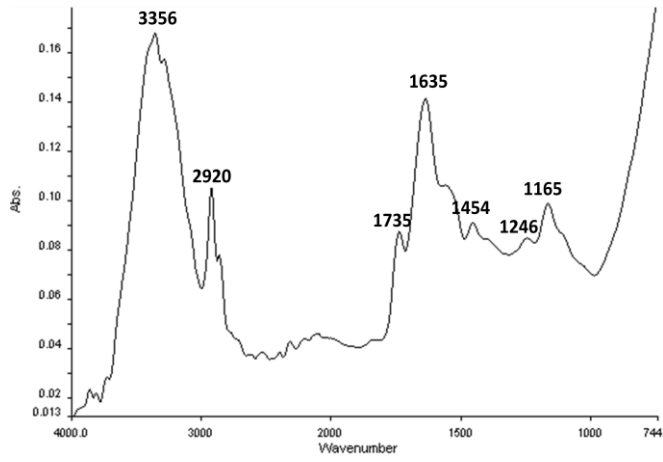
Diğer spektrumlar incelendiğinde ise, b spektrumunda C-H, C=O, amid I, amid II, c spektrumunda ise C-H, C=O ve amid I gruplarından kaynaklanan absorpsiyon bantları baskın olarak gözlemlenmiştir.



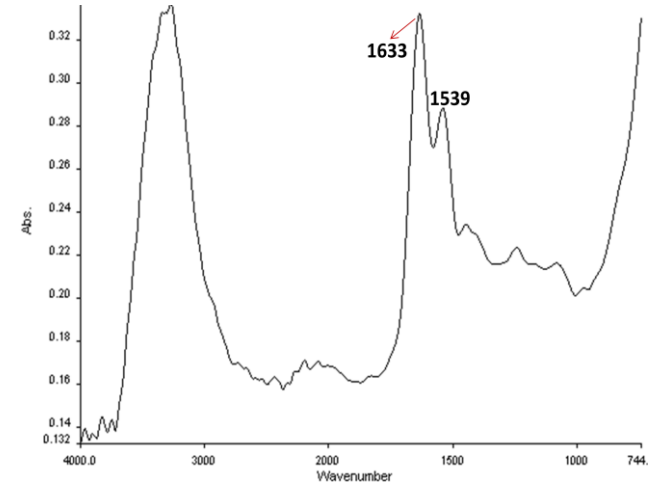
(a)



(b)



(c)



(d)

**Şekil 4.8 :** IV. peynir örneğine ait FTIR mikroyapı görüntülerinden alınmış spektrumlar. (a) Bir noktasından. (b) İki noktasından. (c) Üçnoktasından. (d) Dört noktasından.

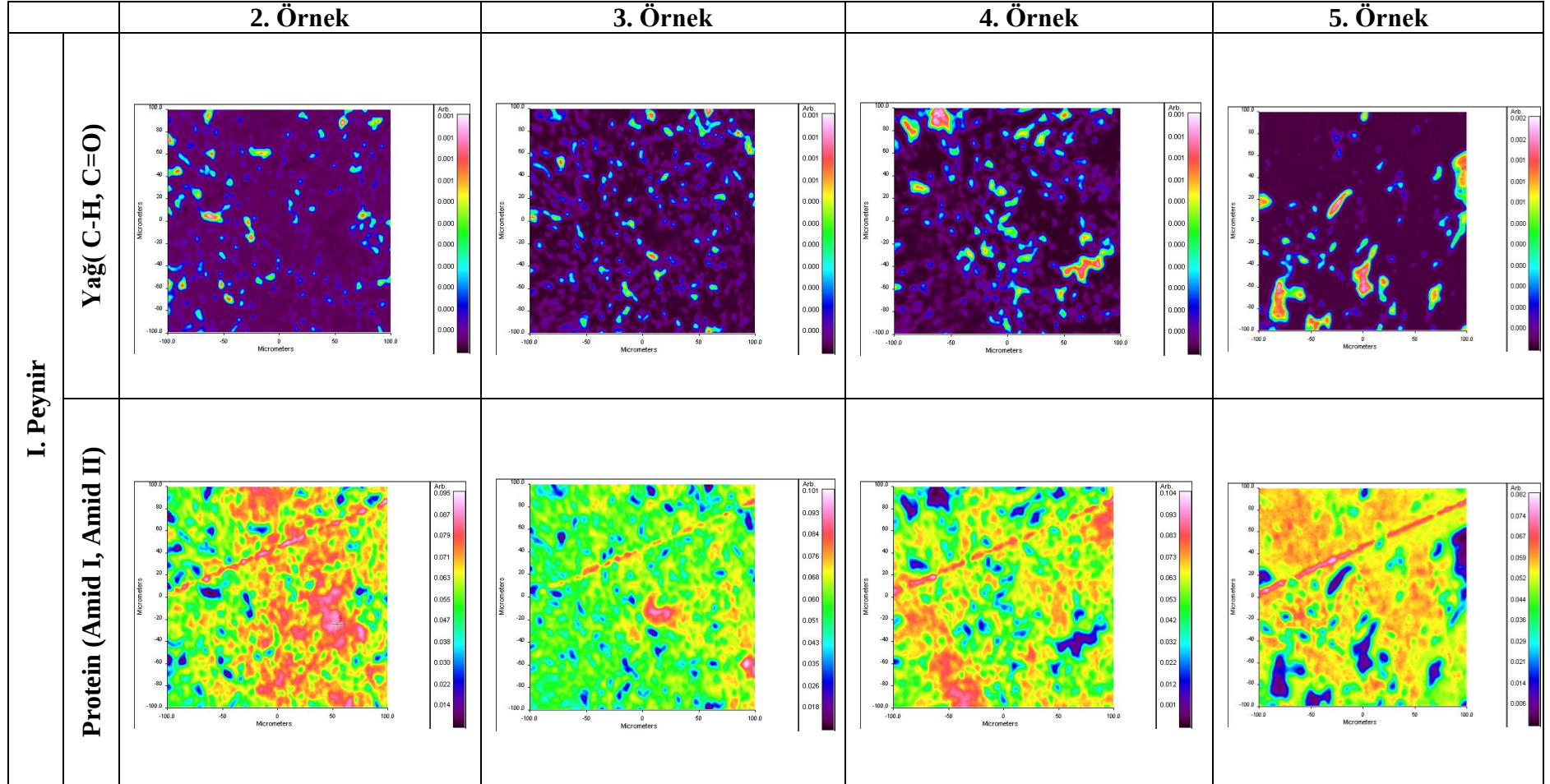
#### **4.1.2 Ezine peynir örneklerinin mikroyapılarının karşılaştırılması**

Bu tez çalışması kapsamında dört çeşit ezine peyniri ile çalışılmıştır. Her bir peynir çeşidi için beş örnek incelenmiştir. Ezine peynirlerinin ilk örnekleri ve yapılan çalışma dördüncü bölüm içerisinde ayrıntılı olarak incelenmiş, açıklanmıştır. Her bir peynir çeşidi için incelenmiş olan diğer dört görüntü ise çizelge olarak verilmiştir. Söz konusu görüntüler çizelge 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5 'te sırasıyla birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü peynirin mikro-FTIR ile elde edilmiş görüntüleri olarak verilmiştir. Bu çizelgelerde, peynir örneklerinden elde edilmiş tarama görüntülerinin yağ dağılımının görüntülenmesi için C-H ve C=O gruplarına, protein dağılımının görüntülenmesi için ise amid I ve amid II gruplarına ait spektral bilgilerin kullanılarak oluşturulduğu yağ ve protein dağılım görüntüleri sunulmaktadır. Çizelge 4.2' de I. peynir örneğine ait Mikro-FTIR ile elde edilmiş mikroyapı görüntüleri verilmektedir. I. Peynir örneklerinin tarama görüntülerinin yağ bileşenine göre işaretlendiği görüntülerde, yağ kitlelerinin dağılımının küçük yığılımlar halinde olduğu gözlenmiştir. Yığılmış haldeki yağların belli bölgelerde daha yoğun olduğuna rastlanmıştır.

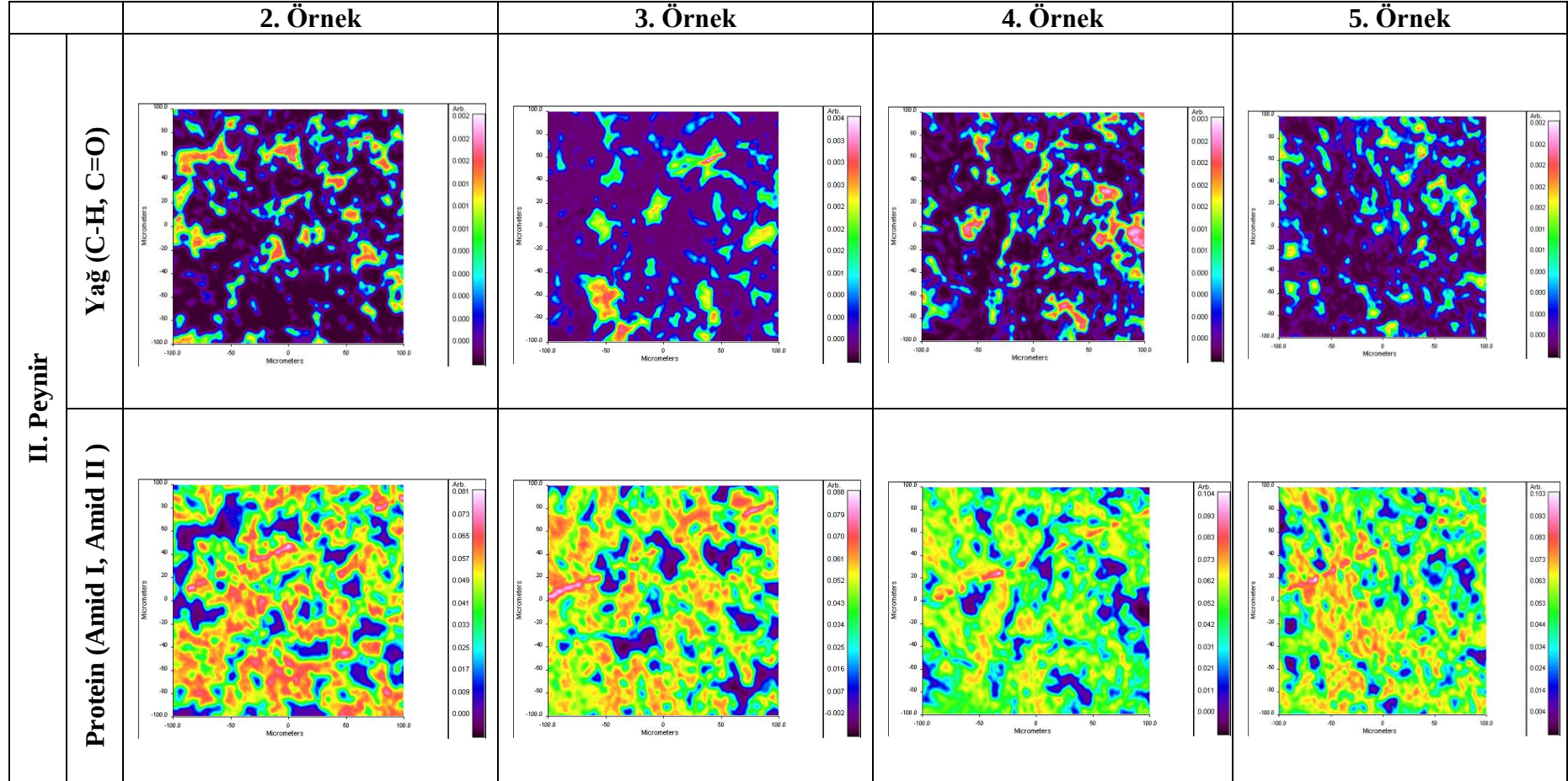
Çizelge 4.3' te II. peynir örneğine ait, Çizelge 4.4' te III. peynir örneğine ait Mikro-FTIR ile elde edilmiş mikroyapı görüntüleri verilmektedir. II. ve III. peynir örneklerinin tarama görüntülerinin yağ bileşenine göre işaretlendiği görüntülerde, yağ kitlelerinin dağılımının büyük yığılımlar halinde olduğu gözlenmiştir, yağ kitlelerinin dağılımının mikroyapı içerisindeki farklı bölgelerde benzer şekilde olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.5' te IV. peynir örneğine ait Mikro-FTIR ile elde edilmiş mikroyapı görüntüleri verilmektedir. IV. Peynir örneklerinden elde edilen görüntülerde yağ kitlelerinin dağılımının büyük yığılımlar halinde olduğu gözlenmiştir. Yağ kitlelerinin bölgeden bölgeye farklılık gösteren bir dağılıma sahip olduğu gözlenmiştir.

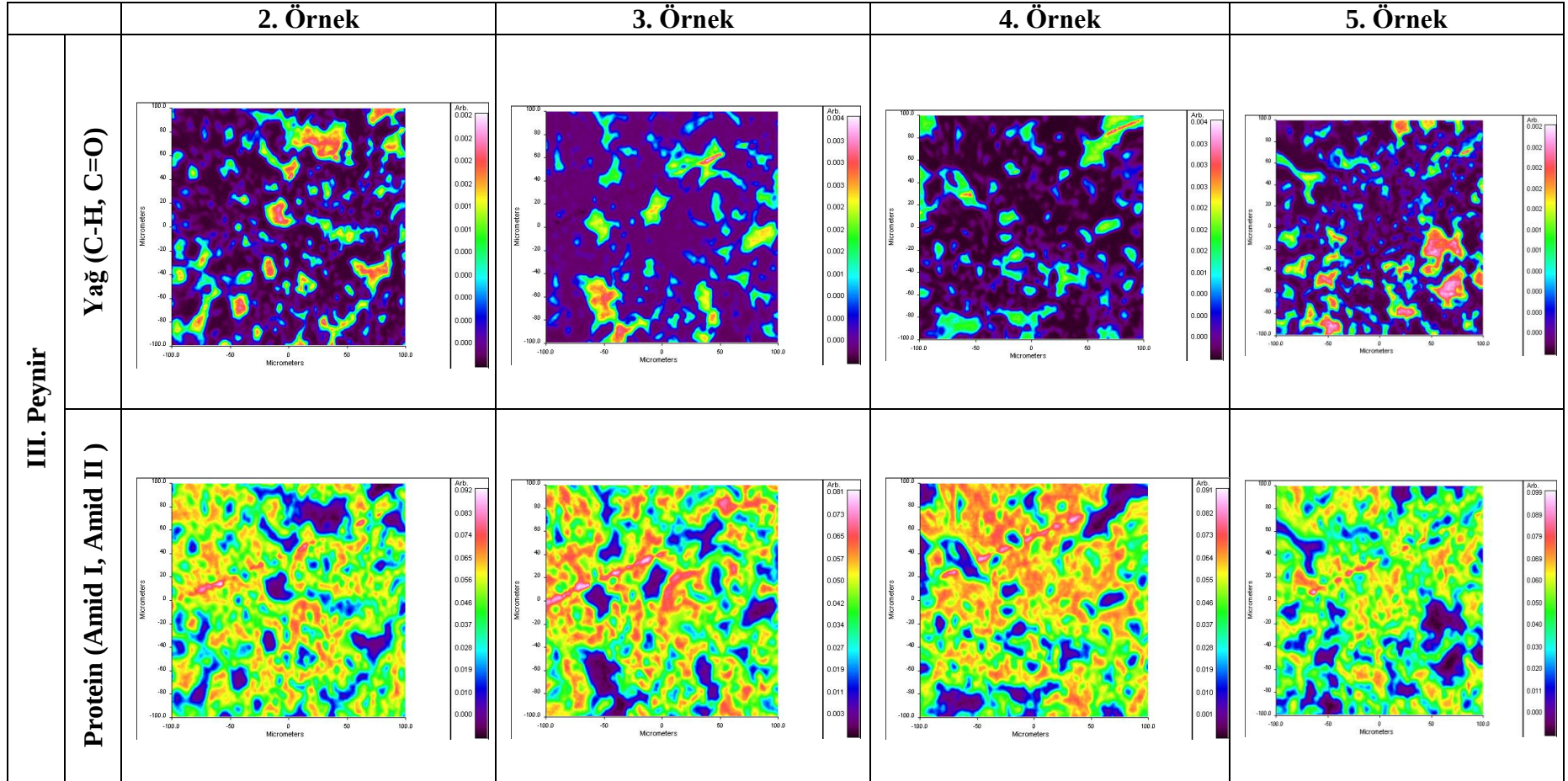
**Çizelge 4.2 : Mikro-FTIR ile elde edilmiş I. Peynir ait mikroyapı görüntüleri**



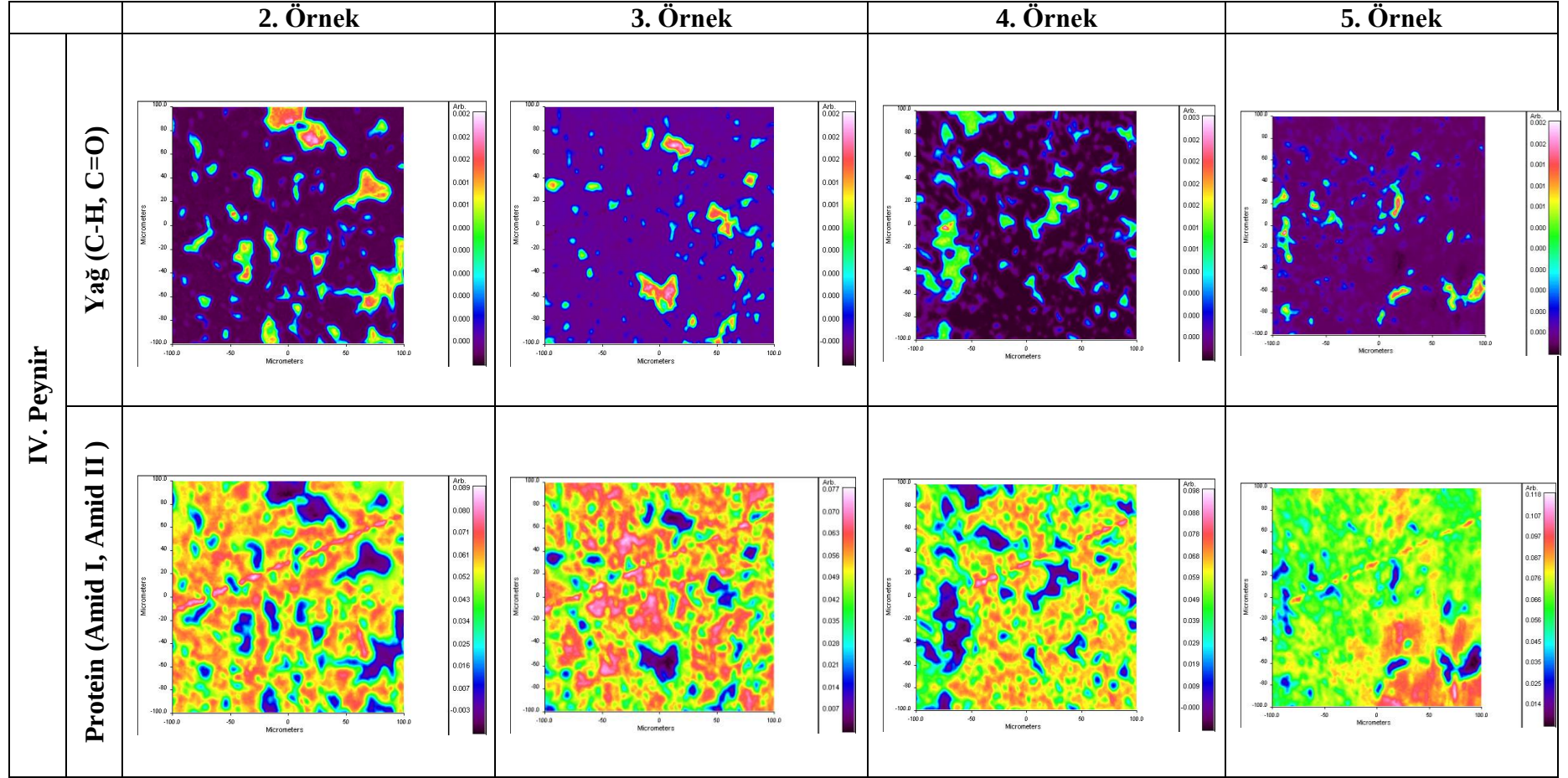
Çizelge 4.3 : Mikro-FTIR ile elde edilmiş II. Peynir ait mikroyapı görüntüleri.



Çizelge 4.4 : Mikro-FTIR ile elde edilmiş III. Peynir ait mikroyapı görüntüleri.

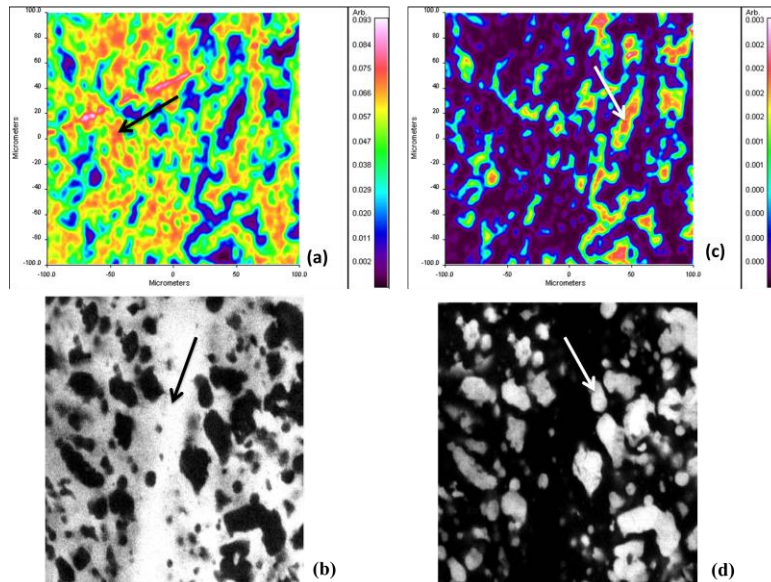


Çizelge 4.5 : Mikro-FTIR ile elde edilmiş IV. Peynir ait mikroyapı görüntüleri.



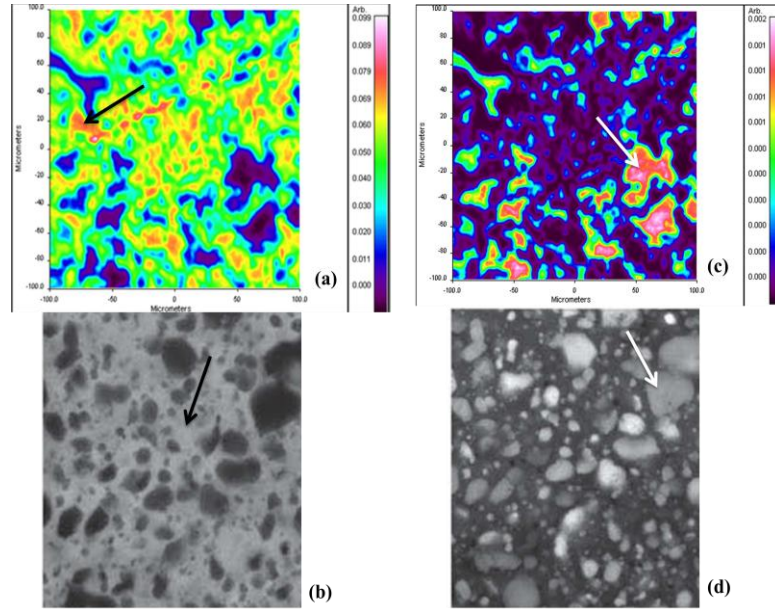
## 4.2 Tartışma

Literatürde, çeşitli mikroyapı görüntüleme teknikleri kullanılarak peynirin mikro yapısının görüntülenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde farklı teknikler ile elde edilmiş peynire ilişkin mikroyapı görüntüleri ile FTIR mikroyapı görüntüleme tekniği ile edilmiş ezine beyaz peyniri görüntülerinin karşılaştırılması yapılmıştır. Şekil 4.9’ da konfokal lazer tarama mikroskopisi tekniği kullanılarak elde edilmiş, Emmantel peynire ait mikroyapı görüntüleri ile II. Ezine peynirine ait mikroyapı görüntüleri karşılaştırılmıştır. Şekilde, a ve b görüntüleri sırasıyla Ezine peynirinin ve Emmantel peynirin protein dağılımını göstermektedir. Benzer şekilde, c ve d görüntüleri sırasıyla Ezine peynirinin ve Emmantel peynirin yağ dağılımını göstermektedir. FTIR görüntüleme tekniği ile elde edilmiş a görüntüsünde tüm kırmızı bölgelerde protein dağılımı gözlenmekte, siyah ok ucu ile temsili olarak protein bileşeninin bulunduğu bir bölge gösterilmektedir, c görüntüsünde ise tüm kırmızı bölgelerde yağ dağılımı gözlemlenmekte, beyaz ok ucu ile yağ bileşeninin bulunduğu bir bölge gösterilmektedir. Konfokal lazer tarama mikroskopisi ile elde edilmiş b görüntüsünde beyaz bölgeler protein bileşenini, d görüntüsünde ise beyaz bölgeler yağ bileşenini göstermektedir. Şekildeki b ve d görüntülerindeki ok uçları ise sırasıyla protein ve yağ bileşeninin bulunduğu bir bölgeyi göstermektedir.



**Şekil 4.9 :** Peynire ait mikroyapı görüntüleri. (a, c) Ezine peyniri FTIR mikroyapı görüntüleri. (b, d) Emmantel peynir CSLM mikroyapı görüntüleri [22].

Şekil 4.10’ da konfokal lazer tarama mikroskopisi tekniği kullanılarak elde edilmiş, Çedar peynirine ait mikroyapı görüntüleri ile III. Ezine peynirine ait mikroyapı görüntüleri karşılaştırılmıştır. Şekilde, a ve b görüntüleri sırasıyla Ezine peynirinin ve Çedar peynirin protein dağılımını göstermektedir. Benzer şekilde, c ve d görüntüleri sırasıyla Ezine peynirinin ve Çedar peynirin yağ dağılımını göstermektedir. FTIR görüntüleme tekniği ile elde edilmiş a görüntüsünde tüm kırmızı bölgelerde protein dağılımı gözlenmekte, siyah ok ucu ile temsili olarak protein bileşeninin bulunduğu bir bölge gösterilmektedir, c görüntüsünde ise tüm kırmızı bölgelerde yağ dağılımı gözlemlenmekte, beyaz ok ucu ile yağ bileşeninin bulunduğu bir bölge gösterilmektedir. Konfokal lazer tarama mikroskopisi ile elde edilmiş b görüntüsünde beyaz bölgeler protein bileşenini, d görüntüsünde ise beyaz bölgeler yağ bileşenini göstermektedir. Şekildeki b ve d görüntülerindeki ok uçları ise sırasıyla protein ve yağ bileşeninin bulunduğu bir bölgeyi göstermektedir.

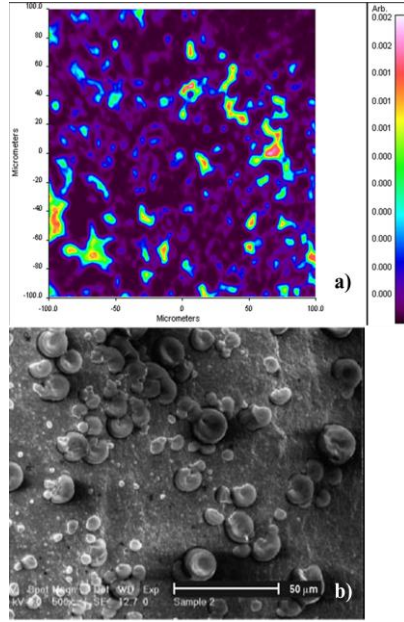


**Şekil 4.10 :** Peynire ait mikroyapı görüntüleri. (a, c) Ezine peyniri FTIR mikroyapı görüntüleri. (b, d) Çedar peyniri CSLM mikroyapı görüntüleri [23].

Şekil 4.9 ve 4.10’ da verilen görüntülerden yola çıkarak hem FTIR görüntüleme tekniği hem de Konfokal lazer tarama mikroskopisi (CLSM) tekniği ile peynirin mikroyapısı hakkında benzer bilgi elde edilmiştir şöyle ki her iki teknik ile de protein matriksi içerisinde farklı büyüklüklerde, sürekli olarak dağılım göstermiş yağ bileşenleri gözlemlenmektedir.

Şekil 4.11’ de SEM tekniği kullanılarak elde edilmiş, İran Beyaz peynirine ait mikroyapı görüntüleri ile FTIR görüntüleme tekniği ile elde edilmiş I. Ezine

peynirine ait mikroyapı görüntüleri karşılaştırılmıştır. Şekilde, a görüntüsü Ezine peynirinin yağ dağılımını gösterirken b görüntüsü İran Beyaz peynirinin mikroyapısını göstermektedir. Şekil 4.11’de, a görüntüsündeki kırmızı bölgeler yağ bileşenini, b görüntüsünde ise küresel yapılar yağ bileşenini göstermektedir.

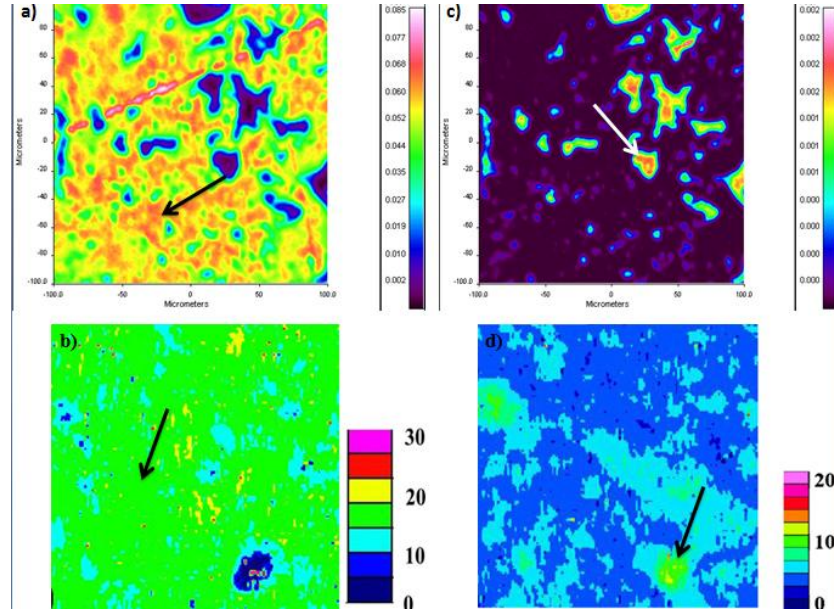


**Şekil 4.11 :** Peynire ait mikroyapı görüntüleri. (a) Ezine peyniri FTIR mikroyapı görüntüsü. (b) İran beyaz peyniri SEM mikroyapı görüntüsü [15].

Şekil 4.11’den yola çıkarak hem FTIR görüntüleme tekniği hem de elektron tarama mikroskopisi (SEM) tekniği ile peynirin mikroyapısı hakkında benzer bilgi elde edildiği söylenebilir. Her iki teknik ile de protein matrisi içerisinde farklı büyüklüklerde, dağılım göstermiş yağ bileşenleri gözlemlenmektedir.

Şekil 4.12’ de nişasta içeren imitasyon peynirin mikroyapısı ile IV. Ezine peynirinin mikroyapısı karşılaştırılmıştır. Şekilde, a ve b görüntüleri sırasıyla Ezine peynirinin ve imitasyon peynirin protein dağılımını göstermektedir. Benzer şekilde, c ve d görüntüleri sırasıyla Ezine peynirinin ve imitasyon peynirin yağ dağılımını göstermektedir. Her iki peynirinde mikroyapıları FTIR görüntüleme tekniği ile incelenmiştir. Şekil 4.12’de ki a görüntüsünde tüm kırmızı bölgelerde protein dağılımı gözlenmekte, siyah ok ucu ile temsili olarak protein bileşeninin bulunduğu bir bölge gösterilmektedir, c görüntüsünde ise tüm kırmızı bölgelerde yağ dağılımı gözlemlenmekte, beyaz ok ucu ile yağ bileşeninin bulunduğu bir bölge gösterilmektedir. FTIR görüntüleme tekniği ile incelenmiş imitasyon peynire ait b görüntüsünde ise yeşil bölgeler protein bileşenini, d görüntüsünde ki yeşil bölgeler

yağ bileşenini göstermektedir. Şekildeki b ve d görüntülerindeki ok uçları ise sırasıyla protein ve yağ bileşeninin bulunduğu bir bölgeyi göstermektedir.



**Şekil 4.12 :** Peynire ait mikroyapı görüntüleri. (a, c) Ezine peyniri FTIR mikroyapı görüntüleri. (b, d) İmitasyon peynir FTIR mikroyapı görüntüleri [14].

Ezine peynirinin ve imitasyon peynirinin mikroyapılarının görüntülenmesi için FTIR görüntüleme tekniği kullanılmıştır. İmitasyon peynirin mikroyapı görüntüleri transmisyon modda elde edilmiştir. Her iki görüntüde, protein matrisi içerisinde dağılım göstermiş yağ bileşeni gözlemlenmektedir. Ezine peynirinin mikroyapısının incelendiği FTIR görüntüleri, ATR tekniği kullanılarak elde edilmiştir dolayısıyla görüntüler daha yüksek çözünürlüğe sahiptir, mikroyapı içerisindeki bileşenler daha güçlü bir şekilde ayırd edilebilmiştir.



## 5. VARGILAR VE DEĞERLENDİRME

Gerçekleştirilen deneysel çalışmalar ile, yeni bir teknik olan Mikro-FTIR spektroskopik görüntüleme tekniğini kullanarak, dört ayrı çeşit peynir örneğinin mikroyapıları kimyasal bileşenlerine göre görüntülenmiştir. Elde edilen kimyasal görüntüler temel bileşenlerin yapı içerisindeki boylamsal (uzamsal) dağılımı sergilemiştir.

Yağ bişenleri yağ asidi zincirindeki C-H kimyasal (kovalent) bağı ve C=O ester bağları ile karakterize edilebildiklerinden, bu fonksiyonel gruplarının absorpsiyon yaptıkları dalgaboyu üzerinde ifadelendirilmiştir. Protein dağılımın için ise amid I ve amid II gruplarının absorpsiyon yaptıkları aralık tanımlanmıştır. Bu iki ana peynir bileşeni için IR spektrumunda ilgili bölgeler kullanarak kimyasal görüntüleme yapılabileceği gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçların genel değerlendirmesinde, peynirin mikroyapısının protein matriksi içerisinde çeşitli oran ve yığılımlarda (cluster) dağılmış halde bulunan farklı yağ kitlelerinden oluştuğu gözlemlenmiştir. Dört farklı üreticiden temin edilen Ezine peynirlerinin mikroyapılarında, protein matriksinde yağ moleküllerinin ne tür dağılım sergiledikleri ve aralarından bir farklılık olup olmadığı incelenmiştir.

I. Peynir örneklerinin tarama görüntülerinin yağ bileşenine göre işaretlendiği görüntülerde, yağ kitlelerinin dağılımının küçük yığılımlar halinde olduğu gözlenmiştir. Yığılmış halde yağların belli bölgelerde daha yoğun olduğuna rastlanmıştır.

II. ve III. peynir örneklerinin tarama görüntülerinin yağ bileşenine göre işaretlendiği görüntülerde, yağ kitlelerinin dağılımının büyük yığılımlar halinde olduğu gözlenmiştir, yağ kitlelerinin dağılımının mikroyapı içerisindeki farklı bölgelerde benzer şekilde olduğu görülmektedir.

IV. peynir örneklerinden elde edilen görüntülerde yağ kitlelerinin dağılımının büyük yığılımlar halinde olduğu ve yağ kitlelerinin bölgeden bölgeye farklılık gösteren bir dağılıma sahip olduğu gözlenmiştir.

Kimyasal görüntüler IR absorpsiyon şiddetine göre düzenlendiği için, yağ ve protein yapılarının saf halden başka karışım halinde bulundukları bölgelerde gösterilebilmiştir. Kimyasal etkileşimin derecesine göre bu dağılımlar görüntülerde açığa çıkmaktadır.

Bütün bu sonuçlar peynir gibi karmaşık bir mikroyapıya sahip gıda ürününde bileşen dağılımı ve kimyasal etkileşimin mikro-FTIR kullanarak 6.25 mikron çözünürlüğünde görüntülenebileceğini göstermiştir. Elde edilen bu mikroyapı bilgilerinin gıdanın makroskopik özelliklerini belirleyici olduğu aşikardır. Bu çalışmanın devamı mikroyapının, bir gıda ürününün makroskopik karakterini, özellikle fiziksel özellikleri nasıl etkileyebileceği yönünde önemli sonuçlar verecek niteliktedir.

## KAYNAKLAR

- [1] **Cogan, T.M., Fox, P.F., Guinee, T.P., McSweeney, P.L.H.,** (2000), *Fundamentals of Cheese Science*, Aspen Publishing, Gaithersburg.
- [2] **Cogan, T., Fox P.F., Guinee T., McSweeney P.,** (2004), *Cheese Chemistry Physics and Microbiology*, Aspen Publishers, Inc., Maryland.
- [3] **Drake, M.A., Eliardi, A., Harper, W.T., Kocaoğlu-Vurma, N.A., Rodriguez-Saona, L.E.,** (2009), Rapid Profiling of Swiss Cheese by Attenuated Total Reflectance(ATR) Infrared Spectroscopy and Descriptive Sensory Analysis, *Journal of Food Science*, **74**, 208-214.
- [4] **Drake, M.A.,** (2007), Sensory Analysis of Dairy Foods, *Journal of Dairy Science*, **90**, 4925-4937
- [5] **TS 591,** (2006), Beyaz Peynir, *Türk Standartları Enstitüsü*, Ankara
- [6] **TPE Coğrafi İşaret Tescil Belgesi,** (2006), *Ezine Peyniri*, *Türk Patent Enstitüsü*, Ankara.
- [7] **Engin, B., Güneser, O., Tuncel, N.B., Yaşar, K., Yüceer, Y.K., Zorba, N.N.,** (2008), Ezine Cheese II. Proteolysis Level During Ripening, *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü*.
- [8] **Caccamo, M., Carrato, S., Impoca, G., Licitra, G., Tuminello, L.,** (2007), Quantitative Analysis of Cheese Microstructure Using SEM Imagery, *SMAI Congress*, **2**, 1-10.
- [9] **Buffa, M.N., Guamis, B., Pavia, M., Trujillo, A.J.,** (2001), Changes in Textural, Microstructural and Colour Characteristics During Ripening of Cheeses Made from Raw, Pasteurized or High-Pressure-Treated Goat's Milk, *International Dairy Journal*, **11**, 927-934.
- [10] **Ferrandini, E., Laencina, J., Rovira, S.,** (2011), Microstructure Quantification by Scanning Electron Microscopy and Image Analysis of Goat Cheese Curd, *Journal of Dairy Science*, **94**, 1091-1097.
- [11] **Mehrota R.,** (2000), Infrared Spectroscopy, *Gas Chromatography in Food Analysis in Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Eds. R.A. Meyer, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- [12] **Ismail, A.A., Sedman, J., Van de Voort, F.R.,** (1997), Fourier Transform Infrared Spectroscopy Principles and Applications in Instrumental Methods In *Food Analysis*, Eds. Belonger, J.M.R., Pane J.R.T., Elsevier, Amsterdam.
- [13] **Price, K.M.,** (2007), *Microstructure and Functionality of Processed Cheese: The Role of Milk Fat*, master's thesis, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina

- [14] **Duggan, E., Noronha, N., O’Riordan, E.D., O’ Sullivan, M., Stapleton, J.J., Ziegler, G.R.,** (2008), Comparison of Microscopy Techniques for the Examination of Microstructure of Starch-Containing Imitation Cheeses, *Food Research International*, **41**, 472-479.
- [15] **Ebrahimzadeh M., Ehsani, M.R., , Karami M., Rezaei, K., Safari, M.,** (2008), Microstructural Changes in Fat During the Ripening of Iranian Ultrafiltered Feta Cheese, *Journal of Dairy Science*, **91**, 4147-4154.
- [16] **Khosroshahi, A., Madadlou, A., Mousavi., M.E.,** (2005), Rheology, Microstructure and Functionality of Low Fat Iranian White Cheese Made with Different Concentrations of Rennet, *Journal of Dairy Science*, **88**, 3052-3062.
- [17] **Lobato-Calleros, C., Ramoz-Solis, L., Rodriguez-Huezo, M.E., Santoz-Moreno, A.,** (2006), Microstructure and Texture of PanelaType Cheese-Like Products: Use of Low Methoxyl Pectin and Canola oil as Milk-Fat Substitutes, *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica*, **5**, 71-79
- [18] **Alvarez, V.B., Sipahioğlu, O., Solano-Lopez, C.,** (1999), Structure, physico-chemical and Sensory Properties of Feta Cheese Made with Tapioca Starch and Lecithin as Fat Mimetics, *International Dairy Journal*, **9**, 783-789.
- [19] **Elsoda, M., Frank, J.F., Hassan, A.N.,** (2002), Observation of Bacterial Exopolysaccharide in Dairy Products Using Cryo-scanning Electron Microscopy, *International Dairy Journal*, **13**, 755-762.
- [20] **Corredig, M., Frank, J.F., Hassan, A.N.,** (2002), Microstructure of Feta Cheese Made Using Different Cultures as Determined by Confocal Scanning Laser Microscopy, *Journal of FoodScience*, **67**, 2750-2753.
- [21] **Ding, K., Gunasekaran S.,** (1999), Three Dimensional Characterisitics of Fat Globules in Cheddar Cheese, *Journal of Dairy Science*, **82**, 1890-1896.
- [22] **Camier, B., Gassi J., Lopez, C.,** (2004), Development of Milk Fat Microstructure During the Manufacture and Ripening of Emmental Cheese Observed by Confocal Laser Microscopy, *International Dairy Journal*, **17**, 235-247.
- [23] **Berry, T.K., Daubert, C.R., Foegeding, E.A., McMahon, D.,J., Rogers, N.R.,** (2010), Rheological Properties and Microstructure of Cheddar Cheese Made with Different Fat Contents, *Journal of Dairy Science*, **93**, 4565–4576.
- [24] **Bastian, E.D., Fulcher, R.G., Martin, F.B., Sutheerawattananonda, M.,** (1997), Fluorescence Image Analysis of Process Cheese Manufactured with Trisodium Citrate and Sodium Chloride, *Journal of Dairy Science*, **80**, 620-627.
- [25] **Griffiths, P.R.,** (2005), Infrared Spectroscopy in *Encyclopedia of Analytical Science*, Eds. Poole, C., Townshend A., Worsfold P., Elsevier Ltd, Moscow.

- [26] **Dufour E.**, (2009), Principles of Infrared Spectroscopy in *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, Ed. Sun D., Elsevier Ltd, Dublin.
- [27] **Harper J., Kocaoğlu-Vurma N., Prabhakar, V., Rodriguez Saona, L.**, (2009), Application of Infrared Microspectroscopy and Multivariate Analysis for Monitoring the Effect of Adjunct Cultures During Swiss Cheese Ripening, *Journal of Dairy Science*, **92**, 3575-3584.
- [28] **Harper, W.J., Rodriguez-Saona, L.E., Subramanian, A.**, (2009), Rapid Prediction of Composition and Flavor Quality of Cheddar Cheese Using ATR-FTIR Spectroscopy, *Journal of Food Science*, **74**, 292-296.
- [29] **Campo, S.T., Corrieu, G., Picque, D., Ramirez, R.**, (2006), Middle Infrared Spectroscopy Characterization of Ripening Stages of Camembert – type Cheeses, *International Dairy Journal*, **17**, 835-845.
- [30] **Harper, W.J., Rodriguez-Saona, L.E., Subramanian, A.**, (2008), Cheddar cheese Classification Based on Flavor Quality Using a Novel Extraction Method and Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Journal of Dairy Science*, **92**, 87-94.
- [31] **Alvarez, V.B., Harper, W.J., Rodriguez-Saona, L.E., Subramanian, A.**, (2011), Monitoring Amino Acids, Organic Acids, and Ripening Changes in Cheddar Cheese Using Fourier-Transform Infrared Spectroscopy, *International Dairy Journal*, **21**, 434-440.
- [32] **Chen, M., Irudayaraj, J., McMahon, D.J.**, (1997), Examination of Full Fat and Reduced Fat Cheddar Cheese During Ripening by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Journal of Dairy Science*, **81**, 2791-2797.
- [33] **Alvarez, V.B., Harper, J., Koca, N., Rodriguez-Saona, E.**, (2007), Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Monitoring Short-Chain Free Fatty Acids in Swiss Cheese, *Journal of Dairy Science*, **90**, 3596-3603.
- [34] **Blazquez, C., Delahunty, C., Downey, G., Everard, C., Howard, V., O'Callaghan, D., O'Donnell, P., Sheehan, E.**, (2005), Modelling of Sensory and Instrumental Texture Parameters in Processed Cheese by Near Infrared Reflectance Spectroscopy, *Journal of Dairy Research*, **73**, 58-69.
- [35] **Bosset, J.O., Luginbühl, W., Picque, D., Pillonel, L., Schaller, E., Tabacchi, R.**, (2002), Analytical Methods for The Determination of The Geographic Origin of Emmental Cheese: Mid and Near Infrared Spectroscopy, *European Food Research and Technology*, **216**, 174-178.
- [36] **Sommer, A.J.**, (2002), Mid-infrared Transmission Microspectroscopy in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Eds. Chalmers, M.J., Griffiths, P.R., John Wiley & Sons Ltd, Oxford.

- [37] **Haka, A.S., Kidder, L.H., Lewis, E.N.**, (2002), Instrumentation for FTIR Imaging in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Eds. Chalmers, M.J., Griffiths, P.R., John Wiley & Sons Ltd, Cambridge.
- [38] **Siesler, W.H., Vogel, C., Wessel, E.**, (2007), FT-IR Imaging Spectroscopy of Phase Separation in Blends of Poly(3-hydroxybutyrate) with Poly(L-lactic acid) and Poly(E-caprolactone), *Biomacromolecules*, **9**, 523-527.
- [39] **Aßhoff, S.J., Hartwig, A., Kowalik, T., Merten C.**, (2010), FTIR Imaging of Poly(3-hydroxybutyrate) and Isotactic Poly(propylene oxide) Spherulites, *Macromolecular Chemistry and Physics*, **211**, 1627–1631.
- [40] **Jim, Y., Su, Z., Yang, X., Wang W.**, (2009), Chain Orientation and Distribution in Ring-Banded Spherulites Formed in Poly(ester urethane) Multiblock Copolymer, *Journal of Polymer Science*, **48**, 541-547.
- [41] **Koenig, J.L., Miller-Chou B.A.**, (2002), FT-IR Imaging of Polymer Dissolution by Solvent Mixtures. 3. Entangled Polymer Chains with Solvents, *Journal of Macromolecules*, **35**, 440-444.
- [42] **Andrew, Chan., Kazarian, S.G.**, (2004), FTIR Imaging of Polymeric Materials under High-Pressure Carbon Dioxide, *Macromolecules*, **37**, 579-584.
- [43] **Frederics, P.M., George, G.A., Nagle D.J., Rintoul, L.**, (2009), Use of micro-ATR/FTIR imaging to study heterogeneous polymer oxidation by direct solvent casting onto the ATR IRE, *Vibrational Spectroscopy*, **53**, 24–27.
- [44] **Koenig, J.L., Magyar, G., Rafferty, D.W., West, J.L.**, (2002), FT-IR Imaging of Patterned Photocrosslinkable Poly(vinyl cinnamate), *Applied Spectroscopy*, **12**, 1549-1551.
- [45] **Afseth, K.N., Böcker, U.**, (2010), Raman and Infrared Imaging of Foods in *Raman, Infrared and Near- Infrared Chemical Imaging*, Eds. Sasic S., Ozaki Y., John Wiley & Sons Ltd.
- [46] **Marcott, C., Panzer, D.D., Reeder, R.C., Sweat, J.A., Wetzel, D.**, (1999), FT-IR spectroscopic imaging microscopy of wheat kernels using a Mercury–Cadmium–Telluride focal-plane array detector, *Vibrational Spectroscopy*, **19**, 123-129.
- [47] **Koc, H., Wetzel, D.**, (2007), Imaging Local Chemical Microstructure of Germinated Wheat with Synchrotron Infrared Microspectroscopy, *Spectroscopy*, **22**, 24-32.
- [48] **Barron, C., Mills, E.N.C., Parker, M.L., Rouau, X., Wilson, R.H.**, (2005), FTIR Imaging of Wheat Endosperm Cell Walls in Situ Reveals Compositional and Architectural Heterogeneity Related to Grain Hardness, *Planta*, **220**, 667-677.
- [49] **Akin, D.E., Himmelsbach D.S., Khalili, S.**, (2002), The Use of FT-IR Microspectroscopic Mapping to Study the Effects of Enzymatic Retting of Flax (*Linum usitatissimum* L) Stems, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82**, 685-696.

- [50] **Cremer, D.R., Kaletunç, G.,** (2002), Fourier Transform Infrared Microspectroscopic Study of the Chemical Microstructure of Corn and Oat Flour-Based Extrudates, *Carbohydrate Polymers*, **52**, 53–65.
- [51] **Host, V., Kirschner, C., Kohler, A., Ofstad, R., Skarpeid, H.J.,** (2004), Monitoring of Denaturation Processes in Aged Beef Loin by Fourier Transform Infrared Microspectroscopy, *J. Agric. Food Chem*, **52**, 3920-3929.
- [52] **Bertrand, D., Hannesson, K., Kirschner, C., Kohler, A., Martens, H., Ofstad, R.,** 2007, Multivariate Image Analysis of a Set of FTIR Microspectroscopy Images of Aged Bovine Muscle Tissue Combining Image and Design Information, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **389**, 1143–1153.
- [53] **Davis, L.C., Dokken, K.M.,** (2007), Infrared Imaging of Sunflower and Maize Root Anatomy, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **55**, 10517–10530.
- [54] **Bonwell, E.S., Wetzel, D.L.,** (2009), Innovative FT-IR Imaging of Protein Film Secondary Structure before and after Heat Treatment, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **57**, 10067–10072
- [55] **Chan, K.L.A., Kazarian, S.G.,** (2004), FTIR Spectroscopic Imaging of Dissolution of a Solid Dispersion of Nifedipine in Poly(ethylene glycol), *Molecular Pharmaceutics*, **1**, 331-335.
- [56] **Chan, K.L.A., Kazarian, S.G.,** (2004), Visualisation of the heterogeneous water sorption in a pharmaceutical formulation under controlled humidity via FT-IR imaging, *Vibrational Spectroscopy*, **35**, 45-49.
- [57] **Coutts-Lendon, C.A., Koenig, J.L., Mieso, E.V., Wright, N.A.,** (2003), The Use of FT-IR Imaging as an Analytical Tool for The Characterization of Drug Delivery Systems, *Journal of Controlled Release*, **93**, 223-248.
- [58] **Chan, A.L.K., Kazarian, S.G.,** (2006), Applications of ATR-FTIR Spectroscopic Imaging to Biomedical Samples, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1758** , 858–867.
- [59] **Koenig, J.L., Rafferty, D.W.,** (2002), FTIR Imaging for the Characterization of Controlled-Release Drug Delivery Applications, *Journal of Controlled Release*, **83**, 29-39.
- [60] **Boese, M., Fabian, H., Haensch, W., Lasch, P.,** (2002), Mid-IR Microspectroscopic Imaging of Breast Tumor Tissue Sections, *Biopolymers*, **67**, 354-357.
- [61] **Diem, M., Haensch, W., Lasch, P., Naumann, D.,** (2003), Imaging of Colorectal Adenocarcinoma Using FT-IR Microspectroscopy and Cluster Analysis, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1688**, 176– 186.
- [62] **Pezzei, C., Pallua J.D., Schaefer, G., Seifarth, C., Huck-Pezzei, V., Bittner, K.L., Klocker, H., Bartsch, G., Bonna, K.G., and Huck, C.W.,** (2010), Characterization of normal and malignant prostate tissue by Fourier transform infrared microspectroscopy, *Molecular BioSystems*, **6**, 2287–2295.

- [63] **Lasch, P.**, Diagnostic Potentials of FT-IR Microspectrometry in the Examination of Colorectal Adenocarcinomas.
- [64] **Anastassopoulou, J., Boukaki E., Conti C., Ferraris, P., Giorgini, E., Rubini, C., Sabbatini, S., Theophanides, T., Tosi, G.**, (2009), Microimaging FT-IR Spectroscopy on Pathological Breast Tissues, *Vibrational Spectroscopy*, **51**, 270–275.
- [65] **Alò, F., Conti, C., Ferraris, P., Giorgini E., Rubini C, Sabbatini S., Tosi G.**, (2009), Micro-FTIR Imaging Spectroscopy of Calcified Atheromatous Carotid Plaques, *Journal of Molecular Structure*, **922**, 58-63.
- [66] **Bhargava, R.,Kong, R.**, (2011), Characterization of porcine skin as a model for human skin studies using infrared spectroscopic imaging, *Analyst*, **136**, 2359–2366.
- [67] **Fabian, H., Thi, N.A.N., Eiden, M., Lasch , P., Schmitt J., Naumann, D.**, (2006), Diagnosing benign and malignant lesions in breast tissue sections by using IR-microspectroscopy, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **7**, 874-882.
- [68] **Anastassopoulou, J., Arapantoni, P., Boukakil, E., Konstadoudakis S.,Theophanides T., Valavanis C., Conti C., Ferraris, P., Giorgini, G., Sabbatini S., and Tosi, G.**, (2007), Brilliant Light in Life and Material Sciences, 273–278.
- [69] **Tfayli, A., Piot, A., Durlach, A., Bernard P.,Manfait, M.**, (2005), Discriminating nevus and melanoma on paraffin-embedded skin biopsies using FTIR microspectroscopy, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1724 , 262 – 269.
- [70] **Crocombe, R.A., Hoult, R.A., Sellors, J., Wright, N.A.**,(2010), FT-IR Imaging Hardware in *Raman, Infrared and Near- Infrared Chemical Imaging*, Eds. Sasic, S.,Ozaki, Y., John Wiley & Sons Ltd.
- [71] **Li-Chan, Eunice C.Y., A.J.**, (2002), Applications of vibrational spectroscopy in food science in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Eds. Chalmers, M.J., Griffiths, P.R., John Wiley & Sons Ltd, Oxford.
- [72] **Fagan, C.C., O'Donnel, C.P.**, (2008), Application of Mid Infrared Spectroscopy to Food Processing Systems in *Nondestructive Testing of Food Quality*, Eds. Irudayaraj, J., Christoph, R., Blackwell Publishing.

## ÖZGEÇMİŞ



**Ad Soyad:** Nur ÇEBİ

**Doğum Yeri ve Tarihi:** Tekirdağ/ 18.07.1986

**Adres:** 100.Yıl mah. Uğurmumcu cad. Atakent sit. A Blok D:19 Tekirdağ-Merkez

**E-Posta:** nur.cebi@gmail.com

**Lisans:** İstanbul Üniversitesi