

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Peynir May. Akt. Tay. İçin Yeni Bir Yön. Geliş

Doktora Tezi

TÜRKAN BUDAK

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

Demirbaş No: 416.33

PEYNİR MAYASI AKTİVİTESİNİN TAYİNİ İÇİN YENİ BİR YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ

Yük. Kimyager Türkan BÖRKLÜ BUDAK

623

FBE Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Programında
Hazırlanan

DOKTORA TEZİ

Tez Savunma Tarihi : 15 Eylül 2009
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Hüseyin AFŞAR (YTÜ)
Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Sıdika SUNGUR (YTÜ)
Prof. Dr. Abdürrezzak BOZDOĞAN (YTÜ)
Prof. Dr. Reşat APAK (İÜ)
Prof. Dr. Esma TÜTEM (İÜ)

İSTANBUL, 2009

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KISALTMA LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
ÇİZELGE LİSTESİ	vi
ÖNSÖZ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ	10
2. GENEL BİLGİ	12
2.1 Süt	12
2.1.1 Türkiye’de Süt Üretimi	12
2.1.2 Sütün Genel Tanımı	13
2.2 Peynir	17
2.2.1 Türkiye’de Peynir Üretimi	17
2.2.2 Peynirin Genel Tanımı	18
2.3 Peynir Mayası	21
2.3.1 Enzim	21
2.3.2 Pıhtılaşma Başlatıcılar (Starter)	22
2.3.3 Doğal Peynir Mayaları (Rennin)	26
2.3.4 Peynir Mayası Aktivitesinin (Kuvvetinin) Belirlenmesi	26
2.3.4.1 Fleischmann Yöntemi	27
2.3.4.2 W.Grimmer Yöntemi	27
2.3.4.3 Berridge Yöntemi	27
2.4 Mayalama İşlemi	28
2.5 Reçine Çalışmaları	31
2.6 Amin Grubunun Kolorimetrik Yöntem (Ninhidrin Yöntemi) İle Analizi	32
3 DENEYSEL BÖLÜM	33
3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	33
3.2 İlgili Çözeltilerin Ve Reçine Kolonunun Hazırlanması	33
3.2.1 Çözeltilerin Hazırlanması	33
3.2.2 Reçine Kolonunun Hazırlanması	34
3.3 Kullanılan Araç Ve Gereçler	34
3.4 Harding ve MacLean’s (Ninhidrin) Yöntemi Uygulamaları	34
3.5 Reçine ile Tutulma Çalışmaları	35
3.5.1 Kesikli (Batch) Yöntemi Çalışmaları	35
3.5.2 Amberlite IRC86 Miktarının Belirlenmesi	35
3.5.3 Elusyon Çözeltisi Derişiminin Ve Hacminin Bulunması	35
3.5.4 Pıhtılaşma İşleminin Durdurulması	36
3.5.5 Pıhtılaşma İşlemine Sıcaklığın Etkisi	36
3.5.6 Pıhtılaşma İşlemine $CaCl_2$ Derişiminin Etkisi	36
3.5.7 İdeal Çalışma Koşullarının Uygulanması	36
3.5.8 Geliştirilen Yöntemin k Değerlerinin Hesaplanması	37

3.5.9	Spektrofotometrik Yöntem ile Peynir Mayası Aktivitesinin (Kuvvetinin)Tayini.	37
3.5.9.1	Tavsiye Edilen Yöntem.....	39
3.5.10	Klasik Yöntem ile Peynir Mayası Aktivitesinin (Kuvvetinin) Tayini	39
3.5.11	İstatistiksel Değerlendirme	39
4	SONUÇLAR.....	40
4.1	Standart Eğri Hazırlama	40
4.2	Harding ve MacLean's (Ninhidrin) Yönteminin Uygulamaları	40
4.3	Kesikli Yöntem (Batch) Çalışmaları	41
4.4	Amberlite IRC86 Miktarının Belirlenmesi	42
4.5	Elusyon Çözeltisi Derişiminin Ve Hacminin Bulunması	43
4.6	Pıhtılaşma İşleminin Durdurulması	45
4.7	Pıhtılaşma İşlemine Sıcaklığın Etkisi	46
4.8	Pıhtılaşma İşlemine $CaCl_2$ Derişiminin Etkisi.....	47
4.9	İdeal Çalışma Koşullarının Uygulanması	48
4.10	Geliştirilen Yöntemin k Değerlerinin Hesaplanması.....	50
4.11	Spektrofotometrik Yöntem ile Peynir Mayası Aktivitesinin (Kuvvetinin)Tayini.	51
4.12	Klasik Yöntem ile Peynir Mayası Aktivitesinin (Kuvvetinin) Tayini	52
4.13	İstatistiksel Değerlendirme	52
5	DEĞERLENDİRME	54
	KAYNAKLAR.....	55
	ÖZGEÇMİŞ.....	57

KISALTMA LİSTESİ

CMP	Kazeinomakropeptid	17
TSE	Türk Standartları Enstitüsü	21
TCA	Trikloroasetik Asit	21
NPN	Protein Yapısında Olmayan Azot (None Protein Nitrogen)	24
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu	25
TEAE	Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü	28
DTM	Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı	28

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Sütün yapısı.....	13
Şekil 2.2 Bey-Köy beyaz peyniri.....	17
Şekil 2.3 Laktik asit fermentasyonu; homofermentatif ve heterofermentatif.....	23
Şekil 2.4 Homofermentatif reaksiyon denklemleri.....	24
Şekil 2.5 Heterofermentatif reaksiyon denklemleri.....	25
Şekil 2.6 Peynir mayası aktivitesinin tayini.....	27
Şekil 2.7 k-kazeinin protein yapısı.....	28
Şekil 2.8 k-kazeinin kimozin etkisi ile parçalanması.....	29
Şekil 2.9 %12'lik TCA filtratında bulunan azot miktarı.....	30
Şekil 2.10 Ninhidrin bileşiğinin amino asitler ile verdiği reaksiyon denklemi.....	32
Şekil 4.1 Standart eğri.....	40
Şekil 4.2 Amberlite IRC86 miktarının belirlenmesi.....	42
Şekil 4.3 Elusyon çözeltisi derişiminin incelenmesi.....	43
Şekil 4.4 Elusyon çözeltisi hacminin incelenmesi.....	44
Şekil 4.5 pH'ya göre süzüntünün azot derişimi.....	46
Şekil 4.6 Pıhtılaşma işlemine sıcaklık etkisinin grafiğı.....	47
Şekil 4.7 Pıhtılaşma işlemine CaCl_2 derişiminin etkisinin grafiğı.....	48
Şekil 4.8 Mayalanma süresi.....	49
Şekil 4.9 k değerlerinin mayalanma süresi ile değışimi.....	51

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1 Süt üretiminin tarımsal çıktı içindeki payı (1995-2004)	12
Çizelge 2.2 Türkiye’de süt üretimi (ton)	12
Çizelge 2.3 Türkiye’de süt ve süt ürünleri tüketimi (kg/kişi-yıl).....	13
Çizelge 2.4 Farklı süt çeşitlerinin analizi (/100 gr süt).....	14
Çizelge 2.5 Kazein fraksiyonları.....	14
Çizelge 2.6 Amino asitlerin açık yazılışları ve kimyasal formülleri.....	16
Çizelge 2.7 Beyaz peynir üretimi akış şeması.....	19
Çizelge 2.8 Kaşar peyniri üretimi akış şeması.....	20
Çizelge 2.9 Kuru maddede bulunan yağ oranlarına göre peynirlerin sınıflandırılması.....	21
Çizelge 2.10 Amberlite IRC86’nın bazı özellikleri.....	31
Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasal maddeler.....	33
Çizelge 4.1 Farklı maddelerin çöktürme amacı ile denenmesi.....	41
Çizelge 4.2 Kesikli yöntem ile reçine çalışmaları.....	41
Çizelge 4.3 Amberlite IRC86 miktarının belirlenmesi.....	42
Çizelge 4.4 Elusyon için gereken NaCl çözeltisi derişiminin bulunması.....	43
Çizelge 4.5 Elusyon için gereken NaCl çözeltisi hacminin bulunması.....	44
Çizelge 4.6 Pıhtılaşma işlemi ile pH değişimi arasındaki ilişki.....	45
Çizelge 4.7 Pıhtılaşma işlemine sıcaklığın etkisi.....	46
Çizelge 4.8 Pıhtılaşma işlemine CaCl_2 derişiminin etkisi.....	47
Çizelge 4.9 İdeal çalışma koşullarının uygulanması.....	49
Çizelge 4.10 Hesaplanan k değerleri.....	50
Çizelge 4.11 Aktivitesi 12000 olan maya eşliğinde gerçekleştirilen çalışmalar.....	51
Çizelge 4.12 Peynir mayası aktivitesinin klasik yöntem ile belirlenmesi.....	52
Çizelge 4.13 İki yöntemin istatistiksel değerlendirmesi.....	53

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde bilgi ve tecrübeleri ile bana her konuda yardımcı olan tez danışmanım ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hüseyin AFŞAR'a;

Çalışmalarım süresince her türlü teknik donanım ve yardımı esirgemeyen, Teknisyen Sayın Karabey EROĞLU'na;

Aynı şekilde her ihtiyaç duyduğumda hiç tereddüt etmeden süt tozu ve peynir mayası ham maddelerini karşılayan Tunçkaya Kimyasal Maddeleri San. Tic. Ltd. Şti. Gıda Mühendisi Sayın Gülnara UZUN'a;

Yine yardımlarını esirgemeyen May-Bi ve Pey-Ma Hansen Şirketlerine;

Proje desteği ile katkıda bulunan Yıldız Teknik Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne;

Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki çalışma arkadaşlarıma ve değerli hocalarıma;

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi, bu zor süreçte de bana sabırla yol gösteren ve maddi manevi desteklerini hiç esirgemeyen sevgili annem Sayın Selma GELMEZLER'e, babam Sayın Ahmet BÖRKLÜ'ye ve kardeşlerime;

Ve son olarak sevgili eşim Yüksek Kimyager Sayın Hakan BUDAK'a ve beni her zaman sabırla bekleyen kızım Hilal ile oğlum Ertuğrul'a,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi borç bilirim.

Ağustos 2009

Arş. Gör. Türkan BÖRKLÜ BUDAK

ÖZET

Dünya'da gıda sektörü içerisinde süt ve süt ürünleri önemli bir yer tutmaktadır. Bunlar içerisinde de, binden fazla çeşidi ile peynircilik sektörü ön sıralarda yer almaktadır. Peynir üretiminin vazgeçilmez yapı taşları süt ve peynir mayasıdır (rennin). Rennin farklı yollarla elde edilebilir. Ancak peynir endüstrisinde, çoğu zaman hayvansal kaynaklı rennin kullanılmaktadır. Bu tür rennin, genç hayvanların (dana veya kuzu) mide bölgelerinden elde edilir. Renninin yaklaşık % 75'ini kimozin % 25'ini ise pepsin enzimi oluşturmaktadır. Rennin süte ilave edildiği zaman, süt içerisinde bulunan kazein tanecikleri enzimatik açıdan kararsız bir hal alır. Sonuç olarak k-kazein iki bölüme parçalanır. Bu parçalar, kalsiyum-parakazeinat ve kazeinomakropeptid (CMP) olarak adlandırılır. Gerçekleşen bu reaksiyon peynir üretiminin temelini oluşturmaktadır.

Peynir endüstrisinin önemli parametrelerinden biri de peynir mayası kuvvetinin (aktivitesinin) belirlenmesidir. Çünkü, ne kadar miktar mayanın ne kadar miktar sütü çöktürebileceğinin bilinmesi, ekonomik açıdan göz ardı edilemeyecek bir parametredir.

Halen kullanılan standart peynir mayası kuvveti tayin yönteminde, görselliğe dayalı bazı zayıf noktalar bulunmaktadır. Hata ihtimalini artırabilecek olan bu zayıflığın giderilebilmesi amacı ile cihaza dayalı yeni bir yöntem üzerinde çalışılmıştır. Yeni yöntemde, sütün rennin (kimozen) etkisi ile parçalanması sonucu oluşan kazeinomakropeptid molekülü, Amberlite IRC86 zayıf asidik katyon değiştirici reçine üzerinde alıkonulmuştur ve sodyum klorür çözeltisi ile elusyon işlemi uygulanmıştır. Ardından Harding ve MacLean's (ninhidrin) yöntemi kullanılarak, pıhtılaşma sonrası süt içerisinde bulunan primer amin azotu miktarındaki artış incelenmiştir. Bu artış ile pıhtılaşma süresi arasında geliştirilen bir formül yardımı ile, peynir mayası aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edilebilmiştir. Geliştirilen yöntem, klasik peynir mayası aktivitesi tayin yöntemi ile karşılaştırılmış ve standart sapmalar arasında anlamlı fark olmadığı anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Peynir mayası aktivitesi, kimozin, kazein, reçine

ABSTRACT

Dairy products take an important place in food industry all over the world, especially, the cheese industry has more than a thousand product variety. Milk and rennin are the most important constituents of the cheese production. Rennin can be obtained by different ways, however, animal based rennin is usually used in cheese industry. This kind of rennin is obtained from stomach region of young calves and lambs. Rennin consists of 75 % chymosin and 25 % pepsin enzyme. When rennin is added to milk, casein particles, in milk, get an unstable situation. As a result κ -casein divides into two parts. These parts are named as calciumparacaseinate and caseino-macropeptide (CMP). This reaction is the basic of cheese production.

One of the important parameters in cheese industry is the determination of milk clotting activity of rennin. Because, knowing that how much milk can be coagulated by how much rennin is a parameter that should be taken into account due to economic reasons.

Currently using methods for determining standard rennin power include some weak points. A new method is studied that is based on devices in order to remove these weak points which increase faulty probability. In this new method, caseinomakropeptid molecule that emerge from proteolysis of milk with effecting rennin (chymosin) is adsorped by Amberlite IRC86, weak asidic cation exchanger resin and then eluated with sodium chloride solution. After that, increasing of the primary amine nitrogen proportion in post coagulation of milk is analysed by using Harding and MacLean's (ninhydrin) method. A formulation is obtained between this increase and coagulation period. Thus, rennin activity can be analyzed by spectrophotometric technique. This innovated process has been compared with the determination method for the classical rennin activation, and it has been understood that there are not any significant Standard deviation between them.

Key Words: Rennin activity, chymosin, casein, resin

1. GİRİŞ

Hayvancılık sektörü içerisinde önemli bir yeri olan süt hayvancılığı, son otuz yılda büyük bir değişim göstermiştir. 1970'li yıllardan bu yana hayvan başına düşen süt verimi yaklaşık olarak %150 oranında artmıştır. Bu yıllarda 4,4 milyon ton olan süt üretimi miktarı bu gün yaklaşık olarak 11 milyon ton civarına yükselmiştir (TEAE, 2002).

Türkiye'de üretilen çiğ süt; içme sütü, tereyağı, peynir, yoğurt, dondurma ve süt tozu gibi çeşitli süt ürünlerine dönüştürülmektedir. İfade edilen süt ürünleri içerisinde, toplam çiğ sütün yaklaşık %40 gibi önemli bir kısmını ise peynir ürünleri almaktadır. Yani toplam 4-5 milyon ton civarında çiğ süt, peynir üretimi için ayrılmaktadır. Peynir, tüketim alışkanlıkları açısından vazgeçilmez bir ürün olduğu gibi, karbohidrat, protein ve kalsiyum gibi içerdiği besin öğeleri açısından da son derece önemli bir gıdadır.

Süt ürünleri arasında bu kadar büyük bir paya sahip peynir üretimine ait önemli ekonomik parametrelerden biri, kullanılan mayanın aktivitesinin (kuvvetinin) belirlenmesidir. Yani, ne kadar miktar mayanın, ne kadar miktar sütü çöktürebileceğinin bilinmesi gerekmektedir. Örneğin 1/15000 olarak ifade edilen maya kuvveti, bu mayanın 1 biriminin (1mL ya da g) 15000 birim (1mL ya da g) taze inek sütünü, 35°C'de 40 dk'da pıhtılaştırabileceği anlamına gelmektedir.

TSE'de ve Dünya peynir sektöründe halen kabul edilen standart maya kuvveti tayin yöntemi uygulanırken; peynir mayası, yağsız süt tozundan hazırlanan süte, 35±0,2°C ortam sıcaklığında ilave edilir ve kronometre ile süre başlatılır. Pıhtılaşmanın gözle görüldüğü an, süre durdurulur ve bulunan rakam kullanılan denklemde yerine yazılarak hesap yapılır (TSE, 1996).

Pıhtılaşma işlemi sırasında, süt içerisinde bulunan kazein molekülleri, peynir mayasının etkisi ile parçalanır. Bu çalışmada, parçalanma ürünlerinden biri olan para-k-kazein molekülü üzerinde durulmuştur. Primer amin grubu özelliğine sahip, para-k-kazein bileşiği, zayıf asidik kation değiştirici reçine olan Amberlite IRC86 kullanılarak tutulmuştur. Ardından, sodyum klorür çözeltisi ile reçine tarafından tutulan primer amin azotu çözeltiye alınmıştır. Elde edilen çözeltiye Harding Mac Lean's (ninhidrin) yöntemi uygulanarak spektrofotometre yardımı ile, 570 nm'deki absorbands değeri ölçülmüştür. Lösün kullanılarak oluşturulan standart eğriden absorbands değerlerinin karşılık geldiği derişimlere ulaşılmıştır. Bulunan değerler, literatürle uyumlu bir şekilde, pıhtılaşma işlemi sırasında, primer amin grubu azotunun miktarında bir artış olduğunu göstermektedir.

Çalışmanın hedefleri doğrultusunda, bu artıştan yola çıkarak, halen yürürlükte olan standart peynir mayası aktivitesi (kuvveti) tayin yöntemi, spektrofotometre yardımı ile maya aktivitesinin bulunabileceği cihaza dayalı bir yöntem haline dönüştürülebilmektedir. Bu sayede ortaya çıkabilecek görsel hataların önüne geçilebilmiştir.

2. GENEL BİLGİ

2.1 Süt

2.1.1 Türkiye’de Süt Üretimi

Türkiye’de süt ve süt ürünlerinin üretim değerleri, Çizelge 2.1’de görüldüğü gibi, yıllar itibariyle artış kaydetmesine rağmen, henüz istenilen düzeye ulaşamamıştır. Çizelge 2.1 incelendiğinde toplam tarımsal üretim değerlerinin 1995–2004 döneminde %37 oranında arttığı anlaşılmaktadır. Ayrıca hayvansal üretim %40, süt üretimi ise %51 oranında büyüme göstermiştir. Süt üretiminin tarımsal üretim içindeki payı yine bu dönemde %14’den %19’a çıkarak artış oranı %5 düzeyinde olmuştur. Süt üretiminin hayvansal üretim içindeki payı da 2004 yılı itibariyle %75 düzeyine ulaşmıştır (TEAE, 2007).

Çizelge 2.1 Süt üretiminin tarımsal çıktı içindeki payı (1995-2004)

Üretim değeri (mil.YTL)	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
Tarımsal üretim	1.633	3.031	4.756	9.721	14.461	21.572	28.319	42.237	55.086	61.118
Hayvansal üretim	385	625	1.202	2.472	3.662	5.152	6.069	9.262	13.432	15.574
Süt üretimi	228	509	519	1.572	1.938	3.093	4.386	7.029	9.463	11.740
Hayvansal üretim içindeki payı (%)	59.22	81.44	43.18	63.59	52.92	60.03	72.27	75.89	70.45	75.38
Tarımsal üretim içindeki payı (%)	13.96	16.79	10.91	16.17	13.40	14.34	15.49	16.64	17.18	19.21

Çizelge 2.2’de Türkiye’de süt üretim miktarları gösterilmektedir. Veriler, Türkiye İstatistik Kurumu’ndan (TÜİK) alınmıştır. 2006 yılında toplam süt üretimi 12 milyon ton seviyesine yaklaşmıştır. Toplam süt üretiminin 10,8 milyon tonu inek sütü, 794 bin tonu ise koyun sütüdür. İnek sütünün toplam süt üretimi içindeki payı yaklaşık %90 düzeyindedir (DTM, 2008).

Çizelge 2.2 Türkiye’de süt üretimi (ton)

YILLAR	KOYUN SÜTÜ	KEÇİ SÜTÜ	İNEK SÜTÜ	MANDA SÜTÜ	TOPLAM
2002	657.388	209.622	7.490.634	50.925	8.408.568
2003	769.959	278.136	9.514.138	48.778	10.611.011
2004	771.715	259.087	9.609.326	39.279	10.679.406
2005	789.878	253.759	10.026.202	38.058	11.107.897
2006	794.681	253.759	10.867.302	36.553	11.952.295

Çizelge 2.3’de belirtildiği gibi, Türkiye’de toplam süt ve süt ürünlerinin kişi başına düşen tüketimin içerisinde ilk sırayı peynir alırken, bunu yoğurt-ayran, içme sütü, tereyağı,

dondurma ve süt tozu izlemektedir (TEAE, 2007). Ancak, içme sütünün toplam süt tüketimi içindeki oranının %13–15 dolayında olması toplumda süt içme alışkanlığının yeterince olmadığını ortaya koymaktadır. Tüketilen toplam sütün %50-53'ünü peynir, %18-19'unu yoğurt ve ayran, %1-2'sini ise dondurma ve süt tozu üretimi oluşturmaktadır. 2007–2008 yıllarında süt ve süt ürünleri tüketiminde artış beklenmektedir.

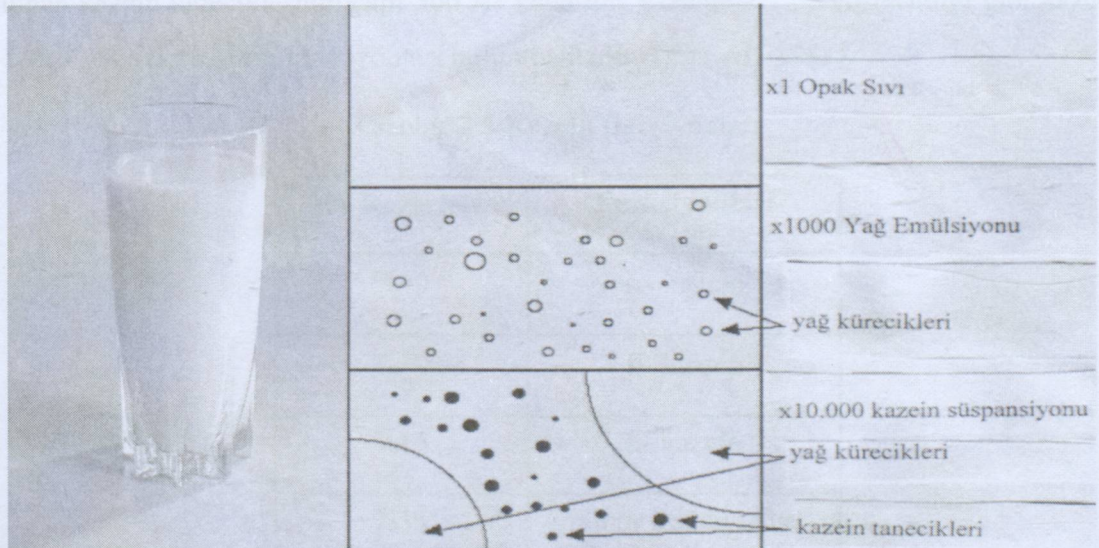
Çizelge 2.3 Türkiye’de süt ve süt ürünleri tüketimi (kg/kışı-yıl)

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007**	2008***
Peynir	77,07	72,80	61,48	79,61	78,31	79,86	81,99	84,00	85,41
Yoğurt-ayran	27,80	26,25	22,17	28,71	28,24	28,80	29,57	30,29	30,80
Tereyağı	18,95	17,90	15,12	19,58	19,26	19,64	20,16	20,66	21,00
Dondurma	1,13	1,33	1,09	1,46	1,43	1,45	1,49	1,52	1,54
Süt tozu	1,39	1,06	0,92	1,15	1,14	1,17	1,20	1,23	1,26
Süt ürünleri toplamı*	126,34	119,34	100,78	130,51	128,37	130,92	134,40	137,70	140,02
İçme sütü	18,93	19,56	20,55	20,58	21,72	23,22	23,78	24,45	26,02
Toplam süt	145,27	138,89	121,33	151,09	150,09	154,14	158,18	162,15	166,04

*süt eşdeğeri **tahmin, ***öngörü

2.1.2 Sütün Genel Tanımı

Süt, besin değeri yüksek beyaz bir sıvıdır. Türlerine göre farklılıklar göstermekle birlikte hemen tüm süt çeşitleri vitaminler, (genellikle A, B₂ ve D vitaminleri), çeşitli mineral tuzları (kalsiyum, potasyum, fosfor ve eser metaller), kolloid halinde dağılmış proteinler (kalsiyum kazeinat, laktalbümin ve laktoglobulin), karbohidratlar (genellikle laktoz), lipidler (yağlar) ve yine kolloidal halde dikalsiyum hidrojen fosfat içermektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Sütün yapısı

Sütün en önemli kolloidleri kalsiyum kazeinat, laktalbümin ve nötral dikalsiyum hidrojen fosfattır. Normal inek sütünün % 2,25-2,75 kadarını kazein bileşikler oluşturur. Geri kalan miktarı içerisinde %0,5-0,7 oranında laktalbümin ve %0,2'den daha az oranda da dikalsiyum hidrojen fosfat bulunmaktadır (Leroy, 1924; Van 1914). Süte ait en önemli eksikliğin demir ve C vitamini yetersizliği olduğu belirtilmektedir (Atacı, 2001). Süt içerisinde bulunan maddelerin miktarları süt çeşitlerine göre farklılık göstermektedir (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4 Farklı süt çeşitlerinin analizi (/100 gr süt)

Bileşenler	Birim	İnek	Keçi	Koyun	Bufalo
Su	g	87,8	88,9	83,0	81,1
Protein	g	3,2	3,1	5,4	4,5
Yağ	g	3,4	3,5	6,0	8,0
Karbonhidrat	g	4,8	4,4	5,1	4,9
Enerji	k cal	66	60	95	110
	k j	275	253	396	463
Şeker (Laktaz)	g	4,8	4,4	5,1	4,9
Yağ Asidi:					
Doymuş	g	2,4	2,3	3,8	4,2
Tek-doymamış	g	1,1	0,8	1,5	1,7
Çoklu-doymamış	g	0,1	0,1	0,3	0,2
Kolesterol	mg	14	10	11	8
Kalsiyum	iu	120	100	170	195

Bilindiği gibi süt proteinlerinin büyük bir kısmını kazein meydana getirir. Süt içerisinde bulunan kazein taneciklerinin çapı 500 A° kadardır. Çizelge 2.5'de gösterildiği gibi kazeinin de farklı yüzdelere sahip fraksiyonları bulunmaktadır (Uraz vd., 1983).

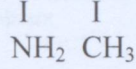
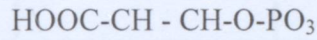
Çizelge 2.5 Kazein fraksiyonları

% Değerleri	Fraksiyonları
%40	α - kazein
%30	β - kazein
%15	k- kazein
%15	minor fraksiyonlar

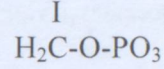
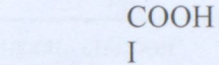
Bu fraksiyonlardan k-kazein, hem tüm kazeinin kolloidal durumunu koruyan, hem de peynir mayasına duyarlı olan bir fraksiyondur. Örneğin, bu kazeinin bulunmaması durumunda Ca^{2+}

olsa bile α ve β kazeinler normal durumlarını koruyamamakta ve çökmektedirler (Carlson vd., 1987).

Fosfoproteinler (bunlar konjuge proteinler sınıfından olup, basit protein komplekslerinden ayrı olarak, diğer küçük molekül ağırlıklı kimyasalları ve prostetik grupları içerir. Bu gruplar protein molekülüne sıkı veya gevşek olarak bağlıdır) bu tür prostetik grup; serin'in hidroksil gruplarının fosfat asidi ile esterleşmiş veya aminohidroksibutirik asidin hidroksil grubunun, fosfat asidi ile esterleşmiş halinden ibarettir.



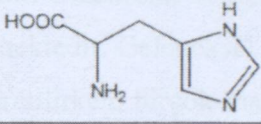
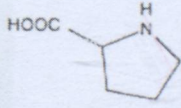
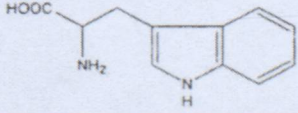
Treonin Fosfat



Serin Fosfat

Fosfat grubu sulu sodyum hidroksit çözeltisi ile veya bazı enzimler ile koparılabilir. Enzim etkisi ile kopma halinde hidroliz, proteoliz olmaksızın gerçekleşir. Fosfor oranı yaklaşık %0,7 civarındadır. En önemli fosfoprotein kazeindir. Kazein süt içerisinde, çözünmüş kalsiyum tuzu şeklinde bulunur. Süt kaynatıldığında kazein koagüle olmaz ve laktalbüminin çökmesini önler (Albüminler suda çözünebilen proteinler sınıfı olup, doymuş amonyum sülfat ilavesi ile çöktürülebilirler). Çizelge 2.6'da proteinlerin yapı taşı olan amino asitlerin açık yazılışları ve kimyasal formülleri gösterilmektedir.

Çizelge 2.6 Amino asitlerin açık yazılışları ve kimyasal formülleri

Simge	Amino Asit	Kimyasal Adı	Formülü
Ala	Alanin (Alanine)	α -aminopropiyonik asit	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_3\text{-CH-COOH} \end{array}$
Arg	Arginin (Arginine)	α -amino- δ -guanidinovalerik asit	$\text{H}_2\text{N-CO-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH} \begin{array}{c} \\ \text{NH}_2 \end{array} \text{-CH-COOH}$
Asn	Asparagin(Asparagine)	α -amino- β -amidopropiyonik asit	$\text{H}_2\text{N-CO-CH}_2\text{-CH} \begin{array}{c} \\ \text{NH}_2 \end{array} \text{-COOH}$
Asp	Aspartik asit(Aspartic acid)	aminosüksinik asit	$\text{HOOC-CH}_2\text{-CH} \begin{array}{c} \\ \text{NH}_2 \end{array} \text{-COOH}$
Cys	Sistein(Cysteine)	α -amino- β -merkaptopropiyonik asit	$\text{HS-CH}_2\text{-CH} \begin{array}{c} \\ \text{NH}_2 \end{array} \text{-COOH}$
Glu	Glutamik asit	α -aminoglutamik asit	$\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH} \begin{array}{c} \\ \text{NH}_2 \end{array} \text{-COOH}$
His	Histidin	α -amino- β -imidazol-4-ilpropiyonik asit	
Ile	Isolöysin(Isoleucine)	α -amino- β -metilvalerik asit	$\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH} \begin{array}{c} \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{-CH} \begin{array}{c} \\ \text{NH}_2 \end{array} \text{-COOH}$
Leu	Löysin(Leucine)	α -aminoisokaproik asit	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH-CH}_2\text{-CH-COOH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$
Lys	Lisin(Lysine)	α -diaminokaproik asit	$\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH} \begin{array}{c} \\ \text{NH}_2 \end{array} \text{-COOH}$
Met	Metionin(Methionine)	α -amino- γ -metiltiobutirik asit	$\text{H}_3\text{CS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH} \begin{array}{c} \\ \text{NH}_2 \end{array} \text{-COOH}$
Phe	Fenilalanin(Phenylalanine)	α -amino- β -fenilpropiyonik asit	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-CH} \begin{array}{c} \\ \text{NH}_2 \end{array} \text{-COOH}$
Pro	Prolin(Prolie)	pirolidin-2-karboksilli asit	
Ser	Serin(Serine)	α -amino- β -hidroksipropiyonik asit	$\text{HO-CH}_2\text{-CH} \begin{array}{c} \\ \text{NH}_2 \end{array} \text{-COOH}$
Thr	Treonin(Threonine)	α -amino- β -hidroksibutirik asit	$\text{CH}_3\text{-CH} \begin{array}{c} \\ \text{OH} \end{array} \text{-CH} \begin{array}{c} \\ \text{NH}_2 \end{array} \text{-COOH}$
Trp	Triptofin(Tryptophan)	α -amino- β -indol-3-ilpropiyonik asit	
Tyr	Tirosin(Tyrosine)	α -amino- β -4-hidroksifenilpropiyonik asit	$\text{HO-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH} \begin{array}{c} \\ \text{NH}_2 \end{array} \text{-COOH}$
Val	Valin(Valine)	α -aminoisovalerik asit	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH-CH}_2\text{-CH-COOH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$

2.2 Peynir

2.2.1 Türkiye’de Peynir Üretimi

Dünya’da binden fazla peynir çeşidi bulunmaktadır. Elimizde somut bir tarihsel kanıt olmamasına rağmen, peynirin ilk kez M.Ö. 6.000’lerde Mezopotamya’da veya İndus Vadisi’nde çobanlar tarafından üretildiği sanılmaktadır. Ülkemizde üretilen peynirin büyük kısmı mandıralarda üretilirken, %10 gibi bir miktarı, modern işletmeler kullanılarak üretilmektedir. Mandıralarda çiğ süttten elde edilen peynirler, taşıdıkları mikroorganizmalar açısından halk sağlığı yönünden büyük riskler oluşturmaktadır. Kaliteli ve standart peynir üretiminde, kaliteli çiğ süt kullanılması, üretimde hijyenik koşullara dikkat edilmesi, süte etkin ısı işleminin uygulanması ve etkin bir paketlemenin yapılması gerekmektedir. Ayrıca kırsal kesimde işletmelerin ürettikleri sütü kendi imkanları dahilinde peynir, yoğurt ve tereyağı gibi çeşitli süt ürünlerine dönüştürdükleri bilinmektedir. Ülkemizde değişik yörelerde mahalli olarak yaklaşık elli çeşit peynir yapıldığı tahmin edilmektedir. Geleneksel olarak evde üretilen bu peynirlerden bazıları fabrikasyon şartlarında da üretilirken, birçok mahalli peynir çeşidimiz halen fabrikasyonla üretilmemekte ve bu yüzden istenen kalite ve standart elde edilememektedir (TEAE, 2007). Sütün uyutulmuş hali de denilen peynirin, Türkiye’de en yaygın tüketilen çeşitleri beyaz peynir (Şekil 2.2), kaşar peyniri ve krem peynirdir.



Şekil 2.2 Bey-Köy beyaz peyniri

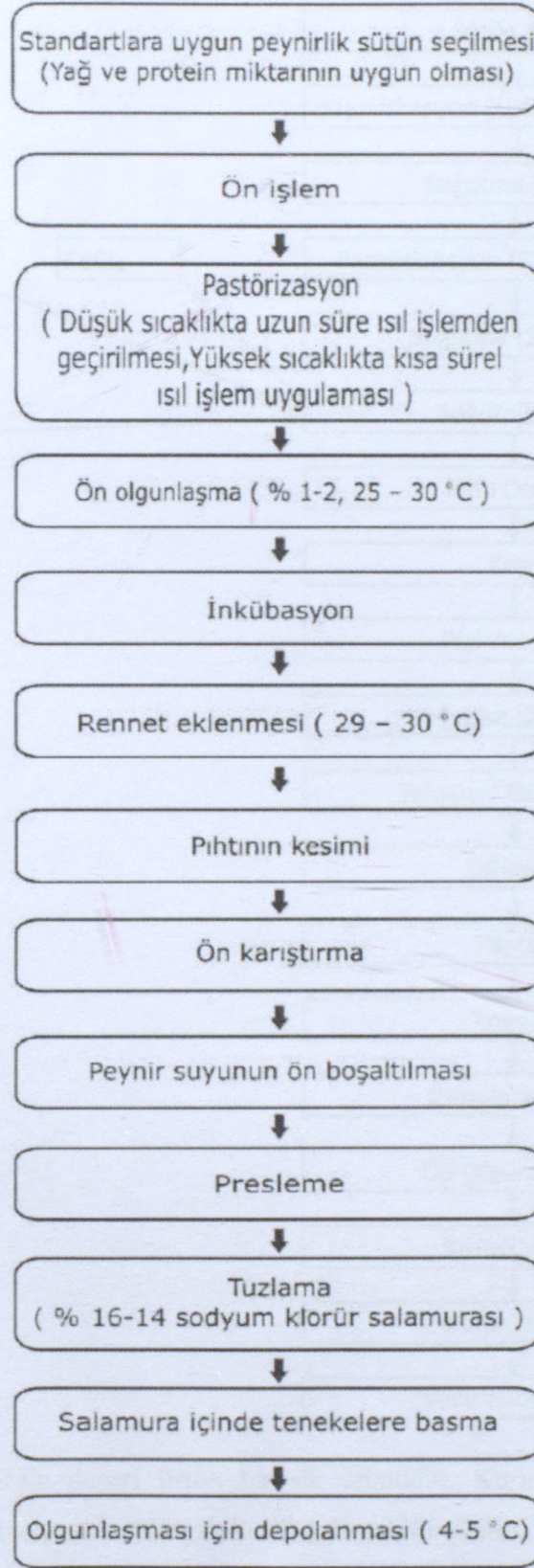
2.2.2 Peynirin Genel Tanımı

Peynir, çok sayıda değişik aroma, tat ve şekle sahip fermente süt ürünleri için kullanılan genel bir ifadedir. Diğer bir tanımla, sütün ön işlemlerden geçirilmesinin ardından, peynir çeşidine uygun bakteri kültürünün eklenmesi ile üretilen fermente bir süt ürünüdür.

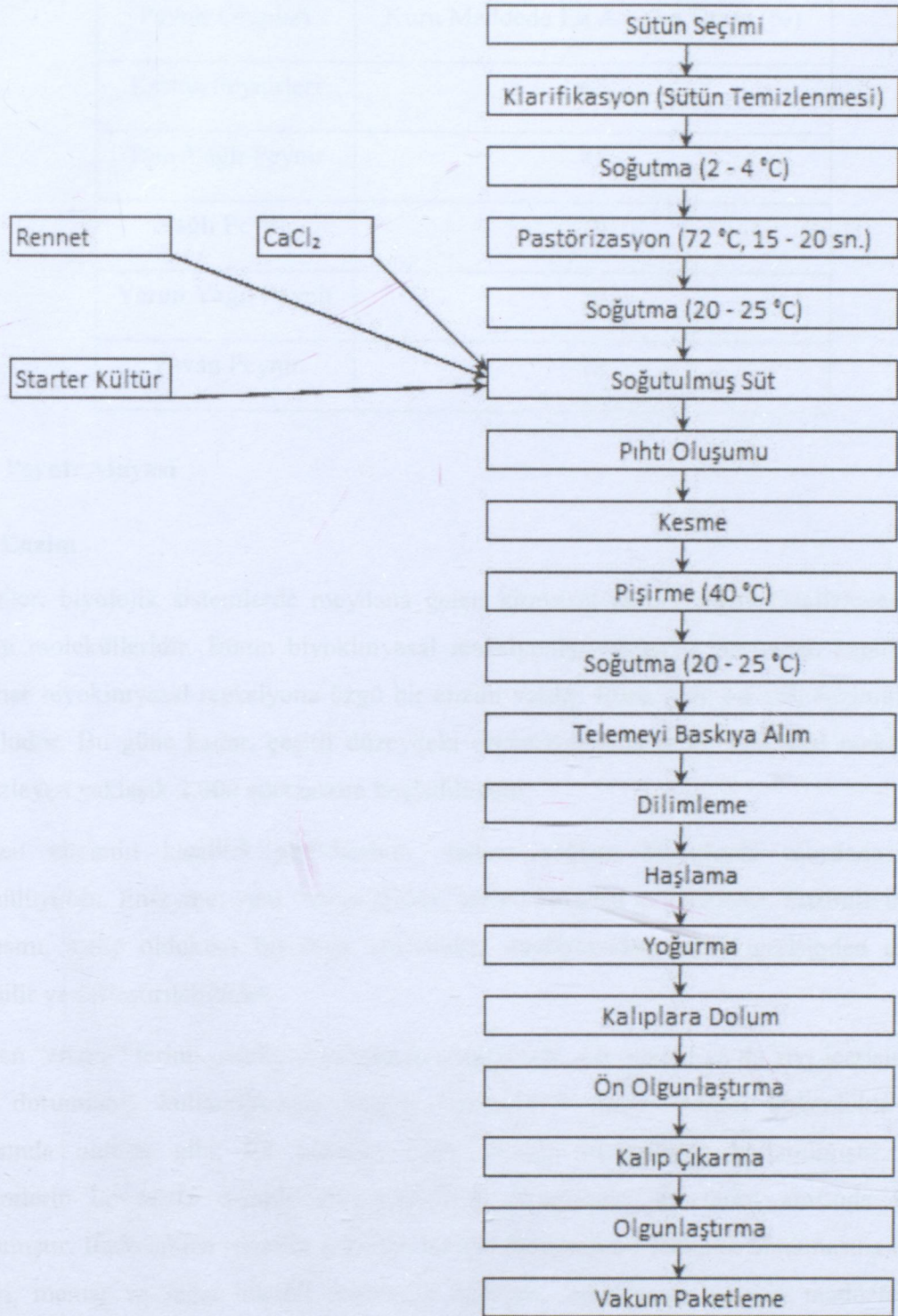
Peynir, peynir mayası veya zararsız organik asitlerin etkisi ile pıhtılaştırılan sütlerin değişik şekillerde işlenmesi sonucu elde edilir. Süte peynir mayası katıldığı zaman elde edilen çökelti (curd), henüz tam anlamı ile peynir değildir. Ancak, peyniri meydana getirecek olan kısımdır. Geri kalan sıvı bölüm ise peynir altı suyu (whey) olarak isimlendirilir. Peynir üretimi yapılırken pıhtılaşma gerçekleştirildikten hemen sonra sıvı kısım, süzülerek ayrılır (Jenness ve Patton, 1959; Leroy, 1924).

Peyniri oluşturan temel unsurlar süt ve peynir mayasıdır. Çizelge 2.7 ve Çizelge 2.8'de beyaz peynir ve kaşar peyniri üretim şemaları yer almaktadır (Süt ve Süt Ürünleri, 2007).

Çizelge 2.7 Beyaz peynir üretimi akış şeması



Çizelge 2.8 Kaşar peyniri üretimi akış şeması



Peynir aynı zamanda besin değeri üstün bir süt ürünüdür. Kuru maddede bulunan yağ oranlarına göre peynir Çizelge 2.9'deki gibi sınıflandırılabilir (Çetin, 2007).

Çizelge 2.9 Kuru maddede bulunan yağ oranlarına göre peynirlerin sınıflandırılması

Peynir Grupları	Kuru Maddede En Az Yağ Oranı (%)
Krema Peynirleri	65
Tam Yağlı Peynir	45
Yağlı Peynir	30
Yarım Yağlı Peynir	20
Yavan Peynir	15

2.3 Peynir Mayası

2.3.1 Enzim

Enzimler, biyolojik sistemlerde meydana gelen kimyasal reaksiyonları katalizleyen büyük protein molekülleridir. Bütün biyokimyasal reaksiyonlar enzimler tarafından katalizlendiği için, her biyokimyasal reaksiyona özgü bir enzim vardır. Buna göre bir çok enzimin varlığı zorunludur. Bu güne kadar, çeşitli düzeydeki organizmalarda farklı kimyasal reaksiyonları katalizleyen yaklaşık 2.000 adet enzim keşfedilmiştir.

Eskiden enzimin katalitik aktivitesinin, sadece sağlam hücrelerde meydana geldiği düşünülüyordu. En-zyme; yani “maya içinde” terimi buradan gelmektedir. Enzimlerin büyük bir kısmı, sahip oldukları biyolojik aktiviteleri kaybolmadan hücre içerisinden ekstrakte edilebilir ve saflaştırılabilirler.

Eskiden “enzim” terimi, sindirim kanalında olduğu gibi, bir çözelti ya da sıvı içerisinde etki ettiği durumlarda kullanılmasına karşın, “ferment = maya” terimi çoğunlukla hamur mayasında olduğu gibi, bir hücreye bağlı olduğu durumlarda kullanılmıştır. Ancak fermentlerin de hücre dışında etki edebildiği anlaşıncaya, iki terim arasında farklılık kalmamıştır. İfade edilen terimler arasında bu gün herhangi bir farklılık olmamasına rağmen, bakteri, mantar ve diğer hücreli enzimatik işlevlere, mayalanma ve etki maddelerine de ferment olarak isimlendirme yapılmaktadır.

Peynir yapımında kullanılan pıhtılaştırıcıları iki ana başlık halinde toparlayabiliriz:

A) Pıhtılaşma Başlatıcılar (Starter)

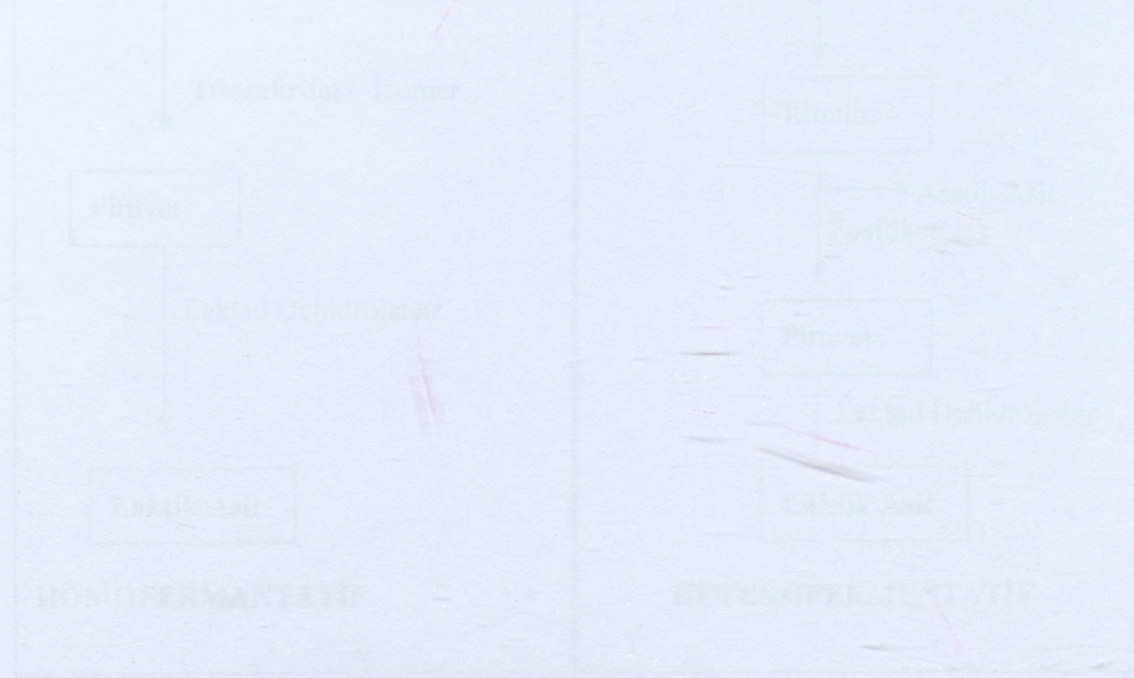
B) Doğal Mayalar (Rennin)

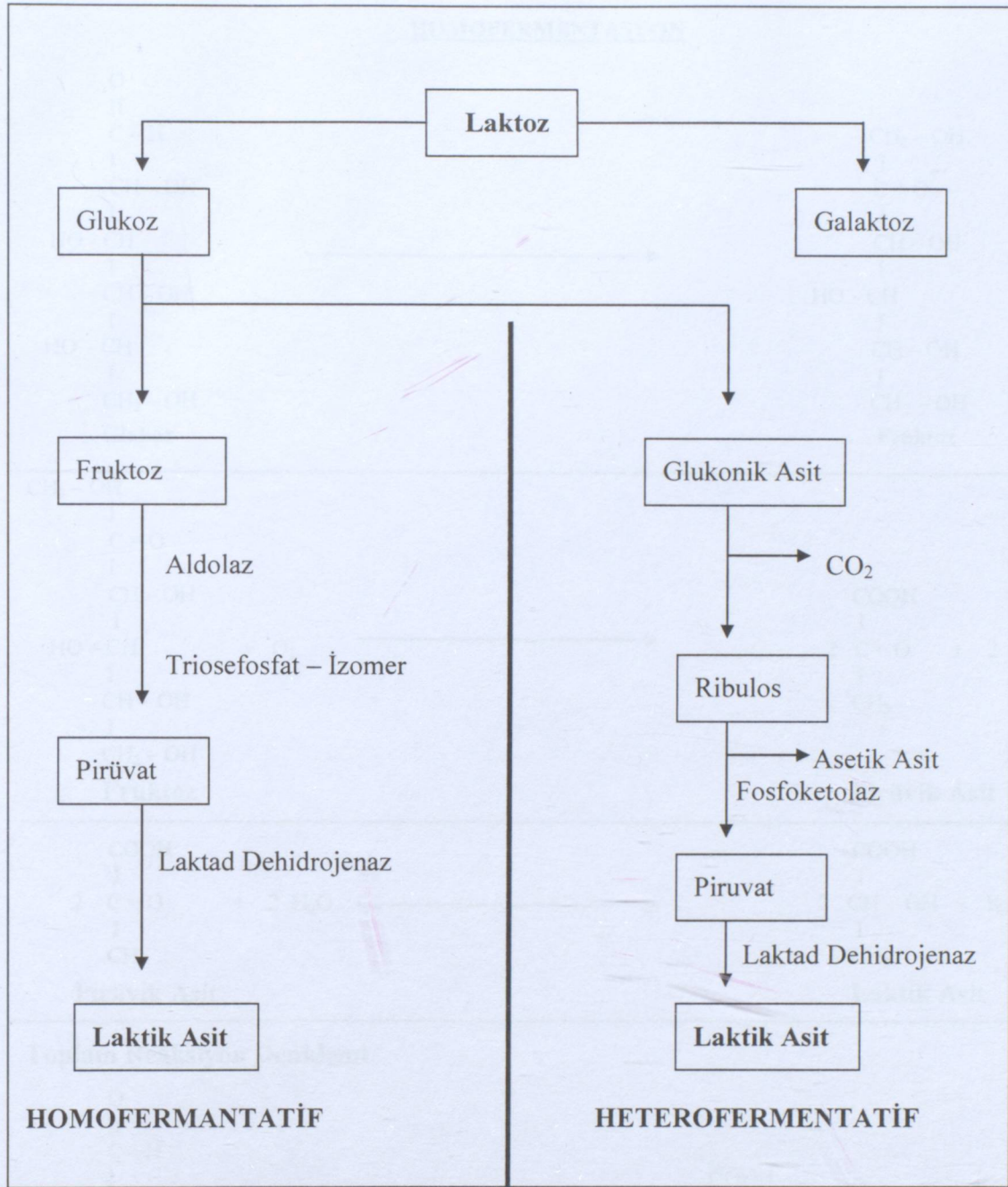
Son yıllarda mikrobiyal yolla peynir yapımında kullanılan maddelerin (proteazların) yaygınlaşması ile verimli ve uygun mikroorganizmaların elde edilmesi yolunda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Peynir yapımında kullanılan bu iki farklı kaynağın meydana getirdiği pıhtılaşma reaksiyonları da farklıdır (Eralp, 1974).

2.3.2 Pıhtılaşma Başlatıcılar (Starter)

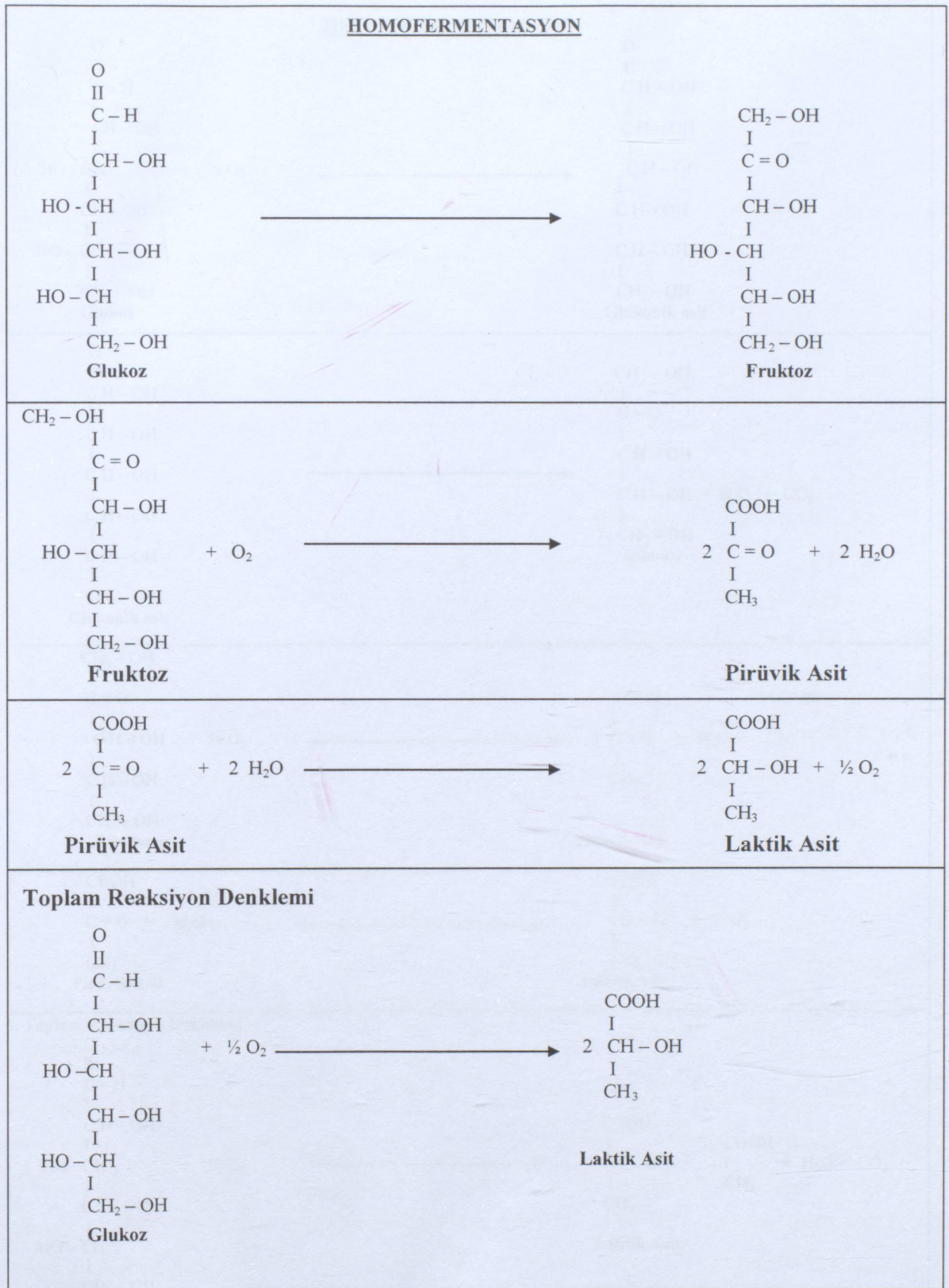
Mikrobiyal yolla elde edilen pıhtılaştırıcılar sınıfına girerler. Süt içerisinde çeşitli mikro organizmalar bulunmaktadır. Bu mikroorganizmaların bir kısmı süt içerisinde yararlı faaliyet göstererek gerekli fermentasyonları sağlarken (laktik asit fermentasyon bakterileri) bazıları da sağlığa zararlı niteliktedir.

Çeşitli mikroorganizmaların etkisiyle sütte oluşan ana fermentasyonlar, süütün içerisinde bulunan laktozun Şekil 2.3'de gösterildiği gibi parçalanması biçimindedir.

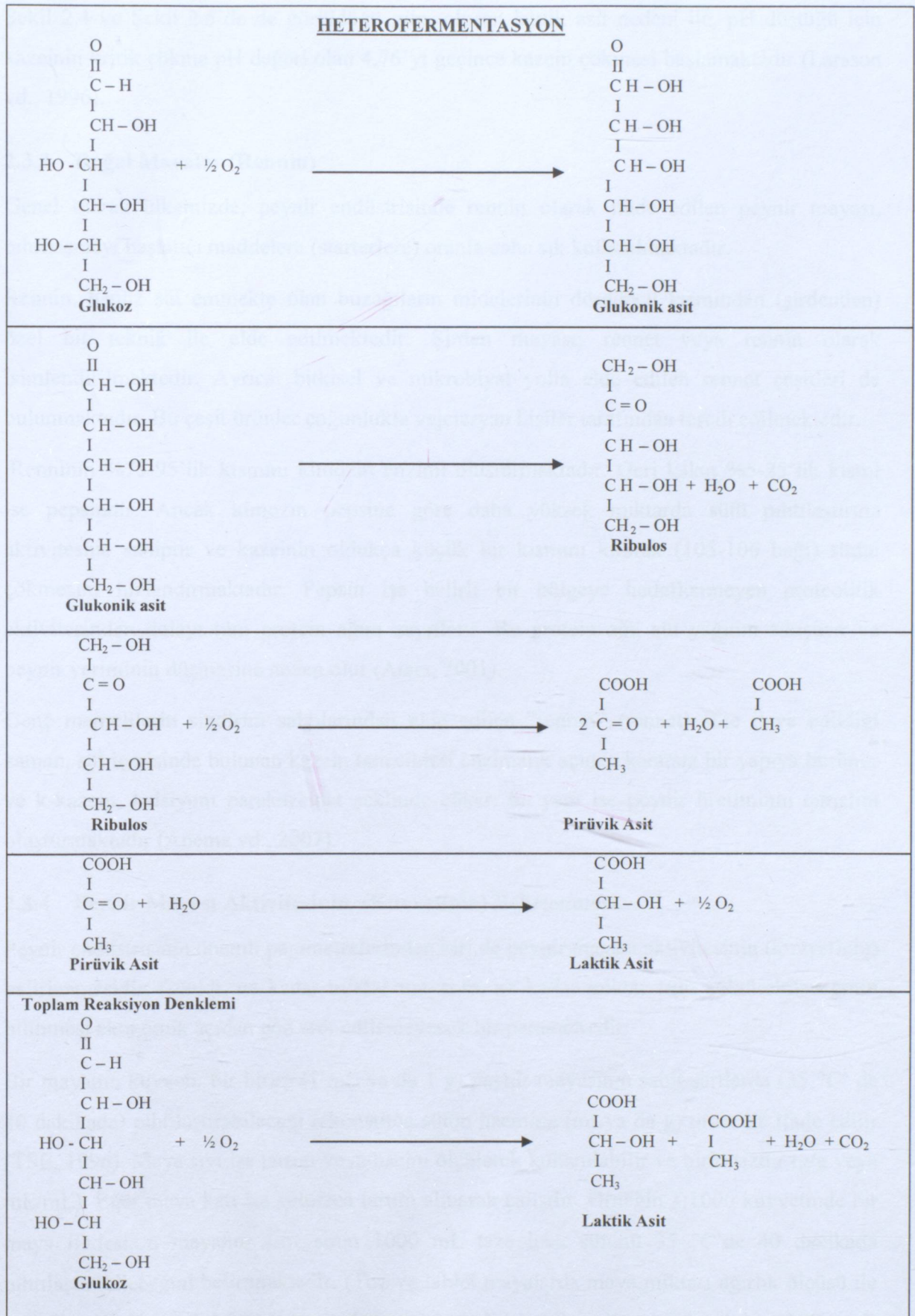




Şekil 2.3 Laktik asit fermentasyonu; homofermentatif ve heterofermentatif

HOMOFERMENTASYON

Şekil 2.4 Homofermentatif reaksiyon denklemleri



Şekil 2.5 Heterofermentatif reaksiyon denklemleri

Şekil 2.4 ve Şekil 2.5’de de görüldüğü gibi, oluşan laktik asit nedeni ile, pH düştüğü için kazeinin kritik çökme pH değeri olan 4,76’yı geçince kazein çökmesi başlamaktadır (Larsson vd., 1996).

2.3.3 Doğal Mayalar (Rennin)

Genel olarak ülkemizde, peynir endüstrisinde rennin olarak ifade edilen peynir mayası, pıhtılaşmayı başlatıcı maddelere (starterlere) oranla daha sık kullanılmaktadır.

Rennin, henüz süt emmekte olan buzağların midelerinin dördüncü kısmından (şirdenden) özel bir teknik ile elde edilmektedir. Şirden mayası; rennet veya rennin olarak isimlendirilmektedir. Ayrıca, bitkisel ve mikrobiyal yolla elde edilen rennet çeşitleri de bulunmaktadır. Bu çeşit ürünler çoğunlukla vejeteryan kişiler tarafından tercih edilmektedir.

Renninin %75-95’lik kısmını kimozen enzimi oluşturmaktadır. Geri kalan %5-25’lik kısmı ise pepsindir. Ancak kimozen pepsine göre daha yüksek miktarda sütü pıhtılaştırma aktivitesine sahiptir ve kazeinin oldukça küçük bir kısmını kırarak (105-106 bağı) sütün çökmesini hızlandırmaktadır. Pepsin ise belirli bir bölgeye hedeflenmeyen proteolitik aktivitesinden dolayı tüm protein ağırlığını zayıflatır. Bu protein ağı, süt yağının sıkıştırır ve peynir veriminin düşmesine neden olur (Atacı, 2001).

Genç memelilerin sindirim salgılarından elde edilen “rennin” (rennet) süte ilave edildiği zaman, süt içerisinde bulunan kazein tanecikleri enzimatik açıdan kararsız bir yapıya bürünür ve k-kazein, kalsiyum parakazeinat şeklinde çöker; bu yapı ise peynir üretiminin temelini oluşturmaktadır (Anema vd., 2007).

2.3.4 Peynir Mayası Aktivitesinin (Kuvvetinin) Belirlenmesi

Peynir endüstrisinin önemli parametrelerinden biri de peynir mayası aktivitesinin (kuvvetinin) belirlenmesidir. Çünkü, ne kadar miktar mayanın, ne kadar miktar sütü çöktürebileceğinin bilinmesi ekonomik açıdan göz ardı edilemeyecek bir parametredir.

Bir mayanın kuvveti, bir birim (1 mL ya da 1 g) peynir mayasının sabit şartlarda (35 °C’ de 40 dakikada) pıhtılaştırabileceği rekonstitüe sütün hacmine (mLya da g) oranı ile ifade edilir (TSE, 1996). Maya sıvı ise tartım veya hacim ölçülerek kullanılabilir ve birimsizdir (g/g veya mL/mL). Eğer maya katı ise yalnızca tartım alınarak çalışılır. Örneğin 1:1000 kuvvetinde bir maya ifadesi, o mayanın 1mL’sinin 1000 mL taze inek sütünü 35 °C’de 40 dakikada pıhtılaştırabileceğini belirtmektedir. (Toz ve tablet mayalarda maya miktarı ağırlık ölçüsü ile belirtilmektedir.) Şekil 2.6’da maya kuvvetinin belirlenebilmesi amacıyla tüplere 10’ar mL süt alınmış ve üzerlerine 1’er mL maya ilave edilerek kronometre ile süre başlatılmıştır.

Pıhtılaşmanın ilk görüldüğü an süre kayıt edilmiş ve Denklem 2.1’de yerine yazılarak maya kuvveti hesaplanmıştır (Madden, 1991; Gill ve Saunders, 1987).

$$MK = (2400 \times S) / (Z \times M) \quad (2.1)$$

MK : Maya kuvveti

S : Rekonstitüe süt miktarı (mL) (20 mL)

Z : Pıhtılaşma süresi (sn)

M : Maya miktarı (mL) (2 mL içindeki maya miktarı)

Peynir mayası aktivitesinin (kuvvetinin) belirlenmesinde literatürde yer alan farklı yöntemler bulunmaktadır (Eralp, 1974).

2.3.4.1 Fleischmann Yöntemi

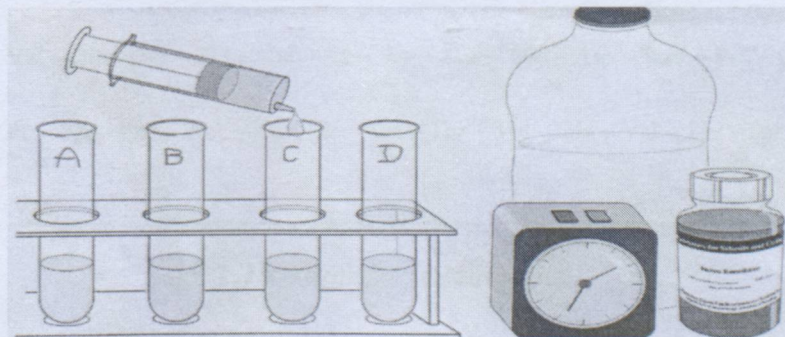
Peynir mayasından 5 mL alınır ve su ile 100 mL’e tamamlanır, iyice karıştırılır. Bu çözeltiden 10 mL alınır su, banyosunda 35 °C’e getirilmiş 500 mL taze süte hızla eklenir ve saate bakılır. Karıştırılarak sütün pıhtılaşmasının görüldüğü an, süre not edilir. Ardından ampirik formülle hesap yapılır.

2.3.4.2 W.Grimmer Yöntemi

Yine benzer işlemler yapılır ve buna ek olarak sütün asitlik derecesi de takip edilir, pıhtılaşma görüldüğünde süre not edilerek ampirik formülden hesap yapılır.

2.3.4.3 Berridge Yöntemi

Farklı sütlerin kullanılması ile pıhtılaşma süresi değişebileceği için, yağsız süt tozu kullanılır. 12 g yağsız süt tozu, 100 mL 0,01 M kalsiyum klorür çözeltisine katılır. 35 °C’deki su banyosunda bulunan bir tüp içerisine, bu çözeltiden 10 mL alınır. 0,5 mL belirlenen bir oranda seğreltilmiş maya çözeltisinden hızla ilave edilir ve süre başlatılır. Yine pıhtılaşmanın görüldüğü an süre belirlenerek ampirik formülle hesap yapılır (Beyenal, 1999; Dönmez ve Özçelik, 1986).



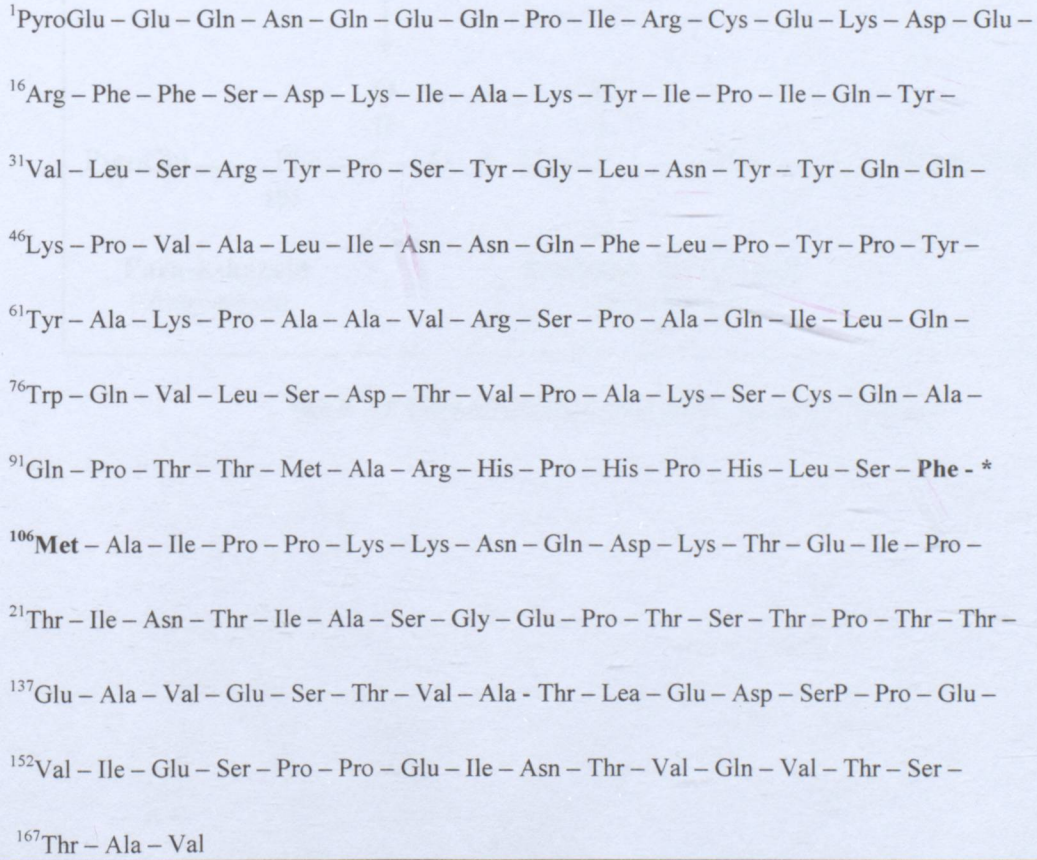
Şekil 2.6 Maya aktivitesinin tayini

Türkiye’de ve Dünya’da halen yürürlükte olan standart peynir mayası aktivitesi (kuvveti) tayin yönteminin esası, son olarak ifade edilen Berridge yöntemine dayanmaktadır (TSE, 1996).

2.4 Mayalama İşlemi

Peynir üretilirken, süt içerisinde bulunan kazeinin %95’i, kesilmiş kısma geçer. Bu geçiş; pıhtılaşma, kurutma ve olgunlaşma olarak tanımlanan üç basamakta gerçekleşir.

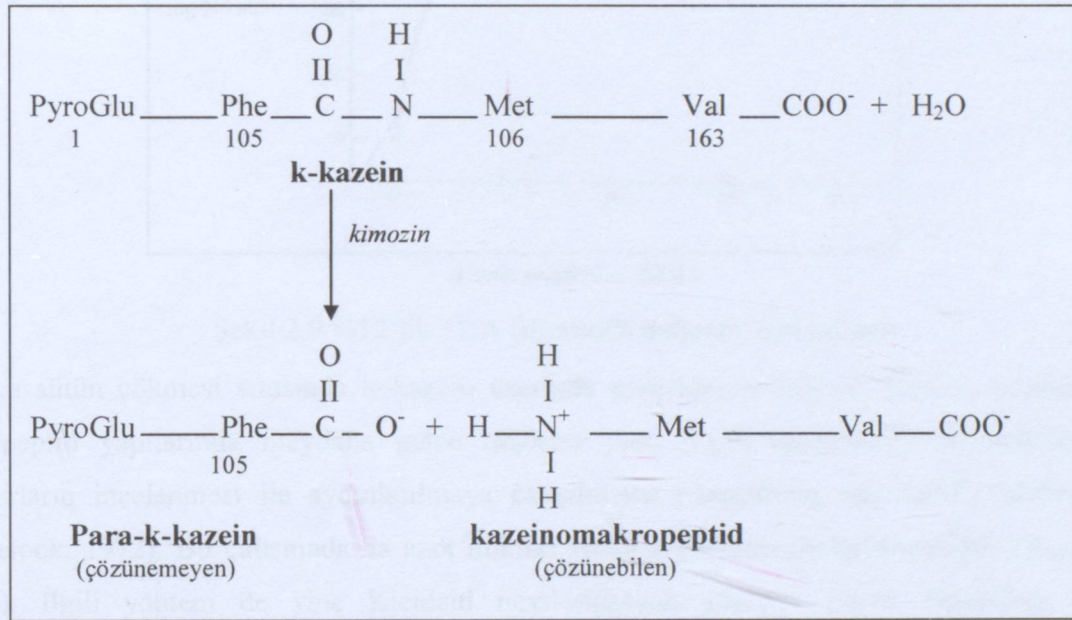
Süte, peynir mayası katıldığı zaman gerçekleşen ve peynir oluşumunun ilk basamağını teşkil eden pıhtılaşma işlemi, iki fazlı bir sistem olarak incelenmektedir (Wheelock ve Penney, 1972; Berridge, 1954). Birinci fazda, enzim süt içerisinde bulunan, çözünebilir kalsiyum kazeinat (Şekil 2.7) moleküllerinin yüzeyindeki glikopeptid bandını kırar ve k-kazein çok dayanıksız olan fenilalanin (105) – metionin (106) (Phe-Met) aminoasit bağından koparak, Şekil 2.8’de görüldüğü gibi, para-k-kazein ve kazeinopeptid olarak adlandırılan iki kısma ayrılır (Turhan ve Mutlu, 1998).



Şekil 2.7 k-kazeinin protein yapısı

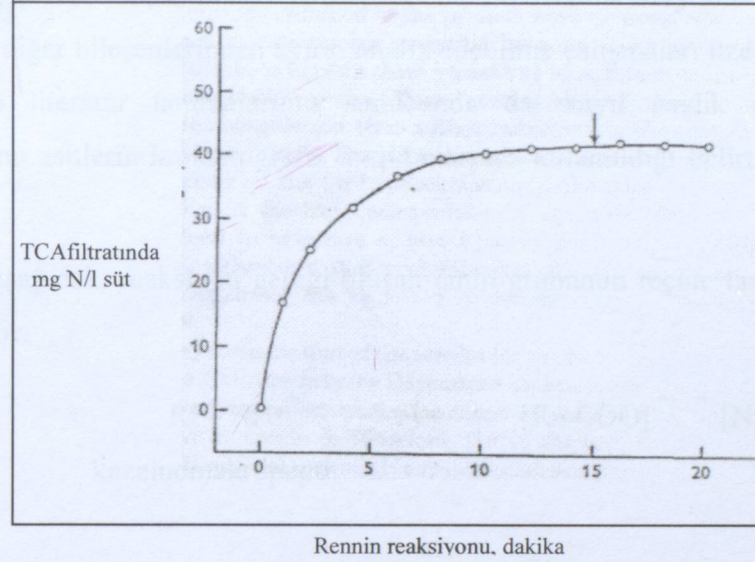
İkinci fazda ise süt içerisinde bulunan kalsiyum iyonları kalsiyum parakazeinat şeklinde çökmeye neden olur (Wheelock vd., 1972; Waugh ve Von, 1956).

Birinci fazda gerçekleşen işlem çökmeye etki eden önemli bir basamaktır. Bu nedenle ilgili faz üzerinde pek çok literatür çalışması yapılmıştır. Bunların bazılarında, süte enzim katıldıktan sonra %12'lik TCA ekleyerek filtrata geçen azot miktarı incelemiş ve pıhtılaşma sırasında oluşan birinci faz aydınlatılmaya çalışılmıştır (Şekil 2.9) (Alais vd., 1953). Bu işlemler sırasında azot miktarının belirlenmesi için mikro Kjeldahl yöntemi kullanılmıştır.



Şekil 2.8 k-kazeinin kimozin etkisi ile parçalanması

Yine literatürde %2'lik TCA ve %12'lik TCA'da bulunan NPN (Non-Protein Nitrogen, Protein Yapısında Olmayan Azot) üzerinde durulmuş ve azot miktarının, sütün çökmesi sırasında arttığı, Technicon Otoanalizör cihazı verilerine dayanarak ispatlanmıştır (Lee vd., 1977; Schafer ve Matsen, 1935).



Şekil 2.9 %12'lik TCA filtratında bulunan azot miktarı

Ayrıca sütün çökmesi sırasında k-kazein üzerinde gerçekleşen hidroliz sonucu, peptid ve glikopeptid yapılarında meydana gelen değişim yine, TCA çözeltisinde bulunabilecek miktarların incelenmesi ile aydınlatılmaya çalışılmıştır (Armstrong vd., 1967; Castle ve Wheelock, 1972). Bu çalışmada da azot miktarı Nessler yöntemi ile belirlenmiştir (Varley, 1954). İlgili yöntem de yine Kjeldahl nesslerizasyon yöntemi olarak literatürde yer almaktadır.

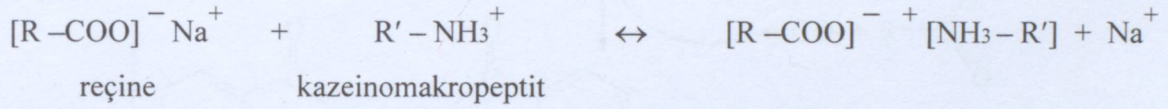
Yine başka bir literatür çalışmasında süt tozu örneklerinde bulunan toplam protein miktarı Kjeldahl metodu ve spektrofotometrik yöntem kıyaslanarak bulunmuştur (Kamizake vd., 2003).

Bu verilerin tümü incelendiğinde genel olarak dikkat çeken nokta yapılan çalışmaların büyük bir kısmının TCA filtratı kullanılarak gerçekleştirilmiş olmasıdır (Armstrong vd., 1967; Chaplin ve Gren, 1980). Pıhtılaşma eğri düzlüğe ulaştığı zaman gerçekleşir (Şekil 2.9). Bu reaksiyon için optimum pH 3,5 – 5,5'dir. pH = 6,7'de (taze sütün pH değeri) reaksiyon benzer şekilde yürür ve düzlüğe ulaşır. Diğer taraftan pH = 3,5'den daha düşük pH değerlerinde bu reaksiyon gittikçe yavaşlar ve pH = 2'de tamamen durur (Eralp, 1974).

2.5 Reçine Çalışmaları

Süte peynir mayası (rennin) katıldığı zaman, k-kazein Şekil 2.7’de gösterildiği gibi (105-106) fenilalanin-metionin peptid bağından kopar ve Şekil 2.8’de belirtildiği gibi primer amin grubu (kazeinomakropeptid) ve karboksilik asit grubu (para-k-kazein) meydana gelir. İşte bu noktadan yola çıkarak, oluşan primer amin grubunu zayıf asidik katyon değiştirici reçine ile tutularak sütün diğer bileşenlerinden ayırıp analiz edebilme çalışmaları üzerinde durulmuştur. Gerçekleştirilen literatür taramalarının sonucunda da, zayıf asidik katyon değiştirici reçinelerin amino asitlerin kromatografik ayrılmalarında kullanıldığı belirtilmektedir (Galen, 1969).

Sonuç olarak, aşağıdaki reaksiyon gereği oluşan amin grubunun reçine tarafından tutulacağı ön görülmektedir.



Bu denemeler sırasında zayıf asidik katyon değiştirici reçine olan Amberlite IRC86 kullanılmıştır. Reçineye ait bazı özellikler Çizelge 3.1’de belirtilmektedir.

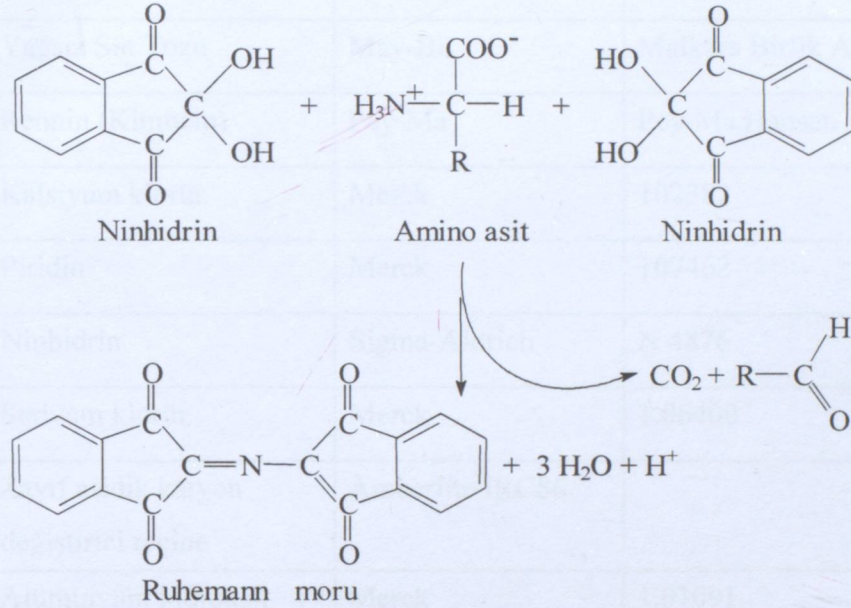
Çizelge 2.10 Amberlite IRC86’nın bazı özellikleri

Fiziksel formu	amber görünümlü
Matriks	poliakrilik kopolimer jel
Fonksiyonel grup	karboksilik asit
İyonik formu	H ⁺

2.6 Amin Grubunun Kolorimetrik Yöntem (Ninhidrin Yöntemi) İle Analizi

Bir α-amino asit çözeltisi ninhidrin ile ısıtılacak olursa, CO₂ ve amino asidin amino grubundan kaynaklanan amonyak açığa çıkar ve bütün α-amino asitlerin verdiği bir reaksiyon sonucu, Ruhemann moru olarak bilinen ve 1910 yılında Siegfried Ruhemann tarafından keşfedilmiş renkli bir ürün oluşur. Maksimum absorbans 570 nm’ dendir. Reaksiyonun ilerleyişi Şekil 3.1’de gösterilmektedir Rengin kararlılığı 3 saat ile 12 saat arasında değişmektedir. Ancak tavsiye edilen süre 3 saati geçmemesidir. Harding ve MacLean’s yöntemine göre amin azotu içeren (0,01 – 0,08 mg/mL amin azotu) örneğe, % 10’luk sulu

piridin çözeltisi ve % 2'lik sulu ninhidrin ilave edilir. Tüp, 20 dk. kaynar su banyosunda bekletilir ve su ile soğutulur belirli hacme seyreltilir. Spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda absorbans değeri okunur. Standart eğri çizimi için lösin kullanılabilir (Harding ve MacLean, 1915).



Şekil 2.10 Ninhidrin bileşiğinin amino asitler ile verdiği reaksiyon denklemi

3. DENEYSEL BÖLÜM

3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasal maddeler

Madde Adı	Firma Adı	Katalog Numarası
Yağsız Süt Tozu	May-Bi	Malkara Birlik A.Ş.
Rennin (Kimozen)	Pey-Ma	Pey-Ma Hansen
Kalsiyum klorür	Merck	102382
Piridin	Merck	107462
Ninhidrin	Sigma-Aldrich	N 4876
Sodyum klorür	Merck	1.06400
Zayıf asidik katyon değiştirici reçine	Amberlite IRC86	
Alüminyum hidroksit	Merck	1.01091
Alüminyum klorür	Merck	8.01081
Alüminyum sülfat	Merck	1.01102

3.2 İlgili Çözeltilerin Ve Reçine Kolonunun Hazırlanması

3.2.1 Çözeltilerin Hazırlanması

Destile su

Kalsiyum klorür çözeltisi, 0,01 M

Yağsız süt tozu

Süt; 12 g yağsız süt tozu 100 mL 0,01 M kalsiyum klorür çözeltisine ilave edildi ve 20 dk manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ardından 30 dk karanlıkta bekletildi günlük olarak hazırlandı.

Maya (rennin); saf kimozen içeren mayanın % 0,5'lik çözeltisi günlük olarak hazırlandı.

Zayıf asidik katyon değiştirici reçine, Amberlite IRC86

% 6'lık Sodyum klorür çözeltisi.

Sodyumhidroksit çözeltisi, 1 M

Zayıf asidik katyon değiştirici reçine, Amberlite IRC86

% 2'lik ninhidrin; 2 g ninhidrin tartılıp 5 mL asetonda çözöldükten sonra su ile 100 mL'e tamamlandı, günlük olarak hazırlandı.

% 10'luk piridin; 10 mL piridin çözeltisi su ile 100 mL'e tamamlandı.

Standart lösin çözeltisi; 1 g/L amin azotu içerecek şekilde standart çözelti hazırlandı.

3.2.2 Reçine Kolonunun Hazırlanması

Bölüm 2.5'de belirtilen işlemleri gerçekleştirmek amacıyla ile, zayıf asidik katyon değiştirici reçine olan Amberlite IRC86 kullanıldı. 1 cm iç çapında 10 cm boyunda cam kolona alınan 8 mL reçine üzerinden 20 dk süre ile 20 mL % 6'luk NaCl çözeltisi 1 mL/dk hızla geçirildi. Ardından destile su ile yıkama yapıldı. İşlem üç defa tekrarlandı ve en son destile su geçirilerek reçine kullanıma hazır hale getirildi.

3.3 Kullanılan Araç Ve Gereçler

UV-visible spektrofotometre: Agilent 8453 UV/Vis Spectrometer

Analitik terazi, Sartorius Analytic

Destile su cihazı

Magnetik karıştırıcılı ısıtıcı, Chiltren Hotplate H531

Çalkalayıcı, Nüve SL 350 (50-250 rpm)

Su banyosu

Santrifüj, Hettich EBA 20

3.4 Harding ve MacLean's (Ninhidrin) Yöntemi Uygulamaları

Sade süt, pıhtılaşma öncesi mayalı süt ve pıhtılaşma sonrası mayalı süt örneklerine ninhidrin yöntemi uygulandı. Özellikle sade süt ve pıhtılaşma öncesi süt karışımlarından elde edilen mor renkli çözeltilerin içerisinde, durulmayan bulanık bir yapı göröldü. Spektrofotometre ölçömlerinde metodolojik hataya neden olan bu taneciklerin giderilebilmesi amacıyla ile farklı maddeler kullanılarak çalışmaları tekrarlandı. Kullanılan maddeler ve elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3'de ifade edilmektedir.

3.5 Reçine ile Tutulma Çalışmaları

3.5.1 Kesikli Yöntem (Batch) Çalışmaları

Bu teknikte, pıhtılaşma işlemi sırasında açığa çıkan primer amin azotu, Amberlite IRC86 zayıf asidik katyon değiştirici reçine üzerinde tutulmaya çalışıldı. Bölüm 3.2'deki gibi hazırlanan 20 mL sütün üzerine 2 mL % 0,5'lik peynir mayası ilave edildi. Kullanılan bu mayanın klasik yöntem ile pıhtılaşma süresi 6 dk civarındadır. Aynı anda başka bir beherde yine 20 mL süt + 2 mL su içeren karışım hazırlandı. Her iki behere de Bölüm 4.2.2'deki gibi hazırlanan 8 mL suda şişirilmiş reçine ilave edildi ve 20 dk çalkalandı. Pıhtılaşma sonrası açığa çıkan primer amin azotunun reçine tarafından alıkonulduğu düşünülen miktarını bulabilmek amacı ile karışım dekante edildi. Reçineler distile su ile yıkandı. Ayrılan reçine 20 mL % 6'lık NaCl'den oluşan elusyon çözeltisi ile 20 dk çalkalanıp çözelti yine dekante edildi. Su ile 100 ml'lik hacme tamamlandı. Elde edilen çözeltilerdeki primer amin azotu miktarı, ninhidrin yöntemi uygulanarak belirlendi. Bulunan sonuçlar Bölüm 4.3'de görülmektedir.

3.5.2 Amberlite IRC86 Miktarının Belirlenmesi

Pıhtılaşma işlemi sonunda açığa çıkan $R-NH_3^+$ grubunun tutulması için gereken reçine miktarının belirlenebilmesi amacı ile Bölüm 3.5.1'de anlatıldığı şekilde bir seri 20 mL süt + 2 mL % 0,5'lik maya çözeltileri hazırlandı. Destile su içerisinde şişirilmiş reçinelerin farklı hacimleri kolona alındı. 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 mL hacimlerinde reçineler farklı kolonlara dolduruldu. Her biri pıhtılaşma sonrası aşamaya getirilmiş olan, süt+maya örnekleri 4000 rpm'de santrifüjlendi. Sıvı kısım ayrıldı. Geriye kalan tortu birkaç defa destile su ile yıkanarak, elde edilen tüm çözeltiler toplandı. Ardından Amberlite IRC86 reçine kolonundan geçirildi. Daha sonra distile su ile kolon yıkandı. Yıkama işlemine kolondan alınan çözelti tamamen berrak olana kadar devam edildi. Tutulan $R-NH_3^+$ grubu, % 6'lık 20 mL NaCl'den oluşan elusyon çözeltisinin, 1 mL/dk hızla kolondan geçirilmesi ile elue edildi. Eluatta bulunan primer amin azotu miktarı ninhidrin yöntemi uygulanarak tayin edildi. Sonuçlar Bölüm 4.4'de verilmiştir.

3.5.3 Elusyon Çözeltisi Derişiminin Ve Hacminin Bulunması

Pıhtılaşma sonrası oluşan primer amin grubu azotunun Amberlite IRC86 reçine tarafından kolon yöntemi ile tutulmasından sonra, geri kazanım için en uygun derişimde NaCl çözeltisi miktarının belirlenebilmesi amacı ile % 2 - % 10 arasında değişen değerlerde 20'şer mL NaCl

çözeltisi kullanılarak eluatlar elde edildi ve ninhidrin yöntemi uygulandı. Sonuçlar Bölüm 4.5'de verilmiştir. Ayrıca uygun NaCl derişiminin bulunmasının ardından uygun NaCl çözeltisi hacminin bulunabilmesi amacı ile, 2 şer mL'lik bölümler halinde alınan toplam 20 mL NaCl çözeltisi, aynı miktar süt + maya karışımının geçirildiği kolondan yine 1mL/dk hızla geçirildi. Yine ninhidrin yöntemi uygulandı. Sonuçlar Bölüm 4.5'de belirtilmektedir.

3.5.4 Pıhtılaşma İşleminin Durdurulması

Süte, peynir mayası (rennin) ilave edildiği anda başlayan pıhtılaşma reaksiyonunun, farklı aşamalarında durdurulabilmesini sağlayabilmek amacı ile, literatür verilerinden de yola çıkarak (Chaplin ve Green, 1980), NaOH ilavesi ile gerçekleştirilen pıhtılaşma reaksiyonu denemeleri yapılmıştır. Yedi adet 20 mL süt + 2 mL %0,5'lik maya karışımı çözeltileri hazırlandı. $35 \pm 0,2$ °C' de su banyosunda bulunan örneklere pıhtılaşmanın ikinci dakikasında 1 M NaOH'den farklı hacimlerde ilave edildi ve meydana gelen hacim farkı destile su ile tamamlanarak giderildi. Kullanılan mayanın klasik yöntem ile pıhtılaşma süresi 6 dk civarındadır. Farklı pH değerlerine sahip süt+maya karışımları, 20 dk sonunda su banyosundan alındı ve reçine kolonundan geçirilerek ninhidrin yöntemi uygulandı. Sonuçlar Bölüm 4.6'da verilmiştir.

3.5.5 Pıhtılaşma İşlemine Sıcaklığın Etkisi

Buraya kadar yapılan bütün deneyler $35 \pm 0,2$ °C'de gerçekleştirilmiştir. Pıhtı oluşumuna sıcaklığın etkisini inceleyebilmek amacı ile Bölüm 3.5.4'deki gibi süt + maya örnekleri hazırlandı. $25 \pm 0,2$ °C ile $65 \pm 0,2$ °C aralığında değişen sıcaklıklarda çalışıldı. 10 dk. sonunda örnekler yine reçine kolonundan geçirilerek ninhidrin yöntemi uygulandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.7'de verilmektedir.

3.5.6 Pıhtılaşma İşlemine CaCl_2 Derişiminin Etkisi

Buraya kadar yapılan deneylerde kullanılan süt, Bölüm 3.2.1'de belirtildiği gibi 0,01 M CaCl_2 çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. En ideal CaCl_2 derişimini belirleyebilmek amacı ile üç farklı derişimde hazırlanan CaCl_2 çözeltileri ile sütler hazırlandı. 20 mL süt + 2 mL %0,5'lik maya karışımı kullanıldı. Yine 10. dk'nın sonunda reçine kolonundan geçirildi ve ninhidrin yöntemi uygulandı. Sonuçlar Bölüm 4.8'de belirtilmektedir.

3.5.7 İdeal Çalışma Koşulların Uygulanması

DeneySEL verilerin ışığında tespit edilen ideal çalışma koşulları sağlanarak, süt + maya çalışmaları gerçekleştirildi. Pıhtılaşma işlemi sırasında meydana gelen primer amin azotu

miktarındaki değişim ideal şartlar sağlanarak incelendi. Bu amaçla 0,01 M CaCl_2 çözeltisinden hazırlanan süt, 20'şer mL'lik kısımlar halinde toplam altı adet örnek olacak şekilde hazırlandı. Her bir örnek $35 \pm 0,2$ °C'de su banyosuna alındı. Üzerlerine 2 mL % 0,5'lik maya çözeltisi ilave edilip kronometre ile süre başlatıldı. Kullanılan mayanın klasik yöntem ile pıhtılaşma süresi 6 dk 40 sn olarak tesbit edildi. Pıhtılaşma işlemi başlatılan süt + maya örneklerine sırası ile 0, 2, 4, 6, 8 ve 10. dk'larda 0,4 mL, 1 M NaOH çözeltisi ilave edildi. Süre tamamlandığında örnekler yine 8 mL reçine içeren kolondan 1 mL/dk hızla geçirildi. Aşağıdan alınan çözelti tamamen berrak olana kadar distile su ile kolon yıkandı. Ardından % 6'lık NaCl çözeltisinin 20 mL'si, yine 1 mL/dk akış hızı ile kolondan geçirilerek reçine tarafından tutulan primer amin azotu çözeltiye alındı. Ninhidrin yöntemi uygulanarak azot miktarı belirlendi. Sonuçlar Bölüm 4.9'da gösterilmektedir.

3.5.8 Geliştirilen Yöntemin k Değerlerinin Hesaplanması

Bölüm 3.5.7'de belirtilen ideal çalışma koşullarının sağlanması ardından elde edilen Çizelge 4.10'daki absorbans değerleri üzerinde çalışmalar yapıldı. Bu absorbans değerleri ile, kullanılan mayanın kuvveti olan 12000 rakamı arasında k değerleri hesaplandı (Denklem 3.1). Sonuçlar Bölüm 4.10'da verilmektedir.

3.5.9 Spektrofotometrik Yöntem İle Peynir Mayası Aktivitesinin (Kuvvetinin) Tayini

Bölüm 3.5.8'de bulunan k değerlerinin ortalamaları Çizelge 4.11'de yer alan ilgili bölüme not edildi. İdeal çalışma koşulları sağlanarak, kuvveti 12000 olan maya ile süt+maya çalışmaları gerçekleştirildi. Pıhtılaşmanın farklı zaman dilimlerinde durdurularak, beş adet absorbans değeri elde edildi. Çizelge 4.11'den bu zaman dilimlerinin karşılığı olan k rakamları bulundu. Denklem 4.1'de yerine yazılarak spektrofotometrik yöntem ile peynir mayası aktivitesi belirlendi. Sonuçlar Bölüm 4.11'de gösterilmektedir.

3.5.9.1 Tavsiye Edilen Yöntem

250 mL'lik beher içerisine 0,01 M kalsiyumklorür (CaCl_2) çözeltisinden $100 \pm 0,1$ mL alınır. Bunun üzerine $12 \pm 0,02$ g yağsız süt tozu yavaş yavaş ilave edilir. Bu sırada magnetik karıştırıcı ile karıştırma yapılarak süt tozunun daha kolay çözünmesi sağlanır. Karıştırma işlemine süt tozu tamamen çözününceye kadar devam edilir (yaklaşık 20 dk). Bu şekilde hazırlanan süt, oda sıcaklığında ve karanlık bir yerde 30 dk kadar bekletildikten sonra kullanıma hazır hale gelir.

Peynir mayası (rennin) çözeltisinden % 0,5 oranında maya içeren çözelti hazırlanır.

Zayıf asidik katyon değiştirici reçine olan, Amberlite IRC86, bir gece destile suda bekletilerek

şişirilir. 1 cm iç çapında 10 cm boyunda cam kolona alınan 8 mL reçine üzerinden 20 dk süre ile 20 mL % 6'lık NaCl çözeltisi 1 mL/dk hızla geçirilir. Ardından destile su ile yıkama yapılır. İşlem üç defa tekrarlanır ve en son destile su geçirilerek reçine kullanıma hazır hale getirilir.

Hazırlanan süt ve maya çözeltileri su banyosu kullanılarak $35 \pm 0,2$ °C sıcaklığa getirilir. Daha sonra 50 mL'lik behere, 20 mL süt alınır ve bunun üzerine 2 mL maya çözeltisi ilave edilir ve kronometre ile süre başlatılır.

Maya ilave edilmesinin ardından, Çizelge 4.10'da belirtilen herhangi bir sürede, 0,4 mL 1 M sodyum hidroksit çözeltisi eklenerek pıhtılaşma işlemi durdurulur. Elde edilen karışım, reçine kolonundan, 1 mL/dk hızla geçirilir.

Kolon distile su ile yıkanır. Kolonun altından alınan çözeltilerde hiç bulanıklık görülme-yene kadar su ile yıkama işlemine devam edilir. Aksi halde sütün kendi bulanıklığından dolayı hatalı sonuçlar elde edilebilir.

Yıkama işlemi bittikten sonra, kolon tarafından tutulan primer amin azotu 20 mL % 6'lık sodyum klorür çözeltisi kullanılarak çözeltiliye alınır ve su ile 25 mL'ye tamamlanır.

Buradan alınan 1 mL örnek üzerine tüp içerisinde, 1 mL % 10'luk piridin ve 1 mL % 2'lik ninhidrin çözeltisi eklenir ve 20 dk kaynar suda bekletilir. Süre bitiminde derhal soğuk suya alınır ve su ile 100 mL'e tamamlanır.

Aynı işlemler 20 mL süt + 2 mL % 0,5'lik maya içeren ve başlangıçta 0,4 mL, 1 M sodyum hidroksit ilave edilen karışıma da uygulanır ve absorbans değeri spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda okunur. Eğer çift ışın yollu spektrofotometre kullanılacak ise; A_s olarak ifade edilen sütün absorbans değerine karşı A_0 örneğin absorbans değeri okunur. Eğer tek ışın yollu spektrofotometre kullanılacak ise suya karşı süt ve örneğin absorbans değeri okunup farkı alınara işlem yapılır.

Bulunan absorbans değeri, aşağıdaki formülde yerine yazılarak maya kuvveti hesaplanır.

$$MK = (A_0 - A_s) \times k \quad (3.1)$$

Burada;

MK : Maya kuvveti

A_0 : Örneğin absorbans değeri (570 nm)

A_s : Sütün absorbans değeri (570 nm)

k : Faktör

Bu denklemde k bir faktör olup, süte peynir mayası katıldığı an ile sodyum hidroksit ilave

edildiği zamana kadar geçen süre 120-420 sn'lerin dışında ise sabittir. Eğer ilgili süre bu aralıkta ise, maya kuvveti hesaplanırken kullanılması gereken k değeri Çizelge 4.10'dan okunabilir veya denklem 3.2 yardımı ile hesaplanabilir.

$$k = 10^{2,6645 - 0,9395 \log t} \quad (3.2)$$

3.5.10 Klasik Yöntem İle Peynir Mayası Aktivitesinin (Kuvvetinin) Tayini

Denemeler sırasında kullanılan peynir mayasının (renninin) pıhtılaştırma süresi klasik yöntem ile belirlendi. Bu amaçla Bölüm 3.2.1'de hazırlanan 20 mL süt $35 \pm 0,2$ °C sıcaklıkta su banyosuna koyuldu ve 2 mL % 0,5'lik maya çözeltisi eklendiği anda kronometre ile süre başlatıldı. Pıhtı taneciklerinin gözle görüldüğü an süre durduruldu ve denklem 2.1 kullanılarak maya kuvveti hesaplandı. Bulunan değerler Bölüm 4.12'de belirtilmektedir.

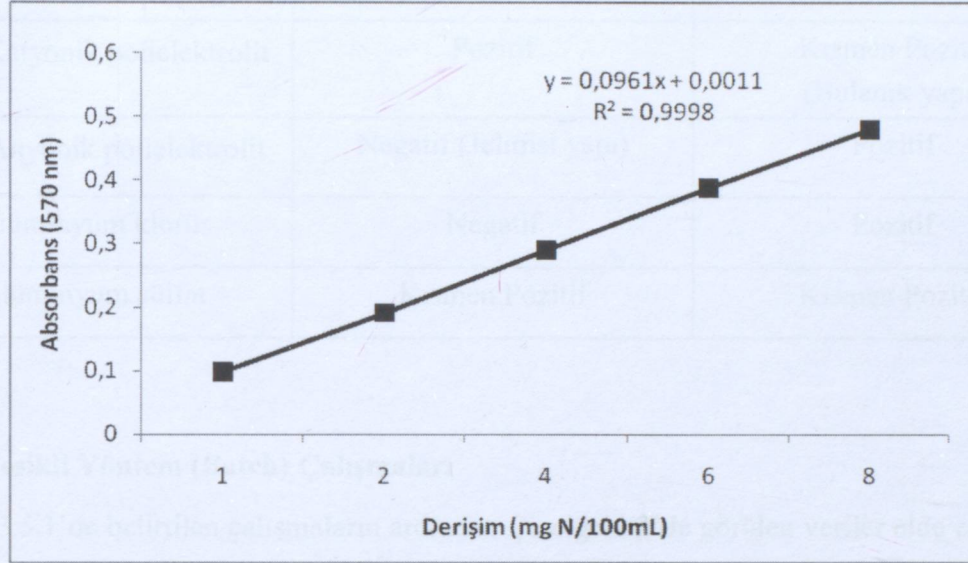
3.5.11 İstatistiksel Değerlendirme

Klasik yöntem ile bulunan maya kuvveti ile, k değerleri kullanılarak bulunan maya kuvveti değerleri karşılaştırıldı. Sonuçlar Bölüm 4.13'de gösterilmektedir.

4. SONUÇLAR

4.1 Standart Eğri Hazırlama

Şekil 4.1'de görüldüğü gibi lōsin kullanılarak standart eğri hazırlanmış ve devam eden çalışmalar sırasında, bu eğri yardımı ile absorbans değerlerinden derişim değerlerine geçilmiştir.



Şekil 4.1 Standart eğri

4.2 Harding ve MacLean's (Ninhidrin) Yönteminin Uygulamaları

Bölüm 3.4'de belirtildiği gibi oluşan bulanık yapıyı giderebilmek amacı ile Çizelge 4.1'de görülen maddeler ile çeşitli denemeler yapıldı. Bu çalışmalar incelendiğinde, hiçbir maddenin tam anlamı ile oluşan bulanıklığı gideremediği anlaşılmaktadır. Sadece alüminyum sülfat ile bir seri çalışma denenmiş ancak ninhidrin yöntemi uygulandığında, çözeltinin alt kısmında meydana gelen tortuların yine mor renk aldığı ve spektrofotometrik ölçümler sırasında metodolojik hataya neden olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle başka bir yöntem araştırılmış ve Amberlite IRC86 zayıf asidik katyon değiştirici reçine kullanılarak yapılan çalışmalara geçilmiştir. Zayıf asidik katyon değiştirici reçine kullanılması ile elde edilen olumlu sonuçlar nedeni ile durultma amacı ile polielektrolitle yapılabilecek diğer çalışmalara gerek kalmamıştır.

Çizelge 4.1 Farklı maddelerin çöktürme amacı ile denenmesi

Eklenen Madde	Durulma İşleminin Gerçekleşip Gerçekleşmediği	
	Sade Süt	Mayalı Süt
Alüminyum hidroksit	Negatif	Negatif
% 1 Katyonik polielektrolit	Pozitif	Kısmen Pozitif (Bulanık yapı)
% 1 Anyonik polielektrolit	Negatif (Jelimsi yapı)	Pozitif
Alüminyum klorür	Negatif	Pozitif
Alüminyum sülfat	Kısmen Pozitif	Kısmen Pozitif

4.3 Kesikli Yöntem (Batch) Çalışmaları

Bölüm 3.5.1’de belirtilen çalışmaların ardından Çizelge 4.2’de görülen veriler elde edilmiştir. Süt + maya pıhtılaşma sonrası azot derişimi ile sade sütün azot değerleri arasında anlamlı bir fark olduğu görülmektedir. Ayrıca, elde edilen mor çözeltilerde, hem sade sütte, hem de pıhtılaşmış sütte hataya neden olabilecek herhangi bir tortuya rastlanmamıştır.

Çizelge 4.2 Kesikli yöntem ile reçine çalışmaları

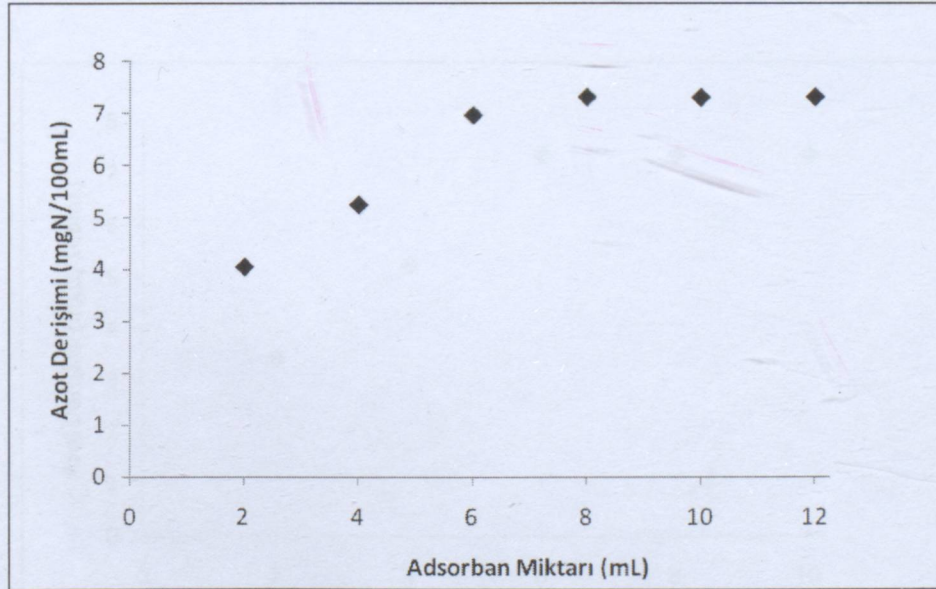
Deney No	Sade Süt Azot Derişimi (mgN/100mL)	Süt + Maya Azot Derişimi (mgN/100mL)
1	1,22	7,65
2	1,32	7,15
3	1,30	7,18
4	1,25	6,82
5	1,24	7,63
X _{ort}	1,27	7,20
S	0,04	0,35

4.4 Amberlite IRC86 Miktarının Belirlenmesi

Sütün maya etkisi ile pıhtılaşmasının ardından, açığa çıkan amin grubu azotunun tutulması için yeterli olan reçine miktarının belirlenebilmesi amacı ile, Bölüm 3.5.2’de anlatıldığı şekilde çalışmalar yapıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3’de görülmektedir. Şekil 4.2’den de anlaşıldığı gibi, 20 mL süt + 2 mL % 0,5’lik peynir mayası çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilen maya aktivitesi tayini işlemi sırasında açığa çıkan $R-NH_3^+$ grubunun tutulabilmesi için gereken Amberlite IRC86 miktarının, 8 mL suda şişirilmiş reçine olarak belirlendiği anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.3 Amberlite IRC86 miktarının belirlenmesi

Reçine Miktarı (mL)	Azot Derişimi (mgN/100mL)				X_{ort}
	deney no 1	deney no 2	deney no 3	deney no 4	
2	4,10	3,98	4,15	4,01	4,06
4	5,24	5,30	5,24	5,20	5,25
6	6,92	6,98	7,00	6,92	6,96
8	7,31	7,31	7,29	7,30	7,30
10	7,29	7,29	7,30	7,30	7,30
12	7,31	7,30	7,30	7,31	7,31



Şekil 4.2 Amberlite IRC86 miktarının belirlenmesi

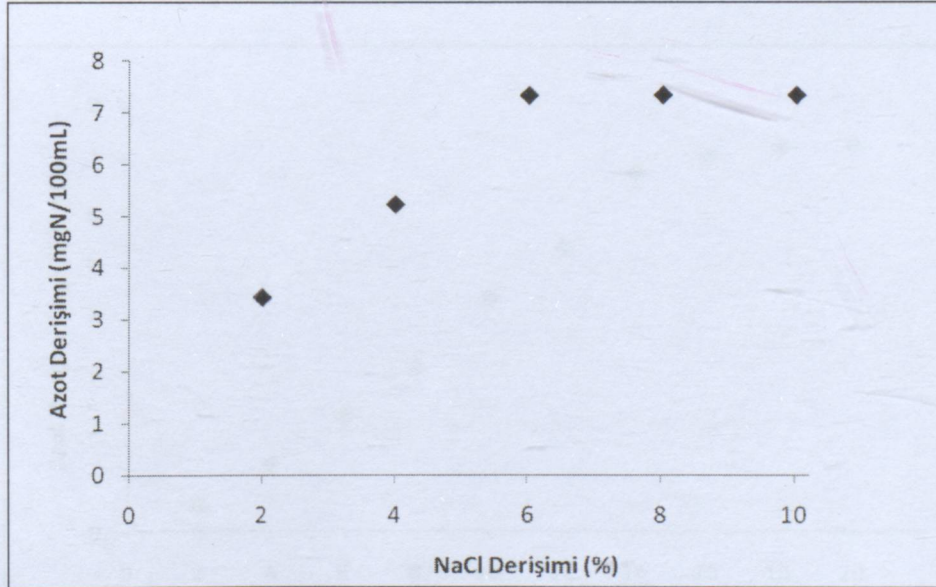
4.5 Elusyon Çözeltisi Derişiminin ve Hacminin Bulunması

Amberlite IRC86 reçine üzerinde tutulmuş olan $R-NH_3^+$ grubunun geri kazanımı için gerekli NaCl çözeltisi derişiminin ve hacminin saptanabilmesi amacı ile Bölüm 3.5.3'de anlatıldığı şekilde çalışmalar yapıldı. Çizelge 4.4'de NaCl çözeltisinin derişimine; Çizelge 4.5'de ise NaCl çözeltisinin hacmine ilişkin elde edilmiş olan veriler görölmektedir.

Şekil 4.3'deki verilerden geri kazanım için en uygun NaCl derişiminin % 6'lık NaCl derişimi olduğu; Şekil 4.4'den ise % 6'lık NaCl'ün 20 mL'sinin geri kazanım için yeterli olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.4 Elusyon için gereken NaCl çözeltisi derişiminin bulunması

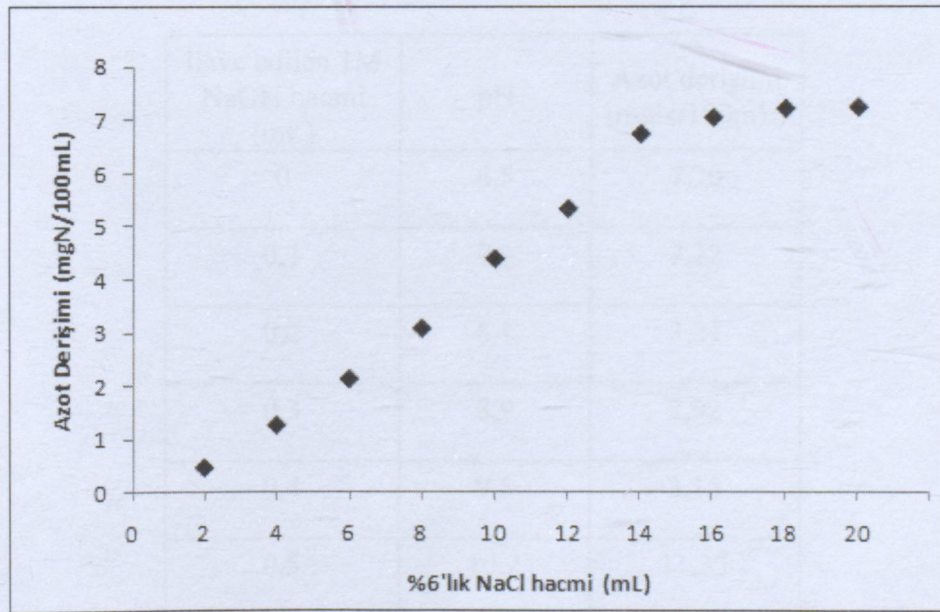
NaCl Derişimi (%)	Azot Derişimi (mgN/100mL)				X_{ort}
	deney no 1	deney no 2	deney no 3	deney no 4	
2	3,43	3,43	3,40	3,43	3,42
4	5,23	5,24	5,37	5,03	5,22
6	7,33	7,32	7,33	7,32	7,32
8	7,33	7,32	7,33	7,32	7,32
10	7,31	7,32	7,33	7,31	7,32



Şekil 4.3 Elusyon çözeltisi derişiminin incelenmesi

Çizelge 4.5 Elusyon için gereken %6'lık NaCl çözeltisi hacminin bulunması

%6'lık NaCl Hacmi (mL)	Azot Derişimi Ortalama (mgN/100mL)
2	0,45
4	1,25
6	2,12
8	3,07
10	4,38
12	5,32
14	6,73
16	7,04
18	7,21
20	7,23



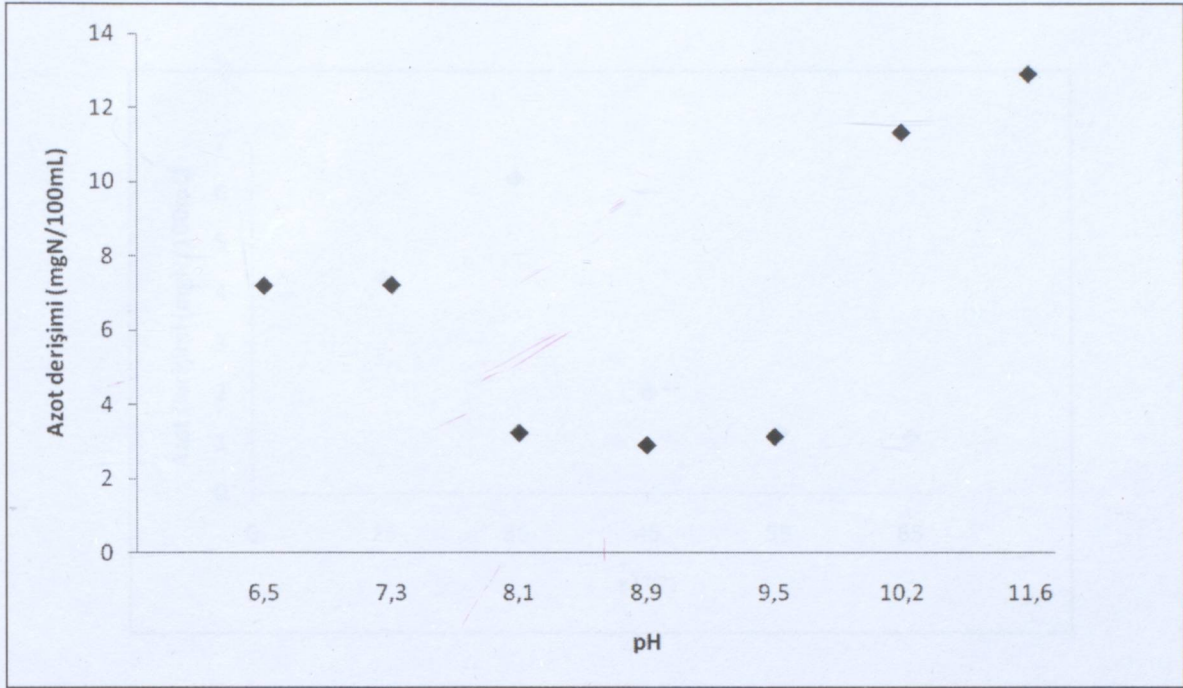
Şekil 4.4 Elusyon çözeltisi hacminin icelenmesi

4.6 Pıhtılaşma İşleminin Durdurulması

Pıhtılaşma işleminin, farklı aşamalarında durdurulabilmesini sağlayabilmek amacı ile NaOH ilavesi ile gerçekleştirilen farklı pH çalışmalarının sonuçları Çizelge 4.6'da gösterilmektedir. Şekil 4.5'den de anlaşıldığı gibi pH=6,5 olan örneğe hiç NaOH ilave edilmemiştir. Süt + maya karışımının doğal pH değeri olan pH=6,5 değerinde açığa çıkan azot derişimi 7,198 mgN/100mL şeklindedir. Ardından farklı hacimlerde ilave edilen NaOH çözeltisinin etkisi ile pH=7,3'den pH=11,6'a kadar değişen değerler elde edilmiştir. Şekil 5.5'de görüldüğü gibi pH=7,3'de yine azot değeri 7,245 mgN/100mL derişime ulaşarak pıhtılaşma işleminin durdurulamadığı anlaşılmıştır. pH=8,1 ila pH=9,5 aralığında ise azot değeri ortalama 3,1 mgN/100 mL civarında sabit kalmıştır. pH=10,2 ve pH=11,6 olarak gerçekleştirilen çalışmalarda ise maya etkisi ile süt içinde bulunan k-kazeinin parçalanmasının yanı sıra, sütün diğer proteinlerinin de parçalandığı ve bu nedenle azot değeri artışının fazla olduğu görülmektedir. Bu nedenle pıhtılaşmayı durdurabilecek en uygun pH aralığının pH=8,1 ile pH=9,5 arasında olduğu anlaşılmıştır. Devam eden çalışmalarda 0,4 mL, 1 M NaOH çözeltisi 20 mL süt + 2 mL maya karışımlarına ilave edilerek pıhtılaşma işlemi istenilen aşamalarda durdurulabilmiştir.

Çizelge 4.6 Pıhtılaşma işlemi ile pH değışimi arasındaki ilişki

İlave edilen 1M NaOH hacmi (mL)	pH	Azot derişimi (mgN/100mL)
0	6,5	7,20
0,1	7,3	7,22
0,2	8,1	3,24
0,3	8,9	2,92
0,4	9,5	3,15
0,5	10,2	11,33
0,6	11,6	12,90



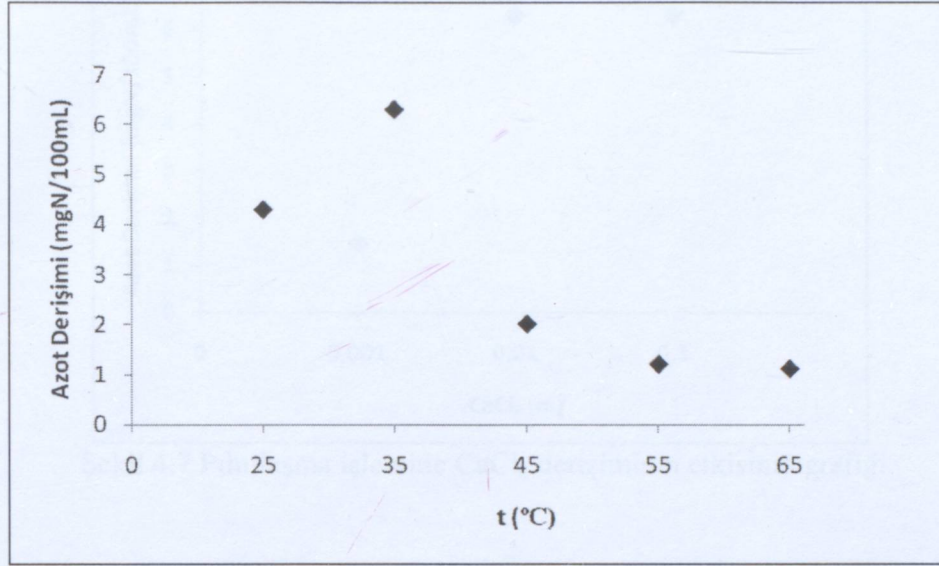
Şekil 4.5 pH'ya göre süzüntünün azot derişimi

4.7 Pıhtılaşma İşlemine Sıcaklığın Etkisi

Süt + maya karışımında pıhtı oluşumu ile açığa çıkan amin grubu azotunun değişimine sıcaklığın etkisini inceleyebilmek amacı ile Bölüm 3.5.5'de belirtilen çalışmalar yapıldı. Çizelge 4.7'de elde edilen değerlerden de görüldüğu gibi, enzimatik olarak gerçekleşen bir reaksiyon olan pıhtılaşma işlemi, ortam sıcaklığı $35 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2$ 'nin üzerine çıkınca enzim aktivitesinin bozulmasından dolayı, $35 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2$ 'nin altındaki değerlerde ise reaksiyon yavaş ilerlediğu için, pıhtılaşma işlemi henüz tamamlanamamış ve bu nedenle de amin azotu derişimi maksimum değere ulaşamamıştır (Şekil 4.6). İdeal alışma sıcaklığı $35 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2$ olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.7 Pıhtılaşma işlemine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık ($^{\circ}\text{C} \pm 0,2$)	Derişim (mgN/100mL)				X _{ort}
	deney no 1	deney no 2	deney no 3	deney no 4	
25	4,30	4,30	4,31	4,31	4,30
35	6,31	6,31	6,30	6,30	6,30
45	2,00	2,01	2,02	2,02	2,01
55	1,20	1,21	1,20	1,21	1,21
65	1,11	1,12	1,12	1,12	1,12



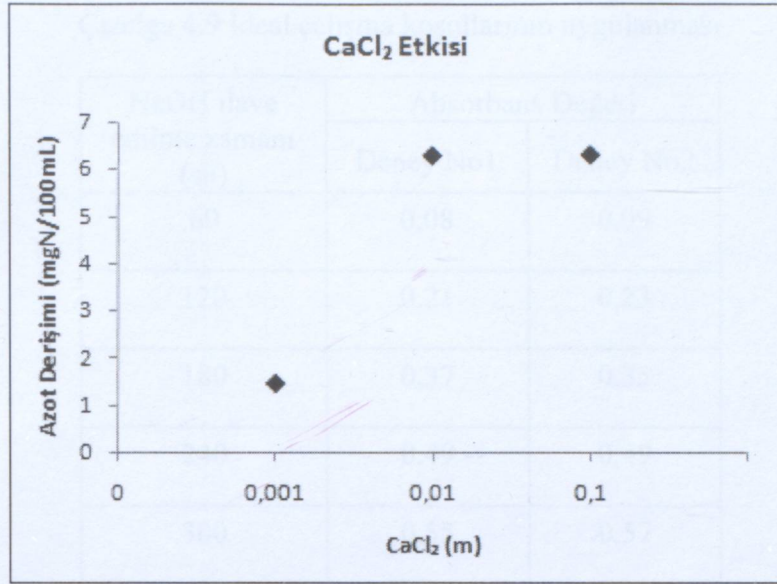
Şekil 4.6 Pıhtılaşıma işlemine sıcaklık etkisinin grafiği

4.8 Pıhtılaşıma İşlemine CaCl_2 Derişiminin Etkisi

Pıhtılaşıma işlemine CaCl_2 çözeltisi derişiminin etkisinin incelenebilmesi için Bölüm 3.5.6'da belirtilen denemeler yapıldı ve Çizelge 4.8'deki değerler elde edildi. Şekil 4.7'de de görüldüğü gibi 0,001 M CaCl_2 'ün kullanıldığı çözeltide, pıhtı oluşumu ve dolayısı ile azot artışı gözlenememiştir. 0,1 M CaCl_2 'ün kullanıldığı çalışmalarda ise maya katıldığı anda, hemen çökme ve azot artışı gerçekleşmiştir. Bu nedenle yine 0,01 M CaCl_2 çözeltisinin kullanıldığı sonuç hem pıhtılaşıma süresi hem de azot derişimi açısından en uygun değer olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.8 Pıhtılaşıma işlemine CaCl_2 derişiminin etkisi

CaCl_2 (M)	Derişim (mgN/100mL)				X_{ort}
	deney no 1	deney no 2	deney no 3	deney no 4	
0,1	6,30	6,32	6,31	6,32	6,31
0,01	6,30	6,30	6,29	6,31	6,30
0,001	1,43	1,46	1,45	1,44	1,44



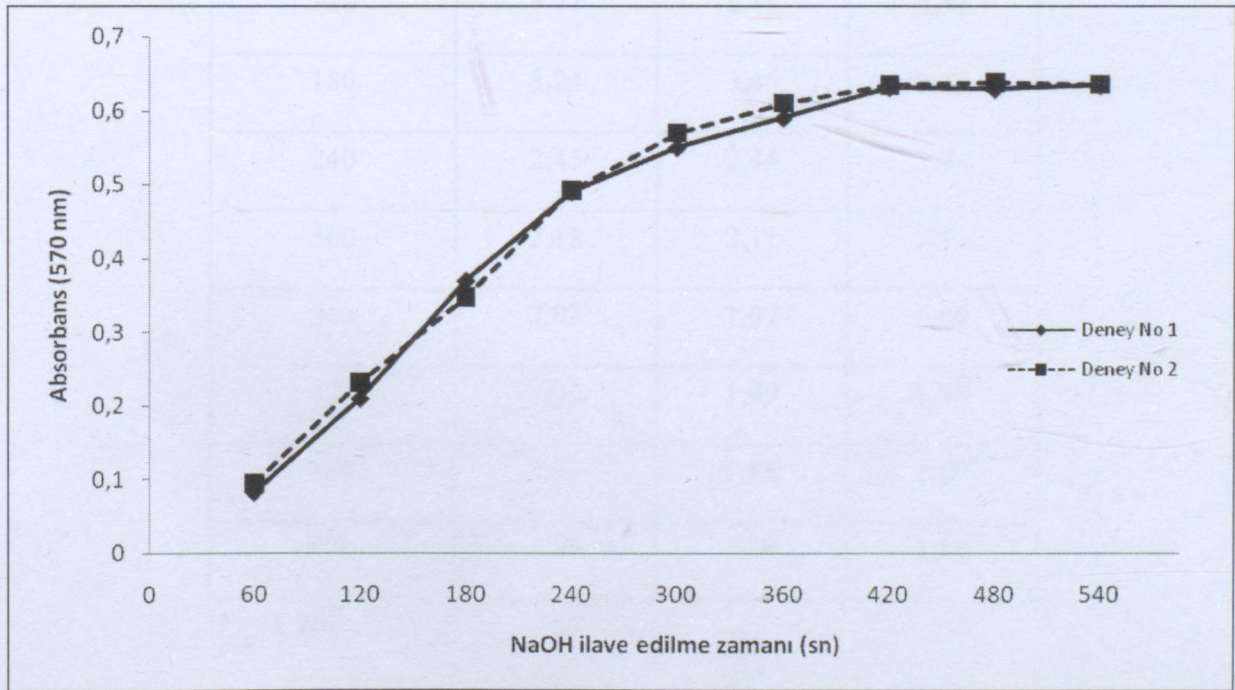
Şekil 4.7 Pıhtılaşıma işlemine CaCl₂ derişiminin etkisinin grafiğı

4.9 İdeal Çalışma Koşullarının Uygulanması

Bölüm 3.5.7’de belirtilen çalışmaların ardından elde edilen, Çizelge 4.9’da yer alan koyu renkli değerler pıhtılaşıma sonrası yapıya ait maksimum absorbands değerleridir. Şekil 4.8’de de görüldüğü gibi pıhtılaşıma noktasına yaklaşılrken azot değerinde bir artış olduğu görülmektedir. Literatür verileri ile uyumlu bir şekilde değışim gösteren azot miktarı, pıhtılaşıma sonrasında sabit bir değere ulaşmaktadır.

Çizelge 4.9 İdeal çalışma koşullarının uygulanması

NaOH ilave edilme zamanı (sn)	Absorbans Değeri	
	Deney No1	Deney No2
60	0,08	0,09
120	0,21	0,23
180	0,37	0,35
240	0,49	0,49
300	0,55	0,57
360	0,59	0,61
420	0,63	0,63
480	0,63	0,64
540	0,63	0,64



Şekil 4.8 Mayalanma süresi

4.10 Geliştirilen Yöntemin k Değerlerinin Hesaplanması

Bölüm 3.5.8’de belirtildiği gibi farklı zaman dilimlerinde absorbands değerleri elde edilen süt+maya karışımları ile, kullanılan mayanın gerçek kuvveti olarak belirtilen 12000 rakamı arasında eşitlik kurularak k değerleri denklem 4.1’deki gibi hesaplandı. Bulunan k değerleri Çizelge 4.10’da ve Şekil 4.9’da gösterilmektedir. Çizelge 5.10 ve Şekil 4.9’da belirtilen “süre” ifadesi süte maya katıldığı an ile sodyum hidroksit ilave edildiği an arasında geçen zamanın saniye cinsinden değerini belirtmektedir.

$$MK = A \times k \quad (4.1)$$

MK: Maya Kuvveti

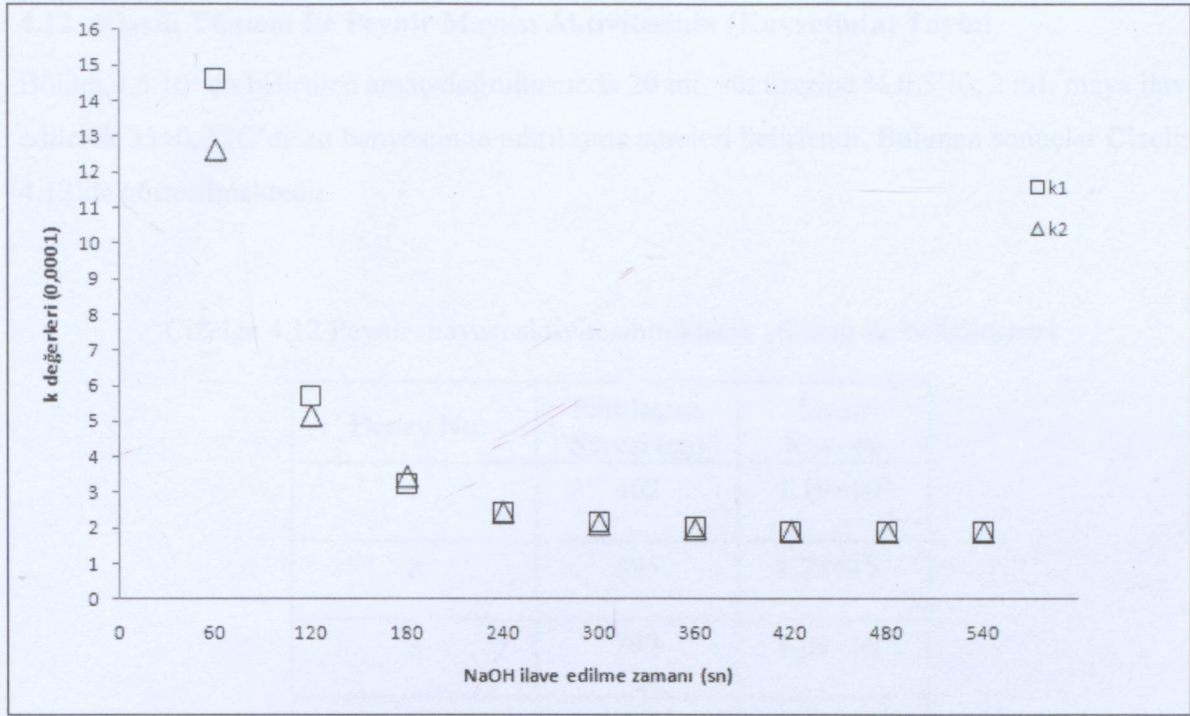
A : Absorbans değeri (570 nm)

k : Faktör

Çizelge 4.10 Hesaplanan k değerleri

NaOH ilave edilme zamanı (sn)	k ₁ *	k ₂ *	k _{ort} *
60	14,63	12,63	13,63
120	5,71	5,15	5,43
180	3,24	3,45	3,35
240	2,45	2,44	2,44
300	2,18	2,11	2,14
360	2,03	1,97	2,00
420	1,90	1,89	1,90
480	1,91	1,88	1,90
520	1,89	1,89	1,89

* x 10⁻⁴



Şekil 4.9 k değerlerinin mayalanma süresi ile değişimi

4.11 Spektrofotometrik Yöntem İle Peynir Mayası Aktivitesinin (Kuvvetinin) Tayini

İdeal çalışma koşulları sağlanarak, maya kuvveti 1/12000 olan maya eşliğinde bir seri absorbans ölçümü yapıldı. Pıhtılaşma işleminin NaOH ilavesi ile durdurulduğu zaman ile değişen azot derişimine ait absorbans değerleri Çizelge 4.11’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.11 Aktivitesi 12000 olan maya eşliğinde gerçekleştirilen çalışmalar

Deney No	NaOH ilave edilme zamanı (sn)	Absorbans değeri (570 nm)	k değeri ($\times 10^{-4}$)	Hesaplanan Maya Kuvveti
1	120	0,22	5,43	$1,20 \times 10^4$
2	180	0,36	3,35	$1,21 \times 10^4$
3	240	0,49	2,44	$1,19 \times 10^4$
4	300	0,56	2,14	$1,21 \times 10^4$
5	360	0,60	2,00	$1,20 \times 10^4$

4.12 Klasik Yöntem İle Peynir Mayası Aktivitesinin (Kuvvetinin) Tayini

Bölüm 3.5.10' da belirtilen amaç doğrultusunda 20 mL süt üzerine % 0,5'lik 2 mL maya ilave edilerek $35\pm0,2$ °C'de su banyosunda pıhtılaşma süreleri belirlendi. Bulunan sonuçlar Çizelge 4.12'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.12 Peynir mayası aktivitesinin klasik yöntem ile belirlenmesi

Deney No	Pıhtılaşma Süresi (sn)	Maya Kuvveti
1	402	$1,19\times10^4$
2	393	$1,22\times10^4$
3	397	$1,09\times10^4$
4	400	$1,20\times10^4$
5	404	$1,19\times10^4$

4.13 İstatistiksel Değerlendirme

Bölüm 3.5.11'de belirtildiği gibi klasik yöntem kullanılarak bulunan maya aktivitesi değerleri ile, k sayıları kullanılarak, denklem 4.1 yardımı ile bulunan maya aktivitesi değerleri istatistiksel açıdan değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre iki yöntem arasında F ve t testine göre anlamlı fark yoktur.

Çizelge 4.13 İki yöntemin istatistiksel değerlendirmesi

Deney No	Klasik yöntem ile bulunan maya kuvveti	Yeni yöntem ile bulunan maya kuvveti
1	$1,19 \times 10^4$	$1,21 \times 10^4$
2	$1,22 \times 10^4$	$1,21 \times 10^4$
3	$1,21 \times 10^4$	$1,19 \times 10^4$
4	$1,20 \times 10^4$	$1,21 \times 10^4$
5	$1,19 \times 10^4$	$1,20 \times 10^4$
X_{ort}	$1,20 \times 10^4$	$1,20 \times 10^4$
S	$0,13 \times 10^3$	$0,07 \times 10^3$
$X_{\text{ort}} \pm t \cdot S / \sqrt{n}$	$1,19 \times 10^4 - 1,22 \times 10^4$	$1,19 \times 10^4 - 1,21 \times 10^4$
t testi	$0,18 < 2,31$	
F_{testi}	$3,89 < 6,39$	
$n_1 = n_2 = 5$	$F_{4,4}^{0,05} (\text{tablo}) = 6,39$	$t_8^{0,05} (\text{tablo}) = 2,31$

5. DEĞERLENDİRME

Türkiye’de ve Dünya’da standart olarak kabul edilen, peynir mayası aktivitesinin (kuvvetinin) tayini işleminin temeli, literatürde yer alan Berridge yöntemine dayanmaktadır. Bu yöntemde ise hataya neden olabilecek görsel faktörlerin bulunduğunu ilgili bölümlerde açıklanmıştır. Ayrıca pıhtılaşma işlemi sırasında azot değerindeki değişim literatür verilerinde çoğunlukla Kjeldahl Yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

Oysa bu çalışma da, Şekil 2.8’de görülen kazeinomakropeptid bileşiği, yapısında yer alan $R-NH_3^+$ grubu vasıtası ile zayıf asidik katyon değiştirici reçine kolonunda alıkonulmuştur. Aynı şekilde sütte bulunan protein zincirinin en ucundaki tersiyer amin grupları da iyon değiştiricide tutulacaktır. Bu nedenle referans olarak süt kullanılmış ve aynı işlem süte de uygulanmıştır. Çizelge 4.10’de yer alan k_{ort} değerleri kullanılarak denklem 3.1 yardımı ile spektrofotometrik yöntem ile peynir mayası aktivitesi tayin edilebilmiştir. Yine klasik yöntem kullanılarak peynir mayası aktivitesi tayin edilmiş ve bulunan sonuçlar Çizelge 4.13’de yer aldığı gibi F ve t testine göre değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuca göre klasik yöntem ile geliştirilen maya kuvveti tayin yöntemi arasında anlamlı fark olmadığı anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.10 yardımı ile k değeri bulunamadığı takdirde maya kuvveti denklem 5.1 yardımı ile de hesaplanabilir.

$$MK = (A_0 - A_s) \times 10^{(2,6645 - 0,9395 \log t)} \quad 5.1$$

MK : Maya kuvveti

A_0 : Örneğin absorbans değeri (570 nm)

A_s : Sütün absorbans değeri (570 nm)

t : süre (sn); süte maya katıldığı an ile sodyum hidroksit ilave edildiği zamana kadar geçen süre

Bu matematiksel ifade deneysel verilerden modelleme ile çıkarılmıştır ve mayalanma süresinin 120 sn ile 420 sn arasında kalması koşulu ile kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Alais, C., Mocquot, G., Nitschmann, H. ve Zahlep, P., (1953), *Helv. Chim. Acta*, 36, 1955.
- Anema, G., S., Lee, S., K. ve Klostermeyer, H., (2007), "Effect of pH at Heat Treatment on the Hydrolysis of casein and the Gelation of Skim Milk by Chymosin", *Swiss Society of Food Science and Technology*, 40, 99-106.
- Armstrong, C.E., Mackinlay, A.G., Hill, R.J. ve Wake, R.G., (1967), "Fractional of s-carboxymethyl-k-casein and characterization of components", *Biochim. Biophys. Acta*, 140, 123.
- Atacı, N., (2001), "Mucor Miehei Rennetin ve Mucor Miehei Rennet-Dekstran Konjugatlarının Spektrofluorometrik Yöntemle İncelenmesi", Yıldız Teknik Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.
- Berridge, N.J., (1954), *Adv. Enzymol.* 15, 423.
- Beyenal, H., Şeker, Ş., Ayhan, F. ve Tanyolaç, A., (1999), "Sürekli Sistem Fermentörde Mikrobiyal Rennin Üretimi ve Aktivitelerin Modellenmesi", *Tr.J. of Engineering and Environmental Science*, 23, 83-91.
- Carlson, A., Hill, C., G. Ve Olson, N., (1987), "Kinetics of Milk Coagulation: I. The Kinetics of Kappa Casein Hydrolysis in the Presence of Enzyme Deactivation", *Biotechnology and Bioengineering*, XXIX, 582-589.
- Castle, A.V. ve Wheelock, J.V., (1972), "Effect of Varying Enzyme Concentration on the Action of Rennin on Whole Milk", *J. Dairy Res.*, 39, 15.
- Chaplin, B. ve Green, M.L., (1980), "Determination of the proportion of k-casein hydrolysed by rennet on coagulation of skim-milk", *Jour. of Dairy Research*, 47, 351-358.
- Çetin, H., (2007), "Süt Teknolojisi Ders Nnotları", Kocaeli Üniversitesi, İhsaniye Meslek Yüksek Okulu.
- D.T.M., Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı, Süt Ve Süt Mamulleri Sektör Raporu, Nisan 2008.
- Dönmez, S. ve Özçelik, F., (1986), "Mucor Miehei'den Rennet Üretiminde Bazı Azotlu Katkı Maddelerinin Enzim Üretimine Etkisi Üzerinde Bir Araştırma", *Gıda*, Yıl.11, Sayı.2, Mart-Nisan, 67-73.
- Eralp, M.; (1974), "Peynir Teknolojisi", Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara Üniversitesi Basımevi, 533, Ders Kitabı, 178.
- Galen, W.E., (1969), *Instrumental Methods of Chemical Analysis*, Third edition, Kogakusha Company, LTD., Tokyo.
- Gill, J. ve Saunders, T., (1987), "Rennin-a Neglected Enzyme?", *Journal of Biological Education* 21, (4) 248-250.
- Harding V.J. ve MacLean., R.M., (1915), "A colorimetric method for estimation of amino-acid α -nitrogen.II", *The Journal of Biological Chemistry*, January 14.
- Jenness, R. ve Patton, S., (1959), "Constituents of Milk", *Principles of Dairy Chemistry*, John Wiley, p3.
- Kamizake, N.K.K., Gonçalves, M.M., Zaia, T.B.V.C. ve Zaia, A.M.D., (2003), "determination of total proteins in coc milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods", *Jour. of Food Composition and Analysis*, 16, 507-516.

- Larsson, K.I., Andren, A., Geurts, J.T., Roos, L.A. ve Walstra, P., (1996), "Association of chymosin with artificial casein micelles as influenced by micelle composition and pH", *Int. Dairy Journal*, 7, 43-46.
- Lee, H.J., Olson, N.F. ve Richardson, T., (1977), "Peptide Release from Milk During Treatment with Immobilized Pepsin and Totality of Clotting of Treated Milk", *J. Dairy Sci.*, 60, 1683-1688.
- Leroy, S.P., (1924), "The chemistry of Milk and Dairy Products Viewed from a Colloidal Standpoint", *Industrial and Engineering Chemistry*, 16:6.
- Madden, D., (1991), "Milk-Coagulating Enzymes by Accident and Design", *NCBE Newsletter*, Summer, 1-5.
- Schafer, H.H. ve Matsen, H., (1935), "The Relation of Mastitis to Rennet Coagulability and Curd Strength of Milk", *J. Dairy Sci.* 18:741.
- Süt ve süt Ürünleri, Düzey 2 Bölgeleri Kalkınma Programı Raporu, Kasım 2007.
- TEAE, Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü-Bakış, Sayı 1, Nüsha 11, Aralık 2002.
- TEAE, Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü-Bakış, Sayı 9, Nüsha 13, Haziran 2007.
- Turhan, M. ve Mutlu, M., (1988), "Kinetics of k-casein/immobilized Chymosin Hydrolysis", *Enzyme and Microbial Technology*, 22: 342 – 347.
- Türk Standartları Enstitüsü (TSE), (1996), "Peynir Mayası", TS 3844, Nisan.
- Uraz, T., Koçak, C. ve Alpar, O., "Beyaz Peynir Yapımında Peynir Mayası, Sütü Mayalama Sıcaklığı ve Pıhtılaşma Süresinin Önemi", *Beyaz Peynir Sempozyumu*, Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Süt Teknolojisi Anabilimdalı, 22-23 Aralık.
- Van, S., (1914), "Condition of Casein and Salts in Milk", *N.Y.Agr. Expt. Sta., Tech. Bull.*, 39,8.
- Varley, H., (1954), *Practical Clinical Biochemistry*, p.137. London: Heinemann.
- Wheelock, J.V. ve Penney, J. P., (1972), "The Role of the Primary Phase of Rennin Action in the Coagulation of Cow's Milk", *J. Dairy Res.*, 39,23.
- Waugh, D.F. ve Von Hippel, P. H., (1956), *J. Am. Chem. Soc.* 78,4576.

ÖZGEÇMİŞ

Doğum Tarihi	28.07.1975	
Doğum Yeri	İstanbul	
Lise	1989-1992	İstanbul Şehremini Lisesi
Lisans	1993-1998	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Yüksek Lisans	2000-2002	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı
Doktora	2002-	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programı
Çalıştığı Kurumlar	1998-2000	Kızılay Dispanseri Biyokimya Lab. Sorumlusu
	2000-Devam ediyor	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Araştırma Görevlisi