

**FARKLI ORİJİNDEN SÜTLERİN RENNİTLENME
KİNİTİKLERİNİN YÜZEY HİDROFOBİSİTESİ
YAKLAŞIMIYLA İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF RENNETING KINETICS OF
MILKS FROM DIFFERENT ORIGINS: A SURFACE
HYDROPHOBICITY APPROACH**

SEDA YILDIRIM

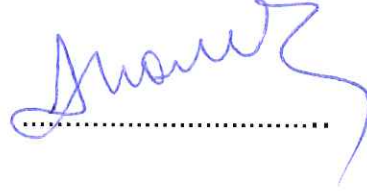
PROF. DR. YAŞAR KEMAL ERDEM
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
GIDA Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2014

SEDA YILDIRIM' in hazırladığı "**Farklı Orijinden Sütlerin Rennetlenme Kinetiklerinin Yüzey Hidrofobisitesi Yaklaşımıyla İncelenmesi**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'** nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr., Metin ATAMER
Başkan



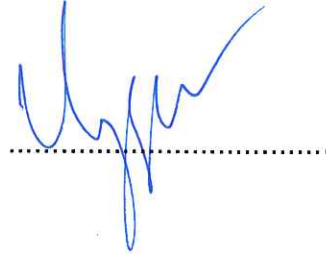
Prof. Dr., Yaşar Kemal ERDEM
Danışman



Prof. Dr., Vural GÖKMEN
Üye



Prof.Dr., Ümran UYGUN
Üye



Doç.Dr., Ali TOPÇU
Üye



Bu tez **HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ** tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof.Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallara uygun olarak elde ettiğimi
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

12/06/2014



Seda Yıldırım

ÖZET

FARKLI ORİJİNDEN SÜTLERİN RENNİTLENME KİNİTİKLERİNİN YÜZEY HİDROFOBİSİTESİ YAKLAŞIMIYLA İNCELENMESİ

SEDA YILDIRIM

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yaşar Kemal ERDEM

Haziran 2013, 70 Sayfa

Bu çalışmada farklı orijinden (inek, koyun, keçi ve manda) sütün rennetlenme kinetiklerindeki farklılıkların, protein yüzey hidrofobisitesi yaklaşımı ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak, öncelikle çiğ süt örneklerinin 8-anilinonaphthalene-1-sulfonic acid (ANS) ile titrasyonu sonucu süt proteinlerinin hidrofobisitesine ilişkin kinetik parametreler hesaplanmıştır. Yüzey hidrofobik kısımların sayısını temsil eden F_{max} değeri, en yüksek inek sütünde hesaplanmış; buna karşılık bağlanma sıklığının bir ifadesi olan $1/K_d$ değeri en yüksek manda sütünde gözlenmiştir. Koyun sütünün ise, incelenen türler arasında, en düşük yüzey hidrofobik kısım ve bağlanma afinitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Birim protein başına hidrofobik bağlanma ve bağ sıklığı kavramlarını temsil eden protein yüzey hidrofobisite indeksi (PYHI), en yüksek inek sütünde; en düşük ise koyun sütünde hesaplanmıştır. Çalışmanın esas amacına yönelik olarak, rennetlenme süreci boyunca belli zaman aralıklarıyla elde edilen presipitatlarda (floküle ve koagüle olan kısım) ANS ve protein dağılımı incelenmiş ve çizilen eğriler yardımıyla rennetlenme süreci iki aşamada yorumlanmıştır. Protein partitasyonu ve ANS partitasyonu eğrileri, rennetlenme sürecinde inek-koyun sütünleri ile keçi-manda sütünlerinin benzer eğilim gösterdiğini ortaya koymuştur. Rennetlenme süreci enzimatik faz ve flokülasyon fazı olarak iki aşamada incelendiğinde, her iki aşamanın da manda sütünde oldukça belirgin biçimde daha hızlı tamamlandığı gözlenmiştir. Protein partitasyonu ile elde edilen parametrelerden, rennetlenmenin birinci aşamasını karakterize eden proteoliz süresi en kısa manda sütünde gözlenmiş ve onu sıra ile keçi,

koyun ve inek sütleri izlemiştir. Proteoliz süresinin türler arasındaki farklılığı önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Rennetlenmenin ikinci fazını karakterize eden sıkılaşma sresinde yine en hızlı floküle olan süt manda sütü olmuş, onu inek, keçi ve koyun sütleri izlemiştir. Rennetlenme süreci, zamana karşı elde edilen presipitatların ANS bağlama derişimindeki değişimden yola çıkılarak değerlendirildiğinde de; türler arasında pıhtılaşma süreci değişiminin, presipitatların protein derişimlerindeki değişim ile benzer olduğu ve oransal olarak sürecin benzer eğilim gösterdiği, ayrıca türler arası farkın da önemli olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Rennetlenme süreci bütün olarak değerlendirildiğinde, enzimatik fazın tamamlandığı ve flokülasyon fazının da tamamlanmaya yakın olduğu an, tüm sürecin %80'inin tamamlandığı an olarak değerlendirilmiştir. Tüm türlerde sürecin %80'i tamamlandığında, protein bağlanmalarının yarıdan fazla (~%60) tamamlandığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Koaglasyon, st, inek, koyun, keçi, manda, yüzey hidrofobisitesi, ANS, rennetlenme kinetiği

ABSTRACT

INVESTIGATION OF RENNETING KINETICS OF MILKS FROM DIFFERENT ORIGINS: A SURFACE HYDROPHOBICITY APPROACH

SEDA YILDIRIM

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Yaşar Kemal ERDEM

June 2014, 70Pages

The objective of this study is to investigate the differences in renneting kinetics of milks from different origins including bovine, ovine, caprine and buffalo via surface hydrophobicity approach. Raw milk samples from different origins were firstly titrated with 8 anilinonaphthalene-1-sulfonic acid (ANS) in order to calculate the kinetic parameters concerning protein hydrophobicity of milk samples. F_{max} values, representing both the maximum fluorescence that could be attained at the given conditions and also the maximum number of surface sites allowable for ANS to be bound, were found to be highest in cow milk. On the other hand, $1/K_d$ values, indicating the binding affinity of ANS to the milk proteins, were higher in buffalo milk. Ovine milk samples had the lowest number of hydrophobic surface sites and bonding affinity among the investigated samples. Protein surface hydrophobicity index (PSHI) which represents the average tightness of bonding ANS per protein, was found to be the highest for bovine milk and the lowest for ovine milk samples. ANS and protein partition were evaluated for the precipitates (flocculated and coagulated part) obtained by centrifuging the samples at certain intervals during renneting period. And the renneting period was interpreted via curves showing ANS and protein partition over time for different origins. Generally, protein partition and ANS partition curves showed similar trend between bovine-ovine and caprine-water buffalo milk samples. When renneting period discussed in two stages, namely enzymatic phase and flocculation phase, both two phases were completed distinctly fast for buffalo milk. According to the

parameters which were obtained by protein partition, water buffalo milk completed the enzymatic phase much more earlier and followed by caprine, ovine and bovine milk. The difference between required time for the first stage to be completed within different origins was significant ($p < 0,05$). Similarly, the second phase of renneting period was also found to be completed fast for buffalo milk and followed by bovine, caprine and ovine milk. The renneting curves (based on ANS titration) of milk samples from different origins was found to have similar differences with protein partition curves and the difference of renneting parameters between origins was statistically significant ($p < 0,05$). Furthermore, the time when 80% of renneting period completed ($t_{0.8}$), was thought to show that the first phase (enzymatic phase) was completed and the second phase was almost completed as well. The protein concentration at $t_{0.8}$ for all samples showed that more than 60% of protein-protein interactions was completed.

Keywords: Coagulation, milk, bovine, ovine, caprine, buffalo, surface hydrophobicity, ANS, renneting kinetics

TEŞEKKÜR

Tezimin tüm aşamalarında deneyim ve zamanını özverili bir biçimde benimle paylaşan, tecrübelerini aktarırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, değerli danışmanım Prof. Dr. Yaşar Kemal ERDEM' e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Spektrofluorimetrik ölçümlerin gerçekleştirilmesinde laboratuvarlarını kullanma olanağı sağlayan sayın Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI'ya ve yine UV-spektroskopisi ile analizlerimi yapmamı sağlayan sayın Prof. Dr. Vural GÖKMEN'e en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca sağladığı maddi destekten ötürü bursiyeri olduğum TÜBİTAK BİDEB'e teşekkür ederim.

Bu tezin yürütülmesinde her türlü çalışma olanağı sağlayan Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne ve tüm çalışanlarına içtenlikle teşekkür ederim. Özellikle bu çalışmanın yürütülmesinde desteklerini esirgemeyen, deneyim ve bilgilerini her zaman benimle paylaşan, Yrd. Doç. Dr. Ceyda DUDAK ŞEKER, Dr. Esra ERKUT ACAR, Araş. Gör. Tuğba Bulat, Yrd. Doç. Dr. Tuğrul MASATÇIOĞLU, Araş. Gör. Burçe ATAÇ MOĞOL'a ve dostluklarından güç aldığım, heyecanımı ve stresimi içtenlikle paylaşan, devamlı desteklerini gördüğüm sevgili arkadaşlarım Uzm. Meltem YILDIRIM ve Uzm. Yelda ZENCİR'e sevgiyle teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, yaşamım boyunca her zaman olduğu gibi tez çalışmam sırasında da gösterdikleri sonsuz sevgi, ilgi, sabır ve fedakarlıklarıyla bana güç veren canım aileme ve aileme beraber hayattaki en büyük şansım olarak gördüğüm; her zaman desteğini ve varlığını en derinden hissettiğim Canel ELİKOĞLU'na şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER	viii
ŞEKİLLER	ix
SİMGE VE KISALTMALAR	x
1.GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1. Sütün Genel Bileşimi	3
2.2. Türler Arası Bileşim Farklılıkları	4
2.3. Süt Proteinleri	7
2.4. Protein Yüzey Hidrofobisitesi.....	9
2.5. Türler Arası Protein Profili Farklılıkları	10
2.6. Sütün Rennetlenmesi	12
2.6.1. Sütün Rennetle Pıhtılaşma Mekanizması	14
2.6.1.1. Pıhtılaşmanın Birinci Aşaması (Enzimatik Faz)	15
2.6.1.2. Pıhtılaşmanın İkinci Aşaması (Agregasyon Fazı).....	17
2.6.2. Sütün Rennetle Pıhtılaşma Kinetiği	18
2.6.3.Türler Arası Pıhtılaşma Süreci Farklılıkları	22
3.MATERYAL VE METOT	24
3.1.Materyal	25
3.2.Metot	25
3.2.1.Toplam Kuru Madde İçeriğinin Belirlenmesi.....	25
3.2.2.Yağ İçeriğinin Belirlenmesi	25
3.2.3.Yağsız Kuru Madde İçeriğinin Belirlenmesi	25
3.2.4.Titrasyon Asitliğinin Belirlenmesi	25
3.2.5. Kül İçeriğinin Belirlenmesi	25
3.2.6. pH Değerinin Belirlenmesi	25

3.2.7. Protein İçeriğinin Belirlenmesi.....	26
3.2.8. Üre-PAGE yöntemi ile Protein Fraksiyonlarının Belirlenmesi.....	26
3.2.9. Protein Yüzey Hidrofobisitesi İndeksinin (PYHI) Belirlenmesi	26
3.2.10. ANS ve Protein Partitasyonu Belirlenmesi	27
3.2.11. Rennet ile Koagulasyon Denemesi	28
3.2.12. RP-HPLC ile Koagulasyonun İzlenmesi	29
3.2.13. İstatistiksel Değerlendirmeler.....	30
4. SONUÇLAR.....	31
4.1. Süt Örneklerinin Genel Bileşimi	31
4.2. Süt Örneklerinin Hidrofobisitesine İlişkin Bulgular.....	32
4.2.1. Süt Örneklerinin Protein Yüzey Hidrofobisitesi	32
4.2.2. Süt Örneklerinin Protein ve ANS Partitasyonu	34
4.2.3. Süt Örneklerinin Rennetlenme Sürecindeki Hidrofobisite Değişimi	36
4.3. Rennetlenme Sürecinde Protein Profilinde Kromatografik Olarak Ortaya Çıkan Değerişimler	40
4.4. Rennetlenme Sürecinde Protein Profilinde Gözlenen Elektroforetik Değerişimler	42
TARTIşMA	46
KAYNAKLAR	51
EKLER.....	58
ÖZGEÇMİş.....	70

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2. 1. İnek, koyun, keçi ve manda sütünün ortalama genel bileşimi.....	5
Çizelge 3. 1. RP-HPLC yönteminde kullanılan gradient program..	30
Çizelge 4. 1. Süt örneklerinin genel nitelikleri.....	31
Çizelge 4. 2. İnek, koyun, keçi ve manda sütlerinin ANS titrasyonu sonucu elde edilen floresans intensiteleri.....	32
Çizelge 4. 3. Örneklerin ANS titrasyonu verilerinden elde edilen kinetik parametreler.....	33
Çizelge 4. 4. İncelenen türlerin protein ve ANS partitasyonu	34
Çizelge 4. 5. Farklı orijinden sütlerin rennetlenme sürecinde presipitatların protein içeriğinden hesaplanan parametrik süreler.....	38
Çizelge 4. 6. Farklı orijinden sütlerin rennetlenme sürecinde presipitatların protein içeriğinden hesaplanan sürelerin toplam rennetlenme süresine oranı	38
Çizelge 4. 7. Farklı orijinden sütlerin rennetlenme sürecinde presipitatların ANS bağlama derişiminden hesaplanan parametrik süreler	39
Çizelge 4. 8. Farklı orijinden sütlerin rennetlenme sürecinde presipitatların ANS bağlama derişiminden hesaplanan sürelerin toplam rennetlenme süresine oranı	39
Çizelge 4. 9. Rennetlenme sürecinin tamamlanmaya yakın olduğu t0.8 anında presipitatların protein derişimi ve bağlanan ANS miktarı	40

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. Sütün enzimatik koagülasyonunun şematik gösterimi	15
Şekil 4.1. İnek, keçi, koyun ve manda sütlerinin ANS titrasyon eğrileri.....	34
Şekil 4.2. İnek, koyun, keçi ve manda sütünün protein partitasyonu (dağılımı)	35
Şekil 4.3. İnek, koyun, keçi ve manda sütünün ANS partitasyonu (dağılımı)	36
Şekil 4.4. Rennetlenme süresi boyunca farklı türlerden elde edilen presipitatlara bağlanan ANS derişimleri	37
Şekil 4.5. Rennetlenme süresi boyunca farklı türlerden elde edilen presipitatlardak protein derişimleri.....	37
Şekil 4.6. Rennetlenme süresi boyunca elde edilen presipitatlarda α -kazein konsantrasyonu değişimi	41
Şekil 4.7. Rennetlenme süresi boyunca elde edilen presipitatlarda β -kazein konsantrasyonu değişimi	42
Şekil 4.8. İzole inek süt proteinleri ve analiz edilen farklı tür süt örneklerine ait üre-PAGE elektroforetogramları.....	43
Şekil 4.9. İnek sütünün rennetlenme süreci boyunca protein profilindeki değişimi gösteren üre-PAGE elektroforetogramı	44
Şekil 4.10. Keçi sütünün rennetlenme süreci boyunca protein profilindeki değişimi gösteren üre-PAGE elektroforetogramı	44
Şekil 4.11. Koyun sütünün rennetlenme süreci boyunca protein profilindeki değişimi gösteren üre-PAGE elektroforetogramı	45
Şekil 4.12. Koyun sütünün rennetlenme süreci boyunca protein profilindeki değişimi gösteren üre-PAGE elektroforetogramı	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	alfa
β	beta
K	kapa
μ	mikro

Kısaltmalar

RP-HPLC	Ters Faz Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi
β -lg	Beta laktoglobülin
α - la	Alfa laktalbumin
CCP	Kolloidal Kalsiyum Fosfat
GMP	Glikomakropeptit
CMP	Kazeinmakrpeptit
GDL	Glukanodeltalakton
UV	Mor ötesi
A.O.Ç	Atatürk Orman Çiftliği
TFA	Trifloroasetik Asit
ANS	8-anilinonaphthalene-1-sulfonic acid
PS	Pıhtılaşma Süresi
SS	Sıkılaşma Süresi
RS	Toplam Rennetlenme Süresi
PYHİ	Protein yüzey hidrofobisite indeksi

1.GİRİŞ

Süt üretiminin önemli düzeylere ulaştığı birçok ülkede peynir üretimi, süt endüstrisi içinde en önemli payı almaktadır ve genellikle üretilen peynirlerin çoğunun sütün rennet ile pıhtılaştırılması esasına dayandığı gözlenmektedir [1].

Peynir üretiminin temeli olarak kabul edilen sütün rennet (enzim) ile pıhtılaşma süreci, elde edilen ürünün niteliklerini belirleyen en önemli etmenlerden biri olarak düşünülmektedir [2]. Sütün enzim ile pıhtılaşma aşamalarının (proteoliz ve agregasyon) izlenmesi, rennetlenme sürecinin belirlenmesinde önemli olduğu gibi, oluşan jelin basit yapısı ve reolojik özellikleri hakkında öngörülebilir bulunma olanağı da sağlamaktadır [3]. Bu nedenle sütün rennet ile koagülasyon süreci uzun yıllardır çeşitli çalışmalara konu olmuştur ve hala da araştırmacıların gündeminde yer almaya devam etmektedir [4].

Sütün rennetle koagülasyon sürecinin izlenmesinde, bu süreçte değişim gösteren viskozite, türbidite ya da reolojik özelliklerin değerlendirilmesine olanak sunan çeşitli ultrasonik, mekanik, termal ve optik analiz aygıtlarının kullanımı en yaygın yöntemlerdir [5].

Pıhtılaşma süreci proses şartlarına bağlı olmakla birlikte, farklı orijinden sütler arasında, hatta türler içindeki genetik farklılıklar nedeni ile değişim göstermektedir. İnek, koyun, keçi ve manda sütlerinin pıhtılaşma özelliklerinde gözlemlenen farklılıklarda; sütlerin genel bileşimindeki farklılıkların yanı sıra, özellikle peynir yapımında önemli role sahip olan kazeinin nicel ve nitel farklılıklarının önemli bir etmen olduğu düşünülmektedir [6].

Protein hidrofobisitesinin, proteinlerin moleküler yapılarının ve onların modifikasyonlarının kararlılığına etkisi üzerine yapılan çalışmalar sonucunda, özellikle yüzey hidrofobisitesinin proteinlerin fonksiyonel özellikleri üzerinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Sütte bulunan kazeinlerin yüzey hidrofobisitesinin, kazein misel yapısının oluşumunda

önemli rol oynadığı, kazein misellerinin yapısı ve pıhtılaşma kinetikleri hakkında bilgi verebileceği de düşünülmektedir [7, 8].

Bu tez çalışması kapsamında farklı orijinlerden süt örneklerinin protein yüzey hidrofobisiteleri arasındaki olası farklılıkların ve uygun modellerden elde edilen kinetik parametrelerin; inek, koyun, keçi ve manda sütü proteinlerinin rennetlenme nitelikleri arasındaki farklılıkları belirlemede yol gösterici olacağı düşüncesi üzerinde durulmuştur. Ayrıca protein ve ANS partitasyonu ile örneklerin floküle olma eğilimi ve bu durumda ANS bağlama miktarları arasındaki fark değerlendirilmiştir. Çalışmanın esas amacı olan farklı orijinden sütlerinin rennetlenme sürecindeki farklılıkları belirlemek amacıyla, koagülasyon sürecinde örneklerin floküle olma eğilimi protein partitasyonu ile; ANS bağlama eğilimi ise ANS partitasyonu ile belirlenmiş ve zamana karşı elde edilen grafiklerden yola çıkarak hesaplanan parametrik süreler ile rennetlenmenin birinci aşaması (proteoliz süresi) ve ikinci aşaması (sıkılaştırma süresi) farklı türler için karakterize edilmeye çalışılmıştır. Rennetlenme sürecinde, presipitatların protein profilindeki değişimler ise üre-PAGE yöntemi ile elektroforetik olarak; RP-HPLC ile de kromatografik olarak değerlendirilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Sütün Genel Bileşimi

Süt, 4000'den fazla memeli türü tarafından salgılanan, temel işlevi yeni doğanın beslenme gereksinimini karşılamak olan biyolojik bir sıvı olarak tanımlanmaktadır [9].Tüm dünyada süt üretimi 2011 yılında yaklaşık 706 milyon tona ulaşmıştır.Manda sütü dünyada toplam süt üretiminin %5'ini, keçi sütü %2.2'sini koyun sütü ise %1.3'ünü oluşturmaktadır [10].

Süt; karbonhidrat, yağ vb. temel bileşenlerinin yanı sıra %95' i protein formunda olmak üzere, 5.3 g / kg azot, ayrıca vitaminler, metal iyonlar ve aroma bileşikleri gibi yüzlerce minör bileşen içermektedir [11]. Sütte bulunan proteinler, kazeinler ve serum proteinleri olmak üzere iki ana gruptan oluşmaktadır.Sütün asit ile ya da enzim ile koagülasyonunda rol oynayan temel bileşen olan kazeinler, yoğurt ve peynir gibi süt ürünlerinin üretilmesinde kilit rol oynayan asal bileşenlerdir [9].Kazeinler genetik olarak birincil yapılarına göre α_{S1-} , α_{S2-} , $\beta-$ ve $\kappa -$ kazeinler olarak ayrılrsa da, tüm kazein türlerinin kendi içinde de varyantları bulunmaktadır. $\alpha-$ ve $\beta-$ kazeinler çözüner Ca^{++} varlığında presipite olma eğiliminde olan fosfoproteinlerdir. $\kappa-$ kazein ise Ca^{++} iyonlarına karşı dayanıklı olup, değişik oranlarda glikolize ve fosforilize olmuş formlarda bulunmaktadır [12].

Süt yağı fosfolipid ve proteinlerden oluşan bir zarla çevrili olup sütte bulunan diğer katı maddelerden daha düşük özgül ağırlığa sahip olması nedeniyle, sütün üst kısmında krema tabakası oluşturma eğilimindedir.Sütün bileşiminde birkaç çeşit şeker bulunsa da, en önemli grup bir disakkarit olan laktozdur. Sütün mineral madde içeriği ise %0,7- 0,8 arasında değişmekle birlikte kalsiyum ve fosfatniteliği ve niceliği, peynir yapım aşamasında pıhtı oluşumu ve oluşan pıhtının reolojik özelliklerini önemli ölçüde etkilemektedir [12, 13].

2.2. Türler Arası Bileşim Farklılıkları

Koyun ve keçi sütünden üretilen ürünler kendine özgü tat, aroma ve tekstürleri ile tüm dünyada, özellikle Akdeniz ve Ortadoğu ülkelerinde inek sütünden elde edilen ürünlere alternatif olarak üretilmektedir [14]. Manda sütü ise Hindistan ve Pakistan başta olmak üzere Asya ülkeleri için daha önemli yere sahiptir [15]. Türkiye, manda sütü üretiminde 32443 ton/yıl üretim kapasitesi ile Avrupa'da, İtalya'dan sonra en yüksek üretim kapasitesine sahip olan ülke konumundadır [16]. Fransa, İtalya, İspanya ve Yunanistan gibi, süt endüstrisinin ülke ekonomisine önemli katkısının olduğu ülkelerde, koyun ve keçi sütü üretimi ve ürünlere işlenmesi daha organize bir şekilde sürdürülmekte olsa bile; birçok ülkede koyun ve keçi sütü sektörleri inek sütüne göre sınırlı olarak üretim gerçekleştirmekte ve mevsimsel farklılıklar ürün kalitesi üzerinde önemli rol oynamaktadır [17]. Bu nedenle süt endüstrisinde, özellikle koyun ve keçi sütünden üretilen ürünlerin gelişimi ve standardizasyonun sağlanabilmesi amacıyla bu sütlerin genel kompozisyonu ve fizikokimyasal özelliklerinin incelenmesi çok önemlidir [18]. Çünkü bu ürünlerin ekonomik anlamda katma değeri görece yüksektir.

Yapılan çalışmalar manda, koyun, keçi ve inek sütünün genel bileşiminin yanı sıra fizikokimyasal özelliklerinin de birbirinden farklı olduğunu göstermektedir [18, 19]. Ancak bu farklılıklar değişik türler ve hatta bireyler arasında da değişiklik göstermektedir. Ayrıca hayvanın diyeti, beslenme alışkanlığı, laktasyon evresi gibi bireysel etmenlerin yanı sıra lokasyon, mevsim gibi çevre şartları da sütün bileşiminin değişmesinde önemli rol oynamaktadır. Bilindiği gibi laktasyon süresinin sonlarında sütün yağ, protein ve mineral içeriği artış gösterirken laktoz içeriğinde azalma görülmektedir [18]. Laktasyon süresi boyunca gözlemlenen bu değişiklikler koyun sütü ve keçi sütü için inek sütüne oranla daha belirgin olarak gözlenmektedir. Koyun, keçi, inek ve manda sütünün genel bileşimi Çizelge2.1'de gösterilmiştir. Koyun ve manda sütünün

inek ve keçi sütüne göre belirgin oranda yüksek kuru madde, kazein ve mineral içeriğine sahip olduğu görülmektedir [18, 20].

Çizelge 2. 1. İnek, koyun, keçi ve manda sütünün ortalama genel bileşimi (Kaynak: [14,18,20,21])

	İnek	Koyun	Keçi	Manda
Yağ (%)	3,6	7,9	3,8	7,4
Yağ harici kuru madde (%)	9	12	8,9	10,1
Laktoz (%)	4,7	4,9	4,1	5
Protein (%)	3,2	6,2	3,4	4,4
Kazein (%)	2,6	4,2	2,4	3,7
Mineral (%)	0,7	0,9	0,8	0,8
Ca (mg/kg)	1200	1950	1260	1800
P (mg/kg)	920	1250	970	1200

Toplam protein miktarının koyun sütü için 4,7-7,2 g/100g ve keçi sütü için ise 2,6-4,1 g/100g arasında değişebildiği bildirilmektedir [14]. Sütün temel karbonhidratı olarak bilinen laktozun, keçi sütünde inek sütüne göre %0,2-0,5 daha az oranda bulunduğu rapor edilmiştir. Koyun sütünde ise laktoz miktarı inek sütüne yakın düzeydedir. Ancak koyun sütünün protein, yağ ve toplam kuru madde içeriğinin inek sütüne göre daha yüksek olması nedeniyle; laktozun kuru maddedeki oranı, inek sütünde koyun sütüne göre yaklaşık olarak %11-13 daha fazladır [22]. Manda sütü ise koyun, keçi ve inek sütüne göre en yüksek laktoz içeriğine sahip olan tür olarak belirtilmektedir. Benzer şekilde oligosakkarit içeriği de yine manda sütünde görece yüksek düzeyde bulunmaktadır [20].

Genel olarak süt yağı, nitel ve nicel özellikleri bakımından birçok faktöre bağlı olarak en fazla değişim gösteren süt bileşeni olarak nitelendirilmektedir [14]. Yapılan çalışmalarda süt yağı için türler arasında belirgin farklılıklar olduğu rapor edilmektedir. Örneğin globuler formda bulunan süt yağının inek sütü için ortalama boyutu 3,5µm iken koyun ve keçi sütünde 3 µm'den daha kk yağ globullerinin baskın olduğu belirtilmektedir [18]. Koyun ve keçi sütü yağ globullerinin boyutlarını karşılaştıran çalışmalarda ise çelişkili sonuçlar elde edilmiştir [17, 23]. Manda sütünde bulunan yağ globüllerinin ortalama boyutunun (5 µm) diğer türlere göre daha büyük olması ise manda sütünün yüksek yağ içeriği ile ilişkilendirilmiştir [24]. Türler arası farklılıklar sadece yağ miktarı ve yağ globüllerinin boyutu ile sınırlı değildir. Keçi sütü başta olmak üzere kkbaş hayvanların sütlerinin kısa ve orta zincir uzunluğuna sahip yağ asitleri içeriğinin, inek sütüne göre daha yüksek düzeyde olduğu belirtilmiştir [18]. Keçi sütü yağını diğer türlerden ayıran bir diğer önemli özellik de aglütinasyonu sağlayan antikor olan agltininden yoksun olmasıdır. Bu durum keçi sütünün diğer türlere göre daha yavaş kaymak bağlama niteliğine (cream up) sahip olmasını açıklamaktadır [14].

Sütün bileşiminde bulunan mineraller nitel olarak ele alındığında minör bileşenler olarak değerlendirilse de, süt önemli bir mineral kaynağı olarak görünmektedir. Kuru madde içeriği oldukça yüksek olan koyun sütünün mineral içeriğinin de inek ve keçi sütüne göre daha yüksek olduğu belirtilmektedir [14]. Keçi sütü yüksek klor ve potasyum içeriği ile diğer türlerden ayrılmaktadır. Aynı zamanda keçi sütü en düşük demir içeriğine sahip olsa da demirin biyoyararlanımının keçi sütünde inek sütüne göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir [25]. Bunun yanı sıra kalsiyum, fosfor ve magnezyumun çözünür ve kolloidal yapıdaki dağılımı inek ve keçi sütünde benzer olmasına rağmen; koyun sütünde bu minerallerin görece daha az çözünür yapıda olduğu belirtilmiştir [14]. Manda sütünün ise inek sütünde bulunanın yaklaşık iki katı kalsiyum ve

fosfor içerdiği; diğer minerallerin ise inek sütüne yakın seviyelerde olduğu gözlenmiştir [26].

2.3. Süt Proteinleri

Sütte bulunan azotun yaklaşık %95'inin oluşturan süt proteinleri, temel olarak, α_{s1} -, α_{s2} -, β - ve κ -kazeinler, β -laktoglobulin (β -lg), α -laktalbumin (α -la), laktotransferrin ve immunoglobulinlerden oluşmaktadır. Bunların dışında proteoz- pepton fraksiyonları da diğer serum proteinleridir [26].

İnek sütünün pH' sı 25°C' de 6.6 olarak kabul görmekte ve yaklaşık 30°C' de pH 4.6' da proteinlerin yaklaşık %80'i presipite olarak çözüldükten ayrılmaktadır. Ayrılan kısım kazein olarak tanımlanır ve pH 4.6 kazeinlerin izoelektirik noktasıdır. Bu koşulda çözünür formda kalan proteinler ise serum proteinleri olarak anılmaktadır [9].

Sütün asal proteinlerinden kazeinler, doğada bulunan globüler ve fibroz yapılardan hiçbirine tam olarak uymayan; serin kalıntıları ile esterleşmiş fosfoproteinler olup, koloidal partiküller halinde bulunmaktadır [26, 27]. Kazeinlerin asal olarak 3 farklı protein molekülünden oluştuğu (α -, β -, ve γ -kazein) bilinmektedir. α -kazein fraksiyonu, temelde iki farklı protein bileşeni içermektedir. Bunlar düşük kalsiyum (Ca^{++}) derişimlerinde presipite olan α_s -kazein ve kalsiyuma dirençli olan κ -kazeindir. α_s -kazein de α_{s1} -, α_{s2} -kazein olarak adlandırılan iki fraksiyon içermektedir. α_{s1} -, α_{s2} -, β -, ve κ -kazein fraksiyonları, sırası ile toplam kazeinin %37, 10, 35, 12' sini oluşturmaktadır [9,28].

Diğer kazeinlerde olduğu gibi α_{s1} - kazeinde de hidrofobik ve yüklü kalıntıların zincir boyunca dağılımı tek düze değildir. Yapısında fark edilebilir üç hidrofobik bölge bulunmaktadır [29]. Yapısındaki aminoasitlerin %8.5' ini prolin oluşturduğu için [7], bu proteinler oldukça yüksek esnek polipeptid zincirlerine sahiptir [11].

α_{s2} -kazein ise karboksil-ucu yakınlarındaki pozitif yükler ve amin-ucu yakınlarındaki negatif yükler nedeni ile dipolar bir yapıya sahiptir [11]. α_{s2} -kazein bütün kazeinlerin en hidrofilik olanı olup, yüksek fosforilasyon

ve düşük prolin içeriğine sahiptir [30]. Diğer kazeinlere göre daha az prolin içermesine rağmen, yüksek fosforilasyon derecesi ve yüklü kalıntılar içermesinden dolayı pH ve iyonik dirence karşı duyarlıdır [29].

β -kazein, toplam kazeinin %30-35'ini oluşturmaktadır [30]. β -kazein bütün kazeinler içinde en hidrofobik fraksiyon olarak bilinmektedir [29]. β -kazeinin yapısında yüksek miktarda bulunan prolin kalıntıları, heliks yapının oluşumunu engellemektedir. Negatif yüklü bir amin-ucuna ve yüksüz hidrofobik bir karboksil-ucuna sahiptirler [11].

κ -kazein, koloidal misel yapının korunmasından sorumlu olan ve toplam kazeinin %12'sini oluşturan, sistein içeren tek kazein fraksiyonudur [30]. Tüm kazeinler gibi fosfat içermektedir. Karboksil ucunda içerdiği karbonhidrat kalıntısı ile diğer kazeinlerden ayrılmaktadır [28]. κ -kazein, fosfoserin gruplarından yoksundur. Sonuç olarak, diğer kazeinlerle aynı düzeyde Ca^{++} bağlamamakta ve çözünürlüğü bu iyondan etkilenmemektedir [29].

İnek sütündeki kazeinler, koloidal (dispersiyon) formda bulunmaktadır. 20-600 nm çapında (ortalama 100 nm) olan dispersiyon fazındaki bu partiküller kazein miseli olarak adlandırılmaktadırlar [11]. Kazein miselleri, kazein alt-miselleri olarak bilinen çok sayıda alt birimden oluşmaktadır ve alt birimlerinin boyutunun; protein derişimi, pH, iyonik direnç ve sıcaklık gibi birçok etkene bağlı olarak değiştiği bilinmektedir [29].

Kazein misellerinde bulunan inorganik maddeler, magnezyum ve fosfat gibi diğer maddelerle birlikte koloidal kalsiyum fosfat (CCP) olarak adlandırılmaktadır [29]. Kalsiyum fosfatın, alt-misellerin birbiriyle birleşmesi sonucu misele organize olmasında rol oynadığı bildirilmektedir [26]. Kazein miselinin (kuru maddede) %93' ü kazeinden, geri kalanı ise CCP' den oluşmaktadır. Niceliği az olmakla birlikte CCP, misel kararlılığında önemli işleve sahiptir [11].

İnek sütü proteinlerinin yaklaşık %20' sini kapsayan protein grubu, serum veya peynir altı suyu proteinleri olarak bilinmektedir [9].çoğu, globüler yapıda olup, ısıl işlem ile çözünürlükleri azalmaktadır [11].

Serumda bulunan iki asal protein α -laktalbumin ve β -laktoglobulin' dir [29]. β -Lg, kovalent olmayan bağlarla bir araya gelmiş iki monomerdan oluşmuş bir dimerdir [11]. Bir tane serbest tiol grubu içermektedir ve globuler yapısı moleküller arası iki disülfit bağı ile kararlı kılınmaktadır.

α -La, serum proteinlerinin yaklaşık %20'sini, toplam süt proteinlerinin %3,5' ini oluşturmaktadır [9]. α -La' ya güçlü bir Şekilde (2mol) kalsiyum bağlandığı [28], bağlanmanın iki sistein kalıntısı arasında kurulan disülfit bağları aracılığı ile oluştuğu ne sürülmektedir.Kalsiyum varlığının, ısıl denatürasyona karşı protein kararlılığında rol oynadığı bildirilmektedir [30].

2.4. Protein Yüzey Hidrofobisitesi

Proteinlerin hidrofobisitelerinin, doğal proteinlerin moleküler yapılarının ve onların modifikasyonlarının, kararlılığına etkisi üzerine uzun yıllardır çalışılmaktadır [31, 32].Protein yüzey hidrofobisitesi, proteinlerin çözünürlük, kolloidal kararlılık, hidrasyon, denatürasyon gibi teknik ve fonksiyonel özelliklerini belirleyen önemli unsurlardan biri olarak kabul edilmektedir [33-35].

Protein yüzey hidrofobisitesini belirlemede en sık kullanılan yöntemlerden biri, yüksek duyarlılık nedeniyle tercih edilen ve proteinlerin hidrofobik floresans markörler (ANS, Nile Red vb.) ile etkileşime girmesine dayanan spektrofotometrik yöntemlerdir [36].

Sütte bulunan kazeinlerin çok fazla sayıda prolin ve az sayıda sistein aminoasitleri içerdiği bilinmektedir. Kazeinlerin moleküler yapısındaki hidrofobik bölgelerin daha çok u kısımlarda yer aldığı kabul edildiği için serum proteinlere göre daha yüksek yüzey hidrofobisite değerlerine sahip oldukları bildirilmiştir[37]. Ayrıca kazeinler, görece yüksek miktardaki apolar aminoasit kalıntıları ile karakterize edilmektedir ve bu nedenle "düzgün"ikincil ve üçüncül yapılarının oluşumu

engellenmektedir. Yani kazeinlerin yüksek hidrofobisitesinin, polar olmayan grupların proteinin iç kısımlarında bulunan bir globüler yapı oluşumunu engellediği bildirilmektedir [38]. Bu durum kazeinlerin kendi aralarında ya da diğer proteinlerle etkileşime girme eğiliminde olmalarına yol açmaktadır. Hiller ve Lorenzen [33] süt proteinlerinin yüzey hidrofobisitesindeki farklılıkları incelediği çalışmasında, kazein fraksiyonlarının (α -kazein, β -kazein ve κ -kazein) serum proteinlerine (α -laktalbumin ve β -laktoglobulin) göre daha düşük hidrofobisite değerlerine sahip olduğunu bildirmektedir. Wagner ve ark. [39] ise düşük yüzey hidrofobisitesini proteinin sıkı ve kompakt yapısı ile ilişkilendirmiştir. Bu durumda kazein fraksiyonlarının yapısı göz önünde bulundurulduğunda; serum proteinlerine göre daha düşük yüzey hidrofobisitesine sahip olmaları çelişki yaratsa da, bu durum kazein monomerleri arasındaki güçlü hidrofobik bağların bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Ayrıca Erdem [40], protein yüzey hidrofobisitesinin kazein misellerinin yapısı hakkında fikir verebileceğini de belirtmiştir. Yüksel ve ark. [41] yaptıkları çalışmada, Kaz Dağları bölgesinde inek, koyun ve keçi sütlerinin yüzey hidrofobisite indekslerini incelemiş ve koyun sütünde bulunan kazein misellerinin yüzeyindeki hidrofobik bağlanma bölgelerinin sayısının inek ve koyun sütüne oranla önemli ölçüde az olduğunu ancak bu bölgelerin inek ve keçi sütündeki hidrofobik bölgelere göre daha sıkı/güçlü bağlanmalar oluşturduğunu, yani koyun sütündeki misellerin daha kompakt yapıya sahip olduğunu öne sürmüşlerdir.

2.5. Türler Arası Protein Profili Farklılıkları

Birçok ülkede koyun ve keçi sütünün ekonomik kalite kriteri toplam protein derişimi olarak belirlenmiş olsa da, peynir yapımında esas önemli role sahip olan kazein niceliği, türler içinde farklılık gösterebilmektedir. Kazein misel yapısının koyun, inek ve keçi sütleri için benzer sayılabileceğini ancak misel boyutunda ise önemli farklılıkların olduğu bildirilmektedir [42].

Bornaz ve ark. [43], kazein misellerinin ortalama çapının inek, koyun ve keçi sütü için sırası ile 150 nm, 180 nm ve 260 nm olduğunu belirtmişlerdir. Manda sütünün ortalama misel boyutu ise 190 nm olarak rapor edilmiştir [44]. Misel boyutunun kazein derişimi ve Ca/Kazein oranı ile doğrudan ilişkili olduğu ve inek sütü için ortalama misel boyutuna kazein derişiminin etkisinin önemli olmadığı rapor edilmiştir [43]. Ayrıca Brule ve ark.[42], görece küçük çaplı misellerin κ -kazein ve büyük çaplı misellerin ise kalsiyumfosfat yönünden zengin olduğunu belirtmişlerdir. Misel boyutunun yanı sıra koyun ve keçi sütündeki kazein misellerinin hidrasyon ve mineralizasyonunun da inek sütünden farklı olduğu ve keçi sütündeki misellerin inek sütü misellerine göre daha fazla kalsiyum ve inorganik fosfor içerdiği belirtilmektedir [18]. Benzer şekilde manda sütü de yüksek kolloidal kalsiyum içeriği ve kısmen daha büyük misel boyutuna sahip olması nedeniyle inek sütüne göre daha az hidrate olmaktadır [20]. Keçi sütünün görece düşük kolloidal kararlılık göstermesinin nedenleri arasında yüksek mineralizasyon düzeyi ve kalsiyum içeriği olduğu da düşünülmektedir [18].

Koyun ve keçi sütündeki temel kazein fraksiyonları inek sütünde olduğu gibi α_{s1} , α_{s2} , β -kazein ve κ -kazeindir. Ancak bu fraksiyonların oransal dağılımında ve boyutlarında belirgin farklılıklar gözlendiği bildirilmektedir. Örneğin, inek sütünde bulunan temel α_s -kazein fraksiyonu α_{s1} kazein iken; keçi sütünde α_{s2} kazeindir [45].Ayrıca keçi sütünün diğer tüm küçükbaş hayvanlardan daha düşük oranda α_{s1} kazein içermesi ve α_{s2} kazein niceliğinin de inek sütünde bulunan α_{s2} kazein oranına göre düşük olması nedeniyle β -kazeinin nicel olarak keçi sütünün başlıca proteini olduğu kabul edilmektedir [21]. Koyun sütü ile karşılaştırıldığında ise keçi sütü daha fazla β -kazein ve κ -kazein içeriğine sahipken daha düşük oranda α_s -kazein içermektedir. Literatürde yer alan ve manda sütü proteinlerinin nitel analizleri sonucu elde edilen veriler uygulanan yönteme göre farklılık gösterebilmektedir. Örneğin Yamauchi (1983), manda sütünün elektroforez ile belirlediği kazein

içeriğini; %40 α_{s1} ; %6-9 α_{s2} ; %35 β -kazein ve %12 κ -kazein olarak rapor etmektedir[20]. İnek sütü standartları temel alınarak yapılan bir başka çalışmada, manda sütünün kazein fraksiyonlarının oranı; α_{s1} , α_{s2} , β -kazein ve κ -kazein için sırası ile %22,7; %13,2; %53,6 ve %10,5 olarak saptanmıştır [45]. Ancak Bonfatti ve ark. [46], yaptıkları çalışmada manda sütünün protein fraksiyonlarını RP-HPLC ile belirlemiş ve inek sütüne göre α_{s2} ve κ -kazein içeriğinin yüksek, α_{s1} ve β -kazein içeriğinin ise daha düşük olduğunu rapor etmişlerdir. Manda sütü kazeinlerini diğer türlerden ayıran bir diğer özellik de kazeinlerin neredeyse tamamının koloidal yapının içinde bulunmasıdır [47]. α_{s1} kazein pıhtılaşma ve peynir yapımı aşamasında rol aldığından; düşük düzeyde bulunması keçi sütünden üretilen peynirlerin yapısını görece olumsuz yönde etkileyebileceği düşünülmektedir. Nitekim,Storry ve ark.(1983), hemen hemen eşit kazein derişimine sahip olan inek ve keçi sütlerinden elde edilen peynirlerden keçi peynirinin daha yumuşak yapıya sahip olduğunu gözlemlemiştir[18]. Keçi sütünün sahip olduğu düşük kazein miktarı, α_s -kazein fraksiyonlarının oranı ve misel boyutunun görece büyük olması keçi sütünden elde edilen jellerde gözlenen zayıf tekstürünü açıklamaktadır.

İnek sütü proteinlerinin yaklaşık %20'sini oluşturan serum proteinlerinin temel fraksiyonları olan α -laktalbumin ve β -laktoglobulin içerikleri de türler arasında farklılık göstermektedir. Bonfatti ve ark. [46], manda sütünde β -laktoglobulin içeriğinin α -laktalbumin miktarının yaklaşık 1,3 katı olduğunu belirtmiştir. Ayrıca manda sütünün α -laktalbumin ve laktoferrin içeriğinin inek sütünden önemli derecede fazla olduğu da rapor edilmiştir [48]. Keçi sütünde bulunan β -laktoglobulin oranının ise inek ve koyun sütüne göre daha düşük olduğu gözlenmiştir[18].

2.6. Sütün Rennetlenmesi

Sütte bulunan proteinlerin denatürasyonu ve sütün pıhtılaşmasına bağlı jel oluşumu peynir ve fermente süt ürünleri üretiminin temeli olarak bilinmektedir. Süt proteinlerinin koloidal kararlılığını değiştirmek ve

böylece arzulanan ürünlere işlenmesini sağlamak amacıyla ısı işlem (serum proteinleri), rennet enzimi kullanımı (kazeinler), asitlendirme (serum proteinleri ve kazeinler) ya da bu uygulamaların kombinasyonları kullanılabilir [49].

Sütün asitliğin düşürülmesine bağlı olarak pıhtılaşma özelliği yoğurt gibi fermente ürünlerin üretiminde jel oluşumunu sağlamaktadır [50]. Bu durum temel olarak laktik asit bakterilerinin faaliyetinden kaynaklanırsa da, bu bakterilerin bazı proteolitik enzimlerinin κ -kazeini parçalayabilmesi özelliğinin de sütün pıhtılaşmasında az da olsa rol oynadığı düşünülmektedir [12]. Ancak asitliğin düşürülmesi ile pıhtılaşmada temel mekanizma, pH'nın kazeinlerin izoelektrik noktada çöktürülmesidir. Bunun yanı sıra kazein misellerinin koloidal kararlılığın sağlanmasında önemli bir faktör olarak görülen κ -kazeinlerin sahip olduğu "hairy" yapının da pH düşüşüne bağlı olarak bozulduğu ve sterik etkinin azalmasının, kazein misellerinin agregasyonunda önemli rol oynadığı belirtilmiştir. Ayrıca koloidal kalsiyum fosfat (CCP), asitliğin gelişmesiyle pH düşüşüne bağlı olarak çözünür hale gelmekte ve misel yapısından ayrılmaktadır [49]. Böylece kazein misellerinin içyapısı değişmekte ve miseller kararlılığını kaybederek izoelektrik noktada ($\text{pH} \approx 4,6$) çökmeye başlamaktadır [9]. Sütün asitliğinin artırılması laktik asit fermentasyonu yapabilen bakterilerle, direkt asit ilavesiyle (laktik asit, HCl vb.) ya da glukano- δ -lakton (GDL) ilavesiyle gerçekleştirilebilmektedir. Ancak Lucey ve Singh [51], GDL kullanılarak oluşan asit jelin reolojik ve yapısal özelliklerinin bakteri kültürleri ile üretilen jelden farklı olduğunu belirtmiştir.

Süt üretiminin önemli düzeylere ulaştığı birçok ülkede üretilen sütün önemli bir kısmı peynir üretimi amacıyla kullanılmaktadır [52]. Sütün pıhtılaşma özelliklerinin; pıhtılaşma yeteneği, verim ve üretilen peynirlerin kalitesini belirleyen en önemli etmen olduğu düşünülmektedir [13]. Bu nedenle peynir üretiminin temeli olan sütün rennet ile koagülasyonu süt endüstrisi için büyük önem taşımaktadır.

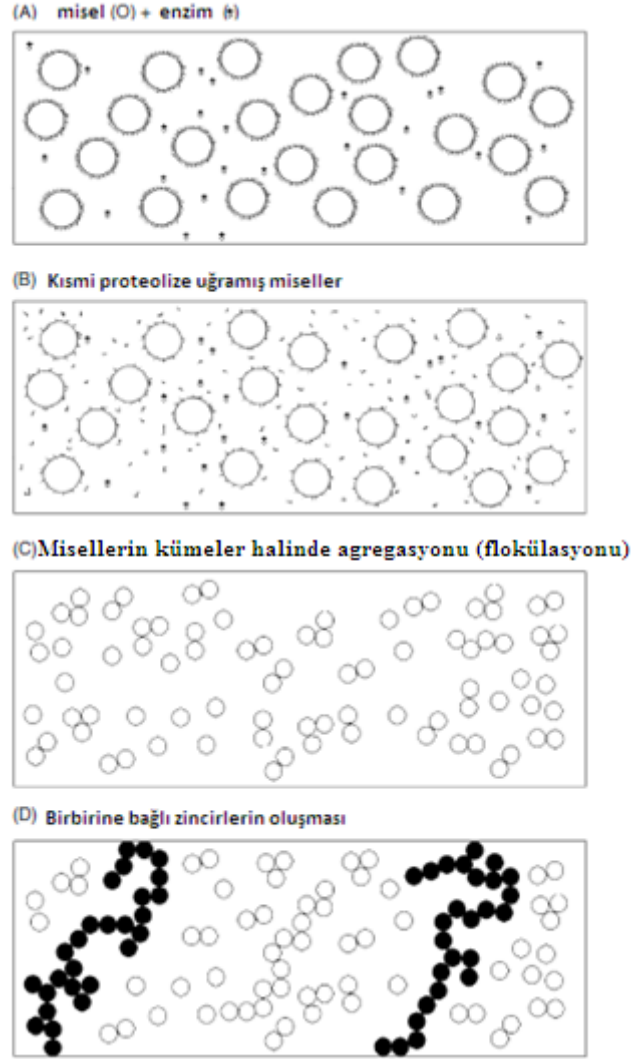
Pıhtı oluşumu sütte bulunan koloidal yapıların (kazeinler) proteolitik bir enzim (kimozi) aracılığı ile koloidal kararlılığını kaybetmesi sonucu ortaya çıkmaktadır [53-55]. Bu aşamada κ -kazein, rennette bulunan asit proteazların gerçekleştirdiği sınırlı proteoliz ile Phe₁₀₅-Met₁₀₆ bağından parçalanarak para- κ -kazein ve kazeinomakropeptit (CMP) olmak üzere iki kısma ayrılır. Böylelikle kimozi, kazein misellerinin dış kısmında bulunan, sterik ve elektrostatik stabilizasyonu sağlayan κ -kazeinin su fazına doğru çıkıntı yapan C-terminalini ayırarak, Ca⁺⁺ varlığında misellerin floküle ve agrege olmasını ve bunu izleyen süreçte peynir jelinin oluşumunu sağlamaktadır [55].

2.6.1. Sütün Rennetle Pıhtılaşma Mekanizması

Daha önce de belirtildiği gibi dünyada üretilen peynirlerin büyük bölümü(≈ %75) sütün özel proteolitik enzimlerle pıhtılaştırılması sonucu elde edilmektedir.

Birçok proteolitik enzim sütün koagülsayonunu sağlayabilme özelliğine sahip olduğundan değişik kaynaklardan (bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal) elde edilen enzimler, peynir yapımında kullanılmaktadır [56]. Peynir yapımında en yaygın kullanılan enzimler ise kimozi (EC 3.4.23.4) ve pepsindir (EC 3.4.23.2). Yapılan çalışmalarda, kimozinin, peynir üretimi için diğer enzimlere göredaha uygun olduğu belirtilmiştir. Pepsinin tek başına peynir üretiminde kullanılması çok yaygın görülen bir durum değildir. Çünkü pepsinin proteolitik aktivitesinin yüksek olması peynirde randıman düşüşü ve acı tat oluşumuna yol açabilmektedir. Ayrıca, pepsinin çok düşük pH'da(pH 1,7-2,3) optimum aktivite göstermesinden dolayı sütün normal pH'sında pıhtılaşması uzun zaman almakta ve peynir olgunlaşması yavaşlamaktadır[57].Peynir yapımında en çok kullanılan preparat (şirden mayası); buzağı, oğlak ve kuzu midelerinden ekstrakte edilen ve düşük pH'da optimum aktivite gösteren kimozi ve pepsin enzimlerinin karışımından oluşmaktadır [58].

Sütün rennet ile pıhtılaştırılması; temel olarak, κ -kazeinin parçalanması ile kazein misellerinin koloidal kararlılığını yitirdiği enzimatik aşama ve yapısı değişen misellerin agregasyonunun gözlemlendiği ikinci aşama olmak üzere iki basamakta gerçekleşmektedir. Misel agregasyonunun ardından, agregatlar jel yapısını oluşturmaktadır [59].



Şekil 2. 1. Sütün enzimatik koagülasyonunun şematik gösterimi [1]

2.6.1.1. Pıhtılaşmanın Birinci Aşaması (Enzimatik Faz)

Sütün enzim ile koagülasyonunun ilk aşaması olan enzimatik faz, proteolitik enzimlerin etkinliği ile başlamaktadır [56]. Bu evrede kimozen (rennin) tarafından gerçekleştirilen proteoliz ile kazein misellerinin

yüzeyinde bulunan κ -kazeinler, Phe₁₀₅-Met₁₀₆ bağından parçalanarak para- κ -kazein (1-105) ve kazeinomakropeptit (106-169) olmak üzere iki kısma ayrılır [53]. Bu peptitlerden para- κ -kazein hidrofobik karakterde olup misellar yapı üzerinde yer almaya devam eder, ancak CMP hidrofilik niteliktedir ve misellerden ayrılarak serum fazına geçer. Misellerden serum fazına doğru saç benzeri çıkıntılar halinde bir görünüm sergileyen kazeinomakropeptitlerin misel yüzeyinden ayrılması ile misellerin sahip olduğu toplam negatif yük azalmaktadır. Dalgleish [60], kimozi aktivitesi sonucunda misellerin zeta potansiyelinin -10/-20'den -5/-7 mV'a (\approx %50) düştüğünü belirtmiştir. Kazein misellerinin zeta potansiyelinin düşmesine bağlı olarak elektrostatik / sterik etkinin ve hidrasyonun azlamasının, kazeinler arası bağlanma güçlerinin etkin hale gelmesine ve misellerin birbirine yaklaşmasına neden olduğu, böylelikle de pıhtı oluşumuna zemin hazırlandığı belirtilmektedir [61].

Enzimatik aşamada enzimatik tepkimeleri etkileyen tüm faktörler etkili olmakla birlikte enzim derişimi, ısı işlem, pH ve iyonik kuvvet bu faktörlerin başında yer almaktadır [62]. pH'nın belirli bir seviyeye kadar düşüşünün proteolizi hızlandırdığı ve pıhtı oluşma süresini kısalttığı belirtilmiştir [62, 63]. Ancak pH'nın daha da fazla düşmesi enzimin adsorbsiyonunun artmasına ve reaksiyon hızında azalmaya neden olduğu belirtilmektedir [12]. Daha önceleri yapılan çalışmalarda ısı işleminin, rennetlenmenin enzimatik aşamasını inhibe ettiği belirtilmişse de son yıllarda yapılan çalışmalarla çok şiddetli olmayan ısı işlem uygulamalarının enzimatik fazın hızını çok düşük oranda etkilediği ve ısı işleminin esas inhibe edici etkisinin agregasyon ve pıhtılaşma aşamalarında gözlemlendiği belirtilmiştir [64]. Benzer şekilde Walstra [12], sütün rennet ile pıhtılaşmasında sıcaklığın etkisinin önemli olmadığını, pıhtılaşmanın düşük sıcaklıklarda da gerçekleştiğini belirtmiştir. Enzimatik reaksiyonun Q₁₀ değeri pH=7'de 1,8-2 arasında iken, agregasyon aşamasının Q₁₀ değeri aynı pH'da 11-12 arasında değişmektedir [56].

2.6.1.2. Pıhtılaşmanın İkinci Aşaması (Agregasyon Fazı)

Misellerde bulunan κ -kazeinin önemli bir kısmının (\approx %70) proteolize uğrayarak parçalanmasının ardından, sıcaklık ve Ca^{++} iyon derişiminin yeterli düzeyde olması durumunda koloidal kararlılığını yitiren kazein miselleri birbirleriyle birleşerek gözle görülebilir pıhtı partikülleri oluştururlar [12, 55].

Misellerin agregasyonu kısmen van der Waals kuvvetinin etkisi ile gerçekleşse de bu çekim tek başına yetersizdir ve agregasyon için Ca^{++} iyonlarına gereksinim vardır. Ca^{++} iyonlarının iki şekilde agregasyona katkı sağladığı belirtilmektedir. Bunlardan ilki Ca^{++} iyonlarının miseller üzerindeki net negatif yükü nötrleyerek, elektrostatik itmenin azalmasına yol açması; ikincisi ise para kazein misellerinin negatif yüklü yüzeylerinde tuz köprüleri kurması olarak açıklanmıştır [12]. Özetle hidrofobik etkileşimler, van der Waals etkileşimleri ve elektrostatik etkileşimler ile birlikte (para) κ -kazein misellerinin agregasyonunda kilit rol oynamaktadır [65].

Kazein misellerinin agregasyonuna etki eden başlıca etmenlerin enzim (kimozin) derişimi, kazein derişimi, pH, sıcaklık ve iyonik kalsiyum (Ca^{++}) derişimi olduğu belirtilmektedir. Agregasyon hızına enzim miktarının doğrudan etki etmediği belirtilmiştir. Ancak etkinlik hidrolize uğrayan κ -kazein miktarına bağlı olduğundan enzim derişimi agregasyonu dolaylı olarak etkiler. Sütün agregasyon hızının kazein içeriği ile de doğru orantılı olduğu ve kazein derişiminin agregasyon üzerinde önemli etkiye sahip olduğu belirtilmektedir [66]. Sütün pH'sındaki değişim de agregasyonu etkileyen bir diğer etmendir. Düşük pH'nın agregasyona iki mekanizmayla etki ettiği düşünülmektedir. İlki Ca^{++} aktivitesini artırması ve ikincisi de sabit Ca^{++} aktivitesinde bile misellerin yüzeyinden ayrılan 'hairy' yapıların daha az κ -kazein hidrolizi ile mümkün olması olarak belirtilmiştir [12]. van Hooydonk ve ark. [63], κ -kazeinin %70'inin pH=6,7'de hidrolize olmasıyla viskozitenin artış gösterdiğini belirlemişlerdir. Kazeinin pH=6,2'de %64'ü ve pH= 5,6'da

ise %30'unun viskozitede artış görülmeden hidrolize uğradığını tespit etmişlerdir. Agregasyon düzeyi, kalsiyum iyon aktivitesinin artışı ile de artış göstermektedir. Kalsiyum iyonlarının hem miseller üzerindeki negatif yükü nötrleyerek elektrostatik itmeyi azalttığı, hem de para- κ -kazein miselleri arasında tuz köprüleri kurarak agregasyonu hızlandırdığı belirtilmiştir.

Enzimatik hidrolizin ardından kümeleşen (floküle olan) kazein miselleri sürecin ilerlemesiyle, birkaç μm genişliğinde porlara sahip olan protein ağını, yani protein jelini oluştururlar. Bu aşama "jelleşme aşaması" olarak adlandırılmaktadır [62].

2.6.2. Sütün Rennetle Pıhtılaşma Kinetiği

Peynir üretim sürecinde son ürünün niteliklerini belirlemede büyük önem taşıyan sütün koagülasyon süreci, uzun yıllardır birçok araştırmaya konu olmuş ve pıhtılaşma aşamasını izlemek amacıyla çeşitli aygıt ve yöntemler geliştirilmiştir [5].

Proteoliz ve agregasyon süreçlerinin (rennetlenme sürecinin)izlenebilirliği, oluşan jelin temel yapısı ve reolojik özelliklerini kontrol altına alma olanağı sağlamaktadır. Örneğin agregasyon hızının yüksek olması düzensiz (irregular) ve homojen olmayan jellerin oluşumuna yol açmaktadır [3]. Ayrıca rennetlenme süreci amaca uygun olarak yönlendirilerek son ürünün nitelikleri de belirlenebilmektedir. Örneğin, yukarıda verilen örnekteki yüksek agregasyon hızı ve sonuçta ortaya çıkan kaba (irregular) ağ yapısı, hızlı sinerezise yol açmaktadır ve sert peynir üretimine uygundur.

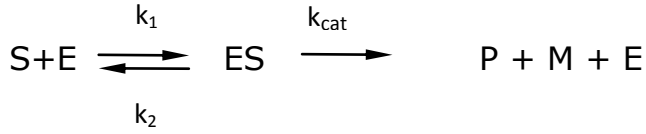
Sütün rennet ile pıhtılaşma sürecinin, birinci ve ikinci aşamalarında farklı tepkimelerin gerçekleşmesi ve bu tepkimelerin kısmen birbiri içine girmesi nedeniyle, kinetik açıdan yorumlanmasının çok basit olmadığı belirtilmiştir [9, 67]. Lopez ve ark.[68], enzimatik fazda gerçekleşen κ -kazeinin hidroliz tepkimesinin temelde birinci dereceden bir tepkime kinetiği izlediği, yani reaksiyon hızının substrat derişimi ile orantılı olduğunu öne sürmektedir. Flokülasyon evresinin temelini oluşturan

ve olmayan partiküller arasında kurulan dinamik bir denge olduğu düşünülürken, koagülasyon sürecinin başlangıcında flokülasyon hızının sıfır olduğu ve κ -kazein hidrolizinin belli bir düzeye (%70-85) ulaştığı andan itibaren hızla arttığı ve bu evrenin van Smoluchowski(1917) kinetiği ile açıklanabileceği düşünülmektedir [9, 69]. Ancak Gatti ve ark. [7], agregasyon aşamasının van Smoluchowski kinetiği ile açıklanan mekanizmadan daha karmaşık olduğunu öne sürmüşlerdir. Ayrıca sütün enzimatik koagülasyonunun ilk aşamasında hidrolize olan kazein misellerinin koloidal kararlılığı bozulmakta ve sonrasında da misellerhızla floküle olmaktadır. Yüksek enzim miktarı ile çalışıldığında, hidroliz aşamasının kısa bir sürede tamamlandığı ve tüm aglomerasyon sürecinin hızını agregasyon aşamasının belirlediği belirtilmiştir [7].

Sürecin enzimatik faz olarak tanımlanan ilk fazında, κ -kazeinin Phe₁₀₅-Met₁₀₆ peptid bağının yıkımı ile çözünür CMP ve çözünmez formda bulunan para- κ -kazeinin açığa çıktığı bilinmektedir. Bu mekanizma için enzim aktivitesini ölçmenin en uygun yolunun κ -kazein hidrolizinin veya para- κ -kazein ya da CMP'nin artışının zamana bağlı olarak gözlemlenmesi olduğu düşünülmektedir. Para- κ -kazein birçok çözültide çözünmemesine karşın; üre içeren çözültülerde çözünebilmekte ve nicel olarak poliakrilamid jel elektroforez ile belirlenebilmektedir[70]. Ancak proteoliz hızını değerlendirmede en sık kullanılan metotların HPLC, far-UV ve immünokimyasal yöntemlerle CMP oluşumunu değerlendirmek olduğu belirtilmektedir[9].

Kimozinin birincil işlevinin κ -kazeinin Phe₁₀₅-Met₁₀₆ bağının yıkımı olduğu anlaşılmeden önce Waugh (1958), bu bağın kimozi enzimi tarafından yıkımının, kazein kompleksindeki herhangi başka bir peptid bağın yıkımına göre 1000 kat daha hızlı gerçekleştiğini öne sürmüştür [9]. Bu gözlemlerden yola çıkarak araştırmacılar koagülasyonun ilk aşaması olan enzimatik fazın Michaelis-Menten kinetiğine uygun olabileceğini öne

sürmüşlerdir. Michaelis –Menten kinetiğine göre enzimatik faz aşağıda gösterildiği gibi ifade edilebilir;



S: Substrat(κ -kazein)konsantrasyonu

E: Enzim (kimozin) konsantrasyonu

ES: Enzim-substrat kompleksi

P: para- κ -kazein

M: Kazeinomakropeptit(CMP)

k_1, k_2 : Kararlı hal öncesi reaksiyon hız sabiti

k_{cat} : Katalitik reaksiyon hız sabiti

Michaelis-Menten kinetiğine göre reaksiyon hızı ise aşağıdaki eşitlikle belirlenmektedir.

$$V = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{max}[S]}{(K_m+[S])} \quad (2.1)$$

$$V_{max} = k_{cat} * E_0 \quad (2.2)$$

E_0 : Toplam enzim konsantrasyonu

K_m : $(k_2+k_{cat})/ k_1$ (Michaelis-Menten sabiti)

Michaelis-Menten kinetiğinde tepkimenin kararlı halde olduğu varsayımı söz konusudur. Koagülasyon reaksiyonlarında da yatışkın duruma kısa sürede ulaşıldığından bu yaklaşımın rennetlenme sürecinin enzimatik aşaması için uygun olduğu düşünülmektedir. Michaelis-Menten kinetiği ile çalışırken en çok kullanılan yöntem, farklı substrat derişimlerinde, tepkime ürünlerindeki artış ya da substrat niceliğindeki azalış hızlarını ölçerek, çizilen grafikten K_m ve V_{max} parametrelerinin hesaplanması yöntemidir. K_m ; reaksiyonda maksimum hızın yarısı olarak kabul edilen hıza ($V_{max}/2$) ulaşıldığı andaki substrat derişimi olarak

tanımlanmaktadır [9]. Bu değer substratın enzime olan afinitesi olarak tanımlanmakta ve enzim ya da substrat derişiminden bağımsız olduğu kabul edilmektedir. Bu bağlamda düşük K_m değeri, daha aktif enzim sistemleri ile ilişkilendirilmektedir. Kimozin ve κ -kazein arasında gerçekleşen hidroliz üzerine yapılan çalışmalarda bulunan K_m değerleri 10^{-6} - $5 \cdot 10^{-4}$ arasında geniş bir aralıkta değişmektedir[9].

K_m 'nin tersine; V_{max} ' in enzim derişimine bağı olarak değiştiği öngörülmektedir. Eşitlik2.2'de, V_{max} 'ın k_{cat} ile orantılı olduğu da görülmektedir. Rennetlenme tepkimesi için bulunan k_{cat} değerlerinin ise 2 - 100 s^{-1} arasında olduğu rapor edilmiştir [9]. Reaksiyon başlangıçtaki enzim derişimi bilindiğinde; k_{cat} ,Eşitlik2.2'den V_{max} yardımı ile hesaplanabilmektedir. k_{cat}/K_m oranı genellikle katalitik aktivitenin ölçüsünü belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu oran ne kadar yüksek ise enzim aktivitesinin de yüksek olduğu kabul edilmektedir [12].

van Hooydonk ve ark. [71], κ -kazein ve kimozin arasında gerçekleşen tepkimeyi yeniden değerlendirmiş ve κ -kazeinin misel içinde bulunduğu birinci fazın hemen başlangıcında,tepkimenin birinci dereceden kinetikler izlediğini öne sürmüştür. Bu durum, substrat derişimi ve K_m değerlerine bağı olarak sıfıncı ya da birinci dereceden tepkimeleri tanımlayan Michaelis-Menten kinetiğinin enzimatik fazın yorumlanmasında kullanımının yanlış olduğu sonucunu doğurmamaktadır.Çünkü; $[S] \gg K_m$ olduğu durumlar için substratın dönüşüm hızının sıfıncı derece; $[S] \ll K_m$ için ise substrat dönüşüm hızı birinci dereceden tepkime kinetiği izlediği kabul edilmektedir.

Sütte bulunan ortalama κ -kazein derişiminin yaklaşık $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ olduğu düşünöldüğünde, daha önce yapılan çalışmalarda hesaplanan K_m değerlerine göre tepkimenin sıfıncı ya da birinci dereceden kinetikleri izleyebileceği görünmektedir [9].

Bazı araştırmacılar ise enzim ve substratın difüze olabilme yetenekleri göz önüne alındığında, κ -kazeinin enzimatik hidrolizinin Michaelis-Menten kinetiği ile açıklanamayacağını öne sürmektedirler [72]. Bu görüşe göre

difüzyon katsayısı, moleküler ağırlık ile ters orantılı olduğundan, kazein miselleri kimozinden çok daha düşük difüzyon katsayısına sahiptir ve tepkimenin gerçekleşmesi için doğal olarak enzimin kazein misellerine (Phe105-Met106 bağına) ulaşması gerekmektedir. Bu nedenle enzimatik tepkimenin difüzyon kontrollü gerçekleştiği öne sürülmektedir.

Rennetlenme sürecinin ikinci aşaması olan agregasyon fazını gözlemlemek ve modellemek amacıyla birçok yöntem tartışılmaktadır. Gerçekleştirilen modelleme çalışmalarının çoğunda ilk olarak Drak(1972)'in öngördüğü ve van Smuluchowski kinetiğinin de temeli olan eşitlikten (2.3) yararlanıldığı belirtilmiştir [9].

$$\frac{d\mu n}{dt} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} [(i + j^n) - i^n - j^n] k_{ij} c_i c_j \quad (2.3)$$

Bu eşitlik için rennetlenmenin önemli olarak görülen çeşitli evrelerinde, birim hacim başına düşen partikül sayısı önem taşıdığından, yapılan ilk çalışmalar kazein misellerinin sayısını belirlemeye yönelik olmuştur. Elektron mikrografileri, kazein misellerinin rennetlenme sürecinde başlangıçta lineer diziler oluşturduğunu ve sonrasında da bu zincirler arasında dallanmaların oluştuğunu göstermiştir [73]. RCT'nin %60'ı ile %80'i arasındaki süreçte rennet ile değişime uğrayan miseller, toplanmanın tipinde ya da ölçüsünde ani bir değişim olmaksızın sabit bir biçimde topaklanmaya (floküle olmaya) başlarlar. Kümeleşmelerden önce küçük zincir yapılı birleşmelerin ilk önce oluştuğu belirtilmiştir.

2.6.3. Türler Arası Pıhtılaşma Süreci Farklılıkları

Sütün rennet ile koagüle olma özellikleri peynir verimi ve niteliğini etkileyen en önemli etmenlerden biri olarak değerlendirilmektedir [74]. Peynir yapımı sırasında kullanılan kültürün niteliği ve niceliği, Ca⁺⁺ derişimi, rennet niceliği, inkübasyon sıcaklığı ve pH gibi etmenlerin yanı sıra sütün bileşiminin de pıhtılaşma sürecinde göz önünde bulundurulması gerekmektedir [2, 75]. Dolayısı ile sütün bileşimine etki

eden çevresel ve genetik faktörlerin yanısıra hayvanın diyeti, cinsi, yaşı, laktasyon süresi vb. etmenler koagülasyon sürecini de etkilemektedir [76]. Literatürde daha çok inek sütünde olmak üzere koyun, keçi ve manda sütünde rennetlenmeyi etkileyen etmenlerin incelendiği çalışmalar bulunmaktadır [77-79]. Şüphesiz ki proteinlerin türler arasındaki nicel ve nitel farklılığı da rennet ile koagülasyon mekanizmasını etkileyen faktörlerin başında gelmektedir [80].

Ljutovac ve ark.[14] ile Raynal ve Remeuf [81], koyun ve keçi sütünün kolloidal kararlılığının inek sütüne göre daha düşük olduğunu, bu nedenle rennetlenme sürecinde inek sütünden farklı davranış sergilediğini ve daha kısa sürede pıhtılaştığını rapor etmişlerdir. Koyun sütü ve keçi sütünün ise rennet ile jelleşme süresinin benzer olduğu belirtilmiştir [82]. Grandison [83] ise, koyun sütünün inek sütüne göre daha kısa sürede rennetlenmesini, koyun sütünün yüksek protein ve kazein içeriği ile açıklamıştır. Ayrıca keçi sütünün rennetlenme süresinin de kazein içeriğinden dolayı inek sütüne oranla daha düşük olduğu ve jel sıkılığının daha düşük olduğu; hatta inek sütüne eşit miktarda kazein içeren keçi sütünden elde edilen jellerin sıkılığının yine inek sütünden elde edilen jellerden daha düşük olduğu da rapor edilmiştir [18]. Keçi sütünden rennet jeli oluşum sürecinin kısa flokülasyon süresi ve düşük pıhtı sıkılığı ile nitelendirildiği gözlenmektedir. Ayrıca kazein derişiminin flokülasyon süresine etkisinin düşük olduğu ve düşük kazein derişiminde agregasyon hızının, enzimatik proteoliz hızına oranla düşük olduğu rapor edilmiştir [82].

Koyun, keçi ve inek sütünün rennetlenme sürecindeki farklılıkları inceleyen bir başka çalışmada, koagülasyon süreci iki aşamada (enzimatik faz ve agregasyon fazı) değerlendirilmiş ve enzimatik fazda κ -kazeinin proteolizi sonucu oluşan GMP oluşum hızı, inek sütünde, koyun ve keçi sütüne göre daha yüksek iken; koyun ve keçi sütü arasındaki farkın önemsiz olduğu belirtilmiştir [84]. Benzer şekilde Bornaz ve ark.[43] de keçi sütünün hidroliz süresinin inek sütüne göre

daha uzun olduğunu (sırası ile; 552 sn. ve 372 sn.) gözlemişlerdir. Buna karşılık agregasyon hızı ise koyun ve keçi sütünde inek sütüne göre daha yüksek bulunmuştur [84]. Keçi ve koyun sütlerine benzer şekilde manda sütü de inek sütüne göre daha kısa rennetlenme süresi ile karakterize edilmektedir [85].

3.MATERYAL VE METOT

3.1.Materyal

Denemelerde kullanılan koyun, keçi, inek ve manda sütü örnekleri Atatürk Orrman Çiftliği (AOÇ) süt fabrikası (Ankara)' dan sağlanmıştır. Çiğ süt örnekleri 3000 rcf devirde, 7°C' de 10 dakika santrifüjlenerek (Sigma 3-30K, UK) yağından ayrılmıştır. Mikrobiyel gelişmeyi önlemek amacıyla içerisine 1:10000 oranında sodyum azid (NaN_3) eklendikten sonra örnekler, denemelerde kullanılmak üzere 10°C'nin altında muhafaza edilmiştir.

3.2.Metot

3.2.1.Toplam Kuru Madde İçeriğinin Belirlenmesi

Örneklerde toplam kurumadde miktarı tayini gravimetrik olarak 103 °C'de gerçekleştirilmiştir [86].

3.2.2.Yağ İçeriğinin Belirlenmesi

Çiğ süt örneklerinin yağ içeriği Gerber yöntemi ile belirlenmiştir [87].

3.2.3.Yağsız Kuru Madde İçeriğinin Belirlenmesi

Süt örneklerinin yağı ayrıldıktan sonra kuru madde içeriği gravimetrik yöntemle belirlenmiştir[86].

3.2.4.Titrasyon Asitliğinin Belirlenmesi

IDF Standardına göre, modifiye edilerek, SH birimi ile hesaplanmıştır [88]. 25 mL süt örneği 0,1 N ayarlı NaOH ile tite edilerek harcanan NaOH miktarı kaydedilmiş ve SH değerleri belirlenmiştir.

3.2.5. Kül İçeriğinin Belirlenmesi

Örneklerin kül içeriği, kül fırınında yakılarak (520°C) gravimetrik yöntemle belirlenmiştir.

3.2.6.pH Değerinin Belirlenmesi

pH ölçümleri masa tipi pH metre (Hanna Instruments, HI 221)ile gerçekleştirilmiştir. pH metre kalibrasyonu pH 4.0 (Merck, HC824188) ve pH 7.0(Merck, HC822844) tamponları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Örneklerin protein içerikleri Bradford [89] yöntemi ile belirlenmiştir. Çiğ süt örneklerine uygun seyreltme işlemi yapıldıktan sonra, hazırlanan Bradford reaktantı varlığında örneklerin 595 nm'deki absorbansı ölçülmüş ve değişen derişimlerdeki kazein çözeltileri kullanılarak oluşturulan standart eğri ile karşılaştırılarak protein miktarı belirlenmiştir.

3.2.8. Üre-PAGE yöntemi ile Protein Fraksiyonlarının Belirlenmesi

Çiğ süt örneklerindeki protein fraksiyonlarını belirlemek amacıyla üre-PAGE yöntemi kullanılmıştır [90]. Üre-PAGE elektroforez sisteminde denatürant olarak 8-12 M derişimlere kadar kovalent olmayan bağları yıkarak proteinleri denatüre eden üre kullanılmaktadır. Kazein alt fraksiyonlarının molekül ağırlıkları birbirine oldukça yakın olduğu için (20-25 kDa) SDS-PAGE yöntemi ile ayırım tam olarak yapılamamaktadır. Üre-PAGE yönteminde proteinler moleküler ağırlıkların yanı sıra elektrik yüklerine göre de ayrılmaktadırlar [91].

İnek sütünden elde edilen süt protein standartları (α -kazein(Sigma-C6780), β -kazein(Sigma-C6905), κ -kazein(Sigma-C0406), α -Laktalbumin(Sigma-L5385), β -LaktoglobulinA (Sigma-L7880), β -LaktoglobulinB(Sigma-L8005)), çiğ süt örnekleri ve koagülasyon denemesi sonucu elde edilen presipitatlar için gerekli seyreltme işlemleri yapılmıştır. Sistem 20 mA sabit akımda çalıştırılmıştır.

Jellerin boyanması için Commassie Brilliant Blue G (G-250) (Acros Organics #191480250) kullanılmıştır. Boya çözeltisinde 1 gece bekletilen jeller sonrasında saf su ile yıkanıp bir süre saf suda bekletildikten sonra "Agfa Fotolook" yazılımı kullanılarak taranmıştır.

3.2.9. Protein Yüzey Hidrofobisitesi İndeksinin (PYHI) Belirlenmesi

Protein yüzey hidrofobisitesi Bonomi ve ark. [92] ile Pagliarini ve ark. [93]'a göre, gerekli modifikasyonlar gerçekleştirilerek, Erdem[40] tarafından geliştirilen yöntem ile saptanmıştır.

Tek başına fluoresans göstermezken, proteinlerin hidrofobik yüzey kısımlarına bağlanarak oluşturduğu kompleksin fluoresans gösterdiği ANS (8-anilinonaphthalene-1-sulfonic acid ammonium salt, Merc cat.no. 10762) bu çalışmada fluoresans probu olarak kullanılmıştır. Spektrofluorimetre (Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, USA) bir deterjan çözeltisi (%5 Triton-X 100, Fluka cat.no. 93426) kullanılarak ayarlanmıştır. λ_{ex} : 390 nm, λ_{em} : 480 nm, bant genişliği: 5 nm'dir.

Çiğ süt örneklerinde öncelikle ANS titrasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla örneklerden 10'ar mL alınmış; 1 mM, 5 mM ve 10 mM ANS çözeltilerinin her birinden sırasıyla 10 μ L, 25 μ L ve 50 μ L alınarak örneklere eklenmiş ve fluoresans intensiteleri ölçülmüştür. Kör olarak örneğe ANS eklenmeden ölçülen fluoresans değerleri kullanılmıştır.

ANS titrasyonu sonucu elde edilen verilerin kinetik analizinde; Lineweaver-Burk, Hanes-Wolf, Eadie-Hofstee ve Direct Linear eşitlikleri ayrı ayrı kullanılarak F_{max} ve K_d değerleri hesaplanmıştır. F_{max} , doymuş ANS derişimindeki maksimum fluoresanstır ve fonksiyonel olarak hidrofobik kısımların sayısını vermektedir. K_d , ANS titrasyon eğrisinde Michealis-Menten kinetiğine göre $F_{max}/2$ koşulundaki ANS derişimidir ve fluoresant karakterdeki ANS-protein kompleksinin dissosiyasyon sabitidir. Proteinlerin hidrofobisitesini belirlemede hem F_{max} değeri; hem de proteinin proba karşı gösterdiği affinite olarak tanımlanan $1/K_d$ değeri önemli parametrelerdir. Bunların yanında değerlendirilmesi gereken diğer parametreler; prob-protein bağlanmasının ortalama sıklılığını ifade eden F_{max}/K_d ve protein yüzey hidrofobisite indeksi (PYHI) olarak tanımlanan ve birim protein başına hidrofobisiteyi ifade eden $F_{max}/K_d*[P]$ olarak belirlenmiştir.

3.2.10. ANS ve Protein Partisyonu Belirlenmesi

ANS ve protein partisyonu (dağılımı), Erdem [40]'e göre saptanmıştır. Herbir süt örneği için 9 mL örnek alınıp 36 μ L 50 mM ANS ilave edildikten sonra 27000 rpm ve 7°C'de 45 dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonucu elde edilen presipitata 3 mL 50mM fosfat tamponu (pH=6,8) ilave edilerek çözünmesi sağlanmış ve gerekli seyreltme işlemi yapıldıktan sonra 595nm'de absorbansı ölçülerek protein partitasyonu Bradford yöntemi ile belirlenmiştir.

ANS partitasyonu için fosfat tamponu ilave edilmiş presipitat çözeltilerinden 100'er µL alınarak, %5'lik Triton-X-100 çözeltisi ile 5 mL'ye tamamlanmıştır. Bu örnekler için λ_{ex} : 390 nm, λ_{em} : 480 nm, bant genişliği: 5 nm olmak üzere spektrofluorimetrik ölçümler gerçekleştirilmiş ve floresans intensiteleri belirlenmiştir (F_0). Ardından aynı örnekler 10µL 1 mM ANS çözeltisi ilave edilmiş ve ölçülen floresans intensiteleri " F_1 " değerleri olarak kaydedilmiştir. Seyreltme faktörleri ile gerekli düzeltmeler yapılarak bağlanan ANS miktarı belirlenmiştir.

3.2.11. Rennet ile Koagülasyon Denemesi

Rennet ile koagülasyon denemesi koyun, keçi, inek ve manda sütü örnekleri için Erdem[40]'e göre gerçekleştirilmiştir.

Buz banyosundaki süt örneklerine son derişimi 0,2mM olacak şekilde ANS ve 100µL rennet (%5) (Maxiren, 600 IMCU) ilave edilmiştir. Örnekler iyice karıştırıldıktan sonra bekletilmeden 10 adet tüpe paylaştırılmış ve tüpler 35°C'deki su banyosuna yerleştirilmiştir. Tüpler ön denemelerle, Berridge yöntemi ile belirlenen pıhtılaşma süresini de kapsayacak şekilde belli aralıklar ile (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90. dk) sıcak su banyosundan alınmış ve buz banyosuna alınarak enzimatik tepkimenin durdurulması sağlanmıştır. Tüm örnekler sıcak su banyosundan alınıp buz banyosunda bir süre bekletildikten sonra 10000 rpm ve 4°C'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen presipitatların üzerine ayrılan süpernatant hacmi kadar 8 M üre çözeltisi eklenerek; setler ultrasound banyosunda çözünene kadar bekletilmiştir. Hazırlanan presipitat örnekleri 10°C'nin altında bir gece periyodu dengelenmiş ve ardından protein ve ANS partitasyonu (dağılımı) saptanmıştır.

Koagülasyon denemesi için ANS ve protein partitasyonu aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir:

Her bir tüp içeriğinden 100 µL alınarak hacmi %5'lik Triton-X-100 çözeltisi ile 5 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan örneklerin fluoresansı ölçülerek "kör örnek" olarak değerlendirilmiş, ardından içerisine 10 µL, 1 mM ANS çözeltisi eklenerek tekrar fluoresansı ölçüldükten sonra aradaki fark değerlendirilerek presipitata bağlanan ANS derişimi hesaplanmıştır. Koagülasyon işlemi sonrasında elde edilen presipitatlarda protein dağılımı Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Yöntem, ANS partitasyonu için elde edilen presipitat çözeltilerinin 30 kat seyreltikten sonra Bradford çözeltisi varlığında 595 nm'de absorbansının ölçülmesi sonucu protein içeriğinin belirlenmesine dayanmaktadır.

Ayrıca, ANS partitasyonu için hazırlanan presipitat çözeltileri saf su ile 4 kat seyreltilerek Üre-PAGE uygulamalarında kullanılmış ve presipitatlardaki protein fraksiyonları elektroforetik olarak da analiz edilmiştir.

3.2.12.RP-HPLC ile Koagülasyonun İzlenmesi

Deneme kapsamında protein profili RP-HPLC (Agilent 1100 series) cihazında ZORBAX C8 (250x4,6mm iç çap, 5 µm partikül boyutu, 300°A) kolonu ile $\lambda = 226$ nm'de 40°C sıcaklıkta 1 mL/dakika akış hızı ile belirlenmiştir. Ayırma işlemi mobil faz A (% 0,1 TFA içeren 1/9 oranındaki Acetonitril/ Deiyonize su karışımı) ve mobil faz B (% 0,1 TFA içeren 9/1 oranındaki Acetonitril/ Deiyonize su karışımı) ile belirlenen gradient programa göre gerçekleştirilmiştir. Kullanılan gradient programı Çizelge 3.1'de belirtilmiştir.

ANS partitasyonu için hazırlanan presipitat çözeltisi 30 kat Mobil faz A: Mobil faz B (70:30) karışımı ile seyreltilerek RP-HPLC analizinde kullanılmak üzere buzdolabında saklanmıştır.

Süt örnekleri ve koagülasyon sonucu elde edilen presipitat örneklerinden elde edilen kromotogramlardaki pikleri tanımlamak amacıyla inek sütünden elde edilen standart proteinler (α -kazein, β -

kazein, κ -kazein, α -laktalbumin, β -laktoglobulinA ve β -laktoglobulinB) kullanılmıştır.

Çizelge 3. 1. RP-HPLC yönteminde kullanılan gradient program

Süre (dk.)	Mobil faz A (%)	Mobil faz B (%)	Akış hızı (ml/ dak.)
0	80	20	1
6	60	40	1
16	55	45	1
19	50	50	1
20	50	50	1
23	30	70	1
24	0	100	1
25	0	100	1
27	80	20	1
30	80	20	1

3.2.13. İstatistiksel Değerlendirmeler

Tüm denemeler 5 tekrarlı yürütülmüştür. Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS ®21 for Windows yazılımı kullanılmıştır. Varyanslar arasındaki farklılığın önem kontrolü Duncan testi ile gerçekleştirilmiştir.

4. SONUÇLAR

Bu tez çalışması kapsamında peynir üretiminin temelini oluşturan sütün rennet ile pıhtılaştırılması süreci inek, koyun, keçi ve manda sütünde incelenmiş ve türler arası farklılığın rennetlenme kinetiğinde yarattığı farklılıklar üzerinde durulmuştur.

4.1. Süt Örneklerinin Genel Bileşimi

Örneklerin genel bileşimini belirlemek amacıyla yapılan analizler sonucunda inek, koyun, keçi ve manda sütüne ait ortalama değerler Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Süt örneklerinin genel nitelikleri (ortalama)

	İnek	Keçi	Koyun	Manda
pH	6,64±0,06	6,64±0,07	6,63±0,05	6,6±0,06
Titrasyon asitliği (SH)	6,98±0,41	6,45±0,66	8,88±0,28	7,84±0,68
Yağsız kuru madde(%)	8,74±0,34	9,97±0,50	12±0,50	10,8±0,84
Kül (%)	0,748±0,03	0,809±0,04	0,925±0,04	0,787±0,06
Yağ (%)	3,61±0,10	3,91±0,17	7,28±0,41	6,85±0,21
Protein (g/L)	35,5±3,10	40,6±3,60	54±4,30	47,7±2,00

Genel olarak ölçülen pH değerleri manda sütünde daha düşük olmakla birlikte diğer türler arasında önemli fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Elde edilen titrasyon asitliği verilerine bakıldığında; en alkali özellikteki sütün keçi sütü olduğu; koyun sütünün ise titrasyon asitliği değerinin diğer türlerden önemli derecede yüksek olduğu görülmektedir. Yağsız kuru madde, kül ve yağ içeriği analiz edilen türler arasında en yüksek koyun sütünde bulunmuştur. Protein içerikleri, inek, keçi, manda ve koyun sütü için sırası ile 35,5±3,1; 40,6±3,6; 54±4,3; 44,7±2 g/L olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1). Farklı türlerin protein içerikleri arasındaki fark önemli düzeydedir ($p<0,05$). Örneklerin genel bileşim analiz verileri

değerlendirildiğinde, deneme kapsamına alınan süt örnekleri rennetlenme sürecinde değerlendirilebilir genel niteliğe sahip olduğu görülmektedir [18, 20].

4.2. Süt Örneklerinin Hidrofobisitesine İlişkin Bulgular

4.2.1. Süt Örneklerinin Protein Yüzey Hidrofobisitesi

Protein yüzey hidrofobisite indeksinin (PYHI) belirlenmesi amacıyla yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucu değişen ANS derişimlerinde çiğ süt örnekleri için ölçülen floresans intensite değerleri Çizelge 4.2 ve Şekil 4.1'de; spektrofotometrik ölçümlerden yola çıkılarak hesaplanan kinetik parametreler ise Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Yüzey hidrofobik kısımların sayısını temsil eden F_{max} değerleri incelendiğinde inek sütünün en yüksek değeri gösterdiği ve onu sırası ile keçi, manda ve koyun sütünün izlediği bulunmuştur. Farklı orijinden örnekler için yüzey hidrofobik kısımların sayısı arasındaki farkın önemli olduğu gözlenmiştir($p<0,05$).

Çizelge 4.2. İnek, koyun, keçi ve manda sütlerinin ANS titrasyonu sonucu elde edilen floresans intensiteleri (ortalama)

ANS (μM)	İnek	Keçi	Koyun	Manda
1,0	4,234	3,451	1,299	3,292
3,5	12,298	9,909	4,464	9,627
8,5	23,387	19,623	7,710	17,306
13,5	41,664	26,795	12,289	23,199
26,0	49,125	41,528	18,538	32,557
51,0	65,916	54,850	26,983	43,127
61,0	70,803	57,915	29,469	46,011
86,0	79,669	65,471	36,538	50,847
136,0	85,912	73,619	38,918	56,979

Yüzey hidrofobik kısımlarının sayısının en fazla olmasına rağmen inek sütünün en yüksek bağlanma afinitesini($1/K_d$) göstermediği; en yüksek bağlanma afinitesinin manda sütüne ait olduğu ve onu sırası ile keçi,

inek ve koyun sütlerinin izlediği; türler arasındaki farkın ise keçi ve inek sütü arasındaki fark hariç önemli olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

Çizelge 4.3. Örneklerin ANS titrasyonu verilerinden elde edilen kinetik parametreler (ortalama)

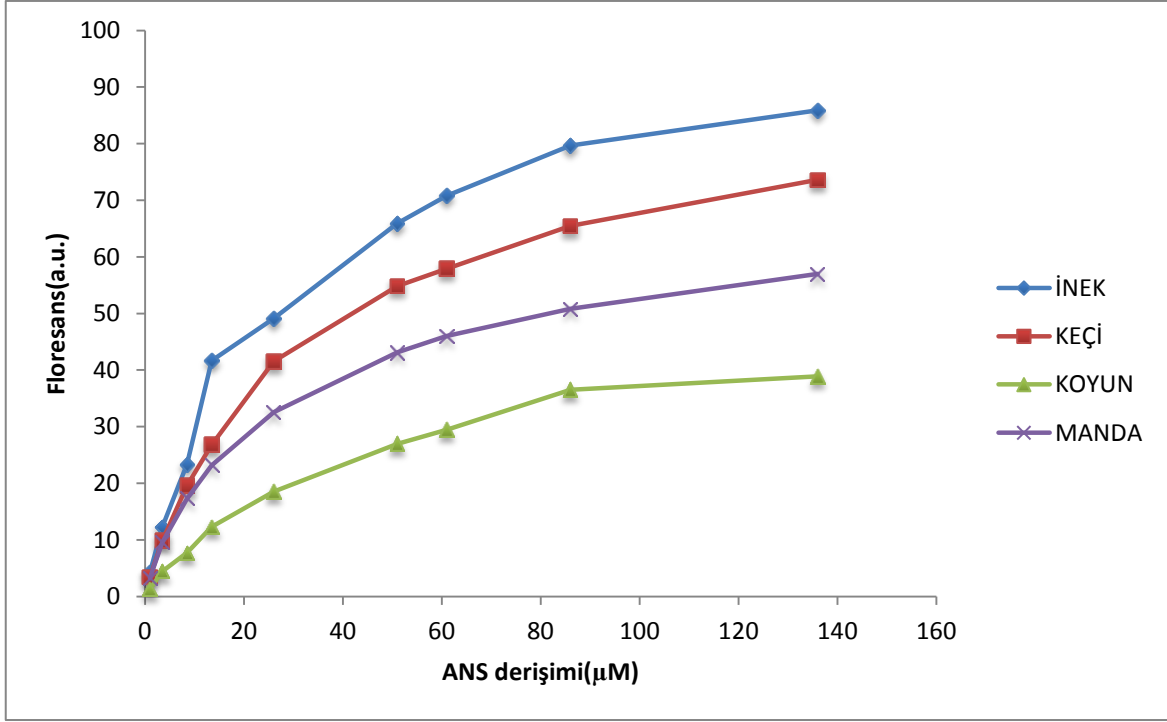
	İnek	Keçi	Koyun	Manda
F_{max}	96,264	82,409	50,014	60,542
K_d	26,188	25,904	33,267	19,862
1/K_d	0,038	0,039	0,030	0,050
F_{max}/K_d	3,676	3,181	1,503	3,048
Prot	35,498	40,557	54,016	42,674
F_{max}/P	2,712	2,032	0,926	1,419
PYHİ	0,104	0,078	0,028	0,071
k_{cat}	0,00036	0,00026	0,00015	0,00014

İnek sütü proteinlerinin yüzey hidrofobik kısımların bağlanma sıklığının (F_{max}/K_d) diğer türlere göre daha yüksek olduğu; koyun sütü proteinlerinin ise en düşük bağlanma sıklığına sahip olduğu gözlenmiştir. Keçi ve manda sütü hariç türler arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Farklı orijinlerden süt örneklerinin içerdiği protein miktarları farklı olduğundan, örneklerde birim protein başına düşen hidrofobik kısımların sayısı (F_{max}/P) hesaplandığında; inek sütünde birim protein başına düşen yüzey hidrofobik kısımların sayısı en yüksek bulunmuş, onu sırası ile keçi, manda ve koyun sütleri izlemiş ve türler arasındaki farkın önemli olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$).

Proteinlerin yüzey hidrofobisite indeksi (PYHİ), birim protein başına hidrofobik bağlanma ve bağ sıklığı kavramlarını temsil etmektedir. Yapılan çalışmada en yüksek hidrofobisiteyi inek sütü proteinlerinin sergilediği, onu sırası ile keçi, manda ve koyun sütü proteinlerinin izlediği; keçi ve manda sütü hariç ($p>0,05$), türler arasındaki farkın önemli düzeyde olduğu ortaya konulmuştur ($p<0,05$).

Sütün rennetlenme süreci ve peynir üretimi açısından önemli bir bağlama pratiğine sahip olan protein-protein bağlanmalarının temelini oluşturan protein yüzey hidrofobisitesi, genel anlamda en yüksek inek sütünde gözlenmiş; onu sırası ile keçi ile manda izlemiş ve en düşük değerler koyun sütünde gözlenmiştir.



Şekil 4.1. İnek, keçi, koyun ve manda sütlerinin ANS titrasyon eğrileri

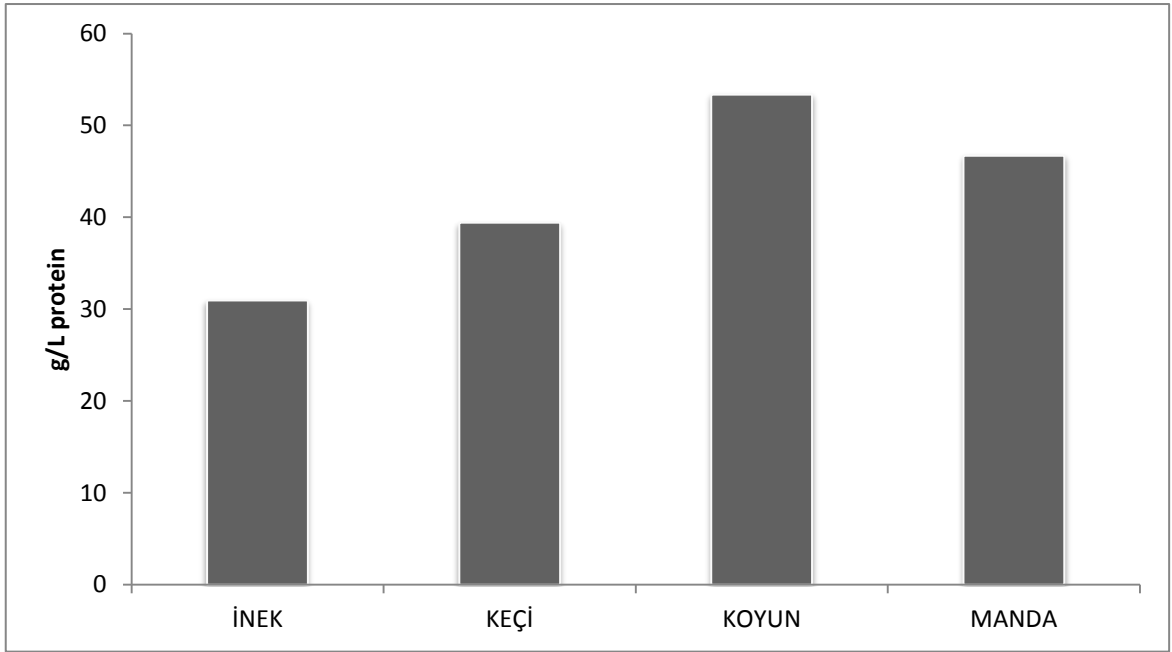
4.2.2. Süt Örneklerinin Protein ve ANS Partitasyonu

Örneklerdeki protein ve ANS partitasyonu (dağılımı) Bölüm 2. Materyal ve Metot kısmında belirtildiği şekilde incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.4' te gösterilmiştir.

Çizelge 4. 4. İncelenen türlerin protein ve ANS partitasyonu (ortalama)

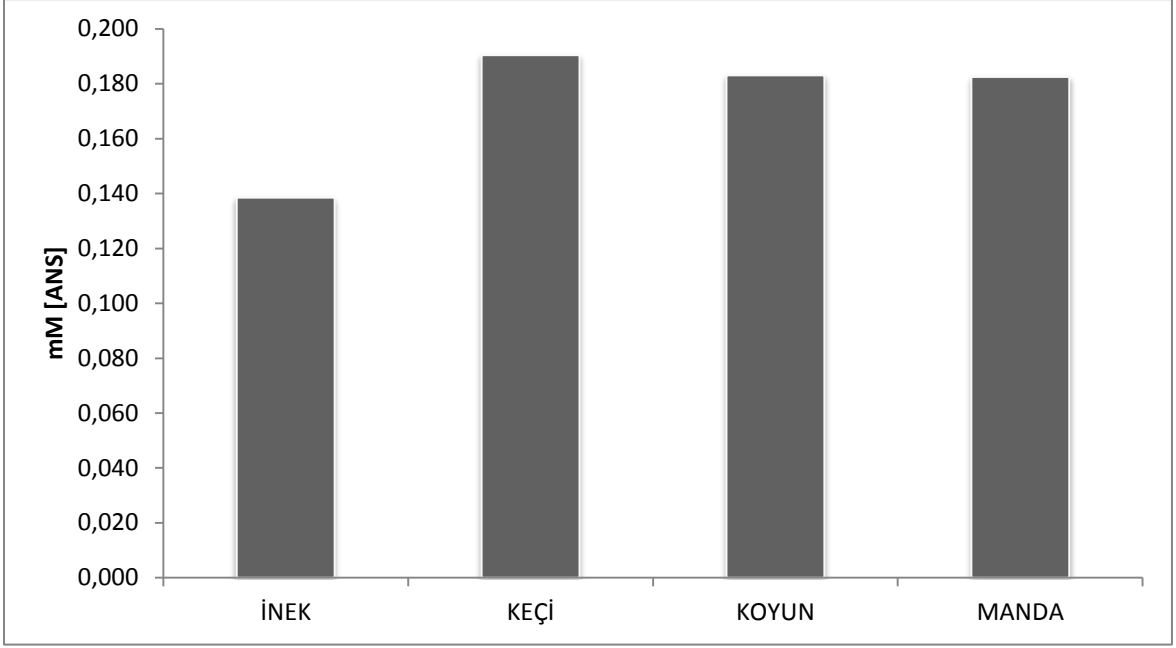
	Protein Partitasyonu (g/L protein)	%protein partitasyonu	ANSPartitasyonu (mM ANS)	% ANS part.
İnek	30,96±3,01	86	0,138±0,03	69
Keçi	39,41± 2,98	95	0,190±0,02	95
Koyun	53,37±3,80	98	0,183±0,03	92
Manda	47,2±2,86	99	0,182±0,02	91

Süt örneklerinde protein partitasyonu incelendiğinde floküle olma eğiliminin birbirine çok yakın olduğu; en düşük eğilimin inek sütü proteinlerinde olduğu, onu sırası ile keçi, koyun ve manda sütü proteinlerinin izlediği gözlenmiştir. Tüm örneklerde floküle olan protein miktarının toplam protein içeriğinin %85'inden daha fazla olduğu, manda sütü için bu oranın neredeyse %100'e ulaştığı belirlenmiştir(Şekil 4.2).



Şekil 4.2. İnek, koyun, keçi ve manda sütünün protein partitasyonu (dağılımı)

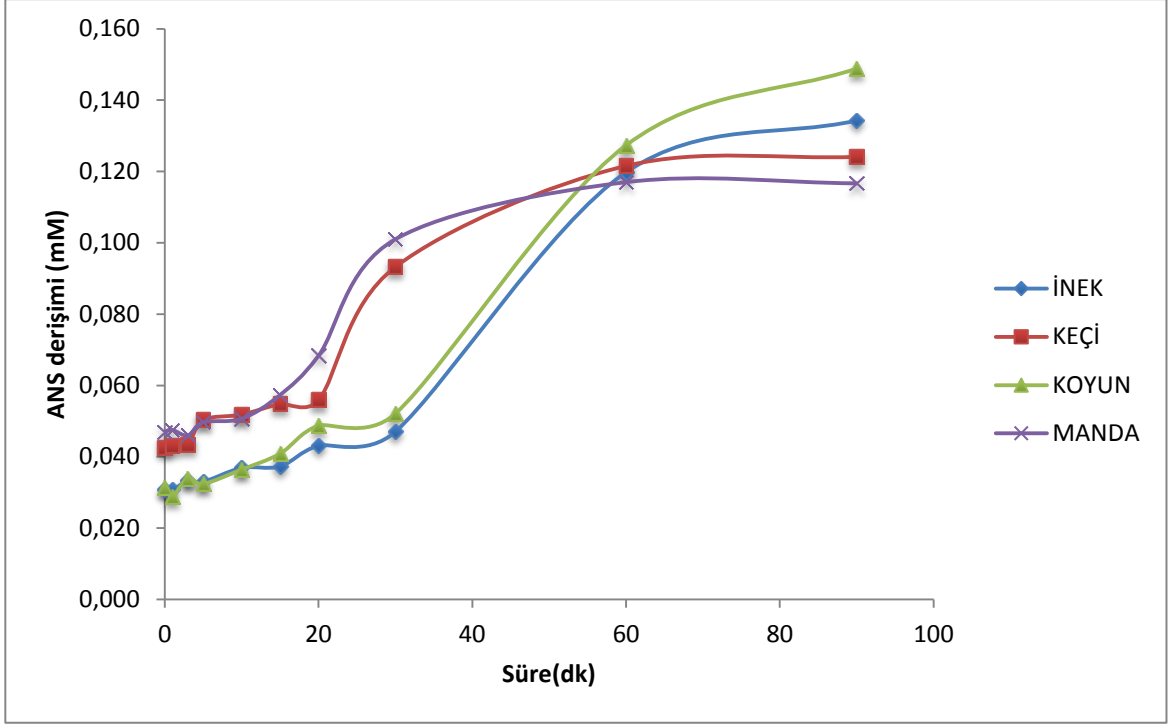
Türler arasında ANS dağılımı incelendiğinde yine en düşük partitasyon inek sütünde gözlenmiş (%69), diğer türlerde ise ANS dağılımı %90'ın üzerinde bulunmuştur. Yani koyun, keçi ve manda sütü proteinlerinin floküle olmasına rağmen ANS bağlanma oranının inek sütünden fazla olduğu gözlenmiştir. İnek sütü ve diğer türler arasındaki farkın önemli olduğu ($p < 0,05$) bulunmuştur (Şekil 4.3).



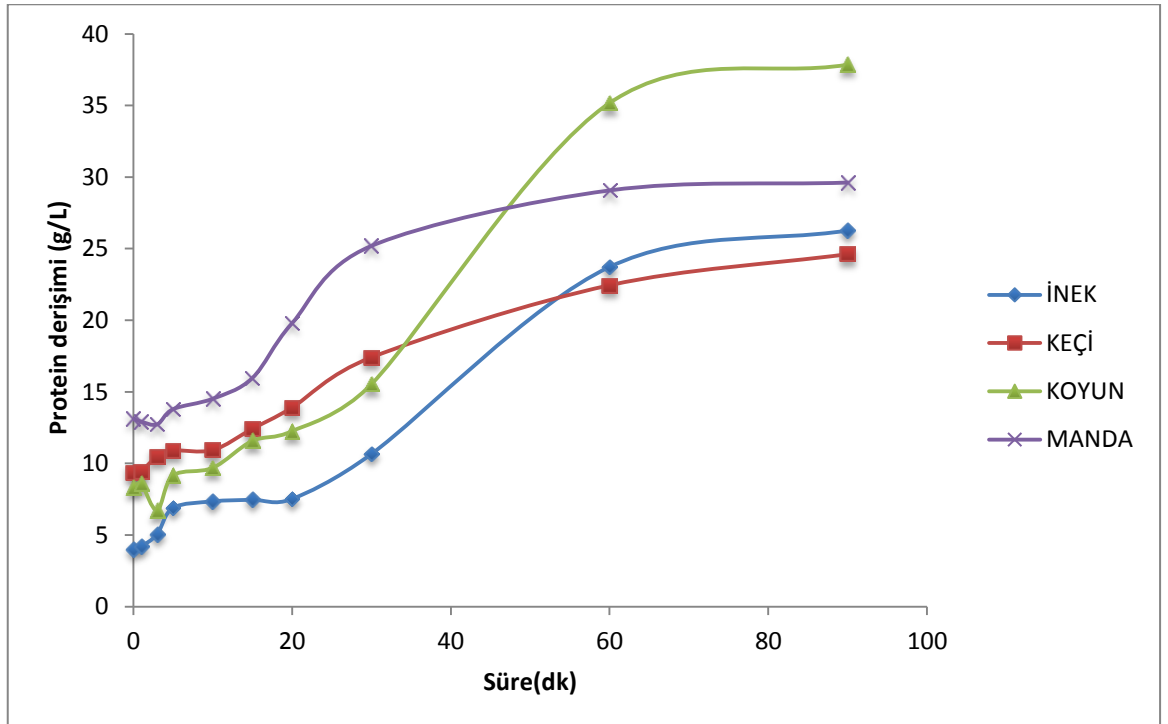
Şekil 4.3. İnek, koyun, keçi ve manda sütünün ANS partitasyonu (dağılımı)

4.2.3. Süt Örneklerinin Rennetlenme Sürecindeki Hidrofobisite Değişimi

Sütün rennet ile pıhtılaşma (rennetlenme) süreci Materyal ve Metot kısmında açıklandığı biçimde incelenmiştir. Rennetlenme sürecinde zamana karşı süt örneklerinden elde edilen presipitatların protein derişimi (g/L) ve bağlanan ANS derişimleri (mM) hesaplanmış ve grafiğe aktarılmıştır (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).



Şekil 4.4. Rennetlenme süresi boyunca farklı türlerden elde edilen presipitatlara bağlanan ANS derişimleri



Şekil 4.5. Rennetlenme süresi boyunca farklı türlerden elde edilen presipitatlardak protein derişimleri

Bu grafiklerden elde edilen her bir süt örneğine ait eğriler Ek 1’de açıklandığı üzere ayrı ayrı değerlendirilerek parametrik veriler elde edilmiş ve elde edilen bulgular Çizelge 4.5- Çizelge 4.8’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı orijinden sütlerin rennetlenme sürecinde presipitatların protein içeriğinden hesaplanan parametrik süreler

	Proteoliz Süresi(PS)(dk)	Sıkılaştırma Süresi (SS)(dk)	Rennetlenme Süresi(RS)(dk)
İnek	17,8	51,6	69,4
Keçi	10,6	54	64,6
Koyun	15,7	54,5	70,2
Manda	8,8	37,9	46,7

Örneklerin toplam rennetlenme süreleri incelendiğinde en kısa sürenin manda sütüne ait olduğu, onu sırası ile keçi, inek ve koyun sütlerinin izlediği saptanmıştır.

Farklı türlerdeki süt örneklerinin rennetlenme sürecinde proteoliz süresinin (PS), toplam rennetlenme süresi(RS) içindeki oranına bakıldığında, keçi sütünde bu oranın en düşük olduğu, onu artarak manda, koyun ve inek sütlerinin izlediği ve türler arası farklılığın önemli olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 4.6. Farklı orijinden sütlerin rennetlenme sürecinde presipitatların protein içeriğinden hesaplanan sürelerin toplam rennetlenme süresine oranı (%)

	Proteoliz Süresi(PS)(%)	Sıkılaştırma Süresi (SS)(%)
İnek	25,6	74,4
Keçi	16,4	83,6
Koyun	22,4	77,6
Manda	18,8	81,2

Rennetlenme süreci, zamana karşı elde edilen presipitatların ANS bağlama derişimindeki değişimden yola çıkılarak da değerlendirilmiş ve hesaplanan parametrik veriler Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8’de gösterilmiştir. Türler arasında pıhtılaşma süreci değişiminin; bağlanan ANS derişimi, yani protein hidrolizi düzeyi açısından presipitatların protein derişimlerindeki değişim ile aynı olduğu ve oransal olarak sürecin benzer eğilim gösterdiği, ayrıca türler arası farkın da önemli olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$).

Çizelge 4.7. Farklı orijinden sütlerin rennetlenme sürecinde presipitatların ANS bağlama derişiminden hesaplanan parametrik süreler

	Proteoliz Süresi(PS)(dk)	Sıkılaşma Süresi (SS)(dk)	Rennetlenme Süresi(RS)(dk)
İnek	24,5	50	74,5
Keçi	18,1	44,3	62,4
Koyun	26,5	44,9	71,4
Manda	8,5	34	42,5

Çizelge 4.8. Farklı orijinden sütlerin rennetlenme sürecinde presipitatların ANS bağlama derişiminden hesaplanan sürelerin toplam rennetlenme süresine oranı (%)

	Proteoliz Süresi(PS)(%)	Sıkılaşma Süresi (SS)(%)
İnek	32,9	67,1
Keçi	29	83,6
Koyun	37,1	77,6
Manda	20	81,2

Rennetlenme süreci boyunca protein derişimi ve ANS bağlama miktarlarının değişiminden yola çıkılarak hesaplanan parametrelerin (SS, PS, RS) yanısıra, sürecin tamamlanmaya yakın olduğu %80’lik kısımdaki protein ve ANS derişimlerinin türler arası farklılığı da ortaya konulmaya çalışılmış ve Çizelge 4.9’da belirtilen veriler elde edilmiştir.

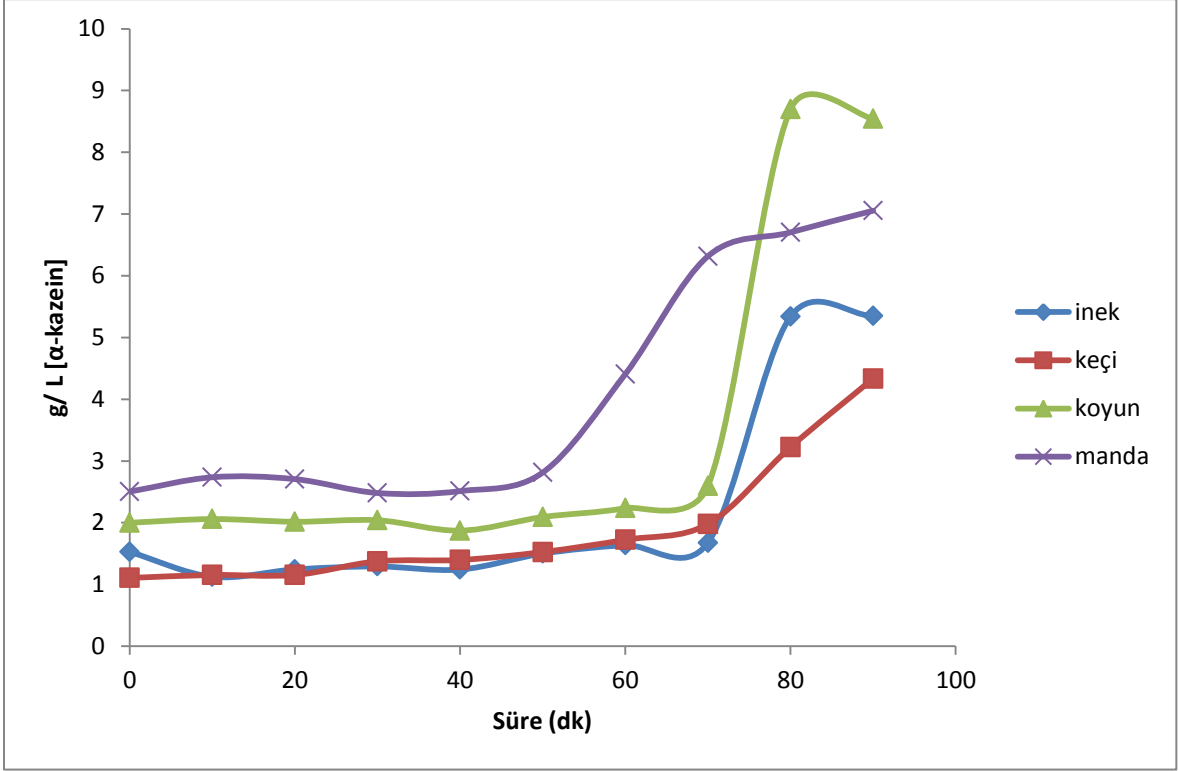
Çizelge 4.9. Rennetlenme sürecinin tamamlanmaya yakın olduğu t0.8 anında presipitatların protein derişimi ve bağlanan ANS miktarı

	[P] ₀ (g/L)	[P] _{0.8} (g/L)	Δ[P] (%)	[ANS] ₀ (mM)	[ANS] _{0.8} (mM)	Δ[ANS] (%)
İnek	35,5	22,3	63	0,2	0,119	60
Keçi	40,6	21,1	52	0,2	0,114	57
Koyun	54	33,4	62	0,2	0,122	61
Manda	42,7	26,3	62	0,2	0,104	52

Enzimatik sürecin tamamlandığı ve peşi sıra flokülasyon sürecinin de tamamlanmaya yakın olduğu an, sürecin %80'inin tamamlandığı an olarak değerlendirilmiştir. Bu andaki farklı türlere ait presipitatlarda protein ve ANS içerikleri hesaplanarak (Ek 1 ve Ek 2), başlangıç (t₀) anındaki değerlerden farklılığı değerlendirilmiştir. Tüm türlerde sürecin %80'i tamamlandığında protein bağlanmalarının yarıdan fazla (~ %60) tamamlandığı gözlenmiştir.

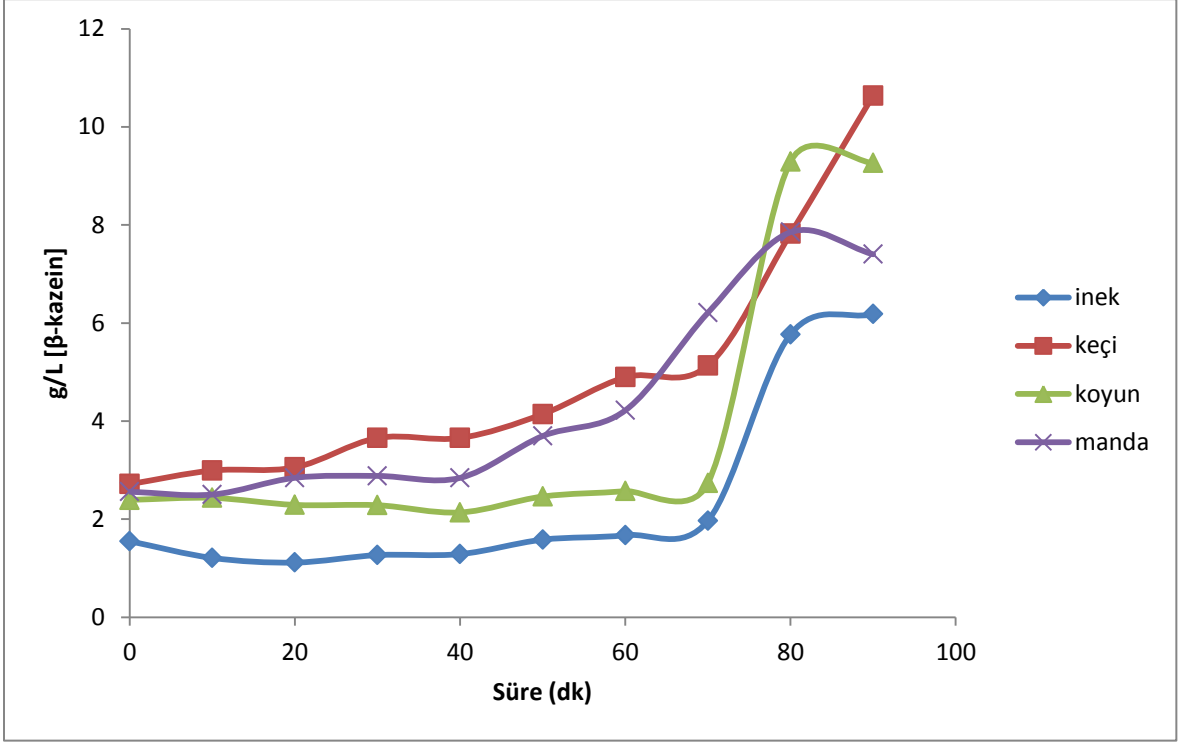
4.3. Rennetlenme Sürecinde Protein Profiline Kromotografik Olarak Ortaya Çıkan Değişimler

Tüm örnekler için rennetlenme sürecinde değerlendirmeye alınan presipitatların protein profili RP-HPLC yöntemi ile de izlenmiştir(Bkz. Bölüm 3- Materyal ve Metot). Kullanılan yöntemde κ-kazein piklerinin küçük olması ve yüksek deneysel hata yaratması nedeniyle değerlendirme dışı bırakılmış; onun yerine elde edilen kromotogramlarda hidrofobisite açısından da anlamlı fraksiyonlar olan α-kazein ve β-kazein pikleri değerlendirilmiştir. Rennetlenme süreci boyunca elde edilen presipitatlarda anılan iki kazein fraksiyonunun konsantrasyonundaki değişim Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Ayrıca hesaplamaların yapıldığı RP-HPLC kromatogramları Ek 3-11'de verilmiştir.



Şekil 4. 6. Rennetlenme süresi boyunca elde edilen presipitatlarda α -kazein konsantrasyonu değişimi

α -kazein fraksiyonunun zamana karşı değişim grafikleri incelendiğinde (Şekil 4.6), rennetlenmenin ilk aşamasını karakterize eden lag fazında sütünde yaklaşık 50 dakikada tamamlandığı, diğer türlere ait örneklerde ise yaklaşık 70 dakikada tamamlandığı gözlenmiştir. Rennetlenme süreci sonunda içeriğe bağlı olarak en yüksek derişimin koyun sütüne ait olduğu görülmektedir. Bu olgu β -kazein fraksiyonu açısından da değerlendirildiğinde benzer eğilimler gözlenmiştir (Şekil 4.7). Ancak süreç, β -kazein içeriği açısından keçi sütünde farklılık göstermiştir. β -kazein miktarının zamana karşı değişimi α -kazein ile benzer ve türler arasındaki farklılık da önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

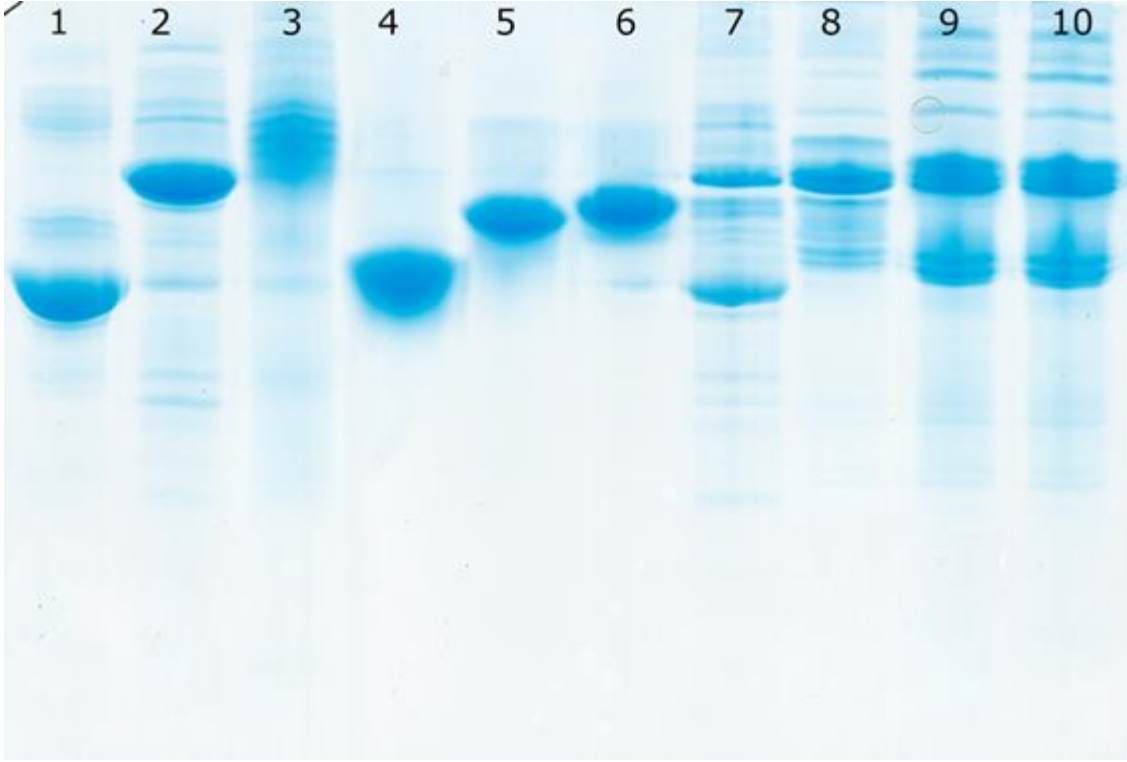


Şekil 4. 7. Rennetlenme süresi boyunca elde edilen presipitatlarda β -kazein konsantrasyonu değişimi

4.4. Rennetlenme Sürecinde Protein Profiline Gözlenen Elektroforetik Değişimler

İnek sütüne ait α -kazein, β -kazein, κ -kazein, α -laktalbumin, β -laktoglobulin A ve β -laktoglobulin B standartları ve farklı türlere ait süt örneklerinin üre-PAGE analizine ait jel görüntüleri Şekil 4.8' de gösterilmiştir. Üre-PAGE elektroforetogramından, koyun ve manda sütü protein profillerinin benzer olduğu görülmektedir (Line 9 & Line 10). Ayrıca keçi sütünde α -kazein miktarının inek sütüne göre daha düşük olduğu ve keçi sütünde baskın kazein fraksiyonunun β -kazein olduğu görülmektedir (line 8).

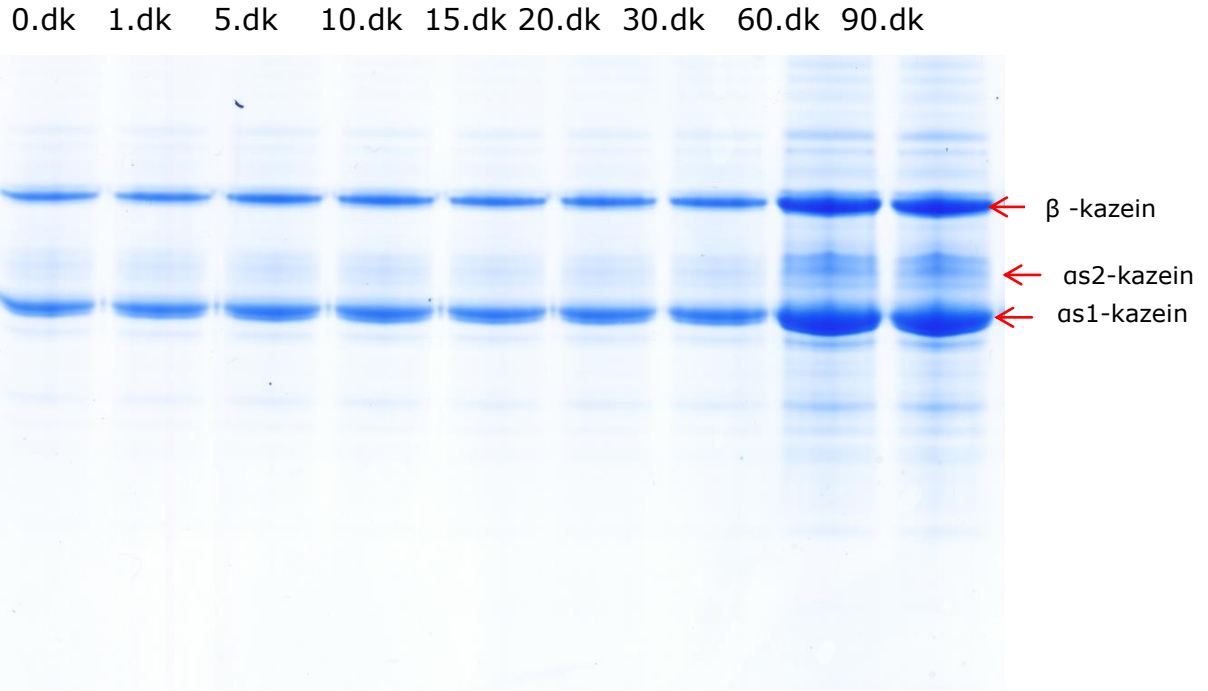
Çalışmada analiz edilen tüm örnekler için rennetlenme sürecinde değerlendirmeye alınan presipitatların protein profilindeki değişim de elektroforetik olarak incelenmiş ve farklı türlere ait jel görüntüleri Şekil 4.9- Şekil 4.12 de gösterilmiştir.



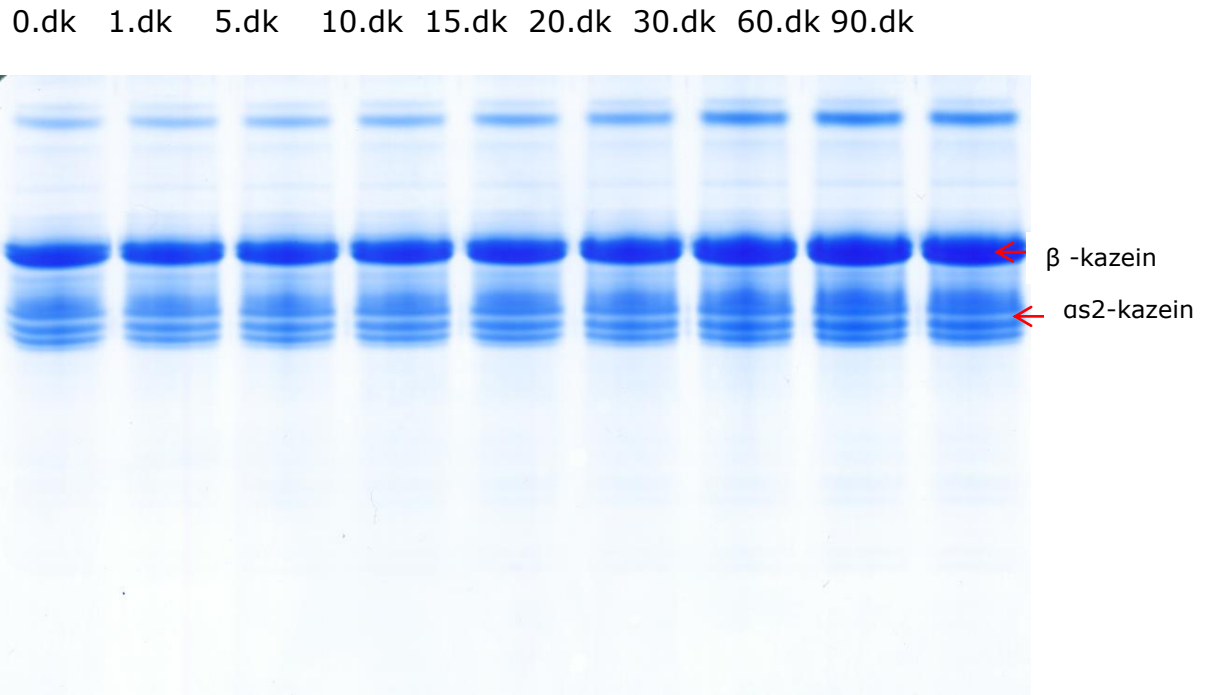
Şekil 4.8. İzole inek süt proteinleri ve analiz edilen farklı tür süt örneklerine ait ure-page elektroforetogramları.(1: α -kazein, 2: β -kazein, 3: κ -kazein, 4: α -laktalbumin, 5: β -laktoglobulin A, 6: β -laktoglobulin B, 7:inek sütü, 8:keçi sütü, 9:koyun sütü, 10:manda)

Rennetlenme süreci boyunca β -kazein derişimindeki değişim incelendiğinde, derişimdeki belirgin artışın manda sütünde diğer türlere göre daha erken ortaya çıktığı; koyun sütü örneklerinde ise bant genişliğindeki farkın en belirgin 60 ve 90. dakikalar arasında ortaya çıktığı görülmektedir. Keçi sütünde baskın kazein fraksiyonunun β -kazein olduğu, β -kazein bantlarının diğer türlere göre belirgin oranda geniş olduğu ve β -kazein derişimindeki artışın süreç boyunca az miktarda da olsa süreklilik de söylenebilir. Kazein fraksiyonlarındaki derişim değişiminin kantitatif olarak belirlendiği RP-HPLC analizi sonuçları ile üre-PAGE elektroforetogramları benzerlik göstermektedir.

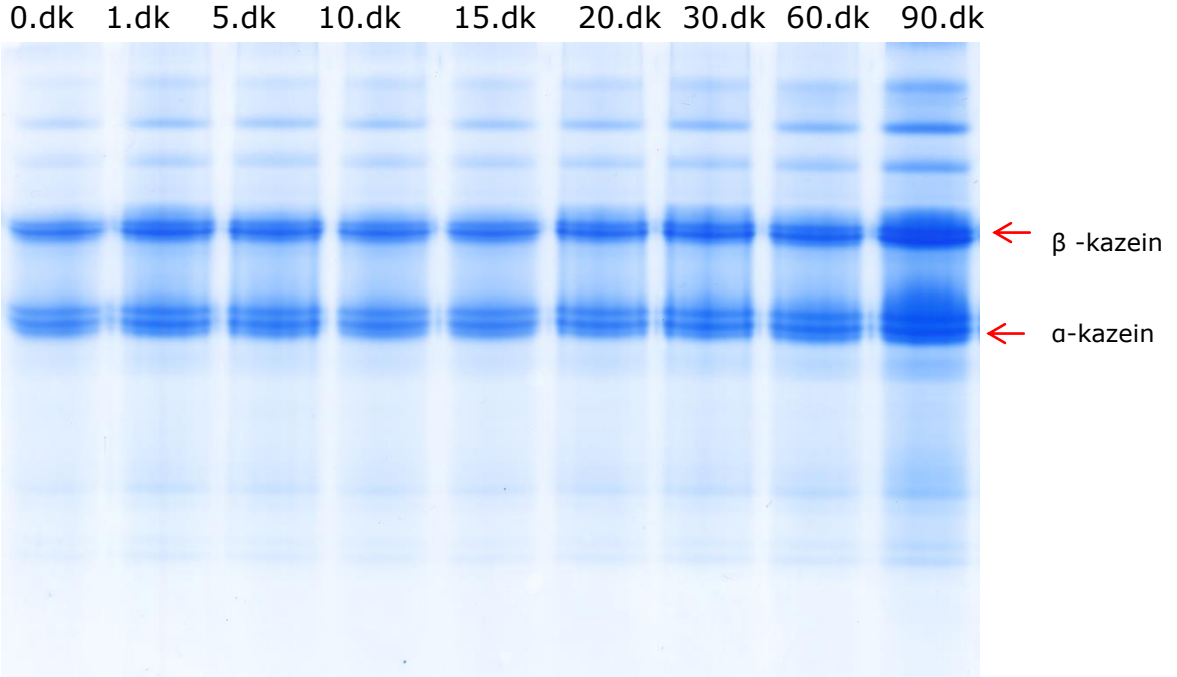
Rennetlenme süreci boyunca α -kazein konsantrasyonundaki değişim incelendiğinde yine üre-PAGE jel görüntülerinin RP-HPLC ile elde edilen sonuçlar ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Keçi sütü hariç, diğer türler için α -kazein içeriğindeki değişim β -kazein ile benzerlik göstermektedir.



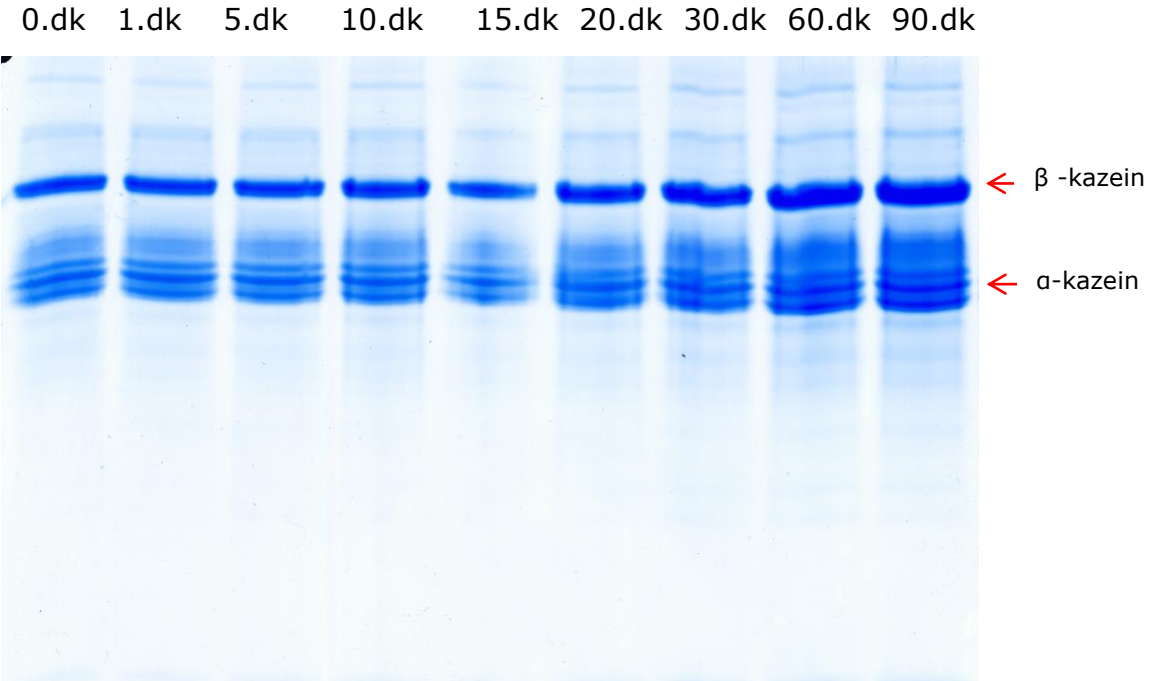
Şekil 4. 9. İnek sütünün rennetlenme süreci boyunca protein profilindeki değişimi gösteren üre-PAGE elektroforetogramı.(jel görüntüleri)



Şekil 4. 10. Keçi sütünün rennetlenme süreci boyunca protein profilindeki değişimi gösteren üre-PAGE elektroforetogramı.(jel görüntüleri)



Şekil 4. 11. Koyun sütünün rennetlenme süreci boyunca protein profilindeki değişimi gösteren üre-PAGE elektroforetogramı.(jel görüntüleri)



Şekil 4. 12. Manda sütünün rennetlenme süreci boyunca protein profilindeki değişimi gösteren üre-PAGE elektroforetogramı.(jel görüntüleri)

5.TARTIŞMA

Tez kapsamında kullanılan süt örneklerinin, genel bileşimleri açısından değerlendirilebilir karakterde olduğu açıktır (Bkz. Çizelge 4.1).

Rennetlenme sürecinin kinetik olarak değerlendirilmesi amacıyla yararlanılan protein yüzey hidrofobitesindeki değişimlerin de anlamlı olduğu düşünülmektedir.

Hidrofobisite verileri açısından, protein derişiminden bağımsız olarak, protein yüzeyindeki hidrofobik kısımların sayısının inek sütünde en fazla olduğu belirgindir (Bkz. Çizelge 4.3). Anılan hidrofobik kısımların sayısının, rennetlenme süreci açısından κ -kazeinin hidrolizi sonrası gerçekleşecek olan flokülasyon aşaması açısından belirleyici olduğu düşünülmektedir [94]. Ancak sadece bu veri açısından değerlendirme yapmak pek doğru değildir. Çünkü proteinlerin birbirine olan mesafesi (bir anlamda derişimi), misel boyutu ve bütünlüğü (kompakt yapısı) vb. nitelikler de flokülasyon sürecinde etkilidir [53, 95].

Çalışma kapsamında incelenen farklı türlere ait örneklerden, yüzey hidrofobik kısımların sayısı inek sütünde en yüksek olmakla beraber, bu kısımların hidrofobik bağlanma afinitesi (eğilimi) en yüksek inek sütünde değil, manda sütünde gözlenmiş; inek sütü bunu izlemiş ve en düşük koyun sütünde saptanmıştır. Koyun sütü ayrıca en düşük bağlanma sıklılığını gösteren tür olmuştur. Protein yüzey hidrofobitesinin protein derişimi ve sıklıkla birlikte değerlendirildiği, bir anlamda toplam hidrofobisite olarak adlandırılabilcek olan indeks değeri (PYHI) de en yüksek inek sütünde, en düşük koyun sütünde gözlenmiştir.

K_d , etkin bir bağlanmanın oluşabilmesi için gerekli olan ANS derişimi olarak tanımlanabilir. Bu anlamda protein sisteminin kararlı bir organizasyona ulaşabilmesi için gereken yüzey hidrofobik kısımların sayısı olarak nitelendirilebilir. Bu tez kapsamında yürütülen denemeler açısından bakıldığında da K_d , protein sisteminin rennetle koaglasyon sürecini nitelerken de anlamlı bir veri olarak değerlendirilebilir. Bir

proteinin yüksek K_d değerine sahip olması, belirli bir bağlanma afinitesine ulaşılabilmesi için gereken ANS derişiminin yüksek olması, bir başka deyişle yüzey hidrofobik kısımlara görece çok sayıda gerek duyması anlamına gelmektedir.

K_d değeri yüksek olan süt türünün protein sistemi, rennetlenme sürecinde kararlı bir organizasyona ulaşabilmek için daha fazla bağlanma bölgesine ve hidrofobik bağ sayısına ihtiyaç duyacaktır. Bu bağlamda, rennetlenme sürecinde flokulasyon aşamasına hâkim olan protein-protein bağlanmalarının sayısının en yüksek olması gereken tür koyun sütüdür ve koyun sütünü sırası ile inek ve keçi sütü izlemektedir. Sürecin tamamlanmasında en az sayıda bağlanma bölgesine ihtiyaç duyan türün ise manda sütü olduğu gözlenmiştir.

Turnover sayısı (k_{cat} , s^{-1}) ile optimum koşullar altında bağlanmanın oluşumuna ilişkin doğrudan bir değerlendirme yapılabileceği sanılmaktadır. Birim bağlanma hızı olarak nitelendirilebilecek bu değerin resiprokali ($1/k_{cat}$) iki hidrofobik kısmın bağlanabilmesi için gerekli süre olarak tanımlanabilir. İncelenen türlerin süt protein sistemine bakıldığında bir bağlanma sürecinin tamamlanması için gereken süre en kısa manda sütünde gözlenmiş ve onu artarak koyun, keçi ve inek sütleri izlemiş (Çizelge 4.3.) ve birim zamanda gerçekleşen bağlanma düzeyinin türler arasındaki farkı önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Ancak bu süre, sadece iki hidrofobik bölgenin bağlanabilmesi için gerekli olan süre olduğundan ve incelenen farklı orijinlerden süt örneklerindeki protein derişimi ve miseller arası uzaklık da farklı olduğundan direkt olarak $1/k_{cat}$ değerlerini toplam flokülasyon süresi ile bağdaştırmak doğru olmayacaktır. Ayrıca kazein misellerinin ortamda sayıca fazla olması, enzim kinetiği açısından "turnover" sayısının da yüksek olması anlamına gelmemektedir. Burada "turnover" sayısı katalitik sabit olarak (k_{cat}) değerlendirilmelidir (Bkz. Çizelge 4.3).

Tez kapsamında incelenen süt örneklerinin rennetlenme süreçleri, hidrofobisite parametresiyle değerlendirildiğinde keçi-manda sütü ile

inek-koyun sütlerinin birbirine benzer eğilim gösterdiği gözlenmiştir (Bkz. Şelik 4.4 ve Şekil 4.5).

Rennetlenme süreci iki aşamada (enzimatik faz ve flokülasyon fazı) değerlendirilecek olursa, her iki aşama da incelenen türlerde en hızlı manda sütünde tamamlanmıştır. Bunu ilk aşamada sırasıyla keçi, koyun ve inek sütleri; ikinci aşamada inek, koyun ve keçi sütleri izlemiştir. Rennetlenme süresinin tamamlanması da hemen hemen aynı sıra ile gerçekleşmiştir. Ancak manda sütünde gözlemlenen sıra dışı durumu, genelde değerlendirildiği gibi, protein içeriğine bağlamak pek doğru değildir. Koyun sütünün, protein içeriği en yüksek tür olmasına karşın, inek ve keçi sütünden görece kısa bir rennetlenme süresine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum, rennetlenme sürecinin protein derişiminin yanı sıra, proteinlerin fiziksel ve kimyasal karakteri tarafından da denetlendiği sonucunu akla getirmektedir.

İnek sütünün görece yavaş bir enzimatik faz izlemesi, görece düşük protein derişiminin sonucu olarak değerlendirilebilir gibi görünmektedir. Miseller arası mesafenin uzun olması sonucu dışında bir değerlendirme de pek olası görünmemektedir.

Ayrıca protein derişiminin yüksek olması, hidrofobik yüzey kısımlarının da daha fazla sayıda olacağı anlamına gelmemektedir. Nitekim %3,5 protein içeren inek sütü 96 birim hidrofobik kısma sahipken; %5,5 protein içeren koyun sütü 50 birim hidrofobik kısım içermektedir. Bu durum, koyun sütü kazein misellerinin görece kompakt bir yapıya evrildiği ve hidrofobik kısımların bu yapı içerisine gömülü olduğu, ya da bu yapının organizasyonunda kullanıldığı kanısını doğurmaktadır. Koyun sütünün daha kompakt bir misel yapısına sahip olmasının, inek sütüne göre daha hızlı enzimatik, ancak daha yavaş flokülasyon sürecine sahip olmasını da açıklayabileceği kanısı doğmuştur. Daha kompakt misel yapısı, daha kısa "collision" mesafesi ve enzimin daha süratli çalışabileceği sonucunu da getirebilir. Ancak hidrofobik kısımlarda $F_{max}/[P]$ sayısındaki düşüklüğün, beraberinde hidrofobik bağlanmaların

hakim olduğu flokülasyon sürecinin uzamasına neden olabileceği düşünölmektedir. Toplam rennetlenme süreci açısından inek ve koyun sütü arasında önemli bir farklılık görünmese de, yukarıda açıklanan faz farklılıklarının, jelin reolojik yapısında farklılığa neden olabileceği düşünölebilir, ancak bu başka bir araştırmanın konusudur.

İnek sütü ile karşılaştırıldığında, keçi sütünün inek sütüne en yakın hidrofobisite parametrelerine sahip olan tür olduğu görölmektedir (Bkz. Çizele 4.3). Aradaki farklılığın nedeni koyun sütü için yapılan açıklamalar ile uyumludur. Yukarıda açıklanan farklılık, belirli ölçüde inek ve keçi sütü arasındaki farklılıklar için de kısmen geçerlidir. Ancak keçi sütünün protein yapısı bu tez kapsamında açıklanamamış olmakla beraber, misel yapısındaki farklılıklar enzimatik fazın ve toplamda rennetlenme süresinin inek sütündekinden daha kısa olmasına neden olmuş olabilir [43]. Keçi sütü ile inek sütü arasındaki aynı olgu, çok belirgin biçimde manda sütü için de geçerlidir.

Tez kapsamında uygulanan koagölasyon denemesinde, yöntem gereği, floküle ve koagüle olan kazein misellerinin artan kütleleri nedeniyle, uygulanan santrifüj kuvvetinin etkisi sonucu presipitatta toplanma eğilimi gözlenmiştir. İncelenen presipitatlarda, rennetlenme sürecinde, zamana bağlı olarak presipitatlardaki protein ve hidrofobisitesi değerlendirilmiştir. Teorik olarak floküle ve koagüle olan misel yapı, bu süreçleri protein-protein bağlanmaları ve hidrofobik bağlanmalar ile gerçekleştirmektedir [54]. Dolayısıyla, sütün protein yapısı ve hidrofobisitesine bağlı gerçekleşen ve arta kalan hidrofobik kısımların sayısı (bağlanan ANS derişimi) bir değerlendirme yapma olanağı sağlayacağı düşünölmüştür.

Rennetle koagölasyon sürecinde elde edilen presipitatların ANS bağlama eğilimi Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8' de verilmiştir. Süreç, bağlanmadan arta kalan hidrofobik kısımların sayısı (ANS partitasyonu) açısından değerlendirildiğinde, yine en kısa rennetlenme süresi manda sütünde

gözlenmiş, onu keçi, koyun ve inek sütü izlemiştir. Bu değerlendirmede protein derişimleri arasındaki fark elimine edilememektedir.

Rennetlenmenin enzimatik fazının görece hızlı gözlemlenmesinin bu parametre açısından değerlendirilmesi, protein partitasyonu ile yapılan değerlendirmeden kısmen farklı olmak durumundadır. Çünkü süreçte zamana bağlı ANS bağlanabilecek "port" sayısının değişimi, bir anlamda flokülasyona açık bölgelerin derişimini nitellemektedir.

ANS partitasyonu açısından inek sütü ile koyun sütünde gözlenen kinetik veriler, protein partitasyonunun değerlendirilmesiyle elde edilen verilerden farklılık göstermekle beraber, aynı eğilimler gözlenmiştir. Hidrofobik portların agregasyonu sürecinde gözlemlendiği bu deneme sonuçları da inek sütü ve keçi sütü arasında belirgin bir farklılık ortaya koymuştur. Kabaca aynı protein derişimi ve hidrofobik yapıya sahip olan inek ve keçi sütleri, rennetlenme sürecindeki ANS partitasyonu değerlendirildiğinde de benzer sonuçlar vermiş ve keçi sütü inek sütüne göre daha hızlı bir rennetlenme süreci sergilemiştir.

Bu tez kapsamında incelenen sütler içerisinde, tüm verileri göz önüne aldığımızda bir "rennetlenme performansı" değerlendirecek olursak, manda sütü en yüksek rennetlenme performansını sergileyen tür olmuştur. Onu sırasıyla keçi, koyun ve inek sütleri izlemiştir. Ancak koyun sütü protein derişimi ve niteliklerine göre inek sütüne en yakın rennetlenme kinetiğini izlemiştir. Rennetlenme sürecinde, süre açısından yapılan bu değerlendirmenin, reoloji açısından da izlenmesi zorunludur. Bu koşulda daha anlamlı bir sonuca ulaşmanın mümkün olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Fox, F.P., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P., *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology Volume 1: General Aspects*, 2.Edition, Aspen Publishers Inc., Maryland, **1999**.
- [2] Clark, S., Sherbon, J.W., Alphas1-casein, milk composition and coagulation properties of goat milk, *Small Ruminant Research*, 38, 123-134, **2000**.
- [3] Green, M.L., Morant, S.V., Mechanism of aggregation of casein micelles in rennet treated milk, *Journal of Dairy Research*, 48, 57-63, **1981**.
- [4] Walstra, P., On the stability of casein micelles, *Journal of Dairy Science*, 73, 1965-1979, **1990**.
- [5] Klandar, A.H., Lagaude, A., Chevalier-Lucia, D., Assessment of the rennet coagulation of skim milk: A comparison of methods, *International Dairy Journal*, 17, 1151-1160, **2007**.
- [6] Storry, J.E., Grandison, A.S., Millard, D., Owen, J., Ford, G.D., Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminant, *Journal of Dairy Research*, 50, 215-229, **1983**.
- [7] Gatti, C.A., Risso, P.H., Pires, M.S., Spectrofluorometric study on surface hydrophobicity of bovine casein micelles in suspension and during enzymic coagulation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2339-2344, **1995**.
- [8] Yuksel, Z., Avci, E., Erdem, Y.K., Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins, *Food Chemistry*, 121, 450-456, **2010**.
- [9] Fox, F.P., McSweeney, P.L.H., *Advanced Dairy Chemistry Volume 1: Proteins*, 3. Edition, Kluwer Academic- Plenum Publishers, New York, **2003**.
- [10] FAO, FAO Statistics Division 2011 Total Milk Production, <http://faostat.fao.org/site/569/default.aspx#ancor> (Mart **2013**).
- [11] Walstra, P., Jenness, R., *Dairy Chemistry and Physics*, John Wiley and Sons Inc., New York, **1984**.
- [12] Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J., *Dairy Science and Technology*, 2. Edition, CRC Press, Newyork, **2006**.
- [13] Hui, Y.H., *Dairy Science and Technology Handbook*, Wiley WCH, USA, **1993**.
- [14] Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., Chilliari, Y., Composition of goat and sheep milk products: An update, *Small Ruminant Research*, 79, 57-72, **2008**.
- [15] FAO, FAO Statistics Division 2011, Buffalo Milk (whole, fresh) Production <http://faostat.fao.org/site/569/default.aspx#ancor>. (Mart **2013**)

- [16] Addeo, F., Alloisio, V., Chianese, L., Tradition and innovation in the water buffalo dairy products, *Italian Journal of Animal Science*, 6, 51–57, **2007**.
- [17] Juarez, M., Ramos, M., Physico-chemical characteristics of goat milk as distinct from those of cow milk, *IDF Seminar Production and Utilization of Ewe's and Goat's Milk*, Bulletin No: 202. Athens, 54–67, **1986**.
- [18] Park, Y.W., Juarez, M., Ramos, M., Haenlein, G.F.W., Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 88–113, **2007**.
- [19] Anifantakis, E.M., Comparison of the physico-chemical properties of ewe's and cow's milk, *IDF Seminar Production and Utilization of Ewe's and Goat's Milk*, Athens, Greece, September 23–25, International Dairy Federation Publication, Brussels, Bulletin No: 202, 42–53, **1986**.
- [20] Ahmad, S., Anjum, F.M., Huma, N., Sameen, A., Zahoor, T., Composition and physico-chemical characteristics of buffalo milk with particular emphasis on lipids, proteins, minerals, enzymes and vitamins, *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 23, 62–74, **2013**.
- [21] Jandal, J.M., Comparative aspects of goat and sheep milk, *Small Ruminant Research*, 22, 177–185, **1996**.
- [22] Ramos, M., Juarez, M., Sheep milk, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, (eds: Roginski, H., Fuquay, J.W., Fox, P.F.), Academic Press, Amsterdam, 2539–2545, **2003**.
- [23] Mehaia, M.A., The fat globule size distribution in camel, goat, ewe and cow milk, *Milchwissenschaft*, 50, 260–263, **1995**.
- [24] Ménard, O., Ahmad, S., Rousseau, F., Briard-Bion, V., Gaucheron, F., Lopez, C., Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane, *Food Chemistry*, 120, 544–551, **2010**.
- [25] Barłowska, J., Sz wajkowska, M., Litwinczuk, Z., Krol, J., Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 291–302, **2011**.
- [26] Walstra, P., Jenness, R., *Dairy chemistry and physics*, John Willey and Sons Inc., New York, 407 p., **1984**.
- [27] Payens, T.A.J., Stable and unstable casein micelles, *Journal of Dairy Science*, 65, 1863–1873, **1982**.
- [28] McKenzie, H.A., Milk proteins: chemistry, physics and molecular biology, Academic Press, London, **1970**.
- [29] Fox, P.F., Heat induced coagulation of milk, *Developments of Dairy Chemistry*, Applied Science Publishers, Essex, 189–227, **1982**.

- [30] Wong, D.W.S., Camirand, W.M., Pavlath, A.E., Structures and functionalities of milk proteins, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 8, 807-844, **1996**.
- [31] Tanford, C., *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*, John Wiley and Sons Inc, New York, **1980**.
- [32] Nakai, S., Li-Chan, E., Argeta G.E., Measurement of surface hydrophobicity, *Methods of Testing Protein Functionality* (eds: Hall, G.M.), Chapman and Hall, UK, 226-256, **1996**.
- [33] Hiller, B., Lorenzen, P.C., Surface hydrophobicity of physicochemically and enzymatically treated milk proteins in relation to techno-functional properties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 461-468, **2008**.
- [34] Keshavarz, E., Nakai, S., The relationship between hydrophobicity and interfacial tension of proteins, *Biochimica et Biophysica Acta*, 576, 269-279, **1979**.
- [35] Kato, A., Nakai, S., Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties, *Biochimica et Biophysica Acta*, 624, 13-20, **1980**.
- [36] Shimizu, M., Saito, M., Yamauchi, K., Hydrophobicity and emulsifying activity of milk proteins, *Agricultural and Biological Chemistry*, 50, 791-792, **1986**.
- [37] Fox, F.P., McSweeney, P.L.H., *Dairy Chemistry and Biochemistry*, Blackie Academic & Professional, London, **1998**.
- [38] Schmidt, D.G., Payens, T.A.J., Micellar aspects of casein: surface and colloidal science, vol 9, John Wiley and Sons Inc, NY, 165-229, **1976**.
- [39] Wagner, J. R., Guéguen, J., Surface functional properties of native, acid-treated and reduced soy glycinin. 2. Emulsifying Properties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2181-2187, **1999**.
- [40] Erdem, Y.K., Influence of ultrafiltration on modification of surface hydrophobic sites of the milk protein system in the course of renneting, *Journal of Food Engineering*, 44, 63-70, **2000**.
- [41] Yuksel, Z., Avci, E., Uymaz, B., Erdem, Y.K., General composition and protein surface hydrophobicity of goat, sheep and cow milk in the region of Mount Ida, *Small Ruminant Research*, 106, 137-144, **2012**.
- [42] Brule, G., Lenoir, J., Remeuf, F., The casein micelle and milk coagulation. *Cheese making from science to quality assurance* (eds: Eck, A., Gillis J.C.), Lavoisier Publishing, Paris, **2000**.
- [43] Bornaz, S., Sahli, A., Attalah, A., Attia, H., Physicochemical characteristics and renneting properties of camels' milk: A comparison with goats', ewes' and cows' milks, *International Journal of Dairy Technology*, 62, 505-513, **2009**.
- [44] Ahmad S., *Understanding of the molecular changes in casein micelles of buffalo milk as a function of physico-chemical*

- conditions: a comparison with cow milk*, PhD Thesis, Agrocampus Ouest-INRA, France, **2010**.
- [45] Feligini, M., Bonizzi, I., Buffoni, J. N., Cosenza, G., Ramunno, L., Identification and quantification of α -s₁, α -s₂, β , and κ -caseins in water buffalo milk by reverse phase-high performance liquid chromatography and mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2988–2992, **2009**.
- [46] Bonfatti, V., Giantin, M., Rostellato, R., Dacasto, M., Carnier, P., Separation and quantification of water buffalo milk protein fractions and genetic variants by RP-HPLC, *Food Chemistry*, 136, 364–367, **2013**.
- [47] Ganguli, N.C., State of the casein micelle in buffalo milk, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 27, 258-272, **1973**.
- [48] Buffoni, J.N., Bonizzi, I., Pauciullo, A., Ramunno, L., Feligini, M., Characterization of the major whey proteins from milk of Mediterranean water buffalo (*Bubalus bubalis*), *Food Chemistry*, 127, 1515–1520, **2011**.
- [49] Lucey, J.A., Milk protein gels, *Milk Proteins From Expression to Food* (Eds.: Thompson, A., Boland, M., Singh, H.), Academic Press Inc., **2009**.
- [50] Tamime, A., *Fermented Milks*, Blackwell Publication, ??, **2006**.
- [51] Lucey, J.A., Singh, H., Formation and physical properties of acid milk gels: a review, *Food Research International*, 30, 529 – 42, **1998**.
- [52] Ng-Kwai-Hang, K.F., Politis, I., Cue, R.I., & Marzali, A.S., Correlations between coagulation properties of milk and cheese yielding capacity and cheese composition, *Journal of Canadian Institute of Food Science and Technology*, 22, 291–294, **1989**.
- [53] Walstra, P., On the stability of casein micelles, *Journal of Dairy Science*, 73, 1965–1979, **1990**.
- [54] Lucey, J.A., Formation and physical properties of milk gels, *Journal of Dairy Science*, 85, 281–294, **2002**.
- [55] Dalgleish, D. G., The enzymatic coagulation of milk. *Advanced Dairy Chemistry. Proteins Vol. 1* (Ed.: Fox, P.F.) Elsevier Applied Science Publishers, London, **1992**.
- [56] Noble, P.W., *Fundamentals of Dairy Chemistry*, Aspen Publishers Inc., Maryland, **1999**.
- [57] Jacob, M., Jaros, D., Rohm, H., Recent advances in milk clotting enzymes, *International Journal of Dairy Technology*, 64, 14–33, **2011**.
- [58] Foltmann, B., Prochymosin and chymosin (prorennin and rennin), *Methods in Enzymology*, 19, 421-437, **1970**.
- [59] McMahon D.J., Brown R.J., Enzymic coagulation of casein micelles: a review, *Journal of Dairy Science*, 67, 919-929, **1984**.
- [60] Dalgleish D.G., Measurement of electrophoretic mobilities and zeta potentials of particles from milk using laser doppler

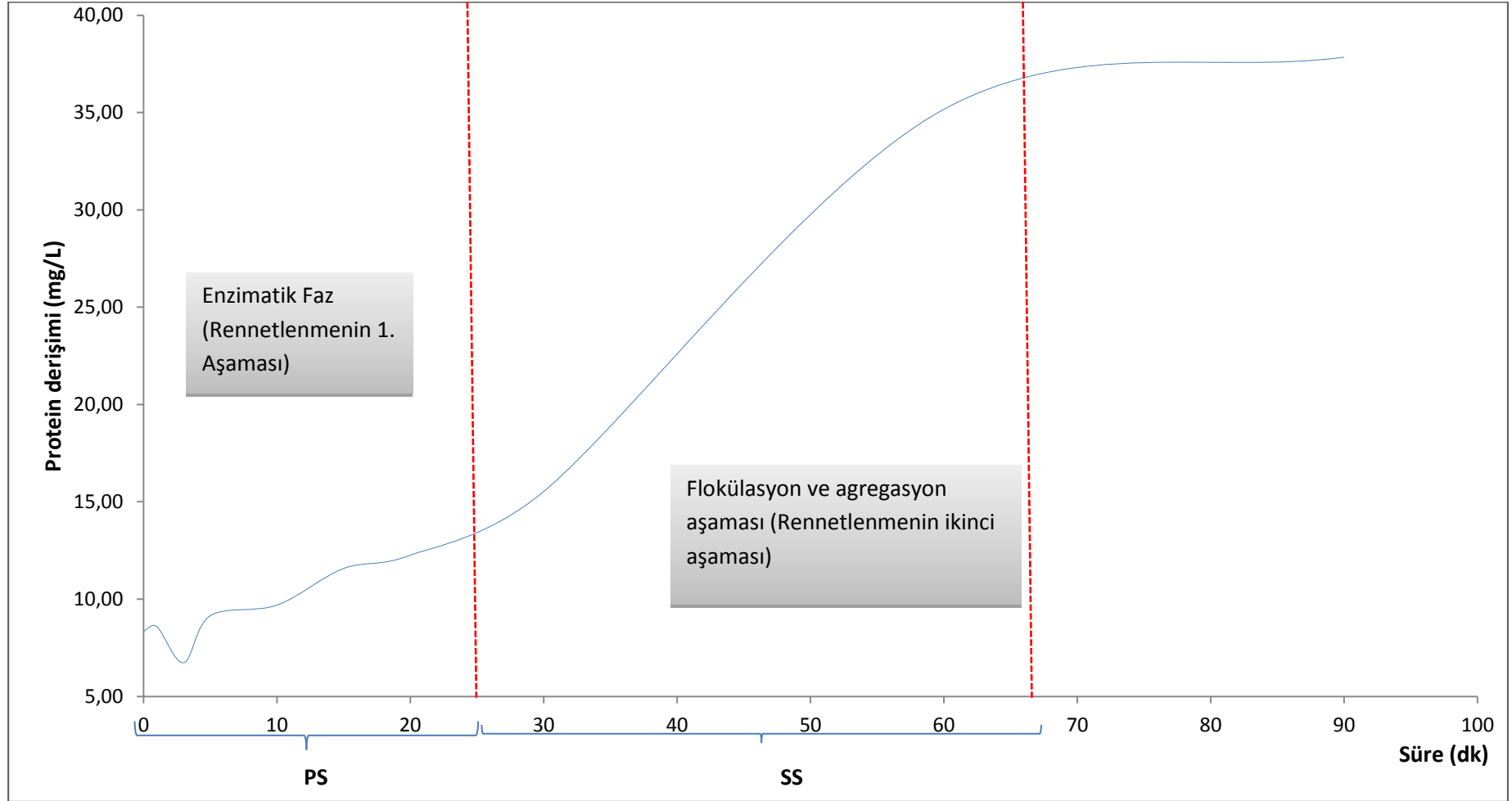
- electrophoresis, *Journal of Dairy Research*, 51, 425-438, **1984**.
- [61] Brule, G., Lenoir, J., The coagulation of milk. *Cheesemaking Science and Technology* (Ed.: Eck, A.) Lavoisier publishing, Newyork,USA, **1986**.
- [62] Hayaloğlu, A.A., Özer, B., *Peynir Biliminin Temelleri*, Sidaş medya, İzmir, **2011**.
- [63] van Hooydonk, A.C.M., Boerrigter, I.J., Hagcdoorn, H.G., pH-induced physicochemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. 2. Effect of pH on renneting of milk, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 40, 297-313, **1986**.
- [64] Anema, S.G., Lee, S.K., Klostermeyer, H., Rennet induced aggregation of heated pH adjusted skimmilk, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 8413-8422, **2011**.
- [65] Horne, D.S., Casein interactions: casting light on the black box, the structure in dairy products, *International Dairy Journal*, 8, 171 -177, **1998**.
- [66] Akin, N., *Temel Peynir Bilimi-I*, Damla Ofset, Konya, **2010**.
- [67] van Hooydonk, A.C.M., Walstra, P., Interpretation of the kinetics of the renneting reaction in milk, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 41, 19-47, **1987**.
- [68] Lopez, M.B., Lomhoit, S.B., Qvist, K.B., Rheological properties and cutting time of rennet gels. Effect of pH and enzyme concentration, *International Dairy Journal*, 8, 289-93, **1998**.
- [69] Lomholt, S.B., Woming, P., Ogendal, L., Qvist, K.B., Hyslop, D.B., Bauer, R., Kinetics of the renneting reaction followed by measurement of turbidity as a function of wavelength, *Journal of Dairy Research*, 65, 545-54, **1998**.
- [70] Chaplin, B., Green, M.L., Determination of proportion of k casein hydrolyzed by rennet on coagulation of skimmilk, *Journal of Dairy research*, 47, 351-358, **1980**.
- [71] van Hooydonk, A.C.M., Olieman, C., Hagedoom, H.G., Kinetics of the chymosin catalysed proteolysis of k-casein in milk, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 38, 207-, **1984**.
- [72] Gatt, S., Bartfai, T., Rate equations and simulation curves for enzymatic reactions which utilize lipids as substrates, II. Effect of adsorption of the substrate or enzyme on the steady state kinetics, *Biochimica et Biophysica Acta*, 56, 354-356, **1977**.
- [73] Green, M.L., Hobbs, D.G., Morant, S.V., Hill, V.A., Intermicellar relationships in rennet treated separated milk. II. Process of gel assembly, *Journal of Dairy Research*, 45, 413-422, **1978**.
- [74] Ostensen, S., Foldager, J., Hermansen, J.E., Effects of stage of lactation, milk protein genotype and body condition at calving on protein composition and renneting properties of bovine milk, *Journal of Dairy Research*, 64, 207-219, **1997**.
- [75] Najera, A.I., de Renobales, M., Barron, L.J.R., Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-

- clotting properties of milk: A multifactorial study,*Food Chemistry*, 80,345–352, **2003**.
- [76] Clark, S.,*Associations between breed, age, lactation number, days in milk, season, month and percent protein in goat milk*, Master's Thesis, Cornell University, Ithaca, NY, **1993**.
- [77] Bonfatti, V.,Gervaso, M., Rostellato, R., Coletta, A., Carnier, P., Protein composition affects variation in coagulation properties of buffalo milk,*Journal of Dairy Science*, 96, 4182–4190, **2013**.
- [78] Remeuf, F., Lenoir, J., Duby, C., A study of the relations between physicochemical characteristics of goat milks and their renneting properties,*Lait*, 69, 499-518, **1989**.
- [79] Remeuf, F., Cossin, V., Dervin, C., Lenoir, J., Tomassone, R. Relationships between physicochemical characteristics of milks and their cheesemaking properties,*Lait*, 71, 397-421, **1991**.
- [80] Uniacke-Lowe, T., Chevalier, F., Hem, S., Fox, P.F., Mulvihill, D.M., Proteomic comparison of equine and bovine milks on renneting,*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(11), 2839-2850, **2013**.
- [81] Raynal, K.,Remeuf, F.,The Effect of Heating on Physicochemical and Renneting Properties of Milk: a Comparison between Caprine, Ovine and Bovine Milk,*International Dairy Journal*, 8, 695-706, **1998**.
- [82] Lenoir, J., Remeuf, F, Schneid, N., Rennetability of milk,*Cheese making from science to quality assurance* (Ed.: Eck, A., Gillis, J.C.), Lavoisier, Paris, **2010**.
- [83] Grandison, A., Causes of variation in milk composition and their effects on coagulation and cheese making, *Dairy Industries International*, 51, 21-24, **1986**.
- [84] Calvo, M.M., Influence of fat, heat treatments and species on milk rennet clotting properties and glycomacropeptide formation,*European Food Research Technology*, 214, 182–185, **2002**.
- [85] El-Salam, M.H.A.,El-Shibiny, S., A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk, *Dairy Science and Technology*, 91, 663-699, **2011**.
- [86] IDF, International Dairy Federation, Milk, cream and evaporated milk - Determination of total solids content (Reference method). IDF Standard 21B, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, **1987**.
- [87] IDF, International Dairy Federation, Determination of fat contents, gerber butyrometers. IDF Standard 105, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, **1981**.
- [88] IDF, International Dairy Federation, Dried milk- determination of titratable acidity (routine method), IDF Standard 81, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, **1977**.
- [89] Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of

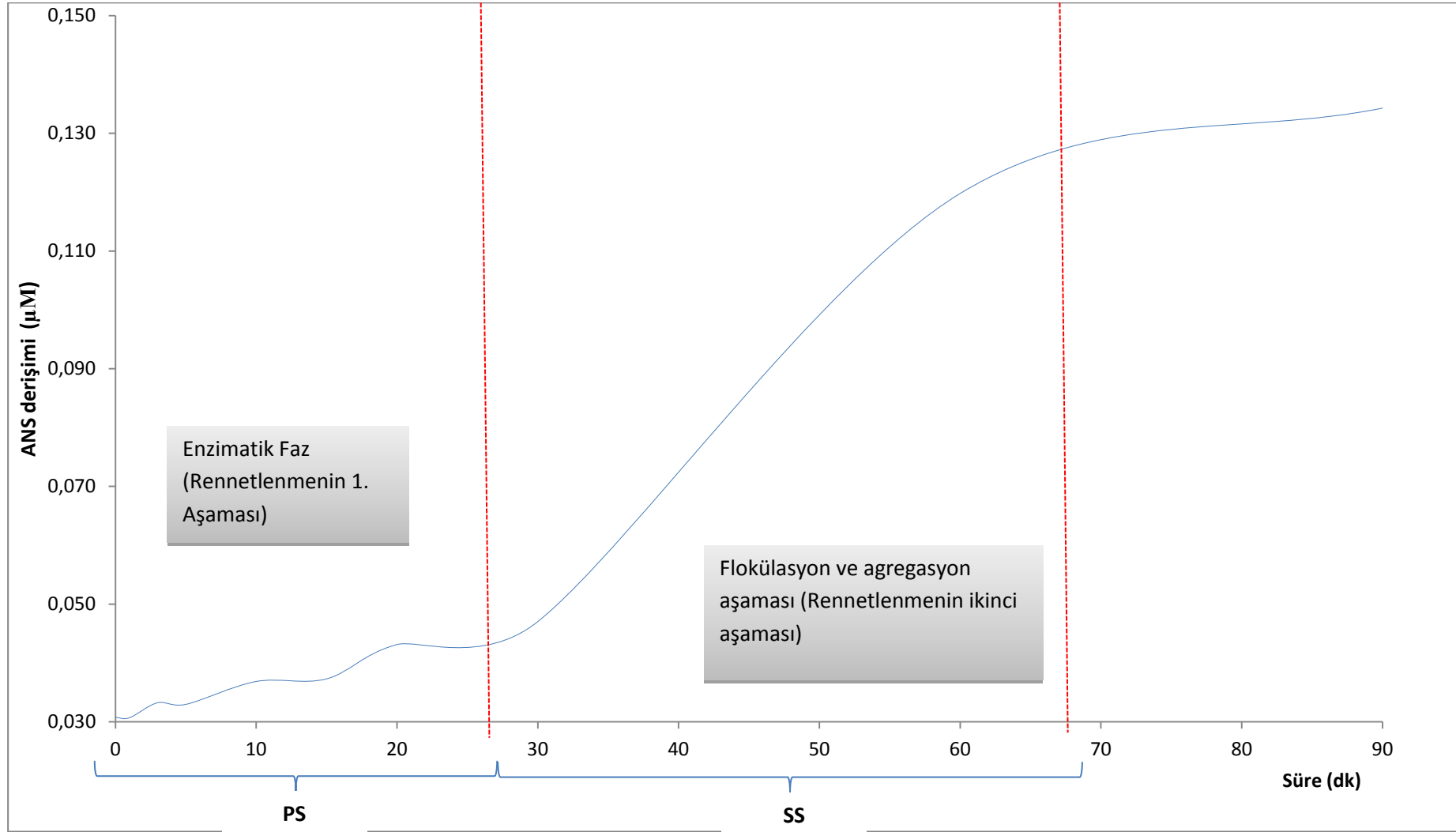
- protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254, **1976**.
- [90] Andrews, A.T., *Electrophoresis, Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications*, Oxford University Press, New York, **1987**.
- [91] Topçu, A., Hayaloğlu, A.A., Koca, N., *Peynir Analizleri, Temel Peynir Biliminin Temelleri*, (Eds.: Hayaloğlu, A.A, Özer, B.), Sidaş medya, İzmir, **2011**.
- [92] Bonomi, F., Iametti, S., Pagliarini, E., Peri, C., A spectrofluorimetric approach to the estimation of the surface hydrophobicity modifications in milk proteins upon thermal treatment, *Milchwissenschaft*, 43, 281-285, **1988**.
- [93] Pagliarini, E., Iametti, S., Peri, C., Bonomi, F., An analytical approach to the evaluation of heat damage in commercial milks, *Journal of Dairy Science*, 73, 41-44, **1990**.
- [94] Peri, C., Pagliarini, E., Iametti, S., Bonomi, F., A study of surface hydrophobicity of milk proteins during enzymic coagulation and curd hardening, *Journal of Dairy Research*, 57, 101-108, **1990**.
- [95] Mellema, M., Leermakers, F.A.M., de Kruif, C.G., Molecular mechanism of the renneting process of casein micelles in skim milk, examined by viscosity and light-scattering experiments and simulated by model SCF calculations, *Langmuir*, 15, 6304-6313, **1999**.

EKLER

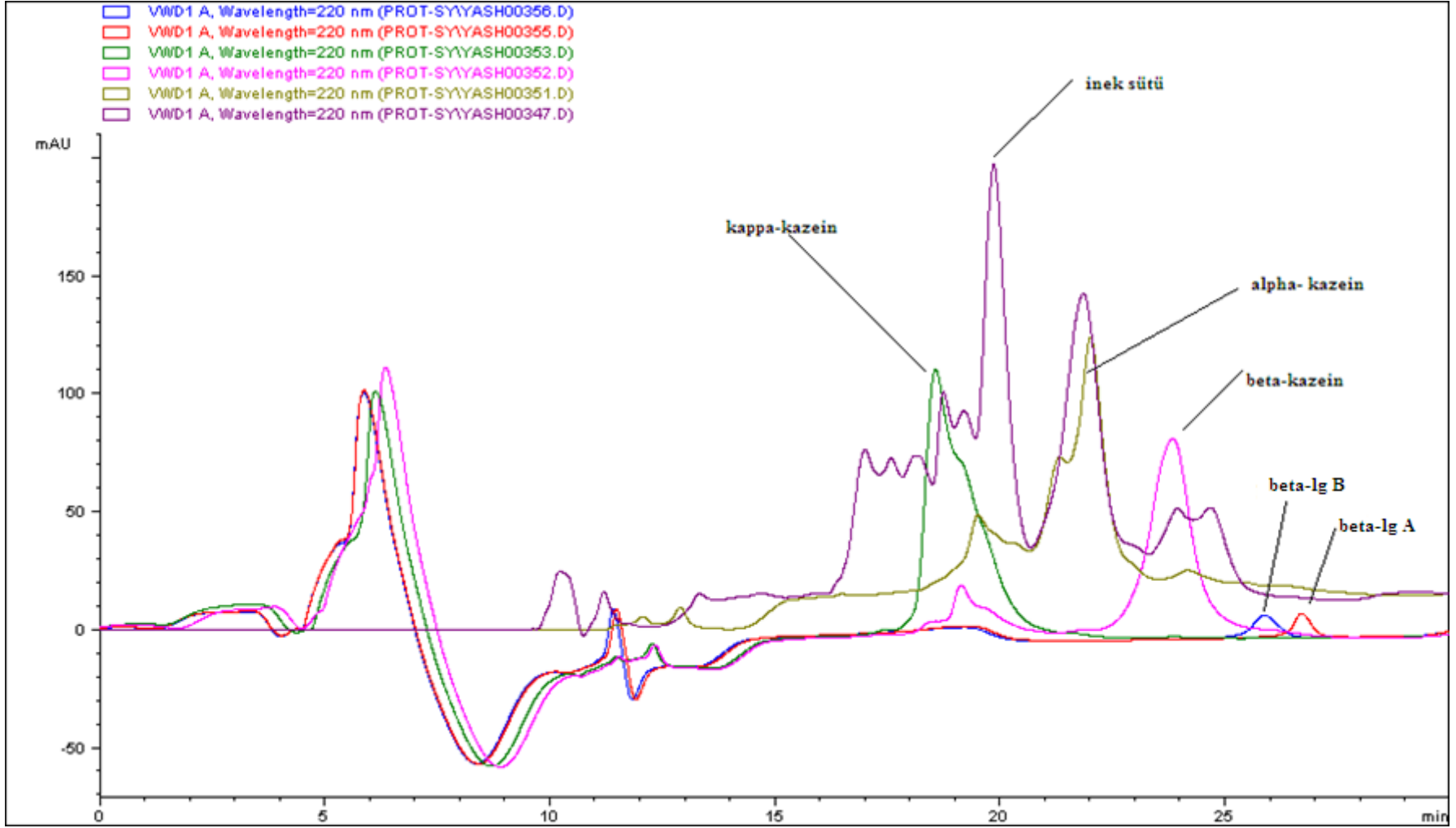
EK 1. Rennetlenme süresi boyunca koyun sütünden zamana karşı elde edilen presipitatlarda protein dağılımı eğrisi



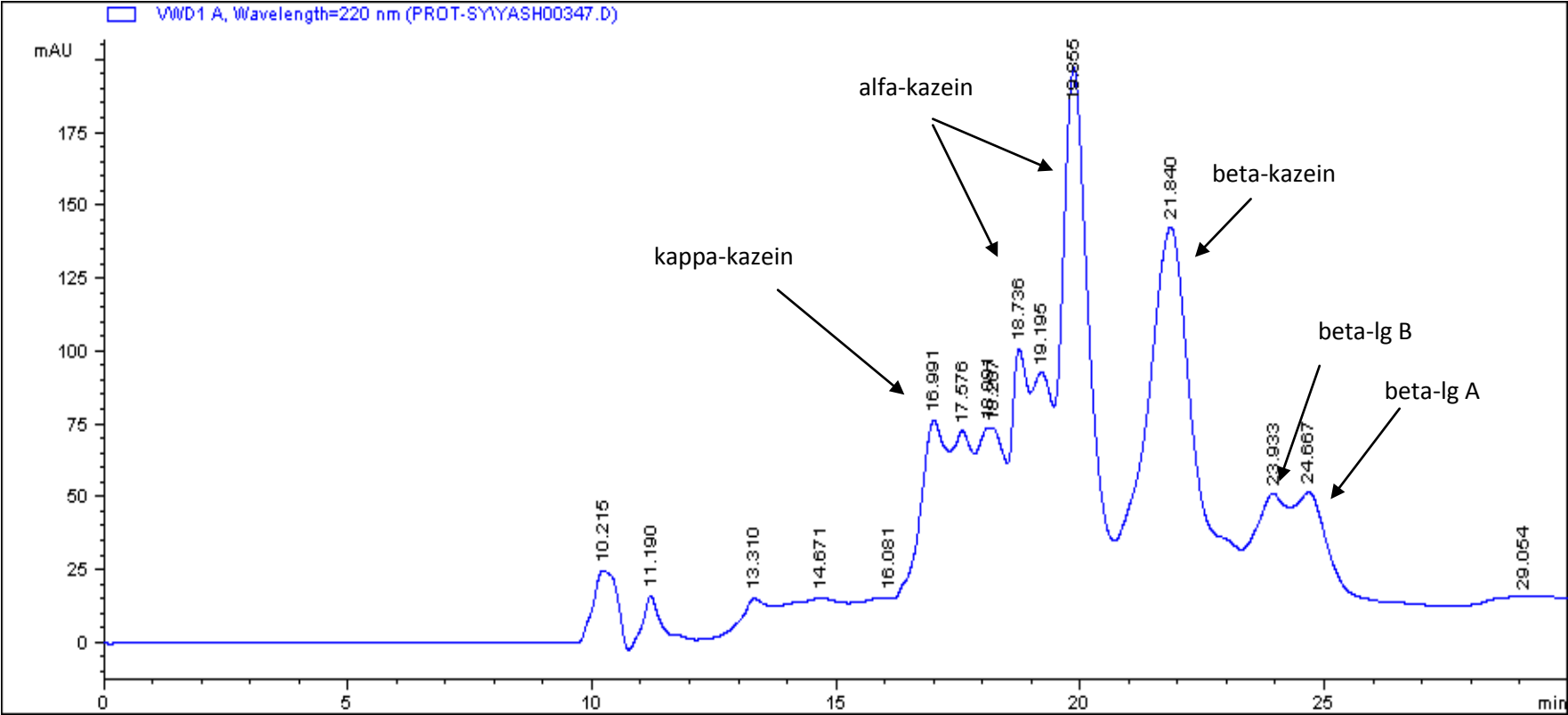
Ek 2. Rennetlenme süresi boyunca inek sütünden zamana karşı elde edilen presipitatlarda ANS bağlanma eğrisi



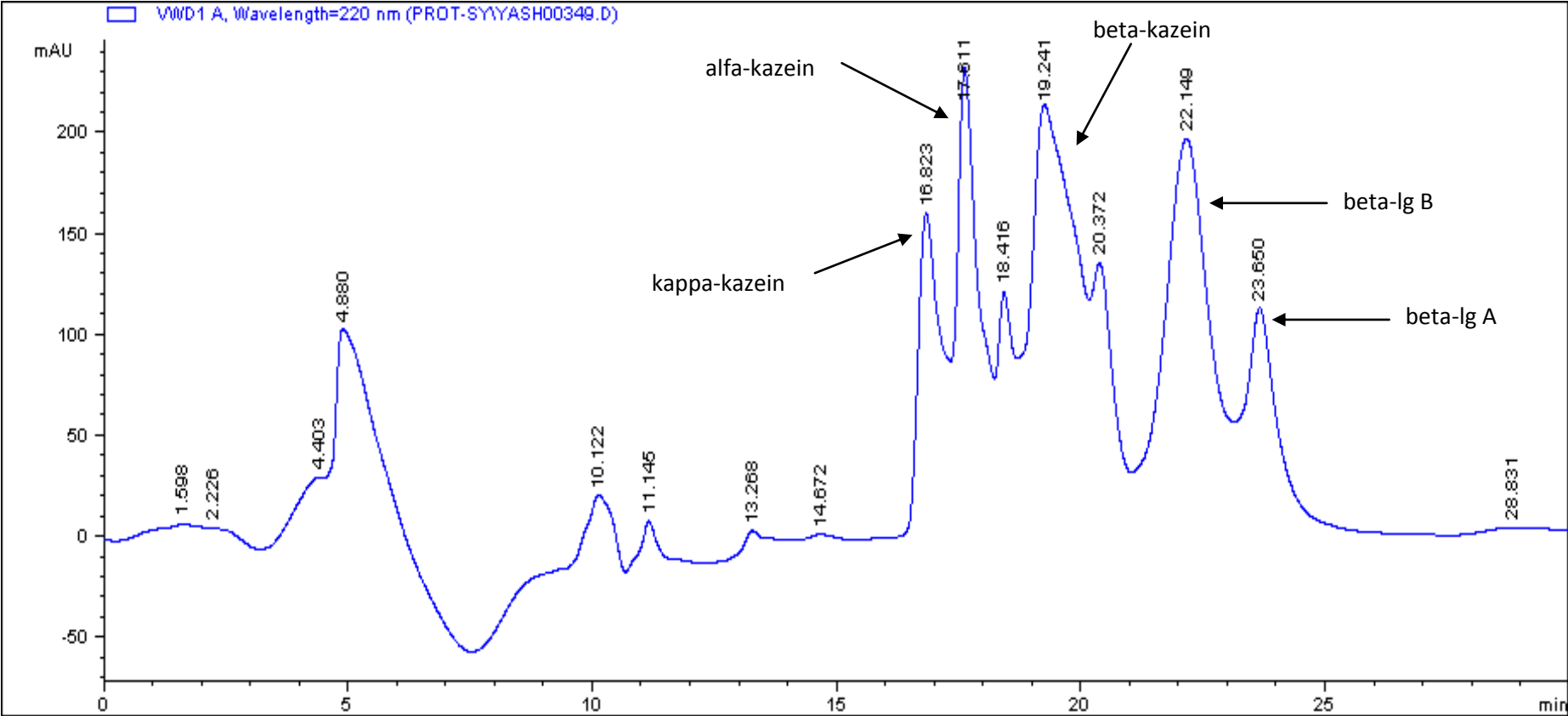
Ek 3. İnek sütü protein standartları ve inek sütüne ait RP-HPLC kromotogramları



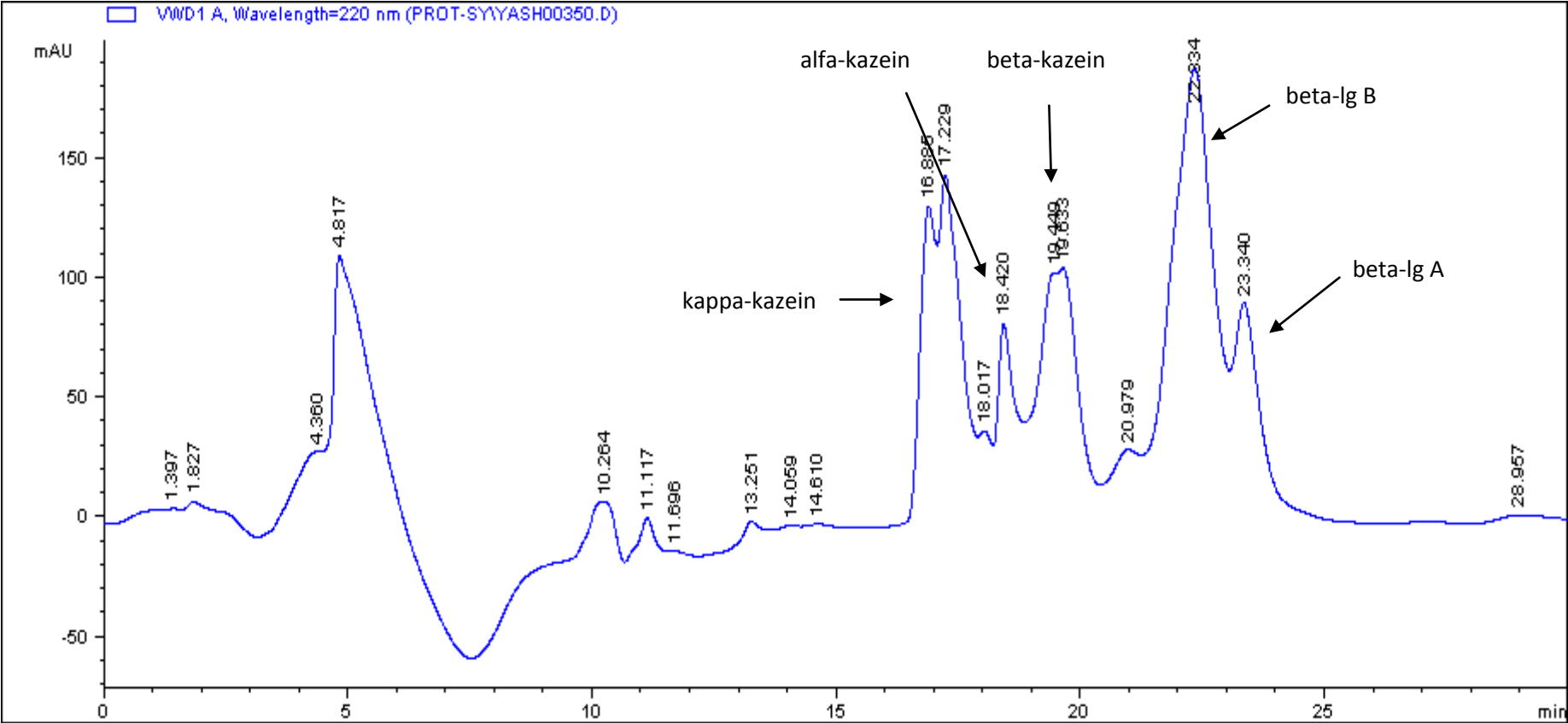
Ek 4. İnek sütüne ait RP-HPLC kromotogramı



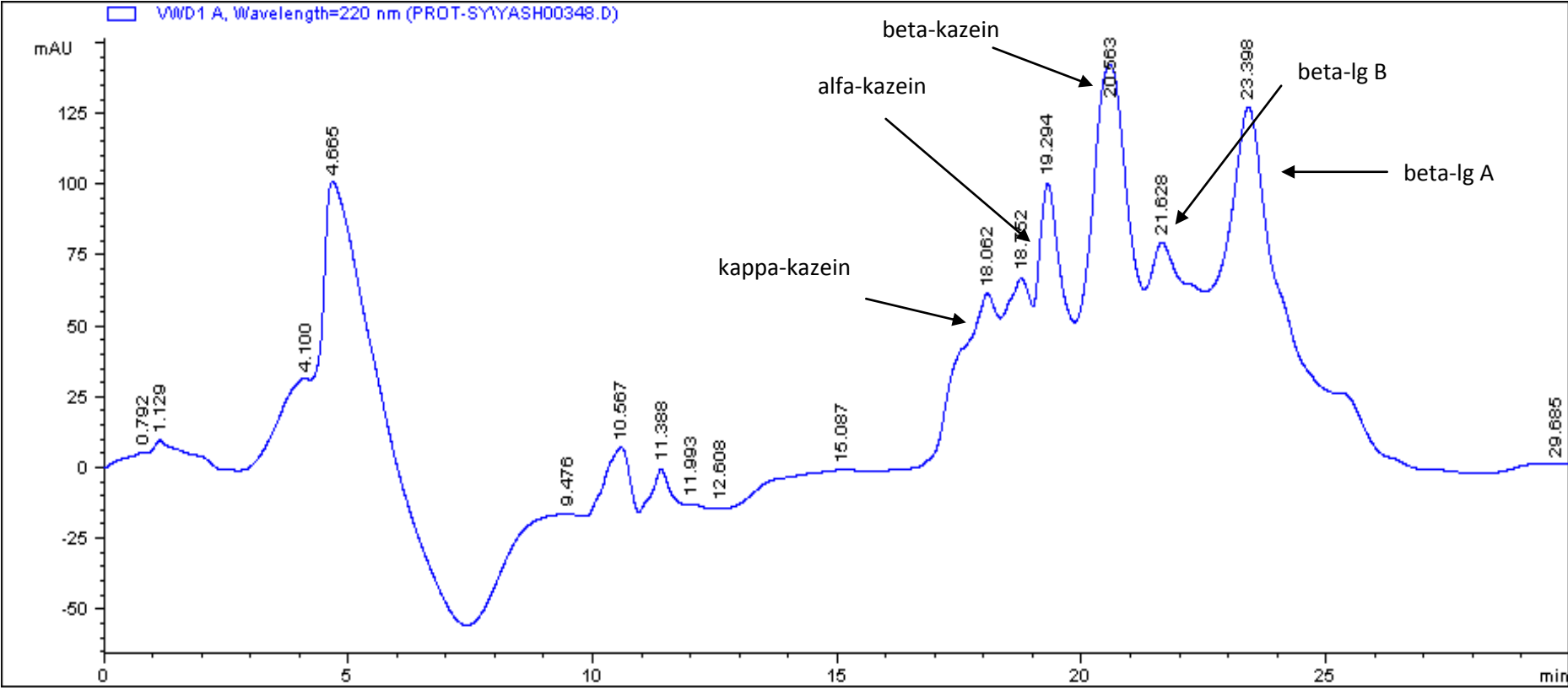
Ek 5. Koyun sütüne ait RP-HPLC kromotogramı



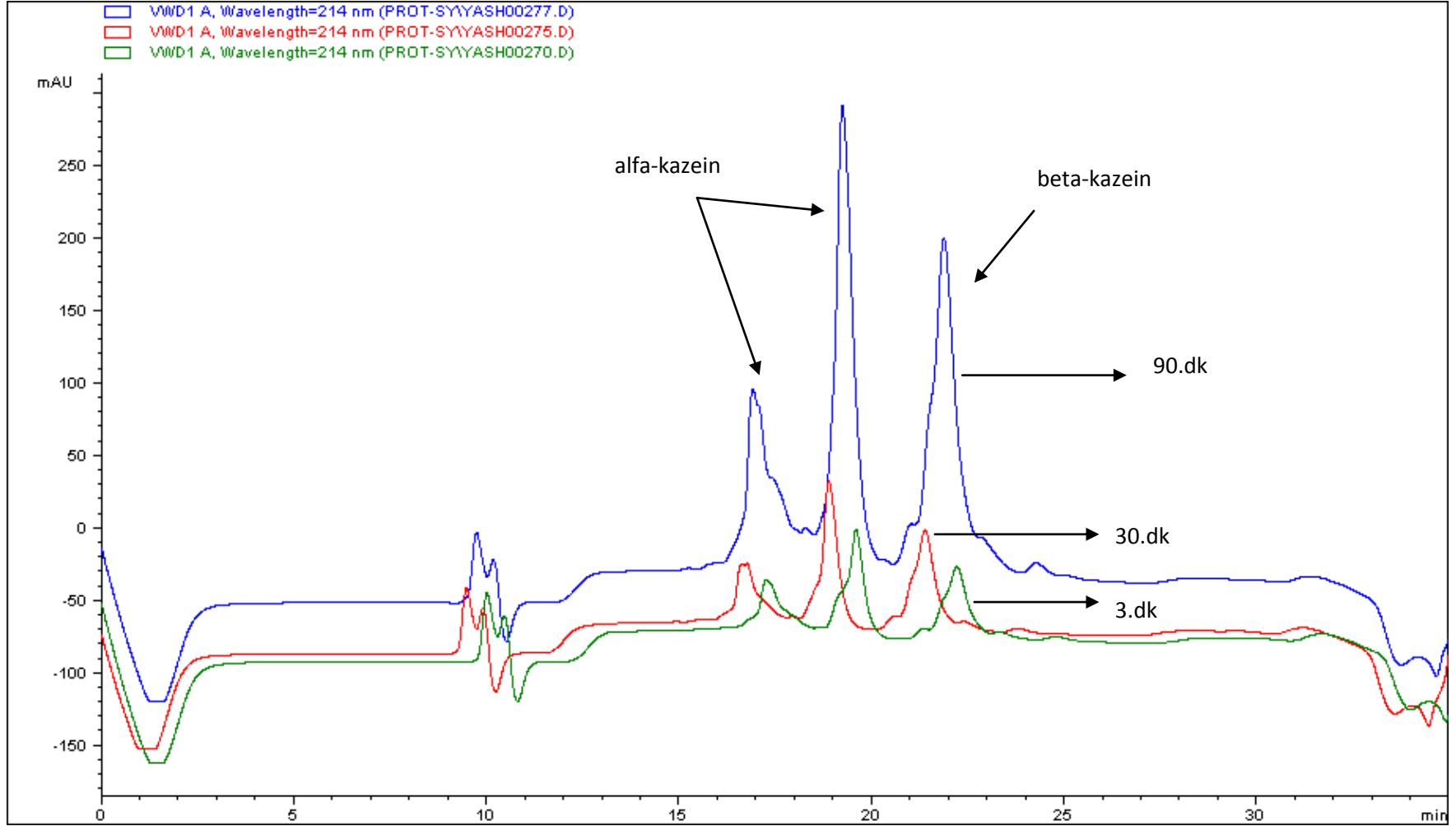
Ek 6. Keçi sütüne ait RP-HPLC kromotogramı



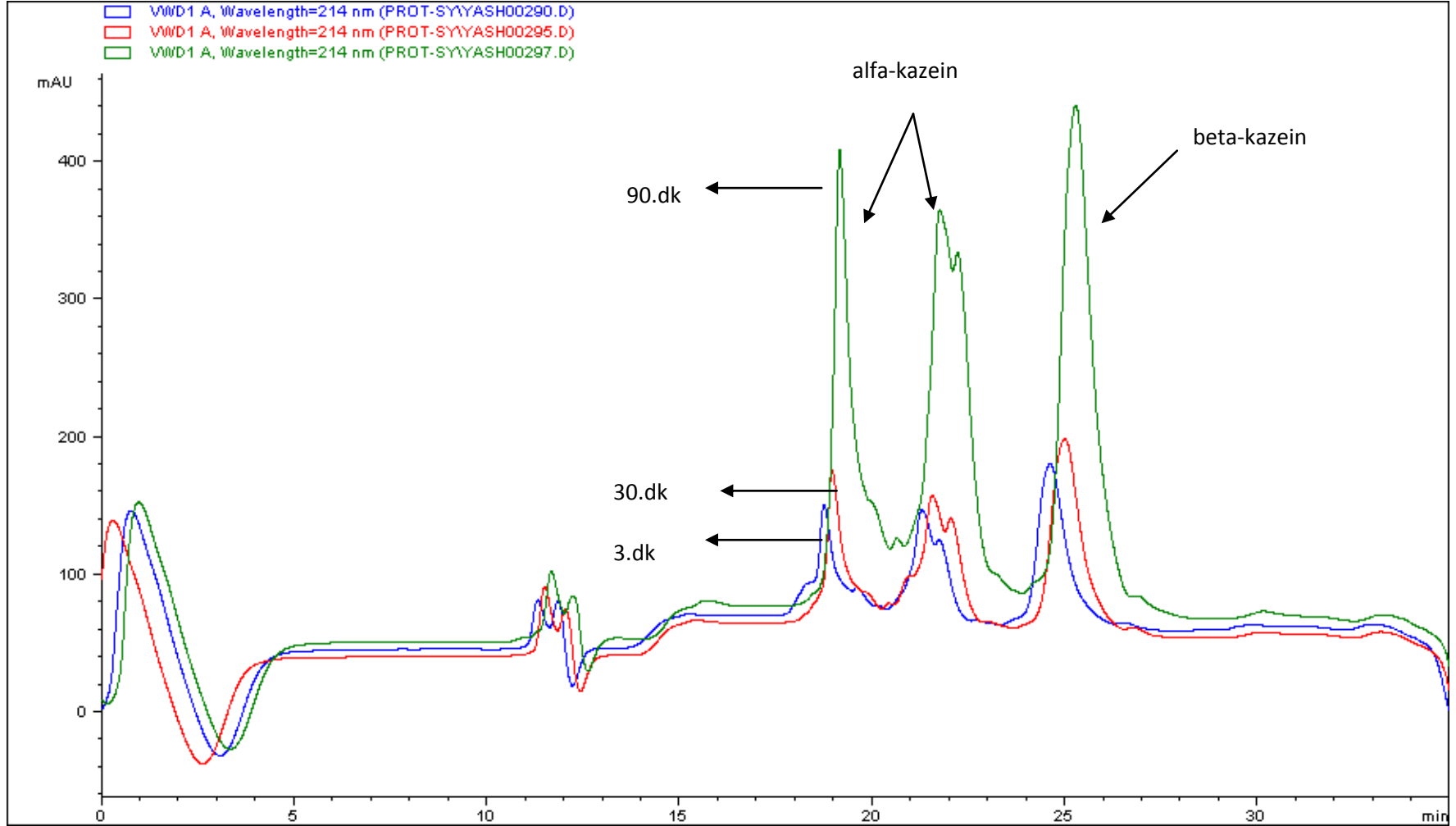
Ek 7. Manda sütüne ait RP-HPLC kromotogramı



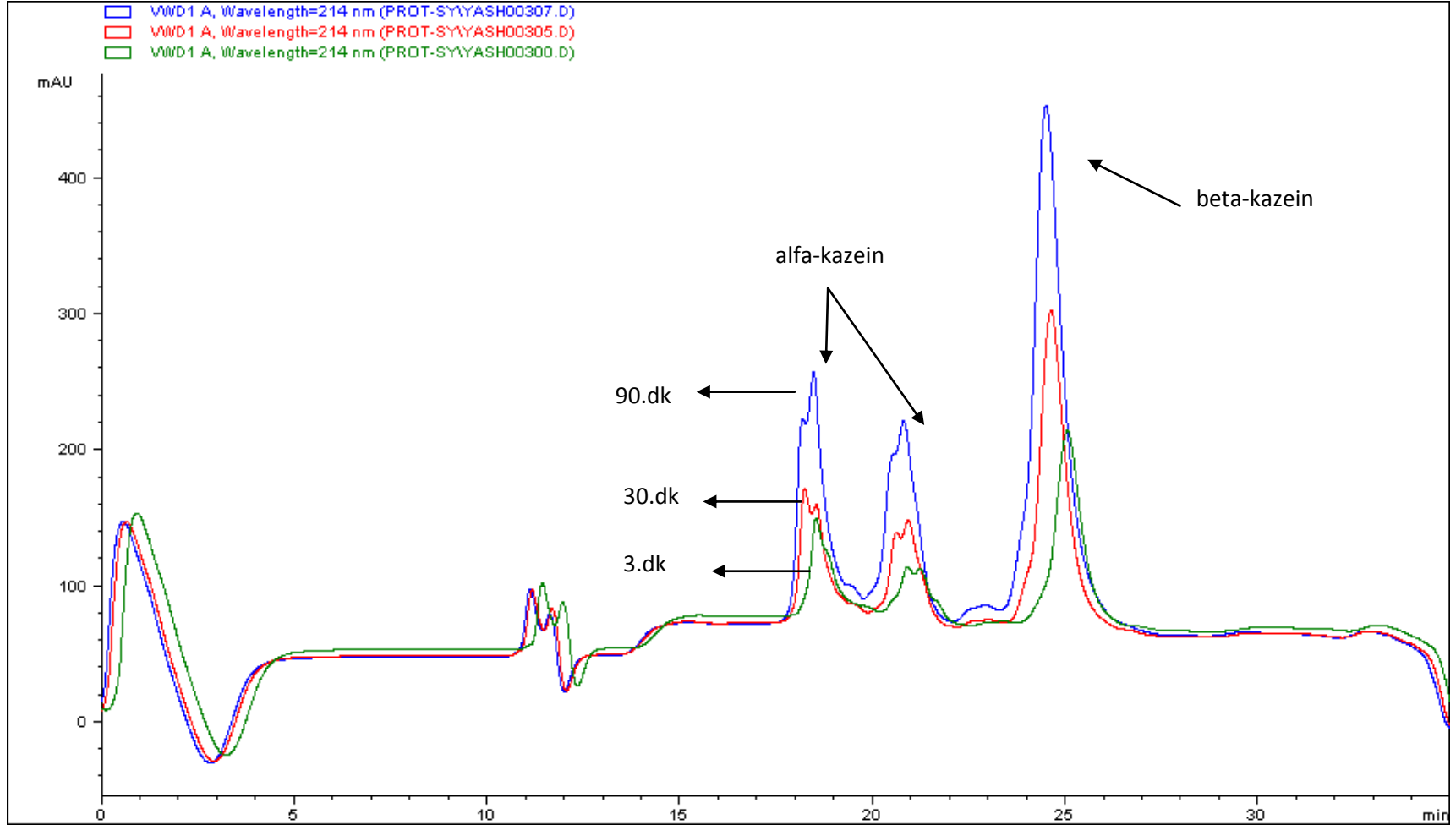
Ek 8. Rennetlenme süresi boyunca inek sütünden elde edilen presipitatlara ait kromotogramlar (3.dk, 30.dk, 90.dk)



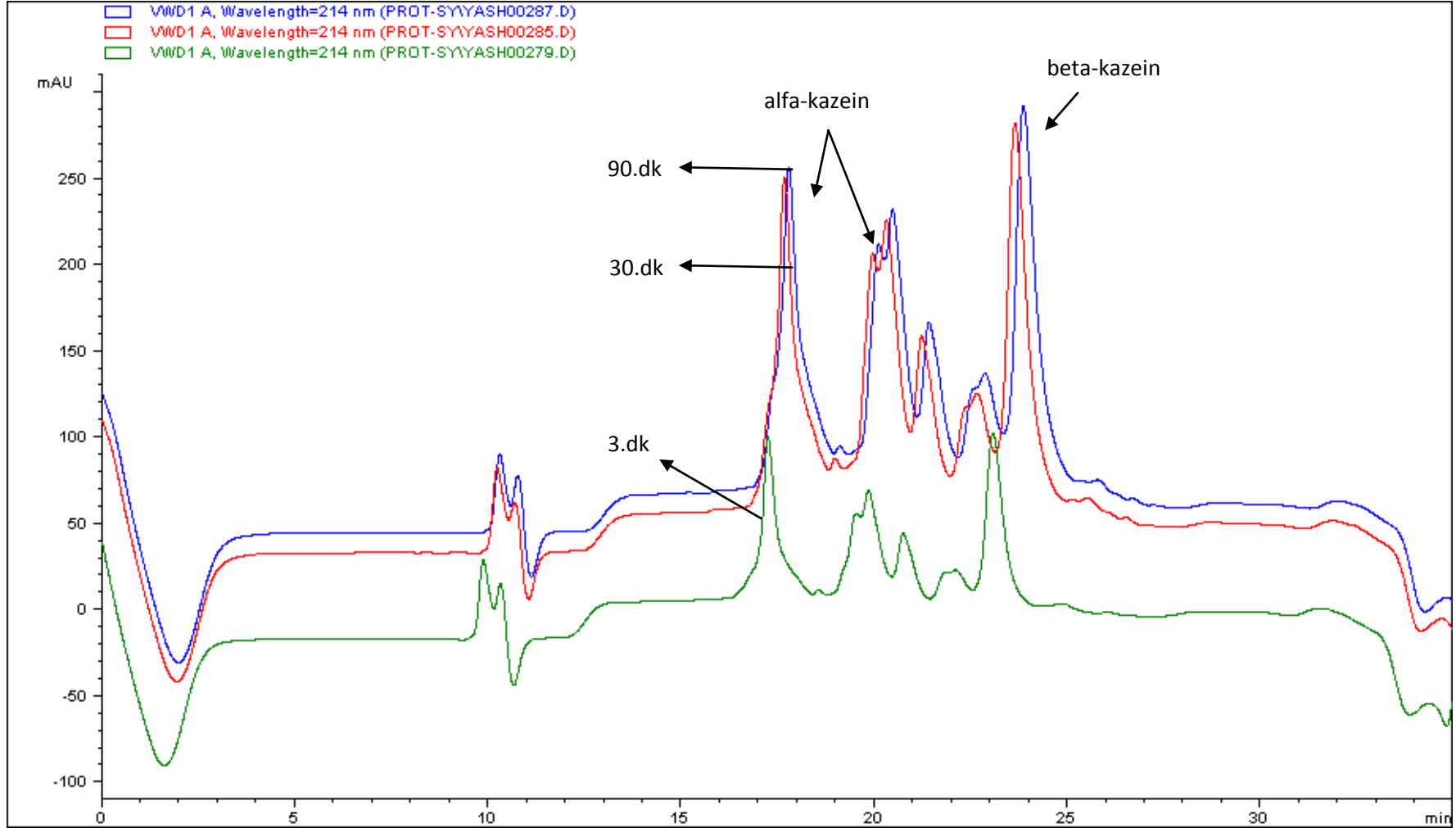
Ek 9. Rennetlenme süresi boyunca koyun sütünden elde edilen presipitatlara ait kromotogramlar (3.dk, 30.dk, 90.dk)



Ek 10. Rennetlenme süresi boyunca keçi sütünden elde edilen presipitatlara ait kromotogramlar (3.dk, 30.dk, 90.dk)



Ek 11. Rennetlenme süresi boyunca manda sütünden elde edilen presipitatlara ait kromotogramlar (3.dk, 30.dk, 90.dk)



ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Seda Yıldırım

Doğum Yeri : Konya

Medeni Hali : Bekar

E-posta : yildirims@hacettepe.edu.tr

Adresi : Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Eğitim

Lise Konya Meram Anadolu Lisesi, 2002-2006

Lisans Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği, 2006-2011

Kopenhag Üniversitesi, Gıda Bilimleri, Eylül 2009-
Şubat 2010 (Erasmus Değişim Programı)

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (İleri)

İş Deneyimi

2012- : Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

Deneyim Alanları

-

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-

