

**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FARKLI ORANLARDA MİKROBİYAL  
TRANSGLUTAMİNAZ (MTGase) İLE İŞLEM GÖRMÜŞ SÜTLERDEN  
ÜRETİLEN YARIM YAĞLI AYRANLARIN BAZI ÖZELLİKLERİ**

**Aslı ÇELİKEL**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA**

**2012**



**T.C.**  
**HARRAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FARKLI ORANLARDA MİKROBİYAL  
TRANSGLUTAMİNAZ (MTGase) İLE İŞLEM GÖRMÜŞ SÜTLERDEN  
ÜRETİLEN YARIM YAĞLI AYRANLARIN BAZI ÖZELLİKLERİ**

**Aslı ÇELİKEL**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA**

**2012**

Doç Dr. Mutlu Buket AKIN danışmanlığında Aslı ÇELİKEL'in hazırladığı ‘Farklı Oranlarda Mikrobiyal Transglutaminaz (MTGase) ile İşlem Görmüş Sütlerden Üretilen Yarım Yağlı Ayranların Bazı Özellikleri"konulu bu çalışma .12../07../2012.. tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı' nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Mutlu Buket AKIN

Üye: Doç. Dr. A. Ferit ATASOY

Üye: Yrd. Doç. Dr. H. Avni KIRMACI

**Bu Tezin Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.**

**Prof. Dr.Mehmet CİCİ**  
Enstitü Müdürü

**Bu Çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.**  
Proje No:1194

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların Kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	5
2.1. Transglutaminaz.....	5
2.2. Transglutaminazın süt ürünlerinde kullanılması.....	10
2.3. Transglutaminazın ayran üretiminde kullanılması.....	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	19
3.1. Materyal.....	19
3.2. Yöntem.....	19
3.2.1. Ayran üretimi.....	19
3.2.2. Çiğ sütlerde yapılan analizler.....	21
3.2.2.1. pH Tayini.....	21
3.2.2.3. Titrasyon Asitliği Tayini.....	21
3.2.2.3. Kurumadde oranları.....	21
3.2.2.4. Yağ oranı.....	21
3.2.2.5. Protein oranları.....	22
3.2.3. Ayran analizleri.....	22
3.2.3.1. pH Tayini.....	22
3.2.3.2. Titrasyon asitliği tayini.....	22
3.2.3.3. Kurumadde oranlar.....	22
3.2.3.4. Yağ oranı.....	22
3.2.3.5. Protein oranları.....	23
3.2.3.6. Tuz oranı.....	23
3.2.3.7. Viskozite.....	23
3.2.3.8. Su tutma kapasitesi.....	23
3.2.3.9. Serum ayrılması.....	24
3.2.3.10. Mikrostrüktürel özellikler.....	24
3.2.3.11. Mikrobiyolojik analizler.....	24
3.2.3.12. Duyusal analizler.....	25
3.2.3.13. İstatiksel analizler.....	25
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	27
4.1. Araştırmada kullanılan çiğ ve ayrana işlenen standize sütün bazı nitelikleri.....	28
4.2. Depolama Süresince Ayranların Fizikokimyasal Özelliklerinde Görülen Değişmeler.....	28
4.2.1. Ayran örneklerinin pH ve titrasyon asitliği değerlerinde görülen değişimler.....	29
4.2.2. Ayran örneklerinin serum ayrılması değerlerinde görülen değişimler.....	31
4.2.3. Ayran örneklerininviskozite değerlerinde görülen değişimler.....	33
4.2.4. Ayran örneklerinin su tutma kapasitesi değerlerinde görülen değişimler.....	34
4.3. Depolama Süresince Ayranların Duyusal Niteliklerinde Görülen Değişimler.....	36
4.3.1. Tat-aroma.....	37
4.3.2. Kıvam.....	38
4.3.3. Genel kabul edilebilirlik.....	39
4.4. Ayran Örneklerinin Mikrostrüktürü.....	40
4.5. Depolama Süresince Ayran Örneklerinin Mikrobiyolojik Özelliklerinde Görülen Değişimler.....	43
4.5.1. <i>Streptococcus thermophilus</i> Sayısı.....	44
4.5.2. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> sayısı.....	45
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	56
ÖZET.....	57
SUMMARY.....	59

## ÖZ

### Yüksek Lisans Tezi

# FARKLI ORANLARDA MİKROBİYAL TRANSGLUTAMİNAZ (MTGase) İLE İŞLEM GÖRMÜŞ SÜTLERDEN ÜRETİLEN YARIM YAĞLI AYRANLARIN BAZI ÖZELLİKLERİ

Ash ÇELİKEL

Harran Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. B. Mutlu AKIN

Yıl: 2012 Sayfa: 60

Bu çalışmada, farklı oranlarda mikrobiyaltransglutaminaz (MTGase) enzimi ilavesinin yarım yağlı ayranların fizikokimyasal, duyuşal, mikrostrüktürel ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla ayranlara 0 ( kontrol: E), 0,5 (A), 1 (B), 2 (C) ve 4 (D) unit/g protein oranlarında MTGase enzimi ilave edilmiş ve 20 günlük depolama süresince ayranların pH, titrasyon asitliği, viskozite, serum ayrılması, su tutma kapasitesi, tat-aroma, kıvam, genel kabul edilebilirlik, *Str. Thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sayıları belirlenmiştir.

Farklı oranda enzim ilavesinin ayranların incelenen tüm özelliklerine, depolamanın süresinin de ayranların titrasyon asitliği, viskozite, serum ayrılması, su tutma kapasitesi, *Str. Thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* üzerine etkileri önemli bulunmuştur ( $p<0,01$ ).

MTGase kullanımı ayranların fizikokimyasal, mikrobiyolojik ve kısmen de duyuşal özellikleri üzerinde olumlu etki yaratmıştır. Elde edilen verilere göre duyuşal olarak en iyi örnek 1 unit/gr protein oranında enzim katkılı B örneği olsa bile, diğer özellikler açısından en iyi örneğin 2 unit/gr protein oranında enzim katkılı C örneği olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak; yarım yağlı ayran üretiminde 1 ve/veya 2 unit/g protein oranında MTGase enzimi kullanılması önerilebilir.

**Anahtar Kelimeler:**Mikrobiyel transglutaminaz, ayran, kalite, tekstür

## ABSTRACT

M.Sc. Thesis

### SOME PROPERTIES OF REDUCED FAT AYRAN PRODUCED FROM MILK ADDED DIFFERENT RATIOS OF MICROBIAL TRANSGLUTAMINASE

Ash Çelikel

Harran University  
Graduate School of Natureland Applied Sciences  
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. B. Mutlu AKIN

Year: 2012, Page: 60

In this study, the effects of microbial transglutaminase (MTGase) enzyme addition at different rates, on physicochemical, sensorial, microstructural and microbiological properties of skim ayran are investigated. For this purpose, MTGase enzyme was added to the ayran at 0 ( control: E), 0.5 (A), 1 (B), 2 (C) and 4 (D) unit/g protein rates and pH, titratable acidity, viscosity, syneresis property, water-holding capacity, taste-aroma, consistence, general acceptability, *numbers of Str. Thermophilus* and *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* in the ayran samples were determined for the storage period of 20 days.

The effects of enzyme addition at different rates were found significant for all properties of the examined ayran; and effect of the storage time was significant for the,viscosity, syneresis, water-holding capacity numbers of *Str. Thermophiles* and *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* ( $p<0,01$ ).

The use ofMTGase enzyme created a positive effect on physicochemical, microbiologic properties and partially sensitive properties of the ayran. According to achieved data, even though the best sample is B sample which has enzyme content of 1 unit/gr protein sensorially, it was determined that the best sample is C sample which has enzyme on 2 unit/gr protein rate in terms of other properties. As a result, MTGase enzyme usage of 1 and/or 2 unit rate can be suggested for the production of reduce ayran.

**Key words:** Microbial transglutaminase, ayrans, quality, texture

## TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusunun seçiminde ve çalışmanın gerçekleştirilmesi aşamasında yönlendiren, her türlü konuda ilgi ve görüşlerini esirgemeyen danişman hocam sayın Doç. Dr. B. Mutlu AKIN'a; ayrıca tezin deneme ve yazma aşamasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen AİLEM 'e sayın hocam Doç. Dr. Serdar AKIN ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.



## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
Çizelge 4.1. Araştırmada kullanılan çiğ sütün bileşimi.....	27
Çizelge 4.2. Depolama süresince ayranların fizikokimyasal özellikleri.....	27
Çizelge 4.3. Ayranların bazı fizikokimyasal özelliklerinde depolama süresince görülen değişiklikler.....	28
Çizelge 4.4. Ayranların duyuşal özelliklerinde depolama süresince görülen değişiklikler .....	37
Çizelge 4.5. Ayranların mikrobiyolojik özelliklerinde depolama süresince görülen değişiklikler .....	44

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1.1. Transglutaminaz enzimi ile proteinlerin modifikasyonu .....	4
Şekil 2.1. Mikrobiyal Transglutaminazın primer yapısı .....	6
Şekil 2.2. Mikrobiyal Transglutaminazın (MTGase) genel yapısı .....	7
Şekil 2.3. MTGase tarafından katalizlenen tepkimeler .....	8
Şekil 3.1. Ayran üretim şeması.....	20
Şekil 3.2. Duyusal analiz formu .....	26
Şekil 4.1. Farklı oranda MTGase içeren ayranların pH değerleri .....	29
Şekil 4.2. Farklı oranda MTGase içeren ayranların titrasyon asitliği değerleri .....	29
Şekil 4.3. Farklı oranda MTGase içeren ayranların serum ayrılması değerleri.....	31
Şekil 4.4. Farklı oranda MTGase içeren ayranların vizkozite değerleri .....	33
Şekil 4.5. Farklı oranda MTGase içeren ayranların su tutma kapasitesi değerleri .....	35
Şekil 4.6. Farklı oranda MTGase içeren ayranların tat ve aroma değerleri .....	38
Şekil 4.7. Farklı oranda MTGase içeren ayranların kıvam değerleri .....	39
Şekil 4.8. Farklı oranlarda MTGase içeren ayranların genel kabul edilebilirlik değerleri.....	40
Şekil 4.9. A örneğinin mikrostrüktürü .....	41
Şekil 4.10. B örneğinin mikrostrüktürü.....	41
Şekil 4.11. C örneğinin mikrostrüktürü.....	41
Şekil 4.12. D örneğinin mikrostrüktürü.....	42
Şekil 4.13. E örneğinin mikrostrüktürü.....	42
Şekil 4.14. Ayranlardaki <i>Streptococcus thermophilus</i> sayısındaki değişim .....	45
Şekil 4.15. Ayranlardaki <i>Lb. delburckii subsp bulgaricus</i> sayısındaki değişim.....	46

**1.GİRİŞ**

Fermente süt ürünlerinin insan beslenmesindeki önemi uzun yıllardan beri bilinmektedir. Söz konusu ürünlerin başında gelen yoğurdun en önemli tüketim şekillerinden biri ayrandır. Geleneksel bir süt ürünümüz olan ayran yoğurda su katılarak veya kurumaddesi ayarlanan süte yoğurt kültürü ilave edilerek içilebilir kıvamda hazırlanan fermente bir süt ürünüdür (Anonim, 2001).

Türkiye’de üretilen yaklaşık 10 milyon ton sütün % 23’ yoğurt ve Ayran retiminde kullanılmaktadır (Tan ve Ertürk, 2001). Türkiye İstatistik Kurumu’nun verilerine göre 2010 yılında entegre süt işletmeleri tarafından 6 745 011 ton süt toplanırken, 1 090 605 ton içme sütü, 473 057 ton peynir, 908 269 ton yoğurt, 397 935 ton süt ise ayran üretiminde kullanılmıştır. Gülmez ve ark. (2003); Köksoy ve Kılıç (2003) zellikle sindiriminin kolaylığı ve ferahlatıcı etkisi açısından ayranın üretimi özellikle yaz aylarında artığını belirtmektedir.

Ayranlarda çeşitli sebeplerden dolayı pıhtılı yapı, asidik tat ve serum ayrılması gibi bozukluklar sıklıkla görülmektedir (Ergüllü ve Demiryol,1983). Özellikle de yaz aylarında asitlik artışı ve serum ayrılması ayranların satışıının azalmasına neden olmaktadır (Demir, 1983). Bu nedenle bugüne kadar ayran üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların çoğunda serum ayrılmasının ayranların kalite özelliklerini etkileyen faktörler arasında en önemlilerinden biri olduğu belirtilmiştir (Ergüllü ve Demiryol, 1983; Yaygın ve Gahun, 1983; şimşek, 1995; Atamer ve ark., 1999). Genellikle sinerez ile aynı anlamda kullanılan serum ayrılması, yoğurt benzeri asit jellerinin yüzeyinde kendiliğinden meydana gelen bir kusurdur (Lucey,2001). Söz konusu parametre ısı uygulaması ve asitlik gelişimi ile kolloidal stabilitesi bozulmuş olan süt proteinlerinin, özgül ağırlık farkı ve yerçekimi kuvvetinin etkisiyle, içinde buldukları serumun tabanına doğru batmaları olarak tanımlanmaktadır (Anonymous, tarihsiz; Bodyfelt ve ark., 1988; şimşek, 1995; Atamer ve ark., 1999).

Viskozite ise kısaca bir sıvının iç sürtünmesidir (Renner, 1991). Lucey (2001)'in asit jelinde meydana gelen serum ayrılmasının nedenleri hakkında az şey bilindiğini belirtmesine karşın, birçok araştırmacı serum ayrılması ve viskozite üzerine toplam kurumadde içeriği, protein içeriği (kazein ve serum proteinleri arasındaki oran) yağ içeriği, ısıl işlem ve serum proteinlerinin denatürasyonu, homojenizasyon, asitlik, ürünün depolama sıcaklığı, sütün tuz dengesi, starter kültürün aktivitesi gibi faktörlerin etkili olduğunu bildirmektedirler (Rasic ve Kurmann, 1978; Yaygın ve Gahun, 1983; Gönç ve ark., 1989; Renner, 1991).

Fermente süt ürünlerinde tekstürel yapıda gözlemlenen olumsuzlukların giderilmesi amacıyla yağsız kuru madde artırımı ve stabilizatör kullanımı bilinen en etkili yöntemlerdir. Ayrıca son yıllarda ekzopolisakkarit üreten starter kültür kullanımı da alternatif bir metottur. Bununla birlikte, kuru madde artırımının ek maliyet getirmesi ve stabilizatör kullanımının önünde yasal engeller bulunması yeni metotların geliştirilmesi zorunluluğunu yaratmıştır.

Gıda proteinleri ürünlerin yapısını ve işleme özelliklerini etkilediği için işlevseldir ve birçok gıda proteini gıdaların tekstür, stabilite, viskozite, jelleşme, emülsifiye etme ve su bağlama gibi niteliklerini etkileyen ve geliştiren fonksiyonel bileşenler olarak kullanılmaktadırlar (Faergemandve ark., 1998). Gıda katkı maddesi olarak kullanılan proteinlerin fonksiyonel özellikleri çoğunlukla arzu edilen seviye değildir. (Yıldırım ve ark.,1996).Proteinlerin fonksiyonel nitelikleri onların yapısı ile yakından ilişkilidir. (Faergemandve ark., 1998). Protein yapısı kimyasal, fiziksel ve enzimatik metotlar kullanılarak modifiye edilebilmektedirler (Yıldırım ve ark., 1996;Faergemandve ark., 1998; Gerrard, 2002). Protein yapısının enzimatik modifikasyonu bu amaçla yaygın olarak kullanılan metottur (Imm ve Lee, 2000). Kimyasal modifikasyon yerine enzimatik modifikasyon kullanılması enzimatik reaksiyonların daha spesifik olmaları, yalnızca katalitik etki yapacak miktarı gerektirmeleri ve toksik yan ürünlerin meydana gelme olasılığının daha az olması nedeniyle avantajlıdır (Faergemandve ark., 1998; Gerrard, 2002). Bu amaçla enzimler gıda proteinlerinin fonksiyonel niteliklerinin geliştirilmesinde endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Gerrard, 2002). Tekstürel modifikasyonu

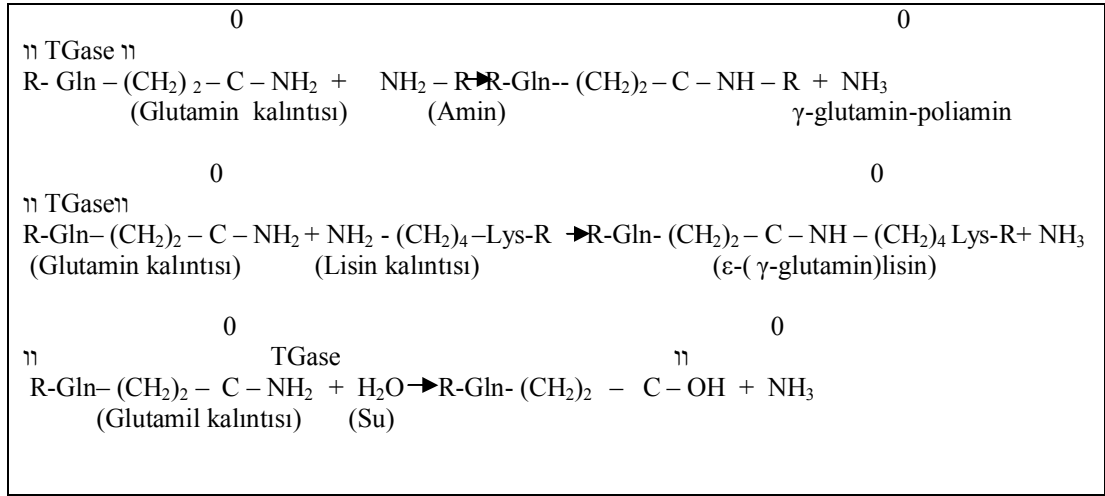
tetikleme açısından en ilgi çeken enzimler kovalent çapraz bağlanma gerçekleştirebilenlerdir.

Gıda proteinlerinin fonksiyonel niteliklerinin iyileştirilmesi ve geliştirilmesinde etkili olan “enzimatik çapraz bağlanma - cross-linking” son yıllarda popülerite kazanmış alternatif bir metottur ( Ya-Tanimoto ve Kinsella, 1988; Sakamoto ve ark., 1994;Faergemandve ark., 1999a; Imm ve Lee, 2000). Enzimatik modifikasyon amacıyla kullanılan transglutaminaz (protein-transglutaminase  $\gamma$ -glutamy transferase) enzimi doğada yaygın olarak bulunan ve proteinlerde çapraz bağlanmaya neden olduğu bilinen bir transferazdır (Motoki ve Segura, 1998). Transglutaminazın birçok gıda proteini ile çapraz bağlanma oluşturduğu ve özellikle süt proteinleri arasında yer alan kazeinlerin transglutaminaz için çok iyi substrat oldukları bilinmektedir (Faergemandve ark.,1999; Dickinson ve Yamamoto, 1996; Lauber ve ark., 2000; Lorenzen, 2000;, Kuraishi ve ark., 2001).

Transglutaminaz enzimi proteinlerin modifikasyonunda 3 reaksiyonu katalize edebilmektedir:

- 1- Aminlerin birleşmesi
- 2- Proteinler arası çapraz bağlanma
- 3- Deamidasyon

Yüksek moleküler ağırlıklı polimerlerin oluşumuyla sonuçlanan proteinlerin çapraz bağlanması, bu enzim için doğada en etkili reaksiyondur. Bununla birlikte; MTGase enzimi Şekil 1.1.’de sistematik olarak gösterildiği gibi iki önemli reaksiyonu daha katalize eder (O’Sullivan ve ark., 2001; Sharma ve ark., 2001; Jong ve Koppelman, 2002). Enzimin katalize ettiği bu üç reaksiyon da gıda proteinlerinin fonksiyonel niteliklerini modifiye etmek için kullanılabilir (Jong ve Koppelman, 2002). Bununla birlikte; gıda endüstrisinde önemli olan başlıca reaksiyon  $\epsilon$ -(  $\gamma$ -glutamin) lisinin meydana geldiği proteinler arası çapraz bağlanmadır (Kuraishi ve ark., 2001; Schey, 2003).



Şekil 1. Transglutaminaz enzimi ile proteinlerin modifikasyonu 1-Aminlerin birleşmesi 2-Çapraz bağlanma 3-Deamidasyon

Süt proteinlerinin enzimatik modifikasyonun özellikle fermente süt ürünlerinde stabil bir protein yapısının oluşmasını sağladığı ve ürünün fiziksel niteliklerini olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir (Faergemand ve ark., 1999b). Transglutaminaz kullanımı için avantajlı ürün olarak görülen fermente süt ürünlerinin üretiminde enzimin başlıca etkilerinin pıhtı sıkılığı ve viskozitede artış, su bağlama kapasitesindeki artışın sonucu olarak da serum ayrılmasında azalma olduğu bildirilmektedir (Kuraishi ve ark., 2001). Transglutaminaz enzimi kullanımının yoğurtlarda pıhtı stabilitesini geliştirerek jel gücünü arttırdığı, serum ayrılmasını azalttığı, viskozitede artış sağladığı birçok araştırmacı tarafından belirlenmiştir (Lorenzen ve Schlimme, 1998; Motoki ve Segura, 1998; Faergemand ve ark., 1999a; Farnsworth ve Guo, 2003). Ayrıca enzimatik modifikasyon, süt teknolojisi alanında yoğurt üretiminde klasik kuru madde artırımı ve stabilizatör kullanımına alternatif bir metot olarak gösterilmektedir (Lorenzen ve Schlimme, 1998; Faergemand ve ark., 1999a; Kuraishi ve ark., 2001; Lorenzen ve Neve, 2003 ).

Bu çalışmada yarım yağlı ayranların üretiminde oluşan kusurlar mikrobiyal transglutaminaz (MTGase) enziminin etkisi ve uygun kullanım oranının tespit edilmiştir. Ayrıca kullanımında yasal engel bulunan stabilizörlerin yerine yararlanma olanakları araştırılmıştır. Bu amaçla farklı oranlarda MTGase enzimi ile protein yapısı modifiye edilmiş süttten üretilen yarım yağlı ayranların kimyasal, fiziksel, duyuşsal, mikrostrüktürel ve mikrobiyolojik niteliklerinin belirlenmiştir.

**2.KURAMSAL TEMELLER****2. 1. Transglutaminaz**

Transglutaminaz enzimi aktivitesi ilk kez, kobayların (Ginea pig) karaciğerindeki transamidasyondan sorumlu enzimlerin, çeşitli yaşayan organizmalarda biyolojik fonksiyonların tamamlanmasında yer aldığı gözlemlenmesi ile ortaya konulmuştur. Bu enzimlerin tümü  $\gamma$ -glutamilttransferaz sınıfındadır, hayvansal dokularda ve vücut sıvılarında oldukça geniş bir varlık göstermektedir. Kanın pıhtılaşması, yaraların iyileşmesi, epidermal keratinizasyon ve eritrosit membranının sertleşmesi gibi birçok biyolojik olayda yer almaktadır.

TGase uygulamaları, enzimin memelilerin doku ve vücut sıvısından izole edilmesi ile başlamıştır (Ikura ve ark., 1985; Jiang ve Lee, 1992). 1980'li yılların sonuna kadar, ticari olarak kullanılabilen tek,transglutaminaz kobay karaciğerinden elde edilen (GTGase) olmuştur. Gıdalarda tekstürü iyileştirmek için kullanılmasına karşın; kaynak yetersizliği ve kapsamlı saflaştırma prosedürü enzimin fiyatını arttırmıştır, bu sebeple endüstriyel uygulamalarda kullanımı çok tercih edilmemiştir (Zhu ve ark., 1995; Motoki ve Kumazawa, 2000). Ayrıca GTGase; kazein, soya fasulyesi globülini veya miyozin içeren gıdalarda, proteinlerin presipitasyonu için  $Ca^{+2}$ 'nin aktivasyonuna ihtiyaç duymaktadır. Kandan izole edilen ve Faktör XIII olarak adlandırılan transglutaminaz, kırmızı pigmentler içerdiğinden ve aktivasyonu için trombine ihtiyaç duyduğundan gıda endüstrisinde kullanımı pek tercih edilmemiştir (Motoki ve Kumazawa, 2000; Yokoyama ve ark., 2004). *Escherichia coli* gibi mikroorganizmaların genetik manipülasyonu sonucu transglutaminaz üretmek için pek çok çalışma yapılmasına rağmen (Ikura ve ark., 1990), hiçbiri ticari olarak kullanılamamıştır (Motoki ve Kumazawa, 2000; Yokoyama ve ark., 2004).

Topraktan yaklaşık 5000 suşun incelenmesi sonucu, Ando ve ark. (1989) *Streptovercillium* S-8112 (*Streptovercillium mobaraense*)'den mikrobiyal transglutaminaz (MTGase) izole etmeyi başarmıştır. Bakteri, enzimi doğrudan kültür besi yerine salgıladığı için hücreparçalama gereksinimine gerek yoktur ve enzimin



Şekil 2. 1. Mikrobiyal Transglutaminazın primer yapısı (\*:olası aktif sistein) (Motoki ve Seguro, 1998).

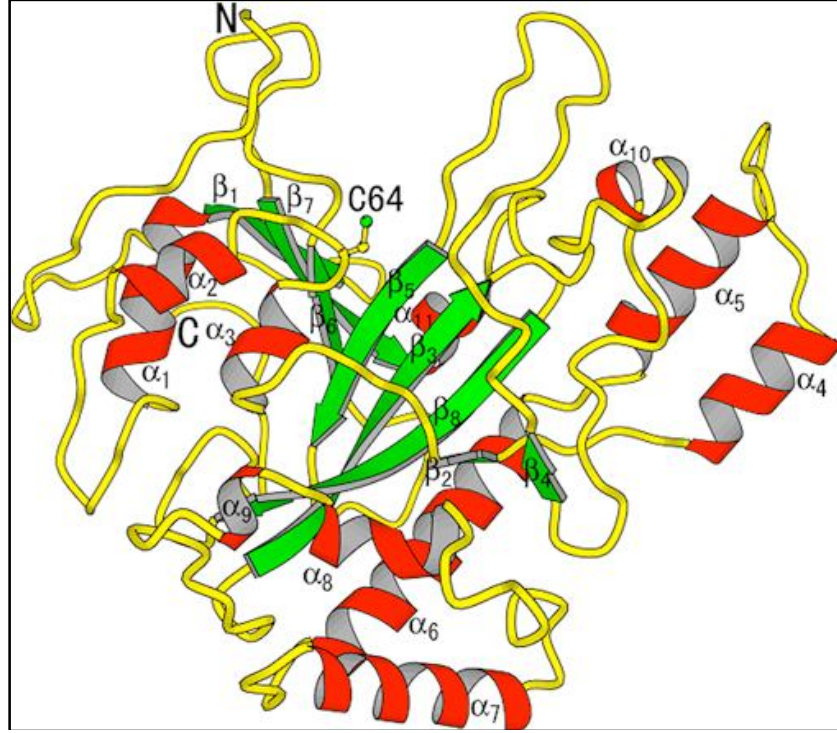
saflaştırılması da kolaydır (Motoki ve Kumazawa, 2000; Yokoyama ve ark., 2004). Ayrıca; MTGase  $Ca^{+2}$  gibi bir aktivatöre ihtiyaç duymamakta, GTGase ve Faktör XIII' e göre belirgin bir substrat seçiciliği göstermemektedir (De Jong ve ark., 2001; De Jong ve Koppelman, 2002; Shimba ve ark., 2002). Bütün bu avantajların yanı sıra üretiminin de ucuz olması, MTGase'in gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaya başlamasını sağlamıştır.

MTGase'nin izoelektrik noktası yaklaşık pH 8.9 dolayındadır. Optimum pH aralığı ise 6.0 ile 7.0 arasındadır; pH 4.0 ve pH 9.0'da da aktivite göstermektedir. Edman yöntemi ve kütle spektrofotometrisi yöntemleri ile MTGase'in protein diziliminin primer yapısı belirlenmiş ve yaklaşık 331 aminoasitten oluştuğu saptanmıştır (Şekil 2. 1 ve Şekil 2. 2). Aminoasit kompozisyonundan belirlenen molekül ağırlığı 37842 Da olarak hesaplanmış ve bu değer diğer yöntemde 38000 Da olarak bulunan değere çok yakın çıkmıştır (Motoki ve Seguro, 1998).

MTGase enzimi; bir peptid bağındaki glutamin kalıntısının  $\gamma$ -karboksiamid grubu (açıl verici) ile bir primer amin (açıl alıcı) arasındaki açıl-transfer tepkimesini katalizlemektedir. Bir peptid bağındaki lisin kalıntısının  $\epsilon$ -amino grubu substrat işlevini üstlenirse de bu iki peptid zinciri  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)lisin [ $\epsilon$ -( $\gamma$ -Gln)Lys] bağı ile molekül içi ve/veya moleküller arası çapraz bağlanmaktadır (Yüksel ve ark., 2009)



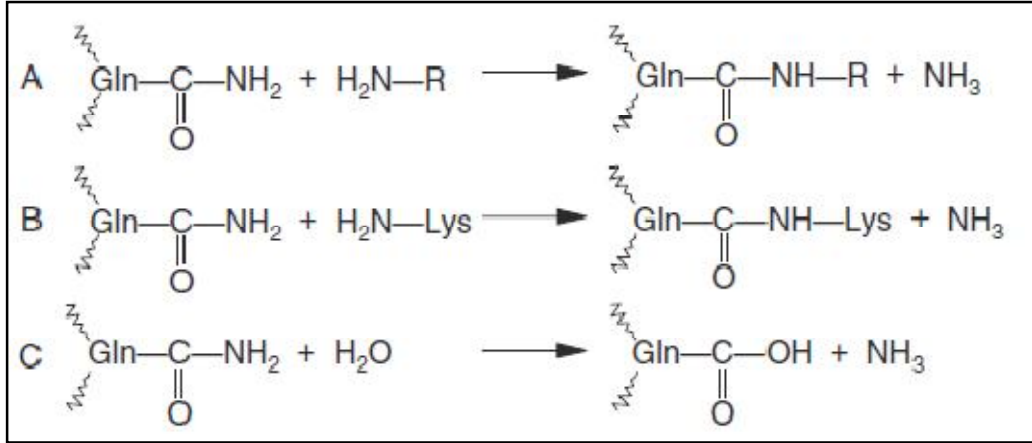
Amin substratları olmadığında ise, su moleküllerinin açıl alıcı grup olduğu glutamin deamidasyonu tepkimesini katalizlemektedir. MTGase, amin birleşmesi, çapraz bağ oluşumu ve deamidasyon yolları ile proteinleri modifiye etmektedir.



Şekil 2. 2. Mikrobiyal Transglutaminazın (MTGase) genel yapısı (Yokoyama ve ark., 2004)

Açıl transfer tepkimesi, aminoasit veya peptitlerin, protein yapısı içine girerek lisilpeptit ve lisilmetiyoninin enzimatik çapraz bağlanması sonucu kazein ve soya proteini yapısındaki metiyonin ve lisin miktarını arttırabilmektedir (Yokoyama ve ark. 2004). Protein yapısına katılan aminoasitler, önceden buldukları proteinin yapısında oldukları gibi davranmaya devam ettiğinden MTGase'nin gıdaların besinsel değerlerine olumlu etkide bulunduğu söylenebilmektedir (Motoki ve Kumazawa, 2000). Ayrıca; çapraz bağlanma tepkimeleri proteinlerin çözünürlük, emülsiyonlaştırma kapasitesi, köpük oluşturma ve jelleşme gibi bazı fonksiyonel özelliklerinde modifikasyonlara yol açabilmektedir (Faergemand ve ark., 1998).

Deaminasyon tepkimesi işlevselliği arttırmaktadır; fakat uygulamalarda proteinlerin geniş bir glutamin ve kısa bir lisin kalıntısına sahip olması gerekmektedir (Ohtsuka ve ark., 2001).



Şekil 2.3. MTGase tarafından katalizlenen tepkimeler: (A), Açıl transfer tepkimesi; (B), Çapraz bağlanma tepkimesi; (C), Deaminasyon (Motoki ve Seguro, 1998)

Proteinlerin çapraz bağlanması, proteince zengin gıdaların yapısının iyileştirilmesi amacıyla işlevselliğinin artırılmasına olanak sağlamaktadır (Motoki ve Seguro, 1998). Süt proteinleri MTGase tepkimeleri için genelde uygun bir substrat olarak değerlendirilmektedir. Kazeinler;  $\alpha_{S1}$ -kazein,  $\alpha_{S2}$ -kazein,  $\beta$ -kazein ve  $\kappa$ -kazeinden meydana gelen misel olarak adlandırılan stabil kalsiyum fosfat protein kompleksleri olarak bulunurlar. Bu protein yapısı sayesinde enzimin yapıya ulaşması kolaydır ve bu da kazeinleri, çapraz bağlanma için elverişli bir substrat yapmaktadır.

MTGase ile çapraz bağlanmanın hızı, protein substratının makro moleküler yapısına bağlıdır. Genelde reaktif Gln kalıntıları polipeptid zincirinin ters dönüşlerinde (Berbers ve ark., 1983) ya da esnek kısımlarında bulunurlar. Bu nedenle görece esnek bir yapıya sahip olan kazeinler MTGase için en uygun substrattır (Nio ve ark., 1986a). Diğer ovalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin ( $\beta$ -Lg) gibi globüler proteinler, doğal yapıları ile MTGase için bir substrat niteliği taşımazlar. Globüler proteinleri MTGase tarafından gerçekleştirilen çapraz bağlanmaya karşı duyarlı duruma getirmek için birkaç yöntem başvurulabilir; örneğin molekül içi S-S bağlarının kırılması (Aboumahmoud ve Savello, 1990), doğal globül durumuna dönüştürülmesi (Matsumura ve ark., 1996) ya da yağ-su ara yüzeyine adsorpsiyonu (Faergemand ve ark., 1997). MTGase tepkimesini etkileyen diğer etmenler ise sıcaklık, pH ve kalsiyum iyon derişimidir. Memeli doku ve organlarında farklı biyolojik işlevlere sahip, kalsiyum-bağımlı birkaç tipi bulunmaktadır (Folk ve Finlayson, 1977). Örneğin insan plazma MTGase'nin etkin bir formu olan Factor

XIII'nin önemli işlevlerinden biri yaralanma (veya kesik) durumunda kanın pıhtılaştırılarak kanamanın durdurulmasıdır (Hornyak ve ark., 1989). Bu süreçte anılan enzim, fibrin moleküllerinin çapraz bağlanmasını sağlar, böylece kan pıhtısının mekanik dayanımı arttırılmış olur ve bu pıhtı partikülleri yaralanmanın gerçekleştiği yerde tutunarak proteolize karşı da direnci arttırır. Gıda uygulamasında ise bu tür endojen MTGase'in balıkentinin oda sıcaklığında sol-jel geçişinde görev aldığı ve  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Gln)Lys'in (G-L bağı), MTGase'a bağlı olarak, benzersiz bir balıketi tekstürü yarattığı öne sürülmektedir.

MTGase uygulaması ilke olarak işlevsel özellikleri geliştirilmiş yeni farklı bileşenli biyopolimerlerin sentezi anlamına gelir. Bu durumda enzimatik çapraz bağlanmanın, biyopolimer(ler)in kolloidal sisteme katılımı öncesinde oluşması söz konusu olacaktır. Örneğin, düzensiz yapıya sahip bir proteinin (kazein) köpük oluşturma özelliği ile bir globüler proteinin köpük-kararlılığını arttırıcı karakteristiğini birleştiren işlevsel bir katkı maddesi üretimi üzerinde durulsun. Öncelikle çapraz bağlanmanın benzer tipte protein yapıları arasında oluştuğu, benzeş olmayanlarda ortaya çıkmadığı bilinmelidir. Dolayısıyla, çapraz bağın oluşumunda bu substrat karışımındaki bileşenlerin enzimin aktif kısmına karşı termodinamik anlamda yarışması söz konusudur.

Sharma ve ark. (2001), MTGase ile çapraz bağlanma söz konusu olduğunda, ısı işlem görmemiş sütte bulunan  $\kappa$ -kazeinin en yüksek afiniteyi gösterdiğini, ön ısı işlem görmüş (85°C, 15 dakika) sütte ise  $\kappa$ -kazeinin yanı sıra  $\beta$ -kazeinin de bağlanmaya katıldığını saptamıştır. Tolkach ve Kulozik (2005) ise kazeinomakropeptit (CMP) olarak bilinen  $\kappa$ -kazeinin hidrofilik kısmının, MTGase'ye karşı reaktif olduğunu ortaya koymuştur.  $\alpha_{S2}$ -kazein ve  $\kappa$ -kazeinin her ikisi de iki sistein kalıntısı içermektedir ve reaktif SH gruplarına sahiptir. Bu da kazein fraksiyonlarının MTGase ile çapraz bağlanmaya karşı duyarlılığını etkileyebilecek disülfid bağlarının oluşmasını sağlamaktadır (Rasmussen ve ark., 1999).

Kazeinlerin aksine, disülfid bağları ile sabitlenen globüler yapıları nedeniyle sütteki serum proteinleri çapraz bağlanma tepkimelerine daha az eğilimlidir. Buna

rağmen; ısıtma işlemi ile denatürasyon sonucu serum proteinlerinin çapraz bağlanmayı arttırılabileceği üzerinde de durulmuştur (Sharma ve ark., 2001).

MTGase gıda teknolojisinde kullanıldığı için, isopeptid bağın sindirilebilirliği ve isopeptid yapısında yer alan lizin biyolojik yararlanımı ile ilgili sorularla karşılaşmaktadır. Yapılan çalışmalarda, böbreğin yanı sıra bağırsak çeperinde bulunan  $\gamma$ -glutamil transpeptidaz enzimi (E.C. 2.3.2.2) MTGase'nin oluşturduğu dipeptidi, lizin ve glutamata dönüştürmektedir (Seguro ve ark., 1995).

Ortaya çıkan lizin, vücut tarafından kullanılabilir. Üstelik bağlanmanın  $\epsilon$ - amino grubunda gerçekleştiği düşünülürse, lizin yararlanımında bir sorun olmayacağı da öne sürülebilir. Canlı vücudunda yapılan deneylerde, çapraz bağlı kazein içeren gıdalarla beslenmiş bir farenin gelişimi, doğal yapısında kazein içeren gıdalarla beslenmiş farenin gelişimi kadar normal olarak gözlenmiştir.

Hayvanın idrar ve dışkıında yapılan HPLC analizleri, alınan dipeptitlerin yaklaşık % 99'unun vücutta absorbe edildiğini göstermiştir.

## **2. 2. Transglutaminazın Süt Ürünlerinde Kullanılması**

Süte MTGase ilave edilmesinin sütün ısı kararlılığını etkilediği düşünülmektedir. Bu bağlamda, sürecin MTGase ile inkübasyondan önce süte ön ısıtma işlemi uygulanmasına ve bu ısıtmanın sıcaklığına bağlı olduğu sanılmaktadır. Çiğ sütte kazeinler arasında ortaya çıkan çapraz bağlanmanın, minimum kararlılık bölgesindeki pH değerlerinde, miselden  $\kappa$ -kazeinin dissosiyasyonunun engellendiği ileri sürülmektedir. Sütün MTGase ile inkübasyondan önce ön ısıtma işlemine tabi tutulması ise, serum proteinlerinin denatürasyonu sonucu, denature serum proteinleri ile kazeinler arasında çapraz bağların oluşumuna izin vermektedir. (O'Sullivan ve ark., 2001, 2002a). Sütün ısı kararlılığı, sterilizasyon sıcaklığında koagülasyona karşı gösterdiği direnç olarak tanımlanmaktadır (Singh ve Fox, 1987). Özellikle UHT süt ve konsantre süt gibi ürünlerde ticari öneme sahip olan sütün ısı kararlılığı, çeşitli faktörlere (pH, tuzlar ve süt proteinleri) ve proses parametrelerine (ön ısıtma

işlem, konsantrasyon, homojenizasyon) bağlıdır. Bu süreçte proses boyunca kısmi veya tam koagülasyon ve depolama boyunca jelasyon ortaya çıkabilir (Singh ve Fox, 1987; Fox ve McSweeney, 1998). Çeşitli kimyasallar (deterjanlar, aldehitler, ketonlar, polifenolik bileşikler gibi) sütün ısıl kararlılığını değiştirirler. Ancak gıdalarda bu katkı maddelerinin kullanımına yasal olarak izin verilmemektedir (Singh ve Fox, 1987). UHT sütler ve UHT ürünlerde, sterilizasyon boyunca koagülasyon ve depolama boyunca sedimentasyon ortaya çıkabileceğinden, bu ürünlerin kararlılığı üzerine herhangi bir pozitif etki ekonomik açıdan önemlidir. Bu bağlamda MTGase, gıda katkı maddesi olarak ticari uygulamalara sahip olabilecek bir enzimdir (Lorenzen, 2000b).

UHT gibi şiddetli ısıl işlemlere tabi tutulmuş gıda ürünlerinin formülasyonunda Na-kazeinatın kullanımı için koagülasyon, jelasyon ve / veya sedimentasyona karşı direnç göstermesi gerekliliği bulunmaktadır. Na-kazeinatın MTGase ile modifikasyonu sonucu ısıl kararlılığının gelişmesi, birçok ticari uygulamalarda yer alması açısından önemlidir (Flanagan ve ark., 2003).

Benzer şekilde, serum protein izolatu ve UF-yağsız süt proteinlerinin ısıl kararlılığının MTGase kullanımı ile belirgin bir şekilde arttığı ortaya konulmuştur. Bu, ısıl kararlılığı arttırılmış serum proteinlerinin gıdalarda kullanım alanlarının artmasını beraberinde getireceğinden üstünde durulması gereken bir konudur. Ayrıca Na- kazeinatın MTGase ilavesi ile su bağlama kapasitesinin artması gıda teknolojisi açısından önemlidir. Çapraz bağlı Na-kazeinatın su bağlama özelliklerindeki gelişimin, modifiye kazein ile hazırlanan emülsiyonların kararlılığındaki artışı da beraberinde getirdiği bildirilmektedir (Lorenzen, 2000b).

Emülsiyonların kararlı hale getirilmesi, birçok süt ürünlerini de içine alan gıdaların üretiminde en önemli tekniklerden biridir (Nio ve ark., 1986b). Proteinlerin yağ-su emülsiyonlarındaki kararlılıkları, adsorbe protein filminin mekanik/viskoelastik ve sterik özellikleri ile yakından ilişkilidir. Genel olarak, emülsiyonlardaki faz ayrılması, film tabakaları arasındaki etkileşimler yoluyla emülsiyon damlalarının flokulasyonu/agregasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır.

Flokulasyon/agregasyon hızı ve derecesi, partiküller arasındaki itme ve çekme kuvvetlerinin büyüklüğüne bağlıdır. Bu nedenle, bir protein emülsiyonunun kararlılığı, partiküller arasındaki itme kuvvetlerinin artması veya film içindeki protein molekülleri arasındaki bağlanma (cohesiveness) etkileşimlerin artması yoluyla geliştirilebilir. Emülsiyon partiküllerinin flokulasyon/agregasyonu, yağ damlacıkları ile adsorbe protein tabakası arasındaki van der Waals ve hidrofobik etkileşimleri içine alan çekme kuvvetleri ile elektrostatik ve sterik itmeden kaynaklanan itme kuvvetlerini içermektedir. Adsorbe protein tabakaları arasındaki sterik itme, emülsiyon partikülleri flokulasyona karşı koruyan en önemli kuvvettir. Bu sterik itmenin büyüklüğü, protein zincir kalınlığı ve polimer zincir sayısı ile orantılı olarak değişmektedir. Bu bağlamda, MTGase ile katalizlenmiş protein polimerleri, emülsiyon kararlılığını geliştirmektedir. MTGase tepkimesi sonucu, lineer polimerlerden çok dallanmış polimerler ortaya çıkmakta ve dallanmanın artmasıyla sterik itme artacağından emülsiyon kararlılığı da gelişmektedir. MTGase ile çapraz bağlanma tepkimesi sonucu oluşan dallanmış  $\beta$ -kazein polimerlerinin stabil emülsiyon oluşturduğu ortaya konulmuştur (Liu ve Damodaran, 1999).

Benzer şekilde, yağ-su ara yüzeyinde yüzey kayma viskozitesi ve “interfacial dilatational modülü” ölçülerek yapılan çalışmalarda, süt proteinlerini içeren emülsiyon ve köpüklerin kararlılığının enzimatik çapraz bağlanma ile kontrol edilebileceği gösterilmiştir (Faergemand ve ark., 1997, Faergemand ve Murray, 1998).

Süt kullanılarak geleneksel olarak üretilen jeller, yoğurt ve peynirdir. Yoğurdun tekstürü, bileşenlerin miktarı ve fonksiyonelliğine bağlı olarak değişmektedir. Örneğin protein miktarının artmasıyla yoğurt jel dayanımının arttığı bilinmektedir. Emülsiyon formdaki yağın ortamda bulunması da, asit süt jeli dayanımının artmasına neden olmaktadır. Yoğurt jelini modifiye etmenin bir diğer yolu da, özellikle düşük yağlı yoğurtlara uygulanan, gumların kullanımınıdır. Yoğurt üretiminde kuru maddenin artırılması ve gumların kullanılması maliyetin artmasına yol açabilmektedir. Bu nedenle, düşük yağlı yoğurdu da içine alan jellerde yoğurt tekstürünü modifiye etmek için alternatif yöntemleri araştırmak gerekmektedir. Gıda

protein fonksiyonelliğini geliştirmek için yüksek özgülüğe sahip enzimatik tepkimelerin gerçekleştiği enzimatik modifikasyon yöntemi oldukça kullanışlı bir yöntem olarak önerilmektedir. Sözü edilen bu enzimatik tepkimelerde toksik yan ürünlerin oluşum riski de oldukça düşüktür. Enzimatik çapraz bağlanma tepkimeleri ise son on yıldır ilginin arttığı bir yöntemdir (Faergemand ve ark., 1999a, b).

Çoğu araştırmacı ısıyla koagülasyona karşı duyarlı olmaması nedeniyle kazeini farklı MTGase'ler için çok iyi bir substrat olarak görmektedir (Motoki ve Seguro, 1998). Ayrıca doğal  $\kappa$ - ve  $\beta$ - kazeinlerin her ikisinin de çapraz bağlanmaya karşı duyarlılığının  $\alpha$ -kazeinden daha fazla olduğu bildirilmektedir.  $\kappa$ - ve  $\beta$ -kazeinin çapraz bağlanmaya karşı gösterdiği duyarlılık,  $\kappa$ -kazeinin kazein misellerinin yüzeyinde yer alması ve  $\beta$ -kazeinin ise daha yüksek orve a prolin içermesi ve enzim tepkimesinin daha kolay gerçekleşebileceği esnek ve açık yapıya sahip olması ile açıklanabilmektedir. Yağsız süte ön ısıtma işlemi uygulanmasıyla  $\kappa$ - ve  $\beta$ -kazeinler üzerine MTGase'nin çapraz bağlama etkisinin belirgin bir şekilde arttığı bulunmuştur. Süte uygulanan ısıtma işlemlerinin serum proteinlerinin denaturasyonuna ve kazein miselleri ile etkileşime girmelerine neden olduğu bilinmektedir. Isıtma işlemi ile ortaya çıkan bu değişikliklerin, proteinlerin MTGase tepkimelerine karşı duyarlılıklarının artmasına yol açtığı düşünülmektedir. Ancak ön ısıtma işlemi uygulanması ile yalnızca  $\beta$ -laktoglobulinin MTGase'ye karşı duyarlılığı artarken  $\alpha$ -laktalbumin çapraz bağlanma seviyesinin aynı kaldığı bulunmuştur (Sharma ve ark., 2001).

$\alpha$ -laktalbumin, nötral pH'da bir mol başına bir  $\text{Ca}^{+2}$  bağlamaktadır. Yapısında bağlı  $\text{Ca}^{+2}$ 'nin uzaklaşması ile çapraz bağlanma tepkimelerine daha açık hale geldiği ileri sürülmektedir. Sharma ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada  $\alpha$ -laktalbumin'nin çapraz bağlanmasının, yapıdan  $\text{Ca}^{+2}$ 'nin uzaklaştırılması ve hidrofobik bağların kırılması ile arttığını göstermiştir. Endüstriyel  $\alpha$ -laktalbumin konsantratlarında, MTGase ile çapraz bağlanma tepkimelerinin gerçekleştirilmesinin, süt ürünlerinin fonksiyonel olarak modifikasyonunu beraberinde getireceği düşünülmektedir.

$\beta$ -laktoglobulinin bazı fiziksel özellikleri üzerine GTGase ile çapraz bağlanmanın etkisi araştırılmıştır. GTGase, kobay karaciğerinden elde edilmiş ve G-L bağı oluşumu yoluyla  $\beta$ -laktoglobulini çapraz bağlamak için kullanılmıştır.  $\beta$ -laktoglobulin polimerlerinin viskozitesinin, çapraz bağlı proteinlerin derişiminin artmasıyla arttığı ve çapraz bağlı  $\beta$ -laktoglobulinin pH 7.0'de belirgin bir ısıl kararlılık gösterdiği bulunmuştur. Doğal  $\beta$ -laktoglobulinin tersine, polimerize  $\beta$ -laktoglobulinin 95 °C ve 30 dk. ısıl işlem ile daha sıkı ve pürüzsüz bir jel oluşturduğu ortaya konulmuştur. Bu çalışmada MTGase kullanımının, gıda ürün formulasyonlarında yumuşak yapıda jel oluşturmak için enzimatik bir yöntem olabileceği düşünülmektedir (Tanimoto ve Kinsella, 1988).

MTGase'nin Na-kazeinat ve yağsız süt gibi ürünlerden birçok farklı fiziksel özelliğe sahip jeller hazırlamak için eşsiz bir ajan olduğu ileri sürülmektedir. Jellerin kırılma gücü (fracture force) ve sıkılığının (hardness) enzim derişiminin artmasıyla belirgin bir şekilde arttığı bulunmuştur. Bu yolla elde edilen jellerin, çeşitli gıdalarda istenilen tekstür gelişimi için kullanılabilceği düşünülmektedir (Nonoka ve ark., 1992).

Asit veya rennet ile elde edilen geleneksel kazein jellerinde zayıf fiziksel etkileşimler ile bir arada tutulan çapraz bağlar bulunurken, MTGase kullanılarak oluşan jeller kovalent olarak çapraz bağlanmaktadır (Schorsch ve ark., 2000). MTGase tepkimesiyle kazeinden ısıya dirençli sıkı bir jel oluştuğu bulunmuştur. MTGase kullanımının bir örneği yoğurt üretiminde görülmektedir.

Yoğurt laktik starter kullanılarak üretilen bir süt jelidir. 2001 yılında, büyük ölçüde Avrupa'da olmak üzere, 9 milyon tondan fazla yoğurt üretilmiştir. Tüketici beğenisi ve kalite kriterlerini oluşturan asal parametreler, aroma maddeleri ve asitliğin yanı sıra yoğurdun tekstürel özellikleri ve düşük serum ayrılması olarak sıralanabilir. Ürünün tekstürel özellikleri ve su tutma kapasitesi, jelde yeni kovalent bağların oluşumu ile değiştirilebilir. Bilindiği gibi yoğurdun jel ağ yapısı zayıf kovalent olmayan bağlar ile kararlı haldedir. Bu nedenle günümüzde MTGase'nin süt



ürünlerinde kullanımında en avantajlı alanın yoğurt üretimi olduğu düşünülmektedir (Kuraishi ve ark., 2001).

Yoğurdun tekstürel ve fiziksel özellikleri üzerine yağsız süt tozu, serum protein konsantratlara gibi katkı maddelerinin kullanımının pozitif etkisi olduğu bilinmektedir. Buna karşın, yoğurttaki sıcaklık değişimleri ve fiziksel etkilerle ortaya çıkan serum ayrılması veya sineresiz olarak adlandırılan problemler ortaya çıkabilmektedir. MTGase enzimi yoğurt jelinin su tutma kapasitesini geliştiren çapraz bağlanma tepkimesini katalizlediğinden, üretim sürecinde enzim kullanımı ile bu gibi problemlerin üstesinden gelinebilir (Motoki ve Seguro, 1998; Kuraishi ve ark., 2001). Üretimde kullanılan MTGase'nin temel etkileri sineresizin azalması ile sonuçlanan su tutma kapasitesinin gelişmesi ile viskozite ve jel sıklığındaki artış olarak özetlenebilir.

Yoğurdun tekstürü, süt bileşenlerinin miktarı ve fonksiyonelliğine bağlıdır. Örneğin protein miktarının artmasının ve yağın ortamda bulunmasının yoğurt jel dayanımının artmasını beraberinde getirdiği bilinmektedir (Faergemand ve ark., 1999a). Ayrıca yoğurt üretiminde kullanılacak sütün yağsız kuru madde miktarı (asal olarak laktoz, protein ve mineral maddeler) ürünün fiziksel özellikleri üzerine etki etmektedir. Genellikle ticari yoğurt üretiminde % 15–16 kuru madde içeriğine sahip süt kullanılmaktadır (Tamime ve Robinson, 1999).

Yağsız süte pH 6.7'de MTGase eklendiğinde, kazein miselleri arasındaki sterik ve elektrostatik engellemelerden dolayı inter-moleküler çapraz bağ oluşumu engellenmekte ve jel oluşmamaktadır. MTGase'nin istenilen etkiyi gösterebilmesi için, örneğin sütün asitliğinin artırılması gibi, işlemler ile protein partikülleri arasındaki sterik ve elektrostatik stabilizasyonun ortadan kaldırılması gerekmektedir (Schorsch ve ark., 2000).

Yağsız yoğurtlarda kurumadde artırımının MTGase ile işlem görmüş sütlerden üretilen süt tozları ile yapılması durumunda daha yüksek bir jelleşme ve su tutma kapasitesinin elde edildiği ve çapraz bağlanma yeteneğinin arttığı bildirilmiştir (Imm

ve ark., 2000). Bu tip süt tozlarından hazırlanan asit jellerinin daha yüksek su tutma kapasitesine sahip olması, bu tip süt tozlarının özellikle az yağlı yoğurtlarda görülen sinerez olayını azaltmak için kullanım potansiyelini arttırmaktadır.

MTGase katımının inkübasyondan önce gerçekleştirilmesi ve starter kültür inokülasyonu sırasında enzim aktivitesinin durdurulması ile starter kültür dengesinde (*S. Thermophilus*, *L.delbrueckii* spp. *bulgaricus*, bir miktar kayıp olduğu, buna karşılık MTGase ile starter kültürlerin birlikte kullanılması durumunda kültür dengesinde değişim meydana gelmediği saptanmıştır (Neve ve ark., 2001).

Kuraishi ve ark. (2001) kullanılan MTGase miktarının yoğurt jel yapısı üzerine etkisi araştırmıştır. Set tipi yoğurtlarda, jel sıklılığının 5 unit/ protein miktarlarına kadar kullanılan MTGase ile artığı, ancak daha fazla miktarda kullanılan enzimin aynı etkiyi göstermediği bulunmuştur. Yüksek miktarlarda MTGase kullanımı ile yoğurdun maksimum jel sıklılığı ve kırılma gücüne ulaştığı sonra bu niceliklerin kademeli olarak azaldığı bildirilmektedir. Bu sonuç, fazla miktarda oluşan G-L bağlarının yoğurt jeli oluşumundaki ağ yapısını inhibe edebildiğini göstermektedir.

Stirred tipi yoğurtlarda MTGase ilavesi ile viskozitenin arttığı gösterilmiştir. Yağsız kuru madde miktarının azaltılmasıyla ki bu maliyetin azalması anlamına gelir, MTGase kullanımı ile viskoziteyi arttırmak mümkündür. Ayrıca bu tip yoğurtlarda enzimin kullanılmasıyla serum ayrılmasının önüne geçildiği bildirilmektedir (Kuraishi ve ark., 2001).

Dondurulmuş sütlü tatlılarda kalite gelişimi üzerine çeşitli çalışmalar yer almaktadır. MTGase eklenmiş dondurmanın daha pürüzsüz ve kaşığa alınmasının daha kolay olduğu bulunmuştur. Düşük kalorili şeker içermeyen dondurmalarda ortaya çıkan buzlu tekstür kaliteyi olumsuz yönde etkilediğinden bu ürünlerde MTGase kullanımı önemlidir (Kuraishi ve ark., 2001).

MTGase'ın set yoğurtlarda kullanım olanaklarının araştırıldığı bir çalışmada, inkübasyon öncesi enzim uygulaması ile inkübasyon süresinin uzadığı, ancak enzim

ile termofilik starter kültürün bir arada kullanımının inkübasyon süresi üzerine etkili olmadığı, depolama sırasında asitlik gelişiminin sınırlı kaldığı, buna karşın duyuşal açıdan MTGase ile üretilen yoğurtların klasik yoğurt aroma özelliklerini tam olarak taşımadığı belirlenmiştir (Lorenzen ve ark., 2002).

Kırmacı (2005), MTGase enziminin yağsız yoğurtlarda, yağın uzaklaştırılması ile meydana gelen tekstürel zayıflığın giderilmesinde başarıyla uygulanabileceğini ortaya koymuştur. Çalışmada ayrıca, MTGase enziminin yoğurt bakterileri üzerine kısmi inhibisyon etkisi olduğu ve buna bağlı olarak da inkübasyon süresinin ve depolama süresinin uzadığı belirlenmiştir. MTGase uygulanan yoğurtların duyuşal niteliklerinin, kontrol örneğinden daha zayıf olduğu görülmüştür. Ayrıca MTGase kullanımı durumunda ısıl işlem sıcaklığının 75–80°C'ye çekilebileceği ve kurumadde artırımının elemine edilebileceği belirlenmiştir.

Yoğurt üretiminde MTGase ilave edilmiş süt kullanıldığında, fermentasyon süresinin daha uzun ancak depolama süresince ortaya çıkan asitlik gelişimin daha hızlı olduğu gözlenmiştir (Lorenzen, 2000a; Ozer ve ark., 2007). Bu yolla elde edilen yoğurt örneklerinin jel dayanımının daha yüksek, sineresiz hızının ise daha düşük olduğu bulunmuştur. Çapraz bağlı jellerin daha düşük geçirgenliğe sahip olmasının, daha iyi bir mikro yapı ve protein ağ yapısında daha küçük porların oluşumu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Faergeme ve ark., 1999; Lorenzen, 2000a; Schorsch, ve ark., 2000). Ayrıca enzim ilave edilmiş süttten elde edilen yoğurt örnekleri daha pürüzsüz, kuru ve beyaz bir yüzeye sahip olup tadı daha hafif ve kıvamı daha fazladır (Lorenzen, 2000a). MTGase düşük yağ ve yağsız kuru madde içeriğine sahip peynir ve dondurma gibi süt ürünleri üretimini de olasıklar (Motoki ve Seguro, 1998).

### **2. 3. Transglutaminazın Ayran Üretiminde Kullanılması**

Literatürde transglutaminaz enzimi ile ilgili yoğurtlarda yapılmış birçok çalışma bulunmakla birlikte ayran konusunda yapılmış bir çalışmaya rastlanmıştır. Yapılan bu çalışmada (Şanlı ve ark., 2011); transglutaminaz enzimi ile süt proteinlerinin enzimatik modifikasyonunun ayran üretiminde uygulanabilirliği ve

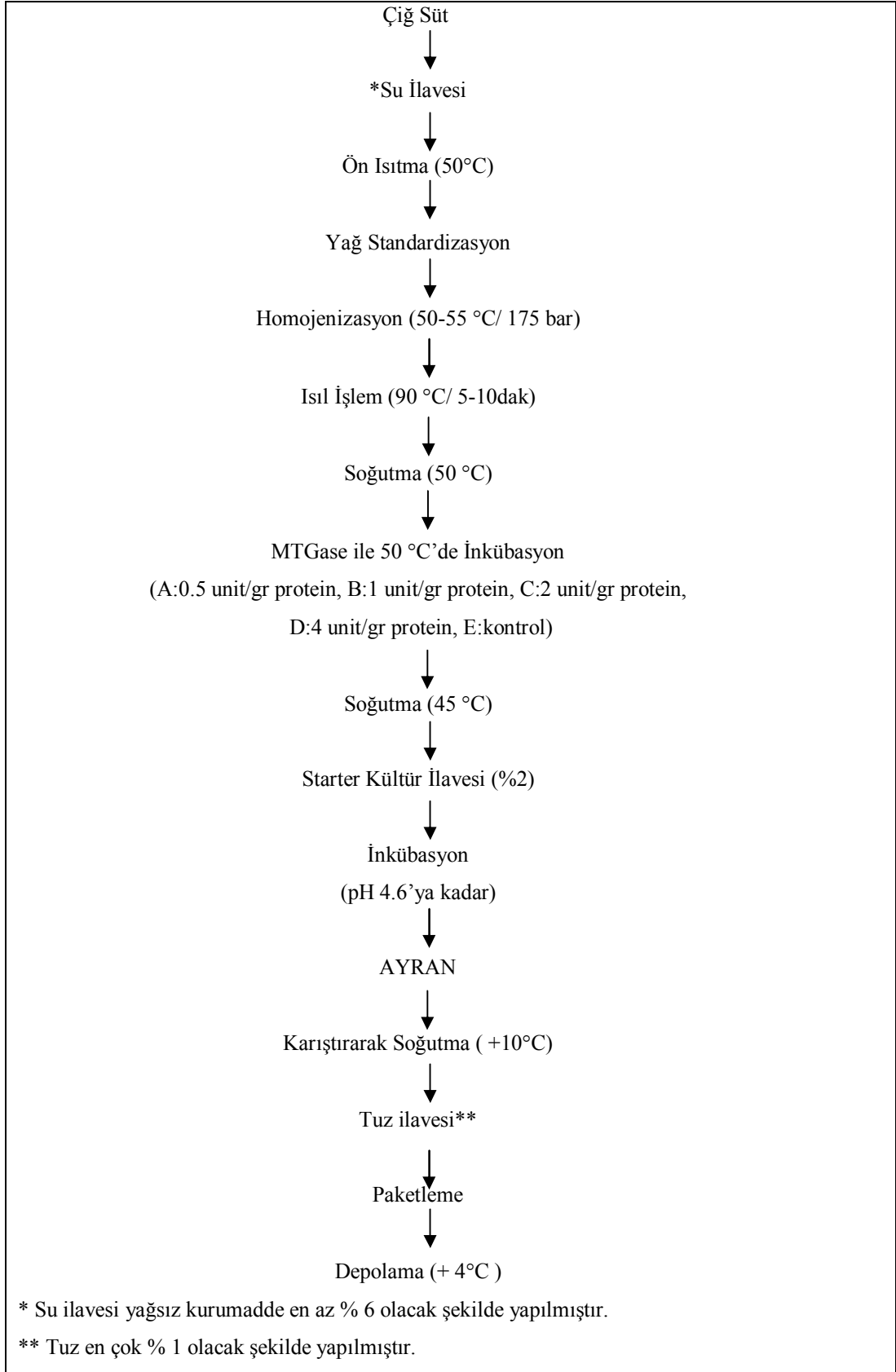
enzim ilavesinin ürünün kalite kriterleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada enzim süte farklı aşamalarda katılmış ve farklı sürelerde muamele edilmiştir. Araştırma sonucunda enzimle muamele edilmiş süttten üretilen Ayranların reolojik özelliklerinin iyileştiği ve mikrostrüktürel yapısının sıkılaştığı belirlenmiştir. Enzimle muamele ayranların kimyasal ve duyusal özelliklerinde ise önemli bir değişiklik meydana gelmediği bildirilmiştir.

**3.MATERYAL ve YÖNTEM****3. 1. Materyal**

Araştırmada hammadde olarak; Anı Süt A.Ş.'den sağlanan inek sütleri kullanılmıştır. Ayran üretiminde, starter kültür olarak Chr.Hansen (Peyma-Hansen, Türkiye) firmasının ürettiği YC-350 (*Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus*) liyofilize kültürü, transglutaminaz enzimi olarak Ajinomoto Co. Inc. (Japon)firmasından temin edilmiştir ve *Streptoverticillium* spp.'den izole edilmiş mikrobiyal trans glutaminaz (MTGase) (Activa WM) enzimi kullanılmıştır.

**3. 2. Yöntem****3.2.1. Ayran üretimi**

Şekil 3. 1'de Ayran üretim şeması verilmiştir. Şekil 3.1'de görüldüğü gibi Ayran üretiminde, sütler yağ, kurumadde ve tuz içerikleri TS 3810 Ayran Standardı (Anonim 2003) ve Fermente Sütler Tebliği (Anonim, 2001) esas alınarak yağsız kurumadde en az % 6 olacak şekilde sulandırılmıştır, yağ standardizasyonu ve homojenizasyonu gerçekleştirildikten sonra  $90\pm 2^{\circ}\text{C}$  de 5–10 dakika süre ile ısıl işlem uygulanmıştır. Pastörizasyon işleminin ardından  $50^{\circ}\text{C}$  de 0.5 unit/gr protein, 1 unit/gr protein, 2 unit/gr protein, 4 unit/gr protein oranlarda MTGase ile yine 10 dk. inkübasyon işlemi uygulanmıştır. (1 unit MTGase/g süt; süt proteinin her 1 gramına karşılık transglutaminazın 1 unite katılacağını ifade etmektedir.) Daha sonra  $45^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulan sütlere % 2 oranında *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii spp.bulgaricus* starter kültür ilave edilerek ve pH 4.6'ya kadar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda ayranlar karıştırılarak soğutulmuş ve tuz ilavesi yapıldıktan sonra paketlenmiştir.



Şekil 3.1. Ayran üretim şeması

Ayran üretimi iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Sütlerin bileşimleri ile Ayranların fiziksel, kimyasal, mikrotekstürel, duyusal ve mikrobiyolojik analizleri depolamanın 1., 10. ve 20. günlerinde yapılmıştır.

### **3. 2. 2. Çiğ sütlerde yapılan analizler**

#### **3. 2. 2. 1. pH Tayini**

Sütlerde pH değerleri doğrudan Thermo Scientific firmasına ait orion 4 star marka dijital pH metre kullanılarak saptanmıştır.

#### **3. 2. 2. 2. Titrasyon Asitliği Tayini**

Çiğ sütlerde asitlik tayini alkali titrasyon yöntemi ile saptanmış ve sonuçlar % laktik asit cinsinden ifade edilmiştir. (IDF, 1982).

#### **3. 2. 2. 3. Kurumadde Oranları**

Çiğ sütte gravimetrik yöntem kullanılarak belirlenmiş ve sonuçlar % olarak ifade edilmiştir.(IDF, 1982).

#### **3. 2. 2. 4. Yağ Oranı**

Yağ oranı 0-8 taksimathlı özel süt bütirometresi ile Gerber yöntemine göre % olarak belirlenmiştir. (Anonim, 1990).

### **3. 2. 2. 5. Protein Oranı**

Protein oranı, protein azot cihazı Leco FB 528 cihazı ile % protein olarak belirlenmiştir

### **3. 2. 3. Ayran analizleri**

#### **3. 2. 3. 1. pH Tayini**

Sütlerde pH değerleri doğrudan Thermo Scientific firmasına ait orion 4 star marka dijital pH metre kullanılarak saptanmıştır.

#### **3. 2. 3. 2. Titrasyon Asitliği Tayini**

Ayranlarda asitlik tayini alkali titrasyon yöntemi ile saptanacak ve sonuçlar % laktik asit cinsinden ifade edilecektir (IDF, 1982).

#### **3. 2. 3. 3. Kurumadde Oranları**

Ayranlarda gravimetrik yöntem kullanılarak belirlenecek ve sonuçlar % olarak ifade edilecektir (IDF, 1982).

#### **3. 2. 3. 4. Yağ Oranı**

Ayranların yağ oranı 0-8 taksimatlı özel süt bütirometresi ile Gerber yöntemine göre % olarak belirlenmiştir (Anonim, 1994).



**3. 2. 3. 5. Protein Oranı**

Protein oranı, protein azot cihazı Leco FB 528 cihazı ile % protein olarak belirlenmiştir

**3. 2. 3. 6.Tuz Oranı**

Tuz oranları Mohr titrasyon yöntemine göre, hazırlanan örneğin ayarlı 0.1 N AgNO<sub>3</sub> ile titrasyonu sonucu belirlenmiş ve sonuçlar % olarak ifade edilmiştir (Anonim, 1989).

**3. 2. 3. 7. Viskozite**

T bar başlıklı Brookfield viskozimetresi (Brookfield Model RVDV-II+, Brookfield engineering Laboratories. Inc Middlesbrough UK.) kullanılarak ölçülmüştür (Özer ve Ark., 1997).

**3. 2. 3. 8. Su Tutma Kapasitesi**

Ayranlarda yapılan su tutma kapasitesi Remeuf ve ark. (2003) tarafından tanımlanan yöntemin modifiye edilmesiyle belirlenmiştir. Buna göre bir plastik tüpe yaklaşık 20 g örnek tartılarak bir santrifüjde (MSE Hi-Spin 21. Model, Fison Scientific Equipment Pic., UK) 6000 d/d'de 10 dak. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sıcaklığı 20°C olarak seçilmiştir. Santrifüj işleminden sonra örnekten ayrılan su plastik tüpten süzölmüş ve bu tüpün tabanında biriken santrifügat tartılmıştır. Elde edilen bu santrifügatın orijinal örnek ağırlığına oranı % su tutma kapasitesi olarak adlandırılmıştır.

**3.2.3.9. Serum ayrılması**

100 ml'lik mezürlere konulan ayranlarda 4-5°C ' de depolama süresi boyunca ayrılan serum miktarı ölçülerek (ml olarak) % olarak verilmiştir. (Özünü, 2005 )

**3. 2. 3. 10. Mikrostrüktürel Özellikler**

Ayranlar örneklerinin mikrostrüktürlerini belirlemek üzere analize hazırlanmasında Hayat (1981) tarafından bildirilen yöntemden yararlanılmıştır. Ayran örnekleri 0.45 por çapına sahip hazır kapsüller içine konulacak ve bu kapsüllerin ağzı kapatılarak preparasyon şişelerine alınmıştır. Kapsüller 0.1M sodyum fosfat tamponu ile hazırlanan (pH:7.2) %3'lük glutaraldehit çözeltisi içinde 1 gece bekletilerek ön fiksasyonu yapılan ve dört defa tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Daha sonra %1'lik osmium tetroksit içinde 1 saat post fiksasyona tabi tutulmuş ve yine tampon çözeltisi ile 4 defa yıkanmıştır. Fiksasyon işlemlerinden sonra örnekler dehidrasyona alınmıştır. Dehidrasyonda %30 – 40 – 50 – 60 – 70 – 80 – 90 – 100'lük alkol serileri kullanılmıştır. %100'lük alkolden 3 kez geçirildikten sonra, kapsüller açılarak etüv içinde 30°C de kurumaya bırakılmıştır. Hazırlanan örnekler, karbon kaplı bant yardımı ile staplar üzerine yapıştırılmış ardından Polaron SC 502 sputter coater aleti ile saf altınla kaplandıktan sonra taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenerek görüntüleme yapılmıştır.

**3. 2. 3. 11. Mikrobiyolojik analizler**

TS 3810'a göre alınacak (Anonim, 2003) 1 mL ayran örneğinin % 0.1'lik steril peptonlu su ile karıştırılmasından sonra uygun dilisyonlar hazırlanmıştır ve değişik grup mikroorganizmalar için önceden ayarlanan petri kutularına, hazırlanan dilüsyonlarından 1 ml alınarak dökme ekim yöntemi ile ekim yapılmıştır. Ekimler 2 paralelli olarak, 2 değişik dilisyonda yapılmış ve petri kutularında oluşan koloni sayıları logaritmik transformasyona tabi tutulduktan sonra örneklerde canlı mikroorganizma sayıları belirlenmiştir.

Mikrobiyolojik analizlerde anaerobik ortam, Merck (Almanya) firmasından sağlanan anaerobik kitler aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, her bir kit üzerine 35 ml damıtık su homojen bir şekilde yayılacak ve kitler hemen anaerobik jarlara konulmuştur.

### **Toplam starter sayısı**

Ayran örneklerinde *S. thermophilus* M 17 Agar kullanılarak aerobik olarak, *L. delbrueckii spp.bulgaricus* MRS agarda anaerobik olarak 37°C'de 48 saat süre ile inkübe edilerek belirlenmiştir (Rybka ve Kailasaphaty, 1996).

### **3. 2. 3. 12. Duyusal Analizler**

Ayranlarda depolamanın 1., 10. ve 20. günlerinde 10 kişiden oluşan panel tarafından Ranking test modeli kullanılarak Bodyfelt ve ark.'na (1988) göre yapılmıştır.

### **3. 2. 3. 13. İstatistiksel Analizler**

İstatistik analizler "Tesadüf Parsellerinde Faktöriyel Deneme Planı"na göre (5x3x2) (Enzim Oranı x Depolama x Tekerrür) yapılacak ve SPSS 9.0 paket programı kullanılmıştır. Fiziksel ve kimyasal özellikler açısından, örnekler arasında farklılık olup olmadığını saptamak için varyans analizi yapılmış ve varyans analizinde önemli olanlar LSD testine tabi tutulmuştur (Bek ve Efe, 1995).

**AYRAN DUYUSAL ANALİZ FORMU**

Panelist Adı-Soyadı: \_\_\_\_\_ Tarih: \_\_\_\_\_

Birazdan size Ayran örnekleri servis edilecek ve size ürünün bazı kriterleri hakkındaki düşünceleriniz sorulacaktır. Lütfen;

1. Size verilen Ayran örneklerini aşağıda verilen sıraya göre tat-aroma, kıvam ve genel beğeniniz yönünden değerlendiriniz.
2. Ürünün sizde bıraktığı etkiye göre, aşağıdaki skalayı kullanarak 1 ile 9 arasında bir numarayı daire içerisine alınız.

*Puanlandırmada, 1= Çok çok kötü, 5= Ne iyi ne kötü, 9= Çok çok iyi'ye eşittir.*

3. Ürün ile ilgili varsa yapmak istediğiniz önerileri aşağıda ayrılan kısma yazınız.
4. Her ürünü tattıktan sonra, diğerine geçmeden önce ağızınızı su ile çalkalayınız.

*Sizin yapacağınız dürüst bir puanlama bizlerin çalışmasına yön verecektir.*

**TAT AROMA**

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

☹️ 😊

**KIVAM**

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

☹️ 😊

**GENEL KABUL EDİLEBİLİRLİK**

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

☹️ 😊

Ürün hakkındaki diğer düşünceleriniz: .....

Not: Lütfen örnekleri tercihinize göre sıralayınız.

1) 2) 3) 4) 5)

Şekil 3.2. Duyusal analiz formu

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

## 4.1. Araştırmada Kullanılan Çiğ Sütün ve Ayranların Bazı Nitelikleri

Üretimde kullanılan çiğ sütlerin ve ayranların bileşimi Çizelge 4.1’de ve Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Araştırmada kullanılan çiğ sütün bileşimi

	pH	Titration asitliği (%L.A.)	Kurumadde (%)	Protein (%)	Yağ (%)	Laktöz (%)	Kül (%)
<b>1. tek</b>	6.69	0.184	8.52	3.32	0.2	4.20	0.76
<b>2. tek</b>	6.68	0.176	8.62	3.38	0.2	4.27	0.75
<b>Ort.</b>	<b>6.69</b>	<b>0.180</b>	<b>8.57</b>	<b>3.35</b>	<b>0.2</b>	<b>4.24</b>	<b>0.76</b>

Üretimde kullanılan çiğ sütün bileşiminin, TS1018 Çiğ İnek Sütü standardına uygun olduğu belirlenmiştir.

Hammadde çiğ süt, TS 3810 Ayran Standardında (Anonim, 2003) verilen yarım yağlı ayran sınıfına uygun olarak, ayran örneklerinin yağ oranı en az % 0.8 olacak şekilde standardize edilmiştir.

Çizelge 4.2. Deneme ayranlarının ilk gün bileşimleri (n=2)

Ayranlar*	pH	Titration asitliği (°SH)	Kurumadde (%)	Protein (%)	Yağ (%)	Tuz (%)
<b>A</b>	4.679	29.92	6.37	1.97	0.80	0.65
<b>B</b>	4.629	30.98	6.25	2.03	0.75	0.62
<b>C</b>	4.683	29.92	6.43	2.01	0.78	0.72
<b>D</b>	4.700	30.56	6.39	2.00	0.80	0.68
<b>E</b>	4.580	32.64	6.37	1.99	0.80	0.65

\*A:0.5 unit/gr protein, B:1 unit/gr protein, C:2 unit/gr protein, D:4 unit/gr protein, E:kontrol

## 4. 2. Depolama Süresince Ayranların Fizikokimyasal Özelliklerinde Görülen Değişmeler

Depolama süresince ayranların bileşiminde görülen değişmeler Çizelge 4.3'de verilmiştir. Denemede üretilen ayranların bileşimlerinin Fermente Sütler Tebliği'ne (2009) uygun olduğu belirlenmiştir

Çizelge 4.3.'de Ayranların bazı fizikokimyasal özelliklerinde depolama süresince görülen değişiklikler (n=2)

Örnek *	Depolama Süresi	pH	Titrasyon Asitliği (°SH)	Viskozite	Serum Ayrılması	Su tutma Kapasitesi
A	1. gün	4.68±0.013 <sup>b1</sup>	29.92±0.311 <sup>g2</sup>	990±28.3 <sup>13</sup>	0±0.00 <sup>e3</sup>	77.51±0.127 <sup>12</sup>
	10. gün	4.27±0.018 <sup>e2</sup>	32.00±0.990 <sup>d1</sup>	1105±7.1 <sup>e2</sup>	1±0.00 <sup>d2</sup>	78.66±0.014 <sup>d1</sup>
	20. gün	4.01±0.008 <sup>i3</sup>	32.40±0.283 <sup>d1</sup>	1285±7.1 <sup>c1</sup>	1.5±0.00 <sup>d1</sup>	71.03±0.057 <sup>i3</sup>
B	1. gün	4.63±0.030 <sup>c1</sup>	30.98±0.028 <sup>f3</sup>	1045±21.2 <sup>d3</sup>	0±0.00 <sup>e1</sup>	78.04±0.113 <sup>e2</sup>
	10. gün	4.24±0.039 <sup>12</sup>	32.64±0.085 <sup>e2</sup>	1190±14.1 <sup>d2</sup>	0±0.00 <sup>e1</sup>	79.58±0.057 <sup>b1</sup>
	20. gün	3.99±0.039 <sup>i3</sup>	33.20±0.424 <sup>c1</sup>	1420±28.3 <sup>b1</sup>	0±0.00 <sup>e1</sup>	72.25±0.014 <sup>i3</sup>
C	1. gün	4.68±0.033 <sup>a1</sup>	29.92±0.170 <sup>g2</sup>	1150±14.1 <sup>d3</sup>	0±0.00 <sup>e1</sup>	78.27±0.099 <sup>e2</sup>
	10. gün	4.23±0.009 <sup>12</sup>	33.28±0.594 <sup>c1</sup>	1290±28.3 <sup>c2</sup>	0±0.00 <sup>e1</sup>	80.41±0.184 <sup>a1</sup>
	20. gün	4.01±0.001 <sup>i3</sup>	33.00±0.283 <sup>c1</sup>	1485±21.2 <sup>a1</sup>	0±0.00 <sup>e1</sup>	74.65±0.042 <sup>h3</sup>
D	1. gün	4.70±0.027 <sup>a1</sup>	30.56±0.113 <sup>12</sup>	1095±7.1 <sup>e2</sup>	0±0.00 <sup>e1</sup>	77.18±0.071 <sup>g2</sup>
	10. gün	4.30±0.011 <sup>e2</sup>	31.60±0.141 <sup>e1</sup>	1100±70.7 <sup>e2</sup>	0±0.00 <sup>e1</sup>	79.23±0.057 <sup>c1</sup>
	20. gün	4.10±0.015 <sup>h3</sup>	31.80±0.141 <sup>d1</sup>	1160±28.3 <sup>d1</sup>	0±0.00 <sup>e1</sup>	72.17±0.042 <sup>i3</sup>
E	1. gün	4.58±0.018 <sup>d1</sup>	32.64±0.283 <sup>e3</sup>	400±42.4 <sup>h2</sup>	3±0.00 <sup>e3</sup>	71.12±0.057 <sup>j1</sup>
	10. gün	4.19±0.021 <sup>g2</sup>	34.00±0.566 <sup>b2</sup>	435±21.2 <sup>g1</sup>	30±1.41 <sup>b2</sup>	69.70±0.424 <sup>k2</sup>
	20. gün	3.91±0.006 <sup>k3</sup>	34.98±0.424 <sup>a1</sup>	460±28.3 <sup>g1</sup>	36±1.41 <sup>a1</sup>	68.64±0.057 <sup>13</sup>

\*A:0.5 unit/gr protein, B:1 unit/gr protein, C:2 unit/gr protein, D:4 unit/gr protein, E:kontrol

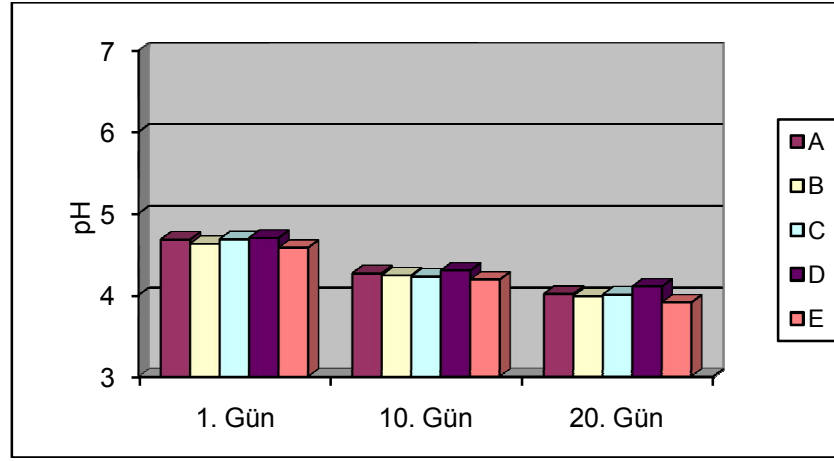
\*\*MTGase enzimi oranına göre sütunlar yukarıdan aşağıya doğru incelendiğinde aynı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

Depolama süresine göre, sütunlar yukarıdan aşağıya doğru incelendiğinde aynı rakamlarla gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

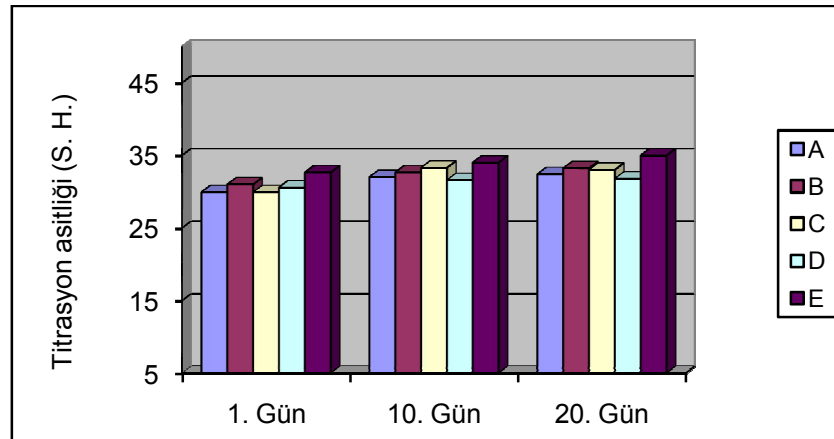
#### 4. 2. 1. Ayran örneklerinin pH ve titrasyon asitliği değerlerinde görünen değişimler

Aktif asitlik (serbest asitlik) ve toplam asitlik (titrasyon asitliği) olmak üzere iki tip asitlik vardır. Aktif asitlik solüsyondaki hidrojen iyonları konsantrasyonunun miktarını verir ve pH değeri ile ifade edilmektedir.

Ayran örneklerinin pH ve titrasyon asitliği değerleri Çizelge 4.3'de Şekil 4. 1.'de ve Şekil 4. 2.'de verilmiştir.



Şekil 4. 1. Farklı oranda MTGase içeren ayranların pH değerleri



Şekil 4. 2. Farklı oranda MTGase içeren ayranların titrasyon asitliği değerleri

Enzim ilavesinin ayranların pH'sına ve titrasyon asitliğine etkisi önemli bulunmuştur ( $p < 0.01$ ). Enzim ilaveli örneklerin pH değerlerinin kontrol örneğine göre daha yüksek, titrasyon asitliği değerlerinin ise daha düşük olduğu tespit

edilmiştir. TG ile süt proteinlerinin ve peptidlerin çapraz-bağlanmasının bir sonucu olarak yoğurt bakterilerinin özellikle laktobasillerin proteolitik aktivitesinin azalacağı ve bunun da streptokokların gelişimini dolayısıyla laktik asit üretimini yavaşlatacağı düşünülmektedir. Kırmacı (2005) ve Yüksel (2007) de MTGase ilave edilen yoğurtlarda benzer sonuçlara ulaşmıştır.

Ayranlara ilave edilen enzim konsantrasyonu arttıkça örneklerin pH değerlerinin arttığı, titrasyon asitliği değerlerininse azaldığı belirlenmiştir ( $p < 0.01$ ). En yüksek pH ve titrasyon asitliği değerleri sırasıyla D ve A örneklerinde, buna karşılık en düşük pH ve titrasyon asitliği değerleri de sırasıyla A ve D örneklerinde elde edilmiştir. Bunun nedenin MTGase enzimin laktobasiller üzerindeki inhibitif etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Neve ve ark., 2001).

Şekil 4. 1. ve Şekil 4. 2.'de yer alan histogramlardan görüldüğü gibi, depolama süresi boyunca yoğurt örneklerinin pH'sı azalmış ve titrasyon asitliği değerleri ise artmıştır. pH değerlerindeki bu azalış istatistiksel olarak önemsiz ( $p > 0.05$ ) olmasına rağmen, depolamanın titrasyon asitliğine etkisi istatistiksel olarak önemli çıkmıştır ( $p < 0.01$ ). Ayranların pH değerlerindeki azalma ve titrasyon asitliğindeki artmanın depolama sırasında laktik asit bakterilerinin faaliyetlerine devam etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kırmacı (2005) farklı konsantrasyondaki MTGase ilaveli yoğurt örnekleri üzerinde yaptığı çalışmada depolama süresince pH değerlerinin düştüğünü tespit etmiştir.

Bunun yanı sıra depolama sırasındaki bu azalma starter kültürler ve özellikle de bunların üretmiş olduğu enzimlerin aktivitelerine bağlı olarak fermente ürünlerde asitliğin arttığı birçok araştırmacı tarafından da belirlenmiştir. (Abrahamsen ark., 1978; Abrahamsen ve Holmen, 1981; Atamer ark., 1989; Sezgin ark., 1993; Aydar, 1996; Altınayar, 1997; Atamer ark., 1999; Gülmez ve Güven, 2003). Atamer ark. (1999) Dayanıklı ayran üretimi üzerine yapılan çalışmada, iki haftalık depolama sonunda ayranların asitliklerinde 0.06-0.13 pH'lık bir düşüş saptamışlardır. Katkı



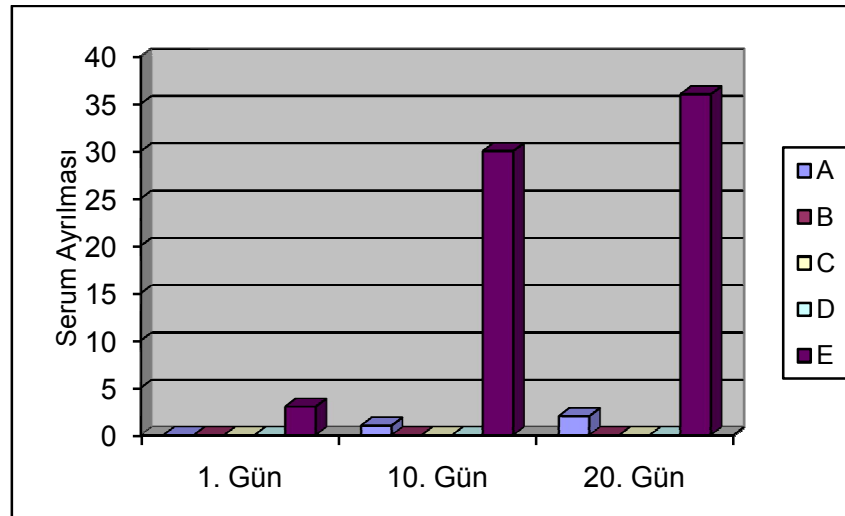
maddesi olarak mikrobiyel koruyucu ilavesinin denendiği bir çalışmada da Ayranların pH'sında 7 günlük depolama sonucunda 0.21 pH'lık bir azalış saptanmıştır (Gönç ark., 1989). Aynı depolama süresince, farklı oranlarda su katılarak üretilen Ayranların pH değerleri de benzer düzeyde azalma (0.2 pH) göstermiştir (Ergüllü ve Demiryol, 1983).

Lorenzen ve Schlimme (1998) yoğurt örneklerinde MTGase enzimi ilavesinin titrasyon asitliği değerinde 14 günlük depolama sürecinde enzim ilave edilmeyen örneklere göre farklılık yaratmadığını bildirmektedirler. Yüksel (2007) ise yağlı yoğurt örneklerinde enzim ilavesinin titrasyon asitliği değerini önemli oranda etkilemediğini tespit etmiştir.

#### 4. 2. 2. Ayran örneklerinin serum ayrılması değerlerinde görülen değişimler

Ayran gibi fermente süt ürünlerinin kalitesinde etkili olan önemli stabilite parametrelerinden biri serum ayrılmasıdır. En önemli kusur olarak tanımlanan serum ayrılması, yoğurt ve ayranların yüzeyinde zamana bağlı olarak ve kendiliğinden meydana gelen, katı ve sıvı fazın birbirinden ayrılmasıdır (Lucey, 2001).

Ayran örneklerinin depolamanın 1., 10. ve 20. gününde belirlenen serum ayrılması değerleri Çizelge 4.3.'de ve Şekil 4.3.'de verilmiştir.



Şekil 4. 3.Farklı oranda MTGase içeren ayranların serum ayrılması değerleri

Enzim ilavesi ayranların serum ayrılması değerlerini önemli düzeyde etkilemiştir ( $p<0.01$ ). Kontrol örneklerinde serum ayrılması gözlenirken enzim ilave edilen örneklerde A örneği hariç, serum ayrılması olmamıştır. Bu durumun MTGase enziminin oluşturduğu çapraz bağlanma tepkimelerine bağlı olduğu düşünülmektedir.

Enzim oranları ayran örneklerinin serum ayrılması değerlerini önemli düzeyde etkilemiştir ( $p<0.01$ ). Şekil 4.3.'de de görüldüğü gibi kontrol örneğinde serum ayrılması gözlenirken, enzim ilaveli A, B, C ve D örneklerinde serum ayrılması olmamıştır. Bu durum MTGase enzimin oluşturduğu çapraz bağlardan ve bu bağlar arasında serbest suyu hapsetmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. A örneğinde serum ayrılması gecikmiş ama tamamen önlenememiştir.

MTGase enziminin katalize ettiği çapraz bağlanmanın yoğurdun jel sıklığını arttırdığı ve geçirgenliğini azalttığı, özellikle de yağsız ya da az yağlı yoğurtlarda kullanımının pıhtı stabilitesini geliştirdiği, serum ayrılmasını geciktirdiği ve depolama asitliğini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Faergemand ve ark., 1999a).

Süt proteinlerinden kazeinlerin sahip olduğu primer yapılarından dolayı MTGase enzimi için çok uygun substrat oldukları bildirilmektedir (Faergemand ve ark., 1999a; Dickinson ve Yamamoto, 1996; Imm ve Lee, 2000; Lauber ve ark., 2000; Lorenzen, 2000; Kuraishi ve ark., 2001). Buna karşın; süt proteinlerinin önemli bir kısmını oluşturan serum proteinlerinin ikincil ve üçüncül yapılarından dolayı enzim reaksiyonuna karşı dayanıklı oldukları, ancak; ısı ile denatürasyonları sonucu enzimin serum proteinleri üzerindeki etkinliğinin arttığı bilinmektedir (Lorenzen, 2000; O'Sullivan ve ark., 2001). Bu nedenle enzim miktarındaki artış sıkı yapı oluşumunu sağlamakta ve serbest su tutulmaktadır.

Benzer şekilde, Kırmacı (2005), Lorenzen (2002), Farnsworth ve ark. (2003) ve Özer (2007) de yaptıkları çalışmalarda MTGase enziminin yoğurtlarda serum ayrılmasında azalmaya neden olduğunu belirlenmişlerdir. Serum ayrılmasındaki

azalmanın nedeninin, enzimin katalize ettiği süt proteinlerinin çapraz bağlanmasının bir sonucu olarak jel geçirgenliğindeki azalma olduğu düşünülmektedir.

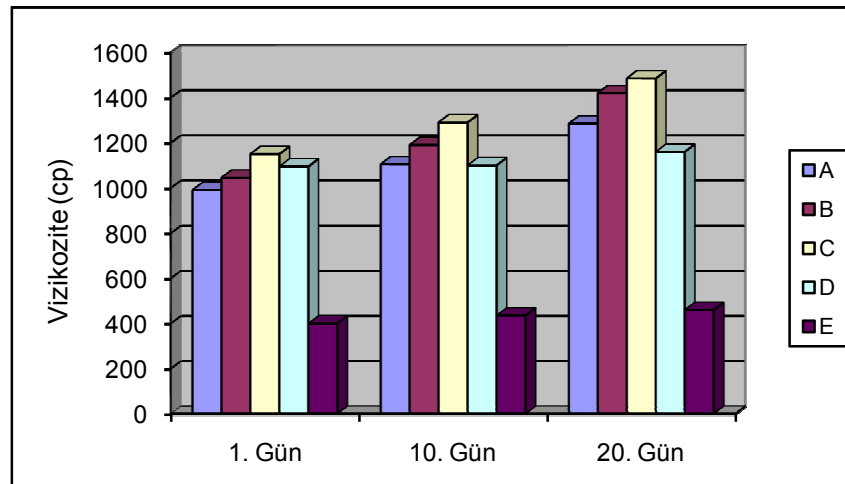
Depolama süresinin örneklerin serum ayrılması değerleri üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli olmuştur ( $p<0.01$ ). Şekil 4. 3.'de de görüldüğü gibi depolamanın 1. gününde kontrol örneğinde serum ayrılması gözlenirken, depolamanın sonundakontrol ve 0.5 unit/gr protein enzim içeren (A) örneklerde serum ayrılması görülmüştür. Aynı şekilde depolamanın 20. günde de serum ayrılması sadece A ve E (kontrol) örneklerinde görülmüştür. Depolama süresince A ve E örneklerinin serum ayrılması değerlerinin arttığı belirlenmiştir.

Kırmacı (2005) da MTGase katkılı yoğurtlar ile yaptığı çalışmada hem depolama süresinin hem de enzim konsantrasyonundaki değişimin serum ayrılması üzerine etkisinin önemli olduğunu bulmuştur.

#### 4. 2. 3. Ayran örneklerinin viskozite değerlerinde görülen değişimler

Fermente süt ürünlerinin kalitesinde etkili olan viskozite ise bir sıvının iç sürtünmesi olarak tanımlanmaktadır (Renner, 1991).

Ayran örneklerinin depolamanın 1. 10. ve 20. gününde belirlenen viskozite değerleri Çizelge 4.3.'de ve Şekil 4.4.'de verilmiştir



Şekil 4. 4. Farklı oranda MTGase içeren ayranların viskozite değerleri

MTGase enzimi ilavesinin ayranların viskozite değerleri üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0.01$ ). MTGase ilaveli tüm örneklerin viskozite değerleri kontrol örneğinden (E) yüksek çıkmıştır. Bu durum MTGase enzimin oluşturduğu çapraz bağlanmanın viskozite üzerine etkisini göstermektedir. Şanlı (2011) yaptığı çalışmada MTGase ilaveli ayran örneklerinin kontrol örneğinden daha yüksek viskozite değerlerine sahip olduğunu saptanmıştır.

Örneklerdeki enzim oranı arttıkça viskozite değerleri de artmıştır. En yüksek değer C örneğinde tespit edilmiştir. Ancak enzim oranı olarak artış göstermesine rağmen D örneğinde viskozite düşmüştür. Set tipi yoğurtlarda, jel sıklığının 5 unit/protein miktarlarına kadar kullanılan TG ile artığı, ancak daha fazla miktarda kullanılan enzimin aynı etkiyi göstermediği bulunmuştur. Yüksek miktarlarda TG kullanımı ile yoğurdun maksimum jel sıklığı ve kırılma gücüne ulaştığı sonra bu niceliklerin kademeli olarak azaldığı bildirilmektedir. Bu sonuç, fazla miktarda oluşan G-L bağlarının yoğurt jeli oluşumundaki ağ yapısını inhibe edebildiğini göstermektedir (Kuraishi ve ark., 2001).

Depolama süresinin ayranların viskozitesi üzerine etkisinin önemli olduğu saptanmıştır ( $p<0.01$ ). Depolama boyunca tüm örneklerin viskozite değerleri artmıştır.

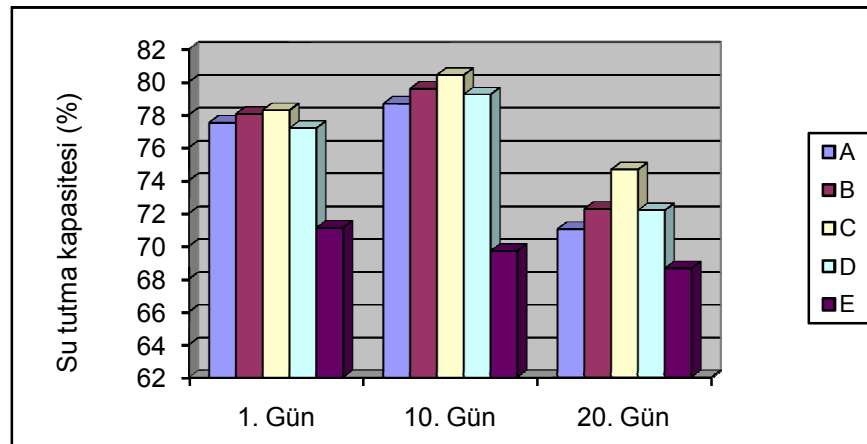
Benzer şekilde; Kırmacı (2005) ve Özer (2007) yaptıkları çalışmalarda ısı işleminin ardından MTGase ile muamele edilen sütten elde ettikleri yoğurt örneklerinde viskozitenin kontrol örneğine göre istatistiksel açıdan önemli sayılacak oranda yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

#### **4. 2. 4. Ayran örneklerinin su tutma kapasitesi değerlerinde görülen değişimler**

“Su tutma kapasitesi” (WHC) yoğurdun reolojik özelliklerini yansıtan ölçütlerden biridir ve tüketici beğenisi açısından önemli bir parametredir. Şekil 22’de TG-içeren yoğurt örnekleri ile kontrol örneklerinin su tutma kapasiteleri (%WHC)

karşılaştırılmıştır. Serum ayrılması, set yoğurdun yüzeyinde ya da mekanik olarak jel kırıldığında açığa çıkan serum olarak ifade edilmektedir. Sinerezis, ağ yapının yeniden düzenlenmesi ile partikül-partikül bağlanmalarının sayısında artışa neden olmaktadır. Daha sonra ağ yapı büzülme; (contraction) ve serum ayrılması gerçekleşmektedir. Sinerezisin nedenlerinin düşük kuru madde ve protein içeriği, yüksek inkübasyon sıcaklığı ile depolama ve inkübasyon boyunca üründe ortaya çıkan fiziksel etkiler olduğu kabul edilmektedir (Walstra ve ark., 1999). Kuru madde ve/veya protein içeriği artırılarak yoğurtta serum ayrılmasının önüne geçilebileceği bildirilmektedir (Tamime and Robinson, 1999). TG ile üretilen yoğurt örneklerinde de su tutma kapasitesinin daha fazla olduğu ve serum ayrılmasının önüne geçilebileceği öne sürülmektedir (Kuraishi ve ark., 2001). Çalışmamızda da ayranlara ilave edilen MTGase enzimi ayranların su tutma kapasitesi değerlerini belirgin olarak arttırdığı saptanmıştır ( $p<0.01$ ).

Enzim oranının ayranların su tutma kapasitesi değerlerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0.01$ ). Çizelge 4. 3.'de ve Şekil 4. 5.'de görüleceği gibi kontrol örneğinde (E) su tutma kapasitesi ilk gün 71.12 iken enzim oranı artıka ayranların su tutma kapasitesinde bir miktar artış gözlenmiş (sırasıyla A: 77.51, B: 78.04, C: 78.27), ancak oran daha da artırılınca su tutma kapasitesi değerinin azalmaya başladığı belirlenmiştir (D: 77.12). Bu değişimin D örneğinde protein yapısının fazla sıkılaşmasından ve proteinler arasındaki suyu dışarı atmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4. 5. Farklı oranda MTGase içeren ayranların su tutma kapasitesi değerleri

Motoki ve Seguro (1998) transglutaminaz enzimin süt proteinlerinin su bağlama kapasitesini arttırdığını bildirmektedir. MTGase enzimin katalize ettiği süt proteinlerinin çapraz bağlanmasının bir sonucunda oluşan yapı içinde serbest su tutulmakta, bu da su tutma kapasitesini artırmaktadır..

Imm ve ark. (2000) MTGase ile işlem görmüş sütlerden üretilen yağsız set yoğurtlarda su tutma kapasitesi ve jelleşme özelliklerinde önemli artışlar meydana geldiğini belirlemişlerdir.

Ayrıca Şanlı (2011) çalışmasında sütü sulandırarak yapılan ayran üretiminde pastörizasyon işlemi ardından sütün MTGase enzimi ile inkübasyonun serum ayrılmasını önlediğini tespit etmiştir.

Ayran örneklerinin su tutma kapasitesi değerleri üzerine depolama süresinin etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0.01$ ). Çizelge 4. 3.'de ve Şekil 4. 5.'de MTGase enzimi katkılı örneklerde depolama boyunca su tutma kapasitesinin azaldığı gözlemlenmiştir. Bu azalmanın örneklerin asitliğindeki yükselmeden kaynaklandığı düşünülmektedir. Fermente süt ürünlerinin asitlik düzeyindeki değişim ürünün yapısında ve serum ayrılmasında etkili bir faktördür. Düşük asitlikte proteinlerin su tutma kapasiteleri yetersiz iken, yüksek asitlikte söz konusu özellikte azalış görülmektedir. Bu nedenle ideal asitlikte proteinlerin su tutma kapasiteleri artmakta ve dolayısıyla viskozite iyileşmekte ve serum ayrılması azalmaktadır (Rasic ve Kurmann, 1978; Atamer ark., 1986).

#### **4. 3. Depolama Süresince Ayranların Duyusal Niteliklerinde Görülen Değişimler**

Ayran örneklerinin duyusal özelliklerinde depolama süresince görülen değişiklikler Çizelge 4. 4.'de verilmiştir.

Çizelge 4. 4 Ayranların duyuşal özelliklerinde depolama süresince görülen değişiklikler (n=2)

Örnek	Depolama Süresi	Tat-Aroma	Kıvam	Genel Kabul Edilebilirlik
A	1. gün	8.00±2.121 <sup>a1</sup>	7.88±0.028 <sup>a1</sup>	7.40±0.141 <sup>c2</sup>
	10. gün	8.22±0.057 <sup>a1</sup>	8.00±1.414 <sup>a1</sup>	8.22±0.028 <sup>a1</sup>
	20. gün	7.77±0.028 <sup>a1</sup>	7.00±1.414 <sup>b2</sup>	7.25±0.071 <sup>c2</sup>
B	1. gün	8.77±0.028 <sup>a1</sup>	8.77±0.042 <sup>a1</sup>	8.50±0.141 <sup>a1</sup>
	10. gün	8.88±0.014 <sup>a1</sup>	8.33±0.057 <sup>a1</sup>	8.55±0.071 <sup>a1</sup>
	20. gün	8.00±0.707 <sup>a1</sup>	8.22±0.156 <sup>a1</sup>	7.80±0.212 <sup>b2</sup>
C	1. gün	7.88±0.156 <sup>a1</sup>	7.88±0.141 <sup>a1</sup>	7.00±0.707 <sup>c1</sup>
	10. gün	7.44±0.057 <sup>b1</sup>	8.27±0.028 <sup>a1</sup>	6.66±0.042 <sup>d1</sup>
	20. gün	6.77±0.028 <sup>b2</sup>	8.22±0.028 <sup>a1</sup>	6.25±0.354 <sup>d2</sup>
D	1. gün	6.22±0.028 <sup>c1</sup>	6.22±0.028 <sup>c1</sup>	6.50±0.071 <sup>d1</sup>
	10. gün	6.11±0.014 <sup>c1</sup>	6.22±0.113 <sup>c1</sup>	5.88±0.028 <sup>e2</sup>
	20. gün	6.00±0.283 <sup>c1</sup>	5.88±0.198 <sup>c1</sup>	5.63±0.014 <sup>e2</sup>
E	1. gün	8.10±0.141 <sup>a1</sup>	7.66±0.028 <sup>b1</sup>	8.10±0.141 <sup>a1</sup>
	10. gün	8.88±0.014 <sup>a1</sup>	7.33±0.014 <sup>b1</sup>	8.00±0.849 <sup>b1</sup>
	20. gün	7.00±1.414 <sup>b2</sup>	7.22±0.141 <sup>b1</sup>	7.63±0.042 <sup>b2</sup>

\*A:0.5 unit/gr protein, B:1 unit/gr protein, C:2 unit/gr protein, D:4 unit/gr protein, E:kontrol

\*\*MTGase enzimi oranına göre sütunlar yukarıdan aşağıya doğru incelendiğinde aynı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

Depolama süresine göre, sütunlar yukarıdan aşağıya doğru incelendiğinde aynı rakamlarla gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

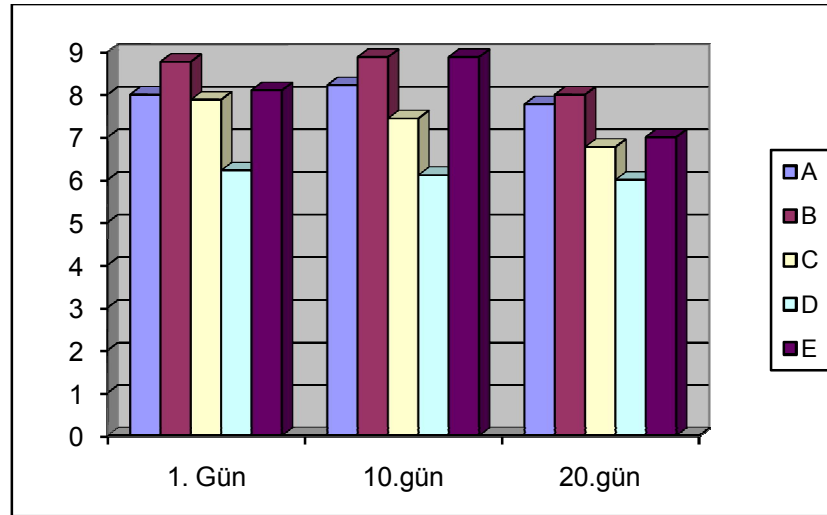
### 4. 3. 1. Tat-aroma

Örneklere ait tat-aroma puanlar Çizelge 4. 4. ve Şekil 4. 6.'de verilmiştir. Enzim ilavesinin ayranların tat ve aroma özeliğinin üzerine etkisi önemli bulunmuştur (p<0.01). Farklı enzim oranına göre örneklerin tat- aroma değerleri farklılık göstermiş ve bu farklılık istatistiksel olarak da önemli çıkmıştır (p<0.01). A ve B örneklerinin tat–aroma puanlarında artış olduğu belirlenmiştir. Ancak enzim oranı 2 unit/g protein ve üzerine çıkarıldığında (C ve D örnekleri) ayranların tat-aroma puanlarının düştüğü tespit edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre tat-aroma bakımından en yüksek puanı B örneğinin, en düşük puanı da D örneğinin aldığı

görülmüştür. Ayrıca duyuusal değerlendirilmede panelistler tarafından D örneğinde istenmeyen tat olduğu ifade edilmiştir.

Kırmacı (2005) farklı oranlarda MTGase içeren yoğurt örneklerinin tat aroma değerlendirmesinde enzim dozajının etkisi olmadığını bulmuştur. Ayrıca enzim miktarındaki artışa bağlı olarak damak lezzetinde düşüğe olsa artış olduğunu tespit etmiştir.

Depolama süresi boyunca ayranların tat-aroma puanlarının düştüğü saptanmış, fakat yapılan istatistiksel analizlere göre depolama süresinin ayran örneklerinin tat ve aroma değeri üzerine etkisi önemsiz bulunmuştur ( $p>0.05$ ).



Şekil 4.6.Farklı oranda MTGase içeren ayranların tat ve aroma puanları

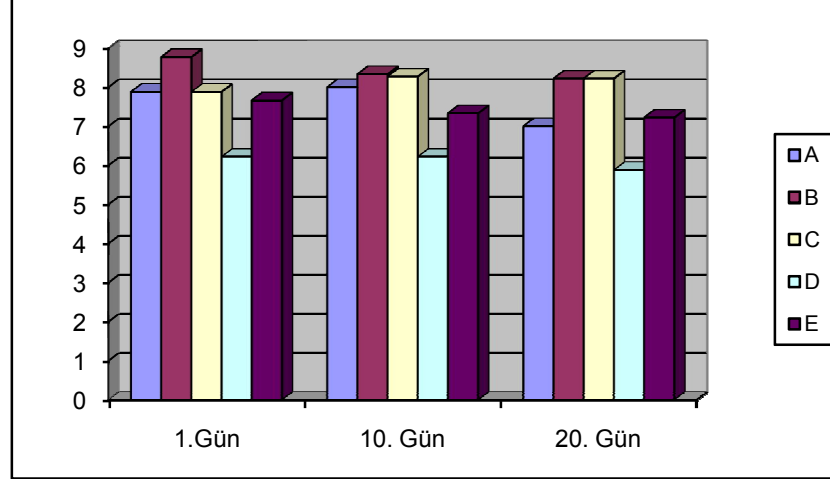
#### 4. 3. 2. Kıvam

Örneklere ait kıvam değerlendirilmesi Çizelge 4.4. ve Şekil 4.7.'de verilmiştir. Enzim ilavesinin ayranların kıvam puanlarına etkisi önemli olmuştur ( $p<0.01$ ). 0.5unit/g protein oranında enzim içeren A örneğinin kıvam puanı kontrol örneğine en yakın olduğu tespit edilmiştir.

Enzim oranını ayranların kıvam puanlarını önemli düzeyde etkilemiştir ( $p<0.01$ ). Enzim ilaveli örnekler arasında en yüksek puanı B (1 unit/g protein) örneği



almış, bunu sırasıyla C, A ve D (0.5, 2 ve 4 unit/g protein) örnekleri takip etmiştir. Yüksek oranda enzim içeren ayranların kıvam puanlarındaki düşüş ayranların sıkılaştıran yapısından ve örneklerin neredeyse yoğurt kıvamında olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



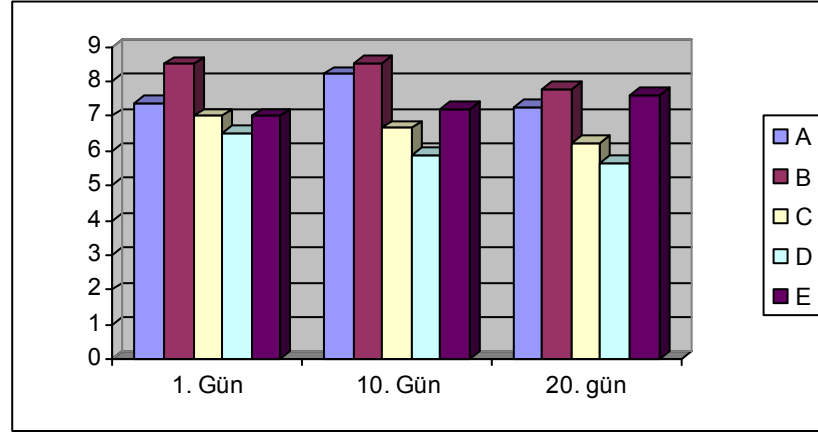
Şekil 4.7. Farklı oranda MTGase içeren ayranların kıvam puanları

Depolama süresinin ayran örneklerinin kıvamı üzerine etkisi önemsiz bulunmuştur ( $p>0.05$ ).

#### 4. 3. 3. Genel Kabul Edilebilirlik

Örneklere ait genel kabul edilebilirlik puanları Çizelge 4.4. ve Şekil 4.8.'de verilmiştir. Enzim ilavesinin ayranların genel kabul edilebilirliği üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0.01$ ). B örneğinin genel kabul edilebilirlik puanları kontrol örneğinden bile yüksek olurken, A örneği kontrole yakın değerler almıştır.

Enzim oranı arttıkça ayranların genel kabul edilebilirlik puanlarında düzenli olmayan bir değişim gözlenmiş, ancak bu değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır ( $p<0.01$ ). En yüksek kabul edilebilirlik değeri B örneği (1 unit/gr protein); en düşük değer ise D (4 unit/gr protein) örneği sahip olmuştur. Örneklerdeki kıvam artışı ile ayranların ferahlatıcı etkisinin kaybetmesi ve panelistler tarafından hoş gitmeyen tat oluşumu D örneğinin puanlarının düşük olmasında önemli bir faktör olmuştur.



Şekil 4.8. Farklı oranda MTGase içeren ayranların genel kabul edilebilirlik puanları

Kırmacı (2005) yaptığı çalışmada enzim oranı artıkça örneklerinde duyuşal kabul edilebilirliğinin daha yüksek olduğu tespit etmiştir.

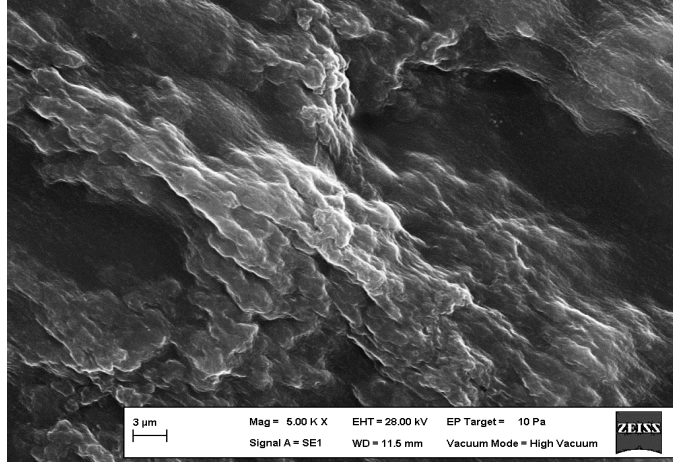
Depolama süresince ayran örneklerinin genel kabul edilebilirlik puanlarında azalma gözlenmiş ve bu azalmanın istatikselsel olarak da önemli olduğu bulunmuştur ( $p < 0.01$ ).

#### 4. 3. Ayran örneklerinin mikrostrüktürü

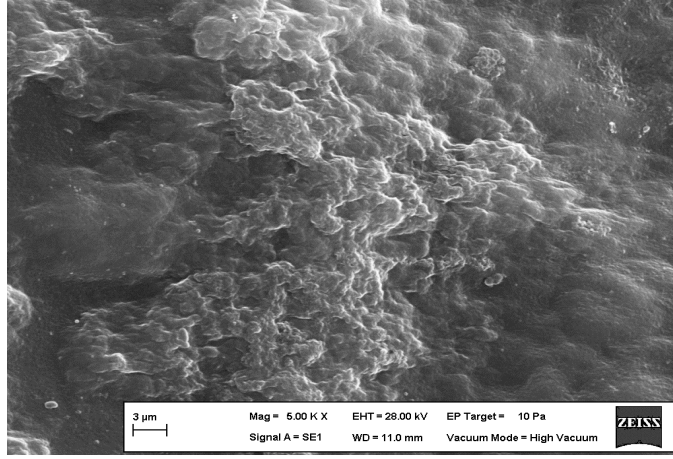
Ayran örneklerinin mikrostrüktürleri Şekil 4. 9., Şekil 4. 10., Şekil 4. 11., Şekil 4. 12. ve Şekil 4. 13.'de verilmiştir.

Ayranlardaki enzim ilavesinin mikrostrüktür yapının sıkılaşmasındaki etkisi Şekil 4. 9., Şekil 4. 10., Şekil 4. 11., Şekil 4. 12. ve Şekil 4. 13.'de açıkça görülmüştür. Enzimin katalize ettiği protein-protein çapraz bağlanmasıyla protein kümelerinin bir araya geldiği ve böylece sıkı bir mikrostrüktür olduğu görülmektedir.

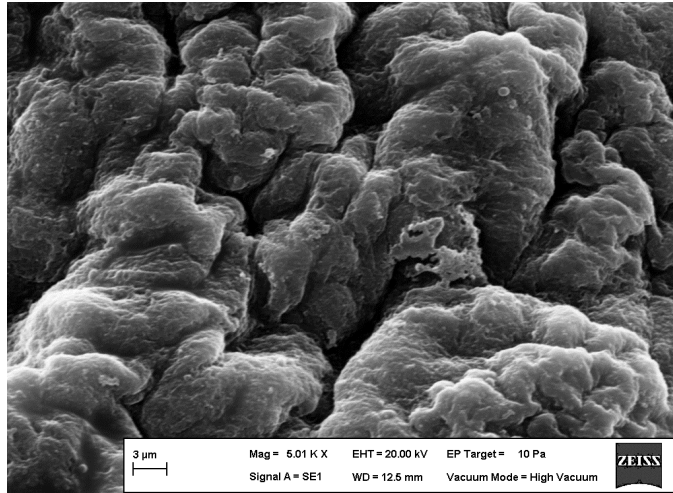
Şekil 4. 9. ve Şekil 4. 13. deki SEM görüntüleri incelendiğinde kontrol ve A örneğinin birbirlerine benzer bir yapıya sahip olduğu görülmüştür. Ancak her ne kadar yapı birbirine benzese de A örneğinde protein kümeleşmeleri tespit edilmiştir.



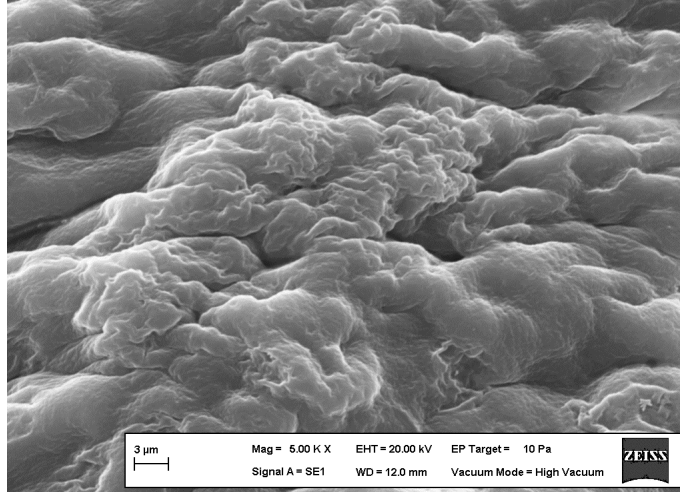
Şekil 4. 9. A (0,5 unit/g protein MTGase ilave edilmiş) örneğinin mikrostrüktürü



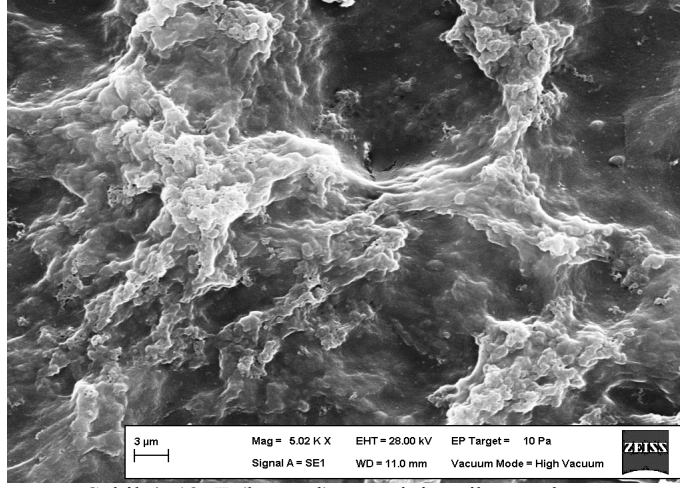
Şekil 4. 10. B (1 unit/g protein MTGase ilave edilmiş) örneğinin mikrostrüktürü



Şekil 4. 11. C (2 unit/g protein MTGase ilave edilmiş) örneğinin mikrostrüktürü



Şekil 4. 12. D (4 unit/g protein MTGase ilave edilmiş) örneğinin mikrostrüktürü



Şekil 4. 13. E (kontrol) örneğinin mikrostrüktürü

Ayrıca şekillerde örneklerdeki enzim oranı artıkça yapı gittikçe sıkılaştığı proteinler molekülleri arası boşlukların azaldığı ve daha pürüzsüz bir görünüme sahip olduğu görülmektedir.

Şanlı (2011) MTGase katkılı ayran örneklerinde kontrol örneğinden farklı olarak daha güçlü jel yapısı içerisinde proteinlerin daha düzenli dağıldığı ve protein ağ yapısında gözenekliliğin azaldığını bildirmektedir.

Benzer şekilde; Lorenzen ve ark. (2002) set tipi yoğurtlarda yaptıkları çalışmalarında, süte MTGase enzimi ilavesinin protein ağ yapısında gözenek

boyutunu azalttığını ve yoğurt jelinde proteinlerin daha homojen dağıldığını elektron mikroskopunda görüntülemişlerdir.

Bir başka çalışmada Farnsworth ve Guo (2003); MTGase enzimi ilaveli keçi sütünden yapılan yoğurt örneklerinde kontrol örneğine göre daha sıkı bir yapı görüntülemişlerdir.

#### **4. 5. Depolama Süresince Ayran örneklerinin mikrobiyolojik özelliklerinde görülen değişimler**

Yoğurt ve Ayran laktik asit bakterileri tarafından, laktozun fermantasyonu sonucunda üretilen fermente bir süt ürünüdür (Rasic ve Kurmann, 1978; Tamime ve Deeth, 1980; Kılıç ve ark., 2004). Burada kullanılan laktik kültürün türü ürünün tekstürü, asitliği, viskozitesi ve aromasının gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (Akalin ve Gönç, 1999). Ayranve yoğurt üretiminde kullanılan *Lactobacillus delbrueckii spp.bulgaricus* (*Lb.bulgaricus*) ve *Streptococcus thermophilus*(*Str.thermophilus*) 'un birlikte gelişimi sonucunda bu ürünlere ilişkin özellikler ortaya çıkmaktadır. *Lb.bulgaricus*, kazeinden serbest hale getirdiği birçok amino asit ile (bunların en önemlisi valindir) *Str.thermophilus* gelişimini teşvik etmektedir. Amino asitlerin bu simülatif etkisinden dolayı streptokok hücrelerinin jenerasyon süresi kısalmakta ve sayıları artmaktadır. İnkübasyonun ilk saatlerinde hızla sayıları artan streptokokların gelişimi laktik asit içeriğinin artmasıyla yavaşlamaktadır. Bu sırada *Str.thermophilus* 'da formik asit oluşturarak *Lb.bulgaricus*'un gelişimini teşvik etmektedir. Diğer bir ifadeyle inkübasyon sonunda *Lb.bulgaricus* 'un sayısı artmaktadır (Rasic ve Kurmann, 1978).

Üretilen Ayranların mikrobiyolojik niteliklerini belirlemek amacıyla, depolama süresince örneklerin *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii spp.bulgaricus* sayıları tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

4. 5. 1. *Streptococcus thermophilus* Sayısı

Ayranlara enzim ilave edilmesi örneklerin *S. thermophilus* sayısını önemli düzeyde etkilemiştir ( $p<0.01$ ). Kontrol örneklerindeki *S. thermophilus* sayısı MTGase ilave edilen örneklere göre daha yüksek olmuştur. TG ile süt proteinlerinin ve peptidlerin çapraz-bağlanmasının bir sonucu olarak yoğurt bakterilerinin özellikle laktobasillerin proteolitik aktivitesinin azalacağı ve bunun da streptokokların gelişimini yavaşlatacağı düşünülmektedir.

Çizelge 4. 5 Ayranların mikrobiyolojik özelliklerinde depolama süresince görülen değişiklikler (Log kob  $g^{-1}$ ) (n=2)

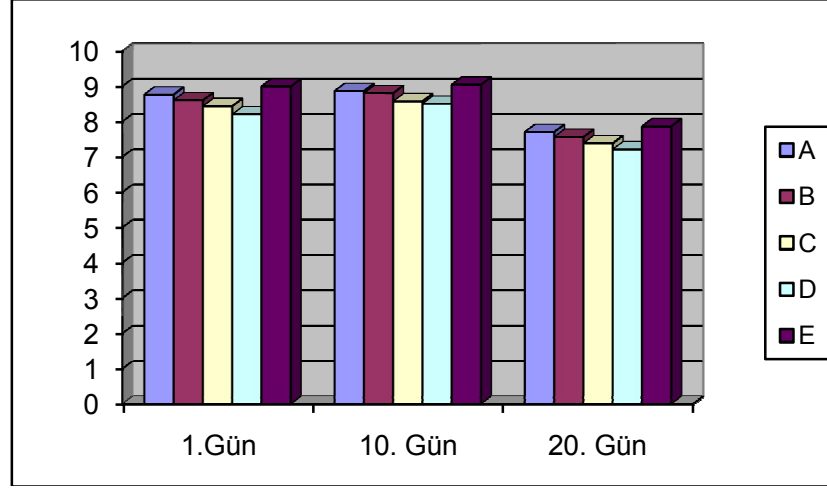
Örnek	Depolama Süresi	<i>S.thermophilus</i>	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
A	1. gün	8.76±0.049 <sup>b1</sup>	8.74±0.021 <sup>b1</sup>
	10. gün	8.86±0.014 <sup>b1</sup>	7.68±0.035 <sup>e2</sup>
	20. gün	7.70±0.021 <sup>g2</sup>	7.35±0.071 <sup>g3</sup>
B	1. gün	8.60±0.106 <sup>e2</sup>	8.68±0.028 <sup>b1</sup>
	10. gün	8.80±0.078 <sup>b1</sup>	7.89±0.014 <sup>d2</sup>
	20. gün	7.56±0.049 <sup>g3</sup>	7.32±0.057 <sup>g3</sup>
C	1. gün	8.43±0.085 <sup>d2</sup>	8.47±0.099 <sup>c1</sup>
	10. gün	8.57±0.042 <sup>c1</sup>	7.76±0.028 <sup>e2</sup>
	20. gün	7.38±0.085 <sup>h3</sup>	7.09±0.127 <sup>h3</sup>
D	1. gün	8.20±0.141 <sup>e2</sup>	8.33±0.212 <sup>c1</sup>
	10. gün	8.50±0.163 <sup>c1</sup>	7.57±0.049 <sup>f2</sup>
	20. gün	7.21±0.099 <sup>h3</sup>	6.99±0.007 <sup>h3</sup>
E	1. gün	8.99±0.007 <sup>a1</sup>	8.96±0.007 <sup>a1</sup>
	10. gün	9.04±0.085 <sup>a1</sup>	8.74±0.057 <sup>b2</sup>
	20.gün	7.86±0.092 <sup>f2</sup>	7.97±0.028 <sup>d3</sup>

\*A:0.5 unit/gr protein, B:1 unit/gr protein, C:2 unit/gr protein, D:4 unit/gr protein, E:kontrol

\*\*MTGase enzimi oranına göre sütunlar yukarıdan aşağıya doğru incelendiğinde aynı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

Depolama süresine göre, sütunlar yukarıdan aşağıya doğru incelendiğinde aynı rakamlarla gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

Enzim oranındaki artışın ayranların *Str. thermophilus* sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14.). Bu azalma istatistiksel olarak da önemli bulunmuştur ( $p<0.01$ ). En yüksek koloni sayısı kontrol örneğinde görülmüştür.



Şekil 4.14. Ayranlardaki *Streptococcus thermophilus* sayısındaki değişim

Depolama süresince örneklerin koloni sayılarında azalma olduğu saptanmış ve depolama süresinin *Str. thermophilus* sayısına etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,01$ ).

Kırmacı (2005) yoğurt üzerine yaptığı çalışmada  $0.1\text{gr L}^{-1}$  ve  $0.2\text{gr L}^{-1}$  oranında enzim içeren örneklerin *Str. thermophilus* düzeyinde belirgin değişim olmadığını, ancak  $0.3\text{gr L}^{-1}$ ,  $0.4\text{gr L}^{-1}$  ve  $0.5\text{gr L}^{-1}$  oranında enzim içeriğine sahip örneklerde 7 günden sonra azalma olduğunu tespit etmiştir.

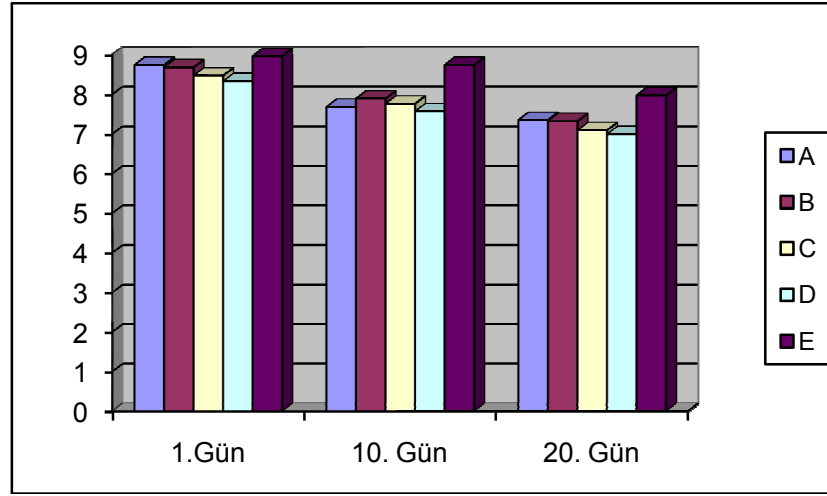
#### 4. 5. 2. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Sayısı

MTGase enzimi ilavesinin ayranlardaki *Lb. bulgaricus* koloni sayısını önemli düzeyde etkilediği belirlenmiştir ( $p<0.01$ ). Şekil 4. 15’de görüldüğü gibi MTGase ilave edilen ayranlardaki *Lb. bulgaricus* sayısı kontrol örneklerinden daha düşük bulunmuştur.

Enzim oranını ile ayranlardaki *Lb. bulgaricus* sayısı arasında ters bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. MTGase konsantrasyon arttıkça ayranların *Lb.*

*bulgaricus* sayısının azaldığı saptanmıştır ( $p < 0.01$ ). En yüksek koloni sayısına A örneği, endüyük koloni sayısına da D örneği sahip olmuştur.

Kırmacı (2005) MTGase enzim konsantrasyonunun yoğurtların mikrobiyolojik özelliklerine etkisini incelediği çalışmada, *Lb. bulgaricus* en yüksek sayısının kontrol örneğinde olduğunu ve MTGase miktarı ile *Lb. bulgaricus* koloni sayısı arasında ters bir ilişki olduğunu tespit etmiştir.



Şekil 4.15. Ayrırlardaki *Lb. delburckii subsp bulgaricus* sayısındaki değişim

Depolama süresinin de ayrırların *Lb. bulgaricus* sayısını önemli düzeyde etkilediği görülmüştür ( $p < 0.01$ ). Depolama süresince *Lb. bulgaricus* koloni sayısı azalmıştır.



**5.SONUÇ ve ÖNERİLER**

Çalışmamızda farklı oranlarda mikrobiyal transglutaminaz (MTGase) ile işlem görmüş sütlerden üretilen ayranların bazı özellikleri incelenmiştir.

Araştırma sonucunda ayran üretiminde farklı konsantrasyonda MTGase enzimi ilavesinin, enzimin katalize ettiği süt proteinlerinin çapraz bağlanması sonucunda ürünün fiziksel niteliklerini olumlu yönde geliştirdiği bulunmuştur.

Ayran örneklerinde MTGase miktarı arttıkça pH'da artış ve titrasyon asitliğinde düşüş gözlenmiştir. Örneklerin inkubasyonunda ve depolamasında da asitlik gelişimi yavaşlamıştır. Bu durumun temel sebeplerinden birinin MTGase enziminin *Lactobacillus delbrueckii spp.bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* metabolik faaliyetleri üzerindeki etkisi olduğu düşünülmektedir.

Ayranların viskozite değerleri ve su tutma kapasiteleri belli bir enzim konsantrasyonuna kadar (2 unit/gr protein) artmış, daha yüksek konsantrasyonda (4 unit/gr protein) azalmıştır.

Enzim katkılı ayran örnekleri duyuşal açıdan kontrol örneğiyle karşılaştırıldığında; ayranların tat-aroma, kıvam ve genel kabul edilebilirlik puanları enzim oranı arttıkça düşmüş ve panelistler tarafından tercih edilmemiştir (B örneği hariç).

Ayran örneklerine ait SEM görüntüleri incelendiğinde MTGase enziminin ayran örneklerinin mikrostrüktürel yapısındaki etkisini açıkça ortaya koymuştur. Genel olarak bakıldığında MTGase katkılı ayran örneklerinde kontrol örneğinden farklı olarak daha sıkı jel yapısı içerisinde proteinlerin daha düzenli dağıldığı görülmüştür. Oluşan bu yapı enzim konsantrasyonu arttıkça sıkılaştırmıştır. Bu durum MTGase enzimin katalize ettiği protein-protein çapraz bağlanmasıyla oluşan protein kümelerini düzgün şekilde bir araya gelmesi ve homojen bir jel yapısının şekillenmesi ile açıklanabilir.

MTGase enzimi ilavesi ayranların mikrobiyolojik özelliklerini de önemli düzeyde etkilemiştir. Enzim konsantrasyonu arttıkça ayranlardaki *Str. Thermophilus* ve *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sayılarının azaldığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak MTGase kullanımı ayranların fizikokimyasal, mikrobiyolojik ve kısmen de duyuşal özellikleri üzerinde olumlu etki yaratmıştır. Elde edilen verilere göre duyuşal olarak en iyi örnek 1 unit/gr protein oranında enzim katkılı B örneği olsa bile, diğer özellikler açısından en iyi örneğin 2 unit/gr protein oranında enzim katkılı C örneği olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular ışığında ayran üretiminde 1 ve/veya 2 unit/g protein oranında MTGase enzimi kullanılması önerilebilir. Böylece yarım yağlı ayranlarda ortaya çıkan kusurların önlenmesi için MTGase'dan yararlanılabilir. Böylece, kullanımında yasal kısıtlama bulunan stabilizöre ihtiyaç duyulmadan fiziksel ve kimyasal özellikler açısından çok iyi nitelikte ve duyuşal olarak da kabul edilebilir özellikte yarım yağlı ayran üretilmesi mümkün olabilecektir.

## KAYNAKLAR

- ABOUMAHMOUD, R. and SAVELLO, P., 1990. Crosslinking of Whey Proteins by Transglutaminase, *Journal of Dairy Science*, 7;256-263.
- ABRAHAMSEN, R.K., SVENSEN, A. and TUFTO, G.N., 1978. Some Bacteriological and Biochemical Activities During the Incubation of Yoghurt From Goats' and Cows' Milk. XX. International Dairy Congress Published by Congrilait, Paris.
- ABRAHAMSEN, R.K. and HOLMEN, T.B. 1981. Goats' Milk Yoghurt Made from Non-Homogenized and Homogenized Milks, Concentrated by Different Methods. *Journal of Dairy Research*, 48;457-463.
- AKALIN, A. S. ve GÖNÇ, S. 1999. Katı Kıvamlı Yoğurdun Reolojik ve Duyusal Özellikleri, Aroma Maddeleri ve Starter Bakteri Sayıları Üzerine Viskoz Kültürlerin Etkisi. *Gıda Dergisi* 24(5);319-325.
- ALTINAYAR, A. 1997. Farklı Yöntemlerle Ayrar Üretiminde Karboksimetil Selüloz Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü, Ankara.
- ANDO, H., ADACHI, M., UMEDA, K., MATSUURA, A., NONAKA, M., UCHIO, R., TANAKA, H. and MOTOKI, M. 1989. Purification and Characteristics of a Novel Transglutaminase Derived from Microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53;2613-2617.
- ANONİM, TS 3043 1, 1978. "Peynirde Klorür Miktarı Tayini (Referans Metot)", Türk Standartlar Enstitüsü, Ankara.
- ANONİM, TS 8189, 1990. Süt-Yağ Tayini-Gerber Metodu (Rutin Metot), Türk Standartlar Enstitüsü, Ankara.
- ANONİM, TS 1018, 1994. Çiğ İnek Sütü Standardı, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, 15s.
- ANONİM, 2001. Fermente Sür Tebliği Türk Gıda Kodeksi, Ankara.
- ANONİM, TS 3810, 2003. Ayrar Kısa Ömürlü, Türk Standartlar Enstitüsü, Ankara.
- ANONYMOUS, 1993. Milk Determination of Nitrogen Content, International Dairy Federation, IDF Standard, Brussels.
- ATAMER, M. ve SEZGİN, E., 1986. Yoğurtlarda Kurumadde Artırımının Fiziksel Özellikler Üzerine Etkisi, *Gıda*, 11;327-331.
- ATAMER, M., GÜRSEL, A., TAMUÇAY, B., GENÇER, N., YILDIRIM, G., ODABAŞI, S., KARADEMİR, E., ŞENEL, E. ve KIRDAR, S. 1999. Dayanıklı Ayrar Üretiminde Pektin Kullanım Olanakları Üzerine Bir Araştırma. *Gıda Teknolojisi Dergisi Yayınları* 24(2);119-126.
- AYDAR, K. 1996. Ayrar Üretiminde Karboksimetil Selüloz Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü, Ankara.
- BEK, Y. ve EFE, E., 1995. Araştırma ve Deneme Metotları. Çukurova Üniversitesi. Ziraat Fakültesi. Ders Notları No:71, Adana.
- BERBERS, G.A.M., BENTLAGE, H.G.M., BRANS, A.M.M., BLOEMENDAL, H. and JONG, W.W., 1983. B-Crystallin: Endogenous Substrate of Lens Transglutaminase, *Eur. J. Biochem.*, 135;315-320.
- BODYFELT, F. W., 1988. The Sensory Evaluation of Dairy Products. an AVI Book Published by Van Nostrand Reinhold, New York.

- DE JONG, G. A. H. and KOPPELMAN, S.J., 2002. Transglutaminase Catalyzed Reactions: Impact on Food Applications. *Journal of Food Science* 67;2798-2806.
- DE JONG, G. A. H., WIJNGAARDS, G., BOUMANS, H., KOPPELMAN, S.J. and HESSING, M., 2001. Purification and Substrate Specificity of Transglutaminases from Blood and *Streptovorticillium mobaraense*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49;3389-3393.
- DICKINSON, E. and YAMAMOTO, Y., 1996. Rheology of Milk Protein Gels and Protein-Stabilized Emulsion Gels Cross-Linked with Transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44;1371-1377.
- ERGÜLLÜ, E. VE DEMİRYOL, İ., 1983. Yoğurda Değişik Oranlarda Su Katılarak Yapılan Ayranların Bazı Özellikleri Üzerine Araştırma. *Gıda Dergisi*, 8(5);203-208.
- FAERGERMAND, M., MURRAY, B. S. and DICKINSON, E., 1997. Cross-linking of Milk Proteins with Transglutaminase at the Oil-Water Interface, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45;2514-2519.
- FAERGEMAND, M., MURRAY, B. S., 1998. Interfacial Dilatational Properties of Milk Proteins Cross-Linked by Transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3);884-890.
- FAERGEMAND, M., OTTE, J. and QVIST, K. B., 1998. Emulsifying Properties of Milk Proteins Cross-Linked with Microbial Transglutaminase. *International Dairy Journal*, 8;715-723.
- FAERGAMAND, M., SORENSEN, M., JORGENSEN, U., BUDOLFSEN, G. and QVIST, K. B., 1999a. Transglutaminase: Effect on Instrumental and Sensory Texture Of Set Style Yoghurt. *Milch Wissenschaft*, 54(10);563-566.
- FAERGAMAND, M., MURRAY, B. S., DICKINSON, E. and QVIST, K. B. 1999b. Cross-linking of Absorbed Casein Films with Transglutaminase. *International Dairy Journal*, 9;343-346.
- FARNSWORTH, J. P., LI, J. and GUO, M. R., 2003. Improved Structure and Consistency of Probiotic's Milk Yogurt. *the Australian Journal of Dairy Technology*, 58(2);187.
- FLANAGAN, J., GUNNIG, Y. and FITZGERALD, R. J., 2003. Effect of Cross Linking with Transglutaminase on the Heat Stability and Some Functional Characteristics of Sodium Caseinate, *Food Research International*, 267-274,
- FOLK, J.E. and FINLAYSON, J.S., 1977. The  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl) Lysine Crosslink and the Catalytic Role of Transglutaminase, *Advances Protein Chemistry*, 31;1-133.
- FOX, P. F. and M.C. SWEENEY, P. L. H., 1998. *Dairy Chemistry and Biochemistry*, Chapman and Hall, London, UK, 478 p.
- GERRARD, J. A., 2002. Protein-protein Crosslinking in Food: Methods, Consequences, Applications. *Trends in Food Science and Technology*, 13;389-397.
- GÖNÇ, S., AKBULUT, N., KINIK, Ö. ve KILIÇ, S., 1989. Bazı Kimyasal Koruyucu Katkı Maddelerinin Ayranın Dayanıklılığına Etkisi Üzerine Bir Araştırma. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. Bornova/İzmir 26(2);195-206.
- GÜLMEZ, M., GÜVEN, A. ve SEZER, Ç. ve DUMAN, B., 2003. Evaluation of Microbiological and Chemical Quality of Ayran Samples Marketed Kars and

- Ankara Cities in Turkey. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 9(1);49-52.
- HARRIGAN, W.F. and MC. CANCE, M. E., 1993. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press, London, 452p.
- HAYAT, M. A., 1981. Principles and Techniques of Electron Microscopy Vol. 1., Edward Arlond Lt., London, 522.
- HORNYAK TJ, BISHOP PD, SHAFER JA., 1989. Alpha-Thrombin-Catalyze Dactivation of Human Platelet Factor XIII, Relationship Between Proteolysis and Factor XIII Activation Biochemistry, 28;7326-7332.
- IDF,1982. Determination of Titratable Acidity and Moisture, Standard. International Dairy Federation, Brussels, p81-114.
- IDF, 1993. Milk Determination of Nitrogen Content. IDF: 20B, International Dairy Federation: 41, Brussels, 12p.
- IKURA, K., SAKURAI, H., OKUMURA, K., SASAKI, R. and CHIBA, H. 1985. One-Step Purification of Guinea Pig Liver Transglutaminase Using a Monoclonal Antibody Immuno Adsorbent. Agricultura and Biological Chemistry 49;3527-3531.
- IMM, J. Y. and LEE, C. M., 2000. Gelationand Water Binding Properties of Transglutaminase-Terated Skim Milk Powder. Food Chemistry and Toxicology, 65(2);200-205.
- IMM, J. Y., LIAN, P. and LEE, C. M., 2000. Gelationand Water Binding Properties of Transglutaminase-Treated Skim Milk Powder. Journal of Food Science, 65 (2);200-205.
- JIANG, S.T. and LEE, J. J., 1992. Purification, Characterization, Andutilization of Pig Plasma Factor XIII. Agricultural and Biological Chemistry, 40;1101–1107.
- JONG, G. A. H. and KOPPELMAN, S. J., 2002. Tranlglutaminase Catalyzed Reactions: Impact on Food applications. Journal of Food Science, 67(8);2798-2806.
- KILIÇ, S., UYSAL, H., ARSLAN, F. and GÜLEY, Z., 2004. Comparison of Some Properties of Yoghurt Produced with Different Lactic Bacreia Cultures. International Dairy Symposium: Recent Developments in Dairy Science and Technology, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, p213-217.
- KIRMACI, H. A., 2005. Yağsız Yoğurtlarda Transglutaminaz Enzimi Kullanımının Yoğurdun Tekstürel Özellikleri Üzerine Etkileri. Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, 98s.
- KÖKSOY, A. and KILIÇ, M., 2003. Effects of Water and Salt Level on Rheological Properties of Ayran, a Turkish Yoghurt Drink. International Dairy Journal (13);835-839.
- KURAIISHI, C., YAMAZAKI, K. and SUSU, Y., 2001. Transglutaminase: Itsutilization in the Food Industry, Food Reviews International, 17(2);221-246.
- LIU, M. and DAMODARAN, S., 1999. Effect of Transglutaminase-Catalyzed Polimerization of  $\beta$ -casein on It Semulsifying Properties, J. Agric. Food Chemistry, 47;1514-1519.
- LAUBER, S., HENLE, T.and KLOSTERMEYER, H.,2000. Relationship Between the Crosslinking of Caseins by Transglutaminase and The Jel Strength of Yoghurt. European Food Research and Technology, 210;305-309.

- LORENZEN, P. C. and SCHLIMME, E., 1998. Properties and Potential Fields of Application of Transglutaminase Preparations in Dairying. *International Dairy Federation*, 332;47-53.
- LORENZEN, P. C. 2000a. Renneting Properties of Transglutaminase-Treated Milk, *Milch Wissenschaft*, 55(8);433-437.
- LORENZEN, P. C., 2000b. Techno-functional Properties of Transglutaminase-Treated Milk Proteins, *Milch Wissenschaft*, 55(12);667-670.
- LORENZEN, P. C., NEVE, H., MAUTNER, A. and SCHLIMME, E., 2002. Effect of Enzymatic Cross-linking of Milkproteins on Functional Properties of Set-style yoghurt. *International Dairy Journal*, 55(3);152-157.
- LORENZEN, P. C. and NEVE, H., 2003. Enzymatic Cross Linking of Protein in the Manufacture of Fermented Milk. *International Dairy Federation Fermented Milk*, p241-249.
- LUCEY, A. J., 2001. The Relationship Between Rheological Parameters and Whey Separation in Milk Gels. *Food Hydrocolloids* 15;603-608.
- MATSUMURA, Y. and MOTI, T., 1996. Gelation in Methods of Testing Protein Functionality, Blackie, p76-109.
- MOTOKI, M. and SEGURO, K. 1998. Transglutaminase and Its Use for Food Processing. *Trends in Food Science and Technology*, 9;204-210.
- MOTOKI, M. and KUMAZAWA, Y., 2000. Recent Research trends in Transglutaminase Technology for Food Processing. *Food Science and Technology Research*, 6;151-160.
- NEVE, H., LORENZEN, P. C., MAUTNER, A., SCHLIMME, E. and HELLER, K. J., 2001. Effect of Transglutaminase Treatment on the Production of Set Skim Milk Yoghurt: Microbial Aspects. *Kielermilchwirtschaftliche Fortschungsberichte*, 53 (4);347-361.
- NIO, N., MOTOKI, M. and TAKINAMI, K., 1986a. Gelation Mechanism of Protein Solution by Transglutaminase, *Agricultural Biology and Chemistry*, 50;851-855.
- NIO, N., MOTOKI, M. and TAKINAMI, K., 1986b. Gelation Mechanism of Protein Emulsion by Transglutaminase, *Agricultural Biology and Chemistry*, 50;1409-1412.
- NONAKA, M., SAKAMOTO, H., TOIGUCHI, S., KAWAJIRI, H., SOEDA and T., MOTOKI, M., 1992. Sodium Caseinate and Skim Milk Gels Formed by Incubation with Microbial Transglutaminase, *Journal of Food Science*, 57;1214-1241.
- OHTSUKA, T., UMEZAWA, Y., NIO, N. and KUBOTA, K., 2001. Comparison of Deamidation Activity of Transglutaminases. *Journal of Food Science*, 66;25-29.
- O'SULLIVAN, M. M., LORENZEN, P. C., O'CONNELL, J. E., KELLY, A. L., SCHLIMME, E. and FOX, P. F. 2001. Short Communication: Influence of Transglutaminase on the Heat Stability of Milk, *Journal of Dairy Science*, 84;1331-1334.
- O'SULLIVAN, M. M., KELLY, A. L. and FOX, P. F., 2002a. Effect of transglutaminase on the Heat Stability of Milk: a Possible Mechanism, *Journal of Dairy Science*, 85;1-7.

- O'SULLIVAN, M. M., KELLY, A. L. and FOX, P. F., 2002b. Influence of Transglutaminase Treatment on Some Physico-Chemical Properties of Milk, *Journal of Dairy Research*, 69(3);433-442.
- ÖZER, B., ROBINSON, R. K., GRANDISON, A. S. and BELL, A. E., 1997. Comparison of Techniques for Measuring the Rheological Properties of Labneh (Concentrated Yoghurt). *International Journal of Dairy Research* 50;129-133.
- ÖZER, B., KIRMACI, A., OZTEKİN, S., HAYALOĞLU, A. and ATAMER, M., 2007. Incorporation of Microbial Transglutaminase into Non-Fat Yoghurt Production, *International Dairy Journal*, 17;199-207.
- ÖZÜNLÜ, T., B., KOÇAK, C. ve AYDEMİR, S., 2007. Ayran Stabilitelerini Etkileyen Faktörler. *Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No:35*, Ankara, 43s.
- RASMUSSEN, L. K., JOHNSEN, L. B., TSIORA, A., SORENSEN, E. S., THOMSEN, J. K. and NIELSEN, N. C., 1999. Disulphide-Linked Caseins and Casein Micelles. *International Dairy Journal*, 9;215-218.
- RASIC, J., and KUMMANN, J., 1978. *Yoghurt: Specific Grounds, Technology, Manufacture and Preparations*. Technical Dairy Publishing House, Copenhagen, Denmark, p466.
- REMEUF, F., MOHAMMED, S., SODİNİ, I. and TISSIER, J. P., 2003. Preliminary Observations on the Effects of Milk Fortification and Heating on Microstructure and Physical Properties of Stirred Yoghurt *International Dairy Journal*, 13;773-782.
- RENNER, E. 1991. *Dictionary of Milk and Dairying*. Printing Pustet Resenburg, Germany, 384s.
- RYBKA S., KAILASAPHATY, K., 1996. Media Forenumeration of Yoghurt Bacteria. *International Dairy Journal Dairy*, 6;839-850.
- SAKAMOTO, H., KUMAZAWA, Y. and MOTOKI, M., 1994. Strength of Protein Gel Prepared with Microbial Transglutaminase as Related to Reaction Conditions. *Journal of Food Science*, 59(4);866-871.
- ŞANLI, T., SEZGİN, E., SENEL, E. ve BENLİ, M., 2011. Geleneksel Yöntemle Ayran Üretiminde Transglutaminaz Kullanımının Ayranın Özellikleri Üzerine Etkileri. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü*, Ankara, 36 (4);217-224
- SCHEY, A., 2003. Texture Improvement of Fermented Dairy Products by Enzymatic Crosslinking with Transglutaminase. *International Dairy Federation, Fermented Milk*, p371-376.
- SCHORSCH, C., CARRIE, H. And NORTON, I. T., 2000. Crosslinking Casein Micelles by a Microbial Transglutaminase: Influence of Crosslinks in Acid-Induced Gelation, *International Dairy Journal*, 10;529-539.
- SEGURO, K., KUMAZAWA, Y., OHTSUKA, T., TOIGUCHI, S. and MOTOKI, M., 1995. Microbial Transglutaminase and  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl) Lysine Crosslink Effects on Elastic Properties of Kamaboko gel, *Journal of Food Science*, 60;305-311.
- SEZGİN, E., ATAMER, M., and YETİŞMEYEN, A., 1993. Effect of the Different Fortification Methods on The Quality of Turkish Type Yoghurt. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No:1295 Bilimsel Araştırma*
- SHARMA, R., LORENZEN, P. C, and QVIST, K.B., 2001. Influence of Transglutaminase Treatment of Skim Milk on the Formation of  $\epsilon$ -( $\Gamma$ -Glutamyl)

- Lysine and the Susceptibility of Individual Proteins Towards Crosslinking, *International Dairy Journal*, 11;785-793.
- SHARMA, R., ZAKORA, M. and QVIST, K. B., 2002. Susceptibility of an Industrial  $\alpha$ -lactalbumin Concentrate to Crosslinking by Microbial Transglutaminase, *International Dairy Journal*, 12;1005-1012.
- SHIMBA, N., YOKOYAMA, K. and SUZUKI, E., 2002. NMR -Baseds Creenin Method for Transglutaminases: Rapid Analysis of Their Substrate Specific It Sand Reactionrates. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 50;1330-1334.
- SINGH, H. and FOX, P. F., 1987. Heatstabilty of Milk: Influence of Modifying Sulphydryl-disufideinte Ractions on the Heat Cogulation Time-pH Profile, *Journal of Dairy Research*, 54;347-359.
- ŞİMŞEK, O. 1995. Ayran Yapımında Farklı Stabilizatör Kullanımı ve Etkileri. Trakya Üniv. Tekirdağ Ziraat Fakültesi. Yayın No: 229, Araştırma No:89, Tekirdağ.
- TAN, S. ve ERTÜRK, Y. E., 2001. Türkiye’de Süt ve Süt Mamullerinde Durum. *Gıda* 17;17-27.
- TAMINE, A. Y., and DEETH, H. C., 1980. Yoghurt: Technology and Biotechnology. *Journal of Food Protection*,43(2);939-997
- TAMIME, A. Y. and ROBINSON, R. K., 1999. Yoghurt Science and Technology, Second Edition , Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 619p.
- TANIMOTO, S. and KINSELLA, J., 1988. Enzymatic Modifications of Proteins: Effects of Transglutaminase Cross-linking on Some Physical Properties of  $\beta$ -lactoglobulin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36;281-285.
- TOLKACH, A. and KULOZIK, U., 2005. Fractionation of Whey Protein Sand Casein Macropeptide by Means of Enzymatic Crosslinking and Membrane Separationt Echniques, *Journal of Food Engineering*, 67:13-20.
- WALSTRA, P., GEURTS, T. J. NOONMEN, A., JELLEMA, A., and VAN BOEKEL, M. A. J. S., *Dairy Tecnology Marcel Dekker New York*, 1999, 727 p.
- YA-TANIMOTO, S. and KINSELLA, E. J., 1988. Enzymatic Modification of Proteins: Effects of Transglutaminase Cross-Linking on Some Physical Properties of  $\beta$ -Lactoglobulin. *J. Agric. Foodchem.*, 36;281-285.
- YAYGIN, H. ve GAHUN, Y., 1983. Değişik Kaynaklı Yoğurtlardan Yapılan Ayranların Bazı Özellikleri Üzerinde Bir Araştırma. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20(3);83-90.
- YILDIRIM, M., HETTIARACHCHY, N. S. and KALAPATHY, U., 1996. Properties of Biopolymers From Cross-Linking Whey Protein İsolate and Soybean 11S Globulin. *Journal of Food Science*, 61(6);1129-1132.
- YOKOYAMA, K., NİO, N. and KİKUCHİ, Y., 2004. Properties and Applications of Microbial Transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64;447-454.
- YÜKSEL, Z., 2007. Transglutaminazın Süt Proteinlerinin Bazı İşlevsel Özelliklerinin Değişimi Üzerine Etkisi ve Yoğurt Ve Peynire Uygulanabilirliği. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği. Anabilim Dalı, Ankara.
- YÜKSEL, Z. and ERDEM, Y.K., 2009. The Influence of Transglutaminase Treatment on Functional Properties of Set Yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 63;86-97.



ZHU, Y., RINZEMA, A., TRAMPER, J. and BOL, J., 1995. Microbial Transglutaminase-A Review of its Production and Application in Food Processing, *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 44;277-282.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1984 yılında İstanbul'da doğdu. İlköğretimi ve ortaokul Şanlıurfa' da tamamladı. 2006 yılında Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümünden mezun oldu. 2010 yılında Harran Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim dalı 'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı.

## ÖZET

Bu çalışmada, farklı oranlarda Mikrobiyal Transglutaminaz (MTGase) enzimi ilavesinin yarım yağlı ayranların fizikokimyasal, duyuşal, mikrostrüktürel ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla ayranlara 0 (kontrol: E), 0.5 (A), 1 (B), 2 (C) ve 4 (D) unit/g protein oranlarında MTGase enzimi ilave edilmiş ve 20 günlük depolama süresince ayranların pH, titrasyon asitliği, viskozite, serum ayrılması, su tutma kapasitesi, tat-aroma, kıvam, genel kabul edilebilirlik, *Str. thermophilus*, *L. delbrueckii*ssp. *bulgaricus* ve maya-küf sayıları belirlenmiştir.

Farklı oranda enzim ilavesinin ayranların incelenen tüm özelliklerine, depolamanın süresinin de ayranların titrasyon asitliği, viskozite, serum ayrılması, su tutma kapasitesi, *Str. thermophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve maya-küf sayıları üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0.01$ ).

Ayran örneklerinde MTGase miktarı artıkça pH'da artış ve titrasyon asitliğinde düşüş gözlenmiştir. Ayranların viskozite değerleri ve su tutma kapasiteleri belli bir enzim konsantrasyonuna kadar (2 unit/gr protein) artmış, daha yüksek konsantrasyonda (4 unit/gr protein) azalmıştır.

Enzim katkılı ayran örnekleri duyuşal açıdan kontrol örneğiyle karşılaştırıldığında; ayranların tat-aroma, kıvam ve genel kabul edilebilirlik puanları enzim oranı artıkça düşmüş ve panelistler tarafından tercih edilmemiştir (B örneği hariç).

Ayran örneklerine ait SEM görüntüleri incelendiğinde MTGase enziminin ayran örneklerinin mikrostrüktürel yapısındaki etkisini açıkça ortaya koymuştur. Genel olarak bakıldığında MTGase katkılı ayran örneklerinde kontrol örneğinden farklı olarak daha sıkı jel yapı içerisinde proteinlerin daha düzenli dağıldığı görülmüştür. Oluşan bu yapı enzim konsantrasyonu artıkça sıkılaştırmıştır. Bu durum MTGase enzimin katalize ettiği protein-protein çapraz bağlanmasıyla oluşan protein

kümelerini düzgün şekilde bir araya gelmesi ve homojen bir jel yapısının şekillenmesi ile açıklanabilir.

MTGase enzimi ilavesi ayranların mikrobiyolojik özelliklerini de önemli düzeyde etkilemiştir. Enzim konsantrasyonu arttıkça ayranlardaki *Str. Thermophilus* ve *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* azaldığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak MTGase kullanımını ayranların fizikokimyasal, mikrobiyolojik ve kısmen de duyuşal özellikleri üzerinde olumlu etki yatarmıştır. Elde edilen verilere göre duyuşal olarak en iyi örnek 1 unit/gr protein oranında enzim katkılı B örneği olsa bile, diğer özellikler açısından en iyi örneğin 2 unit/gr protein oranında enzim katkılı C örneği olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular ışığında yarım yağlı ayran üretiminde 1 ve/veya 2 unit/g protein oranında MTGase enzimi kullanılması önerilebilir. Böylece stabilizör kullanımına ihtiyaç duyulmadan fiziksel ve kimyasal özellikler açısından çok iyi nitelikte ve duyuşal olarak da kabul edilebilir özellikte yarım yağlı ayran üretilmesi mümkün olabilecektir.

## SUMMARY

In this study, the effects of Microbial transglutaminase (MTGase) enzyme addition in different rates, on physicochemical, sensitive, microstructural and microbiological properties of low fat ayran were investigated. Thus, MTGase enzyme was added to the ayran in ( control: E), 0.5 (A), 1 (B), 2 (C) and 4 (D) unit/g protein rates and pH, titratable acidity, viscosity, syneresis, water-holding capacity, taste-aroma, consistence, general acceptability, *Str. Thermophiles* and *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* numbers of the ayran were determined for the storage of 20 days.

The effects of enzyme addition in different rates to all properties of the examined ayran, and effect of the storage time on the, viscosity, syneresis, water-holding capacity *Str. thermophiles* and *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* numbers were found as significantly ( $p < 0.01$ ).

While MTGase amount increased in ayran samples, an increase was observed in pH and decrease was observed in titration acidity. Viscosity values and water retention capacities of the ayran increased up to a certain enzyme concentration (2unit/gr protein), and decreased in higher concentrations (4 units/gr protein).

When ayran samples which have enzyme were compared in terms of sensitivity with the control sample; the taste-aroma, consistency and general acceptability points decreased when the enzyme rate increased and were not preferred by the panelists (except B sample).

When SEM views examined in relation to ayran samples, the effect of MTGase enzyme on the micro structural structure of ayran samples. It was observed that proteins are distributed more regularly in firmer gel structure in comparison to control samples in MTGase additive ayran samples. This structure become firmer as the enzyme concentration increase. This situation can be explained combining of the

protein sets which arise by cross connection of protein which MTGase enzyme catalyze and shaping of a homogenous gel structure.

MTGase enzyme also effect microbiologic properties of ayrans in significant levels. It was determined that *Str. Thermophilus* and *Lb. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* numbers in the ayrans decrease when enzyme concentration increase.

As a result, TGcase usage created positive effect on physiochemical, microbiological properties and also partially on sensitive properties of the ayran. According to achieved date, even though the best sample is B sample which has enzyme on 1 unit/gr protein sensitively, it was determined that the 4 best sample is C sample which has enzyme on 2 unit/gr protein rate in terms of other properties.

According to obtained foundations, usage of T Gase enzyme can be suggested for reduced fat ayrans production in 1 and/or 2 unit/g protein rate. Thus, it will be possible to produce reduced fat ayran without needing stabilizer usage in terms of physical and chemical properties and have very good quality and acceptable sensitively.