


UHT İçme Sütlerinde Jelleşme Sorunu: Enzimlerin Etkisi

Firuze Ergin , Ahmet Küçükçetin 

Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

Geliş Tarihi (Received): 15.07.2018, Kabul Tarihi (Accepted): 05.10.2018

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): kucukcetin@akdeniz.edu.tr (A. Küçükçetin)

☎ 0 242 310 65 69 📠 0 242 310 63 06

Öz

Sütün raf ömrünü uzatmak için endüstride kullanımı en yaygın ısı işlem yöntemi UHT (Ultra High Temperature - Çok Yüksek Sıcaklık Uygulaması) işlemidir. Ancak, depolama sırasında enzimatik ve fiziksel etkilere bağlı olarak meydana gelen jel oluşumu UHT içme sütlerinin raf ömrünü kısaltmaktadır. Çiğ sütte bulunan psikrotrofik bakteriler tarafından üretilen yüksek sıcaklığa dirençli proteinazlar ile sütün yapısında doğal olarak bulunan plazmin ve plazmin sistemi enzimleri UHT içme sütlerinde jel oluşumuna neden olmaktadır. Söz konusu enzimler, sütün en önemli proteini olan kazeine farklı şekilde etki etmekte ve UHT içme sütlerinde farklı metabolitler üretmektedir. Bu derlemede, UHT içme sütlerinde meydana gelen jelleşmenin oluşum mekanizması ve oluşumunu etkileyen enzimler hakkında bilgi verilmesi amaçlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: UHT içme sütü, Jelleşme, Proteinaz, Plazmin

Gelation Problem in UHT Milk: Effect of Enzymes

ABSTRACT

The most prevalent heat treatment method used in the industry to extend shelf life of milk is UHT (Ultra High Temperature) process. However, the gel formation occurred depending on enzymatic and physical effects during storage shortens the shelf life of UHT milk. Heat-stable proteinases produced by psychotropic bacteria, and the native plasmin and plasmin system enzymes in raw milk cause gel formation in UHT milk. These enzymes differently affect casein, which is the most important milk protein, and produce different metabolites in UHT milk. In this review, it is aimed to give information about the mechanism of gelation and enzymes affecting its formation in UHT milk.

Keywords: UHT milk, Gelation, Proteinase, Plasmin

GİRİŞ

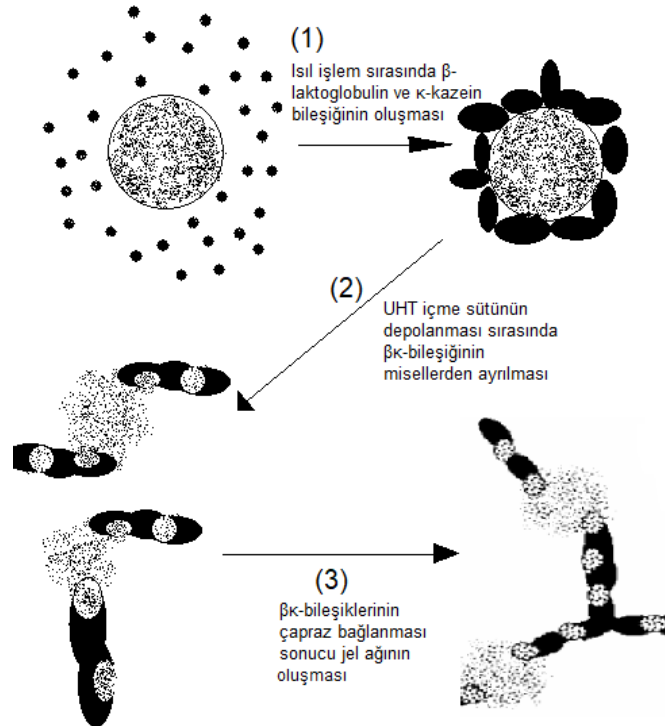
Başta protein, karbonhidrat ve yağ olmak üzere mineral maddeler ve vitaminler ile zengin bir bileşimine sahip olan süt, bireylerin dengeli ve yeterli beslenmesinde önemli bir yere sahiptir [1, 2]. Bununla birlikte süt; içerdiği besin öğeleri, yüksek su miktarı ve yaklaşık nötr pH değerine sahip olması ile mikroorganizmaların gelişimi için de uygun bir ortam oluşturmaktadır [3]. Sağlık açısından güvenilirliğini sağlamak ve raf ömrünü uzatmak için süte endüstride pastörizasyon ve sterilizasyon gibi ısı işlemleri uygulanmaktadır [4]. Türk

Gıda Kodeksi Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği'ne göre ısı işlem görmüş içme sütü; pastörizasyon, UHT veya sterilizasyon işlemlerinden biriyle ısı işlem görerek tüketiciye sunulan süt olarak tanımlanmaktadır [5]. Patojen mikroorganizmaların vejetatif formlarının tamamının, diğer mikroorganizmaların büyük bir kısmının yok edilmesi ile elde edilen pastörize içme sütlerinin 6°C'yi geçmeyecek sıcaklarda depolanması gereksinimi ve raf ömrünün kısa olması, çiğ sütün büyük kısmının UHT içme sütü üretiminde kullanılmasına yol açmaktadır [5, 6]. Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre 2017 yılında ülkemizde

pastörize içme sütü ve UHT içme sütü olarak toplam 1548880 ton içme sütü üretilmiştir [7]. UHT içme sütü; oda sıcaklığında saklanabilen ticari olarak steril bir ürün üretmek amacı ile çiğ sütün kimyasal, fiziksel ve duyuşal özelliklerinde en az değişikliğe yol açarak bozulma yapabilen tüm mikroorganizmaları ve bunların sporlarını yok eden, en az 135°C'de 1 saniye veya benzer etkiyi oluşturabilecek sıcaklık-süre kombinasyonlarında gerçekleştirilen ve yüksek sıcaklıkta kısa süreli sürekli akış altında uygulanan ısı işlem uygulanmış süt olarak ifade edilmektedir [5]. UHT içme sütleri oda sıcaklığında 6-9 ay muhafaza edilebilse de, ısı işlem uygulaması ve muhafazası sırasında sütün yapısında fiziksel ve biyokimyasal reaksiyonlar meydana gelmekte ve süt bileşiminde bulunan protein, karbonhidrat, yağ ve vitaminlerin yapısı değişebilmektedir [8, 9]. Söz konusu değişimler UHT içme sütlerinde jelleşmeye, çökelmeye, yağ ayrılmasına, kötü kokuya ve renk değişimlerine neden olmaktadır [10, 11]. UHT içme sütlerinin depolanması sırasında jel oluşumunu etkileyen temel faktörler; enzim aktiviteleri, UHT işleminin değişkenleri, depolama sıcaklığı ve süt bileşimi ile kalitesi olarak sıralanabilmektedir [12]. Bu derlemede UHT içme sütlerinde meydana gelen jelleşmenin oluşum mekanizmasının ve oluşumunu etkileyen enzimatik faktörlerin açıklanması amaçlanmaktadır.

UHT İÇME SÜTLERİNDE JELLEŞMENİN OLUŞUM MEKANİZMASI

UHT içme sütlerinin raf ömrünü kısaltan jelleşme, 20°C'deki sütün viskozite değerinde 10 mPa.s'den fazla bir artış olması ve sütün akıcılığını yitirmesi olarak ifade edilmektedir [13]. Süte 70°C ve üzerindeki sıcaklık değerlerinde ısı işlem uygulanması sırasında β -laktoglobulin denatüre olmaktadır. Denatürasyonun ilk aşamasında β -laktoglobulinin tersiyer globüler yapısı açılmakta, serbest hale gelen tiyol grupları ve hidrofobik etkileşimler ile monomerler arasında dönüşümlü reaksiyonlar gerçekleşmektedir. Denatürasyonun ikinci aşamasında ise, dönüşümsüz olarak sülfidril grupları ve hidrofobik etkileşimler ile β -laktoglobulin agregatları oluşabileceği gibi, β -laktoglobulin ile κ -kazein veya süt yağı globül membranındaki proteinler gibi diğer sülfidril içeren moleküller arasında disülfid bağları da oluşabilmektedir [14, 15]. Isıl işlem sonucunda oluşan β -laktoglobulin ve κ -kazein bileşimi ($\beta\kappa$ -bileşimi), UHT içme sütünün depolanması sırasında kazeinden kısmen veya tamamen ayrılarak aralarında çapraz bağlar yapmaktadır. Jel yapısı, peyniraltı suyu proteinlerinin özellikle de β -laktoglobulinin κ -kazein ile etkileşime girmesi ve depolama sırasında bileşikler arasındaki çapraz bağlanmalar sonucu oluşan üç boyutlu protein ağından meydana gelmektedir (Şekil 1) [16].



Şekil 1. UHT içme sütlerinde jelleşme modeli (McMahon'den [17] uyarlanmıştır.)

Depolama sırasında sütte gerçekleşen jelleşmenin mekanizması tam olarak belirlenemese de, yapılan çalışmalar enzimatik ve enzimatik olmayan fizikokimyasal tepkimelerin jelleşmeye neden olabileceğini ortaya koymaktadır [18]. Maillard reaksiyonunun UHT içme sütlerinde jelleşme oluşumu üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada; çiğ süttten, UHT süttten ve 30°C'de 11 ile 27 ay depolanan UHT

içme sütlerinden asit çöktürme yöntemiyle ayrılan kazeinin toplam çökelme katsayıları sırasıyla 7.3, 7.6, 13.4 ve 13.7 s olarak tespit edilirken, NH_2 içerikleri sırasıyla 100, 95.9, 95.7 ve 77.8 NH_2/mg kazein olarak belirlenmiştir. Çalışmada, UHT işlemi ve artan depolama süresi ile birlikte farklı süttlerden elde edilen kazeinin NH_2 içeriğinde azalma olduğu, söz konusu durumun maillard reaksiyonundan kaynaklandığı belirtilmiştir.

Maillard reaksiyonu sonucunda polipeptit zincirlerindeki net yükün değişimiyle spesifik grupların etkileşime girmesinin, sütün koloidal yapısını bozabileceği ve jelleşmeye neden olabileceği bildirilmiştir [19]. Yapılan başka bir çalışmada ise, laktoz oranı %0.05'in altına düşürülen sütlere %3 ve %6 oranlarında laktoz veya sakkaroz eklendikten sonra 140°C'de 4 saniye UHT işlemi uygulanmıştır. Aseptik koşullarda dolmuştur yapılan sütler 4, 20 ve 35°C'lerde 22 hafta süresince depolanmıştır. Depolama süresinin 21. haftasında 4 ve 20°C'lerde depolanan tüm sütlerde jelleşme olduğu, 35°C'de depolanan sütlerde ise depolama süresince jelleşme meydana gelmediği; ancak 40. haftadan sonra sütün çökelti ve serum olmak üzere iki faza ayrıldığı tespit edilmiştir. Depolama süresince 4 ve 20°C'lerde depolanan sütler ile 35°C'de depolanan ve sakkaroz içeren sütlerin renginde değişim gözlenmezken, 35°C'de depolanan ve laktoz içeren sütlerde kahverengi rengin gözlemlendiği belirtilmiştir. Şeker içerikleri farklı olmasına rağmen, jelleşme görülen tüm sütlere ait elektron mikroskopu görüntülerinin benzer olduğu saptanmıştır. Çalışma sonunda, yüksek sıcaklıkta depolanan ve laktoz içeren sütlerde maillard reaksiyonu sonucunda kahverengi bileşenlerin oluştuğu; ancak maillard reaksiyonu ve jel oluşumu arasında korelasyon olmadığı belirlenmiştir [20]. Jelleşme ile sonuçlanan diğer bir fizikokimyasal tepkime de ısı işlemi ile birlikte kazein misellerinin potansiyel enerjilerinin değişimidir. Potansiyel enerjideki farklılıklar, kazein misellerin kümeleşmesini hızlandırmakta ve depolama sırasında sütün viskozitesini arttırmaktadır [21]. Manji ve Kakuda [22] ise, depolama sırasında sütlerde oluşan jelleşmenin iki aşamada gerçekleştiğini; ilk aşamada enzimlerin etkisi ile sütte değişimler meydana geldiğini ve ikinci aşamada ise fizikokimyasal tepkimeler sonucunda sütün stabilitesini kaybederek jel oluşumu gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

UHT İÇME SÜTLERİNİN ENZİMLERİN ETKİSİYLE JELLEŞMESİ

Sütün doğal enzimlerinden olan plazmin ve yüksek sıcaklığa dirençli bakteri proteinazları UHT içme sütlerinde jelleşme sorununa neden olmaktadır. Proteolitik enzimler, kazein miselinden β k bileşiminin ayrılmasını hızlandırarak ve kazeini proteolitik hidrolize uğratarak sütün jelleşmesine etki etmektedir. Plazmin ve bakteriyel proteinazlar direkt olarak β k-bileşiklerine etki etmese de, bağlı oldukları α _{s1}-kazein gibi diğer kazein fraksiyonlarına etki ederek β k- bileşiklerinin misellerden ayrılmasını sağlamaktadır. Serbest hale geçen β k-bileşiklerinin birleşmesi ve kritik yoğunluğa ulaşması ile yarı katı jel oluşmaktadır [17].

Bakteri Proteinazları

Çiğ süt, mezofilik bakterilerin gelişimini engellemek ve kaliteyi korumak için işleninceye kadar geçen sürede çiftliklerde ya da süt işleme tesislerinde soğukta depolanmaktadır [23]. Türk Gıda Kodeksi Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği'ne göre, içme sütü üretiminde kullanılacak olan çiğ sütler üretim tesisinde sütün kabulünden sonra 4 saat içinde işlenmeyecekse,

6°C'yi geçmeyen bir sıcaklığa soğutulmalı ve ısı işlem uygulanıncaya kadar bu sıcaklıkta tutulmalıdır [5]. Çiğ sütün uzun süre soğukta depolanması doğal mikrobiyotasının değişmesine neden olmaktadır. Soğutulmuş çiğ sütte başlangıçta Gram pozitif mezofilik aerobik bakteriler baskın olarak bulunurken, depolama süresinin uzamasıyla Gram negatif ve Gram pozitif psikrotrofik bakteriler baskın duruma geçmektedir [24]. Psikrotrofik bakteriler, 7°C veya daha düşük sıcaklık değerlerinde gelişebilen ve metabolik faaliyetlerini optimum 20-30°C sıcaklık değerleri arasında gösteren bakteriler olarak tanımlanmaktadır [25]. Süte uygulanan ısı işlem sıcaklıklarında psikrotrofik bakteriler inaktif hale gelmektedir. Bununla birlikte, söz konusu bakterilerin sütte ürettikleri enzimler yüksek sıcaklığa karşı direnç göstererek içme sütlerinde bozulmaya neden olmaktadır [26].

Soğukta depolanan çiğ sütlerde psikrotrofik bakterilerden *Pseudomonas* cinsine ait suşların baskın mikrobiyotayı oluşturduğu bildirilmektedir [27]. Almanya'da yapılan bir çalışmada, 10 farklı çiftlik ve süt işletmesinden toplam 20 çiğ süt örneği alınarak 2 ile 4 gün süresince 4°C'de depolanmıştır. Depolama sonunda çiğ sütlerdeki toplam bakteri sayıları 30, 15 ve 6°C sıcaklık değerlerinde sırasıyla 5, 7 ve 10 gün inkübasyondan sonra belirlenmiştir. İnkübasyon sonrası çiğ süt örneklerinde toplam 2906 bakteri izolasyonunun tanımlanması yapılmıştır. Çiğ sütlerde en yaygın olarak *Pseudomonas*, *Lactococcus* ve *Acinetobacter* cinslerinin bulunduğu ve söz konusu cinslerin toplam bakteri izolasyonlarının %66'sını oluşturduğu saptanmıştır. Proteolitik ve lipolitik aktivitenin tespiti için 6°C'de agar difüzyon yöntemiyle 966 bakteri izolatu incelenmiş ve bakteri izolasyonlarının %22'sinin proteolitik, %16'sının lipolitik, %20'sinin ise hem proteolitik hem de lipolitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Tanımlanan *Pseudomonas* cinsine ait izolasyonların tümünün proteolitik ya da lipolitik aktiviteye sahip olduğu, tanımlanan *Acinetobacter* cinsine ait izolasyonların ise tamamına yakınının lipolitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [27]. Yapılan diğer bir çalışmada, Avustralya'da bulunan üç farklı süt çiftliğinden (A, B ve C) bir yıl boyunca her ay toplanan çiğ sütler 2, 4, 6, 8 ve 10°C sıcaklık değerlerinde 10 gün depolanmıştır. Çiğ sütlerde psikrotrofik bakteri sayısının 5.75×10^2 ile 6.72×10^3 kob/mL arasında değiştiği belirlenmiştir. Çiğ sütlerdeki psikrotrofik bakteri sayısının en yüksek olduğu aylar Avustralya için kış mevsiminin yaşandığı Haziran, Temmuz ve Ağustos olarak saptanırken, en düşük olduğu aylar ise yaz mevsiminin yaşandığı Aralık, Ocak ve Şubat olarak tespit edilmiştir. MALDI-TOF MS ile yapılan çalışmalar sonucunda çiğ sütlerde toplam 604 bakteri izolatu tanımlanmıştır. Filogenetik analizler ile söz konusu bakterilerin *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacilli*, *Actinobacteria*, *Flavobacteria* ve *Sphingobacteria* sınıflarına ait oldukları ve *Gammaproteobacteria* (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Hafnia*), *Bacilli* (*Bacillus*, *Paenibacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*) ile *Actinobacteria* (*Microbacterium*, *Micrococcus* ve *Rhodococcus*) sınıflarına ait bakterilerin toplam

psikrotrofik bakterilerin %89'unu oluşturdukları belirlenmiştir. A ve C çiftliklerinden toplanan çiğ sütlerde *Pseudomonas* cinsinin de içinde bulunduğu *Gammaproteobacteria* sınıfına ait bakteriler %82 oranında baskın olarak bulunurken, B çiftliğinden toplanan çiğ sütlerde bakterilerin %44'ünün *Bacilli* sınıfına ait olduğu tespit edilmiştir. Depolama sıcaklığı 2 ve 4°C olan çiğ sütlerde *Pseudomonas* (özellikle *Pseudomonas fluorescens*) ile *Bacillus* cinsine ait bakterilerin sayısında artış olduğu saptanırken, 6°C ve üzerindeki sıcaklıklarda depolanan çiğ sütlerde ise mezofilik özellik gösteren bakterilerinin sayısında artış olduğu belirlenmiştir. İzole edilen *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Lactococcus*, *Acinetobacter* ve *Hafnia* cinslerine ait bakterilerin sırasıyla %62.5, %53.3, %70.2, %5.3, %25.6 ve %40'ının proteaz aktivitesine sahip olduğu; sırasıyla %58.3, %50.1, %65.2, %1.3, %19.8 ve %34.2'sininin 142°C'de 4 saniye UHT uygulamasından sonra proteaz aktivite gösterdiği saptanmıştır. Çalışma sonucunda, çiğ sütlerin elde edildiği aylara ve bölgelere göre psikrotrofik bakteri sayısı ile mikroorganizma çeşitliliğinin değiştiği, proteaz aktivitesinin UHT işleminin sonrasında da devam ettiği belirlenmiştir.

Stoeckel ve ark. [28] yaptıkları çalışmada, *Pseudomonas weihenstephanensis* DSM 29166, *Pseudomonas proteolytica* 691 ve *Pseudomonas* sp. W15a bakterilerinin raf ömrü süresince UHT içme sütlerinin stabilitesi üzerine etkisini incelemişlerdir. Çiğ süt, 60°C'de 32 saniye süresince uygulanan termizasyon işleminden sonra üç kısma ayrılmış ve 10⁴ kob/mL olacak şekilde sırasıyla *Pseudomonas* sp. W15a, *P. weihenstephanensis* DSM 29166 ve *P. proteolytica* 691 bakterileri aşılansak 4-5 gün süresince 6°C'de bekletilmiştir. UHT işlemi öncesi bakteri aşılansak 6°C'de bekletilmiş sütlerle bakteri aşılansak ve 6°C'de bekletilmemiş sütlerin belirli oranlarda eklenmesi ile elde edilen süt karışımlarından, UHT işlemi öncesi bakteri aşılansak 6°C'de bekletilmiş sütlerden ve bakteri aşılansak 6°C'de bekletilmemiş sütlerden 140°C'de 8.4 saniye ısıtım uygulanması ile üretilen UHT içme sütleri 4 ay süresince 20°C'de depolanmıştır. Depolama süresi sonunda bakteri aşılansak sütün üretilen kontrol grubu UHT içme sütlerinde herhangi bir proteolitik aktivite tespit edilmezken, *P. weihenstephanensis* DSM 29166 aşılansak ve bakteri aşılansak süt içermeyen 6°C'de bekletilmiş sütün üretilen UHT içme sütlerinde 0.35 picokatal/mL (pkat/mL) ile en yüksek proteolitik aktivite değeri saptanmıştır. Çalışmada depolama süresince UHT içme sütlerine ait acılık, krema tabakası, partikül, çökelti ve jel oluşumu değerleri incelenmiştir. Kontrol grubu UHT içme sütlerinde söz konusu kusurlardan herhangi biri tespit edilememiştir. Proteolitik aktivite değeri 0.05 pkat/mL ve üstünde olan tüm UHT içme sütlerinde acılık belirlenmiş olup, *P. weihenstephanensis* DSM 29166 aşılansak 6°C'de bekletilmiş süte bakteri aşılansak sütün 1:1 oranında eklenmesi ile elde edilen karışımdan üretilen UHT içme sütlerinde ve *P. weihenstephanensis* DSM 29166 aşılansak ve bakteri aşılansak süt içermeyen 6°C'de bekletilmiş sütün üretilen UHT içme sütlerinde üretimden hemen sonra acılık saptanmıştır. *Pseudomonas* sp. W15a aşılansak 6°C'de bekletilmiş ve

bakteri aşılansak süt içermeyen sütün üretilen UHT içme sütlerinde ve *P. weihenstephanensis* DSM 29166 aşılansak sütlerden üretilen tüm UHT içme sütlerinde depolama süresinin sonunda çökelti oluşum değerlerinin %100 olduğu tespit edilmiştir. Proteolitik aktivite değeri 0.07 pkat/mL'den yüksek olan UHT içme sütlerinin yüzeyinde 1 cm'den daha kalın bir krema tabakasının oluştuğu belirlenirken, proteolitik aktivite değeri 0.16 pkat/mL değerine ulaşan UHT içme sütlerinde depolama süresinin sonunda jelleşme meydana geldiği saptanmıştır. Çalışmada, depolama süresince *Pseudomonas* cinsi bakteriler tarafından üretilen peptidazların süt serumunda ve yağ globül membranında bulunan kazeine etki ederek acı tadın, krema tabakasının ve çökeltinin oluşumuna neden olduğu belirtilmiştir.

Pseudomonas cinsi bakteriler, her bir molekülünde altı ile sekiz adet kalsiyum ve bir adet çinko iyonu bulduran, metalloenzim karakterde serralisin ailesine ait ve AprX olarak adlandırılan proteazlar sentezleyebilmektedir [29, 30]. *Pseudomonas* cinsi bakteriler tarafından sentezlenen metaloproteazların molekül ağırlıkları, optimum aktivite gösterdikleri pH ve sıcaklık değerleri, ortamda bulunan Ca²⁺ gibi iyonların konsantrasyonları ile termal dirençleri farklılıklar göstermektedir [31]. AprX proteinin yapısında kalsiyum ve çinko ile S-S (disülfid) bağlarının olmasından dolayı yüksek sıcaklık değerlerine karşı direnç gösterebildiği bildirilmektedir [32].

Pseudomonas LBSA1 bakterisinin UHT içme sütlerinin stabilitesi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada çiğ süt, 5x10⁴ kob/mL olacak şekilde *P. LBSA1* aşılansak sonra 6°C'de 72 saat bekletilmiştir. *P. LBSA1* ile kontamine süt ve bakteri içermeyen kontrol grubu sütün UHT işlemine tabi tutulduktan sonra 90 gün süresince 20°C'de depolanmıştır. Kontamine sütün üretilen UHT içme sütlerinde depolanmanın 1, 30, 60 ve 90. günlerinde kazein olmayan azot miktarları sırasıyla 2.9, 4.7, 7.0 ve 8.0 g/kg olarak belirlenirken, protein olmayan azot miktarları ise sırasıyla 1.2, 2.9, 3.9 ve 4.7 g/kg olarak saptanmıştır. Kontrol grubu UHT içme sütlerinde ise kazein olmayan azot ve protein olmayan azot değerlerinin sırasıyla 3.1 ve 1.3 g/kg olduğu ve her iki değer de depolama süresince değişmediği tespit edilmiştir. Kontamine sütün üretilen UHT içme sütlerinde negatif yüklü kazein misellerinin ve partikül hidrasyonunun depolama süresince azaldığı belirlenmiş olup, söz konusu durumun sütte gerçekleşen proteoliz sonucu kazein misellerinin arasındaki itme kuvvetinin azalması ve agregatların oluşmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. Çalışmada, ayrıca *P. LBSA1* tarafından sentezlenen proteaz enzimi tanımlansak, enzimin çalışma koşulları ve kazeine olan etkisi araştırılmıştır. Yapılan gen dizilimi analizi sonucunda *P. LBSA1* tarafından sentezlenen proteaz enziminin 49 kDa molekül ağırlığına sahip AprX olduğu, en yüksek aktiviteyi pH 9.0'da ve 40°C'de gösterdiği saptanmıştır. Sodyum kazeinat, sodyum kazeinattan elde edilen saf kazein miseli ve peyniraltı suyu proteini çözültülerine 0.07 µg/mL olacak şekilde saflaştırılmış AprX enzimi ilave edildikten sonra 37°C'de 24 saat süresince inkübe edilmiştir. Peyniraltı suyu proteinlerinin AprX'den

etkilenmediği, misel haldeki kazeinin sodyum kazeinata göre daha yavaş hidrolize olduğu belirlenmiştir. İnkübasyonun ilk 4 saatinde sodyum kazeinat çözeltisinde β -kazeinin tamamının parçalandığı, κ -kazeinin α_s -kazeine göre hidrolize karşı daha dirençli olduğu tespit edilmiştir. Misel haldeki kazein çözeltisinde ise β - ve κ -kazeinin α_s -kazeine göre daha hızlı parçalandığı saptanmıştır. İnkübasyonun sonunda sodyum kazeinat ve misel haldeki kazein çözeltilerinde sadece 3 ve 16 kDa molekül ağırlığına sahip iki molekülün tespit edildiği ve 16 kDa ağırlığındaki molekülün peynir yapımı sırasında κ -kazeinin parçalanmasıyla oluşan para- κ -kazein olduğu belirlenmiştir [30]. Konu ile ilgili yapılan başka bir çalışmada ise, mikrofiltrasyon işlemi uygulanarak somatik hücre sayısı 10^4 somatik hücre/mL'nin altına ve toplam bakteri sayısı 10 kob/mL'ye düşürülen çiğ süt iki kısma ayrılmıştır. Bir kısım süte *Pseudomonas fluorescens* F bakterisinden elde edilen ve 45 kDa molekül ağırlığına sahip AprX enziminden 0.2 mg/L ilave edilirken, kontrol grubunu oluşturan diğer kısma ise enzim ilavesi yapılmamıştır. Her iki süt grubu 140°C 'de 4 saniye süresince UHT işlemine tabi tutulduktan sonra 20°C 'de 90 gün depolanmıştır. Depolama sonunda kontrol grubu sütün stabilitesinin bozulmadığı, akışkanlığını ve homojenliğini koruduğu belirlenirken, enzim içeren sütlerin bulunduğu şişelerin diplerinde beyaz çökelti tabakasının oluştuğu saptanmıştır. Enzim ilavesi yapılan sütte kazein olmayan azot miktarının depolamanın 8. ve 90. günlerinde sırasıyla 9.2 ve 18.5 g/kg, protein olmayan azot miktarının ise sırasıyla 6.2 ve 13.9 g/kg olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubu sütlerde depolama süresince kazein olmayan azot (3.1 g/kg) ile protein olmayan azot (1.4 g/kg) miktarının değişmediği belirlenmiştir. Enzim içeren sütlerde depolama boyunca kazein olmayan azot fraksiyonuna ait peptitler kromatografik yöntemlerle tanımlanmış ve orijinlerine göre peptit sayısının β - > α_{s1} - > κ - > α_{s2} - kazein olacak şekilde sıralandığı saptanmıştır. Kontrol grubu sütün zeta potansiyel değerinin -17.3 mV olduğu ve depolama sonuna kadar sabit kaldığı belirlenmiş olup, enzim içeren sütlerde zeta potansiyel değerinin ilk 8 gün içinde -13.9 mV'a düştüğü tespit edilmiştir. Enzim içeren sütlere ait partikül boyutu değerlerinin depolamanın 8. ve 30. günlerinde sırasıyla 0.7 ile 9 μm ve 2 ile 700 μm arasında değiştiği saptanmıştır. Sütün zeta potansiyel değerinin düşmesi ile birlikte kazein miselleri arasındaki itme kuvvetinin azaldığı ve söz konusu durumun sütte partikül oluşumuna neden olduğu belirtilmiştir [32].

Soğukta depolanan çiğ sütlerde *Pseudomonas* türleri dışında *Serratia*, *Aeromonas* ve *Erwinia* türlerinde de AprX enziminin sentezini yöneten apr geninin bulunduğu bildirilmesiyle birlikte, konu ile ilgili diğer türlere ait detaylı çalışmalar yapılmıştır [33]. Machado ve ark. [34] çiğ süttten izole edilen 17 farklı *Serratia liquefaciens* suşları ile *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi* ve *Pseudomonas lundensis* bakterilerini 10^4 kob/mL düzeyinde aşılacakları çiğ sütlerin proteoliz değerlerini 7°C 'de 2 ve 4 gün ile 5°C 'de 5 gün depoladıktan sonra ölçmüşlerdir. *S. liquefaciens*, *P. fluorescens* ve *P. lundensis* bakterilerinin sayısının 7°C 'de 2 gün depolanan sütlerde 10^6 - 10^7 kob/mL düzeyine ulaştığı ve proteoliz değerlerinin 0.2 μmol

glisin eşdeğeri/mL değerinden yüksek olduğu belirlenmiştir. Proteoliz değerlerinin 7°C 'de 2 gün, 7°C 'de 4 gün ve 5°C 'de 5 gün bekletilen sütlerde sırasıyla 0-0.514, 0.147-28.685 ve 0.043-27.159 μmol glisin eşdeğeri/mL arasında değiştiği saptanmıştır. Yüksek proteolitik aktivite değerine sahip *S. liquefaciens* L53 ve *S. liquefaciens* L98 suşlarına ait yüksek sıcaklığa direnç gösteren proteaz enzimlerinin tespiti için yapılan elektroforez analizi sonucunda, 52 kDa molekül ağırlığında sadece bir tane protein belirlenmiştir. Söz konusu proteinin yapısında kalsiyum ve çinko bulunduran bir metalloproteaz olduğu ve sentezinin ser2 geni tarafından gerçekleştiği saptanmıştır. Çalışmada, ser2 ve apr genlerinin nükleotid dizilerinde benzerlik bulunmadığı; ancak her iki genin de, yapılarında kalsiyum ve çinko bağlanma bölgelerini içeren M10 peptidaz ailesine ait olduğu belirtilmiştir.

Baglinere ve ark. [35] yaptıkları bir çalışmada, 5×10^4 kob/mL olacak şekilde *Serratia liquefaciens* L53 ve *Serratia liquefaciens* L64 aşılacakları çiğ sütü 7°C 'de 72 saat bekletmişlerdir. Bakteri aşılardan sütler ile bakteri aşılardan kontrol grubu sütler 140°C 'de 4 saniye UHT işlemine tabi tutulduktan sonra 20°C 'de 90 gün depolanmıştır. Kontrol grubu UHT içme sütü ve *S. liquefaciens* L64 aşılardan süttten üretilen UHT içme sütünün depolama süresi sonunda akışkanlığını koruduğu, *S. liquefaciens* L53 aşılardan süttten üretilen UHT içme sütünün bulunduğu şişelerin diplerinde ise beyaz tortu tabakasının oluştuğu belirlenmiştir. Kontrol grubu UHT içme sütünde, *S. liquefaciens* L64 ve *S. liquefaciens* L53 aşılardan sütlerden üretilen UHT içme sütlerinde kazein olmayan azot miktarları 90 günlük depolama sonunda sırasıyla 3.3, 3.4 ve 8.3 g/kg; protein olmayan azot miktarları ise sırasıyla 1.4, 1.5 ve 4.3 g/kg olarak tespit edilmiştir. Kazein olmayan azot fraksiyonlarının, kontrol grubu UHT içme sütünde 145 β -kazein, 54 α_{s1} -kazein, 22 α_{s2} -kazein ve 19 κ -kazein orijinli peptit olduğu, *S. liquefaciens* L64 aşılardan sütlerde ise 346 β -kazein, 191 α_{s1} -kazein, 56 α_{s2} -kazein ve 96 κ -kazein orijinli peptit bulunduğu saptanmıştır. *S. liquefaciens* L64 aşılardan süttten üretilen UHT içme sütünde κ -kazeinin 95-105 aminoasit dizilimine sahip, kazeinomakropeptitten türeyen peptitler belirlenmiş olup, *S. liquefaciens* L64 tarafından sentezlenen Ser2 proteaz enziminin rennet benzeri etki göstererek süt stabilizasyonunu bozduğu belirtilmiştir.

Sütün bakteriyel proteazların etkisi sonucunda jelleşmesi ile peynir yapımı sırasında rennetle koagüle olması birbirine benzetilse de, çeşitli farklılıklar bulunmaktadır. Bakteriyel proteazlar ile rennet arasındaki temel fark; rennet sadece κ -kazeinin 105.-106. aminoasitleri arasındaki peptit bağına etki ederken, bakteriyel proteazlar düşük etki özgülüğüne sahiptir. Bir diğer farklılık ise bakteriyel proteazların etkisi ile κ -kazein sadece %5-10 oranında hidrolize uğrarken, rennet etkisi ile κ -kazeinin hidroliz oranının %80-90'lara ulaşmasıdır. Peynir yapımındaki koagülasyon süresi ile karşılaştırıldığında UHT içme sütlerinde jelleşme daha uzun sürede meydana gelmektedir [13, 36].

Plazmin

Sütte doğal olarak bulunan plazmin enzimi, UHT içme sütlerinde jelleşme sorununa neden olabilmektedir [37]. Plazmin, sütte baskın olarak bulunan, pH 7.5 ve 37°C'de optimum düzeyde aktivite gösteren ve kan kaynaklı tripsin benzeri bir serin proteinazdır [38]. Plazmin, inaktif formdaki plazminojen, plazminojen aktivatörleri ve inhibitörlerini içeren karmaşık bir sistemin parçasıdır. Süt ve süt ürünlerinde, plazmin sistemini oluşturan bileşenler proteolizi aktive veya inhibe etmek için birbirleriyle ve diğer süt bileşenleriyle etkileşime girmektedir. Plazmin, plazminojen ve plazminojen aktivatörleri sütün kazein fraksiyonunda; plazmin inhibitörleri ile plazminojen aktivatör inhibitörleri ise serum fraksiyonunda yer almaktadır. Sütte, doku-tipi ve ürokinaz-tipi olmak üzere sırasıyla kazein ve somatik hücrelerle ilişkili olarak bulunan iki tip plazminojen aktivatör bulunmaktadır. Söz konusu aktivatörler plazminojenin arjinin-izolösin (Arg557-Ile558) peptitleri arasındaki bağı hidroliz ederek plazmine dönüşmesini sağlamaktadır. Plazminojen aktivatör inhibitörleri ile plazmin inhibitörleri de plazminojenin plazmine dönüşümünü ve plazminin kazeini hidrolizini engellemektedir. Yüksek sıcaklığa karşı plazmin, plazminojen ve plazminojen aktivatörlerinin stabil olduğu, plazminojen aktivatör inhibitörleri ile plazmin inhibitörlerinin ise hassas olduğu bildirilmektedir [21, 39]. Saint Denis ve ark. [40] yaptıkları bir çalışmada, sütte plazmin, plazminojen ve plazminojen aktivatörlerinin 60 ve 140°C sıcaklık değerleri arasındaki inaktivasyon kinetiklerini incelemişlerdir. Enzimin %90'ının inaktif olması için gereken süre değeri olan D değerinin plazmin, plazminojen ve plazminojen aktivatörü için 70°C'de sırasıyla 11700, 8040 ve 9960 saniye; 140°C'de ise sırasıyla 13, 11 ve 16 saniye olduğu belirlenmiştir. Plazmin, plazminojen ve plazminojen aktivatörü için aktivasyon enerjileri 70-90°C arasındaki sıcaklık değerleri için sırasıyla 244, 230 ve 241 kJ/mol olarak tespit edilirken, 95-140°C arasındaki sıcaklık değerleri için sırasıyla 29, 35 ve 24 kJ/mol olarak saptanmıştır. Plazminojen aktivatörünün plazmin ve plazminojene göre sıcaklığa karşı daha hassas olduğu belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca 1, 2, 3, 4 ve 5 g/mL olacak şekilde β -laktoglobulin eklenen kazein çözeltileri 90°C'ye ısıtılarak β -laktoglobulinin plazmin ve plazminojen aktivatörü üzerine etkisi araştırılmıştır. β -laktoglobulin eklenmeyen kazein çözeltilerinde plazmin ve plazminojen aktivatörü için D değerinin sırasıyla 833 ve 1180 saniye olduğu, 5 g/mL β -laktoglobulin eklenen kazein çözeltilerinde ise sırasıyla 101 ve 160 saniye olduğu tespit edilmiştir. Kazein çözeltilerindeki β -laktoglobulin miktarının artışına bağlı olarak söz konusu enzimlerin inaktivasyonları için gereken sürenin azaldığı belirlenmiştir. Plazminojenin yapısında 48 sistein, 23 disülfid bağı ve 2 serbest tiyol grubu mevcutken, β -laktoglobulinin yapısında 2 sülfid bağı ve 1 serbest tiyol grubu bulunmaktadır [41, 42]. Plazmin ile plazminojen 50-70°C'ler arasında, β -laktoglobulin ise 70°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda denatüre olmaya başlamakta ve yapılarında bulunan tiyol grupları serbest hale gelerek reaksiyona girebilmektedir [14, 43]. Plazmin, plazminojen ve plazminojen aktivatörünün

sıcaklık ile dönüşümsüz inaktivasyonu, içerdikleri serbest tiyol grupları ile β -laktoglobulin ve ortamdaki diğer denatüre plazmin sistemi enzimlerinin tiyol grupları arasında tekrardan disülfid bağlarının meydana gelmesi ile gerçekleşmektedir [42].

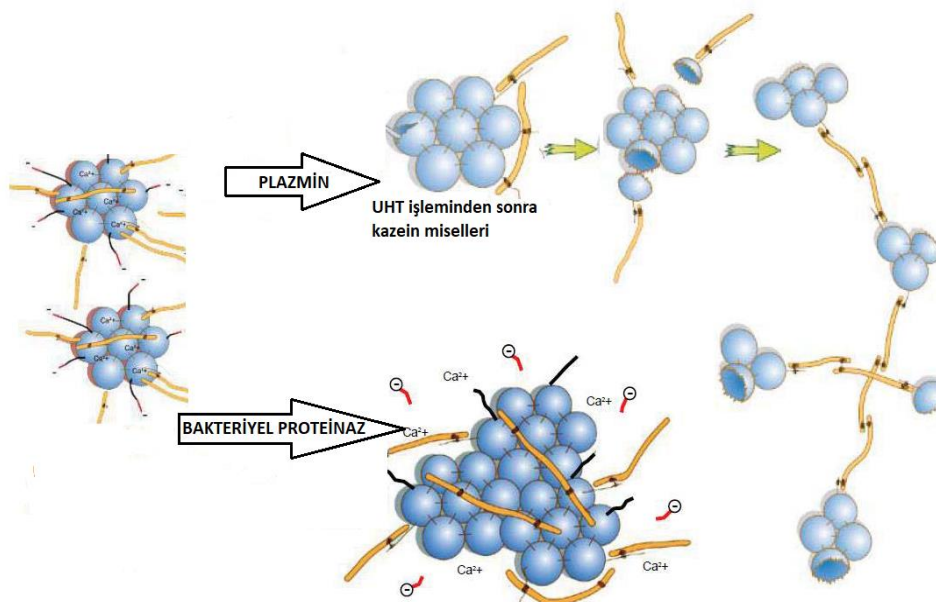
UHT işlemi ile içme sütlerinde plazmin, plazminojen ve plazmin aktivatörü tamamen inaktive edilememekte ve depolama süresince UHT içme sütlerinde bozulmaya neden olmaktadır. Çiğ sütün yapısında yaklaşık 0.3 mg/L plazmin ile 9.0 mg/L plazminojen olduğu ve plazminin aktivitesi sonucu oluşan bozulmayı engellemek için sütte bulunan mevcut plazminin %99.9'unun inaktive edilmesi gerektiği bildirilmiştir [13, 42]. Yapılan bir çalışmada, 134.4°C'de 14.2 saniye UHT işlemi uygulanarak doğal plazmin aktivitesi tamamen inhibe edilen sütlere steril ortamda 0.15 mg/L olacak şekilde plazmin ilave edilmiştir. Plazmin ilavesi yapılmayan kontrol grubu UHT içme sütleri ile plazmin ilaveli UHT içme sütlerinin 23°C'de 181 gün depolanması süresince fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir. Depolamanın 27. gününde plazmin ilave edilen UHT içme sütlerinde hafif sarı renk ve süt yüzeyinde küçük partiküller belirlenirken, depolamanın 100. gününde süt yüzeyinde pıhtı yapısının, dibinde ise saydam, yumuşak ve kolay bozulabilen jel yapısının oluştuğu saptanmıştır. Kontrol grubu UHT içme sütlerinde depolamanın sonunda jelleşme olmadığı belirlenmiştir. Plazmin ilaveli UHT içme sütleri ile kontrol grubu sütlerin viskozite değerlerinin depolamanın 56. gününe kadar eşit (4 cP) olduğu; ancak sonrasında plazmin ilaveli UHT içme sütlerinin viskozite değerinin artarak depolama sonunda yaklaşık 36 cP'ye ulaştığı tespit edilmiştir. Elektroforez ile yapılan analizler sonucunda, plazmin ilaveli UHT içme sütlerinde β -kazeinin α -kazeine göre daha hızlı hidrolize uğradığı, 23 hafta sonunda α ve β -kazeinin tamamının hidrolize olduğu, κ -kazeinin ise tespit edilebildiği belirlenmiştir. Çalışma sonunda düşük konsantrasyonda plazmin varlığının UHT içme sütlerinde jelleşmeye neden olduğu değerlendirilmiştir [44]. Plazmin aktivitesinin UHT içme sütlerindeki jelleşme sorununa etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada, 72 ve 95°C'lerde 180 saniye ön ısıtma işlemi uygulanan sütler 150°C'de 0.2 saniye tutulduktan sonra aseptik paketlenerek 20°C'de 16 hafta depolanmıştır. UHT işleminden sonra yapılan analizlerde, 72°C'de ön ısıtma uygulanan UHT içme sütlerinde plazmin ve plazminojen aktivitelerinin sırasıyla %30.9 ve %14.0 olduğu, 95°C'de ön ısıtma uygulanan UHT içme sütlerinde ise plazmin ve plazminojen aktivitesinin olmadığı belirlenmiştir. Ön ısıtma işlemi 72°C'de uygulanan UHT içme sütlerinde depolama süresince plazminojen aktivitesinde azalış; plazmin aktivitesinde ise artış olduğu saptanmıştır. Söz konusu durumun plazminojen aktivatörlerinin sıcaklığa karşı dirençli, plazmin ve plazminojen aktivatör inhibitörlerinin ise hassas olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. Depolamanın 6. haftasında 72°C'de ön ısıtma işlemi uygulanan UHT içme sütlerinde acılaşıma başladığı, 10. haftadan sonra sütlerin bulunduğu şişelerin dibinde yumuşak ve kırılğan bir jel tabakasının oluştuğu ve 16. haftadan sonra sütün tamamen jelleştiği tespit edilmiştir. Depolama süresinin sonunda 95°C'de

ön ısıtma işlemi uygulanan UHT içme sütlerinin viskozite değerlerinin değişmediği, jelleşme ve çökelti sorununun olmadığı saptanmıştır. UHT işleminden sonra 72 ve 95°C'de ön ısıtma uygulanan sütlerin viskozite değerleri sırasıyla 2.0 ve 2.5 mPas olarak belirlenirken, 72°C'de ön ısıtma işlemi uygulanan UHT içme sütlerinde 10. haftanın sonunda ortalama viskozite değeri 13.6 mPas olarak tespit edilmiştir. Kromatografik analizler sonucunda, 72°C'de ön ısıtma uygulanan UHT içme sütlerinde en hızlı parçalanmanın β -kazein A¹ fraksiyonunda olduğu ve bunu sırasıyla α_{s1} -kazein ile β -kazein A²'nin takip ettiği belirlenmiştir. Ön ısıtma işlemi 72°C'de uygulanan UHT içme sütlerinde meydana gelen jelleşmenin β -kazein A¹ ve α_{s1} -kazeinin %95'inin parçalanmasından sonra; acı tadın ise β -kazeinin yaklaşık %75'inin ve α_{s1} -kazeinin %70'inin parçalanmasından sonra olduğu tespit edilmiştir. β - ve α_{s1} -kazein orijinli polipeptitlerin jel kısmında sütün sıvı kısmına göre daha fazla miktarda bulunduğu, κ -kazein ve peyniraltı suyu proteinlerinin ise jel ve sıvı kısmında hemen hemen aynı miktarlarda olduğu saptanmıştır. κ -kazein ve peyniraltı suyu proteinlerinin jel yapısında diğer kazein fraksiyonlarına göre daha düşük miktarlarda bulunmasından dolayı jel oluşumunun temel nedeninin serbest hale geçen β -bileşiklerinin olmayabileceği bildirilmiştir [45]. Plazminin aktivitesi sonucu UHT içme sütlerinde oluşan acılaşmaya ve jelleşmeye neden olan peptitlerin tanımlanmasının amaçlandığı başka bir çalışmada ise, süte önce 74°C'de 180 saniye ön ısıtma işlemi sonrasında ise 150°C'de 0.2 saniyeden daha kısa süre UHT işlemi uygulanmıştır. UHT işlemi uygulanan sütler aseptik ambalajlanarak 14 hafta süresince 20°C'de depolanmıştır. Depolama süresince UHT içme sütlerinde 36 adet α_{s2} -kazein, 31 adet α_{s1} -kazein ve 17 adet β -kazein orijinli olmak üzere toplam 84 farklı peptit belirlenirken, 66 peptidin sadece plazmin aktivitesi sonucu olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu peptitlerin 23'ünün UHT içme sütlerinde acılaşmaya neden olabileceği ve α_{s1} -kazein ile α_{s2} -

kazein orijinli peptitlerin acı tat oluşturma potansiyellerinin β -kazein orijinli peptitlere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Çalışmada, kazein miselinin iç kısmında oransal olarak daha fazla bulunan β -kazein ile α_{s2} -kazeinin depolanmanın ilk 4 haftasında UHT içme sütlerinde yüksek oranda parçalanmasının tespiti ile plazminin kazein miseli içerisine nüfuz edebilme yeteneğine sahip olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca, plazminin etki etmek için kazein miselinin sütün serum fazı ile temas halinde olan hidrofilik bölgelerine yüksek; hidrofobik ve fosforilize bölgelerine ise daha az ilgi gösterdiği saptanmıştır. Plazminin kazein-kazein ve kazein-kalsiyum fosfat bağlarının bulunduğu bölgeleri hidrolize etmesi ile misel yapısının stabilitesinin bozulmasının ve misellerin bir araya gelmesinin UHT içme sütlerinde jelleşme nedeni olabileceği bildirilmiştir [46].

Plazmin ve Bakteri Proteinazları

Plazmin ile bakteri kaynaklı proteinazlar, UHT içme sütlerinde farklı hidroliz ürünlerinin ve jel yapısının oluşumuna yol açmaktadır. Bakteriye proteinazlar, UHT içme sütlerinde koyu kıvamlı pıhtı ve jel tabakasının oluşumuna neden olurken, plazmin etkisi ile süt yüzeyinde önce kremamsı bir tabaka oluşmakta sonrasında ise bu tabaka kalınlaşarak teleme benzeri yapıya dönüşmektedir. Plazminin neden olduğu jel yapısı kısmen parçalanmış kazein miselleri ve zayıf misel bağlantılarından oluşmaktadır. Bakteriye proteinazlarının etkisi ile oluşan jel yapısı ise plazminin neden olduğu jel yapısına göre daha sıkı bir protein ağına sahip olmakla birlikte, daha fazla kazein miseli ve misel agregatları içermektedir (Şekil 2). Plazmin ve bakteriye proteinazların kazein üzerine farklı etkileri sonucunda oluşan parçalanma ürünleri çeşitli kromatografik ve elektroforetik yöntemlerle analiz edilerek UHT içme sütlerinde jelleşmenin kaynağı tespit edilebilmektedir [13].



Şekil 2. Plazmin ve bakteriye proteinaz enzimlerinin kazeine etkisi (Anonim [48]'den uyarlanmıştır.)

UHT içme sütlerinde plazmin ve bakteriyel proteinaz olan AprX enziminin süt proteinleri üzerine gösterdiği farklı hidrolitik etkilerin araştırıldığı bir çalışmada; farklı oranlarda AprX enzimi (10, 20 ve 50 µg/mL) ilave edilen UHT içme sütleri oda sıcaklığında ve 42°C'de, plazmin (0.8, 1.6 ve 2.4 µL/mL) ilave edilen UHT içme sütleri ise oda sıcaklığında ve 37°C'de 6 hafta süresince depolanmıştır. Oda sıcaklığında depolanan, 20 µg/mL AprX enzimi ve 1.6 µL/mL plazmin içeren UHT içme sütlerinin her ikisinde de 4. haftada jel yapısının oluştuğu, artan enzim konsantrasyonu ve depolama sıcaklığı ile birlikte jel yapısının oluşması için gereken sürenin kısaldığı belirlenmiştir. AprX enziminin etkisi ile oluşan jel yapısının plazminin etkisi ile oluşan jel yapısına göre daha sert, serum kısmının ise daha az opak olduğu saptanmıştır. Enzim ilave edilmeyen UHT içme sütlerinde partikül boyutu dağılım yoğunluğunun ortalama 200 nm olduğu ve depolama sonuna kadar değişmediği, bununla birlikte depolama süresince AprX içeren UHT içme sütlerinde partikül boyutunun arttığı ve dağılım yoğunluğunun 500 nm ile 1 µm arasında olduğu belirlenmiştir. Plazmin içeren UHT içme sütlerinde ise depolamanın 3. haftasında partikül boyutu yoğunluğunun 200 nm'den küçük, 200 nm ile 1 µm arası ve 1 µm'den büyük olmak üzere üç farklı aralıkta dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan kromatografik analizler sonunda, AprX enzimi ilave edilen UHT içme sütlerinde κ-kazeinin depolama süresince tamamen hidrolize uğradığı ve AprX enziminin sırasıyla en fazla κ-, β-, α_{s1}-kazeine etki ettiği saptanmıştır. Plazmin ilave edilen UHT içme sütlerinde jel yapısının oluşmaya başlamasıyla birlikte β-kazein A¹ ve α_{s1}-kazein 9P fraksiyonlarının tamamen hidrolize olduğu ve jelleşmenin başlaması için toplam β- ve α_{s1}-kazeinin %60'ının hidrolize olması gerektiği belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada, AprX enzimi ve plazmin ilave edilen UHT içme sütlerinde jel yapısının oluşması için enzim konsantrasyonu ve depolama sıcaklığından bağımsız olarak toplam protein hidroliz derecelerinin sırasıyla yaklaşık olarak %1.3 ve %2.1 olduğu ortaya konulmuştur [47]. Yapılan başka bir çalışmada, UHT içme sütlerine 200 mL/L bakteriyel proteinaz ve 100 mg/mL plazmin eklendikten sonra 40°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Hem enzim eklenmiş UHT içme sütlerinin hem de enzim ilave edilmeyen kontrol grubu UHT içme sütlerinin inkübasyondan sonra %12'lik trikloroasetik asit (TCA) ile pH 4.6'da çözünen protein fraksiyonları RP-HPLC (Ters faz yüksek basınç sıvı kromatografisi) kullanılarak incelenmiştir. Bakteriyel proteinaz içeren UHT içme sütlerinde pH 4.6'da çözünen protein fraksiyonlarına ait kromatogramda sadece analizin ilk 20 dakikasında kolonu terk eden metabolitlerin bulunduğu; plazmin eklenen UHT içme sütlerinde ise analizin 20 ile 40. dakikaları arasında da kolonu terk eden metabolit grubunun olduğu saptanmıştır. Analizin ilk 20 dakikasında belirlenen metabolitlerin, 20 ile 40. dakikalar arasında belirlenen metabolitlere göre asitle daha iyi çözüldüğü, daha az hidrofobik özellikte ve daha küçük molekül ağırlığında olduğu belirtilmiştir. Enzim ilavesi yapılmayan kontrol grubu UHT içme sütleri ile plazmin ilave edilen UHT içme sütlerinin TCA'da çözünen protein fraksiyonlarına ait kromatogramların benzer olduğu tespit edilirken, UHT içme sütlerinde plazmin aktivitesi sonucu oluşan metabolitlerin TCA'da

çözünmediği belirtilmiştir. Bununla birlikte, bakteriyel proteinaz ilave edilen UHT içme sütlerinde TCA'da çözünen protein fraksiyonlarına ait kromatogramda analizin ilk 20 dakikasında kolonu terk eden metabolitlerin olduğu saptanmıştır. Çalışmada ayrıca 100, 500, 1000 ve 2000 mg/mL plazmin eklenen UHT içme sütlerinde floresamin yöntemiyle belirlenen TCA'da çözünen protein fraksiyonları miktarlarının sırasıyla 0.09, 0.12, 0.16 ve 5.0 mmol/L; pH 4.6'da çözünen protein fraksiyonları miktarlarının ise sırasıyla 3.4, 4.1, 5.8 ve 11.6 mmol/L olduğu tespit edilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda plazmin içeren UHT içme sütlerinde TCA'da çözünen protein fraksiyonlarının önemsenmeyecek miktarlarda olduğu; ancak yüksek konsantrasyondaki plazmin etkisi ile UHT sütlerde fazla miktarda TCA'da çözünebilir aminoasit ve küçük molekül ağırlıklı peptit üretiminin gerçekleştiği belirtilmiştir [49].

SONUÇ

Süt endüstrisinde UHT işlemi, düşük enerji tüketimine sahip olmasının yanında, sütlerin uzun süre muhafaza edilebilmesini ve ortam sıcaklığında depolanabilmesini sağladığı için diğer ısı işlem yöntemlerine göre daha fazla tercih edilmektedir. UHT içme sütleri oda sıcaklığında 6-9 ay muhafaza edilebilse de, süttün doğal enzimlerinden olan plazmin ve plazmin sistemi enzimleri ile yüksek sıcaklığa dirençli bakteri proteinazları UHT içme sütlerinde depolama süresince jelleşme sorununa yol açmaktadır. Jel oluşumu ile viskozitesi artan UHT içme sütlerinde proteoliz sonucu oluşan bileşiklerin neden olduğu acılaşıma meydana gelmekte ve sonuç olarak sütün raf ömrü kısalmaktadır. UHT içme sütlerinin raf ömrünü etkileyen diğer faktörler; yaş, laktasyon dönemi ve hastalık durumu gibi sütün elde edildiği hayvana özgü özellikler ile mevsimsel değişikliklere bağlı olarak farklılık gösteren sütün bileşimi ve mikrobiyal kalitesi, UHT işleminin değişiklikleri ve depolama sıcaklığı olarak sıralanabilmektedir. Konu ile ilgili yapılacak çalışmalarda, UHT içme sütlerinin muhafaza sürelerini uzatabilmek için söz konusu tüm faktörlerin etkisinin detaylı olarak incelenmesi ve enzimlerin neden olduğu proteolitik etkilerin engellenmesine veya kontrol altında alınmasına yönelik uygulamaların araştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Ünal, R., Besler, H.T. (2008). Beslenmede sütün önemi. Sağlık Bakanlığı Yayın No:727. Ankara.
- [2] Hodgkinson, A.J., Wallace, O.A.M., Boggs, I., Broadhurst, M., Prosser, C.G. (2018). Gastric digestion of cow and goat milk: Impact of infant and young child *in vitro* digestion conditions. *Food Chemistry*, 245, 275-281.
- [3] Claeys, W.L., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K., De Zutter, L., Huyghebaert, A., Imberechts, H., Thiange, P. (2013). Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*, 31(1), 251-262.
- [4] Muñoz, I., Gou, P., Picouet, P.A., Barlabé, A., Felipe, X. (2018). Dielectric properties of milk

- during ultra-heat treatment. *Journal of Food Engineering*, 219, 137-146.
- [5] Anonim, (2000). Türk Gıda Kodeksi Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği. T.C. Resmi Gazete. 23964 (2000/6), Ankara.
- [6] Gunnar, R., Jens, K. (2006). Extended shelf life milk-advances in technology. *International Journal of Dairy Technology*, 59(2), 85-96.
- [7] Anonim, (2018). Süt ve süt ürünleri üretimi miktarı ve değişim oranları. Türkiye İstatistik Kurumu, Ankara.
- [8] Richards, M., De Kock, H.L., Buys, E.M. (2014). Multivariate accelerated shelf-life test of low fat UHT milk. *International Dairy Journal*, 36(1), 38-45.
- [9] Urgan, M., Saatli, T.E., Türk, A., Koca, N. (2017). Isıl işlem görmüş içme sütlerinde (Pastörize, UHT ve Laktozsuz UHT Süt) hidrokümetilfurfural içeriğinin belirlenmesi. *Akademik Gıda*, 15(3), 249-255.
- [10] Richards, M., Buys, E.M., De Kock, H.L. (2016). Survival analysis, consumer perception and physico-chemical analysis of low fat UHT milk stored for different time periods. *International Dairy Journal*, 57, 56-61.
- [11] D'Incecco, P., Rosi, V., Cabassi, G., Hogenboom, J.A., Pellegrino, L. (2018). Microfiltration and ultra-high-pressure homogenization for extending the shelf-storage stability of UHT milk. *Food Research International*, 107, 477-485.
- [12] Deeth, H. (2017). High Temperature Processing of Milk and Milk Products. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 261p.
- [13] Datta, N., Deeth, H. (2001). Age gelation of UHT milk-a review. *Food and Bioprocess Technology*, 79(4), 197-210.
- [14] Wolz, M., Mersch, E., Kulozik, U. (2016). Thermal aggregation of whey proteins under shear stress. *Food Hydrocolloids*, 56, 396-404.
- [15] Loveday, S.M. (2016). β -Lactoglobulin heat denaturation: A critical assessment of kinetic modelling. *International Dairy Journal*, 52, 92-100.
- [16] Vaghela, K.D., Chaudhary, B.N., Mehta, B.M. (2018). A review on proteolysis rate in UHT milk: Its mechanism, pattern, assessment and enzymatic changes during storage. *Research & Reviews: Journal of Dairy Science and Technology*, 6(3), 1-16.
- [17] McMahon, D.J. (1996). Age-gelation of UHT milk: Changes that occur during storage, their effect on shelf life and the mechanism by which age-gelation occurs. Heat treatments and alternative methods. IDF Symposium, Vienna Austria, 315p.
- [18] Malmgren, B., Ardö, Y., Langton, M., Altskär, A., Bremer, M.G., Dejmek, P., Paulsson, M. (2017). Changes in proteins, physical stability and structure in directly heated UHT milk during storage at different temperatures. *International Dairy Journal*, 71, 60-75.
- [19] Andrews, A., Cheeseman, G. (1972). Properties of aseptically packed ultra-high-temperature milk: II. Molecular weight changes of the casein components during storage. *Journal of Dairy Research*, 39(3), 395-408.
- [20] Venkatachalam, N., McMahon, D.J., Savello, P. (1993). Role of protein and lactose interactions in the age gelation of ultra-high temperature processed concentrated skim milk. *Journal of Dairy Science*, 76(7), 1882-1894.
- [21] Chavan, R.S., Chavan, S.R., Khedkar, C.D., Jana, A.H. (2011). UHT milk processing and effect of plasmin activity on shelf life: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(5), 251-268.
- [22] Manji, B., Kakuda, Y. (1988). The role of protein denaturation, extent of proteolysis, and storage temperature on the mechanism of age gelation in a model system. *Journal of Dairy Science*, 71(6), 1455-1463.
- [23] Alves, M.P., Salgado, R.L., Eller, M.R., Dias, R.S., Oliveira de Paula, S., Fernandes de Carvalho, A. (2018). Temperature modulates the production and activity of a metalloprotease from *Pseudomonas fluorescens* 07A in milk. *Journal of Dairy Science*, 101(2), 992-999.
- [24] Samaržija, D., Zamberlin, Š., Pogačić, T. (2012). Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. *Mljekarstvo*, 62(2), 77-95.
- [25] Akan, E., Yerlikaya, O., Kınık, Ö. (2014). Psikrotrof bakterilerin çiğ süt ve süt ürünleri kalitesine etkisi. *Akademik Gıda*, 12(4), 68-78.
- [26] Xin, L., Meng, Z., Zhang, L., Cui, Y., Han, X., Yi, H. (2017). The diversity and proteolytic properties of psychrotrophic bacteria in raw cows' milk from North China. *International Dairy Journal*, 66, 34-41.
- [27] von Neubeck, M., Baur, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Kranz, B., Stressler, T., Fischer, L., Hinrichs, J., Scherer, S., Wenning, M. (2015). Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *International Journal of Food Microbiology*, 211, 57-65.
- [28] Stoeckel, M., Lidolt, M., Achberger, V., Glück, C., Krewinkel, M., Stressler, T., von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S., Fischer, L. (2016). Growth of *Pseudomonas weihenstephanensis*, *Pseudomonas proteolytica* and *Pseudomonas* sp. in raw milk: Impact of residual heat-stable enzyme activity on stability of UHT milk during shelf-life. *International Dairy Journal*, 59, 20-28.
- [29] Sørhaug, T., Stepaniak, L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 8(2), 35-41.
- [30] Matéos, A., Guyard-Nicodème, M., Baglinière, F., Jardin, J., Gaucheron, F., Dary, A., Humbert, G., Gaillard, J.L. (2015). Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk. *International Dairy Journal*, 49, 78-88.
- [31] Ertan, H., Cassel, C., Verma, A., Poljak, A., Charlton, T., Aldrich-Wright, J., Omar, S.M., Siddiqui, K.S., Cavicchioli, R. (2015). A new broad specificity alkaline metalloprotease from a *Pseudomonas* sp. isolated from refrigerated milk: Role of calcium in improving enzyme productivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 113, 1-8.
- [32] Baglinière, F., Matéos, A., Tanguy, G., Jardin, J., Briard-Bion, V., Rousseau, F., Robert, B.,

- Beaucher, E., Gaillard, J.L., Amiel, C., Humbert, G., Dary, A., Gaucheron, F. (2013). Proteolysis of ultra high temperature-treated casein micelles by AprX enzyme from *Pseudomonas fluorescens* F induces their destabilisation. *International Dairy Journal*, 31(2), 55-61.
- [33] Martins, M.L., de Araújo, E.F., Mantovani, H.C., Moraes, C.A., Vanetti, M.C.D. (2005). Detection of the apr gene in proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 102(2), 203-211.
- [34] Machado, S.G., Heyndrickx, M., De Block, J., Devreese, B., Vandenberghe, I., Vanetti, M.C.D., Van Coillie, E. (2016). Identification and characterization of a heat-resistant protease from *Serratia liquefaciens* isolated from Brazilian cold raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 222, 65-71.
- [35] Baglinière, F., Jardin, J., Gaucheron, F., De Carvalho, A.F., Vanetti, M.C.D. (2017). Proteolysis of casein micelles by heat-stable protease secreted by *Serratia liquefaciens* leads to the destabilisation of UHT milk during its storage. *International Dairy Journal*, 68, 38-45.
- [36] McMahon, D.J., Brown, R.J. (1984). Enzymic coagulation of casein micelles: A review. *Journal of Dairy Science*, 67(5), 919-929.
- [37] Bhatt, H., Cucheval, A., Coker, C., Patel, H., Carr, A., Bennett, R. (2017). Effect of micellar structure of casein and its modification on plasmin-induced hydrolysis. *International Dairy Journal*, 75, 75-82.
- [38] Aydemir, O., Dervişoğlu, M., Temiz, H. (2008). Süt alkali proteinazı plazmin. *Gıda Dergisi*, 33(5), 235-240.
- [39] Ismail, B., Nielsen, S. (2010). Invited review: plasmin protease in milk: current knowledge and relevance to dairy industry. *Journal of Dairy Science*, 93(11), 4999-5009.
- [40] Saint Denis, T., Humbert, G., Gaillard, J.L. (2001). Heat inactivation of native plasmin, plasminogen and plasminogen activators in bovine milk: A revisited study. *Le Lait*, 81(6), 715-729.
- [41] Tolkach, A., Kulozik, U. (2007). Reaction kinetic pathway of reversible and irreversible thermal denaturation of beta-lactoglobulin. *Le Lait*, 87(4-5), 301-315.
- [42] Stoeckel, M., Lidolt, M., Stressler, T., Fischer, L., Wenning, M., Hinrichs, J. (2016). Heat stability of indigenous milk plasmin and proteases from *Pseudomonas*: A challenge in the production of ultra-high temperature milk products. *International Dairy Journal*, 61, 250-261.
- [43] Burbrink, C.N., Hayes, K.D. (2006). Effect of thermal treatment on the activation of bovine plasminogen. *International Dairy Journal*, 16(6), 580-585.
- [44] Kohlmann, K., Nielsen, S., Ladisch, M. (1991). Effects of a low concentration of added plasmin on ultra-high temperature processed milk. *Journal of Dairy Science*, 74(4), 1151-1156.
- [45] Rauh, V.M., Sundgren, A., Bakman, M., Ipsen, R., Paulsson, M., Larsen, L.B., Hammershøj, M. (2014). Plasmin activity as a possible cause for age gelation in UHT milk produced by direct steam infusion. *International Dairy Journal*, 38(2), 199-207.
- [46] Rauh, V.M., Johansen, L.B., Ipsen, R., Paulsson, M., Larsen, L.B., Hammershøj, M. (2014). Plasmin activity in UHT milk: Relationship between proteolysis, age gelation, and bitterness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6852-6860.
- [47] Zhang, C., Bijl, E., Hettinga, K. (2018). Destabilization of UHT milk by protease AprX from *Pseudomonas fluorescens* and plasmin. *Food Chemistry*, 263, 127-134.
- [48] Anonim, (2018). Research Theme 6-Proteases in UHT Milk. https://www.wur.nl/upload_mm/4/0/8/d661dad0-5e6b-491d-9283-7a04047ba98b_6%20Proteases%20in%20UHT%20milk.pdf Erişim tarihi: 29.06.2018
- [49] Datta, N., Deeth, H.C. (2003). Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. *LWT-Food Science and Technology*, 36(2), 173-182.