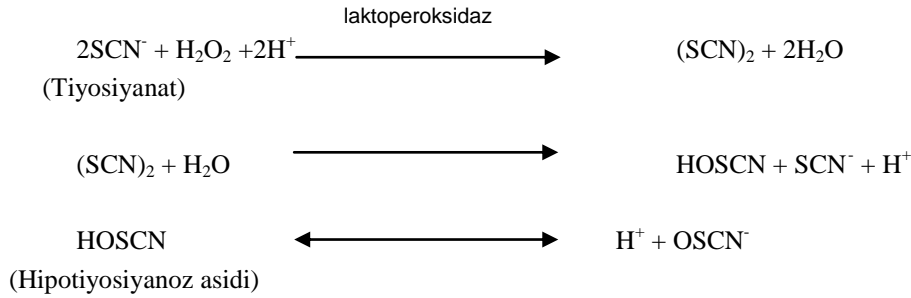
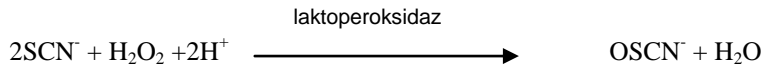


Sütün Doğal Anti-Mikrobiyel Sistemlerinin Aktivasyonu

Yaklaşık son 20 yıldır çiğ sütün korunmasında sütün doğal anti-mikrobiyel sistemlerinden yoğun olarak yararlanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan en etkin sistem laktoperoksidaz sistemidir (LP sistemi). Laktoperoksidaz sistemi, sütte doğal olarak bulunan laktoperoksidaz enzimi (E.C. 1.11.1.7; LPO, donör oksidoredüktaz) ve eşit molar konsantrasyonlarda tiyosiyanat (SCN^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) içermektedir. Laktoperoksidaz enzimi, H_2O_2 varlığında SCN^- 'yi okside etmekte ve ana oksidasyon ürünü olan hipotiyosiyanit (OSCN^-) aracılığı ile antibakteriyel etki yaratmaktadır. Bu reaksiyon sonunda insan sağlığına zarar vermeyen ancak birçok Gr (+) ve Gr (-) bakteri ile sitoplazmik enzimler üzerinde inhibisyon etkisi yaratan bazı ara ürünler de açığa çıkmaktadır. Laktoperoksidazın etki mekanizması aşağıda gösterilmektedir:



Bazı durumlarda SCN^- direkt olarak OSCN^- 'ye okside olabilmektedir.



Normal koşullarda, inek ve koyun sütleri antibakteriyel etki yaratacak düzeyde laktoperoksidaz enzimini doğal olarak içermektedir. Ancak, LP sisteminin aktive olabilmesi için gerekli olan diğer parametrelerin [tiyosiyanat (SCN^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2)] eşit molar konsantrasyonlarda sütte yer alması gerekmektedir. İnek sütü ortalama $10\text{-}15 \text{ mg l}^{-1}$ düzeyinde SCN^- içermektedir ve bu düzey çoğu zaman LP sistemi aktivasyonu için yeterli olmaktadır. Burada LP sisteminin aktivasyonu için tek sınırlayıcı faktör H_2O_2 konsantrasyonudur. Her türlü koşulda H_2O_2 'nin çiğ süte dışarıdan ilavesi bir zorunluluktur. LP sisteminin bakteriler üzerindeki inhibisyon etkisi sürekli ya da tersinir olabilmektedir. *Streptococci spp.* ve *Lactobacilli spp.* gibi birçok Gr (+) bakteri LP sistemi tarafından kısmen inhibe edilmektedir. Buna karşın LP sistemi Gr (-) bakteriler üzerinde çok daha etkilidir. LP sistemi başta *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Eschericia coli* olmak üzere birçok patojen mikroorganizma üzerinde de son derece etkin bir

inhibisyon etkisine sahiptir. LP sisteminin etkinliği depolama sıcaklığı ile ilişkilidir ve depolama sıcaklığı azaldıkça LP sisteminin etki süresi de artmaktadır (*Bkz.* Çizelge 9).

LP sisteminin aktivasyonu sonucunda yoğurdun ve peynirin inkübasyon süresi uzamaktadır. Örneđin; 20 mg kg⁻¹ düzeyinde SCN⁻ ve H₂O₂ ilave edilmiş sütlerden üretilen yoğurtlarda inkübasyon süresi 243 dakika olarak belirlenmişken, 80 mg kg⁻¹ düzeyinde SCN⁻ ve H₂O₂ ilave edilmiş sütlerden üretilen yoğurtlar 364 dakikada inkübasyon son noktasına ulaşmıştır. Ayrıca, yoğurda işlenecek LP sistemi aktive edilmiş sütlerde kalıntı H₂O₂'nin varlığı termofilik yoğurt bakterilerinin inhibisyonuna ve dolayısıyla inkübasyon ve depolama sırasında asitlik gelişiminin yavaşlamasına neden olabilmektedir. Dolayısıyla, LP sisteminin aktivasyonu için gerekli parametrelerin dikkatli seçilmesi gerekmektedir. En uygun SCN⁻ ve H₂O₂ konsantrasyonlarının 20-40 mg kg⁻¹ aralığında olduğu bildirilmektedir.

Çizelge 9. Çiğ sütün depolama sıcaklığı ile LP sisteminin aktivasyon süresi arasındaki ilişki.

Depolama Sıcaklığı (°C)	Etki Süresi (saat)
30	7-8
25	11-12
20	16-17
15	24-26

Laktoperoksidaz sisteminin üç temel bileşeni bulunmaktadır. Bunlar; laktoperoksidaz enzimi, hidrojen peroksit ve tiyosiyanattır.

Laktoperoksidaz (LPO)

Laktoperoksidaz (EC 1.11.1.7; LPO) peroksidaz-siklooksigenaz ailesine ait bir enzimdir ve inek sütünde en yaygın bulunan enzim konumundadır. İnek sütü toplam serum proteinlerinin yaklaşık %1'ini oluşturmaktadır. LPO demir (Fe⁺³) içeren hem grubuna sahip bir enzimdir. İnek sütü kökenli LPO 612 aminoasit içermektedir ve izoelektrik noktası pI=9.6'dır. Yaklaşık moleköl ağırlığı ise 78 000 Da'dır. İnek sütünde ortalama LPO konsantrasyonu 1.4 U/ml düzeyindedir. pH 4-7 aralığında aktivite göstermesine karşın en yüksek enzimatik aktivite pH 6.0 dolayında elde edilmektedir. In vitro çalışmalarda pH 3'e kadar dayanım gösterdiği de bildirilmektedir.

LPO'nun ısıya karşı direnci nispeten yüksektir. Bu nedenle, pastörizasyon etkinliğinin ölçümünde indikatör olarak da kullanılmaktadır. LPO'nun temel fonksiyonu hidrojen peroksit ile tiyosiyanat arasındaki reaksiyonu katalizlemektir ve 74 °C'de kısa süreli ısıl işlemlere karşı varlığını koruyabilmektedir. LPO'nun tamamen inaktivasyonu için > 78 °C'de 15 saniyelik ısıl

işlem uygulaması gerekmektedir. Asidik koşullarda muhtemelen yapısında yer alan demirin çözünmesine bağlı olarak ısı stabilitesinde azalma meydana gelmektedir. Riboflavin varlığında ışığa karşı direnci zayıflamaktadır. L-askorbik asit varlığında ise LPO aktivitesi durmaktadır. Laktoz, serum proteinleri, sodyum, magnezyum ve kalsiyum klorid varlığında aktivitesi stimüle edilirken, kazein varlığında aktivitesi önemli ölçüde düşmektedir.

Tiyosiyanat (SCN⁻)

Tiyosiyanatınana kaynağı hayvansal dokular ve salgılardır. Kan ve tükürük sıvısında tiyosiyanat konsantrasyonu sırasıyla, 0.1-0.3 mg/kg ve 1-27 mg/kg'dır. İnek sütlerinde tiyosiyanat konsantrasyonu besleme rejimine göre değişkenlik göstermektedir. Normal koşullarda inek sütünde tiyosiyanat konsantrasyonu 1-10 mg/kg arasında değişmektedir. İnek sütünün SCN⁻ konsantrasyonu LPO aktivitesini sağlayacak düzeyin altındadır. LPO sisteminin aktivasyonu için 15 mg/kg düzeyinde SCN⁻'ye gereksinim duyulmaktadır.

SCN⁻, lahanası, Brüksel lahanası, karnabahar, turp gibi *Brassica* (family *Cruciferae*) genusuna bağlı sebzelerde yüksek konsantrasyonlarda yer almaktadır.

Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Sütün doğal katalaz ve peroksidaz enzimlerinin H₂O₂'yi indirgeme özelliğinden dolayı inek sütünde H₂O₂ konsantrasyonu LPO sistemini aktive etmeye yeterli düzeyde değildir. Bununla birlikte, süte özellikle laktobasiller, laktokoklar ve streptokokların kontaminasyonu sonucunda H₂O₂ konsantrasyonunda kısmi bir artış meydana gelmektedir. Sütte LPO sistemini aktive etmek için gerekli H₂O₂ düzeyine ulaşabilmek amacıyla süte sodyum perkarbonat gibi H₂O₂ üreticisi bileşenlerin ilavesi de söz konusudur. Buna karşın, LPO aktivasyonu için en yaygın yöntem süte direkt H₂O₂ ilavesidir.

LAKTOFERRİN (LF)

Laktoferrin (eski adı ile laktotransferrin) demir bağlama özelliğinde bir glikoproteindir ve transferin ailesine aittir. Tek zincirli yapıda ve 203 aminoasit içeren LF meme bezlerinde sentezlenmekte ve bronşlar ile tükürük bezlerinde de yer almaktadır. Molekü ağırlığı 80 kDa dolayında olan LF güçlü bir antimikrobiyel etkiye sahiptir. Tripsin ve tripsin benzeri proteolitik

enzimler tarafından proteolize karşı dirençli protein fraksiyonudur. İnek sütünde LF konsantrasyonu 0.2 mg/ml, kolostrumdaki düzeyi ise 1 mg/ml dolayındadır. Mastitis LF konsantrasyonunda artışa neden olmaktadır. Beslenme rejimine bağlı olarak inek sütlerinde LF konsantrasyonu değişmektedir.

LF hem bakteriyostatik hem de bakterisidal etki göstermektedir. Bakterilerin önemli bir bölümü gelişim için demire gereksinim duymaktadır. LF'nin demir bağlama özelliğinden dolayı bakterilerin gelişimleri için gerekli demire erişemediklerinden gelişimleri yavaşlamakta ya da durmaktadır. LF'nin bir diğer antibakteriyel etki mekanizması ise LF'nin yüzeyinde lokalize olan katyonik grupların Gram (-) bakterilerin lipopolisakkaritleri ile direkt interaksyonu temeline dayanmaktadır. Bu interaksiyon sonucunda hücre permeabilitesini (geçirgenliğini) değişikliğe uğratarak lipopolisakkaritlerin hücreden sızmasına neden olmaktadır. Böylece, hücre bütünlüğünü kaybederek inaktivasyona uğramaktadır.

LF'nin antibakteriyel etkisi sütün Ca^{+2} ve sitrat konsantrasyonu ile yakından ilişkilidir. Genellikle, Ca^{+2} ve sitrat konsantrasyonu ile LF'nin antibakteriyel kapasitesi arasında ters ilişki bulunmaktadır. LF; *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexnerii*, *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* üzerinde güçlü antibakteriyel etki göstermektedir. LF'nin antiviral (hepatit C virüsü, parainfluenza virüsü vb..) ve antiprotozoan (*Trypanosoma cruzi*, *Tritrichomonas fetus*, *Trichomonas vaginalis*, *Toxoplasma gondii* and *Entamoeba histolytica* vb..) etkileri de bulunmaktadır.