

# Enzimlere Etkisi

- Çiğ sütteki enzimler;
  1. Doğal halde bulunan enzimler,
  2. Bakteri faaliyeti sonucu oluşan enzimler.
- Enzimlerin çoğu 30-40 °C'de arasında nispeten stabil durumdadır ve optimum bir aktiviteye sahiplerdir.
- Optimum sıcaklık derecesi aşıldığında (genellikle 40 °C ve üzeri) denatüre olmaya başlarlar ve aktivitelerini kaybederler.
- Termostabil enzimler yüksek sıcaklık derecelerine karşı dirençli enzimlerdir.

- Enzimlerin aktivitesi ve stabilitesi üzerine etkili faktörler;
  - Isıl işlem,
  - pH değeri,
  - Ortamın rutubet içeriği,
  - Ortamda mevcut enzim substratları,
  - Enzim aktivatörlerinin ve inhibitörlerin varlığı.

# Enzimlerin reaktivasyonu

- Bazı enzimler (katalaz, alkali fosfataz, peroksidaz gibi) ısı işlem uygulamasından sonra soğukta depolama sırasında yeniden aktif hale gelebilirler.
- İkincil ve üçüncül yapılarındaki bozulmalar, polimerik enzimlerin alt birimlerinin veya esansiyel kofaktörün disosiasyonu ısıtma sırasında geri dönüşümlü inaktivasyona yol açabilir.
- Ayrıca, ısıtma sırasında enzim moleküllerinden bir kısmının tamamen inaktif hale gelmek için yeterli enerjiyi absorbe etmemeleri de buna neden olabilmektedir.

Sütteki doğal enzimlerin sayısı 60'ın üzerindedir.

Doğal süt enzimlerinin aktivitelerinden bazı alanlarda yararlanılır;

- Süte uygulanan ısı işlem şiddetinin etkinliğini belirlemek,
- Mastitis ve diğer meme hastalıklarının anlaşılmasına yardımcı olmak,
- Süt ve ürünlerinin kalitesini ortaya koymak.

# Alkali fosfataz

- Alkali fosfataz ısıya karşı nispeten duyarlı, alkali pH değerinde (pH 9.8-9.9) fosforik asit monoesterlerini parçalayan bir fosfomonoesterazdır.
- Süte 63 °C/30 dakika & 72 °C/15 saniyelik ısı uygulamasıyla hem Mycobacterium tuberculosis yok olur hem de alkali fosfataz enzimi inaktif hale geçer.
- Sütün pastörizasyon kontrolünde alkali fosfataz enziminden (fosfataz testi) yararlanılmaktadır.

- Test sonucunda enzimin varlığının belirlenmesi ısıtılmanın yetersiz olduğunu ya da pastörize süte çiğ süt karıştığını ifade eder.
- Alkali fosfataz enzimi minimum pastörizasyon sıcaklığında inaktif hale geçer, 82 °C ve üzeri kısa süreli ısıtımlarda ise sütün depolanması sırasında aktif hale gelebilmektedir.
  - Alkali fosfataz reaktivasyonu, fosfataz testinde hatalı-pozitif sonuca neden olabilmektedir.

# Alkali fosfatazın reaktivasyonu üzerine etkili faktörler;

- Çiğ sütün enzim konsantrasyonu.
- Ortamda mineral maddelerin var olması.
- Ortamın pH değeri.
- Isıl işlem karakteristikleri.
- Ürünün depolama koşulları.
- Sütün oksijen içeriği.

# Asit Fosfataz

- Fosforik asit monoesterlerini asidik pH aralığında parçalayan bir fosfomonoesterazdır.
- Peynir olgunlaşmasında rol oynamaktadır.
- Termostabil bir enzimdir. HTST pastörizasyon koşullarında aktif halde bulunurken, 80 °C/2 dakika ısıtıldığında aktivitesinin ~%20'sini kaybeder.
- UHT sterilizasyon işlemiyle aktivitesini ~%80 oranında kaybeder.
- pH değeri azalıkça ısıyla denatürasyona karşı stabilitesi artar.



# Ksantin Oksidaz

- Süt yağ globül membranının başlıca bileşenidir.
- Sütte okside tat gelişimi üzerinde etkili olabilmektedir.
- Isıya karşı nispeten dayanıklıdır.
- Homojenizasyon işlemiyle YGM'ından ayrılarak mekanik işlemlere ve ısıya karşı duyarlılığı artar.
- Homojenize edilmeyen sütlerde daha stabil durumdadır.
- Depolanma sırasında ısı stabilitesi azalır.

# Katalaz

- Katalaz enzimi hidrojen peroksitin su ve oksijen parçalanmasında katalizör görevi yapar. Açığa çıkan oksijen ortamda serbest haldedir.
- Normal sütte katalaz miktarı azdır.
- Sütte katalaz miktarındaki artış somatik hücrelerin ya da kontaminant bakterilerin sayısında artıştan ileri gelir ve kötü kalitenin bir göstergesidir.
- Ağız sütlerinin, mastitis ve şap hastalığına yakalanmış hayvanların sütlerinin normal süttten ayırt edilmesinde katalaz aktivitesinden yararlanılır.
- Isıya duyarlıdır. Minimum pastörizasyon normunda (72 °C/15 saniye) inek sütündeki katalaz enziminin % 60'ı inaktif hale gelir, fakat 4 °C'de uzun süre depolama sırasında yeniden aktif hale geçer.

# Laktoperoksidaz

- Katalaz gibi hidrojen peroksitin su ve oksijene parçalar. Ancak açığa çıkan oksijen serbest değildir. Bu oksijen laktoperoksidaz tarafından tiyosiyanat ve iyot gibi kolay oksitlenebilen maddelere taşınır.
- Laktoperoksidaz enziminin ısıya karşı dayanımı yüksektir. Pastörizasyon sıcaklığında varlığını korur.
- Süt 80 °C/5 saniye-3.5 dakika arasında değişen sürelerde ısıtıldığında tamamen inaktif hale geçer.
- Bu enzimin aktivitesinden yararlanılarak pastörize sütün, daha yüksek sıcaklıklarda ısıtılan ya da kaynatılan sütlerden ayırt edilmesi mümkündür.
- Soğukta depolanma sırasında, kalıntı enzim düzeyine bağlı olarak değişen düzeylerde reaktivasyon meydana gelebilir.

# $\gamma$ -Glutamil transpeptidaz

- $\gamma$ -Glutamil transpeptidaz (GGTP enzimi),  $\gamma$ -glutamil bulunduran peptitlerin glutamil gruplarını diğ̈er aminoasitlere ya da peptitlere taşır.
- Enzim, 79 °C'de 16 saniyeden daha uzun süreyle ısıtmak suretiyle tamamen inaktif hale geçer.

# Lipoprotein lipaz

- İnek sütünün başlıca lipolitik enzimidir.
- YGM'ni zarar görmemiş sütlerde hemen hemen hiç aktivite göstermez.
- Sütün homojenizasyonu, çalkalanması, köpürtülmesi, ısıtılıp soğutulması gibi teknolojik işlemler YGM'ninin zarar görmesine neden olur ve sütte lipolizi başlatır.
- Lipolize uğrayan sütte, Lipoprotein lipaz enziminin etkisiyle tri, di ve monogliseritler parçalanır ve açığa çıkan serbest yağ asitleri sabunumsu ransid bir tat oluşturur.
- HTST pastörizasyonla lipolitik aktivite yok edilebilmektedir. Fakat YGM'ni fazlaca zarara uğramış sütlerde pastörizasyondan sonra kalıntı lipaz aktivitesi gözlenebilmektedir.
- Lipoprotein lipaz ısıya duyarlı bir enzimdir. 85 ° C'de 10 saniye süreyle uygulanan ısı işlemlerde tamamen inaktif hale gelir.

# Proteinazlar

- Sütteki başlıca doğal proteolitik enzimler alkali ve asit süt proteinazlarıdır. Bunlardan asit proteinaz ısıya nisbeten duyarlıdır, 70°C'de 10 dakika süreyle ısıtmada tamamen inaktif hale gelir.
- Normal inek sütünde plazminin %80'den fazlası inaktif proenzim (plazminojen) halinde bulunmaktadır. Plazminojenin plazmine dönüşümü ortamdaki plazmin inhibitörlerinin ve plazminojen aktivatörlerinin aktivitesine bağlıdır
- Plazminin inaktivasyonu 100°C'nin altındaki ısı işlem uygulamalarında sıcaklık derecesine bağlılık göstermekte, 110°C'nin üzerindeki uygulamalarda ise sıcaklık derecesinden ziyade bekletme süresine bağlı olarak değişmektedir.

- HTST pastörizasyon işleminde plazmin aktivitesinin %85'den fazlası korunmakta ve depolama sırasında enzimin proteolitik aktivitesinde artar.

Enzimin aktivitesindeki artışın nedenleri,

- plazmin inhibitörünün kısmen inaktif hale gelmesi
- plazminojen aktivatörünün daha aktif bir hal alarak plazminojeni plazmine dönüştürmesidir.

- Sütün 120°C'de 15 dakika süreyle klasik sterilizasyonunda plazmin tamamen inaktif hale gelmektedir. Fakat enzimin bazı UHT sterilizasyon uygulamalarına kısmen direnç gösterdiği saptanmıştır.
- Kalıntı plazmin aktivitesi, oda sıcaklığında uzun süre depolanan UHT sterilize ürünlerde proteoliz (jelleşme, pıhtılaşma, incelme), acılaşıma ve camsı görünüş kusurlarına yol açabilmektedir.

Kalıntı enzim aktivitesini azaltmak ve böylece ürünün raf ömrünü uzatmak için sütün;

- 142°C'de en az 16 saniye süreyle sterilize edilmesi
- 25-30°C yerine 2-4°C'de depolanması önerilmektedir.



# Ribonükleaz

- Bu enzim 3-fosfomononükleotidlerin ve 3-fosfooligononükleotidlerin endonükleik parçalanmasında katalizör rolü oynar.
- Sütün 62.5°C'de 30 dakika ısıtılması ribonükleaz aktivitesinde %6 oranında azalma meydana getirirken,
- 121°C'de 10 saniye ısıtılması %99.9 azalma sağlar.

# Diğer doğal enzimler

Enzim	Isıl işlem	Kalıntı enzim aktivitesi, %
Glutatiyon peroksidaz	80°C/10 dak.	0
Superoksit dismutaz	75°C/10 dak.	25
5-Nükleotidaz	60°C/30 dak.	80
	72°C/15 sn	40
	80°C/15 sn	3
N-asetil-b-glukozaminidaz	70°C/15 sn	25
	75°C/15 sn	10
	>80°C/15 sn	0
a-Mannozidaz	80°C/15 sn	93
	85°C/15 sn	24
	90°C/15 sn	0
a-L-fukozidaz	60°C/15 sn	78
	65°C/15 sn	30

# Bakteriyel enzimler

## 1. Bakteriyel proteinaz ve lipazlar

- Bu enzimler esas olarak gram-negatif psikrotrof bakteriler tarafından üretilmektedir.
- Çiğ sütlerin sağımdan sonra çiftlikte toplanıp 2-3 gün süreyle soğukta depolanması ve işletmeye geldiğinde soğukta bir gün daha bekletilmesi psikrotrof bakterilerin gelişimini teşvik eder.
- Soğukta depolanan sütlerde gram-negatif psikrotrof flora içerisinde *Pseudomonas* cinsi bakteriler baskın olmak üzere, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Acromobacter*, *Alcaligenes* ve koliform mikroorganizmalar bulunmaktadır.

- Bu bakteriler suda ve toprakta bulunmakta ve iyi temizlenmemiş ekipmanlardan süte bulaşmaktadır.
- Optimum gelişme sıcaklıkları 20-30°C arasında değişebilmekle birlikte 10°C hatta 5°C'nin altında gelişebilirler.
- Çiğ sütteki gram-negatif psikrotrof bakterilerin ısıya dirençleri genellikle zayıftır. Termizasyon (65°C/10 saniye) işlemiyle yeterince elemine edilebilirler. HTST pastörizasyon işleminde tümü yok edilir.

- *Bacillus* cinsi spor oluşturan psikrotrof bakteriler ise ısıya dirençlidir. Normal pastörizasyon koşulları *Bacillus* sporlarını yok etmemektedir.
- Sporların yok olması için 90°C'de 30 dakika ya da 110°C'de 15 saniye ısı işlem uygulanması gerekmektedir.
- Psikrotrof bakterilerin çoğu ısıya duyarlı oldukları halde bunların salgıladıkları proteinaz ve lipaz enzimlerinin bazıları pastörizasyon, UHT ve şişede sterilizasyon işlemlerine karşı çok dirençlidir, dolayısıyla aktivitelerini korurlar.

Isıya gösterdikleri duyarlık/dirence göre bakteriyel enzimler üç grupta toplanabilmektedir:

1. Isıya duyarlı olan, HTST pastörizasyon (72°C/15 saniye) işlemiyle etkili şekilde denatüre edilenler.
2. Pastörizasyon ve UHT işlemlerine dirençli ya da kısmen dirençli olanlar.
3. Düşük sıcaklıkta (50-65°C/5-30 dakika) inaktif hale geçebilen, fakat UHT işlemine (140°C/5 saniye) karşı direnç gösterenler

- UHT işlemine en dirençli proteinaz ve lipaz enzimleri çoğunlukla *Pseudomonas* türleri tarafından üretilmektedir.
- Bazı *Pseudomonas* türlerinin (*Pseudomonas fluorescens* MC 60) ürettiği enzimler ısıya karşı *Bacillus stearothermophilus* sporlarından daha fazla direnç göstermektedir.
- *Pseudomonas* türlerinin 70°C'deki termal ölüm süreleri 0.05-0.06 saniye iken, bunların ürettikleri proteinazlar aynı sıcaklıkta birkaç saat ısıtılmak suretiyle yok edilebilmektedir.

- Bakteriyel proteinaz ve lipaz enzimleri süt ve ürünlerinde tat ve yapı bozukluklarına yol açmaktadır.
- Bakteriyel proteinaz ve lipazlar gram-negatif bakteri sayısı mililitrede  $10^7$  adedi aşan sütlerde en yüksek düzeyde üretilmektedir.
- Bu tip sütlerden işlenen pastörize ve UHT sterilize sütlerde depolama sırasında kalıntı bakteriyel lipazın faaliyeti sonucu kısa zincirli serbest yağ asitlerinin düzeyi arttığından ransit ya da sabunumsu tat kusuru ortaya çıkmaktadır.
- .



- Kalıntı bakteriyel proteinaz aktivitesi de UHT sterilize sütlerin oda sıcaklığında depolanması sırasında proteolize (pıhtılaşma veya jelleşme) ve tadın acılaşmasına yol açmaktadır
- *Bacillus cereus* tarafından üretilen fosfolipaz enzimi de pastörize sütün soğukta depolanması sırasında süt yağ globül membranı üzerinde faaliyet göstererek kusurlara neden olmaktadır.

Bakteriyel proteinaz ve lipaz enzimlerinin faaliyetini ve yol açabilecekleri kusurları önlemek için dikkat edilmesi gereken noktalar;

- Mikrobiyolojik kalitesi yüksek çiğ süt kullanılmalıdır.
- Çiğ süt soğukta ( $<4^{\circ}$ ) 3 günden fazla saklanmamalı ve fabrikaya iletdikten sonra 1 gün içerisinde işlenmelidir. Bu mümkün değilse, çiğ süte termizasyon işlemi uygulanmalıdır.
- Çiğ sütün temas ettiği kaplar, ekipmanlar ve süt işleme hattı etkili bir şekilde temizlenmelidir.
- UHT sütün raf ömrünü uzatmak için, sterilizasyondan sonra süt  $55-85^{\circ}\text{C}$ 'de 3-5 dakika süreyle işleme tabi tutularak ısıya dirençli enzimlerde yeterli düzeyde inaktivasyon sağlanabilir.

## 2. Bakteriyel alkali fosfataz

- Sütteki psikrotrof bakterilerle çiğ sütün doğal mikroflorasının da fosfataz enzimleri ürettiği ve bu bakterilerin pastörizasyon işlemiyle öldürülmesine karşın enzimlerinin ısıya dirençli oldukları görülmüştür.
- Mikrobiyolojik kalitesi kötü olan, örneğin mililitresinde  $1.2 \times 10^7$  adetten daha fazla bakteri bulunduran çiğ sütte pastörizasyona dirençli alkali fosfataz aktivitesi belirlenmiştir.
- Bu durum sütün pastörizasyon kontrolünde yararlanılan fosfataz testinin sonucunu etkileyerek yanlış bir değerlendirmeye yol açabilmesi açısından önem taşımaktadır.
- Çok hassas florimetrik ölçüm yöntemleri ile doğal ve bakteriyel alkali fosfatazlar birbirinden ayırte dilebilir.