

Sütün Rennet İle Pıhtılaşma Süreci

Ar. Gör. Uz. Yaşar Kemal ERDEM

*Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü — Beytepe - ANKARA***1. GİRİŞ**

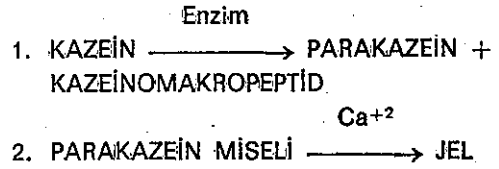
Bazı proteolitik enzimlerin sütü pıhtılaştırma yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Bu enzimler arasında tecimsel anlamda en yaygın kullanılan preparat rennettir. Rennet preparatı içerisinde baskın olarak bulunan enzim kimozin enzimidir (renin, E. C. 3. 4. 23. 4.). Kimozin bir endopeptidazdır, moleküler ağırlığı 30.700 dalton ve izoelektrik nokta pH'si 4,6-4,7'dir. Sığır pepsini de (E.C.3.4.23.1) kimozine çok yakın bir etkinliğe sahiptir. Ancak farklı olarak immunoglobulinleri de hidrolize edebilmektedir. Sütün enzimatik pıhtılaştırılmasında kimozinin kapp-kazein üzerindeki özgül proteolitik etkinliğinden yararlanılmaktadır.

Sütün pıhtıya ve peynire dönüştürülmesinde yer alan asal bileşeni kazein'dir. Kazein; submiseller olarak anılan ve birkaç farklı fraksiyonun oluşturduğu alt-birimlerin hidrofobik bağlarla ve tuz köprüleri ile birarada tutulmasıyla oluşturulmuş miseller halinde bulunan kolloidal partiküllerdir. Misellerin hidrofilik dış katmanını kapp-kazein içeren submiseller oluşturmaktadır. Kapp-kazeinin kazeinomakropeptid olarak anılan, karbonhidrat içeren C-terminali, miselden seruma doğru «saç» benzeri çıkıntılar görünümünde bulunmaktadır. Bu yapıya bağlı olarak ortaya çıkan elektrostatik ve sterik itmeyle ve katkıda bulunduğu yüksek hacimsellik ile kazein miselinin kolloidal kararlılığını koruyucu bir ajan görevini üstlenmiştir.

Rennetin etkinliği miselleri anılan «saç» çıkıntılarının çoğunu oluşturan (sütün soğutulması sonrasında beta-kazein de aynı yapıyı sergiler) kazeinomakropeptidin yapıdan uzaklaştırılması şeklinde ortaya çıkmaktadır. Buna bağlı olarak sterik ve elektrostatik itme ile hidrodinamik hacimsellik azalır. Bu etkileşim sonucu ortaya çıkan para-kazein miselleri, asit süt jeli eldesinde olduğu gibi beta-kazeini belirgin biçimde yitirmez. Sıcaklığın azalması ile pH'ya karşı bağımlılık göstermeksizin, para-

kazein misellerinin hacimselliği artar (WALSTRA ve JENNES, 1984)

Bilindiği gibi sütün rennet ile indüklenen pıhtılaştırılması (Rennetlenmesi) iki tepkimeyi içermektedir; pıhtılaştırıcı enzim tarafından (kimozin, pepsin, vb) kapp-kazeinin bölünmesi ve kolloidal kararlılığını yitirmiş olan para-kazein misellerinin flokulasyonu. Özetle,



Enzimatik aşama olarak anılan birinci aşamada misellerin diffüzyon hızı enzim molekülü ile karşılaştırıldığında ihmal edilebilir düzeyde olduğu için 1. dereceden kinetiklere uymaktadır. Parakazein misellerinin flokulasyonunun gerçekleştiği ikinci aşamada ise Smoluchowski kinetikleri açıklayıcı olmaktadır. Anılan bu kombine tepkimenin başlangıç aşamasına ilişkin kinetik kuramlar PAYENS (1979), HOOYDONK ve WALSTRA (1987 a ve 1987 b) tarafından açıklanmıştır. Konuya ilişkin tartışmalar halen güncelliğini korumaktadır. (Ayrıntılı bilgi için bkz. BĪJK ve WALSTRA, 1986; GERVAIS ve CERF, 1983; HOOYDONK ve BERG, 1982; HOOYDONK, OLLEMAN ve HAGEDOORN, 1984; HOOYDONK, HAGEDOORN ve BOERRIGTER, 1986 a; 1976 b; HOOYDONK ve WALSTRA, 1987 a ve 1987 b; PAYENS, 1984; PAYENS, 1987; PAYENS, 1989; VLIET ve WALSTRA, 1985).

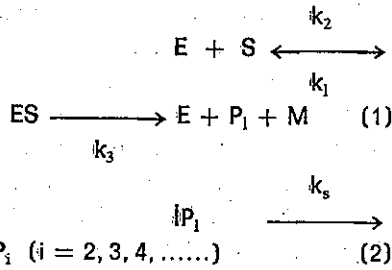
2. RENNETLE PIHTILAŞMANIN ENZİMATİK AŞAMASI

Kimozin, en az diğer endopeptidazlar kadar iyi biçimde, özgül olarak kapp-kazeinin 105-106. kalıntıları (Phe-Met) arasındaki bağı parçalamaktadır. Bu özgül etkinlik sonucu kapp-kazeinin en az % 95'i bölünmektedir. Görece hızlı gerçekleşen bu tepkimenin pH 6,7 ve 30°C koşullarındaki sütte yinleme düzeyi (turn-over) 100 s⁻¹ kadardır.

Tepkime sırasında olasılıkla kappa-kazeinin peptid zincirinin pozitif yüklü bölgesi, negatif yüklü enzim molekülünün hızlı ve kolay bir biçimde bağlanmasını üstlenmektedir. Bu tepkime için $Q_{10} \approx 3$ dolayındadır. Tepkime hızı (düzeyi) pH 6,6' yakınında H^+ iyonu etkinliği ile orantılıdır, Ca^{+2} iyonundan etkilenmez ancak belirli bir iyonik dirence gerek gösterir.

Anılan tepkime sonucu kappa-kazein, parakappa-kazein ve bir kazeinomakropeptide ayrılır. Her iki polipeptid de farklı özelliklere sahiptir. Parakappa-kazein, süt serumunda ve ayrıca Ca^{+2} bulunmaması durumunda tutulabilir. Aynı koşullarda kazeinomakropeptid (serum proteozu olarak da anılır) üst düzeyde çözünürdür ve topaklaşmaz, uzun bir konformasyon sergileyerek serumda yer alır.

Parakappa-kazein oluşum süreci aşağıdaki denklemler ile açıklanabilir :



Burada E : enzim, S : substrat, M : makropeptid, P_1 : topaklaşmamış parakappa-kazein, P_i : topaklaşan parakappa-kazeini sembolize etmektedir. (1) denkleminin oluşum hızı incelenecek olursa bunun, Michealis - Menten eşitliği ile açıklanabileceği görülür.

Sütte pıhtılaştırıcı enzimlerin etkinliği çoğunlukla çözünür olan protein azotunun niceliğinin saptanmasıyla izlenir. Sütteki toplam azotun % 3,8 kadarını kapsayan çözünür peptidler görece hızlı bir oluşum izlerler, bu birincil proteoliz kazeinomakro-peptid ayrılması ile karşımıza çıkar. Ayrıca pH ve enzim etkinliğine bağlı olarak bir ikincil proteolizin de oluşumu söz konusudur.

3. PARAKAZEİN MİSELLERİNİN FLOKULASYONU

Flokulasyon için gereken aktivasyon serbest enerjisi önemli ölçüde sterik ve elektros-tatik itmeye bağlıdır. «Saç» katmanının tamamı

uzaklaştırıldıktan sonra flokulasyon, ölçülebilir bir düzeye gelmektedir. Parakappa-kazein, kappa-kazeinin koruyucu niteliğini yitirmiştir. Sodyumparakazeinat pH 6,7'de mM Ca^{+2} aktivitesinde çökelmektedir (sütteki Ca^{+2} ve Mg^{+2} aktivitesi 2 mM'un altındadır) ve flokulasyon hızı büyük ölçüde sıcaklığa bağlıdır. Flokulasyon hızı, sıcaklık düştükçe aşamalı olarak azalır ve $15^\circ C$ 'de olasılıkla sıfıra iner. Bu sıcaklık bağımlılığı, soğutma sonucu misel yüzeyinden seruma doğru çıkan beta-kazein zincirlerinin sterik itmesinden kaynaklanabilir. Ancak $30^\circ C$ 'da elde edilen bir jel $5^\circ C$ 'a soğutma ile yeniden çözünür bir karakter kazanmaz, yani bu etkileşim geri dönüşümsüzdür.

Parakazein misellerini birarada tutan van der Waals çekmelerinin ötesinde tuz köprüleri ve görece az niceliklerde de olsa hidrofobik bağlanmalardır (parakazein miselleri de görünür bir hidrofobik yapı sergiler). Flokulasyon hızı Ca^{+2} aktivitesi ve koloidal kalsiyum-fosfat içeriğinin artmasıyla da artar. Flokulasyon düzeyi büyük bir pH bağımlılığı göstermez (sabit Ca^{+2} aktivitesinde). Ancak pH 5,0'in altında bu görüngü yukarıdaki saptamadan biraz sapmaktadır. Örneğin $5^\circ C$ 'da bile pıhtılaşma ortaya çıkabilmektedir (ROEFS, 1987). Oysa rennetlenmiş süt pH 4,6'da $5^\circ C$ 'da pıhtılaşmamaktadır.

Partikül boyutlarının küçük olması flokulasyonu hem bir presi-pitat hem de bir jel sonucuna götürmektedir. Mikroskobik olarak önce düzensiz bir oluşum gözlenmekte, ancak ortaya çıkan lif benzeri agregatlar birbirlerine tutunarak sürekli bir ağ oluşturmaktadırlar (WALSTRA ve JENNES, 1984). Eğer bu flokulasyon engellenmeden ilerlerse ve partiküllerin hacim fraksiyonu küçükse oldukça geniş porlu, sürekli bir ağ oluşur.

Flokulasyon hızını etkileyen diğer etmenleri özetleyecek olursak: (1) kappa-kazein fraksiyonunun bölünmesi hızı etkiler. Diğer koşullar aynı kalmak üzere, kappa-kazein oranı yüksek olan sütler yavaş flokule olur. (2) Sıcaklık bağımlılığı oldukça güçlüdür. $Q_{10} = 30$, $Q_1 = 1,4$. Flokulasyon için gereken aktivasyon enerjisi sıcaklığın azalması ile güçlü bir biçimde artmaktadır. (beta-kazein zincirlerinin

seruma açılması, van der Waals etkileşimlerinin azalması, misellerin hacim fraksiyonunun artması vb. olası nedenlerle). (3) pH'nın doğrudan bir etkiye sahip olmadığı bildirilmesine karşın (4) ve (5) nci etmenler üzerinde etkili olduğu için gözönüne alınması gerekir. (4) Ca^{+2} aktivitesi arttırılmazsa flokulasyon ortaya çıkmamaktadır. (6) ikinci dereceden tepkime kinetikleri izlediği kabul edilen flokulasyon tepkimesinin hızı bu bağlamda kazein derişiminin artması ile artacaktır.

Flokulasyon kinetiklerinin ikinci dereceden tepkime kinetikleri izlemesi bu süreçte bir lag fazının varlığını da beraberinde getirecektir. Lag fazının uzunluğu rennet derişimi ile ters orantılıdır. Ancak burada algılanan kararlılık (constancy) kappa-kazeinin önemli bir kısmının -misellerin kuagüle olabilmesi için -bölünmesi gerektiğini ortaya koymaktadır (VLİET ve WALSTRA, 1985). Bu saptama kazein misellerinin binlerce kappa-kazein molekülünce kararlı kılındığı yaklaşımı ile uyumludur ve proteolizin boyutu ile yalnızca bir aşamaya kadar değişir. Ancak dış katmanın (kappa-kazeinin kazeinomakropeptid kısmı) tamamen ayrılmış misellerin sahip olduğu yüksek flokulasyon hızının enzimin olduğu kadar miselin de derişimine bağımlı olmadığı öne sürülmektedir (PAYENS, 1982).

Pıhtılaşma (rennetleme) süresi, yani bir jel ya da gözle görünür agregatların oluşması için gereken süre, yukarıda anılan her iki tepkimenin gerçekleştiği zaman aralıklarının toplamıdır. Enzimatik tepkime, kappa-kazeinin bölünme süresi ile açıklandığında, flokulasyon süresi önemsiz olduğu için, olaya büyük ölçüde hakim olduğu öne sürülmektedir (WALSTRA ve JENNES, 1984). Ancak bu her zaman geçerli değildir, özellikle de düşük sıcaklıklarda. Örneğin 4°C'da pıhtılaşma bir hafta sürerken enzimatik etkinlik, üç saat gibi bir zaman aralığında saptanabilir boyuta ulaşmaktadır. Bu farklılık anılan iki tepkimenin, birbirinden ayrıldığını anlamamıza da katkıda bulunmaktadır. Eğer enzimin 5°C'da çalışmasına olanak sağlayabilirsek ve hemen ardından sıcaklığı 30°C'a hızlı bir ısıtma ile çıkarırsak, bir dakika içerisinde çok hızlı bir pıhtılaşma gözleyebiliriz. Pıhtılaşma süresini (t_R) Storch-Segelcke ku-

ralı ile tanımlayacak olursak - t_R 'nin rennet derişimi (c) ile ters orantılı olduğu öne sürülmektedir:

$$t_R = \frac{K}{C + t_0} \quad (3)$$

olduğu görülecektir. Burada t_0 , 20 saniye olarak kabul edilir. Ters orantı sahibi K ise sütlerin hemen çoğunda 2 gibi bir faktördür. Burada tür, mevsim, vb. etmenlerin de etkisi söz konusu olacaktır. Eğer $CaCl_2$ eklenmesi söz konusu ise t_R 'de görece az değişim olacaktır.

4. JEL OLUŞUMU VE SİNERESİS

Flokule olan (topaklaşan) parakazein miselleri önce şekilsiz ve uzamış yapıda küçük agregatlar oluştururlar. Bu agregatlar sonra birkaç mikrometre genişliğinde porlara sahip bir ağ yapıya organize olurlar. Yağ globüllerinin varlığında porlar daha geniş bir yapı kazanırlar ancak burada globüller ağ içinde tutunmuşlardır, ağı yapısal bir parçası şeklinde algılanmamaları gerekir. Jelleşen süt içerisinde sürekli bir ağ oluşumu söz konusudur ve bu ağ bir jel ya da yaygın adıyla pıhtı halini alır. Jel, gittikçe daha katı bir karakter kazanır ve bu kappa-kazeinin hemen tamamı bölünmüş olmasına karşın kazein miselleri arasında görece çok sayıda oluşması ile açıklanabilir. Jel ağının oluşmasından sonra misellerin bu bağlanmalar ile daha sıkı biçimde toplanması olasıdır. Bu oluşum ile içsel kapillar basıncın artması sonucu ağ içerisinde tutulan sıvı dışarı çıkarılır, bu olay «sineresis» olarak anılır. Normal koşullar altında pıhtının sineresis eğilimi azdır. Eğer jel geometrik olarak sınırlanmışsa sineresis olası değildir. Pıhtı sıkılaşmasının sıvı üzerindeki etkisi sonucu ortaya çıkan endojen sineresis yalnızca 1 Pa (0,1 mm H_2O) düzeyindedir. Büzülme (sıkılaşma) eğilimi, ağı pıhtı içinde, serumda ortaya çıkan bu endojen sineresis basıncı ile (P^s) tanımlanmaktadır. P^s , önce ağ oluşumu nedeniyle artar ancak giderek azalır ve 24 saat sonra en azı iner (DİJK ve WALSTRA, 1986). Sineresis çoğu zaman pıhtıya dışarıdan basınç uygulanması ve/veya pıhtının deforme edilmesi ile sağlanmaktadır. Bu süreçte kimi bağlar kırıl-

makta ve daha sonra görece kolay biçimde yeni bağlar kurulmaktadır. Cheddarlama ve karıştırma işlemleri ile ortaya çıkan çok küçük bir basınç gradyanı bile sineresisi belirgin olarak arttırabilmektedir. Ağ yapıda yer alan serumun, jel porları içerisinde akışı söz konusu olacaktır. Büyük porlu bir yapıda, sıvının daha dar ve kısa bir yol izlemesi nedeniyle sineresise karşı bir direnç ortaya çıkaracaktır. Bu nedenle pıhtının işlenmesi sırasında (peynir yapımında) pıhtı çoğu zaman küçük parçalara bölünmektedir. Jele mekanik bir etki uygulanmaması ve ağın geometrik olarak sınırlandırılması yalnızca mikrosineresis olarak anılan olguyu gündeme getirir. Bu süreçte ortalama genişliği görece büyük porların oluşumuna yol açan yoğun bölgelerden, az yoğun bölgelere doğru bir çeşit açılmadır (segregation) ve geçirgenlikte zamanla ortaya çıkan artış ile birlikte gelişir (WALSTRA, DİJK ve GEURTS, 1985).

Pıhtının nem içeriği yeterince düşük bir düzeye ulaştıktan sonra pıhtı granüllerinin hep birlikte sediment oluşturma eğilimi kazandıkları görülür. Nem içeriğinin azalması yine sürmektedir. Çünkü sedimentasyona uğrayan pıhtı katmanın pıhtı ile serum arasındaki yoğunluk farkından ve uygulanan mekanik kuvvetten kaynaklanan bir basınç gradyanı söz konusudur.

Pıhtıdan ve bununla uyumlu olarak telemede yukarıda sözü edilenlerin yanısıra başkaca değişimler de ortaya çıkar. Starter organizmalar tarafından pH'nın düşmesine yol açacak şekilde asit üretimi söz konusudur. Bu, birkaç değişimi de beraberinde getirir. (1) koloidal kalsiyum fosfat çözelti fazına geçer ve Ca^{+2} aktivitesi artar. Bu değişim başlangıçta önemli düzeyde değildir ancak pH 5,8'in altında belirgindir (PAYENS, 1979). (2) Bu daha düşük peynir verimini (her kg süt için kg ku-

rumadde) ve daha düşük rennetleme sonu pH'yı beraberinde getirir, çünkü tamponlayıcı öğeler artık yitirilmiştir. (3) Düşük koloidal kalsiyum fosfat içeriğine bağlı olarak peynirde görece gevrek (shorter) konsistansı gelişir ve bu ise eğer starter, CO_2 üretiyorsa gaz oluşumundan çok yarık oluşumu riskini artırır. (4) Düşük pH'ya bağlı olarak sineresis hızı büyük ölçüde artar (WALSTRA, DİJK ve GEURTS, 1985) ve ayrıca ulaşılan son nem içeriği de misellerin hacimselliği azaldığı için düşebilir (WALSTRA, DİJK ve GEURTS, 1985). (5) Düşün pH'ya bağlı olarak peynirde alıkonan rennet niceliği belirgin biçimde artar ve buna bağlı olarak peynirin reolojik özelliklerinde değişimler ortaya çıkar.

Son olarak sineresis düzeyini etkileyen etmenleri sıralayacak olursak: (1) pıhtı parçalarının boyutları, başlangıçtaki sineresis düzeyi çoğunlukla pıhtı parçalarının özgül yüzey alanı ile orantılıdır. (2) Mekanik basınç gradyanı. (3) Miselin kalsiyum fosfat içeriği, pıhtıya sertlik kazandırması olası nedeniyle sineresisi azaltıcı bir etmendir. (4) pH, pH düşürüldüğünde kalsiyum fosfat çözünür duruma geçer ve kazein daha sıkı bir konformasyon kazanır, buna bağlı olarak sineresis artar. Ancak pH 4,6 dolayındaki bir rennetleme öncesi asitlikle elde edilen jelin sineresis gösterme olasılığı düşüktür. (5) Ca^{+2} eklenmesi düşük nicelikte ekleme çoğu zaman sineresisi arttırır ancak fazla katmanın olumsuz etkisi söz konusudur. (6) Sıcaklık, çok güçlü bir etkiye sahiptir ve $18^{\circ}C$ 'in altında sineresis fiilen durur. Anımsanacak olursa bu sıcaklıkta parakazein misellerinin de flokulasyon düzeyi çok düşmektedir. (7) Pazif boşluk oluşturucular olarak anılan yağ globülleri de büzülmeyi engelledikleri için sineresis üzerinde dolaylı bir etkiye sahiptirler.

KAYNAKLAR

- DİJK, H.-J.M. van, P. WALSTRA. 1986. Syneresis of curd 2. one-dimensional syneresis of rennet curd in constant conditions. Neth. Milk Dairy J. 40: 3-30.
- GERVAIS, A., O. CERF. 1983. Comparison of two models for fitting rennet induced milk kinetics. J. Texture Studies, 14: 47-53.

- HOOYDONK, A.C.M. van, G. van den BERG. 1982 a. Effect of temperature history of cheese milk on renneting time. Proc. of XX1. Int. Dairy Cong. Moscow. Vol. 1, Book 1, 539.

- HOOYDONK, A.C.M. van, G. van den BERG. 1982 b. Control and determination of the curd-setting during cheese making. IDF - document (basilmamis).
- HOOYDONK, A.C.M. van, C. OLLEMAN, H.G. HAGEDOORN. 1984. Kinetics of the Chymosin-catalysed proteolysis of κ -casein in milk. *Neth. Milk Dairy J.* 38: 207 - 222.
- HOOYDONK, A.C.M. van, I.J. BOERRIGTER, H.G. HAGEDOORN. 1986 a. pH-induced physico-chemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. 1. Effect of acidification on physico-chemical properties. *Neth. Milk Dairy J.* 40: 281 - 296.
- HOOYDONK, A.C.M. van, I.J. BOERRIGTER, H.G. HAGEDOORN. 1986 b. 2. effect of pH on renneting of milk. 40: 297 - 313.
- HOOYDONK, A.C.M. van, P. WALSTRA. 1987 a. Interpretation of the kinetics of the renneting reaction in milk. *Neth. Milk Dairy J.* 41: 19 - 47.
- HOOYDONK, A.C.M. van, P. WALSTRA. 1987 b. a consistent model of the clotting of milk by rennet; a reply to a comment. *Neth. Milk Dairy J.* 41: 293 - 295.
- LEHNINGER, A.L. 1975. *Biochemistry*. 1st ed. Worth Inc. New York, 530 sayfa.
- PAYENS, T.A.J. 1979. Casein micelles: the colloid-chemical approach. *J. Dairy Res.* 46: 291 - 306.
- PAYENS, T.A.J. 1982. Stable and unstable casein micelles. *J. Dairy Sci.* 65: 1863 - 1873.
- BAYENS, T.A.J. 1984. On the gel point in the enzyme-triggered clotting of casein micelles; a comment. *Neth. Milk Dairy J.* 38: 195 - 197.
- PAYENS, T.A.J. 1989. The enzyme-triggered coagulation of casein micelles. *Adv. in Colloid and Interface Sci.* 30: 31 - 69.
- ROEFS, S.P.F.M. 1987. Structure of acid casein gels. Asturyof of gels formed after acidification in the cold. *Neth. Milk Dairy J.* 41: 99 - 101.
- SCHMIDT, D.G. Proteins «in, *Developments in Dairy Chemistry*, Ed. P. F. FOX» Applied Sci. Publ., London, 61 - 86.
- VLIET, T, van, P. WALSTRA. 1985. Note on the shear modulus of rennetinduced milk gels. *Neth. Milk Dairy J.* 39: 115 - 118.
- WALSTRA, P., R. JENNES. 1984. *Dairy Chemistry and Physics*, Wiley and Sons Inc, New York.
- WALSTRA, P., H.J.M. van DIJK, T.J. GEURTS. 1985. The syneresis of curd. 1 General Considerations and a literature review. *Neth. Milk Dairy J.* 39: 209 - 246.
- WALSTRA, P., T. van VLIET. 1986. The physical chemistry of curd making. *Neth. Milk Dairy J.* 40: 241 - 253.