

YOĞURT ÜRETİMİ ve DEPOLAMA SIRASINDA ORGANİK ASİTLERİN BELİRLENMESİ

DETERMINATION OF ORGANIC ACIDS DURING PRODUCTION AND STORAGE OF YOGHURT

A.Sibel AKALIN, Özer KINIK, Sıddık GÖNÇ
Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü, İZMİR

ÖZET: Laboratuvar koşullarında yoğurt üretimi esnasında inkübasyonun 1., 2., ve 3. saatleri ile yoğurdun 4°C'de 14 gün boyunca depolanması sırasında örneklerdeki organik asitler HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) ile tespit edilmiştir. Ayrıca yoğurt örneklerinin asitlik ve pH değerleri ile depolama sırasındaki duyuşsal özellikleri belirlenmiştir. Yoğurt yapımı ve muhafazası sırasında pH'nın düştüğü ve bu arada organik asitlerden laktik, asetik ve propionik asitlerin arttığı, orotik asidin ise azaldığı belirlenmiştir. Pürivik asit inkübasyonun 3. saatinde maksimum konsantrasyona ulaşmış ve depolama sırasında düşmüştür. İnkübasyon sırasında azalan ürik ve sitrik asit miktarının ise depolama sırasında önemli bir değişim göstermediği tespit edilmiştir. Depolama boyunca asitliğin artmasına paralel olarak yoğurdun tat ve koku değerlerinin azaldığı görülmüştür.

ABSTRACT: The organic acids found in yogurt samples manufactured under laboratory-scale conditions were determined by HPLC during the 1., 2. and 3. hours of fermentation and storage at 4°C. In addition, acidity, pH and sensory properties of yogurts during storage were examined. It was found that the acidity increased and pH decreased while lactic, acetic and propionic acids increased and orotic acid decreased because of the utilization by yogurt starter bacteria during fermentation and storage. Pyruvic acid showed a maximum concentration in the 3th h of fermentation and then decreased during the storage. It was found that the concentrations of uric and citric acids decreasing in the fermentation showed no significant change during the storage.

GİRİŞ

Süt ve ürünlerinde bulunan ve bir kısmı da hayvanın biyometabolizması sonucunda ortaya çıkan organik asitlerin meydana gelmesinde esas kaynak yağ, protein ve laktozdur. Diğer bir deyişle, mikrobiyal aktivite ile lipoliz, proteoliz ve glikoliz sonucu oluşan primer ürünlerden çok değişik yapıda serbest organik asitler meydana gelmektedir (ÖZTEK, 1985). Süt ürünlerinde organik asitlerin kantitatif tespiti gerek beslenme açısından gerekse bakteriyel aktivite ve aroma göstergesi olarak önem taşımaktadır (NAVDER ve ark. 1990). Özellikle fermente süt ürünleri için bu asitler ürünün duyuşsal özellikleri yönünden ve doğal koruyucu maddeler olarak olumlu etki göstermektedir. Örneğin yoğurt teknolojisinde laktik asit fermentasyonu üretimin esasını oluşturmakta ve ürünlerdeki laktik asit miktarı süte göre %60 daha fazla artış göstermektedir. Ayrıca yoğurt yapımı sırasında ve yoğurt bakterilerinin kullanımı sonucu orotik asidin azaldığı, asetik, propionik, formik asitlerin arttığı belirtilmiştir (ANONYMOUS, 1981).

Diğer yandan son yıllarda yoğurt ve değişik fermente süt ürünleri tüketiminde görülen anlamlı ve büyük artışlar onların besleyici ve sağlığa elverişli gıdalar olduğu imajına bağlanmaktadır. Örneğin bazı organik asitlerin belirli hastalıkları tedavi edici rol oynadıkları, bu arada laktik asidin yoğurda reenfekte olan birtakım patojen bakterilerin inhibisyonunda etkili olduğu belirtilmektedir (RUBIN ve ark. 1982). Orotik asit laktobasiller için bir gelişme faktörüdür. Ayrıca bu asidin insanlarda yüksek kolesterolün düşürülmesinde etkili olduğu da saptanmıştır (MC CARTHY ve ark., 1984; SUZUKI ve ark., 1986; WARD ve ark., 1987).

Organik asitlerin tespitinde özellikle son yıllarda sıklıkla kullanılan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) örnek hazırlama kolaylığı ve birçok asidin aynı zamanda belirlenmesi gibi avantajlara sahiptir. Ayrıca sonucun kısa sürede alınması, mükemmel lineer ilişki ve yüksek geri kazanım (recovery) oranı gibi nedenlerden dolayı yöntemin organik asit analizi için çok uygun olduğu bildirilmiştir (BEVILACQUA ve COLIFANO, 1989; BOUZAS ve ark., 1991; FERNANDEZ-GARCIA ve MAC GREGOR, 1994).

Bu araştırmanın amacı, yoğurta bulunan ve bakteriyel aktivite, aroma göstergesi ve koruyucu madde olarak rol oynayan, ayrıca beslenme ve sağlık yönünden önem taşıyan organik asitleri tespit ederek fermentasyon ve depolamanın organik asit miktarlarına etkisini belirlemektir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Yoğurt üretiminde kullanılan çiğ inek sütleri E.Ü. Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Sığırcılık İşletmesi'nden, süttozu Pınar Süt A.Ş.'den, yoğurt kültürü E.Ü. Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü'nden temin edilmiştir.

Yöntem

Yoğurt Üretimi

Çiğ inek sütünün kuru maddesi süttozu katılarak %15'e ayarlandıktan sonra 95°C'de 15 dak. ısıtılmış ve 43°C'ye soğutulmuş %3 sıvı yoğurt kültürü (%50-%50 *Streptococcus thermophilus*-*Lactobacillus bulgaricus*) ile aşılanmıştır. 200 ml'lik ağzı kapaklı plastik kaplara paylaştırılan örnekler aynı sıcaklıkta yaklaşık 3 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. pH 4.7'de inkübasyona son verilmiş ve yoğurt örnekleri 30 dak. oda sıcaklığında bekletilerek pasif soğutulduktan sonra 4°C'de aktif olarak soğutulmuş ve 14 günlük depolama süresi boyunca bu sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. Çalışma 3 tekrür halinde gerçekleştirilmiştir.

Analiz Yöntemleri

Yoğurda işlenecek sütte ve inkübasyonun 1., 2. ve 3. saatleri ile depolamanın 1., 7. ve 14. günlerinde alınan örneklerinde organik asit analizi (BEVILACQUA ve CALIFANO, 1989), pH (SS-3 model pH-metre ile) ve asitlik (YÖNEY, 1973) tayinleri yapılmıştır. Ayrıca örnekler depolama süresince duyuşal özellikleri yönünden değerlendirilmiştir. Bu amaçla farklılık testlerinden puanlama metodu kullanılmış ve American Dairy Science (ADSA) Süt ve Mamulleri Değerlendirme Komitesi'nden temin edilen puanlama formundan yararlanılmıştır.

Organik asit analizi

BEVILACQUA ve CALIFANO (1989) tarafından belirtilen yöntem esas alınmış ve aletin çalışma koşulları (taşıyıcı faz bileşimi, pH, akış hızı ve dalga boyu) en uygun sonucu alıncaya kadar denenmiştir. Analizlerde LC-900 seri nolu Jasco model bir sıvı kromatografi cihazı, 20 µl örnek hacimli enjektör ve JASCO UV-980 model dedektör kullanılmıştır. Kolon olarak ters fazlı Machery Nagel C 18 (120x5 mm)'den yararlanılmış, dalga boyu organik asitlerin en iyi cevap verdiği 214 nm'ye ayarlanmıştır. Taşıyıcı faz olarak sulu %0.5 (NH₄)₂HPO₄-%0.4 asetonitril (pH 2.24, H₃PO₄ ile) kullanılmış ve akış hızı piklerin en iyi ayrıştığı 0.3 ml/dak.'ya ayarlanmıştır. Taşıyıcı fazın hazırlanmasında analitik saflıktaki (NH₄)₂HPO₄ ve HPLC saflığındaki asetonitril bidestile suda çözündürülmüş, H₃PO₄ ile pH'sı ayarlanarak vakum altında degaze işlemine tabi tutulmuştur. HPLC kalitesindeki organik asit standartları (formik, asetik, pürivik, propionik, ürik, orotik, sitrik, laktik ve bütirik) Sigma'dan temin edilmiştir (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Hazırlanan sulu organik asit standart çözeltileri ve taşıyıcı faz kullanılmadan önce 0.45 µm membran filtreden geçirilmiştir.

Organik asitlerin süt ve ürünlerinde bulunabilecek geniş bir konsantrasyon alanında 5'er adet sulu çözeltileri hazırlanarak alete 10'ar µl enjekte edilmiş ve ortaya çıkan pik alanları tespit edilmiştir. Miktar belirleme dış standart metoduna göre yapılmış ve organik asitlerin herbiri için lineer regresyon ile standart eğriler belirlenmiştir. Önce kromatografide alıkonma süreleri tespit edilen organik asitlerin standart çözeltileri yoğurda işlenecek süt ve yoğurt örneklerine ayrı ayrı ilave edilerek piklerin identifikasyonu doğrulanmıştır.

Örnek hazırlama

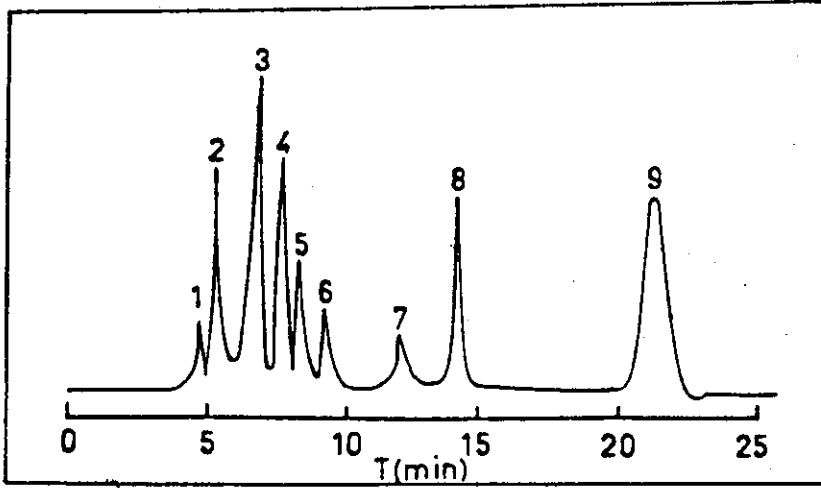
Yoğurda işlenecek sütte ve inkübasyonun 1. ve 2. saatlerinde alınan örneklerde bulunan organik asitlerin ekstraksiyonu için 10 ml örneğe 40 ml, inkübasyonun 3. saati ile depolama sırasında alınan yoğurt örneklerindeki organik asitlerin ekstraksiyonu için de 7 g yoğurt örneğine 30 ml taşıyıcı faz ilave edilerek iyice karıştırılmış, 1 saat sonra 6000 devir/dak.'da 5 dak. santrifüj edilmiştir. Üste kalan berrak kısım Whatman no=1 filtre kağıdından süzülerek 0.45 µm membran filtreden geçirilmiş ve HPLC aletine enjekte edilmiştir (BEVILACQUA ve CALIFANO 1989; BOUZAS ve ark. 1991).

Geri kazanım çalışması

Ekstraksiyon işleminin etkinliği yoğurt örneklerine organik asitler ilave edilerek değerlendirilmiştir. Depolamanın 1. gününde alınan 7 g yoğurt örneğine organik asitlerin standart çözeltilerinin belirli miktardaki karışımı eklenerek yukarıda belirtildiği gibi ekstrakte edilmiştir. Eklenen miktarlar örnekteki gerçek konsantrasyonun yaklaşık %50'si kadardır.

ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile belirlenen tüm organik asitlerin sulu standart çözeltilerinin piklerini gösteren bir kromatogram Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1.: Organik asit standart çözeltilerinin karışımına ait kromatogram.

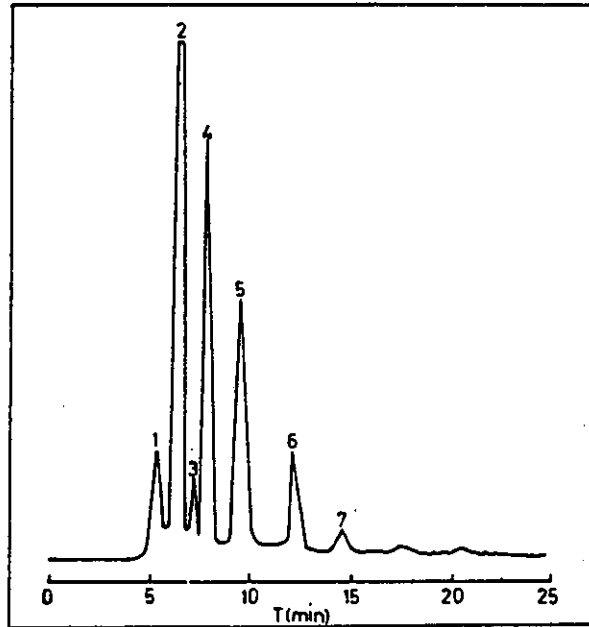
Pikler; 1: formik, 2: pürivik,
3: laktik, 4: asetik, 5: orotik, 6: sitrik,
7: ürik, 8: propionik ve 9: bütirik.

Organik asitlerin sulu standart çözeltilerine ait konsantrasyonlar ile pik alan değerleri arasında belirlenen korelasyon katsayıları mükemmel lineer ilişkiyi göstermektedir. Bu değerlerin %99'un üzerinde olduğu bulunmuştur. Asitlerin en düşük geri kazanım değerleri süt ve yoğurt örneklerinde bulunmayan formik (%87) ve bütirik (%85.4) asitte belirlenmiştir. Diğer 7 adet organik asit için oldukça yüksek olan bu değerler %90.7 ile %98.8 arasında değişmektedir. Bunlarla ilgili verileri Çizelge 1'de görmek mümkündür. Ayrıca yoğurda işlenecek sütte ve inkübasyonun 1., 2, 3. saatleri ile depolamanın 1., 7. ve 14. günlerinde saptanan organik asit miktarları Çizelge 1'de toplu halde verilmiştir.

Çizelge 1. Yoğurt üretim ve muhafazası sırasında belirlenen organik asit miktarları (mg/g), standart eğriler için tespit edilen korelasyon katsayıları ve organik asitlerin geri kazanım değerleri (%), (n=3)

	Organik asitler								
	formik	pirüvik	laktik	asetik	orotik	sitrik	ürik	propionik	bütir.
Çiğ süt	-	0.01± 0.003	1.77± 0.16	-	0.08± 0.006	1.086± 0.012	0.019± 0.002	-	-
Kültür ilave edilmiş sütün inkübasyonu									
İnkübasyon 1. saat	-	0.012± 0.002	3.78± 0.18	0.018± 0.002	0.075± 0.003	0.9± 0.03	0.019± 0.002	0.0077± 0.002	-
İnkübasyon 2. saat	-	0.017± 0.0015	9.18± 0.16	0.022± 0.0006	0.064± 0.004	0.86± 0.01	0.018± 0.0006	0.012± 0.002	-
İnkübasyon 3. saat	-	0.036± 0.002	13.29± 0.15	0.04± 0.0015	0.056± 0.003	0.83± 0.017	0.017± 0.0006	0.021± 0.004	-
Yoğurdun depolanması									
Depolama 1. gün	-	0.029± 0.001	15.83± 0.15	0.063± 0.002	0.053± 0.002	0.92± 0.016	0.015± 0.001	0.043± 0.002	-
Depolama 7. gün	-	0.024± 0.002	17.21± 0.22	0.066± 0.001	0.046± 0.002	0.83± 0.026	0.013± 0.0006	0.049± 0.001	-
Depolama 14. gün	-	0.019± 0.002	19.55± 0.19	0.07± 0.002	0.043± 0.002	0.7± 0.015	0.014± 0.001	0.055± 0.001	-
Korelasyon katsayısı	0.9976	0.9998	0.9999	0.9985	0.9988	0.9981	0.9984	0.9998	0.9969
% Geri kazanım	87.0	94.9	99.4	94.2	98.6	90.7	92.3	98.8	85.4

Şekil 2'de depolamanın 1. gününde alınan yoğurta saptanan organik asitlerin kromatogramı görülmektedir.



Şekil 2.: Yoğurta bulunan organik asitlerin tipik kromatogramı

Yoğurda işlenen inek sütünde pürivik, laktik, orotik, sitrik ve ürik asit gibi organik asitler belirlenmiştir. Sütün inkübasyonu ve depolama sırasında alınan yoğurt örneklerinde ise bu asitlerin yanısıra asetik ve propionik asit tespit edilmiştir. Formik ve bütirik asidin süt ve yoğurt örneklerinde bulunmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar benzer yöntemle yoğurtta organik asit analizi yapan FERNANDEZ-GARCIA ve MCGREGOR (1994) ve BEVILACQUA ve CALIFANO (1989) tarafından da elde edilmiştir.

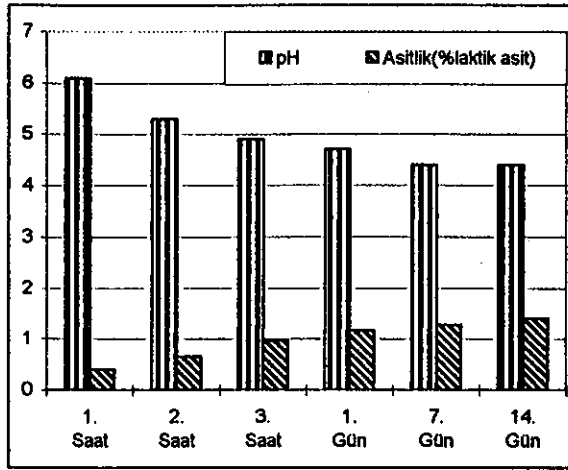
Inek sütlerinde ortalama 0.01 mg/g bulunan pürivik asidin inkübasyon sırasında yoğurt oluşuncaya kadar artış gösterdiği, yoğurdun depolanması müddetince ise azalma eğiliminde olduğu görülmüştür. Pürivik asit muhtemelen farklı birçok metabolik yolla ortaya çıkan ve kullanılan bir ara ürün olup, ortamda birikmemektedir. FERNANDEZ-GARCIA ve MCGREGOR (1994) da dondurulmuş starter kültür kullanılarak yapılan yoğurtlarda 8 saatlik inkübasyon süresinin 6. saatine kadar artış gösteren pürivik asit miktarının daha sonra azaldığını ve yoğurtta 4 haftalık depolama boyunca düşme eğiliminde olduğunu tespit ederek sonuçlarımızla benzer bulgular elde etmişlerdir. BEVILACQUA ve CALIFANO (1989), piyasadan topladıkları ticari yoğurt örneklerinde bulunan ortalama pürivik asit miktarının (0.019±0.002 mg/g) bulgularımızda olduğu gibi, çiğ inek sütlerinden yüksek olduğunu (0.004 mg/g'in altında) belirlemişlerdir.

Nükleotidlerin sentezinde bir ara ürün olan orotik asit yoğurt starter bakterileri için bir gelişme faktörüdür. Dolayısıyla inkübasyon ve depolama sırasında orotik asitin azalması doğaldır (Çizelge 1). Araştırmada yoğurt yapımı sırasında sütte bulunan orotik asitin inkübasyon sonlarında %30 oranında azaldığı hesaplanmış, benzer şekilde OKONKWA ve KINSELLA (1969), ALM (1982), SAIDI ve WARTHESEN (1989) VE FERNANDEZ-GARCIA ve MCGREGOR (1994)'da aynı süre zarfında orotik asit miktarında %30-%48 arasında azalma tespit etmişlerdir. NAVDER ve arkadaşları (1990) ise yağsız süttten yapılan yoğurtlarda tesbit edilen orotik asit düşüşünün 1. günde %56 olduğunu belirlemişlerdir. Ticari yoğurt örneklerinde bulunan orotik asit miktarları da bulgularımızda olduğu gibi 0.05 ve 0.06 mg/g olarak tespit edilmiştir (LARSON ve HEGARTY, 1979; BEVILACQUA ve CALIFANO, 1989).

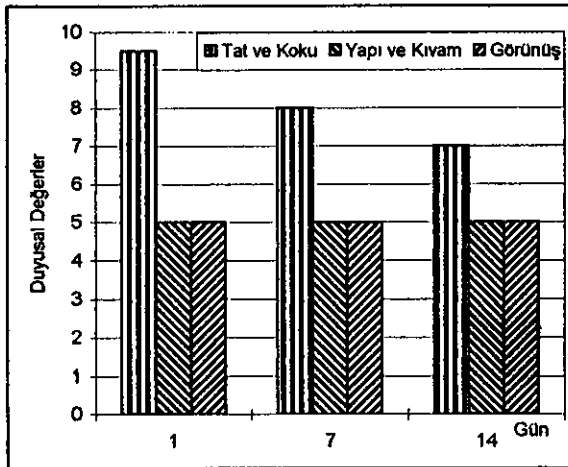
Sütte bulunmayan asetik ve propionik asitlerin yoğurt yapımı ve depolama sırasında arttığı görülmüştür (Çizelge 1). Benzer sonuçlar BEVILACQUA ve CALIFANO (1989) ile FERNANDEZGARCIA ve MCGREGOR (1994) tarafından da elde edilmiştir. Sitrik ve ürik asit miktarlarının yoğurt aypımı sırasında azaldığı, depolama sırasında ise önemli bir değişim göstermediği belirlenmiş, FERNANDEZ-GARCIA ve MCGREGOR (1994) da ürik asidin yoğurtta fermentasyon sırasında bir miktar azaldığını, ancak sitrik asit konsantrasyonunun değişmediğini tespit etmiştir. Diğer yandan bulgularımıza paralel olarak ticari yoğurt örneklerinde belirlenen sitrik asit miktarlarının çiğ süt örneklerinkinden düşük bulunduğu tespit edilmiştir (MARSILI ve ark., 1981; BEVILACQUA ve CALIFANO, 1989).

Yoğurt üretiminin esasını oluşturan laktik asit gerek yoğurt yapımı gerekse depolama sırasında artış göstermiş ve inek sütünde ortalama 1.77 mg/g olan değer devamlı bir şekilde artarak 14 gün depolanan yoğurt örneklerinde 19.55 mg/g'a yükseldiği tespit edilmiştir. Bu arada pH değerlerinin düşerek asitliğin (% laktik asit cinsinden) yükseldiği de belirlenmiştir.

Inkübasyon ve yoğurdun muhafazası sırasında örneklerin pH değerleri devamlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 3). Yoğurda işlenecek sütte yaklaşık 6.7 olan pH değeri, inkübasyonun 1 saatinden 6.1'e, 3. saatinde ise 4.8'e düşmüştür. Yoğurtta titre edilebilir asitlik de beklendiği gibi sütün inkübasyonu ve yoğurdun muhafaza edilmesi sırasında %0.40'dan başlayarak %1.4'e kadar artış göstermiştir. Bu yükselme bazı araştırmacılar tarafından da elde edilmiştir (BAVILACQUA ve CALIFANO, 1989; FERNANDEZ-GARCIA ve MCGREGOR, 1994). 14 gün sonunda belirlenen pH ve titre edilebilir asitlik değerleri yoğurdun tüketilebilirlik sınırları içinde bulunmuştur.



Şekil 3. İnkübasyon ve yoğurdun muhafazası sırasında pH ve asitlik değişimi



Şekil 4. Yoğurtlarda duyuşal değerlerin değişimi

Yoğurt örneklerinde depolama sırasında belirlenen duyuşal özelliklerin değişimi Şekil 4'de grafik olarak verilmiştir. Depolama başlangıcından özellikle depolamanın sonlarına doğru örneklerin tat ve koku değerleri azalmıştır. Bunda mamulde asitlik düzeyinin artarak ekşi tada neden olmasının yanında, diğer metabolik parçalanmalar sonucu meydana gelen maddeler etkili olmaktadır. Yapı, kıvam ve görünüş değerlerinde ise herhangi bir değişim belirlenmemiştir.

KAYNAKLAR

- ALM, L. 1982. Effect of fermentation on B-vitamin content of milk in Sweden. J. Dairy Sci. 65:353-359.
- ANONYMOUS, 1981. Süt ve Mamülleri Teknolojisi, Segem-Sinai Eğitim ve Geliştirme Merkezi, Yayın No: 103, Ankara.
- BEVILACQUA, A. E. CALIFANO, A.N. 1989. Determination of organic acids in dairy products by high performance liquid chromatography. J. Food Sci. 54(4) 1076-1079.
- BOUZAS, J., KANTT, C.A., BODYFELT, F. TORRES, J.A. 1991. Simultaneous determination of sugars and organic acids in Cheddar cheese by high performance liquid chromatography. J. Food Sci. 56(1) 276-278.
- FERNANDEZ-GARCIA, E. MCGREGOR, J.U. 1994. Determination of organic acids during the fermentation and cold storage of yoghurt. J. Dairy Sci. 77:2934-2939.

- LARSON, B., L. HEGARTY, H.M. 1979. Orotic acid in milks of various species and commercial dairy products. J. Dairy Sci. 62(10) 1641-1644.
- MARSILI, R.T., OSTAPENKO, H., SIMMONS, R.E. GREEN, D.E. 1981. High performance liquid chromatographic determination of organic acids in dairy products. J. Food Sci. 46:52.
- McCARTHY, R.D., SMITH-STOSICH, KILARA, A. WARD, P.G. 1984. Milk orotic acid and hepatic cholesterol synthesis: HMGCoA-reductase is unaffected. Milchwissenschaft 39(7) 412-415.
- NAVDER, K.P., HUANG, R.S., FRYER, E.B. FRYER, H.C. 1990. Effects of fermentation and storage on the concentration of orotic acid and uric acid in skim milk. J. Food Sci. 55(2) 585-586.
- OKONKWO, P. KINSELLA, J.E. 1969. Orotic acid in yoghurt. J. Dairy Sci. 52(11) 1861-1862.
- ÖZTEK, L. 1985. Organik asitlerin önemi ve peynirin kalitesi üzerine etkileri. Gıda 10(4) 247-254.
- RUBIN, H. E., NERAD, T. and VAUGHAN, F. 1982. Lactate acid inhibition of *Salmonella typhimurium* in yogurt. j. Dairy Sci. 65:197.
- SAIDI, B. WARTHESEN, J.J. 1989. Analysis and stability of orotic acid in milk. J. Dairy Sci. 72:2900-2905.
- SUZUKI, I. S., KATO, T., KIZADA, N. MORICHI, T. 1986. Growth of *Lactobacillus bulgaricus* in milk. 2. Characteristics of purine nucleotides, pyrimidine nucleotides and nucleic acid synthesis. J. Dairy Sci. 69:971.
- WARD, P. C., McCARTHY, R.D. KILARA, A. 1987. The role of orotic acid in the hypocholesterolemic effect of bovine milk. Milchwissenschaft 42(8) 499-504.