

**OKSİDASYON-REDÜKSİYON POTANSİYELİNİN
ULTRAFİLTRE BEYAZ PEYNİRİN OLGUNLAŞMA
SÜRECİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**THE EFFECT OF OXIDATION-REDUCTION POTENTIAL
ON RIPENING OF ULTRAFILTERED WHITE CHEESE**

TUĞBA BULAT

DOÇ. DR. ALİ TOPCU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2017

TUĞBA BULAT'ın hazırladığı “Oksidasyon-Redüksiyon Potansiyelinin Ultrafiltre Beyaz Peynirin Olgunlaşma Süreci Üzerine Etkisi” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

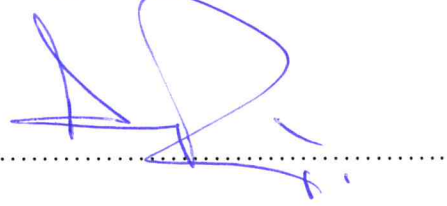
Prof. Dr. Celalettin KOÇAK
Başkan



Doç. Dr. Ali TOPCU
Danışman



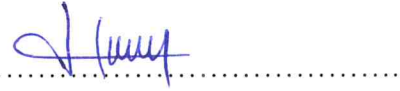
Prof. Dr. Ayhan TEMİZ
Üye



Prof. Dr. Barbaros ÖZER
Üye



Prof. Dr. Halil VURAL
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından DOKTORA TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☐ **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☒ **Tezimin/Raporumun 01/01/2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ **Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- ☐ **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

31/01/2017

Tuğba BULAT

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

31/01/2017

TUĞBA BULAT

ÖZET

OKSİDASYON-REDÜKSİYON POTANSİYELİNİN ULTRAFİLTRE BEYAZ PEYNİRİN OLGUNLAŞMA SÜRECİ ÜZERİNE ETKİSİ

Tuğba BULAT

Doktora, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ali TOPCU

Ocak 2017, 197 sayfa

Oksidasyon redüksiyon (redoks) potansiyeli, kimyasal veya biyokimyasal sistemlerin yükseltgenme veya indirgenme eğilimlerini belirleyen önemli bir fizikokimyasal parametredir. Hücre içi ve hücre dışı redoks potansiyelinin değiştirilmesi biyokimyasal reaksiyonları ve dolayısıyla fermente ürünlerin kalitesini önemli düzeyde etkileyebilmektedir.

Bu çalışmanın amacı, redoks potansiyelinin ultrafiltre (UF) beyaz peynirin olgunlaşma karakteristikleri üzerindeki etkisini belirlemektir. Çalışmanın ilk aşamasında, starter laktokok suşlarının sütü indirgeme aktivitelerinin ve asidifikasyon hızlarının birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir. İkinci aşamada, redoks potansiyelinin aminoasit katabolizması üzerindeki etkisini belirlemek için, bu suşlar tarafından kontrol, indirgenmiş ve yükseltgenmiş model sistemlerde gerçekleştirilen fenilalanin, metiyonin, triptofan ve lösin katabolizması sonucu üretilen uçucu bileşikler saptanmıştır. Üretilen uçucu bileşiklerin türünün ve konsantrasyonunun, aminoasitin çeşidine, laktokok suşuna ve ortamın redoks potansiyeline göre değiştiği belirlenmiştir.

Üçüncü aşamada, çeşitli redoks ajanlarının fermente sütün redoks potansiyeli ve pH'sı üzerindeki etkisi belirlenmiştir. İndirgen ajan olarak, sodyum hidrosülfid, ditiyotritol,

sistein, askorbik asit ve heksoz oksidaz kullanılmıştır. Yükseltgen ajan olarak ise potasyum iyodat ve potasyum ferrisiyanit kullanılmıştır. Sütün başlangıç pH'sı, fermentasyon sonundaki pH'sı, pH'nın düşme hızı, başlangıç redoks potansiyeli ve fermentasyon sonundaki redoks potansiyeli göz önünde bulundurularak peynir üretiminde indirgen ajan olarak sodyum hidrosülfid ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}_4$) ve yükseltgen ajan olarak potasyum iyodat (KIO_3) kullanılmasına karar verilmiştir.

Peynir üretiminde kullanılacak olan sodyum hidrosülfidin ve potasyum iyodatın konsantrasyonlarının belirlenmesi için yağı azaltılmış UF süt kullanılarak optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu redoks ajanlarının konsantrasyonunun artması pH düşüşünü olumsuz etkilemesinin yanı sıra kullanılan starter kültürlerin canlılığını da olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle, peynir üretiminde indirgen ajan olarak kullanılan sodyum hidrosülfidin % 0.01 (a/a) oranında UF süte ilave edilmesine karar verilmiştir. Yükseltgen ajan olarak kullanılan potasyum iyodatın peynir üretiminde kullanılacak olan tam yağlı UF süte başlangıçta % 0.025 (a/a) ve ardından yeterli pH düşüşü sağlandıktan sonra peynirlere tuz ile birlikte % 0.025 (a/a) ve toplamda % 0.05 (a/a) oranında ilave edilmiştir.

Çalışmada kullanılan yağı azaltılmış UF sütün redoks potansiyelinin ortalama 125.2 ± 4.8 mV (E_h , 332.2 mV), tam yağlı UF sütün redoks potansiyelinin ise 146.9 ± 8.3 mV (E_h , 353.9 mV) olduğu belirlenmiştir.

Dördüncü aşamada, çalışmanın bu kısmına kadar elde edilen veriler göz önünde bulundurularak, çalışma kapsamında kullanılan laktokok suşları içerisinde *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu ve *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşları saf starter kültür olarak UF beyaz peynir üretiminde kullanılmak üzere seçilmiştir. Her bir kültür için kontrol, indirgenmiş ve yükseltgenmiş olmak üzere 3 farklı peynir üretilmiştir. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu ile kontrol 1 (K1), indirgenmiş 1 (İ1) ve yükseltgenmiş 1 (Y1) ve *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu ile kontrol 2 (K2), indirgenmiş 2 (İ2) ve yükseltgenmiş 2 (Y2) peynirleri üretilmiştir. Üretilen peynirler 90 gün süreyle olgunlaştırılmıştır. Olgunlaşmanın, 7., 30., 60. ve 90. günlerinde örnekleme yapılarak, mikrobiyolojik analizler, bileşim analizleri, olgunlaşma karakteristiklerini belirlemeye yönelik analizler (pH 4.6'da çözünür azot, %12'lik TCA'da çözünür azot, RP-HPLC ile peptit profili, toplam serbest aminoasit, üre-PAGE, SDS-PAGE, serbest yağ, organik asit, uçucu bileşikler), tekstürel ve duyu analizler gerçekleştirilmiştir.

Olgunlaşmanın 7. gününde K1, İ1, Y1, K2, İ2 ve Y2 peynirlerinin redoks potansiyellerinin (ORP değeri olarak), sırasıyla -311.2, -337.4, 164.0, -329.5, -348.4 ve 185.1 mV olduğu tespit edilmiştir. Bileşim analizlerinin sonuçlarına göre, yükseltgenmiş peynirlerde (Y1 ve Y2) ve UD459 suşu ile üretilen indirgenmiş peynirde (İ2) pH'nın 4.9'un altına düşmemesi nedeniyle nem içeriğinin yüksek olduğu, buna bağlı olarak bu peynirlerde peyniraltı suyu ayrılmasının düşük olduğu ve titrasyon asitliğinin düşük olduğu saptanmıştır. Olgunlaşmanın 1. gününde K1, İ1, Y1, K2, İ2 ve Y2 peynirlerinin, sırasıyla 9.14, 9.20, 8.30, 8.46, 7.89 ve 7.95 log KOB/mL canlı laktokok içerdiği saptanmıştır. Olgunlaşmanın 90. gününde ise K1, İ1, K2 ve İ2 peynirlerinde bulunan canlı laktokok sayısının sırasıyla, 7.34, 5.78, 6.51 ve 7.55 log KOB/mL olduğu belirlenmiştir. Ancak, yükseltgenmiş peynirlerde, olgunlaşmanın 60. gününden itibaren laktokokların canlılığını yitirdiği belirlenmiştir. Redoks potansiyelinin laktokoklar tarafından peynirde gerçekleştirilen proteolizi etkilediği belirlenmiştir. İndirgenmiş redoks potansiyeli ile laktokokların peptidolitik aktivitesi arasında pozitif bir ilişki olduğu saptanmıştır. Peynirlerin redoks potansiyellerinin lipoliz üzerinde belirgin bir etkisi saptanmamıştır. Organik asit sonuçları incelendiğinde, özellikle laktik asit üretiminin ve diğer bazı organik asitlerin ortamın redoks potansiyelinden etkilendiği saptanmıştır. Ortamın redoks potansiyelinin peynirde bulunan uçucu tat-koku bileşiklerinin türünü ve konsantrasyonunu önemli düzeyde etkilediği belirlenmiştir. Özellikle yükseltgenmiş redoks potansiyeline sahip peynirlerde (Y1 ve Y2), badem aromasına sahip olan benzaldehit, 4-metil benzaldehit ve benzonitrilin yüksek konsantrasyonda bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca, kontrol ve indirgenmiş peynirler duyu özellikleri açısından, yükseltgenmiş peynirlere göre panelistler tarafından daha yüksek puanlar almıştır. Sonuç olarak, UF beyaz peynir açısından, kaliteli bir peynir eldesi için olgunlaşma süresince düşük redoks potansiyelinin gerekli olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Oksidasyon redüksiyon potansiyeli, laktik asit bakterileri, aminoasit katabolizması, ultrafiltre beyaz peynir, proteoliz, lipoliz, uçucu tat-koku bileşikleri

ABSTRACT

THE EFFECT OF OXIDATION-REDUCTION POTENTIAL ON RIPENING OF ULTRAFILTERED WHITE CHEESE

Tuğba BULAT

Doctor of Philosophy, Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ali TOPCU

January 2017, 197 pages

Oxidation–reduction (redox) potential is a fundamental physicochemical parameter that determines the ability of chemical or biochemical systems to oxidize or reduce. Altering intracellular and extracellular redox potentials can significantly affect the biochemical reactions and the quality of fermented products.

The aim of the study was to determine the effect of redox potential on the ripening characteristics of ultrafiltered (UF) white cheese. In the first step, it was determined that the reducing activities and the acidification rates of the starter lactococcal strains were different from each other. In the second step, in order to determine the effect of redox potential on amino acid catabolism, the volatile compounds produced by the catabolisms of phenylalanine, methionine, tryptophan and leucine in the control, reduced and oxidized model systems by these strains were detected. It was determined that the species and concentration of the volatile compounds varied depending on the amino acid, the *Lactococcus* strain and the redox potential of the medium.

In the third step, the effects of various redox agents on the redox potential and pH of the fermented milk were determined. As reducing agent, sodium hydrosulfite, dithiothreitol,

cysteine, ascorbic acid, and hexose oxidase were used. Potassium iodate and potassium ferricyanide were used as oxidizing agent. It was decided to use sodium hydrosulfite ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}_4$) as the reducing agent and potassium iodate (KIO_3) as the oxidizing agent in the cheese production, considering the initial pH of the milk, the pH at the end of fermentation, the rate of drop of pH, the initial redox potential, and the redox potential at the end of fermentation.

Optimization studies were carried out to determine the concentrations of sodium hydrosulfite and potassium iodate to be used in the cheese production by using reduced fat ultrafiltered (UF) milk. The increase in the concentration of these redox agents negatively affects the pH drop, as well as the viability of the starter cultures used. For this reason, it was decided to addition of 0.01% (w/w) of sodium hydrosulfite as the reducing agent to the full fat UF milk in the cheese production. As the oxidizing agent potassium iodate was added to the full fat UF milk (0.05% (w/w) in total) at a ratio of 0.025% (w/w) at the beginning and then added to the cheese at the ratio of 0.025% (w/w) with salt after the sufficient pH drop was achieved.

It has been determined that the redox potential of the reduced fat UF milk was 125.2 ± 4.8 mV (E_h , 332.2 mV) and the redox potential of the full fat UF milk was 146.9 ± 8.3 mV (E_h , 353.9 mV).

In the fourth step, the single strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CM41 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UD459 were selected as the starter culture for UF cheese production, considering the data up to this part of the study. For each culture, three different cheeses were produced: control, reduced and oxidized. Control 1 (K1), reduced 1 (I1) and oxidized 1 (Y1) cheeses were produced with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CM41 strain and, control 2 (K2), reduced 2 (I2) and oxidized 2 (Y2) were produced with *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UD459 strain. The produced cheeses were ripened for 90 days. On the 7th, 30th, 60th, and 90th days of ripening, microbiological analyses, composition analyses, analyses to determine ripening characteristics (pH 4.6 soluble nitrogen, 12% TCA soluble nitrogen, peptide profile by RP-HPLC, total free amino acid content, urea-PAGE, SDS-PAGE, free fatty acid content, organic acids, volatile compounds), textural and sensory analyses were performed.

On the 7th day of ripening, the redox potentials (as ORP value) of K1, I1, Y1, K2, I2 and Y2 cheeses were found to be -311.2, -337.4, 164.0, -329.5, -348.4 and 185.1 mV,

respectively. According to the results of the composition analysis, it was determined that the moisture content was high in the oxidized cheeses (Y1 and Y2) and the reduced cheese (I2) because the pH did not decrease below 4.9, consequently the whey separation was high in these cheeses and the titratable acidity was low. On the 1st day of ripening, the K1, I1, Y1, K2, I2 and Y2 cheeses were found to contain 9.14, 9.20, 8.30, 8.46, 7.89 and 7.95 log CFU/mL viable lactococci, respectively. On the 90th day of ripening, the number of viable lactococci in K1, I1, K2 and I2 cheeses were 7.34, 5.78, 6.51 and 7.55 log CFU/mL, respectively. However, it was determined that the starter lactococci in the oxidized cheeses have lost their viability from the 60th day of the ripening. It was determined that the redox potential affected the proteolysis by lactococcal strains. It was found that there was a positive correlation between the reduced redox potential and the peptidolytic activity of lactococci. The redox potential of the cheeses was found to have no effect on the lipolysis. When the organic acid results were examined, it was found that particularly the production of lactic acid and some other organic acids were influenced by the redox potential of the cheese. It was determined that the redox potential of the medium significantly affected the variety and concentration of the volatile flavour compounds present in the cheese. Especially in the cheeses with oxidized redox potential (Y1 and Y2), benzaldehyde, 4-methyl benzaldehyde and benzonitrile with almond aroma were found to be in high concentration. In addition, the control and reduced cheeses were rated higher by the panelists than the oxidized cheeses in terms of their sensory properties. As a result, it has been determined that low redox potential was required during cheese ripening to obtain a quality UF white cheese.

Key words: Oxidation reduction potential, lactic acid bacteria, amino acid catabolism, ultrafiltered white cheese, proteolysis, lipolysis, volatile flavour compounds

TEŞEKKÜR

Öncelikle, akademik hayatımın başından itibaren ilgi, destek, yardım ve bilgisini esirgemeyen ve bu çalışmanın gerçekleştirilmesini mümkün kılan, bana her zaman cesaret veren, tecrübesi ve teşviği ile iyi bir araştırmacı olmayı öğreten, değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ali TOPCU'ya,

Tez çalışması süresince engin bilgi ve tecrübeleri ile değerli katkılarından dolayı, Tez İzleme Komitesi üyeleri değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ayhan TEMİZ ve Sayın Prof. Dr. Barbaros ÖZER'e ve yine değerli katkıları nedeniyle Sayın Prof. Dr. Paul L.H. MCSWEENEY'e,

Her zaman yanımda olduklarını bildiğim, varlıklarından güç aldığım, sevgi ve desteklerini esirgemeyen, sevinci de üzüntüyü de birlikte paylaştığım sevgili arkadaşlarım Beyhan GÜNAYDIN DAŞAN ve Nazife Nur KARAÇAĞLAR'a,

Çalışmam süresince yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım Sattar EGHBALIAN, Reyhaneh GHAVAM, Havva Tümay TEMİZ, Hüseyin Efe GENİŞ ve Yelda ZENCİR'e ve adını burada yazamadığım emeği geçen tüm arkadaşlarıma,

Sağladıkları maddi ve manevi destekten ötürü Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nün tüm çalışanlarına,

Bu çalışmayı, "2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Tez Bursu" kapsamında destekleyen TÜBİTAK BİDEB'e,

Bu çalışma kapsamında kullandığım ultrafiltrasyon retentantının temini için Bahçıvan Gıda San. ve Tic. A.Ş.'ye ve *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CM41 kültürünü sağlayan Maysa Gıda San. ve Tic. A.Ş.'ye,

Ve bana benden daha çok inanan, bir sonraki adımı atabilmem için cesaret ve güç veren, her zaman ve her koşulda beni seven ve destekleyen, beni bugünlere getiren annem Türkan BULAT'a ve ağabeylerim Yusuf BULAT'a ve Salim BULAT'a sonsuz sevgileri, sabırları ve emekleri için, yeğenlerim Tuna BULAT, Bora BULAT ve Elif BULAT'a varlıklarıyla dahi hayatımı güzelleştirdikleri için ve ayrıca, destek ve anlayışları için Yöntem BULAT ve Hale BULAT'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ÇİZELGELER.....	xi
ŞEKİLLER	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xx
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1 Oksidasyon Redüksiyon Potansiyeli.....	4
2.2 Oksidasyon Redüksiyon Potansiyelinin Ölçümü.....	6
2.3 Oksidasyon Redüksiyon Potansiyeli ve Mikroorganizmalar.....	10
2.3.1 Oksidasyon Redüksiyon Potansiyeli ve Mikrobiyel Gelişim.....	11
2.3.2 Gıda Mikrobiyolojisinde Redoks Potansiyeli Uygulamaları.....	13
2.3.3 Oksidasyon Redüksiyon Potansiyeli ve Laktik Asit Bakterileri	14
2.3.4 Redoks Potansiyelinin Laktik Asit Bakterileri Tarafından Gerçekleştirilen Aroma Biyosentezi Üzerindeki Etkisi.....	16
2.3.5 Bakteriyel Gelişim Süresince Redoks Potansiyelinin Değişiminde Rol Oynayan Mekanizmalar	22
2.4 Sütün Oksidasyon Redüksiyon Potansiyeli	24
2.5 Süt ve Süt Ürünlerinin Oksidasyon Redüksiyon Potansiyelinin Kontrol Altında Tutulması	27
2.6 Oksidasyon Redüksiyon Potansiyelinin Yoğurt Üzerindeki Etkisi	31
2.7 Oksidasyon Redüksiyon Potansiyelinin Peynir Üzerindeki Etkisi	33
3. MATERYAL ve METOT	39
3.1 Süt Örnekleri.....	39
3.2 Starter Kültürler	39
3.3 Pıhtılaştırıcı Enzim	39
3.4 Laktik Asit Bakterilerinin Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi.....	39

3.5	Laktik Asit Bakterileri İçin Sütün Asidifikasyon Eğrilerinin Belirlenmesi.....	40
3.6	Laktik Asit Bakterilerinin Sütü İndirgeme Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	40
3.7	Oksidasyon Redüksiyon Potansiyelinin Aminoasit Katabolizması Üzerindeki Etkisi..	41
3.7.1	Kültürlerin Hazırlanması	41
3.7.2	Model Sistemlerin Hazırlanması	41
3.7.3	SPME-GC-MS ile Uçucu Bileşiklerin Saptanması	42
3.7.4	Aminoasit Katabolizması Çalışmasından Elde Edilen Verilere Temel Bileşen Analizi (PCA) Uygulaması	43
3.7.5	Redoks Potansiyeli ve pH Ölçümü.....	43
3.7.6	Laktokok Sayımı	44
3.8	Peynirin Redoks Potansiyelinin Kontrolü İçin Kullanılacak Redoks Ajanlarının Belirlenmesi	44
3.8.1	Fermente Sütün Redoks Potansiyelinin Kontrol Altında Tutulması	44
3.8.2	Fermente Yağı Azaltılmış UF Sütün Redoks Potansiyelinin Kontrol Altında Tutulması.....	45
3.9	UF Peynir Üretimi Boyunca Redoks Potansiyeli ve pH Değişiminin Belirlenmesi..	46
3.10	UF Peynir Üretimi ve Olgunlaşma Periyodu Süresince UF Peynirlere Uygulanan Analizler.....	47
3.10.1	UF Peynir Üretimi	47
3.10.2	Mikrobiyolojik Analizler	49
3.10.3	Bileşim Analizleri.....	49
3.10.4	Redoks Potansiyeli ve pH Ölçümleri	50
3.10.5	Proteoliz Düzeyini Belirlemeye Yönelik Analizler.....	50
3.10.6	Serbest Yağ Asidi Ekstraksiyonu ve Analizi.....	53
3.10.7	Organik Asit ve Şeker Analizi.....	54
3.10.8	Uçucu Bileşiklerin Analizi	55
3.10.9	Tekstürel Analizler	56
3.10.10	Duyusal Analiz	56
3.10.11	İstatistiksel Analizler	57
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	58
4.1	Laktik Asit Bakterilerinin Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi.....	58
4.2	Laktik Asit Bakterileri Tarafından Gerçekleştirilen Sütün Asidifikasyon ve İndirgenme Düzeylerinin Belirlenmesi.....	59

4.3 Oksidasyon Redüksiyon Potansiyelinin Aminoasit Katabolizması Üzerindeki Etkisi..	61
4.3.1 Aminoasit Katabolizması Çalışması Süresince Redoks Potansiyelinin ve pH'nın Değişimi.....	62
4.3.2 Aminoasit Katabolizması Çalışması Süresince Kültürlerin Canlılığı	66
4.3.3 Redoks Potansiyelinin Aminoasit Katabolizması ile Uçucu Bileşiklerin Üretimi Üzerindeki Etkisi	70
4.4 Peynirin Redoks Potansiyelinin Kontrolü İçin Kullanılacak Redoks Ajanlarının Belirlenmesi	111
4.4.1 Fermente Sütün Redoks Potansiyelinin Kontrol Altında Tutulması	111
4.4.2 Fermente Yağı Azaltılmış UF Sütün Redoks Potansiyelinin Kontrol Altında Tutulması.....	117
4.5 UF Peynir Üretimi Boyunca Redoks Potansiyeli ve pH Değişiminin Belirlenmesi.....	119
4.6 Redoks Potansiyelinin UF Peynirin Olgunlaşma Karakteristikleri Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	123
4.6.1 Mikrobiyolojik Analizler.....	123
4.6.2 Bileşim Analizleri.....	125
4.6.3 Redoks Potansiyeli Ölçümü	128
4.6.4 Proteoliz Düzeyini Belirlemeye Yönelik Analizler.....	131
4.6.5 Serbest Yağ Asidi Analizi	150
4.6.6 Organik Asit ve Şeker Analizi.....	152
4.6.7 Uçucu Bileşiklerin Analizi	158
4.6.8 Tekstürel Analizler	168
4.6.9 Duyusal Analiz	169
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	172
KAYNAKLAR.....	183
EKLER.....	198
ÖZGEÇMİŞ.....	208

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2.1. Elektrot kompozisyonu ve sıcaklığın fonksiyonu olarak referans elektrotlar için elektrot potansiyelleri	8
Çizelge 2.2. Mikrobiyel katabolizmada önemli olan redoks çiftlerinin redoks potansiyelleri	11
Çizelge 2.3. Cheddar peynirinden izole edilen laktik asit bakterileri tarafından üretilen aminoasit katabolitleri	20
Çizelge 2.4. Süt için önemli olan bazı redoks sistemlerinin standart redoks potansiyelleri (E_0) ve taze sütteki konsantrasyonları ($T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$)	25
Çizelge 2.5. Laktik starterler kullanılarak asitlendirilmiş sütün farklı E_h koşullarındaki jel yapısı karakteristikleri	33
Çizelge 3.1. Aminoasit katabolizması sonucunda üretilen uçucu bileşiklerin analizleri için kullanılan GC-MS koşulları.....	43
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan indirgen ve yükseltgen ajanlar ve bunların konsantrasyonları (%a/h).....	45
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan indirgen ve yükseltgen ajanlar ve bunların konsantrasyonları (%a/a)	46
Çizelge 3.4. UF peynir üretimi boyunca redoks potansiyeli ve pH değişiminin belirlenmesi	47
Çizelge 3.5. UF peynir üretiminde kullanılan UF retentantının bileşimi	48
Çizelge 3.6. UF peynir üretim basamakları	48
Çizelge 3.7. Serbest yağ asidi analizinde kullanılan GC koşulları	54
Çizelge 3.8. Organik asit ve şeker analizleri için kullanılan HPLC koşulları	55
Çizelge 3.9. Uçucu bileşiklerin analizleri için kullanılan GC-MS koşulları	55
Çizelge 4.1. <i>Lactococcus lactis</i> suşlarının gelişimleri süresince canlı hücre sayılarında (log KOB/mL) meydana gelen değişim	59
Çizelge 4.2. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CM41'in aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince redoks potansiyeli ve pH değişimi	63
Çizelge 4.3. <i>L. lactis</i> 'in aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince redoks potansiyeli ve pH değişimi	64
Çizelge 4.4. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 35-C-9'un aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince redoks potansiyeli ve pH değişimi	64

Çizelge 4.5. <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> UD459'un aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince redoks potansiyeli ve pH değişimi	65
Çizelge 4.6. <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> IP5'in aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince redoks potansiyeli ve pH değişimi	65
Çizelge 4.7. <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> HP'nin aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince redoks potansiyeli ve pH değişimi	66
Çizelge 4.8. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CM41'in aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince canlılığı (log KOB/mL).....	67
Çizelge 4.9. <i>L. lactis</i> 'in aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince canlılığı (log KOB/mL)	67
Çizelge 4.10. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 35-C-9'un aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince canlılığı (log KOB/mL).....	68
Çizelge 4.11. <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> UD459'un aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince canlılığı (log KOB/mL).....	68
Çizelge 4.12. <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> IP5'in aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince canlılığı (log KOB/mL).....	69
Çizelge 4.13. <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> HP'nin aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince canlılığı (log KOB/mL).....	69
Çizelge 4.14. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CM41'in metiyonin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşikler	74
Çizelge 4.15. <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> UD459'un metiyonin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşikler.....	78
Çizelge 4.16. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CM41'in fenilalanin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşikler.....	84
Çizelge 4.17. <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> UD459'un fenilalanin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşikler.....	88
Çizelge 4.18. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CM41'in triptofan katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşikler	94
Çizelge 4.19. <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> UD459'un triptofan katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşikler.....	98
Çizelge 4.20. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CM41'in lösin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşikler	104
Çizelge 4.21. <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> UD459'un lösin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşikler	108

Çizelge 4.22. Redoks ajanlarının farklı konsantrasyonlarının yağsız sütün ve fermente sütün (<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CM41 ile) redoks potansiyeli ve pH'sı üzerindeki etkisi.....	112
Çizelge 4.23. Redoks ajanlarının farklı konsantrasyonlarının yağı azaltılmış UF sütün ve yağı azaltılmış UF fermente sütün (<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CM41 ile) redoks potansiyeli ve pH'sı üzerindeki etkisi.....	119
Çizelge 4.24. Redoks ajanlarının farklı konsantrasyonlarının yağı azaltılmış UF sütün ve yağı azaltılmış UF fermente sütün (<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> UD459 ile) redoks potansiyeli ve pH'sı üzerindeki etkisi.....	119
Çizelge 4.25. Olgunlaşma süresince peynirlerin bileşim özellikleri ve pH'ları	126
Çizelge 4.26. Olgunlaşmanın 7., 30., 60. ve 90. günlerinde peynirlerde bulunan toplam serbest yağ asidi konsantrasyonu ve olgunlaşmanın 90. günündeki 10 farklı serbest yağ asidinin her birinin konsantrasyonu.....	151
Çizelge 4.27. Peynir örneklerine ait uçucu bileşiklerin (asitler) analiz sonuçları ^a	159
Çizelge 4.28. Peynir örneklerine ait uçucu bileşiklerin (esterler) analiz sonuçları	160
Çizelge 4.29. Peynir örneklerine ait uçucu bileşiklerin (ketonlar) analiz sonuçları.....	162
Çizelge 4.30. Peynir örneklerine ait uçucu bileşiklerin (aldehitler) analiz sonuçları.....	165
Çizelge 4.31. Peynir örneklerine ait uçucu bileşiklerin (alkoller) analiz sonuçları.....	166
Çizelge 4.32. Peynir örneklerine ait uçucu bileşiklerin (diğer aroma bileşenleri) analiz sonuçları	168
Çizelge 4.33. Peynirlerin duyusal özelliklerinin olgunlaşma süresince değişimi	170
Çizelge 4.34. Peynirlerin toplam kabul edilebilirlik ve acılık puanlarının olgunlaşma süresince değişimi	170

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. Redoks potansiyelinin (E_h) ölçümünde kullanılan elektrokimyasal hücre.....	7
Şekil 2.2. <i>Lactococcus</i> ve <i>Leuconostoc</i> tarafından gerçekleştirilen sitrat metabolizması...	17
Şekil 2.3. Süt trigliseritlerinin ve yağ asitlerinin metabolizmasının genel yolları	18
Şekil 2.4. Süt proteinlerinin degradasyonu sonucu oluşan tat-koku bileşikler	21
Şekil 2.5. Peynirin olgunlaşması süresince mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen metiyonin degradasyonu.....	22
Şekil 2.6. <i>L. lactis</i> tarafından gerçekleştirilen sütün indirgenmesinde rol oynayan mekanizmaların şematik gösterimi	23
Şekil 2.7. Askorbik asit ve türevlerinin kimyasal yapısı	26
Şekil 2.8. Membran elektroliz hücresinin şematik diyagramı	31
Şekil 2.9. Laboratuvar ölçekli Cheddar üretimi süresince zamanın ve peynir yapım basamaklarının bir fonksiyonu olarak oksidasyon redüksiyon potansiyelinin değişimi.	35
Şekil 2.10. Cheddar peynirinin oksidasyon redüksiyon potansiyelinin (ORP) ölçümünün detaylarını gösteren diyagram	36
Şekil 2.11. Cheddar peynirinin oksidasyon redüksiyon potansiyelinin 12 °C'de zamanla değişimi	37
Şekil 3.1. Aminoasit katabolizmasının gerçekleştirildiği model sistemlerde redoks potansiyeli ve pH ölçümü düzeneği.....	44
Şekil 3.2. UF peynir üretimi süresince redoks potansiyeli ve pH'da meydana gelen değişimleri belirlemek için oluşturulan ölçüm düzeneği.....	46
Şekil 3.3. Üretimi gerçekleştirilen UF peynir örnekleri	48
Şekil 3.4. Üretilen peynirlerde redoks ve pH ölçüm düzeneği.....	50
Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan <i>Lactococcus lactis</i> suşlarının gelişimlerine ait absorbans-zaman eğrisi.....	58
Şekil 4.2. Laktik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilen sütün asidifikasyonu ve indirgenmesi	60
Şekil 4.3. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CM41'in metiyonin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Metiyonin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler	73

Şekil 4.4. a) <i>L. lactis</i> 'in metiyonin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Metiyonin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler.....	75
Şekil 4.5. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 35-C-9'un metiyonin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi b) Metiyonin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler	76
Şekil 4.6. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> UD459'un metiyonin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Metiyonin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler.....	77
Şekil 4.7. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> IP5'in metiyonin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Metiyonin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler	79
Şekil 4.8. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> HP'nin metiyonin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Metiyonin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler.....	80
Şekil 4.9. Fenilalanin katabolizması.....	81
Şekil 4.10. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CM41'in fenilalanin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Fenilalanin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler.....	83
Şekil 4.11. a) <i>L. lactis</i> 'in fenilalanin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Fenilalanin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler.....	85
Şekil 4.12. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 35-C-9'un fenilalanin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Fenilalanin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler.....	86
Şekil 4.13. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> UD459'un fenilalanin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Fenilalanin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler.....	87
Şekil 4.14. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> IP5'in fenilalanin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Fenilalanin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler.....	89
Şekil 4.15. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> HP'nin fenilalanin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Fenilalanin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler.....	90

Şekil 4.16. Triptofan katabolizması.....	92
Şekil 4.17. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CM41'in triptofan katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Triptofanın katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler	93
Şekil 4.18. a) <i>L. lactis</i> 'in triptofan katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Triptofanın katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler.....	95
Şekil 4.19. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 35-C-9'un triptofan katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Triptofanın katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler	96
Şekil 4.20. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> UD459'un triptofan katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Triptofanın katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler	97
Şekil 4.21. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> IP5'in triptofan katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Triptofanın katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler	99
Şekil 4.22. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> HP'nin triptofan katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Triptofanın katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler	100
Şekil 4.23. Dallanmış zincire sahip aminoasitlerin ilgili α -keto asitlere transaminasyonu	102
Şekil 4.24. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CM41'in lösin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Lösinin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler	103
Şekil 4.25. a) <i>L. lactis</i> 'in lösin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Lösinin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler	105
Şekil 4.26. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 35-C-9'un lösin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Lösinin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler	106
Şekil 4.27. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> UD459'un lösin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Lösinin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler	107

Şekil 4.28. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> IP5'in lösin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Lösinin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırımında etkili olan uçucu bileşikler	109
Şekil 4.29. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> HP'nin lösin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Lösinin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırımında etkili olan uçucu bileşikler	110
Şekil 4.30. Sodyum hidros�lfitin farklı konsantrasyonlarının fermente sütün ORP ve pH'sı üzerine etkisi.....	113
Şekil 4.31. Ditiyotreit�l�n (DTT) farklı konsantrasyonlarının fermente sütün ORP ve pH'sı üzerine etkisi.....	114
Şekil 4.32. Sisteinin farklı konsantrasyonlarının fermente sütün ORP ve pH'sı üzerine etkisi	114
Şekil 4.33. Askorbik asitin farklı konsantrasyonlarının fermente sütün ORP ve pH'sı üzerine etkisi.....	115
Şekil 4.34. Heksoz oksidazın (% 0.025, %a/h) sütün ORP ve pH'sı üzerine etkisi.....	115
Şekil 4.35. Potasyum iyodatın farklı konsantrasyonlarının fermente sütün ORP ve pH'sı üzerine etkisi.....	116
Şekil 4.36. Potasyum ferrisiyanitin farklı konsantrasyonlarının fermente sütün ORP ve pH'sı üzerine etkisi.....	117
Şekil 4.37. Laboratuvar �l�ekli UF peynir üretimi süresince redoks potansiyeli (ORP, mV) ve pH'nın değişimi (Kontrol peyniri, K1).....	121
Şekil 4.38. Laboratuvar �l�ekli indirgenmiş UF peynir üretimi süresince redoks potansiyeli (ORP, mV) ve pH'nın değişimi (�ndirgenmiş peynir, �1)	122
Şekil 4.39. Laboratuvar �l�ekli yükseltgenmiş UF peynir üretimi süresince redoks potansiyeli (ORP, mV) ve pH'nın değişimi (Yükseltgenmiş peynir, Y1)	123
Şekil 4.40. Peynir örneklerinde bulunan laktokokların canlılığının (log KOB/g) olgunlaşma süresince değişimi	124
Şekil 4.41. Peynir örneklerinde meydana gelen peyniraltı suyu ayrılmasının olgunlaşma süresince değişimi (%).....	127
Şekil 4.42. Peynir �rneklerinin titrasyon asitliğinin (% laktik asit) olgunlaşma süresince değişimi	128
Şekil 4.43. Peynirlerin redoks potansiyellerinin (mV) olgunlaşma süresince değişimi....	129
Şekil 4.44. Peynirlerin pH 4.6'da ������r azotlu maddeler bazında olgunlaşma indeksi değerleri (%).....	132

Şekil 4.45. Peynirlerin %12'lik TCA'da çözünür azotlu maddeler bazında olgunlaşma indeksi değerleri (%)	133
Şekil 4.46. Peynirlerin toplam serbest aminoasit konsantrasyonlarının olgunlaşma süresince değişimi	135
Şekil 4.47. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CM41 suşu kullanılarak üretilen peynirlerin olgunlaşmanın 7. gününde ve 214 nm'de RP-HPLC kromatogramları	137
Şekil 4.48. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CM41 suşu kullanılarak üretilen peynirlerin olgunlaşmanın 90. gününde ve 214 nm'de RP-HPLC kromatogramları	138
Şekil 4.49. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CM41 suşu kullanılarak üretilen peynirlerin olgunlaşmanın 90. gününde ve 280 nm'de RP-HPLC kromatogramları	138
Şekil 4.50. <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> UD459 suşu kullanılarak üretilen peynirlerin olgunlaşmanın 7. gününde ve 214 nm'de RP-HPLC kromatogramları	139
Şekil 4.51. <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> UD459 suşu kullanılarak üretilen peynirlerin olgunlaşmanın 90. gününde ve 214 nm'de RP-HPLC kromatogramları	139
Şekil 4.52. <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> UD459 suşu kullanılarak üretilen peynirlerin olgunlaşmanın 90. gününde ve 280 nm'de RP-HPLC kromatogramları	140
Şekil 4.53. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CM41 suşu kullanılarak üretilen peynirlerde olgunlaşma süresince 214 nm'de RP-HPLC profiline ait temel bileşen analizi, b) Temel bileşen analizinden elde edilen ve peptitlerin yaklaşık alıkonma sürelerine ait hesaplama verileri.....	141
Şekil 4.54. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> UD459 suşu kullanılarak üretilen peynirlerde olgunlaşma süresince 214 nm'de RP-HPLC profiline ait temel bileşen analizi, b) Temel bileşen analizinden elde edilen ve peptitlerin yaklaşık alıkonma sürelerine ait hesaplama verileri.....	143
Şekil 4.55. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CM41 suşu kullanılarak üretilen peynirlerde olgunlaşma süresince 280 nm'de RP-HPLC profiline ait temel bileşen analizi, b) Temel bileşen analizinden elde edilen ve peptitlerin yaklaşık alıkonma sürelerine ait hesaplama verileri.....	144
Şekil 4.56. a) <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> UD459 suşu kullanılarak üretilen peynirlerde olgunlaşma süresince 280 nm'de RP-HPLC profiline ait temel bileşen analizi, b) Temel bileşen analizinden elde edilen ve peptitlerin yaklaşık alıkonma sürelerine ait hesaplama verileri.....	145
Şekil 4.57. Olgunlaşmanın 7. gününe ait üre-PAGE elektroforetogramı	147
Şekil 4.58. Olgunlaşmanın 90. gününe ait üre-PAGE elektroforetogramı	147

Şekil 4.59. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CM41 kullanılarak üretilen peynirlere ait SDS-PAGE elektroforetogramı	149
Şekil 4.60. <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> UD459 kullanılarak üretilen peynirlere ait SDS-PAGE elektroforetogramı.....	149
Şekil 4.61. Peynirlerdeki şekerler, organik asitler ve asetoin konsantrasyonlarının olgunlaşma süresince değişimi	153
Şekil 4.62. Peynirlerin sertlik (N) değerlerinin olgunlaşma süresince değişimi	169



SİMGELER VE KISALTMALAR

ADP	Adenozin difosfat
AhpR	Alkil hidroperoksit redüktaz
ATP	Adenozin trifosfat
ÇA	Çözünür azot
DAD	Diode Array Dedector
DTT	Ditiyotritol
E _h	Redoks potansiyeli (mV) (normal hidrojen elektrot ile ilişkili)
E _{h7}	pH 7'deki redoks potansiyeli (mV)
EPS	Ekzopolisakkarit
ETS	Elektron Taşıma Sistemi
FADH ₂	Flavin Adenin Dinükleotid
FID	Flame Ionization Detector
GC	Gas Chromatography
GC-MS	Gas Chromatography–Mass Spectrometry
GDL	Glukono-δ-lakton
İ	İndirgenmiş peynir
K	Kontrol peyniri
KOB	Koloni Oluşturan Birim
LAB	Laktik asit bakterileri
MRS	Man-Rogosa-Sharp besiyeri
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NOX	NADH oksidaz
NSLAB	Starter olmayan laktik asit bakterileri
ORP	Oksidasyon Redüksiyon Potansiyeli (mV)
PCA	Principal Component Analysis, Temel Bileşen Analizi
PDA	Photo-Diode Array
PTA	Fosfotungstik asit
RI	Refraktif İndeks
RP-HPLC	Reverse Phase- High Pressure Liquid Chromatography
SDS- PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SPME	Solid-Phase Microextraction
TCA	Trikloroasetik asit

TFA	Trifloroasetik asit
TMAO	Trimetilamin <i>N</i> -oksit
TNBS	Trinitrobenzensülfonik asit
UF	Ultrafiltrasyon
Üre-PAGE	Üre-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
VRBA	Violet Red Bile Agar
Y	Yükseltgenmiş peynir
η	Viskozite
a/a	Ağırlık/Ağırlık
a/h	Ağırlık/Hacim
h/h	Hacim/Hacim



1. GİRİŞ

Kimyasal ve biyokimyasal sistemlerin elektron kazanma veya kaybetme kapasitesinin göstergesi olan oksidasyon redüksiyon (redoks) potansiyeli (ORP, standart hidrojen referans elektroda karşı düzeltme yapılmışsa E_h olarak kısaltılmaktadır), tıpkı pH gibi biyolojik sistemlerin durumunu gösteren bir parametredir [1]. Oksidasyon (yükseltgenme) süresince, elektronlar bir elektron vericisinden bir elektron alıcısına aktarılmaktadır. Ortamın redoks potansiyelinin mikrobiyel gelişimi inhibe ettiği veya geliştirdiği uzun zamandır bilinmekte ve redoks potansiyelinin fermente süt ürünlerinin kalitesi ve mikroorganizmalar (starter ve/veya ek kültürler ve starter olmayan laktik asit bakterileri) üzerindeki etkisinin belirlenmesi son yıllarda araştırmacılar tarafından ilgi görmektedir. Mikrobiyel kültürler gelişimleri süresince indirgeyici bir aktivite göstermektedirler. Bakterilerin redoks potansiyelini değiştirme yetenekleri oksijen varlığında gelişebilme yeteneklerine bağlıdır. Genellikle, mikroorganizmaların gelişebildiği E_h aralığı, aeroblar için +500 ile +300 mV, fakültatif anaeroblar için +300 ile -100 mV ve anaeroblar için +100 ile -250 mV'dir [2].

Kemosentetik organizmalar olan laktik asit bakterilerinin metabolizması bir dizi dehidrojenasyon (oksidasyon) ve hidrojenasyon (indirgeme) reaksiyonlarını içermektedir. Bu metabolizma, enerji ve maddenin korunumu prensibini takip etmekte ve bu nedenle bir terminal elektron alıcısı bulunmasını gerektirmektedir. Homofermantatif laktik asit bakterileri karbon kaynağını (öncelikli olarak karbonhidratları) temel olarak pirüvata indirgemektedir. Homofermantatif laktik asit bakterilerinde bulunan redoks koenzimleri ($NAD^+/NADH$) oksidasyon redüksiyon reaksiyonlarında yer almaktadır. Glukoz glikolizde 2 mol NADH oluşumu ile birlikte 2 mol pirüvata okside olmaktadır. Daha sonra pirüvat, laktik aside indirgenmektedir. Sonuçta, 1 mol glukozdan 2 mol laktik asit oluşmaktadır. Bu nedenle, hücre dışı redoks ortamı laktik asit bakterilerinin biyokimyasal reaksiyonlarını etkileyebilmektedir. Ayrıca, laktik asit bakterileri NADH oksidaz ile oksijeni suya indirgeyebilmektedir. Bu süreç, hücre içi ve hücre dışı redoks potansiyelini değiştirerek, biyokimyasal olayları ve dolayısıyla fermente ürünlerin kalitesini önemli düzeyde etkileyebilmektedir. Bu nedenle redoks potansiyelinin modifikasyonu ve ölçümü, özellikle fermente ürünlerde, ürün kalitesi açısından önemli bilgiler verebilmektedir [3].

Oksidasyon redüksiyon potansiyelinin elektrokimyasal ölçümü yeni olmamakla birlikte, fermantasyon proseslerinin kontrolü için kullanılabilir bir parametre olması nedeniyle bu

konuya olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Hava ile dengede bulunan sütün E_h değeri genellikle +250 mV ile +350 mV arasında değişmekte[4] iken, çoğunlukla peynirler indirgenmiş bir ortama sahiptir. Literatürde Cheddar peyniri için E_h değerinin -118 mV ile -126 mV arasında olduğu [1], başka bir çalışmada -90 mV ile -210 mV arasında değiştiği [5] ve Camembert peyniri için bu değer -300 mV ile -360 mV aralığında olduğu [6] bildirilmiştir [7]. Ayrıca, salamura beyaz peynirin E_h değerinin -60 mV ve -121 mV arasında değiştiği saptanmıştır [8]. Peynirdeki indirgenmiş ortam, starter bakterilerin gelişmesi, kalıntı laktozun fermentasyonu [9] ve hücre metabolizması nedeniyle oksijenin tüketilmesi sonucu oluşmaktadır [10]. Redoks potansiyeli, peynirde, hem mikrobiyel kaynaklı tat-koku bileşiklerinin üretimini (starter ve/veya NSLAB metabolizması sonucu üretilen tat-koku bileşikleri), hem de kimyasal kaynaklı tat-koku bileşiklerini (özellikle uçucu tat-koku bileşikleri) etkilemektedir [7]. Redoks potansiyeli dengeli tat-koku gelişimi için gerekli olan koşulların oluşmasına katkıda bulunmaktadır [11-13]. Peynirlerde, anaerobik koşulları sağlayan düşük redoks potansiyelinin dengeli tat-koku oluşumu için gerekli olduğu bildirilmiştir [14]. Bununla birlikte, redoks potansiyelinin peynirin olgunlaşması üzerindeki etkisi ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Beslenmede oldukça büyük yer tutan bir gıda olan peynirin üretiminde pH, kimyasal bileşim, tuz (NaCl), ve sıcaklık kriterlerine büyük önem verilmektedir. Ancak, temel fizikokimyasal parametrelerden biri olmasına rağmen ölçümündeki zorluklar nedeniyle peynirde redoks potansiyelinin ölçümü göz ardı edilmektedir.

Bu çalışmanın;

- Birinci aşamasını, çalışma kapsamında kullanılan starter laktokok suşlarının sütü indirgeme kapasitesinin ve asidifikasyon aktivitesinin belirlenmesi oluşturmaktadır.
- Ardından, bu suşlar tarafından kontrol, indirgenmiş ve yükseltgenmiş model sistemlerde gerçekleştirilen çeşitli aminoasitlerin katabolizması sonucu üretilen uçucu bileşiklerin saptanması, yani redoks potansiyelinin aminoasit katabolizması üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.
- Çalışmanın üçüncü aşamasında, çeşitli redoks ajanlarının (indirgen ve yükseltgen) fermente sütün redoks potansiyeli ve pH'sı üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre belirlenen redoks ajanlarının (indirgen ajan olarak sodyum hidrosülfid ve yükseltgen ajan olarak potasyum iyodat) peynir üretiminde

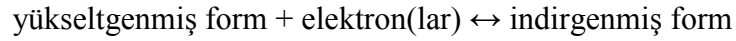
kullanılacak olan konsantrasyonlarının belirlenmesi için yağı azaltılmış ultrafiltre (UF) süt kullanılarak optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir.

- Dördüncü aşamada, çalışmanın bu kısmına kadar elde edilen veriler göz önünde bulundurularak, çalışma kapsamında kullanılan laktokok suşları içerisinde *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu ve *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşları saf starter kültür olarak tam yağlı UF beyaz peynir üretiminde kullanılmak üzere seçilmiştir. Bu çalışmanın UF beyaz peynirde gerçekleştirilmesinin nedeni, bu peynirin üretim prosesinde pıhtının kesimi, peynir altı suyunun drenajı, baskılama, ısıtma işlemi gibi uygulamaların yapılmaması, bu sayede redoks potansiyelinin üretim süresince kontrol altına alınabilmesidir. Peynir üretiminde redoks potansiyelinin kontrol altında tutulabilmesi için, indirgen ajan olarak sodyum hidrosülfid ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}_4$) % 0.01 konsantrasyonunda ve yükseltgen ajan olarak potasyum iyodat (KIO_3) % 0.05 konsantrasyonunda kullanılmıştır. Böylece, her bir starter kültür için kontrol, indirgenmiş ve yükseltgenmiş olmak üzere 3 farklı peynir üretilmiştir. Peynirin üretimi süresince redoks potansiyeli ve pH'da meydana gelen değişim ölçülmüştür.
- Üretilen peynirler 90 gün süreyle olgunlaştırılmıştır. Olgunlaşmanın 7., 30., 60. ve 90. günlerinde örnekleme yapılarak, mikrobiyolojik analizler, bileşim analizleri, olgunlaşma karakteristiklerini belirlemeye yönelik analizler, tekstürel analizler ve duysal analizler gerçekleştirilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Oksidasyon Redüksiyon Potansiyeli

Oksidasyon redüksiyon (redoks) potansiyeli, kimyasal veya biyokimyasal sistemlerin yükseltgenme veya indirgenme eğilimlerini belirleyen önemli bir fizikokimyasal parametredir[1, 7]. Yükseltgenme sürecinde sistemde bulunan bir bileşik elektronlarını vermektedir. İndirgenme ise bu prosesin tersi olarak tanımlanmaktadır. Bir sistemdeki bir bileşik yükseltgendiğinde, bir başka bileşik indirgenmektedir. İndirgenme ve yükseltgenme arasındaki ilişki aşağıdaki gibi yazılabilmektedir [15].



Yükseltgen ajan bir redoks tepkimesinde bir başka bileşikten elektron(lar) alan bileşik olarak, indirgen ajan ise başka bir bileşiğe elektron(lar) veren bileşik olarak tanımlanabilir. pH bir çözeltinin asit-baz karakteristiklerini belirlerken, E_h indirgenme ve yükseltgenme karakteristiklerini belirlemektedir. Aşağıda indirgenme yükseltgenme tepkimesi verilmiştir [3].



Nerst eşitliği redoks potansiyeli ve yükseltgenmiş (Ox) ve indirgenmiş (Red) bileşiklerin aktiviteleri arasındaki ilişkiyi vermektedir:

$$E_h = E_h^0 + 2.3 \times \left(\frac{RT}{nF}\right) \times \log\left(\frac{[Ox]}{[Red]}\right) \quad (2)$$

Burada:

E_h = redoks potansiyeli (mV) (normal hidrojen elektrot ile ilişkili)

E_h^0 = standart redoks potansiyeli (mV) (normal hidrojen elektrot ile ilişkili) (pH 0'da)

F = Faraday sabiti (96500 C.mol⁻¹)

n = değiştirilen elektronların sayısı

R = gaz sabiti (8.31 J.mol⁻¹.K⁻¹)

T = sıcaklık (K)

Bir elektron transferi için $2.3 \times \left(\frac{RT}{nF}\right)$ ifadesinin değeri 25 °C’de 59 mV’tur ve Eşitlik (2) aşağıdaki gibi basitleştirilebilir [7].

$$E_h = E_h^0 + 59 \times \log\left(\frac{[Ox]}{[Red]}\right) \quad (3)$$

Ancak, sulu sistemlerde gerçekleşen kimyasal tepkimeler protonları içermektedir. Bu nedenle aşağıda verilen yarı reaksiyon gerçekleşmektedir.



Buna göre Eşitlik (2) ve (3) sırasıyla aşağıdakiler gibi düzenlenebilir:

$$E_h = E_h^0 - 2.3 \times \left(\frac{mRT}{nF}\right) \times pH + 2.3 \times \left(\frac{RT}{nF}\right) \times \log\left(\frac{[Ox]}{[Red]}\right) \quad (5)$$

m = reaksiyonda yer alan protonların sayısı

$$E_h = E_h^0 - 59 \times pH + 59 \times \log\left(\frac{[Ox]}{[Red]}\right) \quad (6)$$

Eşitlik (5) ve (6), biyokimyasal ve biyolojik proseslere yakın olan pH 7’deki standart redoks potansiyelini (E_h^0) belirlemek için kullanılmaktadır [3].

Eşitlik (6)’ya göre her bir birimlik pH değişiminde E_h değeri yaklaşık 59 mV değişecektir. Ancak, 59 mV’lik düzeltme faktörünün uygulanması sadece basit çözeltiler için geçerlidir. Biyolojik sistemlerde, karışık potansiyele ve/veya çeşitli redoks çiftlerine bağlı olarak tahmin edilen değerlerden sapmalar meydana gelmektedir. Bu nedenle, biyolojik sistemlerde pH düzeltmesi, belli bir sıcaklıkta asit veya baz ilavesi yapılarak E_h değerinin pH ile değişiminin (mV/birim pH) ölçülmesi yoluyla deneysel olarak belirlenmelidir [15, 16]. pH değerlerine karşı E_h değerleri grafiğe geçirilirse, grafiğin eğimi pH’nin birim değişimi için E_h ’deki değişimi ifade eden değeri verecektir [17]. Cachon ve ark.’ın [11] yaptığı çalışmada, steril yağsız süt için 26 °C’de ve 42 °C’de E_h değişimi deneysel olarak sırasıyla, 38 ve 40 mV/birim pH olarak belirlenmiştir. Camembert peyniri ile yapılan başka bir çalışmada da 38 mV/birim pH düzeltme faktörü kullanılmıştır [6]. Kristoffersen ve ark.’ı [18] yaptıkları çalışmada, Cheddar peyniri için düzeltme faktörü olarak 10 °C’de 56.5 mV/birim pH değerini kullanmışlardır. Leistner ve Mirna eşitliğini (Eşitlik (7)) kullanarak E_h ’nin pH’ya bağımlılığını belirlemek mümkün olmaktadır [3].

$$E_{h7} = E_{h\beta} - \alpha \times (7 - \beta) \quad (7)$$

Burada,

E_{h7} = pH 7'deki redoks potansiyeli (mV)

$E_{h\beta}$ = pH β 'daki redoks potansiyeli (mV)

β = ortamın pH'sı

α = Nernst E_h -pH korelasyon faktörü (mV/birim pH)

Referans elektrot ve buna bağlı bir inert soy metal elektrot, tersinir redoks sistemi içeren bir çözeltiye daldırıldığında, redoks potansiyeli voltaj (volt veya milivolt) olarak belirlenebilmektedir. Bu değer,

- i. Mikroorganizma kültürü içindeki redoks potansiyeli oluşumu
- ii. Bir redoks zincirindeki redoks bileşiklerinin sıralaması (solunumda rol alan enzimlerin düzeni gibi)
- iii. Redoks bileşiklerinin serbest entalpisi

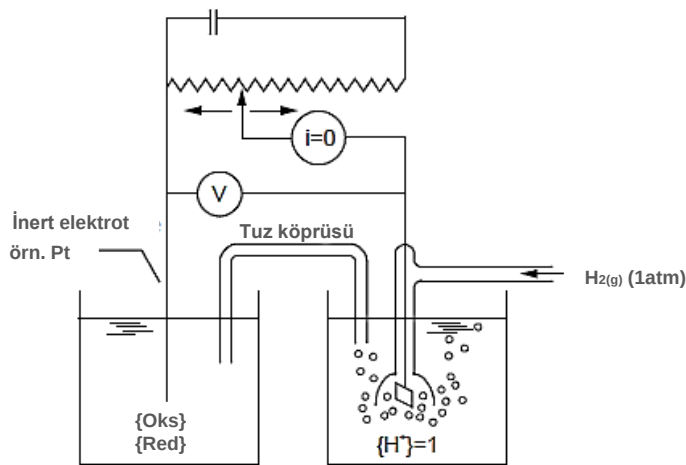
hakkında bilgi vermektedir [15].

2.2 Oksidasyon Redüksiyon Potansiyelinin Ölçümü

Bir sistemin redoks potansiyelini ölçmek için çoğunlukla iki yöntem kullanılmaktadır [7]. Redoks potansiyelini ölçmek için kullanılan ilk yöntem renkli indikatörlere (redoks indikatörleri) dayanmaktadır. Bunlar, çoğunlukla yükseltgenmiş (renkli) ve indirgenmiş (renksiz) koşullar arasında tersinir bir yapıya sahip olan indofenoller veya indigo türevleridir [3]. Çiğ sütün mikrobiyel kalitesini belirlemeye yönelik eski bir yöntem olan metilen mavisi indirgenme testi, metilen mavisinin indirgenme süresi ile bakterilerin sayısı arasındaki genel korelasyondan yola çıkılarak yapılan varsayıma dayanmaktadır [7, 16]. Ancak, biyolojik ortamlarda ve gıdalarda redoks ölçümü için renkli indikatörlerin kullanımı sınırlıdır. Bu moleküller elektron alıcısı veya vericisi olarak davrandıkları için bulundukları ortamın redoks dengesini etkilemekte ve değiştirebilmektedirler. Ayrıca, bu bileşikler biyolojik reaksiyonları katalizleyebilmekte veya inhibe edebilmekte ve mikroorganizmalar için toksik olabilmektedir [3, 7, 15]. Dahası, bazı durumlarda önemli renk değişimlerinin değerlendirilmesi güç olmakta ve bazı redoks indikatörleri ortamın pH'sına göre renk değiştirmektedir. Bu nedenle, redoks indikatörleri nadiren

kullanılmaktadır. Günümüzde daha çok redoks eşiklerinin indikatörü olarak kullanılmaktadır. Özellikle, zorunlu anaerobik kültür besiyerlerinin üretiminde (resazurin), anaerobik mikroorganizmaların gelişimi için gerekli olan indirgenmenin minimum düzeyinin oluşturulması amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca, resazurin süt endüstrisinde, starter kültürlerin indirgeme aktivitesinin belirlenmesi, sterilite testi ve çiğ sütteki mikroorganizma sayısının belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır [3].

İkinci yöntem ise günümüzde çoğunlukla kullanılmakta olan potansiyometrik yöntemdir. Redoks indikatörlerinin aksine potansiyometrik yöntem direkt bir yöntemdir. Potansiyometrik yöntemin prensibi inert bir elektrot (genellikle platin veya altın) ile bir referans elektrot arasındaki potansiyel farkın hassas bir potansiyometre ile ölçümüne dayanmaktadır (Şekil 2.1) [3, 7, 19]. İndirgenmiş veya yükseltgenmiş gruplarla elektron değişimi inert elektrot üzerinde gerçekleşmektedir. İntert elektrot elektrokimyasal olarak stabil olan paslanmaz metalden üretilmiş olmalıdır. Bu metal, ölçüm ortamı ile referans elektrot arasında iletken olarak rol almaktadır. Referans sistem standart hidrojen elektrottur. Ancak, uygulamada kalomel (civa/civa klorür) elektrot veya gümüş/gümüş klorür (Ag/AgCl) elektrodu kullanılmaktadır [3]. Karbon yüzeyde redoks reaksiyonları genellikle hızlı gerçekleştiğinden, karbon inert elektrot olarak kullanılabilir. Karbon elektrotların dezavantajı, elektron transferi her zaman tersinir olmadığı için tekrarlanabilir sonuçların alınamamasıdır [7, 20]. Potansiyometre, elektrotların polarizasyonu olmadan çevrimden üretilen çok düşük voltajların ölçülebilmesi için çok yüksek giriş direncine ($>10^{12} \Omega$) sahip olmalıdır [7, 15].



Şekil 2.1. Redoks potansiyelinin (E_h) ölçümünde kullanılan elektrokimyasal hücre [19]

Potansiyel fark, yükseltgenmiş (Oks) ve indirgenmiş (Red) grupları içeren çözelti ile bağlı olan inert bir elektrot (genellikle Pt) ve bir referans elektrot arasında ölçülmektedir [19].

Redoks potansiyeli volt (V) veya milivolt (mV) olarak ifade edilmektedir. Ölçümlerde kullanılan farklı elektrotlara bağlı olası değişimlerin önlenmesi için, redoks potansiyeli hidrojen elektrodu ile ilişkili olarak verilmelidir [3]. Bu nedenle, ölçülen redoks potansiyeli (E_m) aşağıdaki gibi düzeltilmelidir.

$$E_h = E_m + E_r \quad (8)$$

Burada, E_h normal hidrojen elektrodu ile ilişkili olan redoks potansiyeli (mV), E_m redoks sensörü ile ölçülen redoks potansiyeli (mV) ve E_r ölçümde kullanılan referans elektrodun redoks potansiyelidir. E_r , ölçüm için kullanılan referans elektrodun türüne, dolgu çözeltisinin türüne ve konsantrasyonuna ve ölçüm sıcaklığına bağlıdır (Çizelge 2.1) [21, 22]. Kalomel (doymuş KCl çözeltisi), Ag/AgCl (doymuş KCl çözeltisi) ve Ag/AgCl (3 mol/L KCl çözeltisi) referans elektrotları için karakteristik elektrot değerleri sırasıyla 244, 199 ve 207 mV'dir [7, 22, 23].

Çizelge 2.1. Elektrot kompozisyonu ve sıcaklığın fonksiyonu olarak referans elektrotlar için elektrot potansiyelleri [22]

Standart Hidrojen Elektroda Karşı Potansiyeller (mV)					
Sıcaklık (°C)	0.1 M Kalomel	3.5 M Kalomel	Doygun Kalomel	3.5 M Ag/AgCl	Doygun Ag/AgCl
15	336	254	251	212	209
20	336	252	248	208	204
25	336	250	244	205	199
30	335	248	241	201	194
35	334	246	238	197	189

Martin ve ark.'ı [3], iki referans elektrot için E_r ve sıcaklık arasındaki bağlantıyı Galster 'den [21] alınan verilere göre düzenlenen aşağıdaki eşitlikleri önermişlerdir. Formüllerde yer alan 0.8, 0.7 ve 1.01 değerleri, mV cinsinden sıcaklık katsayılarını ifade etmektedir.

$$\text{Ag/AgCl (3 mol/L KCl çözeltisi)} \quad E_r = 207 + 0.8 \times (25 - T) \quad (9)$$

$$\text{Kalomel (doymuş KCl çözeltisi)} \quad E_r = 244 + 0.7 \times (25 - T) \quad (10)$$

$$\text{Ag/AgCl (doymuş KCl çözeltisi)} \quad E_r = 199 + 1.01 \times (25 - T) \quad (11)$$

McSweeney ve ark.'ı [7], süt gibi sıvı gıda örneklerinin redoks potansiyelinin potansiyometrik ölçümü için inert metal bir elektrot ve bir referans elektrot veya kombine elektrotların direkt olarak kullanılabildiğini bildirmiştir. Ancak, peynir gibi düşük nem içeriğine sahip katı gıdaların redoks potansiyelinin ölçümü için KCl tuz köprüsünün kullanımının gerekli olduğunu belirtilmektedir [1, 7]. Tuz köprüsü olarak KCl'nin kullanılmasının nedeni, K^+ ve Cl^- iyonlarının eşit mobiliteye sahip olması, buna bağlı olarak da bağlantı potansiyelinin ihmal edilebilecek kadar küçük olmasıdır [22].

Temel olarak, pH ölçümlerinden farklı olarak redoks potansiyelinin ölçümünde kalibrasyona gerek duyulmamaktadır [7]. Ancak yine de, sistemden elde edilen verilerin doğrulamasını yapmak için sensörün doğruluğunu, redoks potansiyeli bilinen standartlara karşı test etmek gereklidir [7, 23]. Redoks tampon çözeltisi olarak ifade edilen birçok ticari kimyasal redoks sensörlerinin test edilmesi için önerilmektedir. Bunların tamamı +200 ile +700 mV arasında E_m değerine sahip yükseltgen çözeltilerdir. Kimyasal stabilite ile ilgili problemler ortaya çıktığı için uygun bir indirgen çözelti bulunmamaktadır. Bu çözeltiler güçlü bir şekilde tamponlanmıştır ve bu durum ölçümde meydana gelebilecek olan muhtemel bir sapmayı maskeleyebilmektedir. Böylece, bu çözeltiler bazı üreticiler tarafından belirtildiği şekilde, sadece referans elektrotların kontrolü için önerilmektedir. Redoks tampon çözeltilerinde yapılan ölçüm hatalı ise, yanlış referans elektroliti, tıkalı veya kirli diyafram ve sensör içindeki elektrik bağlantısı ile ilgili bir problemden şüphelenilebilir [23]. Yapılan bazı çalışmalarda, redoks elektrotlarının doğrulaması, musluk suyu [23-25], 0.066 M fosfat tamponu (pH 7.0) [15], doymuş KCl çözeltisi [18] veya 3M KCl çözeltisine [1, 8] karşı yapılmıştır [7].

Süt ve peynir gibi biyolojik sistemlerde, redoks potansiyeli ölçümü her zaman kolaylıkla gerçekleştirilememektedir. Ölçümdeki zorluklar ile çoğunlukla, farklı elektrotlar ile tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesinde ve ölçümün dengeye gelmesinde karşılaşılmaktadır. Ancak, üretici talimatlarına uygun olarak yapılan elektrot temizliği ile bu zorlukların üstesinden gelinmektedir. Jacob'a [15] göre metal elektrot yüzeyinin

cilalanması (seryum oksit veya platin elektrotlar için alüminyum oksit ile) tekrarlanabilir redoks ölçümleri gerçekleştirilmesinde önemli etkiye sahiptir [7].

Topçu ve ark.'ın [1] yaptıkları çalışmada, Cheddar peynirinin redoks potansiyelinin ölçümü için kendinden yalıtılmış platin elektrot geliştirilmiş ve bu elektrot ile tekrarlanabilir ölçümler alınmıştır. pH elektrotlarından farklı olarak, redoks elektrotları örneğin yapısına bağlı olarak dengeye gelmek için belli bir süreye ihtiyaç duymaktadır. Düşük nem içeriği nedeniyle, Cheddar peynirinin redoks ölçümü oldukça fazla zaman almaktadır. Yapılan bir başka çalışmada, Camembert peynirinin redoks potansiyelinin ölçümünde mikro elektrot kullanıldığında dengeye 10 dakikada gelirken, kombine elektrot kullanıldığında 1 saatte denge değerine ulaşıldığı bildirilmiştir [6].

2.3 Oksidasyon Redüksiyon Potansiyeli ve Mikroorganizmalar

Oksidasyon redüksiyon reaksiyonları, enerji açısından zengin bileşiklerin kademeli olarak yükseltgendiği biyolojik sistemlerde enerji üretiminin temel prensibidir. Mikrobiyel katabolizmada önemli rol oynayan bazı redoks çiftlerinin redoks potansiyelleri (E_h^0) Çizelge 2.2'de verilmiştir. Oksijen gerilimi ve redoks potansiyeli mikroorganizmaların gelişimini ve canlılığını etkilemektedir. Genellikle, mikroorganizmaların gelişebildiği E_h aralığı, aeroblar için +500 ile +300 mV, fakültatif anaeroblar için +300 ile -100 mV ve anaeroblar için +100 ile -250 mV'dir. Mikrobiyel kültürler, oksijen varlığında gelişme yeteneklerine bağlı olan gelişimleri süresince indirgeme aktivitesine sahiptirler. Redoks dengesinin düzenlenmesi, hücre içi ve hücre dışı redoks durumunun ve redoks homeostazının kontrolü için hayati önem taşımaktadır. Hücrel redoks potansiyelinin düzenlenmesi, proteinlerin disülfid bağlarının indirgenmesi ve yükseltgenmesinde önemli rol oynamaktadır. Hücrel tiyol-redoks dengesi, tiyol-redoks enzimleri tarafından yönlendirilmektedir. Redoks sensörleri tarafından düzenlenen redoks ve oksijen konsantrasyonunu hücrelerin algılamasını sağlayan moleküler mekanizmalar, redoks sinyallerini düzenleyici çıktılara dönüştürmektedir [2].

Çizelge 2.2. Mikrobiyel katabolizmada önemli olan redoks çiftlerinin redoks potansiyelleri [2]

Yarı reaksiyon	E_h^0 (mV)
Suksinat + CO ₂ + 2H ⁺ + 2e ⁻ ↔ α-Ketoglutarat + H ₂ O	-670
Asetat + 2H ⁺ + 2e ⁻ ↔ Asetaldehit	-580
2H ⁺ + 2e ⁻ ↔ H ₂	-415
α-Ketoglutarat + CO ₂ + 2H ⁺ + 2e ⁻ ↔ İzositrat	-380
NADP ⁺ + 2H ⁺ + 2e ⁻ ↔ NADPH + H ⁺	-324
NAD ⁺ + 2H ⁺ + 2e ⁻ ↔ NADH + H ⁺	-320
FAD ⁺ + 2H ⁺ + 2e ⁻ ↔ FADH ₂	-219
SO ₄ ²⁻ + 10H ⁺ + 8e ⁻ ↔ H ₂ S + 4H ₂ O	-210
Asetaldehit + 2H ⁺ + 2e ⁻ ↔ Etanol	-197
Pirüvat + 2H ⁺ + 2e ⁻ ↔ Laktat	-185
Oksaloasetat + 2H ⁺ + 2e ⁻ ↔ Malat	-166
SO ₃ ²⁻ + 3H ₂ O + 6e ⁻ ↔ S ²⁺ + 6OH ⁻	-116
Fumarat + 2H ⁺ + 2e ⁻ ↔ Süksinat	+31
Ubikinon + 2H ⁺ + 2e ⁻ ↔ Ubikinol	+45
2Sitokrom c _(oks) + 2e ⁻ ↔ 2Sitokrom c _(red)	+254
NO ₂ ⁻ + H ₂ O + e ⁻ ↔ NO + 2OH ⁻	+374
2Sitokrom a ₃ _(oks) + 2e ⁻ ↔ 2Sitokrom a ₃ _(red)	+385
NO ₃ ⁻ + H ₂ O + 2e ⁻ ↔ NO ₂ ⁻ + 2OH ⁻	+420
Fe ³⁺ + e ⁻ ↔ Fe ²⁺	+771
1/2O ₂ + 2H ⁺ + 2e ⁻ ↔ H ₂ O	+815

2.3.1 Oksidasyon Redüksiyon Potansiyeli ve Mikrobiyel Gelişim

Mikrobiyel kültürler gelişimleri süresince indirgeyici bir aktivite göstermektedirler. Bakterilerin redoks potansiyelini değiştirme yetenekleri, oksijen varlığında gelişebilme yeteneklerine bağlıdır. Gelişmekte olan mikrobiyel hücrelerin indirgeme aktivitesi, metabolik aktiviteleri sonucu redoks potansiyelinin düşmesi ile karakterize edilmektedir. Bu durum, elektron alıcıları gibi yükseltgen moleküllerin kullanımı ve indirgen bileşiklerin üretimine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Mikrobiyel gelişim süresince E_h 'nin düşmesinin önemli mekanizmalarından biri oksijenin harcanmasıdır [2].

Mikrobiyel hücreler tarafından enerji üretimi, glikoliz ve sitrik asit döngüsü gibi indirgenmiş elektron taşıyıcılarının üretildiği (nikotinamid adenin dinükleotid: NADH, flavin adenin dinükleotid: FADH₂) biyoenerjetik yollar üzerinden organik bileşiklerin oksidasyonuna dayanmaktadır. Adenozin trifosfat (ATP), elektron transfer sistemi (ETS) aracılığı ile yükseltgenmiş elektron vericilerden bir elektron alıcısına elektron taşıyan oksidatif fosforilasyon ile üretilmektedir. ETS, bakterilerde sitoplazmik membranda ve funguslarda ise iç mitokondriyal membranda yer almaktadır. Elektronlarda bulunan enerjiyi kullanırken, protonlar membranın dış yüzeyine yerleşmektedir. Bu durum, ATP'den adenozin difosfat (ADP) ve P_i oluşturan ATPazı yönlendiren bir transmembran elektrokimyasal gradyent üretmektedir. Aerobik solunum süresince, ETS'nin son elektron alıcısı olan oksijen suya indirgenmektedir. Aerobik solunum ile enerji üretimi için elektron alıcısı olarak oksijene ihtiyaç duyan zorunlu aerobik mikroorganizmalar, E_h'yi +500 mV'den -100 mV'ye düşürebilmektedir. Gıdalarda bozulmaya yol açan aerobik mikroflora baskın olarak *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Moraxella* ve *Pseudomonas* türlerinden oluşmaktadır. Bu bakteriler, gıdaların yüzeyinde veya havayla kolaylıkla temas edebilecekleri bölgelerde gelişmektedirler. Buna karşılık, fakültatif anaerobik ve zorunlu anaerobik mikroorganizmalar fermantasyon ile ATP üretmektedirler. Fermantasyonun son ürünleri, kısmi oksidasyon sonucu ortaya çıkan enerjice zengin metabolik bileşiklerdir ve çoğunlukla, indirgen NADH'nin yeniden oksidasyonu yoluyla üretilmektedirler. H₂ (E_h^{0'} = -415 mV) veya H₂S (E_h^{0'} = -210 mV) gibi kuvvetli indirgen fermantasyon son ürünlerinin üretilmesi de bakteriyel indirgeme kapasitesini açıklayabilmektedir. *Escherichia coli* ve *Clostridium* türleri fermantasyon sonucu H₂ üretebilmektedir. Zorunlu anaerobik mikroorganizmalar çok düşük konsantrasyondaki oksijen varlığında dahi gelişememektedirler. Genellikle, zorunlu anaerobik mikroorganizmalar +100 mV ile -250 mV'den daha düşük değerlerdeki E_h aralığında gelişebilmekte ve ortamın E_h değerini +100 mV'den -500 mV'ye düşürebilmektedirler. *Clostridium perfringens* yaklaşık +200 mV E_h değerinde gelişmeye başlayabilmektedir. *Clostridium botulinum* optimum gelişim için +60 mV'den daha düşük E_h değerine ihtiyaç duymaktadır. Gelişimi sınırlayıcı faktör olarak E_h değeri, tuz ile önemli ölçüde artırılabilir. Oksijensiz koşullarda bakteri sayısı, nitrat, fumarat, trimetilamin N-oksit (TMAO) veya tiyosülfat gibi alternatif elektron alıcılarının oksidatif fosforilasyonu ile azaltılabilmektedir. Balık ürünlerinde temel oksidan ajan olarak kullanılan TMAO, bozulma etmeni olan veya patojen bakteriler için elektron alıcısı olarak rol oynamaktadır. Örneğin, bu koşullar altında, TMAO elektron alıcısı olarak kullanıldığında, C.

botulinum'un gelişimini sınırlayıcı faktör olan E_h değeri +150 mV'den yüksek olabilmektedir [2].

2.3.2 Gıda Mikrobiyolojisinde Redoks Potansiyeli Uygulamaları

Mikrobiyolojik test için redoks potansiyeli ölçümünün hızlı bir yöntem olarak kullanılması

Redoks potansiyelinin ölçümünün, mikrobiyel kontaminasyonun kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmesinde hızlı ve kullanışlı bir yöntem olabileceği düşünülmektedir. Mikrobiyel gelişim E_h değerinin düşmesine neden olmakta ve mikroorganizmanın türüne göre farklı E_h eğrileri elde edilmektedir. Yeni nesil redoks sensörleri ile empedans ve iletkenlik ekipmanlarına benzer şekilde otomatik sistemler geliştirilmiştir. E_h 'nin zamana bağlı değişimi ile mikroorganizmaların başlangıç konsantrasyonlarının logaritması arasında lineer bir korelasyon kurulabilmektedir. Bu standart kalibrasyon eğrisi, başlangıç hücre konsantrasyonunu genellikle 10 hücre/mL nicel analiz sınırı ile belirlemek için kullanılmaktadır. Redoks potansiyeli yöntemi empedans tekniğinin bazı dezavantajlarının önüne geçmektedir. Konvansiyonel sıvı besiyeri kullanılabilmekte, hassas sıcaklık ayarlamasına ihtiyaç duyulmamaktadır ve daha basit ve ucuz bir yöntem olduğu belirtilmektedir [2].

Redoks potansiyeli ve ısıl stabilite

Yapılan bazı çalışmalar, redoks potansiyelinin bakteriyel ısıl direncin üzerindeki etkisini ele almaktadır. Oksijensiz ortamda, *E. coli* O157:H7'nin ısıl direnci pH'ye bağlı olarak önemli ölçüde değişiklik göstermiştir. *Lactobacillus plantarum* ve *Saccharomyces cerevisiae*, gaz modifikasyonu yoluyla redoks potansiyeli artırılan portakal suyunda yüksek oranda termal yıkıma uğramıştır. *E. coli*, *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* Enteritidis'in ısıl direnci aerobik koşullar altında yükseltgen anaerobik koşullara göre daha düşüktür. Yükseltgen koşullar, mikroorganizmaların termal inaktivasyonunu, sadece oksijen varlığında ısıl işlem ile artırmaktadır. Redoks potansiyelinin mikroorganizmaların termal inaktivasyonu üzerindeki etki oldukça karmaşıktır ve henüz açıkça anlaşılamamıştır. Bu durum, redoks potansiyelini ayarlamak için kullanılan yöntem ve mikroorganizma gibi faktörlerden kaynaklanmaktadır [2].

İndirgen bir gaz ile E_h 'nin kontrolü yöntemi, üretim süresince endüstriyel mikroorganizmaların canlılığını sürdürebilmesi için kullanılmaktadır. İndirgen koşulların,

fermente gıdalarda (probiyotik içeren fermente süt gibi) veya süt ve süt ürünleri endüstrisi için starter veya ek kültür olarak liyofilize laktik asit bakterilerinin ve *Bifidobacterium*'un üretimi süresince bakterilerin canlılığının artması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [2].

2.3.3 Oksidasyon Redüksiyon Potansiyeli ve Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB), Gram-pozitif, spor oluşturmeyen bakterilerin farklı gruplarını kapsamaktadır. LAB kok veya basil şekilli ve genellikle katalaz negatif (nadir olarak pseudo-katalaz bulunabilmektedir) olarak bulunmaktadırlar. Kemo-organotrofik olan LAB sadece kompleks ortamlarda gelişebilmektedir. Fermente edilebilir karbonhidratlar enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Heksozlar, homofermantatifler tarafından temel olarak laktata veya heterofermantatifler tarafından laktata ek olarak asetat, etanol, CO₂, format veya süksinat gibi diğer ürünlere degrade olmaktadır. LAB gıdalarda (süt ürünleri, fermente et ürünleri, ekşi hamur, fermente sebzeler, silaj, içecekler), bitkilerin yüzeyinde, atık sularda ve ayrıca, insan ve hayvanların genital bölgelerinde, intestinal sistemlerinde ve solunum yollarında bulunmaktadır [26]. LAB özellikle fermente süt ürünlerinin üretiminde biyoteknolojik olarak büyük öneme sahiptir. LAB gıda bileşenleri ile interaksiyona girmekte ve kompleks biyokimyasal reaksiyonlar aracılığıyla gıdanın özelliğini değiştirmektedir [11].

Mikrobiyel gelişimin uygun redoks potansiyeli tarafından sınırlandırıldığı ve artırıldığı uzun zamandır bilinmekte ve E_h'nin peynir mikrobiyolojisi ve tat-koku gelişimi üzerindeki etkisi bazı araştırma grupları tarafından incelenmektedir [1, 5, 6, 8, 27-33]. Bu çalışmalarda, peynirdeki kalıntı laktozun starter bakteriler tarafından fermentasyonu sonucunda indirgenmiş bir ortam oluşmakta ve buna bağlı olarak, kompleks biyokimyasal reaksiyonlar dizisinin gerçekleşmesinin kolaylaştığı ve olgunlaştırılmış peynirlerdeki oksijene duyarlı tat-koku bileşikleri korunduğu belirlenmiştir [33].

Bir laktik asit bakterisi olan *Lactococcus lactis*, süt endüstrisinde starter kültür olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır. Temel rolü sütte asit üretimini gerçekleştirmek olan *L. lactis*, indirgeme kapasitesi en yüksek olan laktik asit bakterilerinden bir tanesidir ve süütün redoks potansiyelinin çok düşük değerlere ulaşmasını sağlamaktadır [11, 34, 35]. Redoks potansiyeli birçok süt ürününün mikrobiyotasını etkilemektedir. Laktik asit bakterilerinin indirgeme kapasiteleri, türler arasında farklılık gösterdiği gibi suşlar arasında da farklılık göstermektedir [36]. Redoks potansiyeli, peynirde bulunan starter ve/veya ek kültür ve ikincil floranın gelişimini ve aktivitesini [8, 33, 37] ve *Lactobacillus acidophilus*,

Bifidobacterium veya *Enterococcus faecium* gibi probiyotik bakterilerin süt ürünlerindeki canlılığını [8, 35, 38] etkilemektedir. Ayrıca, ortamın redoks potansiyeli aroma bileşikleri oluşumunu ve stabilitesini de etkilemektedir [32, 39].

Bakteriyel olgunlaştırılan peynirlerde tat-koku gelişimi, LAB ve enzimlere ihtiyaç duyan kompleks ve dinamik bir prosestir [40]. Bu prosese katkıda bulunan LAB, starter ve ek kültür olarak eklenmekte ve ayrıca, starter olmayan laktik asit bakterileri (NSLAB) süt veya proses ortamı yoluyla peynirde bulunmaktadır [9]. Peynirdeki, starter veya ek kültürlerin türü ve sayısı kolaylıkla kontrol altında tutulabilirken, NSLAB sayısı ve çeşitliliği ve peynir kalitesi üzerindeki etkisi çoğu zaman kontrol edilememektedir [33]. Boucher ve ark.'ın [33] yaptıkları çalışmada, starter kültürlerin ve NSLAB'nin gelişimi süresince ortam E_h 'sinin suşa bağlı olarak değiştiği ve ortam E_h 'sinin NSLAB'nin gelişim hızını etkilediği belirlenmiş ve bu durumun, peynirin olgunlaşması sırasında herhangi bir zamanda çoğalan NSLAB türlerinin veya suşlarının belirlenmesinde E_h 'nin önemli rol oynayabileceği bildirilmiştir.

Brasca ve ark.'ı [34], geleneksel İtalyan peynirlerinden on farklı LAB türünü (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Enterococcus durans*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* ve *Pediococcus pentosaceus*) izole etmişler ve bu türlerin indirgeme kapasitelerini araştırmıştır. Laktokokların en düşük redoks potansiyeli değerine laktobasillerden önce ulaştığı gözlenmiştir. *Enterococcus* türlerinin ve *L. lactis* subsp. *lactis*'in indirgeme hızının streptokoklar ve *Lactobacillus* türlerinin indirgeme hızından daha yüksek olduğu bulunmuştur. *P. pentosaceus* diğer türlerle karşılaştırıldığında ise oldukça düşük indirgeme kapasitesine sahip olduğu tespit edilmiştir [34].

Cachon ve ark.'ın [11] yaptıkları çalışmada, sütün fermentasyonu süresince *L. lactis*'in dokuz farklı suşunun, *S. thermophilus*'un altı farklı suşunun ve *L. helveticus*'un beş farklı suşunun asidifikasyon ve indirgeme aktiviteleri araştırılmıştır. Genellikle, laktokokların maksimum indirgeme hızının, streptokoklar ve laktobasillerden yaklaşık altı kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, streptokokların ve laktobasillerin, laktokoklara göre daha yüksek asit üretme hızına sahip oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca, bu üç LAB türünün, temel bileşen analizi ile asidifikasyon ve indirgeme yeteneklerine göre belirgin şekilde birbirlerinden ayrıldığı bildirilmiştir. Bu yöntemin, fermente süt

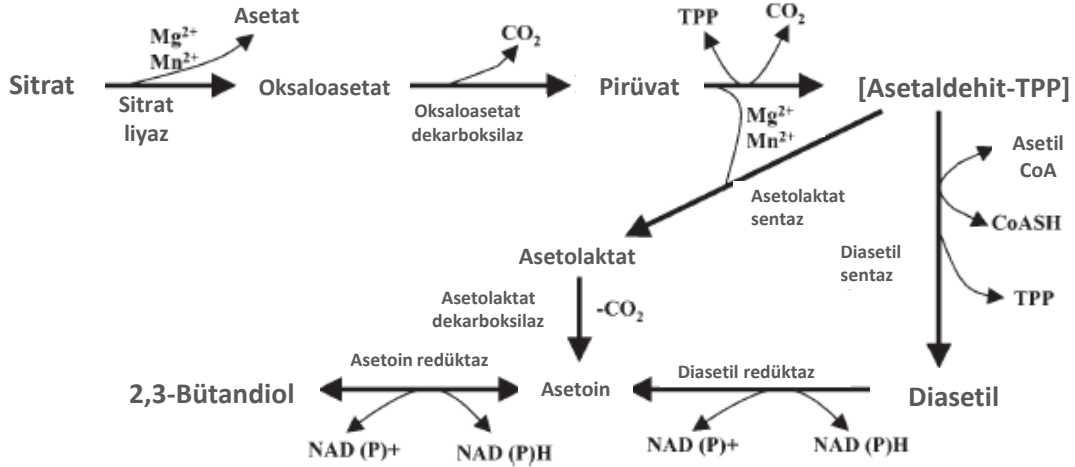
ürünlerinin üretimi için uygun starter seçiminde kullanılabileceği ifade edilmiştir [11]. Yapılan benzer çalışmalarda da, redoks kapasitesinin suşlar arasında farklılık gösterdiği ve E_h gelişim eğrisinin türler arasında belirgin farklılıklara sahip olduğu bildirilmiştir [12, 36].

Morandi ve ark.'ı [13], *L. lactis*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans* ve *S. thermophilus* türlerine ait toplam 709 yabancı suşun indirgeme aktivitelerini araştırmıştır. Suşların çoğunda, sütün indirgenmesinin üç fazda tanımlanabildiği; ilk fazda E_{h7} 'nin stabil kaldığı ve çok yavaş azaldığı, ikinci fazda E_{h7} 'nin en düşük değerine düştüğü (E_{h7min}) ve üçüncü fazda ise E_{h7} ya en düşük değerde stabil kaldığı ya da çok az arttığı bildirilmiştir. *S. thermophilus* düşük indirgeme kapasitesi ile karakterize edilirken, *L. lactis* ve *E. faecalis*'in indirgeme kapasitesi en yüksek olan türler olduğu bulunmuştur. Bu durumun, *L. lactis* ve *E. faecalis*'in sütün redoks potansiyelinin indirgenmesinde rol oynayan menakinonları (Vitamin K_2) üretebilmesinden, ancak *S. thermophilus*'un bu bileşikleri sentezleyememesinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür [13, 35, 41]. Ayrıca, en fazla heterojenitenin *E. durans* ve *E. faecium* suşları arasında olduğu belirtilmiştir [13].

2.3.4 Redoks Potansiyelinin Laktik Asit Bakterileri Tarafından Gerçekleştirilen Aroma Biyosentezi Üzerindeki Etkisi

Redoks potansiyeli, fermente süt ürünlerinin mikrobiyel kalitesine katkıda bulunmakta [13, 32, 36-38] ve dengeli tat-koku gelişimi için gerekli olan koşulların oluşmasını [3, 32, 39, 42] sağlamaktadır. Genellikle, peynir kalitesi ve fermente süt ürünlerinin tat-koku karakteristiklerinin yeterli gelişimi için negatif E_h değerlerinin gerekli olduğu ileri sürülmektedir [43].

İnek sütü sitratı göreceli olarak düşük düzeyde (~8 mM) içermektedir. Sütte bulunan sitratın yaklaşık % 90'ı çözünmüş halde bulunmakta ve bunun büyük bir kısmı peynir üretimi sırasında peyniraltı suyu ile kaybedilmektedir [44]. *Leuconostoc* ve *L. lactis* subsp. *diacetylactis* gibi bazı LAB sitratı diasetile metabolize edebilmektedirler. Şekil 2.2'de *Lactococcus* ve *Leuconostoc* tarafından gerçekleştirilen sitrat metabolizmasının mekanizması verilmiştir. Diasetil, tereyağ ve taze peynirler gibi süt ürünlerinin karakteristik tat-kokusunun oluşumunda rol oynamaktadır. Bu metabolizmanın anahtar basamağı α -asetolaktatın dekarboksilasyonudur. Yükseltgen koşullarda, oksidatif dekarboksilasyon gerçekleşmekte ve diasetil üretilmektedir. İndirgen koşullarda ise, α -asetolaktatın enzimatik dekarboksilasyonu sonucu aseton oluşmaktadır. Reaksiyonun diasetil üretimi yönünde ilerlemesi için gerekli olan yükseltgen koşullar sütün aerasyonu ile mümkün olabilmektedir [2].

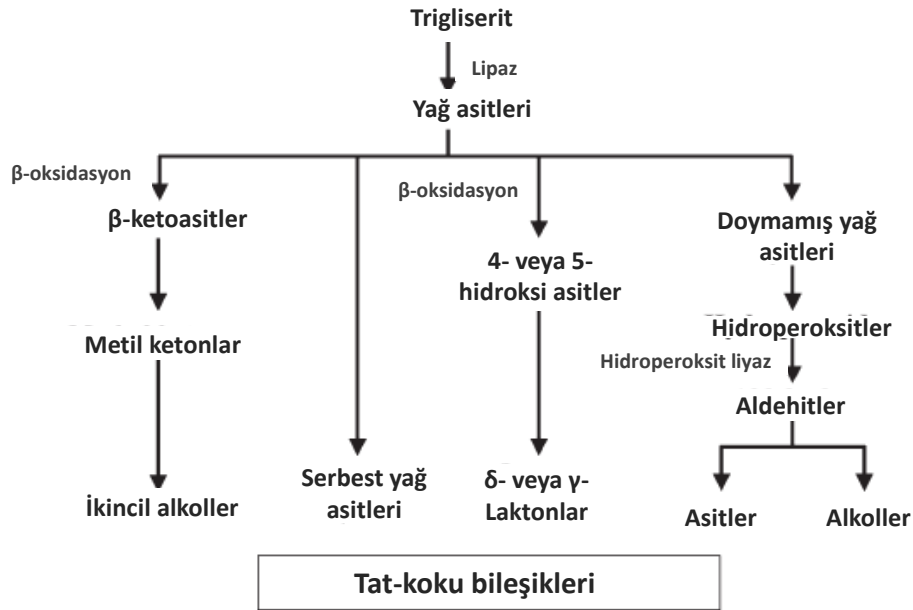


Şekil 2.2. *Lactococcus* ve *Leuconostoc* tarafından gerçekleştirilen sitrat metabolizması [45]

Peynirde bulunan sitrat *Lactococcus* ve *Leuconostoc*'tan oluşan karışık kültürün sürekli karıştırılması, 2-asetolaktatın oksidatif dekarboksilasyonuna olanak sağladığı için diasetil üretimini teşvik etmektedir [46, 47]. Karıştırılmayan kültürlerde ise, ortamın redoks potansiyeli fermantasyonun başlangıcında hızla düşmektedir. Bu durumda sadece asetoin ve 2-asetolaktat üretilmektedir. *L. lactis* subsp. *lactis* kültürü ortamına kontrollü şekilde oksijen verilmesi durumunda, diasetil sentazın aktivitesinin artmasına bağlı olarak diasetil üretimi gerçekleşmektedir [48]. Yapılan bir çalışmada, pirüvattan karbon akışının dağılımının, NADH / NAD⁺ oranına, hücre içi redoks potansiyeline veya metabolitlerin ve özellikle pirüvatın konsantrasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir [49]. Peynirdeki diasetil konsantrasyonunu arttırmak için süte hava veya oksijen ilavesinin gerekli olduğu yapılan bir çalışmada belirtilmiştir [43].

İndirgenmiş E_h koşulları altında olgunlaştırılan peynirlerde, uçucu yağ asitlerinin üretiminin arttığı bildirilmiştir [50]. Serbest yağ asitleri birçok farklı reaksiyona katılabilmektedir (Şekil 2.3). Metil ketonlar yağ asitlerinin oksidatif degradasyonu sonucu oluşmaktadır. Metil ketonların üretimi yağ asitlerinin β-ketoasitlere oksidasyonunu içermektedir. Metil ketonlar esas olarak, mavi damarlı peynirlerin karakteristik aromasından sorumludur. Ancak, Cheddar gibi peynirlerin aromasında sınırlı rol oynamaktadır. Son olarak, metil ketonlar peynir aromasına katkıda bulunmayan ikincil alkollere indirgenebilmektedir [44]. Doymamış yağ asitlerinin özellikle çoklu doymamış yağ asitlerinin girdiği bir diğer reaksiyon oksidasyondur. Bununla birlikte, peynirdeki oksidasyon derecesi peynirin düşük redoks potansiyeline sahip olmasına ve doğal antioksidanları içermesine bağlı olarak oldukça sınırlıdır. Bu etkenler oksidasyon

mekanizmalarının başlatılmasını engellemekte veya birincil oksidasyon ürünlerinin indirgenmesini sağlayan koşulları oluşturmaktadır [51]. Alifatik ve aromatik esterler peynirin tat-kokusu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir, ancak, bazen Cheddar peynirinde istenmeyen tat-kokuya neden olabilmektedirler. Peynirde bulunan esterler, kısa ve orta zincirli yağ asitleri ile alkoller (alifatik (etanol), aromatik (feniletanol) veya tiyoller (metantiyol)) arasında gerçekleşen esterleşme reaksiyonu sonucu sentezlenmektedir. Esterler laktik asit bakterileri tarafından enzimatik olarak da üretilebilmektedir [52, 53]. Peynirde tespit edilen γ - ve δ -laktonların özellikle Cheddar peynirinde tat-koku için önemli olduğu bildirilmiştir [54]. Laktonlar halkalı yapıyı oluşturmak için su kaybetmesi yoluyla hidroksi asitlerin intramoleküler esterifikasyonu sonucu oluşan halkalı yapıdaki esterlerdir. Güçlü bir aromaya sahip olan laktonlar özellikle peynirimsi bir aromaya sahip olmamalarına rağmen, peynirin genel tat-kokusu üzerinde önemli rol oynayabilmektedirler. Peynirde lakton oluşumunda kabul edilen mekanizma olarak, süt yağının normal bileşenlerinden olan hidroksi yağ asitlerinin salınması ve bunu takiben laktonizasyonu önerilmektedir [44].

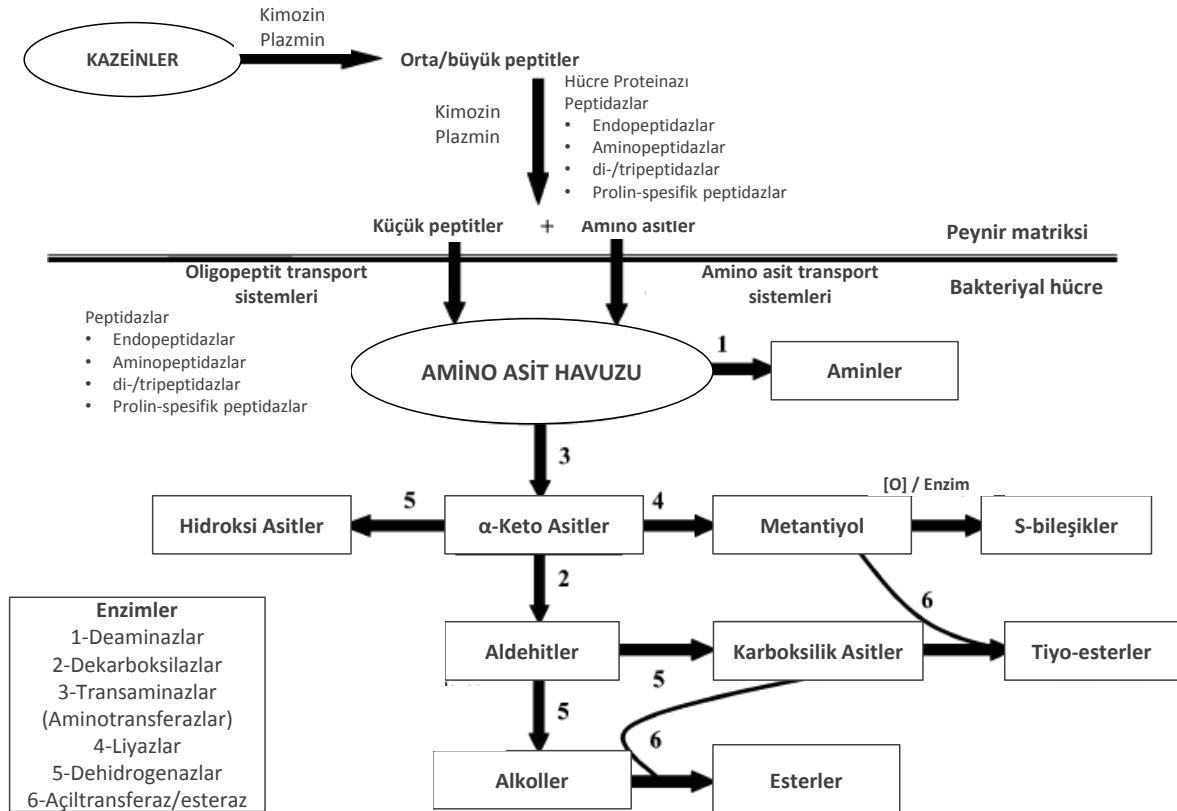


Şekil 2.3. Süt trigliseritlerinin ve yağ asitlerinin metabolizmasının genel yolları [44]

Kieronczyk ve ark.'ın [39] yaptıkları çalışmada, ortamın redoks potansiyelinin, *L. lactis* hücreleri tarafından gerçekleştirilen aminoasit katabolizması sonucu üretilen aroma bileşiklerini büyük ölçüde etkilediği belirlenmiştir. Yükseltgen koşullarda malt, çiçek, meyve, badem ve lahana aromalarından sorumlu olan aldehitlerin ve uçucu kükürtlü bileşiklerin üretiminin gerçekleştiği bildirilmiştir. İndirgen koşulların ise hidroksi asitlerin üretimi ve aşırı olgunlaşmış peynir aromasına katkıda bulunan fenilasetik, metiltiyopropiyonik ve izovalerik asitler gibi karboksilik asitlerin üretimini teşvik ettiği saptanmıştır. Bu sonuçlara göre peynir üretimi ve olgunlaşması süresince E_h 'nin kontrol altında tutulmasının peynirde aroma oluşumunun kontrol edilebilmesine olanak sağlayacağı bildirilmiştir [39]. Laktokoklarda aminoasit degradasyonunun birinci basamağı α -keto asitlerin oluşumuna neden olan transaminasyondur (Şekil 2.4). Aromatik aminotransferaz enzimleri daha önce *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* [55, 56] ve *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*'ten [57] karakterize edilmiştir. Bu enzimler peynirdeki tat-koku bileşiklerinin öncülü olarak bilinen valin, lösin, izolösin, fenilalanin, tirozin, triptofan ve metiyoninin degradasyonunu başlatmaktadır (Çizelge 2.3'te çeşitli katabolitler ve aroma notaları görülmektedir).

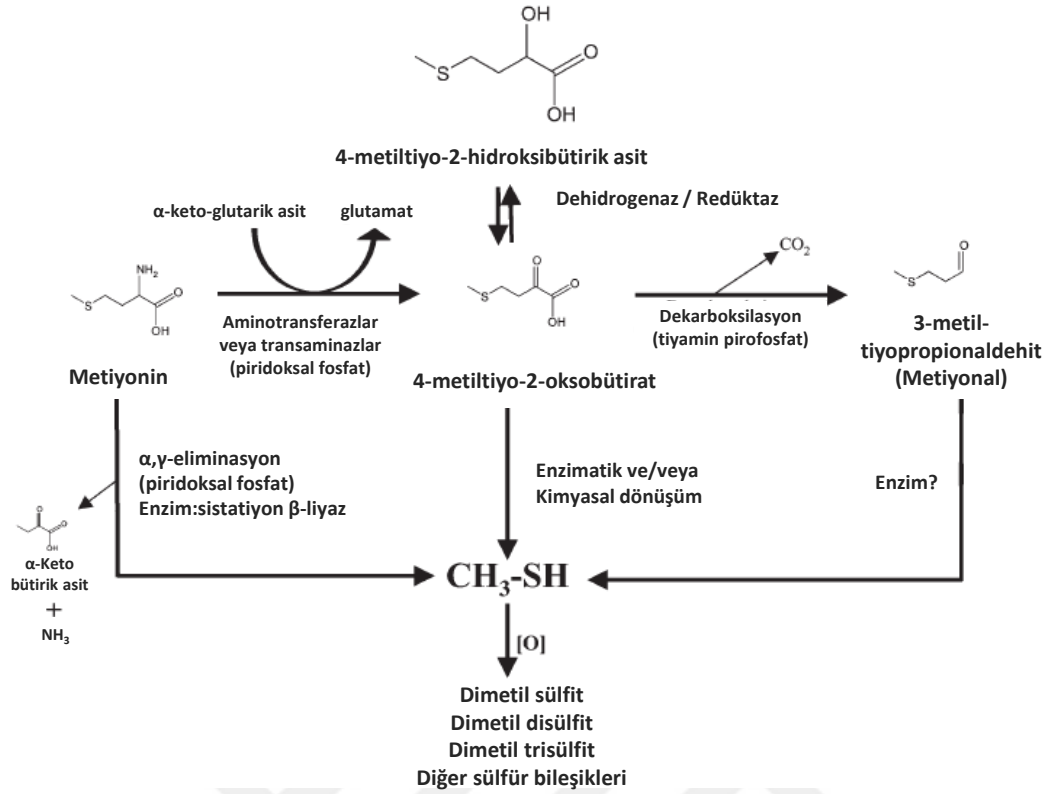
Çizelge 2.3. Cheddar peynirinden izole edilen laktik asit bakterileri tarafından üretilen aminoasit katabolitleri [44]

Katabolik ürünler	Öncül aminoasitler	Aroma notası
2-Metil propanoik asit	Valin	Ransit tereyağı, ter kokusu, tatlı, elma benzeri
2-Metil-1-propanol	Valin	Keskin, alkol, şarap benzeri
2-Metil propanal	Valin	Malt
3-Metil bütanoik asit	Lösin	Peynirimsi, ter kokusu, çorap kokusu, ransit, fekal, çürümüş meyve
3-Metil-1-butanol	Lösin	Meyvems, alkol, çözücü benzeri,
3-Metil bütanal	Lösin	Bitter çikolata, malt
2-Metil bütanoik asit	İzolösin	Meyvems, mumsu, ter-yağ asidi kokusu
2-Metil-1-bütanol	İzolösin	-
2-Metil bütanal	İzolösin	Bitter çikolata, malt
3-(Metiltiyo) propanal	Metiyonin	Pişmiş/haşlanmış patates
3-(Metiltiyo) propanol	Metiyonin	Pişmiş/haşlanmış patates
Metantiyol	Metiyonin/sistein	Lahana, haşlanmış lahana, kükürtlü
Metil sülfid	Sülfür içeren	Lahana, kükürtlü
Dimetil disülfid	Sülfür içeren	Soğan
Dimetil trisülfid	Sülfür içeren	Sarımsak
Dimetil tetrasülfid	Sülfür içeren	Lahana
Asetofenon	Fenilalanin	Badem, küflü, tutkal
Benzaldehit	Fenilalanin	Badem, acı badem
Fenil asetaldehit	Fenilalanin	Gül benzeri, menekşe benzeri
Feniletıl alkol	Fenilalanin	Temiz olmayan, gül, menekşe benzeri, bal
Fenil asetik asit	Fenilalanin	Çiçeksi, gül benzeri, plastik
Fenol	Tirozin	İlaç benzeri
p-OH-fenil aldehit	Tirozin	-
p-OH-fenil laktat	Tirozin	-
p-OH-fenil asetat	Tirozin	-
p-Kresol	Tirozin	Temiz olmayan, ilaç benzeri
İndol	Triptofan	Temiz olmayan, naftalin
Skatol	Triptofan	Temiz olmayan, naftalin
Benzaldehit	Triptofan	Badem



Şekil 2.4. Süt proteinlerinin degradasyonu sonucu oluşan tat-koku bileşikleri [44, 59]

Genellikle, aromatik sülfür bileşiklerinin büyük çoğunluğu metiyoninden kaynaklanmaktadır [60]. Metiyoninden metantiyol oluşumuna yol açan iki enzimatik yolun, laktokoklarda var olduğu kabul edilmektedir (Şekil 2.5) [44]. α , γ eliminasyonu ile gerçekleşen metiyonin katabolizması yolunda, bir liyaz, metiyoninin deaminasyonunu ve demetiltiyolasyonunu eş zamanlı olarak katalize etmekte ve reaksiyon metantiyol ve α -keto bütirik asitin oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Hem bir sistatyonin β -liyaz hem de bir γ -sistatyonin liyaz enzimi *Lactococcus lactis*'ten saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir [61, 62]. Bununla birlikte, bu enzimlerin her ikisinin de metiyonin üzerindeki aktivitelerinin nispeten düşük olduğu belirtilmiştir [44]. Diğer potansiyel yol ise, metiyoninin 4-metiltiyol-2-oksobütirik asite transaminasyonu ile başlatılmaktadır. Laktokoklardan karakterize edilen aromatik aminotransferazlar metiyonin üzerinde önemli aktivite sergilemektedir [55, 57].



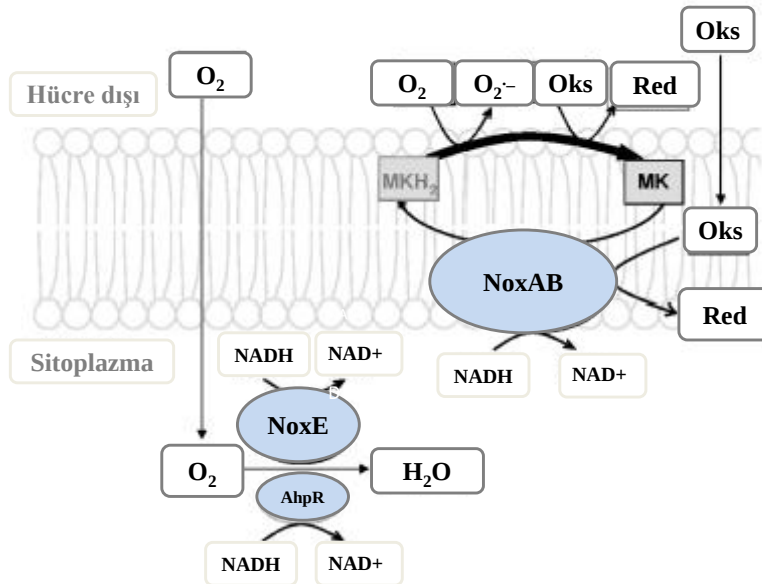
Şekil 2.5. Peynirin olgunlaşması süresince mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen metiyonin degradasyonu [44]

Metantiyol kolaylıkla dimetil disülfid ve dimetil trisülfite yükseltgenmektedir (Şekil 2.5). Bu bileşiklerin oluşumu doğrudan metantiyol içeriğinin bir sonucudur ve peynirin düşük redoks potansiyeli tarafından ayarlanmaktadır. Ayrıca, dimetil sülfid ve dimetil trisülfitin önemli aroma bileşikleri olduğu literatürde belirtilmiştir [44].

2.3.5 Bakteriyel Gelişim Süresince Redoks Potansiyelinin Değişiminde Rol Oynayan Mekanizmalar

Laktik asit bakterisi ile inoküle edilmiş bir ortamın redoks potansiyelinin düşmesi ile ilgili birçok teori ileri sürülmüştür [25, 35, 37, 63]. *L. lactis*'in sütün E_h 'sini düşürme yeteneğinin temel olarak oksijenin indirgenmesiyle ilgili olduğu düşünülmektedir [25]. Jeanson ve ark.'ı [25], sütün E_h değerinin, ancak çözünmüş haldeki oksijen *L. lactis* tarafından tüketildikten sonra düştüğünü göstermiştir. *L. lactis*, ETS'yi kodlayan genlere sahip olmasına rağmen, hem grubunun biyosentez genini içermediği için gelişim ortamına hem grubu eklenmediğinde oksijenli solunum yapamamaktadır. Hem grubunun yokluğunda, O₂'nin H₂O'ya indirgenmesi, büyük olasılıkla NADH oksidaz (NOX) NoxE'ye bağlı olarak gerçekleşmektedir. Ayrıca, *L. lactis* H₂O₂'yi H₂O'ya indirgeyen, H₂O₂-oluşturan NADH oksidaz (AhpF) ve peroksiredoksinden (AhpC) oluşan alkil

hidroperoksit redüktaz (AhpR) sistemini içermektedir. AhpR sistemi, O_2 'nin H_2O 'ya indirgenmesinde de rol oynayabilmektedir [35]. Ancak, oksijen içermeyen süt (azot ile doyurulmuş) hala pozitif E_h değerine sahipken, *L. lactis* ile fermente edilmiş sütün E_h değeri -220 mV civarındadır [25]. Bu durum, *L. lactis*'in oksijenin yanında sütte bulunan diğer yükseltgen bileşikler de indirgediğini göstermektedir [35]. Tachon ve ark.'ı [35], *L. lactis*'in elektron taşıma zincirinin (ETS) fonksiyonel bir kısmının temel olarak, menakinonlar ve membran NADH dehidrogenazlardan (NoxA ve NoxB) oluştuğunu ve bunun, süte eklenen tetrazolyum viyoletin indirgenmesinden sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. NoxA ve/veya NoxB, elektronları hücre içi NADH'den hücre membranındaki menakinonlara iletmektedir. Bu, hücre yüzeyindeki veya hücre membranındaki tetrazolyum viyoleti indirgemektedir. Bu sonuçlar, ETS'nin sütün indirgenmesinde görev rol oynayabildiğini göstermektedir. Yine aynı çalışmada, sütün indirgenmesinde etkili olan birinci mekanizmanın NADH oksidaz (özellikle NoxE) tarafından çözülmüş oksijenin kullanılması olduğu, ikinci mekanizmanın ise oksijenden bağımsız olduğu ve oksijen dışındaki yükseltgen bileşiklerin ETS tarafından indirgendiği belirlenmiştir (Şekil 2.6). Dahası, *L. lactis* suşlarının indirgeme aktivitesinin oldukça büyük farklılık gösterdiği ve bunun, fermente süt ürünlerinin E_h 'sinin kontrolü için starter seçiminde büyük önem taşıdığı bildirilmiştir [35].



Şekil 2.6. *L. lactis* tarafından gerçekleştirilen sütün indirgenmesinde rol oynayan mekanizmaların şematik gösterimi [35] (Nox AB, membran dehidrogenazlar NoxA ve NoxB; NoxE, NADH oksidaz; AhpR, alkil hidroperoksit redüktaz sistemi; Oks, yükseltgenmiş bileşikler; Red, indirgenmiş bileşikler; MK, yükseltgenmiş menakinonlar ve MKH2, indirgenmiş menakinonlar)

Michelon ve ark.'ın [63] yaptıkları çalışmada, *L. lactis*'in oksijeni uzaklaştırılmış Man-Rogosa-Sharp (MRS) besiyerinin E_{h7} 'sini (pH 7'deki redoks potansiyeli) 200 mV'den -200 mV'ye düşürebildiğini belirlenmiştir. Aynı çalışmada, laktik asit fermentasyonu süresince gerek yükseltgen bileşiklerin tüketilmesinin gerekse indirgen bileşiklerin ortama salınmasının bakteriler tarafından E_{h7} 'nin düşürülmesi ile ilgili olmadıkları bildirilmiştir. En düşük E_{h7} değerine ulaşıldıktan sonra, bakteri hücreleri kültür ortamından filtrasyon ile uzaklaştırılmış ve *L. lactis*'in üç farklı suşu için, filtratların ölçülen E_{h7} değerlerinin başlangıçta ölçülen steril MRS besiyerinin E_{h7} değerinden farklı olmadığı bulunmuştur. Bakteriyel hücre yüzeyinde yer alan tiyol gruplarının, platin elektrot ve bakteri arasındaki akım değişimini sağlayan temel bileşen olduğu ileri sürülmüştür. Tiyol grupları *L. lactis*'in dış yüzeyinde bulunan proteinlerde yer almaktadır. Tiyol grupları özellikle proteinlerdeki sisteinde bulunmaktadır. Bu sonuçlar, ekzoproteinlerin (membran proteinleri veya hücre duvarı proteinleri gibi) redoks potansiyelinin düşmesinde rol oynadığını göstermektedir [63]. Yapılan bir başka çalışmada, LAB'nin indirgeme kapasitelerinin, gelişimleri süresince üretilen indirgen moleküllere dayandığı ileri sürülmüştür [37]. Son olarak, Larsen ve ark.'ı [64], oksijenin tükendiği anda redoks potansiyelinin düşüşünün en yüksek olduğunu ve ardından, son redoks değerine daha kademeli bir düşüşün gerçekleştiğini göstermiş ve bu durumun, indirgenme prosesinde hem oksijenin hem de biyolojik faktörlerin rol oynadığını belirtmiştir.

2.4 Sütün Oksidasyon Redüksiyon Potansiyeli

Hava ile dengede bulunan sütün (pH 6.6-6.7) E_h değeri genellikle +250 mV ile +350 mV arasında değişmektedir. Sütün redoks potansiyelini etkileyen temel faktör çözünmüş halde bulunan oksijenin konsantrasyonudur. Süt memede salgılandığında oksijen içermemektedir ancak, hava ile dengede iken oksijen içeriği yaklaşık 0.3 mM'dir. Anaerobik olarak sağılan sütün, mikrobiyel gelişim sonucu çözünmüş haldeki oksijeni tükenen sütün veya O_2 içeriği diğer gazlarla yer değiştirilmiş sütün redoks potansiyeli çözünmüş oksijen içeren süttten daha düşüktür [4]. Sütün su dışındaki yağ, laktoz ve protein gibi temel bileşenlerinin, sütün redoks potansiyeli üzerinde direkt etkisinin göreceli olarak çok düşük olduğu ve sütteki temel redoks sistemlerinin laktat-pirüvat, askorbat ve riboflavini içerdiği belirtilmiştir [65]. Çizelge 2.4, sütte bulunan bazı redoks sistemlerini göstermektedir. Standart potansiyel tek başına belirleyici değildir. Çünkü her bir redoks sisteminin konsantrasyonu, yükseltgenmiş veya indirgenmiş farklı standart potansiyellerin sisteminin kapsamını belirlemektedir. Dahası, konsantrasyon E_h 'nin oksidanlar gibi katkılara olan

duyarlılığını, diğer bir deyişle, “poising kapasitesi”ni belirlemektedir [66]. Süt gibi gerçek sistemler, redoks potansiyelindeki değişime direnç gösterme kapasitesine sahip olabilmektedir ve bu tamponlama kapasitesi “poising kapasitesi” veya “poising etkisi” adını almaktadır. Poising kapasitesi redoks çiftlerinin toplam konsantrasyonuna ve indirgenmiş ve yükseltgenmiş bileşiklerin konsantrasyonuna bağlıdır [15, 16, 67].

Çizelge 2.4. Süt için önemli olan bazı redoks sistemlerinin standart redoks potansiyelleri (E_0) ve taze sütteki konsantrasyonları ($T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$) [22, 60, 66]

Redoks Sistemi	n^a	E_0 (pH 6.7’de) (mV)	Konsantrasyon (mg/L)
Oksijen		+818	
$\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$	1	+770	0.3-0.6 ^b
$\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$	1	+150	<0.5
(Dehidro)askorbat	2	+70	18-31 ^c
Riboflavin	2	-200	1.5-2.0
Laktat/pirüvat	1	-160	(^d)
Sistein		-340	300-1000
$\text{Zn}^+/\text{Zn}^{2+}$	2	-762	4.0-4.5
Metilen mavisi	2	+200	11 ^e

^a Herbir molekül için transfer edilen elektronların sayısı.

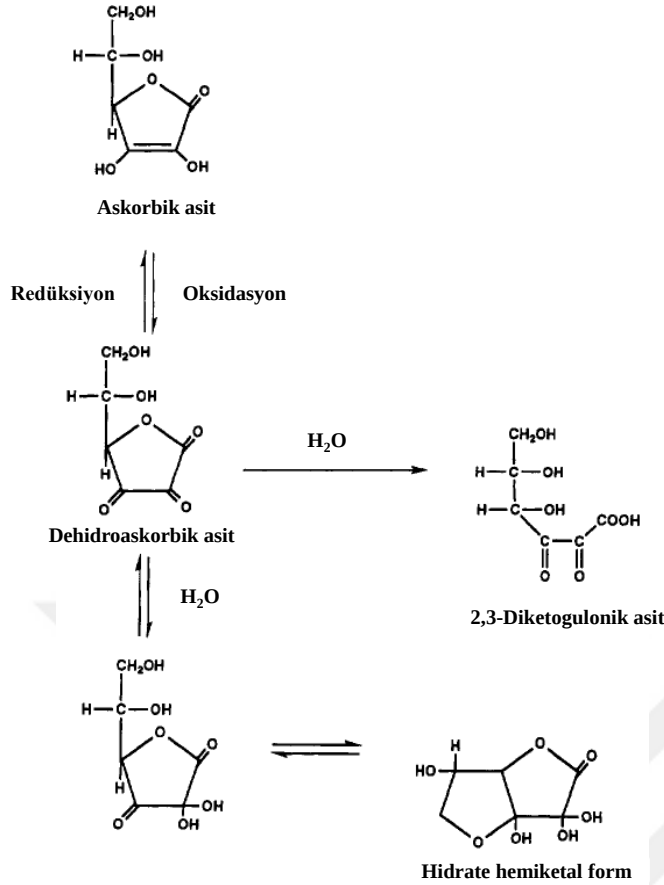
^b Muhtemelen sadece kısmi tersinir.

^c Pastörize sütte bu konsantrasyondan %50 daha az olmaktadır.

^d Taze sütte tersinmezdir. Aktivitesi ve konsantrasyonu bakterilere bağlıdır.

^e Metilen mavisi indirgeme testindeki konsantrasyon ($\mu\text{Eq/L}$).

Taze sütün askorbik asit içeriği yaklaşık 11.2–17.2 mg/L’dir. Süt memeden çıktığı anda askorbatın tamamı indirgenmiş formdadır, ancak dehidroaskorbata tersinir oksidasyonu pH, sıcaklık ve Cu, Fe ve O_2 ’nin konsantrasyonuna bağlı bir hızda gerçekleşmektedir [4, 65]. Dehidroaskorbat, sulu sistemlerde hidrate hemiketal olarak bulunmaktadır. Tersinmez olan dehidroaskorbatın lakton halkasının hidrolizi sonucunda 2,3-diketogulonik asit oluşmaktadır (Şekil 2.7). Sütteki askorbat/dehidroaskorbat sistemi oksijen içermeyen sütün redoks potansiyelini yaklaşık 0.0 mV’de stabilize etmektedir [4].



Şekil 2.7. Askorbik asit ve türevlerinin kimyasal yapısı [4]

Sütteki riboflavin de tersinir olarak yükseltgenebilmektedir. Ancak, sütteki konsantrasyonu (yaklaşık 4 μM), sütün redoks potansiyelini önemli düzeyde etkilemek için oldukça düşüktür [4, 65]. Çok düşük konsantrasyonda bulunduğu için laktat-pirüvat sisteminin (enzim katalizli olmadıkça tersinir değildir) sütün redoks potansiyeli üzerindeki etkisinin önemli olmadığı düşünülmektedir. Düşük molekül ağırlığına sahip tiyoller (serbest sistein gibi) de konsantrasyonlarının düşük olması nedeniyle sütün redoks potansiyelini etkilememektedir. Denatüre olan proteinlerdeki sistein kalıntıları arasındaki tiyol-disülfid etkileşimleri ısıtma işlemi görmüş sütlerin redoks özelliklerini etkilemektedir. Laktozun serbest aldehit grubu, alkali pH'da karboksilik aside (laktobiyonik asit) yükseltgenebilmekte ancak bu sistem pH'sı 6.6 olan sütün redoks özelliklerini çok düşük düzeyde katkıda bulunmaktadır [4].

Sütün redoks potansiyeli ışıktan ve sütteki oksijen konsantrasyonunun değişmesine neden olan çok sayıda proses operasyonlarından etkilenmektedir. Metal iyonlarının ilavesi (özellikle Cu^{2+}) de redoks potansiyelini etkilemektedir. Süte uygulanan ısıtma işlemi, temel olarak β -laktoglobulinin denatürasyonuna ve oksijen kaybına bağlı olarak redoks

potansiyelinin düşmesine neden olmaktadır [4, 67]. Yapılan bir çalışmada, süte uygulanan farklı ısıt işlemlerin peynirin antioksidan ve prooksidan özellikleri üzerindeki etkisi araştırılmış ve süte uygulanan ısıt işlemin antioksidan aktivitesini artırdığı belirlenmiştir [68]. Laktoz ve proteinler arasında gerçekleşen Maillard reaksiyonu sonucu oluşan bileşikler de ısıt işlem gören sütün, özellikle kurutulmuş süt ürünlerinin E_h 'sini etkilemektedir [4, 69].

Fizikokimyasal açıdan, kompleks reaktif bir ortam olan sütte, uygulanan işlemler ve depolama süresince farklı modifikasyonlar meydana gelmektedir [67]. Sütte oksidasyon redüksiyon reaksiyonlarının neden olduğu temel kimyasal transformasyonlardan bir tanesi yağın oksidasyonudur. Süt yağ globül membranındaki pozisyonu ve çoklu doymamış yağ asitlerinden oluşması nedeniyle, fosfolipitler oksidatif strese duyarlı olan temel yağ molekülleridir [70]. Işık, metalik iyonlar ve oksijen yağ moleküllerinin oksidasyonunu katalizlemektedir. Doymamış lipidlerin oksidasyonuna neden olan faktörler, direkt oksidasyon ile veya serbest radikal oluşumunun etkisi ile sütteki A ve E vitaminlerinin degradasyonunu artırmaktadır [67].

Sütte mikrobiyel gelişim süresince gerçekleşen laktoz fermentasyonu, redoks potansiyeli üzerinde majör etkiye sahiptir. Buna bağlı olarak, peynir ve diğer fermente süt ürünlerinin redoks potansiyeli negatif değere sahiptir. Redoks indikatörlerinin (resazurin ve metilen mavisi gibi) indirgenmesi, uygun sıcaklıkta “indirgenme süresinin” ölçülmesine dayanarak sütün bakteriyel kalitesinin indikatörü olarak kullanılabilir [4, 65].

Bakır ve demir, oksidatif proseslerde güçlü katalitik etkilere sahiptir. Bakırın katalitik etkisi, demirinkinden 100 kat daha yüksektir [71]. Bu nedenle, sütün bakır veya demir ile kontaminasyonun E_h 'nin yükselmesine neden olmaktadır. Reaksiyonun başlangıç basamağı askorbik asidin yükseltgenmesini içermektedir [65]. Schreyer ve ark.'ı [69], redoks potansiyelinin sütün organoleptik kalitesinin belirlenmesinde kullanılabileceğini ve sütteki bakır ve demir konsantrasyonlarının, sütün redoks potansiyeli ve okside tat-kokunun oluşumu ile bağlantılı olduğunu belirtmiştir.

2.5 Süt ve Süt Ürünlerinin Oksidasyon Redüksiyon Potansiyelinin Kontrol Altında Tutulması

Oksidasyon redüksiyon potansiyelinin sütün kalitesi üzerindeki etkisinin bilinmesine rağmen, sütte redoks potansiyelinin kontrolü için yapılan çalışmalar hala devam etmektedir [24, 32, 39, 67-69, 72]. Bu amaçla, süte kimyasal bileşiklerin [32, 39, 73] veya gazların

[24, 72] ilavesi yapılabilmekte veya süte elektroredüksiyon işlemleri [67, 69] uygulanabilmektedir. Süte uygulanan ısı işlemler de E_h değerini protein denatürasyonu ve oksijen kaybına bağlı olarak düşürebilmekte ancak, sütün duyusal özelliklerini ve besinsel değerini olumsuz etkilemektedir [67, 74].

Literatürde, ditiyotritol, potasyum ferrisiyanid, sodyum borohidrit, sistein gibi kimyasal bileşikler [38, 39, 75], süt ürünlerinin redoks potansiyelini kontrol altına almak için kullanılmıştır [32]. Ancak, çok az çalışmada, redoks ajanlarının peynire ilavesi üzerinde çalışılmıştır [32, 43, 76-78]. Bütirik asit fermentasyonunu önlemek için Edam peyniri üretiminde süte nitrat, nitrit veya klorat gibi yükseltgen ajanlar ilave edilmiş ve sonuç olarak, E_h 'nin düşüşü geciktirilmiştir [77, 79]. Ancak, Galesloot [80], bütirik asit bakterilerinin yokluğunda, nitratin Edam peynirinin redoks potansiyeli üzerinde herhangi bir etkisinin bulunmadığını bildirmiştir.

Peltola ve Antila'nın [76] yükseltgen tuzların (KNO_3 ve $KClO_3$), redoks potansiyeli ve Emmmental peynirinin olgunlaşması üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmada, KNO_3 tek başına veya $KClO_3$ ile birlikte eklendiğinde E_h 'yi yükselttiği, ancak $KClO_3$ 'ün tek başına kullanıldığı durumda redoks potansiyelini düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada, KNO_3 'ün tek başına proteazlar üzerinde etkisi gözlenmezken, yüksek miktarda eklendiğinde propiyonik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilen aminoasit deaminasyonunun geciktiği belirlenmiştir [76]. Bu konuda yapılan bir başka çalışmada, KNO_3 , $KClO_3$ ve $KClO_4$ gibi yükseltgen ajanların peynirin redoks potansiyelini yüksek değerlerde tutmakta olduğu ve özellikle, olgunlaşmanın beşinci ayından sonra proteoliz miktarını düşürdüğü bildirilmiştir. Ayrıca, aynı çalışmada KCN'nin proteoliz veya redoks potansiyeli üzerinde etkisi bulunmadığı belirtilmiştir [81].

Yapılan bir çalışmada, ditiyotritol, glutatyon veya sistein gibi indirgen ajanlar, Cheddar peyniri üretiminin baskılama basamağından önce peynir pıhtısına eklenmiştir. İndirgen ajanların ilavesinin, redoks potansiyelinin kontrol peynirine göre daha düşük olmasına ve olgunlaşmanın üçüncü ayında yüksek konsantrasyonda hidrojen sülfid ve metantiyol üretimine neden olduğu belirlenmiştir [43].

Caldeo ve ark.'ın [32] yaptığı çalışmada, oksidasyon redüksiyon potansiyelinin Cheddar peynirinin olgunlaşması üzerindeki etkisini belirleyebilmek için, Cheddar peyniri üretiminin tuzlama basamağında yükseltgen ve indirgen ajanların ilavesi gerçekleştirilmiştir. Olgunlaşma süresince, redoks potansiyelinin peynirin tat-kokusunun

gelişimini etkilediği belirlenmiştir. Peynirde, aroma bileşiklerinin özellikle uçucu sülfür bileşiklerinin stabilitesi için negatif redoks potansiyelinin gerekli olduğu bildirilmiştir. İndirgen ajanlar kullanılarak üretilen peynirlerin uçucu bileşiklerinin, yükseltgen ajanlar kullanılarak üretilen peynirlerden temel bileşen analizi ile belirgin şekilde ayrıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, indirgen ajanlar içeren peynirler sülfür bileşiklerinin varlığı ile karakterize edilirken, KIO_3 ile yapılan peynirlerin çoğunlukla aldehitler ile karakterize edildiği saptanmıştır [32].

İndirgen ajan olarak sistein veya sodyum sülfid ilavesinin sütün redoks potansiyelini düşürmede etkili olduğu ancak, sütün tat-kokusunu değiştirebileceği bildirilmiştir [73, 82].

Redoks potansiyelini modifiye etmek için gaz kullanımı, fermente süt ürünlerinde bulunan oksijene duyarlı olan suşların (probiyotikler gibi) canlılığını artırmak amacıyla olduğu kadar süt ürünlerinin organoleptik özelliklerini çeşitlendirmek amacıyla da başvurulmuş yöntemler arasında yer almaktadır. Probiyotik mikroorganizmalar çoğunlukla anaerobiktir. Güçlü bir yükseltgen olan oksijen, üretim ve depolama süresince redoks potansiyeli ve probiyotik bakterilerin canlılığı üzerinde oldukça büyük bir etkiye sahiptir [3, 83, 84].

Larsen ve ark.'ın [64] çözünmüş oksijenin redoks potansiyeli ve sütün laktik asit bakterileri tarafından asidifikasyonu üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmada, süte uygulanan oksijen püskürtme işleminin LAB'nin redüksiyon ve asidifikasyon kapasitesini olumsuz etkilediği belirlenmiştir.

Ebel ve ark.'ı [85], N_2 gazı ile muamele edilmiş süttten üretilen fermente süt ürünlerinin ve özellikle, N_2-H_2 gaz karışımını içeren süt ile üretilen fermente süt ürünlerinin, depolama süresince *Bifidobacterium bifidum*'un canlılığında meydana gelen önemli bir artış ile karakterize edildiğini göstermiştir. Ayrıca, bu gazların yoğurt üretiminde kullanımının *S. thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus*'un canlılığını ve fermentasyon kinetiklerini etkilemediği yine aynı çalışmada belirlenmiştir.

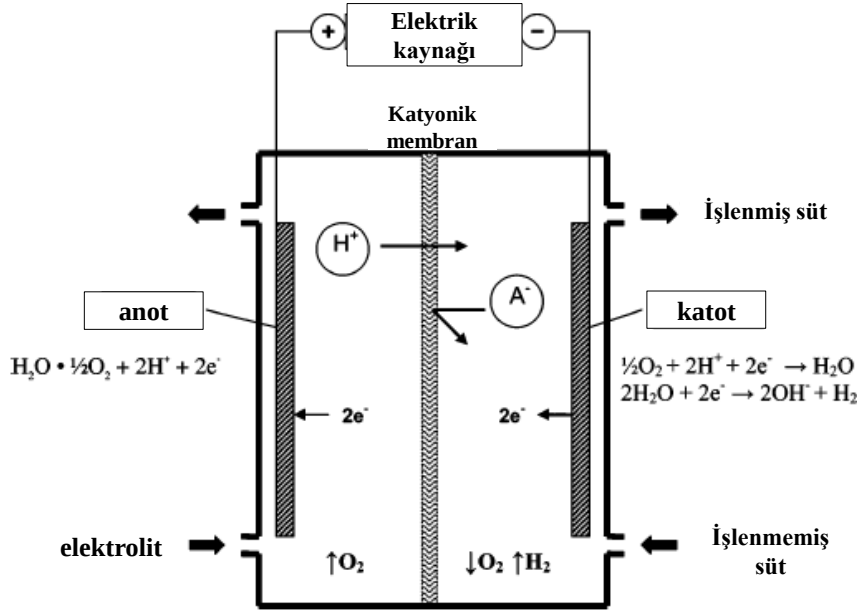
Martin ve ark.'ı [42], redoks potansiyelinin *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* tarafından yoğurtta aroma bileşiklerinin üretiminden sorumlu olan metabolik yolları hangi düzeyde etkilediğini araştırmıştır.

Çizelge 2.5'te verilen gaz koşullarının aynısı oluşturulmuştur. Hava ilavesi ile üretilen yoğurtlardaki asetaldehit ve diasetil konsantrasyonlarının standart yoğurtlara göre daha yüksek olduğu ve dimetil sülfid konsantrasyonunun daha düşük olduğu belirlenmiştir. N₂ ilavesi ile üretilen yoğurtlardaki asetaldehit konsantrasyonunun hava ile ilavesi ile üretilen yoğurtlara benzediği ancak, dimetil sülfid konsantrasyonunun daha düşük olduğu bildirilmiştir. Son olarak, N₂-H₂ gaz karışımı ilavesi (indirgen ortam) ile üretilen yoğurtlardaki diasetil konsantrasyonunun, diğer üç farklı E_h ortamında üretilen yoğurtlardan önemli ölçüde düşük olduğu saptanmıştır.

Elektroliz, işleme tabi tutulan sıvı ile temas halinde olan bir elektrodun yüzeyinde reaksiyonların gerçekleşmesini sağlayan elektriksel enerjiyi kullanan bir prosesdir. Elektroliz hücresi, bir iyon değişim membranı tarafından iki bölüme ayrılmıştır. İşleme tabi tutulacak olan sıvı, oksidasyon reaksiyonlarının (elektrooksidasyon) gerçekleştiği anot ile temas halinde veya diğer tarafta, redüksiyon reaksiyonlarının (elektroredüksiyon) gerçekleştiği katot ile temas halinde sirküle olabilmektedir. Membran elektroliz hücresinin şematik diyagramı Şekil 2.8'de verilmiştir [67]. Bolduc ve ark.'nın [67] yaptıkları çalışmada, sütün elektroredüksiyonu sonucunda çok düşük E_h değerlerine ulaşıldığı ancak, sütteki bu değişimin depolama süresince kalıcı olmadığı belirlenmiştir. Sütün E_h değerinin yaklaşık 5 gün sonra tekrar başlangıç değerine geldiği gözlenmiştir. Bu durumun, sütte bulunan poising etkiye sahip türlerin, redoks potansiyelinin değişimine karşı tamponlama etkisi göstermesinden kaynaklandığı bildirilmiştir [15, 67].

Schreyer ve ark.'ı [69], sütün farklı majör bileşenlerinin ve ısıtılma işlemin, elektroredüksiyon süresince ve sonrasında redoks potansiyeli üzerindeki etkisini belirlemek için süte bir seri elektroliz işlemi uygulamıştır. Sütün yağ içeriğinin, elektroredüksiyon süresince redoks potansiyelinin düşüşünü etkilediği belirlenmiştir. Benzer şekilde, Pastushenko ve ark.'nın [86] yaptığı çalışmada, redoks potansiyelinin sütün yağ içeriği ile birlikte arttığı bildirilmiştir. Schreyer ve ark. [69], bu durumu süt yağının girişim yapması ile açıklamıştır. Paslanmaz çelik katot yüzeyinde yağın bulunması, redoks potansiyeli ve pH ile ilgili proseslerin etkinliğini azaltmaktadır. Katot ile temas halinde olan indirgenmiş türlerin konsantrasyonunun hidroksit oluşumu kadar düşük olması protonların göçünü engellemektedir. Ayrıca, yine aynı çalışmada süt proteinlerinin redoks potansiyeli üzerindeki etkisini belirlemek için ultrafiltrasyon (UF) permeatına elektroredüksiyon uygulanmıştır. UF permeatı yağ, proteinler ve diğer bileşenleri ya çok düşük düzeyde içermekte ya da hiç içermemektedir. Elektroredüksiyon uygulanan UF permeatının redoks

potansiyelinde meydana gelen düşüşün, elektoredüksiyon uygulanan pastörize yağsız süte göre daha az olduğu gözlenmiştir. Araştırmacılar, bu durumun, proteinlerin elektoredüksiyon öncesinde ve sonrasında redoks potansiyeli üzerindeki etkisinin önemli olduğunu gösterdiğini ifade etmişlerdir [69].



Şekil 2.8. Membran elektroliz hücresinin şematik diyagramı [67]

UF permeatındaki peptitler ve sütteki tiyol grupları, daha doğru bir ifadeyle kazeinler, β -laktoglobulin ve L-sistein antioksidan kapasiteye sahiptir [69, 87, 88]. Proteinler antioksidan kapasitesi sayesinde süütün redoks potansiyelini etkilemekte ve sütteki konsantrasyonları ile orantılı olarak sütü indirgemektedir [69]. Bazinet ve ark.'nın [89] sistindeki disülfid bağlarının ve serum proteinlerinin indirgenmesi üzerinde yaptıkları çalışmada, bu proteinlerin elektrot tarafından sağlanan elektronların alıcısı olarak davrandığını göstermiştir.

2.6 Oksidasyon Redüksiyon Potansiyelinin Yoğurt Üzerindeki Etkisi

Redoks potansiyelinin süt ve süt ürünlerinin kalitesi üzerindeki etkisi bilinmektedir [6, 24, 31, 32, 42, 67, 69, 72]. Süütün redoks potansiyelini değiştirmek için gaz kullanımının fermente süt ürünlerinin duyu özelliklerini değiştirdiğini yapılan çalışmalar göstermiştir [42, 72]. Ancak, bu değişimlerin, redoks potansiyelinin fizikokimyasal olaylar veya laktik asit bakterileri veya her ikisi üzerindeki etkisinden kaynaklanıp kaynaklanmadığı bilinmemektedir [3]. Bu amaçla, Martin ve ark.'ı [24], süütün farklı E_h koşullarında, asit ile pıhtılaştırılmasını etkileyen kimyasal etkenlerin düzeyini belirleyebilmek için, süütün

asitliğini glukono- δ -lakton (GDL) kullanarak artırmıştır. Böylece, E_h değişimine duyarlı olan mikroorganizmaların meydana getireceği farklılıkları önlemiştir. Model asidifiye yağsız süt jelleri farklı gazları içeren koşullarda GDL kullanılarak elde edilmiştir. Yükseltgen ortam olarak hava, nötral gaz olarak azot (bu sayede oksijen ortamdan uzaklaştırılmış, ancak E_h bu koşullar altında yükseltgen olarak kalmıştır) ve indirgen ajan olarak da hidrojen kullanılmıştır. Üretimin ardından uygulanan bu farklı yöntemlerin jel yapısı üzerindeki etkisi viskoelastik özelliklerin ve serum ayrılmasının ölçülmesi ile ortaya konulmuştur. Farklı E_h koşulları altında üretilen her bir jelin görünür viskozitesi, GDL ilavesinden 24 saat sonra pH 4.6'da ve 4 °C'de ölçülmüştür. Jel üretimi sırasında kullanılan gazların türünün, jellerin görünür viskozitesi üzerindeki etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, N_2-H_2 gazı kullanılarak E_h değeri negatife düşürülen süttten üretilen jelde meydana gelen serum ayrılmasının diğer jellere göre (yükseltgen ve kontrol) daha düşük olduğu bulunmuştur [3, 24].

Yapılan bir başka çalışmada, farklı redoks potansiyeline sahip koşullar altında, laktik asit bakterilerinin asit jeli (yoğurt) oluşumu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Araştırmacılar, bu çalışmada ekzopolisakkarit üretimi ve jel yapısı üzerine odaklanmışlardır (Çizelge 2.5). Bir önceki çalışmada (GDL ile asit jeli üretimi) kullanılan koşulların aynısı oluşturulmuştur. Kontrol olarak üretilen yoğurdun ekzopolisakkarit içeriği ile N_2-H_2 gazı kullanılarak indirgen E_h ortamında üretilen yoğurdun ekzopolisakkarit içeriğinin birbirine yakın değerlerde olduğu belirlenmiştir [72]. *Lactobacillus sake* 0-1 suşu tarafından gerçekleştirilen optimal ekzopolisakkarit üretimi için anaerobik koşulların gerekli olduğu bildirilmiştir [90]. Martin ve ark.'ı [72], görünür viskozitenin gaz türünden etkilendiğini ve indirgen ortamın yoğurdun görünür viskozitesini azalttığını belirtmiştir. Ayrıca, bakteriler tarafından üretilen ekzopolisakkaritlerin yoğurdun reolojik özelliklerine katkıda bulunduğu düşüncesinin aksine, yapılan bazı çalışmalarda [72, 91] yoğurdun viskozitesi ile ekzopolisakkarit konsantrasyonu arasında herhangi bir korelasyon bulunmadığı rapor edilmiştir [3]. Ayrıca, süttün E_h 'sinin indirgenmiş değerlere ayarlanması ile serum ayrılmasının önemli ölçüde azaltılabileceği bildirilmiştir [72].

Çizelge 2.5. Laktik starterler kullanılarak asitlendirilmiş sütün farklı E_h koşullarındaki jel yapısı karakteristikleri [3, 72]

Süte uygulanan gaz koşulları	pH		E_{h7} (mV)		EPS konsantrasyonu (mg/L)	η (Pa.s)	Serum ayrılması (g/100g)
	t=0	t=3.5 saat	t=0	t=3.5 saat			
Hava	6.80	4.6	425	171	63.60	0.046	1.98
Hava ilavesi	6.80	4.6	435	241	15.22	0.046	1.76
N ₂ ilavesi	6.81	4.6	285	139	25.29	0.035	1.03
N ₂ -H ₂ ilavesi	6.81	4.6	-345	-309	62.70	0.021	0.59

2.7 Oksidasyon Redüksiyon Potansiyelinin Peynir Üzerindeki Etkisi

Peynir, sütün temel bileşenlerini korumak amacıyla üretilen fermente bir süt ürünüdür [92]. Fermente gıdalar, daha uzun raf ömrüne sahip olmalarının yanında, genellikle arzu edilen duyuşal özelliklere de sahiptir. Fermente süt ürünlerinin duyuşal özellikleri laktik asit bakterilerinin metabolik aktivitesinin bir sonucudur. Fermantasyon ve laktik asit bakterilerinin gelişimi, pH ölçümü ile dolaylı olarak kontrol edilmektedir. Peynir üretimi süresince meydana gelen kimyasal, fiziksel ve mikrobiyolojik değişimlerin ve bu değişimlerin peynir kalitesi üzerindeki etkilerinin dikkate alınması, peynir üretimi süresince çeşitli değişimlerin ilerlemesinin kontrolü için yararlı olmaktadır. Önemli bir fizikokimyasal parametre olan redoks potansiyeli, pH, sıcaklık ve iyonik kuvvet ile birlikte peynirin mikro ortamını belirlemektedir [31].

Hava ile dengede bulunan sütün E_h değeri, pH 6.6 ile 6.7 aralığında, genellikle +250 mV ile +350 mV arasında değişmekte [4] iken, literatürde Cheddar peyniri için bu değerin -118 mV ile -126 mV arasında olduğu [1], başka bir çalışmada -90 mV ile -210 mV arasında değiştiği [5] ve Camembert peyniri için E_h değerinin -300 mV ile -360 mV aralığında olduğu [6] bildirilmiştir [7].

Peynirin iç kısmı anaerobik bir sistemdir ve sadece, zorunlu anaerobik ve fakültatif anaerobik mikroorganizmaların gelişimini desteklemektedir [9]. Bakteriye gelişim süresince, ortamın redoks potansiyeli düşmekte ve redoks potansiyeli/zaman eğrisinin gelişimi, gelişen mikroorganizmaların türü ve aktivitesi tarafından belirlenmektedir [34, 93]. Peynirdeki indirgenmiş ortam, starter bakterilerin gelişmesi, kalıntı laktozun fermantasyonu [9] ve hücre metabolizması nedeniyle oksijenin tüketilmesi sonucu oluşmaktadır [10]. Starter olmayan laktik asit bakterilerinin olgunlaşma süresince redoks potansiyelinin düşmesinin temel sorumlusu olduğu ve peynirin redoks potansiyelinin

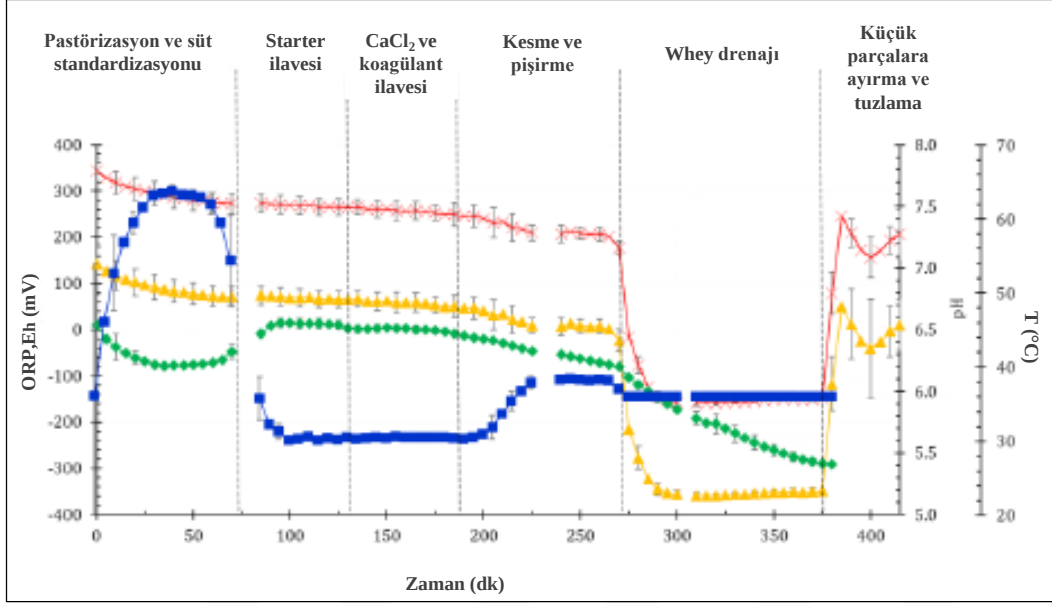
olgunlaşmanın herhangi bir anında baskın olan türlerin veya suşların belirlenmesinde önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir [7, 33]. Redoks potansiyeli, peynirde, hem mikrobiyel kaynaklı tat-koku bileşiklerinin üretimini (starter ve/veya NSLAB metabolizması sonucu üretilen tat-koku bileşikleri) hem de kimyasal kaynaklı tat-koku bileşiklerini (özellikle uçucu tat-koku bileşikleri) etkilemektedir [7].

Redoks potansiyeli dengeli tat-koku gelişimi için gerekli olan koşulların oluşmasına katkıda bulunmaktadır [11-13]. Peynirlerde, anaerobik koşulları sağlayan düşük redoks potansiyelinin dengeli tat-koku oluşumu için gerekli olduğu bildirilmiştir [14]. Yapılan bir çalışmada, peynirin redoks potansiyelinde meydana gelen değişimler ile aktif tiyol grupları arasında kimyasal bir ilişki olduğu belirlenmiştir [29]. Sülfidril oksidaz, proteinlerin sülfür gruplarını okside etmekte ve korumaktadır. Bu durumun, peynirin redoks potansiyelini ve tiyol bileşiklerinin stabilitesini, dolayısıyla peynirin kalitesini ve stabilitesini etkileyebileceği bildirilmiştir [92].

Redoks potansiyelinde meydana gelen değişimler, farklı enzim grupları tarafından gerçekleştirilen hücre düzenlemesinde değişimlere neden olmaktadır [94]. Yağ asitleri, özellikle çoklu doymamış yağ asitleri yağ oksidasyonuna karşı duyarlıdır. Yüksek yağ içeriğine sahip gıdalar arasında olmasına rağmen, yağ oksidasyonu, peynirin olgunlaşması süresince büyük bir öneme sahip değildir. Bu durum, kısmi olarak çoklu doymamış yağ asitlerin süt yağında düşük düzeyde bulunmasından kaynaklanmaktadır. Ancak, bu durumun asıl nedeni peynirin düşük redoks potansiyelinin doğal antioksidanların varlığı ile birlikte yağ oksidasyonunu engellemesi veya azaltmasıdır [44].

Yapılan bir çalışmada, laboratuvar ölçekli peynir üretimi süresince redoks potansiyelinde meydana gelen değişimler belirlenmiştir. Redoks potansiyeli, Cheddar, Gouda, Emmental ve Camembert peynirlerinin temsili üretimi süresince ölçülmüştür (Cheddar üretimine ait veriler Şekil 2.9'da verilmiştir). Çalışmada, redoks potansiyeli, pH ve sıcaklık, bir veri toplayıcısı ile bağlı olan ticari platin elektrot ve Ag/AgCl referans elektrot, kombine elektrot ve sıcaklık sensörü kullanılarak izlenmiştir. Başlangıçta, moleküler oksijenin atmosferden süte difüzyonuna bağlı olarak sütün redoks potansiyeli 0 mV'nin üzerindedir. Pastörizasyonun, muhtemelen oksijenin kaybına bağlı olarak redoks potansiyelinde hafif bir düşüşe neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, ısıtma işlemi süresince kalsiyum ve fosfatın kolloidal faza geçişinin yanında üretilen H⁺ nedeniyle pH düşüşü gerçekleşmiştir. Starter ilavesinden sonra, redoks potansiyeli pH ile birlikte azalmıştır. Peynir altı suyunun drenajı

süresince, pH yavaşça 5.4'e düşerken, redoks potansiyelinde büyük bir düşüş meydana gelmiştir ve küçük parçalara ayırma basamağına kadar devam etmiştir. Bu aşama süresince ise, teleme küçük parçalara ayrıldığında havaya maruz kaldığı için redoks potansiyeli artmıştır. Ardından, 12 saatlik presleme süresince redoks potansiyeli tekrar yaklaşık -320 mV'ye düşmüştür [7, 31].

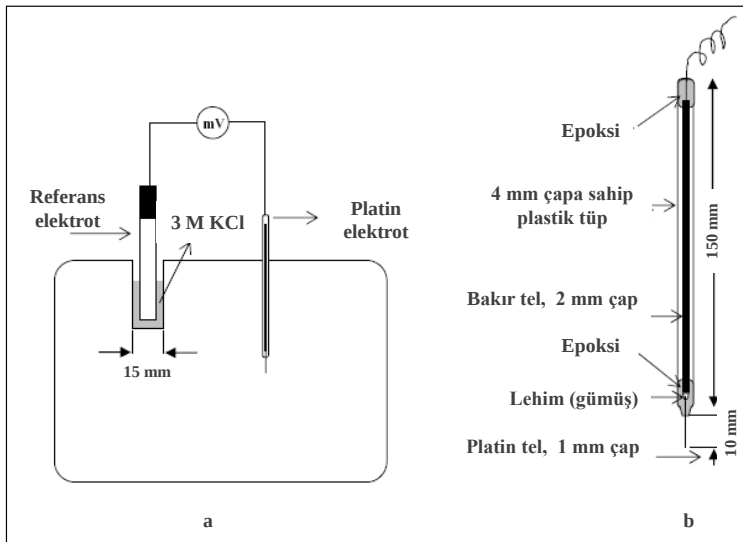


Şekil 2.9. Laboratuvar ölçekli Cheddar üretimi süresince zamanın ve peynir yapım basamaklarının bir fonksiyonu olarak oksidasyon redüksiyon potansiyelinin değişimi (E_h, ×: standart hidrojen elektrot ile ilgili potansiyel ve ORP, ▲: platin elektrot-Ag/AgCl referans elektrodu ile pH düzeltmesi yapılmamış direkt ölçüm, □: pH, ■: sıcaklık(T)) [7, 31].

E_h genellikle kalomel referans elektrot ile bağlanmış platin elektrot kullanılarak ölçülmektedir ve mV olarak ifade edilmektedir [95]. Ayrıca, E_h, farklı redoks potansiyellerinde renk değiştiren indikatör boyalar kullanılarak da belirlenebilmektedir [27]. Kristoffersen ve Gould [5], peynirin redoks potansiyelini belirlemek için hem indikatör boyaları hem de platin elektrot kullanmıştır. Ancak, her iki yöntemle gerçekleştirilen ölçümler sonucunda bulunan değerlerin birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir. Galesloot [28], Gouda peynirinin E_h'sini ölçmek için elektrotları peynirin içine daldırmıştır. Ancak, diğer araştırmacılar, bu yöntemin Cheddar peyniri için kullanıldığında, elektrotlarla peynir arasında iyi bir temas sağlamanın zor olduğunu bunun da ölçüm sonucunu etkilediğini bildirmişlerdir. Bu yöntemde, elektrotlar hafifçe hareket ettiğinde, redoks potansiyeli değerinin değiştiği bildirilmiştir [96]. Yine aynı çalışmada, peynir gibi heterojen ortamlarda E_h değerinin ölçülmesinin şüpheli olduğu ileri

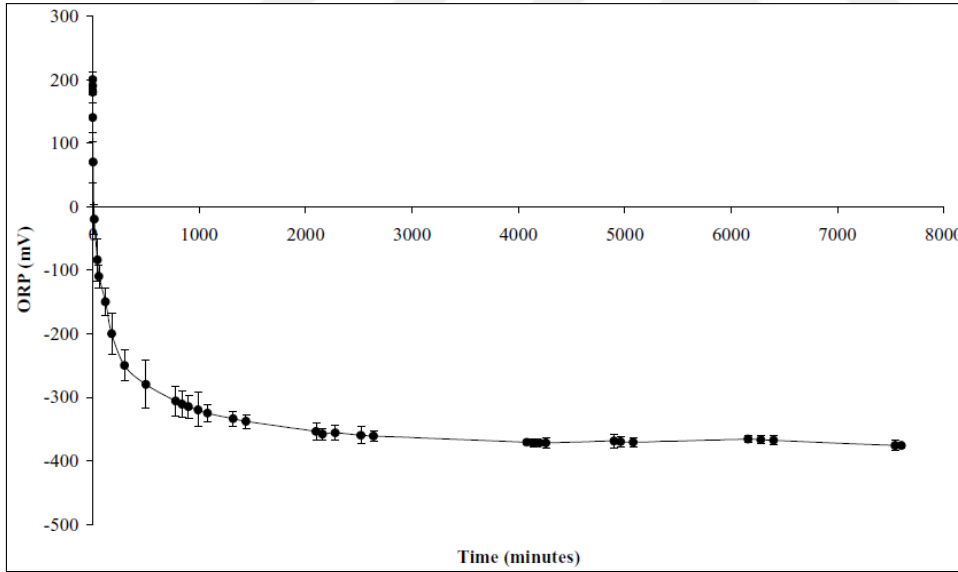
sürülmektedir [96]. Buna rağmen, Kristoffersen ve ark. [18], platin elektrot kullanarak tekrarlanabilir ölçümler elde etmişlerdir. Abraham ve ark.'nın [6] yaptıkları çalışmada, Camembert peynirinin (tam yağlı, yumuşak peynir) E_h 'sinin ölçümü için mikroelettrotlar kullanılmıştır. Araştırmada, platin ve referans elektrotlar direkt peynirin içine daldırılmış ve yumuşak peynirin redoks ölçümü ile ilgili herhangi bir problemle karşılaşmadığı belirtilmiştir. Ancak, sert peynirlerde redoks ölçümü sırasında, elektrotlar ile peynir dokusu arasında oluşabilecek muhtemel çatlakların oksijenin difüzyonunu kolaylaştırarak redoks ölçümünde sorunlara neden olabileceği bildirilmiştir [1].

Bu konuda yapılan bir çalışma ile sert bir peynir olan Cheddar peynirinde redoks ölçümü tekrarlanabilir olarak gerçekleştirilmiş ve yine aynı çalışmada, sıcaklık, referans elektrot ile platin elektrot arasındaki uzaklık, platin elektrodun peynir yüzeyinden derinliği gibi peynirin redoks ölçümündeki farklı parametrelerin etkisi ortaya konmuştur [1]. Şekil 2.10, Cheddar peynirinin redoks potansiyelini belirlemek için kullanılan elektrokimyasal hücreyi göstermektedir. Geliştirilen yöntemde, kullanılan elektrot ince olup peynir içine oksijen difüzyonuna neden olmamaktadır. Bu yöntem, sert peynirlerin redoks potansiyelinin ölçümüne olanak sağlamaktadır. Ayrıca, aynı çalışmada, peynir üretimi boyunca kontrol edilmeyen redoks parametresinin, peynir yapımı ve olgunlaşması süresince kontrol altına alınması, olgunlaşmanın daha kontrollü yapılmasına olanak sağlayabileceği bildirilmektedir [1].



Şekil 2.10. Cheddar peynirinin oksidasyon redüksiyon potansiyelinin (ORP) ölçümünün detaylarını gösteren diyagram (a, redoks ölçümü için kullanılan elektrokimyasal hücrenin şematik gösterimi ve b, kendinden kaplı platin elektrodun tasarımı) [1]

Topcu ve ark.'ın [1] yaptıkları çalışmada, peynir örneğinin içine direkt olarak saplamak için yeterli incelik ve esneklikte olan kendinden kaplı platin çalışma elektrodu yapılmıştır. Referans elektrot olarak kalomel elektrot kullanılmış ve çevrim 3 M KCl tuz köprüsü ile tamamlanmıştır. Referans elektrot ile çalışma elektrodu arasındaki uzaklık gibi elektrotların fiziksel yönelimleri, redoks potansiyeli ölçümlerinde, dengeye gelme süresi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Redoks potansiyelinde dengeye ulaşmak için gerekli olan süre Cheddar peynirinde iki gündür ve platin ve kalomel elektrotlar arasındaki optimum uzaklık 2.5 cm'dir. En hızlı dengeye gelme süresi, çalışma elektrodu peynirin 5-6 cm içine saplandığında elde edilmiştir. Sıcaklık da redoks potansiyeli üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Potansiyel dengeye ulaşmak için gerekli olan en kısa süre oda sıcaklığında (20 °C) elde edilmiştir, ancak peyniri 2 günlük süre boyunca bu sıcaklıkta tutmanın ölçüm güvenliği açısından uygun olmaması nedeniyle, daha uzun dengeye gelme süresine rağmen, redoks ölçümlerini 12 °C'de gerçekleştirmenin daha uygun olacağı aynı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. Belirtilen ölçüm normlarında Cheddar peynirine ait redoks grafiği Şekil 2.11'de verilmiştir [1].



Şekil 2.11. Cheddar peynirinin oksidasyon redüksiyon potansiyelinin 12 °C'de zamanla değişimi [1]

Topcu ve ark. [1], peynirde gerçekleştirilen redoks ölçümünde sıcaklığın etkisinin önemli olduğunu, 4 °C'de gerçekleştirilen ölçülen redoks potansiyeli değerlerinin 12 ve 20 °C'de ölçülen değerlerden farklı olduğunu belirlemiştir. Araştırmacılar, bu durumu iyonik aktivitenin sıcaklığa bağlı olması ile açıklamışlardır. İyonik aktivite, disosiyasyon, aktivite

katsayıları ve çözeltide bulunan iyonlar arasındaki interaksiyonların etkisine bağı olarak sıcaklıktan etkilenmektedir [97].

Redoks potansiyelinin ölçümü sırasında, redoks potansiyelinin zamanla arttığı gözlenmiş ve bu durumun, pH'nın düşüşünden ve havanın peynire yavaş penetrasyonundan kaynaklandığı belirtilmiştir [98]. Langeveld ve Galesloot [99], ölçüm sırasında hava difüzyonunun önüne geçmek için elektrotların çevresinde sıvı parafin halkası kullanmıştır. Topcu ve ark. [1], Cheddar peynirinde gerçekleştirdikleri redoks ölçümünde, kendinden kaplı platin elektrotları kullanmış ve bu elektrotların yeterince ince olduğunu ve elektrotlarla peynir arasında sıkı bir bağlantı bulunduğunu, bu nedenle hava difüzyonunu önlemek için sıvı parafine ihtiyaç duyulmadığını belirtmiştir.



3. MATERYAL ve METOT

3.1 Süt Örnekleri

Çalışmada kullanılan tam yağlı (%15.2) ve yağı azaltılmış (%7.2) Ultrafiltre (UF) Süt retantantı (UF süt) Bahçıvan Gıda San. ve Tic. A.Ş. tarafından temin edilmiştir. Firmada yapılan testlerde antibiyotik varlığı tespit edilmemiştir. UF işleminde, ayırım boyutu 10 kDa olan yarı geçirgen polietersülfon (PES) spiral membran (Koch Membrane Systems Inc., Wilmington, MA) kullanılmış ve operasyon basıncı yaklaşık 4 bar olacak şekilde ayarlanmıştır. UF işleminde konsantrasyon faktörü 3.5 olacak şekilde işlem yapılmıştır. Konsantre haldeki UF süt örnekleri +4 °C’de transfer edilmiş ve UF peynir üretimleri Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, çalışmada kullanılan yağlı ve yağsız UHT sütlerin piyasadan temin edilen bir markanın aynı partisinden olmasına dikkat edilmiştir.

3.2 Starter Kültürler

Çalışmada kullanılan kültürler NCIMB (Aberdeen,UK) kültür koleksiyonundan seçilmiştir. Suşların seçiminde peynirden izole edilmiş olmasına dikkat edilmiştir. Ayrıca, Maysa Gıda San. ve Tic. A.Ş. (İstanbul, Türkiye)’den, ticari olarak kullanılmakta olan tek suş kültürü temin edilmiştir.

- *Lactococcus lactis* (NCIMB, 10493)
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 35-C-9 (NCIMB, 700275)
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HP (NCIMB, 8662)
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IP5 (NCIMB, 700495)
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UD459 (NCIMB, 700499)
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CM41 (Maysa Gıda, DVS kültür)

3.3 Pıhtılaştırıcı Enzim

Pıhtılaştırıcı enzim olarak fermente buzağı kimozeni (Maxiren®, 600 IMCU, DSM Food Specialties B.V., The Netherlands) kullanılmıştır.

3.4 Laktik Asit Bakterilerinin Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi

Lactococcus lactis, *L. lactis* subsp. *lactis* 35-C-9, *L. lactis* subsp. *cremoris* HP, *L. lactis* subsp. *cremoris* IP5 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 kültürlerinin üreme eğrilerinin saptanması amacıyla, 12 saat süreyle 30 °C’de M17 sıvı besiyerinde (Merck) canlandırılmış kültürlerden yararlanılmıştır [100]. Bu canlandırılmış kültürlerden M17 sıvı

besiyerine % 1 oranında inokülasyon yapılmıştır. Kültürler 30 °C’de 16 saat boyunca inkübasyona alınmıştır. Her saat başında 600 nm’de steril besiyerine karşı absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Thermo Scientific Evolution 201 UV-Visible Spektrofotometre (Shanghai, China) kullanılmıştır. Ayrıca, inkübasyonun 6. saatinden 12. saatine kadar 2 saatte bir M17 agara dökme plak yöntemi ile kültürel ekim yapılmıştır. Absorbans-zaman grafiğine ve kültürel sayım sonuçlarına göre bu kültürlerde maksimum canlı bakteri sayısına 12 saatlik inkübasyon sonunda ulaşıldığı belirlenmiştir. Bu nedenle, yapılan çalışmalarda kültürlerin canlandırılması ve geliştirilmesi işlemleri, 30 °C’de 12 saatlik inkübe edilmeleri ile gerçekleştirilmiştir. Canlı hücre sayım sonuçları log KOB/mL (koloni oluşturan birim/mL) olarak belirlenmiştir. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CM41 ticari DVS kültür olup kültürel sayım sonucunda yaklaşık 11 log KOB/g canlı bakteri içerdiği tespit edilmiştir. Gerekli seyreltmeler yapılarak yaklaşık 9 log KOB/mL olacak şekilde çalışmalarda kullanılmıştır.

3.5 Laktik Asit Bakterileri İçin Sütün Asidifikasyon Eğrilerinin Belirlenmesi

Yağsız UHT süt aseptik koşullar altında 3 adet 40 mL’lik viallere alınmış ve ardından, % 0.3’lük H₂O₂ kullanılarak sanitize edilmiş 3 adet kombine pH elektrodu (pHC3001-8, Radiometer analytical, France) viallere daldırılmıştır. pH değeri dengeye geldikten sonra art arda 2 defa canlandırılmış kültür, içinde pH elektrodu bulunan yağsız UHT süte % 1 oranında inoküle edilmiştir. Vialler hava almayacak şekilde kapatılmış ve 30 °C’deki su banyosuna yerleştirilmiştir. Data logger (Elit 9808, 8 Channel Ion Analysers and Software, Nico2000 Ltd, London, UK) kullanılarak her 5 dakikada bir 24 saat süreyle pH ölçümü yapılmıştır.

3.6 Laktik Asit Bakterilerinin Sütü İndirgeme Kapasitelerinin Belirlenmesi

Yağsız UHT süt aseptik koşullar altında 3 adet 40 mL’lik viallere alınmış ve ardından % 0.3’lük H₂O₂ kullanılarak sanitize edilmiş 3 adet kombine Ag/AgCl redoks elektrodu (InLab® Redox, Mettler-Toledo AG, Switzerland, elektrodun referans sistem dolgu sıvısı 3 M KCl olup standart hidrojen elektroda karşı 25 °C’de düzeltme faktörü 207 mV’dir) viallere daldırılmıştır. Redoks potansiyeli dengeye geldikten sonra (yaklaşık 5 dk.) art arda 2 defa canlandırılmış kültür, içinde redoks elektrodu bulunan yağsız UHT süte % 1 oranında inoküle edilmiştir. Vialler hava almayacak şekilde kapatılmış ve 30 °C’deki su banyosuna yerleştirilmiştir. Data logger kullanılarak her 5 dakikada bir 24 saat süreyle redoks ölçümü yapılmıştır. Tüm sonuçlar, E_h düzeltmesi yapılmadan direkt ORP (oksidasyon-redüksiyon potansiyeli) olarak verilmiştir.

3.7 Oksidasyon Redüksiyon Potansiyelinin Aminoasit Katabolizması Üzerindeki Etkisi

3.7.1 Kültürlerin Hazırlanması

L. lactis, *L. lactis* subsp. *lactis* 35-C-9, *L. lactis* subsp. *cremoris* HP, *L. lactis* subsp. *cremoris* IP5, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 ve *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşları ile ayrı ayrı çalışılmıştır. *L. lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* 35-C-9, *L. lactis* subsp. *cremoris* HP, *L. lactis* subsp. *cremoris* IP5, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşları M17 sıvı besiyeri kullanılarak 30 °C’de 12 saatlik canlandırma işlemine tabi tutulmuştur. Ardından, bu kültürden % 1 oranında M17 sıvı besiyerine inokülasyon gerçekleştirilmiş ve tekrar 30 °C’de 12 saat inkübasyona bırakılmıştır. Son olarak, elde edilen bu kültürden % 1 oranında M17 sıvı besiyerine tekrar ekim yapılmış ve 30 °C’de 12 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, elde edilen kültür 24 °C sıcaklıkta 4000 g’de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Ardından, süpernatant uzaklaştırılmış ve bakteri peleti 2 defa 75 mM derişime sahip β -gliserofosfat tamponu ile yıkanmıştır. *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 kültürü liyofilize halde bulunduğu için 75 mM β -gliserofosfat tamponu içinde süspanse edilmiş ve 2 defa aynı tampon ile yıkanmıştır.

3.7.2 Model Sistemlerin Hazırlanması

Yukarıda hazırlanan bakteri peletleri aşağıda verilen tampon ortamlarında süspanse edilerek kullanılmıştır [39]. Bu amaçla;

- yükseltgenmiş reaksiyon ortamı olarak; 100 mM potasyum fosfat tamponu, 0.05 mM piridoksal 5-fosfat ve 24 mM potasyum ferrisiyanid içeren çözelti (ORP +390±30 mV) (pH 6.0)
- indirgenmiş reaksiyon ortamı olarak; 100 mM potasyum fosfat tamponu, 0.05 mM piridoksal 5-fosfat ve 30 mM ditiyotritol (DTT) içeren çözelti (ORP -230±20 mV) (pH 6.0)
- kontrol (normal) ortamı olarak; 100 mM potasyum fosfat tamponu, 0.05 mM piridoksal 5-fosfat içeren çözelti (ORP +300±30 mV) (pH 6.0)

kullanılmıştır (redoks değerleri herhangi bir düzeltme yapılmadan direkt ölçülen değerler olup, kısaca ORP olarak ifade edilmiştir).

Laktik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilen aminoasit katabolizması sonucunda üretilen aroma bileşiklerini saptamak amacıyla, her bir reaksiyon ortamına fenilalanin,

metiyonin, triptofan ve lösin aminoasitlerinden, son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde, ayrı ayrı ilave edilmiştir. Böylece, her bir kültür için 12 farklı reaksiyon ortamı oluşturulmuştur. Pelet halinde bulunan kültür bu reaksiyon ortamları içerisinde sayısı $\sim 10^9$ KOB/mL olacak şekilde süspanse edilmiştir. Hazırlanan bu süspanسیونlardan, aroma analizi için GC-MS viallerine (5 mL olacak şekilde 20 mL'lik viallere alınmış ve üzerine 50 µL 40 ppm 2-metil-3-heptanon iç standart olarak eklenmiştir), redoks potansiyeli ve pH ölçümü için uygun viallere (20 mL olacak şekilde 40 mL'lik viallere) alınmış ve 30 °C'de çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Tüm vialler hava almayacak şekilde sıkıca kapatılmıştır. Ayrıca, tüm deneylerde kontrol ortamı olarak bakteri içermeyen (negatif kontrol) veya substrat (aminoasit) içermeyen (pozitif kontrol) ortamlar kullanılmıştır. İnkübasyonun 0., 2. ve 4. günlerinde örnekler alınmış, SPME-GC-MS ile uçucu bileşiklerin analizi, ORP ve pH ölçümleri yapılmıştır. Ayrıca, bakterilerin inkübasyon süresi boyunca canlılığını belirlemek için M17 agar besiyerine ekim yapılmıştır.

3.7.3 SPME-GC-MS ile Uçucu Bileşiklerin Saptanması

Uçucu maddelerin ekstraksiyonunda çözücüsüz teknik kullanılmıştır. Bu amaçla, yukarıda hazırlanmış olan ve içinde örneklerin/ iç standardın bulunduğu GC-MS vialleri, belirtilen sürelerde inkübasyondan çıkarılmış ve direkt olarak analizde kullanılmıştır. Viallerin tepe boşluğunda bulunan uçucu bileşiklerin ekstraksiyonu, SPME CAR/PDMS fiber (75 µm, 1 cm, Carboxen/Polydimethylsiloxane, Supelco, Bellefonte, PA, USA) ile otosampler (ThermoScientific TriPlus RSH, Switzerland) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fiber, vial içinde 40 °C'de 30 dakika tepe boşluğunda (headspace) tutulmuş ve uçucu maddelerin adsorpsiyonu sağlanmıştır. Uçucu maddelerin analizinde ThermoScientific ISQ-QD GC-MS sistemi (ThermoFisher Scientific, USA) ve tanımlama için WILEY ve NIST kütüphaneleri kullanılmıştır. Sonuçlar uçucu bileşik pik alanı/internal standart pik alanı olarak verilmiştir. Analiz koşulları Çizelge 3.1'de belirtildiği gibi ayarlanmıştır.

Çizelge 3.1. Aminoasit katabolizması sonucunda üretilen uçucu bileşiklerin analizleri için kullanılan GC-MS koşulları

Desorpsiyon:	SPME fiber 270 °C’de 5 dakika
Enjektör:	Splitless mode
Dedektör:	ISQ-QD MS
Kolon:	TR-WaxMS kolon (60 m uzunluk x 0.25 mm iç çap x 0.25 µm film kalınlığı, ThermoFisher Scientific, Bellefonte PA, USA)
Taşıyıcı gaz:	Helyum (1 mL/dk) akış hızında
Kütle aralığı:	25-350
Sıcaklık programı:	Sıcaklık, 40 °C’de 10 dakika beklemeden sonra, 5 °C/dak hızla artarak 240°C’ye çıkmıştır. Bu sıcaklıkta 15 dakika bekletilmiştir.

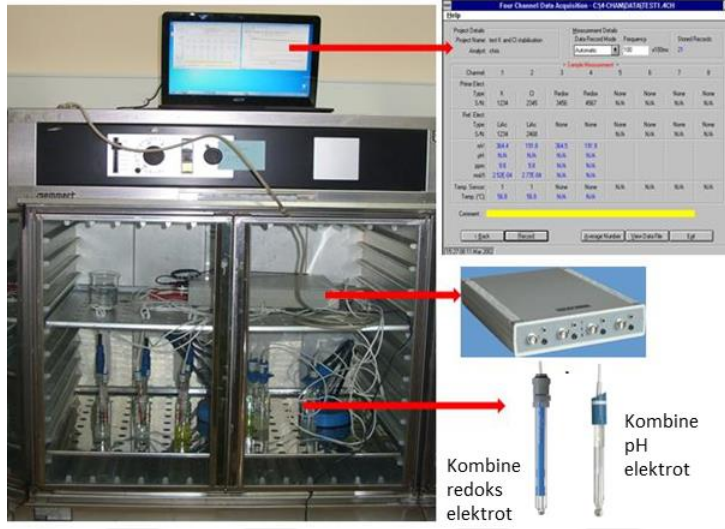
3.7.4 Aminoasit Katabolizması Çalışmasından Elde Edilen Verilere Temel Bileşen Analizi (PCA) Uygulaması

Temel Bileşen Analizi (Principal Component Analysis, PCA) Solo 8.1 (Eigenvector Research, Inc.) programı kullanılarak yapılmıştır. Veriler preprocessing işleminden önce uçucu bileşiğe ait pik alanının internal standardın pik alanına oranı şeklinde düzenlenmiştir. Sırasıyla, verilere birinci türev (derece:2) ve mean center preprocessing uygulanmıştır.

3.7.5 Redoks Potansiyeli ve pH Ölçümü

Redoks potansiyelinin ölçümü için kombine Ag/AgCl redoks elektrodu (InLab® Redox, Mettler-Toledo AG, Switzerland) ve pH ölçümü için kombine pH elektrodu (pHC3001-8, Radiometer Analytical, France) kullanılmıştır. Elektrotlar 8 kanal ELIT 9808 ISE/pH interfaz (data logger) (Nico2000 Ltd, London, UK) ile akuple kullanılmış ve veriler bu interfaza ait bilgisayar programı kullanılarak kayıt edilmiştir. Elektrotlar 20 mL reaksiyon ortamı içeren 40 mL’lik viallere daldırılmış ve kapağı sıkıca kapatılmıştır. Dengeye ulaştıktan sonra ölçümler kaydedilmiştir. Her analiz öncesinde ve sonrasında redoks elektrotları ultra ince alüminyum oksit tozu ile temizlenmiştir. Daha sonra elektrot yüzeyi saf su ile yıkanmış ve 3 M KCl çözeltisinde ölçüm doğruluğu test edilmiştir. Gerekli görülmesi durumunda elektrotlar bir süre saf su içinde ultrasonik su banyosunda bekletilmiştir. Ayrıca, elektrotların (redoks ve pH) dolgu sıvıları gerekli görüldüğünde değiştirilmiştir. Elektrot gözeneklerinde olası tıkanmaların önlenmesi için, üreticinin önerdiği çözeltilerle temizleme yapılmıştır. Bu işlemler tüm deney düzeneğinde

tekrarlanmıştır. Ölçüm sonuçları direkt ORP (mV) olarak verilmiştir. Ölçümler oda sıcaklığında yapılmıştır. Ölçüm düzeneği aşağıda görülmektedir.



Şekil 3.1. Aminoasit katabolizmasının gerçekleştirildiği model sistemlerde redoks potansiyeli ve pH ölçümü düzeneği

3.7.6 Laktokok Sayımı

Model sistemlerden örnek alınarak uygun dilüsyonlar hazırlanmış ve M17 agar besiyerine (Merck) dökme plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. Kültürler 30 °C’de 72 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda gelişen tipik kolonilerin sayımı gerçekleştirilmiştir. Sayım sonuçları log KOB/mL olarak verilmiştir [100].

3.8 Peynirin Redoks Potansiyelinin Kontrolü İçin Kullanılacak Redoks Ajanlarının Belirlenmesi

3.8.1 Fermente Sütün Redoks Potansiyelinin Kontrol Altında Tutulması

Bu çalışmada kullanılan indirgen ve yükseltgen ajanlar ve bunların konsantrasyonları Çizelge 3.2’de verilmiştir. Yağsız UHT süt aseptik koşullar altında 6 adet vialle alınmış ve indirgen veya yükseltgen ajanlar Çizelge 3.2’de belirtilen konsantrasyonda süte eklenmiştir. Ardından % 0.3’lük H₂O₂ kullanılarak sanitize edilmiş 3 adet kombine redoks elektrodu ve 3 adet kombine pH elektrodu viallere daldırılmıştır.

Redoks potansiyeli dengeye geldikten sonra (yaklaşık 5 dakika) su içinde %1 (a/h) oranında süspanse edilmiş *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu yağsız UHT süte % 1 oranında inoküle edilmiştir. Heksoz oksidaz ile yapılan çalışma kültür ilavesiz ve kültür ilaveli olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. Vialler hava almayacak şekilde kapatılmış ve 30 °C’deki su banyosuna yerleştirilmiştir. Data logger kullanılarak her 5 dakikada bir 16-24 saat süreyle redoks potansiyeli ve pH ölçümü yapılmıştır.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan indirgen ve yükseltgen ajanlar ve bunların konsantrasyonları (%a/h)

Redoks ajanları	Konsantrasyon % (a/h)			
<i>İndirgen ajanlar</i>				
Sodyum hidrosülfid (Na ₂ S ₂ O ₄)	0.01	0.025	0.05	0.1
Ditiyotreitol (DTT) (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	0.01	0.05	0.1	
Sistein (C ₃ H ₇ NO ₂ S)	0.5	1.0	1.5	
L-askorbik asit (C ₆ H ₈ O ₆)	0.05	0.1	0.5	
Heksoz oksidaz	0.025			
<i>Yükseltgen ajanlar</i>				
Potasyum iyodat (KIO ₃)	0.05	0.075	0.1	
Potasyum ferrisiyanit (K ₃ [Fe(CN) ₆])	0.05	0.1	0.5	

3.8.2 Fermente Yağı Azaltılmış UF Sütün Redoks Potansiyelinin Kontrol Altında Tutulması

Bir önceki çalışmanın (3.8.1) sonuçlarına göre indirgen ajan olarak sodyum hidrosülfid ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) ve yükseltgen ajan olarak potasyum iyodat (KIO_3) ile çalışmaya karar verilmiştir. Çalışmanın bu bölümünde UHT süt yerine yağı azaltılmış UF retantant kullanılmış olup, kullanılan redoks ajanları ve bunların konsantrasyonları Çizelge 3.3'te verilmiştir. Yağı azaltılmış UF süt aseptik koşullar altında 6 adet vialle alınmış ve redoks ajanları Çizelge 3.3'te belirtilen konsantrasyonda süte eklenmiştir. Ardından % 0.3'lük H_2O_2 kullanılarak sanitize edilmiş 3 adet kombine redoks elektrodu ve 3 adet kombine pH elektrodu viallere daldırılmıştır. Ayrıca, bu çalışmada kullanılan kültürlerin yağı azaltılmış UF sütün redoks potansiyelini ve pH'sını inkübasyon süresi boyunca nasıl etkilediğini belirleyebilmek için (kontrol olarak) süte redoks ajanları eklenmeden sadece kültür inokülasyonu gerçekleştirilmiştir.

Redoks potansiyeli dengeye geldikten sonra (yaklaşık 5 dakika) su içinde %1 (a/h) oranında süspanse edilmiş *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu veya M17 sıvı besiyerinde 2 defa art arda 12 saat süreyle canlandırma yapılan *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu yağı azaltılmış UF süte inoküle edilmiştir. *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu ile yapılan çalışmalarda % 1 ve % 3 oranında, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu ile yapılan çalışmalarda ise % 3 oranında inokülasyon gerçekleştirilmiştir. Vialler hava almayacak

şekilde kapatılmış ve 30 °C'deki su banyosuna yerleştirilmiştir. Data logger kullanılarak her 5 dakikada bir 16-24 saat süreyle redoks potansiyeli ve pH ölçümü yapılmıştır.

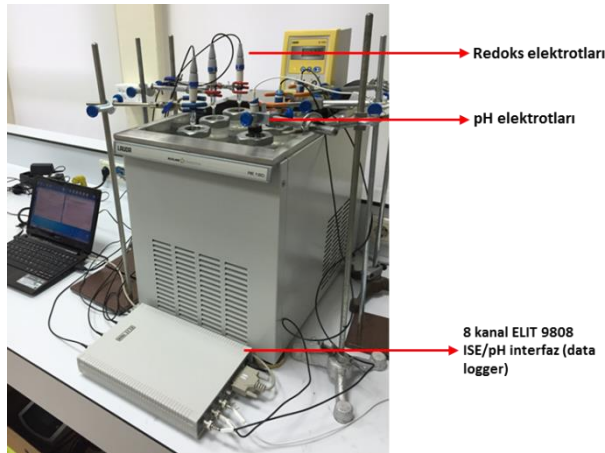
Ayrıca, kullanılan redoks ajanlarının ve konsantrasyonlarının *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşlarının canlılığı üzerindeki etkisini belirlemek için, inkübasyon sonunda M17 agara dökme plak yöntemi ile kültürel ekim gerçekleştirilmiştir. Kültürler 30 °C'de 72 saat süreyle inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda gelişen tipik koloniler sayıma alınmıştır [100]. Sonuçlar log KOB/g olarak verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan indirgen ve yükseltgen ajanlar ve bunların konsantrasyonları (%a/a)

Redoks ajanları		Konsantrasyon % (a/a)		
<i>İndirgen ajan</i>				
Sodyum hidrosülfıt (Na ₂ S ₂ O ₄)	0.05	0.025	0.01	
<i>Yükseltgen ajanlar</i>				
Potasyum iyodat (KIO ₃)	0.05	0.04	0.03	0.025

3.9 UF Peynir Üretimi Boyunca Redoks Potansiyeli ve pH Değişiminin Belirlenmesi

UF peynir üretimi süresince redoks potansiyeli ve pH'da meydana gelen değişimleri belirlemek için gerçekleştirilen peynir üretim basamakları Çizelge 3.4'te verilmiştir. Üretimde tam yağlı UF süt kullanılmıştır. Redoks ve pH ölçümleri yaklaşık 3 gün süreyle data logger ile kayıt edilmiştir. Ölçüm düzeneği Şekil 3.2'de verilmiştir. Her deneme düzeneği öncesi redoks elektrotun platin yüzeyi temizlenmiştir.



Şekil 3.2. UF peynir üretimi süresince redoks potansiyeli ve pH'da meydana gelen değişimleri belirlemek için oluşturulan ölçüm düzeneği

Çizelge 3.4. UF peynir üretimi boyunca redoks potansiyeli ve pH değişiminin belirlenmesi

Üretim Basamakları	K1	İ1	Y1	K2	İ2	Y2
Pastörizasyon	75 °C, 5 dakika					
Soğutma	45 °C					
Kaplara dolum	120 g					
Redoks ajanlarının ilavesi	-	% 0.01 (%a/a) Na ₂ S ₂ O ₄	% 0.025 (%a/a) KIO ₃	-	% 0.01 (%a/a) Na ₂ S ₂ O ₄	% 0.025 (%a/a) KIO ₃
Kültür ilavesi (35 °C’de)	L. lactis subsp. lactis CM41 (3.6 mL (%1 a/h) bakteri süspansiyonu / 120 g UF süt)			L. lactis subsp. cremoris UD459 (3.6 mL kültür / 120 g UF süt)		
Koagülant ilavesi	Maxiren®, 600 IMCU (DSM Food Specialties B.V.), 9µL					
Redoks ve pH ölçümü	Ag/AgCl redoks elektrotları (InLab® Redox, Mettler-Toledo AG) Kombine pH elektrodu (pHC3001-8, Radiometer analytical) Data logger (Elit 9808, 8 Channel Ion Analysers and Software, Nico2000 Ltd)					
İnkübasyon	33-34 °C’de soğutmalı su banyosunda (Lauda, RE120) peynirlerde uygun pH düşüşü gerçekleşene kadar (18-26 saat)					
Tuz ilavesi	2 g tuz	2 g tuz	2 g tuz + KIO ₃ % 0.025 (%a/a)	2 g tuz	2 g tuz	2 g tuz + KIO ₃ % 0.025 (%a/a)
	Yaklaşık 2 saat oda sıcaklığında inkübasyon					
Sıcaklığın düşürülmesi	+ 4 °C’de inkübasyon					

K1, İ1, Y1: *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu kullanılarak yapılan üretim, K2, İ2, Y2: *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu kullanılarak yapılan üretim (K:Kontrol, İ:İndirgen, Y:Yükseltgen ortam)

3.10 UF Peynir Üretimi ve Olgunlaşma Periyodu Süresince UF Peynirlere Uygulanan Analizler

3.10.1 UF Peynir Üretimi

Redoks potansiyelinin UF peynirin olgunlaşma karakteristikleri üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla iki farklı saf kültür kullanılarak (*L. lactis* subsp. *lactis* CM41 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459) peynir üretimi gerçekleştirilmiştir. Her bir kültür ile kontrol (K1 ve K2), indirgenmiş (İ1 ve İ2) ve yükseltgenmiş (Y1 ve Y2) olmak üzere altı farklı peynir üretilmiştir. UF peynir üretiminde kullanılan tam yağlı UF retentantının bileşimi Çizelge 3.5’te verilmiştir. UF peynir üretiminin basamakları Çizelge 3.6’da verilmiştir. Akış planına uygun olarak, üretimi gerçekleştirilen UF peynirlere ait fotoğraf Şekil 3.3’te verilmiştir.

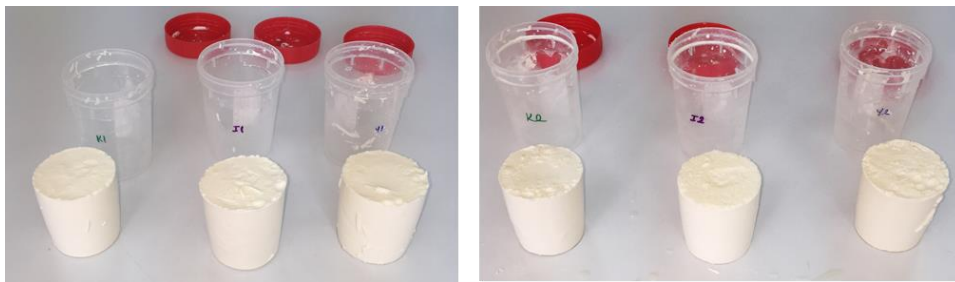
Çizelge 3.5. UF peynir üretiminde kullanılan UF retentantının bileşimi

Bileşim	UF retentantı
Kurumadde (%)	32.16±0.59
Briks	31.63±0.32
Yağ (%)	15.60±0.00
Protein (%)	10.83±0.11
Laktoz (%)	4.34±0.12
pH	6.5±0.1
ORP (mV)	146.9±8.3

Çizelge 3.6. UF peynir üretim basamakları

Üretim Basamakları	K1	İ1	Y1	K2	İ2	Y2
Pastörizasyon	75 °C, 5 dakika					
Soğutma	45 °C					
Kaplara dolum	120 g					
Redoks ajanlarının ilavesi	-	% 0.01 (%a/a) Na ₂ S ₂ O ₄	% 0.025 (%a/a) KIO ₃	-	% 0.01 (%a/a) Na ₂ S ₂ O ₄	% 0.025 (%a/a) KIO ₃
Kültür ilavesi (35 °C’de)	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CM41 (3.6 mL (%1 a/h) bakteri süspansiyonu / 120 g UF süt)			<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> UD459 (3.6 mL kültür / 120 g UF süt)		
Koagülant ilavesi	Maxiren®, 600 IMCU (DSM Food Specialties B.V.), 9µL					
İnkübasyon	33-34 °C’de etüvde peynirlerde uygun pH düşüşü gerçekleşene kadar (18-26 saat)					
Tuz ilavesi	2 g tuz	2 g tuz	2 g tuz + KIO ₃ % 0.025 (%a/a)	2 g tuz	2 g tuz	2 g tuz + KIO ₃ % 0.025 (%a/a)
	Yaklaşık 2 saat oda sıcaklığında inkübasyon					
Olgunlaştırma	+ 6-8 °C’de, 90 gün olgunlaştırma					

K1, İ1, Y1: *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu kullanılarak yapılan üretim, **K2, İ2, Y2:** *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu kullanılarak yapılan üretim (**K:**Kontrol, **İ:**İndirgen, **Y:**Yükseltgen ortam)



Şekil 3.3. Üretimi gerçekleştirilen UF peynir örnekleri

3.10.2 Mikrobiyolojik Analizler

Olgunlaşmanın 1., 7., 30., 60. ve 90. günlerinde her bir peynir örneği için örnekleme yapılmış ve analizler 4 paralelli olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Peynirlerden alınan 10'ar g örnek, 90 mL steril trisodyum sitrat (Sigma) çözeltisi (2 g/100 mL, a/h) ile karıştırılmış ve Stomacher'da (Stomacher 400, Seward Laboratory, England) 2 dakika homojenizasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen süspansiyonun uygun dilüsyonları serum fizyolojik çözeltisi (0.85 g NaCl/100 mL, a/h) kullanılarak hazırlanmıştır. Ekim sonuçları log KOB/g olarak verilmiştir.

Laktokok sayımı

Starter laktokokların sayımı için M17 agar kullanılmıştır. Ekim dökme plak yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve Petri kutusunun 2/3'ünü kaplayacak kadar M17 agar dökülmüştür. Kültürler 30 °C'de 72 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tipik koloniler sayılmıştır [100]. Sonuçlar log KOB/g olarak verilmiştir.

Laktobasil sayımı

Laktobasil sayımı için, Rogosa agar (Merck) kullanılarak çift katlı dökme plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. Kültürler 30 °C'de 5 gün inkübe edilmiştir [101].

Peynirlerde koliform aranması

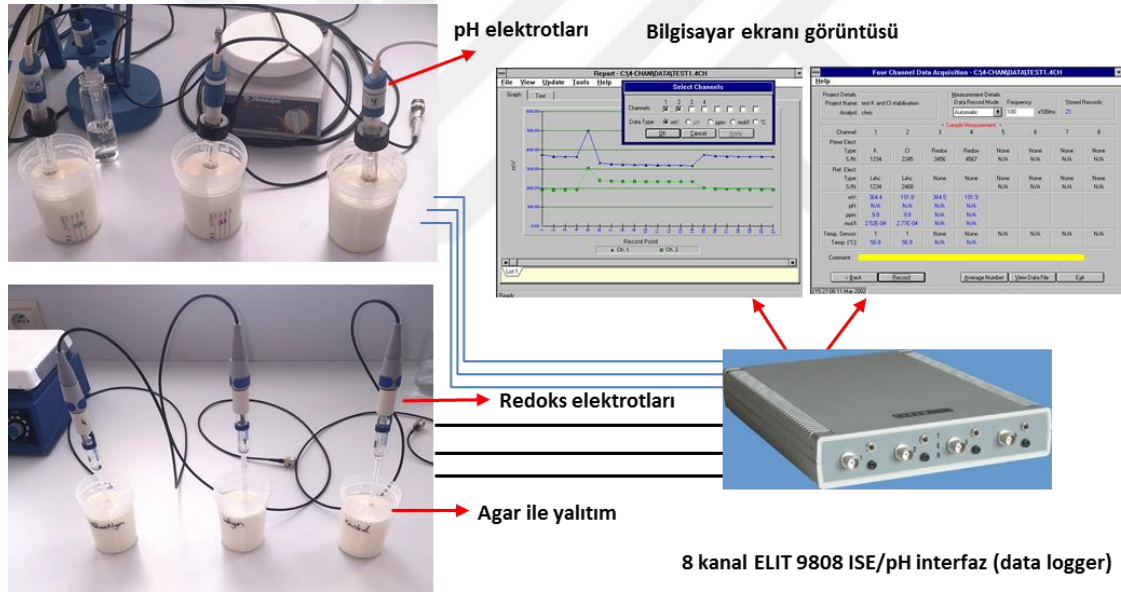
Koliform grubu bakterilerin varlığının tespiti için, Violet Red Bile (VRB) Agar (Merck) besiyeri kullanılarak çift katlı dökme plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. Kültürler 37 °C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir.

3.10.3 Bileşim Analizleri

Olgunlaşmanın 7., 30., 60. ve 90. günlerinde her bir peynir örneği için örnekleme yapılmış ve analizler (kuru madde, protein, yağ, tuz, titrasyon asitliği) 3 paralelli olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Kuru madde tayini gravimetrik yöntem kullanılarak 103 °C'de yaklaşık 5 saat süreyle tutularak gerçekleştirilmiştir [102]. Protein tayini Kjeldahl metoduna göre yapılmıştır [103]. Yağ analizi Gerber yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir [104]. Titrasyon asitliği analizi TS 591 Beyaz Peynir Standardı'na göre yapılmıştır. Sonuçlar % laktik asit cinsinden verilmiştir [105]. Peynir örneklerindeki tuz miktarı potansiyometrik titrasyon ile belirlenmiştir [106]. Peynir örneklerinde meydana gelen su salma (peyniraltı suyu ayrılması) miktarı tartım yapılarak belirlenmiş ve % olarak hesaplanmıştır.

3.10.4 Redoks Potansiyeli ve pH Ölçümleri

Her analiz öncesinde ve sonrasında redoks elektrotları ultra ince alüminyum oksit tozu ile temizlenmiştir. Daha sonra elektrot yüzeyi saf su ile yıkanmış ve 3 M KCl çözeltisinde ölçüm doğruluğu test edilmiştir [1]. Peynirlerin redoks potansiyelinin ölçümü için kombine redoks elektrotları peynir kalıbında çatlak oluşturmayacak şekilde oda sıcaklığındaki peynirin orta noktasına kadar yavaşça daldırılmıştır. Ardından, oksijenle temasını engellemek için yaklaşık 50 °C sıcaklığındaki % 1'lik agar peynir kalıbının yüzeyinde 1-2 cm'lik bir tabaka oluşacak şekilde üzerine dökülmüştür. Redoks potansiyeli dengeye gelene kadar (yaklaşık 24 saat) ölçüm alınmış ve sonunda denge durumundaki redoks potansiyeli değeri kaydedilmiştir (Şekil 3.4). Bu işlem olgunlaşmanın ilgili günlerinde tekrarlanmıştır. Ölçüm sonunda, elektrotlar Topcu ve ark. [1] tarafından belirtilen yöntemle göre temizlenmiştir. pH ölçümü için kombine pH elektrodu direkt olarak peynir kitlesinin içine daldırılmış ve ölçüm alınmıştır (Şekil 3.4). Ölçümler oda sıcaklığında yapılmıştır.



Şekil 3.4. Üretilen peynirlerde redoks ve pH ölçüm düzeneği

3.10.5 Proteoliz Düzeyini Belirlemeye Yönelik Analizler

pH 4.6'da çözünür ve çözünmeyen fraksiyon ekstraksiyonu

pH 4.6'da çözünür ve pH 4.6'da çözünmeyen fraksiyon ekstraksiyonu bazı modifikasyonlarla Kuchroo ve Fox'a [107] göre yapılmıştır. Ezilmiş ve homojen hale getirilmiş peynir örneklerinden 7 g alınmış ve üzerine 35 mL oda sıcaklığında deiyonize su

eklenmiştir. Bu karışıma 12000 rpm’de 1 dakika süreyle homojenizasyon (Heidolph Silent Crusher M, Germany) yapılmıştır. Homojenizatların pH’sı 2 N HCl ve 2 N NaOH kullanılarak 4.6’ya ayarlanmıştır. Daha sonra, homojenizatlar 40 °C’de çalkalamalı su banyosunda 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından, 4 °C’de ve 5000 g’de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Whatman No:113 filtre kağıdı ile filtrasyon yapılmıştır. pH 4.6’da çözünür fraksiyon, pH 4.6’da çözünür azot tayini, % 12’lik TCA’da çözünür azot tayini, toplam serbest aminoasit tayini ve RP-HPLC ile peptit profilinin belirlenmesinde kullanılmak üzere ayrılmıştır. Analiz anına kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir. pH 4.6’da çözünmeyen fraksiyon ise liyofilize edilerek üre-poliakrilamid jel elektroforezi (üre-PAGE) ve sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS- PAGE) için hazırlanmıştır.

pH 4.6’da çözünür azot tayini

pH 4.6’da çözünür fraksiyonun bir kısmı Kjeldahl yöntemi ile azotlu madde tayininde kullanılmıştır [104]. pH 4.6’da çözünür azotlu (ÇA) maddeler bazında olgunlaşma indeksi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmaktadır.

Olgunlaşma indeksi (pH 4.6’da ÇA bazında) = $\text{pH 4.6’da ÇA} / \text{toplam azot} \times 100$

% 12’lik TCA’da çözünür azot tayini

pH 4.6’da çözünür fraksiyon ile %24’lük trikloroasetik asit (TCA) (Merck) çözeltisi 1:1 oranında karıştırılmış ve 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından, 10000 g’de 5 dakika santrifüj edilmiş ve Whatman No:42 filtre kağıdı kullanılarak filtre edilmiştir. Daha sonra, Kjeldahl yöntemi ile azotlu madde tayini yapılmıştır [104]. TCA’da (%12’lik) çözünür azotlu maddeler bazında olgunlaşma indeksi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmaktadır.

Olgunlaşma indeksi (TCA’da(%12) ÇA bazında) = $\text{TCA’da (\%12) ÇA} / \text{toplam azot} \times 100$

Toplam serbest aminoasit tayini

Peynir örneklerindeki toplam serbest aminoasit miktarını belirlemek için trinitrobenzensülfonik asit (TNBS) yöntemi kullanılmış ve analiz Ardö ve Polychroniadou’ya [104] göre yapılmıştır. Ölçümler, Thermo Scientific Evolution 201 UV-Visible Spektrofotometre (Shanghai, China) ile gerçekleştirilmiştir.

RP-HPLC ile peptit profilinin belirlenmesi

Hazırlanan pH 4.6'da çözünür fraksiyon, deiyonize suda hazırlanmış % 0.2 TFA (trifloroasetik asit, h/h) (Acros Organics) ile 1:1 oranında karıştırılmış ve vortekslenmiştir. Ardından, 20000 g'de, 25 °C'de 15 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Süpernatant HPLC vialine aktarılmış ve analize alınmıştır.

Analiz için, ThermoFinnigan SpectraSystem HPLC sistemi (ThermoFinnigan Inc., CA, USA) kullanılmıştır. Sistem; AS3000 model otosampler (örnek enjeksiyon miktarı 100 µL, kolon sıcaklığı 30 °C), SCM 1000 degazer, P4000 gradyent pompa, UV 6000LP DAD dedektörden oluşmaktadır. Kromatografik ayırım için Phenomenex Jupiter C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm, 300 Å) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) RP-HPLC kolonu kullanılmıştır. Mobil faz A olarak, % 0.1 TFA içeren deiyonize su ve mobil faz B olarak, % 0.1 TFA içeren far UV grade asetonitril (Merck) kullanılmıştır. Ölçümler 214 ve 280 nm'de yapılmıştır. Veriler ChromQuest 5.0 yazılımı ile değerlendirilmiştir. Elüsyon, gradyent olarak gerçekleştirilmiştir [108].

Üre-poliakrilamid jel elektroforezi (Üre-PAGE)

Peynir örneklerinde olgunlaşma süresince meydana gelen proteoliz düzeyinin elektroforetik olarak belirlenmesi için kullanılan üre-PAGE yöntemi Andrews [109], Shalabi ve Fox [110] ve Bulat [8] tarafından belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Liyofilize edilmiş pH 4.6'da çözünmeyen fraksiyon örneklerinden 10 mg alınmış ve 1 mL elektroforez örnek hazırlama tamponunda çözülmüştür. Analizde, sodyum kazeinat standart olarak kullanılmıştır. Hazırlanan bu örneklerden jellere 8 µL yüklenmiştir. Çalışmada, Protean II XL dikey jel ünitesi kullanılmıştır (Bio-Rad Laboratories Ltd., Watford, UK).

Jellere örnekler yüklenmeden önce 280 V'da 40 dakika ön yürütme yapılmıştır. Ardından, örnekler jelle yüklendikten sonra, sıralama jeline 280 V, ayırma jeline ise 300 V sabit voltaj uygulanmıştır. Yürütme tamamlandıktan sonra, Blakesley ve Boezi [111] tarafından geliştirilen yöntemle göre jeller boyanmıştır. Jeller, Agfa Fotolook v3.5 ile kontrol edilen Agfa Arcus 1200 tarayıcı kullanılarak taranmıştır.

Sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel elektroforezi (SDS- PAGE)

SDS-PAGE yöntemi bazı modifikasyonlarla Laemmli [112] ve Hayaloğlu ve ark. [113] tarafından belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Liyofilize edilmiş pH 4.6'da çözünmeyen fraksiyonlardan 10 mg örnek 1 mL örnek hazırlama tamponunda (pH 6.8) çözülmüştür. Analizde, sodyum kazeinat standart olarak kullanılmıştır. Hazırlanan bu örneklerden 8 µL ve sodyum kazeinattan ise 4 µL jellere yüklenmiştir. Çalışmada, Protean II XL dikey jel ünitesi kullanılmıştır (Bio-Rad Laboratories Ltd., Watford, UK).

Örnekler yüklenmeden önce jellere 200 V'da 40 dakika ön yürütme yapılmıştır. Daha sonra, örnekler jelle yüklendikten sonra, 200 V sabit voltaj ile yürütme yapılmıştır. Yürütme tamamlandıktan sonra, jeller tespit çözeltisinde 60 dakika bekletilmiştir. Ardından, jeller Blakesley ve Boezi [111] tarafından geliştirilen yönteme göre boyanmıştır. Jeller, Agfa Fotolook v3.5 ile kontrol edilen Agfa Arcus 1200 tarayıcı kullanılarak taranmıştır.

3.10.6 Serbest Yağ Asidi Ekstraksiyonu ve Analizi

Peynir örneklerinde bulunan serbest yağ asitlerinin ekstraksiyonu bazı modifikasyonlarla De Jong ve Badings'e [114] göre yapılmıştır. Homojen hale getirilmiş peynir örneklerinden 3.0 g alınmış ve 8.0 g susuz sodyum sülfat (Merck) homojen bir karışım elde edilinceye kadar ezilmiştir. Karışımın üzerine 0.3 mL dietil eter içinde hazırlanmış 2.5 M H₂SO₄, 1 mL internal standart çözeltisi (herbiri 0.5 g/L konsantrasyona sahip pentanoik asit (C_{5:0}), nonanoik asit (C_{9:0}), heptadekanoik asit (C_{17:0})) ve 15 mL dietil eter/heptan (1:1) karışımı eklenmiştir. Bu karışım 1 dakika süreyle vortekslenmiş ve 490 g'de 2 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Ardından, süpernatant, içinde yaklaşık 1 g susuz sodyum sülfat bulunan kaplara aktarılmıştır. Daha sonra, santrifüjden sonra altta kalan pelet üzerine 2 defa daha 15 mL dietil eter/heptan (1:1) karışımı eklenmiş, vortekslenmiş, santrifüjlenmiş ve süpernatantlar toplanmıştır. Sonunda hacmi yaklaşık 45 mL olan süpernatantlar, heptan kullanılarak koşullandırılan katı faz ekstraksiyon aminopropil kolondan (500 mg/ 3 mL Strata NH₂ (55 µm, 70 Å), Phenomenex, California, USA) geçirilmiştir. Ardından, nötral trigliseritleri kolondan uzaklaştırmak için 20 mL hekzan/2-propanol karışımı (3:2, h/h) geçirilmiştir. Kolon dolgu maddesine bağlanmış olan serbest yağ asitleri, dietil eter içinde hazırlanmış % 3 formik asit çözeltisinden (h/h) 2.5 mL geçirilerek viallere alınmıştır. Ektrakte edilen serbest yağ asitleri ThermoScientific TRACE 1310 GC ile analiz edilmiştir. GC sistemi, otosampler (ThermoScientific TriPlus RSH, Switzerland) ve alev

iyonlaşma dedektöründen (FID) oluşmakta ve ChromQuest 5.0 yazılımı ile kontrol edilmektedir. Analiz koşulları Çizelge 3.7’de verilmiştir. Sonuçlar mg serbest yağ asidi/kg peynir olarak verilmiştir [8].

Çizelge 3.7. Serbest yağ asidi analizinde kullanılan GC koşulları

Kolon tipi:	TR-FFAP kolon (30 m uzunluk x 0.25 mm iç çap x 0.25 µm film kalınlığı, Thermo Fisher Scientific, Bellefonte PA, USA)
Taşıyıcı faz:	Helyum
Akış hızı:	2 mL/dakika
Split oranı:	20:1
Enjeksiyon sıcaklığı:	250 °C
Dedektör:	FID, 260 °C
Ayrım sıcaklığı:	Kolon sıcaklığı 90 °C’den başlatılmış ve bu sıcaklıkta 1 dakika bekletildikten sonra 240 °C’ye çıkarılmıştır (10 °C/dakika) ve bu sıcaklıkta 10 dakika sabit tutulmuştur.

3.10.7 Organik Asit ve Şeker Analizi

Peynir numunesinden 5 g alınarak 25 ml 0.013 N H₂SO₄ eklenmiş ve 3 dakika süreyle orta hızda homojenize edilmiştir (Heidolph, Silent Crusher M). Örnekler daha sonra 4-6 °C’de 10000 g değerinde 20 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant 0,45 µm’lik naylon filtreden geçirilmiş ve 20 µL örnek, HPLC’ye enjekte edilmiştir [115, 116].

Analizlerde, P4000 model gradyent pompa, AS3000 model otosampler, UV6000 model PDA (Photo-diode Array Dedector) dedektörden oluşan ThermoFinnigan SpectraSystem HPLC kullanılmıştır. Ayrıca, şeker analizleri için, bu sisteme seri bağlanmış olan bir refraktif indeks (RI) dedektör (Shodex RI-101, Showa Denko, NY, USA) kullanılmıştır. Mobil faz olarak deiyonize suda hazırlanmış 0.013 N H₂SO₄ kullanılmıştır. Kromatogramlar, ChromQuest 5.0 yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir. Sitrik, pirüvik, laktik, formik, ve asetik asit ölçümleri 210 nm, orotik, ürik asit ve asetoin ölçümleri 280 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Analizler izokratik olarak gerçekleştirilmiştir [115, 117]. Ayırmada, birlikte çıkan organik asit piklerinin hesaplanması Zeppa ve ark.’na [118] uygun olarak yapılmıştır.

Her bir örnekteki organik asit ve şeker miktarlarının belirlenmesi ve tanımlanması için yüksek saflıkta standartlar kullanılmıştır. Bu amaçla standart olarak kullanılan sitrik asit, orotik asit, laktik asit, ürik asit, formik asit, asetik asit, pirüvik asit, asetoin, laktoz,

galaktoz ve glukoz Sigma, Fluka veya Merck firmalarından temin edilmiştir. Organik asit ve şeker analizleri için kullanılan HPLC koşulları Çizelge 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Organik asit ve şeker analizleri için kullanılan HPLC koşulları

Kolon tipi:	Rezex ROA H ⁺ kolon (300x7,8 mm. ID) (Phenomenex, USA)
Kolon sıcaklığı:	65 °C
Mobil faz:	0.013 N H ₂ SO ₄
Akış hızı:	0.50 mL/dakika
Dedektör:	PDA 210 nm ve 280 nm, organik asit analizi için
Dedektör:	RI, şeker analizi için

3.10.8 Uçucu Bileşiklerin Analizi

Peynirlerin uçucu bileşiklerinin ekstraksiyonu için çözücüsüz yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla, 3'er g peynir örneği 20 mL'lik viallere alınmıştır. İç standart olarak, 2-metil-3-heptanon kullanılmıştır. Konsantrasyonu 20 ppm olan 2-metil-3-heptanon peynir örneklerine 80 µl ilave edilmiştir. SPME fiber olarak DVB/CAR/PDMS (50/30 µm, 1 cm stbalefleks fiber, divinilbenzen/ karboksen/ polidimetilsiloksan, Supelco, Bellefonte, PA, USA) kullanılmıştır. Analizlerde, Bölüm 3.7.3'te verilen sistem kullanılmıştır. Fiber, 45 °C'de 30 dak. dengeye getirilmiş vial içinde 30 dakika tepe boşluğunda tutulmuş (45 °C'de) ve uçucu maddelerin adsorplanması sağlanmıştır. Analiz koşulları Çizelge 3.9'da verilmiştir[119, 120]. Tanımlama için WILEY, NIST kütüphaneleri ve dış standart kullanılmıştır. Alıkonma indeks hesaplamasında C8-C20 alkan standardı (Supelco, Bellefonte, PA, USA) kullanılmıştır. Sonuçlar uçucu bileşik pik alanı/internal standart pik alanı olarak verilmiştir. Analiz koşulları aşağıda belirtildiği gibi ayarlanmıştır.

Çizelge 3.9. Uçucu bileşiklerin analizleri için kullanılan GC-MS koşulları

Desorpsiyon	: SPME fiber 260 °C'de 3 dk tutulmuştur.
Enjektör	: Splitless mode
Dedektör	: ISQ-QD MS
Kolon	: TR-WaxMS kolon (60 m uzunluk x 0,25 mm iç çap x 0,25 µm film kalınlığı, Thermo Fisher Scientific, Bellefonte PA, USA)
Taşıyıcı gaz	: Helyum, 1 mL/dk akış hızında
Kütle aralığı	: 35-350 m/z (kütle/yük)
Sıcaklık programı	: 40 °C'de 10 dakika beklemeden sonra, 5 °C/dk hızla artarak 250°C'ye çıkmıştır. Bu sıcaklıkta 10 dk. bekletilmiştir.
İyon kaynağı sıcaklığı	: 260 °C

3.10.9 Tekstürel Analizler

Enstrümental tekstür profil analizi (TPA), TA Plus Texture Analyzer (Ametek Lloyd Ins. Ltd., UK) aleti kullanarak gerçekleştirilmiştir. UF peynir örneklerinde olgunlaşma süresince sertlik, esneklik, çiğnenebilirlik, parçalanabilirlik, yüzeye yapışabilirlik ve yapışkanlık özellikleri incelenmiştir.

Bu amaçla peynir örnekleri 25 mm çap ve 20 mm yüksekliğe sahip silindir halinde kesilerek, oda sıcaklığında analiz edilmiştir. Aletin 10 mm çapındaki silindir probunun hızı 0,5 mm/s'ye ayarlanmıştır. Sıkıştırma oranı % 33 olarak belirlenmiştir [108]. Tekstür analizinde iki ardışık sıkıştırma işlemi uygulanmıştır. Elde edilen grafikten, peynir kitlesinin tekstür analiz parametreleri belirlenmiştir. Bu parametreler aşağıda açıklanmıştır.

Hardness (Sertlik): Örneğe birinci sıkıştırmada uygulanan maksimum kuvvet (N)

Springiness (Esneklik): Birinci sıkıştırma sonrası örneğin eski halini alma oranı (mm)

Gumminess (Parçalanabilirlik): Yarı katı bir gıdayı yutmaya hazır hale getirmek için gerekli parçalama kuvveti (N)

Chewiness (Çiğnenebilirlik): Katı bir gıdayı yutmaya hazır hale getirmek için gerekli çiğneme kuvveti (Nmm)

Adhesiveness (Yüzeye yapışabilirlik): Gıda ile diğer yüzeyler arasındaki çekim kuvvetinin üstesinden gelmek için gerekli güç (Nmm)

Cohesiveness (Yapışkanlık): Gıdayı bir bütün halinde tutan bağlar arasındaki kuvvet [121].

3.10.10 Duyusal Analiz

Üretimi gerçekleştirilen beyaz peynirlerin duyusal değerlendirmesi 5 panelist tarafından gerçekleştirilmiştir. Peynirler, görünüş, yapı, koku, tat, toplam kabul edilebilirlik ve acılık derecesi açısından değerlendirilmeye tabi tutulmuştur. UF beyaz peynir için duyusal değerlendirme puanları Ek 1'de verilmiştir. Toplam kabul edilebilirlik düzeyleri için hedenoik test tekniği uygulanmıştır. Peynirlerin acılık düzeyleri 4 puan üzerinden belirlenmiştir. Değerlendirmede, 0 puan acılaşmanın olmadığını ifade etmekte iken 4 puan acılaşmanın maksimum olduğunu ifade etmek için kullanılmıştır [8, 108].

3.10.11 İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde, SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılmıştır. Çalışmada analizler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Varyansların homojenliği Levene testi kullanılarak tespit edilmiştir. Varyanslar arasındaki farklılığın önem kontrolü ANOVA kullanılarak saptanmıştır. Varyans çözümleme sonuçları, Duncan çoklu karşılaştırma testleri kullanılarak $P < 0.05$ önemlilik düzeyinde değerlendirilmiştir.

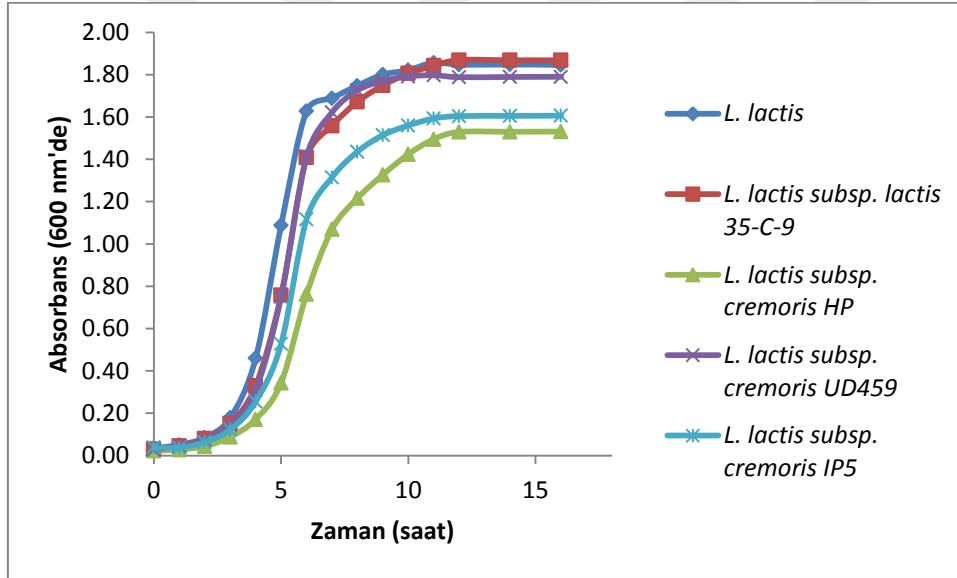
Temel Bileşen Analizi (Principal Component Analysis, PCA) Solo 8.1 (Eigenvector Research, Inc.) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler, preprocessing işleminden önce uçucu bileşiğe ait pik alanının internal standardın pik alanına oranı şeklinde düzenlenmiştir. Verilere, sırasıyla birinci türev (derece:2) ve mean center preprocessing uygulanmıştır.

Peynirlerin pH 4.6 çözünür fraksiyonlarının RP-HPLC kromatogramlarından elde edilen verilere temel bileşen analizi uygulanmıştır. Bu amaçla, uygulanan sayısal modifikasyon Piraino ve ark.'na [122] göre gerçekleştirilmiştir. Kısaca, HPLC kromatogramları (214 nm için piklerin yüksekliği/280 nm için pik alanı ve alıkonma süresi) 1'er dakikalık 91 sınıfa ayrılmış ve 5 ile 90. dakikalar arası kromatogramlar değerlendirmeye alınmıştır. Sınıf genişliği 1 dakika olarak belirlenmiştir. Şekilsel parametre 248.6 olarak ayarlanmıştır. PCA analiz kovaryans matriks olarak hesaplanmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 Laktik Asit Bakterilerinin Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi

Çalışmanın bu bölümünde araştırma kapsamında kullanılan *Lactococcus lactis* suşlarının üreme eğrileri ve kapasiteleri belirlenmiştir. Şekil 4.1 ve Çizelge 4.1 incelendiğinde, *L. lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* 35-C-9 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşlarına ait absorbans değerleri ve canlı hücre sayılarının (log KOB/mL), *L. lactis* subsp. *cremoris* IP5 ve özellikle de *L. lactis* subsp. *cremoris* HP suşuna göre daha yüksek düzeylerde olduğu görülmektedir. Maksimum canlı hücre sayısına *L. lactis* subsp. *lactis* 35-C-9 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* IP5 suşlarında inkübasyonun 12. saatinde, diğer suşlarda ise inkübasyonun 6. ve 12. saatleri arasında ulaşıldığı belirlenmiştir. Bütün bunlara karşılık denenen *L. lactis* suşlarının tamamının inkübasyonun 12. saatinde 9 log KOB/mL değerine eriştiği saptanmıştır.



Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan *Lactococcus lactis* suşlarının gelişimlerine ait absorbans-zaman eğrisi

Ayrıca, çalışmanın sonraki aşamalarında, kültürlerin logaritmik fazın sonu olan 12. saatte peletlenerek kullanılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4.1. *Lactococcus lactis* suşlarının gelişimleri süresince canlı hücre sayılarında (log KOB/mL) meydana gelen değişim

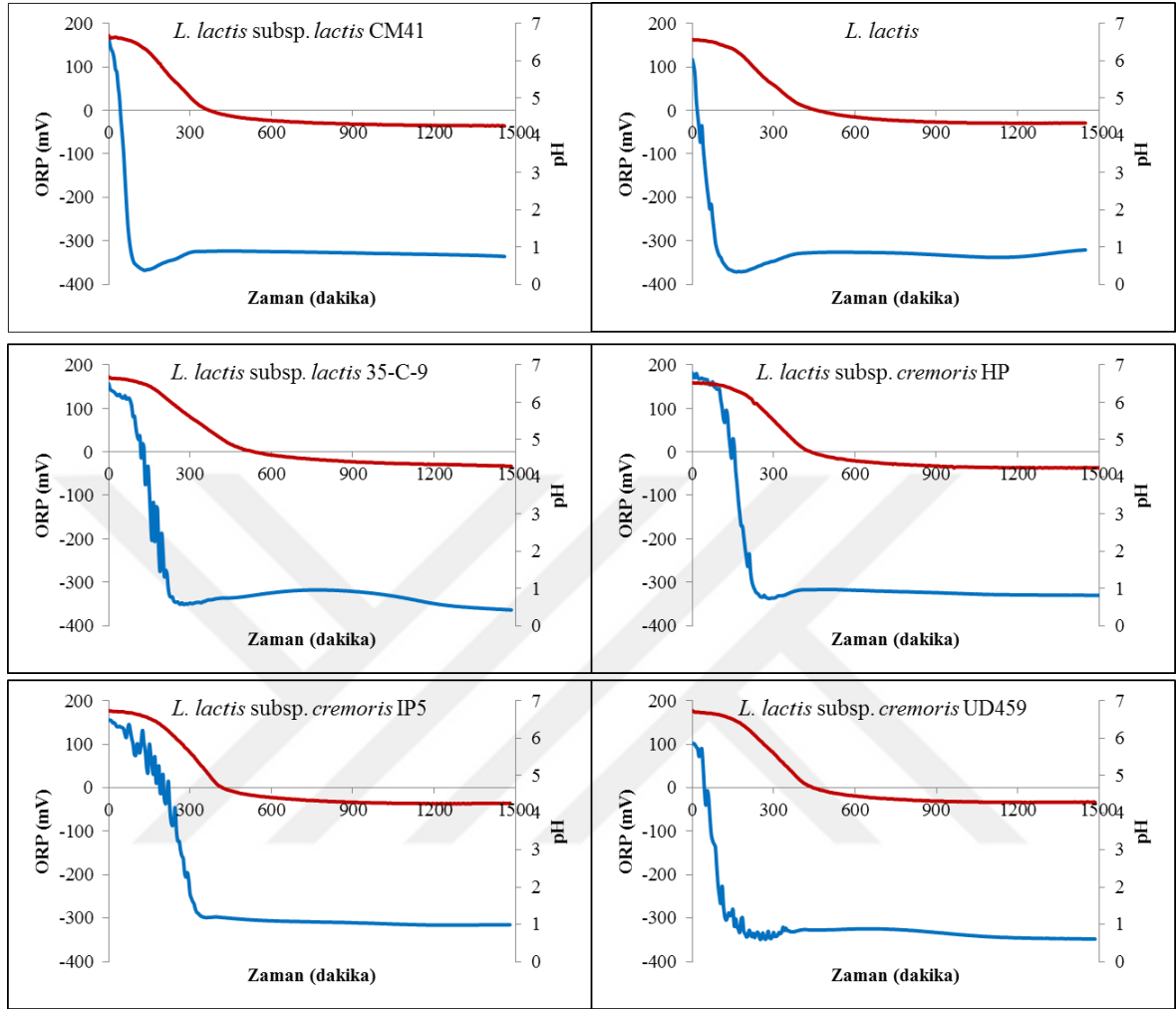
Laktik asit bakterisi (log KOB/mL)	İnkübasyon Süresi (saat)			
	6	8	10	12
<i>L. lactis</i>	9.66 ± 0.02	9.53 ± 0.04	9.58 ± 0.01	9.51 ± 0.04
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 35-C-9	9.40 ± 0.02	9.38 ± 0.01	9.22 ± 0.01	9.78 ± 0.03
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> IP5	8.55 ± 0.16	8.66 ± 0.03	8.95 ± 0.13	9.22 ± 0.05
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> HP	8.36 ± 0.03	8.46 ± 0.08	8.64 ± 0.07	8.58 ± 0.06
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> UD459	9.06 ± 0.08	8.94 ± 0.06	9.13 ± 0.11	9.13 ± 0.05

4.2 Laktik Asit Bakterileri Tarafından Gerçekleştirilen Sütün Asidifikasyon ve İndirgenme Düzeylerinin Belirlenmesi

Çalışmanın bu kısmında, laktokokların sütü indirgeme aktivitelerinin ve asidifikasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Laktokok suşlarının tamamının sütün redoks potansiyelini negatif değerlere düşürmesine rağmen, suşların sütü indirgeme aktivitelerinin birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2). Morandi ve ark.'nın [13] yaptığı çalışmada, sütün laktik asit bakterileri tarafından indirgenmesinin üç fazdan oluştuğunu ve lag tipi fazda E_{h7} 'nin stabil kaldığı veya çok yavaş azaldığı, ikinci fazda E_{h7} 'nin en düşük değerine (E_{h7min}) hızla düştüğü ve durgun fazda ise E_{h7} 'nin en düşük değerinde stabil kaldığı veya çok az artış gösterdiği bildirilmiştir. Buna göre, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41, *L. lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşlarının sütü indirgeme davranışları incelendiğinde, bu suşlarda lag fazının oldukça kısa sürdüğü ve diğer suşlara nazaran hızla negatif redoks potansiyeli değerlerine ulaşıldığı gözlenmiştir. Çalışmada kullanılan suşlar içinde, indirgeme kapasitesi en yüksek olan kültürün *L. lactis* subsp. *lactis* 35-C-9 (-364.0 mV) ve en düşük olan kültürün ise *L. lactis* subsp. *cremoris* IP5(-315.1 mV) olduğu saptanmıştır. Ayrıca, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşunun asidifikasyon hızının, çalışmada kullanılan diğer kültürlerle göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Asidifikasyon hızı en düşük olan kültür ise sütü indirgeme kapasitesi en yüksek olan *L. lactis* subsp. *lactis* 35-C-9 suşudur. Yapılan bir çalışmada, asidifikasyon hızı düşük olan suşların diğer suşlara göre daha indirgen olabildiği bildirilmiştir [34].

Bu konu ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda da, laktik asit bakterilerinin sütün redoks potansiyelini negatif değerlere düşürdüğü ve alt türlerin ve hatta suşların indirgeme aktivitelerinin karakteristik bir trend sergilediği bildirilmiştir [11, 13, 33, 34, 64, 123]. Türler arasındaki bu farklılığın sütün redüksiyonunda rol oynayan bir vitamin olan menakinonların (K_2 vitamini) üretimi ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir [13, 35,

41]. Ayrıca, *L. lactis*'in dış yüzeyinde bulunan proteinlerde yer alan tiyol gruplarının redoks potansiyelinin düşmesinde rol oynadığı ileri sürülmektedir [63].



Şekil 4.2. Laktik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilen sütün asidifikasyonu ve indirgenmesi (Mavi eğri ORP'ye, kırmızı eğri pH'ya aittir.)

Brasca ve ark. [34], *Enterococcus* türlerinin ve *L. lactis* subsp. *lactis*'in sütü indirgeme hızının streptokoklar ve *Lactobacillus* türlerinin indirgeme hızından daha yüksek belirlemiştir. Diğer türlerle karşılaştırıldığında, *P. pentosaceus*'un indirgeme kapasitesinin çok düşük olduğu tespit edilmiştir [34].

Cachon ve ark.'nın [11] yaptıkları çalışmada, laktokokların maksimum indirgeme hızının, streptokoklar ve laktobasillerden yaklaşık altı kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, streptokokların ve laktobasillerin, laktokoklara göre daha yüksek asidifikasyon hızına sahip oldukları tespit edilmiştir.

Morandi ve ark.'nın [13] yaptıkları çalışmada, *S. thermophilus* düşük indirgeme kapasitesi ile karakterize edilirken, *L. lactis* ve *E. faecalis*'in indirgeme kapasitesi en yüksek olan türler olduğu bulunmuştur. Bu durumun, *L. lactis* ve *E. faecalis*'in menakinonları üretebilmesinden, ancak *S. thermophilus*'un bu bileşikleri sentezleyememesinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür [13, 35, 41].

4.3 Oksidasyon Redüksiyon Potansiyelinin Aminoasit Katabolizması Üzerindeki Etkisi

Serbest aminoasitlerin katabolizması sonucunda peynirin tat ve kokusuna katkıda bulunan amonyak, aminler, aldehitler, fenoller, indol ve alkoller gibi birçok bileşik oluşmaktadır. Aminoasit katabolizmasının ilk basamağını dekarboksilasyon, deaminasyon, transaminasyon, desülfürasyon ve aminoasitin yan zincirinin hidrolizi oluşturmaktadır. İkinci basamak, temel olarak deaminazların aminler üzerindeki etkisine bağlı olarak, birinci basamak sonucunda oluşan bileşiklerin (aminler ve α -keto asitler) ve aminoasitlerin aldehitlere dönüşümünü içermektedir. Aminoasit katabolizmasının son basamağı ise, aldehitlerin alkollere indirgenmesi veya asitlere yükseltgenmesidir. Kükürt içeren aminoasitler ileri düzeyde bir dönüşüme uğrayabilmekte ve sonuç olarak metantiyol ve diğer sülfür türev bileşikleri gibi çok sayıda bileşik oluşabilmektedir [124]. Serbest aminoasitlerin katabolizması için genel yollar Şekil 2.4'te verilmiştir [44, 59].

Dekarboksilasyon, karbondioksitin kaybı ile aminoasitin amine dönüşümünü içermektedir. Biyojenik aminler de dahil olmak üzere aminler, serbest aminoasitlerin enzimatik dekarboksilasyonu yoluyla peynirde üretilmektedir [125]. Tiramin ve histamin, birçok peynir çeşidinde bulunan temel aminlerdir ve sırasıyla tirozin ve histidinin dekarboksilasyonu ile üretilmektedirler. Her bir aminin konsantrasyonu peynir çeşidine ve starter olmayan mikrofloraya (laktobasiller) bağlıdır [124].

Serbest aminoasitlerin deaminasyonu amonyak ve α -keto asitlerin oluşumuna yol açmaktadır. Amonyak, Camembert, Gruyere ve Comte gibi peynirlerin önemli bir bileşenidir ve *Geotrichum candidum* ve *Brevibacterium linens* amonyak üretiminde temel rol oynamaktadır. Aminler, oksidatif deaminasyona maruz kalabilmekte ve bunun sonunda aldehitler üretilmektedir [124, 126]. Neredeyse bütün aminoasitlere karşılık gelen α -keto asitlerin Cheddar, Emmental veya Hollanda mavi küflü peynirleri, Manchego, Parmesan, Gouda, Provolone ve Camembert peynirlerinde bulunduğu rapor edilmiştir. α -keto-3-metilbütanoik ve α -keto-3-metilpentanoik asitlerin yoğun peynirimsi aromaya sahip olduğu bildirilmiştir. Ancak, bu asitlerin konsantrasyonu peynirler arasında büyük farklılık

göstermektedir. Peynirde bulunan α -keto asitler, gaz kromatografisi ile bu bileşiklerin analizi güç olduğu için saptanamamaktadır, ancak 2,4-dinitrofenil hidrazon türevleri oluşturulduktan sonra analiz edilebilmektedir [124].

Aldehitler aminoasit katabolizmasının bir sonucu olarak üretilebilmektedir [45]. Serbest aminoasitlerin enzim katalizli transaminasyonu bir ara ürün olan imid oluşumuna neden olmakta ve ardından imid dekarboksilasyon veya Strecker reaksiyonu yoluyla degrade olmakta [14, 126] ve aldehit oluşmaktadır [45]. Peynir olgunlaşmasının başlangıcında, düşük pH ile birlikte, aminoasitler aminlere dekarboksile edilmektedir. pH'nın arttığı olgunlaşmanın sonraki aşamalarında, bu aminler Strecker degradasyonu yoluyla aldehitlere yükseltgenmektedir [127]. Peynirde, aldehitler hızla alkollere ve ilgili asitlere dönüştürüldüğü için yüksek konsantrasyonlarda birikmemektedir [128, 129]. Aldehitlerin Cheddar ve Parmesan gibi peynir çeşitlerinin tat-kokusuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir [127, 128]. Strecker kaynaklı bileşiklerin konsantrasyonları Cheddar'da belirli bir eşik değerini aştığında temiz olmayan tat-kokunun gelişmesine rağmen, peynirde Strecker yoluyla üretilen bileşiklerin konsantrasyonları ile serbest aminoasitlerin konsantrasyonları arasında herhangi bir korelasyon bulunmamıştır [128]. Fenilasetaldehit, izobütanal, 3-metilbütanal ve metiyonal bu mekanizma yoluyla sırasıyla fenilalanin, lösin/izolösin, valin ve metiyoninden [51], asetaldehit treonin aldolaz yardımı ile treoninden ve etanal alkol dehidrogenaz pirüvat dekarboksilazdan daha az aktif olduğunda mayalar tarafından üretilebilmektedir [126]. Ayrıca, benzaldehit, fenilasetaldehitin α -oksidasyonundan veya sinamik asitin β -oksidasyonundan üretilebilmektedir [130, 131].

4.3.1 Aminoasit Katabolizması Çalışması Süresince Redoks Potansiyelinin ve pH'nın Değişimi

Redoks potansiyelinin, laktokoklar tarafından gerçekleştirilen aminoasit katabolizması üzerine etkisini belirlemek amacıyla, reaksiyon ortamlarının redoks potansiyelleri, redoks ajanları kullanılarak kimyasal olarak modifiye edilmiştir. Çizelge 4.2, Çizelge 4.3, Çizelge 4.4, Çizelge 4.5, Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7'de çalışma kapsamında kullanılan laktokokların 4 günlük inkübasyon süresi boyunca gerçekleştirdiği aminoasit katabolizması esnasında redoks potansiyeli ve pH'da meydana gelen değişimler verilmiştir. Model sistemde indirgenmiş redoks potansiyelini oluşturmak için ditiyotritol (DTT) ve yükseltgenmiş redoks potansiyelini oluşturmak için potasyum ferrisiyanit kullanılmıştır [39].

Oluşturulan model sistemlerin redoks potansiyellerinin kültürlerle ve aminoasitlere göre değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Genellikle, kontrol reaksiyon ortamlarının redoks potansiyellerinin suşa, aminoasit türüne ve inkübasyon süresine göre değiştiği gözlenmiştir. Buna karşın, indirgenmiş reaksiyon ortamlarının redoks potansiyeli inkübasyon süresi boyunca negatif değerlerde kalırken, yükseltgenmiş reaksiyon ortamlarının redoks potansiyeli ise pozitif değerlerde kalmıştır. Benzer şekilde, Kieronczyk ve ark. [39] yaptıkları çalışmada, redoks ajanları ilave edilmeden gerçekleştirilen deneyde, kontrol ortamının Eh₇'sinin, inkübasyon, suş ve aminoasite göre farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.2. *L. lactis* subsp. *lactis* CM41'in aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince redoks potansiyeli ve pH değişimi

Model sistem	İnkübasyon süresi (gün)					
	0		2		4	
	pH	ORP (mV)	pH	ORP (mV)	pH	ORP (mV)
Phe-K	6.02	315.0	6.00	281.9	6.12	-32.5
Phe-İ	6.07	-195.8	6.02	-168.4	6.04	-177.8
Phe-Y	5.96	384.5	5.69	306.9	5.46	294.9
Met-K	6.04	300.1	6.06	-75.5	6.13	-170.1
Met-İ	6.04	-145.0	6.00	-219.6	6.00	-210.5
Met-Y	5.95	368.4	5.82	327.5	5.82	329.1
Trp-K	6.04	311.5	6.01	181.0	6.12	34.1
Trp-İ	6.05	-137.8	6.01	-180.1	6.04	-225.8
Trp-Y	5.90	341.5	5.70	307.0	5.65	308.6
Leu-K	6.05	312.8	6.00	286.2	6.06	-32.3
Leu-İ	6.05	-137.9	6.01	-168.4	6.04	-172.0
Leu-Y	5.97	372.2	5.70	330.9	5.83	332.0
K ^a	6.07	360.9	5.98	291.5	6.06	-135.2
İ ^a	6.05	-192.0	6.01	-178.4	6.06	-200.5
Y ^a	5.95	369.9	5.84	332.7	5.84	334.2

Phe, fenilalanin; **Met**, metiyonin; **Trp**, triptofan; **Leu**, lösin; **K**, kontrol ortamı; **İ**, indirgenmiş ortam, **Y**, yükseltgenmiş ortam. ^a **K, İ, Y**: Pozitif kontrol verileridir.

Bu açıklama aksi belirtilmedikçe çalışmanın bu bölümündeki bütün çizelgeler için geçerlidir.

Çizelge 4.3. *L. lactis*'in aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince redoks potansiyeli ve pH değişimi

Model sistem	İnkübasyon süresi (gün)					
	0		2		4	
	pH	ORP (mV)	pH	ORP (mV)	pH	ORP (mV)
Phe-K	6.02	389.6	6.01	101.6	6.06	-99.8
Phe-İ	6.02	-240.9	6.00	-203.8	6.05	-215.5
Phe-Y	5.97	447.5	5.90	365.8	5.99	345.6
Met-K	6.04	374.3	5.99	21.2	6.03	-161.4
Met-İ	6.00	-244.1	5.98	-200.6	6.04	-190.7
Met-Y	5.95	405.0	5.89	340.9	5.93	328.4
Trp-K	6.04	378.1	5.98	162.6	6.06	-65.6
Trp-İ	6.02	-242.2	6.00	-184.7	6.06	-210.7
Trp-Y	5.83	330.6	5.70	305.4	5.76	294.9
Leu-K	6.03	389.4	5.99	115.6	6.02	-51.4
Leu-İ	6.02	-240.8	6.00	-185.9	6.05	-194.5
Leu-Y	5.97	428.5	5.91	371.5	6.01	354.8
K	6.00	383.2	5.99	105.4	6.04	-115.6
İ	6.03	-208.9	6.01	-252.4	6.06	-280.5
Y	5.96	434.1	5.89	369.6	5.97	349.9

Çizelge 4.4. *L. lactis* subsp. *lactis* 35-C-9'un aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince redoks potansiyeli ve pH değişimi

Model sistem	İnkübasyon süresi (gün)					
	0		2		4	
	pH	ORP (mV)	pH	ORP (mV)	pH	ORP (mV)
Phe-K	6.08	359.9	6.06	353.3	6.07	347.3
Phe-İ	6.10	-252.5	6.06	-238.3	6.05	-202.4
Phe-Y	6.10	360.7	6.04	334.8	6.06	328.3
Met-K	6.07	340.1	6.04	317.9	6.06	330.3
Met-İ	6.10	-264.9	6.07	-230.3	6.06	-210.4
Met-Y	6.07	329.8	6.00	305.4	5.97	296.4
Trp-K	6.07	353.2	6.04	351.9	6.07	352.2
Trp-İ	6.09	-262.1	6.08	-239.3	6.04	-202.9
Trp-Y	5.88	275.8	5.81	268.3	5.74	265.6
Leu-K	6.07	359.5	6.05	356.3	6.07	354.6
Leu-İ	6.09	-268.7	6.08	-228.0	6.03	-202.0
Leu-Y	6.09	371.5	6.03	343.3	6.07	334.7
K	6.07	358.8	6.05	352.4	6.06	350.7
İ	6.08	-339.4	6.06	-337.9	6.02	-271.9
Y	6.10	365.0	6.03	343.0	6.07	332.9

Çizelge 4.5. *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459'un aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince redoks potansiyeli ve pH değişimi

Model sistem	İnkübasyon süresi (gün)					
	0		2		4	
	pH	ORP (mV)	pH	ORP (mV)	pH	ORP (mV)
Phe-K	6.13	378.3	6.15	364.4	6.04	342.9
Phe-İ	6.10	-170.9	6.07	-168.0	5.98	-157.8
Phe-Y	6.11	411.6	6.00	360.5	6.00	350.5
Met-K	6.11	369.3	6.13	341.3	6.00	145.1
Met-İ	6.09	-163.8	6.08	-184.1	5.97	-169.5
Met-Y	6.10	382.3	6.00	329.1	5.95	315.5
Trp-K	6.08	368.9	6.12	264.0	5.97	360.8
Trp-İ	6.07	-167.2	6.04	-188.9	5.96	-172.5
Trp-Y	5.91	310.5	5.85	282.3	5.70	277.7
Leu-K	6.05	377.9	6.13	373.5	5.96	345.0
Leu-İ	6.06	-160.5	6.04	-181.8	5.97	-163.4
Leu-Y	6.10	406.9	6.13	361.2	6.00	356.4
K	6.11	380.6	6.11	360.3	6.06	302.6
İ	6.09	-181.9	6.11	-219.8	5.96	-235.4
Y	6.12	397.3	6.12	363.5	6.00	353.0

Çizelge 4.6. *L. lactis* subsp. *cremoris* IP5'in aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince redoks potansiyeli ve pH değişimi

Model sistem	İnkübasyon süresi (gün)					
	0		2		4	
	pH	ORP (mV)	pH	ORP (mV)	pH	ORP (mV)
Phe-K	6.12	430.2	6.10	365.9	6.09	231.4
Phe-İ	6.10	-137.8	6.10	-142.9	6.08	-86.9
Phe-Y	6.11	455.9	6.06	403.0	6.05	403.1
Met-K	6.12	417.2	6.10	344.3	6.09	169.0
Met-İ	6.12	-136.9	6.11	-153.7	6.09	-99.7
Met-Y	6.10	428.9	6.01	363.4	5.99	360.9
Trp-K	6.10	419.6	6.11	375.4	6.09	269.4
Trp-İ	6.11	-149.5	6.09	-149.3	6.08	-87.6
Trp-Y	5.93	357.7	5.84	323.8	5.75	332.2
Leu-K	6.10	431.4	6.12	387.6	6.09	259.8
Leu-İ	6.12	-139.7	6.12	-130.3	6.10	-96.4
Leu-Y	6.10	455.9	6.09	410.2	6.04	408.9
K	6.12	428.8	6.12	354.9	6.12	324.3
İ	6.09	-132.0	6.11	-145.6	6.09	-87.4
Y	6.10	459.7	6.08	416.0	6.04	411.5

Çizelge 4.7. *L. lactis* subsp. *cremoris* HP'nin aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince redoks potansiyeli ve pH değişimi

Model sistem	İnkübasyon süresi (gün)					
	0		2		4	
	pH	ORP (mV)	pH	ORP (mV)	pH	ORP (mV)
Phe-K	6.13	373.2	6.12	361.2	6.11	363.8
Phe-İ	6.11	-237.9	6.08	-173.8	6.10	-163.8
Phe-Y	6.12	400.4	6.09	336.8	6.06	333.7
Met-K	6.11	360.4	6.06	322.2	6.10	336.9
Met-İ	6.11	-231.8	6.06	-180.1	6.09	-167.7
Met-Y	6.07	353.6	6.00	309.8	5.99	303.2
Trp-K	6.10	357.8	6.04	349.2	6.10	345.6
Trp-İ	6.10	-229.1	6.05	-174.1	6.08	-161.2
Trp-Y	5.91	285.2	5.83	273.5	5.77	270.5
Leu-K	6.07	377.1	6.09	365.0	6.10	363.4
Leu-İ	6.11	-238.8	6.06	-182.6	6.08	-165.7
Leu-Y	6.09	402.9	6.09	343.1	6.06	342.1
K	6.12	371.2	6.12	355.5	6.11	339.0
İ	6.10	-183.9	6.09	-190.9	6.07	-180.3
Y	6.12	403.3	6.11	344.9	6.07	343.8

4.3.2 Aminoasit Katabolizması Çalışması Süresince Kültürlerin Canlılığı

Reaksiyon ortamlarının redoks potansiyellerini ayarlamak için kullanılan DTT ve potasyum ferrisiyanitin çalışmada kullanılan konsantrasyonlarının, suşların canlılığını ve aktivitelerini etkilemediği belirlenmiştir. İnkübasyon sonunda, model sistemlerdeki kültürlerin canlılığında genellikle, yaklaşık 1.00-3.00 log KOB/mL'lik bir azalma meydana gelmiştir (Çizelge 4.8, Çizelge 4.9, Çizelge 4.10, Çizelge 4.11, Çizelge 4.12). Bununla birlikte, *L. lactis* subsp. *cremoris* HP suşu ile yapılan çalışmada, model sistemlerin tamamında inkübasyonun 2. gününde yapılan ekim sonucu bu suşun canlılığını yitirdiği saptanmıştır (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.8. *L. lactis* subsp. *lactis* CM41'in aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince canlılığı (log KOB/mL)

Model sistem	İnkübasyon süresi (gün)		
	0	2	4
Phe-K	9.50 ± 0.00	8.24 ± 0.04	7.31 ± 0.02
Phe-İ	9.42 ± 0.01	8.75 ± 0.02	7.28 ± 0.02
Phe-Y	9.56 ± 0.02	8.80 ± 0.02	7.24 ± 0.01
Met-K	9.52 ± 0.01	8.67 ± 0.01	7.15 ± 0.01
Met-İ	9.61 ± 0.01	8.74 ± 0.04	7.12 ± 0.02
Met-Y	9.64 ± 0.01	8.78 ± 0.03	7.07 ± 0.01
Trp-K	9.57 ± 0.00	8.22 ± 0.02	7.45 ± 0.01
Trp-İ	9.47 ± 0.01	8.63 ± 0.00	7.16 ± 0.01
Trp-Y	9.48 ± 0.01	8.04 ± 0.01	7.11 ± 0.02
Leu-K	9.56 ± 0.00	8.13 ± 0.02	7.23 ± 0.01
Leu-İ	9.57 ± 0.00	8.80 ± 0.02	7.28 ± 0.02
Leu-Y	9.54 ± 0.00	8.68 ± 0.00	7.19 ± 0.00
K	9.47 ± 0.01	8.26 ± 0.01	7.29 ± 0.02
İ	9.47 ± 0.00	8.67 ± 0.01	7.25 ± 0.02
Y	9.55 ± 0.01	8.70 ± 0.01	7.25 ± 0.02

Çizelge 4.9. *L. lactis*'in aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince canlılığı (log KOB/mL)

Model sistem	İnkübasyon süresi (gün)		
	0	2	4
Phe-K	9.51 ± 0.02	9.65 ± 0.07	8.82 ± 0.01
Phe-İ	9.52 ± 0.07	9.77 ± 0.04	8.54 ± 0.04
Phe-Y	9.82 ± 0.07	9.06 ± 0.08	8.45 ± 0.03
Met-K	9.51 ± 0.04	9.39 ± 0.01	8.65 ± 0.03
Met-İ	9.73 ± 0.06	9.33 ± 0.08	7.80 ± 0.03
Met-Y	9.64 ± 0.01	9.29 ± 0.00	9.56 ± 0.01
Trp-K	9.46 ± 0.03	9.28 ± 0.04	8.22 ± 0.02
Trp-İ	9.54 ± 0.00	9.53 ± 0.02	8.51 ± 0.09
Trp-Y	9.64 ± 0.06	9.46 ± 0.01	7.78 ± 0.07
Leu-K	9.56 ± 0.00	9.41 ± 0.02	9.04 ± 0.05
Leu-İ	9.63 ± 0.05	9.78 ± 0.01	7.86 ± 0.05
Leu-Y	9.81 ± 0.06	9.39 ± 0.01	8.81 ± 0.02
K	9.37 ± 0.01	9.43 ± 0.09	8.80 ± 0.01
İ	9.66 ± 0.01	9.82 ± 0.08	8.45 ± 0.03
Y	9.45 ± 0.05	9.44 ± 0.07	9.13 ± 0.03

Çizelge 4.10. *L. lactis* subsp. *lactis* 35-C-9'un aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince canlılığı (log KOB/mL)

Model sistem	İnkübasyon süresi (gün)		
	0	2	4
Phe-K	9.11 ± 0.04	8.86 ± 0.01	6.07 ± 0.04
Phe-İ	9.23 ± 0.04	8.85 ± 0.01	6.77 ± 0.01
Phe-Y	9.06 ± 0.03	9.08 ± 0.09	7.74 ± 0.02
Met-K	9.13 ± 0.05	8.94 ± 0.01	7.51 ± 0.01
Met-İ	9.02 ± 0.02	8.94 ± 0.01	6.83 ± 0.04
Met-Y	9.13 ± 0.08	8.97 ± 0.02	8.02 ± 0.02
Trp-K	9.18 ± 0.03	8.83 ± 0.04	6.19 ± 0.06
Trp-İ	9.21 ± 0.01	9.04 ± 0.02	7.15 ± 0.03
Trp-Y	9.00 ± 0.00	8.63 ± 0.08	6.41 ± 0.05
Leu-K	9.16 ± 0.04	8.73 ± 0.05	6.17 ± 0.03
Leu-İ	9.21 ± 0.09	8.97 ± 0.02	6.71 ± 0.02
Leu-Y	9.11 ± 0.04	9.04 ± 0.03	7.79 ± 0.02
K	9.31 ± 0.07	8.74 ± 0.04	6.32 ± 0.03
İ	9.24 ± 0.02	9.03 ± 0.03	7.11 ± 0.02
Y	9.21 ± 0.04	9.14 ± 0.01	7.94 ± 0.01

Çizelge 4.11. *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459'un aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince canlılığı (log KOB/mL)

Model sistem	İnkübasyon süresi (gün)		
	0	2	4
Phe-K	8.24±0.02	7.89±0.01	7.15±0.01
Phe-İ	8.47±0.12	7.88±0.05	7.35±0.01
Phe-Y	8.21±0.09	7.98±0.09	7.31±0.09
Met-K	8.30±0.09	8.12±0.01	7.84±0.03
Met-İ	8.39±0.15	8.02±0.07	7.38±0.02
Met-Y	8.29±0.05	8.10±0.00	6.68±0.03
Trp-K	8.20±0.08	6.78±0.04	6.67±0.01
Trp-İ	8.33±0.10	8.04±0.03	7.44±0.01
Trp-Y	7.69±0.12	5.81±0.05	5.53±0.00
Leu-K	8.24±0.02	7.74±0.04	7.20±0.07
Leu-İ	8.34±0.03	7.86±0.01	7.58±0.01
Leu-Y	8.30±0.00	7.98±0.05	7.73±0.01
K	8.33±0.07	8.12±0.02	6.96±0.02
İ	8.38±0.11	7.61±0.19	7.43±0.04
Y	8.25±0.03	7.67±0.03	6.59±0.00

Çizelge 4.12. *L. lactis* subsp. *cremoris* IP5'in aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince canlılığı (log KOB/mL)

Model sistem	İnkübasyon süresi (gün)		
	0	2	4
Phe-K	8.24 ± 0.02	7.89 ± 0.01	7.15 ± 0.01
Phe-İ	8.47 ± 0.12	7.88 ± 0.05	7.35 ± 0.01
Phe-Y	8.21 ± 0.09	7.98 ± 0.09	7.31 ± 0.09
Met-K	8.30 ± 0.09	8.12 ± 0.01	7.84 ± 0.03
Met-İ	8.39 ± 0.15	8.02 ± 0.07	7.38 ± 0.02
Met-Y	8.29 ± 0.05	8.10 ± 0.00	6.68 ± 0.03
Trp-K	8.20 ± 0.08	6.78 ± 0.04	6.67 ± 0.01
Trp-İ	8.33 ± 0.10	8.04 ± 0.03	7.44 ± 0.01
Trp-Y	7.69 ± 0.12	5.81 ± 0.05	5.53 ± 0.00
Leu-K	8.24 ± 0.02	7.74 ± 0.04	7.20 ± 0.07
Leu-İ	8.34 ± 0.03	7.86 ± 0.01	7.58 ± 0.01
Leu-Y	8.30 ± 0.00	7.98 ± 0.05	7.73 ± 0.01
K	8.33 ± 0.07	8.12 ± 0.02	6.96 ± 0.02
İ	8.38 ± 0.11	7.61 ± 0.19	7.43 ± 0.04
Y	8.25 ± 0.03	7.67 ± 0.03	6.59 ± 0.00

Çizelge 4.13. *L. lactis* subsp. *cremoris* HP'nin aminoasit katabolizmasını gerçekleştirdiği model sistemlerde inkübasyon süresince canlılığı (log KOB/mL)

Model sistem	İnkübasyon süresi (gün)		
	0	2	4
Phe-K	8.81 ± 0.00	-	-
Phe-İ	8.85 ± 0.03	-	-
Phe-Y	8.77 ± 0.01	-	-
Met-K	8.77 ± 0.01	-	-
Met-İ	8.87 ± 0.01	-	-
Met-Y	8.76 ± 0.03	-	-
Trp-K	8.78 ± 0.03	-	-
Trp-İ	8.81 ± 0.00	-	-
Trp-Y	8.69 ± 0.03	-	-
Leu-K	8.88 ± 0.05	-	-
Leu-İ	8.78 ± 0.12	-	-
Leu-Y	8.77 ± 0.06	-	-
K	8.88 ± 0.01	-	-
İ	8.78 ± 0.04	-	-
Y	8.72 ± 0.03	-	-

4.3.3 Redoks Potansiyelinin Aminoasit Katabolizması ile Uçucu Bileşiklerin Üretimi Üzerindeki Etkisi

Çalışmanın bu bölümünde, ortamın redoks potansiyelinin, altı farklı laktokok suşu tarafından gerçekleştirilen metiyonin, fenilalanin, triptofan ve lösin katabolizması üzerindeki etkisi ve üretilen farklı metabolitler araştırılmıştır. Aminoasit katabolizması sonucu üretilen uçucu bileşikler GC-MS ile saptanmış ve elde verilere Temel Bileşen Analizi (Principal Component Analysis, PCA) uygulanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, ortamın redoks potansiyelinin aminoasitlerin katabolizması sonucu üretilen metabolitlerin türünü ve konsantrasyonunu etkilediği gözlenmiştir. Ayrıca, çalışmada kullanılan kültürlerin alt türlerinin ve hatta suşlarının aynı aminoasitin katabolizması sonucunda farklı metabolitleri üretebildiği belirlenmiştir.

Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de sırasıyla, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41, *L. lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* 35-C-9, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459, *L. lactis* subsp. *cremoris* IP5 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* HP tarafından gerçekleştirilen metiyonin katabolizması sonucu üretilen uçucu bileşik verilerine uygulanan PCA görülmektedir. Buna göre yapılan her bir PCA’da örneklerin redoks potansiyellerine (K, kontrol ortamı; İ, indirgenmiş ortam ve Y, yükseltgenmiş ortam) ve inkübasyon sürelerine (0d, 0. gün; 2d, 2. gün ve 4d, 4. gün) göre birbirlerinden ayrıldığı belirlenmiştir.

Peynirde bulunan kükürtlü bileşikler esas olarak metiyoninden kaynaklanmaktadır, çünkü kazein fraksiyonlarındaki metiyonin konsantrasyonu sisteinden daha yüksektir (kazeinlerdeki sistein kalıntıları sadece α_{s2} - ve κ -kazeinlerde düşük seviyelerde bulunmaktadır). Metiyonin katabolizması için literatürde önerilen olası yollar Şekil 2.5'te gösterilmektedir. Kükürt içeren aminoasitlerin katabolik ürünleri Cheddar peynirinin ve diğer pek çok peynir çeşidinin tat-kokusuna büyük katkıda bulunmaktadır [44, 51, 124]. Peynirde bulunan düşük molekül ağırlıklı sülfür bileşikleri, metantiyol (CH_3SH), hidrojen sülfid (H_2S), dimetil sülfid (DMS; CH_3SCH_3), dimetil disülfid (DMDS; CH_3SSCH_3), dimetil trisülfid (DMTS; $\text{CH}_3\text{SSSCH}_3$) ve karbonil sülfiti ($\text{O}=\text{C}=\text{S}$) içermektedir. Kükürtlü bileşiklerin, peynirde, birbirleriyle ve diğer bileşiklerle etkileşime girdiği ve diğer uçucu tat-koku bileşiklerini ürettiği düşünülmektedir [132].

Metantiyol, 2,4-ditiyapentan, 3,4-ditiyahekzan, 2,4,5-tritiyahekzan ve 3-metiltiyo-2,4-ditiyapentan gibi diğer kükürtlü bileşikler ile birlikte Camembert peynirinde bulunmaktadır. Bu bileşikler, olgunlaştırılmış Camembert peynirinde bulunan sarımsak aromasından sorumludur [124]. *B. linens*, smear peynirlerin yüzeyinde bulunan temel

mikroorganizmalardan biridir ve ayrıca, küflü peynirlerin (Camembert gibi) yüzeyinde bulunmakta ve enzimatik olarak metantiyol üretebilmektedir. Yüzey mikroflorası olmayan Cheddar gibi peynirlerde, tat-koku bileşikleri starter ve starter olmayan bakteriler ve enzimleri tarafından üretilmekte ve bu tür peynirlerde metantiyol oluşumunun kimyasal bir proses olduğu düşünülmektedir [132]. Aksine, Urbach [14], özellikle Cheddar ve Emmental peynirlerinde yer alan ikincil floranın, kükürtlü bileşiklerin oluşumu için kimyasal reaksiyonlardan daha önemli olduğunu ileri sürmektedir.

Weimer ve ark.'ı [133], dimetil trisülfidin peynirin tat-kokusuna katkıda bulunmasına rağmen dimetil disülfidin katkıda bulunmadığını bildirmiştir. Bu bileşiklerin oluşumu, peynirin metantiyol içeriği ve düşük redoks potansiyeli ile ilgilidir [124]. Cheddar peynirinin aromasının bir parçası olarak kabul edilen metiyonal [133], kendiliğinden veya dekarboksilasyon yoluyla metantiyole degrade olabilmektedir [134]. Yapılan bir çalışmada, toplam uçucu sülfür bileşiklerinin üretiminin, *L. lactis* subsp. *cremoris* S3 tarafından asitlendirilen peynir bulamacında glukonik asit- δ -lakton ile kimyasal olarak asitlendirilen peynir bulamacına göre dört kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir [133].

Seefeldt ve Weimer [135] yaptıkları çalışmada, laktik asit bakterileri tarafından sülfür bileşiklerinin üretimini araştırmışlardır. Laktokoklar metiyonin için oksotrofik iken laktobasillerin hem sistein hem de metiyonin için oksotrofik olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak, laktokokların, laktobasillere göre daha yüksek sistatinyonin liyaz aktivitesine sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, hem laktokokların hem de laktobasillerin hücre içermeyen ekstraktlarının, metantiyol, dimetil disülfid ve dimetil trisülfid gibi uçucu sülfür bileşiklerini üretebildiği ortaya konmuştur [135].

Yapılan bir çalışmada, 7 farklı *Lactobacillus casei* ve 22 farklı *L. plantarum* suşunun, metiyoninden tat-koku bileşiklerini üretme yetenekleri araştırılmıştır. Metiyonin aminotransferaz, hidroksi asit dehidrogenaz, metiyonin liyaz ve aminoasit dekarboksilaz enzimlerinin aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan suşların yaklaşık % 25'inin, metiyoninin α -keto- γ -metiltiyobütirata transaminasyonunu gerçekleştirebildiği belirlenmiştir. Dehidrogenaz aktivitesinin, glukoz varlığında arttığı gözlenmiş ve bu etkinin laktat akımı tarafından üretilen proton itici kuvveti sayesinde enerji sağlanmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Metiyonin liyaz veya aminoasit dekarboksilaz aktivitesi tespit edilmemiştir [136].

Amarita ve ark.'nın [137] yaptığı çalışmada, peynir bulamacında *L. lactis* IFPL730 tarafından gerçekleştirilen metiyonal üretimini incelenmiştir. Araştırmacılar, metiyonal konsantrasyonunda azalma ve bununla birlikte, 3-metiltiyopropanol konsantrasyonunda bir artış olduğunu bildirmiştir. Metiyonalin, 3-metiltiyopropanol dahil olmak üzere diğer uçucu bileşiklere dönüşümünün, peynirin tat-kokusuna katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır.

S-metil tiyoesterler, yüzeyi olgunlaştırılmış peynirlerde önemli tat-koku bileşikleridir. Bu bileşiklerin spesifik tat-kokuları, zincir uzunluğuna ve konfigürasyonuna bağlıdır [133]. Lamberet ve ark. [138] peynirle ilgili bazı bakterilerin (korineform bakteriler, mikrokoklar, *Lactococcus* ve *Leuconostoc*) S-metil tiyoester sentezleme yeteneklerini araştırmışlardır. Test edilen *B. linens* suşlarının, dallanmış zincirli tiyoesterleri üretme eğiliminde oldukları, ancak diğer korineformlarda bu özelliğin gözlenmediği bildirilmiştir. Ayrıca, laktokokların bu bileşikleri sentezleme yeteneklerinin düşük olduğu gösterilmiştir.

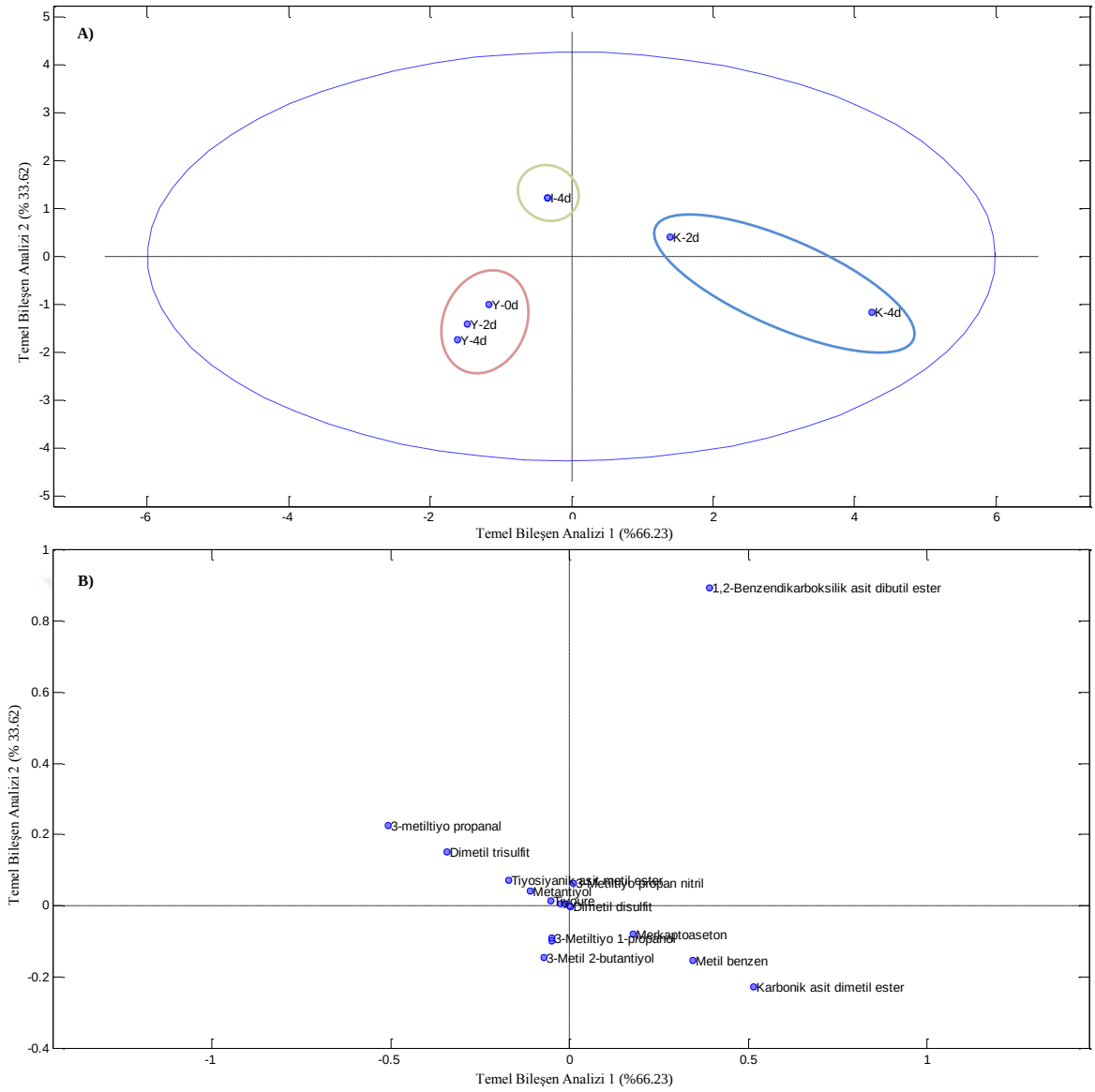
L. lactis subsp. *lactis* CM41 ile gerçekleştirilen deneyde, örnekler arasındaki farklılık çoğunlukla, benzenasetik asit, 2-metil benzonitril, 1,2,3-tritiyolan, etantiyol, 3-metiltiyopropanoik asit metil ester gibi uçucu bileşiklerden kaynaklanmıştır (Şekil 4.3b). Şekil 4.3b incelendiğinde, grafik orijininin uzakta bulunan bileşiklerin, örneklerin ayırımında etkili olan bileşikler olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.14. *L. lactis* subsp. *lactis* CM41'in metiyonin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşikler

Uçucu bileşik	Kontrol			İndirgenmiş			Yükseltgenmiş		
	0.gün	2.gün	4.gün	0.gün	2.gün	4.gün	0.gün	2.gün	4.gün
Metantiyol	-	7.01	6.84	-	0.11	0.08	-	-	-
Etantiyol	-	-	-	-	0.32	0.20	-	-	-
2,3-Bütandion	-	-	-	0.21	0.32	-	-	0.10	-
Etantiyoik asit S-metil ester	-	1.31	2.88	-	-	-	-	-	-
Dimetil disülfid	0.27	202.8	477.2	-	-	-	0.54	1.14	0.81
S-Metil propan tiyoat	-	-	0.43	-	-	-	-	-	-
Bütantiyoik asit S-metil ester	-	0.05	0.08	-	-	-	-	-	-
Tiyosiyanik asit metil ester	-	-	-	-	-	-	-	1.13	0.82
3-Metil-2-bütantiyol	-	-	-	-	0.20	-	-	-	-
2,5-Dimetil-3-hekzanol	-	0.32	4.06	-	0.16	1.22	-	-	0.41
Dimetil trisülfid	-	1.66	5.19	-	-	-	-	-	-
2-Pentantiyol	-	-	-	0.41	0.77	0.34	-	-	-
Karbonoditiyoik asit S,S-dimetil ester	-	-	0.47	-	-	-	-	-	-
3-Metiltiyo propanoik asit metil ester	-	0.60	0.79	-	-	0.05	-	0.24	0.06
Benzaldehit	0.19	-	-	0.17	0.43	0.16	1.02	8.08	2.84
Benzoik asit metil ester	-	0.05	0.32	-	-	-	-	-	0.04
Metil metiltiyometil disülfid	-	0.37	1.41	-	-	-	-	-	-
3-Metiltiyo-2-propenoik asit metil ester	-	0.54	0.83	-	-	-	-	-	-
3-Metiltiyo propan nitril	-	-	-	0.06	-	-	56.70	90.43	51.06
1,2,3-Tritiyolan	-	-	-	-	0.20	0.10	-	-	-
2-Metil benzonitril	-	-	-	-	-	-	0.15	0.12	0.08
Benzenasetik asit	-	-	-	0.37	-	0.70	-	-	-

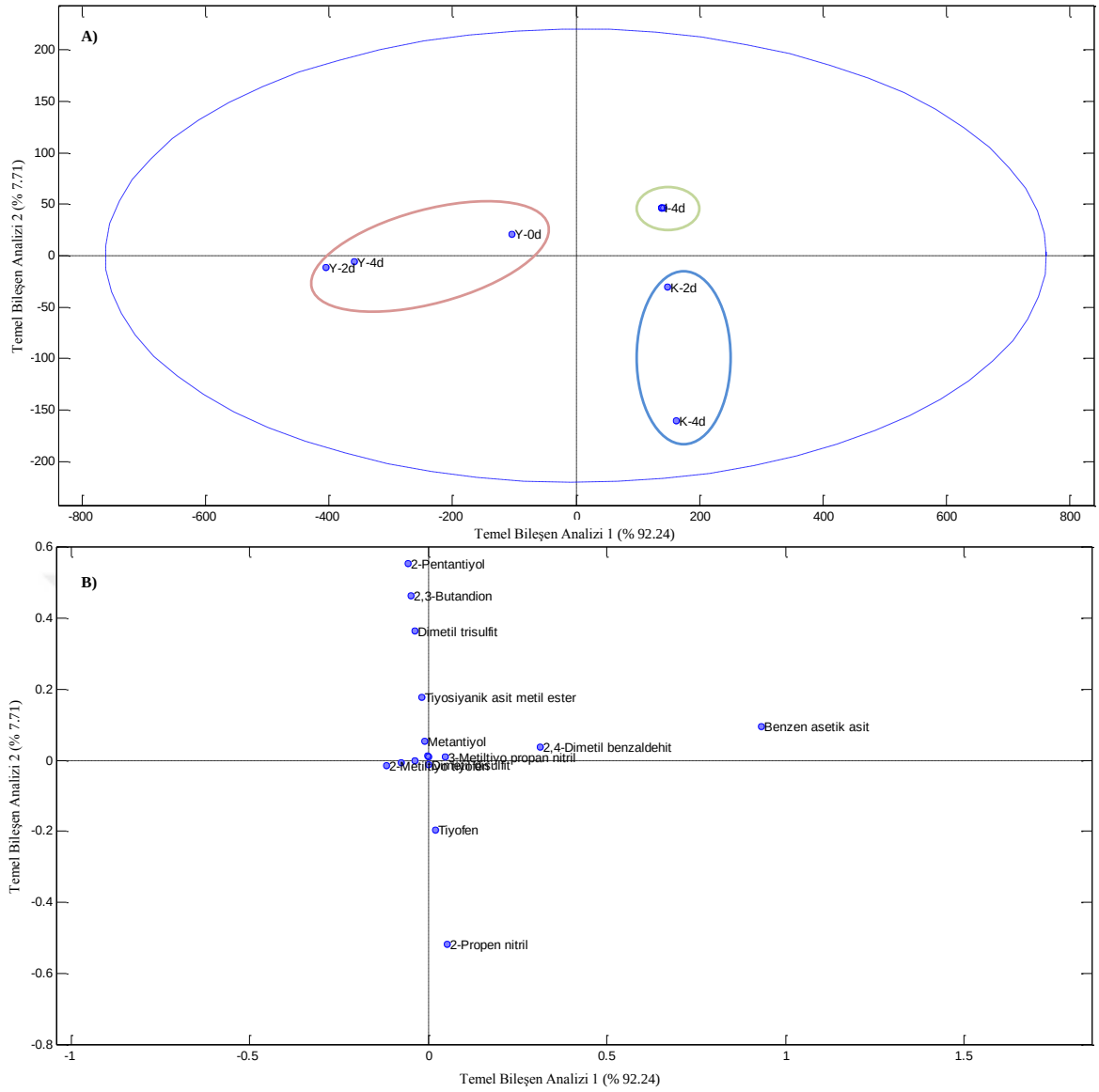
(Soniclar uçucu bileşik pik alanı/internal standart pik alanı olarak verilmiştir.)

L. lactis tarafından gerçekleştirilen metiyonin katabolizması deneyinde örneklerin ayırımı çoğunlukla, 1,2-benzendikarboksilik asit dibütül ester, karbonik asit dimetil ester, 3-metiltiyo propanal, dimetil trisülfid, metil benzen, 3-metil-2-bütantiyol ve 3-metiltiyo-1-propanol gibi uçucu bileşikler üzerinden gerçekleşmiştir (Şekil 4.4b).



Şekil 4.4. a) *L. lactis*'in metiyonin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Metiyonin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler

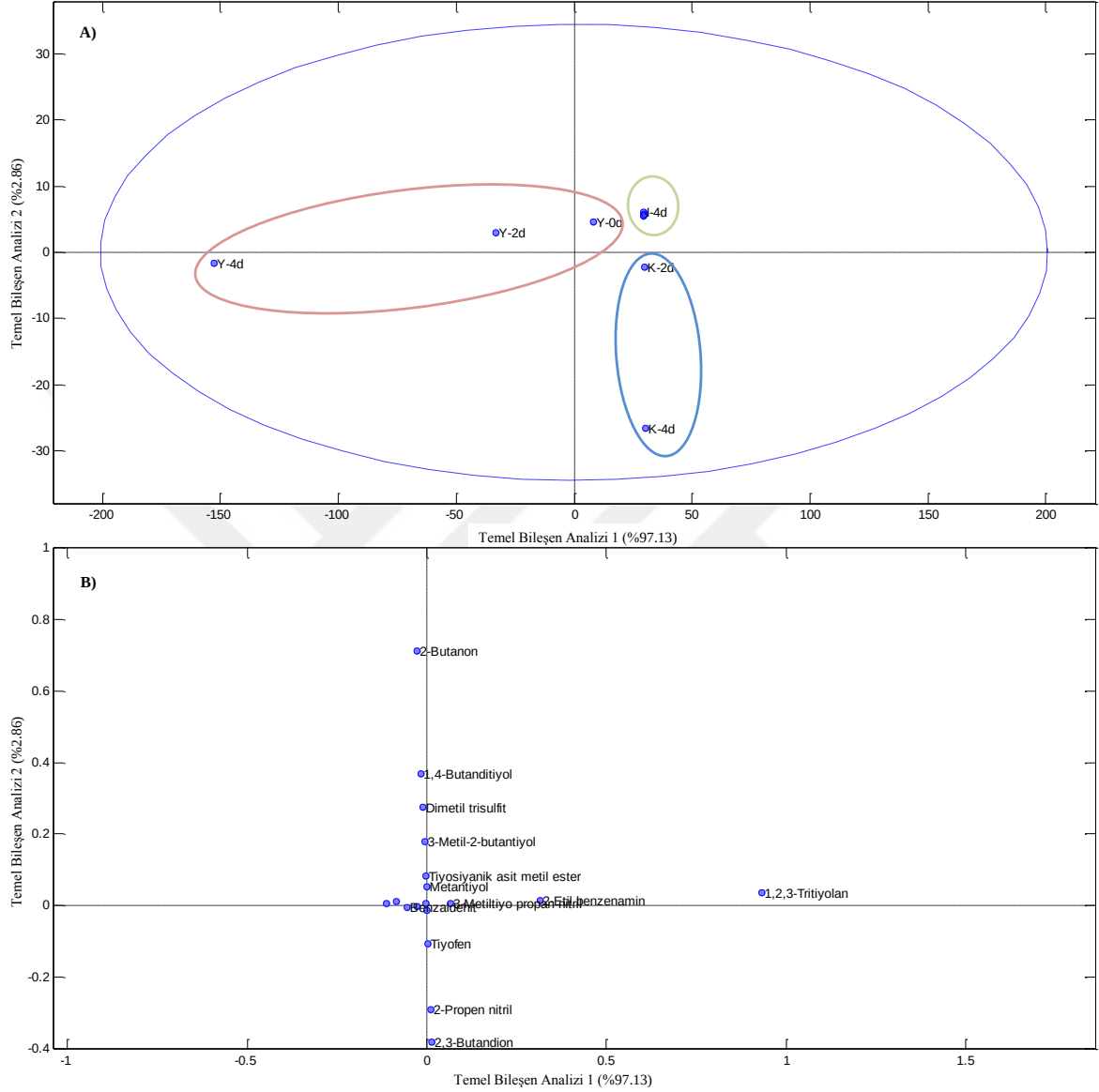
L. lactis subsp. *lactis* 35-C-9'un metiyonin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklerden benzen asetik asit, 2-pentantiyol, 2,3-bütandion, dimetil trisülfid, tiyosiyanik asit metil ester, 2,4-dimetil benzaldehit, metantiyol, tiyofen ve 2-propen nitril örneklerin ayırımında etkili olan bileşiklerdir (Şekil 4.5b).



Şekil 4.5. a) *L. lactis* subsp. *lactis* 35-C-9'un metiyonin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi b) Metiyonin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırmada etkili olan uçucu bileşikler

L. lactis subsp. *cremoris* UD459 tarafından gerçekleştirilen metiyonin katabolizması deneyinde, örneklerin ayırımı çoğunlukla, 2-bütanon, 1,4-bütanditiyol, dimetil trisülfid, 3-metil-2-bütantiyol, tiyosiyamik asit metil ester, metantiyol, 2-etil benzenamin, 1,2,3-triyolan, tiyofen, 2-propen nitril ve 2,3-bütandion bileşiklerinin üzerinden gerçekleşmiştir (Şekil 4.6b). *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459'un metiyonin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşikler Çizelge 4.15'te verilmiştir. Buna göre, kontrol ortamında sentezlenen uçucu bileşikler metantiyol, dimetil disülfid, dimetil trisülfid, 3-metiltiyo propanoik asit metil esterdir. İndirgenmiş ortamda ise, 2-bütanon, 2,3-bütandion, tiyofen, 1,4-bütanditiyol, 2-pentantiyol, 1,2-ditiyan ve 1,2,3-triyolan gibi ketonlar ve tiyol grubu içeren

bileşikler üretilmiştir. 2-Propen nitril, dimetil disülfid, tiyosiyanik asit metil ester, benzaldehit, 3-metiltiyo propan nitril, yükseltgenmiş ortamda, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 tarafından metiyonin katabolizması sonucu üretilen bileşiklerdir.



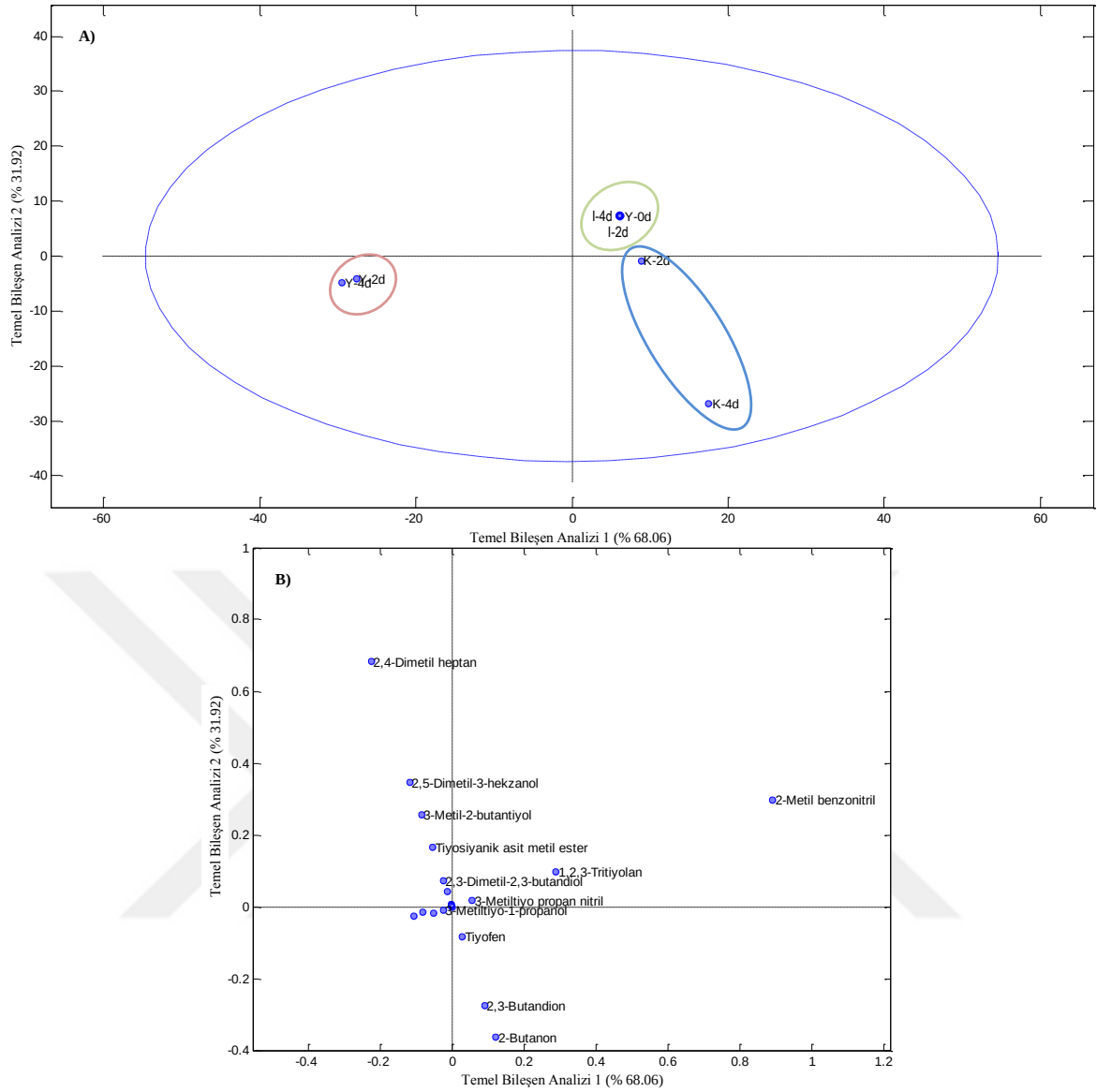
Şekil 4.6. a) *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459'un metiyonin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Metiyonin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırmada etkili olan uçucu bileşikler

Çizelge 4.15. *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459'un metiyonin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşikler

Uçucu bileşik	Kontrol			İndirgenmiş			Yükseltgenmiş		
	0.gün	2.gün	4.gün	0.gün	2.gün	4.gün	0.gün	2.gün	4.gün
Metantiyol	-	0.97	1.57	-	0.18	0.27	-	-	-
2-Bütanon	-	-	-	0.11	0.41	0.54	-	-	-
2,3-Bütandion	-	-	-	0.43	1.57	2.87	-	-	-
2-Propen nitril	-	-	-	-	-	-	-	0.14	0.42
Tiyofen	-	-	-	0.32	0.51	0.84	-	-	-
Dimetil disülfid	0.27	42.00	177.39	-	-	-	0.38	1.33	2.65
Tiyosiyanik asit metil ester	-	-	-	-	-	-	-	0.30	2.20
3-Metil-2-bütantiyol	-	-	-	-	0.25	0.47	-	-	-
Dimetil trisülfid	0.04	3.67	7.39	-	-	-	-	-	-
1,4-Bütanditiyol	-	-	-	0.07	0.36	0.11	-	-	-
2-Pentantiyol	-	-	-	0.30	1.23	2.27	-	-	-
1,2-Ditiyan	-	-	-	0.55	0.55	0.72	-	-	-
3-Metiltiyopropanoik asit metil ester	-	0.05	0.24	-	-	-	-	-	-
Benzaldehit	-	0.17	-	0.06	0.18	0.10	1.20	1.79	9.26
Metil metiltiyometil disülfid	-	0.07	0.64	-	-	-	-	-	-
3-Metiltiyopropan nitril	-	-	-	-	-	-	35.64	103.85	303.86
2-Etil benzenamin	-	0.05	0.06	0.24	-	0.48	-	-	-
1,2,3-Tritiyolan	-	-	-	-	0.27	0.30	-	-	-

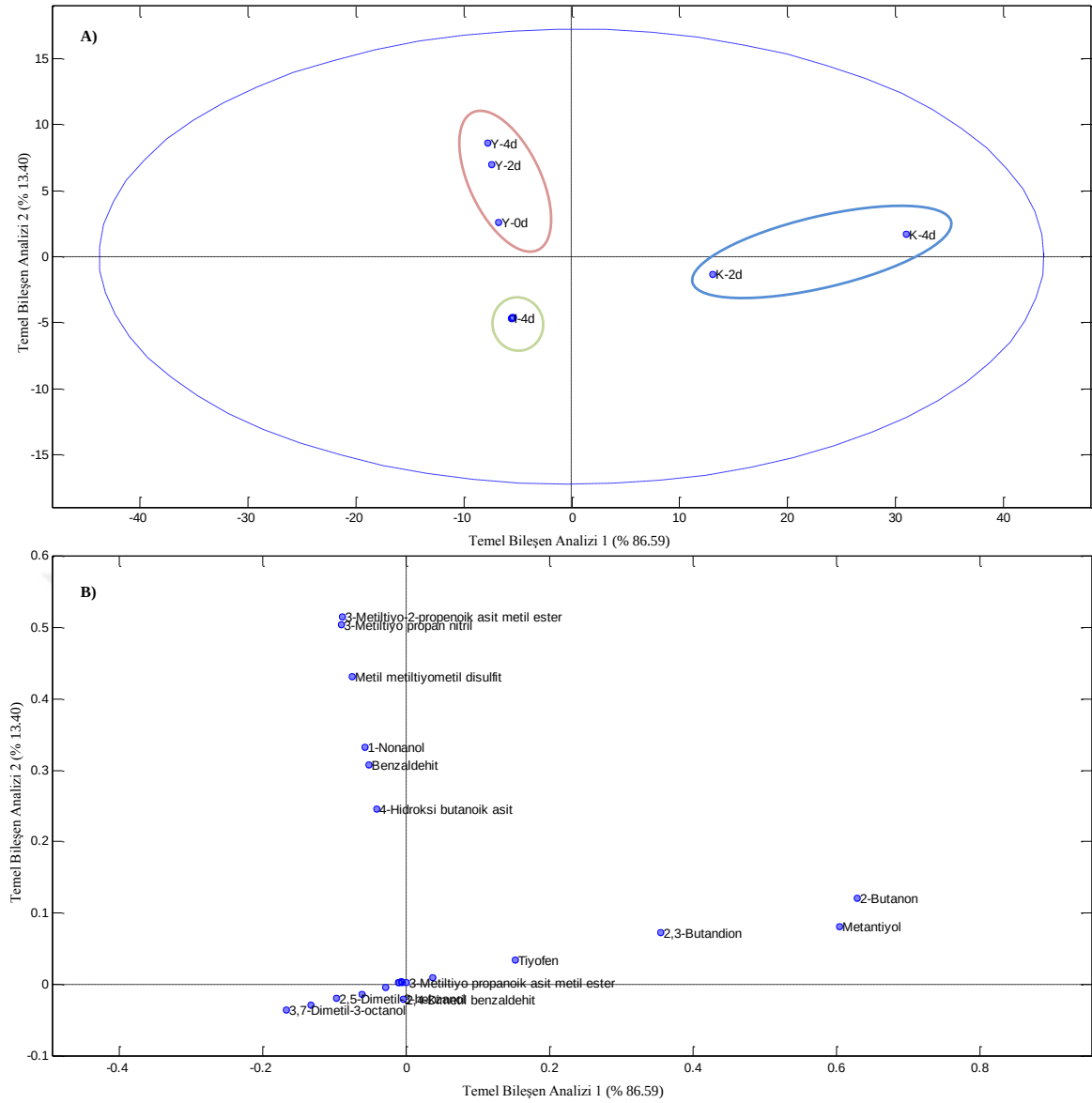
(Sonaçlar uçucu bileşik pik alanı/internal standart pik alanı olarak verilmiştir.)

L. lactis subsp. *cremoris* IP5'in metiyonin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklerden 2,4-dimetil heptan, 2-metil benzonitril, 2,5-dimetil-3-hekzanol, 3-metil-2-bütantiyol, tiyosiyanik asit metil ester, 1,2,3-triyolan, 2,3-dimetil-2,3-bütandiol, 3-metiltiyopropan nitril, 2,3-bütandion, tiyofen ve 2-bütanon nitril örneklerin ayırımında etkili olan bileşiklerdir (Şekil 4.7b).



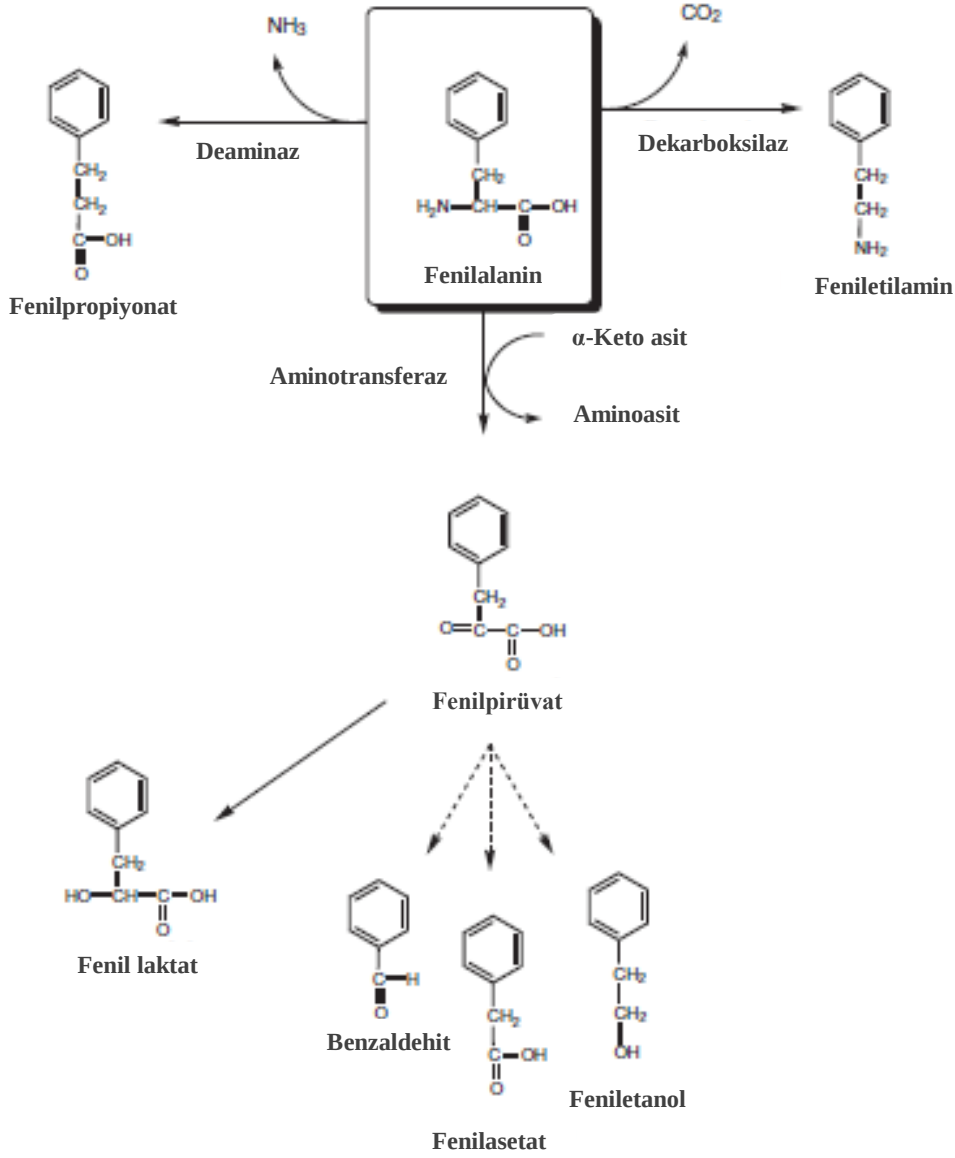
Şekil 4.7. a) *L. lactis* subsp. *cremoris* IP5'in metiyonin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Metiyonin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırmada etkili olan uçucu bileşikler

L. lactis subsp. *cremoris* HP ile gerçekleştirilen deneyde, örnekler arasındaki farklılık çoğunlukla, 3-metiltiyo propenoik asit metil ester, 3-metiltiyo propan nitril, metil metiltiyo metil disülfid, 1-nonanol, benzaldehit, 4-hidroksi bütanoik asit, tiyofen, 2,3-bütandion, 2-bütanon ve metantiyol gibi uçucu bileşiklerden kaynaklanmıştır (Şekil 4.8b).



Şekil 4.8. a) *L. lactis* subsp. *cremoris* HP'nin metiyonin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Metiyonin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırmada etkili olan uçucu bileşikler

Fenil metanol, fenil etanol, fenil propan, metil fenil hidroksi asetat, fenil asetaldehit, fenil pirüvat ve fenil etil asetat, peynir veya model sistemlerde bulunan fenilalanin türevi tat-koku bileşikleridir [51, 128, 140]. Fenilalanin yıkımına katılan enzimler, aminotransferazlar, L-aminoasit oksidazlar, L-fenilalanin amonyak liyazlar, L-aromatik aminoasit dekarboksilazlar ve fenilalanin dehidrogenazlardır. Fenil pirüvat, bir aminotransferazın etkisi ile oluşmakta ve ardından, feniletanol ve benzaldehite degrade olabilmektedir (Şekil 4.9) [134].



Şekil 4.9. Fenilalanin katabolizması [134]

Camembert peynirinin olgunlaşmasının ilk haftası süresince, aktif olarak gelişen maya hücreleri L-fenilalaninden feniletanol üretmiştir [141]. *B. linens*'in sıvı kültürlerde uçucu bileşikler üretme yeteneği incelendiğinde, bir fenil grubuna sahip çeşitli bileşikler tespit edilmiştir [140]. Fenil metanol, feniletanol, fenil propan ve metil fenil hidroksiasetat bu bileşikler arasında yer almaktadır [134].

L. plantarum'un gerçekleştirdiği fenilalaninden benzaldehit üretimi bir aminotransferaz tarafından başlatılmaktadır [142]. Fenil pirüvik asit reaksiyonda bir ara bileşik olduğu ve bu bileşiğin benzaldehite dönüşümünün, *L. plantarum* hücrelerinde yüksek seviyelerde bulunan Mn (II) ile katalize edildiği bildirilmiştir [143]. Peynirin düşük pH ve düşük oksijen konsantrasyonuna sahip olması ve düşük sıcaklıkta olgunlaştırılması, bu kimyasal

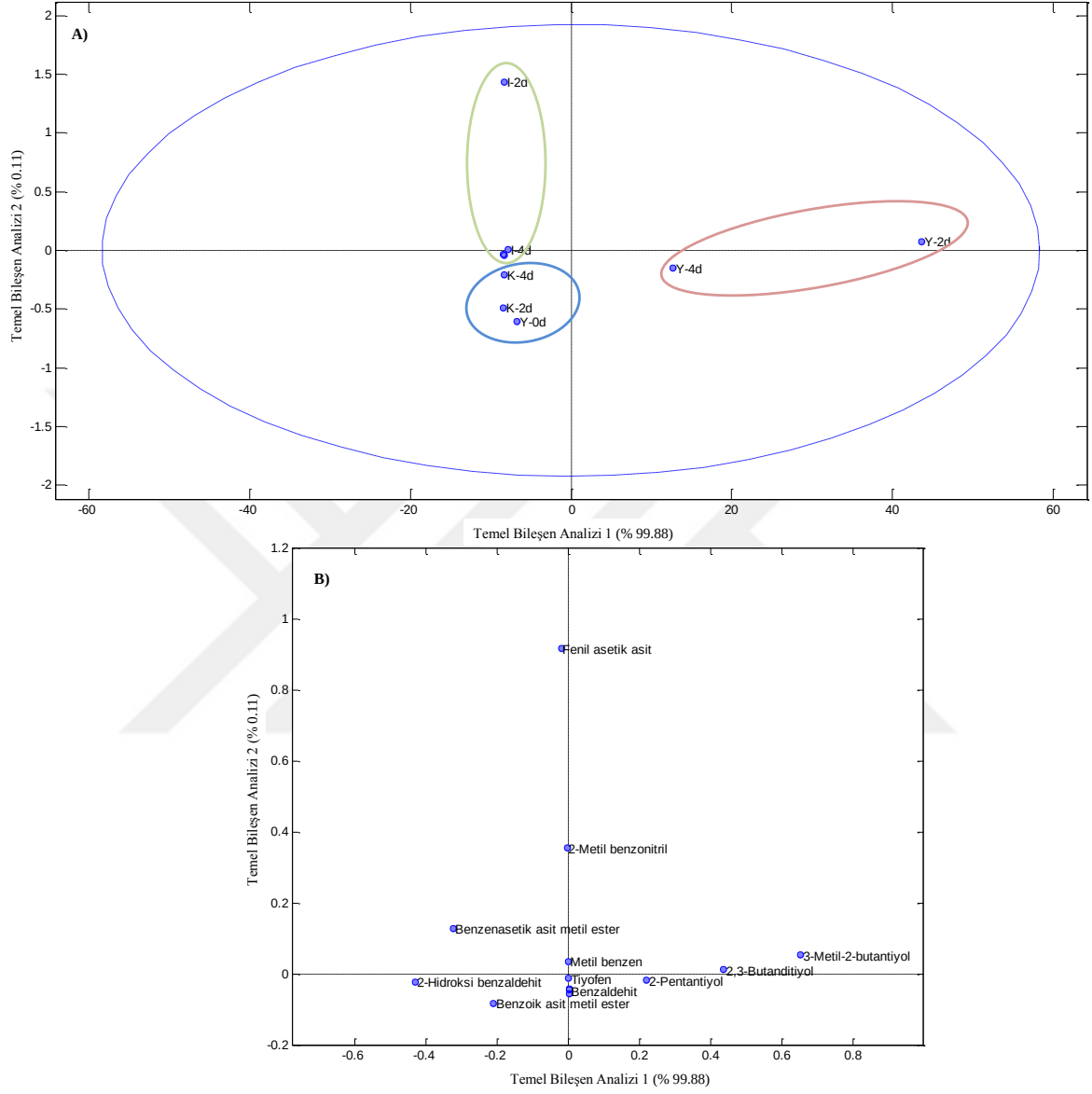
reaksiyon üzerinde negatif etkiye sahiptir. Bununla birlikte, araştırmacılar, belirli peynir çeşitlerinin olgunlaşma süresinin uzun olması nedeniyle, bu reaksiyonun peynire önemli bir katkısı olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, Klein ve ark. [144], fenilalaninin *L. helveticus* tarafından transaminasyonu ile oluşan indol pirüvattan benzaldehit üretimini, kimyasal bir reaksiyona dayandırmıştır.

L. lactis subsp. *lactis* S3'den iki aromatik aminoasit aminotransferaz saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Her ikisinin de peynir olgunlaşma koşulları altında aktif olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar, *p*-hidroksi fenil asetik asitin tirozinden üretilebileceğini ve kimyasal olarak *p*-kresole degrade olabileceğini gözlemlemişlerdir. Aynı zamanda, bu enzimler, triptofanı kullanarak, skatole dönüştürülebilen indol-3-asetik asidi üretebilmektedir [57]. *L. lactis* NCDO763'ün sahip olduğu bir aminotransferazın, sadece L-aminoasitlerin transaminasyonunu katalizlediği belirlenmiştir. Bir amino grubu alıcısı olarak α -ketoglutaratı kullanarak, bu mikroorganizmanın kalan hücreleri, fenilalaninden fenil pirüvat, fenil asetat ve fenil laktat üretmiştir. Aminotransferazın, aroma bileşiklerinin öncülleri olan aminoasitlerin (lösin, fenilalanin, tirozin, triptofan, metiyonin) transaminasyonunu gerçekleştirdiği için, olgunlaşma süresince peynirin tat-kokusunun gelişiminde önemli bir role sahip olduğu ileri sürülmüştür [55].

Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te sırasıyla, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41, *L. lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* 35-C-9, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459, *L. lactis* subsp. *cremoris* IP5 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* HP tarafından gerçekleştirilen fenilalanin katabolizması sonucu üretilen uçucu bileşik verilerine uygulanan PCA görülmektedir. Buna göre, yapılan her bir PCA'da genellikle örneklerin redoks potansiyellerine ve inkübasyon sürelerine göre birbirlerinden ayrıldığı belirlenmiştir.

L. lactis subsp. *lactis* CM41 ile gerçekleştirilen fenilalanin katabolizması deneyinde, inkübasyonun 0. gününde üretilen aroma bileşikleri, kontrol ortamında üretilenlere yakın çıkmıştır. Bunun dışında diğer örnekler arasında başarılı bir ayırım gerçekleşmiştir. Ayırım fenil asetik asit, 2-metil benzonitril, benzen asetik asit metil ester, 3-metil-2-bütantiyol, 2-pentantiyol, benzoik asit metil ester, 2-hidroksi benzaldehit, metil benzen ve benzaldehit üzerinden gerçekleşmiştir (Şekil 4.10). Çizelge 4.16 incelendiğinde, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşunun fenilalanini indirgenmiş ortamda katabolize etmesi sonucunda etantiyol, 3-metil-2-bütantiyol, 2,3-bütanditiyol, 2-pentantiyol gibi tiyol bileşikleri ve fenil asetik asit

gibi karboksilik asitlerin üretildiği belirlenmiştir. Yükseltgenmiş ortamda ise benzaldehit, 2-hidroksi benzaldehit gibi aldehitlerin ve benzoik asit metil ester, benzen asetik asit metil ester gibi esterlerin üretildiği gözlenmiştir.



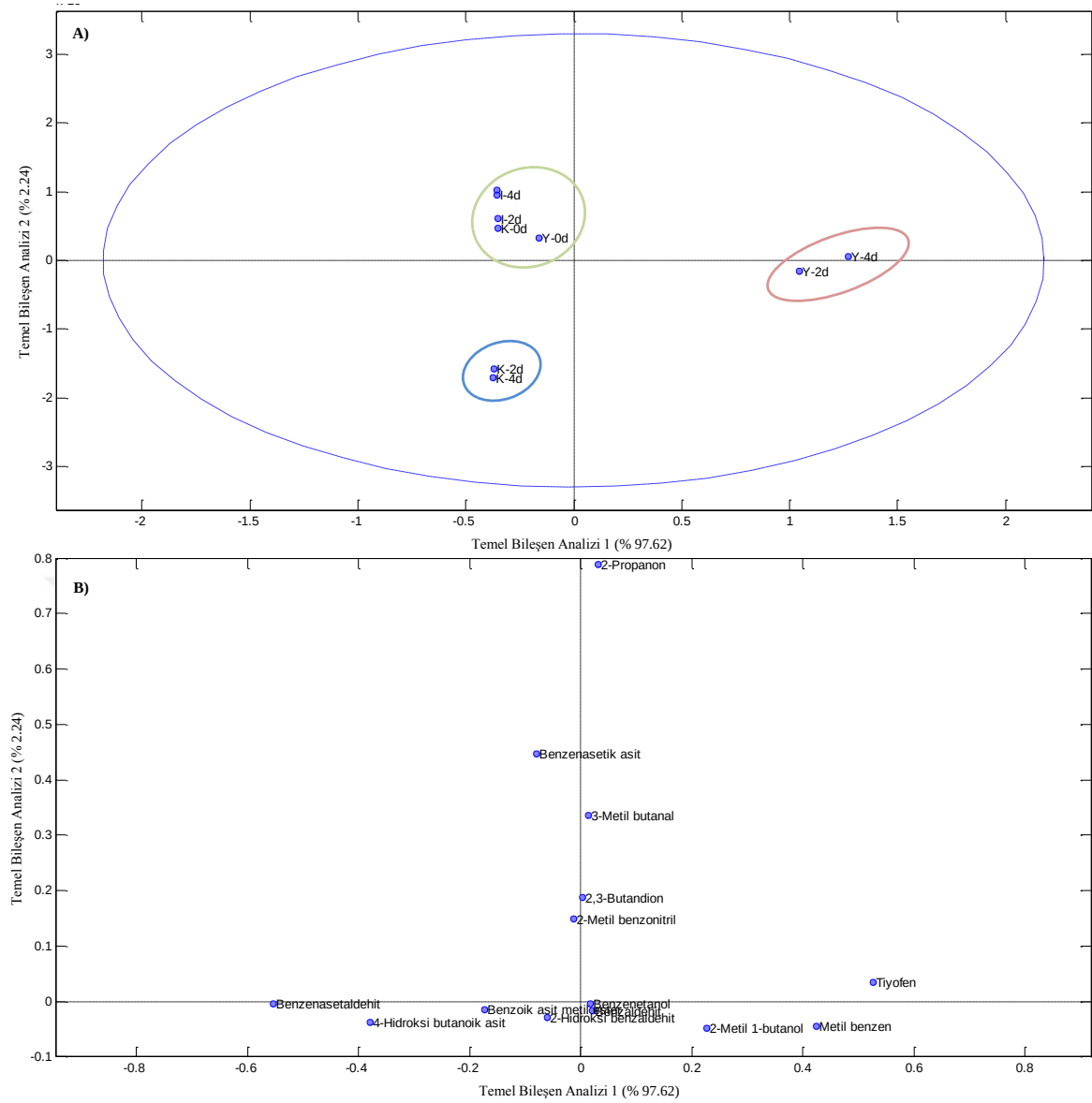
Şekil 4.10. a) *L. lactis* subsp. *lactis* CM41'in fenilalanin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Fenilalanin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırmada etkili olan uçucu bileşikler

Çizelge 4.16. *L. lactis* subsp. *lactis* CM41'in fenilalanin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşikler

Uçucu bileşik	Kontrol			İndirgenmiş			Yükseltgenmiş		
	0.gün	2.gün	4.gün	0.gün	2.gün	4.gün	0.gün	2.gün	4.gün
Etantiyol	-	-	-	-	0.30	0.44	-	-	-
2,3-Bütandion	-	-	-	0.22	0.26	-	-	0.14	-
3-Bütildiyo-1-büten	-	-	-	-	0.14	0.30	-	-	-
Tiyofen	-	-	-	0.20	0.18	-	-	-	-
Metil benzen	-	0.81	0.05	1.54	0.79	0.62	0.50	0.66	0.10
3-Metil-2-bütantiyol	-	-	-	-	0.21	-	-	-	-
2,3-Bütanditiyol	-	-	-	0.10	0.07	-	-	-	-
2-Pentantiyol	-	-	-	0.31	0.90	1.08	-	-	-
Benzaldehit	0.23	0.12	0.03	0.18	1.72	2.92	10.86	316.25	128.45
Benzoik asit metil ester	-	-	0.65	-	-	-	-	-	0.10
2-Hidroksi benzaldehit	-	-	-	-	-	-	0.07	0.33	0.23
Benzenasetik asit metil ester	-	0.50	0.20	-	-	-	-	0.14	-
2-Metil benzonitril	-	-	-	-	-	-	1.02	1.60	1.04
Fenil asetik asit	-	-	-	-	1.24	-	-	-	-

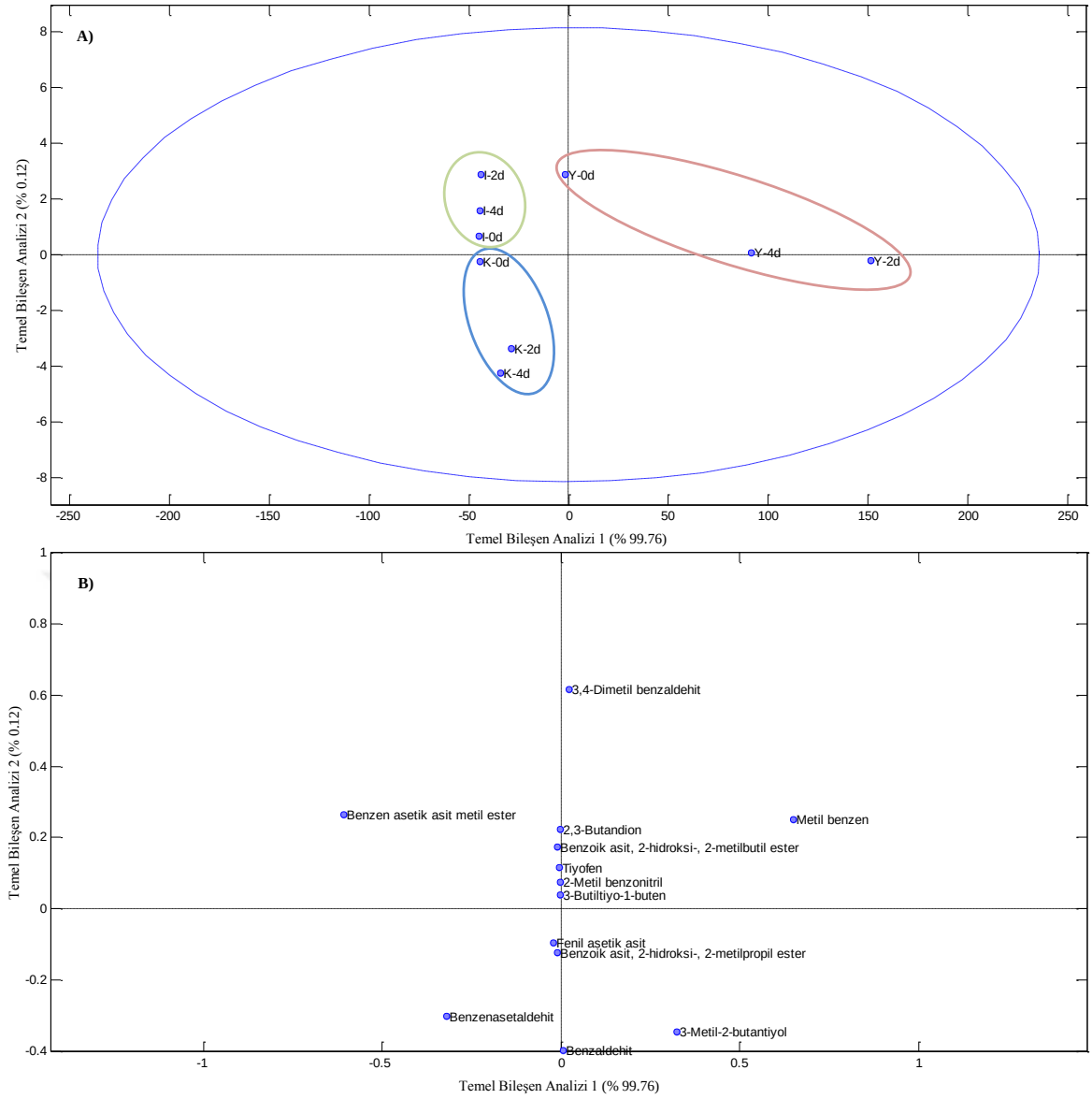
(Soniclar uçucu bileşik pik alanı/internal standart pik alanı olarak verilmiştir.)

L. lactis'in fenilalanin katabolizması sonucunda, kontrol ortamında ve yükseltgenmiş ortamda inkübasyonun 0. gününde üretilen aroma bileşikleri ile indirgenmiş ortamda üretilen aroma bileşikleri aynı grupta sınıflandırılmıştır. Kontrol ve yükseltgenmiş ortamda inkübasyonun ilerleyen günlerinde üretilen aroma bileşikleri ise ayrı ayrı sınıflandırılmıştır. Ayrıca, ayırım 2-propanon, benzen asetik asit, 3-metil bütanal, 2,3-bütandion, 2-metil benzonitril, tiyofen, 2-metil-1-bütanol, metil benzen, benzen asetaldehit ve 4-hidroksi bütanoik asit üzerinden gerçekleşmiştir (Şekil 4.11).



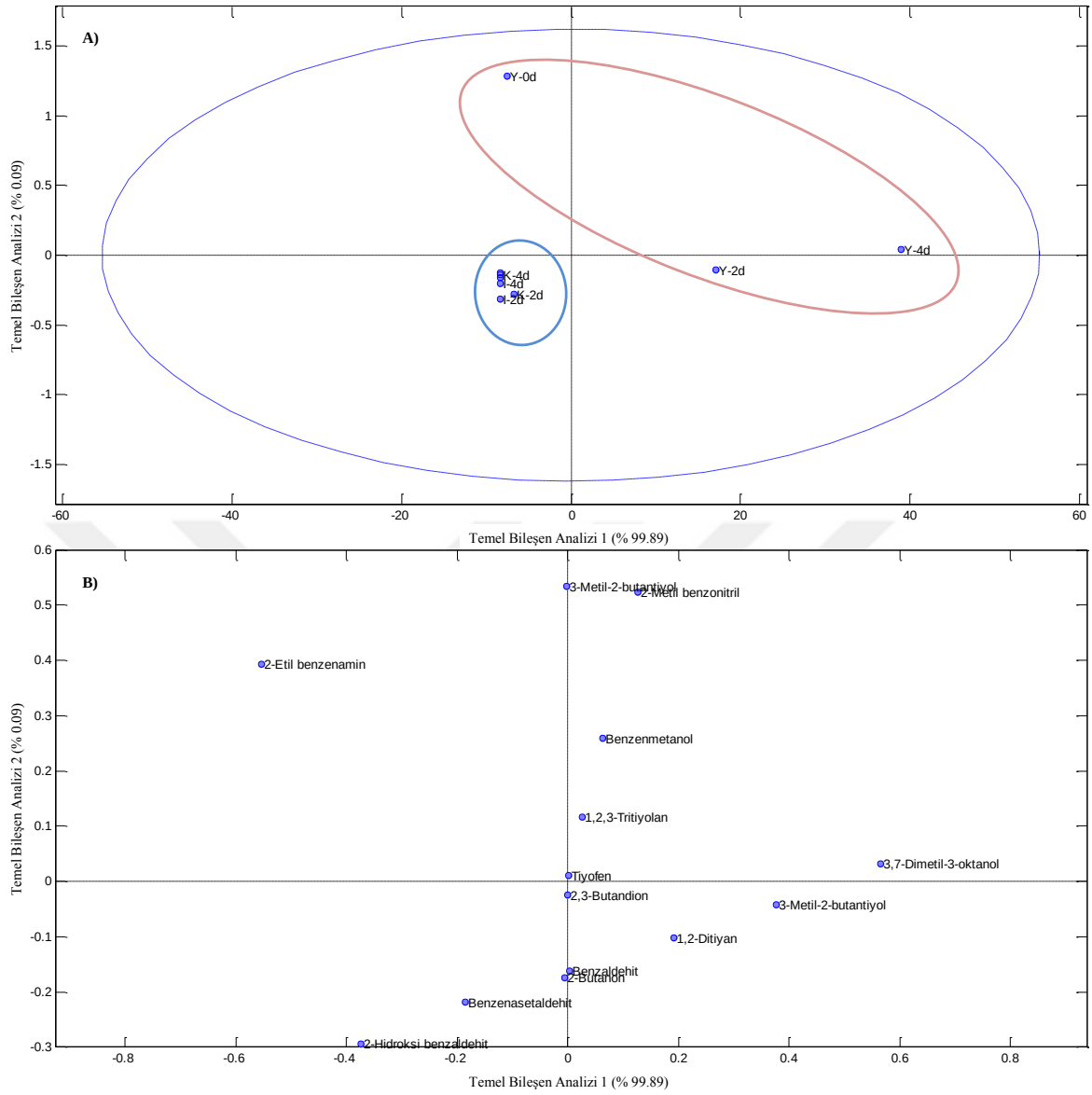
Şekil 4.11. a) *L. lactis*'in fenilalanin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Fenilalanin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler

L. lactis subsp. *lactis* 35-C-9 suşu ile gerçekleştirilen fenilalanin katabolizması sonucunda, kontrol, indirgenmiş ve yükseltgenmiş ortamlarda üretilen uçucu bileşikler açısından örnekler redoks potansiyellerine göre PCA ile başarılı bir şekilde ayrılmıştır. Ayırimda etkili olan bileşikler ise, 2,3-bütandion, 3-bütildiyo-1-büten, tiyofen, metil benzen, 3-metil-2-bütantiyol, benzaldehit, benzen asetaldehit, benzen asetik asit metil ester, 3,4-dimetil benzaldehit, 2-metil benzonitril, fenil asetik asit, benzoik asit 2-hidroksi 2-metilpropil ester, benzoik asit 2-hidroksi 2-metilbütül esterdir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. a) *L. lactis* subsp. *lactis* 35-C-9'un fenilalanin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Fenilalanin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırmada etkili olan uçucu bileşikler

L. lactis subsp. *cremoris* UD459'un kontrol ortamında fenilalanini katabolize etmesi sonucunda benzaldehit ve benzen asetaldehit oluşmuştur. Yükseltgenmiş ortamda ise kontrol ortama kıyasla çok yüksek konsantrasyonda benzaldehit birikimi gerçekleşmiştir. 2-Hidroksi benzaldehit ve 2-metil benzonitril de *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 tarafından yükseltgenmiş ortamda üretilen metabolitler arasında yer almaktadır. İndirgenmiş ortamda ise tiyol bileşikleri ve ketonlar baskın olarak üretilen metabolitlerdir (Çizelge 4.17).



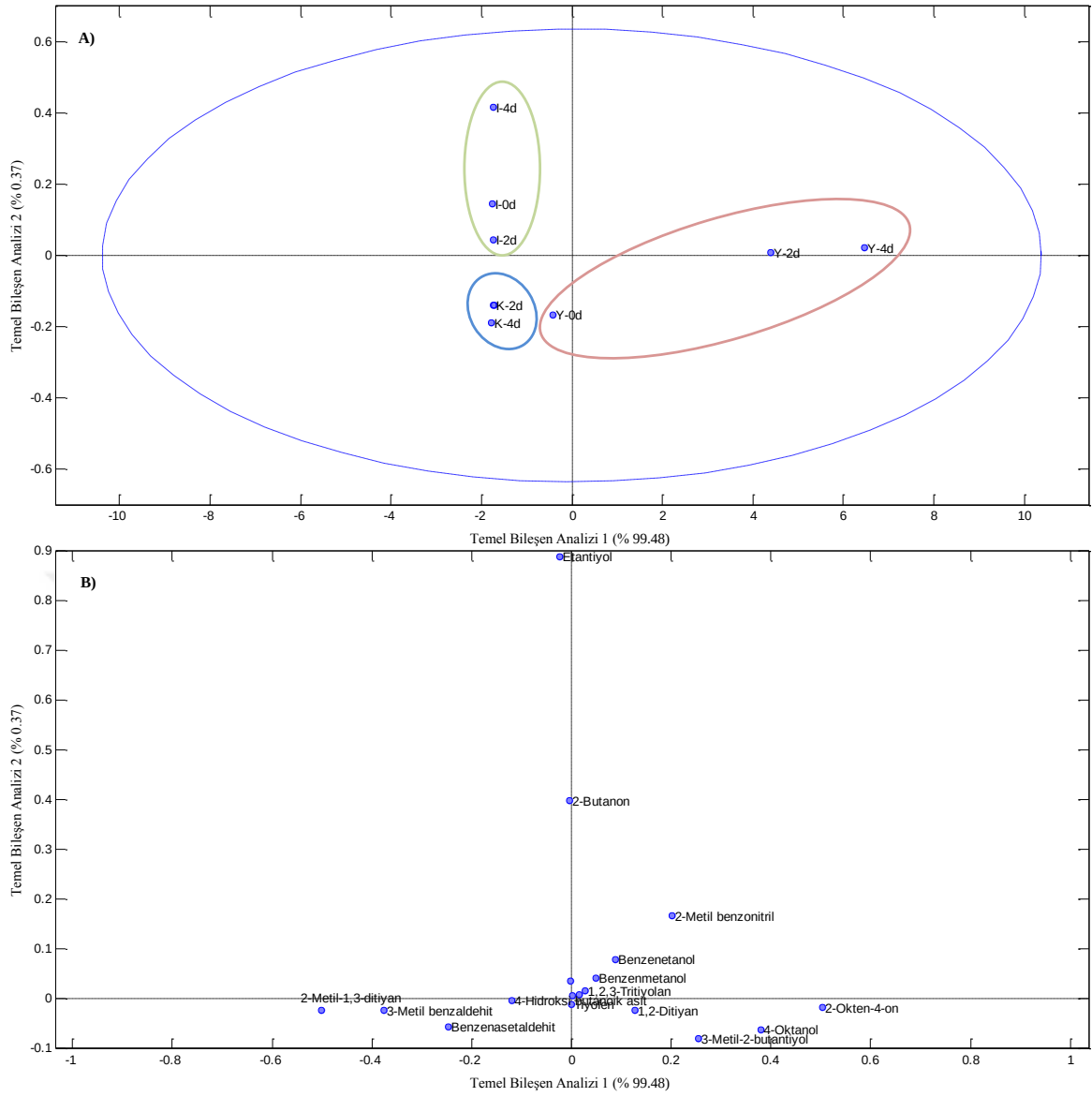
Şekil 4.13. a) *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459'un fenilalanin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Fenilalanin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırmada etkili olan uçucu bileşikler

Çizelge 4.17. *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459'un fenilalanin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşikler

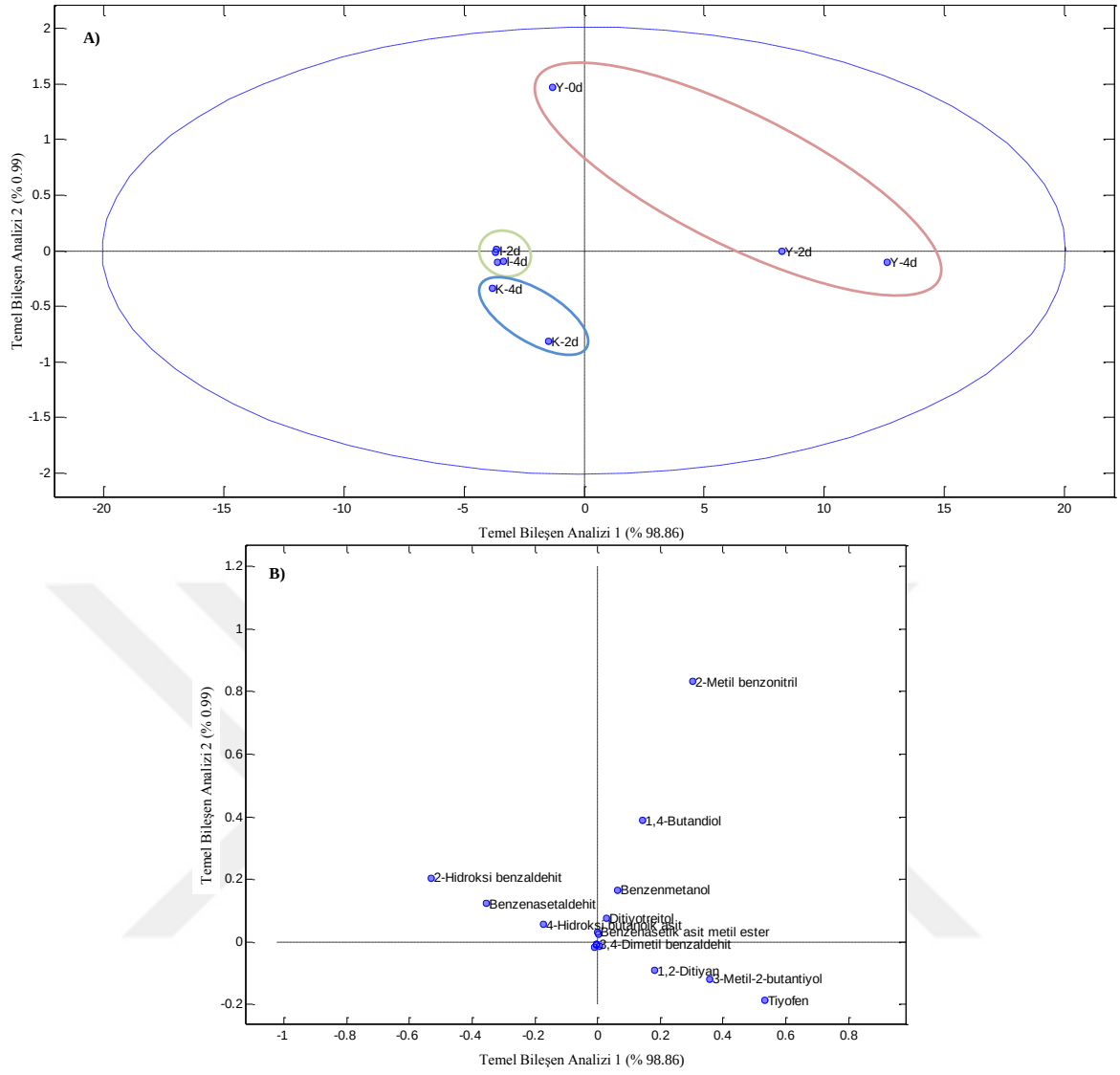
Uçucu bileşik	Kontrol			İndirgenmiş			Yükseltgenmiş		
	0.gün	2.gün	4.gün	0.gün	2.gün	4.gün	0.gün	2.gün	4.gün
2-Butanon	-	-	-	0.15	0.28	0.14	-	-	-
2,3-Butandion	-	-	-	0.48	0.83	0.58	-	-	-
Tiyofen	-	-	-	0.46	0.38	0.36	-	-	-
3-Metil-2-butantiyol	-	-	-	-	0.21	0.06	-	-	-
3,7-Dimetil-3-oktanol	-	-	-	-	-	-	-	0.09	0.13
3-Metil-2-butantiyol	-	-	-	0.26	0.83	0.48	-	-	-
1,2-Ditiyan	-	-	-	0.55	0.47	0.38	7.56	-	-
Benzaldehit	0.10	8.72	-	0.12	0.43	0.46	0.03	134.53	249.84
Benzen asetaldehit	-	0.27	-	-	-	-	-	-	-
2-Hidroksi benzaldehit	-	-	-	-	-	-	0.07	0.93	1.43
2-Etil benzenamin	-	-	0.06	0.17	-	0.25	-	-	-
1,2,3-Tritiyolan	-	-	-	-	0.28	0.10	-	-	-
Benzen metanol	-	-	0.06	-	-	-	-	-	0.38
2-Metil benzonitril	-	-	-	-	-	-	0.77	3.07	6.03

(Sonuçlar uçucu bileşik pik alanı/internal standart pik alanı olarak verilmiştir.)

L. lactis subsp. *cremoris* IP5 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* HP tarafından gerçekleştirilen fenilalanin katabolizması sonucunda üretilen uçucu bileşiklere göre PCA kullanılarak örneklerin redoks potansiyellerine göre ayırımı tam olarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15). *L. lactis* subsp. *cremoris* IP5 ile gerçekleştirilen deneyde ayırım, etantiyol, 2-bütanon, 2-metil benzonitril, benzen etanol, benzen metanol, 2-metil-1,3-ditiyan, 3-metil benzaldehit, benzen asetaldehit, 3-metil-2-bütantiyo, 1-oktanol ve 4-okten-4-on üzerinden meydana gelmiştir. *L. lactis* subsp. *cremoris* HP ile yapılan deneyde ise, 2-metil benzonitril, 1,4-bütandiol, 2-hidroksi benzaldehit, benzen asetaldehit, benzen metanol, 1,2-ditiyan, 3-metil-2-bütantiyol ve tiyofenin örneklerin ayırımında etkili olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.14. a) *L. lactis* subsp. *cremoris* IP5'in fenilalanin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Fenilalanin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırmada etkili olan uçucu bileşikler



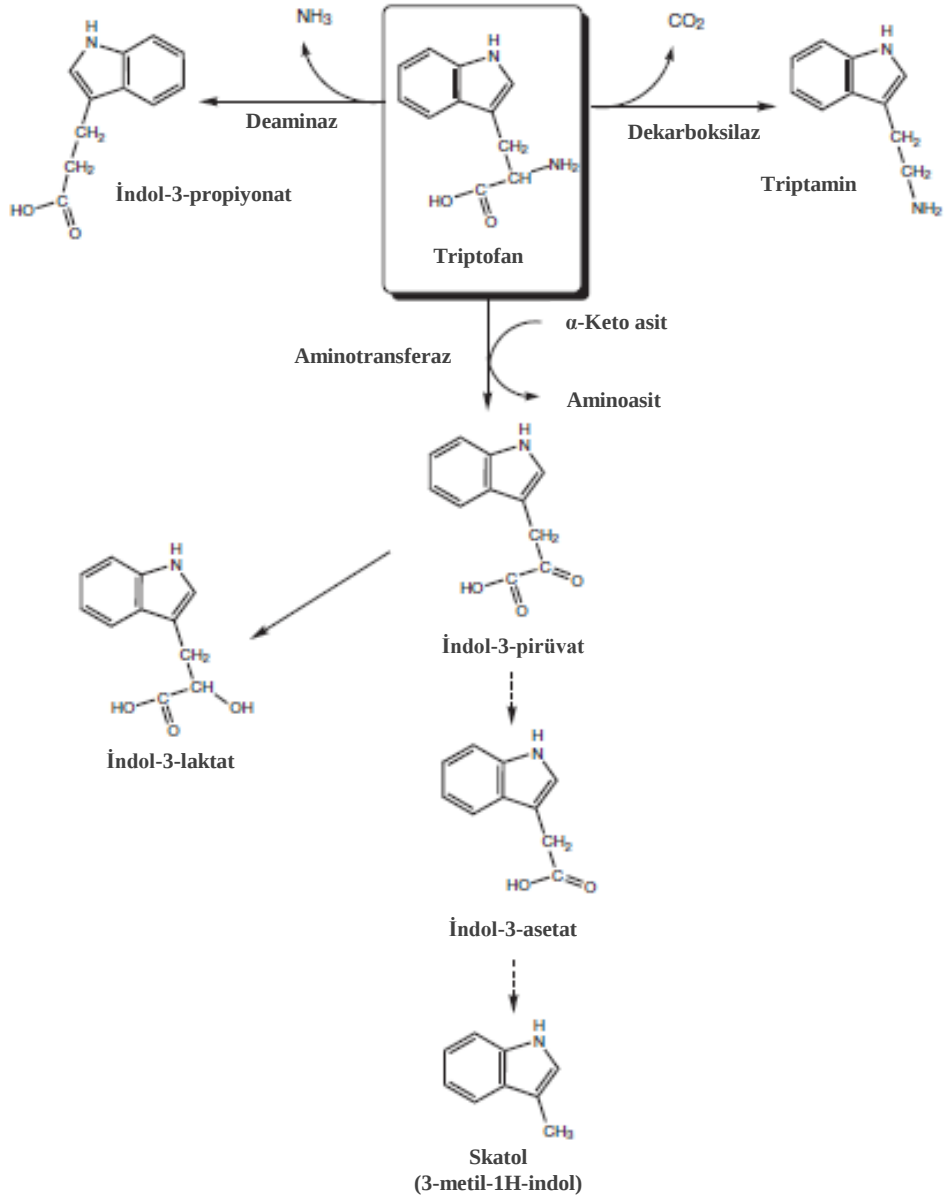
Şekil 4.15. a) *L. lactis* subsp. *cremoris* HP'nin fenilalanin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Fenilalanin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırmada etkili olan uçucu bileşikler

Triptofan katabolizması için yollar Şekil 4.16'te gösterilmiştir [134]. Triptofan katabolizması sonucunda, daha sonra indol laktik asit, indol asetik asit, indol aldehit ve benzoaldehit ile katabolize edilebilen indol pirüvat üretilmektedir [145]. Gummalla ve Broadbent [146], laktobasillerin istenmeyen tat-koku gelişimine katkısını belirlemek için, ek kültür olarak kullanılan laktobasiller tarafından gerçekleştirilen triptofan katabolizması üzerinde çalışmışlardır. *L. casei* tarafından gerçekleştirilen triptofan katabolizmasının ana mekanizmasının, triptofanın, tek ara bileşik olan indol-3-pirüvik asit ile bir dizi transaminasyon ve dehidrojenasyon reaksiyonu yoluyla indol laktik asite dönüşümünü içerdiği bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada, sonuçların starter olmayan laktobasillerin ve ek

kültür olarak kullanılan laktobasillerin, indol-3-pirüvik asit ve diğer aromatik metabolitleri içeren sekonder reaksiyonlarda önemli rol oynayabildiğini gösterdiği belirtilmiştir.

Hem optimum (pH 6.5, 25 °C, çalkalamalı) hem de peynir benzeri (pH 5.2, 15 °C, % 4 NaCl) koşullarda *B. linens* BL2'nin gerçekleştirdiği triptofan katabolizması Ummadi ve Weimer [147] tarafından çalışılmıştır. Optimum sıcaklık ve pH'da *B. linens* BL2, çeşitli yollarla kendiliğinden triptofanı degrade edebildiği, ancak, peynir benzeri koşullar altında bu bakterinin triptofanı katabolize edemediği belirlenmiştir. Her iki koşulda gelişen hücreler, triptofanaz, triptofan dekarboksilaz veya triptofan 2-monooksijenaz aktivitesi göstermemiştir.

Gao ve ark.'ın [145], laktokoklardaki aromatik aminoasitlerin katabolizmasını araştırdığı çalışmada, sekiz farklı laktokok suşu tarafından gerçekleştirilen triptofan katabolizmasının ilk basamağının aminotransferaz aktivitesinden kaynaklandığı bildirilmiştir. Ayrıca, L-tirozin ve L-fenilalanin üzerindeki aminotransferaz aktivitesi de saptanmıştır. Buna ek olarak, üretilen triptofan metabolitlerinin suşlar arasında değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir.

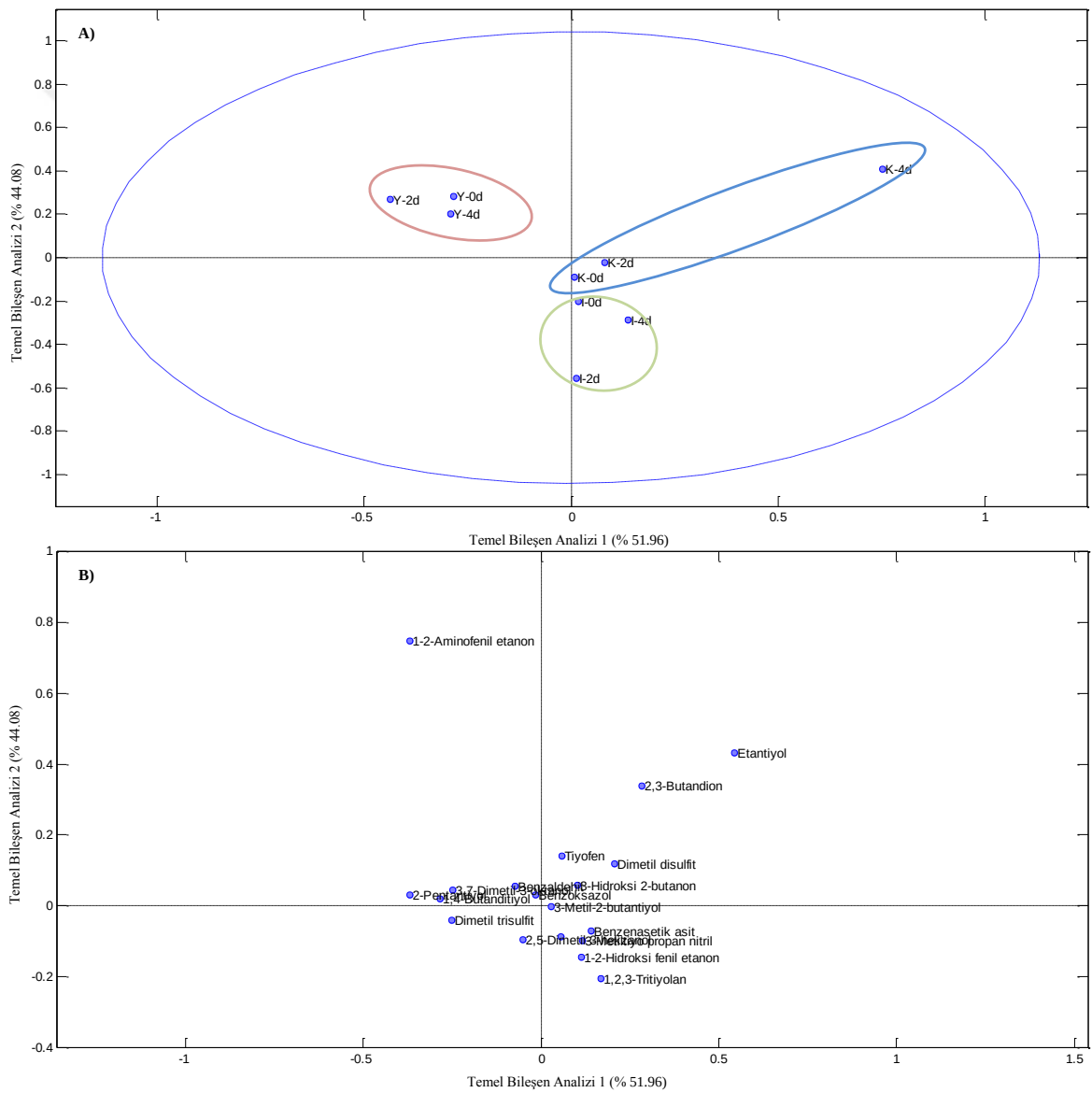


Şekil 4.16. Triptofan katabolizması [134]

Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21 ve Şekil 4.22’de sırasıyla, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41, *L. lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* 35-C-9, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459, *L. lactis* subsp. *cremoris* IP5 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* HP tarafından gerçekleştirilen triptofan katabolizması sonucu üretilen uçucu bileşik verilerine uygulanan PCA görülmektedir. Buna göre, yapılan her bir PCA’da genellikle örneklerin redoks potansiyellerine ve inkübasyon sürelerine göre birbirlerinden ayrıldığı belirlenmiştir.

L. lactis subsp. *lactis* CM41 ile gerçekleştirilen triptofan katabolizması sonucunda farklı redoks potansiyeline sahip örnekler 1-2-aminofenil etanon, etantiyol, 2,3-bütanon, tiyofen, dimetil disülfid, dimetil trisülfid, 1-2-hidroksifenil etanon ve 1,2,3-tritiyolan bileşikleri

üzerinden ayrılmıştır (Şekil 4.17). Çizelge 4.18 incelendiğinde, diğer aminoasitlerin katabolizmasında olduğu gibi yükseltgen ortamın aldehit üretimini ve indirgen ortamın ise tiyol bileşikleri ve karboksilik asitlerin üretimini teşvik ettiği belirlenmiştir. Fenilalanin katabolizması sonucunda oluşan benzaldehit konsantrasyonundan çok daha düşük olmakla birlikte yükseltgen ortamda triptofan katabolizması sonucu benzaldehit üretimi gerçekleşmiştir. Yükseltgenmiş reaksiyon ortamlarında triptofan katabolizması deneylerinde ortaya çıkan benzoksazol bakterilerin faaliyeti sonucu üretilen bir metabolit değildir. Benzoksazol, 2-aminofenolün iyot katalizörlüğünde çeşitli aldehitlerle girdiği kondensasyon reaksiyonu sonucunda üretilmektedir [148].



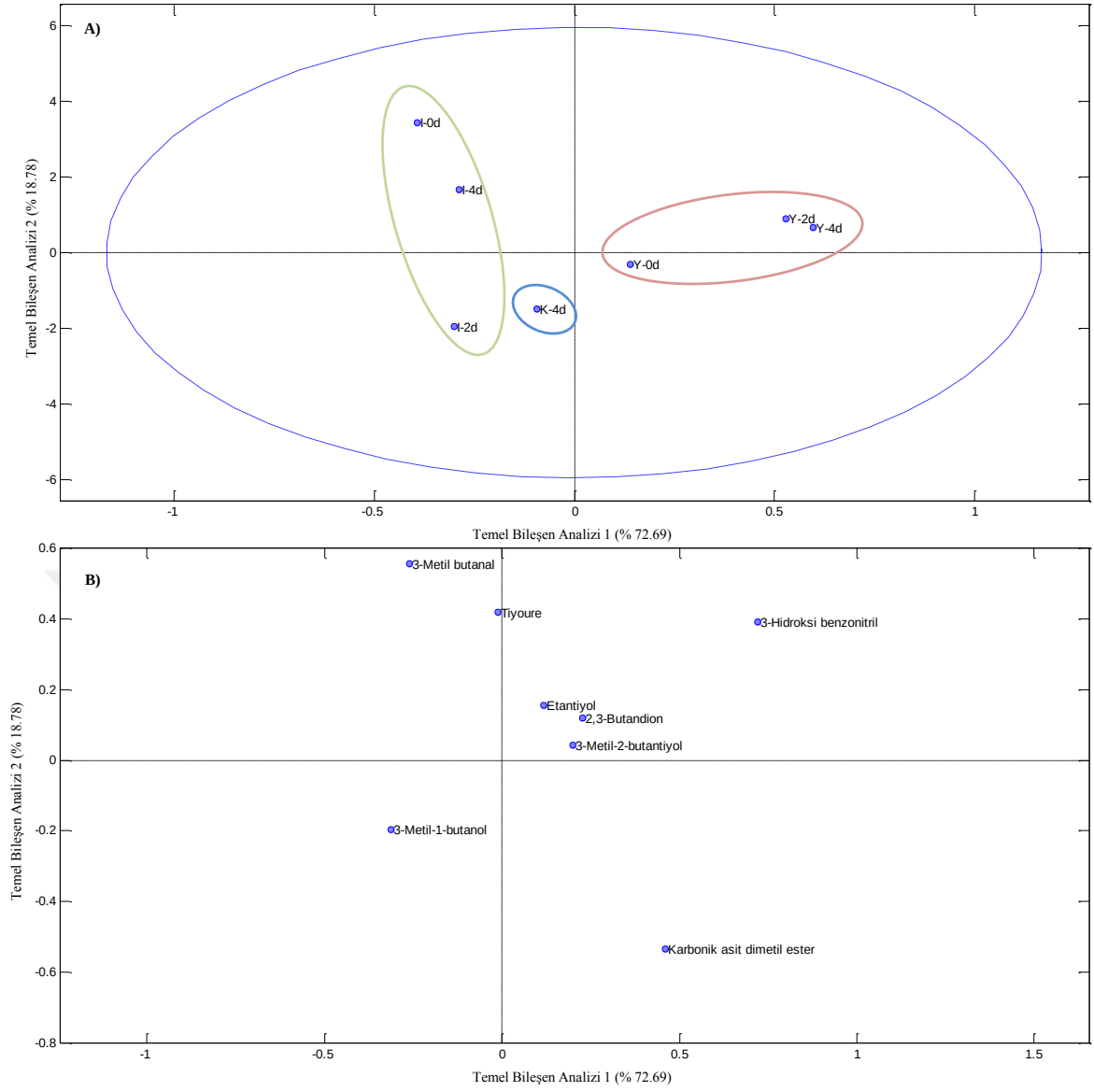
Şekil 4.17. a) *L. lactis* subsp. *lactis* CM41'in triptofan katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Triptofanın katabolizması sonucu elde edilen ve ayırmada etkili olan uçucu bileşikler

Çizelge 4.18. *L. lactis* subsp. *lactis* CM41'in triptofan katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşikler

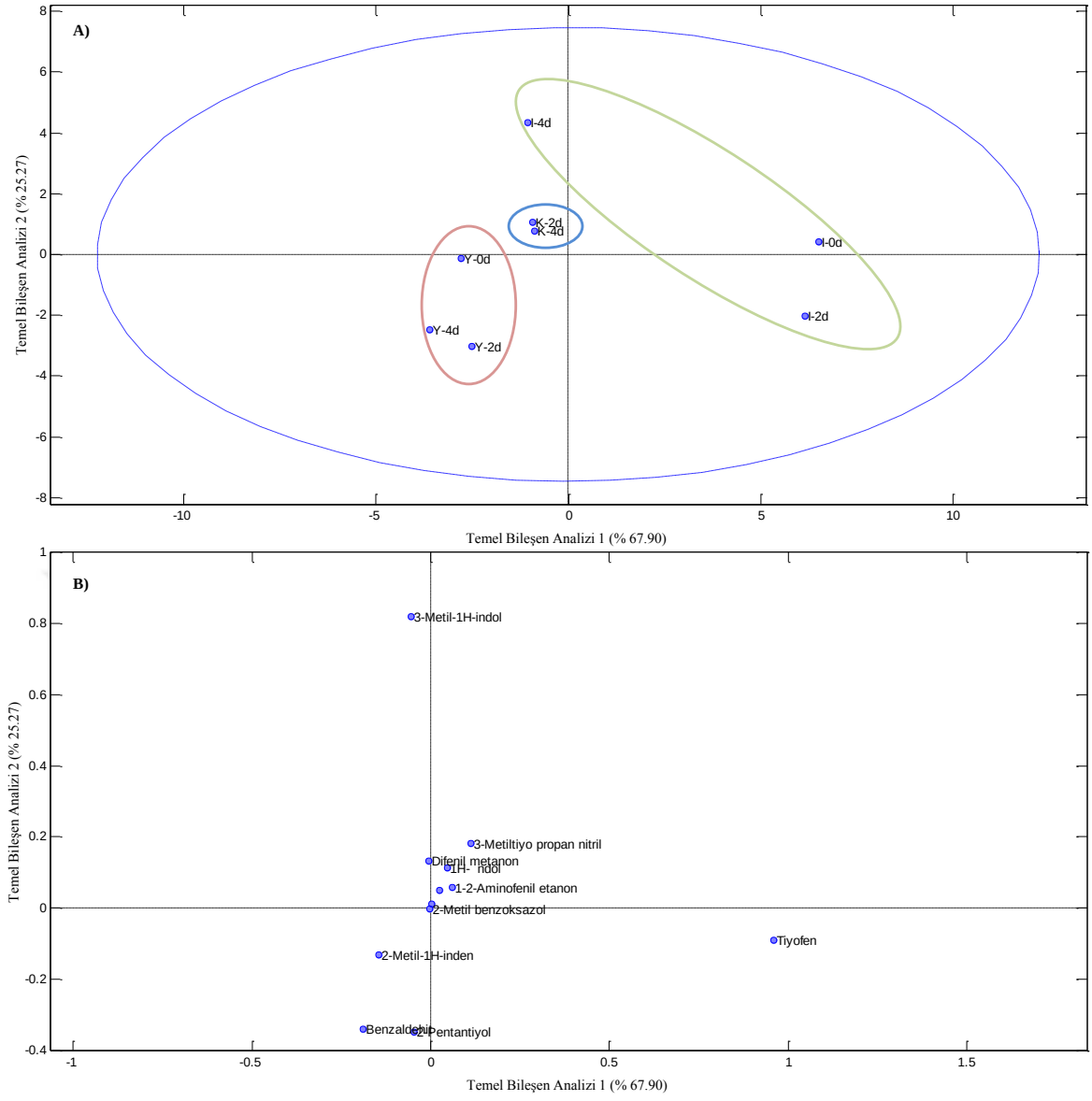
Uçucu bileşik	Kontrol			İndirgenmiş			Yükseltgenmiş		
	0.gün	2.gün	4.gün	0.gün	2.gün	4.gün	0.gün	2.gün	4.gün
Etantiyol	-	-	-	0.11	0.29	0.17	-	-	-
2,3-Bütandion	-	-	-	0.22	0.11	-	-	0.09	-
Tiyofen	-	-	-	0.09	-	0.15	-	-	-
Dimetil disülfid	-	0.19	1.61	-	-	-	-	-	-
3-Hidroksi 2-bütanon	-	-	-	-	-	-	-	0.37	-
3-Metil-2-bütantiyol	-	-	-	-	0.17	-	-	-	-
2,5-Dimetil-3-hekzanol	-	0.33	4.13	-	0.50	1.75	-	-	-
Dimetil trisülfid	-	-	0.07	-	-	-	-	-	-
3,7-Dimetil-3-oktanol	-	-	0.28	-	0.25	-	0.06	0.15	0.26
1,4-Bütanditiyol	-	-	-	0.22	-	0.20	-	-	-
2-Pentantiyol	-	-	-	0.44	0.84	0.36	-	-	-
Benzaldehit	-	-	-	0.12	0.24	0.13	0.45	2.66	1.52
Benzoksazol	-	0.04	0.13	-	-	-	0.66	0.87	0.93
4-Metil benzaldehit	-	-	-	-	-	-	-	0.10	0.08
3-Metiltiyopropan nitril	-	-	-	-	-	-	1.12	0.90	0.84
1,2,3-Tritiyolan	-	-	-	-	0.23	0.19	-	-	-
1-2-Hidroksi fenil etanon	-	-	-	-	-	-	-	-	0.20
Benzenasetik asit	-	-	-	0.53	1.48	0.65	-	-	-
1-2-Aminofenil etanon	-	0.03	0.11	-	-	-	-	0.09	0.14

(Sonnular uçucu bileşik pik alanı/internal standart pik alanı olarak verilmiştir.)

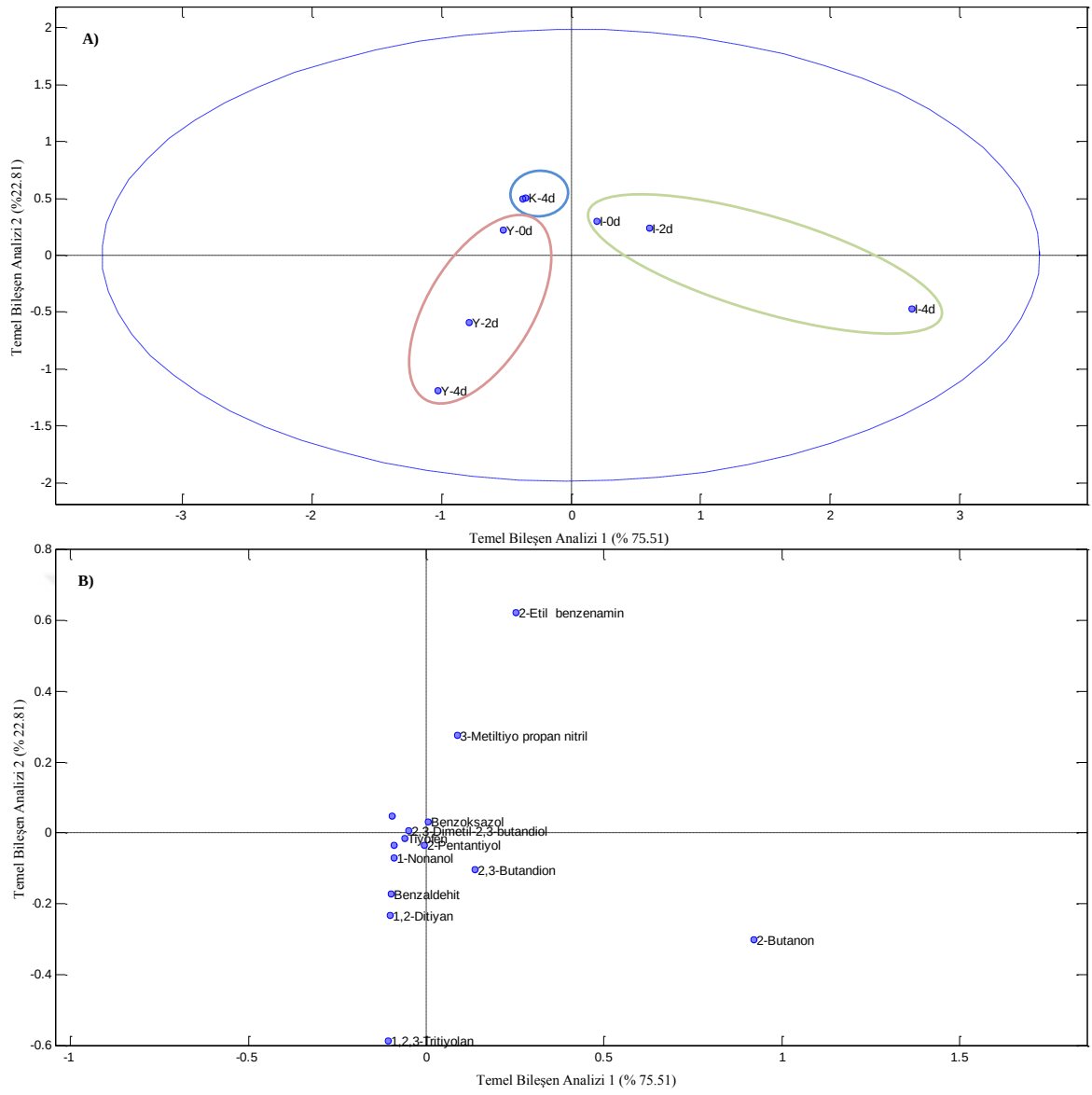
L. lactis ve *L. lactis* subsp. *lactis* 35-C-9'un triptofan katabolizması sonucunda örnekler redoks potansiyellerine göre PCA ile ayrılmıştır. Yükseltgenmiş ve indirgenmiş ortamlarda inkübasyon süresinin de uçucu bileşiklerin üretimi ve konsantrasyonu üzerindeki etkisinin önemli olduğu ancak, inkübasyon süresinin kontrol ortamında uçucu bileşikler üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da görülmektedir. Ayrıca, bu iki suş için de ayırımın, neredeyse reaksiyon ortamlarında üretilen bütün uçucu bileşikler üzerinden gerçekleştiği belirlenmiştir.



Şekil 4.18. a) *L. lactis*'in triptofan katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Triptofanın katabolizması sonucu elde edilen ve ayırmada etkili olan uçucu bileşikler



Şekil 4.19. a) *L. lactis* subsp. *lactis* 35-C-9'un triptofan katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Triptofanın katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler

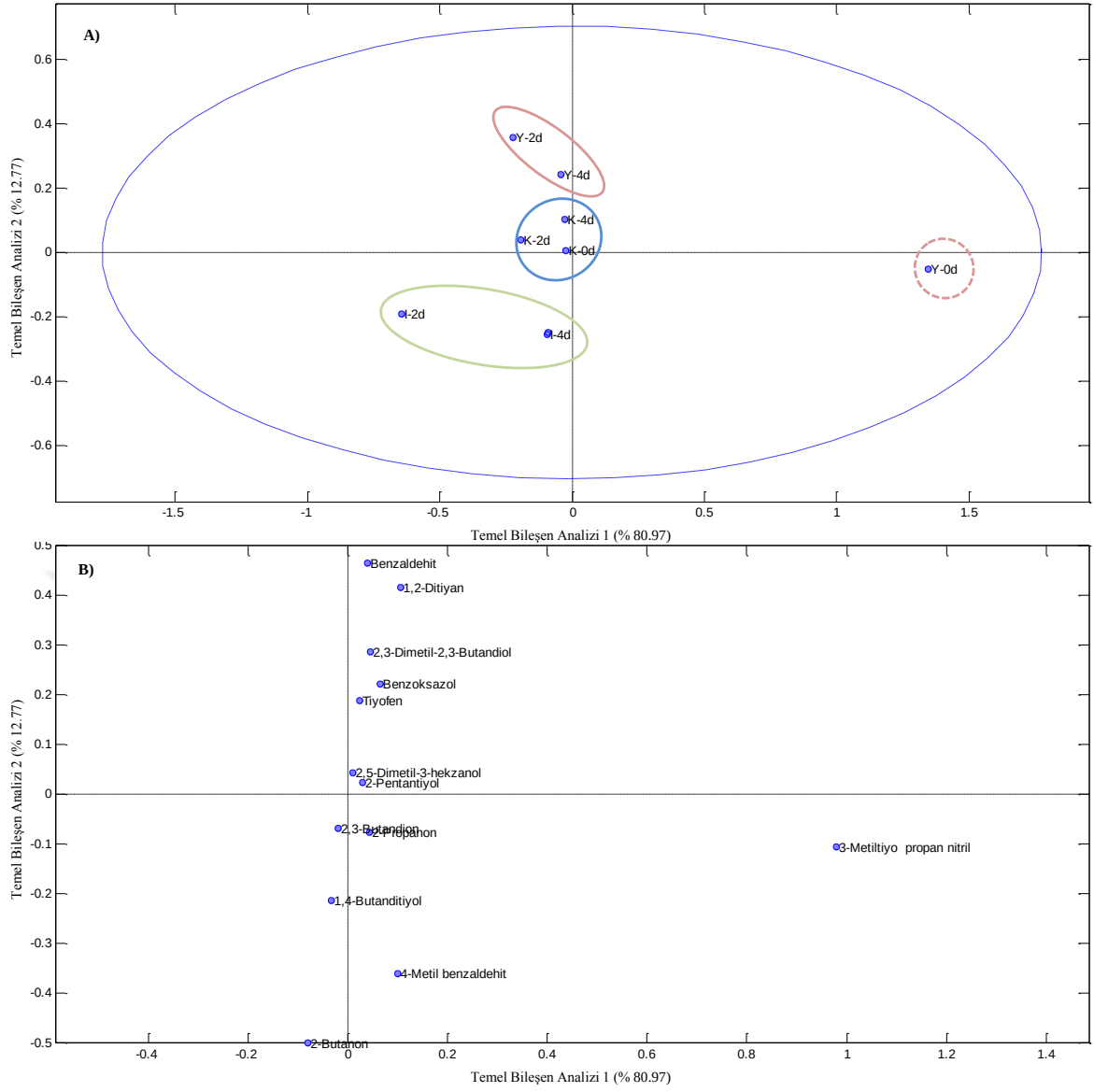


Şekil 4.20. a) *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459'un triptofan katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Triptofanın katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler

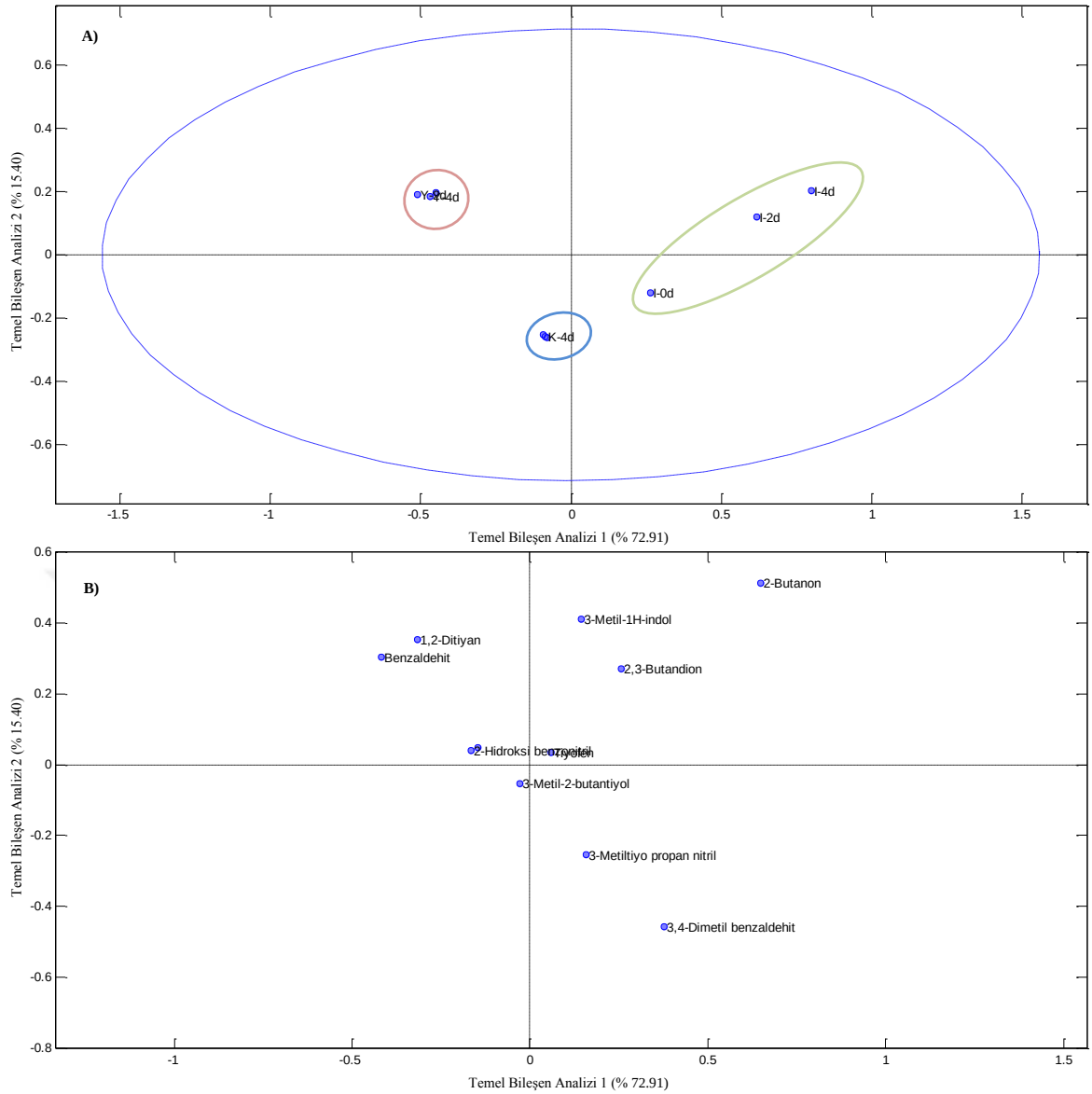
Çizelge 4.19. *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459'un triptofan katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşikler

Uçucu bileşik	Kontrol			İndirgenmiş			Yükseltgenmiş		
	0.gün	2.gün	4.gün	0.gün	2.gün	4.gün	0.gün	2.gün	4.gün
2-Bütanon	-	-	-	0.17	0.56	0.74	-	-	-
2,3-Bütandion	-	-	-	0.63	1.46	2.32	-	-	-
Tiyofen	-	-	-	0.43	0.77	2.79	-	-	-
2,3-Dimetil-2,3-bütandiol	0.05	0.05	-	0.06	0.11	0.13	0.08	0.16	0.26
3-Metil-2-bütantiyol	-	-	-	-	0.15	0.41	-	-	-
3,7-Dimetil-3-oktanol	-	-	-	-	-	-	0.05	0.15	0.37
2-Pentantiyol	-	-	-	0.44	1.39	1.66	-	-	-
1,2-Ditiyan	-	-	-	0.69	0.50	-	-	-	-
Benzaldehit	-	0.04	-	0.11	-	0.24	0.41	0.82	1.59
1-Nonanol	-	-	-	-	0.20	0.37	-	-	-
Benzoksazol	-	-	-	-	-	-	0.94	2.61	3.98
3-Metiltiyo propan nitril	-	-	-	-	-	-	0.65	0.62	0.85
2-Etil benzenamin	-	-	0.04	-	0.10	-	-	-	-
1,2,3-Tritiyolan	-	-	-	0.10	0.16	0.15	-	-	-

(Soniclar uçucu bileşik pik alanı/internal standart pik alanı olarak verilmiştir.)



Şekil 4.21. a) *L. lactis* subsp. *cremoris* IP5'in triptofan katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Triptofanın katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler

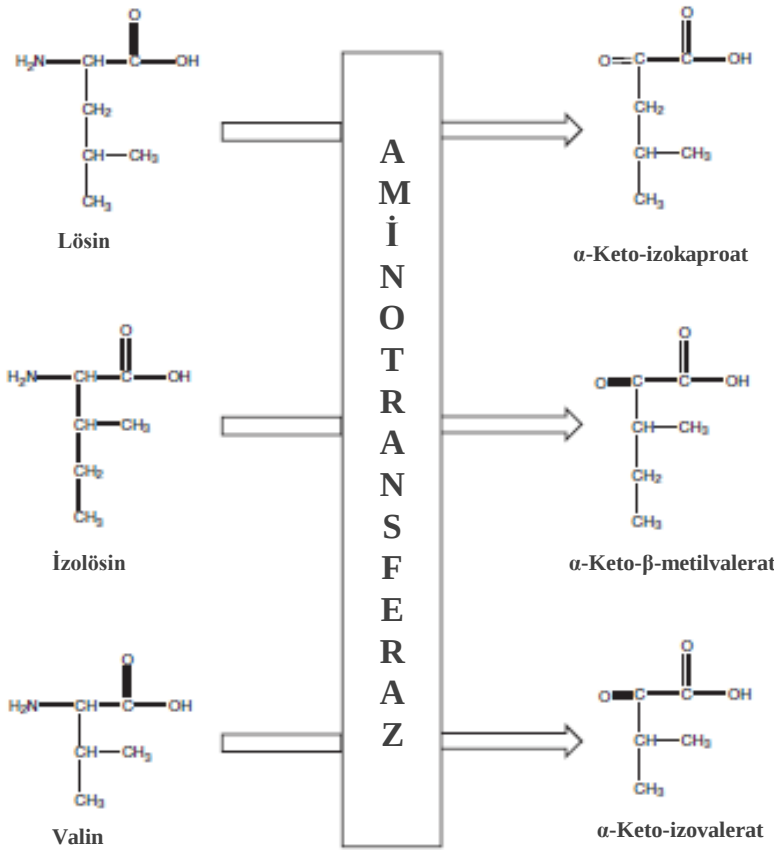


Şekil 4.22. a) *L. lactis* subsp. *cremoris* HP'nin triptofan katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Triptofanın katabolizması sonucu elde edilen ve ayırmada etkili olan uçucu bileşikler

Dallanmış zincirli aminoasitlerin katabolizması, çoğunlukla, *L. lactis*'te bir aminotransferaz tarafından başlatılmakta, lösin, izolösin ve valin sırasıyla, α -ketoizokaproat, α -keto- β -metilvalerat ve α -ketoizovalerata dönüştürülmektedir [124]. Dallanmış zincirli aminoasitlerin katabolizması, tipik olarak fermente süt ürünlerinin üretiminde, ürünün tat-kokusu üzerinde olumsuz bir etkiye sahip bileşiklerin üretilmesiyle ilişkilidir [149]. Dallanmış zincirli aminoasitlerin katabolizmasının ürünleri olan aldehytlerin ve alkollerin peynirde kusurlara neden olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda dallanmış zincirli aminoasitlerin katabolizması tarafından üretilen 18-90 ppm düzeyinde 3-metil bütanal ve 9-45 ppm düzeyinde 3-metil bütanol içeren peynirlerin, kontrol peynirlerine göre, tat-koku

kalitesi açısından daha düşük puan aldığı ve daha maltımsı bir aromaya sahip olduğu belirtilmiştir [150]. Buna ek olarak, buruk ve yavan olarak tanımlanan tat-koku ile 3-metil bütanal ve 2-metil propanal konsantrasyonlarının artışı arasında korelasyon olduğu saptanmıştır [128]. Emmental peynirinde, 3-metilbütanal yüksek konsantrasyonda bulunabilmekte ve tipik tat-kokuyu belirleyen bileşiklerden biri olmasa da bütirik asitin ter kokusuna benzeyen hoş olmayan kokusunu bastırmada rol oynayabildiği bildirilmiştir [151].

Dallanmış zincirli aminoasitler, aminotransferazlar tarafından ilgili α -keto asitlere indirgenmektedir (Şekil 4.23) [134]. *L. lactis* subsp. *cremoris* NCDO763'ün aminotransferazının, lösin üzerindeki aktivitesinin aromatik aminoasitler üzerindeki aktivitesine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir [55]. Dallanmış zincirli aminoasit aminotransferazı, *L. lactis* subsp. *cremoris* NCDO763'ten, Yvon ve ark. [152] tarafından karakterize edilmiştir. Bu enzim, üç farklı dallanmış zincirli aminoasidin transaminasyonunu katalize ettiği ve peynirin olgunlaşma koşulları altında aktif olduğu belirtilmiştir. Ancak, optimum çalışma pH'sı ve sıcaklığı sırasıyla, 7.5 ve 35-40 °C olarak belirlenmiştir. Bu aminotransferazın, izölösün ve valin degradasyonunda rolü olduğu gibi, lösin ve metiyoninin transaminasyonunda rol oynaması ve olgunlaşma süresince peynirin sahip olduğu koşullara benzer koşullar altında aktif olması nedeniyle, tat-koku gelişimine yüksek oranda katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır [152].



Şekil 4.23. Dallanmış zincire sahip aminoasitlerin ilgili α-keto asitlere transaminasyonu [134]

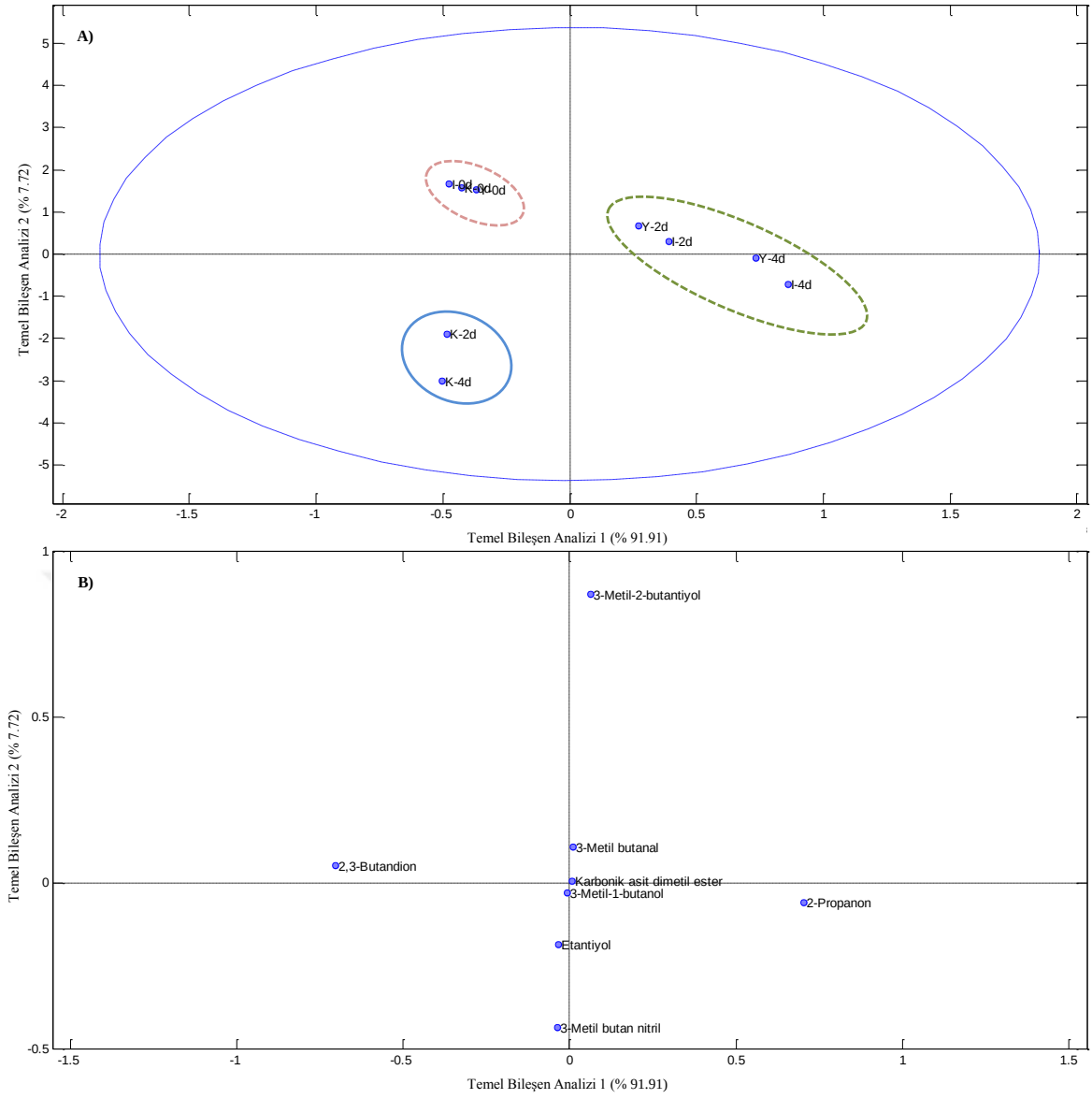
L. paracasei subsp. *paracasei* LC01'in, daha çok izolösin ve lösin üzerinde aktivite gösteren ve dallanmış zincirli aminoasitlerin transaminasyonunu katalizleyebilen en az bir aminotransferaz ürettiği bildirilmiştir. Cevap yüzeyi yöntemine göre, lösin konsantrasyonunun aminotransferaz aktivitesi üzerinde ihmal edilebilir bir etkiye sahip olduğu, buna karşın çok yüksek düzeylerdeki α-ketoglutarat konsantrasyonunun enzimi inhibe edebildiği gösterilmiştir [153].

Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28 ve Şekil 4.29'da sırasıyla, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41, *L. lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* 35-C-9, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459, *L. lactis* subsp. *cremoris* IP5 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* HP tarafından gerçekleştirilen lösin katabolizması sonucu üretilen uçucu bileşik verilerine uygulanan PCA görülmektedir. Buna göre yapılan her bir PCA'da örneklerin büyük bir kısmının redoks potansiyellerine ve inkübasyon göre birbirlerinden ayrıldığı belirlenmiştir. Lösin katabolizması sonucu diğer aminoasitlerden farklı olarak 3-metil bütanalın olduğu gözlenmiştir.

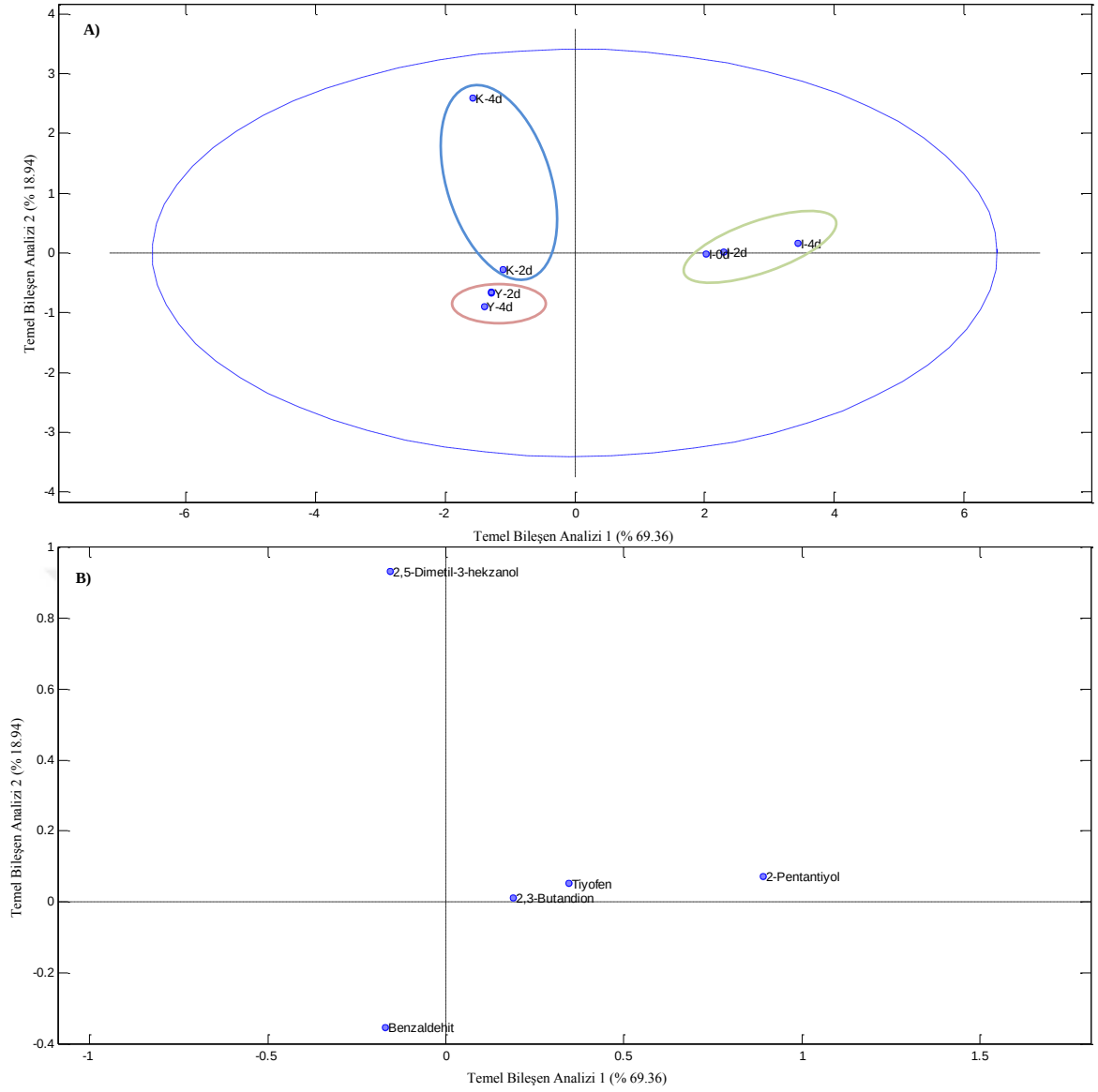
Çizelge 4.20. *L. lactis* subsp. *lactis* CM41'in lösin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşikler

Uçucu bileşik	Kontrol			İndirgenmiş			Yükseltgenmiş		
	0.gün	2.gün	4.gün	0.gün	2.gün	4.gün	0.gün	2.gün	4.gün
Etantiyol	-	-	-	0.10	0.34	0.22	-	-	-
2-Propanon	-	0.05	0.07	-	-	-	-	-	-
3-Metil bütanal	0.47	-	-	-	0.17	-	0.06	0.36	0.36
2,3-Bütandion	-	-	-	0.20	0.36	-	-	0.14	-
Tiyofen	-	-	-	0.09	0.14	-	-	-	-
Dimetil disülfid	-	0.11	0.06	-	-	-	-	-	-
3-Metil bütan nitril	-	-	-	-	-	-	0.37	0.37	0.77
3-Hidroksi 2-bütanon	-	-	-	-	-	-	-	0.14	-
3-Metil-2-bütantiyol	-	-	-	0.08	0.05	-	-	-	-
2,5-Dimetil-3-hekzanol	-	0.87	6.29	-	0.32	1.68	-	-	-
3,7-Dimetil-3-oktanol	-	-	-	-	0.19	-	-	0.09	0.22
2-Pentantiyol	-	-	-	0.35	1.05	0.42	-	-	-
Benzaldehit	-	-	-	0.11	0.17	0.06	0.21	0.96	1.91
Benzoik asit metil ester	-	-	0.55	-	-	-	-	-	-
Benzoksazol	-	-	-	-	-	-	0.05	0.14	-
3-Metiltiyo propan nitril	-	-	-	0.15	-	-	0.26	0.12	0.44
1,2,3-Tritiyolan	-	-	-	-	0.20	0.12	-	-	-

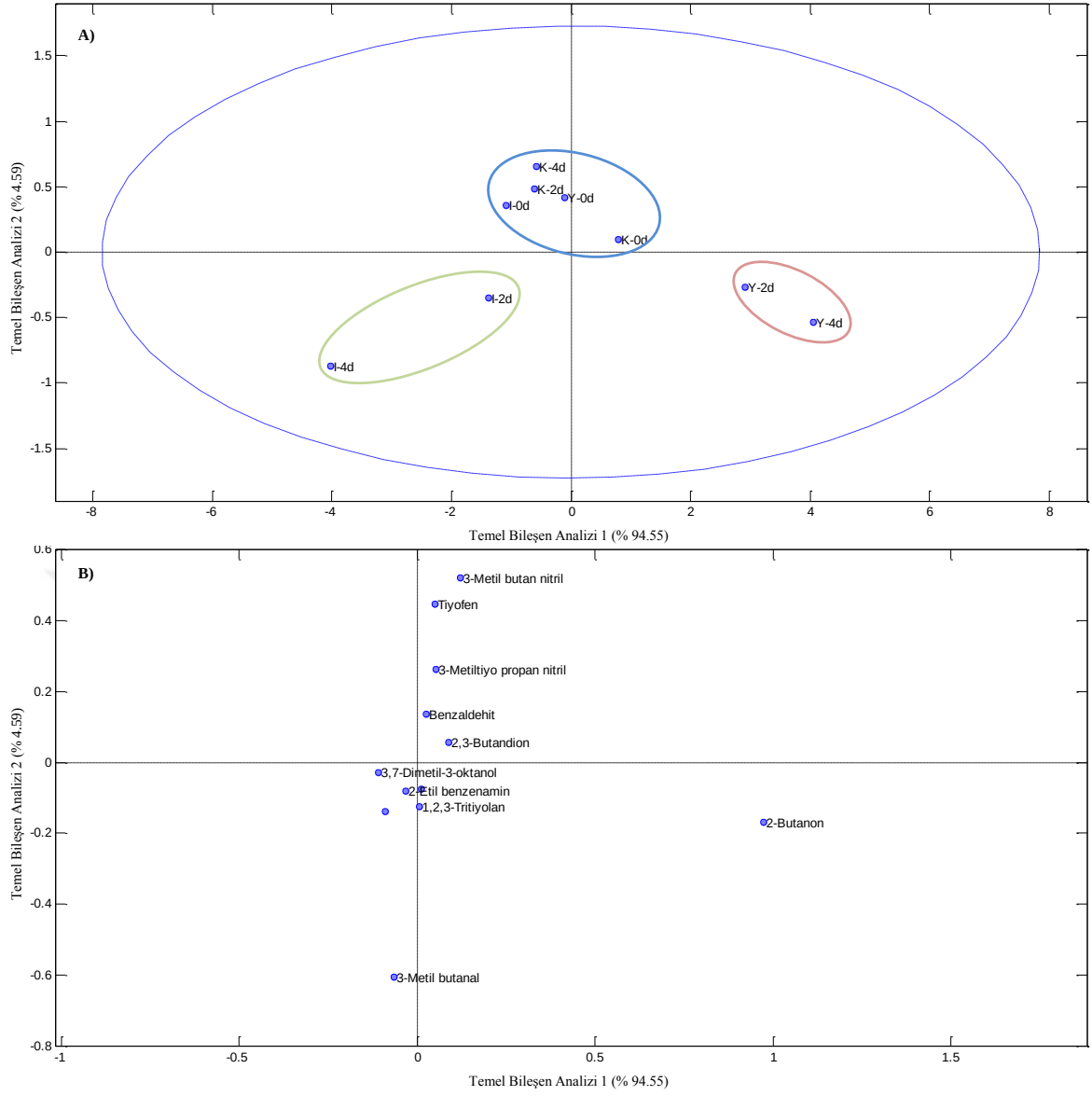
(Sonaçlar uçucu bileşik pik alanı/internal standart pik alanı olarak verilmiştir.)



Şekil 4.25. a) *L. lactis*'in lösin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Lösinin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırmada etkili olan uçucu bileşikler



Şekil 4.26. a) *L. lactis* subsp. *lactis* 35-C-9'un lösin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Lösinin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler

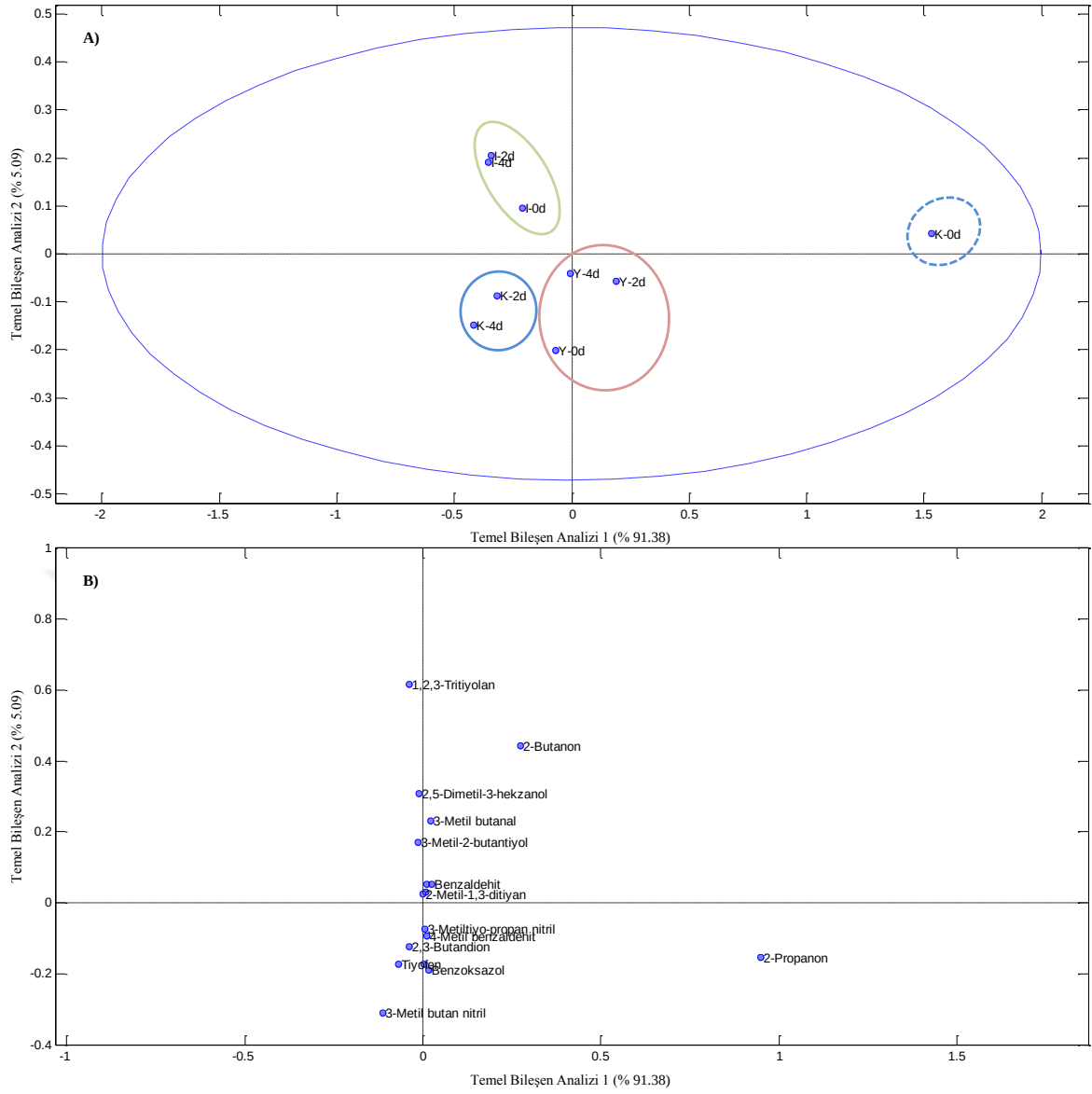


Şekil 4.27. a) *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459'un lösin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Lösinin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler

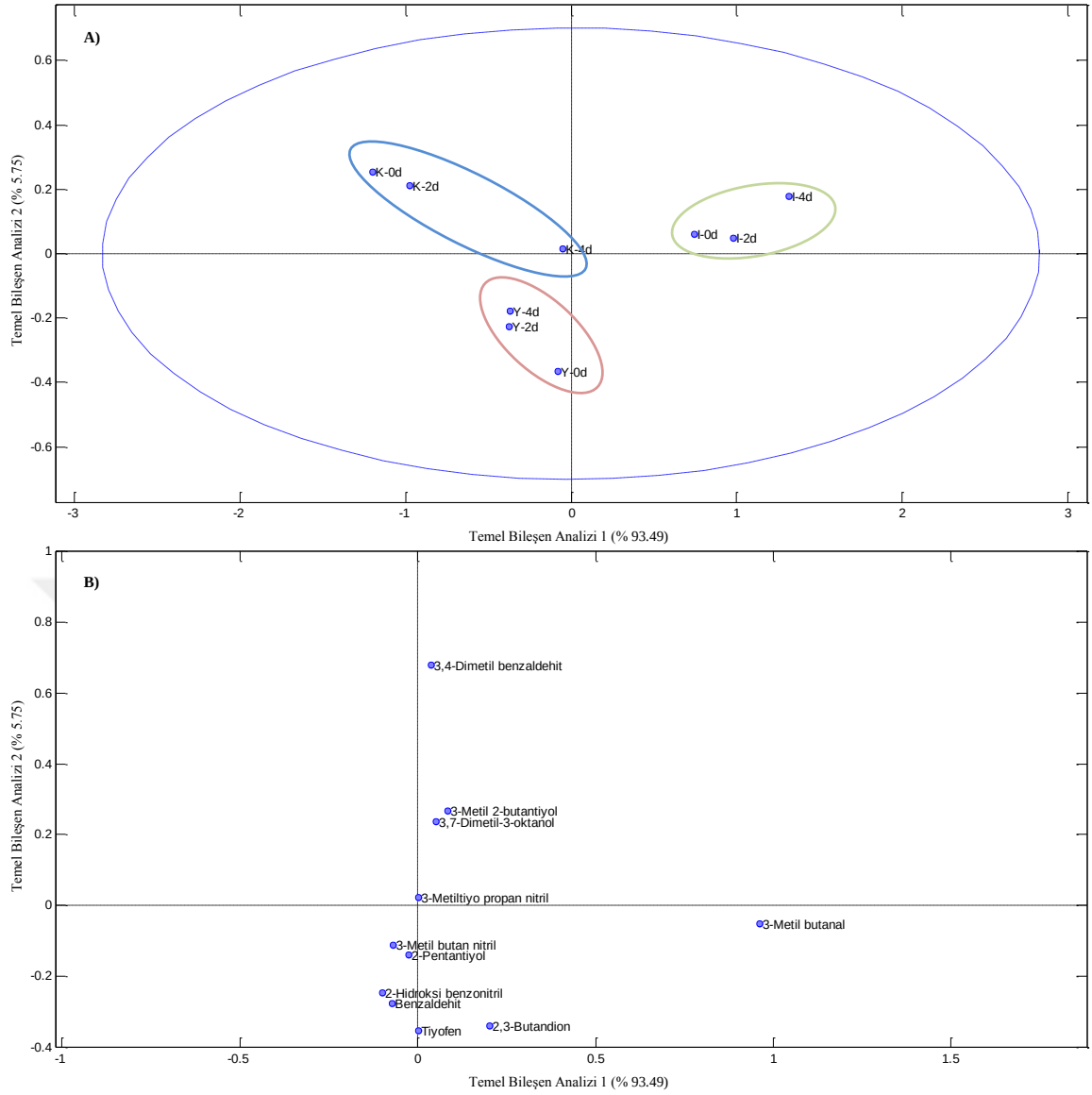
Çizelge 4.21. *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459'un lösin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşikler

Uçucu bileşik	Kontrol			İndirgenmiş			Yükseltgenmiş		
	0.gün	2.gün	4.gün	0.gün	2.gün	4.gün	0.gün	2.gün	4.gün
2-Bütanon	-	-	-	0.14	0.67	1.66	-	-	-
3-Metil bütanal	0.73	-	-	-	0.73	1.00	0.23	1.77	2.35
2,3-Bütandion	-	-	-	0.48	2.08	5.23	-	-	-
Tiyofen	-	-	-	0.38	0.58	0.88	-	-	-
3-Metil bütan nitril	-	-	-	-	-	-	1.00	2.40	3.22
2,5-Dimetil-3-hekzanol	-	-	1.03	-	-	-	-	-	-
3,7-Dimetil-3-oktanol	-	-	-	-	-	-	0.11	0.26	0.14
2-Pentantiyol	-	-	-	0.40	1.85	3.20	-	-	-
Benzaldehit	-	-	-	-	-	-	0.21	0.19	0.60
3-Metiltiyo propan nitril	-	-	-	-	-	-	0.23	0.08	0.25
2-Etil benzenamin	0.04	0.04	0.08	-	-	0.32	-	-	-
1,2,3-Tritiyolan	-	-	-	-	0.26	0.40	-	-	-

(Sonn lar uçucu bileşik pik alanı/internal standart pik alanı olarak verilmiştir.)



Şekil 4.28. a) *L. lactis* subsp. *cremoris* IP5'in lösün katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Lösünün katabolizması sonucu elde edilen ve ayırimda etkili olan uçucu bileşikler



Şekil 4.29. a) *L. lactis* subsp. *cremoris* HP'nin lösin katabolizması sonucu oluşan uçucu bileşiklere ait Temel Bileşen Analizi, b) Lösinin katabolizması sonucu elde edilen ve ayırmada etkili olan uçucu bileşikler

Yapılan benzer bir çalışmada, yükseltgenmiş ortamın malt, çiçek, meyve, badem ve lahana aromasından sorumlu olan aldehitlerin ve uçucu sülfür bileşiklerinin üretimine neden olduğu bildirilmiştir. Bu durumun, aminoasitlerin transaminasyonu yoluyla üretilen α -keto asitlerin kimyasal oksidasyonundan kaynaklandığı belirtilmiştir. İndirgenmiş ortamın ise, aşırı olgunlaşmış peynir aromasına katkıda bulunan fenil asetik, metiltiyo propiyonik ve izovalerik asit gibi karboksilik asitlerin üretimini teşvik ettiği tespit edilmiştir [39].

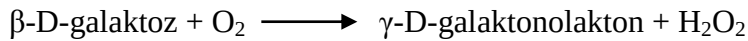
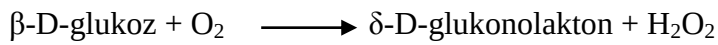
4.4 Peynirin Redoks Potansiyelinin Kontrolü İçin Kullanılacak Redoks Ajanlarının Belirlenmesi

4.4.1 Fermente Sütün Redoks Potansiyelinin Kontrol Altında Tutulması

Çalışmanın bu bölümünde, farklı indirgen ajanların ve yükseltgen ajanların farklı konsantrasyonlarının yağsız UHT sütün redoks potansiyeli ve pH'sı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ardından, bu redoks ajanlarının fermente yağsız sütün redoks potansiyeli ve pH'sı üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla redoks ajanlarını içeren sütlere *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu inoküle edilmiştir. Fermantasyon süresince (16-24 saat) redoks potansiyeli ve pH her 5 dakikada bir kaydedilmiştir.

Çalışmada, redoks potansiyeli (ORP) 168.6 mV ve pH'sı 6.68 olan yağsız UHT süt kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan indirgen ajanlar içinde sodyum hidrosülfid ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) ile en düşük redoks potansiyeli sağlanmıştır. Sodyum hidrosülfid % 0.01 oranında yağsız süte eklendiğinde redoks potansiyeli -518.6 mV olarak ölçülmüştür. Sodyum hidrosülfid ilavesinin sütün başlangıç pH'sını etkilemediği gözlenmiştir. Ditiyotritol ve sistein ilavesinin de sütün redoks potansiyelini düşürdüğü, ancak, sodyum hidrosülfid kadar indirgen olmadıkları belirlenmiştir. Ayrıca, sistein ilavesinin sütün pH'sını düşürdüğü tespit edilmiştir. Diğer bir indirgen ajan olan askorbik asit ise, sütün redoks potansiyelini negatif değerlere düşürememiş ve pH'nın düşmesine neden olmuştur.

Peynirde redoks potansiyeli heksoz oksidaz enzimi kullanılarak kontrol altına alınabileceği bildirilmiştir [154]. Sistemik adı D-heksoz:oksijen 1-oksidoredüktaz (EC 1.1.3.5) olan heksoz oksidaz monosakkaritlerin ve oligosakkaritlerin ilgili laktonlara dönüşümünü katalizlemektedir. Heksoz oksidaz tarafından katalizlenen reaksiyon aşağıda gösterilmiştir.



Heksoz oksidaz D-glukoz, D-galaktoz, ksiloz, arabinoz, sellobiyoz, laktoz, maltoz, maltotrioz ve maltotetraozu okside edebilmektedir. Heksoz oksidaz monosakkaritlere ve disakkaritlere karşı yüksek eğilim göstermektedir [155]. Heksoz oksidaz cottage peynir ve tofuda kullanıldığında, laktozun laktobiyonik asite yükseltgenmesi ürünlerin asitliğini artırmakta ve böylece pıhtı oluşumunu kolaylaştırmaktadır [154].

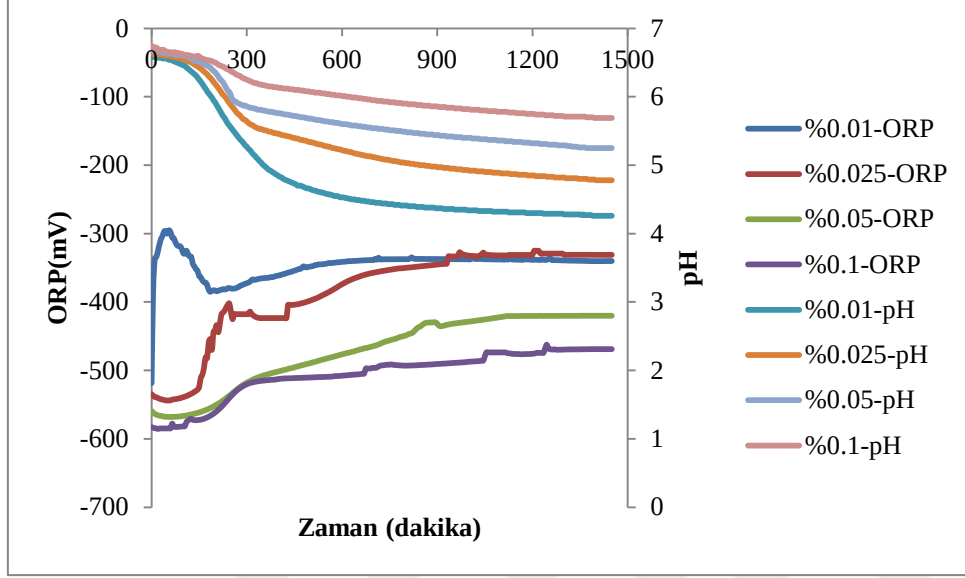
Çizelge 4.22. Redoks ajanlarının farklı konsantrasyonlarının yağsız sütün ve fermente sütün (*L. lactis* subsp. *lactis* CM41 ile) redoks potansiyeli ve pH'sı üzerindeki etkisi

	Konsant. (%a/h)	ORP (t _{ilk}) (mV)	ORP (t _{son}) (mV)	pH (t _{ilk})	pH (t _{son})
Yağsız UHT süt	Kontrol	168.6	-336.1	6.68	4.25
<i>İndirgen Ajanlar</i>					
Sodyum hidrosülfid (Na ₂ S ₂ O ₄)	0.01	-518.6	-340.1	6.65	4.26
	0.025	-534.7	-331.1	6.64	4.78
	0.05	-559.3	-420.1	6.69	5.25
	0.1	-582.9	-468.9	6.75	5.69
Ditiyotritol (DTT, C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	0.01	-122.6	-341.9	6.64	4.18
	0.05	-195.3	-341.2	6.65	4.16
	0.1	-227.4	-345.4	6.63	3.90
Sistein (C ₃ H ₇ NO ₂ S)	0.5	-192.8	-334.5	6.59	4.30
	1.0	-219.9	-326.4	6.45	4.26
	1.5	-235.7	-352.1	6.48	4.37
L-askorbik asit (C ₆ H ₈ O ₆)	0.05	21.6	-240.5	6.24	4.22
	0.1	21.0	-300.8	6.06	4.29
	0.5	38.1	-336.4	5.35	4.18
Heksoz oksidaz (CM41 ilavesiz)	0.025	171.3	-313.9	6.73	4.36
Heksoz oksidaz (CM41 ilaveli)	0.025	173.7	-329.2	6.75	4.22
<i>Yükseltgen ajanlar</i>					
Potasyum iyodat (KIO ₃)	0.05	218.2	139.4	6.68	4.86
	0.075	230.0	159.1	6.66	5.52
	0.1	245.6	205.8	6.66	5.62
Potasyum ferrisiyanit (K ₃ [Fe(CN) ₆])	0.05	239.6	-315.6	6.62	4.24
	0.1	289.9	-333.0	6.62	4.16
	0.5	331.0	-304.2	6.58	4.20

t_{ilk}:fermantasyon başlangıcı
değişmektedir.

t_{son}:fermantasyon sonu, fermentasyon süresi 16-24 saat arasında

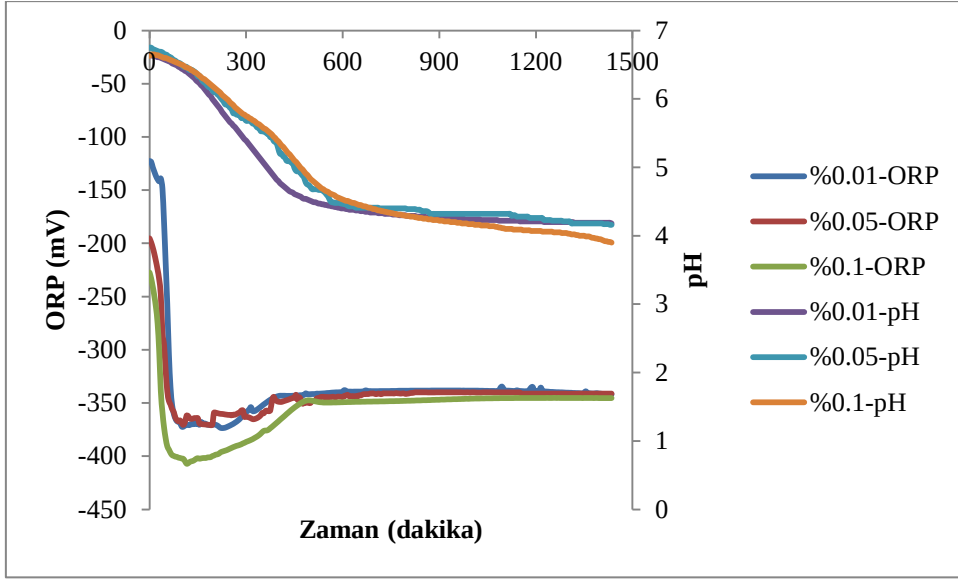
Yükseltgen ajan olarak kullanılan potasyum iyodat (KIO_3) % 0.05 oranında süte ilave edildiğinde sütün redoks potansiyelini 218.2 mV'ye ve potasyum ferrisiyanit ($K_3[Fe(CN)_6]$) % 0.05 oranında eklendiğinde ise sütün redoks potansiyelini 239.6 mV'ye yükseltmiştir. Ancak, potasyum iyodat sütün pH'sını etkilemezken, potasyum ferrisiyanit az da olsa sütün pH'sında bir düşüşe neden olmuştur (Çizelge 4.22).



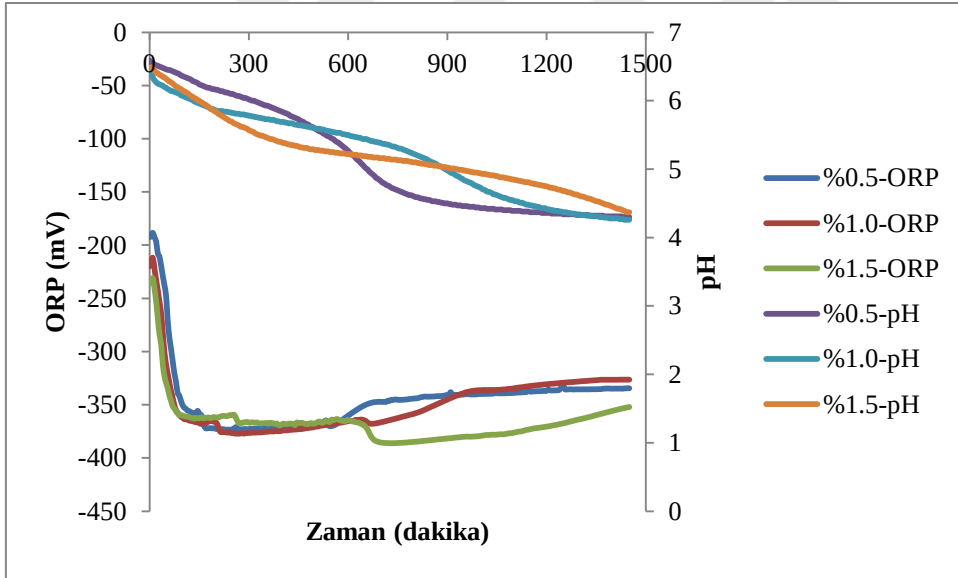
Şekil 4.30. Sodyum hidrosülfid'in farklı konsantrasyonlarının fermente sütün ORP ve pH'sı üzerine etkisi

Şekil 4.30'da, % 0.01, % 0.025, %0.05 ve % 0.1 konsantrasyonunda sodyum hidrosülfid'in süte ilavesinin *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşunun gerçekleştirdiği fermentasyon süresince redoks potansiyeli ve pH üzerindeki etkisi verilmiştir. Sodyum hidrosülfid %0.05 ve % 0.1 konsantrasyonunda süte ilave edildiğinde, fermentasyon sonunda redoks potansiyeli sırasıyla -420.1 ve -468.9 mV olarak belirlenmiştir. Ancak, bu konsantrasyonlarda pH'nın 5.0'in üzerinde kaldığı saptanmıştır. Bu nedenle, indirgenmiş redoks potansiyelini elde etmek ve aynı zamanda pH düşüşünü sağlamak için uygun sodyum hidrosülfid konsantrasyonunun % 0.01 olduğu belirlenmiştir.

İndirgen ajan olarak ditiyotritol (DTT) kullanıldığında ise çalışmada test edilen konsantrasyonları ile inkübasyon sonunda, birbirine yakın redoks potansiyellerine ulaşıldığı gözlenmiştir. DTT'nin sütün redoks potansiyelini negatif değerlere düşürmesinin ve bu noktada redoks potansiyelinin stabil olarak kalmasını sağlamasının yanında pH düşüşüne de engel olmadığı belirlenmiştir. Ancak, bu bileşiğin ağır bir kükürt kokusuna sahip olması nedeniyle peynir üretiminde kullanılmamasına karar verilmiştir.

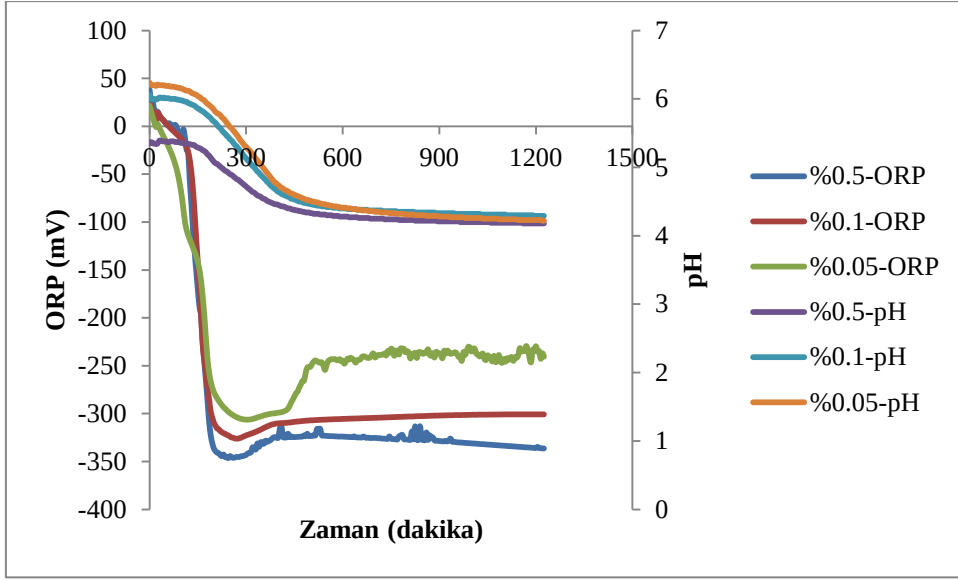


Şekil 4.31. Ditiyotreitölün (DTT) farklı konsantrasyonlarının fermente sütün ORP ve pH'sı üzerine etkisi



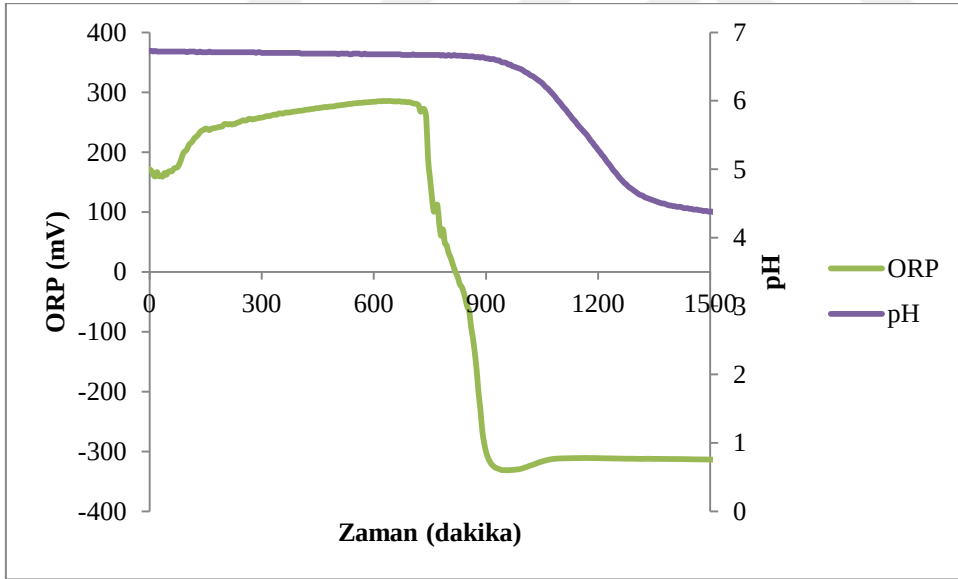
Şekil 4.32. Sisteinin farklı konsantrasyonlarının fermente sütün ORP ve pH'sı üzerine etkisi

Diğer bir indirgen ajan olan sisteinin, sodyum hidrosülfid kadar yüksek bir indirgen aktiviteye sahip olmaması ve sütün başlangıç pH'sını düşürmesi nedeniyle peynir üretiminde kullanılamayacağına karar verilmiştir.



Şekil 4.33. Askorbik asitin farklı konsantrasyonlarının fermente sütün ORP ve pH'sı üzerine etkisi

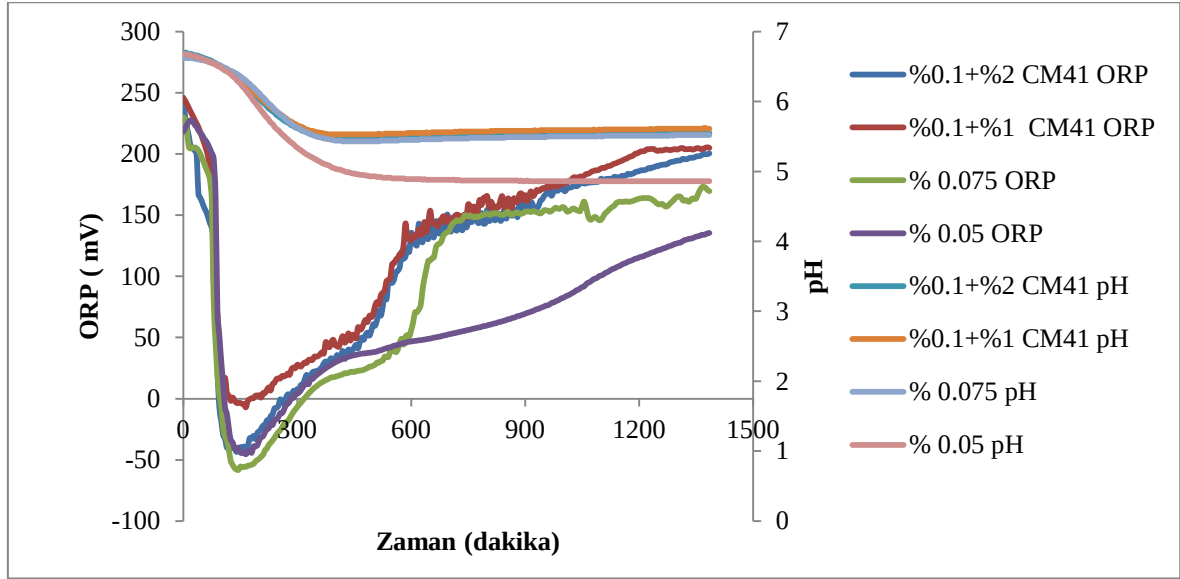
Askorbik asit sütün başlangıç redoks potansiyelini negatif değerlere düşürememiş ve ayrıca, başlangıç pH'sının düşmesine neden olmuştur.



Şekil 4.34. Heksoz oksidazın (% 0.025, %a/h) sütün ORP ve pH'sı üzerine etkisi

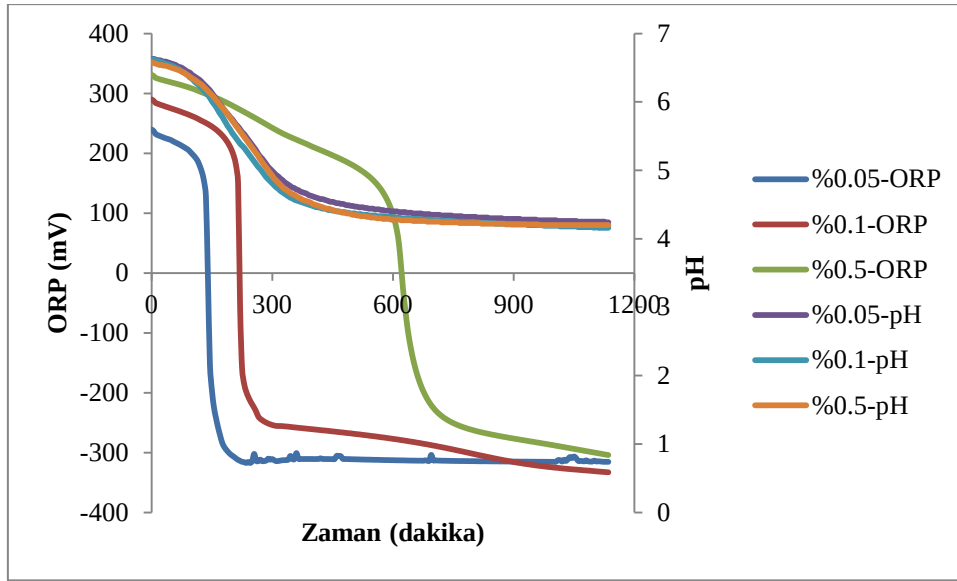
Heksoz oksidaz, kültür inokülasyonu gerçekleştirilmeden süte % 0.025 konsantrasyonunda ilave edildiğinde, inkübasyonun yaklaşık 16. saatinden sonra pH düşüşü başlamış ve 4.36'ya kadar düşmüştür. pH düşüşünün gecikmesinin nedeninin, heksoz oksidaz katalizörlüğünde laktozdan laktobiyono- δ -laktonun oluşması [156] ve ardından bunun sütte (sulu sistem) laktobiyonik asite hidrolize olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Ayrıca, redoks potansiyeli eğrisi incelendiğinde laktobiyonik asitin oluşumuna bağlı olarak redoks potansiyelinin 700. dakika itibariyle hızla düştüğü belirlenmiştir (Şekil 4.34).



Şekil 4.35. Potasyum iyodatın farklı konsantrasyonlarının fermente sütün ORP ve pH'sı üzerine etkisi

Potasyum iyodat içeren süte, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu inoküle edildikten sonra redoks potansiyelinin hızla -50 mV civarına düştüğü ve inkübasyonun yaklaşık 150. dakikasından itibaren redoks potansiyelini artmaya başladığı gözlenmiştir. İnkübasyon sonunda ise, potasyum iyodatın fermente sütün redoks potansiyelini pozitif değerlerde tutmayı başardığı belirlenmiştir. Bu nedenle, yükseltgenmiş ortam oluşturmak için potasyum iyodatın uygun bir yükseltgen ajan olduğu düşünülmektedir. Ancak, potasyum iyodat süte % 0.075 ve % 0.1 konsantrasyonunda ilave edildiğinde pH'nın 5.0'in altına düşmediği tespit edilmiştir. Potasyum iyodat denemesinde, kullanılan konsantrasyonların içinde % 0.05'in hem pozitif redoks potansiyeli elde etmek için hem de sütün pH'sının 5.0'in altına düşmesi için uygun olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.36. Potasyum ferrisiyanit'in farklı konsantrasyonlarının fermente sütün ORP ve pH'sı üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan diğer yükseltgen ajan olan potasyum ferrisiyanit süte eklendiğinde başlangıç redoks potansiyelini yükseltmiştir. Ancak, fermantasyon başladıktan sonra redoks potansiyeli hızla düşmüş ve inkübasyon sonunda yaklaşık -300 mV olmuştur. Potasyum ferrisiyanit'in konsantrasyonunun artması sadece redoks potansiyelinin düşüşünü geciktirmiş, inkübasyon sonunda ulaştığı değeri etkilememiştir. Bu nedenle, peynir üretimi yükseltgen ajan olarak kullanılamayacağına karar verilmiştir. Ayrıca, potasyum ferrisiyanit ile yapılan çalışmalarda, bu bileşiğin redoks elektrotlarına zarar verdiği belirlenmiştir.

4.4.2 Fermente Yağı Azaltılmış UF Sütün Redoks Potansiyelinin Kontrol Altında Tutulması

Bölüm 4.4.1'den elde edilen veriler ışığında çalışmanın devamında indirgen ajan olarak sodyum hidrosülfid ve yükseltgen ajan olarak potasyum iyodatın kullanılmasına karar verilmiştir. Çalışmanın bu bölümünde, bu redoks ajanların farklı konsantrasyonlarının, yağı azaltılmış UF süte *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 veya *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşunun inokülasyonunun ardından redoks potansiyeli ve pH'sı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Fermantasyon süresince (16-24 saat) redoks potansiyeli ve pH her 5 dakikada bir kaydedilmiştir. Çizelge 4.23 ve Çizelge 4.24 incelendiğinde, % 0.01 oranında sodyum hidrosülfid içeren yağı azaltılmış UF sütün redoks potansiyelinin, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşlarının inokülasyonundan hemen sonra sırasıyla, -314.2 ve -370.9 mV olduğu görülmektedir. Ayrıca, sodyum hidrosülfid konsantrasyonu arttıkça, beklenildiği gibi redoks potansiyelinin de daha düşük değerlere

ulaştığı gözlenmiştir. Ancak, bu redoks ajanının konsantrasyonunun artması pH düşüşünü olumsuz etkilemesinin yanı sıra, kullanılan starter kültürlerin canlılığını da olumsuz etkilemektedir. Ayrıca, yağı azaltılmış UF süt ve tam yağlı UF süt ile gerçekleştirilen peynir üretimi denemelerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir (veriler verilmemiştir). Bu etmenler göz önünde bulundurularak, peynir üretiminde indirgen ajan olarak kullanılan sodyum hidrosülfidin % 0.01 (a/a) oranında UF süte ilave edilmesine karar verilmiştir.

Yükseltgen ajan olarak kullanılan potasyum iyodatın fermente UF sütün redoks potansiyelini başarılı bir şekilde pozitif değerlerde tuttuğu belirlenmiştir. Ancak, potasyum iyodatın dezavantajı fermente sütün pH'sının düşmesine engel olmasıdır. Çizelge 4.23 incelendiğinde, kullanılan diğer konsantrasyonlara göre uygun pH düşüşünün sağlandığı, % 0.025 potasyum iyodat içeren yağı azaltılmış UF sütün redoks potansiyelinin başlangıçta 220.1 mV iken, inkübasyon sonunda -39.9 mV'ye düştüğü görülmektedir. % 0.04 ve % 0.05 oranında potasyum iyodatın pH'nın 5'in altına düşmesine engel olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, hem peynir üretimi ve olgunlaşma süresince redoks potansiyelini pozitif değerlerde tutmak hem de peynir üretimi sırasında yeterli pH düşüşünü sağlamak için potasyum iyodat ilavesinin iki aşamada gerçekleştirilmesine karar verilmiştir. Bu amaçla, potasyum iyodat, peynir üretiminde kullanılacak olan tam yağlı UF süte başlangıçta % 0.025 (a/a) oranında ve ardından, yeterli pH düşüşü sağlandıktan sonra peynirlere tuz ilavesi sırasında tuz ile birlikte % 0.025 (a/a) oranında ilave edilmiştir. Sonuç olarak, son ürün % 0.05 (a/a) oranında potasyum iyodat içermektedir.

Çizelge 4.23. Redoks ajanlarının farklı konsantrasyonlarının yağı azaltılmış UF sütün ve yağı azaltılmış UF fermente sütün (*L. lactis* subsp. *lactis* CM41 ile) redoks potansiyeli ve pH'sı üzerindeki etkisi

	Konsant. (%a/h)	Kültür (%v/w)	ORP (t _{ilk}) (mV)	ORP (t _{son}) (mV)	pH (t _{ilk})	pH (t _{son})	log KOB/mL ^a
UF süt	Kontrol	1	128.6	-344.2	6.52	4.77	9.66
<u>İndirgen Ajan</u>							
Sodyum hidrosülfid (Na ₂ S ₂ O ₄)	0.01	3	-314.2	-397.7	6.48	4.87	9.32
	0.025	3	-400.9	-356.9	6.47	4.89	8.93
	0.05	3	-526.5	-372.9	6.51	5.05	8.09
<u>Yükseltgen ajan</u>							
Potasyum iyodat (KIO ₃)	0.025	3	220.1	-39.9	6.47	4.89	9.19
	0.05	3	245.6	45.3	6.46	5.05	9.05
	0.05	1	280.3	73.5	6.48	5.08	9.06

^aCanlı laktokok sayısı (t_{son}), t_{ilk}:fermantasyon başlangıcı t_{son}:fermantasyon sonu

Çizelge 4.24. Redoks ajanlarının farklı konsantrasyonlarının yağı azaltılmış UF sütün ve yağı azaltılmış UF fermente sütün (*L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 ile) redoks potansiyeli ve pH'sı üzerindeki etkisi

	Konsant. (%a/h)	Kültür (%v/w)	ORP (t _{ilk}) (mV)	ORP (t _{son}) (mV)	pH (t _{ilk})	pH (t _{son})	log KOB/mL ^a
UF süt	Kontrol	1	121.8	-356.7	6.47	4.80	9.29
<u>İndirgen Ajan</u>							
Sodyum hidrosülfid (Na ₂ S ₂ O ₄)	0.01	3	-370.9	-474.8	6.46	4.73	9.06
	0.025	3	-436.1	-383.0	6.52	4.84	8.80
	0.05	3	-566.6	-509.0	6.45	6.31	8.04
<u>Yükseltgen ajan</u>							
Potasyum iyodat (KIO ₃)	0.04	3	206.2	8.7	6.49	4.98	8.70
	0.05	3	232.1	35.6	6.49	5.01	8.56

^aCanlı laktokok sayısı (t_{son}), t_{ilk}:fermantasyon başlangıcı t_{son}:fermantasyon sonu

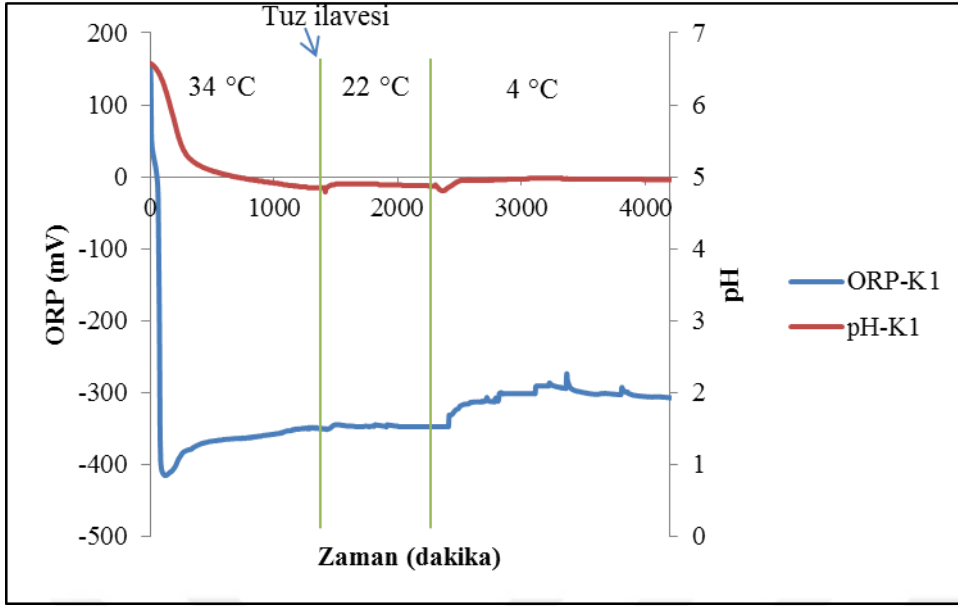
4.5 UF Peynir Üretimi Boyunca Redoks Potansiyeli ve pH Değişiminin Belirlenmesi

UF peynir üretiminde starter kültür olarak *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 saf kültürlerinin kullanımına karar verilmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan altı farklı laktokok suşunun arasından bu iki suşun peynir üretiminde starter olarak seçilmesi, asidifikasyon aktiviteleri, sütü indirgeme kapasiteleri, sütün

fermantasyonu süresince gelişimleri ve canlılıkları, kullanılan redoks ajanlarına karşı dirençleri ve aminoasit katabolizması sonucu üretilen uçucu bileşikler göz önünde bulundurularak gerçekleştirilmiştir. Sodyum hidrosülfidin indirgenmiş peynir (İ1 ve İ2) üretiminde kullanılması ile birlikte kontrol peynirinden (K1 ve K2) farklı olarak, üretimin başlangıcından itibaren indirgenmiş koşullar oluşturulmuştur. Yükseltgenmiş peynir (Y1 ve Y2) üretiminde ise potasyum iyodatın kullanılmasıyla üretimin başlangıcından olgunlaşma periyodunun sonuna kadar yükseltgenmiş koşullar oluşturulmuştur.

Bu çalışma kapsamında, hem *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 hem de *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu kullanılarak kontrol, indirgenmiş ve yükseltgenmiş UF peynir üretimi süresince redoks potansiyeli ve pH'da meydana gelen değişimler ölçülmüştür. Ancak, burada sadece *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu kullanılarak üretilen peynirlere ait bulgular verilmiştir. Şekil 4.37, Şekil 4.38 ve Şekil 4.39'da sırasıyla, kontrol, indirgenmiş ve yükseltgenmiş peynirlerin üretimi süresince redoks potansiyeli (ORP, mV) ve pH değişimi verilmiştir. Çalışmada kullanılan pastörize UF sütün başlangıç redoks potansiyeli 146.9 ± 8.3 mV ve pH'sı 6.5 ± 0.1 olarak ölçülmüştür.

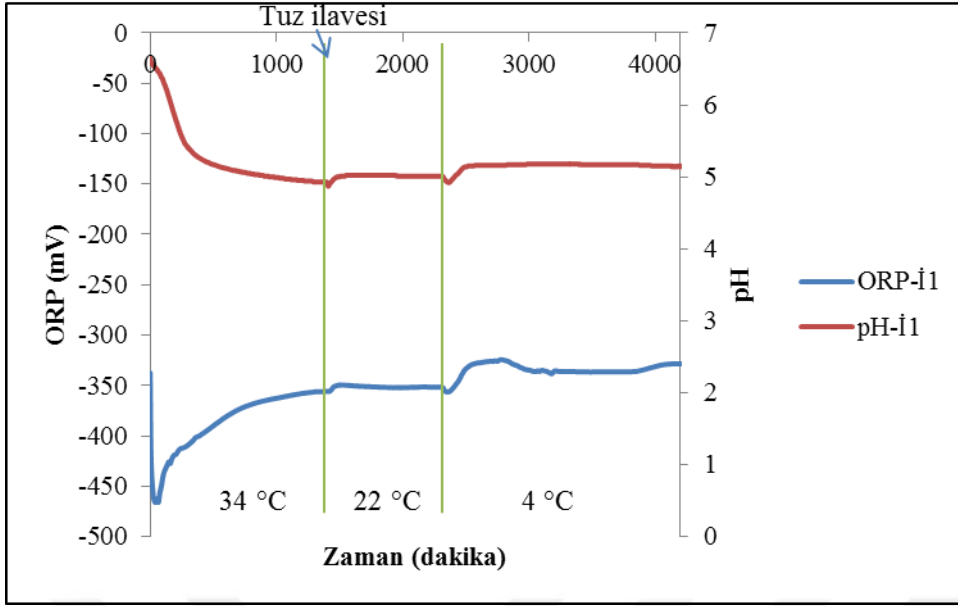
Şekil 4.37 incelendiğinde, kontrol peynirinin üretiminde starter ve rennet inokülasyonu yapıldıktan sonra redoks potansiyelinin hızla, yaklaşık 150 mV'den -400 mV'nin altına düştüğü görülmektedir. Bu hızlı düşüşün nedeni, starter kültür aktivitesine bağlı olarak sütün indirgenmesidir. Yapılan bir çalışmada, sütün indirgenmesinde etkili olan birinci mekanizmanın NADH oksidaz tarafından, ortamdaki çözünmüş oksijenin kullanılması olduğu, ikinci mekanizmanın ise oksijenden bağımsız olduğu ve oksijen dışındaki yükseltgen bileşiklerin ETS tarafından indirgendiği belirlenmiştir [35]. Ayrıca, *L. lactis*'in hücre yüzeyinde bulunan ekzoproteinlerin (membran proteinleri veya hücre duvarı proteinleri gibi) redoks potansiyelinin düşmesinde rol oynadığı ileri sürülmüştür [63]. Yapılan bir başka çalışmada, laktik asit bakterilerinin indirgeme kapasitelerinin, gelişimleri süresince üretilen indirgen moleküllerden kaynaklandığı belirtilmiştir [37].



Şekil 4.37. Laboratuvar ölçekli UF peynir üretimi süresince redoks potansiyeli (ORP, mV) ve pH'nın değişimi (Kontrol peyniri, K1)

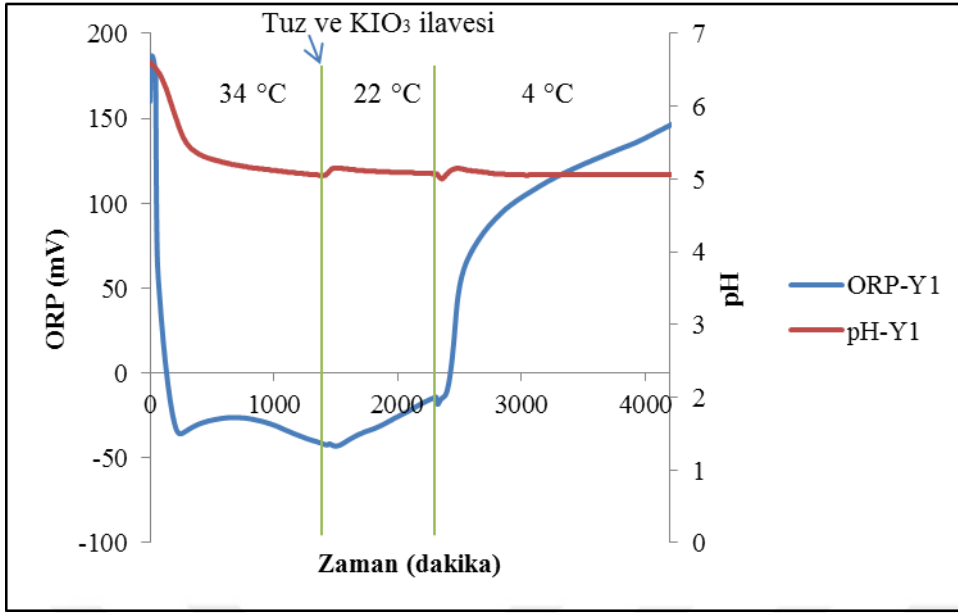
Ardından, redoks potansiyelinin bu noktadan sonra yavaşça tekrar yükselmeye başladığı ve yaklaşık -380 mV'ye ulaştığı gözlenmiştir. Bu durumun, pH'nın düşmesinden ve redoks potansiyelinin pH'ya bağlılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Daha sonra redoks potansiyelinde meydana gelen düşük düzeydeki artışların, sıcaklığın değiştirilmesine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir.

İndirgenmiş peynir üretiminde kullanılan UF süte başlangıçta % 0.01 (a/a) oranında sodyum hidrosülfid ilave edilmiş ve başlangıç redoks potansiyeli -337 mV olarak ölçülmüştür. Fermantasyon başladıktan sonra kontrol peynirinin üretiminde olduğu gibi, redoks potansiyelinde hızlı bir düşüş meydana gelmiştir (Şekil 4.38). Ancak, kontrol peynirinin üretiminde başlangıçta yaklaşık 550 mV'lik bir düşüş meydana gelirken, indirgenmiş peynir üretiminde yaklaşık 150 mV'lik bir düşüşün söz konusu olduğu belirlenmiştir. Bu durumun, sütün poising kapasitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Poising kapasitesinin, sistemde bulunan redoks çiftlerinin toplam konsantrasyonuna ve indirgenmiş ve yükseltgenmiş bileşiklerin konsantrasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir [15, 16, 67]. Ayrıca, pH düşüşünün, kontrol peyniri üretimi sırasında oluşan pH düşüşüne göre daha yavaş gerçekleştiği gözlenmiştir. Bu durumun olası nedenine Bölüm 4.6.6'da değinilmiştir.



Şekil 4.38. Laboratuvar ölçekli indirgenmiş UF peynir üretimi süresince redoks potansiyeli (ORP, mV) ve pH'nın değişimi (İndirgenmiş peynir, İ1)

Şekil 4.39'da yükseltgenmiş peynir üretimi sırasında redoks potansiyeli ve pH'da meydana gelen değişim görülmektedir. Yükseltgenmiş peynir üretiminde UF süte başlangıçta % 0.025 (a/a) oranında potasyum iyodat ilave edilmiştir. Ardından, starter kültür ve rennet inokülasyonu yapılmıştır. Kontrol ve indirgenmiş peynirlerin üretiminden farklı olarak tuz ile birlikte % 0.025 (a/a) potasyum iyodat ilavesi tekrar yapılmıştır. Böylece, pozitif redoks potansiyeline sahip peynir elde edilmiştir. Fermantasyonun başlaması ile birlikte, ortamda bulunan yükseltgen ajana rağmen redoks potansiyeli düşmüş ve yaklaşık -35 mV'ye ulaşmıştır. Daha sonra tuz ile birlikte yapılan ikinci yükseltgen ajan ilavesi sayesinde redoks potansiyeli tekrar artmaya başlamış ve inkübasyon sonunda yaklaşık 148 mV'ye ulaşmıştır. Yükseltgenmiş peynir üretiminde de, pH düşünün kontrol peynirinde olduğu gibi hızlı gerçekleşmediği belirlenmiştir.



Şekil 4.39. Laboratuvar ölçekli yükseltgenmiş UF peynir üretimi süresince redoks potansiyeli (ORP, mV) ve pH'nın değişimi (Yükseltgenmiş peynir, Y1)

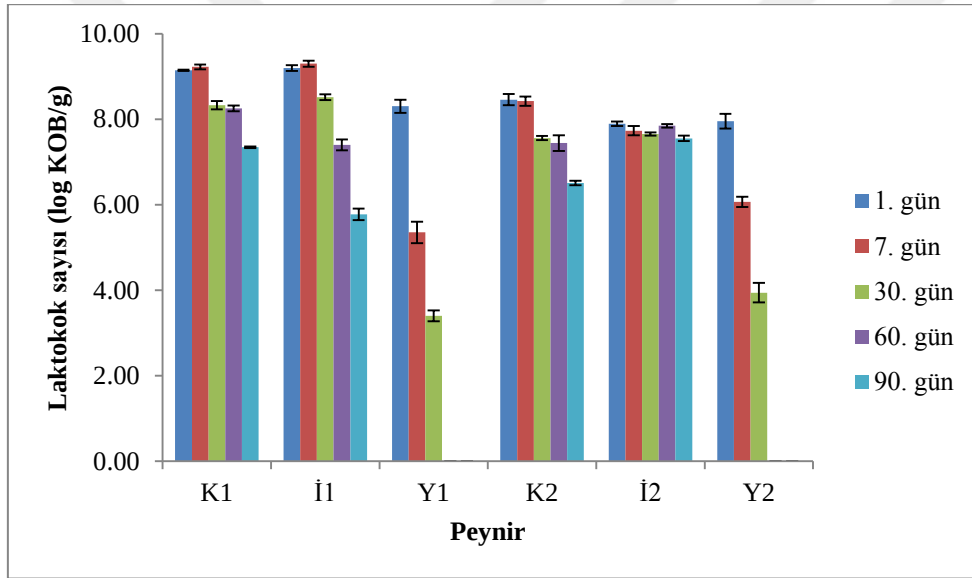
Ayrıca, bu çalışmada, tuz ilavesinin peynirin redoks potansiyelini önemli düzeyde etkilemediği saptanmıştır. *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle, burada o çalışmaya ait sonuçlar verilmemiştir. Bu çalışmada, elde edilen bir diğer önemli bulgu ise, tam yağlı ve yağı azaltılmış UF sütün redoks potansiyelinin farklı olmasıdır. Bir önceki çalışmada kullanılan yağı azaltılmış UF sütün redoks potansiyelinin ortalama 125.2 ± 4.8 mV olduğu saptanmıştır. Peynir üretiminde kullanılan tam yağlı UF sütün redoks potansiyelinin ise 146.9 ± 8.3 mV olduğu belirlenmiştir. Buna göre, UF sütün yağ içeriğinin artmasına bağlı olarak redoks potansiyelinin de arttığı söylenebilir. Benzer şekilde, Pastushenko ve ark.'nın [86] yaptığı çalışmada, redoks potansiyelinin sütün yağ içeriği ile birlikte arttığı bildirilmiştir. Schreyer ve ark. [69], süt yağının, elektrotların yüzeyinin bir yağ tabakasıyla kaplanmasına neden olabileceği ve buna bağlı olarak, ölçülen redoks değerini değiştirmiş olabileceğini ileri sürmüştür.

4.6 Redoks Potansiyelinin UF Peynirin Olgunlaşma Karakteristikleri Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

4.6.1 Mikrobiyolojik Analizler

Olgunlaşma süresince laktokokların canlılığında meydana gelen değişimler Şekil 4.40'da verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, örnekler arasındaki farklılığın önemli olduğu ($P < 0.05$), sadece K2 ve İ2 peynirleri arasındaki farklılığın önemli olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, olgunlaşma süresinin laktokokların canlılığı üzerindeki etkisinin

istatistiksel açıdan önemli olduğu bulunmuştur ($P<0.05$). Genel olarak, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşunun starter olarak kullanıldığı K1 ve İ1 peynirlerindeki laktokok sayısının, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşunun starter olarak kullanıldığı K2 ve İ2 peynirlerine göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Olgunlaşmanın 90. gününde, İ1 peynirindeki laktokok koloni sayısının İ2 peynirindeki ve kontrol peynirlerindeki (K1 ve K2) laktokok koloni sayısına göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşlarının sodyum hidrosülfite karşı dayanıklılıklarının farklı olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). Yapılan bir çalışmada, sistein ilavesi ile üretilen yoğurtta bulunan *S. thermophilus*'un canlılığının sisteinden olumsuz etkilendiği, ancak, *L. acidophilus*'un sayısının, daha yüksek konsantrasyonda sistein içeren yoğurtlarda dahi üretim ve depolama süresince yüksek olduğu bildirilmiştir [73].



Şekil 4.40. Peynir örneklerinde bulunan laktokokların canlılığının (log KOB/g) olgunlaşma süresince değişimi

Potasyum iyodatın yükseltgen ajan olarak kullanıldığı (% 0.05 oranında) Y1 ve Y2 peynirlerinde, olgunlaşmanın 60. günü itibariyle laktokok saptanamamıştır. Olgunlaşmanın ilerlemesiyle birlikte, starter kültürlerin potasyum iyodata olan toleransının azaldığı düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, % 1 oranında potasyum iyodat kullanılarak üretilen Cheddar peynirinde olgunlaşma süresince canlı starter laktik asit bakterilerine rastlanmadığı ancak, % 0.1 ve % 0.05 oranında potasyum iyodat içeren Cheddar peynirlerinde starter laktik asit bakterilerinin olgunlaşma süresince canlılıklarını sürdürdüğü ve canlılıklarında meydana gelen düşüşün kontrol peynirindekine benzer bir trende sahip olduğu bildirilmiştir [32]. Bu çalışma kapsamında % 0.05 oranında potasyum

iyodat kullanılarak üretilen UF peynirlerde (Y1 ve Y2) 60. gün itibariyle laktokokların tamamının canlılığını yitirmesine rağmen, aynı konsantrasyonda potasyum iyodat kullanılarak üretilen Cheddar peynirinde olgunlaşma süresince starter laktokok sayısının yaklaşık 6 log (KOB/g) 'nin üzerinde olmasının nedeninin potasyum iyodatın her iki peynirin üretimi sırasında farklı basamaklarda ilave edilmesinden ve peynir türlerinin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Caldeo ve ark. [32] potasyum iyodatu Cheddar peynirinin tuzlanması aşamasında ilave etmişlerdir. Bu nedenle, peynir matriksinin starter kültürler için potasyum iyodatın kullanılan konsantrasyonuna karşı koruyucu bir bariyer görevi gördüğü düşünülmektedir. Buna karşın, UF peyniri üretiminde potasyum iyodatın yarısı başlangıçta UF süte, diğer yarısı ise tuz ile birlikte peynire eklenmiştir. Potasyum iyodatın UF peynir kalıbı içinde yüksek nem içeriğinin de yardımı ile homojen dağılımı, Cheddar peynirine göre daha muhtemel olması nedeniyle, UF peynir üretiminde kullanılan starter kültürler bu redoks ajanından muhtemelen olumsuz etkilenmişlerdir.

Ayrıca, olgunlaşma süresince peynir örneklerinde starter olmayan laktik asit bakterilerine ve koliform grubu bakterilere rastlanmamıştır.

4.6.2 Bileşim Analizleri

Çalışmada üretilen UF peynirlerin bileşim özellikleri ve pH'sı Çizelge 4.25'de ve peynirlerde meydana gelen peyniraltı suyu ayrımında ve titrasyon asitliğinde olgunlaşma süresince meydana gelen değişimler, sırasıyla Şekil 4.41 ve Şekil 4.42'de verilmiştir. Peynirlerin % kurumadde değerlerinin istatistiksel açıdan birbirinden farklı olduğu ($P<0.05$) ve olgunlaşma süresinin kurumadde değerleri üzerindeki etkisinin önemli olduğu ($P<0.05$) belirlenmiştir. Özellikle, olgunlaşma süresince pH'sı diğer peynirlere göre yüksek olan Y1, İ2 ve Y2 peynirlerinin kurumadde değerlerinin diğer peynirlere göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Peynirin pH'sı, peynirin nem içeriğini kontrol eden ve böylece, bakterilerin gelişimini ve peynirdeki enzimlerin aktivitesini düzenleyen jel sineresisini etkilemektedir [157].

Peynir örneklerinin % protein değerleri incelendiğinde ise, üretimin ve olgunlaşma süresinin ayrı ayrı etkilerinin istatistiksel açıdan önemli olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, üretimin ve olgunlaşma süresinin % kurumaddede tuz değerleri üzerindeki etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir. Peynir örneklerinin % kurumaddede yağ değerleri istatistiksel açıdan karşılaştırıldığında,

olgunlaşmanın 7. ve 60. günlerinde peynir örnekleri arasındaki farklılığın önemli olmadığı belirlenmiştir. Olgunlaşmanın 30. gününde ise sadece K1 peynirinin % kurumaddede yağ değerinin diğer peynirlerden farklı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, olgunlaşma süresinin etkisinin önemli olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.25. Olgunlaşma süresince peynirlerin bileşim özellikleri ve pH'ları

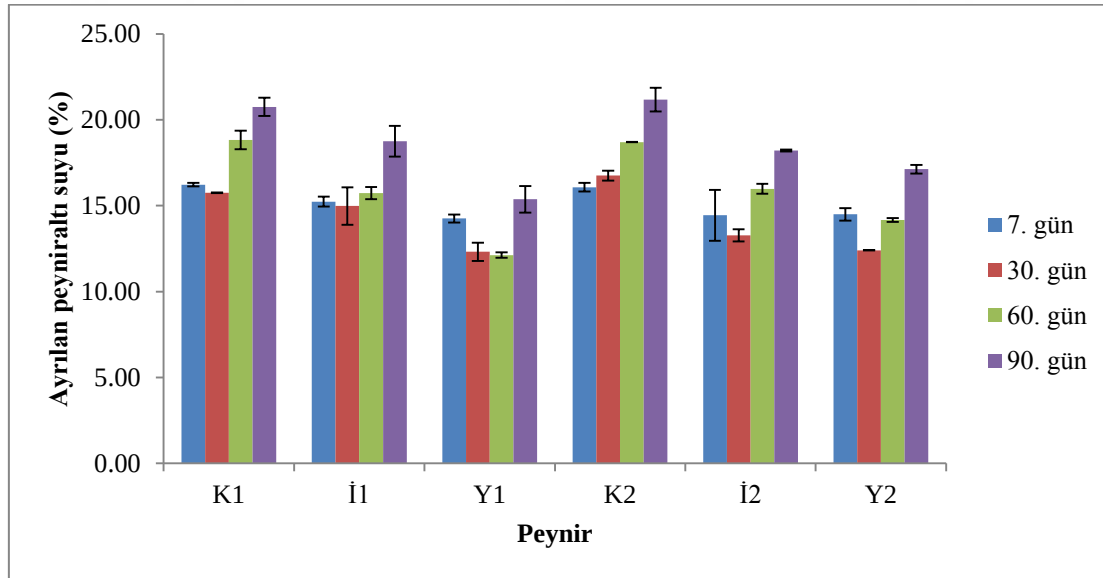
Özellik	Olgunlaşma süresi	K1	İ1	Y1	K2	İ2	Y2
% Kurumadde	7.gün	34.21±0.13 ^{ab}	34.53±0.16 ^b	33.84±0.26 ^a	34.74±0.40 ^b	34.23±0.35 ^{ab}	34.20±0.29 ^{ab}
	30.gün	34.51±0.41 ^{cd}	33.76±0.13 ^{ab}	33.62±0.39 ^{ab}	34.96±0.28 ^d	33.44±0.22 ^a	34.11±0.26 ^{bc}
	60.gün	34.93±0.11 ^c	33.90±0.49 ^b	33.18±0.51 ^a	35.28±0.45 ^c	33.89±0.11 ^b	33.66±0.17 ^b
	90.gün	34.55±0.11 ^d	34.13±0.27 ^c	33.29±0.08 ^a	35.43±0.07 ^e	33.64±0.06 ^b	33.07±0.02 ^a
% Protein	7.gün	12.18±0.13 ^b	11.85±0.17 ^b	11.02±0.15 ^a	11.86±0.46 ^b	11.70±0.11 ^b	11.62±0.26 ^{ab}
	30.gün	12.61±0.34 ^{ab}	12.43±0.69 ^{ab}	12.25±0.20 ^{ab}	12.93±0.12 ^b	11.88±0.48 ^a	11.77±0.08 ^a
	60.gün	12.17±0.27 ^c	11.86±0.06 ^b	11.53±0.10 ^a	12.46±0.06 ^c	11.54±0.01 ^{ab}	11.65±0.06 ^{ab}
	90.gün	12.30±0.08 ^{bc}	12.06±0.05 ^{abc}	11.78±0.13 ^{ab}	12.66±0.65 ^c	11.81±0.11 ^{ab}	11.51±0.07 ^a
% Tuz/KM	7.gün	4.77±0.03 ^b	4.58±0.01 ^a	4.75±0.02 ^b	4.67±0.09 ^{ab}	4.58±0.08 ^a	4.65±0.06 ^{ab}
	30.gün	4.85±0.01 ^b	4.81±0.02 ^b	4.82±0.01 ^b	4.65±0.07 ^a	4.81±0.07 ^b	4.68±0.01 ^a
	60.gün	4.75±0.07 ^{abc}	4.76±0.04 ^{abc}	4.86±0.07 ^c	4.59±0.07 ^a	4.61±0.10 ^{ab}	4.78±0.02 ^{bc}
	90.gün	4.94±0.03 ^d	4.57±0.08 ^{ab}	4.76±0.02 ^c	4.44±0.03 ^a	4.69±0.04 ^{bc}	5.01±0.05 ^d
% Yağ/KM	7.gün	46.77±0.00	47.06±1.02	46.54±1.04	46.78±1.02	46.01±1.03	46.78±0.00
	30.gün	48.54±1.02 ^b	45.17±1.05 ^a	45.35±1.05 ^a	45.77±0.00 ^a	45.61±1.06 ^a	46.17±1.04 ^a
	60.gün	47.95±1.01	46.46±1.04	45.21±0.00	47.48±1.00	45.74±0.00	46.05±2.10
	90.gün	48.50±1.02 ^c	46.15±1.04 ^{ab}	45.06±0.00 ^a	47.28±1.00 ^{bc}	46.08±0.00 ^{ab}	45.36±0.00 ^a
pH	7.gün	4.73±0.01 ^a	4.84±0.01 ^b	4.99±0.01 ^c	4.66±0.04 ^a	4.95±0.05 ^c	4.98±0.02 ^c
	30.gün	4.67±0.00 ^b	4.80±0.01 ^c	4.97±0.01 ^d	4.59±0.01 ^a	4.93±0.06 ^d	4.99±0.01 ^d
	60.gün	4.53±0.18 ^a	4.79±0.00 ^b	4.98±0.01 ^{bc}	4.56±0.01 ^a	4.92±0.04 ^{bc}	5.00±0.02 ^c
	90.gün	4.63±0.01 ^b	4.78±0.01 ^c	4.97±0.00 ^e	4.50±0.06 ^a	4.90±0.04 ^d	4.99±0.02 ^e

Harflendirme Duncan testi kullanılarak yapılmıştır. **a-e:** Her bir özellik için aynı satırdaki farklı üstlere sahip örnekler arasındaki fark önemlidir (P<0.05).

Peynir örneklerinin pH'sında meydana gelen değişimler olgunlaşma süresince ölçülmüştür. Olgunlaşmanın 90. gününde, % 0.05 oranında potasyum iyodat kullanılarak üretilen Y1 ve Y2 peynirleri dışında diğer peynirlerin pH'sı 4.50 ile 4.90 arasında değişmektedir. Ancak, Y1 ve Y2 peynirlerinin pH'sı olgunlaşma süresince 4.97 ile 5.00 arasında kalmıştır. Bu nedenle, bu peynirlerin nem içeriği diğer peynirlere göre daha yüksektir. Potasyum iyodat çalışmada kullanılan starter kültürlerin canlılığını olumsuz etkilediği için yükseltgenmiş peynirlerde olgunlaşma süresince pH düşüşü gözlenmemiştir. Caldeo ve ark.'nın [32] yaptığı çalışmada, % 1 oranında potasyum iyodat içeren Cheddar peynirinin pH'sının olgunlaşma süresince 5.8 civarında olduğu, % 0.05 oranında potasyum iyodat içeren Cheddar peynirinin pH'sının ise 5.2-5.3 aralığında değiştiği bulunmuştur. Çalışmada

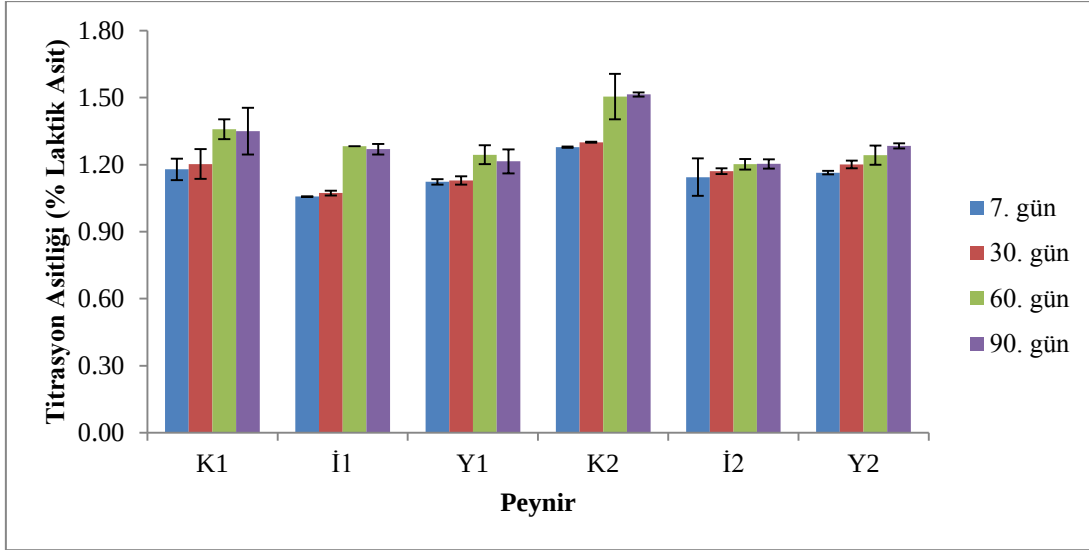
Üretilen peynir örneklerinin pH'ları istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde, üretimin ve olgunlaşma süresinin pH üzerindeki etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$).

Peynir örneklerinde meydana gelen peyniraltı suyu ayrılmasının olgunlaşma süresince değişimi şekil 4.41'de verilmiştir. Üretimin peyniraltı suyu ayrılmasızerindeki etkisi istatistiksel açıdan önemli bulunurken ($P<0.05$), kontrol peynirleri (K1 ve K2) arasında farklılık bulunmamıştır. Ayrıca, olgunlaşma süresinin peyniraltı suyu ayrılması üzerindeki etkisinin de önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). pH, peynir üretimi sırasında pıhtının sıklılığını dolayısıyla, peyniraltı suyunun ayrılmasını etkilemektedir [157]. Buna bağlı olarak, pH'sı diğer peynir örneklerine göre yüksek olan Y1, İ2 ve Y2 peynirlerinde peyniraltı suyu ayrılmasının düşük olduğu belirlenmiştir.



şekil 4.41. Peynir örneklerinde meydana gelen peyniraltı suyu ayrılmasının olgunlaşma süresince değişimi (%)

Peynir rneklerinin titrasyon asitliğinde meydana gelen değişimler olgunlaşma süresince belirlenmiştir (şekil 4.42). İ1, Y2, K1 ve K2 peynirlerinin, istatistiksel açıdan titrasyon asitliği değerlerine göre birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Y1 ve İ2 peynirleri arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Olgunlaşma süresine göre titrasyon asitliğinde meydana gelen değişimler incelendiğinde ise, 7. ve 30. günler arasında ve 60. ve 90. günler arasında önemli bir farklılık olmadığı, ancak, bu gruplar arasındaki farklılığın önemli olduğu bulunmuştur ($P<0.05$).



Şekil 4.42. Peynir örneklerinin titrasyon asitliğinin (% laktik asit) olgunlaşma süresince değişimi

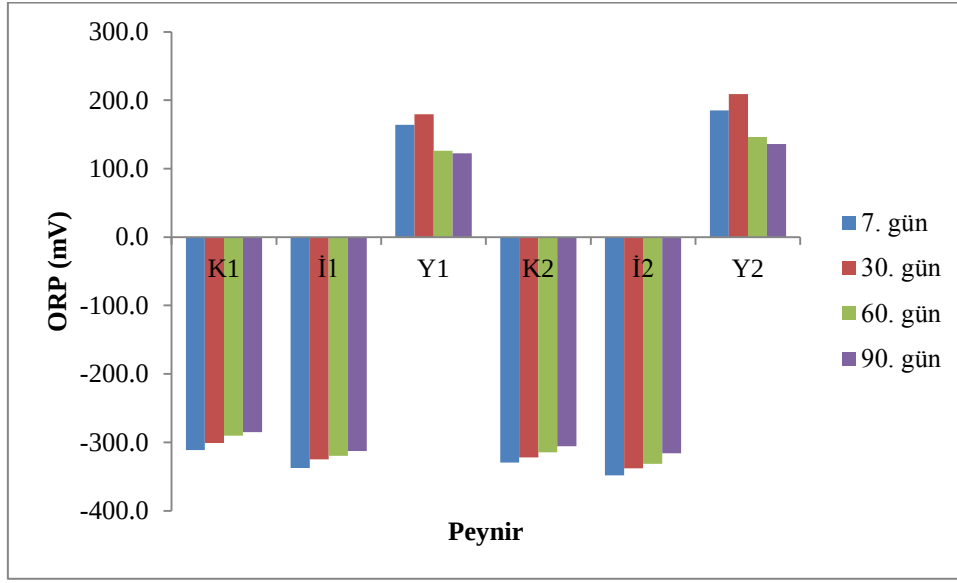
Ayrıca, kontrol peynirlerinin titrasyon asitliğinin diğer peynirlere göre daha yüksek olduğu Şekil 4.42’de görülmektedir. Bu durumun, starter kültürlerin kontrol peynirlerinde canlılıklarını koruyabilmesinden (Şekil 4.40) ve laktoz metabolizmasını redoks ajanlarını içeren peynirlere göre daha rahat gerçekleştirebilmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.6.3 Redoks Potansiyeli Ölçümü

Beyaz peynirin redoks potansiyelinin ölçümü, kırılgan bir tekstüre sahip olması nedeniyle oldukça zor yapılmaktadır. Kombine redoks elektrodu veya bir referans ve platin elektrot birlikte ölçüm için peynire daldırıldığında peynir kalıbında yarıklar meydana gelmekte ve elektrot oksijenle temas ettiği için doğru bir ölçüm gerçekleştirilememektedir. Bu çalışma kapsamında, elektrotun muhtemel çatlaklar nedeniyle oksijenle temasını engellemek için elektrot peynir kalıbına daldırıldıktan hemen sonra üzerine agar dökülmüş ve böylece peynir kalıbının hem üst yüzeyinin hem de yan yüzeyinin agar ile kaplanarak oksijenle temas etmesi önlenmiştir. Redoks potansiyelinin dengeye gelmesi için 24 saat süreyle ölçüm alınmıştır ve denge değeri kaydedilmiştir (Şekil 4.43). Caldeo’nun [158] yaptığı çalışmada, Cheddar peynirinde redoks potansiyeli ölçümünün 60 saatte dengeye geldiği bildirilmiştir. Cheddar peyniri gibi sert peynirlerde redoks potansiyelinin ölçümü KCl tuz köprüsü kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir [1, 158].

Şekil 4.43 incelendiğinde, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 kültürü kullanılarak üretilen K2 peynirinin, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 kullanılarak üretilen K1 peynirine göre, aynı

şekilde İ2 peynirinin de İ1 peynirine göre olgunlaşma süresince daha düşük redoks potansiyeline sahip olduğu görülmektedir. Bu durum, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşunun indirgeme kapasitesinin daha yüksek olmasından kaynaklanmıştır. Çalışma kapsamında kullanılan laktokok suşlarının sütü indirgeme kapasiteleri incelendiğinde de (Şekil 4.2), *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşunun sütü indirgeme kapasitesinin *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. İ1 ve İ2 peynirlerinin üretiminde kullanılan sodyum hidrosülfid sayesinde, kontrol peynirlerine kıyasla (K1 ve K2) daha düşük redoks potansiyeli değerlerine ulaşılmıştır.



Şekil 4.43. Peynirlerin redoks potansiyellerinin (mV) olgunlaşma süresince değişimi

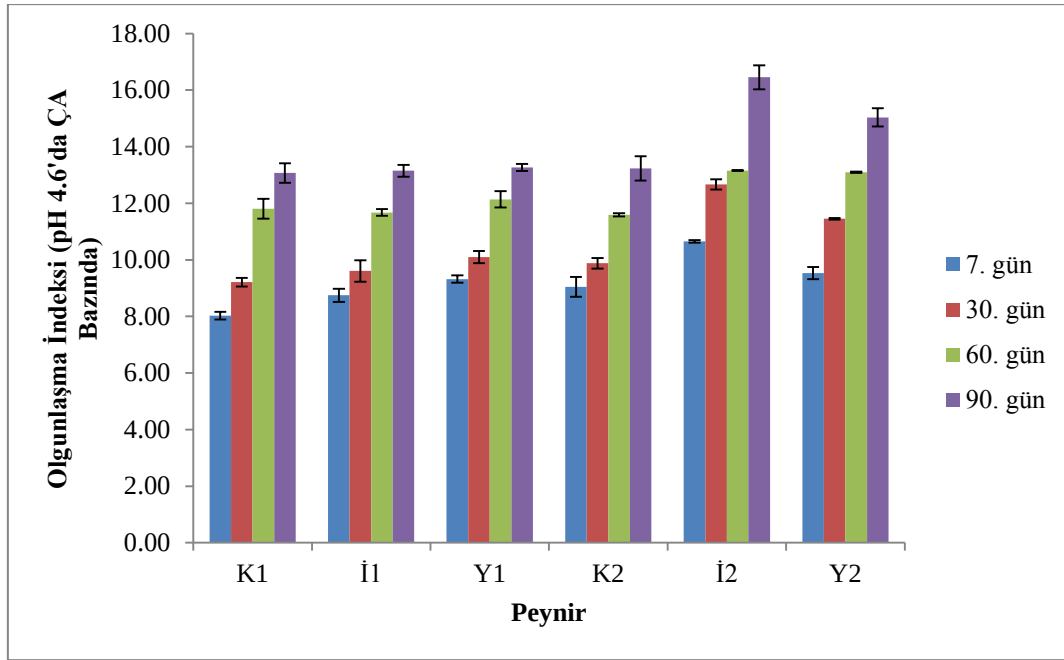
Olgunlaşmanın ilerlemesiyle birlikte, K1, İ1, K2 ve İ2 peynirlerinin redoks potansiyellerinin arttığı ve Y1 ve Y2 peynirlerinde ise olgunlaşmanın 30. gününden sonra azaldığı gözlenmiştir. Bolduc ve ark.'nın [67] yaptıkları çalışmada, sütün elektroredüksiyonu sonucunda çok düşük E_h değerlerine ulaşıldığı ancak, depolama süresince E_h değerinin tekrar arttığı gözlenmiştir. Bu durumun, sütte bulunan poising etkiye sahip türlerin, redoks potansiyelinin değişimine karşı tamponlama etkisi göstermesinden kaynaklandığı bildirilmiştir [15, 67]. Bu çalışmada gözlenen değişimin ise, olgunlaşmaya bağlı olarak ortaya çıkan proteoliz ürünlerinin ve diğer bazı bileşiklerin poising etki göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bir diğer olasılığın ise, proteoliz sonucu oluşan peptitlerin, peynirde bulunan redoks aktif gruplar ile ölçümde kullanılan elektrot arasında bariyer görevi görmesi olduğu düşünülmektedir.

Olgunlaşmanın 7. gününde Y1 ve Y2 peynirlerinin (yükseltgenmiş peynir) redoks potansiyeli değerlerinin sırasıyla, 164.0 ve 185.1 mV olduğu belirlenmiştir. Yükseltgenmiş peynirlerde redoks potansiyelinin 30. günde arttığı ve ardından, olgunlaşmanın ilerleyen günlerinde düştüğü belirlenmiştir. Ancak, 90 günlük olgunlaşma süresince Y1 ve Y2 peynirlerinin redoks potansiyeli pozitif değerlerde kalmıştır. Yapılan diğer çalışmalarda ise, yükseltgen ajan kullanılarak üretilen peynirlerin redoks potansiyellerinin olgunlaşmanın erken dönemlerinden itibaren düşmeye başladığı ve negatif redoks potansiyeli değerlerine ulaştığı bildirilmiştir [76-78, 158]. Yapılan bir çalışmada, anaerobik bütirik asit bakterilerinin gelişimini önlemek amacıyla peynire eklenen KNO_3 'ün, olgunlaşmanın ilk on gününde peynirin E_h 'sinin kontrol peynirine göre yaklaşık 100 mV daha yüksek olmasına neden olduğu ve olgunlaşmanın ileriki günlerinde E_h 'nin kontrol peynirinin E_h 'sine yaklaştığı tespit edilmiştir [77]. Caldeo ve ark.'nın [32] yaptığı çalışmada, % 0.05 ve 0.1 oranında KIO_3 içeren Cheddar peynirlerinin kontrol peynirine göre daha yüksek redoks potansiyeline sahip olduğu ve olgunlaşmanın ilk 2 haftası süresince redoks potansiyelinin pozitif değerlerde (sırasıyla 179 ve 316 mV) kaldığı bildirilmiştir. Olgunlaşmanın birinci ayında % 0.05 ve 0.1 oranında KIO_3 içeren Cheddar peynirlerinin E_h 'sinin yavaşça düştüğü ve 2 aydan sonra kontrol peynirinin E_h 'sine yaklaştığı tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresince peynirin redoks potansiyelinin yükseltgen ajanlar ile pozitif değerlerde tutulamamasının nedeninin peynirdeki bakteriyel gelişim (özellikle starter olmayan laktik asit bakterileri) ile ilgili olabileceği bildirilmiştir [32]. Peynire eklenen yükseltgen ajanların, bakteriyel redoks sistemleri tarafından [72] veya var olan indirgen bileşikler ile gerçekleşen kimyasal reaksiyonlar nedeniyle indirgenebileceği düşünülmektedir [32]. Şekil 4.40 incelendiğinde, Y1 ve Y2 peynirlerinde, olgunlaşmanın 60. günü itibarıyla laktokok tespit edilememiş ve ayrıca, olgunlaşma süresince peynirlerde starter olmayan laktik asit bakterilerine rastlanmamıştır. Bu nedenle, diğer çalışmalardan farklı olarak, olgunlaşma süresince yükseltgen ajan kullanılarak üretilen peynirlerin redoks potansiyeli değerleri negatif değerlere düşmemiştir. Benzer şekilde, Jeanson ve ark.'nın [25] yaptıkları çalışmada, farklı gazlarla muamele edilen sütlerin redoks potansiyelinin, bakteriyel gelişim olmadığında uzun süre sabit kaldığı belirtilmiştir.

4.6.4 Proteoliz Düzeyini Belirlemeye Yönelik Analizler

pH 4.6'da çözünür azot tayini

Peynirde meydana gelen birincil proteoliz, pH 4.6'da çözünür azot düzeyi ve üre-PAGE ile belirlenmektedir [40]. pH 4.6'da çözünür azot (yaygın olarak proteoliz indeksi olarak kullanılmaktadır) içeriğindeki farklılıklar, nem içeriğindeki, sıcaklık ve pH'daki farklılıklar, olgunlaşma süresi, pişirme sıcaklığı ve drenajdaki pH farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Bu fraksiyondaki peptitler, çoğunlukla kimozin ve daha az miktarda plazmin aktivitesi yoluyla üretilmektedir [159]. UF beyaz peynir üretiminde pıhtı kesimi ve peynir altı suyunun drenajı gerçekleşmediği için üretimde kullanılan koagülant ve starter kültürlerin tamamı peynirin yapısında kalmaktadır. Peynir örneklerine ait pH 4.6'da çözünür azotlu maddeler bazında olgunlaşma indeksi değerleri Şekil 4.44'te verilmiştir. Buna göre, bütün örneklerde, pH 4.6'da çözünür azotlu maddelerin miktarı olgunlaşma süresince artmıştır. İstatistiksel açıdan da olgunlaşma süresinin, pH 4.6'da çözünür azotlu maddeler bazında olgunlaşma indeksi üzerindeki etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Peynir örnekleri arasındaki farklılık da istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Sadece, İ1 ve K2 peynirleri arasındaki fark istatistiksel açıdan önemsizdir. Peynir örnekleri içinde, pH 4.6'da çözünür azotlu maddeler bazında olgunlaşma indeksi en yüksek olan peynirler sırasıyla İ2, Y2 ve Y1 peynirleridir. Bu üç peynirin pH'sının ve nem içeriğinin diğer peynirlere göre yüksek olması, enzim aktivitesinin artmasına, dolayısıyla pH 4.6'da çözünür azot miktarının bu peynirlerde daha yüksek olmasına neden olmuş olabilir.



Şekil 4.44. Peynirlerin pH 4.6'da çözünür azotlu maddeler bazında olgunlaşma indeksi değerleri (%)

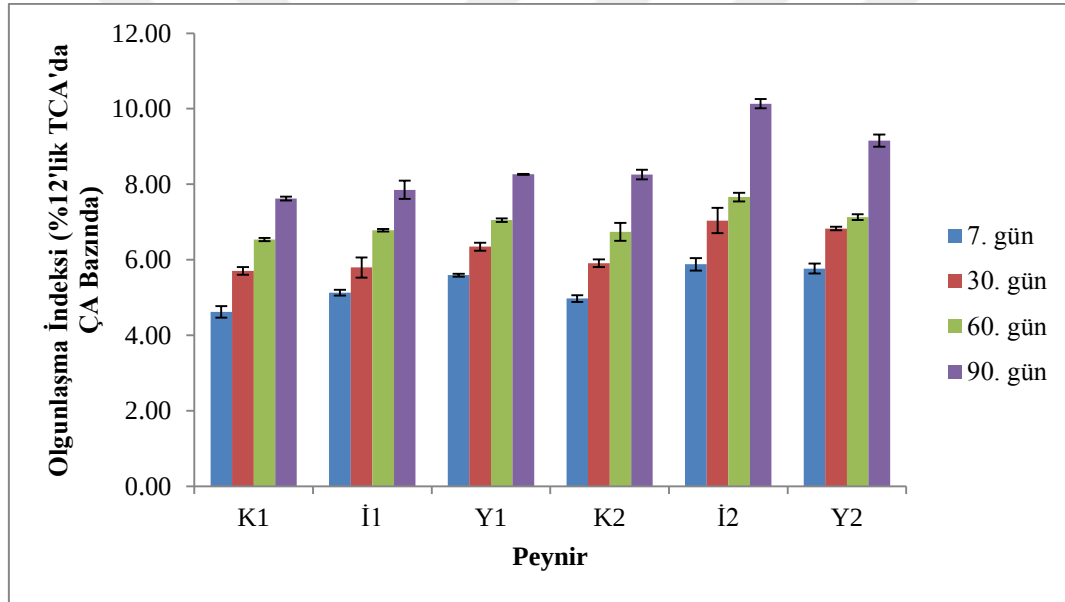
Yapılan bir çalışmada, Havarti ve Saint-Paulin peynirleri geleneksel ve UF teknikleri kullanılarak üretilmiştir. Peynir üretiminden önce, UF retentantlarına ürokinaz ve KIO_3 ayrı ayrı ve birlikte eklenmiştir. Ürokinazın, UF Havarti ve Saint-Paulin peynirlerindeki plazmin aktivitesini artırdığı ve buna bağlı olarak, β -kazein proteolizinin ve pH 4.6'da çözünür azotlu maddelerin konsantrasyonunun arttığı belirlenmiştir. Ancak, potasyum iyodatın, UF peynirdeki starter organizmaları inhibe ettiği ve plazmin aktivitesini etkilemediği bildirilmiştir [160].

% 12'lik TCA'da çözünür azot tayini

Genel olarak, %12'lik TCA'da veya PTA'da (fosfotungstik asit) çözünür toplam azotlu madde miktarı veya serbest aminoasitlerin konsantrasyonu laktik asit bakterilerinin peptidazlarının aktivitelerine bağlı olduğu bildirilmiştir [161]. İleri düzeyde gerçekleşen proteoliz hakkında bilgi veren % 12'lik TCA fraksiyonlarındaki azotlu maddeler, suda çözünür veya pH 4.6'da çözünür azotlu maddelerden farklı olarak daha küçük peptitleri (genellikle 2- 22 aminoasit biriminden oluşan peptitler) içermektedir. Bu peptitlerin daha çok α_{s1} -kazeinin hidrolizi sonucu oluştuğu belirlenmiştir. Bu peptitlerin oluşumunda, sütte bulunan doğal enzimlerin ve mikrobiyel enzimlerin etkili olduğu bildirilmiştir [162]. Ayrıca, starter proteinazlarının, kimozen ve plazmin tarafından oluşturulan polipeptit ve peptitlerde yer alan $\text{Gln}_9\text{-Gly}_{10}$ ve $\text{Gln}_{13}\text{-Glu}_{14}$ arası peptit bağlarını hızlı bir şekilde hidroliz

ederek serbest aminoasitleri ve küçük molekül ağırlıklı peptitleri oluşturduğu rapor edilmiştir [159].

Peynir örneklerinin % 12'lik TCA'da çözünür azotlu maddeler bazında olgunlaşma indeksi değerleri, Şekil 4.45'de verilmiştir. Peynir örneklerinin % 12'lik TCA'da çözünür azotlu maddelerinin miktarının, olgunlaşma süresince arttığı gözlenmiştir. Olgunlaşma süresinin, istatistiksel açıdan % 12'lik TCA'da çözünür azotlu maddeler bazında olgunlaşma indeksi üzerindeki etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Peynir örnekleri arasındaki farklılıklar da istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P<0.05$). pH 4.6'da çözünür azotlu maddeler bazında olgunlaşma indeksinin istatistiksel değerlendirilmesinde olduğu gibi, sadece, İ1 ve K2 peynirleri arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemsiz olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.45. Peynirlerin %12'lik TCA'da çözünür azotlu maddeler bazında olgunlaşma indeksi değerleri (%)

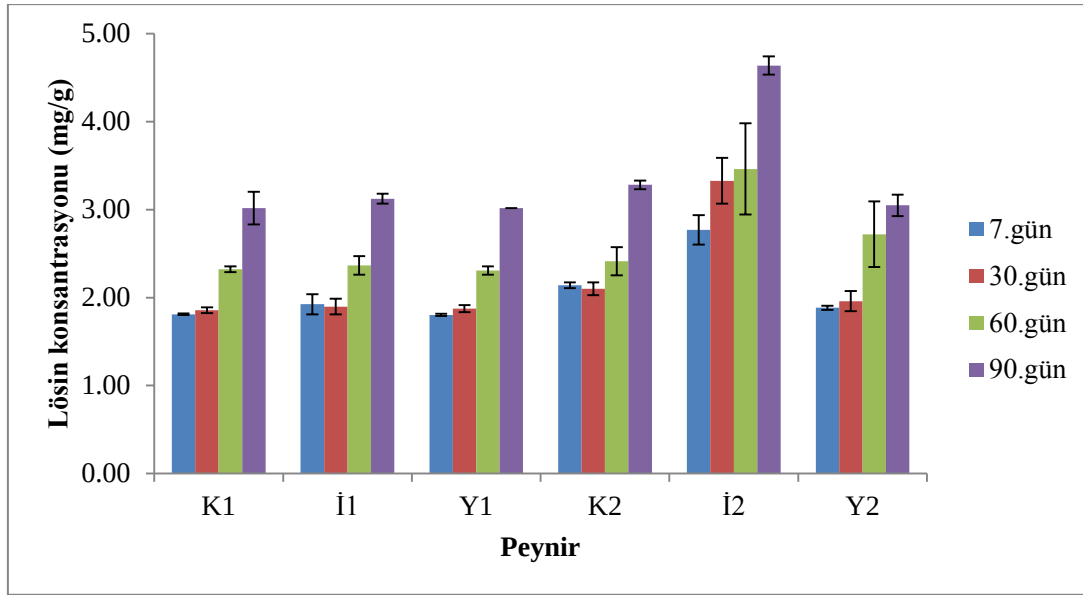
Şekil 4.45 incelendiğinde, İ2 ve Y2 peynirlerindeki % 12'lik TCA'da çözünür azotlu maddelerin miktarının, diğer peynir örneklerine göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durumun, laktokok kaynaklı proteinaz ve peptidazlar için ortamda daha fazla substrat (orta büyüklükteki peptitler gibi) bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu peynir örneklerinin pH'sının ve nem içeriğinin daha yüksek olması nedeniyle, kimozinin yüksek proteolitik aktivitesine bağlı olarak orta büyüklükteki peptitleri daha yüksek konsantrasyonda içerdiği düşünülmektedir. Ayrıca, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu ile üretilen peynirlerin %12'lik TCA'da çözünür azotlu maddeler bazında olgunlaşma

indeksi değerlerinin *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu ile üretilen peynirlere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Toplam serbest aminoasit tayini

Laktik asit bakterileri pek çok aminoasite ihtiyaç duymaktadır ve bu nedenle, çevrelerinde bulunan proteinlerden, gelişimleri için gerekli olan aminoasitlerin serbest kalması için kompleks proteolitik sistemlere sahiptirler. *Lactococcus*'un proteolitik sistemi, laktosepin (cell envelope-associated proteinase) ve bir dizi hücre içi proteinaz ve daha da önemlisi peptidazlardan oluşmaktadır. *Lactococcus*'un temel proteolitik enzimi olan laktosepin, Ca^{+2} ile hücre yüzeyine gevşek şekilde bağlanmaktadır. Laktosepinin birincil rolü, laktokok hücrelerinin sütte gelişimini sağlayabilmek amacıyla, gerekli olan kısa peptitlerin oluşumu için kazeinleri degrade etmektir. Bununla birlikte, peynirde, esas olarak, kimozen veya plazminin kazein üzerindeki aktivitesi sonucu açığa çıkan orta büyüklükteki peptitlerin (kimozen aktivitesi sonucu oluşan α_{s1} -kazein f1-23 gibi) ve kısa zincirli peptitlerin degradasyonunu gerçekleştirmektedir. Laktik asit bakterileri ayrıca, olgunlaşma süresince peynirde proteolizin son basamağında ve katabolik reaksiyonların substratları olarak rol oynayan serbest aminoasitlerin ortama salınmasında, çok önemli göreve sahip olan hücre içi peptidazları da içermektedir. Laktik asit bakterileri, bir dizi aminoasite karşı oksotrofik olduğu için, bu bileşiklerin bulundukları çevrede önceden oluşturulması gerekmektedir. Bu nedenle, laktik asit bakterileri oldukça geniş bir aralıkta peptidazları içermektedir [163].

Peynir örneklerinin toplam serbest aminoasit konsantrasyonlarının olgunlaşma süresince değişimi Şekil 4.46'te verilmiştir. Üretiminin peynirin toplam serbest aminoasit konsantrasyonu üzerindeki etkisi istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Ayrıca, olgunlaşma süresinin toplam serbest aminoasit konsantrasyonu üzerindeki etkisinin de önemli olduğu ($P<0.05$), ancak, olgunlaşmanın 7. ve 30. günleri arasında farklılık olmadığı belirlenmiştir (İ2 kodlu peynirler hariç).



Şekil 4.46. Peynirlerin toplam serbest aminoasit konsantrasyonlarının olgunlaşma süresince değişimi

Ayrıca, Şekil 4.46 incelendiğinde, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu ile üretilen peynirlerin toplam serbest aminoasit konsantrasyonlarının genel olarak *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu ile üretilen peynirlere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Buna göre, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşunun proteolitik ve/veya peptidolitik aktivitesinin *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşuna göre daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlar, %12'lik TCA'da çözünür azotlu maddeler bazında olgunlaşma indeksi sonuçlarını destekler niteliktedir. Buna ek olarak, negatif redoks potansiyeline sahip olan K1 ve İ1 peynirlerinin pozitif redoks potansiyeline sahip olan Y1 peynirine göre ve aynı şekilde, K2 ve İ2 peynirlerinin de Y2 peynirine göre daha yüksek konsantrasyonda toplam serbest aminoasit içerdiği saptanmıştır. İndirgenmiş redoks potansiyeli ile laktokokların peptidolitik aktivitesi arasında pozitif bir ilişki olduğu düşünülmektedir.

RP-HPLC ile peptit profilinin belirlenmesi

RP-HPLC, suda çözünür peptitlerin analizinde kullanılmaktadır. Farklı olgunluk derecesine ve kaliteye sahip peynirlerin proteoliz düzeyini karakterize etmek ve karşılaştırmak amacıyla ve çeşitli peynir üretim parametrelerinin proteoliz üzerindeki etkisini incelemek amacıyla kullanılmaktadır [164]. α_1 -kazein (f1–23), laktosepin tarafından Gln₉-Gly₁₀, Gln₁₃-Glu₁₄, Glu₁₄-Val₁₅ ve Leu₁₆-Asn₁₇ bağlarından hidroliz edilmektedir [159]. Bunun sonucunda oluşan α_1 -kazein (f1–9), α_1 -kazein (f1–13) ve α_1 -

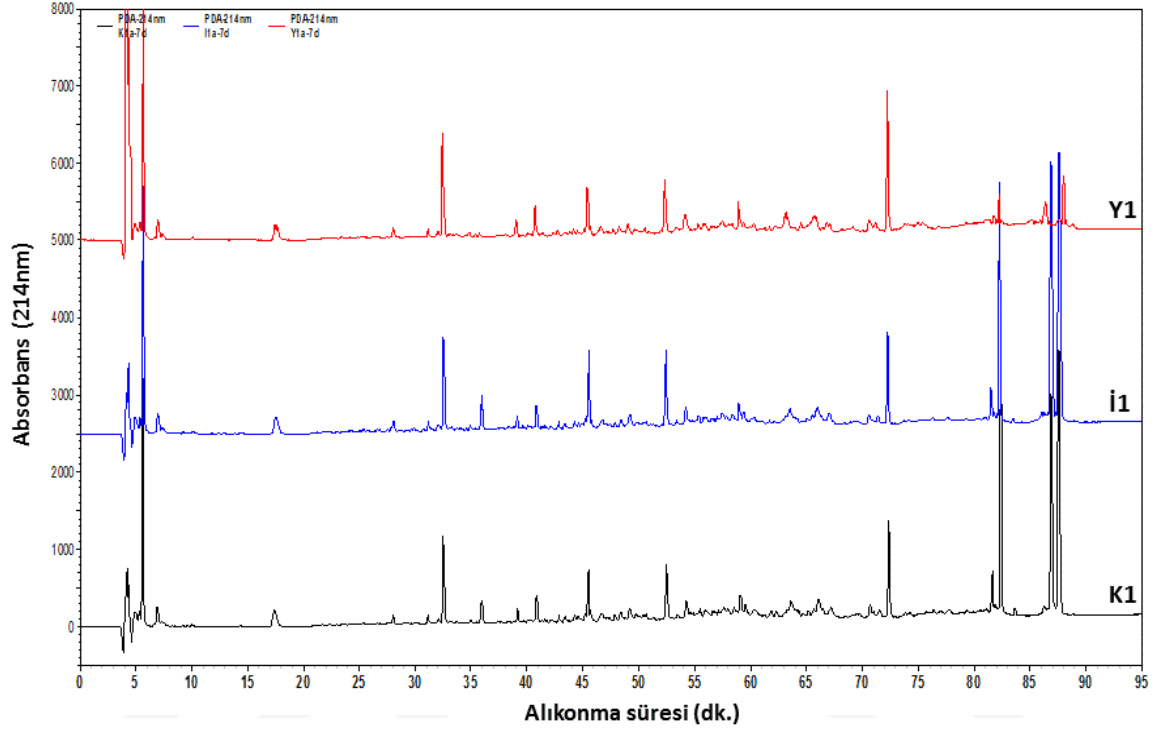
kazein (f1–14) peptitleri [165] ile suda çözünür fraksiyonda bulunan diğer peptitler ve aminoasitler RP-HPLC ile analiz edilebilmektedir.

Şekil 4.47 ve Şekil 4.48’te sırasıyla olgunlaşmanın 7. ve 90. günlerinde, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu kullanılarak üretilen peynirlerin 214 nm’deki RP-HPLC kromatogramları verilmiştir. Ayrıca, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu kullanılarak üretilen peynirlerin olgunlaşmanın 90. gününe ait 280 nm’deki RP-HPLC kromatogramları Şekil 4.49’da görülmektedir. Benzer şekilde, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu kullanılarak üretilen peynirlere ait RP-HPLC kromatogramları da sırasıyla, Şekil 4.50, Şekil 4.51 ve Şekil 4.52’de verilmiştir. Öncelikle, her iki suş ile üretilen peynirler için, olgunlaşmanın 7. ve 90. günlerine ait kromatogramlar karşılaştırıldığında, beklenildiği üzere, proteolizin ilerlemesiyle birlikte, 90. günde, hem pik sayısının arttığı hem de bazı piklerin alanlarının arttığı gözlenmiştir.

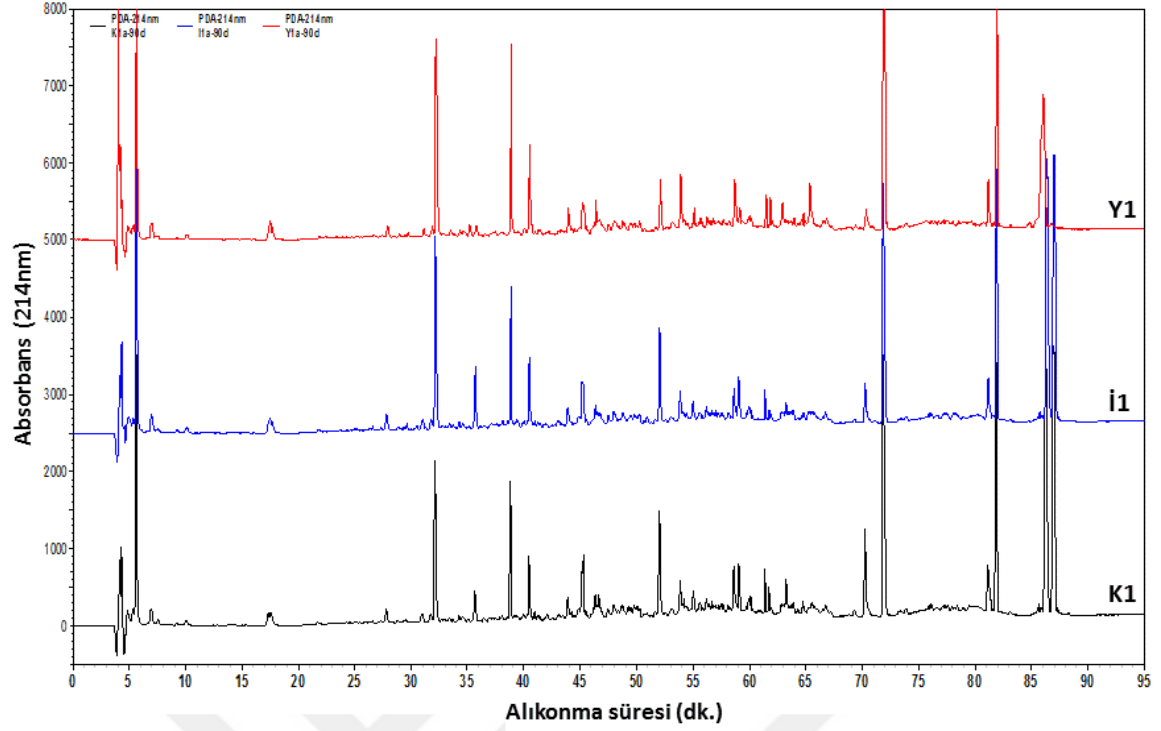
Ayrıca, peynir örneklerine ait kromatogramlar kendi içlerinde karşılaştırıldığında, özellikle yükseltgenmiş peynirler (Y1 ve Y2) ile indirgenmiş redoks potansiyeline sahip peynirler (K1, K2, İ1 ve İ2) arasında temel farklılıklar olduğu görülmektedir. Bu farklılıklar çoğunlukla triptofan (36. dakikada gelen pik) , α -laktalbumin (83. dakikada gelen pik) ile β -laktoglobulinin genetik varyantlarından (yaklaşık 86. ve 87. dakikalarda gelen pikler) kaynaklanmaktadır. Triptofan, α -laktalbumin ile β -laktoglobulinin genetik varyantların konsantrasyonunun (pik alanının) yükseltgenmiş peynirlerde düşük olmasının, bunların oksidasyona uğramaları ve yeni oluşan ürünlerin ya RP-HPLC tekniği ile saptanamaması ya da alıkonma süresinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Proteinlerin oksidasyonu, aminoasitlerin yan zincirinin modifikasyonuna neden olabilmekte, daha ileri düzeyde oksidasyon α -amidasyon veya diamid yolları tarafından peptit bağlarının kırılmasına ve ürün olarak α -keto-açıl ve izosiyanat türevlerinin oluşumuna yol açabilmektedir [166]. Ayrıca, oksidasyon süresince, çapraz bağlı protein agregatları da oluşabilmektedir. Yan zincirlerin oksidatif modifikasyonu açısından, aminoasitler oksidasyona karşı farklı duyarlılık göstermektedirler. Metiyoninin ve sisteinin sülfür merkezlerinin kolaylıkla oksidasyona uğraması nedeniyle oksidasyona en yatkın aminoasitler olduğu [167] ve histidin, triptofan ve tirozinin de oksidasyona karşı duyarlı olduğu [168, 169] bildirilmiştir [170]. Protein oksidasyonu, aromatik ve alifatik aminoasitlerin hidroksilasyonuna ve dolayısıyla, kütlesinde 16 amu’luk bir artışa yol açabilmektedir [170].

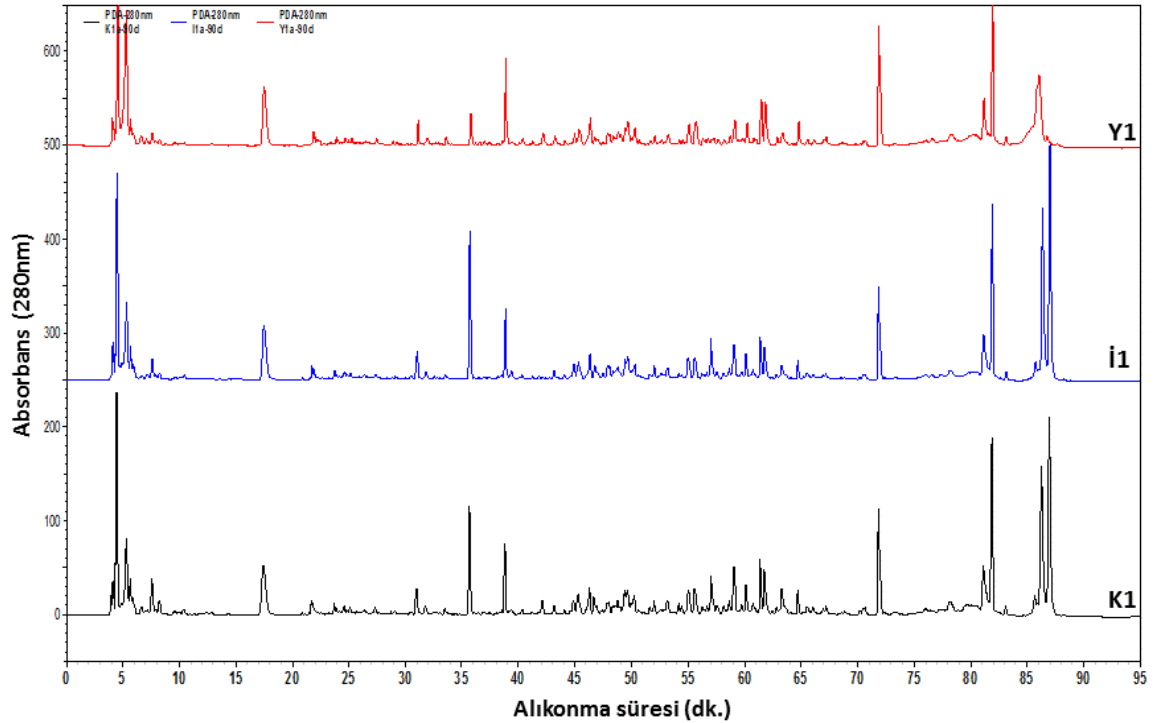
Triptofanın oksidasyonunun kompleks ve tersinmez olduğu ve modifikasyonların benzen halkasında veya pirol biriminde gözlemlendiği bildirilmiştir [170, 171]. α -laktalbumin ve β -laktoglobulinin oksidatif eğiliminin metiyonin, sistein, histidin, tirozin ve triptofanı içermelerinden kaynaklandığı bildirilmiştir [170, 171].



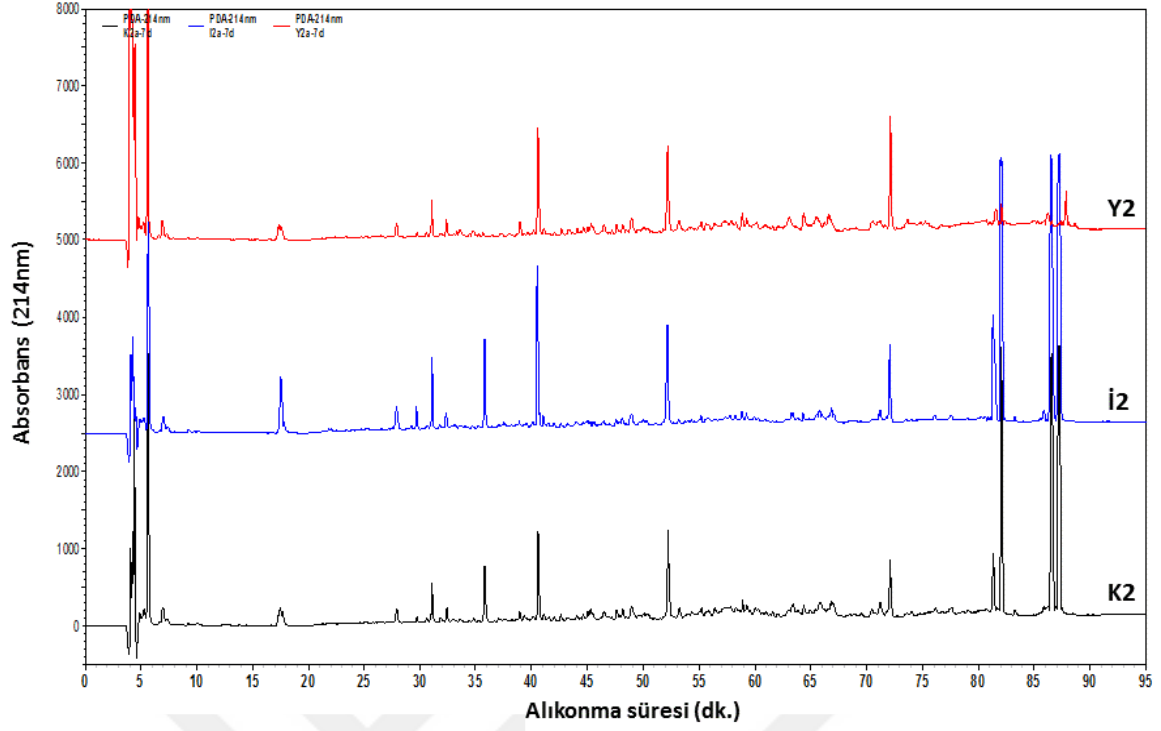
şekil 4.47. *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu kullanılarak üretilen peynirlerin olgunlaşmanın 7. gününde ve 214 nm’de RP-HPLC kromatogramları (K:Kontrol, İ:İndirgen, Y: Yükseltgen)



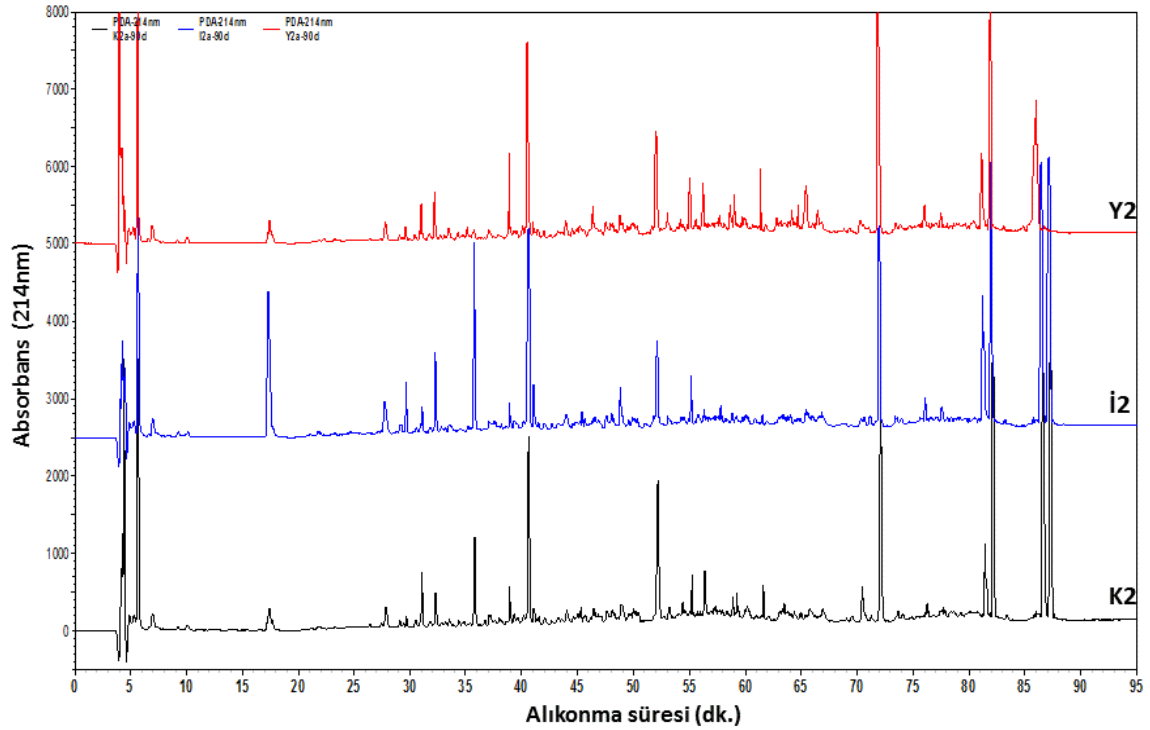
Şekil 4.48. *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu kullanılarak üretilen peynirlerin olgunlaşmanın 90. gününde ve 214 nm’de RP-HPLC kromatogramları (K:Kontrol, İ:İndirgen, Y: Yükseltgen)



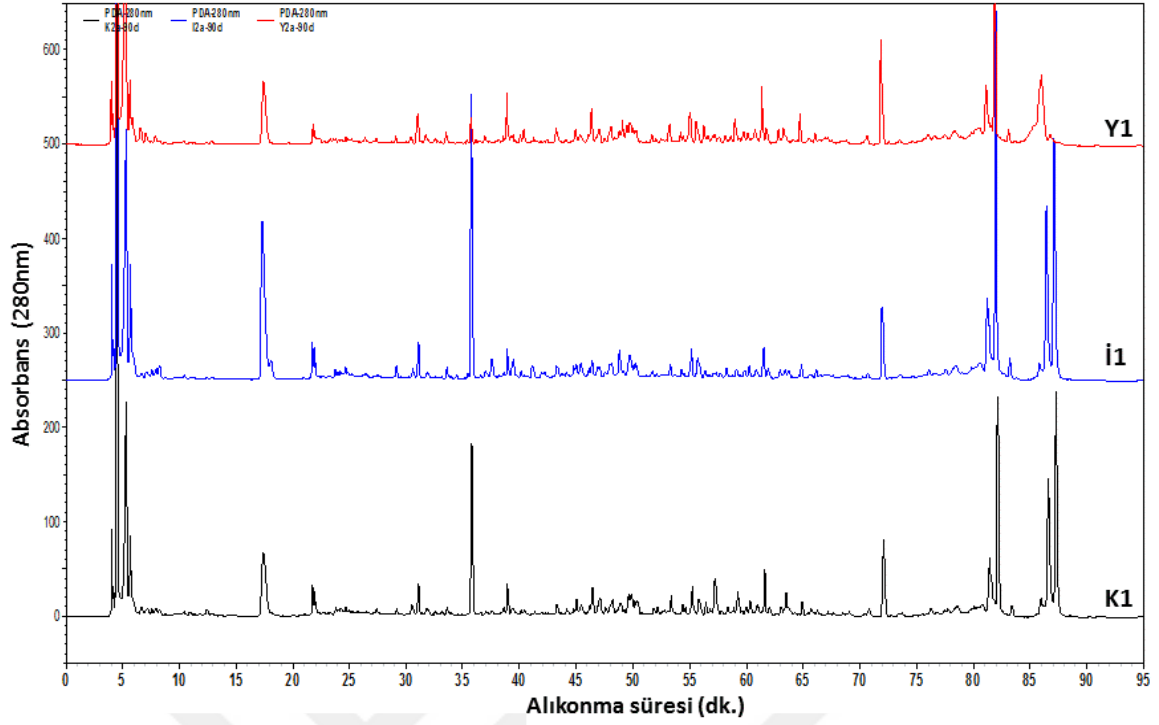
Şekil 4.49. *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu kullanılarak üretilen peynirlerin olgunlaşmanın 90. gününde ve 280 nm’de RP-HPLC kromatogramları (K:Kontrol, İ:İndirgen, Y: Yükseltgen)



Şekil 4.50. *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu kullanılarak üretilen peynirlerin olgunlaşmanın 7. gününde ve 214 nm’de RP-HPLC kromatogramları (K:Kontrol, İ:İndirgen, Y: Yükseltgen)

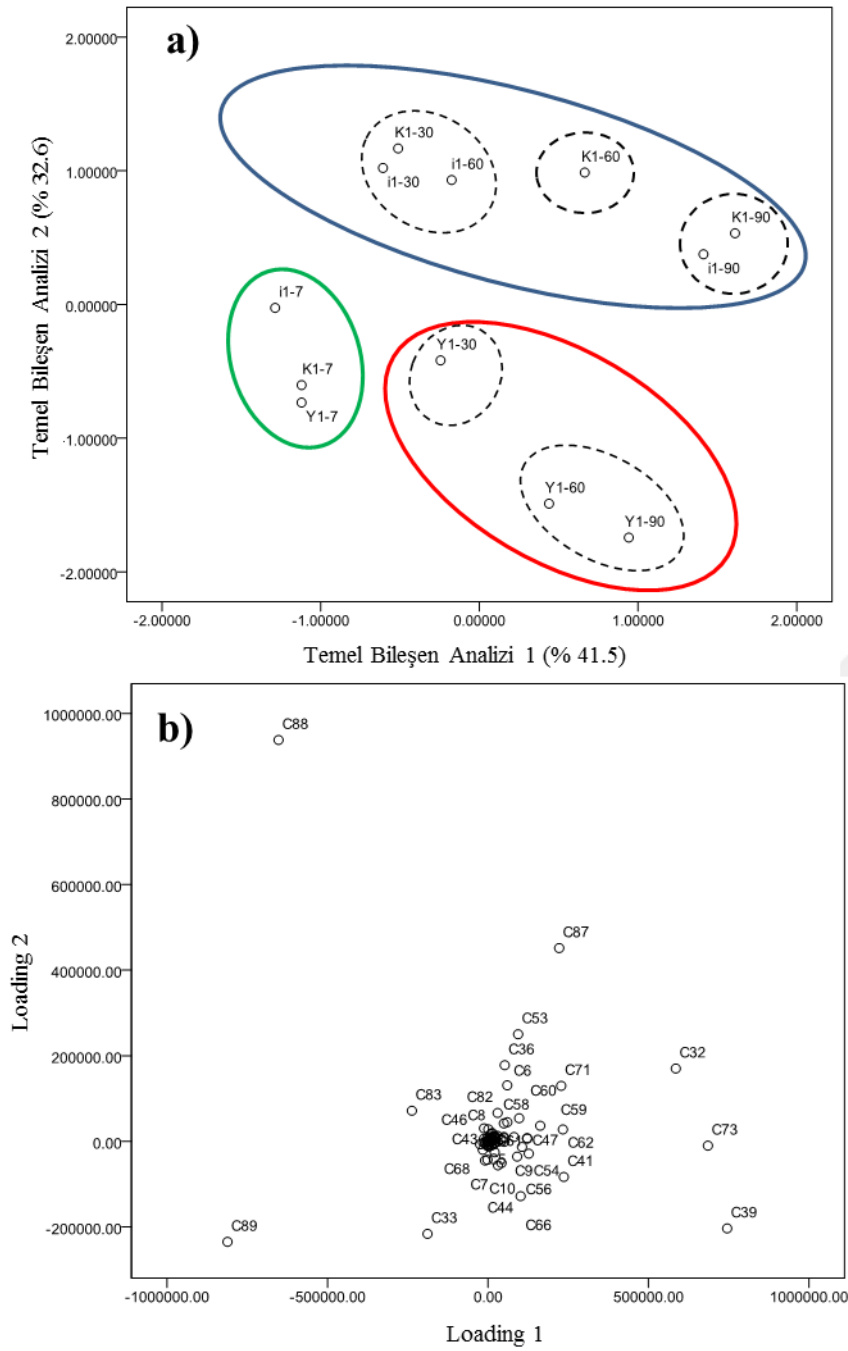


Şekil 4.51. *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu kullanılarak üretilen peynirlerin olgunlaşmanın 90. gününde ve 214 nm’de RP-HPLC kromatogramları (K:Kontrol, İ:İndirgen, Y: Yükseltgen)



Şekil 4.52. *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu kullanılarak üretilen peynirlerin olgunlaşmanın 90. gününde ve 280 nm’de RP-HPLC kromatogramları (K:Kontrol, İ:İndirgen, Y: Yükseltgen)

RP-HPLC analizinin hem 214 nm’de hem de 280 nm’de gerçekleştirilmesinin nedeni, aromatik aminoasitler ve bunların türevleri ve aromatik aminoasitleri içeren peptitlerin 280 nm’de saptanması ve peptit bağlarının 280 nm’de 214 nm’ye göre daha düşük absorbansa sahip olmasıdır [172]. RP-HPLC analizinde, hem 214 nm’de hem de 280 nm’de peynirde gerçekleşen proteoliz düzeyine ait çok sayıda veri elde edilmiştir. Bu nedenle, olgunlaşma süresince pH 4.6’da çözünür fraksiyona ait RP-HPLC kromatogramlarındaki farklılıklar temel bileşen analizi (PCA) kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.53, Şekil 4.54, Şekil 4.55 ve Şekil 4.56’de verilmiştir.

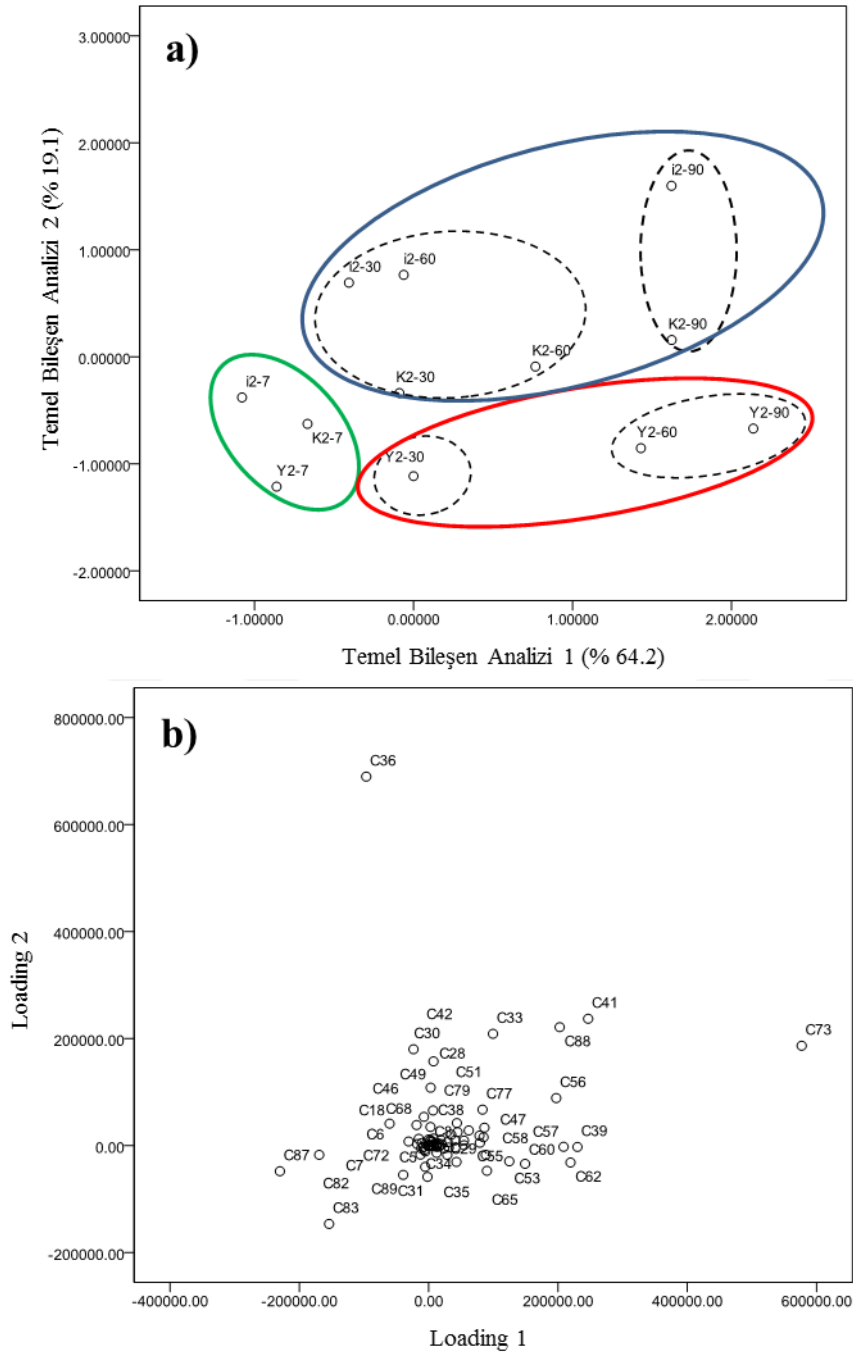


Şekil 4.53. a) *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu kullanılarak üretilen peynirlerde olgunlaşma süresince 214 nm’de RP-HPLC profiline ait temel bileşen analizi (K:Kontrol, İ:İndirgenmiş, Y: Yükseltgenmiş), b) Temel bileşen analizinden elde edilen ve peptitlerin yaklaşık alıkonma sürelerine ait hesaplama verileri (C terimi ve yanında verilen sayısal değer alıkonma süresini ifade etmektedir).

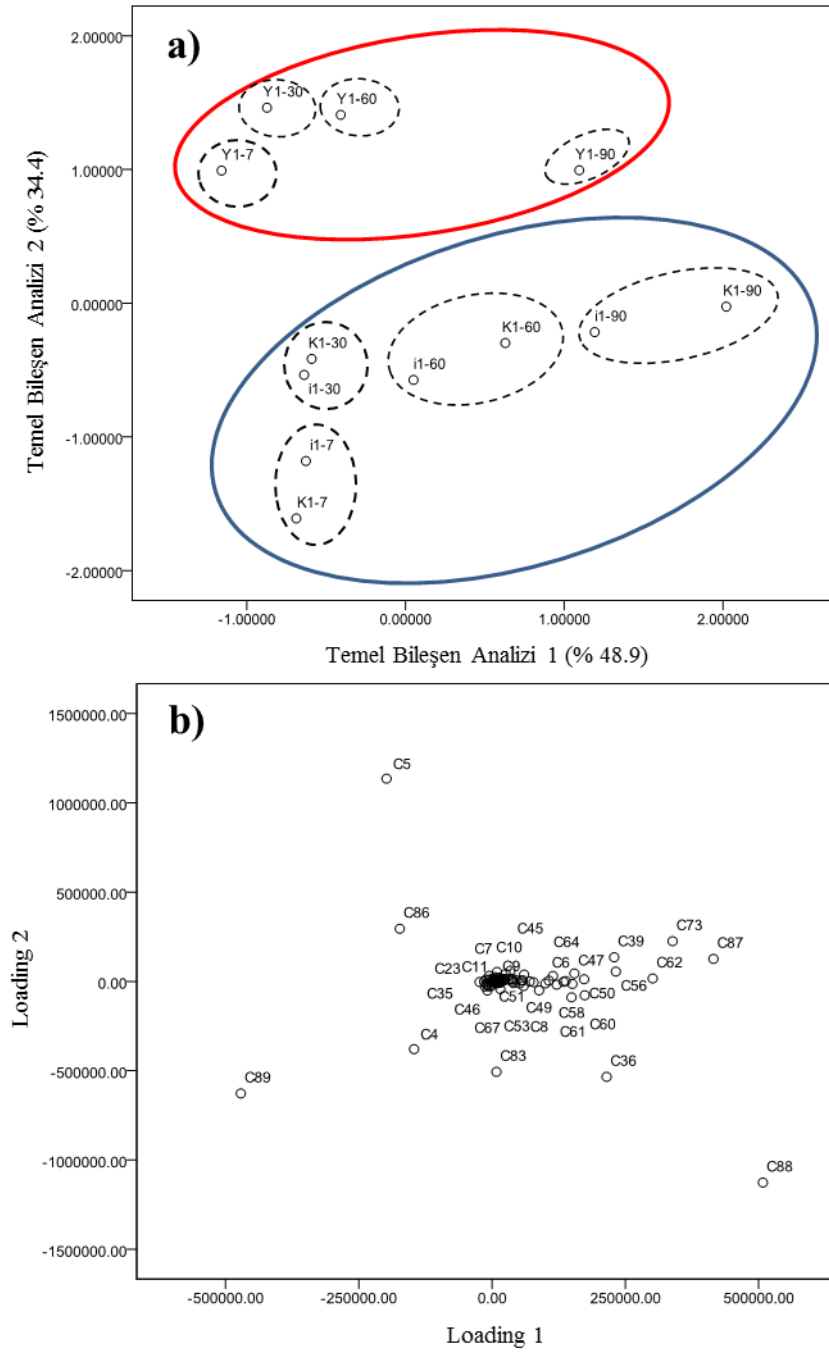
Şekil 4.53a incelendiğinde, 214 nm’de gerçekleştirilen analiz sonucunda peynir örneklerinin (K1, İ1 ve Y1) peptit profillerinin üretim farklılığı ve olgunlaşma süresine göre birbirlerinden ayrıldığı görülmektedir. Buna göre, olgunlaşmanın 7. gününde henüz ileri düzeyde bir proteoliz gerçekleşmediği için K1, İ1 ve Y1 peptit profilleri arasında belirgin bir farklılık bulunmamıştır. Ancak, olgunlaşmanın ilerlemesiyle birlikte 30. günden itibaren peynir örneklerinin birbirinden hem olgunlaşma sürelerine göre hem de redoks potansiyellerine göre ayrıldığı gözlenmiştir. Düşük redoks potansiyeline sahip K1 ve İ1 peynirleri mavi bölgede toplanırken yüksek redoks potansiyeline sahip Y1 peynirinin kırmızı bölge içerisinde toplandığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, hem redoks potansiyelinin hem de olgunlaşma süresinin pH 4.6’da çözünür peptit profilini yani laktokoklar tarafından peynirde gerçekleştirilen proteolizi etkilediği belirlenmiştir. Ayrıca, ayırımın, özellikle, alıkonma süresi 32., 39., 73., 87., 88. ve 89. dakikalar olan peptitler üzerinden gerçekleştiği saptanmıştır (Şekil 4.53b).

L. lactis subsp. *cremoris* UD459 suşu kullanılarak üretilen peynirlerin (K2, İ2 ve Y2) 214 nm’deki peptit profillerinin de, örneklerin redoks potansiyelleri ve olgunlaşma sürelerine göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.54). Ayırımında en etkili olan piklerin, 33., 36., 41., 73., 82., 83., 87. ve 88. dakikada gelen pikler olduğu Şekil 4.54b’de görülmektedir.

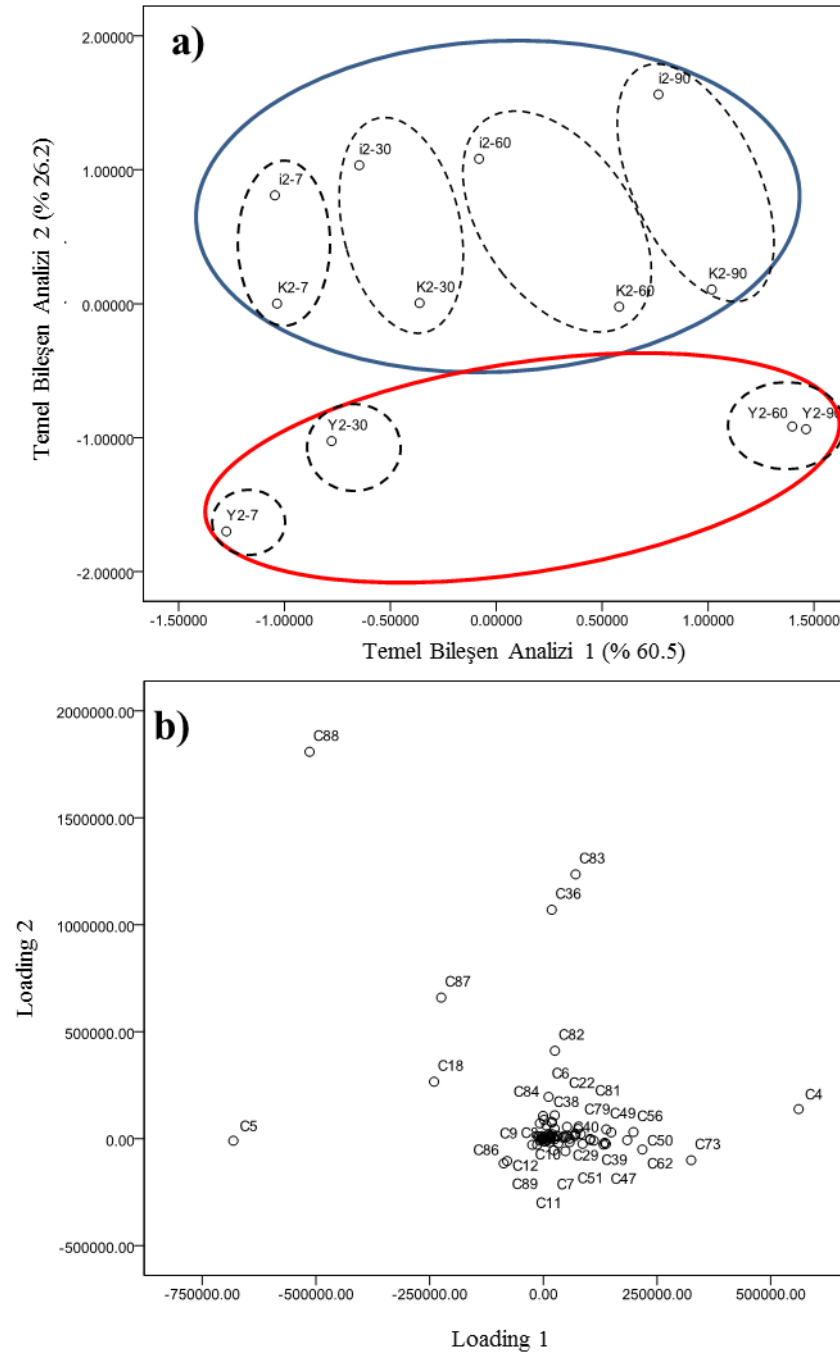
Şekil 4.55 ve Şekil 4.56’de ise sırasıyla *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu ve *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu kullanılarak üretilen peynirlerin olgunlaşma süresince 280nm’deki RP-HPLC peptit profiline ait temel bileşen analizi sonuçları verilmiştir. Buna göre, örnekler olgunlaşmanın 7. gününden itibaren hem olgunlaşma sürelerine göre hem de redoks potansiyellerine göre birbirlerinden ayrılmışlardır. Her iki şekilde de, mavi bölgelerde kontrol (K1 ve K2) ve indirgenmiş (İ1 ve İ2) peynirleri toplanmıştır. İlginç bir şekilde, aynı olgunlaşma süresine sahip kontrol ve indirgenmiş peynirler (K1-İ1 veya K2-İ2) benzer peptit profiline sahip oldukları için aynı kesikli daire içinde toplanmışlardır. Yükseltgenmiş peynirler (Y1 ve Y2) ise kontrol ve indirgenmiş peynirlerden farklı bir peptit profili sergilemiştir ve bu nedenle ayrı bir bölgede (kırmızı) toplanmıştır.



Şekil 4.54. a) *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu kullanılarak üretilen peynirlerde olgunlaşma süresince 214 nm’de RP-HPLC profiline ait temel bileşen analizi (K:Kontrol, İ:İndirgenmiş, Y: Yükseltgenmiş), b) Temel bileşen analizinden elde edilen ve peptitlerin yaklaşık alıkonma sürelerine ait hesaplama verileri (C terimi ve yanında verilen sayısal değer alıkonma süresini ifade etmektedir).



Şekil 4.55. a) *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu kullanılarak üretilen peynirlerde olgunlaşma süresince 280 nm’de RP-HPLC profiline ait temel bileşen analizi (K:Kontrol, İ:İndirgenmiş, Y: Yükseltgenmiş), b) Temel bileşen analizinden elde edilen ve peptitlerin yaklaşık alıkonma sürelerine ait hesaplama verileri (C terimi ve yanında verilen sayısal değer alıkonma süresini ifade etmektedir).



Şekil 4.56. a) *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu kullanılarak üretilen peynirlerde olgunlaşma süresince 280 nm’de RP-HPLC profiline ait temel bileşen analizi (K:Kontrol, İ:İndirgenmiş, Y: Yükseltgenmiş), b) Temel bileşen analizinden elde edilen ve peptitlerin yaklaşık alıkonma sürelerine ait hesaplama verileri (C terimi ve yanında verilen sayısal değer alıkonma süresini ifade etmektedir).

L. lactis subsp. *lactis* CM41 suşu kullanılarak üretilen peynirlerin 280 nm’deki RP-HPLC profillerindeki farklılıklar, alıkonma süresi 4., 5., 36., 62., 73., 83., 86., 87., 88. ve 89. dakikalar olan peptitlerden kaynaklanmaktadır (Şekil 4.55b). *L. lactis* subsp. *cremoris*

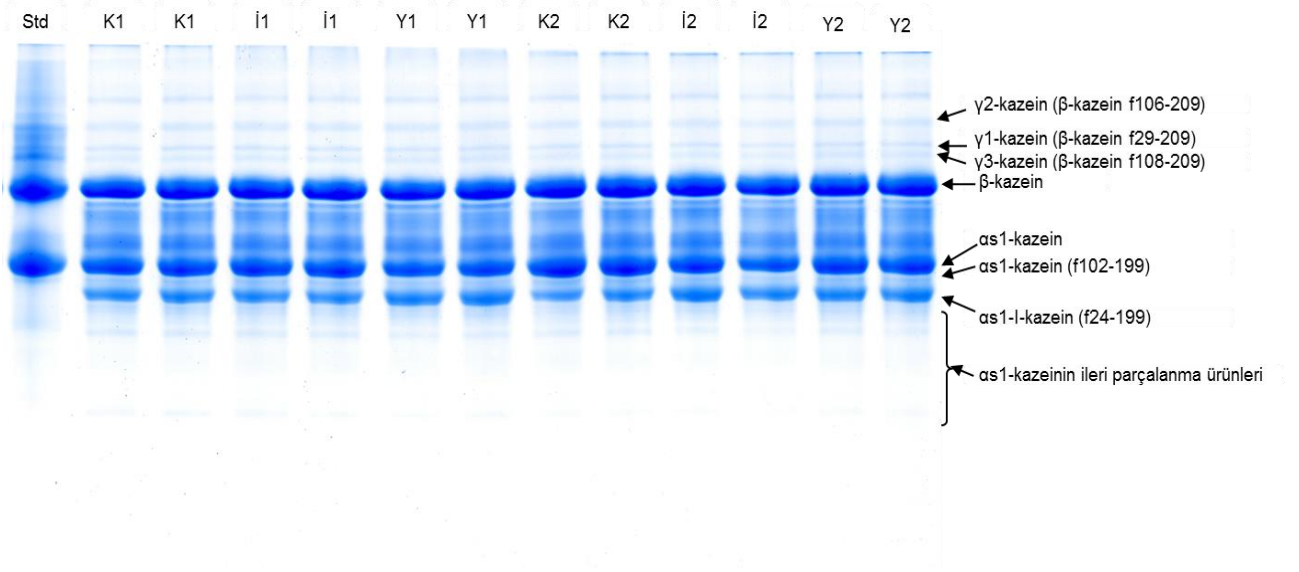
UD459 suşu kullanılarak üretilen peynirlerin ayırımında etkili piklerin, 4., 5., 18., 36., 73., 82., 83., 87. ve 88. dakikada gelen pikler olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.56b).

Üre-Poliakrilamid jel elektroforezi (Üre-PAGE)

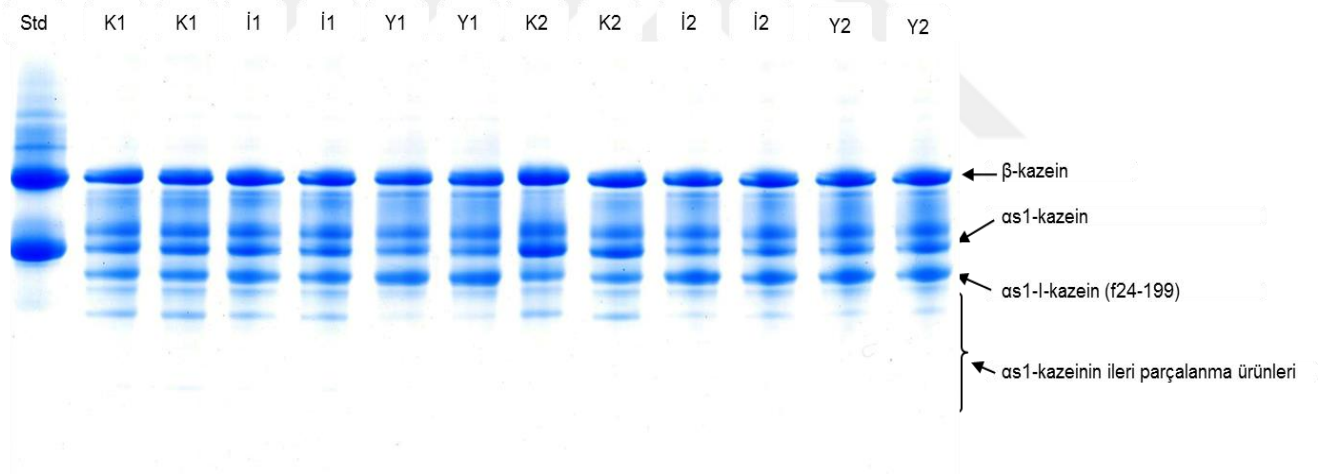
Olgunlaşma süresince peynirde meydana gelen proteoliz, koagülant (kimozen gibi), sütte doğal olarak bulunan proteinazlar (plazmin gibi), starter laktik asit bakterilerinin proteinazları ve peptidazları, starter olmayan laktik asit bakterilerinin proteolitik enzimleri, sekonder starterlerin proteolitik enzimleri ve ekzojen proteinazlar ve peptidazlar tarafından katalizlenmektedir. Kazeinler kalıntı koagülant aktivitesi ve plazmin aktivitesine (ve sütte doğal olarak bulunan diğer proteolitik enzimlerin de aktivitesi olabilir) bağlı olarak birbirinden farklı büyük ve orta büyüklükteki peptitlere hidroliz olmaktadır. Bu peptitler ise starter laktik asit bakterilerinin, starter olmayan laktik asit bakterilerinin ve belki, sekonder mikrofloranın proteinazları ve peptidazları tarafından daha kısa peptitlere ve aminoasitlere hidroliz edilmektedir [165]. Ancak, bu çalışma kapsamında üretilen UF peynirlerde meydana gelen proteolizin daha çok koagülant, sütün doğal proteinazları ve starter laktokokların proteinazları ve peptidazlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Olgunlaşmanın 7. ve 90. gününde peynir örneklerinde meydana gelen proteolizi belirlemek için gerçekleştirilen analize ait elektroforetogramlar sırasıyla Şekil 4.57 ve Şekil 4.58’de verilmiştir.

Şekil 4.57 incelendiğinde, olgunlaşmanın 7. gününde peynir örneklerinin kazein fraksiyonlarının bantları arasında belirgin bir farklılık olmadığı, sadece Y1 ve Y2 peynirlerinin α_{s1} -I-kazein fraksiyonuna ait bantın dansitesinin diğer peynirlerinkine göre biraz daha yüksek olduğu görülmektedir.

Olgunlaşmanın 90. gününde peynir örneklerinin kazein fraksiyonları arasında belirgin farklılıkların olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.58Şekil 4.58). En belirgin farklılık, α_{s1} -I-kazein fraksiyonu ve α_{s1} -kazeinin ileri parçalanma ürünlerinde gözlenmiştir. Y1 ve Y2 peynirlerinde α_{s1} -I-kazein birikiminin söz konusu olduğu ve α_{s1} -kazeinin ileri parçalanma ürünlerinin diğer peynirlere göre daha az olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.57. Olgunlaşmanın 7. gününe ait üre-PAGE elektroforetogramı (Std:Standart (sodyum-kazeinat), K:Kontrol, İ:İndirgenmiş, Y: Yükseltgenmiş, 1: *L. lactis* subsp. *lactis* CM41, 2: *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459) (Bantların tanımlanması [104]'ya göre yapılmıştır.)



Şekil 4.58. Olgunlaşmanın 90. gününe ait üre-PAGE elektroforetogramı (Std:Standart (sodyum-kazeinat), K:Kontrol, İ:İndirgenmiş, Y: Yükseltgenmiş, 1: *L. lactis* subsp. *lactis* CM41, 2: *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459) (Bantların tanımlanması [104]'ya göre yapılmıştır.)

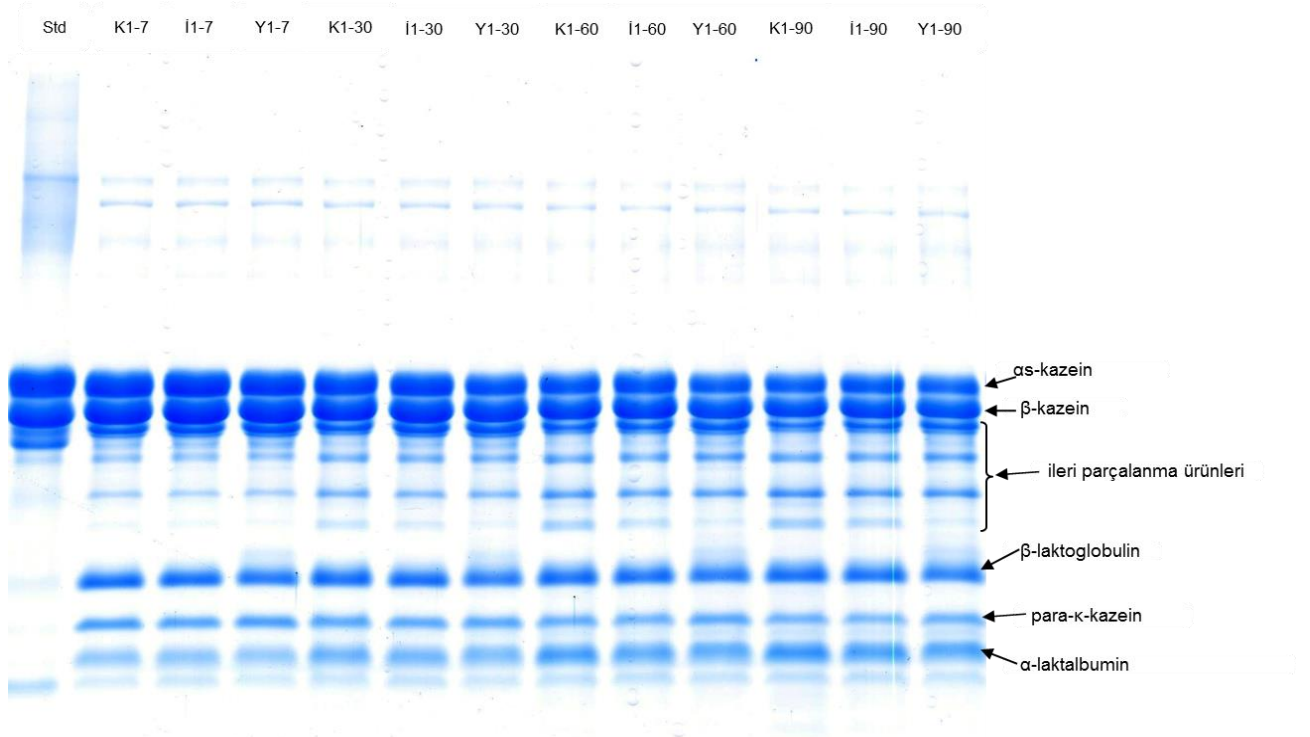
α_{s1} -I-kazein, kimozinin α_{s1} -kazeinin Phe₂₃-Phe₂₄ peptit bağı üzerindeki aktivitesi nedeniyle oluşmaktadır [173, 174]. Bu bağı kırılmasının, peynir tekstürünün başlangıçta yumuşamasından ve starter proteinazları tarafından hızla hidroliz edilen α_{s1} -kazein (f1-23) peptidinden sorumlu olduğu düşünülmektedir [175, 176]. Ayrıca, Y1 ve Y2 peynirlerinde meydana gelen α_{s1} -kazein degradasyonunun ise diğer peynir örneklerine göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Kullanılan redoks ajanlarının ve ortamın redoks potansiyelinin

kimozinin α_{s1} -kazein üzerindeki aktivitesini olumsuz yönde etkilemediği belirlenmiştir. Ancak, α_{s1} -I-kazein fraksiyonunun yükseltgenmiş peynirlerde birikmesinin, yükseltgenmiş redoks potansiyelinin veya potasyum iyodatın veya yükseltgenmiş koşullara bağlı olarak peynirde oluşan bir bileşiğin, starter laktokok proteinazı olan laktosepinin aktivitesini olumsuz etkilemiş olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Laktosepin aktivitesi bu koşullardan olumsuz etkilendiği için α_{s1} -I-kazein fraksiyonunun hidrolizini gerçekleştirememiş ve buna bağlı olarak α_{s1} -I-kazein fraksiyonu yükseltgenmiş peynirlerde birikmiş olabilir.

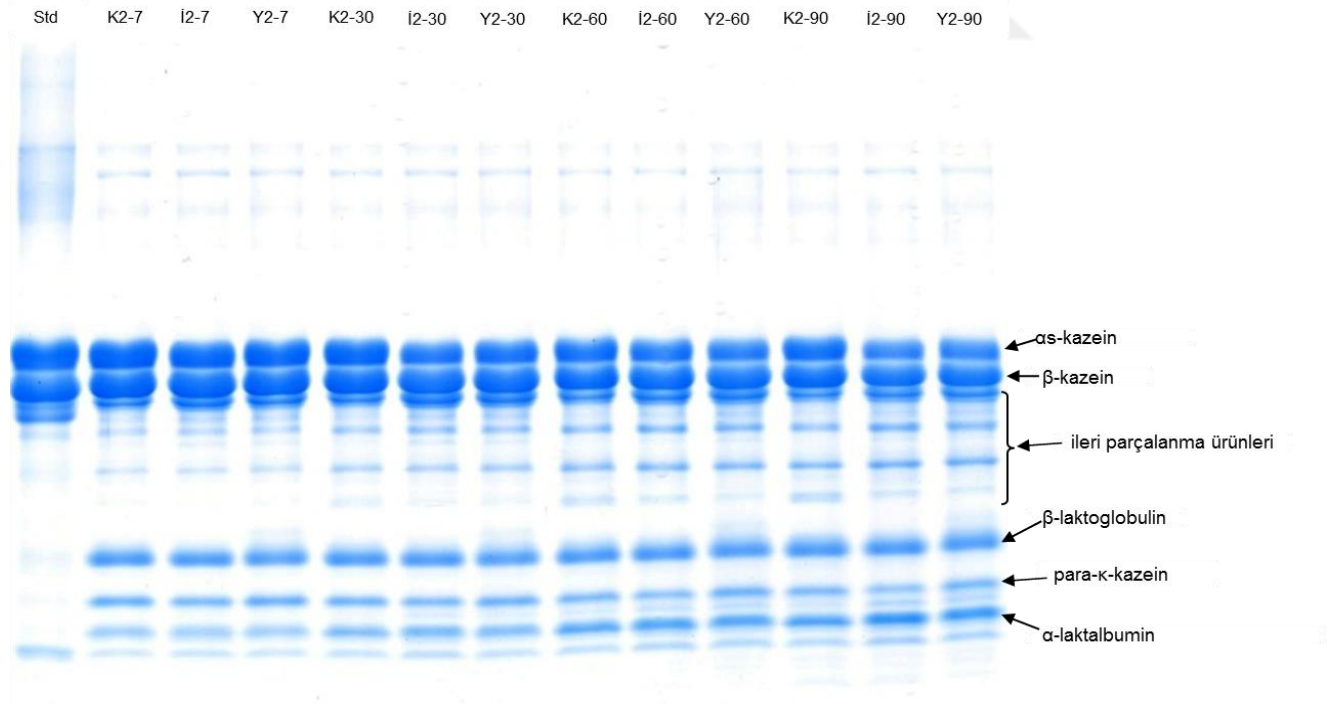
Buna ek olarak, α_{s1} -kazein degradasyonunun β -kazein degradasyonuna göre daha hızlı gerçekleştiği görülmektedir. Bunun nedeninin, UF peynir üretiminde kullanılan kimozinin tamamının peynirin yapısında kalması ve bunun hidrolitik aktivitesini β -kazeinden çok α_{s1} -kazein üzerinde sergilemesi olduğu düşünülmektedir. Peynirde bulunan tuz, pH'ya da bağlı olarak β -kazeinin kimozin tarafından hidrolizini olumsuz etkilemektedir [177]. Plazminin β -kazein, α_{s2} -kazein ve α_{s1} -kazein üzerindeki spesifikliğı bilinmektedir, fakat plazminin peynirdeki en önemli substratı β -kazeindir [163]. Bir çalışmada, serum proteinlerinin UF peynirlerde yüksek konsantrasyonda bulunduğu ve kimozin, mikrobiyel rennetler ve diğer proteinazlar ve peptidazların aktivitelerini inhibe edebildiğı belirtilmiştir [178]. Ancak, çalışmamızda UF peynirlerde olgunlaşma süresince proteolizin devam ettiği belirlenmiştir.

Sodyum dodesil sülfat- Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS- PAGE)

Proteinleri yük ve molekül ağırlıklarına göre ayırdığı için peynirdeki proteolizi gözlemlemek için çoğunlukla üre-PAGE kullanılmaktadır. Ancak, SDS-PAGE proteinleri sadece molekül ağırlıklarına göre ayırdığı ve kazeinlerin molekül ağırlıkları birbirine yakın olduğu için, peynirde gerçekleşen proteolizi incelemek için çok uygun bir yöntem olmadığı bildirilmiştir [165]. Ancak, Ong ve ark.'ı [179] olgunlaşma süresince peynirde meydana gelen proteolizi belirlemek amacıyla SDS-PAGE uygulamıştır. Bu çalışmada, SDS-PAGE yapılmasının nedeni, diğer peynir çeşitlerinin aksine serum proteinlerinin UF peynirin yapısında kalması nedeniyle, olgunlaşma süresince α -laktalbumin ve β -laktoglobulinde meydana gelen değişimleri belirlemektir. Şekil 4.59 ve Şekil 4.60'ta, sırasıyla, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 kullanılarak üretilen peynirlere ait SDS-PAGE elektroforetogramları verilmiştir. α_{s1} -kazein ve α_{s2} -kazein SDS-PAGE ile ayıramamıştır. Yapılan benzer bir çalışmada da, bu iki kazeinin molekül ağırlıklarının birbirine çok yakın olması nedeniyle ayıramadığı belirtilmiştir [179].



Şekil 4.59. *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 kullanılarak üretilen peynirlere ait SDS-PAGE elektroforetogramı (Std: Standart (sodyum-kazeinat), K:Kontrol, İ:İndirgenmiş, Y: Yükseltgenmiş, 7-30-60-90: Olgunlaşma süreleri) (Bantların tanımlanması [179]'a göre yapılmıştır.)



Şekil 4.60. *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 kullanılarak üretilen peynirlere ait SDS-PAGE elektroforetogramı (Std: Standart (sodyum-kazeinat), K:Kontrol, İ:İndirgenmiş, Y: Yükseltgenmiş, 7-30-60-90: Olgunlaşma süreleri) (Bantların tanımlanması [179]'a göre yapılmıştır.)

Her iki suş kullanılarak üretilen peynirlerin SDS-PAGE elektroforetogramları incelendiğinde, örnekler arası farklılıkların α_s -kazeinlerin ve β -kazeinin parçalanma ürünlerine ait bantlardan ve β -laktoglobuline ait banttın kaynaklandığı görülmektedir. Yükseltgenmiş peynirlerin (Y1 ve Y2) α_s -kazeinlerin ve β -kazeinin parçalanma ürünlerine ait bantların dansitesinin olgunlaşma süresince diğer peynirlerinkine göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durumun, proteolizi belirlemeye yönelik yapılan diğer analiz sonuçlarında da olduğu gibi yükseltgenmiş peynirlerde laktosepinin aktivitesini yitirmiş veya azalmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, yükseltgenmiş peynirlerin β -laktoglobulin bantlarının hemen üzerinde daha az yoğunluğa sahip bir bantın olduğu belirlenmiştir. Bu bantın, β -laktoglobulinin oksidasyonu sonucu oluşan türevlerine ait olduğu düşünülmektedir.

4.6.5 Serbest Yağ Asidi Analizi

Lactococcus subsp. ve *Lactobacillus* subsp., *Pseudomonas* gibi bakterilere ve küflere kıyasla düşük lipolitik aktiviteye sahiptir. Bununla birlikte, kuvvetli lipolitik ajanların yokluğunda ve peynirin olgunlaşması gibi uzun bir süre boyunca, laktik asit bakterilerinin yüksek sayılarda bulunması durumunda, pastörize süttten üretilen Cheddar ve Hollanda tipi peynirlerde laktokok ve laktobasillerin lipazları/esterazları başlıca lipolitik ajanlardır. Starter yerine GDL ile asitleştirilen aseptik peynirlerdeki serbest yağ asidi konsantrasyonunun düşük olduğu ve olgunlaşma süresince konsantrasyonunun artmadığı belirlenmiştir. Laktik asit bakterilerinin lipaz/esteraz aktivitesi tamamen hücre içi olduğu düşünülmektedir. Çeşitli laktik asit bakterilerinin hücre içermeyen ekstraktlarının pH 6 ile 8 arasında ve 37 °C'de tribütirin üzerinde daha aktif olduğu ve uzun zincirli yağ asitlerinin (>C₁₀ gibi) trigliseritleri üzerinde düşük aktivite sergilediği veya hiç aktivite göstermediği saptanmıştır. Esteraz / lipaz aktivitesi açısından suşlar arasında önemli farklılıklar olduğu ve bazı suşların iki esteraza sahip olduğu belirlenmiştir. Starter bakteriler, süt lipoprotein lipazı gibi diğer lipazlar tarafından üretilen mono- ve digliseritlerden serbest yağ asitlerinin hidrolizini gerçekleştirebilmektedir [180].

Tez kapsamında serbest yağ asidi analizleri GC sistemi ile yapılmış olup örnek kromatogram Ek 2'de verilmiştir. Çizelge 4.26'da peynirlerde bulunan toplam serbest yağ asidi konsantrasyonunun olgunlaşma süresince değişimi ve olgunlaşmanın 90. günündeki 10 farklı serbest yağ asidinin konsantrasyonu görülmektedir. Buna göre, peynirlerin toplam serbest yağ asidi konsantrasyonunun genellikle olgunlaşma süresince artış gösterdiği saptanmıştır (P<0.05). Ayrıca, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu kullanılarak üretilen

peynirlerdeki toplam serbest yağ asidi konsantrasyonunun, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu ile üretilen peynirlere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, peynirlerin redoks potansiyellerinin lipoliz üzerinde herhangi bir belirgin etkisi saptanmamıştır. Ancak, yapılan bir başka çalışmada, indirgenmiş E_h koşulları altında olgunlaştırılan peynirlerde, uçucu yağ asitlerinin üretiminin arttığı bildirilmiştir [50].

Çizelge 4.26. Olgunlaşmanın 7., 30., 60. ve 90. günlerinde peynirlerde bulunan toplam serbest yağ asidi konsantrasyonu ve olgunlaşmanın 90. günündeki 10 farklı serbest yağ asidinin her birinin konsantrasyonu

Olgunlaşma süresi (gün)	Toplam/Her bir serbest yağ asidinin konsantrasyonu (mg/kg peynir)					
	K1	İ1	Y1	K2	İ2	Y2
7	909.4±68.0	956.7±65.1	1030.2±83.7	1148.1±17.5	1098.7±37.8	1138.4±30.5
30	1082.7±6.5	1142.6±12.0	1200.7±10.0	1301.8±58.0	1294.8±78.1	1273.2±2.9
60	1401.1±125.7	1395.5±67.0	1434.2±15.7	1623.0±141.9	1640.0±26.5	1522.5±28.0
90	1611.8±79.1	1498.0±20.0	1514.9±107.8	1576.4±58.0	1615.7±14.7	1472.6±79.1
Yağ asidi						
C _{4:0}	4.8±0.2	3.5±0.1	4.3±0.3	2.6±0.7	3.1±0.4	3.5±0.1
C _{6:0}	3.1±0.4	2.1±0.1	2.7±0.2	1.6±0.5	2.2±0.5	2.5±0.2
C _{8:0}	6.0±0.1	5.1±0.2	5.5±0.1	4.6±1.0	5.2±0.1	4.9±0.2
C _{10:0}	36.4±1.1	31.1±0.7	27.3±2.3	36.2±9.1	31.1±0.5	28.8±4.6
C _{12:0}	68.3±1.9	60.0±4.8	56.6±8.8	62.7±12.8	69.2±5.6	63.1±23.5
C _{14:0}	130.1±9.6	120.3±1.0	107.1±8.8	115.1±3.1	122.0±3.9	108.8±9.4
C _{16:0}	791.5±37.2	706.8±1.4	704.8±44.1	736.5±19.0	750.3±8.9	667.5±26.2
C _{18:0}	180.1±6.1	157.9±16.1	179.7±18.9	176.5±1.2	176.4±3.7	140.5±11.3
C _{18:1}	333.8±17.2	353.3±1.2	368.9±22.5	382.0±10.7	392.9±6.4	388.6± 2.6
C _{18:2}	57.8±5.3	57.9±0.1	58.2±2.7	58.8±4.4	63.2±0.6	64.4±1.1

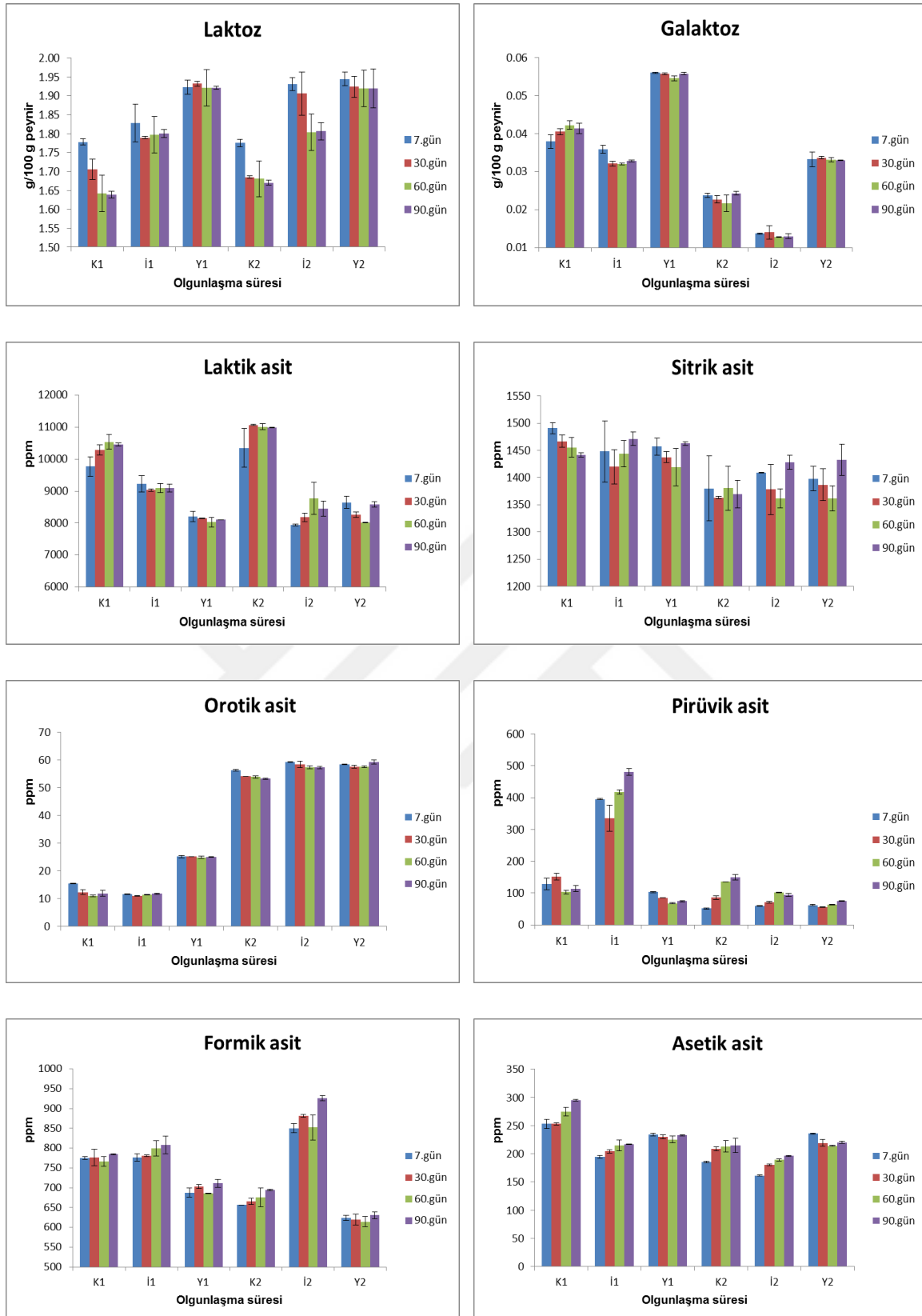
Ayrıca, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu kullanılarak üretilen peynirlerdeki kısa zincirli yağ asitlerinin (C_{4:0}, C_{6:0}, C_{8:0}) konsantrasyonu ile *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu kullanılarak üretilen peynirlerdeki kısa zincirli yağ asitlerinin konsantrasyonu arasında düşük düzeyde farklılıklar belirlenmiştir. Bu kısa zincirli yağ asitleri, düşük algı eşiklerine bağlı olarak peynirin tat-kokusuna direkt olarak katkıda bulunmaktadır [126]. Buna ek olarak, kısa zincirli yağ asitleri peynirde aroma bileşiklerinin (metil ketonlar gibi) oluşumunda substrat olarak da rol oynayabilmektedir [124]. Her bir kısa zincirli serbest yağ asidinin karakteristik bir tat-kokuya sahip olduğu bildirilmiştir. Bütirik asit ransit ve peynirimsi tat-koku verirken, hekzanoik asit keskin ve küflü peynir tat-kokusuna ve oktanoik asit ise sabunumsu, küflü, ransit ve meyvemsi tat-kokuya sahiptir [181]. Yapılan bir çalışmada, ticari ek kültür (*L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* içeren) ile

Üretilen Feta peynirlerindeki serbest yağ asidi konsantrasyonunun kontrol peynirinden farklı olmadığı ve bu kültürlerin düşük lipolitik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [182].

4.6.6 Organik Asit ve şeker Analizi

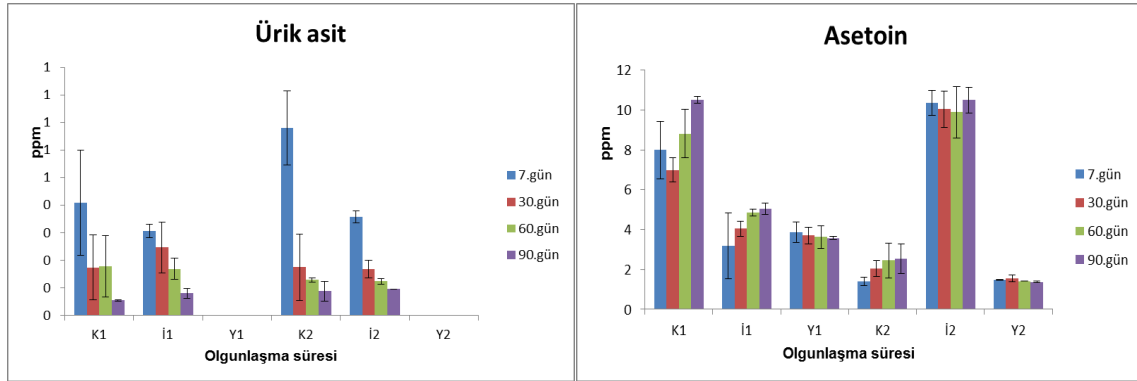
Organik asitler, süt ürünlerinde normal hayvan metabolizması, üretim ve olgunlaşma süresince süt proteinleri, yağ, laktoz ve sitratın yıkımı sonucu oluşmaktadır. İdeal koşullar altında, peynirde bulunan şekerler laktik asite dönüştürülmektedir. Ancak, peynirin olgunlaşması süresince, bakterilerin gelişimi düşük pH, düşük su aktivitesi ve yüksek tuz konsantrasyonu gibi uygun olmayan koşullarda gerçekleşmektedir. Bu durum, bakterileri diğer organik asitlerin üretildiği alternatif biyokimyasal yolları kullanmaya zorlamaktadır. Bunun sonucunda, asetat, asetoin, CO₂, etanol, format ve gliserol gibi çok çeşitli son ürünler üretilmektedir [183]. Organik asitler süt ürünlerinin tat-kokusunda önemli rol oynamaktadır. Bazı araştırmacılar, peynirin olgunlaşması sırasında starter aktivitesini ve bakteriyel gelişimi belirlemek için bazı organik asitlerin seviyesini kullanmaktadır. Ayrıca, organik asitler fermentasyon türünü ve beklenen olgunlaşma seviyesine ulaşıldığını gösterebilmektedir [184]. şekil 4.61’de, peynir örneklerinde bulunan şekerlerin, organik asitlerin ve asetoin konsantrasyonlarının olgunlaşma süresince değişimi görülmektedir. Ayrıca, Ek 3’te organik asit analizine ait örnek kromatogramlar verilmektedir.

Peynir retiminde kullanılan tam yağlı UF sütün laktoz (%), galaktoz (%), sitrik asit (ppm), orotik asit (ppm), pirüvik asit (ppm), laktik asit (ppm), ürik asit (ppm), formik asit (ppm), asetik asit (ppm) ve asetoin (ppm) konsantrasyonları, sırasıyla, 4.34±0.12, 0.02±0.01, 1819±72.18, 113.39±5.23, 34.37±12.69, 161.84±7.11, 11.26±0.27, 981.13±217.55, 205.96±53.91 ve 0.22±0.06 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.61. Peynirlerdeki şekerler, organik asitler ve aseton konsantrasyonlarının olgunlaşma süresince değişimi

Şekil 4.61 devam ediyor.



Şekil 4.61. Peynirlerdeki şekerler, organik asitler ve asetoin konsantrasyonlarının olgunlaşma süresince değişimi

Pek çok peynir çeşidinde, sütte bulunan laktozun büyük bir kısmı, peynir üretimi sırasında, laktoz veya laktat olarak peyniraltı suyu ile birlikte yapıdan uzaklaşmaktadır. Kalan laktoz ise olgunlaşmanın erken döneminde, hızla L-laktata metabolize edilmektedir [163]. Ancak, UF beyaz peynir üretiminde UF retentantında bulunan laktozun tamamı yapıda kalmakta ve bunun bir kısmı peynir üretimi ve olgunlaşması süresince metabolize edilmektedir. Şekil 4.61 incelendiğinde, UF retentantında bulunan % 4.34 laktozun, peynir örneklerinde olgunlaşma sırasında % 1.95'in altına düştüğü gözlenmektedir. Ayrıca, peynirlerin laktoz konsantrasyonlarındaki değişim pH (Çizelge 4.25) ve titrasyon asitliği (Şekil 4.42) değerleri ile birlikte incelendiğinde, beklenildiği üzere, pH'sı diğer peynirlere göre yüksek olan ve dolayısıyla, titrasyon asitliği düşük olan Y1 ve Y2 peynirlerinin laktoz konsantrasyonlarının diğer peynirlere göre olgunlaşma süresince daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum, Y1 ve Y2 peynirlerinde bulunan starter laktokokların olgunlaşma süresince canlılıklarını yitirmelerine bağlı olarak laktoz fermantasyonunu gerçekleştirememiş olmalarından kaynaklanmaktadır.

Laktokoklar tarafından gerçekleştirilen laktoz metabolizması fosfoenol pirüvat-fosfotransferaz sistemlerini içermektedir. Bu sistemde, laktozun fosforilasyonu gerçekleşmekte ve hücre içine laktoz-6-fosfat olarak taşınmaktadır. Ardından, laktoz-6-fosfat, fosfo- β -galaktosidaz tarafından glukoz ve galaktoz-6-fosfata hidroliz edilmektedir [185]. Daha sonra, glukoz Embden-Meyerhof-Parnas yolu aracılığıyla pirüvata metabolize edilmektedir. Galaktoz-6-fosfat ise D-tagatoz-6-fosfat yolu ile triyoz fosfat ara ürünlerine metabolize edilmektedir. Bu ara ürünler Embden-Meyerhof-Parnas yoluna girmekte ve pirüvata dönüştürülmektedir. Pirüvatin laktata dönüşümü laktat dehidrogenazı

içermektedir. Laktat dehidrogenazın aktivitesi, sistemde üretilen laktik asitin düzeyini belirlemektedir [183]. Yapılan bir çalışmada, laktat dehidrogenazın aktivitesinin, hücredeki NADH/NAD⁺ oranı tarafından kontrol edildiği bildirilmiştir. Laktat dehidrogenazın, NADH/NAD⁺ oranına son derece duyarlı olduğu ve *in vitro* koşullarda NADH/NAD⁺ oranı 0.03'ten düşük olduğunda tamamen inhibe olduğu belirtilmiştir [186].

Şekil 4.61 incelendiğinde, peynirlerde bulunan laktik asit konsantrasyonlarının pH, % titrasyon asitliği ve % laktoz değerleri ile uyum içinde olduğu belirlenmiştir. Kontrol peynirlerindeki (K1 ve K2) laktik asit konsantrasyonunun diğer peynirlere göre daha yüksek olduğu, bunu indirgenmiş peynirlerin (İ1 ve İ2) izlediği ve yükseltgenmiş peynirlerin (Y1 ve Y2) ise en düşük laktik asit konsantrasyonuna sahip olduğu belirlenmiştir. Yükseltgenmiş peynirlerdeki laktik asit konsantrasyonunun düşük olmasının nedeninin bu ortamda laktokokların canlılıklarını yitirmesi olduğu düşünülmektedir. Üretimin başından itibaren indirgenmiş ortama sahip olan peynirlerde (İ1 ve İ2), olgunlaşma süresince starter laktokokların canlılıklarını korumalarına rağmen, laktik asit konsantrasyonunun düşük olmasının, hücrelerdeki NADH/NAD⁺ oranının değişiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu peynirlerin üretiminde, UF retentantında indirgenmiş koşulların oluşturulmasına bağlı olarak, inokülasyonu gerçekleştirilen hücrelerdeki NADH/NAD⁺ oranının değişmesi nedeniyle laktat dehidrogenaz aktivitesinin azaldığı ve laktik asit sentezinin yavaşladığı düşünülmektedir. Ayrıca, Bölüm 4.2 ve Bölüm 4.4.1'de, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu tarafından gerçekleştirilen yağsız UHT sütün asidifikasyonu ve fermente sütün redoks potansiyelinin kontrol altında tutulması deneylerinde elde edilen sonuçlar da birlikte değerlendirildiğinde bu sonucu destekler nitelikte bulgular elde edilmektedir. Sadece peynir üretiminde indirgen ajan olarak kullanılan sodyum hidrosülfidin değil, bunun yanında diğer indirgen ajanlar da kullanılarak oluşturulan indirgenmiş ortamda pH'nın düşüşünün geciktiği yani laktik asit sentezinin yavaşladığı belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, indirgen koşulların 37 °C'de *L. plantarum*'un gelişimini yavaşlattığı ve asidifikasyonun geciktiği, aynı etkinin 10 °C'de gözlenmediği bildirilmiştir. Araştırmacılar, bu durumun, ATPaz aktivitesi, membran akışkanlığı ve yüzey özelliklerinde meydana gelen değişim ile açıklanabileceğini belirtmiştir [37].

Sütte bulunan sitrat, trikarboksilik asit çevrimine katılmakta ve burada hem substrat hem de ürün olarak rol oynamaktadır. Sitrat, pirüvik asit, CO₂ ve asetik asit üretmek için sitratı fermente edebilen laktik asit bakterileri tarafından substrat olarak kullanılabilir

[116]. Ayrıca, sitrat birçok laktik asit bakterisi tarafından asetat, asetaldehit ve diasetil gibi tat-koku bileşenlerine metabolize edilmektedir [187]. *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu kullanılarak üretilen peynirlerdeki sitrik asit konsantrasyonunun, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu ile üretilen peynirlerdekine göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşunun sitratı daha yüksek oranda metabolize edebildiği söylenebilir. Peynirlerin redoks potansiyellerinin sitrat tüketimi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, peynir örneklerindeki sitrat konsantrasyonunun olgunlaşma süresince artan ve azalan değişimler gösterdiği saptanmıştır. Salamura beyaz peynirde ve Cheddar peynirinde gerçekleştirilen farklı çalışmalarda da, peynirin olgunlaşması süresince sitrik asit konsantrasyonunun artan ve azalan değişimler gösterdiği belirtilmiştir [183, 188]. Upreti ve ark.'ı [183] yaptıkları araştırmada, sitrat konsantrasyonunun artmasının nedeninin, laktik asit bakterilerinin pirüvat karboksilazı kullanarak karbon dioksiti bağlaması ve pirüvatın oksaloasetata dönüştürülmesi ve ardından oksaloasetatın sitrat sentaz aktivitesine bağlı olarak sitrata veya asonitaz varlığında izositrata dönüştürülmesi olabileceğini belirtmişlerdir. Ardından, çalışmalarında kullandıkları HPLC koşullarında sitrat ve izositratı birbirinden ayıramadıklarını bildirmişlerdir.

Sütte bulunan ve nükleik asitlerin öncülü rolünü üstlenen orotik asit besinsel açıdan oldukça önemli bir organik asittir [189]. Peynir üretiminde kullanılan sütteki orotik asit konsantrasyonunun, peynirde azalması, laktokoklar tarafından metabolize edilebildiğini akla getirmektedir. Ayrıca, Şekil 4.61 incelendiğinde, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu kullanılarak üretilen peynirlerdeki orotik asit konsantrasyonunun, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu ile üretilen peynirlerdekine göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Buna göre, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşunun orotik asiti daha yüksek oranda metabolize ettiği düşünülmektedir. Upreti ve ark.'nın [183] yaptığı çalışmada, benzer şekilde peynirde bulunan orotik asitte olgunlaşma süresince meydana gelen değişimin laktik asit bakterilerinin metabolik aktiviteleri ile ilgili olabileceği bildirilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise, olgunlaşma süresince orotik asit konsantrasyonunun azalmasının, bu asitin laktik asit bakterileri tarafından büyüme faktörü olarak kullanılabilmesi ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür [190]. Ayrıca, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu ile üretilen peynirlerdeki orotik asit konsantrasyonları karşılaştırıldığında, Y1'deki orotik asit konsantrasyonunun İ1 ve K1'e göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Upreti ve ark.'nın [183] yaptığı çalışmada, yüksek laktoz içeriğine sahip peynirlerdeki orotik asit

konsantrasyonunun, düşük laktoz içeriğine sahip peynirlerinkine göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Y1 peynirindeki orotik asit konsantrasyonunun diğer peynirlere göre yüksek olması da yüksek laktoz içeriği ile açıklanabilir.

Sütte yaklaşık 11.26 ppm konsantrasyonunda bulunan ürik asitin, peynirlerde 0-0.7 ppm arasında bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca, K1, İ1, K2 ve İ2 peynirlerinde bulunan ürik asit miktarının olgunlaşma süresince azaldığı gözlenmiştir. Ancak olgunlaşmanın başından itibaren yükseltgenmiş peynirlerde ürik asite rastlanmamıştır. Bunun, ürik asitin yükseltgenmiş ortamda oksidasyona uğramasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ürik asit indirgen bir ajan (elektron verici) ve güçlü bir antioksidandır. Ürik asitin, C vitamini ve E vitamini ile birlikte, insanlarda, toplam serum antioksidan aktivitesine önemli katkı sağladığı bildirilmiştir [191].

Pirüvik asit, glikolizde oluşan bir ara üründür. Ayrıca, birkaç metabolik reaksiyonda (formik asit, etanol ve diasetil oluşumu) görev almaktadır [188]. Yapılan bir çalışmada; Feta peynirlerinde pirüvik asit değerlerinin depolama süresince azaldığı belirtilmiştir [115]. Şekil 4.61 incelendiğinde, peynirlerdeki pirüvik asit konsantrasyonunun yaklaşık 51.66 ile 481.24 ppm arasında değiştiği görülmektedir. İ1 peynirindeki pirüvik asit konsantrasyonunun diğer peynirlere göre çok yüksek olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, bu farklılığın, pirüvatın şeker metabolizmasında anahtar ara ürün olmasından, glikolitik yolda kolaylıkla oluşmasından ve ayrıca, birçok metabolik reaksiyonda substrat olarak rol oynayabilmesinden kaynaklandığı bildirilmiştir [192].

Laktik asit bakterileri heterotrofik kemo-organotroflardır ve böylece, ortamda bulunan substratların miktarı laktik asit bakterilerinin gelişimini ve metabolik yollarını etkilemektedir [183]. *L. lactis*'in fermantasyon davranışında meydana gelen homofermantatıftan heterofermantatife değişimin ilk kanıtı Thomas ve ark.'ı [193] tarafından ortaya konmuştur. Laktokokların sınırlı glukoz konsantrasyonuna sahip kemostatta gelişmeleri durumunda, format, asetat ve etanol oluşumunun gerçekleştiği gözlenmiştir [193].

Asetik asitin, aminoasitlerin metabolize edilmesi, laktik ve sitrik asit fermantasyonları gibi birçok kimyasal olayın ürünlerinden olduğu bilinmektedir. Asetik asitin, peynir aromasına da önemli katkısı olduğu bildirilmiştir [115]. Asetik asit, sitrat, laktoz ve aminoasitlerden üretilmektedir [194]. Yapılan bir çalışmada, aminoasitlerin (alanin ve serin) oksidatif deaminasyonu veya dekarboksilasyonu sonucu asetik asit üretilbildiği bulunmuştur [126].

Peynir örneklerindeki asetik asit konsantrasyonunun olgunlaşma süresince 161.28 ile 294.93 ppm arasında değiştiği saptanmıştır. Salamura beyaz peynirde gerçekleştirilen bir çalışmada, asetik asit konsantrasyonunun 12 aylık olgunlaşma süresi boyunca, 50 ile 1000 ppm arasında artan ve azalan değişimler gösterdiği bulunmuştur [188]. Ayrıca, formik asit konsantrasyonunun en yüksek olduğu peynirlerin sırasıyla, İ2, İ1 ve K1 peynirleri olduğu saptanmıştır. Peynirlerdeki formik asit konsantrasyonu olgunlaşma süresince genellikle artan bir eğilim göstermiştir.

Asetoin, sitratın laktik asit bakterileri (özellikle starter dışı laktobasiller) tarafından metabolize edilmesi sonucu oluşan ve peynir aromasına katkıda bulunan uçucu bir bileşiktir [163]. Asetoin üretiminin en yüksek olduğu peynirler sırasıyla İ2 ve K1 peynirleridir. Peynirlerdeki asetoin konsantrasyonunun olgunlaşma süresince artan ve azalan değişimler gösterdiği belirlenmiştir. Ancak, sitrat konsantrasyonu ile asetoin konsantrasyonu arasında herhangi bir ilişki saptanamamıştır.

4.6.7 Uçucu Bileşiklerin Analizi

Peynirlerde bulunan uçucu bileşikler olgunlaşma süresince değişimi SPME GC-MS ile saptanmıştır. Örneklere ait kimi kromatogramlar Ek 5’de paylaşılmıştır. Peynir örneklerine ait uçucu bileşiklerin analiz sonuçları, uçucu bileşiğin pik alanının internal standardın pik alanına oranı olarak Çizelge 4.27, Çizelge 4.28, Çizelge 4.29, Çizelge 4.30, Çizelge 4.31 ve Çizelge 4.32’de verilmiştir. Ayrıca, belirlenen bazı uçucu bileşenlere ait aromatik tanımlama Ek 4’de yer almaktadır. Peynirde bulunan asitler, hem peynirin tat-kokusuna katkıda bulunmakta, hem de ketonlar, alkoller, esterler ve laktonlar gibi diğer bazı aroma bileşiklerinin öncülleri olarak görev yapmaktadır. [124]. Çizelge 4.27’de peynir örneklerinde bulunan uçucu asitlerin olgunlaşma süresince değişimi verilmiştir. Buna göre, genel olarak, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 ile üretilen peynirlerdeki uçucu karboksilik asit miktarının *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu ile üretilen peynirlere göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Peynir örneklerinde olgunlaşma süresince saptanan uçucu karboksilik asitler, asetik asit, propanoik asit, 2-metil-propanoik asit, bütanoik asit, 3-metil bütanoik asit, pentanoik asit, hekzanoik asit, 2-etil hekzanoik asit, heptanoik asit, oktanoik asit, nonanoik asit ve dekanolik asittir. Ortamın redoks potansiyelinin, peynirlerde bulunan asitlerin konsantrasyonunu etkilemediği belirlenmiştir. Benzer şekilde, Cheddar peynirinde yapılan bir çalışmada, farklı redoks potansiyeline sahip peynir örnekleri arasında asit miktarı açısından önemli bir farklılığın olmadığı bildirilmiştir [158].

Çizelge 4.27. Peynir örneklerine ait uçucu bileşiklerin (asitler) analiz sonuçları^a

Uçucu Bileşen										
Asitler	A.S.	A.İ.	Tanımlama Yöntemi	Olg.süresi (gün)	K1	İ1	Y1	K2	İ2	Y2
Asetik asit	29.28	1443	MS,Aİ,DS	7	46.7	39.3	44.7	65.4	48.7	62.6
				30	53.8	46.0	39.4	59.7	40.9	41.2
				60	46.8	36.9	42.0	53.0	44.8	38.9
				90	31.0	35.8	24.7	46.2	37.4	32.1
Propanoik asit	31.92	1540	MS,Aİ,DS	7	0.2	0.2	0.2	0.5	-	0.5
				30	0.4	0.4	0.4	0.7	-	0.0
				60	-	0.3	0.5	0.7	-	0.5
				90	0.9	1.3	1.0	2.0	1.4	1.6
2-Metil-propanoik asit	32.64	1568	MS,Aİ	7	1.0	0.9	0.9	3.6	1.4	3.2
				30	1.2	0.8	0.8	3.3	0.9	1.8
				60	1.5	0.9	1.2	3.0	1.2	2.2
				90	1.2	1.1	0.9	4.2	1.4	2.7
Bütanoik asit	34.06	1625	MS,Aİ,DS	7	17.4	13.8	18.2	24.2	19.3	22.6
				30	20.2	17.4	16.7	21.7	16.5	14.6
				60	26.1	19.1	22.8	23.5	20.1	17.8
				90	17.9	22.3	16.2	28.8	21.5	19.2
3-Metil bütanoik asit	35.14	1668	MS,Aİ	7	2.4	2.0	2.3	7.9	4.0	7.1
				30	3.0	2.4	1.9	7.9	3.2	4.4
				60	0.2	2.2	2.5	7.0	3.3	5.0
				90	2.8	2.7	2.3	11.5	4.6	6.8
Pentanoik asit	36.64	1729	MS,Aİ,DS	7	-	-	-	-	-	-
				30	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.2
				60	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2
				90	1.0	1.1	0.6	1.2	0.8	0.7
Hekzanoik asit	39.11	1840	MS,Aİ,DS	7	20.2	18.9	21.5	28.4	27.5	29.7
				30	27.4	29.7	20.9	33.7	31.6	23.2
				60	27.6	24.4	27.7	30.8	32.4	29.4
				90	31.6	40.0	27.2	47.0	44.0	35.6
2-Etil hekzanoik asit	41.2	1937	MS,Aİ	7	2.6	2.8	1.4	4.7	3.8	3.0
				30	1.3	1.6	0.3	1.1	1.2	0.9
				60	2.0	0.3	0.3	0.8	0.6	0.4
				90	1.9	0.8	0.3	0.6	0.5	0.3
Heptanoik asit	41.3	1942	MS,Aİ,DS	7	2.4	2.5	1.9	3.9	3.3	3.0
				30	1.9	2.0	0.9	1.7	1.8	1.4
				60	1.2	0.7	0.8	1.1	1.2	1.1
				90	1.9	1.6	1.0	1.8	1.5	1.2
Oktanoik asit	43.61	2054	MS,Aİ,DS	7	12.0	13.8	15.0	16.7	17.0	16.1
				30	17.0	15.7	13.1	18.5	20.4	15.8
				60	17.9	15.8	17.1	19.2	21.0	17.0
				90	8.1	13.8	14.5	16.6	20.4	15.7

Nonanoik asit	45.68	2156	MS,Aİ,DS	7	14.7	16.7	13.0	21.8	14.6	12.3
				30	6.2	5.0	3.5	4.3	5.4	5.2
				60	4.7	2.2	2.5	3.5	3.9	2.1
				90	1.2	0.9	0.6	0.7	0.8	0.6
Dekanoik asit	47.69	2285	MS,Aİ,DS	7	2.4	1.8	4.5	2.5	2.5	3.7
				30	4.4	4.1	4.4	4.7	4.5	5.4
				60	7.8	7.5	7.1	7.2	8.4	7.4
				90	1.4	3.0	3.6	4.0	5.8	4.9

^a Sonuçlar uçucu bileşik pik alanı/internal standart pik alanı olarak verilmiştir. **A.S:** Alıkonma süresi; **A.İ:** Alıkonma indeksi, **DS:** Dış standart. Aksi belirtilmedikçe bu kısaltmalar ve birim ifadesi, bu bölüm altında verilen bütün çizelgelerde geçerlidir.

Peynirde meyvemsi tat-kokudan sorumlu olan esterler; alkoller ve karboksilik asitlerin direkt esterifikasyonu veya alkolizis yoluyla oluşmaktadır [195]. Çizelge 4.28'de olgunlaşma sürecinde, peynirlerde saptanan esterler verilmiştir. Asetik asit etil ester ve bütanoik asit etil estere olgunlaşma süresince bütün peynir örneklerinde rastlanmıştır. Asetik asit etil ester meyvemsi ve ananas benzeri bir aromaya sahipken, bütanoik asit etil ester meyvemsi ve elma, muz benzeri bir aromaya sahiptir [195]. Peynir örneklerinde bulunan diğer esterler olgunlaşmanın ilerleyen günlerinde saptanmıştır. Etantiyoik asit S-metil estere sadece yükseltgenmiş peynirlerde rastlanmıştır. Bu bileşiğin peynirimsi ve pişmiş karnabahar aromasına sahip olduğu bildirilmiştir [195]. Laktokoklar ve lökonostoklar, alkil esterlerin yanı sıra, metantiyol ve kısa zincirli yağ asitlerinden oluşan S-metiltiyo asetat gibi S-metiltiyo esterleri de üretebilmektedir [138]. Metantiyolun varlığı, S-metiltiyo esterlerin oluşumu için kritiktir ve bu tiyol, kolayca sülfür bileşiklerine yükseltgenmektedir. Metantiyol, laktik asit bakterileri tarafından metiyoninden üretilen [133], ancak, oksijen duyarlılığı nedeniyle genellikle bu tiyolün yalnızca küçük miktarları tespit edilebilmektedir [195].

Çizelge 4.28. Peynir örneklerine ait uçucu bileşiklerin (esterler) analiz sonuçları

Uçucu Bileşen										
<i>Esterler</i>	A.S.	A.İ.	Tanımlama Yöntemi	Olg.süresi (gün)	K1	İ1	Y1	K2	İ2	Y2
Asetik asit etil ester	7.82	880	MS,Aİ	7	1.5	1.6	1.8	1.7	1.8	2.4
				30	1.4	1.3	1.3	1.2	1.4	1.4
				60	1.3	1.2	1.3	1.0	1.3	1.1
				90	0.9	1.1	1.1	1.1	1.3	1.2
Bütanoik asit etil ester	14.34	1034	MS,Aİ	7	0.7	0.7	0.8	0.9	1.1	1.1
				30	0.9	0.8	0.7	0.9	1.2	0.8
				60	1.3	1.0	1.0	1.0	1.8	0.8
				90	1.2	1.4	1.0	1.3	2.6	1.0

Bütanoik asit hekzil ester	16.82	1086	MS,Aİ	7	-	-	-	-	-	-
				30	0.2	-	0.1	-	-	0.2
				60	-	-	-	-	-	-
				90	0.2	-	-	-	-	-
Etantiyoik asit, S-metil ester	17.73	1106	MS,Aİ	7	-	-	-	-	-	-
				30	-	-	0.2	-	-	-
				60	-	-	0.6	-	-	0.4
				90	-	-	1.2	-	-	0.4
Pentanoik asit propil ester	18.73	1131	MS,Aİ	7	0.2	0.1	-	-	0.2	-
				30	0.2	0.2	-	0.2	-	-
				60	0.2	0.2	-	0.2	0.3	-
				90	0.2	0.2	-	-	-	-
Hekzanoik asit etil ester	22.54	1230	MS,Aİ	7	-	-	-	-	-	-
				30	-	-	-	-	-	-
				60	0.2	0.2	-	0.1	0.4	-
				90	0.2	0.3	0.2	0.2	0.6	0.1
Oktanoik asit etil ester	28.91	1431	MS,Aİ	7	-	-	-	-	0.2	-
				30	-	-	-	-	-	-
				60	-	-	-	-	-	-
				90	0.9	0.8	0.5	0.4	0.8	0.2
Dekanoik asit metil ester	33.17	1588	MS,Aİ	7	-	-	-	-	-	-
				30	-	-	-	-	-	-
				60	-	-	-	-	-	-
				90	0.2	0.2	0.1	0.1	-	-
Dekanoik asit etil ester	34.24	1630	MS,Aİ	7	-	-	-	-	-	-
				30	-	-	-	-	-	-
				60	-	-	-	-	-	-
				90	2.3	2.5	1.9	2.0	-	-
9-Oktadekenoik asit etil ester	35.49	1682	MS,Aİ	7	-	-	-	-	-	-
				30	-	-	-	-	-	-
				60	-	-	-	-	-	-
				90	0.2	0.2	0.1	-	-	-

2-propanon, 2-bütanon, 2-pentanon, 2-heptanon, 3-hidroksi 2-bütanon (asetoin) ve 2,3-bütandion (diasetil) gibi bileşikler, serbest yağ asitlerinin β -ketoasitlere enzimatik oksidasyonu ve bunların daha sonra metil ketonlara dekarboksilasyonu sonucu oluşmaktadırlar [124, 196]. Ara bileşikler olan ketonlar alkollere indirgenebilmekte ve küflü peynirin keskin aromasına katkıda bulunmaktadır [126]. Diasetil, sitrat metabolizması sırasında stabil olmayan öncül α -asetolaktattan kaynaklanmakta ve peynire tereyağ tat-kokusu vermektedir [197]. Yapılan bir çalışmada, *Lactococcus* ve *Leuconostoc*'tan oluşan karışık kültürün sürekli karıştırılmasının, 2-asetolaktatın oksidatif dekarboksilasyonuna olanak sağladığı için diasetil üretimini teşvik ettiği bildirilmiştir [46,

47]. Karıştırılmayan kültürlerde ise, ortamın redoks potansiyeli fermantasyonun başlangıcında hızla düşmektedir. Bu durumda sadece aseton ve 2-asetolaktat üretilmektedir. Yükseltgenmiş (Y1 ve Y2) peynirlerdeki aseton konsantrasyonunun olgunlaşmanın 90. gününde düşük redoks potansiyeline sahip K1, İ1, K2 ve İ2 peynirlerine göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Ancak, peynir örneklerinin diasetil miktarları karşılaştırıldığında, beklenildiği gibi yükseltgenmiş peynirlerdeki diasetil konsantrasyonunun diğer peynirlere göre daha yüksek bulunmamıştır. Dahası, K1 ve İ1 peynirlerindeki diasetil konsantrasyonunun diğer peynir örneklerinden çok daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durumda, diasetil üretimi için redoks potansiyelinin yüksek olmasının tek başına yeterli olmadığı, ortamda mutlaka oksijenin bulunması gerektiği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, *L. lactis* subsp. *lactis* kültür ortamına kontrollü şekilde oksijen verilmesi durumunda, diasetil sentazın aktivitesinin artmasına bağlı olarak diasetil üretimi gerçekleştiği bildirilmiştir [48]. Peynirdeki diasetil konsantrasyonunu arttırmak için süte hava veya oksijen ilavesinin gerekli olduğu yapılan bir çalışmada belirtilmiştir [43]. Ayrıca, 1-hidroksi-2-propanon konsantrasyonunun yükseltgenmiş peynirlerde daha yüksek miktarda bulunduğu belirlenmiştir. Metiltiyo-2-propanona sadece yükseltgenmiş peynirlerde rastlanmıştır. Bu bileşiğin metantiyolün yükseltgenmesine bağlı olarak, sadece Y1 ve Y2 peynirlerinde bulunduğu düşünülmektedir.

Çizelge 4.29. Peynir örneklerine ait uçucu bileşiklerin (ketonlar) analiz sonuçları

Uçucu Bileşen										
Ketonlar	A.S.	A.İ.	Tanımlama Yöntemi	Olg.süresi (gün)	K1	İ1	Y1	K2	İ2	Y2
2-Propanon	6.24	810	MS,Aİ	7	10.1	8.4	9.1	18.1	11.9	19.6
				30	9.9	7.1	6.4	13.0	8.9	11.6
				60	10.0	6.1	6.3	12.1	7.6	8.7
				90	7.6	6.1	5.0	10.9	8.2	8.4
2-Bütanon	8.19	895	MS,Aİ	7	5.1	4.0	4.7	8.1	5.3	10.2
				30	5.0	3.5	3.7	6.1	4.1	6.5
				60	5.4	3.1	3.5	5.8	3.5	4.8
				90	3.8	3.2	2.9	5.3	3.7	4.7
2-Pentanon	11.4	970	MS,Aİ	7	1.8	2.1	2.9	2.3	1.8	5.3
				30	1.8	2.1	3.1	2.8	1.7	4.4
				60	1.9	2.4	3.4	3.0	1.6	3.5
				90	1.4	2.5	2.6	3.0	1.5	3.5

2,3-Bütandion (Diasetil)	11.55	975	MS,Aİ,DS	7	30.4	9.4	17.3	15.4	16.8	16.2
				30	28.0	9.7	9.2	12.1	15.6	4.8
				60	25.2	7.4	9.5	9.3	8.4	4.5
				90	25.5	7.5	8.1	7.8	15.7	5.5
3-Metil-2-bütanon	12.6	997	MS,Aİ	7	0.5	0.3	-	-	0.2	-
				30	0.2	-	-	-	-	-
				60	0.2	-	-	-	0.2	-
				90	0.1	-	-	-	0.2	-
2-Heptanon	20.58	1175	MS,Aİ	7	7.3	8.0	7.9	7.8	6.4	10.1
				30	8.1	7.7	7.4	8.2	7.5	8.0
				60	8.6	7.9	9.3	8.9	8.1	8.2
				90	7.5	9.8	8.0	9.6	8.7	8.7
4-Oktanon	20.81	1182	MS,Aİ	7	0.9	0.4	2.3	2.1	1.9	2.9
				30	2.6	2.1	-	1.3	-	0.2
				60	-	1.6	0.3	0.7	-	0.2
				90	-	1.2	1.2	-	-	0.2
1-Kloro-2-propanon	21.79	1207	MS,Aİ	7	-	-	0.4	-	-	0.6
				30	-	-	0.3	-	-	0.6
				60	-	-	0.5	-	-	0.5
				90	-	-	0.4	-	-	0.5
2-Okten-4-on	22.83	1237	MS,Aİ	7	-	0.2	0.2	-	-	-
				30	-	-	0.2	-	-	0.3
				60	-	0.2	-	-	-	-
				90	0.3	0.3	0.3	-	-	0.2
3-Hidroksi 2-bütanon (asetoin)	24.32	1280	MS,Aİ	7	140.6	111.3	118.2	68.9	240.4	78.9
				30	135.3	107.2	83.8	64.4	196.9	42.7
				60	130.7	90.2	97.4	60.5	173.5	41.5
				90	117.4	94.3	72.9	60.1	181.1	38.8
1-Hidroksi-2-propanon	24.76	1293	MS,Aİ	7	1.2	1.4	3.5	-	0.8	1.8
				30	1.1	1.5	2.8	0.5	1.3	1.0
				60	0.7	1.2	3.0	-	0.8	0.9
				90	0.8	1.2	2.2	0.2	0.7	1.1
4-Bütoksi-2-bütanon	24.96	1298	MS,Aİ	7	-	0.5	0.9	0.5	0.6	1.1
				30	0.7	0.8	0.7	0.7	0.8	0.9
				60	0.7	0.8	0.8	0.6	0.9	0.6
				90	0.3	0.6	0.7	0.6	0.7	0.5
Metiltiyo-2-propanon	25.89	1328	MS,Aİ	7	-	-	0.5	-	-	0.4
				30	-	-	2.4	-	-	1.4
				60	-	-	4.5	-	-	3.1
				90	-	-	7.0	-	-	5.9
2-Hidroksi-3-pentanon	26.64	1353	MS,Aİ	7	-	0.1	0.3	0.2	0.3	0.4
				30	-	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3
				60	0.1	0.2	0.3	0.2	0.2	0.3
				90	0.1	0.1	0.3	0.1	0.3	0.3

2-Nonanon	27.61	1385	MS,Aİ	7	1.0	0.9	1.4	1.3	1.1	1.7
				30	1.5	1.4	1.2	1.4	1.3	1.3
				60	1.5	1.3	1.7	1.5	1.2	1.3
				90	1.4	1.7	1.6	1.3	1.5	1.6
2-Undekanon	33.32	1594	MS,Aİ	7	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.5
				30	-	-	0.4	-	-	0.5
				60	0.7	0.5	0.6	0.6	-	0.5
				90	0.4	0.5	0.5	0.5	-	0.5

Geçiş bileşikler olan aldehitler, hızla alkollere veya asitlere dönüştürüldüğü için peynirde birikmemektedir [124]. Cheddar ve Hispanico peynirlerinde temiz olmayan ve sert tatkokudan sorumlu olan 2-metil propanal, 2-metil bütanal ve 3-metil bütanal gibi dallanmış yapıdaki aldehitler Strecker degradasyonu veya transaminasyon ile sırasıyla, valin, izolösin ve lösin aminoasitlerinden üretilmektedir [197]. Olgunlaşma süresince peynir örneklerinde saptanan aldehitler 3-metil bütanal, hekzanal, nonanal, benzaldehit ve 4-metil benzaldehittir (Çizelge 4.30). Ancak, aldehitler ara ürün oldukları için olgunlaşma süresince peynirlerdeki konsantrasyonları değişkenlik göstermektedir. *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 ile üretilen peynirlerin hepsinde olgunlaşmanın 90. günü itibarıyla 3-metil bütanala rastlanmıştır. Kieronczyk ve ark. [39] löşinden 3-metil bütanal üretiminin α -keto asit dekarboksilaz aktivitesine bağlı olarak gerçekleştiğini ve bu aktivitenin *L. lactis* suşları arasında farklılık gösterdiğini ileri sürmüştür. Aldehit içerikleri açısından peynirler arasındaki en önemli farklılık benzaldehit ve 4-metil benzaldehite bağlı olarak gerçekleşmiştir. Badem aromasına sahip olan benzaldehit ve 4-metil benzaldehitin yükseltgenmiş (Y1 ve Y2) peynirlerde daha yüksek oranda bulunduğu saptanmıştır. Benzer şekilde, Kieronczyk ve ark. [39] yükseltgenmiş koşulların bunların üretimini teşvik ettiğini bildirmiştir. Yapılan bir başka çalışmada da, yükseltgenmiş ortama sahip peynirlerdeki benzaldehit konsantrasyonunun, kontrol ve indirgenmiş peynirlere göre önemli düzeyde yüksek olduğu bildirilmiştir [158].

Çizelge 4.30. Peynir örneklerine ait uçucu bileşiklerin (aldehitler) analiz sonuçları

Uçucu Bileşen										
Aldehitler	A.S.	A.İ.	Tanımlama Yöntemi	Olg.süresi (gün)	K1	İ1	Y1	K2	İ2	Y2
3-Metil bütanal	8.8	910	MS,Aİ	7	-	-	-	-	-	0.7
				30	-	-	-	-	-	1.0
				60	-	-	-	-	0.9	-
				90	-	-	-	0.5	1.3	0.5
Hekzanal	16.31	1075	MS,RI,DS	7	0.6	0.6	0.8	0.5	1.0	0.6
				30	1.2	1.1	0.4	0.6	0.8	0.6
				60	1.3	0.9	0.5	1.2	0.6	0.6
				90	1.8	1.0	0.7	0.8	1.0	1.0
Nonanal	27.75	1390	MS,Aİ	7	0.2	0.3	0.3	-	0.3	-
				30	-	-	1.0	-	-	0.8
				60	0.5	-	-	1.1	-	0.5
				90	0.8	0.8	-	-	0.3	0.8
Benzaldehit	31.43	1520	MS,Aİ	7	0.5	0.5	0.9	0.7	0.8	1.2
				30	0.8	0.4	1.0	0.5	-	1.5
				60	0.4	0.3	1.2	0.9	-	1.7
				90	0.4	0.3	1.2	0.4	-	2.1
4-Metil benzaldehit	34.63	1646	MS,Aİ	7	-	0.4	0.8	0.4	0.5	0.6
				30	0.5	0.4	1.4	-	-	1.3
				60	-	-	1.5	0.4	0.3	1.5
				90	-	-	1.8	0.6	0.5	2.3

Esterlerin oluşumunda önemli role sahip olan etanol, başlıca laktoz fermantasyonu ve alanin katabolizması yoluyla üretilmektedir. 2-metil-1-bütanol, 2-metil-1-propanol ve 3-metil-1-bütanol gibi dallanmış zincirli birincil alkollerin varlığı sırasıyla izölösün, valin ve lösin katabolizmasından üretilen aldehitlerin dönüşümüne işaret etmektedir [196]. Olgunlaşma süresince en yüksek etanol içeriğine sahip peynirin İ2 peyniri olduğu ve genel olarak yükseltgenmiş peynirlerdeki konsantrasyonunun diğer peynirlere göre düşük olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.31). Ayrıca, peynir örneklerinde saptanan alkollerin büyük kısmının, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 ile üretilen peynirlerde daha yüksek konsantrasyonda bulunduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.31. Peynir örneklerine ait uçucu bileşiklerin (alkoller) analiz sonuçları

Uçucu Bileşen										
<i>Alkoller</i>	A.S.	A.İ.	Tanımlama Yöntemi	Olg.süresi (gün)	K1	İ1	Y1	K2	İ2	Y2
2-Propanol	9.2	920	MS,Aİ	7	-	-	-	13.6	9.7	17.3
				30	-	-	-	10.1	8.5	11.3
				60	-	-	-	9.0	6.8	9.0
				90	-	-	-	8.0	7.3	8.5
Etanol	9.4	925	MS,Aİ,DS	7	21.9	23.9	18.1	20.5	59.6	18.2
				30	19.7	21.6	13.7	16.1	48.5	11.8
				60	18.0	17.8	14.7	14.2	37.4	9.6
				90	14.1	17.7	11.4	13.2	42.2	9.6
2-Metil-1-propanol	17.18	1095	MS,Aİ	7	0.9	1.1	1.1	1.9	1.3	2.4
				30	1.0	0.8	0.8	1.4	1.0	1.5
				60	1.0	0.7	1.0	1.3	0.8	1.3
				90	0.8	0.8	0.7	1.0	0.7	1.0
1-Bütanol	19.17	1142	MS,Aİ	7	1.5	1.6	1.7	4.7	3.3	5.5
				30	1.2	1.4	1.3	3.8	3.1	4.1
				60	1.1	1.1	1.4	3.9	2.6	3.4
				90	0.8	1.1	1.1	3.1	2.6	3.2
3-Metil-1-bütanol	21.53	1200	MS,Aİ	7	3.1	3.2	3.7	8.2	5.7	10.8
				30	3.0	3.0	2.8	6.7	4.8	6.9
				60	2.8	2.5	3.4	6.3	4.2	5.9
				90	2.1	2.4	2.4	5.5	4.5	5.7
1-Pentanol	23.02	1243	MS,Aİ	7	3.2	-	3.1	3.7	2.0	3.5
				30	3.4	-	-	2.7	-	-
				60	3.2	-	-	2.5	-	-
				90	2.6	-	-	0.0	2.5	-
3-Metil-2-büten-1-ol	25.34	1310	MS,Aİ	7	1.4	1.4	1.5	1.5	1.1	1.6
				30	1.5	1.6	1.5	1.5	1.2	1.3
				60	1.6	1.4	1.8	1.4	1.1	1.2
				90	1.2	1.5	1.2	1.4	1.1	1.2
3-Pentanol	26.2	1336	MS,Aİ	7	0.2	0.2	0.2	0.3	0.9	0.5
				30	0.2	0.2	0.2	0.3	0.9	0.3
				60	0.2	0.2	0.2	0.3	0.8	0.4
				90	0.2	0.2	0.0	0.3	1.1	0.4
1-Hekzanol	26.35	1342	MS,Aİ	7	2.3	0.9	2.3	3.0	1.1	2.7
				30	3.6	1.0	2.5	3.7	1.2	2.1
				60	3.5	0.9	2.9	6.0	1.2	2.1
				90	2.9	1.0	2.7	3.4	1.4	2.4

1-Oktanol	32.05	1545	MS,Aİ	7	-	-	-	-	-	-
				30	0.7	0.7	0.7	0.9	0.0	0.9
				60	0.7	0.6	0.8	0.9	1.4	0.9
				90	0.6	0.7	0.7	1.0	-	1.0
Benzenmetanol	39.57	1860	MS,Aİ	7	-	-	-	0.5	0.5	0.7
				30	-	-	0.3	-	-	0.5
				60	-	-	-	0.5	0.6	0.4
				90	-	-	0.2	0.5	0.4	0.4
1,4-Bütandiol	40.32	1895	MS,Aİ	7	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.4
				30	0.3	-	0.5	-	-	0.3
				60	-	-	-	-	-	-
				90	-	-	-	-	-	-
Benzenetanol	40.37	1898	MS,Aİ	7	-	-	-	-	-	0.3
				30	-	-	-	0.6	-	0.2
				60	0.3	0.2	0.3	0.4	0.4	0.4
				90	0.6	0.5	0.4	0.6	0.6	0.5

Çizelge 4.32 incelendiğinde, metantiyol, dimetil disülfid ve dimetil trisülfid gibi kükürtlü bileşiklere, genel olarak, düşük redoks potansiyeline sahip olan K1, K2, İ1 ve İ2 peynirlerinde rastlandığı görülmektedir. Ancak, bu bileşiklerin oluşumunun, indirgen ajan kullanılarak üretilen peynirlerden çok, kontrol peynirlerinde gerçekleştiği de belirlenmiştir. Bu bileşiklerden dimetil disülfite olgunlaşmanın 7. ve 30. günlerinde Y2 peynirinde de rastlanmıştır. Yapılan benzer bir çalışmada, Cheddar peynirinde sülfür bileşikleri olarak metantiyol, dimetil sülfid, karbon disülfid ve dimetil trisülfidin tespit edildiği ve Cheddar peyniri için önemli tat-koku bileşikleri olan metantiyol, dimetil sülfid ve dimetil trisülfidin oluşumu için düşük redoks potansiyelinin gerekli olduğu bildirilmiştir [158].

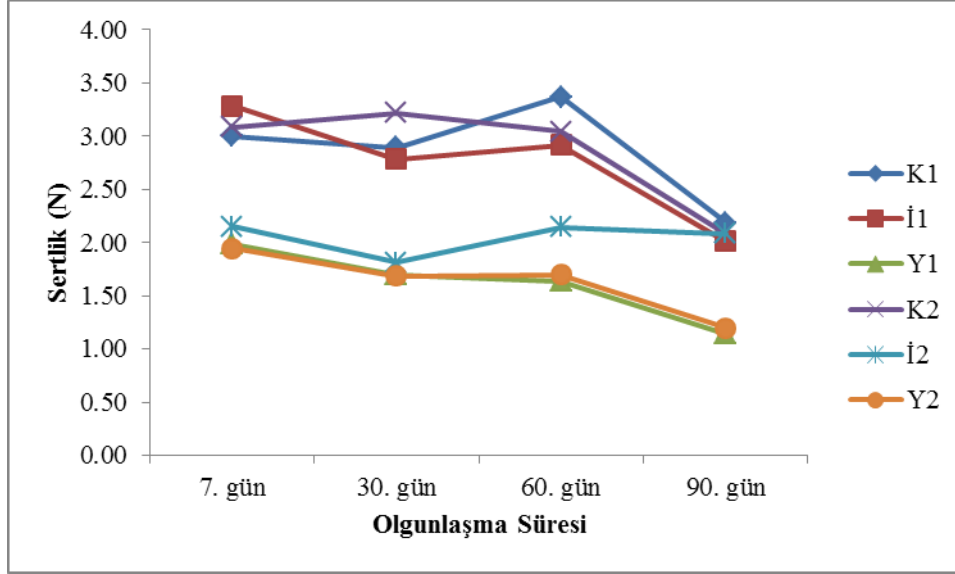
Çizelge 4.32. Peynir örneklerine ait uçucu bileşiklerin (diğer aroma bileşenleri) analiz sonuçları

Uçucu Bileşen										
<i>Diğerler aroma bileşenleri</i>	A.S.	A.İ.	Tanımlama Yöntemi	Olg.süresi (gün)	K1	İ1	Y1	K2	İ2	Y2
Metantiyol	4.88	707	MS,Aİ	7	0.9	-	-	0.9	0.8	-
				30	0.5	-	-	0.6	-	-
				60	0.3	-	-	0.3	-	-
				90	-	-	-	-	-	-
Dimetildisülfid	15.78	1064	MS,Aİ	7	0.3	-	-	0.6	0.5	0.3
				30	0.4	-	-	0.7	0.3	0.2
				60	0.7	0.2	-	0.7	-	-
				90	-	-	-	0.3	-	-
3-Metil-1-butanol asetat	18.18	1117	MS,Aİ	7	-	-	-	-	-	-
				30	-	-	-	-	-	-
				60	0.2	0.1	-	-	-	-
				90	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Dimetil trisülfid	27.34	1376	MS,Aİ	7	-	-	-	-	-	-
				30	-	-	-	-	-	-
				60	0.4	0.2	-	0.5	-	-
				90	0.2	-	-	-	-	-
Benzonitril	33.57	1604	MS,Aİ	7	-	-	0.8	-	-	0.3
				30	-	-	0.8	-	-	0.5
				60	-	-	1.0	-	-	0.3
				90	-	-	1.0	0.3	0.0	0.4
Sülfonilbis metan (Dimetil sülfon)	40.19	1889	MS,Aİ	7	1.1	0.8	1.1	1.3	1.4	1.4
				30	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5
				60	0.9	0.9	1.1	1.2	0.9	0.8
				90	0.7	1.1	0.7	0.9	0.9	0.7

4.6.8 Tekstürel Analizler

Yağ, protein ve nem içeriği ve salamuranın tuz konsantrasyonu gibi birçok faktör peynir tekstürünü etkilemektedir. Genellikle, yüksek asitlik, yüksek protein ve toplam kuru madde içeriği, peyniri daha sert ve daha zor deforme edilebilir yapmaktadır [198]. Tekstürdeki değişim, rennet tarafından kazein ağının proteolizi (α_{s1} -kazein degradasyonu), kolloidal kalsiyum fosfatın çözünürlüğünün artması ve yağ-serum kanallarından serum absorpsiyonu nedeniyle protein hidrasyonunun artması gibi faktörlerden kaynaklanmaktadır [199]. Peynirlerin sertlik değerlerinin olgunlaşma süresince değişimi Şekil 4.62'de verilmiştir. Olgunlaşma süresince peynir örneklerinin sertlik değerlerinde artan ve azalan değişimler

izlenmiştir. Ancak, genellikle peynirlerin sertliğinin olgunlaşmanın 90. gününde 7. güne göre daha düşük olduğu görülmektedir. Olgunlaşma süresince Y1 ve Y2 peynirlerinin sertlik değerlerinin diğer peynirlere göre düşük olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Bu durum, bu peynirlerin pH'larının yüksek olması nedeniyle, nem içeriklerinin diğer peynirlere göre daha yüksek olmasından (Çizelge 2.1) kaynaklanmaktadır. K1 ve K2 peynirlerinin sertlikleri arasında istatistiksel açıdan bir farklılık bulunmamıştır, ancak bunların sertlik değerlerinin diğer peynirlerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$).



Şekil 4.62. Peynirlerin sertlik (N) değerlerinin olgunlaşma süresince değişimi

Ayrıca, yapılan tekstürel analizde, peynirlerin esneklik parçalanabilirlik, çiğnenebilirlik, yüzeye yapışabilirlik, yapışkanlık değerleri de saptanmıştır. Ancak, sonuçlar burada verilmemiştir.

4.6.9 Duyusal Analiz

Peynirlerin duyusal analizi eğitimli 5 panelist tarafından gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.33'te peynir örneklerinin duyusal özelliklerinin olgunlaşma süresince değişimi verilmiştir. Buna göre, peynirlerin görünüşleri arasındaki farklılığın önemsiz olduğu bulunmuştur. Y1 ve Y2 peynirlerinin kitle, koku, tat ve toplam kabul edilebilirlik puanları diğer peynirlerden daha düşüktür.

Çizelge 4.33. Peynirlerin duyusal özelliklerinin olgunlaşma süresince değişimi

Özellik	Olgunlaşma süresi	K1	İ1	Y1	K2	İ2	Y2
Görünüş	7.gün	10.0±0.0	10.0±0.0	10.0±0.0	10.0±0.0	10.0±0.0	10.0±0.0
	30.gün	10.0±0.0	10.0±0.0	9.5±0.7	10.0±0.0	10.0±0.0	10.0±0.0
	60.gün	10.0±0.0	10.0±0.0	10.0±0.0	10.0±0.0	10.0±0.0	10.0±0.0
	90.gün	10.0±0.0	10.0±0.0	10.0±0.0	10.0±0.0	10.0±0.0	10.0±0.0
Kitle	7.gün	9.5±0.7	9.5±0.7	9.0±1.4	9.5±0.7	9.5±0.7	9.0±1.4
	30.gün	9.5±0.7	9.0±0.0	7.5±0.7	9.5±0.7	9.0±0.0	7.0±0.7
	60.gün	9.7±0.6	9.7±0.6	8.3±0.6	9.0±1.0	9.3±0.6	8.7±0.6
	90.gün	9.0±1.0	9.3±0.6	8.0±0.0	9.3±0.6	8.7±0.6	7.7±0.6
Koku	7.gün	9.5±0.7	9.5±0.7	8.0±0.0	9.0±1.4	9.0±1.4	7.5±0.7
	30.gün	9.5±0.7	9.0±0.0	8.0±0.0	9.0±1.4	8.5±0.7	7.0±0.0
	60.gün	9.3±1.2	9.0±1.0	8.0±1.7	9.3±1.2	9.3±1.2	7.3±0.6
	90.gün	9.3±0.6	9.3±0.6	8.3±0.6	9.3±0.6	9.3±0.6	8.3±0.6
Tat	7.gün	9.5±0.7	9.5±0.7	7.5±0.7	9.5±0.7	9.5±0.7	7.5±0.7
	30.gün	9.5±0.7	9.0±0.0	7.0±0.0	9.0±1.4	8.5±0.7	7.0±0.0
	60.gün	9.7±0.6	9.0±1.0	6.0±1.0	9.0±1.0	9.0±0.0	6.0±1.0
	90.gün	8.7±1.2	8.7±1.2	6.3±0.6	9.3±0.6	9.0±1.0	5.7±1.2

Çizelge 4.34. Peynirlerin toplam kabul edilebilirlik ve acılık puanlarının olgunlaşma süresince değişimi

Toplam Kabul Edilebilirlik	7.gün	5.0±0.0	5.0±0.0	4.0±0.0	4.5±0.7	4.5±0.7	4.0±0.0
	30.gün	4.5±0.7	5.0±0.0	3.5±0.7	4.5±0.7	4.0±0.0	3.0±0.0
	60.gün	4.7±0.6	4.3±0.6	3.0±0.0	4.3±0.6	4.7±0.6	3.0±0.0
	90.gün	4.7±0.6	5.0±0.0	3.0±0.0	5.0±0.0	4.7±0.6	3.0±0.0
Acılık Derecesi	7.gün	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	30.gün	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	60.gün	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	90.gün	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.0±0.0

Panelistler tarafından duyusal değerlendirmede, Y1 ve Y2 peynirlerinde olgunlaşmanın 7. gününden itibaren badem aroması bulunduğu bildirilmiştir. Bu badem aroması, uçucu bileşiklerin analizinde, yükseltgenmiş (Y1 ve Y2) peynirlerde saptanan benzaldehit, 4-metil benzaldehit ve benzonitrilden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, olgunlaşmanın 30. gününden itibaren bu peynirlerde oksidasyona bağlı metalik tat oluştuğu belirlenmiştir. Bu metalik tadın, proteinlerin oksidasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Y1 ve Y2 peynirlerinin, diğer peynirlere göre daha yumuşak ve kremimsi bir yapıya sahip olduğu belirtilmiştir.

K1, K2, İ1 ve İ2 peynirleri, panelistler tarafından duyusal özellikleri açısından olgunlaşma süresince yüksek puanlar almıştır. Ayrıca, İ1 ve İ2 peynirlerinin, olgunlaşmanın 30. gününden itibaren pişmiş süt kokusuna sahip olduğu bildirilmiştir. Pişmiş süt kokusunun indirgenmiş peynirlerde bulunan kükürtlü bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Ayrıca, olgunlaşmanın 90. gününde, K1, İ1, Y1 ve Y2 peynirlerinde düşük düzeyde acılık tespit edilmiştir. Toplam kabul edilebilirlik puanları kıyaslandığında, K1, K2, İ1 ve İ2 peynirlerinin en yüksek puanlara sahip olduğu, Y1 ve Y2 peynirlerinin ise toplam kabul edilebilirliğinin düşük olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.34).



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın amacı, oksidasyon redüksiyon potansiyelinin UF beyaz peynirin olgunlaşma karakteristikleri üzerindeki etkisinin belirlenmesidir. Redoks potansiyeli biyokimyasal reaksiyonları ve dolayısıyla fermente ürünlerin kalitesini önemli düzeyde etkileyebilmektedir. Bu nedenle, redoks potansiyelinin modifikasyonu ve ölçümü, özellikle fermente ürünlerde, ürün kalitesi açısından önemli bilgiler verebilmektedir.

Bu çalışmanın ilk aşamasında, araştırma kapsamında kullanılan altı farklı starter laktokok suşunun sütü indirgeme kapasitesi ve asidifikasyon aktivitesi belirlenmiştir. Daha sonra, redoks potansiyelinin aminoasit katabolizması üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Bu amaçla, laktokok suşların kontrol, indirgenmiş ve yükseltgenmiş model sistemlerde gerçekleştirdiği aminoasit katabolizması sonucu üretilen uçucu bileşikler tespit edilmiştir. Bir sonraki aşamada, farklı redoks ajanlarının (indirgen ve yükseltgen) fermente sütün redoks potansiyeli, pH'sı ve starterlerin canlılığı üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre belirlenen indirgen ajan olarak sodyum hidrosülfidin ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}_4$) ve yükseltgen ajan olarak potasyum iyodatın (KIO_3) peynir üretiminde kullanılacak redoks ajanları olmasına karar verilmiştir. Ardından, bu redoks ajanlarının konsantrasyonlarının belirlenmesi için yağı azaltılmış ultrafiltre (UF) süt kullanılarak optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Sütü indirgeme kapasiteleri, asidifikasyon aktiviteleri, aminoasit katabolizması sonucu üretilen uçucu bileşikler, ortam koşullarının canlılıkları üzerindeki etkisi ve kullanılan redoks ajanlarının canlılıkları ve aktiviteleri üzerindeki etkisi göz önünde bulundurularak, çalışma kapsamında kullanılan laktokok suşları içerisinde *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CM41 ve *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşları saf starter kültür olarak UF beyaz peynir üretiminde kullanılmak üzere seçilmiştir. Her bir kültür için kontrol, indirgenmiş ve yükseltgenmiş olmak üzere 3 farklı peynir üretilmiştir. Üretilen peynirler 90 gün süreyle olgunlaştırılmıştır. Olgunlaşmanın, 7., 30., 60. ve 90. günlerinde örnekleme yapılarak, mikrobiyolojik analizler, bileşim analizleri ve olgunlaşma karakteristiklerini belirlemeye yönelik analizler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Çalışma kapsamında kullanılan *Lactococcus* suşlarının üreme eğrileri belirlenmiştir. Buna göre, *L. lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* 35-C-9 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşlarının gelişim hızlarının, *L. lactis* subsp. *cremoris* IP5 ve özellikle *L. lactis* subsp. *cremoris* HP suşuna göre daha yüksek düzeylerde olduğu görülmektedir. Buna ek

olarak, logaritmik fazın sonu olan 12. saatte *L. lactis* subsp. *cremoris* IP5 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* HP suşlarının canlı hücre sayısının (KOB/mL) diğer laktokok suşlarından daha düşük olduğu belirlenmiştir.

- Çalışmada kullanılan laktokokların sütü indirgeme aktivitelerinin ve asidifikasyonunun belirlendiği çalışmada, laktokok suşlarının tamamının sütün redoks potansiyelini negatif değerlere düşürmesine rağmen, sütü indirgeme aktivitelerinin birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir. *L. lactis* subsp. *lactis* CM41, *L. lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşlarının sütü indirgeme davranışları incelendiğinde, bu suşlarda lag fazının oldukça kısa sürdüğü ve diğer suşlara nazaran hızla negatif redoks potansiyeli değerlerine ulaşıldığı gözlenmiştir. Çalışmada kullanılan suşlar içinde, indirgeme kapasitesi en yüksek olan kültürün *L. lactis* subsp. *lactis* 35-C-9 (ORP değeri:-364.0 mV) ve en düşük olan kültürün ise *L. lactis* subsp. *cremoris* IP5 (ORP değeri:-315.1 mV) olduğu saptanmıştır. Ayrıca, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşunun asidifikasyon hızının, çalışmada kullanılan diğer kültürlerle göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Asidifikasyon hızı en düşük olan kültürün ise sütü indirgeme kapasitesi en yüksek olan *L. lactis* subsp. *lactis* 35-C-9 suşu olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada kullanılan her bir laktokok suşunun sütü indirgeme kapasitesinin farklı olması, farklı türlerin, alt türlerin ve suşların bulundukları ortamın redoks potansiyelini değiştirme kapasitelerinin farklı olduğunu göstermektedir. Bu durum, hem peynir üretiminde hem de diğer fermente süt ürünlerinin üretiminde redoks potansiyelini kontrol altında tutabilmenin yollarından bir tanesinin de starter kültür seçimi olduğunu göstermektedir. Ayrıca, ek kültür kullanımının da redoks potansiyelini kontrol altında tutmada etkili olacağı düşünülmektedir.

- Redoks potansiyelinin, laktokoklar tarafından gerçekleştirilen aminoasit katabolizması üzerine etkisini belirlemek amacıyla, potasyum fosfat tamponunun redoks potansiyeli, redoks ajanları kullanılarak kimyasal olarak modifiye edilmiştir. Model sistemde indirgenmiş redoks potansiyelini oluşturmak için ditiyotritol (DTT) ve yükseltgenmiş redoks potansiyelini oluşturmak için potasyum ferrisiyanit kullanılmıştır. Oluşturulan model sistemlerin redoks potansiyellerinin kültürlerle ve aminoasitlere göre değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Genellikle, kontrol reaksiyon ortamlarının redoks potansiyellerinin suşa, aminoasit türüne ve inkübasyon süresine göre değiştiği gözlenmiştir. Buna karşın, indirgenmiş reaksiyon ortamlarının redoks potansiyeli

inkübasyon süresi boyunca negatif değerlerde kalırken, yükseltgenmiş reaksiyon ortamlarının redoks potansiyeli ise pozitif değerlerde kalmıştır.

- Reaksiyon ortamlarının redoks potansiyellerini ayarlamak için kullanılan DTT ve potasyum ferrisiyanitin çalışmada kullanılan konsantrasyonlarının, suşların canlılığını ve aktivitelerini etkilemediği belirlenmiştir. İnkübasyon sonunda (96 saat), model sistemlerdeki kültürlerin canlılığında genellikle, yaklaşık 1.00-3.00 log KOB/mL’lik bir azalma meydana gelmiştir. Bununla birlikte, *L. lactis* subsp. *cremoris* HP suşu ile yapılan çalışmada, model sistemlerin tamamında inkübasyonun 2. gününde yapılan ekim sonucu bu suşun canlılığını yitirdiği saptanmıştır.
- Ortamın redoks potansiyelinin, altı farklı laktokok suşu tarafından gerçekleştirilen metiyonin, fenilalanin, triptofan ve lizin katabolizması üzerindeki etkisi ve üretilen farklı metabolitler araştırılmıştır. Aminoasit katabolizması sonucu üretilen uçucu bileşikler GC-MS ile saptanmış ve elde verilere Temel Bileşen Analizi (Principal Component Analysis, PCA) uygulanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, ortamın redoks potansiyelinin aminoasitlerin katabolizması sonucu üretilen metabolitlerin türünü ve konsantrasyonunu etkilediği gözlenmiştir. Ayrıca, çalışmada kullanılan kültürlerin alt türlerinin ve hatta suşlarının aynı aminoasitin katabolizması sonucunda farklı metabolitleri üretebildiği belirlenmiştir. Metiyoninden kontrol ortamında baskın olarak üretilen uçucu bileşiklerin metantiyol, etantiyolik asit S-metil ester, dimetil disülfid, dimetil trisülfid, metil metiltiyometil disülfid ve 3-metiltiyol-2-propenoik asit metil ester olduğu belirlenmiştir. İndirgenmiş ortamda ise tiyol bileşiklerinin üretildiği gözlenmiştir. Yükseltgenmiş ortamda ise, tiyosiyamik asit metil ester, benzaldehit, 3-metiltiyol propan nitril üretimi baskın olarak gerçekleşmiştir. *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşunun fenilalanini indirgenmiş ortamda katabolize etmesi sonucunda etantiyol, 3-metil-2-bütantiyol, 2,3-bütanditiyol, 2-pentantiyol gibi tiyol bileşikleri ve fenil asetik asit gibi karboksilik asitlerin üretildiği belirlenmiştir. Yükseltgenmiş ortamda ise benzaldehit, 2-hidroksi benzaldehit gibi aldehitlerin ve benzoik asit metil ester, benzen asetik asit metil ester gibi esterlerin üretildiği gözlenmiştir. *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459’un kontrol ortamında fenilalanini katabolize etmesi sonucunda benzaldehit ve benzen asetaldehit oluşmuştur. Yükseltgenmiş ortamda ise kontrol ortama kıyasla çok yüksek konsantrasyonda benzaldehit birikimi gerçekleşmiştir. Karakteristik badem aromasına sahip 2-hidroksi benzaldehit ve 2-metil benzonitril de *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 tarafından yükseltgenmiş ortamda üretilen metabolitler arasında yer almaktadır. İndirgenmiş ortamda ise tiyol bileşikleri ve ketonlar baskın olarak üretilen

metabolitlerdir. Triptofan katabolizmasında da, yükseltgen ortamın aldehit üretimini ve indirgen ortamın ise tiyol bileşikleri ve karboksilik asitlerin üretimini teşvik ettiği belirlenmiştir. Fenilalanin katabolizması sonucunda oluşan benzaldehit konsantrasyonundan çok daha düşük olmakla birlikte yükseltgen ortamda triptofan katabolizması sonucu benzaldehit üretimi gerçekleşmiştir. Lösin katabolizması sonucu diğer aminoasitlerden farklı olarak 3-metil bütanalın oluştuğu gözlenmiştir.

Bu sonuçlara göre, kullanılan laktokok suşlarının, aminoasitin ve ortamın redoks potansiyelinin aminoasit katabolizması sonucu üretilen uçucu bileşikleri ve konsantrasyonlarını etkilediği belirlenmiştir. Bu durumda, istenen duyuşal özelliklere sahip fermente ürünler elde etmek için, starter kültür seçiminin ve diğer üretim parametrelerinin önemi kadar, redoks potansiyelinin öneminin büyük olduğu söylenebilir. Ayrıca, çalışmanın bu bölümü ile ilgili olarak, kullanılan redoks ajanlarından direkt kaynaklı olabilecek bir etkiyi elimine etmek için, aynı çalışmanın farklı redoks ajanları kullanılarak tekrar edilmesinin gerekli olduğu düşünülmektedir.

- Fermente sütün redoks potansiyelini kontrol altında tutabilmek için farklı indirgen ve yükseltgen ajanların farklı konsantrasyonları test edilmiştir. İndirgen ajan olarak, sodyum hidrosülfid, ditiyotritol (DTT), sistein, askorbik asit ve heksoz oksidaz kullanılmıştır. Yükseltgen ajan olarak ise potasyum iyodat ve potasyum ferrisiyanit kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda, sütün başlangıç pH'sı, fermentasyon sonundaki pH'sı, pH'nın düşme hızı, başlangıç redoks potansiyeli ve fermentasyon sonundaki redoks potansiyeli göz önünde bulundurularak indirgen ajan olarak sodyum hidrosülfid ve yükseltgen ajan olarak potasyum iyodat kullanılmasına karar verilmiştir.

Sütün ve fermente süt ürünlerinin redoks potansiyelinin modifikasyonu için kimyasal ajanların ilavesinin dışında, bu amaçla gazlar (hava, O₂, N₂, H₂ veya bunların farklı kombinasyonları) ve elektrokimyasal yöntemler kullanılabilir. Ancak, bu yöntemlerin etki süresi oldukça kısa olduğu için, peynir gibi uzun olgunlaştırma süresine sahip gıdaların üretimi için şu aşamada elverişli yöntemler değildir. Bu nedenle, bu çalışmanın devamında, peynir veya diğer fermente süt ürünlerin redoks potansiyelinin modifikasyonu için bu yöntemlerin uygun hale getirilmesi üzerinde çalışmanın faydalı olacağı düşünülmektedir.

- Bir önceki aşamada, indirgen ajan olarak seçilen sodyum hidrosülfidin ve yükseltgen ajan olarak seçilen potasyum iyodatın, farklı konsantrasyonlarının, yağı azaltılmış UF

süte *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 veya *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşunun inokülasyonunun ardından redoks potansiyeli ve pH'sı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Sodyum hidrosülfid konsantrasyonu arttıkça, beklenildiği gibi redoks potansiyelinin de daha düşük değerlere ulaştığı gözlenmiştir. Ancak, bu redoks ajanının konsantrasyonunun artması, pH düşüşünü olumsuz etkilemesinin yanı sıra, kullanılan starter kültürlerin canlılığını da olumsuz etkilemektedir. Bu etmenler göz önünde bulundurularak, peynir üretiminde indirgen ajan olarak kullanılan sodyum hidrosülfidin % 0.01 (a/a) oranında UF süte ilave edilmesine karar verilmiştir. Yükseltgen ajan olarak kullanılan potasyum iyodatın fermente UF sütün redoks potansiyelini başarılı bir şekilde pozitif değerlerde tuttuğu belirlenmiştir. Ancak, potasyum iyodatın dezavantajı fermente sütün pH'sının düşmesine engel olmasıdır. Bu nedenle, hem peynir üretimi ve olgunlaşma süresince redoks potansiyelini pozitif değerlerde tutmak hem de peynir üretimi sırasında yeterli pH düşüşünü sağlamak için potasyum iyodat ilavesinin iki aşamada gerçekleştirilmesine karar verilmiştir. Bu amaçla, potasyum iyodat, peynir üretiminde kullanılacak olan tam yağlı UF süte başlangıçta % 0.025 (a/a) oranında ve ardından, yeterli pH düşüşü sağlandıktan sonra peynirlere tuz ilavesi sırasında tuz ile birlikte % 0.025 (a/a) oranında ilave edilmiştir.

- Daha sonra, starter kültür *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu kullanılarak kontrol, indirgenmiş ve yükseltgenmiş UF peynir üretimi süresince redoks potansiyeli ve pH'da meydana gelen değişimler ölçülmüştür. Kontrol peynirinin üretiminde starter ve rennet inokülasyonu yapıldıktan sonra redoks potansiyelinin hızla, yaklaşık 150 mV'den -400 mV'nin altına düştüğü görülmektedir. Bu hızlı düşüşün nedeni, starter kültür aktivitesine bağlı olarak sütün indirgenmesidir. Ardından, redoks potansiyelinin bu noktadan sonra yavaşça tekrar yükselmeye başladığı ve yaklaşık -380 mV'ye ulaştığı gözlenmiştir. Bu durumun, pH'nın düşmesinden ve redoks potansiyelinin pH'ya bağlılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Daha sonra redoks potansiyelinde meydana gelen düşük düzeydeki artışların, sıcaklığın değiştirilmesine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. İndirgenmiş peynir üretiminde kullanılan UF süte başlangıçta % 0.01 (a/a) oranında sodyum hidrosülfid ilave edilmiş ve başlangıç redoks potansiyeli -337 mV olarak ölçülmüştür. Fermantasyon başladıktan sonra kontrol peynirinin üretiminde olduğu gibi, redoks potansiyelinde hızlı bir düşüş meydana gelmiştir. Ancak, kontrol peynirinin üretiminde başlangıçta yaklaşık 550 mV'lik bir düşüş meydana gelirken, indirgenmiş peynir üretiminde yaklaşık 150 mV'lik bir düşüşün söz konusu olduğu belirlenmiştir. Bu durumun, sütün poising kapasitesinden

kaynaklandığı düşünülmektedir. Yükseltgenmiş peynir üretiminde UF süte başlangıçta % 0.025 (a/a) oranında potasyum iyodat ilave edilmiştir. Ardından, starter kültür ve rennet inokülasyonu yapılmıştır. Kontrol ve indirgenmiş peynirlerin üretiminden farklı olarak tuz ile birlikte % 0.025 (a/a) potasyum iyodat ilavesi tekrar yapılmıştır. Böylece, pozitif redoks potansiyeline sahip peynir elde edilmiştir. Fermantasyonun başlaması ile birlikte, ortamda bulunan yükseltgen ajana rağmen redoks potansiyeli düşmüş ve yaklaşık -35 mV'ye ulaşmıştır. Daha sonra tuz ile birlikte yapılan ikinci yükseltgen ajan ilavesi sayesinde redoks potansiyeli tekrar artmaya başlamış ve inkübasyon sonunda yaklaşık 148 mV'ye ulaşmıştır. Yükseltgenmiş peynir üretiminde de, pH düşünün kontrol peynirinde olduğu gibi hızlı gerçekleşmediği belirlenmiştir.

- Bu çalışmada, elde edilen bir diğer önemli bulgu ise, tam yağlı ve yağı azaltılmış UF sütün redoks potansiyelinin farklı olmasıdır. Yağı azaltılmış UF sütün redoks potansiyelinin ortalama 125.2 ± 4.8 mV (E_h olarak 332.2 mV) olduğu saptanmıştır. Peynir üretiminde kullanılan tam yağlı UF sütün redoks potansiyelinin ise 146.9 ± 8.3 mV (E_h olarak 353.9 mV) olduğu belirlenmiştir. Buna göre, UF sütün yağ içeriğinin artmasına bağlı olarak redoks potansiyelinin de arttığı söylenebilir. Literatürde birkaç çalışma dışında, genellikle sütün majör bileşenlerinin redoks potansiyeli üzerinde önemli bir etkisi olmadığı bildirilmiştir.

Elde edilen veriler ışığında, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CM41 ve *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşları saf starter kültür olarak UF beyaz peynir üretiminde kullanılmak üzere seçilmiştir. Her bir kültür için kontrol, indirgenmiş ve yükseltgenmiş olmak üzere 3 farklı peynir üretilmiştir. Olgunlaşmanın, 7., 30., 60. ve 90. günlerinde mikrobiyolojik analizler, bileşim analizleri ve olgunlaşma karakteristiklerini belirlemeye yönelik analizler gerçekleştirilmiştir.

- *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşunun starter olarak kullanıldığı K1 ve İ1 peynirlerindeki laktokok sayısının, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşunun starter olarak kullanıldığı K2 ve İ2 peynirlerine göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Potasyum iyodatın yükseltgen ajan olarak kullanıldığı (% 0.05 oranında) Y1 ve Y2 peynirlerinde, olgunlaşmanın 60. günü itibarıyla laktokok saptanamamıştır. Olgunlaşmanın ilerlemesiyle birlikte, starter kültürlerin potasyum iyodata olan toleransının azaldığı düşünülmektedir. Ayrıca, olgunlaşma süresince peynir örneklerinde starter olmayan laktik asit bakterilerine (NSLAB) ve koliform grubu bakterilere rastlanmamıştır.

Yükseltgenmiş peynirlerde olgunlaşmanın 60. günü itibariyle canlı laktokoka rastlanmamasının, kullanılan yükseltgen ajandan veya yüksek redoks potansiyelinden kaynaklanıp kaynaklanmadığı belirlemek amacıyla kimyasal modifikasyon yöntemlerinin dışında bir yöntem kullanılması gerektiği düşünülmektedir.

- Bileşim analizlerinin sonuçları incelendiğinde, Y1, İ2 ve Y2 peynirlerinde pH'nın 4.9 un altına düşmemesi nedeniyle nem içeriğinin yüksek olduğu, bu peynirlerde peyniraltı suyu ayrılmasınınve titrasyon asitliğinin düşük olduğu saptanmıştır. *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşunun aktivitesinin potasyum iyodattan ve *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşunun aktivitesinin ise hem sodyum hidrosülfitten hem de potasyum iyodattan olumsuz etkilendiği düşünülmektedir.
- *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 kültürü kullanılarak üretilen K2 peynirinin, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 kullanılarak üretilen K1 peynirine göre, aynı şekilde İ2 peynirinin de İ1 peynirine göre olgunlaşma süresince daha düşük redoks potansiyeline sahip olduğu görülmektedir. Bu durum, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşunun indirgeme kapasitesinin daha yüksek olmasından kaynaklanmıştır. İ1 ve İ2 peynirlerinin üretiminde kullanılan sodyum hidrosülfid sayesinde, kontrol peynirlerine kıyasla (K1 ve K2) daha düşük redoks potansiyeli değerlerine ulaşılmıştır. Olgunlaşmanın ilerlemesiyle birlikte, K1, İ1, K2 ve İ2 peynirlerinin redoks potansiyellerinin arttığı ve Y1 ve Y2 peynirlerinde ise olgunlaşmanın 30. gününden sonra azaldığı gözlenmiştir.

Gözlenen değişimin, olgunlaşmaya bağlı olarak ortaya çıkan proteoliz ürünlerinin ve diğer bazı bileşiklerin poising etki göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bir diğer olasılığın ise, proteoliz sonucu oluşan peptitlerin, peynirde bulunan redoks aktif gruplar ile ölçümde kullanılan elektrot arasında bariyer görevi görmesi olduğu düşünülmektedir.

- pH 4.6'da çözünür azotlu maddeler bazında olgunlaşma indeksi en yüksek olan peynirler sırasıyla İ2, Y2 ve Y1 peynirleridir. Bu üç peynirin pH'sının ve nem içeriğinin diğer peynirlere göre yüksek olması, enzim aktivitesinin artmasına, dolayısıyla pH 4.6'da çözünür azot miktarının bu peynirlerde daha yüksek olmasına neden olmuş olabilir.
- İ2 ve Y2 peynirlerindeki % 12'lik TCA'da çözünür azotlu maddelerin miktarının, diğer peynir örneklerine göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durumun, laktokok kaynaklı proteinaz ve peptidazlar için ortamda daha fazla substrat (orta büyüklükteki peptitler gibi) bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu peynir örneklerinin

pH'sının ve nem içeriğinin daha yüksek olması nedeniyle, kimozinin yüksek proteolitik aktivitesine bağlı olarak orta büyüklükteki peptitleri daha yüksek konsantrasyonda içerdiği düşünülmektedir. Ayrıca, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu ile üretilen peynirlerin %12'lik TCA'da çözünür azotlu maddeler bazında olgunlaşma indeksi değerlerinin *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu ile üretilen peynirlere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

- *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu ile üretilen peynirlerin toplam serbest aminoasit konsantrasyonlarının genel olarak *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu ile üretilen peynirlere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Buna göre, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşunun proteolitik ve/veya peptidolitik aktivitesinin *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşuna göre daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlar, %12'lik TCA'da çözünür azotlu maddeler bazında olgunlaşma indeksi sonuçlarını destekler niteliktedir. Buna ek olarak, negatif redoks potansiyeline sahip olan K1 ve İ1 peynirlerinin pozitif redoks potansiyeline sahip olan Y1 peynirine göre ve aynı şekilde, K2 ve İ2 peynirlerinin de Y2 peynirine göre daha yüksek konsantrasyonda toplam serbest aminoasit içerdiği saptanmıştır. İndirgenmiş redoks potansiyeli ile laktokokların peptidolitik aktivitesi arasında pozitif bir ilişki olduğu düşünülmektedir.
- Peynir örneklerine ait RP-HPLC kromatogramları kendi içlerinde karşılaştırıldığında, özellikle yükseltgenmiş peynirler (Y1 ve Y2) ile indirgenmiş redoks potansiyeline sahip peynirler (K1, K2, İ1 ve İ2) arasında temel farklılıklar olduğu görülmektedir. Bu farklılıklar çoğunlukla triptofan (36. dakikada gelen pik), α -laktalbumin (83. dakikada gelen pik) ile β -laktoglobulinin genetik varyantlarından (yaklaşık 86. ve 87. dakikalarda gelen pikler) kaynaklanmaktadır. Triptofan, α -laktalbumin ile β -laktoglobulinin genetik varyantların konsantrasyonunun (pik alanının) yükseltgenmiş peynirlerde düşük olmasının, bunların oksidasyona uğramaları ve yeni oluşan ürünlerin ya RP-HPLC tekniği ile saptanamaması ya da alıkonma süresinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. RP-HPLC verilerine uygulanan PCA ile düşük redoks potansiyeline sahip K1 ve İ1 peynirlerinin aynı bölgede toplandığı, yüksek redoks potansiyeline sahip Y1 peynirinin ayrı bir bölge içerisinde toplandığı tespit edilmiştir. Aynı durumun *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu ile üretilen K2, İ2 ve Y2 peynirleri için de geçerli olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, hem redoks potansiyelinin hem de olgunlaşma süresinin pH 4.6'da çözünür peptit profilini yani laktokoklar tarafından peynirde gerçekleştirilen proteolizi etkilediği belirlenmiştir.

- Üre-PAGE elektroforetogramları incelendiğinde, en belirgin farklılığın, α_{s1} -I-kazein fraksiyonu ve α_{s1} -kazeinin ileri parçalanma ürünlerinde olduğu gözlenmiştir. Y1 ve Y2 peynirlerinde α_{s1} -I-kazein birikiminin söz konusu olduğu ve α_{s1} -kazeinin ileri parçalanma ürünlerinin diğer peynirlere göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Olgunlaşma süresince Y1 ve Y2 peynirlerinde meydana gelen α_{s1} -kazein degradasyonunun, diğer peynir örneklerine göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Kullanılan redoks ajanlarının ve ortamın redoks potansiyelinin kimozinin α_{s1} -kazein üzerindeki aktivitesini olumsuz yönde etkilemediği belirlenmiştir. Ancak, α_{s1} -I-kazein fraksiyonunun yükseltgenmiş peynirlerde birikmesinin, yükseltgenmiş redoks potansiyelinin veya potasyum iyodatın veya yükseltgenmiş koşullara bağlı olarak peynirde oluşan bir bileşiğin, starter laktokok proteinazı olan laktosepinin aktivitesini olumsuz etkilemiş olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, α_{s1} -kazein degradasyonunun β -kazein degradasyonuna göre daha hızlı gerçekleştiği belirlenmiştir. Bunun nedeninin, UF peynir üretiminde kullanılan kimozinin tamamının peynirin yapısında kalması ve bunun hidrolitik aktivitesini β -kazeinden çok α_{s1} -kazein üzerinde sergilemesi olduğu düşünülmektedir.
- Peynirlerin SDS-PAGE elektroforetogramları incelendiğinde, farklılıkların α_s -kazeinlerin ve β -kazeinin parçalanma ürünlerine ait bantlardan ve β -laktoglobuline ait banttardan kaynaklandığı gözlenmiştir. Yükseltgenmiş peynirlerin (Y1 ve Y2) α_s -kazeinlerin ve β -kazeinin parçalanma ürünlerine ait bantların dansitesinin olgunlaşma süresince diğer peynirlerinkine göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durumun, proteolizi belirlemeye yönelik yapılan diğer analiz sonuçlarında da olduğu gibi yükseltgenmiş peynirlerde laktosepinin aktivitesini yitirmiş ve azalmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.
- Yapılan serbest yağ asidi analizi sonucunda, peynirlerin toplam serbest yağ asidi konsantrasyonunun genellikle olgunlaşma süresince artış gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, genellikle, *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu kullanılarak üretilen peynirlerdeki toplam serbest yağ asidi konsantrasyonunun, *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu ile üretilen peynirlere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, peynirlerin redoks potansiyellerinin lipoliz üzerinde belirgin bir etkisi saptanmamıştır.
- Organik asit sonuçları incelendiğinde, peynirlerde bulunan laktik asit konsantrasyonlarının pH, % titrasyon asitliği ve % laktoz değerleri ile uyum içinde olduğu belirlenmiştir. Kontrol peynirlerindeki (K1 ve K2) laktik asit konsantrasyonunun

diğer peynirlere göre daha yüksek olduğu, bunu indirgenmiş peynirlerin (İ1 ve İ2) izlediği ve yükseltgenmiş peynirlerin (Y1 ve Y2) ise en düşük laktik asit konsantrasyonuna sahip olduğu belirlenmiştir. Yükseltgenmiş peynirlerdeki laktik asit konsantrasyonunun düşük olmasının nedeninin bu ortamda laktokokların canlılıklarını yitirmesi olduğu düşünülmektedir. Üretimin başından itibaren indirgenmiş ortama sahip olan peynirlerde (İ1 ve İ2), olgunlaşma süresince starter laktokokların canlılıklarını korumalarına rağmen, laktik asit konsantrasyonunun düşük olmasının, hücrelerdeki NADH/NAD⁺ oranının değişiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu peynirlerin üretiminde, UF retentantında indirgenmiş koşulların oluşturulmasına bağlı olarak, inokülasyonu gerçekleştirilen hücrelerdeki NADH/NAD⁺ oranının değişmesi nedeniyle laktat dehidrogenaz aktivitesinin azaldığı ve laktik asit sentezinin yavaşladığı düşünülmektedir.

- Uçucu bileşiklerin analizinin sonuçlarına göre, yükseltgenmiş (Y1 ve Y2) peynirlerdeki asetoin konsantrasyonunun olgunlaşmanın 90. gününde düşük redoks potansiyeline sahip K1, İ1, K2 ve İ2 peynirlerine göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Ancak, peynir örneklerinin diasetil miktarları karşılaştırıldığında, beklenildiği gibi yükseltgenmiş peynirlerdeki diasetil konsantrasyonunun diğer peynirlere göre daha yüksek bulunmamıştır. Dahası, K1 ve İ1 peynirlerindeki diasetil konsantrasyonunun diğer peynir örneklerinden çok daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durumda, diasetil üretimi için redoks potansiyelinin yüksek olmasının tek başına yeterli olmadığı, ortamda mutlaka oksijenin bulunması gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca, etantiyoik asit S-metil estere sadece yükseltgenmiş peynirlerde rastlanmıştır. Metiltiyo-2-propanona sadece yükseltgenmiş peynirlerde rastlanmıştır. Bu bileşiğin metantiyolün yükseltgenmesine bağlı olarak, sadece Y1 ve Y2 peynirlerinde bulunduğu düşünülmektedir. Aldehit içerikleri açısından peynirler arasındaki en önemli farklılık benzaldehit ve 4-metil benzaldehite bağlı olarak gerçekleşmiştir. Badem aromasına sahip olan benzaldehit, 4-metil benzaldehit ve benzonitrilin yükseltgenmiş (Y1 ve Y2) peynirlerde daha yüksek oranda bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca, metantiyol, dimetil disülfid ve dimetil trisülfid gibi kükürtlü bileşiklere, genel olarak, düşük redoks potansiyeline sahip olan K1, K2, İ1 ve İ2 peynirlerinde rastlanmıştır. Bu sonuçlara göre, ortamın redoks potansiyelinin peynirde bulunan uçucu tat-koku bileşiklerini önemli düzeyde etkilediği belirlenmiştir.
- Tekstürel analiz sonuçlarına göre, olgunlaşma süresince Y1 ve Y2 peynirlerinin sertlik değerlerinin diğer peynirlere göre düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durum, bu

peynirlerin pH'larının yüksek olması nedeniyle, nem içeriklerinin diğer peynirlere göre daha yüksek olmasından kaynaklanmaktadır.

- Panelistler tarafından yapılan duyuşsal değerlendirmede, Y1 ve Y2 peynirlerinin olgunlaşmanın 7. günden itibaren belirgin bir badem aromasına sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, olgunlaşmanın 30. günden itibaren bu peynirlerde oksidasyona bağlı metalik tat oluştuğu belirlenmiştir. Bu metalik tadın, proteinlerin oksidasyonundan kaynaklandığı dūřunılmaktadır. Y1 ve Y2 peynirlerinin, diğer peynirlere göre daha yumuşak ve kremimsi bir yapıya sahip olduğu belirtilmiştir. K1, K2, İ1 ve İ2 peynirleri, panelistler tarafından duyuşsal özellikleri ačíısından olgunlaşma süresince yüksek puanlar almıştır. Ayrıca, İ1 ve İ2 peynirlerinin, olgunlaşmanın 30. günden itibaren pişmiş süt kokusuna sahip olduğu bildirilmiştir. Piřmiř süt kokusunun indirgenmiş peynirlerde bulunan kükürtlü bileşiklerden kaynaklandığı dūřunılmaktadır.

Sonuç olarak; redoks potansiyelinin peynirin olgunlaşma karakteristikleri üzerinde, özellikle proteoliz, uçucu bileşikler, organik asitler ve bunlara bağlı olarak da duyuşsal özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Kültür seçiminde asidifikasyon kapasitesinin yanısıra sütü indirgeme aktivitesinin de dikkate alınması peynir ve diğer fermente süt ürünleri kalitesi ačíısından son derece önemlidir. Bu araştırmadan elde edilen veriler, kaliteli bir UF beyaz peynir eldesi için olgunlaşma süresince negatif redoks potansiyelinin gerekli olduğunu işaret etmektedir. Ancak, farklı LAB suşlarının kullanıldığı diğer peynir çeşitleri için de benzer araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, peynirde redoks potansiyelinin kontrol altında tutulabilmesi için kimyasal redoks ajanları yerine farklı indirgeme kapasitesine sahip starter ve/veya ek kültür kullanımının söz konusu olabileceği dūřunılmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Topcu, A.; McKinnon, I.; McSweeney, P. L. H., Measurement of the oxidation-reduction potential of cheddar cheese, *Journal of Food Science*, 73, C198-C203, **2008**.
- [2] Prévost, H.; Brillet-Viel, A., Ecology of Bacteria and Fungi in Foods | Influence of Redox Potential. *Encyclopedia of Food Microbiology* Second Edition (eds: Batt, C. A.; Tortorello, M. L., 595-601, **2014**.
- [3] Martin, F. E., B.; Rojas, C.; Gervais, P.; Cayot, N.; Cachon, R., Redox Potential: Monitoring and Role in Development of Aroma Compounds, Rheological Properties and Survival of Oxygen Sensitive Strains During the Manufacture of Fermented Dairy Products. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, (eds: Kongo, M., InTech: 73-94, **2013**.
- [4] Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H., *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Blackie Academic and Professional: London; **1998**.
- [5] Kristoffersen, T.; Gould, I. A., Oxidation-reduction measurements on Cheddar cheese, *Journal of Dairy Science*, 42, 901, **1959**.
- [6] Abraham, S.; Cachon, R.; Colas, B.; Feron, G.; De Coninck, J., Eh and pH gradients in Camembert cheese during ripening: Measurements using microelectrodes and correlations with texture, *International Dairy Journal*, 17, 954-960, **2007**.
- [7] McSweeney, P. L. H.; Caldeo, V.; Topcu, A.; Cooke, D. R., Ripening of cheese: oxidation-reduction potential and calcium phosphate, *Australian Journal of Dairy Technology*, 65, 178-184, **2010**.
- [8] Bulat, T. *Beyaz peynir üretiminde probiyotik Enterococcus faecium'un ek kültür olarak kullanımı ve bunun oksidasyon-redüksiyon potansiyeli ve peynir kalitesi üzerine etkisi*. Hacettepe Üniversitesi, Ankara, **2011**.
- [9] Beresford, T. P.; Fitzsimons, N. A.; Brennan, N. L.; Cogan, T. M., Recent advances in cheese microbiology, *International Dairy Journal*, 11, 259-274, **2001**.
- [10] Ouvry, A.; Cachon, R.; Diviès, C., Application of microelectrode technique to measure pH and oxidoreduction potential gradients in gelled systems as model food, *Biotechnology Letters*, 23, 1373-1377, **2001**.
- [11] Cachon, R.; Jeanson, S.; Aldarf, M.; Divies, C., Characterization of lactic acid starters based on acidification and reduction activities, *Lait*, 82, 281-288, **2002**.
- [12] Carrasco, M. S.; Scarinci, H. E.; Simonetta, A. C., Associative growth of lactic acid bacteria for cheese starters: Acidifying and proteolytic activities and redox potential development, *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 3, 116-119, **2005**.
- [13] Morandi, S.; Silvetti, T.; Tamburini, A.; Brasca, M., Changes in oxidation-reduction potential during milk fermentation by wild lactic acid bacteria, *Journal of Dairy Research*, 83, 387-394, **2016**.

- [14] Urbach, G., Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products, *International Dairy Journal*, 5, 877-903, **1995**.
- [15] Jacob, H. E., Redox Potential. *Methods in Microbiology*, (eds: Norris, J. R.; Ribbons, D. W., Academic Press: London, 91-123, **1970**.
- [16] Morris, J. G., The effect of redox potential. *The Microbiological Safety and Quality of Food*, (eds: Lund, B. M.; Baird-Parker, T. C.; Gould, G. W., Aspen Publishers Inc: Maryland, 235-250, **2000**.
- [17] Brown, M. H.; Emberger, E., Oxidation-reduction potential. *Microbial ecology of foods: Factors affecting life and death of microorganisms*, (eds: Silliker, J. H.; Elliot, P. P.; Baird Parker, A. C., Academic Press: New York, 112-125, **1980**.
- [18] Kristoffersen, T.; Stussi, D. B.; Gould, I. A., Consumer packaged cheese. II. Chemical changes, *Journal of Dairy Science*, 47, 743-747, **1964**.
- [19] Sigg, L., Redox Potential Measurements in Natural Waters: Significance: Concepts and Problems. *Redox: Fundamentals, Processes and Applications*, (eds: Schüring, J.; Schulz, H. D.; Fischer, W. R.; Böttcher, J.; Duijnsveld, W. H. M., Springer: Berlin, 1-12, **2000**.
- [20] Hutchins, R. S.; Bachas, L. G., Potentiometric techniques. *In Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, (eds: Settler, F. A., Prentice-Hall Inc.: New Jersey, 727-748, **1997**.
- [21] Galster, H., Techniques of measurement, electrode processes and electrode treatment. *Redox: fundamentals, processes and applications*, (eds: Schüring, J.; Schultz, H. D.; Fischer, W. R.; Böttcher, J.; Duijnsveld, W. H. M., Springer: Berlin, 13-23, **2000**.
- [22] Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R., *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 9th ed.; Brooks/Cole: USA; **2014**.
- [23] Abraham, S.; Cachon, R.; Jeanson, S.; Ebel, B.; Michelon, D.; Aubert, C.; Rojas, C.; Feron, G.; Beuvier, E.; Gervais, P.; De Coninck, J., A procedure for reproducible measurement of redox potential (E-h) in dairy processes, *Dairy Science & Technology*, 93, 675-690, **2013**.
- [24] Martin, F.; Cayot, N.; Marin, A.; Journaux, L.; Cayot, P.; Gervais, P.; Cachon, R., Effect of oxidoreduction potential and of gas bubbling on rheological properties and microstructure of acid skim milk gels acidified with glucono-delta-lactone, *Journal of Dairy Science*, 92, 5898-5906, **2009**.
- [25] Jeanson, S.; Hilgert, N.; Coquillard, M. O.; Seukpanya, C.; Faiveley, M.; Neveu, P.; Abraham, C.; Georgescu, V.; Fourcassie, P.; Beuvier, E., Milk acidification by *Lactococcus lactis* is improved by decreasing the level of dissolved oxygen rather than decreasing redox potential in the milk prior to inoculation, *International Journal of Food Microbiology*, 131, 75-81, **2009**.
- [26] Schleifer, K. H.; Ludwig, W., Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, First edition (eds: Wood, B. J. B.; Holzappel, W. H., Springer Science and Business Media Dordrecht: 7-8, **1995**.

- [27] Davis, J. G., Studies in Cheddar cheese: I. The oxidation-reduction potentials of ripening Cheddar cheese, *Journal of Dairy Research*, 3, 241-253, **1932**.
- [28] Galesloot, T. H. E., The oxidation-reduction potential of cheese, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 14, 176-214, **1960**.
- [29] Kristoffersen, T., Interrelationships of flavor and chemical changes in cheese, *Journal of Dairy Science*, 50, 279-284, **1967**.
- [30] Manning, D. J., Chemical production of essential Cheddar flavour compounds, *Journal of Dairy Research*, 46, 531-537, **1979**.
- [31] Caldeo, V.; McSweeney, P. L. H., Changes in oxidation-reduction potential during the simulated manufacture of different cheese varieties, *International Dairy Journal*, 25, 16-20, **2012**.
- [32] Caldeo, V.; Hannon, J. A.; Hickey, D.-K.; Waldron, D.; Wilkinson, M. G.; Beresford, T. P.; McSweeney, P. L. H., Control of oxidation-reduction potential during Cheddar cheese ripening and its effect on the production of volatile flavour compounds, *Journal of Dairy Research*, 1-8, **2016**.
- [33] Boucher, B.; Brothersen, C.; Broadbent J, R., Influence of starter and nonstarter lactic acid bacteria on medium redox, *Australian Journal of Dairy Technology*, 61, 116-118, **2006**.
- [34] Brasca, M.; Morandi, S.; Lodi, R.; Tamburini, A., Redox potential to discriminate among species of lactic acid bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1516-1524, **2007**.
- [35] Tachon, S.; Brandsma, J. B.; Yvon, M., NoxE NADH Oxidase and the Electron Transport Chain Are Responsible for the Ability of *Lactococcus lactis* To Decrease the Redox Potential of Milk, *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 1311-1319, **2010**.
- [36] Scarinci, H. E.; Carrasco, M. S.; Simonetta, A. C., Technological properties of strains of lactic acid bacteria for cheese starter: acidifying activity and redox potential control, *Microbiologie- Aliments Nutrition*, 12, 437-442, **1994**.
- [37] Ouvry, A.; Wache, Y.; Tourdot-Marechal, R.; Divies, C.; Cachon, R., Effects of oxidoreduction potential combined with acetic acid, NaCl and temperature on the growth, acidification, and membrane properties of *Lactobacillus plantarum*, *FEMS Microbiology Letters*, 214, 257-261, **2002**.
- [38] Bolduc, M.-P.; Raymond, Y.; Fustier, P.; Champagne, C. P.; Vuilleumard, J.-C., Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk, *International Dairy Journal*, 16, 1038-1048, **2006**.
- [39] Kieronczyk, A.; Cachon, R.; Feron, G.; Yvon, M., Addition of oxidizing or reducing agents to the reaction medium influences amino acid conversion to aroma compounds by *Lactococcus lactis*, *Journal of Applied Microbiology*, 101, 1114-1122, **2006**.

- [40] Fox, P. F.; Law, J.; McSweeney, P. L. H.; Wallace, J., Biochemistry of cheese ripening. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Second (eds: Fox, P. F., Chapman and Hall: London, 389-438, **1993**.
- [41] Morishita, T.; Tamura, N.; Makino, T.; Kudo, S., Production of Menaquinones by Lactic Acid Bacteria, *Journal of Dairy Science*, 82, 1897-1903, **1999**.
- [42] Martin, F.; Cachon, R.; Pernin, K.; De Coninck, J.; Gervais, P.; Guichard, E.; Cayot, N., Effect of oxidoreduction potential on aroma biosynthesis by lactic acid bacteria in nonfat yogurt, *Journal of Dairy Science*, 94, 614-622, **2011**.
- [43] Green, M. L.; Manning, D. J., Development of texture and flavour in cheese and other fermented products, *Journal of Dairy Research*, 49, 737-748, **1982**.
- [44] Singh, T. K.; Drake, M. A.; Cadwallader, K. R., Flavor of Cheddar Cheese: A Chemical and Sensory Perspective, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 166-189, **2003**.
- [45] Fox, P. F.; Singh, T. K.; McSweeney, P. L. H., Biogenesis of Flavour Compounds in Cheese. *Chemistry of Structure-Function Relationships in Cheese*, (eds: Malin, E. L.; Tunick, M. H., Springer US: Boston, MA, 59-98, **1995**.
- [46] Monnet, C.; Schmitt, P.; Divies, C., Method for Assaying Volatile Compounds by Headspace Gas Chromatography and Application to Growing Starter Cultures, *Journal of Dairy Science*, 77, 1809-1815, **1994**.
- [47] Starrenburg, M. J. C.; Hugenholtz, J., Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp., *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 3535-3540, **1991**.
- [48] Boumerdassi, H.; Desmazeaud, M.; Monnet, C.; Boquien, C. Y.; Corrieu, G., Improvement of diacetyl production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNRZ 483 through oxygen control, *Journal of Dairy Science*, 795, 775-781, **1996**.
- [49] Neijssel, O. M.; Snoep, J. L.; Teixeira de Mattos, M. J., Regulation of energy source metabolism in streptococci, *Journal of Applied Microbiology*, 83, 12S-19S, **1997**.
- [50] Ledon, H. J.; Ibarra, D. Method for modifying hygienic, physico-chemical and sensory properties of cheese by controlling the redox potential, US 2009/0214705 A1, L'Air Liquide, France. **2006**.
- [51] Adda, J.; Gripon, J. C.; Vassal, L., The chemistry of flavour and texture generation in cheese, *Food Chemistry*, 9, 115-129, **1982**.
- [52] Hosono, A.; Elliott, J. A.; McGugan, W. A., Production of Ethylesters by Some Lactic Acid and Psychrotrophic Bacteria¹, *Journal of Dairy Science*, 57, 535-539, **1974**.
- [53] Harper, W. J.; Carmona de Catril, A.; Chen, J. L., Esterases of lactic streptococci and their stability in cheese slurry systems, *Milchwissenschaft*, 35, 129-132, **1980**.
- [54] Wong, N. P.; Ellis, R.; La Croix, D. E.; Alford, J. A., Lactones in Cheddar cheese, *Journal of Dairy Science*, 56, 636-639, **1973**.

- [55] Yvon, M.; Thirouin, S.; Rijnen, L.; Fromentier, D.; Gripon, J. C., An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavor compounds, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 414-9, **1997**.
- [56] Rijnen, L.; Bonneau, S.; Yvon, M., Genetic characterization of the major lactococcal aromatic aminotransferase and its involvement in conversion of amino acids to aroma compounds, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4873-80, **1999**.
- [57] Gao, S.; Steele, J. L., Purification and characterization of oligomeric species of an aromatic amino acid aminotransferase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* S3, *Journal of Food Biochemistry*, 22, 197-211, **1998**.
- [58] Rijnen, L.; Delacroix-Buchet, A.; Demaizières, D.; Le Quéré, J. L.; Gripon, J. C.; Yvon, M., Inactivation of lactococcal aromatic aminotransferase prevents the formation of floral aroma compounds from aromatic amino acids in semi-hard cheese, *International Dairy Journal*, 9, 877-885, **1999**.
- [59] van Kranenburg, R.; Kleerebezem, M.; van Hylckama Vlieg, J.; Ursing, B. M.; Boekhorst, J.; Smit, B. A.; Ayad, E. H. E.; Smit, G.; Siezen, R. J., Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis, *International Dairy Journal*, 12, 111-121, **2002**.
- [60] Tachon, S.; Michelon, D.; Chambellon, E.; Cantonnet, M.; Mezange, C.; Henno, L.; Cachon, R.; Yvon, M., Experimental conditions affect the site of tetrazolium violet reduction in the electron transport chain of *Lactococcus lactis*, *Microbiology*, 155, 2941-8, **2009**.
- [61] Alting, A. C.; Engels, W.; van Schalkwijk, S.; Exterkate, F. A., Purification and Characterization of Cystathionine (beta)-Lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78 and Its Possible Role in Flavor Development in Cheese, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 4037-42, **1995**.
- [62] Bruinenberg, P. G.; De Roo, G.; Limsowtin, G. K. Y., Purification and characterization of cystathionine (gamma)-lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11: possible role in flavor compound formation during cheese maturation, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 561-566, **1997**.
- [63] Michelon, D.; Abraham, S.; Ebel, B.; De Coninck, J.; Husson, F.; Feron, G.; Gervais, P.; Cachon, R., Contribution of exofacial thiol groups in the reducing activity of *Lactococcus lactis*, *FEBS Journal*, 277, 2282-2290, **2010**.
- [64] Larsen, N.; Werner, B. B.; Vogensen, F. K.; Jespersen, L., Effect of dissolved oxygen on redox potential and milk acidification by lactic acid bacteria isolated from a DL-starter culture, *Journal of Dairy Science*, 98, 1640-1651, **2015**.
- [65] McCarthy, O. J.; Singh, H., Physico-chemical Properties of Milk. *Advanced Dairy Chemistry, Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents*, Third (eds: McSweeney, P. L. H.; Fox, P. F., Springer Science+Business Media: New York, USA, 695-697, **2009**.
- [66] Walstra, P.; Wouters, J. T. M.; Geurts, T. J., Milk Properties. *Dairy Science and Technology*, Second (eds: Taylor & Francis Group: USA, 162-164, **2006**.

- [67] Bolduc, M.-P.; Bazinet, L.; Lessard, J. R.; Chapuzet, J.-M.; Vuilleumard, J.-C., Electrochemical modification of the redox potential of pasteurized milk and its evolution during storage, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4651-4657, **2006**.
- [68] Calligaris, S.; Manzocco, L.; Anese, M.; Nicoli, M. C., Effect of heat-treatment on the antioxidant and pro-oxidant activity of milk, *International Dairy Journal*, 14, 421-427, **2004**.
- [69] Schreyer, A.; Britten, M.; Chapuzet, J.-M.; Lessard, J.; Bazinet, L., Electrochemical modification of the redox potential of different milk products and its evolution during storage, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 255-264, **2008**.
- [70] Jensen, R. G.; Ferris, A. M.; Lammi-Keefe, C. J., The Composition of Milk Fat, *Journal of Dairy Science*, 74, 3228-3243, **1991**.
- [71] King, R. L.; Dunkley, W. L., Relation of natural copper in milk to incidence of spontaneous oxidized flavor, *Journal of Dairy Science*, 42, 420-427, **1959**.
- [72] Martin, F.; Cayot, N.; Vergoignan, C.; Journaux, L.; Gervais, P.; Cachon, R., Impact of oxidoreduction potential and of gas bubbling on rheological properties of non-fat yoghurt, *Food Research International*, 43, 218-223, **2010**.
- [73] Dave, R. I.; Shah, N. P., Effect of cysteine on the viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures, *International Dairy Journal*, 7, 537-545, **1997**.
- [74] Van Boekel, M. A. J. S., Effect of heating on Maillard reactions in milk, *Food Chemistry*, 62, 403-414, **1998**.
- [75] Ignatova, M.; Prevost, H.; Leguerinel, I.; Guillou, S., Growth and reducing capacity of *Listeria monocytogenes* under different initial redox potential, *Journal of Applied Microbiology*, 108, 256-65, **2010**.
- [76] Peltola, E.; Antila, M., The effect of oxidizing salts on the oxidation-reduction potential and ripening of Emmental cheese. In *13th International Dairy Congress*, 1953; Vol. 2, pp 729-731.
- [77] Galesloot, T. H. E., Concerning the action of nitrate in preventing butyric acid fermentation in cheese, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 15, 395-410, **1961**.
- [78] Galesloot, T. H. E., Effect of oxidising salts upon the oxidation-reduction potential of cheese and upon the development of butyric acid bacteria in cheese, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 15, 31-80, **1961**.
- [79] Vos, E. A., The influence of potassium nitrate on the butyric acid fermentation in cheese, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 2, 223-245, **1948**.
- [80] Galesloot, T. H. E., Effect of oxidizing salts upon the oxidation-reduction potential of milk inoculated with starter, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 14, 176-214, **1960**.

- [81] Davies, W. L.; Davis, J. G.; Dearden, D. V.; Mattick, A. T. R., Studies in Cheddar Cheese. II. The Effect of Controlled Oxidation-reduction Potential on Ripening. III. The Rôle of Rennin, Pepsin and Lactobacilli, *Journal of Dairy Research*, 5, 144-152, **1934**.
- [82] Singh, H.; Fox, P. F., Heat stability of milk: Influence of modifying sulphydril-disulphide interactions on the heat coagulation time-pH profile., *Journal of Dairy Research*, 54, 347-359, **1987**.
- [83] Talwalkar, A.; Kailasapathy, K., A Review of Oxygen Toxicity in Probiotic Yogurts: Influence on the Survival of Probiotic Bacteria and Protective Techniques, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 117-124, **2004**.
- [84] Storz, G.; Imlay, J. A., Oxidative stress, *Curr Opin Microbiol*, 2, 188-94, **1999**.
- [85] Ebel, B.; Martin, F.; Le, L. D. T.; Gervais, P.; Cachon, R., Use of gases to improve survival of *Bifidobacterium bifidum* by modifying redox potential in fermented milk, *Journal of Dairy Science*, 94, 2185-2191, **2011**.
- [86] Pastushenko, V.; Matthes, H. D.; Heinrich, H., Effect of fat content on the redox potential behaviour of milk, *Milchwissenschaft*, 55, 547-549, **2000**.
- [87] Colbert, L. B.; Decker, E. A., Antioxidant activity of an ultrafiltration permeate from acid whey, *Journal of Food Science*, 56, 1248–1250, **1991**.
- [88] Taylor, M. J.; Richardson, T., Antioxidant activity of skim milk: Effect of heat and resultant sulphhydryl groups, *Journal of Dairy Science*, 63, 1783–1795, **1980**.
- [89] Bazinet, L.; Lamarche, F.; Boulet, M.; Amiot, J., Combined effect of pH and temperature during electroreduction of whey proteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 101-107, **1997**.
- [90] van den Berg, D.; Robijn, G. W.; Janssen, A. C.; Giuseppin, M.; Vreeker, R.; Kamerling, J. P.; Vliegthart, J.; Ledebor, A. M.; Verrips, C. T., Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2840-2844, **1995**.
- [91] Hassan, A. N.; Frank, J. F.; Farmer, M. A.; Schmidt, K. A.; Shalabi, S. I., Formation of yogurt microstructure and three-dimensional visualization as determined by confocal scanning laser microscopy, *Journal of Dairy Science*, 78, 2629-2636, **1995**.
- [92] Fox, P. F.; Cogan, T. M., Factors that affect the quality of cheese. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Third Edition (eds: Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.; Cogan, T. M.; Guinee, T. P., Elsevier Applied Science: Amsterdam, 583-608, **2004**.
- [93] Reichart, O.; Szakmár, K.; Jozwiak, Á.; Felföldi, J.; Baranyai, L., Redox potential measurement as a rapid method for microbiological testing and its validation for coliform determination, *International Journal of Food Microbiology*, 114, 143-148, **2007**.
- [94] Keen, A. R., Growth studies on lactic streptococci. IV. Some observations on redox potential, *Journal of Dairy Research*, 39, 161-165, **1972**.

- [95] Fox, P. F.; Guinee, T. P.; Cogan, T. M.; McSweeney, P. L. H., *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publishers: Gaithersburg; **2000**.
- [96] Urbach, G., The chemical and biochemical basis of cheese and milk aroma. *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*, Second Edition (eds: Law, B. A., Chapman & Hall: London, U.K., 252-299, **1997**.
- [97] Mortimer, C. E., *Chemistry*. 6th Edition ed.; Wadsworth Publishing Company: Belmont, California; **1986**.
- [98] Galesloot, T. H. E.; Kooy, J. S., The oxidation-reduction potential of starter and milk inoculated with starter, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 14, 1–22, **1960**.
- [99] Langeveld, L. P. M.; Galesloot, T. H. E., Estimation of the oxidation-reduction potential as an aid in tracing the cause of excessive openness in cheese, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 25, 15–23, **1971**.
- [100] Terzaghi, B. E.; Sandine, W. E., Improved Medium for Lactic Streptococci and Their Bacteriophages, *Applied Microbiology*, 29, 807-813, **1975**.
- [101] Rogosa, M.; Mitchell, J. A.; Wiseman, R. F., A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli, *Journal of Bacteriology*, 62, 132-3, **1951**.
- [102] IDF, Cheese and processed cheese. Determination of the total solids content. International Dairy Federation, Brussels, Belgium, **1982**.
- [103] IDF, Determination of the nitrogen content (Kjeldahl method) and calculation of crude protein content. International Dairy Federation, Brussels, Belgium, **1986**.
- [104] Ardö, Y.; Polychroniadou, A., *Laboratory Manual for Chemical Analysis of Cheese*. Office for Official Publications of the European Communities: Luxembourg; **1999**.
- [105] TSE, Beyaz peynir standardı (TS-591). Türk Standartları Enstitüsü, Edition (eds: Editor, **2013**.
- [106] Fox, P. F., Potentiometric Determination of Salt in Cheese, *Journal of Dairy Science*, 46, 744-745, **1963**.
- [107] Kuchroo, C. N.; Fox, P. F., Fractionation of the water soluble nitrogen from Cheddar cheese: chemical methods, *Milchwissenschaft*, 37, 651-653, **1982**.
- [108] Topçu, A.; Saldamli, I., Proteolytical, Chemical, Textural and Sensorial Changes During the Ripening of Turkish White Cheese Made of Pasteurized Cows' Milk, *International Journal of Food Properties*, 9, 665-678, **2006**.
- [109] Andrews, A. T., Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins, *Journal of Dairy Research*, 50, 45-55, **1983**.
- [110] Shalabi, S. I.; Fox, P. F., Electrophoretic Analysis of Cheese: Comparison of Methods, *Irish Journal of Food Science and Technology*, 11, 135-151, **1987**.

- [111] Blakesley, R. W.; Boezi, J. A., A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue G250, *Analytical Biochemistry*, 82, 580-582, **1977**.
- [112] Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-5, **1970**.
- [113] Hayaloğlu, A. A.; Topcu, A.; Koca, N., Peynir Analizleri. *Peynir Biliminin Temelleri*, (eds: Hayaloğlu, A. A.; Özer, B., Sidaş: İzmir, Türkiye, 508-517, **2011**.
- [114] De Jong, C.; Badings, H. T., Determination of free fatty acids in milk and cheese procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis, *Journal of High Resolution Chromatography*, 13, 94-98, **1990**.
- [115] Manolaki, P.; Katsiari, M. C.; Alichanidis, E., Effect of a commercial adjunct culture on organic acid contents of low-fat Feta-type cheese, *Food Chemistry*, 98, 658-663, **2006**.
- [116] Bouzas, J.; Kantt, C. A.; Bodyfelt, F.; Torres, J. A., Simultaneous Determination of Sugars and Organic Acids in Cheddar Cheese by High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Food Science*, 56, 276-278, **1991**.
- [117] Califano, A. N.; Bevilacqua, A. E., Multivariate Analysis of the Organic Acids Content of Gouda type Cheese during Ripening, *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 949-960, **2000**.
- [118] Zeppa, G.; Conterno, L.; Gerbi, V., Determination of organic acids, sugars, diacetyl, and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2722-6, **2001**.
- [119] Delgado, F. J.; González-Crespo, J.; Cava, R.; García-Parra, J.; Ramírez, R., Characterisation by SPME–GC–MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese P.D.O. Torta del Casar during ripening, *Food Chemistry*, 118, 182-189, **2010**.
- [120] Özer, B.; Kirmaci, H. A.; Hayaloglu, A. A.; Akçelik, M.; Akkoç, N., The effects of incorporating wild-type strains of *Lactococcus lactis* into Turkish white-brined cheese (Beyaz peynir) on the fatty acid and volatile content, *International Journal of Dairy Technology*, 64, 494-501, **2011**.
- [121] Tunick, M. H., Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture, *Journal of Dairy Science*, 83, 1892-8, **2000**.
- [122] Piraino, P.; Parente, E.; McSweeney, P. L., Processing of chromatographic data for chemometric analysis of peptide profiles from cheese extracts: a novel approach, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6904-11, **2004**.
- [123] Larsen, N.; Moslehi-Jenabian, S.; Werner, B. B.; Jensen, M. L.; Garrigues, C.; Vogensen, F. K.; Jespersen, L., Transcriptome analysis of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* during milk acidification as affected by dissolved oxygen and the redox potential, *International Journal of Food Microbiology*, 226, 5-12, **2016**.

- [124] McSweeney, P. L. H.; Sousa, M. J., Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review, *Lait*, 80, 293-324, **2000**.
- [125] Joosten, H. M. L. J.; Stadhouders, J., Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 1: Decarboxylase properties of starter bacteria, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 41, 247–258, **1987**.
- [126] Molimard, P.; Spinnler, H. E., Review: Compounds Involved in the Flavor of Surface Mold-Ripened Cheeses: Origins and Properties, *Journal of Dairy Science*, 79, 169-184, **1996**.
- [127] Barbieri, G.; Bolzoni, L.; Careri, M.; Mangia, A.; Parolari, G.; Spagnoli, S.; Virgili, R., Study of the Volatile Fraction of Parmesan Cheese, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1170-1176, **1994**.
- [128] Dunn, H. C.; Lindsay, R. C., Evaluation of the Role of Microbial Strecker-Derived Aroma Compounds in Unclean-Type Flavors of Cheddar Cheese, *Journal of Dairy Science*, 68, 2859-2874, **1985**.
- [129] Lemieux, L.; Simard, R., E., Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition, *Lait*, 72, 335-385, **1992**.
- [130] Casey, J.; Dobb, R., Microbial routes to aromatic aldehydes, *Enzyme and Microbial Technology*, 14, 739-747, **1992**.
- [131] Sieber, R.; Bütikofer, U.; Bosset, J. O., Benzoic acid as a natural compound in cultured dairy products and cheese, *International Dairy Journal*, 5, 227-246, **1995**.
- [132] Kim, S. C.; Olson, N. F., Production of methanethiol in milk fat-coated microcapsules containing *Brevibacterium linens* and methionine, *Journal of Dairy Research*, 56, 799-811, **1989**.
- [133] Weimer, B.; Seefeldt, K.; Dias, B., Sulfur metabolism in bacteria associated with cheese, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, 247-61, **1999**.
- [134] Curtin, A. C.; McSweeney, P. L. H., Catabolism of amino acids in cheese during ripening. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Third Edition (eds: Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.; Cogan, T. M.; Guinee, T. P., Elsevier: London, 435 – 454, **2004**.
- [135] Seefeldt, K. E.; Weimer, B. C., Diversity of sulfur compound production in lactic acid bacteria, *Journal of Dairy Science*, 83, 2740-6, **2000**.
- [136] Amarita, F.; Requena, T.; Taborda, G.; Amigo, L.; Pelaez, C., *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* initiate catabolism of methionine by transamination, *Journal of Applied Microbiology*, 90, 971-8, **2001**.
- [137] Amárita, F.; Martínez-Cuesta, C. M.; Taborda, G.; Soto-Yárritu, P. L.; Requena, T.; Peláez, C., Formation of methional by *Lactococcus lactis* IFPL730 under cheese model conditions, *European Food Research and Technology*, 214, 58-62, **2002**.

- [138] Lamberet, G.; Auberger, B.; Bergère, J. L., Aptitude of cheese bacteria for volatile S-methyl thioester synthesis. II. Comparison of coryneform bacteria, *Micrococcaceae* and some lactic acid bacteria starters, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 393-397, **1997**.
- [139] Homatidou, V. I.; Karvouni, S. S.; Dourtoglou, V. G.; Poulos, C. N., Determination of total volatile components of Cucumis melo L. variety cantaloupensis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1385-1388, **1992**.
- [140] Jollivet, N.; Bézenger, M.-C.; Vayssier, Y.; Belin, J.-M., Production of volatile compounds in liquid cultures by six strains of coryneform bacteria, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 790-794, **1992**.
- [141] Lee, C.-W.; Richard, J., Catabolism of L-phenylalanine by some microorganisms of cheese origin, *Journal of Dairy Research*, 51, 461-469, **1984**.
- [142] Nierop Groot, M. N.; de Bont, J. A. M., Conversion of phenylalanine to benzaldehyde initiated by an aminotransferase in *Lactobacillus plantarum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3009-13, **1998**.
- [143] Nierop Groot, M. N.; de Bont, J. A., Involvement of manganese in conversion of phenylalanine to benzaldehyde by lactic acid bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 5590-3, **1999**.
- [144] Klein, N.; Maillard, M. B.; Thierry, A.; Lortal, S., Conversion of amino acids into aroma compounds by cell-free extracts of *Lactobacillus helveticus*, *Journal of Applied Microbiology*, 91, 404-11, **2001**.
- [145] Gao, S.; Oh, D., H.; Broadbent, J., R.; Johnson, M., E.; Weimer, B., C.; Steele, J., L., Aromatic amino acid catabolism by lactococci, *Lait*, 77, 371-381, **1997**.
- [146] Gummalla, S.; Broadbent, J. R., Tryptophan catabolism by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus helveticus* cheese flavor adjuncts, *Journal of Dairy Science*, 82, 2070-2077, **1999**.
- [147] Ummadi, M.; Weimer, B. C., Tryptophan catabolism in *Brevibacterium linens* as a potential cheese flavor adjunct, *Journal of Dairy Science*, 84, 1773-82, **2001**.
- [148] Matloubi Moghaddam, F.; Rezanejade Bardajee, G.; Ismaili, H.; Maryam Dokht Taimoory, S., Facile and Efficient One-Pot Protocol for the Synthesis of Benzoxazole and Benzothiazole Derivatives using Molecular Iodine as Catalyst, *Synthetic Communications*, 36, 2543-2548, **2006**.
- [149] Christensen, J. E.; Dudley, E. G.; Pederson, J. A.; Steele, J. L., Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, 217-46, **1999**.
- [150] Braun, S. D.; Olson, N. F., Microencapsulation of Cell-Free Extracts to Demonstrate the Feasibility of Heterogeneous Enzyme Systems and Cofactor Recycling for Development of Flavor in Cheese, *Journal of Dairy Science*, 69, 1202-1208, **1986**.

- [151] Preininger, M.; Warmke, R.; Grosch, W., Identification of the character impact flavour compounds of Swiss cheese by sensory studies of models, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 202, 30-34, **1996**.
- [152] Yvon, M.; Chambellon, E.; Bolotin, A.; Roudot-Algaron, F., Characterization and Role of the Branched-Chain Aminotransferase (BcaT) Isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO 763, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 571-577, **2000**.
- [153] Hansen, B. V.; Houlberg, U.; Ardö, Y., Transamination of branched-chain amino acids by a cheese related *Lactobacillus paracasei* strain, *International Dairy Journal*, 11, 225-233, **2001**.
- [154] Cook, M. W.; Thygesen, H. V., Safety evaluation of a hexose oxidase expressed in *Hansenula polymorpha*, *Food and Chemical Toxicology*, 41, 523-9, **2003**.
- [155] Poulsen, C.; Høstrup, P. B., Purification and Characterization of a Hexose Oxidase with Excellent Strengthening Effects in Bread, *Cereal Chemistry Journal*, 75, 51-57, **1998**.
- [156] Nordkvist, M.; Nielsen, P. M.; Villadsen, J., Oxidation of lactose to lactobionic acid by a *Microdochium nivale* carbohydrate oxidase: Kinetics and operational stability, *Biotechnology and Bioengineering*, 97, 694-707, **2007**.
- [157] Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H., Cheese: An Overview. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Third (eds: Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.; Cogan, T. M.; Guinee, T. P., Elsevier Applied Science: Amsterdam, 1-18, **2004**.
- [158] Caldeo, V. *Oxidation-reduction potential and its influence on cheddar cheese quality*. University College Cork, Cork, Ireland, **2015**.
- [159] Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H., Proteolysis in cheese during ripening, *Food Reviews International*, 12, 457-509, **1996**.
- [160] Bastian, E. D.; Hansen, K. G.; Brown, R. J., Activation of Plasmin with Urokinase in Ultrafiltered Milk for Cheese Manufacture, *Journal of Dairy Science*, 74, 3669-3676, **1991**.
- [161] Beuvier, E.; Buchin, S., Raw Milk Cheeses. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Third (eds: Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.; Cogan, T. M.; Guinee, T. P., Elsevier Applied Science: Amsterdam, 319-346, **2004**.
- [162] Ardö, Y., Evaluating proteolysis by analysing the N content of cheese fractions, *Bulletin of the IDF*, 4-9, **1999**.
- [163] McSweeney, P. L. H., Biochemistry of cheese ripening, *International Journal of Dairy Technology*, 57, 127-144, **2004**.
- [164] Singh, T. K.; Gripon, J. C.; Fox, P. F., Chromatographic analysis and identification of peptides in cheese, *Bulletin of the IDF*, 17-23, **1999**.
- [165] Upadhyay, V. K.; McSweeney, P. L. H.; Magboul, A. A. A.; Fox, P. F., Proteolysis in cheese during ripening. *Cheese :Chemistry, Physics and Microbiology*, Third (eds: Fox,

P. F.; McSweeney, P. L. H.; Cogan, T. M.; Guinee, T. P., Elsevier Applied Science: Amsterdam, 391-433, **2004**.

[166] Stadtman, E. R.; Levine, R. L., Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins, *Amino Acids*, 25, 207-18, **2003**.

[167] Tornvall, U., Pinpointing oxidative modifications in proteins-recent advances in analytical methods, *Analytical Methods*, 2, 1638-1650, **2010**.

[168] Davies, M. J., The oxidative environment and protein damage, *Biochim Biophys Acta*, 1703, 93-109, **2005**.

[169] Li, S.; Schoneich, C.; Borchardt, R. T., Chemical instability of protein pharmaceuticals: Mechanisms of oxidation and strategies for stabilization, *Biotechnology and Bioengineering*, 48, 490-500, **1995**.

[170] Zeng, X. *Oxidation of alpha-lactalbumin peptides with and without procyanidins*. University of Helsinki, Helsinki, **2014**.

[171] Gürbüz, G. *Chromatographic separation, fractionation and oxidation of selected beta-lactoglobulin peptides*. University of Helsinki, Helsinki, **2010**.

[172] Lau, K. Y.; Barbano, D. M.; Rasmussen, R. R., Influence of Pasteurization of Milk on Protein Breakdown in Cheddar Cheese During Aging, *Journal of Dairy Science*, 74, 727-740, **1991**.

[173] Hill, R. D.; Lahav, E.; Givol, D., A rennin-sensitive bond in alpha-s1 B-casein, *Journal of Dairy Research*, 41, 147-53, **1974**.

[174] McSweeney, P. L.; Olson, N. F.; Fox, P. F.; Healy, A.; Hojrup, P., Proteolytic specificity of chymosin on bovine alpha s1-casein, *Journal of Dairy Research*, 60, 401-12, **1993**.

[175] de Jong, L., Protein breakdown in soft cheese and its relation to consistency. 1-Proteolysis and consistency of Noordhollandse Meshanger cheese, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 30, 242-253, **1976**.

[176] Creamer, L. K.; Olson, N. F., Rheological Evaluation of Maturing Cheddar Cheese, *Journal of Food Science*, 47, 631-636, **1982**.

[177] Mulvihill, D. M.; Fox, P. F., Proteolysis of Bovine Beta-Casein by Chymosin: Influence of pH, Urea and Sodium Chloride, *Irish Journal of Food Science and Technology*, 2, 135-139, **1978**.

[178] Benfeldt, C., Ultrafiltration of cheese milk: Effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening, *International Dairy Journal*, 16, 600-608, **2006**.

[179] Ong, L.; Henriksson, A.; Shah, N. P., Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid, *International Dairy Journal*, 16, 446-456, **2006**.

- [180] Fox, P. F.; Guinee, T. P.; Cogan, T. M.; McSweeney, P. L. H., *Fundamentals of Cheese Science*. Second ed.; Springer US: New York, p 799; **2017**.
- [181] Collins, Y. F.; McSweeney, P. L. H.; Wilkinson, M. G., Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge, *International Dairy Journal*, 13, 841-866, **2003**.
- [182] Kondyli, E.; Katsiari, M. C.; Masouras, T.; Voutsinas, L. P., Free fatty acids and volatile compounds of low-fat Feta-type cheese made with a commercial adjunct culture, *Food Chemistry*, 79, 199-205, **2002**.
- [183] Upreti, P.; McKay, L. L.; Metzger, L. E., Influence of calcium and phosphorus, lactose, and salt-to-moisture ratio on Cheddar cheese quality: changes in residual sugars and water-soluble organic acids during ripening, *Journal of Dairy Science*, 89, 429-43, **2006**.
- [184] Careri, M.; Spagnoli, S.; Panari, G.; Zannoni, M.; Barbieri, G., Chemical parameters of the non-volatile fraction of ripened Parmigiano-Reggiano cheese, *International Dairy Journal*, 6, 147-155, **1996**.
- [185] McKay, L. L.; Walter, L. A.; Sandine, W. E.; Elliker, P. R., Involvement of phosphoenolpyruvate in lactose utilization by group N streptococci, *Journal of Bacteriology*, 99, 603-10, **1969**.
- [186] Garrigues, C.; Loubiere, P.; Lindley, N. D.; Coccagn-Bousquet, M., Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio, *Journal of Bacteriology*, 179, 5282-5287, **1997**.
- [187] Hugenholtz, J., Citrate metabolism in lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 165-178, **1993**.
- [188] Akalin, A. S.; Gönç, S.; Akbaş, Y., Variation in Organic Acids Content during Ripening of Pickled White Cheese, *Journal of Dairy Science*, 85, 1670-1676, **2002**.
- [189] Anastasi, G.; Antonelli, M. L.; Biondi, A.; Vinci, G., Orotic acid: a milk constituent Enzymatic determination by means of a new microcalorimetric method, *Talanta*, 52, 947-52, **2000**.
- [190] González de Llano, D.; Rodriguez, A.; Cuesta, P., Effect of lactic starter cultures on the organic acid composition of milk and cheese during ripening—analysis by HPLC, *Journal of Applied Bacteriology*, 80, 570-276, **1996**.
- [191] Maxwell, S. R.; Thomason, H.; Sandler, D.; Leguen, C.; Baxter, M. A.; Thorpe, G. H.; Jones, A. F.; Barnett, A. H., Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus, *Eur J Clin Invest*, 27, 484-90, **1997**.
- [192] Hutkins, R. W., Metabolism of starter cultures. *Applied Dairy Microbiology*, (eds: Marth, E. H.; Steele, J. L., Marcel Dekker, Inc.: New York, **2001**.

- [193] Thomas, T. D.; Ellwood, D. C.; Longyear, V. M., Change from homo- to heterolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures, *Journal of Bacteriology*, 138, 109-17, **1979**.
- [194] Aston, J. W.; Dulley, J. R., Cheddar cheese flavour, *Australian Journal of Dairy Technology*, 37, 59–64, **1982**.
- [195] Liu, S. Q.; Holland, R.; Crow, V. L., Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review, *International Dairy Journal*, 14, 923-945, **2004**.
- [196] Engels, W. J. M.; Visser, S., Isolation and comparative characterization of components that contribute to the flavour of different types of cheese, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 48, 127-140, **1994**.
- [197] Garde, S.; Carbonell, M.; Fernandez-Garcia, E.; Medina, M.; Nunez, M., Volatile compounds in Hispanico cheese manufactured using a mesophilic starter, a thermophilic starter, and bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* INIA 415, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6752-7, **2002**.
- [198] Beal, P.; Mittal, G. S., Vibration and compression responses of Cheddar cheese at different fat content and age, *Milchwissenschaft*, 55, 139–142, **2000**.
- [199] Lucey, J. A.; Johnson, M. E.; Horne, D. S., Invited review: perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese, *Journal of Dairy Science*, 86, 2725-43, **2003**.
- [200] Curioni, P. M. G.; Bosset, J. O., Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry, *International Dairy Journal*, 12, 959-984, **2002**.
- [201] Marilley, L.; Casey, M. G., Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains, *International Journal of Food Microbiology*, 90, 139-159, **2004**.

EKLER

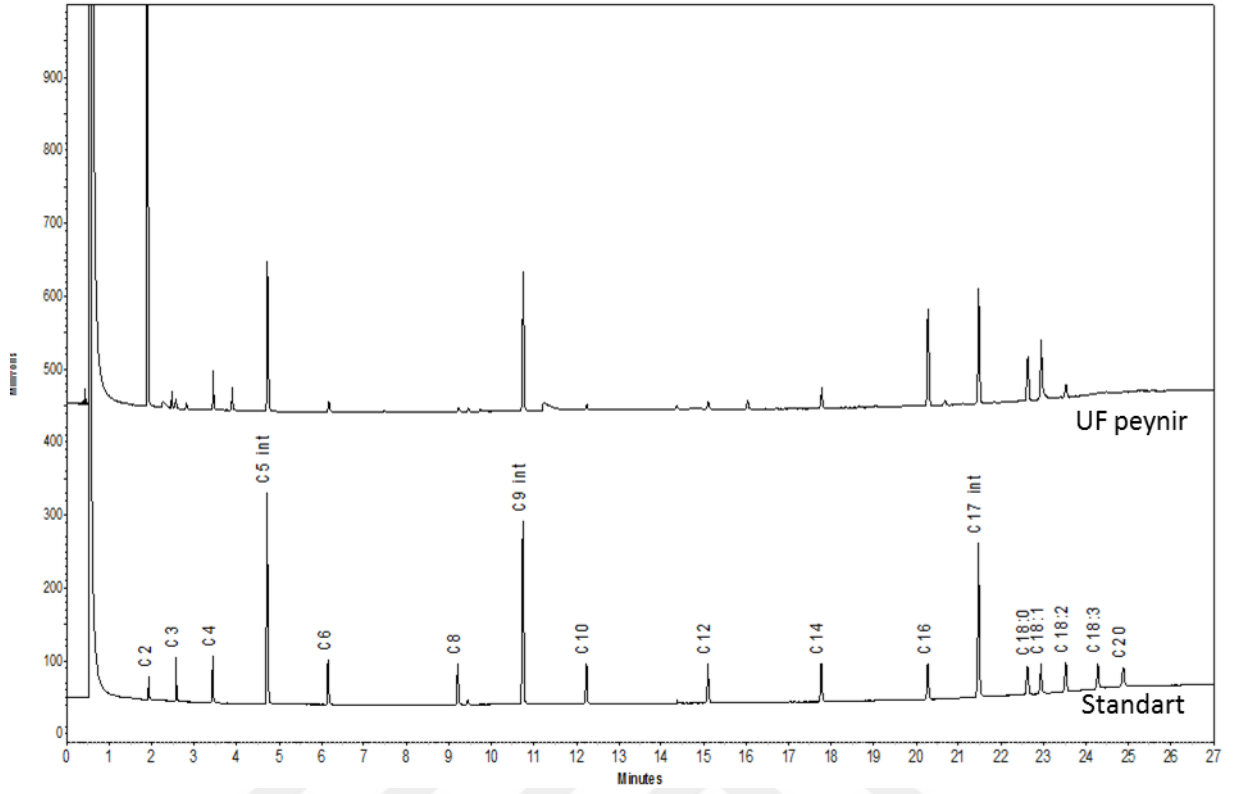
EK 1. Peynir örnekleri için duyuşal muayene değerlendirme puanları

DEĞERLENDİRME KRİTERLERİ	PUAN
DIŞ GÖRÜNÜM VE RENK	
Kendine özgü düzgün parlak beyaz, homojen ve düzgün prizmatik görünümlü bozulmamış kalıp	10
Mat. Soluk beyaz renk ve kesit yüzeyinde birkaç delik ve gözenek	9
Homojen olmayan görünüm	8
Bir örnek olmayan renk dağılımı	7*
Düzgün olmayan prizmatik görünüm	6*
Parçalanan çatlak kalıp, fazla sayıda delik ve gözenek, esmerimsi ve anormal renk, küflü görünüm	≤ 5
TAT	
Kendine özgü tat	10
Maya tadı veya pişmiş tat	9
Tuzlu tat	8
Ekşi tat	7*
Tatlımsı veya yavan tat	6*
Metalik, küflü, acı, ransit veya amonyak tadı	≤ 5
KOKU	
Kendine özgü koku	10
Mayamsı koku	9
Ekşimsi koku	8
Küfümsü koku	7*
Yabancı, hayvansal koku, yem veya ot kokusu	≤ 6
YAPI	
Düzgün, pürüzsüz, lekesiz, homojen kesit, fazla sert veya fazla yumuşak olmayan	10
Kuru ve sert yapı	9
Dağılabilen yapı	8
Lekeli kesit	7*
Kaygan yapı	6*
Kumlu, elastiki, yumuşak ve ıslak, yarık ve çatlak, erimiş yapı	≤ 5

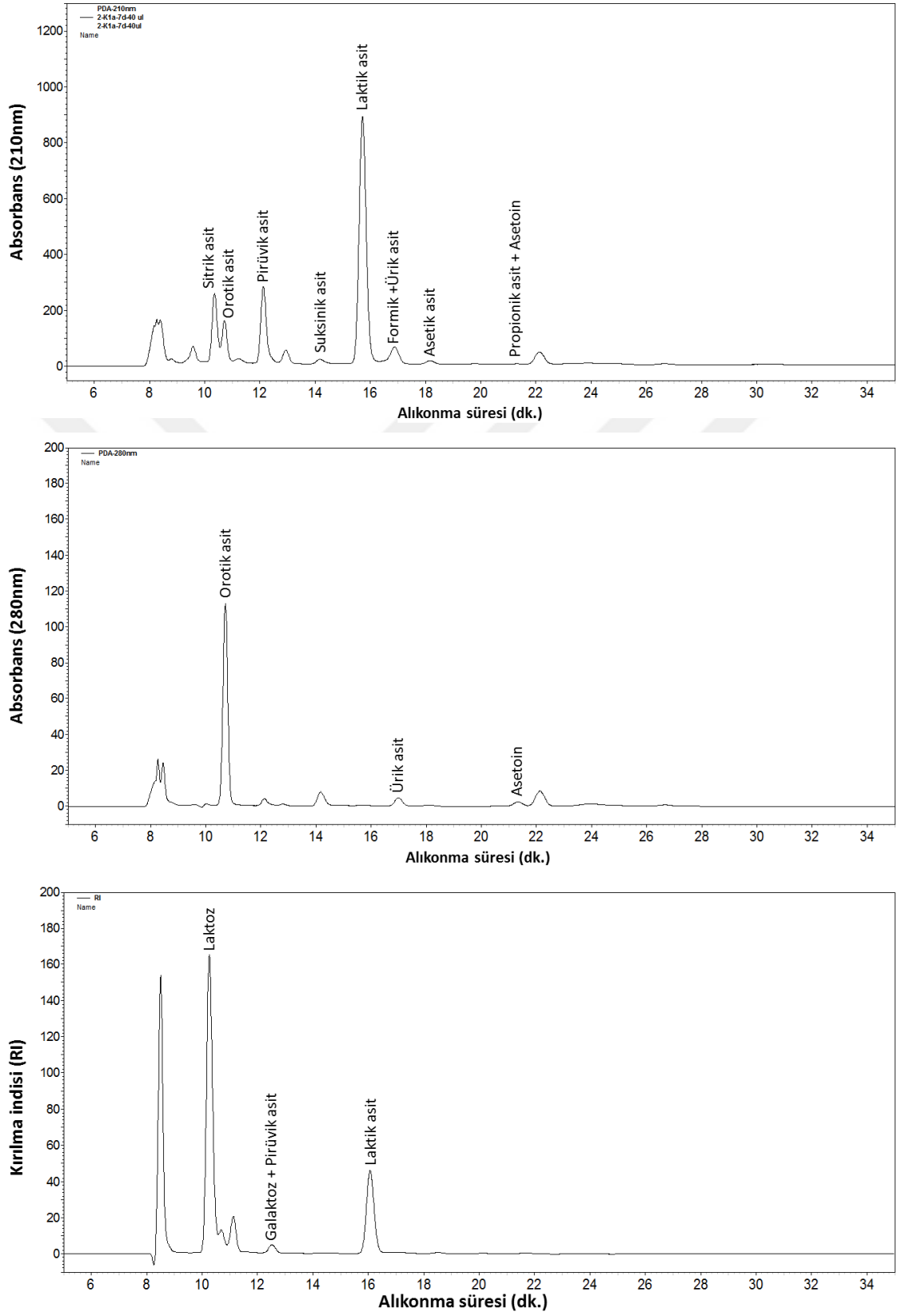
TOPLAM KABUL EDİLEBİLİRLİK	PUAN
Çok beğendim	5
Tüketebilirim	4
Düzeltilmeli	3
Hiç beğenmedim	1-2

ACILIK DERECEŚİ	PUAN
Acılık yok	0
Çok az acı	1
Belirgin acılık	2
Çok acılık	3
Aşırı acılık	4

EK 2. UF peynir örneğine ve serbest yağ asidi standardına ait GC kromatogramı



EK 3. UF peynir örneğinin 210 nm, 280 nm ve RI’de elde edilen HPLC kromatogramları



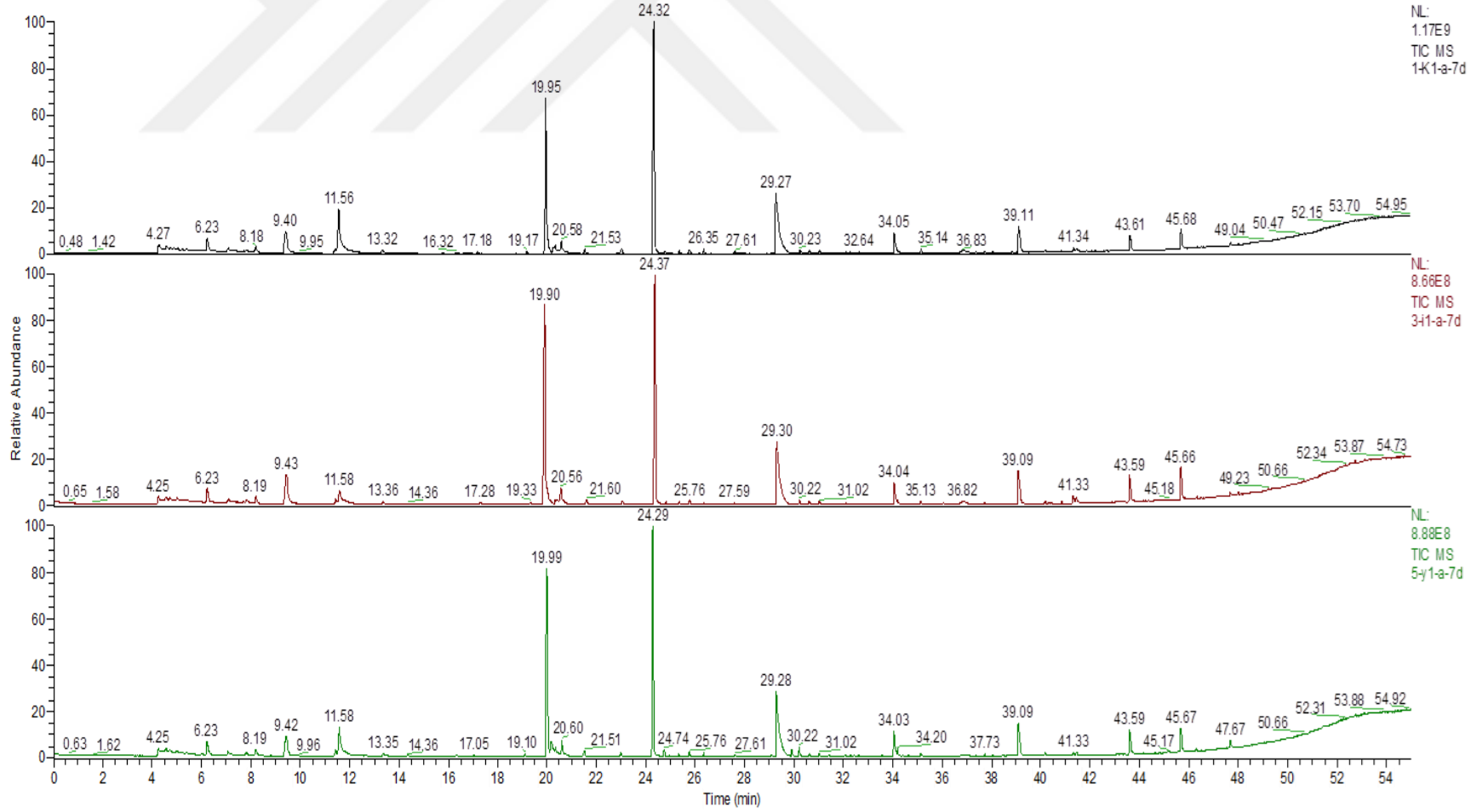
EK 4. Belirlenen bazı uçucu bileşenlere ait aromatik tanımlama^a

Grup	Fonksiyonel Grup	Kimyasal Bileşik	Aromatik Özelliği
Alkoller	Birincil Alkoller	Etanol	Kuru/tozlu
		1-heptanol	Yağlı/çiçek/çimen
		1-oktanol	
		1-nonanol	
		1-dekanol	Yağlı/saman
		1-dodekanol	
	İkincil Alkoller	3-heptanol	Bitki/yağımsı
		4-heptanol	Bitki/toprak
		2-oktanol	Mantar/Hindistan cevizi/ransit
	Doymamış Alkoller	3-metil-2-büten-1-ol	Peynir/meyvemsi/çimen
	Terpen Alkolleri	Linalool	Tatlı/çiçek/bal
Aldehitler	Düz Zincirli Aldehitler	Hekzenal	Ot
		Heptanal	Sabunumsu/ot
		Oktanal	Yağlı/ot
		Nonanal	Ot/mumsu/hayvan
		2-nonenal	Ot/yağlı
		Dekanal	Fındık/çiçek
	Dallanmış Aldehitler	2-etil-2-hekzenal	Acı badem/yağlı
	Halkalı Yapıdaki Aldehitler	Benzaldehit	Badem
		4-metil Benzaldehit	Badem
Ketonlar		2-propanon	Talaş/saman
		2,3-bütandion	Tereyağ
		3-hidroksi-2-bütanon	Tereyağ
		2-pentanon	Tatlı/meyvemsi
		3-metil-2-bütanon	Nane
		3-heptanon	Küflü/sabunumsu/meyvemsi
		4-oktanon	Toprak
		2-okten-4-on	Mantar
		2-nonanon	Ot/toprak/küflü/meyvemsi

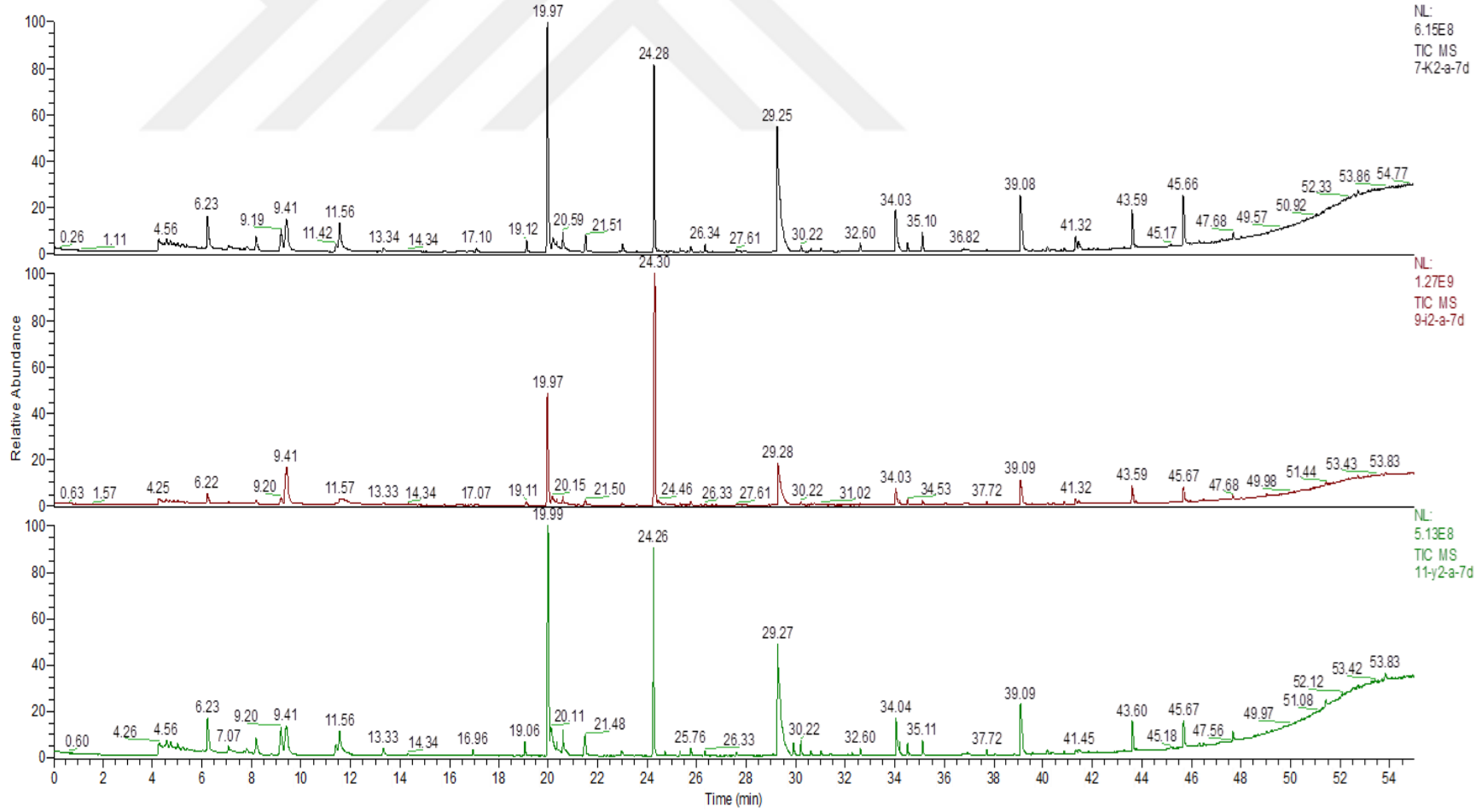
Esterler		Metil bütanoat	Meyvemsi/elma
		Propil bütanoat	Meyvemsi
		2-metil propil bütanoat	Ananas
		1-metil hekzil bütanoat	Nane
		Metil hekzoanat	Ananas
		Etil hekzanoat	Meyvemsi/kavun/çürük meyve
		Metil heptanoat	Meyvemsi
		Metil oktanoat	Meyvemsi
		Etil oktanoat	Meyvemsi
		Etil nonanoat	Çiçek
Asitler	Düz Zincirli Yağ Asitleri	Asetik asit	Sirke
		Propanoik asit	Keskin
		Bütanoik asit	Tatlımsı/peynirimsi
		Pentanoik asit	Odun/sebze/baharat
		Hekzanoik asit	Keskin/keçimsi
		Oktanoik asit	Peynir/keçimsi
		Nonanoik asit	Keçi
		Dekanoik asit	Peynir/keçimsi
		Dodekanoik asit	Sabunumsu
	Dallanmış Yağ Asitleri	2-metil propanoik asit	Peynir/ransit tereyağ
		3-metil bütanoik asit	Tatlımsı/kirli çorap

^a Bu bilgilerin elde edilmesinde Curioni ve Bosset [200] ve Marilley ve Casey [201]'den yararlanılmıştır.

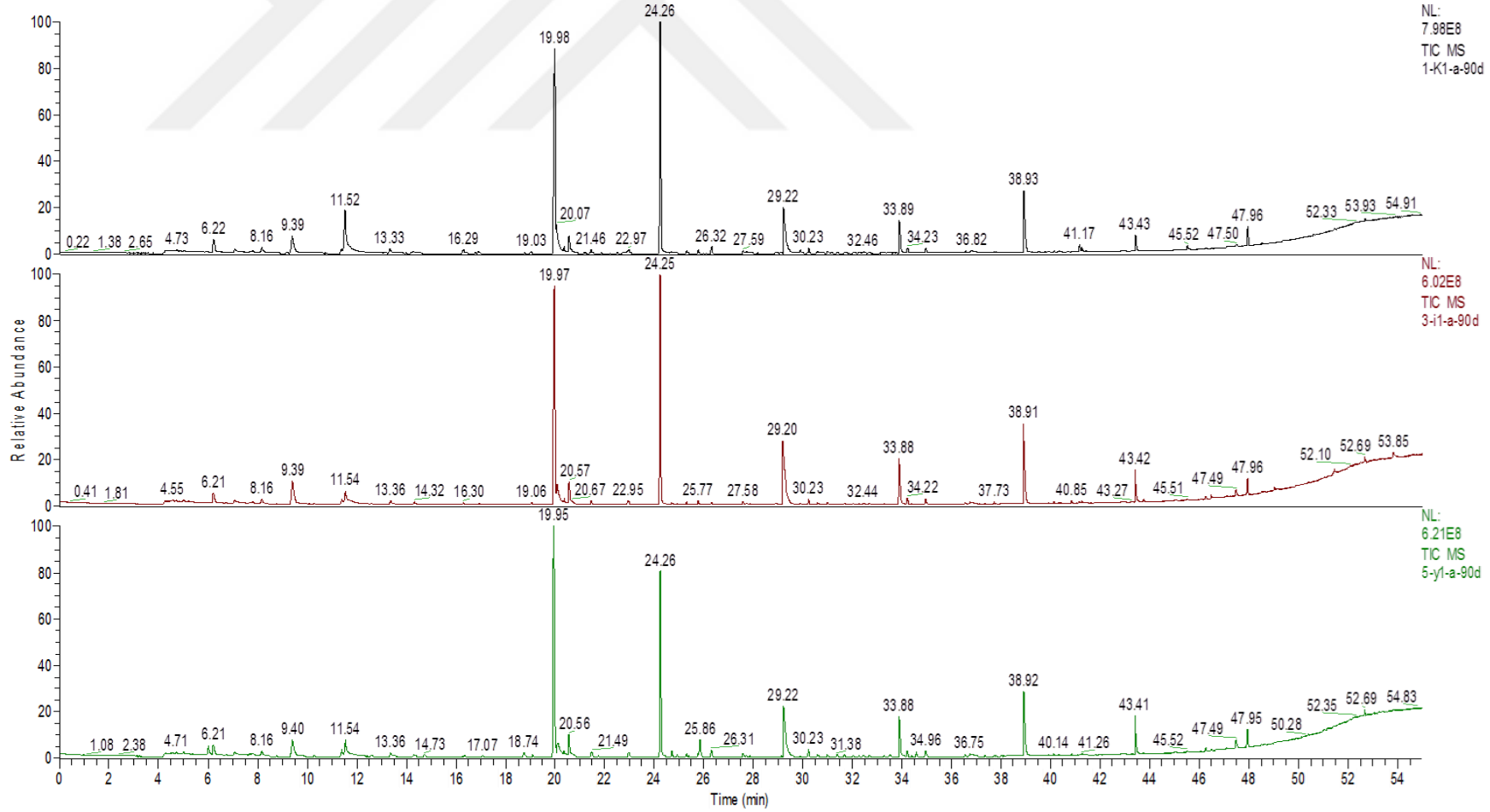
EK 5a. *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu kullanılarak üretilen peynirlerde olgunlaşmanın 7. gününde SPME-GC-MS kromatogramları (K:Kontrol, İ:İndirgen, Y: Yükseltgen)



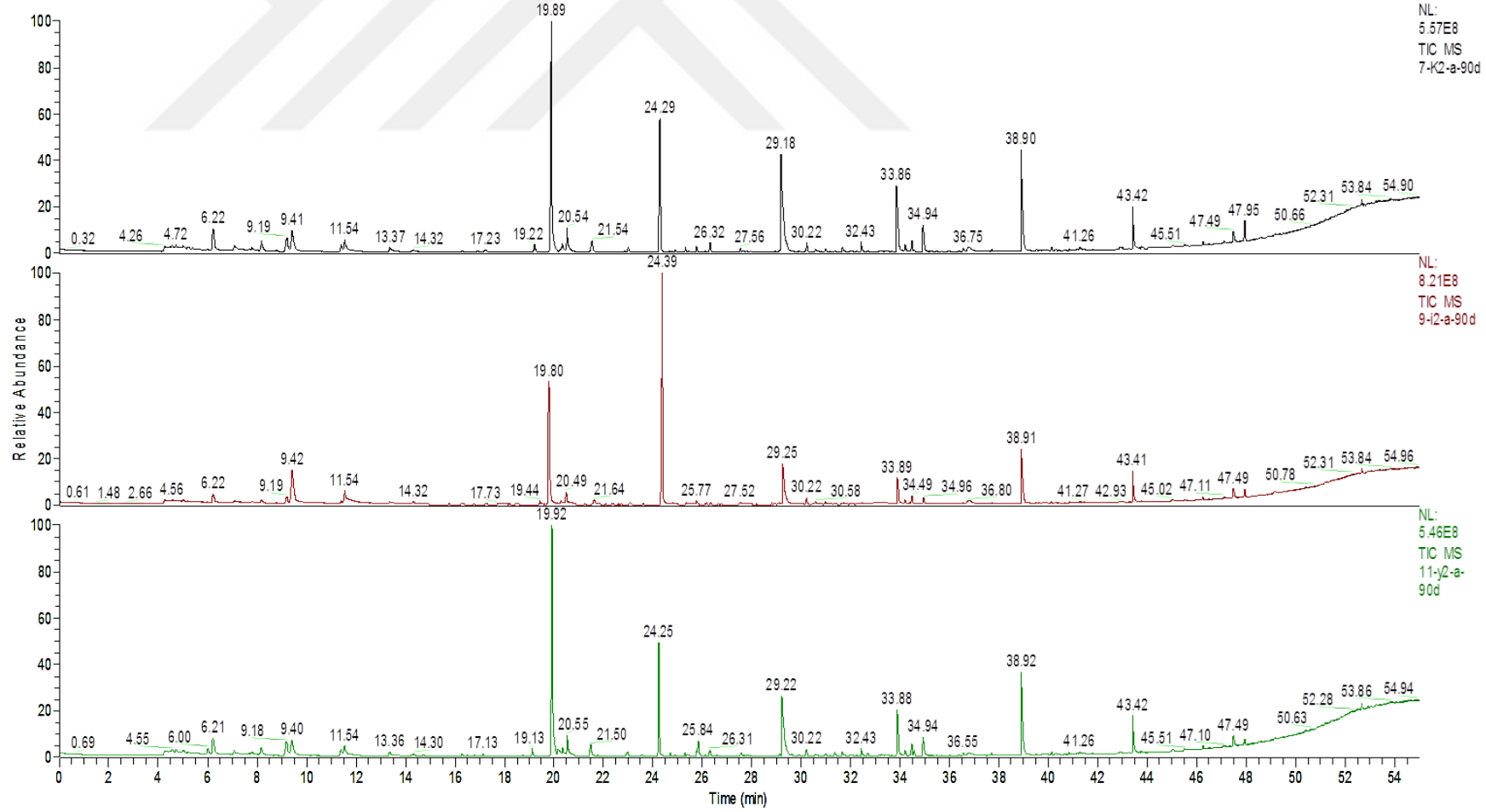
EK 5b. *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu kullanılarak üretilen peynirlerde olgunlaşmanın 7. gününde SPME-GC-MS kromatogramları (K:Kontrol, İ:İndirgen, Y: Yükseltgen)



EK 5c. *L. lactis* subsp. *lactis* CM41 suşu kullanılarak üretilen peynirlerde olgunlaşmanın 90. gününde SPME-GC-MS kromatogramları (K:Kontrol, İ:İndirgen, Y: Yükseltgen)



EK 5d. *L. lactis* subsp. *cremoris* UD459 suşu kullanılarak üretilen peynirlerde olgunlaşmanın 90. gününde SPME-GC-MS kromatogramları (K:Kontrol, İ:İndirgen, Y: Yükseltgen)



ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Tuğba BULAT

Doğum Yeri : Ankara, Türkiye

E-posta : tbulat@hacettepe.edu.tr

Adresi : Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü
06800, Beytepe, Ankara, Türkiye

Eğitim

Lise : Şentepe Lisesi (1998-2001)

Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2002-2007)

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2008-2011)

Doktora : Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2011-2017)

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (İleri)

İş Deneyimi

Gıda Mühendisi, Kavaklıdere Şarapları A.Ş. (Ağustos-Ekim 2007)

Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2008-devam)

Deneyim Alanları

Gıda Mühendisliği, Süt Teknolojisi, Süt Kimyası ve Biyokimyası, Peynir Bilimi ve Teknolojisi, Gıda Analizleri

Ödül ve Burslar:

2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Tez Bursu, TÜBİTAK BİDEB

Projeler: -

Yayınlar: -

Sözlü Sunumlar:

Topcu, A., Bulat, T., "Peynirde Redoks Potansiyelinin Önemi", Süt Endüstrisinde Yenilikçi Yaklaşımlar Sempozyumu, 15-16 Kasım 2012, Denizli.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 07/02/2017

Tez Başlığı / Konusu: **OKSİDASYON-REDÜKSİYON POTANSİYELİNİN ULTRAFİLTRE BEYAZ PEYNİRİN OLGUNLAŞMA SÜRECİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç ve e)Kaynakça kısımlarından oluşan toplam **197** sayfalık kısmına ilişkin, **07/02/2017** tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından **Turnitin** adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/~~dâhil~~
- 3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

07.02.2017

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Tuğba BULAT
Öğrenci No: N10248874
Anabilim Dalı: Gıda Mühendisliği
Programı: Doktora
Statüsü: ☐ Y.Lisans ☒ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Doç. Dr. Ali TOPCU