



PhD Research Article / Doktora Çalışması Araştırma Makalesi
**DEVELOPMENT OF A NEW METHOD FOR THE DETERMINATION OF
RENNIN ACTIVITY**

Türkan BÖRKLÜ BUDAK*, Hüseyin AFŞAR

Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Esenler-İSTANBUL

Received/Geliş: 09.12.2009 Accepted/Kabul: 25.02.2011

ABSTRACT

Dairy products take an important place in food industry all over the world, especially, cheese industry that has more than a thousand product variety. Milk and rennin are the most important constituents of the cheese production. Rennin can be obtained by different ways, however, animal based rennin is usually used in cheese industry. This kind of rennin is obtained from stomach region of young calves and lambs. Rennin consists of 75 % chymosin and 25 % pepsin enzyme. When rennin is added to milk, casein particles, that are in milk, get an unstable situation. As a result k-casein divides into two parts. These parts are named as calciumparacaseinate and caseinomacropetide (CMP). This reaction is the basic of cheese production. One of the important parameters in cheese industry is the determination of milk clotting activity of rennin. Because, knowing that how much milk can be coagulated by how much rennin is a parameter that should be taken into account due to economic reasons.

Currently using methods for determining standard rennin power include some weak points. A new method is studied that is based on devices in order to remove these weak points which increase fault probability. In this new method, caseinomakropeptid molecule that emerge from proteolysis of milk with effecting rennin (chymosin) is adsorped by Amberlite IRC86 weak asidic cation exchanger resin and then eluated with sodium chloride solution. After that, increasing of the primary amine nitrogen proportion in post coagulation of milk is analysed by using Harding and MacLean's (ninhydrin) method. A formulation is obtained between this increase and coagulation period. Thus, rennin activity can be analyzed by spectrophotometric technique. This innovated process has been compared with the determination method for the classical rennin activation, and it has been understood that there are not any significant Standard deviation between them.

Keywords: Rennin activity, chymosin, casein, resin.

RENNİN AKTİVİTESİNİN TAYİNİ İÇİN YENİ BİR YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

ÖZET

Dünya'da gıda sektörü içerisinde süt ve süt ürünleri önemli bir yer tutmaktadır. Bunlar içerisinde de, binden fazla çeşidi ile peynircilik sektörü ön sıralarda yer almaktadır. Peynir üretiminin vazgeçilmez yapı taşları süt ve peynir mayasıdır (rennin). Rennin farklı yollarla elde edilebilir. Ancak peynir endüstrisinde, çoğu zaman hayvansal kaynaklı rennin kullanılmaktadır. Bu tür rennin, genç hayvanların (dana veya kuzu) mide bölgelerinden elde edilir. Renninin yaklaşık % 75'ini kimozin % 25'ini ise pepsin enzimi oluşturmaktadır. Rennin süte ilave edildiği zaman, süt içerisinde bulunan kazein tanecikleri enzimatik açıdan kararsız bir hal alır. Sonuç olarak k-kazein iki bölüme parçalanır. Bu parçalar, kalsiyumparakazeinat ve kazeinomakropeptid (CMP) olarak adlandırılır. Gerçekleşen bu reaksiyon peynir üretiminin temelini oluşturmaktadır. Peynir endüstrisinin önemli parametrelerinden biri de peynir mayası kuvvetinin (aktivitesinin) belirlenmesidir. Çünkü, ne kadar miktar mayanın ne kadar miktar sütü köktürebileceğinin bilinmesi, ekonomik açıdan göz ardı edilemeyecek bir parametredir.

Halen kullanılan standart maya kuvveti tayin yönteminde, görselliğe dayalı bazı zayıf noktalar bulunmaktadır. Hata ihtimalini arttırabilecek olan bu zayıflığın giderilebilmesi amacı ile cihaza dayalı yeni bir yöntem üzerinde çalışılmıştır. Yeni yöntemde, sütün rennin (kimozin) etkisi ile parçalanması sonucu oluşan kazeinomakropeptid molekülü, Amberlite IRC86 zayıf asidik katyon değiştirici reçine üzerinde alıkonulmuştur ve sodyum klorür çözeltisi ile elusyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından Harding ve MacLean's (ninhidrin) yöntemi kullanılarak, pıhtılaşma sonrası süt içerisinde bulunan primer amin azotu miktarındaki artış incelenmiştir. Bu artış ile pıhtılaşma süresi arasında geliştirilen bir formül yardımı ile, peynir mayası aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edilebilmiştir. Geliştirilen yöntem, klasik peynir mayası aktivitesi tayin yöntemi ile karşılaştırılmış ve standart sapmalar arasında anlamlı fark olmadığı anlaşılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Peynir mayası aktivitesi, kimozin, kazein, reçine.

*Corresponding Author/Sorumlu Yazar: e-mail/e-ileti: turkanborklu@yahoo.com, tel: (212) 383 41 50

1. GİRİŞ

1.1. Peynir Mayası

Peynir yapımında kullanılan maddeler; pıhtılaştırma başlatıcılar (starterler) ve doğal mayalar (rennin) olmak üzere iki kısma ayrılır. Pıhtılaştırma başlatıcılar (starterler), mikrobiyal yolla elde edilen pıhtılaştırıcılardır. Doğal mayalar (rennin) ise, henüz süt emmekte olan buzağuların midelerinin dördüncü kısmından (şirdenden) özel bir teknik ile elde edilmektedir. Şirden mayası, rennet veya rennin olarak isimlendirilmektedir. Ayrıca, bitkisel ve mikrobiyal yolla elde edilen rennet çeşitleri de bulunmaktadır. Renninin % 75-95'lik kısmını kimozen enzimi oluşturmaktadır. Geri kalan %5-25'lik kısmı ise pepsindir. Ancak kimozen pepsine göre daha yüksek miktarda sütü pıhtılaştırma aktivitesine sahiptir [1].

Rennin süte ilave edildiği zaman, süt içerisinde bulunan kazein tanecikleri enzimatik açıdan kararlı bir yapıya bürünür ve k-kazein, kalsiyumparakazeinat şeklinde çöker. Bu yapı da peynir üretiminin temelini oluşturmaktadır [2].

1.2. Maya Kuvvetinin Belirlenmesi

Peynir endüstrisinin önemli parametrelerinden biri de peynir mayası aktivitesinin (kuvvetinin) belirlenmesidir. Çünkü, ne kadar miktar mayanın, ne kadar miktar sütü çöktürebileceğinin bilinmesi ekonomik açıdan göz ardı edilemeyecek bir parametredir. Bir mayanın kuvveti, bir birim (1 mL ya da 1 g) peynir mayasının sabit şartlarda (35 °C' de 40 dakikada) pıhtılaştırabileceği rekonstitüe sütün hacmine (mL ya da g) oranı ile ifade edilir ve birimsizdir (g/g ya da mL/mL) (TSE, 1996). Maya sıvı ise tartım veya hacim ölçülerek kullanılabilir. Eğer maya katı ise yalnızca tartım alınarak çalışılır. Örneğin 1:1000 kuvvetinde bir maya ifadesi, o mayanın 1 mL'sinin 1000 mL taze inek sütünü 35 °C de 40 dakikada pıhtılaştırabileceği anlamına gelmektedir. Ayrıca toz ve tablet mayalarda maya miktarı ağırlık ölçüsü ile ifade edilir [3,4,5].

$$MK = (2400 \times S) / (Z \times M) \quad (1)$$

MK : Maya kuvveti

S : Rekonstitüe süt miktarı (mL) (20 mL)

Z : Pıhtılaştırma süresi (sn)

M : Maya miktarı (mL) (2 mL içindeki maya miktarı)

1.3. Mayalama İşlemi

Süte peynir mayası katıldığı zaman gerçekleşen reaksiyon iki fazlı sistem olarak ele alınmaktadır [6,7]. Birinci fazda, enzim süt içerisinde bulunan, çözünebilir kalsiyumkazeinat moleküllerinin yüzeyindeki glikopeptid bandını kırar ve k-kazein çok dayanıksız olan fenilalanin (105) – metionin (106) (Phe-Met) aminoasit bağından koparak, kalsiyumparakazeinat ve kazeinopeptid olarak adlandırılan iki kısma ayrılır [8]. İkinci fazda ise süt içerisinde bulunan kalsiyum iyonları kalsiyumparakazeinat şeklinde çökmeye neden olur [6,9].

Birinci fazda gerçekleşen işlem, çökmeye etki eden önemli bir basamaktır. Bu nedenle ilgili faz üzerinde pek çok literatür çalışması yapılmıştır. Bunların bazılarında, süte enzim katıldıktan sonra %12'lik TCA (trikloroasetikasit) ekleyerek filtrata geçen azot miktarı incelenmiş ve pıhtılaşmada oluşan birinci faz aydınlatılmaya çalışılmıştır [10]. Bu işlemler sırasında azot miktarının belirlenebilmesi amacı ile mikro Kjeldahl yöntemi kullanılmıştır.

Yine literatürde, %2'lik TCA ve %12'lik TCA'da bulunan NPN (None Protein Nitrogen, Protein Yapısında Olmayan Azot) üzerinde durulmuş ve azot miktarının, sütün çökmesi sırasında arttığı, Technicon Otoanalizör cihazı verilerine dayanarak ispatlanmıştır [11].

Ayrıca sütün çökmesi sırasında k-kazeinde gerçekleşen hidroliz sonucunda peptid ve glikopeptid yapılarında meydana gelen değişim yine, TCA çözeltilisinde bulunabilecek miktarların incelenmesi ile aydınlatılmaya çalışılmıştır [12,13]. Bu çalışmada ise azot miktarı Nessler yöntemi ile belirlenmiştir [14]. İlgili yöntem yine Kjeldahl nesslerizasyon yöntemi olarak literatürde yer almaktadır.

1.4. Azot Miktarının Belirlenmesi

Harding ve MacLean's (ninhidrin) yöntemine göre amin azotu içeren (0,01 – 0,08 mg/mL amin azotu) örneğe, %10'luk sulu piridin ve %2'lik sulu ninhidrin ilave edilir. Karışım 20 dk kaynar su banyosunda bekletilir ve süre bitiminde derhal soğuk su banyosuna alınarak distile su ile belirli bir hacme tamamlanır. Ardından spektrofotometrede ölçüm yapılarak 570 nm dalga boyundaki absorbans değeri kayıt edilir. Standart ölçü eğrisi oluşturabilmek amacı ile lösin reaktif kullanılabılır [15].

2. DENEYSEL BÖLÜM

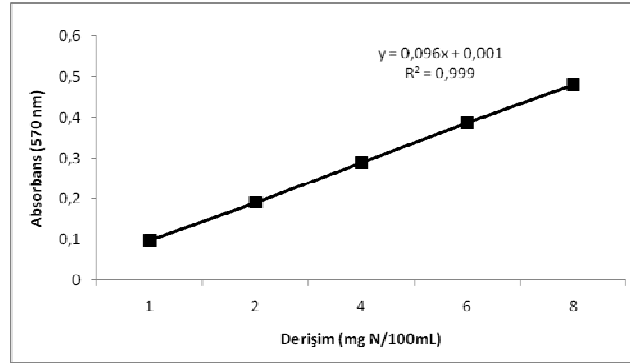
2.1. İlgili Çözeltilerin ve Reçinenin Hazırlanması

%10'luk piridin ve % 2'lik sulu ninhidrin çözeltisi hazırlandı. 12 g yağsız süt tozu 100 mL 0,01 M kalsiyum klorür çözeltisine ilave edildi ve 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ardından 20 dk karanlık bir yerde bekletildi. Saf kimozin içeren mayanın % 0,5'lik çözeltisi günlük olarak hazırlandı. Amberlite IRC86, zayıf asidik katyon değiştirici reçine gerekli işlemlerin ardından çalışma kolonuna alındı.

2.2. Yöntemin Uygulanması

2.2.1. Standart Eğri Çizimi

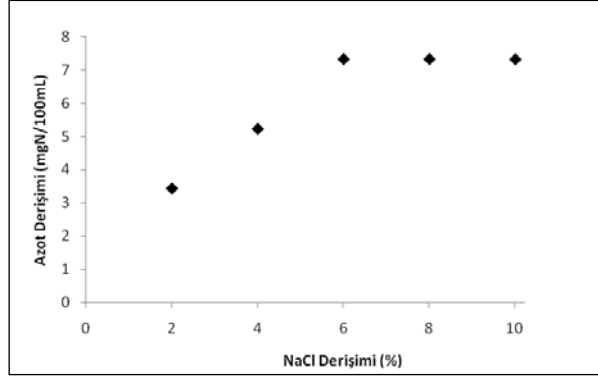
Çalışmalar sırasında spektrofotometrede ölçülen absorbans değerlerine ait derişimlerin hesaplanabilmesi amacı ile, lösin kullanılarak standart eğri hazırlandı. Bu amaçla, standart çözeltilerden alınan 1'er mL'lik örnekler üzerine 1'er mL% 10'luk piridin ve % 2'lik ninhidrin çözeltileri ilave edildi. 20 dk kaynar su banyosunda tutuldu. Süre bitiminde hemen soğuk suya alınıp su ile 100 mL'e tamamlandı. Spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. Ölçü eğrisine ilişkin regresyon analizleri yapıldı. Devam eden çalışmalarda bu standart eğri kullanılarak derişim değerlerine ulaşıldı. Sonuçlar Şekil 1'de görüldüğü gibi bulunmuştur.



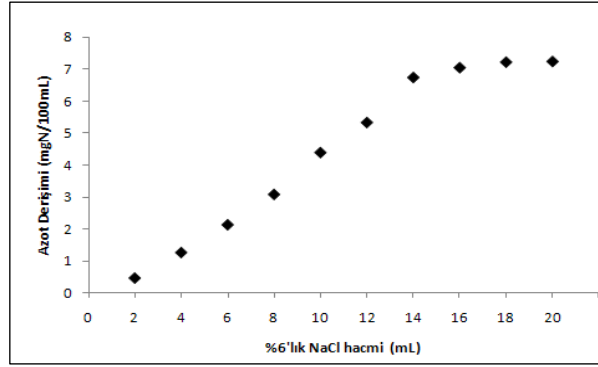
Şekil 1. Standart eğri

2.2.2. Uygun Elusyon Çözeltisi Miktarının Belirlenmesi

Amberlite IRC 86 reçine üzerinde tutulmuş olan primer amin grubu azotunun elusyonu için gerekli en uygun sodyum klorür çözeltisi hacminin ve derişiminin saptanabilmesi için Şekil 2 ve Şekil 3'deki çalışmalar yapılmıştır. Şekil 2'den elusyon için en uygun sodyum klorür derişiminin % 6'lık sodyum klorür olduğu; Şekil 3'den de % 6'lık sodyum klorürün 20 mL'sinin elusyon için yeterli olduğu sonucuna varılmıştır.



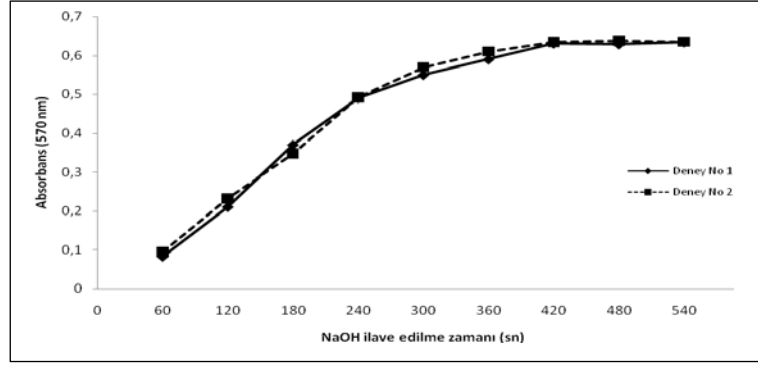
Şekil 2. Elusyon çözeltisi derişiminin incelenmesi



Şekil 3. Elusyon çözeltisi hacminin incelenmesi

2.2.3. Harding ve MacLean's (Ninhidrin) Yöntemi Uygulamaları

20 mL süt + 2 mL %0,5'lik maya karışımı içeren 6 adet örnek, 35°C ±0,2'de su banyosunda bekletildi. Yaklaşık 6 dk sonra pıhtılaşma işlemi gerçekleşti. Strasıyla 2,4,6,8 ve 10. dakikalarda, pıhtılaşma işlemi durdurduğu belirlenen, 0,4'er mL, 1 M sodyum hidroksit çözeltisi ilave edildi. Sonuçlar, Şekil 4'de görüldüğü gibi elde edilmiştir.



Şekil 4. Mayalanma süresi

2.2.4. Yeni Yöntemin k Değerlerinin Bulunması

Pıhtılaşmanın farklı zaman dilimlerinde sodyum hidroksit ilavesi ile durdurularak elde edilen absorbans değerleri ile, kullanılan mayanın gerçek kuvveti olarak bilinen 12000 rakamı arasında eşitlik kurularak k değerleri denklem 2'e göre hesaplandı. Bulunan k değerleri Çizelge 1'de gösterilmektedir. Çizelge 1'de belirtilen "süre" değişkeni, süte maya katıldığı an ile sodyum hidroksit ilave edildiği an arasında geçen zamanın saniye cinsinden değerini ifade etmektedir.

$$MK = (A_0 - A_s) \times k \quad (2)$$

MK : Maya kuvveti

A_0 : Örneğin Absorbans değeri (570 nm)

A_s : Sütün Absorbans değeri (570 nm)

k : Faktör (Çizelge 1'de yer alan k_{ort} değeri)

Çizelge 1. Hesaplanan k değerleri

NaOH ilave edilme zamanı (sn)	k_1 *	k_2 *	k_{ort} *
60	14,63	12,63	13,63
120	5,71	5,15	5,43
180	3,24	3,45	3,35
240	2,45	2,44	2,44
300	2,18	2,11	2,14
360	2,03	1,97	2,00
420	1,90	1,89	1,90
480	1,91	1,88	1,90
520	1,89	1,89	1,89

* $\times 10^{-4}$

2.2.5. Spektrofotometrik Yöntem ile Peynir Mayası Aktivitesinin (Kuvvetinin) Tayini

Maya kuvveti 1/12000 olan maya eşliğinde bir seri absorbans ölçümü yapılmıştır. Pıhtılaşma işleminin sodyum hidroksit ilavesi ile durdurulduğu zaman ile, bulunan azot derişimlerine ait absorbans değerleri Çizelge 2'de gösterilmektedir. Bulunan bu absorbans değerleri kullanılarak,

denklem 2 yardımı ile hesaplanan peynir mayası aktivitesi değerleri yine Çizelge 2’de yer almaktadır.

Çizelge 2. Kuvveti 12000 olan maya eşliğinde gerçekleştirilen çalışmalar

Deney No	NaOH ilave edilme zamanı (sn)	Absorbans değeri (570 nm)	k değeri ($\times 10^{-4}$)	Hesaplanan Maya Kuvveti
1	120	0,22	5,43	$1,21 \times 10^4$
2	180	0,36	3,35	$1,21 \times 10^4$
3	240	0,49	2,44	$1,19 \times 10^4$
4	300	0,56	2,14	$1,21 \times 10^4$
5	360	0,60	2,00	$1,20 \times 10^4$

2.2.6. Klasik Yöntem ile Peynir Mayası Aktivitesinin (Kuvvetinin) Tayini

20 mL süt üzerine % 0,5’lik 2 mL maya ilave edilerek $35 \pm 0,2$ °C’de su banyosunda pıhtılaşma süreleri belirlendi. Denklem 1 kullanılarak peynir mayası aktivitesi hesaplandı. Bulunan sonuçlar Çizelge 3’de gösterilmektedir.

Çizelge 3. Peynir mayası aktivitesinin klasik yöntem ile belirlenmesi

Deney No	Pıhtılaşma Süresi (sn)	Maya Kuvveti
1	402	$1,19 \times 10^4$
2	393	$1,22 \times 10^4$
3	397	$1,21 \times 10^4$
4	400	$1,20 \times 10^4$
5	404	$1,19 \times 10^4$

2.2.7. İstatistiksel Değerlendirme

Klasik yöntem kullanılarak bulunan peynir mayası aktivite değerleri ile, spektrofotometrik yöntem yardımı ile bulunan peynir mayası aktivite değerleri, istatistiksel açıdan incelendi. Sonuçlar Çizelge 4’de gösterilmektedir. Çizelge 4’den de anlaşıldığı gibi, iki yöntem arasında F testi ve t testi açısından anlamlı bir fark yoktur.

Çizelge 4. İki yöntemin istatistiksel değerlendirmesi

Deney No	Klasik yöntem ile bulunan maya kuvveti	Yeni yöntem ile bulunan maya kuvveti
1	$1,19 \times 10^4$	$1,21 \times 10^4$
2	$1,22 \times 10^4$	$1,21 \times 10^4$
3	$1,21 \times 10^4$	$1,19 \times 10^4$
4	$1,20 \times 10^4$	$1,21 \times 10^4$
5	$1,19 \times 10^4$	$1,20 \times 10^4$
X_{ort}	$1,20 \times 10^4$	$1,20 \times 10^4$
S	$0,13 \times 10^3$	$0,07 \times 10^3$
$X_{ort} \pm t.S/\sqrt{n}$	$1,19 \times 10^4 - 1,22 \times 10^4$	$1,19 \times 10^4 - 1,21 \times 10^4$
t testi	0,18 < 2,31	
F_{testi}	3,89 < 6,39	
$n_1 = n_2 = 5$	$F_{4,4}^{0,05}$ (tablo) = 6,39	$t_8^{0,05}$ (tablo) = 2,31

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Türkiye’de ve Dünya’da standart olarak kabul edilen, peynir mayası aktivitesinin (kuvvetinin) tayini işleminin temeli, literatürde yer alan Berridge yöntemine dayanmaktadır. Bu yöntemde ise hataya neden olabilecek görsel faktörlerin bulunduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca pıhtılaşma işlemi sırasında azot değerindeki değişim literatür verilerinde çoğunlukla Kjeldahl Yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

Oysa bu çalışmada kazeinomakropeptid bileşiği, yapısında yer alan R-NH₃⁺ grubu vasıtası ile zayıf asidik katyon değiştirici reçine, Amberlit IRC86, kolonunda alıkonulmuştur. Aynı şekilde sütte bulunan protein zincirinin en ucundaki tersiyer amin grupları da iyon değiştirici de tutulacaktır. Bu nedenle referans olarak süt kullanılmış ve aynı işlem süte de uygulanmıştır. Çizelge 1’de yer alan k_{ort} değerleri kullanılarak denklem 2 yardımı ile spektrofotometrik yöntem ile peynir mayası aktivitesi tayin edilebilmiştir. Yine klasik yöntem kullanılarak peynir mayası aktivitesi tayin edilmiş ve bulunan sonuçlar Çizelge 4’de yer aldığı gibi F ve t testi açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuca göre geliştirilen yöntem ile klasik yöntem arasında anlamlı fark olmadığı anlaşılmaktadır.

Ayrıca Çizelge 1 yardımı ile k değeri bulunamadığı takdirde maya kuvveti denklem 3 yardımı ile de hesaplanabilir.

$$MK = (A_0 - A_s) \times 10^{(2,6645 - 0,9395 \log t)} \quad (3)$$

MK : Maya kuvveti

A₀ : Örneğin Absorbans değeri (570 nm)

A_s : Sütün Absorbans değeri (570 nm)

t : Süre (sn); süte maya katıldığı an ile sodyum hidroksit ilave edildiği zamana kadar geçen süre

Bu matematiksel ifade denel verilerden modelleme ile çıkarılmıştır ve mayalanma süresinin 120 sn ile 420 sn arasında kalması koşulu ile kullanılabilir.

REFERENCES / KAYNAKLAR

- [1] Atacı, N., (2001), “Mucor Miei Rennetin ve Mucor Miei Rennet-Dekstran Konjugatlarının Spektrofluorometrik Yöntemle İncelenmesi”, Yıldız Teknik Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.
- [2] Anema, G., S., Lee, S., K. Ve Klostermeyer, H., (2005), “Effect of pH at Heat Treatment on the Hydrolysis of casein and the Gelation of Skim Milk by Chymosin”, Swiss Society of Food Science and Technology, 40, 99-106.
- [3] Madden, D., (1991), “Milk-Coagulating Enzymes by Accident and Design”, NCBE Newsletter, Summer, 1-5.
- [4] Gill, J. ve Saunders, T., (1987), “Rennin-a Neglected Enzyme?”, Journal of Biological Education 21, (4) 248-250.
- [5] Türk Standartları Enstitüsü (TSE), (1996), “Peynir Mayası”, TS 3844, Nisan.
- [6] Wheelock, J.V. ve Penney, J. P., (1972), “The Role of the Primary Phase of Rennin Action in the Coagulation of Cow’s Milk”, J. Dairy Res., 39, 23.
- [7] Berridge, N.J., (1954), Adv. Enzymol. 15, 423.
- [8] Turhan, M. ve Mutlu, M., (1988), “Kinetics of k-casein/immobilized Chymosin Hydrolysis”, Enzyme and Microbial Technology, 22: 342 – 347.
- [9] Waugh, D.F. ve Von Hippel, P. H., (1956), J. Am. Chem. Soc. 78, 4576.
- [10] Alais, C., Mocquot, G., Nitschmann, H. ve Zahlep, P., (1953), Helv. Chim. Acta, 36, 1955.
- [11] Lee, H.J., Olson, N.F. ve Richardson, T., (1977), “Peptide Release from Milk During Treatment with Immobilized Pepsin and Totality of Clotting of Treated Milk”, J. Dairy Sci., 60:1683-1688.

- [12] Armstrong, C.E., Mackinlay, A.G., Hill, R.J. ve Wake, R.G., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, 140, 123.
- [13] Castle, A.V. ve Wheelock, J.V., (1972), "Effect of Varying Enzyme Concentration on the Action of Rennin on Whole Milk", *J. Dairy Res.*, 39, 15.
- [14] Varley, H., (1954), *Practical Clinical Biochemistry*, p.137. London: Heinemann
- [15] Harding V.J. ve MacLean., R.M., (1915), "A colorimetric method for estimation of amino-acid α -nitrogen.II", *The Journal of Biological Chemistry*, January 14.