



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ENZİM MODİFİYE TEREYAĞI (EMT) ÜRETİMİNDE ÜRETİM İŞLEM
KOŞULLARININ VE ENZİM TİPLERİNİN BELİRLENMESİ

ÇAĞLA ULUBAŞ
YÜKSEK LİSANS



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKEŞ BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ENZİM MODİFİYE TEREYAĞI (EMT) ÜRETİMİNDE ÜRETİM İŞLEM
KOŞULLARININ VE ENZİM TİPLERİNİN BELİRLENMESİ

ÇAĞLA ULUBAŞ
YÜKSEK LİSANS

DANIŞMAN
DOÇ. DR. ZAFER ERBAY

ADANA 2022

**ENZİM MODİFİYE TEREYAĞI (EMT) ÜRETİMİNDE ÜRETİM İŞLEM
KOŞULLARININ VE ENZİM TİPLERİNİN BELİRLENMESİ**

Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Çağla ULUBAŞ tarafından tamamlanan Yüksek Lisans Tezi onaylanmıştır.

Doç. Dr. Ahmet BEYÇİOĞLU
Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Haşim KELEBEK
Anabilim Dalı Başkanı

Doç. Dr. Zafer ERBAY
Danışman

Tez Jürisi

Doç. Dr. Zafer ERBAY
Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi

Prof. Dr. Yonca YÜCEER
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Levent Yurdaer AYDEMİR
Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji
Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi

27/07/2022



Bu tezde yer alan tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik davranışa uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, bu kuralların ve davranışların gerektirdiği şekilde bu çalışmaya özgün olmayan tüm bilgiler için atıf verdiğimi ve kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Çağla ULUBAŞ

ÖZET

ENZİM MODİFİYE TEREYAĞI (EMT) ÜRETİMİNDE ÜRETİM İŞLEM KOŞULLARININ VE ENZİM TİPLERİNİN BELİRLENMESİ

Çağla ULUBAŞ

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Zafer ERBAY

Temmuz 2022, 82 sayfa

Enzim Modifiye Tereyağı (EMT), çeşitli formlardaki süt yağına lipolitik enzimler eklenerek ve belirli koşullarda inkübasyon sağlanarak gerçekleştirilen kontrollü lipoliz prosesidir. Bu süreç sonunda yoğunlaştırılmış tereyağı lezzetine sahip doğal lezzet katkısı üretilmektedir. Süt yağının lipolizi ile ilgili birçok bilimsel çalışma bulunmasına rağmen, konsantre tereyağı lezzeti elde etmeyi amaçlayan çalışmaların literatürdeki sayısı azdır. EMT, endüstriyel uygulanabilirlik, son ürün kararlılığı ve düşük maliyet nedeniyle birçok yönden avantajlıdır.

Bu tez çalışmasında, lipoliz üzerine etkili olduğu düşünülen işlem koşulları belirlenmiş ve kremanın substrat olarak kullanılması ile farklı inkübasyon süresi ve enzim kombinasyonlarında EMT üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Lezzet gelişimi enzimatik aktivite ile gerçekleştiğinden, ilk aşamada enzim aktivitesinin en üst düzeye çıkarılması için uygun lipoliz ortamı belirlenmiştir. Bu amaçla, emülsiyon tipinin ve yağ oranının, emülgatör varlığının, tipinin ve konsantrasyonunun, lipaz konsantrasyonunun, fosfolipaz varlığının ve konsantrasyonunun lipoliz üzerine etkileri incelenmiştir. Hedeflenen yüksek lipoliz düzeyine, su içinde yağ (O/W) tipi emülsiyon ortamıyla, emülsiyondaki yağ oranının artışıyla, lipaz ve fosfolipazın lipolizde eş zamanlı kullanımıyla ve emülgatör varlığıyla ulaşılmıştır. Ancak, gereğinden fazla emülgatör eklendiğinde lipolizin kısıtlandığı saptanmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında, ilk aşamadaki bilimsel deneylerden elde edilen sonuçlar doğrultusunda her bir enzim türü için uygun konsantrasyona karar verilmiş ve farklı inkübasyon sürelerinde EMT üretilmiştir. Inkübasyon sıcaklığı (45 °C), karıştırma hızı (200

rpm), emülsifikasyon hızı ve süresi (30s, 5000 rpm ve 180s, 10000 rpm), emülgatör konsantrasyonu (%0,075), fosfolipaz konsantrasyonu (%0,25) sabit tutularak 240 dakika boyunca inkübasyon sağlanmış ve belirli sürelerde (30, 60, 120 ve 240 dk) örnek alınıp analiz edilmiştir. Enzim kombinasyonları ise Palatase 20000L (%0,25), Lipomod™ 801MDP (%0,2) ve Lipozyme® CALB (%2,5) lipazlarına Lecitase® Ultra (fosfolipaz) eklenmesiyle oluşturulmuştur. Tüm EMT örneklerinde 34 farklı uçucu bileşik saptanırken, uçucu bileşikler içerisinde çeşit ve miktar açısından asitlerin baskın olduğu görülmüştür. En yüksek asitlik düzeyi değeri (ADV) ve toplam serbest yağ asiti miktarına Palatase 20000L kombinasyonu ile elde edilirken, en düşük değerler Lipozyme® CALB kombinasyonu ile elde edilmiştir. Lipozyme® CALB kombinasyonu ile tüm inkübasyon sürelerinde belirgin düzeyde yüksek bütirik asit konsantrasyonları saptanmasına rağmen, duyusal olarak en düşük tereyağına benzerlik ve genel beğeni puanlarına sahip olduğu görülmüştür. Duyusal olarak en beğenilen ve tereyağına en çok benzeten EMT örneklerinin Palatase kullanılarak üretilen örnekler olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Enzim Modifiye Tereyağı (EMT), Lipoliz, Lipaz, Fosfolipaz, Emülsiyon

ABSTRACT

DETERMINATION OF PROCESS CONDITIONS AND ENZYME TYPES IN THE PRODUCTION OF ENZYME MODIFIED BUTTER (EMB)

Çağla ULUBAŞ

M.Sc., Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Zafer ERBAY

July 2022, 82 pages

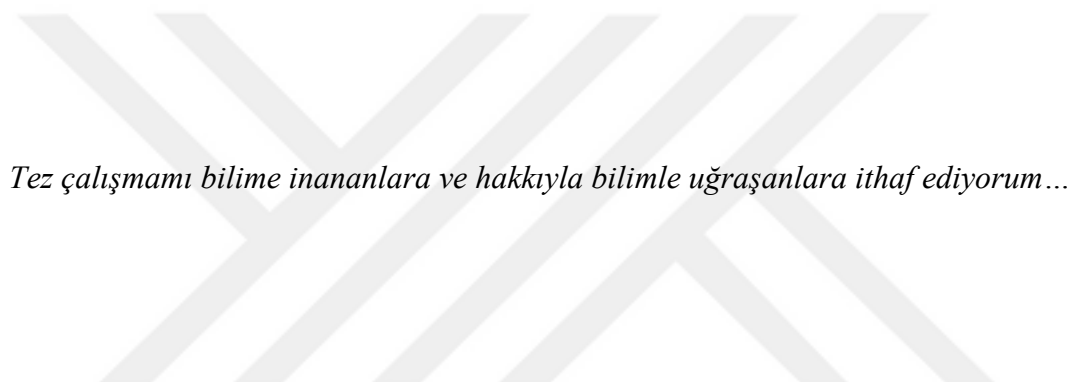
Enzyme Modified Butter (EMB) is a controlled lipolysis process performed by adding lipolytic enzymes to various forms of milk fat and incubation under certain conditions. At the end of this process, natural flavor additive with condensed butter flavor is produced. Although there are many scientific studies on the lipolysis of milk fat, studies aiming to obtain concentrated butter flavor are few in the literature. EMB is advantageous in many ways due to industrial applicability, end product stability and low cost.

In this thesis, the processing conditions that are thought to be effective on lipolysis were determined and EMB production was carried out in different incubation times and enzyme combinations by using cream as a substrate. The studies were carried out in two stages. Since flavor development occurs with enzymatic activity, the appropriate lipolysis medium was determined in order to maximize enzyme activity in the first step. For this purpose, the effects of emulsion type and oil ratio, emulsifier presence, type and concentration, lipase concentration, phospholipase presence and concentration on lipolysis were investigated. The targeted high lipolysis level was achieved with the O/W type emulsion medium, the increase in the oil content in the emulsion, the simultaneous use of lipase and phospholipase in lipolysis, and the presence of emulsifiers. However, it was determined that lipolysis was limited when more emulsifier was added than necessary.

In the second stage of the study, in accordance with the results obtained from the scientific experiments in the first stage, the appropriate concentration was decided for each enzyme type and EMB was produced at different incubation times. By keeping constant incubation temperature (45°C), stirring speed (200 rpm), emulsification speed and time (30s, 5000 rpm

and 180s, 10000 rpm), emulsifier concentration (0.075%), phospholipase concentration (0.25%), incubation was provided for 240 minutes and samples were taken and analyzed at certain times (30, 60, 120 and 240 minutes). Enzyme combinations were created by adding Lecitase® Ultra (phospholipase) to the lipases Palatase 20000L (0.25%), Lipomod™ 801MDP (0.2%) and Lipozyme® CALB (2.5%). While 34 different volatile compounds were detected in all EMT samples, acids were dominant in terms of variety and amount among volatile compounds. The highest acidity level (ADV) and total free fatty acid content were obtained with the combination of Palatase 20000L, while the lowest values were obtained with the combination of Lipozyme® CALB. Although significantly higher butyric acid concentrations were detected at all incubation times with the Lipozyme® CALB combination, it was observed that it had the lowest sensory similarity to butter and overall liking scores. It has been determined that the EMB samples that are most liked and most similar to butter as sensory are the samples produced using Palatase.

Keywords: Enzyme Modified Butter (EMB), Lipolysis, Lipase, Phospholipase, Emulsion.



Tez çalışmamı bilime inananlara ve hakkıyla bilimle uğraşanlara ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca beni destekleyen, bana güvenen, sürekli yeni bilgiler öğrenmeye teşvik eden ve tüm iyi niyetini, bilgi birikimini benimle paylaşan çok değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Zafer ERBAY'a;

Jüri üyeleri Sayın Prof. Dr. Yonca YÜCEER'e ve Dr. Öğr. Üyesi Levent Yurdaer AYDEMİR'e;

Tez çalışmama fikirleriyle katkıda bulunan Prof. Dr. Kieran KILCAWLEY'e;

Yüksek lisans eğitimimin en başından beri tüm sorularıma sabırla ve içtenlikle cevap veren, analizler sırasında yardım ve desteğini esirgemeyen, arkadaşlığı ve bilgisi ile destek olan değerli insan, doktora öğrencisi Pelin SALUM'a;

Hayatımın her anında olduğu gibi yüksek lisans eğitimimde de her türlü desteği gösteren, her fırsatta istediğim alanda başarılı olabileceğime inandıran, benim için çok değerli insan Mustafa ÖLMEZ'e;

Doğduğum andan itibaren beni okutmayı ve başarılı bir insan yetiştirmeyi hedefleyen, tüm sabırlarıyla bana katlanan, maddi ve manevi her türlü desteklerini esirgemeyen, düşüncelerime ve hedeflerime destek olan ve gerçekten haklarını asla ödeyemeyeceğim aileme,

Tez çalışmam kapsamında kullandığım enzimlerin tedarikliğini sağlayan Novozymes'a;

Sevgi ve saygılarımı sunar, tüm içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1. Enzim Modifiye Tereyağı	4
2.2. Enzim Modifiye Tereyağı Üretimi	4
2.3. Süt Yağı.....	5
2.4. Lipolitik Enzimler	7
2.4.1. Lipazlar/Esterazlar.....	7
2.4.2. Lipaz Aktivitesini Etkileyen Durumlar ve Literatürdeki Çalışmalar	8
2.4.3. Lipaz Özgüllüğü.....	11
2.4.4. Süt Yağı Lipolizi	12
2.4.5. Serbest Yağ Asitlerinin Oluşturduğu İkincil Metabolizma Ürünleri (Katabolizma).....	13
2.5. Süt Ürünlerinde Enzimatik Yolla Hidroliz Çalışmaları	14
3. MALZEME VE YÖNTEM	19
3.1. Malzeme	19
3.2. Yöntem	20
3.2.1. Enzim Modifiye Tereyağı Üretim Prosedürü	20
3.2.2. Uygulanan Analiz Yöntemleri.....	21
3.2.2.1. Bileşim Analizleri.....	21
3.2.2.2. Asitlik Düzeyi (ADV) Analizi.....	21
3.2.2.3. Serbest Yağ Asidi Bileşimi ve Miktarı Analizi.....	21
3.2.2.4. Uçucu Bileşik Analizi	22
3.2.2.5. Damlacık Boyutu Dağılımı Analizi.....	23
3.2.2.6. Viskozite Analizi.....	24
3.2.2.7. Türbidite Ölçümü Analizi	24

3.2.2.8. Mikroskop Görüntülemesi.....	25
3.2.2.9. Duyusal Analiz	25
3.2.2.10. İstatiksel Analizler.....	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	27
4.1. Aşama 1: Lipoliz İşlem Koşullarının Belirlenmesi	28
4.1.1. Emülsiyon Tipi ve Emülgatör Kullanımının Lipolitik Aktivite Üzerine Etkisi	28
4.1.2. Emülgatör Türü ve Konsantrasyonunun Lipolitik Aktivite Üzerine Etkisi.....	31
4.1.3. Enzim Konsantrasyonunun ve Fosfolipaz Kullanım Şeklinin Lipolitik Aktivite Üzerine Etkisi.....	35
4.1.4. Emülsiyon Yağ İçeriğinin Lipolitik Aktivite Üzerine Etkisi.....	45
4.2. Aşama 2: EMT Üretimi.....	48
4.2.1. EMT örneklerinin SYA içeriği ve miktarı.....	53
4.2.2. EMT örneklerinin uçucu bileşik profilleri.....	58
4.2.3. EMT örneklerinin duyusal değerlendirmesi	66
5. SONUÇLAR	71
KAYNAKLAR.....	73
ÖZGEÇMİŞ.....	82

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1..Farklı substrat yapıları ve enzim kombinasyonlarıyla enzim aktivitesindeki değişim ...	30
Şekil 4.2. Lipoliz hızı/derecesi üzerine emülgatör türü ve konsantrasyonunun etkisi	33
Şekil 4.3. Örneklerin mikroskop görüntüleri	37
Şekil 4.4. Artan inkübasyon süresiyle lipoliz hızı/derecesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi	
Şekil 4.5. Artan inkübasyon süresiyle lipoliz hızı/derecesi üzerine enzim tipinin etkisi	38
Şekil 4.6. EMT örneklerindeki uçucu bileşikler, pH, ADV ve TUSYA, TSYA, TSYA(Uzun) için PCA Biplot grafiği	52
Şekil 4.7. EMT örneklerindeki serbest yağ asitleri için PCA biplot grafiği.....	55
Şekil 4.8. EMT örneklerindeki uçucu bileşikler için PCA biplot grafiği.....	64
Şekil 4.9. EMT örneklerindeki uçucu bileşikler, pH, ADV ve TUSYA, TSYA, TSYA(UZUN) ve duyuşal özellikleri için PLS grafiği.....	69

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Süt ürünlerinde enzimatik yolla hidroliz çalışmaları.....	15
Tablo 3.1. Malvern Mastersizer'ın yağ damlacık boyutu ölçüm değerleri.....	24
Tablo 4.1. PGPR kullanılarak hazırlanan emülsiyonların elektriksel iletkenlikleri	33
Tablo 4.2. Lipaz ve fosfolipazın tek tek, sıralı ve eş zamanlı kullanımının lipoliz derecesi ile karşılaştırılması	39
Tablo 4.3. Krema ve lipaz-fosfolipaz örneklerinin uçucu serbest yağ asidi bileşimi ve miktarları	41
Tablo 4.4. Krema ve lipaz-fosfolipaz örneklerinin uzun zincirli serbest yağ asidi bileşimi ve miktarları	42
Tablo 4.5. Analiz Edilen Krema ve Lipaz-Fosfolipaz örneklerinin SYA Dağılımı	43
Tablo 4.6. Analiz edilen emülsiyonların ADV değerleri, damlacık boyutu dağılımı, türbidite ve viskozite ölçümleri	45
Tablo 4.7. EMT örneklerinin ADV ve pH değerleri.....	51
Tablo 4.8. EMT örneklerinin uçucu yağ asidi bileşimi ve miktarları	56
Tablo 4.9. EMT örneklerinin uzun zincirli yağ asidi bileşimi ve miktarları	57
Tablo 4.10. EMT Örneklerindeki Uçucu Bileşikler ve miktarları	59
Tablo 4.11. EMT Örneklerinin Duyusal Analiz Sonuçları.....	68

KISALTMALAR

ANOVA	: Varyans Analizi
dk	: Dakika
EMT	: Enzim Modifiye Tereyağı
FID	: Flame Ionization Detector (Alev İyonlaşma Dedektörü)
GC	: Gas Chromatography (Gaz Kromatografisi)
LRI	: Linear Retention Index (Lineer Alıkonma İndeksi)
mL	: Mililitre
SPME	: Solid-Phase Microextraction (Katı Faz Mikroekstraksiyonu)
s	: Saniye
sa	: Saat
SS	: Standart Sapma
SYA	: Serbest Yağ Asidi
TSYA	: Toplam Serbest Yağ Asidi
TSYA (UZUN)	: Toplam Uzun Zincirli Serbest Yağ Asidi
TUSYA	: Toplam Uçucu Serbest Yağ Asidi
°C	: Santigrat Derece

1. GİRİŞ

Gıda endüstrisinin gelişimi, paketlenmiş ürün, hazır yemek gibi sektörlerin gelişimiyle paralel olarak artmıştır. Tüm bu gıda ürünlerinin üretiminde birçok lezzet katkısı/bileşeni kullanılmaktadır. Süt ve süt ürünlerinin ise lezzet katkısı/bileşeni olarak kullanımı büyük öneme sahiptir. Lezzet arttırıcı olarak kullanılan en temel süt ürünleri olgun peynir ve tereyağıdır. Ancak, bu ürünlerin kullanımı birçok sorunu beraberinde getirmektedir. Mevsimsel nedenlerden dolayı süt kompozisyonu farklılık göstermektedir. Bu farklılık elde edilen son ürünün kararlılığını ve işlevselliğini olumlu veya olumsuz etkilemektedir, standart bir son ürünü elde etmeyi güçleştirmektedir. Ayrıca süt ürünlerinin toz ve sıvı halde lezzet arttırıcı olarak kullanımı da mevcuttur. Ancak, son ürün olarak toz elde etme süreci maliyetlidir. Sıvı halde kullanımının ise endüstriyel olarak uygulanabilirliği kısıtlıdır. Süt yağının sıvı veya toz formda doğrudan kullanımı, yüksek yağ içeriğine sahip son ürün eldesine neden olmaktadır. Süt ürünlerinin lezzet arttırıcı olarak doğrudan kullanımının tüm bu dezavantajları göz önünde bulundurulduğunda alternatif yöntemlere başvurmak kaçınılmaz olmuştur. Enzimatik yolla hidroliz alternatif yöntem olarak kullanılmaktadır ve bu yöntemle süt yağının lipolizi ile lezzet yoğunluğu arttırılmış bir katkının eldesi ve çok düşük yağ oranlarında yoğun süt yağı lezzetinin sağlanması mümkündür. Enzimatik yolla hidroliz ile tereyağı (Enzim Modifiye Tereyağı, EMT) üretimi ise son yıllarda önem kazanmıştır. (Erbay, Salum ve Gövce, 2017; Kilcawley, Wilkinson ve Fox, 1998).

Enzim Modifiye Tereyağı (EMT), lipolitik enzimler kullanılarak süt yağının kontrollü koşullar altında hızlandırılmış hidroliz ile muamele edilmesi sonucunda oluşan doğal tereyağı lezzetidir. EMT ile tereyağı lezzetinin yoğunlaştırılması amaçlanmaktadır. Birçok gıda ürünlerinde doğal lezzet katkısı olarak kullanılmaktadır (Erbay ve diğerleri, 2017; Law, 2010; Sibeijn ve Wouters, 2009).

Süt yağı, 3 yağ asidi ve 1 gliserolün birleşimi sonucu oluşan triaçilgliserol omurgasından oluşmaktadır. Gliserol omurgasına 3 yağ asidi *sn*-1, *sn*-2 ve *sn*-3 pozisyonlarında esterleşerek bağlanır. Yağ asitlerinin stereospesifik dağılımı, doymamışlık derecesi ve zincir uzunluğu süt yağının erime davranışından sorumludur. Kısa zincir uzunluğuna sahip yağ asitlerinin genellikle *sn*-1 ve *sn*-3 pozisyonlarında, zincir uzunluğu arttıkça *sn*-2 pozisyonunda

esterleştiği bilinmektedir (Collins, McSweeney ve Wilkinson, 2003; Zhang, Ai, Wang, Tong, Zheng ve Sun, 2016). Özellikle tereyağı aromasından sorumlu bütirik asidin ($C_{4:0}$) çoğunlukla *sn*-1 ve *sn*-3 pozisyonuna spesifik olduğu yönünde bilgiler mevcuttur (Collins ve diğerleri, 2003; Erbay, Salum ve Kilcawley, 2021; Jensen, 2002). Kısa zincir uzunluğuna sahip serbest yağ asitleri peynirimsi, tereyağımsı aromadan sorumludur. Ayrıca, çok uçucudurlar ve düşük algılama eşik değerine sahiptirler. Kısa zincir uzunluğuna sahip serbest yağ asitleri rancid lezzet ile ilişkilendirilirken yüksek konsantrasyonlardaki uzun zincir uzunluğuna sahip serbest yağ asitleri sabunsu lezzetten sorumludur (Kilcawley, 2006; Regado, Cristovao, Moutinho, Balcao, Ferreira ve Malcata, 2007).

Süt yağının fiziksel ve fonksiyonel özelliklerini değiştirmek için uzun yıllardır kimyasal interesterifikasyon, asidoliz, alkoliz ve transesterifikasyon kullanılmıştır, ancak son yıllarda enzim kullanımı daha hassas ve daha temiz işleme koşulları sağladığı için süt yağının modifikasyonunda tercih edilmektedir (Law, 2010). Süt ürünlerinde bulunan lezzet bileşiklerinden kontrollü enzimatik hidroliz yoluyla gıda lezzet katkısı elde edilmesi 19.yy'ın son çeyreğinde çalışılmaya başlanmıştır. EMT üretiminde mikroorganizma ve hayvan kaynaklı enzimler kullanılmaktadır. EMT üretiminde kullanılan enzimler lipazlar ve esterazlardır. Lipazlar, süt yağının triaçilgliserol yapısındaki yağ asitlerini serbest bırakarak yağ-su arayüzünde mono-, di-, triaçilgliserollerini hidrolize eden gliserol ester hidrolazlardır (Kilara, 2011; Konkit ve Kim, 2016). Lipazlar aktiviteleri açısından değerlendirildiğinde, emülsiyonun özellikleri ve doğasına, emülsiyon kararlılığına, emülgatör tipine, ortam pH'sına, damlacık boyutuna, emülsiyon oluşumunda kullanılan cihazlara ve tekniklere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Bauer, Jakob ve Mosenthin, 2005; Gomes, de Figueiredo Furtado ve da Cunha, 2018; Mun, Decker ve McClements, 2007; Piacentini, Mazzei ve Giorno, 2021; Ruiz-Henestrosa, Ribourg, Kermarrec, Anton, Pilosof, Viau ve Meynier, 2022). Lipolitik enzimler, süt yağının triaçilgliserol yapısında bulunan yağ asitlerini zincir uzunluğuna ($C_{4:0}$ - $C_{10:0}$, $C_{12:0}$ - $C_{14:0}$, $C_{16:0}$ - $C_{18:3}$), pozisyonuna (*sn*-1, *sn*-2 ya da *sn*-3), yağ asidi türüne veya substrata (mono- ve diaçilgliserollere) özgüllük gösterirken, bazıları hiçbir özgüllük göstermemektedir. Lipolitik enzimlerdeki bu çeşitliliğinin mekanizması ve net bir sınıflandırması bulunmamaktadır. Süt yağının lipolizi sonucu oluşan EMT aroması, çeşitli enzim özgüllüğü sonucu salınan serbest yağ asidi bileşimi ile doğrudan ilişkilidir (Jensen, DeJong ve Clark, 1983; Kilara, 2011; Kilcawley, 2006; Kim Ha ve Lindsay, 1993; Wang ve Xu, 2009). Ayrıca lipoliz sonucu oluşan ikincil metabolizma ürünleri (laktonlar, metil

ketonlar, esterler, ikincil alkoller ve diğerleri) de EMT aromasına önemli derecede katkıda bulunmaktadır (Tamura, Ueno, Naka, Zhao, Yonekura, Isogai, Wakui ve Shiota, 2021; Tomasini, Bustillo ve Lebeault, 1993; Wang ve Xu, 2009).

EMT'nin hem ticari olarak üretimi, hem de literatürdeki çalışmaları oldukça sınırlıdır. Ticari olarak piyasada bulunan EMT'ler ise çeşitliliği kısıtlıdır ve lipoliz dereceleri farklılık göstermektedir (Erbay ve diğerleri, 2017). Tez kapsamında EMT çeşitliliğine katkı sağlanacak, EMT'lerin lipoliz düzeyleri, üretimi hakkında literatüre katkıda bulunulacaktır. Bu tez çalışması ile kontrollü lipoliz yoluyla olgun tereyağı lezzetine sahip EMT üretimi amaçlanmıştır. Literatürde süt yağının lipolizi ile ilgili çalışmalar bulunmasına rağmen lipoliz ile elde edilen olgun tereyağı lezzetinin lezzet katkısı olarak kullanımıyla ilgili çalışma bulunmamaktadır. Tez çalışması iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada, EMT üretimi için uygun lipoliz işlem koşullarının oluşturulması amaçlanmıştır. Bu aşamada maksimum lipoliz düzeyi elde etmek amacıyla bir dizi deneme yapılarak en yüksek lipolitik aktivite gösteren emülsiyon işlem koşulu (emülsiyon tipi, emülgatör türü ve konsantrasyonu) ve fosfolipaz kullanımının lipolize etkisi belirlenmiştir. İkinci aşama ise, belirlenen uygun lipoliz işlem koşullarında EMT üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen EMT örneklerinin değerlendirilmesinde pH, asitlik derecesi (ADV), serbest yağ asidi profilleri, uçucu bileşikleri ve duyuşal özellikleri incelenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Enzim Modifiye Tereyağı

Lezzet arttırmak amacıyla kullanılan doğal gıda bileşenleri arasında Enzim Modifiye Tereyağı (EMT) kullanımı önemli bir yer tutmaktadır. Bu kapsamda EMT'nin yanı sıra krema/tereyağı tozları da kullanılmaktadır. EMT yüksek lezzet stabilitesine ve süt ürünlerine kıyasla oldukça yoğun lezzete sahiptir (Erbay ve diğerleri, 2017; Kilcawley ve diğerleri, 1998; Law, 2010; Salum, Erbay ve Selli, 2019).

EMT (diğer adıyla lipolize ya da hidrolize süt yağı), süt yağının lipolitik enzimlerle kontrollü koşullarda muamele edilmesi sonucu oluşan olgun tereyağı lezzetine sahip doğal lezzet bileşenidir. Kremesi, tereyağımsı ve peynirimsi aromaya sahiptir. Süt yağının kontrollü hidrolizi ile istenen serbest yağ asidi içeriğine sahip son ürün elde edilmektedir. (Erbay ve diğerleri, 2017; Law, 2010; Regado ve diğerleri, 2007; Sibeijn ve Wouters, 2009). EMT, kremadan, koyulaştırılmış süttten ya da tereyağından elde edilmektedir. EMT margarinlerde, kremada, soslarda, kahve beyazlatıcılarında, fırınlanmış ürünlerde, çikolata şuruplarında, çikolata kaplamalarında ve peynir lezzet katkısı şeklinde kullanılmaktadır (Hill, Ghannouchi ve Garcia, 2001; Kilcawley, 2006; Law, 2010; Regado ve diğerleri, 2007).

EMT oluşumu ile elde edilen lezzetten lipazlar sorumludur. Lipazların süt yağını hidrolizi ile oluşan serbest yağ asitleri EMT lezzetinin karakteristik aromasından sorumludur. Bundan dolayı lipazların özgüllüğü EMT lezzetinde önemli bir role sahiptir (Sibeijn ve Wouters, 2009).

2.2. Enzim Modifiye Tereyağı Üretimi

Lipolize süt yağı (krema) olarak da ifade edilebilecek özgün bir ürün olan Enzim Modifiye Tereyağı (EMT) üretimi, süt yağı ile lipolitik enzimler bir araya getirilmesine dayanmaktadır. Lipaz standardizasyonu yapıldıktan ve süt yağı substrat olarak hazırlandıktan sonra enzim ve substrat (süt yağı) bir araya getirilir. Emülsiyon oluşumunu sağlamak ve aktivitesini arttırmak için homojenizasyon işlemi uygulanır. Süt yağının hidrolizi ile trigliserit omurgasındaki yağ asitleri serbest bırakılır ve kısa zincirli yağ asitleri, uçucu aroma maddelerine katkıda bulunur. Son ürünlerdeki lezzet gelişimi kontrollü olarak takip edilerek istenen koşul elde edildikten

sonra lipolize süt yağına, eklenen enzimleri etkisiz hale getirmek amacıyla ısıtma işlemi uygulanır. Substrat olarak krema yerine sadeyağ da kullanılabilir. (Kilcawley, 2006; Kilara, 2011). Enzim Modifiye Tereyağı (EMT) üretiminde işlem basamakları şu şekildedir;

- ❖ Koyulaştırılmış süt veya tereyağı substratının hazırlanması
- ❖ Lipaz standardizasyonu
- ❖ Lipaz ve substratın birleştirilmesi
- ❖ Homojenizasyon
- ❖ Emülsiyonun inkübasyonu
- ❖ Enzim inaktivasyonu
- ❖ Son ürün standardizasyonu ve formülasyonu

EMT kullanılan üründe hafif lezzet elde etmek için, %0,05-0,1 (ağırlık/ağırlık) kadar düşük kullanım seviyeleri yeterlidir. Ancak daha belirgin bir etki için %0,1–0,5 (ağırlık/ağırlık) seviyeleri kullanılabilir (Kilara, 2011; Kilara ve Chandan, 2011).

2.3. Süt Yağı

Süt yağının yağ asidi bileşimi, beslenme uygulamalarına, mevsime ve hayvan ırkına bağlı olarak değişmektedir. Süt yağında bulunan başlıca yağ asitleri, bütirik (bütanoik, C_{4:0}), kaproik (heksanoik, C_{6:0}), kaprilik (oktanoik, C_{8:0}), kaprik (dekanoik, C_{10:0}), laurik (dodekanoik, C_{12:0}), miristik (tetradekanoik, C_{14:0}), palmitik (heksadekanoik, C_{16:0}), stearik (oktadekanoik, C_{18:0}), oleik (cis-9-oktadekenoik, C_{18:1}), linoleik (cis-9,12-oktadekadienoik, C_{18:2}) ve linolenik (cis-9,12,15-oktadekatrienoik, C_{18:3}) asitlerdir. Palmitik ve stearik asit ise süt yağında en bol bulunan yağ asitleridir (Collins ve diğerleri, 2003). Bununla birlikte, süt yağındaki yağ asitlerinin yaklaşık %40'ının (ağırlık/ağırlık) 12 ile 16 arasında zincir uzunluklarına sahip doymuş yağ asitleri (laurik, miristik ve palmitik asit) olduğu tahmin edilmektedir. Stearik asit (C_{18:0}) ve doymamış yağ asitleri (çoğunlukla oleik asit, C_{18:1}) sırasıyla toplamın %12 ve %25'ini oluşturmaktadır. Sütteki yağ asitlerinin yaklaşık %10'u ise doymuş kısa zincirli (C_{4:0}-C_{10:0}) yağ asitlerinden oluşmaktadır (Nyyssöla, Miettinen, Kontkanen, Lille, Partanen, Rokka, Jarvenpaa, Lantto ve Kruus, 2015). Süt yağı özel bir yağ asidi bileşimine sahiptir ve bu sayede süt ürünlerinden özgün lezzetler elde edilebilmektedir. Bu özgün lezzetler büyük ölçüde süt yağında bulunan 4-10 karbon atomlu kısa zincir uzunluğuna sahip yağ asitlerinin varlığından kaynaklıdır. Bu yağ asitleri çok az miktarlarda dahi sütte serbest bırakılırsa, pek çok süt ürününde istenmeyen sabunsu ve ekşimiş lezzet

oluşumuna neden olabilirler. Buna karşın, sert İtalyan peynirleri ile mavi peynirler gibi süt yağından üretilen bileşiklerin lezzet üzerinde belirleyici olduğu süt ürünlerinde uygun bileşimlerde çok miktarda üretilmesi istenilmektedir. Özetle, bu yağ asitleri kontrollü lipoliz ile serbest bırakıldığında konsantre formda lezzet bileşiklerinin oluşmasında etkili olurlar (Kilara, 2011).

Süt ve süt ürünlerindeki lipitler, çeşitli yağ asidi bileşenlerine sahiptir. Süt yağında bulunan yağ asitleri %98 oranında trigliserit omurgasına esterleşmiş halde bulunur. Trigliserit omurgasında bulunan yağ asitleri 3 farklı şekilde konumlanmaktadır ve bu konumlar *sn*-1, *sn*-2 ve *sn*-3 şeklinde adlandırılmaktadır. Süt yağının kendine özgü aromasından sorumlu kısa zincir uzunluğuna sahip yağ asitleri ise genellikle trigliserit omurgasının *sn*-1 ve *sn*-3 konumunda esterleşmiş halde bulunmaktadır. Tereyağı aromasından sorumlu bütirik asidin ise çoğunlukla *sn*-3 konumunda bulunduğu bilinmektedir. Trigliserit omurgasının *sn*-2 konumunda ise daha uzun karbon zincirine sahip yağ asitlerinin esterleştiği bilinmektedir. Ayrıca, *sn*-1 ve *sn*-3 konumundaki yağ asitlerinin *sn*-2 konumuna kıyasla daha kolay trigliserit omurgasından ayrıldığı yönünde bilgiler mevcuttur (Collins ve diğerleri, 2003; Kendirci, Salum, Bas ve Erbay, 2020; Nyssöla ve diğerleri, 2015; Zhang ve diğerleri, 2016). Kısa zincir uzunluğuna sahip yağ asitlerinin genellikle daha uçucu olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, bu gruptaki serbest yağ asitleri görece düşük algılama eşik değerine sahiptir (Collins ve diğerleri, 2003; Erbay ve diğerleri, 2021; Salum ve diğerleri, 2019). Ek olarak, kısa zincir uzunluğuna sahip serbest yağ asitleri acılaşımla (rancid lezzet) ilişkilendirilirken yüksek konsantrasyonlarda uzun zincir uzunluğuna sahip serbest yağ asitleri sabunsu lezzet ile ilişkilendirilmektedir (Kilcawley, 2006; Regado ve diğerleri, 2007).

2.4. Lipolitik Enzimler

2.4.1. Lipazlar / Esterazlar

Süt yağının enzimatik modifikasyonları, serbest yağ asitleri, mono-gliseritler, di-gliseritler ve gliserol üreten lipazlar ve esterazlarla gerçekleştirilir ve bunun sonucu olarak istenen lezzet gelişimi elde edilir (Erbay ve diğerleri, 2021; Kilcawley ve diğerleri, 1998; Konkit ve Kim, 2016). Lipolitik enzimler, kısa zincir uzunluğuna sahip yağ asitlerinin serbest bırakılmasını sağlayarak aromaya büyük ölçüde katkı sağlamaktadır (Kendirci ve diğerleri, 2020; Lencki, Smink, Snelting ve Arul, 1998; Moskowitz ve Noelch, 1987). Çünkü kısa zincir uzunluğuna sahip yağ asitleri düşük algılama eşik değerine sahiptirler (Kendirci ve diğerleri, 2020;

Kilcawley, 2006). Lipazlar, yağ asitlerini serbest bırakan yağ-su arayüzünde tri-, di- ve monoasilgliserollerini hidrolize eden gliserol ester hidrolazlardır (EC 3.1.1.3) (Kilcawley, 2006; Kilara, 2011). Esterazlar ve lipazlar aktiviteleri açısından değerlendirildiğinde, esterazların, 8 karbon atomundan daha az yağ asitleri içeren ester bağları ile yağda çözünebilen bileşenler üzerine etki ettiği, lipazların ise emülsiyonlaştırılmış sistemlerde ondan fazla karbon atomlu ester bağlarına sahip yağ asitlerini saldığı varsayılmaktadır (Kilcawley ve diğerleri, 1998; Collins ve diğerleri, 2003; Kilcawley, 2006).

Bitkisel lipazlar ticari olarak mevcut değildir ve bu nedenle hayvansal ve mikrobiyal lipazlar/esterazlar, süt endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Birçok hayvan kaynaklı enzim bulunmaktadır. Bu enzimler başlıca büyükbaş hayvanlardan, domuz pankreatik dokulardan ve buzağı, keçi, koyun ve oğlağın pregastrik dokularından elde edilir. Hayvan kaynaklı enzimlerin mikrobiyel enzimlere kıyasla sayılarının daha az olmasından dolayı bu enzimlerin özgüllüğüne dair daha net bilgiler bulunmaktadır. Bu nedenle, hayvan kaynaklı enzimin lipolizi sonucu oluşan serbest yağ asitleri, mono-gliseritler ve di-gliseritlerin hangi tür aromalar oluşturduğuna dair sınıflandırma daha kolay yapılabilmektedir. Pregastrik esterazların (PGE) kısa zincirli yağ asitlerine özgülük gösterdiği bilinmektedir (Collins ve diğerleri, 2003; Kilcawley, 2006; Kilcawley ve diğerleri, 1998; Kilara ve Chandan, 2011; Wilkinson, Doolan ve Kilcawley, 2011). Ayrıca, PGE'lar kaynağına bağlı olarak karakteristik lezzet üretmektedir. Buzağı PGE, "tereyağlı" ve biraz "biberimsi" bir lezzet üretirken; oğlak PGE, genellikle "pikante" olarak adlandırılan keskin bir "biberimsi" lezzet üretir ve kuzu PGE ise genellikle "pecorino" aroması olarak adlandırılan "kirli çorap (dirty sock)" aroması üretir (Collins ve diğerleri, 2003; Kilcawley, 2006; Kilara ve Chandan, 2011).

Mikrobiyal lipazların ise, çeşitli katalitik aktiviteleri ve yüksek verimleri nedeniyle hayvansal enzimlere kıyasla süt ürünlerinin enzimatik hidrolizinde kullanımı daha yaygındır. Ayrıca, mikroorganizmaların gıda endüstrisinde enzim kaynağı olarak kullanımının tercih edilmesi, bu yöntemin ucuz, hızlı olması ve enzimatik reaksiyon ürünlerinin kararlı olmasından kaynaklanmaktadır (Erbay ve diğerleri, 2021; Kilcawley ve diğerleri, 1998; Kilara, 2011; Konkit ve Kim, 2016). Mikrobiyal enzim kullanımını öne çıkaran diğer bir neden ise, hayvansal enzimlerin vejeteryan ürünlerde kullanılamamasıdır. Mikrobiyal kaynaklar, hayvan kaynaklı enzimlere kıyasla çok daha fazla çeşitlidir. Yeni mikrobiyal lipaz/esteraz kaynaklarının bulunması ise enzim endüstrisinde halen çalışılmaktadır (Erbay, Baş, Kendirci,

Çam, Kelebek, Salum ve Selli, 2016; Erbay ve diğerleri, 2021; Kilcawley, 2006; Kilara ve Chandan, 2011; Wilkinson ve diğerleri, 2011).

Mikrobiyal lipazlar, maya, küf veya bakteriden elde edilen lipolitik enzim preparatlarıdır. Mikrobiyel lipazların aktivitelerinin optimum olduğu pH aralığı literatürde çeşitlilik göstermekle birlikte genellikle alkali pH aralığında, optimum olduğu sıcaklık ise 30 – 40 °C arasındadır (Kilara, 2006; Kilara ve Chandan, 2011).

2.4.2. Lipaz Aktivitesini Etkileyen Durumlar ve Literatürdeki Çalışmalar

Lipazlar, yapılarında “lid” adı verilen bir kapak bulundurmaktadır. Bu kapak bir polipeptit zincirinden oluşmaktadır ve lipazların aktif merkezlerinin izolasyonunu sağlamaktadır. Bu kapak kapalı haldeyken, hidrofobik etkileşimler sayesinde enzimin aktif merkezi ile etkileşim halindedir. Kapak ve aktif merkez birbiriyle denge içindedir, kapak kayarak aktif merkez ortaya çıkabilmekte ve herhangi bir hidrofobik yüzeye (yağ damlacığı) adsorbe olabilmektedir (Virgen-Ortiz, dos Santos, Ortiz, Brenguer-Murcia, Barbosa, Rodrigues ve Fernandez-Lafuente, 2019).

Lipazlar, emülsiyon halinde suda çözünmeyen substratı hidrolize edebilen arayüzey enzimleridir (Bauer ve diğerleri, 2005; Golding ve Wooster, 2010; Piacentini ve diğerleri, 2021; Virgen-Ortiz ve diğerleri, 2019). Bu olay, “arayüzey aktivasyon mekanizması” sonucu bu enzimlerin yağ damlacıklarının yüzeyine adsorbe olabilmesiyle gerçekleşir. İlk paragrafta bahsedildiği gibi, lipazlar hidrofobik yüzeyde adsorbe olma eğilimi gösterirler. Ancak, bu eğilim yağ damlacıklarıyla sınırlı değildir. Lipazlar, hidrofobik proteinlere, immobilize enzimlerin kullanıldığı hidrofobik desteklere ve başka lipazların adsorbsiyona açık formuna adsorbe olma eğilimi göstermektedir (Virgen-Ortiz ve diğerleri 2019).

“Arayüzey aktivasyonu” terimi ilk kez 1936 yılında ortaya çıkmıştır. Daha sonra, lipazların monomerik çözeltiler ve emülsiyonlarda aktivitelerinin arttığı ve suda kümelenen yağ moleküllerini hidroliz etmede etkili olduğu görülmüştür. Lipazların bu özelliği uzun bir süre lipaz ve esterazları ayırt etmek için kullanılmıştır. 1990 yılında insan pankreatik lipazı ve *Rhizomucor miehei* lipazı kullanılarak lipazın 3 boyutlu yapısı incelenmiştir. Sonuçta, lipazların yapısında bulunan ve aktivitesinde etkili olan kapağın (lid) yağ-su arayüzeyi varlığında konformasyonel değişikliğe uğradığı anlaşılmıştır. Ayrıca susuz ortamlarda

lipazların ara yüzey aktivasyonu göstermediği görülmüş ve bu durum hidrofobik etkileşimin olmamasından kaynaklı lipaz adsorpsiyonunun gerçekleşmemesine atfedilmiştir. Başka bir deyişle, lipazlarda bulunan ve arayüzeydeki etkileşimden sorumlu “lid” susuz ortamda kapalı formda olduğu için lipaz aktivitesi azalmıştır (Ferrato, Carriere, Sarda ve Verger, 1997; Verger, 1997).

Lipaz aktivitesini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır ve bu açıdan literatür incelendiğinde çoğunlukla lipazların sindirimi ile ilgili *in vitro* çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar büyük ölçüde insanın ağız, mide ve bağırsaklarının taklit edilmesi sonucu emülsiyonların nasıl etkilendiğine dair bilgiler içermektedir. Bu *in vitro* çalışmalar ile lipitlerin biyoerişilebilirliğinin belirlenmesi ve insan vücuduna lipit alımının kontrolü amaçlanmaktadır. Aynı zamanda bu çalışmalarda lipazların aktivitesine etki eden durumlar net bir şekilde ortaya konmaktadır.

Lipazlar, mekanizması gereği büyük oranda emülsiyonların yağ-su arayüzeyinde aktivite gösterirler. Dolayısıyla emülsiyon özellikleri (emülsiyon stabilitesi, doğası, pH, emülgatör türü ve konsantrasyonu, emülsiyon damlacık boyutu) ve bunun yanı sıra fosfolipit varlığı lipolitik aktiviteyi olumlu veya olumsuz etkilemektedir (Bauer ve diğerleri 2005; Gomes ve diğerleri 2018; Mun ve diğerleri 2007; Piacentini ve diğerleri 2021; Ruiz-Henestrosa ve diğerleri 2022).

Lipoliz büyük ölçüde yağ-su arayüzeyinde gerçekleştiği için lipoliz hızı ve yağ damlacıklarının yüzey alanı ilişkilidir. Etkili bir lipoliz gerçekleşmesi için su içinde mümkün olduğunca homojen dağılmış yağ fazı ve kararlı bir emülsiyon gereklidir (Bauer ve diğerleri 2005; Giang ve diğerleri 2016; Gomes ve diğerleri 2018; Ruiz-Henestrosa ve diğerleri 2022). Ayrıca, emülsifikasyon için kullanılan teknikte lipoliz oranını ve hızını etkilemektedir. Çünkü emülsifikasyon için kullanılan cihaz ve teknikle damlacık boyutu etkilenmektedir ve bu durum lipoliz üzerinde etkilidir (Piacentini ve diğerleri, 2021; Saktaweewong, Phinyocheep, Ulmer, Marie, Durand ve Inprakhon, 2011).

O/W emülsiyonlarında lipoliz süreci kullanılan emülgatör tipine de bağlıdır. Emülgatör tipi, emülsiyonun damlacık boyutunu, damlacık agregasyonunu, emülsiyon stabilitesini ve lipolizin hızı ile kapsamını etkilemektedir (Mun ve diğerleri, 2007; Ruiz-Henestrosa ve

diğerleri, 2022). Ayrıca, Emülsiyonlarda sentetik emülgatörlerin hidrofilik-lipofilik dengesinin (HLB) artmasının, lipoliz oranını olumlu etkilediği bilinmektedir (Gomes ve diğerleri, 2018). Bir *in vitro* çalışmada emülgatör türünün damlacık boyutu üzerinde etkili olduğuna dair bilgiler mevcuttur. Damlacık boyutu dağılımının lipolitik aktivite üzerine etkisi ise görece önemlidir. Farklı 2 emülgatör kullanılarak yaklaşık aynı damlacık boyutlarında hazırlanan emülsiyonların aynı pH ortamında (mide ortamı) lipoliz sonucu farklı emülsiyon stabilitesi (damlacık boyut dağılımı) gösterdiği bilgisi mevcuttur (Golding ve Wooster, 2010).

Lipoliz üzerinde etkili bir başka faktör ise lipoliz sonucu oluşan farklı zincir uzunluğuna sahip serbest yağ asitleridir. O/W emülsiyonlarında lipoliz sonucu salınan orta zincir uzunluğuna sahip serbest yağ asitleri daha çok su fazında bulunma eğilimi gösterirken, uzun zincirli serbest yağ asitleri arayüzeyde birikme eğilimi gösterir. Bu durum lipitlere, lipaz erişimini kısıtlamaktadır (Gomes ve diğerleri, 2018; Saktaweevong ve diğerleri, 2011).

Emülsiyonların lipoliz hızını etkileyen diğer bir faktör ise pH'dır. Lipoliz sonucu artan serbest yağ asidi miktarı ortamın asitliğini artırır, pH düşer. Bu durum ise lipolizi olumsuz etkilemektedir (Brindisi, Parker, Turner ve Larick, 2008; Lencki ve diğerleri, 1998; Tomasini ve diğerleri, 1993). Lipoliz sonucu oluşan bileşikler üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi önemlidir. Robertson ve diğerleri (1966), pH 8,6'da lipoliz sıcaklığı 37°C'den 4°C'ye değiştirildiğinde, kısa zincirli yağ asidi metil esterlerinin nispi konsantrasyonunun arttığını ve uzun zincirli metil esterlerin konsantrasyonunun azaldığını gözlemlemişler.

Lipolitik aktivite fosfolipitler tarafından da etkilenmektedir. 1 gliserol ve 3 fosfattan oluşan fosfolipitler, sn-1 ve sn-2 konumlarındaki yağ asitleri ile ester bağları oluştururlar. Fosfolipitler, fosfolipazlar tarafından hidrolize uğrarlar. Bu hidroliz sonucu, fosfolipidik bileşenlerin ester bağları parçalanarak daha basit lipid ürünleri (SYA'lar, lizo-fosfolipitler, diaçilgliseroller ve fosfatidatlar gibi) elde edilmektedir (Virgen-Ortiz ve diğerleri, 2019). Fosfolipitlerin emülsiyon ortamında varlığı ise lipoliz düzeyini etkilemektedir. Ancak literatürde bu etkinin olumlu veya olumsuz olduğu konusunda net bir çıkarım bulunmamakla beraber çelişkili yargılar mevcuttur. Bir *in vitro* çalışmada su içinde yağ (O/W) emülsiyonlarında yağ-su arayüzeyindeki lipolizin, emülgatör özelliği de taşıyan küçük moleküllü yüzey aktif maddeler, fosfolipitler ve proteinler tarafından olumsuz etkilendiği yorumu yapılmıştır. Lipaz aktivitesinin azalmasına neden olan etki bu maddelerin (yüzey aktif

maddeler), lipit moleküllerinin arayüzeydeki hareketliliğine ve dolayısıyla arayüzeydeki lipit molekülü ve enzim arasındaki doğrudan temasın azalmasına bağlanmıştır (Mun ve diğerleri, 2007). Ruiz-Henestrosa ve ark. (2022) ise fosfolipitlerin kalsiyum iyonlarıyla etkileşime girdiğini ve bunun sonucu olarak SYA salınımını azalttığını ifade etmektedir. Ancak, başka bir derlemede, lipoliz sonucu oluşan, yüksek yüzey aktivitesi gösteren yağ asitlerinin ve monogliseritlerin yağ-su arayüzeyinde biriktiği ve bu durumun lipolizi olumsuz etkilediği bilgisi mevcuttur. Yağ-su arayüzeyinde biriken bu maddelerin ise fosfolipitler tarafından sulu fazda çözünmesi sağlandığı ve böylece arayüzeyden uzaklaştırılarak fosfolipit varlığının lipolizi olumlu etkilediği açıklanmıştır (Golding ve Wooster, 2010).

2.4.3. Lipaz Özgüllüğü

Farklı suş kaynaklı lipazlar, lipolitik özgüllükleri sayesinde kendilerine özgü serbest yağ asidi profilleri üretmektedir. Böylece, lipazlar, özgüllük gösterme özellikleri sayesinde lipitlerin hidrolizi sonucunda lezzet çeşitliliğine neden olmaktadır. Çünkü süt yağının trigliserit omurgasında bulunan yağ asitlerinin salınımı, lipoliz sonucu oluşan lezzet bileşikleri üzerine etkilidir ve bu salınımında lipaz özgüllüğü belirleyici role sahiptir. Bu özgüllük durumu aşağıda belirtildiği şekilde sınıflandırılmaktadır:

1) Substrata Özgüllük

- Sadece monoasilgliserollere özgüllük gösterme.
- Mono- ve diaçilgliserollere özgüllük gösterme.
- Sadece triaçilgliserollere özgüllük gösterme.

2) Konumsal Özgüllük

- *sn*-1 ve *sn*-3 konumsal özgüllük gösterme.
- Sadece *sn*- 2 konumsal özgüllük gösterme.

3) Özgüllük göstermeme

- Substrat veya açıl pozisyonlarının hiçbirine tercih göstermeme.

4) Yağ Asidine Özgüllük

- Bazı lipazların belirli yağ asitlerine özgül olma durumudur (Jensen, 1983; Kilara, 2011; Kim Ha ve Lindsay, 1993; Kilcawley, 2006; Wang ve Xu, 2009).

Literatür incelendiğinde enzimlerin özgüllüğü hakkında birçok bilgi bulunmaktadır. PGE ve çoğu mikrobiyal lipazın belirgin bir şekilde *sn*-1 ve *sn*-3'e konumsal özgüllük gösterdiği

düşünülmektedir. Bazı mikrobiyal lipazlar (*Candida cylindracea* ve *Staphylococcus aureus* kaynaklı lipazlar) ise herhangi bir özgülük gösterme özelliğine sahip değildir, trigliserit omurgasındaki yağ asitlerini rastgele serbest bırakmaktadır (Collins ve diğerleri, 2003; Kilcawley ve diğerleri, 1998; Kilara, 2011; Wilkinson ve diğerleri, 2011). *Geotrichum candidum* kaynaklı lipazın ise *n-9* konumunda bir çift bağ içeren uzun zincirli yağ asitlerine özgül olduğuna dair bilgiler mevcuttur (Kilcawley ve diğerleri, 1998; Regado ve diğerleri, 2007). *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus delmar* ve *Pseudomonas fragi* kaynaklı enzimler *sn-1* ve *sn-3* konumsal özgülük göstermektedir. *Penicillium roqueforti* kaynaklı lipazın ise PGE'ler ile benzer şekilde özgülük gösterdiği bilinmektedir. *Penicillium roqueforti* kaynaklı lipaz kısa zincir uzunluğuna sahip yağ asitlerine özgül olmakla birlikte *sn-1*, *sn-3* konumsal özgülük göstermektedir (Kilcawley, 2006; Kilara, 2011). Ayrıca, yapılan çalışmalar sonucunda; ticari bir lipaz olan *Rhizomucor miehei* kaynaklı Palataz 20000 L'nin, büyük ölçüde *sn-1* ve *sn-3* konumsal özgülük gösterdiği bilinmektedir (Kendirci ve diğerleri, 2020; Wang ve Xu, 2009).

2.4.4. Süt Yağı Lipolizi

Lipoliz, triaçilgliserol omurgasına bağlı bir yağ asidi ile gliserol arasındaki ester bağı kırarak, serbest yağ asitleri ile mono- ve digliseritler üreten hidrolazlar olan lipolitik enzimlerin varlığından kaynaklanmaktadır (Collins ve diğerleri, 2003; Kilcawley ve diğerleri, 1998). Lipoliz sonucu oluşan lipolitik aktivite süt yağı substratının emülsifiye edilmesiyle desteklenebilmektedir. Bu emülsifiye işlemi yağ-su arayüzünü arttırmakta ve özellikle yağ-su arayüzünde bulunan lipazlar için optimum bir ortam sağlamaktadır. Lipoliz için potansiyel bir engel ise arayüzü bloke eden yüzey aktif mono- ve digliseritlerin oluşumudur. Bu tür yüzey aktif maddeler kontrol edilmezse, lipoliz hızı ve oranı düşecektir (Kilara ve Chandan, 2011; Wilkinson ve diğerleri, 2011).

Süt yağının lezzetinin ve yoğunluğunun geliştirilmesinde özellikle kısa zincirli uçucu serbest yağ asitlerinin oluşumu önemlidir ve bu süreç lipolizle yönetilir. Lipolizin kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmediği durumda ise kısa ve uzun zincirli serbest yağ asitleri miktarları arasındaki dengesizliğe bağlı olarak ekşimişlik veya sabunlaşmanın gelişmesi söz konusu olur. Bu istenmeyen lezzetlerin oluşumunun, esteraz ve lipaz aktivitelerinin kombinasyonlarını içeren lipolitik preparatlar kullanılarak önlenebileceği düşünülmektedir (Kilcawley ve diğerleri, 1998; Kilcawley, 2006; Wilkinson ve diğerleri, 2011).

2.4.5. Serbest Yağ Asitlerinin Oluşturduğu İkincil Metabolizma Ürünleri

(Katabolizma)

Lipazlar, farklı özgülük mekanizmasına sahip olmalarının bir sonucu olarak farklı yağ asidi profilleri üretmektedir. SYA'lar doğrudan lezzet üzerinde etkilidir ve özellikle kısa zincirli olanlarının algı eşik değerleri de düşük olduğundan oluşumlarının lezzet üzerine etkileri büyük olur. SYA oluşumunun lezzet üzerinde doğrudan etkilerinin yanı sıra, oluşan SYA'ların parçalanması ile de oldukça önemli lezzet bileşiklerinin (metil ketonlar, laktonlar, esterler, aldehitler ve ikincil alkoller gibi) oluştuğu ve Enzim Modifiye Tereyağı (EMT) lezzetine önemli ölçüde katkı sağladığı bilinmektedir (Collins ve diğerleri, 2003; Erbay ve diğerleri, 2021; Kendirci ve diğerleri, 2020; Salum ve diğerleri, 2019; Wang ve Xu, 2009), Bu bileşikler, EMT aromasına meyvemsi, çiçeksi, kremi karakterlere katkıda bulunmanın yanı sıra, yüksek konsantrasyonları ve son derece düşük algılanma eşikleri nedeniyle yağ asitlerinin keskin aromasını da azaltarak lipoliz edilmiş numunelerin aromasına önemli katkı sağlamaktadırlar (Wang ve Xu, 2009).

İlk olarak, metil ketonlar özellikle Mavi peynirde önemli yağ asidi parçalanma ürünleridir ve kekre ve keskin (pungent ve piquant) aromadan sorumludurlar. *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti* ve *Geotrichum candidum* gibi küf kaynaklı lipazların etkisiyle oluştuğu bilinmektedir. Oluşumu dört ana adım içermektedir ve metil ketonların oluştuğu mekanizma, “ β -oksidasyonu” olarak adlandırılmaktadır. Bu mekanizma; serbest yağ asitlerinin lipazlar tarafından salınması, salınan serbest yağ asitlerinin α -ketoasitlere oksidasyonu, ketoasitlerin daha az karbon atomundan oluşan alkan-2-on'lara dekarboksilasyonu ve ardından alkan-2-on'lara karşılık gelen alkan-2-ol'e indirgenmesi şeklinde gerçekleşmektedir. β -oksidasyon ile serbest yağ asitlerinden oluşturulan 2-heptanon, 2-oktanon ve 2-undekanon gibi metil ketonlar, Mavi peynir aroması için anahtar aroma bileşikleridir (Collins ve diğerleri, 2003; Erbay ve diğerleri, 2021; Tomasini ve diğerleri, 1993).

Laktonlar, süt yağında hidroksi yağ asitlerinden molekül içi interesterifikasyon yoluyla meydana gelebilmektedir ve hidroksi asitler ve su varlığında ısı ile oluşabilmektedir. Ayrıca, γ - ve δ -laktonlar trigliseritlerde hidrolizle salındıktan sonra ilgili hidroksi asitlerden kendiliğinden oluşabilmektedir. Ek olarak, lakton konsantrasyonunun lipoliz derecesiyle

ilişkili olduğu düşünülmektedir (Collins ve diğerleri, 2003; Kendirci ve diğerleri, 2020). Tereyağında aroma bileşeni olan δ -dodecalactonenin ise kremi ve hindistan cevizi aromasına sahip olduğu bilinmektedir (Wang ve Xu, 2009).

Esterler son derece yoğun lezzete sahiplerdir ve serbest yağ asitlerinin alkollerle reaksiyona girmesi sonucu meydana gelmektedirler (Collins ve diğerleri, 2003; Kendirci ve diğerleri, 2020). Ek olarak, esterleşme reaksiyonları ile de oluşturulabilirler. Ester oluşumunun, ortamın su aktivitesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Düşük su aktivitesine sahip sistemlerde ester oluşumu esterleşme reaksiyonları ile ilişkilendirilirken, daha yüksek su aktivitesine sahip sulu sistemlerde alkoliz reaksiyonları ile ilişkilendirilmektedir. Bu bilgi doğrultusunda, yüksek su aktivitesine sahip süt ürünlerinde ester oluşumu alkoliz reaksiyonlarına atfedilmiştir (Kendirci ve diğerleri, 2020). Esterler serbest yağ asitlerinin oluşturduğu keskin ve kötü tadı maskeleyebilmektedir. Bu nedenle çok düşük konsantrasyonlarda bile lipolize süt yağı aromasına olumlu katkısı bulunmaktadır. Ancak, yüksek miktarda oluşumu lezzeti olumsuz yönde etkileyerek meyvemsi, çiçeğimsi lezzet oluşumuna neden olmaktadır (Wang ve Xu, 2009; Kendirci ve diğerleri, 2020).

Aldehitler genellikle amino asitlerden transaminasyon yoluyla oluşur. Ek olarak, mikrobiyel olarak da oluşabilirler. Bununla birlikte, bazı düz zincirli aldehitler doymamış yağ asitlerinin β -oksidasyonu yoluyla oluşturulabilmektedir (Collins ve diğerleri, 2003). Düz zincirli aldehitler ise “yeşil çim (green grass)” benzeri aromalarla ilişkilendirilmektedir (Collins ve diğerleri, 2003; Wang ve Xu, 2009).

2.5. SÜT ÜRÜNLERİNDE ENZİMATİK YOLLA HİDROLİZ ÇALIŞMALARI

Literatürde süt yağı lipoliziyle ilgili bir çok çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmalardan örnekler Tablo 2.1’de sunulmaktadır. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde; *Aspergillus niger* kaynaklı enzimlerin lipolitik aktivitelerinin yüksek olduğu ve pregastrik esteraz benzeri bir davranış gösterdiği ifadesi yer almaktadır (Kilara, 2011). Ha ve Lindsay (1993) çalışmasında ise bu enzimin lipolitik aktivitesinin yüksek olduğu bilgisi desteklenmektedir ve çalışma sonucunda orta zincirli yağ asitlerini serbest bırakma eğilimi gösterdiği yorumu yapılmıştır.

Tablo 2.1. Süt ürünlerinde enzimatik yolla hidroliz çalışmaları.

Substrat	Lipoliz Parametreleri	Çalışmanın Amacı	Eklenen Enzim ve Kaynağı	Enzim Özgüllüğü	Sonuç
- Susuz süt yağı (Wang ve Xu, 2009)	Tüm enzim-substrat için aynı koşullar belirlenmiş ve sadece enzimler farklılık göstermiştir.	Lipolize süt yağının uçucu profili üzerine farklı ticari lipazların etkilerinin araştırılması.	- Palatase 20000L (LİPAZ P) (<i>Rhizomucor Miehei</i>) - MER (LİPAZ M) (<i>Rhizopus oryzae</i>) - AY30G (LİPAZ A) (<i>Candida rugosa</i>) - Snow plum blossom (LİPAZ S) (<i>Candida cylindracea</i>)	- Sn1-3 konumsal özgüllük - Sn1-3 konumsal özgüllük - Özgüllük yok - Sn1-3 konumsal özgüllük (Sırasıyla)	GC-MS ve GC-O analizi yapılarak; En yüksek SYA oranı “Lipaz S” olmasına rağmen GC-O analizinde en yüksek puanı alan, en hoş lezzete sahip olan “Lipaz P” olmuştur. Bu tercihin sebebi ikincil metabolizma ürünlerinin oluşumuna atfedilmiştir. Ayrıca LSY’ni tanımlayan bileşikler; bütanoik asit, heksanoik asit, δ-dodecalactone, 2-nonanon ve 2-undekanon olarak belirlenmiştir.
- %99 yağlı tereyağı emülsiyonu - %35 yağlı UHT krema (Tomasini ve diğerleri, 1993)	Sıcaklık (17, 27, 37°C) pH (6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.5)	İki farklı substrat üzerinde 6 farklı ticari lipazın peynir lezzeti üretme yeteneğinin ve belirlenen koşullardaki lipolitik aktivitelerinin incelenmesi.	- Lipaz AY (<i>Candida cylindracea</i>) - Lipaz D (<i>Rhizopus delemar</i>) - Lipaz R (<i>P. Roqueforti</i>) - Lipaz F-AP (<i>Rhizopus sp.</i>) - Lipaz S (<i>Rhizopus arrhizus</i>) - Palatase 1000 ya da 750 (Novo tarafından üretilen enzim karışımı)	Belirtilmemiş.	UHT kremadaki lipolitik aktivite tereyağı emülsiyonuna kıyasla daha yüksektir. Ek olarak, her iki substrat için de en yüksek lipolitik aktiviteyi “Lipaz S” göstermiştir. “Lipaz R” ise roquefort benzeri lezzet oluşturmuştur. Lipazların, sıcaklık değişimine kıyasla pH değişimine daha hassas olduğu, “Lipaz D” haricindeki enzimler için optimum pH ise 6.5-7.5 aralığında olduğu çıkarımı yapılmıştır.
- Eritme peynir (Kendirci ve diğerleri, 2020)	Sabit sıcaklık (45°C) Sabit karıştırma hızı (250 rpm) Sabit enzim konsantrasyonu İnkübasyon süresi (24, 36, 48 saat)	Olgunlaştırılmış beyaz peynir lezzetinde EMP üretimi (lipoliz aşaması).	- (1) Palatase 20000L (<i>Rhizomucor Miehei</i>) - (2) Piccantase® A (<i>Rhizomucor Miehei</i>) - (3) LipomodTM 34MDP (<i>Candida rugosa</i>) - (4) LipomodTM 801MDP (fungal lipaz karışımı)	- Sn1-3 konumsal özgüllük (1) - Belirtilmemiş ama sabunsu lezzet verir. (2) - Belirtilen bir özgüllüğü yoktur. (3) - Kısmen kısa zincirli YA’lerine özgüllük.(4)	GC-MS ve duyu analizi yapılarak; olgunlaştırılmış beyaz peynir lezzetine sahip en yakın lezzet üreten 2 adet enzim-inkübasyon süresi kombinasyonları sırasıyla 2-24 ve 4-48 olmuştur.

Tablo 2.1. (devamı)

Substrat	Lipoliz Parametreleri	Çalışmanın Amacı	Eklenen Enzim ve Kaynağı	Enzim Özgüllüğü	Sonuç
- Tam yağlı tereyağı - Kısa zincirli trigliserit fraksiyonu (Sadeyağ fraksiyonu) (Lencki ve diğerleri, 1998)	2 farklı substrat	<i>P. roqueforti</i> lipazının sadeyağ fraksiyonunda lipolizini etkileyen faktörleri incelemek ve aynı zamanda kısa zincirli yağ asitlerinin lipolizdeki verimini arttırmak.	- <i>P. roqueforti</i> Lipazı	- Sn1-3 konumsal özgüllük ve kısa zincir uzunluğundaki yağ asitlerine özgüllük	Substrat olarak kısa zincirli sadeyağ emülsiyonu kullanıldığında, lipoliz sonucunda istenen kısa zincirli SYA'nın istenmeyen orta zincirli SYA'ya oranı 0,75'ten 1,80'e çıkmıştır. Ayrıca her iki substrat kullanımında da ürün inhibisyonu kaynaklı lipaz inhibisyonu meydana gelmiştir. SYA'nın tampon (fosfat tamponu) çözeltiyle ekstrakte edilmesi ile bu sorun en aza indirilmiştir ve lipaz aktivitesi arttırılmıştır.
- İnek sütü - Koyun sütü karışımı - Keçi sütü (Ha ve Lindsay, 1993)	3 farklı substrat 11 farklı enzim Sabit sıcaklık (lipoliz)(40°C)	Çeşitli lipazlar ve substratlar kullanarak uçucu dallanmış zincirli ve diğer yağ asitlerinin serbest bırakılma mekanizmasını incelemek.	- Pregastrik esterazlar 1. Keçi 2. Buzağı 3. Koyun - Diğer hayvansal lipazlar 4. İnek sütü lipazı 5. Domuz pankreatik lipaz - Mikrobiyel lipazlar 6. <i>Rhizopus arrhizus</i> (RAL) 7. <i>Penicillium roqueforti</i> (PRL) 8. <i>Candida cylindrocea</i> -1 (CCL-1) 9. <i>Candida cylindrocea</i> -2 (CCL-2) 10. <i>Mucor zavanicus</i> (MZL) 11. <i>Aspergillus niger</i> (ANL)	1. kısa zincirli yağ asitlerine özgüllük 2. <i>sn</i> -1, <i>sn</i> -3 özgüllük 3. Küçük boyutlu gliseritlere özgüllük 4. <i>sn</i> -1, <i>sn</i> -3 özgüllük 5. <i>sn</i> -1, <i>sn</i> -3 özgüllük, Gliserit yapısı ve boyutuna, Yağ asidi yapısına özgüllük 6. <i>sn</i> -1, <i>sn</i> -3 ve C ₄ -C ₁₀ zincir uzunluğuna özgüllük 7. Küçük boyutlu gliseritlere özgüllük 8, 9, 10 ve 11. İçin Özgüllük yok.	Lipoliz sonucunda; 3 pregastrik lipazın tümü kısa zincirli yağ asitlerini tercih ederken keçi sütünde diğerlerine kıyasla daha yüksek C ₁₀ serbest bırakmıştır. Koyun sütü yağı, domuz pankreas lipazı ile hidrolize edildiğinde inek veya keçi sütü yağlarından önemli ölçüde daha yüksek bir butanoik asit konsantrasyonunu serbest bırakmıştır. <i>P. roqueforti</i> , <i>A. niger</i> ve <i>R. arrhizus</i> lipazları yüksek miktarda orta zincirli yağ asidi serbest bırakmıştır ve <i>Candida cylindracea</i> lipazı, seçici olmayan bir şekilde yüksek miktarda n- zincirli uçucu yağ asitlerini ve sadece küçük miktarda uçucu ve dallanmış olan yağ asitlerini serbest bırakmıştır. MZL ise kısa zincirli yağ asitleri çoğunlukla özgüllük göstermesine rağmen düşük miktarda C ₄ serbest bırakmıştır. ANL, pregastrik lipazlara benzer özgüllük göstermiştir.

Tablo 2.1. (devamı)

Substrat	Lipoliz Parametreleri	Çalışmanın Amacı	Eklenen Enzim ve Kaynağı	Enzim Özgüllüğü	Sonuç
- İnek süt yağı - Koyun süt yağı - Keçi süt yağı (susuz) (Regado ve diğerleri, 2007)	3 farklı substrat 10 farklı lipaz ve 1 kütinaz	Süt yağının lipolizi ve oluşan SYA profilinin yorumlanması.	- AY30TM (<i>Candida cylindracea</i>) - L5TM (<i>Candida lipolytica</i>) - D20TM (<i>Rhizopus delemar</i>) - NTM (<i>Rhizopus niveus</i>) - R10TM (<i>Penicillium roquefortii</i>) - G50TM (<i>Penicillium camembertii</i>) - AK20TM (<i>Pseudomonas Fluorescens</i>) - CE10TM (<i>Humicola lanuginosa</i>) - GC4 (<i>Geotrichum candidum</i>) - M10 (<i>Mucor Circinelloides</i>)	Belirtilmemiş.	En yüksek hidroliz dereceleri, koyun sütü yağında (%8,7) <i>C. cylindracea</i> lipaz, koyun süt yağında (%8,0) <i>R. niveus</i> lipaz ve sığır sütü yağında (%8,3) <i>P. fluorescens</i> lipaz etkisiyle elde edilmiştir. En düşük hidroliz derecesi ise kütinaz tarafından elde edilmiştir. Ek olarak, lipoliz dereceleri substrat açısından değerlendirildiğinde; koyun ve keçi süt yağı daha yüksek lipoliz seviyesine sahiptir. Enzimlerin çoğu için, serbest bırakılan yağ asitleri büyük ölçüde C _{16:0} ve C _{18:0} , ardından C _{12:0} ve C _{14:0} olarak belirlenmiştir.
- Süt yağı (Nyyssöola ve diğerleri, 2015)	- Hedeflenen hidroliz derecesi (%15, %30, %45) - Sıcaklık (30°C, 40°C) - 3 farklı lipaz - Substrat miktarı (%95 (w/v) yağ-su, %65 (w/v) yağ-su)	Süt yağına sn-2 spesifik enzimle muamele edilmesi ve seçici hidrolizinin incelenmesi.	- CRU-NS (<i>Candida rugosa</i>) - TLA-1,3 (<i>Thermomyces lanuginosus</i>) - PAN-2 lipaz (<i>Pseudozyma antarctica</i>)	- Özgüllük yok - sn-1,3 Özgüllük - sn-2 özgüllük (sırasıyla)	PAN-2 lipazının her iki sıcaklıkta da yağ asidi oranları açısından benzer özellik göstermiştir. TLA-1,3 lipazının net bir özgüllük göstermediği, CRU-NS lipazının ise C ₁₇ -C ₂₄ 'ü daha az tercih ettiği görülmüştür. TLA-1,3 ve CRU-NS lipazlarının süt yağında serbest bıraktığı yağ asidi dağılımları, süt yağına benzerdir ve ikincisinde doymuş uzun ve orta zincirli yağ asitlerinin oranında küçük bir artış meydana gelmiştir. PAN-2, diğliserol ve doymamış yağ asidi ile zenginleştirilmiş süt yağı ürünü üretmek için uzun ve orta zincirli yağ asitlerinin seçici olarak bırakılması için kullanılabilir. Ayrıca, PAN-2 tereyağı ikame ürünlerinin üretiminde kullanımı önerilmiştir.

Wang ve Xu (2009) ile Regado ve diğeri (2007) tarafından yapılan çalışmalarda, *Candida cylindracea*'dan elde edilen lipazın, çalışmalarda kıyaslanan diğeri lipazlar içinde en yüksek lipolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Tomasini ve diğeri (1993) tarafından yapılan çalışmada ise kullanılan enzimler arasında yine *Candida cylindracea* kaynaklı enzim bulunmaktadır ancak en yüksek lipolitik aktiviteyi *Rhizopus arrhizus* kaynaklı enzim göstermiştir. *Penicillium roquefortii* lipazının ise lipolitik aktivite gösterdiği ve roquefort benzeri lezzet oluşturduğu çıkarımı yapılmıştır.

Tablo 2.1' deki çalışmaların sonucu olarak mikrobiyel enzimlerin özgülüğü hakkında genel bir çıkarım yapmak doğru bir yaklaşım olmakla beraber istenen EMT lezzeti için enzim seçimi açısından net bir sonuca varılması çok doğru değildir. EMT lezzeti için enzim kullanımı birçok faktöre bağlıdır. Bu faktörler; enzim türü, enzim kaynağı, substrat özellikleri, substrat konsantrasyonu gibi faktörlerdir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda, istenen EMT lezzeti için diğeri parametreler ise pH, inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon süresi şeklindedir. Yapılan çalışmalar sonucunda, uygun lipoliz derecesi ve lezzet gelişimi genellikle bu parametreler optimize edilerek belirlenmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında ise 3 farklı enzim kombinasyonunda (Palatase 20000 L + Lecitase Ultra; Lipomod 801 + Lecitase Ultra; Lipozyme CALB + Lecitase Ultra) ve 4 farklı inkübasyon süresinde (30-60-120-240. dakika) EMT üretimi hedeflenmiştir. Bu amaçla, tüm enzim kombinasyonlarında lipolitik aktivitenin en yüksek olduğu koşul ön denemelerle belirlenmiştir. Bu koşulda EMT üretimi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında, EMT örneklerinin asitlik düzeyi değerleri (ADV), SYA içerikleri ve miktarları, uçucu bileşik içerikleri, pH ve duyuşsal özellikleri belirlenmiştir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Malzeme

Çalışma kapsamında kullanılan pastörize krema, yerel bir firmadan (Çay Çiftlik Süt Ürünleri, Adana) satın alınmıştır. EMT üretiminde hammadde olarak kullanılan kremaya, saf su ve emülgatör ilave edilerek emülsiyon oluşturulmuş ve enzim ile muamele edilerek lipoliz gerçekleştirilmiştir. Uygun emülsiyon özelliklerinin belirlenmesi amacıyla ilk aşamada emülgatör olarak PGPR (Polyglycerol polyricinoleate, 4150, Palsgaard) kullanılmıştır. Daha sonrasında ise Tween 80 (Polisorbat 80, Crillet 4, Croda) kullanımının su içinde yağ emülsiyonlarına (O/W) daha uygun olması sebebiyle üretime bu emülgatörle devam edilmiştir.

Enzim Modifiye Tereyağı (EMT) üretiminin lipoliz aşamasında 3 farklı ticari lipaz ve 1 fosfolipaz kullanılmıştır. Bu enzimler; Biocatalysts'ten (Cardiff, Galler) satın alınan Lipomod™ 801MDP, Novozymes'dan (Kopenhag, Danimarka) tedarik edilen Palatase 20000L, Lipozyme® CALB ve Lecitase® Ultra'dır. Çalışma kapsamında incelenen lipazlardan birisi olan Lipomod™ 801MDP, karma bir fungal lipaz olup, pankreatik lipaz özellikleri taşımaktadır. Aktivitesi 3900 U/g (Substrat:tribütirat) olarak belirtilmiştir. Optimum pH'sı 5-7, optimum çalışma sıcaklık aralığı 40-50 °C'dir (Biocatalysts, 2015). Enzim spesifikasyonlarına göre dengeli bir lezzet dağılımı sağladığı bilinmektedir (Kendirci ve diğerleri, 2020). Tez çalışmasında incelenen diğer bir lipaz Palatase® 20000L, *Rhizomucor miehei* kaynaklı bir lipazdır. Optimum pH'sı 7-10, optimum çalışma sıcaklık aralığı 30-50 °C'dir (Novozymes Broşür). Genellikle kısa zincirli yağ asitlerini serbest bıraktığı yönünde bilgiler mevcuttur (Kendirci ve diğerleri, 2020). Tezde incelenen son lipaz olan Lipozyme® CALB, *Candida antarctica* B. kaynaklı bir lipazdır. Aktivitesi 5000 LU/g olarak belirtilmiştir. Üretici firmadan alınan bilgilere göre optimum pH'sı 5-9, optimum çalışma sıcaklık aralığı 30-60 °C'dir (Novozymes Broşür). Tez çalışmasında kullanılan son enzim Lecitase® Ultra, *Aspergillus oryzae* kaynaklı bir fosfolipazdır. Enzim üreticisi firma, enzimin aktivitesinin 10 KLU/g, optimum çalışma sıcaklık aralığının ise 30-60 °C olduğunu belirtmektedir (Novozymes).

3.2. Yöntem

3.2.1. Enzim Modifiye Tereyağı (EMT) Üretim Prosedürü

Enzim Modifiye Tereyağı (EMT) üretim koşullarının belirlenmesinde bir dizi ön deneme üretim ve analizi gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasının birinci aşamasını oluşturan bu denemeler doğrultusunda elde edilen sonuçlardan hareketle, tezin ikinci aşamasında yapılan EMT üretimleri şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

Tez çalışmasındaki EMT üretimi temel olarak iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Öncelikle pastörize krema kullanılarak O/W tipi bir emülsiyon elde edilmiş, daha sonra ise bu emülsiyon lipolitik enzimler kullanılarak farklı sürelerde inkübe edilmiştir. O/W emülsiyonunun hazırlanmasında emülsiyon bazında %0,25 oranında kullanılan Tween 80, saf suda tamamen çözündürülmüştür. Sonrasında, bu sulu çözelti ile %67,5 yağ, %71,5 kuru madde oranına sahip pastörize krema (substrat) belirli oranlarda (Palatase ve Lipomod 801 için %40 yağlı; Lipozyme CALB için %25 yağlı emülsiyon olacak şekilde) karıştırılarak emülsiyonlar oluşturulmuştur. Karıştırma işlemi Ultra-Turrax (IKA T-18 Digital Package, IKA®-WerkeGmbH&Co. KG, Almanya) cihazı ile 5000 rpm'de 30 saniye ve 10000 rpm'de 180 saniye olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir üretimde 65 g emülsiyon hazırlanmış ve hazırlanan emülsiyonlar 5 farklı sürede (0-30-60-120-240 dakika) inkübe edilmek üzere, 5 falkona eşit miktarda alınmıştır. Çalkalamalı inkübatörde (IKA KS3000 IC, IKA®-WerkeGmbH&Co. KG, Staufen, Almanya) 45 °C'ye getirilen emülsiyonlara enzim ilavesi gerçekleştirilmiş ve emülsiyonlar 45 °C, 200 rpm'de inkübe edilmiştir. Emülsiyonlara ilave edilecek enzim miktarı substrat yani süt yağı bazında olacak şekilde ayarlanmıştır. Her bir örneğin inkübasyonunda farklı bir lipaz enzimi kullanılmak şartıyla, lipaz ve fosfolipaz enzimlerinin kombinasyonu enzimatik reaksiyonda kullanılmıştır. 3 farklı lipaz ve 1 fosfolipaz kombinasyonu ((1) %0,25 Palatase 20000L + %0,075 Lecitase® Ultra; (2) %0,2 Lipomod™ 801MDP + %0,075 Lecitase® Ultra; (3) %2,5 Lipozyme® CALB + %0,075 Lecitase® Ultra) ile enzim ilavesi gerçekleştirilmiştir. Enzim ilavesi, emülsiyonlara substrat (emülsiyondaki yağ miktarı) bazında eklenerek gerçekleştirilmiştir. Belirlenen sürelerde (30-60-120-240.dakikalarda) 3 farklı enzim kombinasyonu için örnek alınıp enzim aktivitelerini sonlandırmak amacıyla 85 °C'de 15 dakika su banyosunda pastörizasyon işlemi yapılmıştır. Üretimler iki paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Uygulanan Analiz Yöntemleri

3.2.2.1. Bileşim Analizleri

Üretilen EMT'lerin nem içeriği gravimetrik yöntem ile (AOAC, 2012a), yağ oranı Gerber-Roeder yöntemi ile (AOAC, 2012b) belirlenmiştir. EMT'lerin pH değerleri pH metre (Milwaukee MW180 Max, NC, ABD) kullanılarak ölçülmüştür.

3.2.2.2. Asitlik Derecesi Değeri (ADV) Analizi

Asitlik derecesi değerinin (ADV) analizi birkaç değişiklikle birlikte Richardson (1985)'de belirtilen prosedürle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde, örneklerde bulunan yağ, seri halde uygulanan deterjan, ısı ve santrifüj etkileri ile emülsifiye formdan çıkartılmış ve serbest haldeyken içeriğindeki asitlik analiz edilmiştir. 5 gr EMT örneğine, 20 mL BDI (Bureau of Dairy Industries) çözeltisi eklenmiştir. Örnek, Ultra-Turrax ile 10000 rpm'de 1 dakika karıştırma, 1 dakika bekletme, 1 dakika karıştırma prosedürü ile homojenize edilmiştir. Örnekteki yağın ayrılarak karışımın üst kısımda toplanması için 95 °C'deki su banyosunda 60 dk bekletilmiştir. 4 °C'de, 45 dakika, 3000 g'de (5620 rpm) soğutmalı bir santrifüj cihazında (Hettich, Universal 320 R, North Amerika) santrifüj edildikten sonra üst fazda toplanan yağ alınmış, 5 mL çözücü (Petrol eteri:2-Propanol (4:1)) ve 5-6 damla fenolftalein eklenerek 0.02 N metanolik KOH ile titre edilmiştir. Üretilen EMT örneklerinin asitlik düzeyi aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır. Denklemden N ifadesi titrasyonda kullanılan KOH normalitesini temsil etmektedir.

$$ADV (\%) = \frac{(\text{Örneğin KOH sarfiyatı (mL)} - \text{Kör KOH sarfiyatı (mL)}) * N * 100}{\text{Titre edilen Örnek Ağırlığı (g)}}$$

3.2.2.3. Serbest Yağ Asidi (SYA) Bileşimi ve Miktarı Analizi

Süt yağının lipolizi ile açığa çıkan birincil ürünler serbest yağ asitleridir (SYA). SYA'nın belirlenmesi sayesinde, lipoliz düzeyine ve lipoliz sonucunda oluşan SYA profiline dair doğrudan bilgi edinmek mümkündür. Bu amaçla, çalışmada üretilen EMT'lerin SYA bileşiminin ve miktarının belirlenmesinde De Jong ve Badings (1990) ile Deeth, Gerald ve Snow (1983) tarafından açıklanmış olan yöntem esas alınmıştır. Analizlerde alev iyonizasyon dedektörlü (FID) bir gaz kromatografisi (GC) cihazı (7890A, Agilent Technologies, Santa Clara, ABD) kullanılmıştır. Öncelikle SYA'lar katı faz ekstraksiyonu yöntemi kullanılarak ekstrakte edilmiş ve daha sonra ekstraktlar GC'ye enjekte edilerek analiz edilmiştir. Analizin

ekstraksiyon aşamasında, örneklerdeki yağ, hekzan-dietil eter (1:1) çözgenine geçirilmiş, çözelti bond elute kolonlarında bulunan deaktive edilmiş alüminadan vakum manifoldu aracılığıyla süzölmüştür. Süzme işlemleri sonrasında kolonlardaki alümina kurutulmuş ve alüminada tutunan SYA, dietil eterde %3'lük formik asit çözeltisi aracılığıyla alüminadan alınmıştır. Sonrasında, izole edilen SYA, doğrudan GC'ye enjekte edilmiştir.

GC'deki enjeksiyon bloğunun sıcaklığı 250 °C'ye ayarlanmıştır. Her bir örnekten 0,5 µL ekstrakt enjekte edilmiş ve 1:10 split oranı ile ekstraktlar kolona gönderilmiştir. GC'de ayırım DB-FFAP (30 m x 0,25 µm x 0,25 mm, Agilent Technologies, Santa Clara, ABD) kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. GC fırın sıcaklığı 90 °C'ye ayarlanmış, fırın bu sıcaklıkta 1 dk tutulmuş, ardından 7 °C/dk artışla 240 °C'ye aşamalı olarak arttırılmış ve bu sıcaklıkta 15 dk tutulmak suretiyle, 2 mL/dk sabit helyum akış hızında analizler gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyonda FID sıcaklığı 260 °C olarak belirlenmiştir. Analizlerde miktar hesaplamasında iç standart yönteminden yararlanılmıştır. İç standart olarak, pentanoik asit, tridekanoik asit ve heptadekanoikasit (her birisi 0.5 mg/mL) kullanılmıştır. Analiz sonucu SYA bileşimlerinin miktarı mg/100 g yağ olarak ifade edilmiştir.

3.2.2.4. Uçucu Bileşik Analizi

Uçucu bileşiklerinin analizinde, ekstraksiyon işleminde katı faz mikroekstraksiyon (solid-phase microextraction, SPME) tekniğinden yararlanılmış ve ekstraksiyon sonrası örneklerdeki uçucu bileşiklerin miktarı ve tanımlanması GC (7890B, Agilent Technologies, Santa Clara, ABD) ve buna bağlı kütle spektrometresinde (MS) (5977A MSD, Agilent Technologies, Santa Clara, ABD) gerçekleştirilmiştir.

Uçucu bileşiklerin ekstraksiyonunda olgun beyaz peynirlerinin analizi için belirlenmiş olan optimum SPME koşulları kullanılmıştır (Salum ve diğerleri, 2017). Buna göre, ekstraksiyon sıcaklığı 56,2 °C, ekstraksiyon süresi 84,9 dakika ve karıştırma hızı 549 rpm olarak uygulanmıştır. EMT örnekleri 4'er gram olarak 20 mL'lik viallere tartılmış, ekstraksiyon için belirlenmiş olan sıcaklık ve karıştırma hızında 30 dakikalık bir dengeleme işlemine tabi tutulmuştur. Sonrasında, viallerdeki örneklerin hava boşluğuna geçen uçucu bileşikler Carboxen/Polidimetilsilokzan (CAR/PDMS, Auto Merlin 75 µm, SU57343U, Agilent Technologies, Santa Clara, ABD) ile kaplanmış fiber aracılığıyla ekstrakte edilmiş ve GC'ye enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Dengelenme, ekstraksiyon ve enjeksiyon aşamalarında

otomatik enjeksiyon modülü (GC Injector 80, Agilent Technologies, Santa Clara, ABD) kullanılmıştır. Bu işlemler süresince karıştırıcının açık/kapalı zamanı 5/2 s olacak şekilde ayarlanmıştır. Ekstraksiyon sonrasında fiberin enjeksiyon portundaki desorpsiyon süresi 180 saniye, sıcaklığı 250 °C ve septumdaki tahliye akış hızı 3.0 mL/dk'dır. Ayırmada DB-Wax kolonundan yararlanılmıştır (30 m x 250 µm x 0,25 µm; 122-7032, Agilent Technologies, Santa Clara, ABD). Taşıyıcı gaz olarak 2 mL/dk akış hızında helyum gazı kullanılmıştır. Fırın sıcaklığı 40 °C'de 2 dakika tutulduktan sonra 5 °C/dk artışla 70 °C'ye yükseltilmiş, fırın bu sıcaklıkta 1 dakika tutulduktan sonra 10 °C/dk'lık artışla 240 °C'ye ulaştırılmış ve bu sıcaklıkta 4 dakika tutulduktan sonra program tamamlanmıştır. MS iyonlaşma enerjisi 70 eV, iyon kaynağı sıcaklığı 250 °C, kuadropol sıcaklığı 120 °C'ye ayarlanarak, 1 saniye aralıklarla 30-400 kütle/yük (m/e) arasında tarama yapılmıştır. Uçucu bileşiklerin tanımlamasında NIST11 ve Wiley7 kütüphanelerinden yararlanılmıştır. Tanımlanan uçucu bileşiklerin doğrusal alıkonma indekslerini (linear retention index, LRI) hesaplamak için GC-MS analiz koşullarında alkan serisinin (C8-C40, SupelCo, PA, USA) enjeksiyonu yapılarak; elde edilen sonuçlar doğrultusunda bileşiklerin LRI değerleri hesaplanmıştır (Van den Dool ve Kratz, 1963). Uçucu bileşiklerin tanımlanmasını doğrulamak için Otomatik Kütle Spektral Dekonvolüsyon ve Tanımlama Sistemi (AMDIS) kullanılmıştır (Lamichhane ve diğerleri, 2018). Bileşiklerin konsantrasyonunun belirlenmesinde iç standart yöntemi kullanılmıştır. İç standart seçiminde, daha önceki çalışmalarda enzim modifiye süt ürünlerin tespit edilemeyen ve bu tip örneklerde tanımlanan bileşiklerin piklerlerinin alıkonma indeksleri ile çakışmayan bir bileşik olarak 4-nonanol (9 µg/µL) seçilmiştir.

3.2.2.5. Damlacık Boyutu Dağılımı Analizi

Emülsiyon örneklerindeki dağılmış fazdaki damlacıkların boyut dağılımının belirlenmesinde Malvern Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) cihazı ile Himmetagaoglu ve diğerleri (2018) çalışmasında tarif edilen yöntem kullanılmıştır. Çalışmada su içerisinde yağ (O/W) emülsiyonları ile çalışıldığından, yağ damlacıklarının boyut dağılımları ölçülmüştür. Bu amaçla, incelenen emülsiyon örnekleri üretilmelerinin hemen sonrasında analiz edilmiştir. Ölçümlerde süt yağı ve saf suyun kırılma indeksi değerleri sırasıyla 1.460 ve 1.333 olarak alınmıştır (Michalski ve diğerleri, 2001). Ölçüm sırasında örnek kabındaki karıştırma hızı 2100 rpm olarak belirlenmiştir. Kullanılacak örnek miktarı, %12-16'lık bir lazer obscuration değeri elde edilecek şekilde ayarlanmıştır. Emülsiyonlardaki yağ damlacık boyutunun dağılımını karakterize etmek için analiz

sonucunda D(10), D(50), D(90), D(100), Uniformity, D[3,2], D[4,3] ve span parametreleri hesaplanmıştır. Hesaplanan bu parametrelerin açıklamaları Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Damlacık boyut dağılımının belirlenmesinde kullanılan parametreler ve açıklamaları.

Değerler	Tanım
D(10)	Dağılımın %10’u bu değerin altındadır.
D(50)	Dağılımın %50’si bu değerin altındadır.
D(80)	Dağılımın %80’i bu değerin altındadır.
D(90)	Dağılımın %90’ı bu değerin altındadır.
D(100)	Dağılımın %100’i bu değerin altındadır.
D[3,2]	Yüzey alanı ortalama çapı.
D[4,3]	Hacim ortalama çapı.
Uniformity	Ortalama değerlerin standart sapması.
Spesifik yüzey alanı	Parçacık yüzey alanının ortalama çapı.

3.2.2.6. Viskozite Analizi

Çalışma kapsamında üretilen emülsiyonların akıcılığını belirlemek için viskoziteleri ölçülmüştür. Bu amaçla, viskozimetre cihazı (DV-II+ Pro, Brookfield Engineering, Middleboro, MA ABD) kullanılmış, örneklerin viskozite değerleri 45 °C’de ölçülmüştür. Örneklerin sıcaklıklarının ayarlaması için sirkülatörlü su banyosundan (ICC Basic Eco 8, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Almanya) ve Small Sample Adaptor (Brookfield Engineering, Middleboro, MA ABD) aksesuarından yararlanılmış, ölçümlerde spindle olarak SC4-18 (Brookfield Engineering, Middleboro, MA ABD) kullanılmıştır.

Ölçülen emülsiyonların akış özelliklerini belirlemek için, farklı kayma hızlarında (γ , s⁻¹) yapılan ölçümlerle elde edilen kayma gerilimi (τ , Pa) değerleri “Power Law” tipi bir denkleme benzetilerek modellenmiş ve akış davranış indeksi (n) ile kıvam katsayısı (K, Pa.sn) değerleri saptanmıştır:

$$\tau = K \times \gamma^n$$

3.2.2.7. Türbidite Ölçümü Analizi

Çalışma kapsamında üretilen emülsiyonların kararlılıklarına dair fikir edinmek üzere bulanıklıkları ölçülmüştür. Türbidimetre yöntemi, ISO 7027 (ISO, 2016)'ya göre saçılan ışığın algılanmasına dayanmaktadır. Bu amaçla, 50 µL emülsiyon 15 mL saf su ile seyreltilmiştir. Karışım çalkalanarak homojen hale getirilmiş ve hızlı bir şekilde analiz edilmiştir. Emülsiyonların bulanıklığı, taşınabilir bir türbidimetre (MI 415, Milwaukee Instruments, NC, ABD) ile ölçülmüştür. Analiz öncesinde cihazın kalibrasyonu, üretici tarafından sağlanan 10 ve 500 Formazin Nefelometrik Birim (FNU) standartları ile yapılmıştır.

3.2.2.8. Mikroskop Görüntülemesi

Tez çalışmasında üretilen emülsiyonların oluşup oluşmadığının veya hangi tip emülsiyonun oluştuğunun gözlemlenmesi için kimi örneklerin mikrografları, bir ışık mikroskobuna (Omax, M83EZ, OMAX Microscopes, Washington, ABD) bağlı 5 Megapiksel CMOS kamera (OMAX A3550U, OMAX Microscopes, Washington, ABD) ile elde edilmiştir. Çalışmada 40x objektif lens kullanılmıştır. Bu kapsamda analizin niteliğine göre lam üzerine 50 µL distile su veya yağ damlatılmış ve sonrasında bu damlanın üzerine şırınga iğnesi yardımıyla 5 µL emülsiyon eklenmiştir. Sonrasında örneğin üzeri bir lamel ile dikkatlice kapatılmıştır ve örnek mikroskopta incelenmiştir. Elde edilen görüntüler herhangi bir onarım işlemi (kontrast, beyaz dengesi vb.) uygulanmadan Tagged Image File Format Biçimi (TIFF) ile bilgisayara kaydedilmiştir.

3.2.2.9. Duyusal Analiz

Tez çalışmasının ikinci aşamasında üretilen Enzim Modifiye Tereyağı (EMT) örneklerinin (3 farklı enzim kombinasyonu ile 4 farklı inkübasyon süresinde üretilen toplam 12 EMT örneği) duyusal özelliklerinin incelenmesi için duyusal analize tabi tutulmuştur. Duyusal analiz için, Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nde 9 kişiden oluşan bir panelist ekibi oluşturulmuştur. Panelist ekibi 7 kadın ve 2 erkek olmak üzere 9 kişiden oluşmaktadır, yaş aralığı 25-40 arasındadır ve panelistler sigara kullanmamaktadır. Panelistler, tereyağı lezzeti ve EMT konusunda eğitilmiştir. EMT örneklerinin tanımlanması amacıyla hazırlanan referans maddeler panelistlere sunulmuştur. Panelistlere, referans madde olarak “meyvemsi koku”yu temsil etmek üzere için taze ananas ve “ransidite” için %0,04 bütirik asit koklatılmış, “asitlik” için %0,1'lik sitrik asit tattırılmıştır. Bunun yanı sıra, “toplam lezzet yoğunluğu” için minimum yoğunluğu temsil

etmek üzere “süt”, maksimum yoğunluğu temsil etmek üzere ise “olgun beyaz peynir” referans madde olarak sunulmuştur. Analizde, “tereyağına benzerlik” için ise “tereyağı” referans olarak kullanılmıştır. Örnek geçişlerinde burun yorgunluğunu gidermek amacıyla panelistlere koklamaları için kahve, tadımda ise ağız temizlemek için ekmek ve su verilmiştir. EMT’ler panelistlere, rastgele düzende sıralanarak ve 3 haneli rastgele rakamlarla kodlanarak sunulmuştur.

Duyusal analizde, EMT örnekleri herhangi bir seyreltme işlemi yapılmadan 15 mL’lik falkonlara 3’er gram konularak doğrudan panelistlere sunulmuştur. EMT örneklerindeki uçucu bileşiklerin tepe boşluğunda birikmesi için sunum öncesinde örnekler 40 °C’de 10 dakika bekletilmiştir. Panelistlerden EMT örneklerini önce koklayarak “meyvemsi koku” ve “ransidite” özelliklerini, sonra tadarak “asitlik” özelliğini değerlendirmeleri ve ardından genel değerlendirme kapsamında “toplam lezzet yoğunluğu”, “tereyağına benzerlik” ve “genel beğeni” parametrelerine dair görüşlerini sunmaları istenmiştir. Duyusal analizlerde örnekler iki paralel olarak sunulmuş ve oturumlar günde iki oturum olacak şekilde (saat 10.30 ve 14.30) 3 günde gerçekleştirilmiştir. Analizde panelistlerin değerlendirmelerini, 0-15 cm uzunluğunda grafik skala kullanarak yapması istenmiştir ve kullanılan analiz formu Şekil Ek 1’de verilmiştir (Altuğ Onoğur ve Elmacı, 2011).

3.2.2.10. İstatistiksel Analizler

Enzim Modifiye Tereyağı (EMT) örneklerine yapılan analizler sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel olarak anlamlılığını belirlemek amacıyla SPSS İstatistik Paket Programı (SPSSver. 18.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılmıştır. Bu amaçla EMT örneklerinin ADV, SYA ve uçucu bileşik analiz sonuçlarına ANOVA ve Duncan Post Hoc Testleri yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $P < 0.05$ ’tir. Ayrıca, tüm sonuçlar (ADV, SYA, uçucu bileşik, duysal analizler) için eş zamanlı bir şekil elde etmek amacıyla XLSTAT 2011 (Addinsoft, New York, NY, ABD) kısmi en küçük kareler (PLS) regresyon yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Tez çalışmasında Enzim Modifiye Tereyağı (EMT) üretimi için uygun enzim ve inkübasyon koşullarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, süt yağı kaynağı veya substrat olarak kremanın kullanılması ve kremanın farklı lipolitik enzimlerle, farklı inkübasyon sürelerinde hidrolize edilmesi sonucunda elde edilecek EMT örneklerinin özelliklerinin belirlenmesi kurgulanmıştır. Ancak, enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin etkin şekilde aktivite göstermeleri için pH, sıcaklık, enzim konsantrasyonu (Eed, 2012; Scanlon, Henrich ve Whitaker, 2018), karıştırma hızı, substrat miktarı (Robertson, Harper ve Gould, 1996), enzim aktivitesi, substrat/enzim teması, basınç (Scanlon ve diğerleri, 2018), enzim arayüzey aktivasyon özelliği (Saktaweewong ve diğerleri, 2011) gibi çok sayıda işlem değişkeninin var olduğu bilinmektedir. Uygun koşullar sağlanmadığında enzimatik reaksiyon gerçekleşmeyecek veya çok yavaş gerçekleşecektir. Dolayısıyla, herhangi bir enzim için inkübasyon süresi başlangıç değişkeni olmaktan öte, diğer değişkenlere bağlı bir bağımlı değişkendir.

Enzimatik reaksiyonların kinetiği düşünüldüğünde, reaksiyon kinetiği Michealis-Menten tipi bir değişim/gelişim izlemektedir (Cardenas, 2015; Goldbeter, 2013; Grahame, Bryksa ve Yada, 2015). Buna göre, enzim (tipine bağlı olarak kimi farklılıklar barındırsa da) öncelikle substratla fiziksel temasını gerçekleştirmekte ve sonrasında reaksiyon çok yüksek bir hızla gerçekleşmeye başlayıp, reaksiyon hızı ve reaksiyon ürünlerinin artışı sürekli azalarak belirli bir süre sonunda dengeye ulaşılmakta ve reaksiyon durma noktasına gelmektedir. Bu çalışmada, enzimden maksimum verimin yani maksimum reaksiyon ürününün elde edildiği ve reaksiyonun durma noktasına geldiği inkübasyon süresi ile koşullarının belirlenmesi ve bu süreye kadar farklı sürelerde üretilmiş enzimatik reaksiyon ürünlerinin incelenmesi planlanmıştır.

Bu amaçla, tez çalışmasının 1.aşamasında enzimatik reaksiyon veriminin maksimize edildiği işlem koşullarının belirlenmesine çalışılmıştır. Bu kapsamda, oluşturulacak olan emülsiyonların tipi, emülsiyonların yağ içeriği, emülgatör tipi ve oranı, enzim tipi ve konsantrasyonu gibi değişkenlerin enzimatik reaksiyonlar üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir. Bu aşamada elde edilen sonuçlardan hareketle, EMT üretiminde

çalışılacak işlem koşullarına karar verilmiş ve farklı inkübasyon sürelerinde üretilmiş olan EMT örnekleri çalışmanın 2.aşamasında analiz edilmiştir.

4.1. Aşama 1: Lipoliz İşlem Koşullarının Belirlenmesi

4.1.1. Emülsiyon Tipinin ve Emülgatör Kullanımının Lipolitik Aktivite Üzerine Etkisi

Enzimatik reaksiyonlar enzim tipine bağlı olarak değişmekle beraber, reaksiyon koşullarındaki diğer değişiklikler de etki mekanizmaları üzerinde önemlidir. İstenen son ürünü elde etmek için substrat ve enzim konsantrasyonu, ortam sıcaklığı, enzim spesifikliği gibi reaksiyon ortam özellikleri enzim aktivitesi üzerine belirgin etkilere sahiptir (Ferrato ve diğerleri, 2007; Scanlon ve diğerleri, 2018).

Lipolitik enzimlerde ise reaksiyon mekanizması kendine özgü özellikler barındırmaktadır. Lipazlar, özellikle sulu fazda/ortamda ve emülsiyon ortamlarında aktivite göstererek ester bağlarına etki ederler. Bu nedenle, emülsiyon ortamında bulunan yağ damlacıklarının yüzeylerine tutunarak “arayüzey aktivasyonu” gösterme eğilimindedirler. Bu özel etki mekanizmaları nedeniyle diğer enzimlerden ayrılmaktadır (Bauer ve diğerleri, 2005; Golding ve Wooster, 2010; Piacentini ve diğerleri, 2021; Virgen-Ortiz ve diğerleri, 2019). Arayüzey aktivasyonu gösterme eğilimleri nedeniyle genel enzimatik reaksiyonlara etki eden faktörlere ek olarak emülsiyon özellikleri de (emülsifikasyon tekniği (Saktaweewong ve diğerleri, 2011; Piacentini ve diğerleri, 2021), emülsiyon stabilitesi (Golding ve Wooster, 2010), emülsiyon tipi, emülsiyon damlacık boyutu, sıcaklık (Eed, 2012), pH (Tomasini ve diğerleri, 1993), emülgatör varlığı ve tipi (Mun ve diğerleri, 2007; Ruiz-Henestrosa ve diğerleri, 2022)) lipazların aktivitelerinde önemlidir. Bu nedenle, bu aşamada emülsifikasyon tekniği (rotor-stator tekniği ile Ultra-Turrax cihazı kullanılarak), ortam sıcaklığı (45°C), karıştırma süresi (önce 5000 rpm/30 s, devamında 10000 rpm/90 s) sabit tutularak lipazın maksimum aktivite gösterdiği emülsiyon ortamının tipi (su içinde yağ (O/W) veya yağ içinde su (W/O)) belirlenmiş ve ortamdaki emülgatör varlığının aktivite üzerine etkisi incelenmiştir. Ayrıca enzim türünün (fosfolipaz), aktivite üzerine etkisini incelemek amacıyla da tek başına lipaz kullanımına ek olarak fosfolipaz kullanımının etkisi de araştırılmıştır.

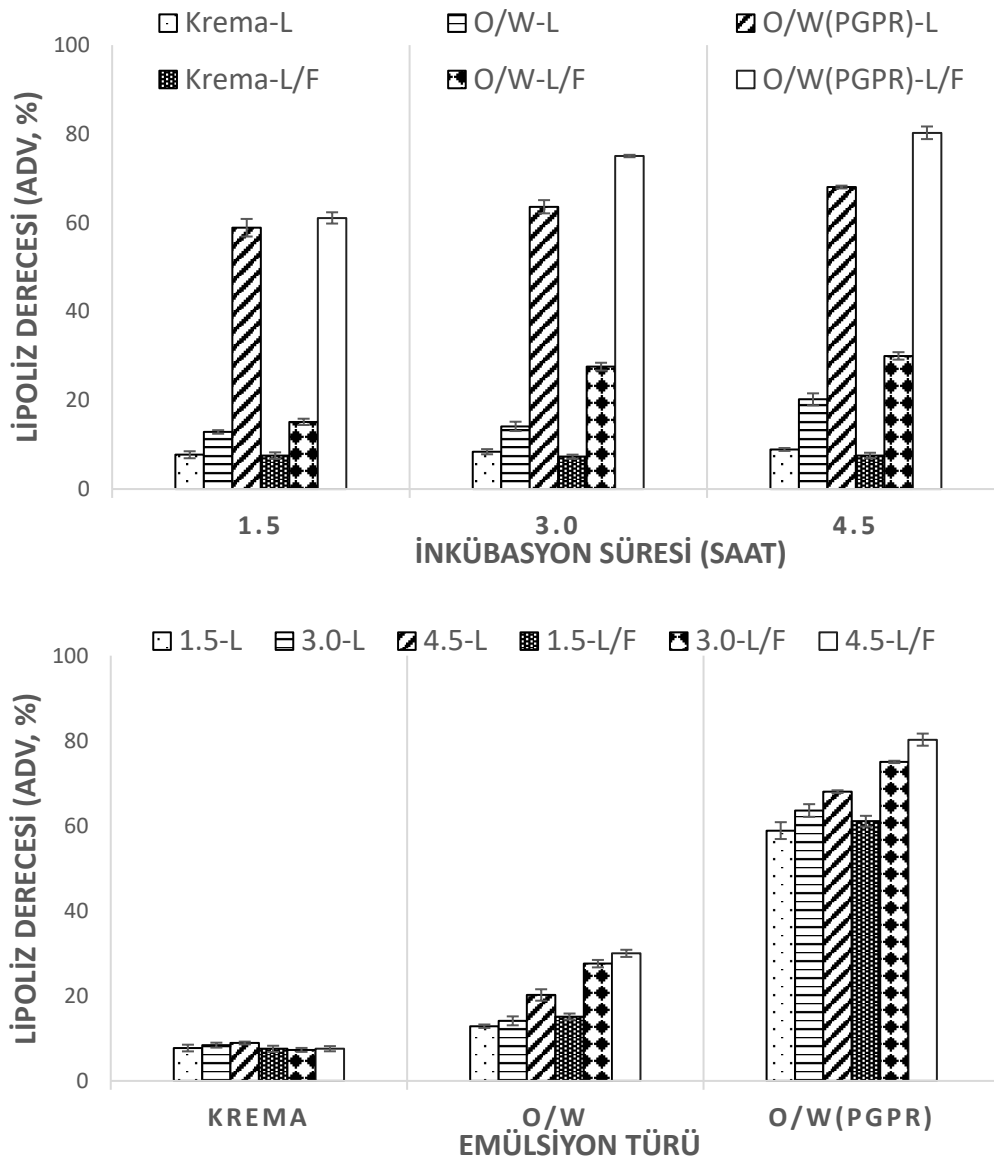
Bu amaçla çalışmada süt yağı kaynağı veya substrat olarak %67,5 yağ ve %71,5 kuru madde içeriğine sahip pastörize krema kullanılmıştır. Örnekler hazırlanmadan önce substrat (krema) 45 °C’de su banyosunda sıvı hale getirilmiştir. İlk olarak enzim/substrat etkileşimi için uygun

emülsiyon ortamına karar vermek üzere kremanın homojenize edilmesiyle W/O emülsiyonu (“Krema” olarak kodlanmış), kremaya sadece su ilave edilmesi sonrası homojenize edilmesiyle (“O/W” olarak kodlanmış) ve bu homojenizasyon öncesi emülgatör de ilave edilmesiyle O/W emülsiyonları (“O/W(PGPR)” olarak kodlanmış) oluşturulmuştur. “Krema” olarak kodlanan örneğin üretilmesinde, sıvı hale getirilmiş olan kremadan 16 g alınmış ve herhangi bir emülgatör ilave edilmeden Ultra-Turrax ile homojenize edilmiştir (W/O emülsiyonu). İkinci ve üçüncü substratlar da aynı şekilde 45 °C’de sıvı hale getirilmiş ve ikinci emülsiyona emülgatör eklenmeden, üçüncü emülsiyona emülgatör eklenerek (PGPR) 16 g krema ve 16 g saf su (O/W) Ultra-Turrax ile aynı koşullarda homojenize edilmiştir.

Bu 3 farklı emülsiyon yapısındaki substrat ortamına tek başına lipaz (“L” olarak kodlanmış) ve lipaz ile fosfolipaz (“L/F” olarak kodlanmış) kombinasyonu eklenerek inkübasyon sağlanmıştır. Bu aşamada lipaz olarak Palatase® 20000 L ve fosfolipaz olarak Lecitase® Ultra kullanılmıştır. Enzimler, emülsiyondaki yağ miktarına oranla 45°C’de ilave edilmiştir (Palatase %0,5 ve Lecitase %0,15). Çalışmada emülgatör ilave edilen örnekte, emülgatör olarak PGPR kullanılmış (“PGPR” olarak kodlanmış) ve toplam emülsiyon miktarının %0,25’i oranında eklenmiştir. Örneklerin inkübasyonu, çalkalamalı inkübatörde 45°C, 200 rpm’de, üç farklı inkübasyon süresinde (1,5; 3, ve 4,5 sa) gerçekleştirilmiştir. Inkübasyon sonrası örneklerdeki enzim aktivitesini durdurmak amacıyla, 85°C’de 15 dakikalık bir ısıtım işlemi uygulanmıştır. Örneklerin lipoliz düzeylerinin belirlenmesinde, yağda oluşan asitliğin bir ölçüsü olarak ADV analizi gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.1’de verilmiştir.

Analizler sonucunda elde edilen verilere göre, O/W emülsiyonlarındaki lipolitik aktivitenin daha yüksek olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlar, lipazların sulu sistemlerde ve emülsiyonlarda (başka bir deyişle arayüzeyde) aktivite gösterdiği yaklaşımla uyumludur. Lipazların aktiviteleri üzerine yapılan çalışmalarda O/W tipi emülsiyon tercih edilmiş ve yüksek yağ içeriğinde aktivitelerinin düştüğü kaydedilmiştir (Tomasini ve diğerleri, 1993). Lipazların O/W emülsiyon sistemlerinde/arayüzeyde daha yüksek aktivite gösterdiği ile ilgili bir çok çalışma bulunmaktadır (Bauer ve diğerleri, 2005; Collins ve diğerleri, 2003; Giang, Gaucel, Brestaz, Anton, Meynier, Trelea ve Feunteun, 2016; Kilcawley, 2006; Kilcawley ve diğerleri, 1998). Ayrıca, Şekil 4.1’deki sonuçlara göre emülgatör kullanımının lipaz aktivitesini arttırdığı görülmektedir. Bu da, emülgatör kullanımına bağlı olarak emülsiyonda azalan yağ damlacık boyutunun ve/veya gelişen emülsiyon stabilitesi sonucu emülsiyonun

daha uzun süreler kararlı kalmasının lipoliz hızını/derecesini arttırdığı şeklinde yorumlanabilir (Bauer ve diğerleri, 2005; Gomes ve diğerleri, 2018; Piacentini ve diğerleri, 2021). Diğer bir sonuç ise lipaza ek olarak üretici firmanın da tavsiyesi üzerine denenen fosfolipaz kullanımının lipoliz derecesi üzerine olumlu etkisi olmasıdır. Ancak, bu durumun nedeni açık değildir. Literatürde fosfolipitlerin varlığının, lipolitik aktivite üzerine olumlu ve olumsuz etkileri olduğuna dair çelişkili bulgular söz konusudur (Golding ve Wooster, 2010; Mun ve diğerleri, 2007; Ruiz-Henestrosa ve diğerleri, 2022). Fosfolipazın, lipoliz hızı/derecesi üzerine etkisine yönelik ek deneysel çalışmalar ve yorumlar Bölüm 4.1.3’de paylaşılmıştır.



Şekil 4.1. Farklı substrat yapıları ve enzim kombinasyonlarıyla enzim aktivitesindeki değişim (her iki grafik aynı veriyi içermektedir).

4.1.2. Emülgatör Tipi ve Konsantrasyonunun Lipolitik Aktivite Üzerine Etkisi

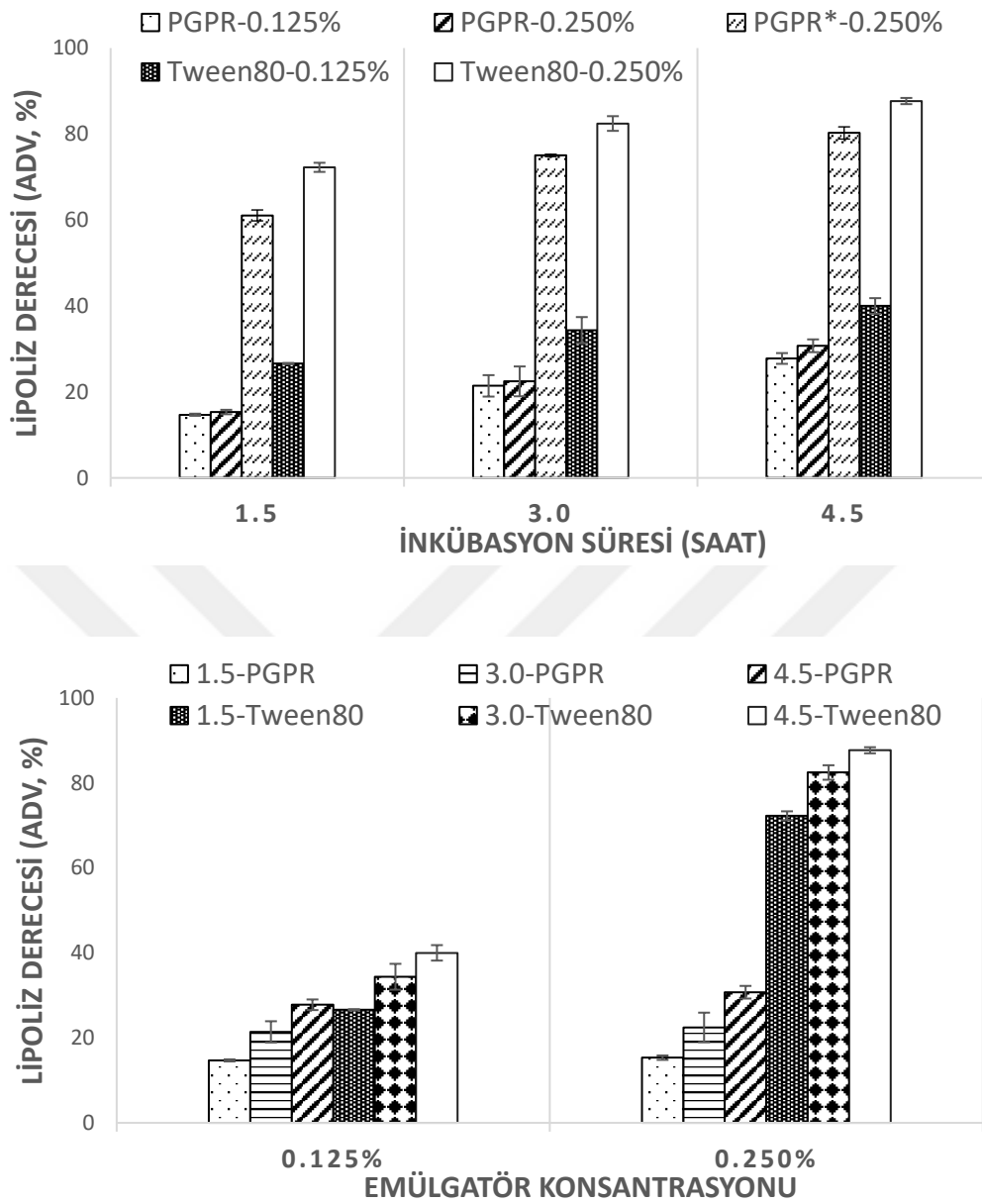
Emülsiyon özellikleri arasında emülgatör tipi, emülsiyon yapısı üzerine büyük etkiye sahiptir (Ruiz-Henestrosa ve diğerleri, 2022). Emülsiyonlar, yerçekimine bağlı ayrılma (kremleşme ve/veya sedimentasyon), topaklaşma (flokülasyon), birleşme (koalesans) gibi çeşitli fizikokimyasal mekanizmalar nedeniyle zamanla bozulma eğilimindedir (Chung, Smith, Degner ve McClements, 2016). Emülsiyonlarda gıda katkısı olarak emülgatör kullanımı ile uzun süreli kararlı ve homojen damlacık boyut dağılımı sağlanarak emülsiyon stabilitesi arttırılabilmektedir (Cox, Sandall, Smith, Rossi ve Whelan, 2020). Lipazlar açısından stabil bir emülsiyon sağlanması ile maksimum enzim aktivitesi hedeflenebilmektedir. Bu aşamada lipolitik aktiviyi maksimize etmek amacıyla uygun emülsiyon özelliklerinin belirlenmesinde etkili olan emülgatör tipi ve konsantrasyonunun etkisi araştırılmıştır. Bir önceki aşama sonucundan hareketle, emülgatör ve lipaz-fosfolipaz kombinasyonunun kullanılması ile O/W emülsiyonunun hazırlanmasına karar verilmişti. Kullanılan enzim kombinasyonu ile oranları, emülsifikasyon işlem koşulları, ortam sıcaklığı, karıştırma süresi bir önceki aşama ile aynı olacak şekilde sabit tutularak değişen inkübasyon sürelerinde (1,5; 3,0 ve 4,5 sa) uygun emülgatör tipi (düşük hidrofilik lipofilik denge (HLB) değerli PGPR ve yüksek HLB değerli Tween 80) ile konsantrasyonunun (%0,125 ve %0,250) incelenmesi düşünülmüştür. Üretilen emülsiyonlara lipaz-fosfolipaz kombinasyonu eklenerek inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir ve örneklerin ADV analizleri gerçekleştirilerek sonuçlar Şekil 4.2’de paylaşılmıştır.

Emülgatörlerin lezzet üzerinde istenmeyen etkilere sahip olabileceği düşünüldüğünden, düşük konsantrasyonlarda kullanımı tercih edilmiştir. PGPR, düşük HLB değerlerine sahiptir, yağ fazında çözünme eğilimi gösterir ve çoğunlukla W/O emülsiyonlarında kullanıma uygun monomerik bir emülgatördür (Smith, Wilson ve Hepburn, 1998). Çalışmanın bu aşamasında yağ fazına ilave edilmiş ve daha sonrasında yağ ile su fazları homojenize edilmiştir. Tween 80 ise yüksek HLB değerlikli, hidrofilik bir emülgatördür ve su fazında kolaylıkla çözünür (Cheng, Zeng, Huang, Yang, Lai, Zhang ve Liu, 2017). Tween 80 hidrofilik bir emülgatör olduğundan, önce distile suda çözülmüş, daha sonra ısıtılmış (sıvılaştırılmış) krema ile karıştırılmış ve homojenize edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre PGPR kullanılan örneklerde emülgatör konsantrasyonundaki değişim önemli bir etki yaratmazken, Tween 80 konsantrasyonundaki artış ADV değerleri üzerinde ciddi bir artışa neden olmuştur. Ayrıca veriler, yüksek HLB değerine sahip

monomerik emülgatör kullanımının lipoliz derecesinde artışa neden olduğunu göstermiştir. Bu, geliştirilmiş emülsiyon stabilitesinin tercih edilmesi gerektiği anlamına gelmektedir.

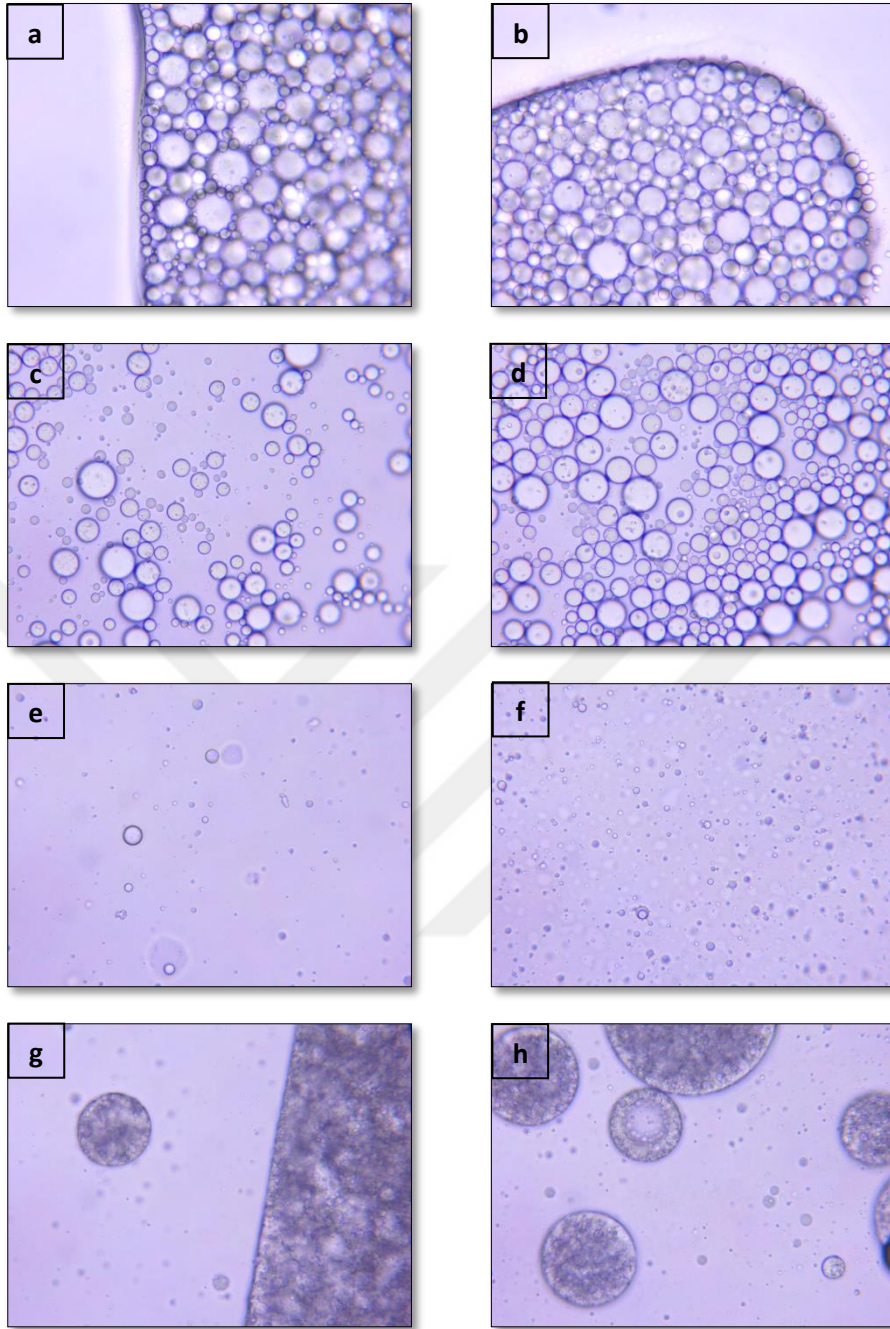
Ancak, bir önceki aşamada PGPR (%0,25) ile üretilen ve 4,5 saat inkübe edilen numunelerde $80,3 \pm 1,4$ ADV ölçülürken, bu aşamada aynı koşullarda üretilen örneklerde ADV değerinin $30,7 \pm 1,5$ olduğu görülmüştür (Şekil 4.1 ve 4.2). Bu durum üretimin tekrarlanmasında da değişmemiştir. Farklılığın nedeni incelenirken, üretimlerin ve deneylerin yapılış şekilleri tekrar kontrol edilerek değişikliğin emülgatör ilave şeklindeki bir farklılaşmadan olduğu anlaşılmıştır. Önceki aşamada örneklerin hazırlanmasında krema ile su fazları karıştırıldıktan sonra ısıtma aşamasında ve homojenizasyonun hemen öncesinde PGPR ilave edilirken (“PGPR*” olarak kodlanmış), bu aşamadaki üretimlerde PGPR doğrudan kremaya ilave edilip ısıtılarak çözündürüldükten sonra su fazı ile karıştırılıp homojenize edilmiştir. Yapılan tekrar üretim ve analizlerinde bu farklılık tekrar ölçülmüştür ve bu farklılığın ardındaki nedenin ortaya konulması için üretilen emülsiyonlar incelenmiştir. Bu incelemede, PGPR ilavesinin farklı aşamalarda yapılmasının emülsiyon özelliklerini çok ciddi şekilde değiştirdiği görülmüştür. Üretilen emülsiyonlardan PGPR* kodlu emülsiyon daha kararlı bir yapı sergilerken, diğer emülsiyonda hızlı kremleşme ve faz ayrımının olduğu gözlemlenmiştir. Bunun üzerine, PGPR* uygulamasında krema ve su fazları biraraya geldikten sonra PGPR ilave edilip homojenize edildiğinden, yüksek su içeriğinden hareketle O/W emülsiyonunun olduğu ve yüksek ADV değerlerinin sağlandığı yorumlanmıştır. Buna karşın, PGPR doğrudan kremaya ilave edilip karıştırıldığında yüksek yağ içeriği dolayısıyla önce W/O emülsiyonunun olduğu, daha sonrasında ilave edilen su ve mekanik kuvvetlerin ise PGPR’nin yağda çözünme halini değiştiremediği, emülsiyonun O/W’ye dönüşemediği ve yüksek su içeriğine rağmen sürekli fazı yağ olan, kararsız bir W/O emülsiyonunun elde edildiği düşünülmüştür. Emülsiyonların fazlarını anlamak amacıyla, üretilen emülsiyonların elektriksel iletkenlikleri ölçülmüş ve mikroskop görüntüleri incelenmiştir. Elektriksel iletkenlik sonuçları Tablo 4.1’de, mikroskop görüntüleri ise Şekil 4.3’te verilmiştir.



Şekil 4.2. Lipoliz hızı/derecesi üzerine emülgatör türü ve konsantrasyonunun etkisi (sadece birincide gösterilen PGPR* hariç 2 grafik aynı veriyi göstermektedir).

Tablo 4.1. PGPR kullanılarak hazırlanan emülsiyonların elektriksel iletkenlikleri

	Süre (Dakika)	Elektriksel İletkenlik (µS/cm)
1. Emülsiyon (PGPR*), 0.250%	0	898
	30	951
2. Emülsiyon, (PGPR), 0.250%	0	172
	30	238



Şekil 4.3. Örneklerin mikroskop görüntüleri. Örnekler su (c,d,g,h) ve yağda (a,b,e,f) seyreltikten sonra elde edilen mikroskop görüntüleri(40X objektif lens). İlk 4 görüntü (a,b,c,d) yüksek ADV değerlerine neden olan örneklerden elde edilmiştir (1.emülsiyonlar, PGPR*). a: PGPR* (0.dk), yağ ile seyreltilmiş; b: PGPR* (30.dk), yağ ile seyreltilmiş; c: PGPR* (0.dk), su ile seyreltilmiş; d: PGPR* (30.dk), su ile seyreltilmiş; e: PGPR (0.dk), yağ ile seyreltilmiş; f: PGPR (30.dk), yağ ile seyreltilmiş; g: PGPR (0.dk), su ile seyreltilmiş; h: PGPR (30.dk), su ile seyreltilmiş.

Tablo 4.1 ve Şekil 4.3'te sunulan sonuçlar, PGPR etkisi hakkındaki hipotezi doğrular niteliktedir. 1. emülsiyonun (PGPR*) suda kolayca seyreltildiği, yağda ise çözünmediği ve ikinci emülsiyonun ise tersi davranış gösterdiği mikroskop görüntülerinden açıkça görülmektedir (Şekil 4.3). Benzer şekilde, sürekli fazı su alan PGPR*'da elektriksel iletkenlik değerleri, diğer emülsiyona kıyasla belirgin şekilde yüksek ölçülmüştür. Lipazların O/W emülsiyonlarında/sulu ortamlarda daha yüksek aktivite gösterdiği bilinmektedir (Verger, 1997) ve çalışmanın ilk aşamasında bu durum gözlemlenmiştir. Çalışmanın bu aşamasında üretilen emülsiyonun O/W emülsiyonuna dönüştürülememesi sonucu lipolitik aktivitenin gelişmemesi veya düşük kalması durumu bu bilgiyi doğrular niteliktedir.

Sonuç olarak, yüksek HLB değerine sahip emülgatör (Tween 80) kullanımı lipoliz derecesini arttırmıştır ve analizlerin devamında minimum konsantrasyonda (%0,25) Tween 80 kullanımına devam edilmesine karar verilmiştir. Ayrıca, literatürde emülsiyonlarda yüksek HLB değerine sahip sentetik emülgatörlerin kullanımının, lipoliz oranını olumlu etkilediğine dair bilgiler mevcuttur (Gomes ve diğerleri, 2018). Bir çalışmada, pankreatik lipaz ile çeşitli emülgatörler (sodyum kazeinat, peyniraltı suyu protein izolatu, lesitin ve Tween 20) kombine edilerek lipidlerin *in vitro* sindirimi gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada stabilitesi en yüksek emülsiyonlar Tween 80 ile benzer özelliklere sahip Tween 20 ile elde edilmiştir (Mun ve diğerleri, 2007). Başka bir çalışmada, emülsiyonlara diyet lifi varlığında farklı emülgatörler (sodyum kazeinat, Tween 80 ve laktoferrin) eklenerek lipidlerin *in vitro* gastrointestinal sistemdeki davranışı incelenmiştir. Sindirim sonucunda en stabil ve en küçük damlacık boyutuna sahip emülsiyonun Tween 80 kullanılan emülsiyon olduğu görülmüştür (Zhang, Zhang, Zhang, Decker ve McClements, 2015).

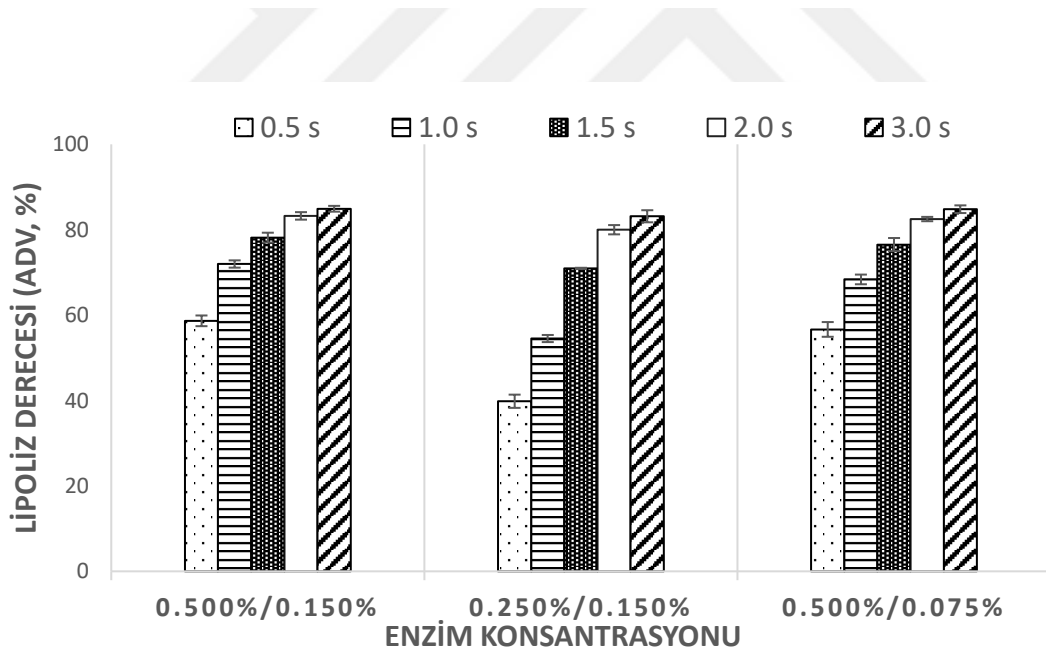
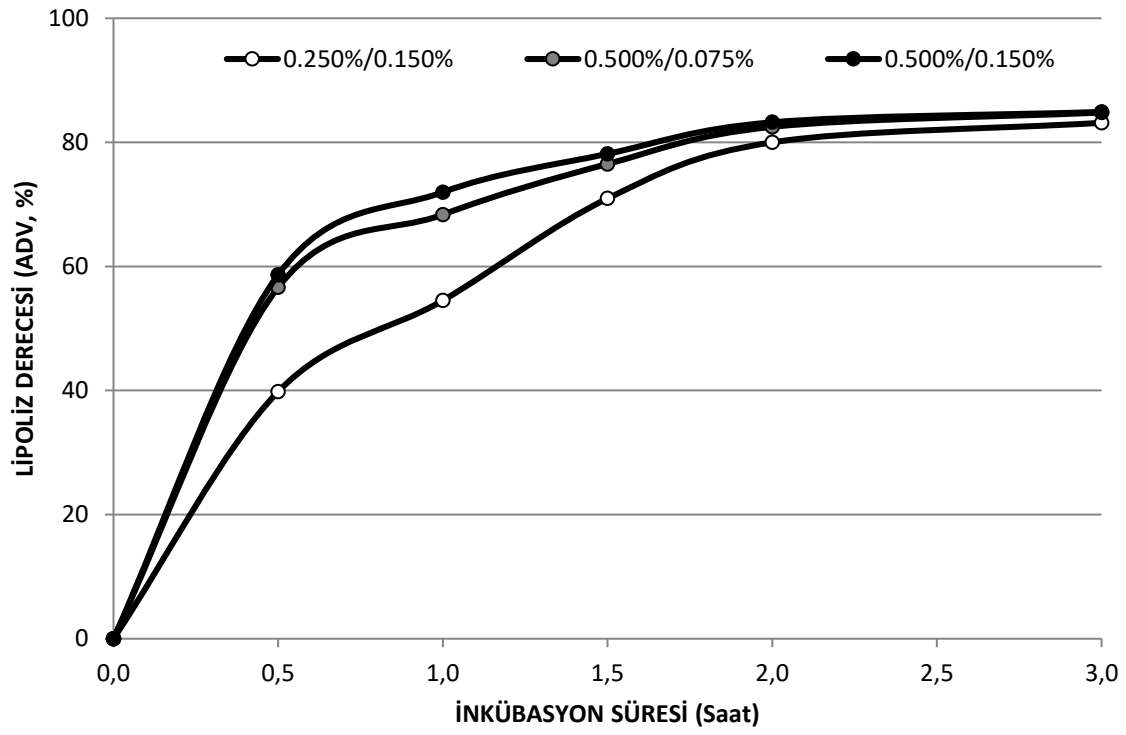
4.1.3. Enzim Konsantrasyonunun ve Fosfolipaz Kullanım Şeklinin Lipolitik Aktivite Üzerine Etkisi

Sütte, lipidler dağılmış damlacıklar halinde bulunmaktadır. Bu damlacıkların çok büyük oranı (%95-98) triağılgiserol olmakla beraber çok az miktarda mono- ve diağılgiserol de içermektedir. Bu damlacıkların membranında polar lipidler (özellikle fosfolipitler) bulunmaktadır. Süt yağının biyokatalizli reaksiyonlarında ise bu yapıları hidrolize etmek amacıyla etkinlik ve spesifliklerinden dolayı lipolitik enzimler kullanılmaktadır. Lipazlar ve fosfolipazlar, birçok süt ürünü prosesinde aktif olarak kullanılmaktadır (Cerminati, Paoletti, Aguirre, Peiru, Menzella ve Castelli, 2019). Fosfolipazlar işlevleri açısından çeşitlilik

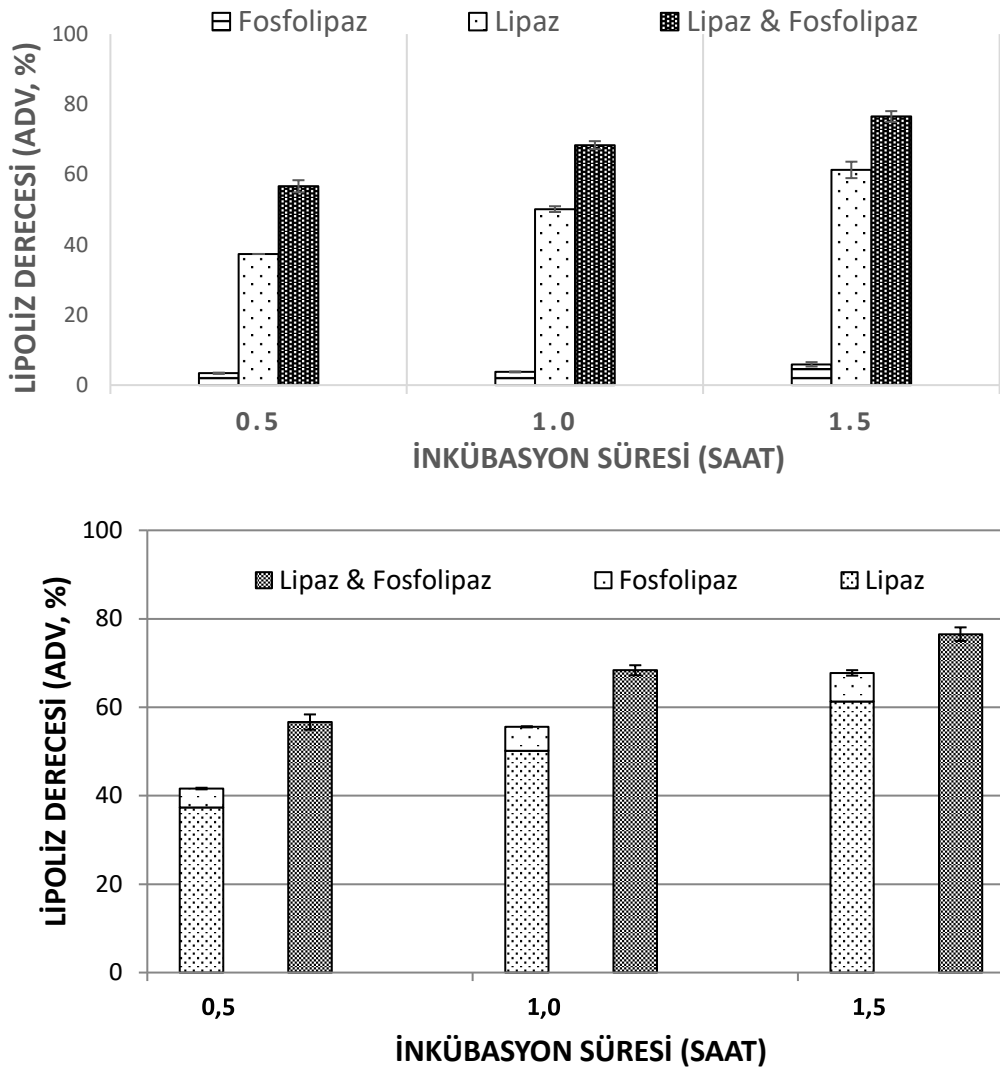
gösterirler ve 2 temel gruba (açılhidrolazlar ve fosfodiesterazlar) ayrılırlar. Fosfolipaz A1, Fosfolipaz A2 ve Fosfolipaz B açıl hidrolazlar olarak sınıflandırılırken, Fosfolipaz C ve Fosfolipaz D fosfodiesterazlar içinde yer almaktadır *Aspergillus oryzae* kaynaklı Lecitase Ultra enzimi ise Fosfolipaz A1 grubundan bir enzimdir ve hidroliz sonucunda SYA ile 2-açillizofosfolipit oluşumuna neden olurlar (Aloulou, Rahier, Arhab, Niriel ve Abousalham, 2018).

Çalışmanın önceki aşamalarında, lipazla beraber fosfolipaz (Lecitase Ultra) kullanımı ile lipoliz düzeyinin arttığı gözlemlenmiştir. Çalışmanın bu aşamasında da bu etkinin kaynağını yorumlamak amacıyla, farklı oranlarda lipaz-fosfolipaz kullanımının ADV değerleri üzerine etkisi incelenmiş ve sonrasında fosfolipazın lipolize katkısı değerlendirilmiştir. İlk olarak, O/W emülsiyonuna 3 farklı konsantrasyon kombinasyonunda lipaz-fosfolipaz (%0,50-%0,150, %0,25-%0,150 ve %0,25-%0,075, %lipaz-%fosfolipaz) ile 5 farklı sürede (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 ve 3,0 sa) inkübasyonlar gerçekleştirilmiş ve örneklerin ADV değerleri analiz edilmiştir (Şekil 4.4). Sonrasında, fosfolipazın etkisini daha net anlamak üzere ek üretimler yapılarak tek başına lipaz, tek başına fosfolipaz ve iki farklı şekilde lipaz ile fosfolipaz (eş zamanlı ve sıralı uygulama şekillerinde) uygulamaları ile üretimler yapıp, örneklerin lipoliz düzeyleri ADV analiziyle belirlenmiştir (Şekil 4.5.). Bu aşamada, daha önce açıklandığı gibi %0,25 Tween 80 kullanılarak farklı enzim konsantrasyonlarında emülsiyonlar oluşturulmuştur.

Sonuç olarak, enzim kinetiği grafiği elde edilmiştir. 120 dakika sonunda lipoliz hızı azalmış ve grafikte durağan bir nokta (plateau) elde edilmiştir. Sonuçlar, lipaz konsantrasyonundaki artışın lipoliz hızını önemli derecede arttırdığını ancak aynı durumun fosfolipaz konsantrasyonun artışıyla gerçekleşmediğini göstermiştir. Buna karşın, Bölüm 4.1.1.'deki analizler sonucunda fosfolipazın lipaz ile beraber kullanımı ile lipoliz derecesinde önemli bir artışın sağlandığı görülmüştür. Bu durumun sonuçlar arasındaki bir çelişkiyi mi, yoksa fosfolipaz konsantrasyonunda doygunluğa ulaşıldığından mı gözlemlendiğini ortaya koymak amacıyla ek üretimler ve analizler yapılmıştır.



Şekil 4.4. Artan inkübasyon süresiyle lipoliz hızı/derecesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi (aynı veri iki farklı grafikte gösterilmiştir).
(İlk yüzde değer lipaz, ikinci yüzde değer ise fosfolipaz konsantrasyonunu göstermektedir).



Şekil 4.5. Artan inkübasyon süresiyle lipoliz hızı/derecesi üzerine enzim tipinin etkisi (iki grafikte aynı veri gösterilmiştir).

Bu amaçla, tek başına lipaz (%0,50 Palatase), tek başına fosfolipaz (%0,075 Lecitase Ultra) ve bu iki enzimin kombinasyonu (%0,50 Palatase + %0,075 Lecitase Ultra) şeklinde kullanımı ile üç emülsiyon daha üretilmiş, 90 dakika inkübe edilmiş ve her 30 dakikada bir ADV değerleri analiz edilmiştir (Şekil 4.5). Analiz sonuçlarına göre, lipaz ve fosfolipazın sinerjistik etki gösterdiği ve lipoliz hızı/derecesinde artışa neden olduğu görülmektedir. Bu durumu daha net ortaya koymak üzere, lipaz ve fosfolipazın sıralı olarak eklendiği başka bir örnek daha üretilmiştir (hazırlanan emülsiyona önce lipaz eklendi, 90 dakika inkübe edildi, sonra pastörizasyonu takiben fosfolipaz eklendi ve 90 dakika daha inkübe edildi). Bu üretimin de sonuçlarını içeren veri Tablo 4.2’de gösterilmektedir. Benzer bir eğilim bu tabloda yer alan

sonuçlarda da görülmektedir. Lipaz (önce 90 dakika inkübasyon) ve fosfolipazın (ek 90 dakika daha inkübasyon) emülsiyona sıralı olarak eklenmesi ile ADV değeri %67,8'e ulaşırken, aynı konsantrasyonda aynı enzimin eş zamanlı eklenerek 90 dakikalık inkübasyonu sonucunda elde edilen ADV değeri %76,5 olmuştur.

Tablo 4.2. Lipaz ve fosfolipazın tek tek, eş zamanlı ve sıralı kullanımının lipoliz derecesi ile karşılaştırması.

İnkübasyon Süresi (dk)	ADV (%)			
	Tek Tek Ekleme Lipaz	Fosfolipaz	Eş Zamanlı Ekleme Lipaz & Fosfolipaz	Sıralı Ekleme Lipaz + Fosfolipaz
0	2,1 ± 0,5	2,1 ± 0,5	2,1 ± 0,5	2,1 ± 0,5
30	37,4 ± 0,1	3,4 ± 0,2	56,6 ± 1,7	-
60	50,1 ± 0,8	3,8 ± 0,1	68,4 ± 1,1	-
90	61,3 ± 2,3	5,9 ± 0,6	76,5 ± 1,5	-
+30	-	-	-	65,6 ± 0,7
+60	-	-	-	66,7 ± 0,3
+90	-	-	-	67,8 ± 0,5

Tablo 4.2'de ADV değerleri verilen ve 4 farklı şekilde, 3 farklı inkübasyon süresinde üretilen 12 örnek ve başlangıç örneği olan kremanın serbest yağ asidi (SYA) profilleri incelenmiştir (Tablo 4.3-4.5). ADV analizi sonuçları ile SYA analizi sonuçları birbirini desteklemektedir. Lipaz ve fosfolipazın eş zamanlı kullanımının sinerjistik etki gösterdiği SYA profilleriyle de açıkça görülmektedir. İnkübasyon işlemlerinin sonunda, en yüksek TSYA (UZUN) miktarının lipaz & fosfolipaz (eş zamanlı) kullanılan örneklerden elde edildiği belirlenmiştir ($P<0.05$). TSYA miktarının en yüksek değeri inkübasyon sonunda lipaz & fosfolipaz (eş zamanlı) kullanımı ile elde edilirken en düşük değeri fosfolipazın tek olarak kullanımı ile elde edilmiştir ($P<0.05$). Sadece fosfolipaz kullanımı ile 1,5 saatin sonunda elde edilen serbest yağ asidi miktarı, 0,5 saatin sonunda diğer 2 enzim kombinasyonu (Lipaz+Fosfolipaz ve Lipaz&Fosfolipaz) ile elde edilen miktardan çok daha düşüktür. 1.5 saatlik inkübasyon süresi sonunda hem TUSYA miktarının hem de tereyağı aromasından sorumlu olduğu bildirilen bütirik asit miktarının en yüksek olduğu değerin lipaz ve fosfolipaz (eş zamanlı) kombinasyonu ile elde edildiği görülmektedir. Tek başına fosfolipaz kullanımı ile tüm sürelerde en düşük miktarda SYA miktarı elde edilmiş (Tablo 4.3 ve 4.4) ve salınan SYA'lardaki kısa zincirli oranları açısından diğer 3 enzim/enzim kombinasyonu ile kıyaslandığında en düşük oran hesaplanmıştır (Tablo 4.5). Ayrıca, Tablo 4.5'de lipaz ve

fosfolipazın eş zamanlı, sıralı ve tek başına lipaz kullanımı sonucu salınan TUSYA oranı birbiri içinde benzerlik gösterirken, tek başına fosfolipaz kullanımında bu oran belirgin şekilde düşüktür. Çalışma sonuçlarından hareketle, lipaz ve fosfolipazın beraber kullanılması sonucu genel olarak lipoliz düzeyinin yükseldiği görülmektedir. Fosfolipitlerin yağ damlacıklarının membranında bulunmasının, lipazın trigliserit yapılarına erişimini engellediğine dair literatürde yaklaşımlar vardır (Bourlieu, Rousseau, Briard-Bion, Madec ve Bouhallab, 2012). Lipaz ve fosfolipazın birlikte kullanımıyla, fosfolipitlerin fosfolipaz aktivitesiyle parçalanmasının, fosfolipitlerin damlacık membranından uzaklaşmasının ve tüm bunların sonucunda lipazın trigliseritlere fiziksel temasının olanaklı hale gelmiş olabileceği düşünülmektedir. Ancak, literatürde fosfolipit varlığının lipolize etkisi veya lipolizde fosfolipaz kullanımı ile ilgili çalışmalar oldukça kısıtlı ve elde edilen sonuçlar çelişkilidir.

Yapılan bir çalışmada, susuz süt yağına farklı düzeylerde enzim aktivitesine (yüksek, orta, düşük) sahip fosfolipaz eklenerek ön hidroliz gerçekleştirilmiş ve sonrasında farklı özgülüğe sahip lipazlarla lipoliz desteklenmiştir. Fosfolipaz aktivitesinin yüksek olduğu örnekte ilk aşamada gecikme süresi (lag time) kısalmış ve daha kısa sürede daha yüksek lipoliz düzeyleri elde edilmiştir (Bourlieu ve diğerleri, 2012). Birkaç çalışmada da benzer şekilde fosfolipit varlığının çeşitli etkilerle lipolizi olumsuz etkilediği belirtilmiştir (Mun ve diğerleri, 2007; Ruiz-Henestrosa ve diğerleri, 2022). Ancak, Golding ve Wooster (2010) *in vitro* lipoliz ile ilgili derlemede, lipoliz yoluyla oluşan yağ asitleri ve monogliseritlerin yüzey aktif özellikleriyle arayüzeyde birikerek lipazları arayüzeyden uzaklaştırdığı, lipolizi kısmen engellediği belirtilmiştir. Bu koşullarda ortamda bulunan fosfolipitlerin ise, bu biriken hidroliz ürünlerinin arayüzeyden uzaklaştırılıp sulu ortamda çözünmelerini sağlayarak lipolizi arttırdığı açıklaması yapılmıştır. Gıda alanı dışında lipaz ve fosfolipazın eş zamanlı kullanımı ile ilgili çalışmalar incelendiğinde, biyodizel üretimi için yağda bulunan fosfolipitlerin, substrat ve enzimin aktif bölgesi arasındaki etkileşimi etkileyerek inhibitör madde olarak bulunduğu belirtilmiştir. Bir çalışmada enzimatik yolla biyodizel üretimi için, düşük maliyet ve yüksek reaksiyon hızından dolayı lipaz tercih edildiği ancak üretimde kullanılan bitkisel yağın fosfolipit içeriği biyodizel üretimi için gereken standarttan daha yüksek olduğundan fosfolipitler uzaklaştırılmak istenmiştir. Bu amaçla, lipaz ve fosfolipaz eş zamanlı kullanılmıştır. Fosfolipaz olarak fosfolipitlerin *sn*-1 ester bağını hidrolize ederek lizofosfolipitleri ve SYA'ları oluşturan Lecitase Ultra kullanılmıştır. Sonuçta, fosfolipitlerin uzaklaşması sonucu üretim verimi artmıştır (Li, Du ve Liu, 2015).

Tablo 4.3. Krema ve Lipaz-Fosfolipaz örneklerinin Uçucu Serbest Yağ Asidi Bileşimi ve Miktarları (mg/100g yağ) (Ortalamalar $\pm$ STD)

Örnek*	İnkübasyon Süresi (sa)	Bütirik Asit ($C_{4:0}$)	Kaproik Asit ($C_{6:0}$)	Kaprilik Asit ($C_{8:0}$)	Kaprik Asit ($C_{10:0}$)	TUSYA ¹	TSYA ²
1	-	2,6 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,1	4,9 $\pm$ 0,2	9,5 $\pm$ 0,6	573,2 $\pm$ 15,8
2	0,5	18,4 $\pm$ 0,5 ^{A,b}	16,6 $\pm$ 0,6 ^{A,b}	10,8 $\pm$ 0,9 ^{A,b}	23,9 $\pm$ 0,7 ^{A,b}	69,7 $\pm$ 1,5 ^{A,b}	1452,1 $\pm$ 50,8 ^{A,b}
	1,0	53,9 $\pm$ 3,7 ^{B,b}	38,5 $\pm$ 2,8 ^{B,b}	22,7 $\pm$ 1,9 ^{B,b}	44,5 $\pm$ 3,8 ^{B,b}	159,7 $\pm$ 1,6 ^{B,b}	3090,1 $\pm$ 39,9 ^{B,b}
	1,5	71,9 $\pm$ 5,3 ^{C,b}	53,3 $\pm$ 4,1 ^{C,b}	35,6 $\pm$ 1,5 ^{C,b}	61,3 $\pm$ 2,4 ^{C,b}	222 $\pm$ 6,1 ^{C,b}	4071,2 $\pm$ 139,5 ^{C,b}
3	0,5	3,8 $\pm$ 0,4 ^{A,a}	1,6 $\pm$ 0,1 ^{A,a}	1,1 $\pm$ 0,2 ^{A,a}	4,7 $\pm$ 0,3 ^{A,a}	11,1 $\pm$ 0,6 ^{A,a}	685,9 $\pm$ 42,2 ^{A,a}
	1,0	5,9 $\pm$ 0,5 ^{B,a}	2,0 $\pm$ 0,1 ^{A,a}	1,7 $\pm$ 0,3 ^{A,a}	8,2 $\pm$ 0,0 ^{B,a}	17,8 $\pm$ 0,7 ^{B,a}	790,5 $\pm$ 26,1 ^{A,a}
	1,5	10,2 $\pm$ 1,0 ^{C,a}	7,6 $\pm$ 0,6 ^{B,a}	6,0 $\pm$ 0,4 ^{B,a}	15,4 $\pm$ 1,8 ^{C,a}	39,3 $\pm$ 3,0 ^{C,a}	1582,1 $\pm$ 78,8 ^{B,a}
4	0,5	50,1 $\pm$ 2,4 ^{A,c}	39,3 $\pm$ 0,4 ^{A,c}	33,2 $\pm$ 3,5 ^{A,c}	69,9 $\pm$ 8,6 ^{A,c}	192,4 $\pm$ 15 ^{A,c}	4802,3 $\pm$ 68,1 ^{A,c}
	1,0	96,3 $\pm$ 0,7 ^{B,d}	69,0 $\pm$ 2,9 ^{B,d}	55,0 $\pm$ 1,5 ^{B,d}	94,1 $\pm$ 5,7 ^{AB,c}	314,3 $\pm$ 2,0 ^{B,d}	6120,0 $\pm$ 140,8 ^{B,d}
	1,5	112,6 $\pm$ 9,3 ^{B,c}	74,2 $\pm$ 1,9 ^{C,d}	62,7 $\pm$ 5,2 ^{B,d}	115,8 $\pm$ 12,7 ^{B,d}	365,3 $\pm$ 20,5 ^{C,d}	6991,5 $\pm$ 83,7 ^{C,d}
5	0,5	66,1 $\pm$ 4,5 ^{A,d}	56,5 $\pm$ 2,1 ^{A,d}	44,1 $\pm$ 2,4 ^{A,d}	82,7 $\pm$ 5,7 ^{A,d}	249,5 $\pm$ 8,8 ^{A,d}	4689,0 $\pm$ 107,8 ^{A,c}
	1,0	73,2 $\pm$ 5,7 ^{AB,c}	57,9 $\pm$ 2,1 ^{A,c}	48,1 $\pm$ 1,9 ^{B,c}	90,0 $\pm$ 2,2 ^{A,c}	269,2 $\pm$ 10,7 ^{B,c}	5154,5 $\pm$ 21 ^{B,c}
	1,5	80,6 $\pm$ 1,8 ^{B,b}	59,2 $\pm$ 2,6 ^{A,c}	49,2 $\pm$ 0,6 ^{B,c}	90,0 $\pm$ 2,4 ^{A,c}	279,0 $\pm$ 4,1 ^{B,c}	5378,5 $\pm$ 101,5 ^{C,c}

*(1) Krema; (2) Lipaz; (3) Fosfolipaz; (4) Lipaz & Fosfolipaz (eş zamanlı ekleme); (5) Lipaz + Fosfolipaz (sıralı ekleme).

TUSYA¹: Toplam Uçucu Serbest Yağ Asidi

TSYA²: Toplam Serbest Yağ Asidi

A-C: Bir enzim içinde farklı üst indislere sahip numunelerin önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir ($P < 0,05$). (Zaman etkisi)

a-d: Bir inkübasyon süresi içinde farklı üst indislere sahip numunelerin önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir ($P < 0,05$). (Enzim etkisi)

Tablo 4.4. Krema ve lipaz-fosfolipaz örneklerinin Uzun Zincirli Serbest Yağ Asidi Bileşimi ve Miktarları (mg/100g yağ) (Ortamalar $\pm$ STD).

Örnek*	İnkübasyon Süresi (sa)	Laurik Asit (C _{12:0})	Miristik Asit (C _{14:0})	Palmitik Asit (C _{16:0})	Stearik Asit (C _{18:0})	Oleik Asit (C _{18:1})	Linoleik Asit (C _{18:2})	Linolenik Asit (C _{18:3})	TSYA (UZUN) ¹
1	-	15,2 $\pm$ 0,7	51,6 $\pm$ 1,6	223,5 $\pm$ 1,7	64,1 $\pm$ 1,3	200,9 $\pm$ 11,2	7,7 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,1	563,6 $\pm$ 15,3
2	0,5	35,1 $\pm$ 3,8 ^{A,b}	159,4 $\pm$ 3,8 ^{A,b}	591,3 $\pm$ 29,0 ^{A,b}	163,7 $\pm$ 5,7 ^{A,b}	411,0 $\pm$ 19,2 ^{A,b}	14,3 $\pm$ 0,7 ^{A,b}	7,7 $\pm$ 0,6 ^{A,b}	1382,4 $\pm$ 52,3 ^{A,b}
	1,0	77,8 $\pm$ 4,5 ^{B,b}	398,1 $\pm$ 21,0 ^{B,b}	1201,5 $\pm$ 40,3 ^{B,b}	353,3 $\pm$ 13,5 ^{B,b}	860,9 $\pm$ 16,1 ^{B,b}	26,9 $\pm$ 2,8 ^{B,b}	12,1 $\pm$ 0,3 ^{B,b}	2930,5 $\pm$ 39,7 ^{B,b}
	1,5	108,4 $\pm$ 5,8 ^{C,b}	525,0 $\pm$ 8,8 ^{C,b}	1581,5 $\pm$ 91,9 ^{C,b}	482,5 $\pm$ 37,0 ^{C,b}	1093,4 $\pm$ 24,6 ^{C,b}	41,0 $\pm$ 4,2 ^{C,b}	17,4 $\pm$ 0,9 ^{C,b}	3849,2 $\pm$ 143,5 ^{C,b}
3	0,5	15,6 $\pm$ 1,4 ^{A,a}	60,6 $\pm$ 4,0 ^{A,a}	269,7 $\pm$ 25,3 ^{A,a}	67,8 $\pm$ 1,6 ^{A,a}	250,2 $\pm$ 17,5 ^{A,a}	7,9 $\pm$ 0,7 ^{A,a}	2,9 $\pm$ 0,4 ^{A,a}	674,7 $\pm$ 41,6 ^{A,a}
	1,0	19,1 $\pm$ 0,2 ^{B,a}	74,8 $\pm$ 2,8 ^{B,a}	307,2 $\pm$ 33,1 ^{A,a}	60,6 $\pm$ 3,2 ^{A,a}	296,2 $\pm$ 12,7 ^{A,a}	9,1 $\pm$ 1,0 ^{A,a}	5,7 $\pm$ 0,4 ^{B,a}	772,7 $\pm$ 26,8 ^{A,a}
	1,5	29,3 $\pm$ 1,0 ^{C,a}	200,5 $\pm$ 7,1 ^{C,a}	608,7 $\pm$ 58,5 ^{B,a}	148,2 $\pm$ 8,9 ^{B,a}	527,3 $\pm$ 27,4 ^{B,a}	17,4 $\pm$ 0,1 ^{B,a}	11,3 $\pm$ 0,7 ^{C,a}	1542,8 $\pm$ 80,9 ^{B,a}
4	0,5	139,0 $\pm$ 2,9 ^{A,c}	601,8 $\pm$ 42,8 ^{A,c}	2019 $\pm$ 13,4 ^{A,d}	557,1 $\pm$ 15,1 ^{A,c}	1218,7 $\pm$ 7,2 ^{A,c}	52,9 $\pm$ 4,4 ^{A,c}	21,5 $\pm$ 0,2 ^{A,c}	4609,9 $\pm$ 53,1 ^{A,d}
	1,0	161,4 $\pm$ 18,4 ^{AB,c}	963,9 $\pm$ 21,2 ^{B,d}	2449,3 $\pm$ 101,4 ^{B,d}	680,3 $\pm$ 4,6 ^{B,d}	1459,6 $\pm$ 81,7 ^{B,d}	63,3 $\pm$ 2,6 ^{B,c}	28,0 $\pm$ 1,1 ^{B,d}	5805,7 $\pm$ 142,7 ^{B,d}
	1,5	181,3 $\pm$ 15 ^{B,d}	1058,8 $\pm$ 63,9 ^{B,d}	2741,1 $\pm$ 133,1 ^{C,d}	830,3 $\pm$ 25,9 ^{C,d}	1713,6 $\pm$ 77,7 ^{C,d}	70,4 $\pm$ 3,0 ^{B,d}	30,9 $\pm$ 1,4 ^{B,d}	6626,2 $\pm$ 101,2 ^{C,d}
5	0,5	143,1 $\pm$ 5,0 ^{A,c}	665,5 $\pm$ 41,1 ^{A,d}	1867,4 $\pm$ 69,7 ^{A,c}	526,0 $\pm$ 36,5 ^{A,c}	1166,1 $\pm$ 46,8 ^{A,c}	49,8 $\pm$ 4,0 ^{A,c}	21,7 $\pm$ 1,8 ^{A,c}	4439,6 $\pm$ 111,6 ^{A,c}
	1,0	152,1 $\pm$ 6,0 ^{A,c}	682,7 $\pm$ 48,5 ^{AB,c}	2042,2 $\pm$ 28,5 ^{B,c}	603,4 $\pm$ 11,7 ^{B,c}	1321,0 $\pm$ 14,5 ^{B,c}	59,9 $\pm$ 2,2 ^{B,c}	24,0 $\pm$ 1,0 ^{A,c}	4885,3 $\pm$ 20,0 ^{B,c}
	1,5	152,4 $\pm$ 4,9 ^{A,c}	757,3 $\pm$ 38,8 ^{B,c}	2099,9 $\pm$ 47,7 ^{B,c}	618,8 $\pm$ 10,6 ^{B,c}	1384,9 $\pm$ 20,9 ^{C,c}	62,1 $\pm$ 0,9 ^{B,c}	24,0 $\pm$ 1,1 ^{A,c}	5099,5 $\pm$ 100,0 ^{C,c}

*(1) Krema; (2) Lipaz; (3) Fosfolipaz; (4) Lipaz & Fosfolipaz (eş zamanlı ekleme); (5) Lipaz + Fosfolipaz (sıralı ekleme).

TSYA (UZUN)¹: Toplam Uzun Zincirli Serbest Yağ Asidi

A-C: Bir enzim içinde farklı üst indislere sahip numunelerin önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir (P < 0,05). (Zaman etkisi)

a-d: Bir inkübasyon süresi içinde farklı üst indislere sahip numunelerin önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir (P < 0,05). (Enzim etkisi)

Tablo 4.5. Analiz Edilen Krema ve Lipaz-Fosfolipaz örneklerinin SYA Dağılımı (%).

SYA ¹	Lipaz			Fosfolipaz			Lipaz & Fosfolipaz			Lipaz + Fosfolipaz			Krema
	0,5 s	1,0 s	1,5 s	0,5 s	1,0 s	1,5 s	0,5 s	1,0 s	1,5 s	0,5 s	1,0 s	1,5 s	-
C _{4:0}	1,3	1,7	1,8	0,5	0,7	0,6	1,0	1,6	1,6	1,4	1,4	1,5	0,5
C _{6:0}	1,1	1,2	1,3	0,2	0,3	0,5	0,8	1,1	1,1	1,2	1,1	1,1	0,2
C _{8:0}	0,7	0,7	0,9	0,2	0,2	0,4	0,7	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,1
C _{10:0}	1,6	1,4	1,5	0,7	1,0	1,0	1,5	1,5	1,7	1,8	1,7	1,7	0,9
C _{12:0}	2,4	2,5	2,7	2,3	2,4	1,9	2,9	2,6	2,6	3,1	3,0	2,8	2,6
C _{14:0}	11,0	12,9	12,9	8,8	9,5	12,7	12,5	15,7	15,1	14,2	13,2	14,1	9,0
C _{16:0}	40,7	38,9	38,8	39,3	38,9	38,5	42,0	40,0	39,2	39,8	39,6	39,0	39,0
C _{18:0}	11,3	11,4	11,9	9,9	7,7	9,4	11,6	11,1	11,9	11,2	11,7	11,5	11,2
C _{18:1}	28,3	27,9	26,9	36,5	37,5	33,3	25,4	23,8	24,5	24,9	25,6	25,7	35,1
C _{18:2}	1,0	0,9	1,0	1,2	1,2	1,1	1,1	1,0	1,0	1,1	1,2	1,2	1,4
C _{18:3}	0,5	0,4	0,4	0,4	0,7	0,7	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5	0,4	0,1
TUSYA ²	4,8	5,2	5,5	1,6	2,3	2,5	4,0	5,1	5,2	5,3	5,2	5,2	1,7
TSYA (UZUN) ³	95,2	94,8	94,5	98,4	97,7	97,5	96,0	94,9	94,8	94,7	94,8	94,8	98,3
TSYA ⁴	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

¹ SYA: Serbest Yağ Asidi² TUSYA: Toplam Uçucu Serbest Yağ Asidi (C_{4:0}-C_{10:0}).³ TSYA (UZUN): Toplam Uzun Zincirli Serbest Yağ Asidi (C_{12:0}-C_{18:3}).⁴ TSYA: Toplam Serbest Yağ Asidi

Steinke ve diğerkleri (2022) ise lipaz ve fosfolipazı eş zamanlı kullanarak SYA ve fosfolipit içeriğı düşük biyodizel üretimini hedeflemiş ve benzer şekilde olumlu sonuçlar elde etmiştir. Ancak süt yağı lipolizinde, lipaz ve fosfolipazın eş zamanlı kullanımının sinerjistik etki gösterdiğine dair çalışmaya rastlanmamıştır.

4.1.4. Emülsiyon Yağ İçeriğinin Lipolitik Aktivite Üzerine Etkisi

Emülsiyonlar, birbirine karışmayan sıvıların çeşitli mekanik etkiler yardımıyla birbiri içinde karışmasını sağlayarak üretilen sistemlerdir. Temelde 2 tip emülsiyon (O/W ve W/O) vardır (Chung ve diğerkleri, 2016). Çalışmada ortaya konulduğu üzere, lipazlar için uygun çalışma ortamı O/W tipi emülsiyonlardır ve emülsiyonlarda su fazında bulunan yağ damlacıklarının boyutu ve dağılımı, viskozitesi ile türbiditesi emülsiyon stabilitesi hakkında fikir vermektedir (Salum, Güven, Aydemir ve Erbay, 2022). Lipazlar emülsiyon sistemlerinde maksimum aktivite gösterdikleri için emülsiyon ortamının bozulmaması, stabil kalması son derece önemlidir. Bu amaçla, tez çalışmasının bu aşamasında emülsiyon yağ içeriğinin, emülsiyon özellikleri (emülsiyon stabilitesi, damlacık boyutu dağılımı, türbiditesi ve viskozitesi) ve lipolitik aktivite üzerine etkisini incelemek amacıyla farklı yağ oranlarına (%10, %25 ve %40) ve emülgatör konsantrasyonuna (%0,25 ve %1) sahip 6 farklı emülsiyon oluşturulmuştur. Bu emülsiyonlar aynı enzim konsantrasyonlarında (%0,25 lipaz ve %0,075 fosfolipaz) inkübe edilmiştir. Ardından, farklı sürelerde (0, 30, 60, 120 ve 240.dk) örnek alınarak ADV analizi yapılmıştır. Ayrıca, emülsiyon özellikleri hakkında fikir vermesi için emülsiyon viskoziteleri ölçülmüş, türbidite analizi yapılmış ve damlacık boyutu dağılımları belirlenmiştir (Tablo 4.6).

Emülsiyonların damlacık boyutu dağılımı farklı boyutlardaki parçacıkların birarada bulunmasını ifade etmektedir. Bir emülsiyonun başlangıçtaki damlacık boyut dağılımı, homojenizasyon koşulları (yöntem, cihaz, işlem koşulları vb.) ya da emülsiyon bileşimi (emülgatör, yağ/su oranı vb.) ile ayarlanabilmektedir. Damlacık boyutu genel olarak homojenizasyon işleminin şiddeti ile süresi ve emülgatör konsantrasyonunun artışı ile küçülürken, yağ/su fazının viskoziteleri ile damlacık boyutunun kararlılığı desteklenebilmektedir. Ancak, bu genelleştirme belirli noktaya kadar geçerli olmakta, aşırı mekanik etkiler ve/veya çok yüksek emülgatör konsantrasyonları emülsiyon damlacık boyutunda olumsuz değişimlere de neden olabilmektedir (Chung ve diğerkleri, 2016). Emülsiyonlardaki damlacık boyut dağılımı sonuçları, emülsiyonların fiziksel özelliklerine (stabilite, viskozite, türbidite vb.) dair önemli ipuçları sunmaktadır (Salum ve diğerkleri, 2022).

Tablo 4.6. Analiz edilen emülsiyonların ADV değerleri, damlacık boyutu dağılımı, türbidite ve viskozite ölçümleri.

Yağ (%)	İçeriği	Emülgatör Konsantrasyonu (%)	İnkübasyon Süresi (dk)	ADV (%)	Damlacık Boyutu			Türbidite	Viskozite (cP) (200 rpm)
					Dx (90), µm	D [4.3], µm	Uniformity		
10	0,25		0	-	21,8	11,0	0,61	138,0	1,04 ± 0,02 ^{A,a}
			30	23,7 ± 0,9 ^{A,a}	-	-	-	126,0	-
			60	29,2 ± 1,8 ^{B,a}	26,9	14,0	0,55	115,0	1,09 ± 0,03 ^{A,a}
			120	49,1 ± 0,9 ^{C,a}	-	-	-	71,0	-
			240	50,3 ± 0,2 ^{C,a}	107,0	51,6	0,69	39,6	1,09 ± 0,03 ^{A,a}
	1,00		0	-	20,2	9,62	0,72	160,0	1,10 ± 0,01 ^{A,a}
			30	10,8 ± 0,7 ^{A,a}	-	-	-	171,0	-
			60	16,9 ± 0,6 ^{B,a}	24,7	12,9	0,56	144,0	1,18 ± 0,03 ^{B,a}
			120	38,2 ± 0,0 ^{C,a}	-	-	-	141,0	-
			240	53,8 ± 1,7 ^{D,a}	54,0	26,2	0,67	93,0	1,20 ± 0,02 ^{B,a}
25	0,25		0	-	22,5	12,2	0,51	303,0	1,92 ± 0,0 ^{A,b}
			30	39,2 ± 0,6 ^{A,c}	-	-	-	276,0	-
			60	53,0 ± 0,1 ^{B,c}	35,0	20,2	0,45	231,0	2,43 ± 0,0 ^{B,b}
			120	72,6 ± 0,4 ^{C,b}	-	-	-	82,0	-
			240	75,2 ± 2,8 ^{C,b}	182,0	85,9	0,78	45,2	2,99 ± 0,16 ^{C,b}
	1,00		0	-	24,9	13,2	0,54	338,0	1,97 ± 0,02 ^{A,b}
			30	43,3 ± 0,9 ^{A,b}	-	-	-	279,0	-
			60	55,5 ± 1,2 ^{B,b}	39,5	20,6	0,57	253,0	2,59 ± 0,02 ^{C,b}
			120	73,1 ± 1,5 ^{C,b}	-	-	-	195,0	-
			240	77,3 ± 0,4 ^{D,b}	116,0	60,1	0,59	79,0	2,10 ± 0,06 ^{B,b}
40	0,25		0	-	26,3	15,6	0,41	417,0	5,21 ± 0,12 ^{A,c}
			30	27,6 ± 0,2 ^{A,b}	-	-	-	351,0	-
			60	43,6 ± 0,4 ^{B,b}	34,8	20,7	0,42	311,0	7,92 ± 0,04 ^{C,c}
			120	75,5 ± 7,2 ^{C,b}	-	-	-	130,0	-
			240	80,5 ± 1,3 ^{C,b}	360,0	163,0	0,81	54,0	7,14 ± 0,36 ^{B,c}
	1,00		0	-	23,6	13,4	0,47	471,0	4,95 ± 0,04 ^{A,c}
			30	40,5 ± 1,9 ^{A,b}	-	-	-	386,0	-
			60	63,4 ± 3,0 ^{B,c}	35,3	19,5	0,50	332,0	7,84 ± 0,04 ^{C,c}
			120	80,2 ± 1,5 ^{C,c}	-	-	-	136,0	-
			240	82,4 ± 0,7 ^{C,c}	182,0	92,4	0,66	78,0	7,04 ± 0,34 ^{B,c}

A-D: Bir yağ içeriği ve emülgatör konsantrasyonu içinde farklı üst indislerle sahip numunelerin önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir (P < 0.05). (Zaman etkisi)

a-c: Bir inkübasyon süresi ve bir emülgatör konsantrasyonu içinde farklı üst indislerle sahip numunelerin önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir (P < 0.05). (Tek bir inkübasyon süresindeki değişen yağ oranının etkisi)

Emülsiyonların damlacık boyutu ölçüm sonuçları çeşitli parametrelerle ortaya konulmaktadır ve bu parametrelerin ne anlama geldiği Tablo 3.1’de açıklanmıştır. Bu tez çalışmasında, damlacık boyut dağılımı verileri değerlendirmek üzere D(90), D[4,3] ve uniformity parametrelerinden yararlanılmıştır. Bu parametrelerin minimum değeri, emülsiyonların kararlı ve homojen olduğunu ifade etmektedir. Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlara göre, emülgatör konsantrasyonunun azalmasının, inkübasyon süresinin artışının ve yağ oranının artışının aynı etkilere neden olduğu ve emülsiyonların damlacık boyutunun tüm koşullarda (D[4,3], Dx (90) (μm)) belirgin bir şekilde büyüdüğü görülmektedir (Tablo 4.6).

Üretilen örneklerin viskoziteleri de ölçülmüş ve Tablo 4.6’da sunulmuştur. Sonuçta, yağ konsantrasyonunun artışıyla ve %10 yağlı emülsiyon hariç diğer iki emülsiyonda 60.dakika itibariyle viskozitede belirgin bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$). Aynı zamanda, 60. dakikadaki viskozite artışıyla birlikte örneklerde damlacık boyutu da artış göstermiştir. Viskozitedeki bu artışın nedeni, inkübasyon süresinin artışıyla emülsiyon ortamının stabilitesi olumsuz etkilendiği için damlacık boyutunun artmasıyla ilişkili olabilir ve artan yağ damlacık boyutunun viskoziteyi arttırdığı düşünülebilir. Yağ konsantrasyon artışına bağlı viskozitedeki artışın nedeni ise açıktır. Bir emülsiyonda yağ damlacıklarının azalmasıyla emülsiyon viskozitesinin azaldığı bilinmektedir (Chung ve diğerleri, 2016). Üretilen 6 emülsiyon örneğinin türbiditesi 5 farklı sürede (0, 30, 60, 120 ve 240.dk) ölçülmüştür. İnkübasyon süresinin artışı ve emülgatör konsantrasyonunun azalışı ile türbidite azalmıştır. Her iki konsantrasyonda emülgatör (%0,25 ve %1,0) varlığında emülsiyon yağ oranı artışı türbiditeyi arttırmıştır.

Emülsiyon özellikleri hakkında literatürdeki bir çalışmada, farklı yağ oranlarına sahip emülsiyonlar üretilerek emülsiyon yağ oranının artışıyla viskozite, türbidite ve damlacık boyutu değerlerinin arttığı saptanmıştır (Salum ve diğerleri, 2022). Emülsiyon özelliklerinin lipolize etkisi ile ilgili literatürdeki çalışmalar incelendiğinde ise lipazlarla ilgili yapılan bir *in vitro* çalışmada, emülsiyon damlacık boyutu ile lipolitik aktivite arasında negatif korelasyon olduğu saptanmıştır (Golding ve Wooster, 2010). Damlacık boyutu küçüldükçe damlacık yüzey alanı artacağından lipolitik aktivitenin de artması beklenmektedir. Çünkü artan yüzey alanı yağ damlacıklarına enzim temasını arttırmaktadır (Golding ve Wooster, 2010; Liu, Holland ve Crow, 2021). Ancak, tez çalışmasında yukarıda belirtilen türde bir ilişki doğrudan saptanmamıştır (Tablo 4.6). ADV değeri üzerinde emülsiyondaki yağ oranının belirleyici

olduğu görülmektedir. Çünkü yağ oranının (substratın) az olması emülsiyonların lipolitik aktivitesini sınırlayan bir faktördür. Bu sonuca sebep olduğu düşünülen bir diğer neden ise emülgatör etkisi olabilir, bu etki bir sonraki paragrafta açıklanmaktadır.

Üretilen örneklerin ADV değerlerindeki değişim Tablo 4.6'da verilmiştir. Emülsiyonun inkübasyon süresi ve yağ oranının artışıyla daha yüksek ADV değeri elde edilirken emülgatör konsantrasyonundaki artış asitlik derecesi değeri (ADV) üzerine düşük etki göstermiştir. Özellikle %25 ve %40 yağlı emülsiyonlarda emülgatör konsantrasyonunun etkisi belirgin şekilde düşüktür. Sonuçta, düşük konsantrasyonda kullanılan emülgatör miktarının lipoliz ortamı için yeterli olduğu ve emülgatör konsantrasyonunda doygunluğa ulaşıldığı görülmüştür. %10 yağlı emülsiyonlarda ise artan emülgatör konsantrasyonuna rağmen ADV değerlerinin oldukça düşük olduğu ve aynı zamanda ADV değerlerinin (240.dakika hariç) emülgatör konsantrasyonu artışı ile ters ilişkili olduğu görülmektedir. Bu durumun nedeni, emülgatörün yağ globüllerinin etrafını (arayüzeyi) kaplayarak lipolizi engellemesi ile açıklanabilir. Çünkü, emülsiyon ortamında diğer iki emülsiyon ortamındaki kadar yüksek oranda yağ bulunmuyor ve emülgatörün, zaten az miktarda olan yağ damlacıklarının etrafını sararak lipolize engel olması kaçınılmaz oluyor. Literatürde de bu etkiyi kanıtlayan çalışmalar mevcuttur (Mun ve diğerleri, 2007). Literatürde yağ oranının lipoliz düzeyi üzerine etkisine dair çalışmalar da bulunmaktadır. Lipazlar ile farklı yağ oranlarına sahip substratların kullanıldığı bir çalışmada, çeşitli lipazlarla iki farklı substrat (%99 yağlı tereyağı ve %35 yağlı krema) kullanılarak lipoliz gerçekleştirilmiş ve %35 yağlı kremanın kullanıldığı örneklerde tüm lipazlar en yüksek aktivite göstermiştir (Tomasini ve diğerleri, 1993).

Tez çalışmasının bu aşamasında üretilen 6 farklı emülsiyonun analiz sonuçları doğrultusunda 4 saatlik inkübasyon süresi boyunca en küçük damlacık boyutu, en düşük türbidite ve en düşük viskozite değerleri %10 yağlı emülsiyonla (O/W) elde edilmesine rağmen en düşük lipolitik aktivite bu yağ oranında belirlenmiştir. Bu durum ise emülsiyondaki yağ oranının diğer iki emülsiyona (%25 ve %40 yağlı) kıyasla daha düşük olmasına ve emülgatör etkisine atfedilmiştir. Dolayısıyla, maksimum lipolitik aktivite hedeflendiğinden bu koşul uygun bulunmamıştır. Aynı hedef doğrultusunda %25 yağlı emülsiyon da seçilmemiştir. Çünkü en yüksek lipolitik aktivite %40 yağlı emülsiyonla elde edilmiştir. Sonuçta, EMT üretimi için %40 yağlı emülsiyon tercih edilmiştir. Emülgatör konsantrasyonu seçiminde ise yüksek konsantrasyonda emülgatör kullanımının lezzet üzerinde olumsuz etkiye neden olması ve

lipoliz düzeyi üzerine belirgin olumlu etki göstermediğinden %0,25 emülgatör konsantrasyonu tercih edilmiştir.

Lipolitik aktivite üzerine etki eden faktörler üzerine Aşama 1'den elde edilen analiz sonuçlarından hareketle genel bir değerlendirme yapıldığında;

- Lipolizin O/W (su içinde yağ) emülsiyonlarında arttığı gözlenmiştir.
- Emülgatör konsantrasyonundaki artış ile stabil hale gelen O/W emülsiyonlarında lipoliz düzeyinde artış meydana gelmiştir. Ancak, yeterli emülgatör ilave edildikten sonra fazla emülgatörün lipoliz düzeyini olumlu etkilemediği, hatta düşük yağ oranına sahip emülsiyonlarda lipolizi engellediği görülmüştür.
- Lipaz ve fosfolipazın eş zamanlı kullanımı daha yüksek lipoliz düzeyleri ile sonuçlanmıştır.
- Lipaz konsantrasyonu ve lipoliz düzeyi/hızı arasında pozitif yönlü bir ilişki bulunmaktadır. Ayrıca, fosfolipaz varlığının lipaz aktivitesini desteklediği analiz sonuçlarında açıkça görülmektedir. Ancak, fosfolipaz konsantrasyonunun arttırılması ile lipoliz düzeyinde anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir.
- Lipoliz düzeyinin, emülsiyondaki dağılmış yağ fazının oranına bağlı olduğu ve yağ oranı arttıkça lipoliz düzeyinin arttığı saptanmıştır.

EMT üretiminde inkübasyon süresinin ve uygun enzim tiplerinin belirlenmesinde, maksimum lipolizin elde edildiği koşulların ortaya konulması istenmiştir. Bu doğrultuda, maksimum lipolizin elde edilmesi için O/W emülsiyonu üretilmesi gerektiği ve en uygun emülsiyonun (Palatase özelinde) %40 yağ içeren, %0,25 emülgatör konsantrasyonunda, lipaz ve fosfolipazın eş zamanlı kullanımının uygun olacağına karar verilmiştir.

4.2. Aşama 2: EMT Üretimi

Enzim modifiye süt ürünü geliştirmek için lipolitik enzimler kullanılmaktadır ve bu ürünlerin lezzet çeşitliliği çok büyük oranda enzim türüne bağlıdır. Çünkü enzim modifiye ürün elde etmek amacıyla kullanılan lipazlar, süt yağına çeşitli şekillerde özgüllük (zincir uzunluğu ve konumsal özgüllük gibi) göstererek farklı SYA profilleri ve uçucu bileşik oluşumuna neden olurlar (Jensen, 1983; Kim Ha ve Lindsay 1993; Kilara, 2011). EMT ise çeşitli substratlara (krema, yoğunlaştırılmış süt vb.) lipolitik enzimler eklenerek gerçekleştirilen lipoliz sonucu

konsantre tereyağı lezzetinin elde edildiği bir süreçtir. EMT gıda üretiminde lezzet katkısı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Hill, Ghannouchi ve Garcia, 2001; Law, 2010; Regado ve diğerleri, 2007).

Özgün bir SYA dağılımı ve uçucu bileşik içeriğinin elde edilebilmesi için enzim aktivitesi büyük öneme sahiptir. En verimli yaklaşım ise enzimin maksimum aktivitede çalıştırılması ve hedeflenen lezzetin özelliklerine ulaşıldığında enzim faaliyetinin durdurulmasıdır. Bu amaçla, EMT üretiminde lipazlar ile çalışıldığından tez çalışmasının ilk aşamasında lipazların verimli çalıştığı koşullar belirlenmiştir. Lipazların emülsiyon ortamlarında verimli olduğu görülmüş ve lipaz aktivitesi ile elde edilecek lipoliz düzeyinin maksimize edileceği emülsiyon koşulları belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise bu koşullar dikkate alınarak EMT üretimleri gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında 3 farklı lipaz, fosfolipazla beraber kullanılmış, 240 dakikalık inkübasyonun sonunda maksimum lipoliz düzeylerine ulaşılması için gerekli koşullarda EMT'ler üretilmiş ve inkübasyonun farklı anlarında alınan örneklerin SYA içeriği ve miktarları, uçucu bileşik profilleri, ADV ve pH değerleri belirlenmiştir.

Tez çalışmasının 2.aşamasında, ilk aşamada karar verilen koşullarda (%40 yağlı emülsiyon, %0,25 emülgatör konsantrasyonu ve eş zamanlı lipaz & fosfolipaz kullanımı) fosfolipazın 3 farklı lipaz (Palatase 20000L, Lipomod 801 ve Lipozyme CALB) ile kombine edilerek EMT üretimi hedeflenmiştir. Bu amaçla, ilk olarak pastörize krema kullanılarak %40 yağ içeriğine sahip O/W emülsiyonu üretilmiştir. O/W emülsiyonunun hazırlanmasında emülsiyon bazında %0,25 oranında kullanılan Tween 80, saf suda tamamen çözündürülmüştür. Sonrasında, bu sulu çözelti ile %67,5 yağ, %71,5 kuru madde oranına sahip pastörize krema (substrat) belirli oranda (%40) karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi Ultra-Turrax (IKA T-18 Digital Package, IKA®-WerkeGmbH&Co. KG, Staufen, Almanya) cihazı ile 5000 rpm'de 30 saniye ve 10000 rpm'de 180 saniye olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir üretimde 65 g emülsiyon hazırlanmış ve hazırlanan emülsiyonlar 5 farklı sürede (0, 30, 60, 120 ve 240 dk) inkübe edilmek üzere, 5 falkona eşit miktarda alınmıştır. Çalkalamalı inkübatörde (IKA KS3000 IC, IKA®-WerkeGmbH&Co. KG, Staufen, Almanya) 45 °C'ye getirilen emülsiyonlara enzim ilavesi gerçekleştirilmiş ve emülsiyonlar 45 °C, 200 rpm'de inkübe edilmiştir. Emülsiyonlara ilave edilecek enzim miktarı yağ bazında olacak şekilde ayarlanmıştır.

Tez çalışmasının ilk aşamasında maksimum enzim aktivitesi elde etmek amacıyla emülsiyon özelliklerinin iyileştirilmesi aşamasında Palatase 20000 ve Lecitase Ultra ile çalışıldığı için bu enzimlerin konsantrasyonuna (%0,25 Palatase 20000 + %0,075 Lecitase Ultra) ilk aşamada karar verilmiştir. Ardından, diğer iki enzim (Lipomod 801 ve Lipozyme CALB) için de 4 saatlik inkübasyon sonunda maksimum lipoliz düzeyi elde etme amacıyla farklı enzim konsantrasyonlarında emülsiyonlar üretilmiş ve ADV analizi yapılmıştır. Başlangıç denemelerindeki lipaz konsantrasyonunun belirlenmesinde Palatase'ın aktivitesi ile ilişki kurularak öngörüle bulunulmuştur. İlk olarak, %40 yağlı emülsiyonlara sabit fosfolipaz oranında (%0,075), %0,5 Lipozyme CALB ve %0,1 Lipomod 801 konsantrasyonları olacak şekilde enzim eklenerek EMT üretilmiş ve ADV analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda Lipozyme CALB ile maksimum $14,2 \pm 0,6$ ADV değeri, Lipomod 801 ile maksimum $45,6 \pm 1,5$ ADV değeri elde edilmiştir. Ancak, her iki enzim kombinasyonu ile da yüksek ADV değeri elde edilememiştir. Bu nedenle, enzim konsantrasyonunun yetersiz olduğu düşünülerek %2 ve %2,5 konsantrasyonda Lipozyme CALB, %0,2 konsantrasyonda Lipomod 801 denenmiştir. Lipomod 801 ile 4 saatlik inkübasyon sonucu üretilen EMT örneğinde yaklaşık %50 ADV değerine ulaşılırken, Lipozyme CALB ile üretilenlerde ADV değeri $18,4 \pm 0,2$ olarak belirlenmiştir. Sonrasında, Lipozyme CALB ile üretilen emülsiyon %25 yağlı olarak yeniden üretilmiş ve bu enzim için %40 yağlı emülsiyona kıyasla daha yüksek ADV değeri elde edilmiştir. Ancak, her iki koşulda (%25 ve %40 yağlı) da ADV analizi sonucunda Lipozyme CALB ile üretilen EMT örneğinde bu enzimin ilk 30 dakikada çalıştığı/aktivite gösterdiği ve sonrasında durduğu görülmüştür. Son durumda, %40 yağlı O/W emülsiyonu ile %0,2 Lipomod 801 + %0,075 Lecitase Ultra kombinasyonu sonucu 240 dakikalık inkübasyon sonucunda $49,7 \pm 0,1$ ADV değeri; %25 yağlı O/W emülsiyonu ve %2,5 Lipozyme CALB + %0,075 Lecitase Ultra kombinasyonu ile ise yine 240 dakikalık inkübasyon sonucunda $23,2 \pm 0,2$ ADV değeri elde edilmiştir.

Uygun enzim konsantrasyonu elde etmek amacıyla yapılan denemeler sonucunda, 3 farklı lipaz ve 1 fosfolipaz kombinasyonu ile enzim ilavesi gerçekleştirilmiştir. Palatase 20000 enzimi “Enzim P”, Lipomod™ 801MDP enzimi “Enzim L” ve Lipozyme® CALB enzimi “Enzim C” olarak kodlanmıştır. Çalışılmasına karar verilen enzim konsantrasyonları;

- %0,25 Enzim P + %0,075 Lecitase® Ultra
- %0,2 Enzim L + %0,075 Lecitase® Ultra
- %2,5 Enzim C + %0,075 Lecitase® Ultra'dır.

Belirlenen inkübasyon sürelerinde (30 dk, 60 dk, 120 dk ve 240 dk) 3 farklı enzim kombinasyonu için örnek alınıp enzim aktivitelerini sonlandırmak amacıyla 85 °C’de 15 dakika su banyosunda pastörizasyon işlemi yapılmıştır. Üretimler iki paralel olarak gerçekleştirilmiştir. EMT örneklerinin pH değerleri, uçucu bileşik ve SYA profilleri belirlenen sürelerinde incelenmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. EMT örneklerinin ADV ve pH değerleri.

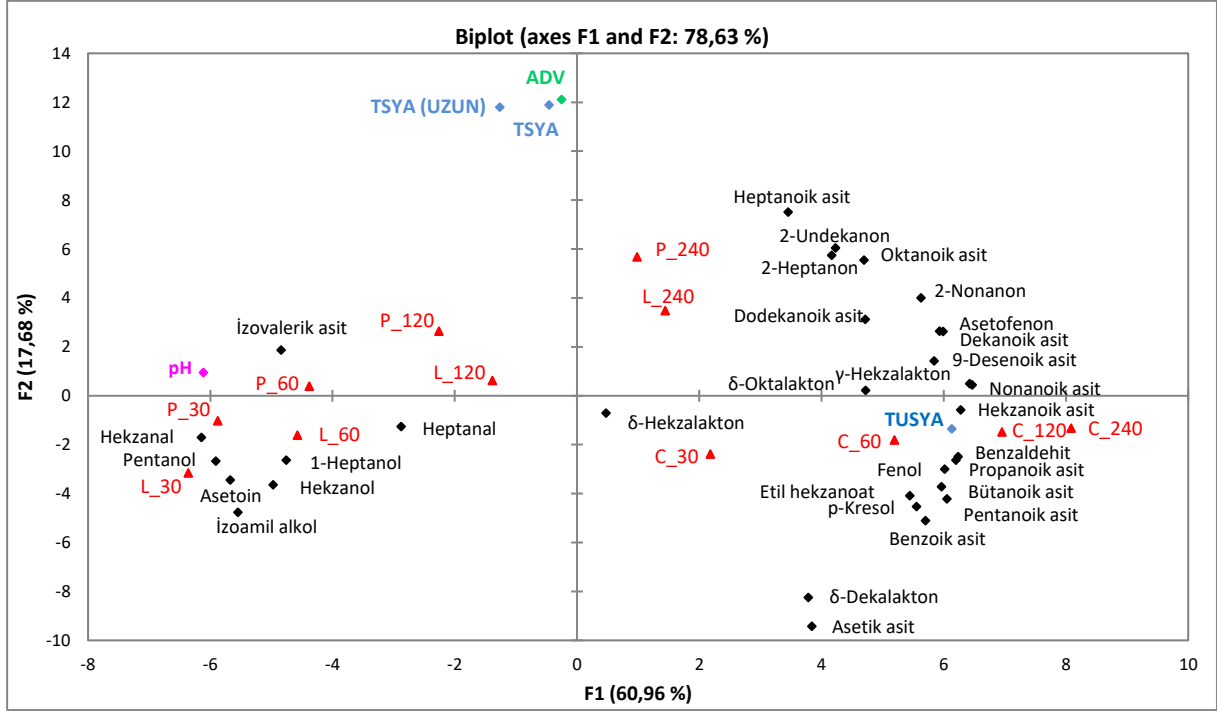
Yağ içeriği (%)	Enzim Kombinasyonu*	İnkübasyon Süresi	ADV	pH
25	Enzim C	0		5,68
		30	20,4 ± 0,3 ^{A,b}	4,33
		60	21,4 ± 0,3 ^{B,a}	4,33
		120	19,7 ± 0,2 ^{A,a}	4,34
		240	23,2 ± 0,2 ^{C,a}	4,20
40	Enzim L	0		5,09
		30	14,4 ± 0,1 ^{A,a}	4,75
		60	22,3 ± 0,0 ^{B,b}	4,62
		120	35,7 ± 0,3 ^{C,b}	4,54
		240	49,7 ± 0,1 ^{D,b}	4,46
	Enzim P	0		5,07
		30	24,8 ± 0,2 ^{A,c}	4,74
		60	35,5 ± 0,3 ^{B,c}	4,63
		120	48,6 ± 0,3 ^{C,c}	4,52
		240	69,2 ± 0,4 ^{D,c}	4,48

*(Enzim P) Palatase® 20000 L + Lecitase Ultra®; (Enzim L) Lipomod™ 801MDP + Lecitase Ultra®; (Enzim C) Lipozyme CALB + Lecitase Ultra®.

A-D: Bir kombinasyonu içinde farklı üst indislere sahip numunelerin önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir (P < 0.05). (Zaman etkisi)

a-c: Bir inkübasyon süresi içinde farklı üst indislere sahip numunelerin önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir (P < 0.05). (Enzim etkisi)

Tablo 4.7 incelendiğinde, en yüksek ADV değerine (%24,8–69,2) “Enzim P” ile üretilen EMT örnekleriyle ulaşılırken, ikinci sırada “Enzim L” ile üretilen (%14,1–49,7) EMT örnekleri yer almaktadır. “Enzim C” kombinasyonu ile üretilen EMT’nin ADV ve pH değerleri benzer eğilim göstermekte ve diğer iki kombinasyon (Enzim L ve P) gibi inkübasyon süresiyle paralel belirgin artış göstermemektedir. PCA biplot grafiğinde EMT’lerin pH ve ADV değerleri F1 negatif, F2 pozitif bölgesinde yakın konumda yer almaktadır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. EMT örneklerindeki uçucu bileşikler, pH, ADV ve TUSYA, TSYA, TSYA(UZUN) için PCA biplot grafiği (P: Palatase 20000 L + Lecitase Ultra; L: Lipomod 801 MDP + Lecitase Ultra; C: Lipozyme CALB + Lecitase Ultra).

“Enzim C” ile üretilen EMT’lerde ilk 30 dakikada asitliğin geliştiği ve sonrasında artan süreyle dalgalı değerlere sahip olduğu görülmektedir. Enzim C’nin bulunduğu emülsiyon ortamında pH’nın ilk 30 dakika sonunda aniden düşerek 5,68’den 4,33’e inmesi ve sonrasında hem ADV değişiminin hem de pH değişiminin durması, düşen pH’ya bağlı olarak enzimatik reaksiyonun durduğu fikrini akla getirmektedir. Diğer iki enzimle üretilen örneklerde (Enzim P ve L) 240 dakikalık üretim sonunda bile “Enzim C” ile üretilen EMT’nin 30.dakikası kadar pH düşüşü yaşanmamış ve ADV değerlerinde belirgin artış sürmüştür. Literatür incelendiğinde, bir çalışmada susuz süt yağına enzimatik hidroliz uygulanarak lezzet gelişimi sağlanmak istenmiş, ancak 1-2 saatin sonunda reaksiyonun hızının azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum, ortamının pH’sının zamanla azalması ve buna bağlı olarak enzimin inaktive olması ile ilişkilendirilmiştir (Regado ve diğerleri, 2007). Benzer şekilde, farklı pH ortamlarında *Mucor javanicus* kaynaklı bir lipazın lipolitik aktivitesini inceleyen Balcao ve diğerleri (1998c), maksimum aktivitenin pH 8’de elde edildiğini ve bu değer öncesinde (pH 4) ve sonrasında (pH 12) aktivitenin azaldığını belirtmiştir. CALB enziminin çalışmamızda saptanmış olan davranışının nedenini açıklamak için bu enzimle yapılan çalışmalar incelendiğinde, bu enzimin diğer lipazlardan farklı olarak yapısında “lid” bulundurmadağı ve

hiçbir zaman arayüzey aktivasyonu göstermediği görülmüştür (Martinelle, Holmquist ve Hult, 1995; Stauch, Fisher ve Cianci, 2015; Song ve Chang, 2022). Bu nedenle enzimin aktif bölgesine doğrudan temas sağlanabildiği belirtilmektedir (Martinelle ve diğerleri, 1995). Ancak, diğer taraftan bu enzimin düşük aktivite göstermesinin nedeni, yapısında “lid” bulundurmaması olarak açıklanmıştır (Martinelle ve diğerleri, 1995; Song ve Chang 2022). Stauch ve diğerleri (2015) ise Lipozyme® CALB enzimini daha ayrıntılı inceleyerek aktivite düşüklüğünün sadece bu duruma atfedilemeyeceğini, çünkü bu enzimde “lid” yapısının bulunup bulunmadığının tartışmalı olduğunu öne sürmüştür. Lipozyme® CALB, yapısında aktif bölgesinin çevreleyen 2 α -Helix (α -Helix 5-10) bulundurmaktadır. Bu yapılar, lipaza “lid” özelliği sağlamaktadır ve sulu ortamlarda hareket halindedir. Ancak, bu yapılar aktif merkezi kapatacak ve lipazın aktivitesini azaltacak kadar büyük değildir. Lipozyme® CALB enziminin aktivitesini ortamın pH değeri de etkilemektedir. Çünkü bu enzim yüksek pH değerinde, hidrofobik “lid” gibi davranan α -Helix 5, enzimin aktif bölgesinin temasını engelleyerek daha yoğun (compact) ve sarmal bir yapı halini alabilmektedir. Lipozyme® CALB enziminin bu pH bağımlılığının amino asit dizilimi değiştirilerek giderilebileceği belirtilmiştir.

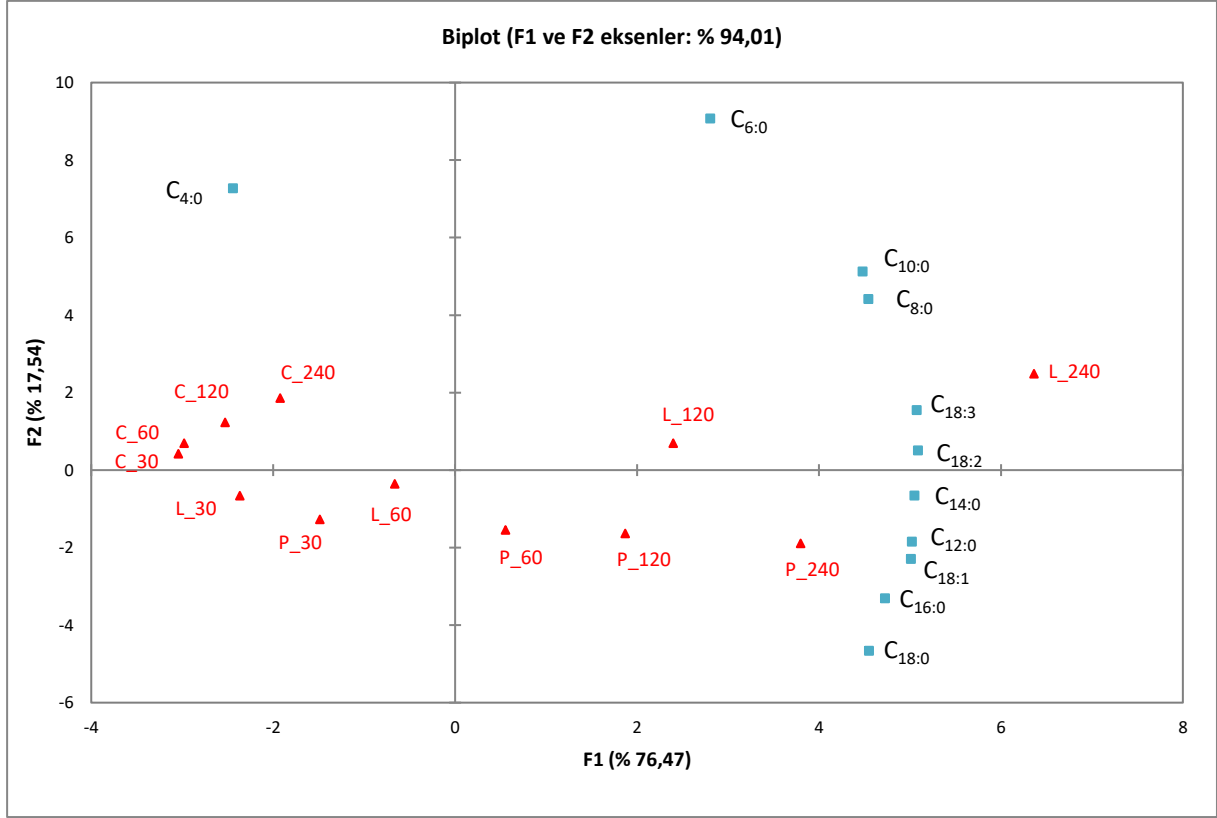
4.2.1. EMT Örneklerinin SYA İçeriği ve Miktarı

Lipazlar, yağ asitlerini triaçilgliserol omurgasındaki konumu (*sn*-1, *sn*-2 ve *sn*-3) veya yağ asidi zincir uzunluğu özgülüğü gibi hidrolitik özgülük gösterirler. Böylece kendilerine özgü yağ asidi profilleri üreterek farklı lezzetlerin oluşumunu sağlarlar. Bu farklı lezzetlerin oluşumuna SYA’ların ikincil ürünleri (ketonlar ve laktonlar gibi) de katkı sağlayarak yağ asitlerinin neden olduğu keskin lezzeti maskelerler. Bu yüzden, bu ürünlerin varlığı süt yağının lipoliziyle oluşan lezzet profili açısından büyük önem taşır (Wang ve Xu 2009). 4-10 karbon atomuna sahip SYA’lar genellikle uçucu SYA olarak nitelendirilirken, 12-18 karbon atomuna sahip SYA’lar için böyle bir durum söz konusu değildir. Bu yüzden, 12-18 karbon atomuna sahip SYA’ların lezzet gelişimi üzerine etkisi görece düşüktür (Collins ve diğerleri, 2003; Kendirci ve diğerleri, 2020).

Tez kapsamında, incelenen örneklerin uçucu SYA bileşim ve miktarları Tablo 4.8’de, orta ve uzun zincirli SYA’ların bileşim ve miktarları ise Tablo 4.9’da sunulmuştur. Tüm EMT örneklerinde en baskın SYA, C_{16:0} (%31,6-39,2) olurken, ikinci sırada C_{18:1} gelmektedir. Süt ürünlerinde lipoliz ile ilgili bir çok çalışmada da C_{16:0} yağ asidinin baskın olduğu saptanmıştır.

Bu yağ asitlerinin baskın olmalarının nedeni süt yağında bol bulunmalarından kaynaklıdır (Kendirci ve diğerleri, 2020; Kilkawley ve diğerleri, 2001; Regado ve diğerleri, 2007).

“Lipozyme CALB + Lecitase Ultra® (Enzim C)” kombinasyonu ile üretilen EMT örneğinin diğer EMT’lerden belirgin şekilde farklılaştığı görülmektedir. Tablo 4.8’e göre tüm enzim kombinasyonları arasında en yüksek $C_{4:0}$ (genellikle *sn*-1 ve *sn*-3 konumunda bulunan) miktarı “Enzim C” ile elde edilmiştir. Aynı zamanda, “Enzim C” için en baskın uçucu serbest yağ asidi (USYA) $C_{4:0}$ ’tür. Bu durum PCA biplot grafiğinde de net bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.7). $C_{4:0}$ ve Enzim C ile üretilen EMT örnekleri F1(%76,47) negatif bölgesinde birbirleriyle çok yakın konumda olduğu belirlenmiştir. $C_{4:0}$ miktarının 4 farklı süredeki artışında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır. Ancak, “Enzim C” kombinasyonu, diğer kısa zincirli serbest yağ asitlerinin salımında $C_{4:0}$ miktarı kadar belirgin artış gerçekleştirmemiştir. Bu kombinasyonla 4.saat sonunda oluşan toplam uçucu serbest yağ asidi (TUSYA) oranı %19.9 iken toplam $C_{4:0}$ oranı %16,4’tür. “Enzim C” kombinasyonunun bütirik asit özgülülüğü gösterdiği SYA profiliyle ortaya konulmuştur. Ayrıca, en yüksek TUSYA oranı “Enzim C” ile üretilen EMT örneğiyle elde edilmiştir (TUSYA: Enzim P (%2,2-2,7) < Enzim L (%3,4-7,4) < Enzim C (%13,9-19,9)). Bu durum Şekil 4.6’deki PCA biplot grafiğinde de açıkça görülmektedir. “Enzim C” ile üretilen tüm EMT örnekleri TUSYA ile F1 pozitif, F2 negatif bölgesinde çok yakın konumda bulunmaktadır. Aynı zamanda, “Enzim C” ile üretilen EMT örneği diğer iki enzim kombinasyonu ile üretilen EMT’lere kıyasla en düşük toplam serbest yağ asidi (TSYA) miktarına sahiptir. TUSYA miktarları ve TSYA içerisindeki yüzdeleri düşük algılama eşik değerlerinden dolayı EMT aroması için büyük öneme sahiptir.



Şekil 4.7. EMT örneklerindeki serbest yağ asitleri için PCA biplot grafiği (P: Palatase 20000 L + Lecitase Ultra; L: Lipomod 801 MDP + Lecitase Ultra; C: Lipozyme CALB + Lecitase Ultra).

Tablo 4.9'a göre tüm inkübasyon sürelerinde en düşük toplam uzun zincirli SYA (TSYA (UZUN)) miktarı “Enzim C” ile elde edilirken, en yüksek miktarlar “Enzim P” ile elde edilmiştir (TSYA (UZUN): Enzim C < Enzim L < Enzim P). PCA biplot grafiğinde “Enzim P” örneğinin P₃₀ süresi hariç diğer sürelerde (P₆₀, P₁₂₀, P₂₄₀), uzun zincirli SYA’lar ile F1(%76,47) pozitif bölgesinde yer almaktadır (Şekil 4.7). Ayrıca, TUSYA oranı “Enzim P” kombinasyonu ile %2,7 iken “Enzim L” kombinasyonu ile %7,4 olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.8. EMT örneklerinin uçucu serbest yağ asidi bileşimi ve miktarı (mg/100 gr yağ) (Ortalama $\pm$ SS).

Örnek*	İnkübasyon Süresi (dk)	Bütirik Asit (C _{4:0})	Kaproik Asit (C _{6:0})	Kaprilik Asit (C _{8:0})	Kaprik Asit (C _{10:0})	TUSYA ¹	TSYA ²
Krema	-	2,6 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,1	4,9 $\pm$ 0,2	9,5 $\pm$ 0,6	580,7 $\pm$ 15,7
Enzim P	30	22,6 $\pm$ 3,3 ^{A,a}	12,4 $\pm$ 0,3 ^{A,a}	10,1 $\pm$ 0,4 ^{A,b}	29,3 $\pm$ 1,8 ^{A,a}	74,4 $\pm$ 4,8 ^{A,a}	3407,2 $\pm$ 104,2 ^{A,b}
	60	33,6 $\pm$ 3,0 ^{B,a}	18,8 $\pm$ 0,6 ^{B,a}	17,9 $\pm$ 0,6 ^{B,b}	46,0 $\pm$ 2,3 ^{B,b}	116,3 $\pm$ 3,3 ^{B,a}	4899,5 $\pm$ 96,2 ^{B,c}
	120	44,0 $\pm$ 1,5 ^{C,a}	24,4 $\pm$ 0,7 ^{C,a}	26,6 $\pm$ 1,3 ^{C,b}	53,5 $\pm$ 3,5 ^{C,a}	148,6 $\pm$ 3,9 ^{C,a}	5799,8 $\pm$ 284,1 ^{C,c}
	240	64,0 $\pm$ 2,9 ^{D,a}	28,2 $\pm$ 2,4 ^{D,a}	31,5 $\pm$ 2,7 ^{D,b}	65,6 $\pm$ 5,8 ^{D,b}	189,3 $\pm$ 9,7 ^{D,a}	7006,7 $\pm$ 203,0 ^{D,b}
Enzim L	30	23,1 $\pm$ 1,7 ^{A,a}	16,9 $\pm$ 1,5 ^{A,b}	13,8 $\pm$ 0,3 ^{A,c}	33,4 $\pm$ 2,1 ^{A,b}	87,3 $\pm$ 4,8 ^{A,a}	2604,3 $\pm$ 102,4 ^{A,a}
	60	53,3 $\pm$ 2,9 ^{B,a}	33,6 $\pm$ 3,1 ^{B,b}	26,4 $\pm$ 2,6 ^{B,c}	49,6 $\pm$ 2,3 ^{B,b}	162,8 $\pm$ 6,3 ^{B,a}	3701,3 $\pm$ 92,3 ^{B,b}
	120	87,6 $\pm$ 7,8 ^{C,b}	64,2 $\pm$ 8,1 ^{C,c}	51,5 $\pm$ 3,9 ^{C,c}	94,7 $\pm$ 15,6 ^{C,b}	298,0 $\pm$ 34,6 ^{C,b}	5075,0 $\pm$ 120,5 ^{C,b}
	240	129,9 $\pm$ 4,8 ^{D,b}	116,2 $\pm$ 3,5 ^{D,c}	98,0 $\pm$ 3,9 ^{D,c}	161,3 $\pm$ 4,8 ^{D,c}	505,4 $\pm$ 1,7 ^{D,b}	6820,5 $\pm$ 258,0 ^{D,b}
Enzim C	30	304,7 $\pm$ 24,1 ^{A,b}	34,1 $\pm$ 2,5 ^{A,c}	8,3 $\pm$ 0,5 ^{A,a}	31,7 $\pm$ 1,1 ^{A,ab}	378,8 $\pm$ 21,6 ^{A,b}	2716,4 $\pm$ 108,4 ^{A,a}
	60	388,2 $\pm$ 39,7 ^{B,b}	35,7 $\pm$ 2,3 ^{A,b}	8,8 $\pm$ 0,3 ^{AB,a}	34,0 $\pm$ 1,2 ^{A,a}	466,7 $\pm$ 42,9 ^{B,b}	2911,1 $\pm$ 276,3 ^{AB,a}
	120	470,0 $\pm$ 6,2 ^{C,c}	49,7 $\pm$ 4,2 ^{B,b}	9,8 $\pm$ 0,4 ^{B,a}	39,5 $\pm$ 1,7 ^{B,a}	569 $\pm$ 0,1 ^{C,c}	3196,7 $\pm$ 157,9 ^{B,a}
	240	594,1 $\pm$ 38,0 ^{D,c}	61,6 $\pm$ 2,0 ^{C,b}	16,0 $\pm$ 1,1 ^{C,a}	49,6 $\pm$ 0,6 ^{C,a}	721,3 $\pm$ 39,6 ^{D,c}	3616,1 $\pm$ 48,2 ^{C,a}

*(Enzim P) Palatase® 20000 L + Lecitase Ultra®; (Enzim L) LipomodTM 801MDP + Lecitase Ultra®; (Enzim C) Lipozyme CALB + Lecitase Ultra®.

TUSYA¹: Toplam Uçucu Serbest Yağ Asidi

TSYA²: Toplam Serbest Yağ Asidi

A–D: Bir enzim içinde farklı üst indislere sahip numunelerin önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir (P < 0,05). (Zaman etkisi)

a-c: Bir inkübasyon süresi içinde farklı üst indislere sahip numunelerin önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir (P < 0,05). (Enzim etkisi)

Tablo 4.9. EMT örneklerinin uzun zincirli SYA bileşimi ve miktarları (mg/100 gr yağ) (Ortalama $\pm$ SS).

Örnek*	İnkübasyon Süresi (dk)	Laurik Asit (C _{12:0})	Miristik Asit (C _{14:0})	Palmitik Asit (C _{16:0})	Stearik Asit (C _{18:0})	Oleik Asit (C _{18:1})	Linoleik Asit (C _{18:2})	Linolenik Asit (C _{18:3})	TSYA (UZUN) ¹
Krema	-	15,2 $\pm$ 0,7	59,2 $\pm$ 2,6	223,5 $\pm$ 1,7	64,1 $\pm$ 1,3	200,9 $\pm$ 11,2	7,7 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,1	571,2 $\pm$ 15,2
Enzim P	30	93,3 $\pm$ 3,1 ^{A,c}	392,7 $\pm$ 26,0 ^{A,b}	1334,9 $\pm$ 61,2 ^{A,b}	508,4 $\pm$ 24,5 ^{A,b}	955,6 $\pm$ 6,5 ^{A,c}	36,2 $\pm$ 1,6 ^{A,c}	11,7 $\pm$ 0,5 ^{A,c}	3332,9 $\pm$ 100,3 ^{A,b}
	60	141,9 $\pm$ 4,7 ^{B,c}	664,0 $\pm$ 5,8 ^{B,c}	1908,5 $\pm$ 80,1 ^{B,c}	706,4 $\pm$ 14,4 ^{B,c}	1296,9 $\pm$ 17,5 ^{B,c}	50,7 $\pm$ 2,0 ^{B,c}	14,8 $\pm$ 1,2 ^{B,c}	4783,2 $\pm$ 93,0 ^{B,c}
	120	161,6 $\pm$ 12,0 ^{C,b}	796,4 $\pm$ 22,9 ^{C,b}	2209,2 $\pm$ 137,2 ^{C,c}	860,8 $\pm$ 81,8 ^{C,c}	1543,5 $\pm$ 55,6 ^{C,c}	61,6 $\pm$ 3,7 ^{C,b}	18,1 $\pm$ 1,1 ^{C,b}	5651,3 $\pm$ 284,8 ^{C,c}
	240	246,9 $\pm$ 11,5 ^{D,b}	950,5 $\pm$ 62,0 ^{D,b}	2672,0 $\pm$ 81,3 ^{D,c}	999,7 $\pm$ 44,3 ^{D,c}	1849,8 $\pm$ 55,5 ^{D,b}	73,4 $\pm$ 4,6 ^{D,b}	25,2 $\pm$ 2,4 ^{D,b}	6817,4 $\pm$ 212,1 ^{D,c}
Enzim L	30	66,1 $\pm$ 3,7 ^{A,b}	264,8 $\pm$ 17,2 ^{A,a}	958,9 $\pm$ 60,4 ^{A,a}	341,6 $\pm$ 8,9 ^{A,a}	844,1 $\pm$ 32,2 ^{A,b}	33,1 $\pm$ 1,5 ^{A,b}	8,4 $\pm$ 0,2 ^{A,b}	2517,0 $\pm$ 107,1 ^{A,a}
	60	108,0 $\pm$ 9,8 ^{B,b}	546,1 $\pm$ 32,6 ^{B,b}	1233,1 $\pm$ 47,6 ^{B,b}	435,9 $\pm$ 8,8 ^{B,b}	1163,1 $\pm$ 74,7 ^{B,b}	41,9 $\pm$ 0,9 ^{B,b}	10,5 $\pm$ 0,6 ^{A,b}	3538,5 $\pm$ 94,8 ^{B,b}
	120	153,4 $\pm$ 24,6 ^{C,b}	766,7 $\pm$ 18,5 ^{C,b}	1706,0 $\pm$ 148,5 ^{C,b}	597,6 $\pm$ 49,0 ^{C,b}	1450,6 $\pm$ 10,3 ^{C,b}	80,3 $\pm$ 5,0 ^{C,c}	22,4 $\pm$ 0,6 ^{B,c}	4777,0 $\pm$ 155,0 ^{C,b}
	240	237,1 $\pm$ 10,4 ^{D,b}	1024,8 $\pm$ 62,4 ^{D,b}	2312,0 $\pm$ 72,8 ^{D,b}	805,2 $\pm$ 30,5 ^{D,b}	1794,1 $\pm$ 97,5 ^{D,b}	105,8 $\pm$ 2,8 ^{D,c}	36,1 $\pm$ 3,8 ^{C,c}	6315,0 $\pm$ 256,4 ^{D,b}
Enzim C	30	49,7 $\pm$ 2,4 ^{A,a}	304,0 $\pm$ 34,3 ^{A,a}	911,8 $\pm$ 18,7 ^{A,a}	302,9 $\pm$ 40,8 ^{A,a}	743,8 $\pm$ 70,2 ^{A,a}	19,7 $\pm$ 0,9 ^{A,a}	5,7 $\pm$ 0,2 ^{A,a}	2337,6 $\pm$ 86,9 ^{A,a}
	60	49,3 $\pm$ 2,4 ^{A,a}	340,6 $\pm$ 42,1 ^{A,a}	985,2 $\pm$ 124,4 ^{AB,a}	274,0 $\pm$ 15,4 ^{A,a}	769,1 $\pm$ 86,0 ^{A,a}	20,0 $\pm$ 1,0 ^{A,a}	6,2 $\pm$ 0,7 ^{A,a}	2444,4 $\pm$ 238,9 ^{A,a}
	120	63,6 $\pm$ 3,8 ^{B,a}	379,9 $\pm$ 27,3 ^{AB,a}	1092,7 $\pm$ 52,5 ^{B,a}	277,4 $\pm$ 41,2 ^{A,a}	782,2 $\pm$ 33,7 ^{A,a}	22,3 $\pm$ 1,1 ^{B,a}	9,7 $\pm$ 0,3 ^{B,a}	2627,8 $\pm$ 157,7 ^{AB,a}
	240	73,9 $\pm$ 0,5 ^{C,a}	455,1 $\pm$ 49,6 ^{B,a}	1144,2 $\pm$ 37,5 ^{B,a}	328,2 $\pm$ 12,8 ^{A,a}	852,6 $\pm$ 7,5 ^{A,a}	29,1 $\pm$ 0,9 ^{C,a}	11,6 $\pm$ 2,3 ^{B,a}	2894,8 $\pm$ 8,6 ^{B,a}

* (Enzim P) Palatase® 20000 L + Lecitase Ultra®; (Enzim L) LipomodTM 801MDP + Lecitase Ultra®; (Enzim C) Lipozyme CALB + Lecitase Ultra®.

TSYA (UZUN)¹: Toplam Uzun Zincirli Serbest Yağ Asidi

A–D: Bir enzim içinde farklı üst indislere sahip numunelerin önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir (P < 0,05). (Zaman etkisi)

a-c: Bir inkübasyon süresi içinde farklı üst indislere sahip numunelerin önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir (P < 0,05). (Enzim etkisi)

Literatürde lipoliz üzerine yapılan bir çok çalışmada *Rhizomucor miehei* kaynaklı Palatase® 20000 L kullanılmıştır. Bu enzimin *sn*-1,3 konumsal özgülük gösterdiği ve kısa zincirli SYA salınımına öncülük ettiği bilinmektedir (Kendirci ve diğerleri, 2020; Kurtovic, Marshall, Miller ve Zhao, 2011; Wang ve Xu 2009; Zhang ve diğerleri, 2016). Ancak, bu çalışmada “Palatase® 20000 L + Lecitase Ultra® (Enzim P)” diğer iki EMT örneğine kıyasla tüm inkübasyon sürelerinde en düşük kısa zincirli SYA miktarına sahiptir ve “Enzim P” için en baskın USYA C_{10:0} (%0.9)’dur. Literatürde, süt yağında bulunan laurik asit (C_{12:0}) miktarının yaklaşık %52’si *sn*-1,3 konumunda bulunduğu bilgisi mevcuttur. Benzer şekilde, diğer uzun zincirli yağ asitleri de belirli oranlarda (%46’dan %74’e değişiklik gösteren) *sn*-1,3 konumunda bulunabilmektedir. Tez kapsamında “Enzim P” ile üretilen EMT’nin daha yüksek oranda uzun zincirli (C_{12:0}-C_{18:3}) SYA salınımı ile sonuçlanması, bu yağ asitlerinin *sn*-1,3’te de bulunmasıyla açıklanmaktadır (Brindisi ve diğerleri, 2008).

Lipomod™ 801MDP karma bir fungal lipazdır ve pankreatik lipazın ürettiği SYA profiliyle benzerlik gösterdiği bilinmektedir. Enzim özellikleri açısından son ürüne dengeli bir lezzet profili sağlamaktadır (Kendirci ve diğerleri, 2020). C_{4:0} hariç diğer USYA’ların salımında en yüksek miktar “Lipomod™ 801MDP + Lecitase Ultra® (Enzim L)” enzim kombinasyonu ile elde edilmiştir. “Enzim L” ile oluşan en baskın USYA C_{10:0} (%1,3-2,4) olurken C_{4:0} (%0,9-1,9) ikinci sırada yer almaktadır.

4.2.2. EMT örneklerinin Uçucu Bileşik Profilleri

Tez çalışması kapsamında, üretilen EMT örneklerinin uçucu bileşik profillerini incelemek amacıyla uçucu bileşik analizi yapılmıştır. Örneklerdeki uçucu bileşiklerin izolasyonu için HS-SPME kullanılmış ve bu bileşiklerin miktarları (mg/kg yağ ± standart sapma) DB-Wax kolonu üzerinde lineer retansiyon indeksi (LRI) değerleri ile Tablo 4.10’da verilmiştir. EMT örneklerinde, 13 asit, 3 aldehit, 5 keton, 4 lakton, 4 alkol, 2 fenol ve 1 ester olmak üzere toplam 34 tane uçucu bileşik tanımlanmıştır. Süt yağı lipolizi sonucu elde edilen çalışmalar incelendiğinde benzer uçucu bileşikler saptanmıştır (Wang ve Xu 2009; Zhang ve diğerleri, 2016).

Tablo 4.10. EMT Örneklerinin Uçucu Bileşikler ve miktarları (mg/kg yağ) (Ortalamalar $\pm$ SS)

Enzim*	İnkübasyon Süresi (dk)	Asitler							
		Asetik asit 1454**	Propanoik asit 1539	Bütirik asit 1626	İzovalerik asit 1666	Pentanoik asit 1738	Hekzanoik asit 1839	Heptanoik asit 1939	Oktanoik asit 2068
Enzim P	30	3,65 $\pm$ 0,08 ^{A,a}	0,115 $\pm$ 0,010 ^{A,a}	77,0 $\pm$ 0,3 ^{A,a}	0,146 $\pm$ 0,003 ^{BC,b}	1,03 $\pm$ 0,00 ^{A,a}	63,9 $\pm$ 0,4 ^{A,a}	0,934 $\pm$ 0,058 ^{A,a}	22,2 $\pm$ 2,7 ^{A,a}
	60	3,70 $\pm$ 0,13 ^{A,a}	0,164 $\pm$ 0,001 ^{B,a}	105,3 $\pm$ 1,6 ^{B,a}	0,128 $\pm$ 0,001 ^{AB,a}	1,50 $\pm$ 0,05 ^{B,a}	80,9 $\pm$ 3,6 ^{B,a}	1,24 $\pm$ 0,08 ^{A,a}	29,1 $\pm$ 0,8 ^{A,a}
	120	3,36 $\pm$ 0,18 ^{A,a}	0,224 $\pm$ 0,010 ^{C,a}	139,0 $\pm$ 0,3 ^{C,a}	0,155 $\pm$ 0,010 ^C	2,15 $\pm$ 0,03 ^{C,a}	107,9 $\pm$ 2,5 ^{C,a}	1,80 $\pm$ 0,13 ^{B,a}	41,1 $\pm$ 3,8 ^{B,a}
	240	3,02 $\pm$ 0,25 ^{A,a}	0,243 $\pm$ 0,020 ^{C,a}	158,7 $\pm$ 1,8 ^{D,a}	0,107 $\pm$ 0,003 ^A	3,01 $\pm$ 0,10 ^{D,a}	143,0 $\pm$ 4,4 ^{D,a}	2,62 $\pm$ 0,13 ^{C,a}	57,8 $\pm$ 3,5 ^{C,a}
Enzim L	30	4,50 $\pm$ 0,28 ^{C,b}	0,147 $\pm$ 0,200 ^{A,a}	100,8 $\pm$ 1,2 ^{A,a}	0,129 $\pm$ 0,001 ^{B,b}	1,85 $\pm$ 0,02 ^{A,a}	85,0 $\pm$ 5,1 ^{A,b}	1,12 $\pm$ 0,14 ^{A,ab}	28,0 $\pm$ 1,7 ^{A,a}
	60	4,15 $\pm$ 0,06 ^{BC,b}	0,178 $\pm$ 0,001 ^{AB,a}	136,6 $\pm$ 0,5 ^{B,b}	0,133 $\pm$ 0,004 ^{B,a}	2,80 $\pm$ 0,06 ^{B,b}	117,1 $\pm$ 0,3 ^{B,b}	1,69 $\pm$ 0,02 ^{B,b}	38,3 $\pm$ 0,7 ^{A,b}
	120	3,70 $\pm$ 0,10 ^{AB,a}	0,225 $\pm$ 0,020 ^{B,a}	179,6 $\pm$ 1,0 ^{C,b}	0,132 $\pm$ 0,009 ^B	4,10 $\pm$ 0,10 ^{C,b}	158,1 $\pm$ 3,9 ^{C,b}	2,63 $\pm$ 0,13 ^{C,b}	59,4 $\pm$ 4,7 ^{B,b}
	240	3,24 $\pm$ 0,23 ^{A,a}	0,234 $\pm$ 0,010 ^{B,a}	198,7 $\pm$ 11,4 ^{C,b}	0,108 $\pm$ 0,003 ^A	4,97 $\pm$ 0,09 ^{D,b}	193,5 $\pm$ 1,1 ^{D,b}	3,48 $\pm$ 0,13 ^{D,b}	77,7 $\pm$ 3,2 ^{C,b}
Enzim C	30	5,60 $\pm$ 0,32 ^{A,c}	0,405 $\pm$ 0,001 ^{AB,b}	376,2 $\pm$ 15,5 ^{B,b}	0,101 $\pm$ 0,007 ^a	10,2 $\pm$ 0,4 ^{A,b}	185,8 $\pm$ 4,9 ^{A,c}	1,50 $\pm$ 0,11 ^{A,b}	40,4 $\pm$ 2,3 ^{A,b}
	60	5,19 $\pm$ 0,05 ^{A,c}	0,383 $\pm$ 0,008 ^{A,b}	349,4 $\pm$ 0,0 ^{AB,c}	0,149 $\pm$ 0,001 ^b	10,0 $\pm$ 0,3 ^{A,c}	202,6 $\pm$ 5,6 ^{AB,c}	1,85 $\pm$ 0,06 ^{AB,b}	50,2 $\pm$ 0,1 ^{B,c}
	120	5,06 $\pm$ 0,12 ^{A,b}	0,401 $\pm$ 0,024 ^{AB,b}	334,9 $\pm$ 6,0 ^{A,c}	-	10,2 $\pm$ 0,2 ^{A,c}	216,9 $\pm$ 8,7 ^{B,c}	2,17 $\pm$ 0,15 ^{BC,ab}	58,2 $\pm$ 3,3 ^{BC,ab}
	240	5,73 $\pm$ 0,01 ^{A,b}	0,450 $\pm$ 0,019 ^{B,b}	367,0 $\pm$ 6,0 ^{AB,c}	-	13,0 $\pm$ 0,3 ^{B,c}	249,1 $\pm$ 7,8 ^{C,c}	2,37 $\pm$ 0,11 ^{C,a}	64,1 $\pm$ 2,9 ^{C,ab}

* (Enzim P) Palatase® 20000 L + Lecitase Ultra®; (Enzim L) LipomodTM 801MDP + Lecitase Ultra®; (Enzim C) Lipozyme CALB + Lecitase Ultra®.

A–D: Bir enzim içinde farklı üst indislere sahip numunelerin önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir ($P < 0,05$). (Zaman etkisi)

a-c: Bir inkübasyon süresi içinde farklı üst indislere sahip numunelerin önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir ($P < 0,05$). (Enzim etkisi)

**LRI: Lineer retention indeks DB-Wax kolona göre hesaplanmıştır.

-: Saptanmamıştır.

Tablo 4.10. (Devamı)

Örnek*	İnkübasyon Süresi (dk)	Asitler (Devamı)					Aldehitler		
		Nonanoik asit 2163	Dekanoik asit 2268	9-Desenoik asit 2335	Benzoik asit 2420	Dodekanoik asit 2482	Hekzanal 1056	Heptanal 1148	Benzaldehit 1521
Enzim P	30	0,180 ± 0,012 ^{A,a}	7,0 ± 0,0 ^{A,a}	0,336 ± 0,017 ^{AB,a}	0,595 ± 0,074 ^{A,a}	0,652 ± 0,068 ^{A,b}	0,377 ± 0,009 ^{C,c}	-	0,045 ± 0,003 ^{A,b}
	60	0,246 ± 0,005 ^{AB,a}	6,88 ± 0,26 ^{A,a}	0,320 ± 0,026 ^{A,a}	0,583 ± 0,008 ^{A,a}	0,470 ± 0,007 ^{A,a}	0,358 ± 0,016 ^C	-	0,062 ± 0,002 ^{B,b}
	120	0,303 ± 0,044 ^{B,a}	8,56 ± 0,16 ^{A,a}	0,448 ± 0,047 ^{B,a}	0,678 ± 0,090 ^{A,a}	0,494 ± 0,053 ^{A,a}	0,275 ± 0,009 ^B	-	0,091 ± 0,008 ^{C,a}
	240	0,438 ± 0,037 ^{C,a}	18,1 ± 1,4 ^{B,a}	1,00 ± 0,02 ^{C,a}	0,840 ± 0,067 ^{A,a}	0,930 ± 0,039 ^{B,a}	0,106 ± 0,004 ^A	-	0,096 ± 0,002 ^{C,a}
Enzim L	30	0,148 ± 0,008 ^{A,a}	5,98 ± 1,04 ^{A,a}	0,378 ± 0,050 ^{A,a}	0,586 ± 0,058 ^{A,a}	0,416 ± 0,017 ^{A,a}	0,335 ± 0,001 ^{C,b}	0,175 ± 0,018 ^A	0,019 ± 0,001 ^{A,a}
	60	0,265 ± 0,025 ^{B,a}	8,19 ± 0,28 ^{A,b}	0,520 ± 0,005 ^{A,b}	0,453 ± 0,066 ^{A,a}	0,561 ± 0,022 ^{A,a}	0,282 ± 0,000 ^B	0,131 ± 0,006 ^A	0,041 ± 0,000 ^{B,a}
	120	0,380 ± 0,038 ^{C,a}	16,5 ± 0,5 ^{B,b}	1,15 ± 0,02 ^{B,b}	0,472 ± 0,069 ^{A,a}	0,615 ± 0,001 ^{A,a}	0,227 ± 0,008 ^A	0,133 ± 0,016 ^A	0,089 ± 0,002 ^{C,a}
	240	0,497 ± 0,027 ^{D,a}	22,5 ± 1,3 ^{C,a}	1,21 ± 0,10 ^{B,a}	0,618 ± 0,059 ^{A,a}	1,21 ± 0,11 ^{B,a}	-	0,134 ± 0,006 ^A	0,091 ± 0,004 ^{C,a}
Enzim C	30	0,458 ± 0,020 ^{A,b}	13,7 ± 0,4 ^{A,b}	0,710 ± 0,014 ^{A,b}	2,90 ± 0,16 ^{A,b}	0,237 ± 0,012 ^{A,a}	0,137 ± 0,011 ^a	-	0,195 ± 0,005 ^{A,c}
	60	0,529 ± 0,042 ^{A,b}	19,4 ± 0,3 ^{B,c}	1,23 ± 0,05 ^{B,c}	4,51 ± 0,02 ^{B,b}	0,896 ± 0,052 ^{B,b}	-	-	0,204 ± 0,003 ^{A,c}
	120	0,683 ± 0,031 ^{B,b}	23,2 ± 0,9 ^{C,c}	1,55 ± 0,07 ^{BC,c}	4,40 ± 0,25 ^{B,b}	1,20 ± 0,12 ^{BC,b}	-	-	0,213 ± 0,003 ^{AB,b}
	240	0,754 ± 0,001 ^{B,b}	23,6 ± 1,4 ^{C,a}	1,36 ± 0,16 ^{C,a}	3,99 ± 0,33 ^{B,b}	1,36 ± 0,16 ^{C,a}	-	-	0,236 ± 0,012 ^{B,b}

* (Enzim P) Palatase® 20000 L + Lecitase Ultra®; (Enzim L) LipomodTM 801MDP + Lecitase Ultra®; (Enzim C) Lipozyme CALB + Lecitase Ultra®.

A–D: Bir enzim içinde farklı üst indislere sahip numunelerin önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir (P < 0,05). (Zaman etkisi)

a-c: Bir inkübasyon süresi içinde farklı üst indislere sahip numunelerin önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir (P < 0,05). (Enzim etkisi)

**LRI: Lineer retention indeks DB-Wax kolona göre hesaplanmıştır.

-: Saptanmamıştır.

Tablo 4.10. (Devamı)

Örnek*	İnkübasyon Süresi (dk)	Laktonlar				Alkoller			
		γ -Hekzalakton 1667	δ -Hekzalakton 1791	δ -Oktalakton 1965	δ -Dekalakton 2165	İzoamil alkol 1218	Pentanol 1260	Hekzanol 1360	Heptanol 1457
Enzim P	30	0,064 $\pm$ 0,005 ^{A,a}	0,175 $\pm$ 0,007 ^{A,a}	0,125 $\pm$ 0,010 ^{A,a}	0,306 $\pm$ 0,018 ^{B,a}	0,334 $\pm$ 0,034 ^C	0,182 $\pm$ 0,007 ^B	0,182 $\pm$ 0,006 ^{C,b}	0,066 $\pm$ 0,001
	60	0,100 $\pm$ 0,002 ^{B,a}	0,187 $\pm$ 0,006 ^{AB,a}	0,133 $\pm$ 0,004 ^{AB,a}	0,326 $\pm$ 0,001 ^{B,a}	0,187 $\pm$ 0,008 ^B	0,173 $\pm$ 0,000 ^B	0,113 $\pm$ 0,001 ^{B,b}	0,054 $\pm$ 0,002
	120	0,125 $\pm$ 0,008 ^{C,a}	0,218 $\pm$ 0,013 ^{B,a}	0,129 $\pm$ 0,003 ^{AB,a}	0,171 $\pm$ 0,006 ^{A,a}	0,083 $\pm$ 0,011 ^A	0,125 $\pm$ 0,004 ^A	0,099 $\pm$ 0,001 ^{B,a}	-
	240	0,157 $\pm$ 0,004 ^{D,a}	0,217 $\pm$ 0,002 ^{B,a}	0,155 $\pm$ 0,006 ^{B,a}	0,155 $\pm$ 0,011 ^{A,a}	-	-	0,068 $\pm$ 0,007 ^A	-
Enzim L	30	0,078 $\pm$ 0,001 ^{A,a}	0,229 $\pm$ 0,018 ^{A,a}	0,113 $\pm$ 0,002 ^{A,a}	0,413 $\pm$ 0,003 ^{A,b}	0,474 $\pm$ 0,015 ^C	0,277 $\pm$ 0,025 ^C	0,352 $\pm$ 0,013 ^{C,c}	0,134 $\pm$ 0,018 ^B
	60	0,946 $\pm$ 0,000 ^{B,a}	0,348 $\pm$ 0,037 ^{B,b}	0,155 $\pm$ 0,000 ^{B,b}	0,351 $\pm$ 0,052 ^{A,a}	0,326 $\pm$ 0,020 ^B	0,226 $\pm$ 0,010 ^{BC}	0,337 $\pm$ 0,000 ^{C,c}	0,111 $\pm$ 0,005 ^{AB}
	120	0,162 $\pm$ 0,006 ^{C,b}	0,358 $\pm$ 0,011 ^{B,b}	0,187 $\pm$ 0,007 ^{C,b}	0,437 $\pm$ 0,000 ^{A,b}	0,221 $\pm$ 0,015 ^A	0,172 $\pm$ 0,003 ^B	0,239 $\pm$ 0,019 ^{B,b}	0,073 $\pm$ 0,002 ^A
	240	0,190 $\pm$ 0,004 ^{D,b}	0,278 $\pm$ 0,007 ^{AB,b}	0,171 $\pm$ 0,010 ^{BC,ab}	0,371 $\pm$ 0,006 ^{A,b}	-	0,076 $\pm$ 0,010 ^A	0,150 $\pm$ 0,014 ^A	0,083 $\pm$ 0,007 ^A
Enzim C	30	0,182 $\pm$ 0,012 ^{A,b}	0,238 $\pm$ 0,020 ^{A,a}	0,106 $\pm$ 0,007 ^{A,a}	0,407 $\pm$ 0,008 ^{A,b}	-	-	0,109 $\pm$ 0,006 ^{B,a}	-
	60	0,216 $\pm$ 0,002 ^{B,b}	0,249 $\pm$ 0,000 ^{A,a}	0,222 $\pm$ 0,004 ^{B,c}	0,535 $\pm$ 0,030 ^{B,b}	-	-	0,064 $\pm$ 0,006 ^{A,a}	-
	120	0,236 $\pm$ 0,007 ^{B,c}	0,238 $\pm$ 0,007 ^{A,a}	0,215 $\pm$ 0,013 ^{B,b}	0,602 $\pm$ 0,023 ^{B,c}	-	-	0,073 $\pm$ 0,011 ^{A,a}	-
	240	0,234 $\pm$ 0,000 ^{B,c}	0,250 $\pm$ 0,017 ^{A,ab}	0,191 $\pm$ 0,002 ^{B,b}	0,514 $\pm$ 0,023 ^{B,c}	-	-	-	-

* (Enzim P) Palatase® 20000 L + Lecitase Ultra®; (Enzim L) LipomodTM 801MDP + Lecitase Ultra®; (Enzim C) Lipozyme CALB + Lecitase Ultra®.

A–D: Bir enzim içinde farklı üst indislere sahip numunelerin önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir (P < 0,05). (Zaman etkisi)

a-c: Bir inkübasyon süresi içinde farklı üst indislere sahip numunelerin önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir (P < 0,05). (Enzim etkisi)

**LRI: Lineer retention indeks DB-Wax kolona göre hesaplanmıştır.

-: Saptanmamıştır.

Tablo 4.10. (Devamı)

Örnek*	İnkübasyon Süresi (dk)	Ketonlar				Fenoller		Ester	
		2-Heptanon 1175	Asetoin 1288	2-Nonanon 1389	2- Undekanon 1600	Asetofenon 1650	Fenol 1978	p-Kresol 2080	Etil hekzanoat 1232
Enzim P	30	4,95 ± 0,28 ^{A,c}	3,15 ± 0,04 ^{D,b}	0,559 ± 0,018 ^{A,a}	-	-	0,079 ± 0,003 ^{A,a}	-	-
	60	4,52 ± 0,17 ^{A,a}	2,47 ± 0,00 ^{C,b}	0,648 ± 0,036 ^{A,a}	0,145 ± 0,006 ^{A,b}	-	0,169 ± 0,001 ^{B,a}	-	-
	120	5,37 ± 0,26 ^{A,ab}	1,26 ± 0,01 ^{B,c}	1,14 ± 0,03 ^{B,b}	0,230 ± 0,009 ^{B,b}	0,144 ± 0,000 ^{A,c}	0,218 ± 0,005 ^{C,a}	-	-
	240	8,86 ± 0,68 ^{B,b}	0,407 ± 0,001 ^{A,b}	1,71 ± 0,16 ^{A,b}	0,395 ± 0,037 ^{C,c}	0,168 ± 0,007 ^{B,a}	0,240 ± 0,007 ^{D,a}	-	-
Enzim L	30	2,08 ± 0,04 ^{A,a}	2,96 ± 0,17 ^{B,b}	0,470 ± 0,046 ^{A,a}	0,042 ± 0,003 ^A	-	0,155 ± 0,001 ^{A,a}	-	-
	60	3,10 ± 0,44 ^{AB,a}	3,37 ± 0,04 ^{C,c}	0,564 ± 0,024 ^{A,a}	0,051 ± 0,008 ^{A,a}	-	0,219 ± 0,007 ^{B,a}	-	-
	120	3,81 ± 0,47 ^{B,a}	0,417 ± 0,015 ^{A,b}	0,734 ± 0,003 ^{B,a}	0,073 ± 0,002 ^{B,a}	-	0,225 ± 0,002 ^{B,a}	-	-
	240	4,15 ± 0,54 ^{B,a}	0,495 ± 0,019 ^{A,c}	1,13 ± 0,03 ^{C,a}	0,115 ± 0,007 ^{C,a}	0,168 ± 0,014 ^a	0,300 ± 0,002 ^{C,b}	-	-
Enzim C	30	3,93 ± 0,23 ^{A,b}	0,225 ± 0,022 ^{B,a}	1,04 ± 0,06 ^{A,b}	0,132 ± 0,007 ^A	0,146 ± 0,011 ^A	0,483 ± 0,035 ^{A,b}	0,057 ± 0,002 ^A	-
	60	6,45 ± 0,52 ^{AB,b}	0,248 ± 0,023 ^{C,a}	1,09 ± 0,06 ^{A,b}	0,251 ± 0,010 ^{B,c}	0,194 ± 0,002 ^B	0,467 ± 0,023 ^{A,b}	0,419 ± 0,001 ^B	0,122 ± 0,013 ^A
	120	6,97 ± 1,01 ^{B,b}	0,181 ± 0,006 ^{AB,a}	1,64 ± 0,04 ^{B,c}	0,265 ± 0,016 ^{B,b}	0,213 ± 0,013 ^B	0,452 ± 0,029 ^{A,b}	0,422 ± 0,011 ^B	0,162 ± 0,010 ^{AB}
	240	6,68 ± 0,75 ^{AB,ab}	0,124 ± 0,001 ^{A,a}	2,01 ± 0,11 ^{C,b}	0,225 ± 0,003 ^{B,b}	0,224 ± 0,010 ^{B,b}	0,470 ± 0,010 ^{A,c}	0,482 ± 0,004 ^C	0,179 ± 0,006 ^B

* (Enzim P) Palatase® 20000 L + Lecitase Ultra®; (Enzim L) LipomodTM 801MDP + Lecitase Ultra®; (Enzim C) Lipozyme CALB + Lecitase Ultra®.

A–D: Bir enzim içinde farklı üst indislere sahip numunelerin önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir (P < 0,05). (Zaman etkisi)

a-c: Bir inkübasyon süresi içinde farklı üst indislere sahip numunelerin önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir (P < 0,05). (Enzim etkisi)

**LRI: Lineer retention indeks DB-Wax kolona göre hesaplanmıştır.

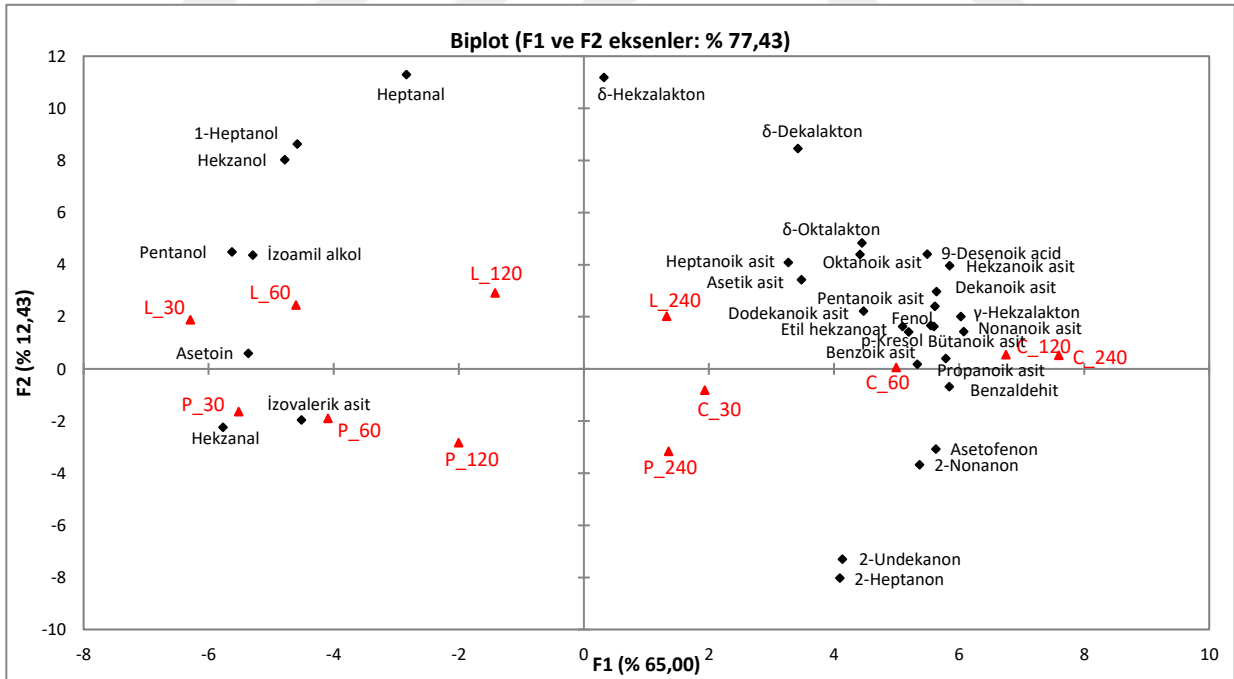
-: Saptanmamıştır.

Tüm Enzim Modifiye Tereyağı (EMT) örneklerinin uçucu profilleri incelendiğinde, en yüksek uçucu bileşik miktarının “Enzim C” ile üretilen EMT’lerle elde edildiği görülmektedir. “Enzim C” ile üretilen EMT’lerin ilk 30 dakikalık inkübasyon sonrası uçucu bileşik miktarına, diğer iki EMT örneğinin 240 saatlik inkübasyon süresi sonrasında bile ulaşamamıştır. Bu durum değerlendirildiğinde, diğer enzimlere kıyasla “Enzim C” ile üretilen emülsiyonların tepe boşluğunda (headspace) daha fazla bileşik salınmış olabileceği yorumu yapılabilir. Çünkü diğer iki EMT örneği %40 yağ içeriğine sahipken “Enzim C” ile üretilen EMT örneği %25 yağ içeriğine sahiptir. Bir aroma bileşiğinin algılanması gıda matrisi içindeki yerine, su fazına yağ-su arayüzüne bağlıdır. Yağ matrisinin çözgen görevi gördüğü ve uçucu bileşik salınımını olumsuz etkilediği bilinmektedir. Kısaca, yağ içeriği azaldıkça lezzet yoğunluğu artmaktadır (Chung ve diğerleri, 2016).

Süt yağı lipolizi ile oluşan serbest yağ asitleri ve ikincil metabolizma ürünleri, süt yağının kendine özgü lezzetinden sorumlu önemli bileşiklerdir. Olgun peynir lezzeti elde etmek için lipoliz ve proteoliz reaksiyonlarının birarada gerçekleştirildiği Enzim Modifiye Peynirde (EMP), en bol miktarda bulunan uçucu bileşikler yağ asitleridir (Bas ve diğerleri, 2019). Benzer şekilde, EMT üretimiyle de lipoliz gerçekleştirildiği için yüksek miktarda yağ asitleri oluşumu beklenen bir durumdur. Bu yağ asitleri arasında en bol miktarda bulunanlar bütirik asit, hekzanoik asit ve oktanoik asittir. Bu üç yağ asidi süt ürünlerindeki lezzet üzerinde önemli etkileri vardır ve tereyağı lezzeti elde etmek istendiğinde özellikle bütirik asit konsantrasyonunun yüksek olması beklenir (Saerens, Descamps ve Dewettinck, 2008). Bütirik asit ransit ve peynirimsi lezzet, hekzanoik asit keskin ve mavi peynir lezzeti, oktanoik asit ise sabunsu, ransit, mumsu (waxy) ve küfsü lezzet ile ilişkilendirilmektedir (Collins, 2003). EMT örneklerinde en yüksek oranda elde edilen ilk 3 yağ asidinin sırasıyla bütanoik asit, hekzanoik asit ve oktanoik asit olduğu görülmektedir. Devamında ise bu yağ asitlerini sırasıyla dekanoik asit ve asetik asit takip etmektedir. Ayrıca, “Enzim L” ve “Enzim P” ile üretilen EMT örneklerinde inkübasyon süresinin artışıyla uçucu asit oranı artarken keton, lakton ve alkollerin oranının azaldığı görülmektedir. Ancak, “Enzim C” ile üretilen EMT’de ise tersi durum söz konusudur.

Tablo 4.10’a göre Enzim Modifiye Tereyağı (EMT) örneklerinde tanımlanan uçucu yağ asitleri arasında bütirik asidin tüm inkübasyon sürelerinde ve enzim kombinasyonlarında en yüksek miktarda salındığı görülmektedir. Ancak, Kurtovic ve diğerlerinin (2011) yaptığı

çalışmada farklı lipazlarla süt yağına yapılan enzimatik muamele sonucunda uçucu bileşik miktarlarının farklılaştığı görülmekte ve en yüksek miktarda salınan USYA'nın hekzanoik asit olduğu belirlenmiştir. Bu durum lipolitik enzimlerin farklılığının lipoliz sonucu oluşan uçucu bileşik miktarı ve lezzet profili üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. İlk 30 dakikada “Enzim C” ile üretilen EMT örneğindeki bütirik asit miktarı, “Enzim P” ile üretilen EMT’den yaklaşık 5 kat, “Enzim L” ile üretilen EMT’den ise yaklaşık 4 kat daha yüksektir. Ancak 4 saattin sonundaki bu fark azalmaktadır (“Enzim P” için 2,3 kat, “Enzim L” için yaklaşık 2 kat). İnkübasyon süresine bağlı olarak “Enzim C” ile üretilen EMT’deki bütirik asit miktarı ile diğer iki EMT örneğindeki bütirik asit miktarı arasındaki farkın azalmasının nedeni “Enzim C” ile üretilen EMT’deki bütirik asit miktarının ilk 30 dakikadan sonra artmaması/nispeten sabit kalması ve buna karşın diğer iki EMT’nin bütirik asit konsantrasyonunun artması ile açıklanabilmektedir (Tablo 4.10). “Enzim C” kombinasyonunun büyük ölçüde bütirik asit özgülüğü gösterdiği uçucu bileşik profiliyle de açıkça görülmektedir. Aynı zamanda Şekil 4.8’deki PCA biplot grafiğinde “Enzim C” ile üretilen EMT’ler ile bütirik asit F1 pozitif bölgesinde yakın konumda yer almaktadır.



Şekil 4.8. EMT örneklerindeki uçucu bileşikler için PCA biplot grafiği (P: Palatase 20000 L + Lecitase Ultra; L: Lipomod 801 MDP + Lecitase Ultra; C: Lipozyme CALB + Lecitase Ultra).

Enzim Modifiye Tereyağı (EMT) örneklerinde ikinci en yüksek orandaki uçucu bileşik grubu ketonlardır. 3 farklı enzim kombinasyonu ile EMT üretimi sonucu 5 keton bileşiği tanımlanmıştır. Metil ketonlar genellikle doymuş yağ asitlerinin β -oksidasyonu reaksiyonlarından sentezlenmektedir. Tatlı (sweet), meyvemsi (fruity) ve kremsi (creamy) kokuya sahip 2-Undekanon ve 2-Nonanon süt ürünlerinin lezzetini bu yolla etkilemektedir. 2-heptanon ise mavi peynir aromasıyla ilişkilendirilmektedir (Crioni ve Bosset, 2002; Singh, Drake ve Cadwallader, 2003; Zhang ve diğerleri, 2016). Asetoin sitrat metabolizması sonucu oluşan lezzet bileşiklerinden biridir ve tereyağımsı (buttery) aroma ile ilişkilendirilmektedir (Singh ve diğerleri, 2003). Çalışma kapsamında üretilen tüm EMT örneklerinde en yüksek miktardaki keton, 2-heptanon'dur. Kremanın substrat olarak kullanıldığı ve lipolitik enzimlerle muamele sonucunda lezzet gelişimi hedeflendiği bir çalışmada benzer şekilde yüksek oranda 2-heptanon saptanmıştır (Kurtovic ve diğerleri, 2011).

Aldehitler hem aminoasitlerin katabolizması sonucu hem de doymamış yağ asitlerinin β -oksidasyonu ile oluşabilmektedir. Hekzanal bileşiğinin doymamış yağ asitlerinin β -oksidasyonu ile oluştuğu, benzaldehitin ise amino asit katabolizması sonucu oluştuğu ve “acı badem” kokusuyla ilişkilendirildiği bilinmektedir (Fox, Guinee, Cogan ve McSweeney, 2000; Bas ve diğerleri, 2019). Çalışma kapsamında 3 aldehit (heptanal, hekzanal, benzaldehit) tanımlanmıştır. Yağımsı ve çimsi lezzetten sorumlu heptanal sadece “Enzim L” ile üretilen EMT örneklerinde oluşmuş ve inkübasyon süresiyle miktarı azalmıştır. Acı badem (almond) lezzeti ile ilişkilendirilen benzaldehit miktarı inkübasyon süresiyle artmış ve “Enzim C” ile üretilen EMT’lerde daha yüksek miktarda salınmıştır (Tablo 4.10). Şekil 4.8’deki PCA biplot grafiğinde, hekzanal ve heptanal, F1 negatif bölgesinde “Enzim P” ve “Enzim L” ile üretilen EMT’lerle (her ikisinin de 240. dakikası hariç) yakın konumda yer alırken benzaldehit bileşiğinin özellikle “Enzim C” ile üretilen EMT’ler ile F1 pozitif, F2 negatif bölgesinde bulunduğu görülmektedir.

Laktonlar, hidroksi yağ asitlerinin molekül içi esterleşmesi ve halka yapısının oluşumuyla meydana gelen siklik bileşiklerdir ve meyvemsi lezzet ile ilişkilendirilirler (Collins, 2003). Ayrıca, trigliseritlerden lipoliz yoluyla salındıktan sonra hidroksi asitlerden kendiliğinden oluşabilirler (Kendirci ve diğerleri, 2016). Farklı enzim kombinasyonları içeren EMT örneklerinde 4 adet lakton tanımlanmıştır. δ -Dekalakton ise tüm EMT örneklerinde en bol bulunan laktonudur. δ -Dekalaktonun ısı ile muamele sonucunda laktoz oksidasyonu ile

oluşabilmektedir (Zhang ve diğerleri, 2016). PCA biplot grafiğinde, δ -Dekalakton ve δ -Hekzalakton F1 pozitif, F2 negatif bölgesinde “Enzim C” ile üretilen EMT’lerin tüm inkübasyon sürelerinde aynı bölgede yer alırken δ -Oktalakton ve γ -Hekzalakton F1 ve F2 pozitif bölgesinde “Enzim P” ile üretilen EMT’nin ve “Enzim L” ile üretilen EMT’nin 240.dakikasıyla (sırasıyla, P_240 ve L_240) aynı bölgede yer almaktadır (Şekil 4.6).

Esterler, süt ürünlerinde esterifikasyon ve alkoliz olmak üzere iki yolla oluşmaktadır. Özellikle meyvemsi koku oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Aynı zamanda, esterler yağ asitlerinin neden olduğu keskin ve kötü lezzete nispeten engel olabilmektedir (Bas ve diğerleri, 2019; Kendirci ve diğerleri 2020). *Rhizomucor miehei* kaynaklı Palatase® 20000 L lipazının, sulu sistemlerde alkoliz ile ester oluşumunu katalize ettiği belirtilmiştir (Liu ve diğerleri 2004). Ancak, tez çalışmasında sadece 1 ester (etil hekzanoat) oluşumu gerçekleşmiştir ve bu ester “Enzim C” ile üretilen EMT örneklerinde tanımlanmıştır. Literatürdeki süt yağı ile ilgili lipoliz çalışmalarında ester oluşumu miktar ve tür açısından çeşitlilik göstermektedir (Wang ve Xu 2009; Zhang ve diğerleri 2016). Ancak çalışma kapsamında tek bir EMT örneğinde ester oluşumu meydana gelmiştir.

4.2.3. EMT Örneklerinin Duyusal Değerlendirmesi

Tez çalışması kapsamında üretilen EMT örneklerine duyusal analiz yapılmıştır. Duyusal analizde panelistlere, örnekler önce koklatılarak meyvemsi koku ve ransidite özellikleri sonra tattırılarak asitlik özellikleri belirlenmiştir. Ardından genel değerlendirme yapılmış ve bu amaçla panelistler tarafından lezzet yoğunluğu, tereyağına benzerlik ve genel beğeni parametreleri değerlendirilmiştir.

Tablo 4.11 incelendiğinde, panelistler tarafından koklanarak belirlenen “meyvemsi koku” özelliğinin tüm EMT örneklerinde düşük olduğu görülmektedir. EMT örneklerinin uçucu bileşik profilleri göz önünde bulundurulduğunda, bu özelliğe düşük puan verilmesi açıklanabilir bir durumdur. Çünkü meyvemsi, çiçeksi lezzetten sorumlu esterler lipoliz sonucunda oluşmamış (“Enzim C” hariç) ve yine meyvemsi lezzet ile ilişkilendirilen lakton bileşikler ise çok az miktarda oluşmuştur. Meyvemsi koku özelliği lakton ve ester oluşumlarıyla ilişkilendirilmektedir. Bu bilgiden hareketle beklendiği üzere, PLS garifiğinde laktonlar ve meyvemsi koku özelliğinin yakın konumda yer aldığı görülmektedir. Ayrıca, PLS grafiğinde P_240 ve L_240 örneklerinin, meyvemsi koku ile t1 ve t2 pozitif bölgesinde 2-

nonanon ve 2-heptanon bileşikleriyle de beraber yakın pozisyonda yer almaktadır. Bu iki keton bileşiği ise meyvemsi, çiçeksi koku ile ilişkilendirilmektedir (Crioni ve diğerleri, 2002; Singh ve diğerleri 2003). EMT örnekleri “Ransidite” özellikleri açısından değerlendirildiğinde, tüm sürelerde “Enzim C” ile üretilen EMT örneklerinin yüksek skora sahip olduğu görülmektedir. Bu durum ise “Enzim C” ile üretilen EMT’lerin yüksek bütirik asit oranına sahip olmaları ile açıklanabilir.

Panelistler tarafından tadılarak değerlendirilen “Asitlik” özelliğinin en yüksek olduğu skorlar “Enzim C” ile üretilen EMT’lerin 60, 120 ve 240. dakikasında elde edilirken en düşük değerler “Enzim P” ile üretilen EMT’lerin 30. ve 60. dakikasında elde edilmiştir. “Enzim C” ile üretilen EMT örneklerinin diğer iki enzimle üretilen EMT örneklerinden yağ oranı ve pH bakımından farklı olması nedeniyle ayrılmaktadır. Bu farklılık duyuşal değerlendirme sonucunda “asitlik” özelliğinin yüksek olması ile de belirgin bir şekilde görülmektedir (Tablo 4.11). Yüksek asitlik sonucu ekşi tat oluşumu lezzet kusuru olarak nitelendirilmektedir (Singh ve diğerleri, 2003). Aynı zamanda, PLS grafiğinde “asitlik” özelliği, “ransidite” ve TUSYA ile yakın konumda yer alırken pH ile tamamen zıt konumlarda yer almaktadır (Şekil 4.9). Asitlik artışı ile pH düşeceğinden “asitlik” özelliği ile “pH” değeri arasındaki bu ilişki beklenen bir durumdur.

Son olarak “genel değerlendirme” yapılarak panelistlerden, örneklerin lezzet yoğunluğunu, tereyağına benzerliğini değerlendirmeleri ve genel beğeni hakkındaki görüşleri istenmiştir. Panelistlerin puanlarına göre örneklerdeki “Lezzet yoğunluğu” özelliği tüm EMT örneklerinde inkübasyon süresiyle artmıştır. Ancak enzim farkının etkisine bakıldığında ilk 60 dakikadaki skorlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. “Enzim L” ve “Enzim P” örneklerinin 240. dakikasında en yüksek lezzet yoğunluğu puanları elde edilmiştir. Bu durum PSL grafiğinde de açıkça görülmektedir. P_240 ve L_240 örnekleri, t2 pozitif bölgesinde yakın konumda bulunmaktadır (Şekil 4.9). Ayrıca, lezzet yoğunluğu özelliğinin TSYA(Uzun) ve ADV ile ilişkili olduğu Şekil 4.9’da net olarak görülmektedir.

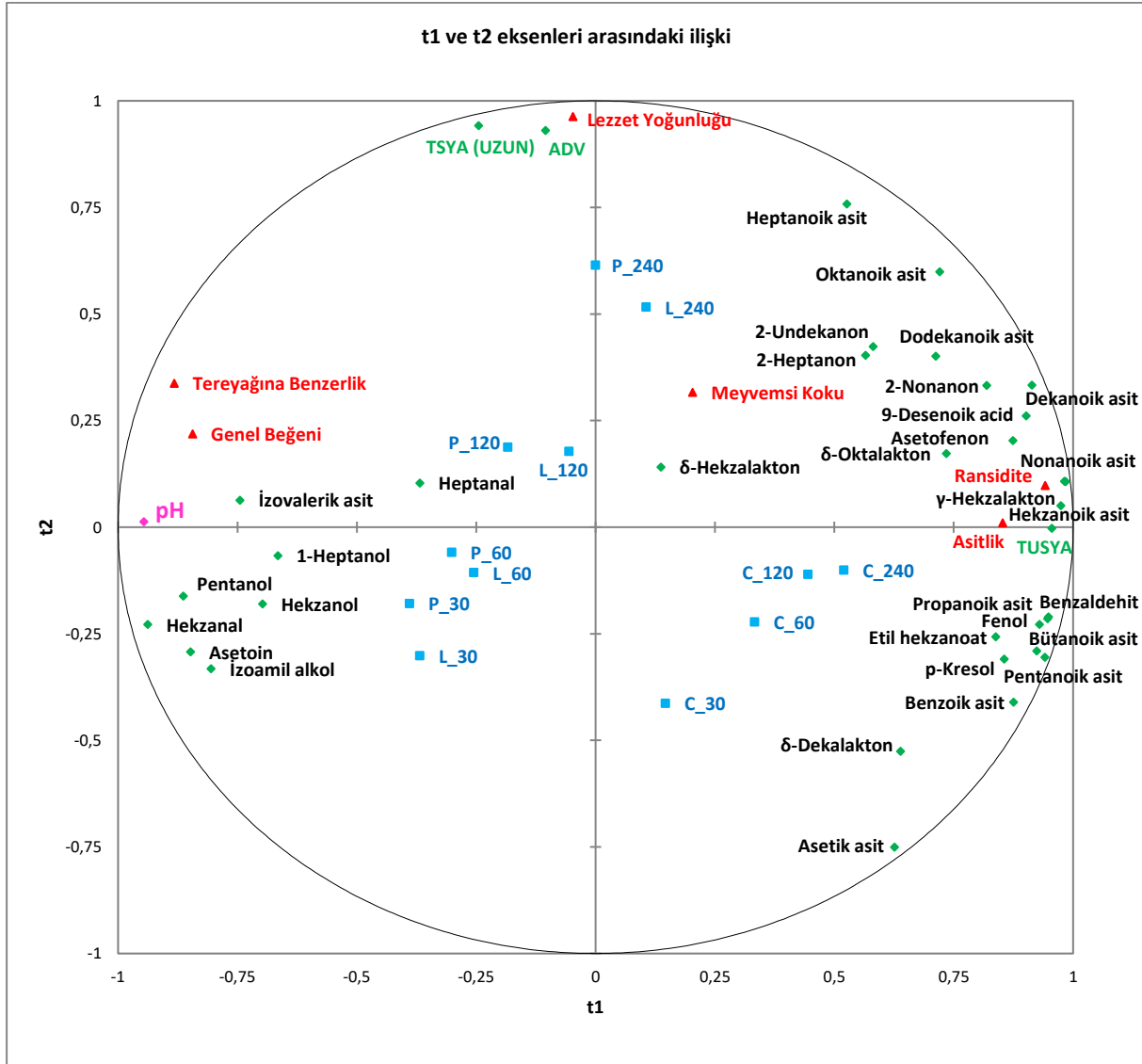
Tablo 4.11. EMT Örneklerinin Duyusal Analiz Sonuçları.

Örnek*	İnkübasyon süresi	KOKU		TAT	GENEL DEĞERLENDİRME		
		Meyvemsi Koku	Ransidite	Asitlik	Lezzet Yoğunluğu	Tereyağına Benzerlik	Genel Beğeni
Enzim C	30	1,13 ± 0,81 ^{A,a}	7,27 ± 3,18 ^{A,b}	3,98 ± 1,62 ^{A,a}	5,76 ± 1,23 ^{A,a}	1,29 ± 1,09 ^{A,a}	1,24 ± 0,71 ^{AB,a}
	60	1,98 ± 1,84 ^{AB,a}	7,74 ± 2,36 ^{A,b}	5,56 ± 1,58 ^{B,b}	6,64 ± 1,37 ^{AB,a}	2,00 ± 1,66 ^{A,a}	1,33 ± 1,16 ^{AB,a}
	120	1,31 ± 1,13 ^{AB,a}	8,12 ± 2,14 ^{A,b}	6,41 ± 1,42 ^{BC,b}	6,97 ± 0,92 ^{AB,a}	1,94 ± 1,56 ^{A,a}	1,95 ± 1,53 ^{B,a}
	240	2,79 ± 1,29 ^{B,a}	8,13 ± 1,78 ^{A,a}	7,37 ± 1,05 ^{C,b}	7,56 ± 1,24 ^{B,a}	1,69 ± 1,38 ^{A,a}	0,24 ± 0,23 ^{A,a}
Enzim L	30	2,62 ± 1,27 ^{A,b}	4,11 ± 1,56 ^{A,a}	4,14 ± 2,88 ^{A,a}	7,13 ± 1,30 ^{A,a}	7,14 ± 1,81 ^{C,b}	6,09 ± 1,89 ^{C,b}
	60	1,55 ± 1,01 ^{A,a}	4,46 ± 1,93 ^{A,a}	4,42 ± 2,46 ^{A,ab}	7,24 ± 1,42 ^{A,a}	6,39 ± 2,21 ^{BC,b}	4,99 ± 2,47 ^{BC,b}
	120	2,03 ± 1,07 ^{A,a}	6,68 ± 1,70 ^{B,b}	4,55 ± 1,25 ^{A,a}	8,36 ± 0,86 ^{AB,b}	5,14 ± 1,29 ^{AB,b}	3,10 ± 1,49 ^{AB,a}
	240	2,40 ± 1,38 ^{A,a}	7,63 ± 1,37 ^{B,a}	5,83 ± 1,83 ^{A,b}	9,17 ± 1,38 ^{B,ab}	3,86 ± 0,86 ^{A,b}	1,62 ± 0,98 ^{A,a}
Enzim P	30	1,33 ± 1,49 ^{A,a}	3,21 ± 2,27 ^{A,a}	1,76 ± 1,68 ^{A,a}	6,72 ± 1,68 ^{A,a}	7,34 ± 0,73 ^{A,b}	7,30 ± 1,08 ^{A,b}
	60	1,44 ± 0,51 ^{A,a}	3,44 ± 2,55 ^{A,a}	2,81 ± 1,62 ^{A,a}	7,46 ± 1,95 ^{AB,a}	6,90 ± 1,55 ^{A,b}	6,42 ± 1,40 ^{A,b}
	120	1,69 ± 0,81 ^{A,a}	4,36 ± 1,85 ^{A,a}	2,97 ± 1,38 ^{A,a}	7,91 ± 1,13 ^{AB,ab}	6,91 ± 1,17 ^{A,c}	6,76 ± 1,76 ^{A,b}
	240	2,11 ± 1,28 ^{A,a}	5,94 ± 2,30 ^{A,a}	3,62 ± 1,95 ^{A,a}	9,46 ± 2,07 ^{B,b}	7,63 ± 1,74 ^{A,c}	7,34 ± 2,40 ^{A,b}

* (Enzim P) Palatase® 20000 L + Lecitase Ultra®; (Enzim L) LipomodTM 801MDP + Lecitase Ultra®; (Enzim C) Lipozyme CALB + Lecitase Ultra®.

A-C: Bir enzim içinde farklı üst indislere sahip numunelerin önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir (P < 0,05). (Zaman etkisi)

a-c: Bir inkübasyon süresi içinde farklı üst indislere sahip numunelerin önemli ölçüde farklı olduğu anlamına gelir (P < 0,05). (Enzim etkisi)



Şekil 4.9. EMT örneklerindeki uçucu bileşikler, pH, ADV ve TUSYA, TSYA(UZUN) ve duyuusal özellikleri için PLS grafiği (P: Palatase 20000 L + Lecitase Ultra; L: Lipomod 801 MDP + Lecitase Ultra; C: Lipozyme CALB + Lecitase Ultra).

Tereyağına benzerlik açısından değerlendirilen EMT örnekleri arasında, “Enzim C” ile üretilenlerin çok düşük skorlara sahip olduğunu ve aslında tereyağına benzerlik göstermediği görülmektedir. “Enzim L” ile üretilen örneklerde ise artan inkübasyon süresiyle tereyağına benzerlik özelliği ters ilişkilidir. Son olarak, “Enzim P” ile üretilen örnekler içinde tereyağına en çok benzeyen örnek P_120 olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.9) ve “Enzim P” örneklerinin diğer sürelerinde inkübasyon süresine bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir artış veya azalış gerçekleşmemiştir. Bütirik asit dışında, asetoin ve δ -dekalakton tereyağı lezzetiyle ilişkilendirilmektedir (Singh ve diğerleri, 2003). Çalışmadaki uçucu bileşik profillerinde,

“Enzim P ve L” örneklerinde asetoin (Enzim P: %1,67-0,4; Enzim L: %1,24-0,01; Enzim C: %0,02-0,04) oranı “Enzim C” örneğine kıyasla daha yüksektir. Ayrıca, panelistler tarafından tüm inkübasyon süreleri için en beğenilen örnek “Enzim P” olmuştur ve ikinci sırada “Enzim L” ile üretilen örnekler yer almaktadır. Genel olarak tereyağına benzerlik gösteren EMT örneklerinin daha çok beğenildiği çıkarımı yapılabilmektedir (Şekil 4.9).



5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, Enzim Modifiye Tereyağı (EMT) üretiminde işlem koşullarının ve farklı lipaz enzimlerinin proses sürecindeki ve son ürün üzerindeki etkileri incelenmiştir.

EMT üretiminde, lipoliz üzerine enzim özgüllüğü ve konsantrasyonunun etkisiyle birlikte enzim ve substrat ortamının özelliklerinin de önemli olduğu bilinmektedir. Bu doğrultuda ilk olarak, lipoliz işleminin gerçekleştirileceği ortamın yapısına karar verilmiş ve emülsiyon ortamında lipolizin çok daha etkin gerçekleştiği görülmüştür. Daha sonrasında, emülsiyon tipine, emülgatör kullanımına, emülgatör tipine, emülgatör konsantrasyonuna, kullanılacak enzim türlerine (lipaz ve fosfolipaz enzimleri), enzim konsantrasyonlarına ve inkübasyon süre aralığına karar verilmiştir. Bu karar verme sürecinde oluşturulan emülsiyonlarda lipoliz düzeyinin maksimize edilmesi hedeflenmiş ve lipoliz düzeyinin ölçümünde asitlik düzeyi değerleri (ADV) dikkate alınmıştır. Çalışmanın 1.aşamasından elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir:

- EMT üretiminde etkin lipolizin sağlanması için substratın O/W tipi bir emülsiyona dönüştürülmesinin gerektiği saptanmıştır.
- Emülsiyon kararlılığının artırılmasının genel anlamda lipolizi olumlu etkilediği ve bu anlamda emülgatör kullanımının da lipoliz düzeyinin artırılmasına yardımcı olduğu görülmüştür. Emülgatör olarak ise HLB değeri daha yüksek olan emülgatörlerin tercih edilmesinin uygun olacağı belirlenmiştir.
- Lipaz ve fosfolipaz enzimlerinin eş zamanlı kullanımının sinerjistik etki sağlayarak lipoliz hızını ve düzeyini arttırdığı belirlenmiştir. Çalışılan enzim konsantrasyonlarında ise lipaz enzim konsantrasyonunun artışı ile lipoliz hızı artarken, fosfolipaz konsantrasyonunun belirgin bir etkisi gözlemlenmemiştir.
- Emülsiyondaki dağılmış faz olan yağ fazının oranının artışı ile emülsiyonların viskozite, türbidite, damlacık boyutu ve lipoliz düzeyi artmıştır. Emülgatör konsantrasyonunun artışı ile damlacık boyutu küçülürken türbidite ve lipoliz düzeyi artmıştır. Ancak, aşırı emülgatör kullanımının lipolizi olumsuz etkilediği saptanmıştır. Inkübasyon süresince ise emülsiyonun kararlılığını yitirdiği emülsiyon özelliklerinin ölçümünde görülmüştür.

Çalışmanın 2.aşamasında ise, 1.aşamada elde edilen deneysel sonuçlardan ve EMT üretim pratiklerinden ve de çalışmada kullanılacak her bir lipaz enzimi için yapılan ön denemelerden hareketle, farklı enzim türü ve inkübasyon sürelerinde EMT üretimleri yapılmıştır. Üretilen EMT örneklerinin ADV değerleri, pH'ları, SYA içerikleri ve miktarları, uçucu bileşik profilleri ve duyuşal özellikleri incelenmiştir. Çalışmanın 2.aşamasından elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir:

- En düşük ADV değeri, en düşük pH değeri, en yüksek TUSYA miktarı ve en yüksek uçucu bileşik miktarı “Lipozyme® CALB + Lecitase® Ultra” kombinasyonu ile elde edilmiştir.
- En yüksek ADV değerine, en yüksek TSYA ve TSYA(Uzun) miktarına “Palatase 20000L + Lecitase® Ultra” kombinasyonu ile ulaşılmıştır.
- EMT örneklerinde, 13 asit, 3 aldehit, 5 keton, 4 lakton, 4 alkol, 2 fenol ve 1 ester olmak üzere toplam 34 farklı uçucu bileşik tanımlanmıştır.
- EMT örneklerinde hoş olmayan lezzeti maskeleyen esterler neredeyse hiç oluşmamış ve yine lezzete olumlu etkisi olan laktonlar çok az miktarda oluşmuştur. Duyusal analizlerde düşük meyvemsi koku puanlarının elde edilmiş olması, bu durumla ilişkilendirilmiştir.
- Tereyağı lezzeti ile ilişkilendirilen asetoin'in, “Palatase 20000L + Lecitase® Ultra” ve “Lipomod 801 + Lecitase® Ultra” kombinasyonlarında “Lipozyme® CALB + Lecitase® Ultra” kombinasyonu kıyasla yüksek oranda bulunduğı belirlenmiştir.
- “Lipozyme® CALB + Lecitase® Ultra” kombinasyonu çok büyük oranda bütirik asit özgülüğü göstermiştir ancak tereyağına benzerlik ve genel beğeni puanı en düşük olan kombinasyon olarak belirlenmiştir.
- Tereyağına benzerlik ve genel beğeni arasında pozitif bir ilişki olduğu saptanmıştır ve bu iki özellik için de en yüksek skora sahip EMT'lerin, Palatase 20000L + Lecitase® Ultra kombinasyonu ile üretilen örnekler olduğu görülmüştür.

Tez çalışması genel olarak değerlendirildiğinde, farklı lipazların kombinasyon halinde kullanımı ile tereyağı lezzetine daha yakın nitelikte EMT'lerin üretiminin mümkün olabileceğı ve bu kapsamdaki çalışmalara devam edilmesi gerektiğı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Aloulou, A., Rahier, R., Arhab, Y., Noiriell, A., & Abousalham, A. (2018). Phospholipases: An overview. In Sandoval, G. (Ed), *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocol, Methods in Molecular Biology*, (pp. 69-105, chapter 3, vol.1835), Springer Science+Business Media, LLC.

Altuğ Onoğur, T., & Elmacı, Y., (2011). Gıdalarda Duyusal Değerlendirme. Sidas Medya Ltd. Şti., İzmir, Turkey.

AOAC International. (2012a). Loss on Drying (Moisture) in Cheese. Official Method 926.08. Official Methods of Analysis of AOAC International (19. Basım). Editör: Latimer Jr., G.W. Gaithersburg, MA: AOAC International.

AOAC International. (2012b). Fat Content of Raw and Pasteurized Whole Milk, Gerber Method by Weight. Official Method 2000.18. Official Methods of Analysis of AOAC International (19. Basım). Editör: Latimer Jr., G.W. Gaithersburg, MA: AOAC International.

Balcao, V.M., Oliveira T.A., & Malcata F.X. (1998c). Stability of a commercial lipase from *Mucor javanicus*: Kinetics modelling of pH and temperature dependencies. *Biocatalysis and Biotransformation*, 16, 45–66.

Bauer, E., Jakob, S., & Mosenthin R., (2005). Principles of physiology of lipid digestion. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 18(2), 282-295.

Biocatalysts, Lipomod™ 801 MDP, Web Sitesi: [Microsoft Word - Lipomod 801MDP \(biocatalysts.com\)](https://www.biocatalysts.com/), Erişim Tarihi: 08/07/2022.

Bourlieu, C., Rousseau, F., Briard-Bion, V., Madec, M.N., & Bouhallab, S. (2012). Hydrolysis of native milk fat globules by microbial lipases: Mechanisms and modulation of interfacial quality. *Food Research International*, 49, 533-544.

Brindisi, J.A., Parker, J.D., Turner, L.G., & Larick, D.K. (2008). Chemical profiles of hydrolyzed milk samples after treatment with commercial enzymes. *Journal of Food Science*, 66(8), 1100–1107.

Cardenas, M.L. (2015). Understanding mechanisms of enzyme co-operativity: The importance of not being at equilibrium. *Perspectives in Science*, 4,10-16.

- Chung, C., Smith G., Degner, B., & McClements, D.J. (2016). Reduced fat food emulsions: Physicochemical, sensory and biological aspects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(4), 650-685.
- Cheng, M., Zeng, G., Huang, D., Yang, C., Lai, C., Zhang, C., & Liu, Y. (2017). Advantages and challenges of Tween 80 surfactant-enhanced technologies for the remediation of soil contaminated with hydrophobic organic compounds. *Chemical Engineering Journal*, 314, 98–113.
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., & Wilkinson, M.G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13, 841–866.
- Cox, S., Sandall, A., Smith, L., Rossi, M., & Whelan, K. (2020). Food additive emulsifiers: a review of their role in foods, legislation and classifications, presence in food supply, dietary exposure, and safety assessment. *Nutrition Reviews*, 79(6), 726-741.
- Crioni, P.M.G., & Bosset, J.O. (2002). Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*, 12, 959-984.
- De Jong, C. & Badings, H.T. (1990). 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, 94-8.
- Deeth, H.C., Gerald, F. & Snow, J. (1983). A gas chromatographic method for the quantitative determination of free fatty acids in milk and milk products. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 18, 13-20.
- Eed, J. (2012). Factors affecting enzyme activity. *Essai*, 10(1), 19.
- Erbay, Z., Baş, D., Kendirci, P., Çam, M., Kelebek, H., Salum, P., & Selli, S. (2016). Lezzet katkısı olarak peynir ve enzim modifiye peynir tekniğinde güncel durum. *Akademik Gıda*, 14(2), 209-217.
- Erbay, Z., Salum, P., & Gövce G. (2017). Türkiye’de üretilen enzim modifiye süt ürünlerinin lipolitik ve proteolitik olgunlaşma düzeylerinin incelenmesi. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 23(7), 919-925.

Erbay, Z., Salum, P., & Kilcawley, K. (2021). Enzyme Modified Cheese. A.L. Kelly, L.B. Larsen (Ed), *Agent of Change* (pp. 397-416), Food Engineering Series, Springer Nature Switzerland AG.

Ferrato, F., Carriere, F., Sarda, L., & Verger, R. (1997). A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. *Methods in Enzymology*, 286, 327–347.

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M. & McSweeney, P. L. H. (Ed.). (2000). *Fundamentals of Cheese Science*, Chapter 19, (pp. 452-483), Gaithersburg, Maryland: Aspen Publication.

Giang, T.M., Gaucel, S., Brestaz, P., Anton, M., Meynier, A., Trelea, I.C., & Le Feunteun, S. (2016). Dynamic modeling of in vitro lipid digestion: Individual fatty acid release and bioaccessibility kinetics. *Food Chemistry*, 194, 1180-1188.

Goldbeter, A. (2013). Oscillatory enzyme reactions and Michaelis-Menten kinetics. *FEBS Letters*, 587(17), 2778–2784.

Golding, M., & Wooster, J.T. (2010). The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15, 90-101.

Gomes, A., De Figueiredo Furtado, G., & da Cunha R.L. (2018). Bioaccessibility of lipophilic compounds vehiculated in emulsions: choice of lipids and emulsifiers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(1), 13-18.

Grahame, D. A. S., Bryksa, B. C., & Yada, R. Y. (2015). Factors affecting enzyme activity. *Improving and tailoring enzymes for food quality and functionality* (pp. 11-55). Elsevier BV, Woodhead Publishing: Cambridgeshire, UK.

Hill Jr, C.G., Ghannouchi, S., & Garcia, H.S. (2001). Lipolysis of butter oil by immobilized lamb pregastric esterase: I. Uniresponse kinetics—pH and Temperature effects. *Journal of Dairy Science*, 84, 1034–1043.

Himmetagaoglu, A.B., Erbay, Z., & Cam, M. (2018). Production of microencapsulated cream: impact of wall materials and their ratio. *International Dairy Journal*, 83, 20–27.

ISO. 2016. Water quality — Determination of turbidity — Part 1: Quantitative methods. Geneva, Switzeland: International Organization for Standardization (ISO).

Jensen, R.G., DeJong, F.A., & Clark, R.M. (1983). Determination of lipase specificity. *Lipids*, 18(3), 239–252.

Jensen, R.G. (2002). The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*, 85(2), 295-350.

Kendirci, P., Salum, P., Bas, D. & Erbay, Z. (2020). Production of enzyme-modified cheese (EMC) with ripened white cheese flavour: II-Effects of lipases. *Food and Bioproducts Processing*, 122, 230-244.

Kilara, A. (2011). Enzymes exogenous to milk in dairy technology: Lipases. In J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney (Ed), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 728–736), London UK: Elsevier Academic Press.

Kilara, A., & Chandan, R.C. (2011). Enzyme-modified dairy ingredients. In Chandan R.C., Kilara, A. (Ed), *Dairy Ingredients for Food Processing* (pp. 317–334), USA: Wiley-Blackwell, West Sussex.

Kilcawley K.N, Wilkinson M.G., & Fox P.F. (1998). Enzyme-modified cheese *International Dairy Journal*, 8, 1–10.

Kilcawley, K. (2006). Enzyme Technology for the Dairy Industry. In K. Shetty, G. Paliyath, A. Pometto, R.E. Levin, (Ed), *Food Biotechnology*, Boca Raton: Taylor & Francis Group, CRC Press.

Kim Ha, J., & Lindsay, R.C. (1993). Release of volatile branched-chain and other fatty acids from ruminant milk fats by various lipases. *Journal of Dairy Science*, 76, 677–690.

Konkit, M., & Kim W. (2016). Activities of amylase, proteinase, and lipase enzymes from *Lactococcus chungangensis* and its application in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 99, 1–9.

Kurtovic, I., Marshall, S.N., Miller, M.R., & Zhao, X., (2011). Flavour development in dairy cream using fish digestive lipases from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and New Zealand hoki (*Macruronus novaezealandiae*). *Food Chemistry* 127, 1562–1568,

Law B.A., (2010). Enzymes in dairy product manufacture. In R.J. Whitehurst, M. van Oort (Ed), *Enzymes in Food Technology* (2nd ed., pp. 88–102), West Sussex, UK: Wiley Blackwell.

Lencki, R.W., Smink, N., Snelting, H., & Arul, J. (1998). Increasing short-chain fatty acid yield during lipase hydrolysis of a butterfat fraction with periodic aqueous extraction. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 75, 1195– 1200.

Liu, S.Q., Holland, R., & Crow, V. (2003). Synthesis of ethyl butanoate by a commercial lipase in aqueous media under conditions relevant to cheese ripening. *J. Dairy Res.*, 70, 359-363.

Li, Y., Du, W., & Liu, D. (2015). Efficient biodiesel production from phospholipids-containing oil: Synchronous catalysis with phospholipase and lipase. *Biochemical Engineering Journal*, 94, 45-49.

Martinelle, M., Holmquist M., & Hult, K. (1995). On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1258, 272-276.

Michalski, M.C., Briard, V., & Michel, F. (2001). Optical parameters of milk fat globules for laser light scattering measurements. *Dairy Science and Technology*, 81(6), 787-796.

Moskowitz, G.J., & Noelck, S.S. (1987). Enzyme-modified cheese technology. *Journal of Dairy Science*, 70, 1761–1769.

Mun, S., Decker, E.A., & McClements, D.J. (2007). Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food Research International*. 40, 770–781.

Novozymes Broşür, Palatase 20000L ve Lipozyme CALB, [Biocatalysis brochure Lipases.pdf](#), *Lipases for biocatalysis for smarter chemical synthesis*, Erişim tarihi: 08/07/2022.

Novozymes, Lecitase Ultra, [Product range Pharma.pdf](#), *Lipases for biocatalysis for smarter chemical synthesis*, Erişim tarihi: 08/07/2022.

Nyyssöola, A., Miettinen, H., Kontkanen, H., Lille, M., Partanen, R., Rokka, S., Jarvenpaa, E., Lantto, R., & Kruus, K. (2015). Treatment of milk fat with sn-2 specific Pseudozyma

antarctica lipase A for targeted hydrolysis of saturated medium and long-chain fatty acids. *International Dairy Journal*, 41, 16-22.

Piacentini, E., Mazzei, R., & Giorno, L. (2021). Comparison between lipase performance distributed at the O/W interface by membrane emulsification and by mechanical stirring. *Membranes*, 11(2), 137.

Regado, M.A., Cristovao, B.M., Moutinho, C.G., Balcao, V.M., Barros, R.A., Ferreira, J.P.M., & Malcata, F. X. (2007). Flavour development via lipolysis of milkfats: changes in free fatty acid pool. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 961–968.

Richardson, G. H. (1985). Standard methods for the examination of dairy products. *American Public Health Association* (15. ed.), Washington, DC, USA.

Robertson, J. A., Harper, W. J., & Gould I. A. (1966) Some factors affecting free fatty acid distribution in lipase-hydrolyzed milk fat I. *Journal of Dairy Sciences*, 49, 11.

Ruiz-Henestrosa, V.M.P, Ribourg, L., Kermarrec, A., Anton, M., Pilosof, A., Viau, M., & Meynier, A. (2022). Emulsifiers modulate the extent of gastric lipolysis during the dynamic in vitro digestion of submicron chia oil/water emulsions with limited impact on the final extent of intestinal lipolysis. *Food Hydrocolloids*, 124, 107336.

Saerens, K., Descamps, D., & Dewettinck K. (2008). Release of short chain fatty acid from cream lipids by commercial lipases and esterases. *Biotechnology Letters*, 30. 311-315.

Saktaweewong, S., Phinyocheep, P., Ulmer, C., Marie, E., Durand, A., & Inprakhon, P. (2011). Lipase activity in biphasic media: Why interfacial area is a significant parameter? *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 70, 8-16.

Salum, P., Güven, O., Aydemir L.Y., & Erbay Z. (2022). Microscopy-Assisted Digital Image Analysis with Trainable Weka Segmentation (TWS) for Emulsion Droplet Size Determination. *Coatings*, 12(3), 364.

Salum, P., Erbay, Z., & Selli, S., (2019). The compositional properties, proteolytic–lipolytic maturation parameters and volatile compositions of commercial enzyme-modified cheeses with different cheese flavours. *International Journal of Dairy Technology*, 72, 416–426.

Scanlon, M. G., Henrich, A. W., & Whitaker, J. R. (2018). Factors affecting enzyme activity in food processing. In Yada R.Y. (Ed), *Proteins in Food Processing* (pp. 337-365, 2.edition), Elsevier, Woodhead Publishing, Sawston, UK.

Sibeijn, M., & Wouters, J.A. (2009). Production of dairy aromas and flavours: New directions. In Corredig M. (Ed) *Dairy-Derived Ingredients: Food and Nutraceutical Uses* (470–481). Woodhead Publishing, Boca Raton, FL, USA.

Smith, M.R., Wilson R., Hepburn P.A. (1998). Assesment of the carcinogenic potential of Polyglycerol Polynicinoleate (PGPR) in rats and mice. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 747-754.

Singh, T.K., Drake, M.A., & Cadwallader K.R. 2003. Flavor of cheddar cheese: A chemical and sensory perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(4), 166-189.

Song, M., & Chang J. (2022). Thermally stable and reusable ceramic encapsulated and cross-cinked CalB enzyme particles for rapid hydrolysis and esterification. *International Journal of Molecular Science*, 23, 2459.

Stauch, B., Fisher S.T., & Cianci, M. (2015). Open and closed states of *Candida antarctica* Lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation. *Journal of Lipid Research*, 56(12), 2348-2358.

Steinke G., Cavali, M., Wancura, J.H.C., Magro, J.D., Priamo, W.L., Mibielle, G.M., Bender, J.P., & de Oliveira, J.V. (2022). Lipase and phospholipase combination for biodiesel production from crude soybean oil. *BioEnergy Research*, 15(1), 1-13.

Tamura, H., Ueno, S., Naka, A., Zhao, H., Yonekura, L., Isogai, T., Wakui, R., & Shiota M. (2021). Characterisation of aroma profile and evaluation of aroma quality in sweet cream butter. *International Dairy Journal*, 114, 104935.

Tomasini, A., Bustillo, G., & Lebeault, J.M. (1993). Fat lipolyzed with a commercial lipase for the production of blue cheese flavour. *International Dairy Journal*, 3, 117-127.

Verger, R. (1997). Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Trends in Biotechnology*, 15(1), 32-38.

Virgen-Ortíz, J.J., dos Santos, J.C.S., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Barbosa, O., Rodrigues, R.C., & Fernandez-Lafuente, R. (2019). Lecitase ultra: A phospholipase with great potential in biocatalysis. *Molecular Catalysis*, 473, 110405.

Wang, B., & Xu, S. (2009). Effects of different commercial lipases on the volatile profile of lipolysed milk fat. *Flavour and Fragrance Journal*, 24, 335–340.

Wilkinson, M.G., Doolan, I.A., & Kilcawley, K.N. (2011). Enzyme-modified cheese. In J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney (Ed), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Vol. 1., pp. 799-804) Elsevier Academic Press, London, UK.

Zhang, X. M., Ai, N. S., Wang, J., Tong, L. J., Zheng, F. P., & Sun B. G. (2016). Lipase-catalyzed modification of the flavor profiles in recombined skim milk products by enriching the volatile components. *Journal of Dairy Science*, 99, 1–15.

Zhang, R., Zhang, Z., Zhang, H., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2015). Influence of emulsifier type on gastrointestinal fate of oil-in-water emulsions containing anionic dietary fiber (pectin). *Food Hydrocolloids*, 45, 175–185.

Şekil Ek 1. EMT Örneklerinin Duyusal Değerlendirme Anketi

ENZİM MODİFİYE TEREYAĞI (EMT) DUYUSAL DEĞERLENDİRME

İsim: _____ Kod: _____ Tarih: _____

Lütfen size sunulan EMT örneğini önce koklayarak, sonra tadarak aşağıdaki özellikler açısından değerlendiriniz.
Yorumlarınızı belirtiniz. Teşekkürler.

KOKU
Meyvemi Koku

Yok		Çok Yoğun
-----	--	-----------

Ransidite

Yok		Çok Yoğun
-----	--	-----------

TAT
Asitlik

Yok		Çok Yoğun
-----	--	-----------

GENEL DEĞERLENDİRME
Lezzet Yoğunluğu

Çok düşük		Çok yüksek
-----------	--	------------

Tereyağına Benzerlik

Hiç benzemiyor		Çok Benziyor
----------------	--	--------------

Genel Beğeni

Hiç beğenmedim		Çok Beğendim
----------------	--	--------------

YORUMLARINIZ.....
.....

