SİDAS MEDYA
Akademik Gıda®
ISSN Online: 2148-015X
*http://www.academicfoodjournal.com*

Akademik Gıda 15(4) (2017) 396-408, DOI: 10.24323/akademik-gida.370264

**Derleme Makale / Review Paper**

# Peynir Üretimi İçin Sütü Pıhtılaştıran Enzimlere Genel Bir Bakış ve Güncel Gelişmeler

Songül Çakmakçı[1], Ayşin Cantürk[1], Yusuf Çakır[1,2]

[1]Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Erzurum
[2]Bingöl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Süt Teknolojisi Bölümü, Bingöl

*Geliş Tarihi (Received): 28.02.2017, Kabul Tarihi (Accepted): 05.04.2017*
*Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): cakmakci@atauni.edu.tr (S. Çakmakçı)*
0 442 231 24 91 0 442 231 58 78

## ÖZ

Farklı kaynaklardan elde edilip kullanıma hazır hale getirilen, kazeini pıhtılaştırıcı enzimlere sütü pıhtılaştıran enzim, peynir mayası veya rennet denir. Rennet (büyük oranda rennin/kimozin içeren), geviş getiren genç hayvanların midelerinin şirden bölümünden elde edilmekte ve peynir yapımında süt pıhtılaştırıcı olarak binlerce yıldır kullanılmaktadır. Dünyada peynir üretimi ve tüketimi giderek artış gösterirken buzağı renneti temininin giderek azalması, alternatif kaynaklardan buzağı renneti yerine kullanılabilecek enzim elde etme çalışmalarına hız kazandırmış, yüksek verimli üretim yöntemlerinin araştırılması zorunlu hale gelmiştir. Buzağı rennetine alternatif olarak yapılan çalışmalar; (i) bitkisel kaynaklardan elde edilen pıhtılaştırıcılar (bitkisel rennet), (ii) mikroorganizmalardan direkt olarak elde edilen ve proteolitik enzimlerden oluşan mikrobiyal peynir mayaları (mikrobiyal rennet), (iii) rennin enzimi üretiminde görevli genetik materyalin, belirli mikroorganizmalara aktarılması sonucu, bu mikroorganizmaların ürettiği rennin enzimine özdeş enzimlerden oluşan mikrobiyal peynir mayaları (rekombinant kimozin) olmak üzere sınıflandırılabilir. Rekombinant kimozin, gelişen gen teknolojisi ile birlikte hızla artan araştırmalara konu olmaktadır. Bu derlemede, hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklı enzimlerin/peynir mayalarının sütü pıhtılaştırma ve peyniri olgunlaştırma aşamalarındaki etkileri ele alınmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Kimozin, Rennin, Rennet çeşitleri, Süt pıhtılaştırıcı enzim, Peynir

## An Overview of Milk-Coagulating Enzymes in Cheese Production and Recent Developments

## ABSTRACT

Enzymes obtained from different sources and made ready for further use, which also coagulate caseins, are called milk coagulant enzyme, cheese rennet or rennet. For thousands of years, rennet (in general rennin/chymosin) from the abomasus section in stomachs of young ruminants animals has been obtained, and it has been used as milk coagulant in cheese making. As cheese production and consumption in the world have been increasing gradually, the steady declining supply of calf rennet has accelerated the acquisition of enzymes that can be used in place of alternative sources of calf rennet, and the search for highly efficient production methods has become compulsory. Studies on alternative sources for calf rennet are categorized as (i) the coagulants obtained from herbal sources (herbal rennet), (ii) the rennet source, the microbial cheese rennets consisting of proteolytic enzymes and obtained directly from microorganisms (microbial rennet), (iii) the transfer of genetic material responsible for rennin enzyme production to certain microorganisms, (recombinant chymosin), which is composed of enzymes identical to the renin enzyme that it produces. Recombinant chymosin is rapidly becoming a subject of research together with developing gene technology. In this review, the effects of animal, plant and microbial origin enzymes/cheese rennets on milk clotting and cheese ripening stages are discussed.

**Keywords:** Chymosin, Rennin, Rennet varieties, Milk-clotting enzyme, Cheese

## GİRİŞ

Sütün peynire işlenmesi sırasındaki en temel işlem sütün pıhtılaştırılmasıdır. Pıhtılaştırmada binlerce yıldır kullanılan ve hayvansal kaynaklı bir enzim preparatı olan rennet (peynir mayası, büyük oranda kimozin içeren), sütle beslenen buzağıların midesinin dördüncü bölümünden (şirden, abomasum) elde edilmektedir. Dünyada peynir üretimi ve tüketimindeki artışla birlikte buzağı rennetinin fiyatının artması ve rennet arzının azalması, yeni rennet kaynakları ve süt pıhtılaştırıcı enzimlerle ilgili alternatif arayışların artmasına sebep olmuştur [1-3]. Sütü pıhtılaştıran enzimlerin hepsi asit proteaz olup hayvanlardan, bitkilerden ve mikroorganizmalardan elde edilmektedirler [3-8]. Peynir endüstrisinde kullanılan enzimlerin en etkili olanı kimozin olmakla birlikte, bunun dışında kullanılan spesifik olmayan bazı aspartik proteazlar peynirde acı tada, protein miktarında azalmaya ve peynir randımanında ciddi kayıplara yol açabilmektedir [1-3]. Pıhtılaştırıcı enzimin kaynağına göre mayalama performansının ve peynirin kalitesinin direkt olarak etkilendiği belirtilmektedir [9]. Bu derlemede, peynir üretiminde peynir mayası adıyla kullanılan/kullanılabilecek enzimlerin özellikleri ile peynir kalitesi ve olgunlaşmasına etkileri araştırma sonuçlarına dayalı olarak anlatılmıştır.

## HAYVANSAL KAYNAKLI PIHTILAŞTIRICILAR

Hayvansal kaynaklı pıhtılaştırıcılar; kimozin, pepsin, tripsin ve kimotripsindir [8]. Proteolitik aktiviteleri çok yüksek olan tripsin ve kimotripsin peynirde acı peptid oluşmasına neden olmaktadırlar. Peynir üretiminde en yaygın kullanılan enzim, süt emme döneminde bulunan geviş getiren hayvanların, özellikle buzağıların şirdeninden elde edilen kimozin enzimi olup rennet preparatında hakim enzimdir [10]. Rennet temel olarak peynir endüstrisinde kullanılan bir aspartik proteaz çeşididir [11, 12]. Kimozin (EC, 3.4.23.4) süt proteini κ-kazeini fenilalanin (105) - metionin (106) (Phe-Met) peptid bağından kırarak çözünmeyen para-κ-kazeini oluşturur, sonuçta sütün pıhtılaşmasını sağlar [13, 14]. Kimozin bu işlem için çok spesifik olup aşırı bir proteoliz oluşturmadan proteinle peptidler arasında uygun oranı sağlamakta ve olgunlaşma sırasında peynirin acılaşmasını önlemektedir [4, 15, 16]. Kimozin pepsine göre daha yüksek pıhtılaştırma aktivitesine sahiptir ve bu peynir üretiminde istenen bir özelliktir. Pepsin ise belirli bir bölgeyi hedeflemeyen proteolitik aktivitesinden dolayı tüm protein ağını zayıflatmaktadır. Bu protein ağı süt yağını sıkıştırmakta ve peynir veriminin düşmesine neden olmaktadır [17]. Kimozin esas olarak sütü pıhtılaştırmak için kullanılır. Ancak %5-8 kadarı pıhtıda kalır ve peynirin olgunlaşması sırasında düşük proteolitik özelliğiyle farklı kazein fraksiyonlarını hidrolize ederek peynirlerin kendilerine özgü lezzetlerinin oluşmasında etkili olur [14]. Buzağının dışında kuzu, oğlak, manda yavrusu, domuz, sığır, tavşan ve tavuk midesinde de kimozin enzimi bulunmaktadır [14, 18].

Uygulamada en yaygın kullanılan hayvansal kaynaklı enzim preparatı buzağı rennetidir. Bu nedenle "standart" kabul edilir ve diğer enzimlerle karşılaştırılır [19]. Rennet, hayvanın kesildiği yaşa, beslenme şekline ve kaynağına (buzağı veya sığır) göre farklı oranlarda kimozin ve pepsin içerir. Ticari ürünlerde kimozin %50-%95 arasında değişir [20]. İyi kalitede standart buzağı rennetinde süt pıhtılaşma işleminin %88-94 kimozin tarafından gerçekleştirilmesi istenmekte, yetişmiş bir hayvandan elde edilen rennette ise %90-94 pepsin ve %6-10 kimozin bulunmaktadır [19, 22, 23]. Kimozin hidrolazlar grubunun endopeptidaz alt grubunda, izoelektrik noktası pH 4.6-4.7 olan bir enzimdir [14]. Moleküler olarak 320 aminoasit içeren tek zincirli bir polipeptiddir. Molekül ağırlığı 35600 dalton'dur ve katalitik olarak aktif aspartil gruplarının yer aldığı iki aktif bölge ile ayrılmıştır [21, 24, 25]. Kimozin, pH 5.3-6.3 aralığında oldukça stabildir. Asidik koşullarda ve pH 7'nin üzerinde aktivitesi çok azalır. Optimum sıcaklığı 41°C olup 20°C'nin altında ve 50°C'nin üzerinde pıhtılaştırma gücü çok azdır. Kimozinin farklı üç izoenzimi (A, B, C) vardır. Kimozinde A ve B'nin miktarı çok, C'nin ise azdır. Kimozin A, kimozin B'ye göre daha aktiftir, C ise A'nın bir parçalanma ürünüdür [2]. Kimozin A ve Kimozin B'nin optimum pH'ları sırasıyla 4.2 ve 3.7'dir. Prokimozin 40777 dalton molekül ağırlığında bir propeptiddir. Prokimozin pH'sı asidik olan midede, amino terminal ucunda bulunan 42 aminoasitlik propeptid kısmını kaybederek aktif kimozin molekülünü oluşturur. [21, 25, 26].

Buzağı, oğlak ve kuzu şirdeninden elde edilen rennetin %95'i kimozin geri kalanı pepsin'dir. Pepsin bir asit proteaz olup optimum pH'sı 2.0 civarındadır. Molekül ağırlığı yaklaşık 34000 daltondur [14]. Ticari olarak satılan buzağı renneti %70 kimozin ve %30 pepsin içerir. Peynir üretiminde pepsinin tek başına kullanımı sınırlıdır [14, 18]. Pepsin, midenin alt kısmındaki mukoza hücrelerinde inaktif pepsinojen halinde bulunur. Bu hücrelerden salgılanan pepsinojen, midenin asitli ortamında, küçük bir polipeptidin kopması ile etkin şekli olan pepsine dönüşür. pH 7'nin üzerinde ise hızla inaktive olur. Kimozine göre daha düşük pH'larda aktivite gösterdiği için sütün normal pH'sında pıhtılaşma süresini uzatır. Buna karşılık proteolitik aktivitesi yüksektir. Dolayısıyla rennette pepsin oranının fazla olması peynirin olgunlaşma süresince acı tat bileşenlerinin oluşumuna neden olduğundan istenmemektedir [23, 27]. Ayrıca, peynir olgunlaşmasında ortalama pH değeri (pH 4.9-5.2), pepsinin optimum pH değerinin (pH 2) üzerinde olduğu için pepsin ile üretilen peynirler biraz daha yavaş olgunlaşırlar. Bu nedenle iki enzimin karışımının kullanılması tercih edilmektedir [2].

Eskiden, pıhtılaştırıcı enzimler peynir üreticileri tarafından temizlenmiş ve kurutulmuş şirdenlerin, peynir altı suyuyla ıslatılması ile ekstrakte edimekteydi. Bu yöntem hala uygulanmaktadır ve üretilen peynir mayası hemen hemen sadece ustalık gerektiren peynirlerde kullanılmaktadır [28]. Örneğin Erzincan Tulum (Şavak) peyniri üretiminde; kullanılan rennetin ekstraksiyonu; temizlenmiş genç buzağıların şirdenlerinin gölgede ve kuru havada kurutulduktan sonra ince dilimler halinde doğranması, yaklaşık %10 NaCl içeren peynir altı suyunda (ağırlık/hacim) 1-2 hafta süresince ara ara karıştırılması ile gerçekleştirilmektedir. Süre sonunda

tülbentten süzülen süzüntü peynir mayası olarak kullanılmaktadır (Şekil 1) [29, 30]. Geleneksel Feta peyniri üretiminde de peynir mayası; sütten kesilmemiş kuzu şirdeninin kurutulup kıyılması ve belli oranlarda tuz ve su ile ıslatılarak yumuşatıldıktan sonra, daha fazla tuzla 4-5°C'de ekstrakte edilmesi ile hazırlanmaktadır [31]. Henüz ot yemeye başlamadan kesilen buzağılardan alınan ve içerdiği enzime zarar vermeden temizlenen, kurutulan ya da dondurulan şirdenler peynir mayası üretiminde kullanılır. Şirden mayası, %12-20 oranında tuz ve koruyucu içeren çözeltiler içerisine belirli oranlarda ilave edilen kıyılmış şirdenlerden enzimin özütlenmesi ile elde edilmektedir. Özütlemeden sonra çözeltiden posa ayrılmakta, çözelti filtre edilerek temizlenmektedir. Bu şekilde elde edilen sıvı maya teknik, fizyolojik, hijyenik ve duyusal olarak kodekse uygun hale getirildikten sonra kullanıma hazır hale getirilmektedir. Sıvı şirden mayası tuz ile doyurularak toz veya tablet haline de dönüştürülmektedir [8]. Modern rennet üretiminde ise şirdenler hayvanın kesiminden hemen sonra dondurulmaktadır. Ticari ekstraksiyonda, eskiye göre sadece; hammaddenin öğütülmesi, enzim eksraksiyonu, asit pH'da proenzim aktivasyonu, nötrleştirme, ekstraktın arıtılması, saflaştırma ve konsantrasyonu kapsayan küçük detaylarda değişiklikler olmuştur [20]. Zhang ve Wang [32], buzağı şirdeninin ultrasonla ekstraksiyonunun optimizasyonundan sonra daha hızlı enzim transferi olduğu ve enzim veriminin arttığını belirtmişlerdir.




Şekil 1. Erzincan Tulum (Şavak) peyniri üretiminde kullanılan, geleneksel olarak şirdenden hazırlanan buzağı renneti ve sütün pıhtılaştırılmasına ait fotoğraflar (Fotoğraf: S. Çakmakçı)

Son yıllarda, en çok üzerinde durulan konular arasında, diğer geviş getiren hayvanlar, özellikle de koyundan rennet geliştirme ve karakterizasyonu gelmektedir [20]. Çok ticari olmasa da, kuzu rennet macunu süt dolu midelerden öğütme ve sonrasında kurutma, tuzlama ve olgunlaştırma ile üretilmekte ve bazı Akdeniz ülkelerinde geleneksel koyun sütü peyniri üretiminde kullanılmaktadır [33]. Orijini koruma altına alınmış (Protected Origin Designation, PDO) statüsüne sahip tipik çeşitleri; İtalya'da Provolone, Valpadana, Pecorino Romano ve FioreSardo ve Majorero, Roncal, Idiazabal ve İspanya'da Cabrales peynirleridir [20]. Rennetin kompozisyonu üzerine geleneksel macunu hazırlama işlemleri, hayvanın yaşı, yemleme, kesim şartları önemli etkiye sahiptir [20]. Kuzu rennet macunları, serbest yağ asidi oluşumunu başlatan lipolitik enzimleri içerir. Bunlar peynirlere keskin ve acı bir aroma verirler ve serbest aminoasit oluşumunun gecikmesine sebep olabilirler [34, 35]. Sığır ve koyun rennetlerinin proteolitik farklarının olup olmadığı hususunda net bir sonuca varılamamış, ancak üretim koşulları ve enzim preparatlarının bileşiminin (örneğin, pepsin/kimozin oranı), proteolitik özellikler üzerinde etkili oldukları belirtilmiştir [36, 37].

Endüstriyel proses, geleneksel yöntemden çok büyük farklılık göstermemektedir. Şirdenler tuzlanmakta ve tabakalar halinde en az 3 ay olgunlaştırılmaktadır. Daha sonra, öğütülüp, karıştırılarak macun haline getirilmektedir [33]. Kuzu rennet macunu, lipolitik enzimler içermekte [34, 35], peynire keskin bir aroma vermektedir [20]. Buzağı rennetinin hazırlanması sırasında, kimozin ve pepsin aktivasyonu süresince lipolitik enzimler denatüre olduklarından, peynir üretiminde lipolitik enzim aktivitesi görülmemekte veya son derece sınırlı kalmaktadır. Kuzu rennet macununda bulunan lipolitik enzimlerin aktivitesi sonucu sütün yapısında bulunan trigliseritler, serbest yağ asitlerine parçalanmakta ve peynire karakteristik tat-koku veren bileşikler oluşmaktadır [35]. Kuzuların beslenmesine probiyotik mikroorganizmalar eklendiğinde [38, 39], rennet macunu enzimatik aktivitesinde, özellikle de

lipazlarla ilgili, artış görülmüştür. Probiyotikleri, rennet macunu olgunlaştırma aşamasında direkt olarak uygulamanın lipolitik ve proteolitik aktiviteyi artırdığı tespit edilmiştir [40, 41].

Rennet, yüksek pıhtılaştırma özelliği göstermeli, κ-kazein üzerine kuvvetli bir etki göstererek iyi bir aktiviteye sahip olmalıdır. Ayrılan peyniraltı suyu aktif pıhtılaştırıcı içermemelidir. Sütü pıhtılaştırmak için kullanılan peynir mayaları saf proteaz preparatlarından oluşmaktadır. Sığır pepsini, domuz pepsini, tavuk pepsini ve *Rhizomucor miehei, Rhizomucor pusillus ve Cryphonectria parasitica*'dan elde edilen asit proteazların kullanılabileceği belirtilmektedir [42]. Beyaz peynirde randıman, titrasyon asitliği, kurumadde, yağ ve tuz içeriği üzerinde buzağı renneti, mikrobiyel rennet ve rekombine mikrobiyel rennet kullanımının önemli farklılık yapmadığı bildirilmiştir [43]. Fromase 46T (*R. miehei*), Rennilase 150 L (*R. miehei*), Maxiren 50 (*Kluyveromyces marxionus* var*. lactis*) ve buzağı renneti dahil 4 farklı peynir mayası ile yapılan başka bir araştırmada da aktivitelerin aynı olduğu bildirilmiştir [44]. Ancak ısıl işlemin, serum proteinlerinin denatürasyonuna neden olarak sütün rennetle pıhtılaşma özellikleri üzerinde olumsuz etkiler yaptığı, bunu önlemek için de mikrofiltrasyonla serum proteinlerinin uzaklaştırıldığı veya ultrafiltrasyonla sütün protein içeriğinin artırıldığı belirtilmektedir [45]. Proteolitik aktivitenin fazla olması sonucu çözünmüş protein miktarının artması ile peynir randımanının düştüğü, olgunlaşma süresince acı tat oluşturma riskinin de arttığı belirtilmektedir [46]. Hayvansal rennetlerin proteolitik aktiviteleri; tavuk pepsini > domuz pepsini > sığır pepsini > buzağı kimozini olarak sıralanmaktadır. Rennetler içerisinde süt pıhtılaştırma aktivitesinin proteolitik aktiviteye oranı en fazla olan buzağı rennetidir. Bu oran buzağı rennetinde mikrobiyel rennete göre yaklaşık olarak 1.5 kat fazladır [22, 25]. Pıhtılaştırıcı enzimlerin peynir verimi üzerine etkisini incelemek için altı farklı süt pıhtılaştırıcı enzim kullanılarak (buzağı renneti, rekombinant kimozin, sığır pepsini ve buzağı renneti karışımı (50:50), *Mucor miehei, M. pusillus* ve *Endothia parasitica'*dan elde edilen mikrobiyal enzimler) eşit pıhtılaşma sürelerine ayarlanarak peynir üretilmiştir. Hayvansal kaynaklı proteazlar ve rekombinant kimozinle üretilen peynirlerin, kurumadde miktarlarının, buzağı renneti ile üretilen peynirle benzer özellikler gösterdiği tespit edilirken *E. parasitica* proteazı ile üretilen peynirde verimin önemli derecede düştüğü, çalışmanın sonucunda; en uygun ve ekonomik süt pıhtılaştırıcı enzimin buzağı renneti olduğu belirtilmiştir [11]. *R. miehei* kaynaklı mikrobiyel rennet ve buzağı renneti ile ultrafiltre sütten üretilmiş Beyaz peynirlerden, buzağı rennetiyle üretilen peynirlerin duyusal kalite açısından daha iyi olduğu belirtilmiştir [47]. Peynir üretiminde, rekombinant sığır kimozini, sığır renneti, mikrobiyal rennet ve rekombinant kuzu kimozinini kullanan Rogelj ve ark. [23], rekombinant kuzu kimozini ile rekombinant sığır kimozini kadar yüksek kalitede peynir üretilebildiğini belirtmişlerdir. Sanjuan ve ark. [48], koyun sütünden hayvansal rennet ve bitkisel rennet kullanılarak üretilen Los Pedroches peynirinin 100 günlük olgunlaşma süresince nem, protein ve su aktivitesi değerlerinin hayvansal rennet kullanılanda daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bir başka çalışmada, farklı pıhtılaştırıcı enzimler (buzağı renneti, rekombinant kimozin, *R. miehei* ve *C. parasitica* proteazları) kullanılarak Kaşar peyniri üretilmiş ve 90 gün olgunlaştırılmıştır. Buzağı renneti, rekombinant kimozin ve *R. miehei* proteazı kullanılarak üretilen peynirlerin randımanları birbirine yakın, *C. parasitica* proteazı ile üretilen peynirin randımanları ise düşük bulunmuştur. Farklı pıhtılaştırıcı enzim kullanımının peynirlerin pH, titrasyon asitliği, kurumadde, yağ, kurumaddede yağ, tuz, pıhtı sıkılığı, toplam serbest yağ asitliği ve tekstür profil analizlerini etkilemezken, protein, kurumaddede protein, suda çözünen azot, %12 TCA'de çözünen azot, %5 PTA'de çözünen azot, kazein azot, proteoz-pepton azot, olgunlaşma oranı, toplam serbest aminoasit miktarı ve duyusal özelliklerini etkilediği belirtilmiştir [49]. Şirdenden geleneksel olarak üretilen ve Erzincan Tulum (Şavak) peyniri üretiminde kullanılan sıvı peynir mayalarının, birçok yönden Peynir Mayası Standardı'na uymadığı tespit edilmiştir [28]. Bu sonuç üzerine; saflaştırmanın yapılmaması, maya kuvvetinin düşük olması ve hijyenik şartların uygun olmamasının etkili olduğu ileri sürülmüştür. Aynı şekilde, ülkemizde kullanılan ticari sıvı şirden mayaların kuvvetinin etikette belirtilenden daha düşük olduğu belirlenmiştir [50].

## BİTKİSEL KAYNAKLI PIHTILAŞTIRICILAR

Bazı ülkelerde, buzağı rennetinin pahalı ve az bulunur olması, bu enzim ile elde edilen ürünlerin vejeteryan beslenme alışkanlıklarına uygun olmaması, dini kısıtlamalar ve genetik değişiklik vb. tepkiler sonucunda hayvansal rennet sorgulanmaktadır. Bitkilerin toplanması pahalı ve işgücü gerektirdiği halde, alternatif kaynak olarak bitkisel pıhtılaştırıcıların süt teknolojisinde kullanımına ilgi giderek artmaktadır [51-53]. Bazı bitkilerde doğal olarak bulunan enzimlerden yararlanılarak süt pıhtılaştırılabilmektedir. Sütü pıhtılaştırıcı etkisi olduğu ve bazı ülkelerde sütü pıhtılaştırmada kullanılabildiği bildirilen bazı bitkiler Tablo 1'de verilmiştir. Bitkisel kaynaklı enzimler, bitkilerin kök, sap, tohum, çiçek, meyve ve yaprak gibi kısımlarının kullanılmasıyla veya farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilmektedirler [14, 53, 54]. Bunlara bitkisel kaynaklı peynir mayaları denilmektedir. Çoğu bitkisel enzimler kuvvetli proteolitik aktiviteye sahip olduklarından peynir randımanında düşüş, pıhtı niteliklerinde bozulma, tekstürde yumuşama ve acı tat oluşumu gibi kusurlara neden olabilmekte ve bu nedenler kullanımlarını sınırlamaktadır [8, 53, 55, 56]. Dolayısıyla bitki seçimi, kullanım miktarı ve mayalama süresi önemlidir. Bitkisel enzimlerin diğer enzimlerden farkı, optimum pH ve sıcaklık değerlerinin yüksek oluşu ve yüksek ısıl işlem gören sütleri de etkili olarak pıhtılaştırmasıdır [53, 57]. Bitki proteazları aspartik proteaz grubundadır. Sistein ve serin proteaz grubundaki enzimler de uygun koşullarda sütü pıhtılaştırma özelliğine sahiptir.

Bitkisel pıhtılaştırıcılar İtalya, İspanya, Portekiz, Hindistan, İsrail ve Fas gibi birçok ülkede peynir ve yoğurt yapımında kullanılmaktadır [53]. *Benincasa cerifera, Calotropis procera, Dieffenbachia maculata,*

*Solanum dobium*'un meyve kısımları, *Centaurea calcitrapa* ve *Cynara cardunculus* çiçekleri [58], İncir (*Ficus carica*, fisin), yaban enginarı-kenger otu (*Cynara cardunculus* L., kardozin), ananas (*Ananas sativa*) ve hintyağı tohumu (*Ricinus communis*) gibi bitkilerden elde edilen protezların sütü pıhtılaştırabildiği saptanmıştır. Ancak inek sütünden peynir yapımında kullanımları, aşırı proteolitik olduklarından, genel olarak başarısızdır. Bu nedenle de bitkisel pıhtılaştırıcılar küçük mandıralar veya çiftliklerde usta yapımı peynirlerde tercih edilmekten öteye gidememiştir [10]. Halk arasında teleme denilen süt ürününün üretilmesinde yaygın kullanılan bazı bitkiler aşağıda özetlenmiştir.

## İncir (*Ficus carica*)

İncir iki grup proteolitik enzim içerir: 1. Yüksek pıhtılaşma aktivitesine sahip ancak düşük proteoliz özelliğine sahip, 2. Yüksek proteolitik etkili [51, 57]. İncir, ülkemizde teleme olarak bilinen süt ürününün yapımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Teleme, hayvancılıkla uğraşan halkın çoğunlukla keçi ve koyun sütlerinden, bitkisel kaynaklı pıhtılaştırıcı kullanılarak kendi tüketimleri için ürettikleri, yapısal özellikleri ile yoğurda benzeyen tatlı tatta geleneksel fermente bir süt ürünüdür [57, 59]. Teleme üretiminde, süt kaynatılıp yoğurt mayalama sıcaklığına kadar bekletilmekte ve bitkinin bazı kısımları veya ekstraktı ilave edilerek sürekli olarak karıştırılmaktadır. Bir süre sonra süt koyulaşmakta ve katı bir görünüm aldığında teleme elde edilmektedir [53].Teleme yapımında keçi sütü tercih edilmektedir. Ülkemizde incirden teleme üretiminde; incirin yaprağı, dal uçları veya meyvesinden elde edilen özsu kullanılmaktadır [60]. Akar ve Fadıloğlu [61], incir sütünü iyon değiştirme kromatografi yöntemiyle saflaştırarak ve direkt olarak süte ilave ederek elde ettikleri telemenin pH değerlerini 6.83 ve 6.75, asitlik değerlerini %0.09 ve %0.108, protein miktarlarını %6.50 ve %3.90 olarak saptamışlardır. Direkt incir sütü ilavesiyle yapılan telemenin, daha acı bir tatta, yapı ve kıvamının daha zayıf ve serum ayrılmasının daha fazla olduğunu belirtmişlerdir [53, 61].

## Altın Çilek (*Physalis peruviana*)

Altın çilek halk arasında İnka eriği, yer çileği, yer kirazı, kış kirazı olarak da adlandırılır. Hayvansal ürünlerin bir kısmına dini nedenlerle insan beslenmesinde yer vermeyen Hindistan'da, bu bitki ile pıhtılaştırılan peynirler tüketilmektedir. Bu peynirlerin özelliği proteolitik enzimlerin fazla olması nedeniyle çabuk acılaşmasıdır. Otsu ve çok yıllık bir bitki olan altın çilek sıcak bölgelerde yetişir ve boyu 0.6-0.9 metreye ulaşabilir. Sarı ve kırmızı renkleri arasında sert bir kabuğu vardır. Kabuk ayrıldıktan sonra içinde küçük, yuvarlak yaklaşık 3 cm çapında ve turuncu renkte meyvesi bulunur. Meyvenin iç kısmında da sarı küçük renkte çekirdekler vardır. Meyve hasat edildiğinde acı bir tada sahipken bir süre sonra meyve olgunlaşır ve daha tatlılaşır [62]. Meyve bir tülbent içine alınarak sıkılmakta ve elde edilen meyvenin suyu ılık süte üç-beş damla damlatılmakta, karıştırılarak teleme elde edilmektedir [53].

## Teleme (Töreme) Otu (*Euphorbia maculata*)

Teleme otu, *Spotted spurge* veya *Prostrate spurge* olarak da isimlendirilir. *Euphorbiaceae* (Sütleğengiller) familyasından yıllık bir bitkidir. Güneşli yerlerde ve kuru topraklarda yetişir. Genellikle bahçelerde ve çimlerde ot gibi yayılmış şekilde görülür. Sert zeminlerde veya duvarlardaki çatlaklarda büyüme özelliğine de sahiptir [64]. Teleme üretiminde teleme otunun dal uçlarından elde edilen özsu ılık süt içine daldırılmakta ve sürekli karıştırılmaktadır. Karışım yoğurt gibi katı bir görünüm aldığında teleme oluşumu tamamlanmaktadır [53].

## *Solanum dubium*

*Solanaceae* (Patlıcangiller) ailesinden *Solanum innacum* gibi bazı bitkiler sütü pıhtılaştıran enzim kaynağı olarak denenmiştir. *Solanum dubium* Fresen, merkez, kuzey ve batı Sudan'da yetiştirilen bir bitkidir [7]. Odunsu dik bir kök ile ortalama 30 cm yüksekliğinde yeşil renkte bir bitkidir (Şekil 2). Meyveler kümeler halinde gruplanmış, pürüzsüz parlak yüzeyli çilekler şeklinde, çapı 1 cm olan küresel görünümdedir. Olgunlaşmamış meyveler yeşildir. Olgun meyveleri sararana kadar neredeyse kapalı dikenli bir çanak içindedir, çekirdekleri koyu kahverengidir ve testa inceden çekirdeksizdir [7]. Sudanlı süt çiftçilerinin bir kısmı keçi ve koyun sütünden beyaz yumuşak peynir yapmak için *S. dubium* çiceklerini kullanmaktadır. Sütün pıhtılaşması yaklaşık 2 saat sürmekte ve kesilmiş sütün suyunun uzaklaştırılması için peynir preslenmektedir. Hafif acı tada sahip, kırılgan ve ufalanan bir dokuya sahip peynir elde edilmektedir. Peynirdeki acılığın muhtemelen, bazı alkaloidlerin varlığı veya çiftçilerin ham tohumları kullanmaları nedeniyle işlem sırasındaki kirlilikten dolayı enzimlerin belirsiz proteolitik aktivitesinin bir sonucu olduğu değerlendirilmiştir. Saflaştırılmış enzim kullanılarak ve optimum özüt konsantrasyonuyla acılığı azaltmanın mümkün olabileceği belirtilmiştir [65]. Ancak, enzimin kimyasal özellikleriyle ilgili detaylı çalışmalara henüz rastlanmamış ve kısmen saflaştırılmış enzimlerin özellikleri üzerinde çalışmalara başlanılmıştır [7]. Tablo 2'de, *S. dubium* çekirdeği enziminin süt pıhtılaştırma ve proteolitik aktivitesi diğer koagülantlarla karşılaştırılmıştır. Tablodan, *S. dubium* enziminin, diğer bitkisel enzimler ve rennete göre yüksek pıhtılaştırma ve proteolitik aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Kısmen saflaştırılmış enzimin, ham özüt ve kontrol numunesi ile karşılaştırıldığında, yağsız sütü çöktürdüğü, sıcaklığın 20°C'den 70°C'ye çıkartılmasıyla enzim aktivitesinin de arttığı belirtilmiştir. 70°C'deki aktivitenin, 40°C ve 20°C'lerdeki aktiviteden sırasıyla 5 ve 10 kat daha yüksek olduğu görülmüştür. Sıcaklığın 80°C civarına ulaşması halinde ise aktivite hızla düşmüştür [7].

Manzano ve ark. [66], kivi meyvesi, kavun ve zencefil özünün sütü pıhtılaştırma aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemişlerdir. Kavun özleri geniş sıcaklık aralığında (45-75°C) yüksek pıhtılaştırma aktivitesi gösterirken, kivi meyvesi ve zencefil özünün dar bir sıcaklık aralığında (sırasıyla en fazla 40°C ve 63°C) yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Kivi proteazı kimozin benzeri özellikler göstermiş olup peynir üretiminde süt pıhtılaştırıcı olarak en iyi potansiyele

sahiptir. Bitki özleri karşılaştırıldığında; kivi özlerinin, ticari kimozine benzer etkilere sahip olduğu ve en yüksek potansiyeli gösterdiği ortaya konulmuştur. Ayrıca, kivi ve zencefil özleri kullanılarak elde edilen taze peynirin tekstürel özelliklerinin kimozin kullanılarak elde edilen peynir ile benzer, kavun özleri kullanılarak üretilen peynir ile farklı olduğu belirlenmiştir. Araştırmada, bitkisel kaynaklı pıhtılaştırıcılar ve kimozin arasında görülen farklılıkların peynirlerin yapısı ve lezzeti üzerindeki olası etkileri ve bitki lezzetlerinin ilavesi ile yeni peynir çeşitlerinin üretimine imkan sağlayabileceği de belirtilmiştir [66]. Başka bir çalışmada [67], ham turunç çiçeği özlerindeki proteolitik enzimlerin geniş bir sıcaklık aralığında (35-70°C) sütü pıhtılaştırma aktivitesi gösterdiğini, ham özlerin proteaz aktivitesinin, ticari rennete benzer şekilde, pıhtılaşma süresi içerisinde sütü yeterli derecede pıhtılaştırdığını tespit etmişlerdir. Proteazlar geniş bir pH (2.5-12) aralığında aktivite göstermiştir ve bu durum muhtemelen birkaç proteaz tipinin varlığından kaynaklanmıştır. Ham özüt içindeki mevcut proteazların farklı substratları hidroliz etme kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Araştırma sonucunda, turunç çiçeklerinin de peynir yapımında süt pıhtılaştırıcı olarak potansiyel proteaz kaynağı olabileceği belirtilmiştir. Sarıkaya [68], Erzurum'un kırsal bölgelerinde bol miktarda yetişen yabani çuha çiçeğinden (*Primula veris*) (Şekil 3) saflaştırılan ve karakterize edilen proteaz enziminin peynir üretiminde pıhtılaştırıcı enzim olarak kullanılabileceğini belirlemiştir.

Tablo 1. Sütü pıhtılaştıran bazı bitkiler [14, 53, 63]

| Latince adı | İngilizce adı | Türkçe adı |
|---|---|---|
| *Achillea millefolium* | Yarrow | Civanperçemi |
| *Ananas sativus* | Ananas | Ananas |
| *Articum minus* | Burdock | Dulavratotu |
| *Carica papaya* | Papaya | Papaya |
| *Centaurea spp.* | Knapweeds | Mavikantaron, Peygamber çiçeği |
| *Cicer arietinum* | Chickpea | Nohut |
| *Cirsium* and *Carlina spp.* | Thistle | Devedikeni |
| *Cynara cardunculus* | Cardoon | Yabani enginar |
| *Datura stramonium* | Datula, Jimson weed | Boru çiçeği, Şeytan elması |
| *Dipsacus sylvestris* | Teasel | Çobantarağı, Tarakotu |
| *Dolichos lubia* | Hyacinth bean | Sümbül fasulyesi |
| *Euphorbia lathyris* | Caper spurge | Sütleğen |
| *Euphorbia maculata* | Spotted spurge | Teleme (töreme) otu |
| *Ficus carica* | Fig | İncir |
| *Galium verum* | Lady's bedstraw | Yoğurt otu |
| *Gundelia tournefortii* | Tumble thistle | Kenger otu |
| *Heracleum sphondylium* | Hogweed | Hakiki yoğurt otu |
| *Lens esculenta* | Lentil | Mercimek |
| *Lupinus leguminosae* | Lupine | Acı bakla |
| *Malva sylvestris* | Mallow | Ebegümeci |
| *Phaseolus vulgaris* | Bean | Fasulye |
| *Physalis peruviana* | Goldenberry | Altın çilek |
| *Pinguicula vulgaris* | Butterwort | Yağ otu, mor çiçekli bataklık bitkisi |
| *Pisum sativum* | Pea | Bezelye |
| *Ranunculus* spp. | Buttercup | Düğün çiçeği |
| *Ricinus communis* | Castor oil seed | Hintyağı tohumu |
| *Senecio Jacobaea* | Ragwort | Kanaryaotu |
| *Solanum dulcamara* | Bittersweet | Yaban yasemini |
| *Urtica dioica* | Nettle | Isırgan otu |
| *Withania coagulans* | Withania berry | - |



Şekil 2. *Solanum dubium*: tüm bitki (sol), meyveler (sarı ve yeşil) ve çekirdekler (siyah kümeler) [7].

Tablo 2. *S. dubium* çekirdeği enzimi ve diğer bazı pıhtılaştırıcıların proteolitik aktivitelerinin karşılaştırılması [7].

| Enzim | Pıhtılaştırma aktivitesi (ünite/mL) | Proteolitik aktivite (OD* 660 nm) | Oran (ünite/OD* 660 nm) |
|---|---|---|---|
| Rennet | 249.6 | 0.05 | 4992 |
| Mucor rennet | 551 | 0.11 | 4650 |
| *E. parastica* enzimi | 750 | 0.29 | 2590 |
| *S. dubium* enzimi | 880 | 0.35 | 2490 |
| Papain | 216 | 0.59 | 367 |

*: OD=optik yoğunluk



Şekil 3. Yabani çuha (*Primula veris*) çiçeği (Fotoğraf: R. Çakmakçı)

## MİKROBİYAL PIHTILAŞTIRICILAR

Mikrobiyal enzimler 1960 yılının sonlarına doğru peynir üretiminde kullanılmaya başlanmıştır [18]. Mikrobiyal rennet, ucuz olması nedeniyle dünyada buzağı kimozininin yerine en fazla kullanılan peynir mayasıdır. Bu enzimlerin kullanımı ilk yıllarda peynirlerde erime, acı tat gibi bazı problemler oluşturmuştur [18, 69]. Mikrobiyal rennetle yapılan peynirlerin lezzetinde problemler olması tekrar buzağı kimozinin önemini ortaya çıkarmıştır. Mikrobiyal peynir mayaları iki grup altında incelenebilir:

a) Mikroorganizmalardan direkt olarak elde edilen proteolitik enzimlerden oluşan mikrobiyal peynir mayaları,
b) Rennin enzimi üretiminde görevli genetik materyalin belirli GRAS mikroorganizmalara (*Escherichia coli, Kluyveromyces lactis, Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Saccharomyces cerevisiae* vb.) aktarılması sonucu, bu mikroorganizmaların ürettiği rennin enzimine özdeş enzimlerden oluşan mikrobiyal peynir mayaları [25, 70].

Birinci grupta yer alanlar esas olarak *C. parasitica*, *R. miehei* ve *R. pusillus* ve ayrıca *A. oryzae* ve *E. parasitica*'dan elde edilen proteolitik enzimleri içeren mikrobiyal rennetlerdir. Bunlar fungal rennet olarak bilinir. Mikrobiyal enzimler arasında en iyi sonuçlar fungal kaynaklı proteolitik enzimlerden alınmış ve peynir üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu grup içerisinde yer alan ve *Bacillus* türlerinden elde edilen bakteriyel rennetlerin ise yüksek proteolitik aktiviteye sahip olmaları nedeniyle peynir mayası olarak kullanımları çok sınırlı kalmıştır. Bu tip ürünlerin piyasada tutunamaması, üretimlerinin durdurulmasına neden olmuştur [1, 2, 8, 71]. Ayrıca *B. subtilis* natto Takahashi ile kimozine benzer özellikte ürün alınabilmektedir. Mikrobiyel kaynaklı pıhtılaştırıcılar, şirden kimozini ile üretilen ürünlere yakın özelliklerde ürün vermeleri nedeniyle ticarette yaygın şekilde kullanılabilecek kaynak oluşturmaktadırlar [1, 2]. Buzağı rennetine alternatif enzim kaynakları araştırma çalışmaları sonucunda; *Pleurotus sajor-caju* (white rot fungus), *Mucor bacilliformis*, *Thermoascus aurantiacus*, *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, *Metschnikowia reukaufii*, *Myxococcus xanthus*, *Enterococcus faecalis*, *Nocardiopsis* sp., *B. subtilis*, *Bacillus licheniformis* gibi mikroorganizmaların yeni enzim kaynakları olabileceği görülmüştür [22].

Mikrobiyal rennetlerin proteolitik aktivitelerinin; *Bacillus polymyxa* > *C. parasitica* > *R. miehei* > *R. pusillus* olarak sıralanabileceği [22], Mikrobiyal enzimler, buzağı rennetinden daha yüksek oranda spesifik olmayan proteolitik aktiviteye sahiptirler. *C. parasitica*'dan elde edilen proteaz ise en yüksek değere sahiptir [11, 47]. *C. parasitica* kaynaklı mikrobiyal enzim ve buzağı renneti kullanarak koyun ve inek sütünden yapılan Beyaz ve Kaşar peynirlerin kimyasal özelliklerinde önemli bir fark bulunmadığı, ancak mikrobiyal enzim kullanılarak üretilen peynirlerin daha yüksek duyusal puan aldıkları saptanmıştır [72]. *R. miehei* kaynaklı mikrobiyal enzim ve şirden mayası kullanılarak üretilen Beyaz ve Kaşar peynirlerinin, çoğu kimyasal özellik üzerine etkilerinin farklı olmadığını, tek farklılığın suda eriyen azot oranları ve olgunluk durumlarında ortaya çıktığı belirtilmiştir [73]. Feta peyniri üretiminde buzağı rennetinin yerine kullanılabilecek renneti belirlemek için yapılan bir çalışmada; buzağı renneti ile ticari olarak üretilen Noury rennet (*M. pusillus* Lindt), Rennilase (*M. miehei*) ve Suparen (*E. parasitica*) olarak bilinen üç mikrobiyal rennet kullanılmıştır. Peynirlerin randıman, kurumadde, tuz ve protein içerikleri benzer bulunurken,

proteoliz düzeylerinin farklı olduğu tespit edilmiştir. Peynirde en yüksek proteoliz düzeyinin buzağı renneti ile üretilen peynirde olduğu, bunu sırasıyla Rennilase, Noury rennet ve Suparen'in izlediği tespit edilmiştir [74]. Pıhtılaşma süresi üzerine pH'nın etkisini inceleyen Budtz [75], sığır pepsini, buzağı renneti, *C. parasitica, R. pusillus* ve *R. miehei* enzimlerini kullanarak sütü pıhtılaştırmış ve buzağı rennetine yakın pıhtılaşma zamanını *R. miehei* enzimiyle elde etmiştir. Ayrıca, *R. miehei* enzimiyle peyniraltı suyuna geçen protein miktarının kimozinden daha fazla olduğu, ancak bu farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirtilmiştir. Johnston ve ark. [76], *R. miehei* ve buzağı renneti kullanarak ürettikleri Cheddar peynirlerinde duyusal özellikler arasında önemli bir farklılık bulunmadığını, ancak, *R. miehei* enziminin β-kazein üzerinde yüksek bir proteolitik etki gösterdiğini dolayısıyla da peynirlerin daha kısa sürede olgunlaştığını tespit etmişlerdir. Eraz [77], *R. miehei*'den ve şirdenden elde edilen pıhtılaştırıcı enzimler ile üretilen Beyaz peynir telemelerinin kurumadde, yağ, titrasyon asitliği, pH, toplam azot ve protein olmayan azot değerleri açısında istatistiksel olarak fark bulunmadığını bildirmiştir. Yun ve ark. [78], *E. parasitica*, *M. miehei* ve hayvansal kaynaklı kimozin olmak üzere 3 farklı pıhtılaştırıcı ile ürettikleri Mozzarella peynirlerinde pH, nem, yağ, protein, tuz ve Ca parametrelerinde önemli bir faklılık olmadığını belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada, hayvansal (%90 kimozin ve %10 pepsin) ve mikrobiyal enzim (*R. miehei*) kullanılarak ultrafiltrasyon ve geleneksel yöntemle salamura Beyaz peynir üretilmiştir. 60 günlük olgunlaştırma süresince peynirlerin suda çözünen azot, protein olmayan azot ve tirozin miktarları az bir artış gösterirken, bu artış mikrobiyal enzimle üretilen peynirlerde daha fazla olmuştur. Duyusal olarak ise hayvansal enzimle üretilen peynirler daha fazla beğenilmiştir [47]. Kim ve Kim [79], Cheddar peynirinin olgunlaşması üzerine *M. miehei* enzimiyle üretilen peynirin, buzağı kimozini ile üretilen peynire göre peynir suyuna geçen yağ ve protein oranının daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Şahan ve Konar [63], mikrobiyal kaynaklı enzimlerin (*M. miehei, M. pusillus* ve *E. parasitica*) abomasum kaynaklı peynir mayasına göre daha yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduklarını ve peynirin tat ve tekstüründe bozulmalara neden olduğunu belirlemişlerdir. Buzağı renneti ve mikrobiyal rennetler (*A. niger* proteazı ve *R. miehei* proteazı) kullanılarak üretilen ve 90 gün olgunlaştırılan Tulum peynirlerinde; buzağı renneti ile üretilen peynirlerin daha sert, daha yapışkan ve daha esnek olduğu, en yüksek lipid oksidasyonunun buzağı renneti ile yapılan peynirde tespit edildiği, en yüksek proteoliz düzeyinin *A. niger* proteazı ile üretilen peynirde görüldüğü belirlenmiş ve bu sonuca göre 90 gün sonra tüketilen Tulum peyniri için bu proteazın daha uygun bir pıhtılaştırıcı olduğu ifade edilmiştir [80]. Lemes ve ark. [81], *Bacillus* spp. P45'ten süt pıhtılaştırma yeteneğine sahip bir proteaz elde ederek enzimin chia ve kinoa unu ile zenginleştirilmiş krem peynir geliştirilmesinde uygulanabilirliğini araştırmışlardır. Enzimin süt pıhtılaştırma gücü ticari kimozine benzer bulunmuştur. Geliştirilen peynir yüksek su tutma kapasitesi (%99.0) ve dolayısıyla düşük sinerezis göstermiştir. Yeni proteaz, yüksek koagülasyon aktivitesi ve süt proteinlerini hidroliz edebilme yeteneği göstermiştir. Ürün, yüksek düzeyde su tutması ve yüksek oranda lif içermesi ile dengeli, sağlığa yararlı bir lif kaynağı olarak tüketilebileceğini desteklemektedir. Ayrıca, saflaştırılmış enzim, fonksiyonel katkı maddeleri içeren yeni süt ürünlerinin geliştirilmesi gibi yenilikçi biyoteknolojik prosesler için alternatif koagülant olduğunu göstermektedir [81].

İkinci grupta yer alan mikrobiyal peynir mayaları rekombinant kimozin olarak bilinmektedir. Rekombinant kimozin esas olarak funguslardan üretilir, fakat bakterilerden de üretilebilir. En yaygın kullanılan mikrorganizmalar *A. niger, Kluyveromices lactis* ve *E. coli*'dir. Bu üç türün genetik ve metabolik yolları, özellikle *A. niger* ve *E. coli*'yi kimozin üretimi gibi rekombinasyon denemelerinde başarılı yapmaktadır. Kimozin üretiminde en yaygın kullanılan *A. niger, Aspergillus niger* var. *awamori*'dir. Rekombinant kimozin, ayrıca fermente üretilen kimozin olarak da bilinir, genetik olarak değiştirilen buzağı kimozini geni taşıyan mikrorganizmalardan elde edilen enzim preparatlarıdır [67]. Doğal rennet üretiminde sıkıntı yaşanırken, rekombinant kimozin üretimindeki gelişmeler ve Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA)'nin 1997'de GRAS (Generally Recognized as Safe-Genellikle Güvenli Kabul Edilen Katkılar) bileşen olarak kullanımına izin vermesi, kısmen de olsa ihtiyacın karşılanmasını sağlamıştır. Hayvansal kodlu kimozinler küresel pazarın %70'den fazlasını, mikroorganizmalarda rekombinant protein olarak %80'i fermente kimozin ve en yaygın olarak Aspergillus ve mayada üretilen proteinler oluşturmaktadır [3].

Dünyada, peynir üretimi için yılda 100 milyon dolar değerinde kimozin kullanılmaktadır. Bu geniş kullanım nedeniyle büyük ölçekte rekombinant kimozin üretimi yoluna gidilmiş ve inek kimozini *E. coli*'de klonlanmıştır. Bu rekombinant kimozin FDA'nın 1990'da insan tüketimi için onayladığı ilk genetik mühendisliği ürünü olmuştur [82]. Rekombinant kimozin; rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak elde edilen ilk enzimdir. 1984 -1985 yılları arasında Danimarka'da Chr. Hansen A/S Bio Ingredients şirketi, kimozin enzimini kodlayan genleri buzağı midesinden izole etmişlerdir. Genetik modifikasyonla *K. lactis'*e ve *Aspergillus* spp. cinsi küflere aktarmışlar ve bu mikroorganizmaları kullanarak kimozin üretimini gerçekleştirmişlerdir [83]. Bu şekilde üretilen kimozin, artık birçok ülkede peynir üretiminde yaygın olarak kullanılmakta ve istenen sonucu vermektedir [84-86]. Rekombinant kimozinin, tüm özellikler açısından buzağı kimozinine benzemesinden ve saflık derecesinin yüksek olmasından dolayı olgunlaşma süresinin kusursuz gerçekleştiği belirlenmiştir [2, 21, 22]. Değişik araştırmacılar tarafından *B. subtilis, Bacillus cereus, B. polymyxa, C. parasitica, R. miehei, R. pusillus, Fusarium moniliforme, Penicillium expansum, Aspergillus versicolor* ve *Irpex lactis*'i de içine alan mikroorganizmaların proteinazları ekstrakte edilerek sütü pıhtılaştırma özellikleri incelenmiştir [22]. Bunlar içinde fungal kaynaklı *R. pusillus, R. miehei, C. parasitica, A. oryzae* ve *Irpex lactis*'den elde edilen proteazlar peynir üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [25]. Rekombinant kimozin *E. coli,*

*S. cerevisiae, K. lactis, Aspergillus nidulans, A. niger* ve*Tricoderma reesei*'ye prokimozin geninin klonlanması ve daha sonra fermentasyon yoluyla üretilmesiyle elde edilmektedir [21, 22].

Buzağı rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesinin %5-50'si pepsinden kaynaklanabilirken, mikrobiyal rekombinant kimozin preparatları pepsin içermez. Böylelikle bu iki enzimle yapılan peynirlerin proteolizleri arasında küçük farklılıklar görülür [10]. Rekombinant kimozinin avantajları şöyle sıralanabilir: Artan peynir mayası ihtiyacı buzağı kesmeden karşılanabilir, çok daha büyük miktarlarda üretim yapılabilir, standart kalite ve maksimum verim sağlanır, enzimin saflığı yüksek olduğu ve pepsin içermediği için peynirin olgunlaşma süreci kusursuz gerçekleşebilir, kalitesiz şirden kullanımından dolayı kaynaklanan peynir kusurlarına rastlanmaz [10]. Ancak bunlarla ilgili de başka mahzurların olabileceği düşünülmeli, daha fazla araştırma yapılmalıdır.

Standart olarak kabul edilen hayvansal kaynaklı enzim buzağı renneti ile rekombinant kimozinin karşılaştırıldığı çalışmalara bakılacak olursa; koyun sütünden Beyaz peynir üretiminde peynir mayası olarak ticari buzağı renneti (A), rekombinant kimozin (*A. niger* var. a*wamori*'den elde edilen*)* (B) ve mikrobiyal rennet (*R. miehei* elde edilen) (C) kullanılmıştır. Olgunlaşma süresince çeşidin ve depolama periyodunun; peynirlerin duyusal karakteristikleri, titrasyon asitliği ve kurumadde değerleri üzerine önemli etkisi olduğu saptanmıştır. Rekombinant kimozin ile üretilen B peynirinin bütün kalite özellikleri ticari buzağı renneti ve mikrobiyal rennetle üretilen peynirlere oldukça benzer bulunmuştur. B peyniri en düşük proteolitik aktiviteye sahip olurken, diğer peynirlere göre en yüksek duyusal puanları aldığı da görülmüştür. Aynı araştırma sonucunda Beyaz peynir üretiminde rekombinant kimozinin; ticari buzağı rennetine ve mikrobiyal rennete alternatif olarak başarılı bir şekilde kullanılabileceği rapor edilmiştir [87]. Green ve ark. [88], Cheddar peyniri üretiminde *E. coli* kaynaklı rekombinant kimozin ve buzağı renneti kullandıkları araştırma sonucunda; her iki enzimle üretilen peynirlerde peyniraltı suyuna geçen protein ve yağ oranları arasında farkın bulunmadığını belirlemişlerdir. Poliakrilamid jel elektroforez ve %2.5 trikloroasetik asit (TCA)'de çözünür azot sonuçları gibi peynirlerde proteoliz düzeylerini gösteren özellikler ve duyusal açıdan farklılık olmadığını bulmuşlardır. Saldamlı ve Kaytanlı [44], fromase, maxiren, rennilase ve buzağı renneti kullanarak ürettikleri Beyaz peynirlerde olgunlaşmanın 1., 30., 60. ve 90. günlerinde duyusal özellikler açısından önemli farklılıklar bulunduğunu ve rekombinant kimozin ile üretilenlerin en az buzağı renneti kadar beğenildiğini belirtmişlerdir. Broome ve ark. [89], rekombinant kimozin, *C. parasitica* proteazı (thermolase) ve *R. miehei* proteazları (fromase ve marzyme) kullanarak ürettikleri Cheddar peynirlerinde, rekombinant kimozinin αs1-kazeine karşı, *C. parasitica* proteazının (thermolase) ise β-kazeine karşı daha proteolitik aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Hicks ve ark. [90], *E. coli*'den gen teknolojisi ile elde edilen rekombinant kimozin ve buzağı renneti kullanarak üretikleri Cheddar ve Colby peynirinde, peynirler arasında bir farklılık saptanmadığını ifade etmişlerdir.

Dave ve ark. [91, 92], starter kültür olarak tek kültür (*Streptococcus thermophilus*) ve karışık kültür (*S. thermophilus* ve *Lactobacillus helveticus*); pıhtılaştırıcı enzim olarak rekombinat kimozin ve *C. paracitica* proteazı kullanarak ürettikleri Mozarella peynirlerini 4°C'de 30 gün olgunlaştırmışlardır. Peynirlerde olgunlaşma süresince rekombinant kimozinin αs1-kazeini, *C. paracitica* proteazının ise β-kazeini daha fazla hidrolize ettiğini belirlemişlerdir. Bines ve ark. [93], *K. lactis*'den gen teknolojisi ile elde edilen rekombinant kimozin ve buzağı renneti ile üretilen Cheddar peynirlerinde 12 aylık depolama süresince kimyasal ve duyusal özellikler açısından belirgin bir farklılık görülmediğini ve olgunlaşma süresince protein parçalanmasının her iki peynirde hemen hemen aynı seviyede olduğunu tespit etmişlerdir. Çepoğlu [94], ticari buzağı renneti, *A. niger* var. *awamori*'den elde edilen rekombinant kimozin ve *R. miehei* proteazı kullanarak üretip 4°C'de 60 gün olgunlaştırdığı Beyaz peynirlerde, farklı pıhtılaştırıcı enzim kullanımının peynirlerin kimyasal, duyusal ve proteoliz özelliklerini etkilediğini belirlemiştir. Kim ve ark. [95], rekombinant kimozin, *C. parasitica* proteazı ve bunların kombinasyonlarını (rekombinant kimozin: *C. parasitica* proteazı (100:0, 0:100, 67:33 ve 33:67) kullanarak ürettikleri Cheddar peynirlerinde, pıhtılaştırıcı enzim çeşidinin peynirlerin proteoliz düzeylerini etkilediğini, yüksek proteolizin ve erimenin *C. parasitica* proteazı ile üretilen peynirlerde görüldüğünü belirlemişlerdir. Abdel-Kader [96], mikrobiyal rennet (suparen) ve rekombinant kimozin (maxiren) kullanılarak inek sütünden üretilen Domiati peynirlerinden, mikrobiyal rennetle yapılan peynirlerde protein hidrolizinin daha yüksek olduğunu, her iki pıhtılaştırıcı enzimin de peynirlerde acılaşmaya neden olmadığını bildirmiştir. Kandarakis ve ark. [97], *E. coli*'den elde edilen rekombinant kimozin ile buzağı renneti kullanılarak üretilen Feta peynirlerinin pıhtı sertliği ve sineresis miktarlarının aynı seviyede olduğunu, peynirlerin duyusal özelliklerinin olgunlaşma süresince farklılık görülmediğini belirtmişlerdir. *E. coli* K12 türevli rekombinant kimozin (chymax), *R. miehei*'den elde edilen mikrobiyal rennet (fromase) ve buzağı renneti kullanılarak Edam, Camembert ve Kortowski peynirlerinin üretildiği bir çalışmada, rekombinant kimozin ve buzağı renneti kullanılarak üretilen peynirlerde protein parçalanmasının önemli olmadığı, peynir randımanının ise mikrobiyal rennet kullanılarak üretilen peynirlerde daha düşük bulunduğu belirtilmiştir [98]. Yun ve ark. [78, 99], *C. parasitica, R. miehei* proteinazları ve fermentasyon türevli rekombinant kimozin kullanılarak üretilen Mozzarella peynirlerinde; pıhtılaştırıcı enzimlerin, peynirlerin pH, nem, protein ve yağ içeriğini etkilememesine karşın, tuz, kurumaddede yağ, proteoliz düzeyleri ve erime özelliklerini etkilediğini bildirmişlerdir. *Pichia pastoris* süpernatant kültüründe rekombinant kimozin enzimini ilk kez üreten Vallejo ve ark. [12], bu mikroorganizmayı seçme nedenleri olarak mikroorganizmanın kendine yabancı rekombinant proteinlerin üretiminde ve sekresyonunda çok kullanışlı olmasını belirtmişlerdir. Ancak üretim aşamasında rekombinant *E. coli* ve *P. pastoris* suşlarının seçimi için zeosin antibiyotiğini kullanmaları maliyeti artırmıştır. Sheehan ve ark. [100],

rekombinant kimozin, *R. miehei* ve *R. pusillus* proteazları kullanarak ürettikleri yağı azaltılmış Mozzarella peynirinde farklı pıhtılaştırıcı enzim kullanımının, peynirin birincil proteoliz düzeylerini etkilediğini, en büyük etkiyi *R. pusillus* proteazının yaptığını belirlemişlerdir. El-Sohaimy ve ark. [101], buzağı abomasumundan saflaştırdıkları RNA'lardan RT-PCR yöntemiyle ürettikleri cDNA'yı kullanarak *E. coli*'de rekombinant kimozin üretmeyi başarmışlardır. Bu kimozin ile yaygın olarak kullanılan emsalleri karşılaştırıldığında, rekombinant kimozinin diğerlerine göre %105 oranında daha fazla pıhtılaştırıcı aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Merheb-Dini ve ark. [102], *T. indicae-seudaticae* N31 ve ticari peynir mayası ile üretilen Prato peynirlerinde 60 günlük olgunlaştırma süresinde, peptid profilindeki bazı farklılıklara rağmen, peynir verimi ve diğer özelliklerde farklılık bulunmadığını tespit etmişler, bu nedenle de *T. indicae-seudaticae* N31'in kaliteli Prato peynirleri üretiminde kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır.

## SONUÇ

Ülkemizde ve dünyada hızlı nüfus artışıyla birlikte artan gıda ihtiyacı, yüksek verimli üretim yöntemlerinin araştırılmasını zorunlu kılmaktadır. Bu bağlamda, peynir üretim ve tüketiminin de artması, yaygın ve geleneksel yöntemle peynir üretiminde kullanılan şirdenlere olan ihtiyacı da artırmıştır. Buzağı sayısının yetersizliği peynir üretimi yapan firmaları uzun zamandır büyük bir hammadde ihtiyacı ile karşı karşıya bırakmıştır. Buzağı kimozinine alternatif olarak, bitkisel kaynaklardan elde edilen pıhtılaştırıcıların kullanılması ise bunların proteolitik aktivitelerinin yüksek olması nedeniyle peynir veriminin düşmesine yol açmıştır. Bu da endüstriyel üretim için bitkisel kaynaklı pıhtılaştırıcıların kullanımını sınırlamaktadır. Ancak, bitkisel enzimlerin maliyetlerinin düşük olması nedeniyle endüstride kullanımına yönelik araştırmaların arttırılması önerilebilir. Bir diğer kimozin kaynağı olan rekombinant kimozin ise gen teknolojisindeki gelişmelerle artan kimozin ihtiyacının da hızla karşılanabileceğini göstermektedir. Yapılan araştırmalar, rekombinant kimozinin hayvanlardan elde edilen kimozin ile eşdeğer olduğunu, gen aktarımı sayesinde mikroorganizmalar aracılığı ile kimozini saf olarak elde etmenin mümkün olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan gen teknolojisinin taşıdığı potansiyel riskler peynir teknolojisi için de geçerlidir. Rekombinant kimozin, bileşiminin standart ve özelliğinin spesifik olması nedeniyle endüstriyel peynir üretiminde bazı avantajlar sağlamakta, ancak, bazı bölgelerde tüketici tarafından kabul görmemektedir. Elde edilen sonuçlar, teknolojik ilerlemelere ve bilimsel araştırmalardan elde edilen bulgulara rağmen, buzağı kimozininin peynir üretiminde en çok tercih edilen süt pıhtılaştırıcı olduğunu ve bilimsel çalışmalarda referans olarak kullanıldığını göstermektedir.

## KAYNAKLAR


[1] Shieh, C.J., Thi, L.A.P., Shih, I.L., 2009. Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis* natto. *Biochemical Engineering Journal* 43: 85-91.

[2] Üçüncü, M., 2004. A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi. Cilt 1. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, 543 s.

[3] Wei, Z.Y., Zhang, Y.Y., Wang, Y.P., Fan, M.X, Zhong, X.F., Xu, N., Lin, F., Xing, S.C., 2016. Production of bioactive recombinant bovine chymosin in tobacco plants. *International Journal of Moleculer Science* 17, 624.

[4] Tejada, L., Abellán, A., Prados, F., Cayuela, J.M., 2008. Compositional characteristics of Murcia al Vino Goat's cheese made with calf rennet and plant coagulant. *International Journal of Dairy Technology* 61(2): 119-125.

[5] Egito, A.S., Girardet, J.M., Laguna, L.E., Poirson, C., Molle, D., Miclo, L., Humbert, G., Gaillard, J.L., 2007. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein. *International Dairy Journal* 17: 816-825.

[6] Guiama, V.D., Libouga, D.G., Ngah, E., Beka, R.G., Ndi, K.C., Maloga, B., Bindzi, J.M., Donn, P., Mbofung, C.M., 2010. Milk-clotting potential of fruit extracts from *Solanum esculentum*, *Solanum macrocarpon* L. and *Solanum melongena*. *African Journal of Biotechnology* 9(12): 1797-1802.

[7] Ahmed, I.A.M., Morishima, I., Babiker, E.E., Mori, N., 2009. Characterization of partially purified milk clotting enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds. *Food Chemistry* 116: 395-400.

[8] Yetişemiyen, A., 2007. Süt Teknolojisi. Ankara Üniv. Basımevi, Ankara, 142 s.

[9] Broome, M.C., Limsowtin, G.Y.K., 1998. Milk coagulants. *Australian Journal of Dairy Technology* 53(3): 188.

[10] Dervişoğlu, M., Aydemir, O., Yazıcı, F., 2007. Peynir yapımında kullanılan pıhtılaştırıcı enzimler ve kazein fraksiyonları üzerine etkileri. *Gıda* 32(5): 241-249.

[11] Üstünol, Z., Hicks, C.L., 1990. Effect of milk-clotting enzymes on cheese yield. *Journal of Dairy Science* 73(1): 8-16.

[12] Vallejo, J.A., Ageitos, J.M., Poza, M., Villa, T.G., 2008. Cloning and expression of buffalo active chymosin in *Pichia pastoris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 10606-10610.

[13] McMahon, D.J., Brown, R.J., 1984. Enzymic coagulation of milk casein miselles. *Journal of Dairy Science* 67: 745-748.

[14] Metin, M., 1998. Süt Teknolojisi: Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. Ege Üniv. Müh. Fak. Yay. No: 33.

[15] Stepaniak, L., 2004. Dairy enzymology. *International Journal of Dairy Technology* 57(2/3): 153-171.

[16] Shamtsyan, M., Dmitriyeva, T., Kolesnikov, B., Denisova, N., 2014. Novel milk-clotting enzyme produced by *Coprinus lagopides* basidial mushroom. *Food Science and Technology* 58: 343-347.

[17] Atacı, N., 2001. *Mucor miehei* Rennetin ve *Mucor miehei* Rennet-Dekstran Konjugatlarının Spektrofluorometrik Yöntemle İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul.

[18] Akın, N., 1996. Peynir yapımında kullanılan süt pıhtılaştırıcı enzimler ve bunların bazı özellikleri. *Gıda* 21(6): 435-442.
[19] Şahan, N., Yaşar, K., 2002. Peynir üretiminde kullanılan pıhtılaştırıcı enzimler. *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 17(3): 21-30.
[20] Jacob, M., Jaros, D., Rohm., 2011. Recent advances in milk clotting enzymes. A review. *International Journal of Dairy Technology* 64(1): 14-33.
[21] Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., 1997. Rennets: Their in milk coagulation and cheese ripening. In: *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk* (Ed: B.A. Law). 1- 40 pp.
[22] Guinee, T.P., Wilkinson, M.G., 1992. Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. *International Journal of Dairy Technology* 45(4): 94-104.
[23] Rogelj, I., Perko, B., Francky, A., Penca, V., Pungercar, J., 2001. Recombinant lamb chymosin as an alternative coagulating enzyme in cheese production. *Journal of Dairy Science* 84(5): 1020-1026.
[24] Foltmann, B., 1987. General ve molecular aspects of rennets. In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology (Ed: P.F. Fox). Volume I. *Elsevier Applied Science*. London and New York, 33-62 pp.
[25] Mohanty, A.K., Mukhopadhyay, U.K., Grover, S., Batish, V.K., 1999. Bovine chymosin: production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnology Advances* 17(2-3): 205-217.
[26] Chitpinityol, S., Crabbe, M.J.C., 1998. Chymosin and aspartic proteinases: Review. *Food Chemistry* 61(4): 395-418.
[27] Irigoyen, A., Izco, J.M., Ibanez, F.C., Torre, P. 2001. Influence of rennet milk-clotting activity on the proteolytic and sensory characteristics of an ovine cheese. *Food Chemistry* 72(2): 137-144.
[28] Gürses, M., Çakmakçı, S., 2009. Şirdenden geleneksel olarak üretilen sıvı peynir mayalarının bazı kalite özellikleri. II. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, s: 881-884, 27-29 Mayıs, Van.
[29] Hayaloglu, A.A., Cakmakci, S., Brechany, E.Y., Deegan, K.C., McSweeney, P.L.H., 2007. Microbiology, biochemistry, and volatile composition of Tulum Cheese ripened in goats skin or plastic bags. *Journal of Dairy Science* 90: 1102-1121.
[30] Cakmakci, S., Dagdemir, E., Hayaloglu, A.A., Gurses, M., Gundogdu, E., 2008. Influence of ripening container on the lactic acid bacteria population in Tulum cheese. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(3): 293-299.
[31] Moschopoulou, E., Kandarakisa, I., Anifantakis, E. 2007. Characteristics of lamb and kid artisanal liquid rennet used for traditional Feta cheese manufacture. *Small Ruminant Research* 72: 237-241.
[32] Zhang, F.X., Wang, B.N., 2007. Optimization of processing parameters for the ultrasonic extraction of goat kid rennet. *International Journal of Dairy Technology* 60: 286-291.
[33] Addis, M., Piredda, G., Pirisi, A., 2008. The use of lamb rennet paste in traditional sheep milk cheese production. *Small Ruminant Research* 79: 2-10.
[34] Bustamante, M., Chavarri, F., Santisteban, A., Ceballos, G., Hernandez, I., Miguelez, M.J., Aranburu, I., Barron, L.J.R., Virto, M., De Renobales, M., 2000. Coagulating and lipolytic activities of artisanal lamb rennet pastes. *Journal of Dairy Research* 67: 393-402.
[35] Virto, M., Chavarri, F., Bustamante, M.A., Barron, L.J.R., Aramburu, M., Vicente, M.S., Perez-Elortondo, F.J., Albisu, M., de Renobales, M., 2003. Lamb rennet paste in ovine cheese manufacture. Lipolysis and flavour. *International Dairy Journal* 13: 391-399.
[36] Irigoyen, A., Izco, J.M., Iba´nez, F.C., Torre, P., 2002. Influence of calf or lamb rennet on the physicochemical, proteolytic, and sensory characteristics of an ewe's-milkcheese. *International Dairy Journal* 12: 27-34.
[37] Pirisi, A., Pinna, G., Addis, M., Piredda, G., Mauriello, R., De Pascale S., Caira, S., Mamone, G., Ferranti, P., Addeo, F., Chianese, L., 2007. Relationship between the enzymatic composition of rennet paste and proteolytic, lipolytic pattern and texture of PDO Fiore Sardo ovine cheese. *International Dairy Journal* 17: 143-156.
[38] Santillo, A., Quinto, M., Dentico, M., Muscio, A., Sevi, A., Albenzio, M., 2007. Rennet paste from lambs fed a milk substitute supplemented with *Lactobacillus acidophilus*: Effects on lipolysis in ovine cheese. *Journal of Dairy Science* 90: 3134-3142.
[39] Santillo, A., Caroprese, M., Marino, R., Muscio, A., Sevi, A., Albenzio, M., 2007. Influence of lamb rennet paste on composition and proteolysis during ripening of Pecorino foggiano cheese. *International Dairy Journal* 17: 535-546.
[40] Santillo, A., Albenzio, M., 2008. Influence of lamb rennet paste containing probiotic on proteolysis and rheological properties of Pecorino cheese. *Journal of Dairy Science* 91: 1733-1742.
[41] Santillo, A., Albenzio, M., Quinto, M., Caroprese,M., Marino,R., Sevi, A., 2009. Probiotic in lamb rennet paste enhances rennet lipolytic activity and conjugated linoleic acid and linoleic acid content in pecorino cheese. *Journal of Dairy Science* 92: 1330-1337.
[42] Wallence, K.L., Fox, P.F., 1997. Effect of adding free amino acids to Cheddar cheese curd on proteolysis, flavour and texture development. *International Dairy Journal* 7(2-3):157-167.
[43] Yeşilyurt, S., 1992. *Mucor miehei*'den Elde Edilen Fromase ve Rennilase Peynir Mayalarının Beyaz Peynir Yapımında Kullanımı Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
[44] Saldamlı, İ., Kaytanlı, M., 1998. Utilization of fromase, maxiren and rennilase as alternative coagulating enzymes to rennet in Turkish white cheese production. *Milchwissenschaft* 53(1): 22-25.
[45] Bulca, S., Karaman, D.A., Bircan, C. 2009. UHT işleminin mikrofiltrasyon ve ultrafiltrasyon

retentatlarının rennet oluşturma özellikleri üzerine etkileri. *Akademik Gıda* 3: 24-29.
[46] Koçak, C., Bitlis, A., Gürsel, A., Avşar, Y.K., 1996. Effects of added fungal lipase on the ripening of Kashar cheese. *Milchwissenschaft* 51(1): 13-17.
[47] Yetişmeyen, A., Çimer, A., Özer, M., Odabaşı, S., Deveci, Ö., 1998. Ultrafiltrasyon tekniği ile salamura Beyaz peynir üretiminde kalite üzerine değişik maya enzimlerinin etkisi. *Gıda* 23(1): 3-9.
[48] Sanjuan, E., Millan, R., Saavedra, P., Carmona, M.A., Gomez, R., Fernandez- Salguero, J., 2002. Influence of animal and vegetable rennet on the physicochemical characteristics of Los Pedroches Cheese during ripening. *Food Chemistry* 78: 281-289.
[49] Yaşar, K., 2007. Farklı Pıhtılaştırıcı Enzim Kullanımının ve Olgunlaşma Süresinin Kaşar Peynirinin Özellikleri Üzerine Etkisi. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
[50] Çakmakçı, S., Boroğlu, E., 2004. Some quality characteristics of commercial liquid rennet samples. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 28: 501-505.
[51] Fadıloğlu, S., 2001. Immobilization and characterization of ficin. *Nahrung/ Food* 45(2): 143-146.
[52] Bornaz, S., Guizani, N., Fellah, N., Sahli, A., Slama, M.B., Attia, H., 2010. Effect of plant originated coagulants and chymosin on ovine milk coagulation. *International Journal of Food Properties* 13: 10-22.
[53] Say, D., Güzeler, N., 2016. Süt pıhtılaştırılmasında kullanılan bazı bitkiler. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi TARGİD* Özel Sayı: 253-261.
[54] Say, D., Soltani, M., Güzeler, N., 2012. Süt ürünlerinde kullanılan bitkiler. III. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu 10-12 Mayıs, 390-391s, Konya.
[55] Sousa M.J., Malcata, F.X., 2002. Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Lait* 82: 151-170.
[56] Çardak, A.D., 2014. Peynir üretiminde bitkisel proteaz kullanımı. 4. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 17-19 Nisan 2014, 517 s, Adana.
[57] Akar, B., Öner, M. D., 1994. İncir sütünün saflaştırılması ve Antep peyniri yapımına uygulanması. *Gıda* 19(5): 329-331.
[58] Sousa, M.J., Ardö, Y., McSweeney P.L.H., 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal* 11: 327–345.
[59] Dayısoylu, K.S., Duman, A.D., Gezginç, Y., Akyol, İ., 2004. Kahramanmaraş Telemesi. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 23-24 Eylül 2004, 412-416 s, Van.
[60] Saydam, İ.B., Güzeler, N., 2012. Bazı bitkisel pıhtılaştırıcıların sütü pıhtılaştırma kuvvetleri. III. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu 10-12 Mayıs 2012, 701-703 s, Konya.
[61] Akar, B., Fadıloğlu, S., 1999. Teleme production by purified ficin. *Journal of Food Quality* 22: 671-680.
[62] Anonymous, 2014a. http://www.sifalibitkitedavisi.com/altin-cilek-faydalari.html (Erişim tarihi:24.12.2014).
[63] Şahan, N., Konar, A., 1990. Peynir üretiminde sütü pıhtılaştırmada kullanılan proteolitik enzimler. *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 5(4): 129-140.
[64] Anonymous, 2014b. http://en.wikibooks.org/wiki/Horticulture/Euphorbia_maculata (Erişim tarihi:30.12.2014).
[65] Yousif, B.H., McMahon, J.D., Shammet, M.K., 1996. Milk-clotting enzyme from *Solanum dobium* plant. *International Dairy Journal* 6: 637-644.
[66] Manzano, M.A.M., Gutierrez, T.C.P., Sanchez, M.E.L., Suarez, J.C.R., Llanez, M.J.T., Cordova, A.F.G., Cordoba, B.V., 2013a. Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. *Food Chemistry* 141: 1902-1907.
[67] Manzano, M.A.M., Hernandez, J.M.M., Suarez, J.C.R., Llanez , M.J.T., Cordova, A.F.G., Cordoba, B.V., 2013b. Sour orange *Citrus aurantium* L. flowers: a new vegetable source of milk-clotting proteases. *Food Science and Technology* 54: 325-330.
[68] Sarıkaya, Ö.S.B., 2006. Yabani Çuha (*Primula veris*) Bitkisinin Çiçeklerinden Proteaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Peynir Üretiminde Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum.
[69] Fox, P.F., Stepaniak, L., 1993. Enzymes in cheese technology. *International Dairy Journal* 3(4): 509-530.
[70] Teuber, M., 1990. Production of chymosin (EC 3.4.23.4) by microorganisms and its use for cheesemaking. IDF Bulletin No 251. Brussels: International Dairy Federation.
[71] Kilcawley, K.N., Wilkinson, M.G., Fox, P.F., 2002. Determination of key enzymes activities in commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal source. *Enzyme and Microbial Technology* 31(3): 310-320.
[72] Şehidi, G., 1974. *Endothia parasitica*'dan Elde Edilen Pıhtılaştırıcı Enzimle (Suparen) İşlenmiş Bazı Yerli Peynirlerimizin Teknolojik Nitelikleri Üzerine Araştırma. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
[73] Öztek, L., 1981. *Rhizomucor miehei* Küf Mantarından Elde Edilen Mikrobiyal Maya "Hannilase"nın Beyaz Peynir ve Kaşar Peyniri Yapımında Kullanımı Üzerinde Araştırmalar. Doçentlik Tezi. Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
[74] Alichanidis, E., Anifantakis, E.M., Polychroniadou, A., Nanou, M., 1984. Suitability of some microbial coagulants for Feta cheese manufacture. *Journal of Dairy Research* 51(1): 141-147.
[75] Budtz, P., 1989. Microbial rennets for cheese making. *Dairy Industries International* 54(5): 15-19.
[76] Johnston, K.A., Dunlop, F.P., Coker, C.J., Wards, S.M., 1994. Comparisons between the electrophoretic pattern and textural assessment of aged Cheddar cheese made using various levels of calf rennet or microbial coagulant (Rennilase 46L). *International Dairy Journal* 4(4): 303-327.
[77] Eraz, G., 1996. *Mucor miehei*'den ve Şirdenden Elde Edilen Pıhtılaştırıcı Enzimler Yardımıyla Üretilen Beyaz Peynir Telemesinin Nitelikleri

Üzerinde Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Süt Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara, 57s.

[78] Yun, J.J., Barbano, D.M., Kindstedt, P.S., 1993a. Mozzarella Cheese: Impact of coagulant type on chemical composition and proteolysis. *Journal of Dairy Science* 76(12): 3648-3659.

[79] Kim, K.S., Kim, Y.K., 1985. Studies on the ripening of Cheddar cheese made with *Mucor* rennet. *Korean Journal of Animal Sciences* 27(5): 323-327.

[80] Şengül, M., Erkaya, T., Dervişoğlu, M., Aydemir, O., Gül, O., 2014. Compositional, biochemical and textural changes during ripening of Tulum cheese made with different coagulants. *International Journal of Dairy Technology* 67: 373-383.

[81] Lemes, A.C., Pavon, Y., Lazzaroni, S., Rozycki , S., Brandelli, A., 2016. A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 applied in cream cheese development*. Food Science and Technology* 66: 217-224.

[82] Ulusu, Y., 2012. Endüstriyel Kullanım Amaçlı Kimozin Enziminin Alternatif Bir Sistemle Rekombinant Olarak Üretilmesi, Saflaştırılması ve Krakterizasyonu. Doktora Tezi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Tokat.

[83] Henriksen, C.M., Nilsson, D., Hansen, S., Johansen, E., 1999. Industrial applications of genetically modified microorganisms: gene Technology at Chr. Hansen A/S. *International Dairy Journal* 9: 17-23.

[84] Feng, Z., Ren J., Zhang, H., Zhang, L., 2011. Disruption of PMR1 in *Kluyveromyces lactis* improves secretion of calf prochymosin. *Journal of Science of Food and Agriculture* 91: 100-103.

[85] Dervişoğlu, M., Aydemir, O., Yazıcı, F., 2006. Peynir yapımında kullanılan pıhtılaştırıcı enzimler ve kazein fraksiyonları üzerine etkisi. Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu, S. 887-890.

[86] Mcsweeney, P.LH. 2007. Conversion of milk to curd. In: Cheese Problems Solved, How Does Rennet Coagulate Milk, Ed. P.L.H. McSweeney, Woodhead Published Ltd., Cambridge, England.

[87] Akın, M.B., Akın, M.S., Kırmacı, Z., 2008. Influence of coagulating enzyme types (commercial calf rennet, *Aspergillus niger* var. a*wamori* as recombinant chymosin and *Rhizomucor miehei* as microbial rennet) on the chemical and sensory characteristics of white pickled cheese made from Ewe's milk. 5th IDF Symposium on Cheese Ripening. Bern Switzerland. 1-4.

[88] Green, M.L., Angal, S., Lowe, P.A., Marston, A.O., 1985. Cheddar cheesemaking with recombinant calf chymosin synthesized in *Escherichia coli*. *Journal of Dairy Research* 52(2): 281-286.

[89] Broome, M.C., Xu, X., Mayes, J.J., 2006. Proteolysis in Cheddar cheese made with alternative coagulants. *The Australian Journal of Dairy Technology* 61(2): 85- 87.

[90] Hicks, C.L., O'leary, L., Bucy, J., 1988. Use of recombinant chymosin in the manufacture of Cheddar and Colby cheese. *Journal of Dairy Science* 71(5): 1127-1131.

[91] Dave, R,I., Sharma, R., Mcmahon, D.J., 2003a. Melt and rheological properties of Mozzarella cheese as affected by starter culture and coagulating enzymes. *Lait* 83(1): 61-77.

[92] Dave, R,I., Sharma, R., Muthukumarappan, K., 2003b. Effects of starter culture and coagulating enzymes on viscoelastic behavior and melt of Mozzarella cheese. *Journal of Food Science* 68(4): 1404-1410.

[93] Bines, V.E., Young, P., Law, B.A., 1989. Comparison of Cheddar cheese made with a recombinant calf chymosin and with standard calf rennet. *Journal of Dairy Research* 56(4):657-664.

[94] Çepoğlu, F. 2005. Beyaz Peynir Üretiminde Rekombinant Kimozin Kullanım Olanaklarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.

[95] Kim, S.Y., Gunasekaran, S., Olson, N.F., 2004. Combined use of chymosin and protease from *Cryphonectria parasitica* for control of meltability and firmness of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 87(2): 274-283.

[96] Abdel-Kader, Y.I., 2003. Changes in the nitrogen fractions of Domiati cheese made with microbial and recombinant rennets during ripening. *Egyptian Journal of Dairy Science* 31(1): 111-124.

[97] Kandarakis, I., Moschopoulou, E., Anıfatakis, E., 1999. Use of fermentation produced chymosin from *E. coli*'in the manufacture of Feta cheese. *Milchwissenschaft* 54(1): 24-29.

[98] Reps, A., Dajnowiec, F., Kolakowski, P., 1997. Chymax preparation in industrial cheese manufacture. *Milchwissenschaft* 52(1): 32-35.

[99] Yun, J.J., Kiely, J.L., Kindstedt, P.S., Barbano, D.M., 1993b. Mozzarella cheese: Impact of coagulant type on functional properties. *Journal of Dairy Science* 76(12): 3667-3663.

[100] Sheehan, J.J., O'sullivan, K., Guinee, T.P., 2004. Effect of coagulant type and storage temperature on the functionality of reduced-fat Mozzarella cheese. *Lait* 84(6): 551-566.

[101] El-Sohaimy, S.A., Hafez, E.E., El- Saadani, M.A., 2010. Cloning and *in vitro*- transcription of cymosin gene in *E. coli. The Open Nutraceuticals Journal* 3: 63-68.

[102] Merheb-Dini, C., Garcia, G.A.C., Penna, A.L.B., Gomes, E., da Silva, R., 2012. Use of a new milk-clotting protease from *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 as coagulant and changes during ripening of Prato cheese. *Food Chemistry* 30: 859-865.