T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TAVŞAN (*Oryctolagus cuniculus*) RENNETİNİN FİZİKOKİMYASAL, BİYOKİMYASAL VE MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Demet EKTİREN

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2019

Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN danışmanlığında, Demet EKTİREN'nin hazırladığı '**Tavşan (*Oryctolagus cuniculus*) Rennetinin Fizikokimyasal, Biyokimyasal ve Mikrobiyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi**' konulu bu çalışma 17/04/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN ……..

Üye :Prof. Dr. Hasan VARDİN ……..

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Hidayet SAĞLAM ……..

Bu tezin Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında yapıldığını ve Enstitümüz kurallarına göre düzenlendiğini onaylarım.

Doç. Dr. İsmail HİLALİ

Enstitü Müdürü

Bu çalışma HÜBAK tarafından desteklenmiştir

Proje No: 18100

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
SİMGELER DİZİNİ vi
1.GİRİŞ 1
1.1.Kimozin 2
1.1.1.Kimozin dizisi, yapısı ve sentezi 3
1.2.Kimozinin Sütü Pıhtılaştırma Mekanizması 4
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 9
2.1.Kimozin Kaynakları 9
2.1.1.Hayvan kökenli aspartik proteinazlar 9
2.1.2.Bitki kökenli aspartik proteinazlar 12
2.1.3.Mikrobiyal kökenli aspartik proteinazlar 13
2.1.4.Rekombinant kimozin 14
2.2.Kimozin Enziminin Fizikokimyasal Özellikleri 16
2.2.1.Moleküler ağırlık 16
2.2.2.Optimum pH 16
2.2.3.pH stabilitesi 16
2.2.4.İzoelektrik nokta 17
2.2.5.Optimum sıcaklık 17
2.2.6.Isı stabilitesi 17
2.3.Kimozinin Mikrobiyolojik Özellikleri 18
2.4.Kimozinin Kazein Hidrolizi 20
2.7.Kimozinin Farklı Sütler Üstündeki Pıhtılaşma Etkinliği 23
3.MATERYAL ve YÖNTEMLER 24
3.1.Materyal 24
3.1.1.Mide ve enzim 24
3.1.2.Süt ve süttozu 24
3.1.2.Kimyasal maddeler 24
3.2.Yöntem 24
3.2.1.Tavşan ve inek midelerinden rennet ekstraksiyonu 24
3.2.2.Protein içeriğinin belirlenmesi 25
3.2.3.Süt pıhtılaştırma aktivitesinin belirlenmesi 25
3.2.4.Rennet sıcaklığının süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi 26
3.2.5.Süt pH' ının süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi 26
3.2.6.Süt sıcaklığının süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi 26
3.2.7.Enzim konsantrasyonunun süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi 26
3.2.8.Substrat konsantrasyonunun süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi 27
3.2.9.$CaCl_2$ konsantrasyonunun süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi 27
3.2.10.NaCl konsantrasyonunun süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi 27
3.2.11.pH analizi 27

3.2.12.% Kuru madde içeriği 27
3.2.13.% Kül içeriği 28
3.2.14.Mikrobiyolojik analizler 28
3.2.15.Rennetlerin polipeptit profillerinin belirlenmesi 30
3.2.16.Proteolitik analizler 31
3.2.16.1.SDS-PAGE analizi ile hidrolizin belirlenmesi 31
3.2.16.2.Ürea-PAGE analizi ie hidrolizin belirlenmesi 31
3.2.16.3.Enzimlerin spesifik α,β, K- kazein hidrolizi 32
3.2.17. Rennetlerin enzimatik aktivitelerinin belirlenmesi 32
3.2.18.Farklı sütler üzerinde süt pıhtılaştırma aktivitesi 33
3.2.19.İstatistiksel analiz 33
4.ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 34
4.1.Protein İçeriğinin Belirlenmesi 34
4.2.Süt Pıhtılaştırma Aktivitesinin Belirlenmesi 34
4.3.Rennet Sıcaklığının Süt Pıhtılaştırma Aktivitesi Üzerine Etkisi 36
4.4.Süt pH' ının Süt Pıhtılaştırma Aktivitesi Üzerine Etkisi 38
4.5.Süt Sıcaklığının Süt Pıhtılaştırma Aktivitesi Üzerine Etkisi 40
4.6.Enzim Konsantrasyonunun Süt Pıhtılaştırma Aktivitesi Üzerine Etkisi 43
4.7.Substrat Konsantrasyonunun Süt Pıhtılaştırma Aktivitesi Üzerine Etkisi 45
4.8.$CaCl_2$ Konsantrasyonunun Süt Pıhtılaştırma Aktivitesi Üzerine Etkisi 46
4.9.NaCl Konsantrasyonunun Süt Pıhtılaştırma Aktivitesi Üzerine Etkisi 49
4.10.pH Analizi 51
4.11.% Kuru Madde İçeriği 51
4.12.% Kül İçeriği 52
4.13.Mikrobiyolojik Analizler 52
4.13.1.Toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı 53
4.13.2.Maya ve küf sayımı 54
4.13.3.Enterobakter ve koliform sayımı 54
4.13.4.*Enterococci* sayımı 55
4.13.5.*Staphylococci* sayımı 55
4.14.Rennetlerin Polipeptit Profillerinin Belirlenmesi 56
4.15.Proteolitik Analizler 57
4.15.1.SDS-PAGE analizi ile hidrolizin belirlenmesi 58
4.15.2.UREA-PAGE analizi ile hidrolizin belirlenmesi 60
4.15.3.Enzimlerin α, β, κ- kazein hidrolizi 62
4.17.Rennetlerin Enzimatik aktivitelerinin belirlenmesi 67
4.18.Rennetlerin Farklı Hayvansal Kaynaklı Sütler Üzerine Pıhtılaştırma Aktivitesi 70
5.SONUÇ ve ÖNERİLER 73
KAYNAKLAR 76
ÖZGEÇMİŞ 87
EKLER 88

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TAVŞAN (*Oryctolagus cuniculus*) RENNETİNİN FİZİKOKİMYASAL, BİYOKİMYASAL VE MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Demet EKTİREN

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN
Yıl: 2019, Sayfa: 88

Yüksek ekonomik değere sahip olan süt ürünlerinden bir tanesi de gelişmiş tat, aroma ve yüksek protein değerine ve uzun raf ömrüne sahip peynirdir. Peynir yapma işlemi pıhtılaştırma, asitlendirme, pıhtı kesme, tuzlama, kalıplama ve olgunlaştırma gibi birçok farklı aşamadan oluşur. Sütün pıhtılaştırılması en önemli işlem olup bu işlem genellikle buzağıların midelerinden elde edilen rennet kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Buzağı dışında kuzu, deve, keçi, oğlak, manda, maymun, domuz, sığır ve tavuk midesinde de rennet enzimi bulunmaktadır. Hayvansal kaynaklı süt pıhtılaştırma enzimleri dışında mikrobiyal, rekombinant ve bitkisel kaynaklı enzimler üzerinde de çok fazla durulmuştur. Fakat bu kaynaklardan elde edilen enzimler peynirde istenmeyen yapı, tat, aroma, proteinde azalmaya ve peynir randımanında çok ciddi kayıplara yol açabilmektedir. Bu enzimler dışında tavşan rennetinin peynir yapımında kullanılabileceği öngörülmüş fakat tavşan rennetinin karakteristik özellikleri ile ilgili çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada tavşan rennetinin tanımlanması, fizikokimyasal, mikrobiyolojik, enzimatik, ve biyokimyasal özellikleri inek renneti ile karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir. İnek ve tavşan rennetinin toplam protein içerikleri sırasıyla 2584.66±4.16, 1990.66±5.03 µg/ml, süt pıhtılaştırma aktiviteleri sırasıyla 17.44±0.35, 15.87±0.25 RU olarak bulunmuştur. İnek rennetinin tavşan rennetine göre daha termostabil olduğu belirlenmiştir. Ayrıca sütün konsantrasyonu, pH' ı ve içindeki tuz miktarının artmasıyla inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesinde azalma olduğu belirlenmiştir. Enzim konsantrasyonu (ml) her iki rennette de arttıkça sütün pıhtılaşma süresinde azalma görülmüştür. İnek rennetinin en yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesi 50 ºC' de 66.67±0.00 RU, tavşan rennetinin ise 55 ºC' de 58.82±0.00 RU olarak belirlenmiştir. İnek renneti için en yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesi 40 mM $CaCl_2$ varlığında 91.41±8.34 RU, tavşan rennetinde ise en yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesi 45 mM $CaCl_2$ varlığında 32.97±0.62 RU olarak tespit edilmiştir. Her iki rennette de koliform grubu bakteri, *Enterococci, Staphylococci*, maya ve küf tespit edilememiştir. Yalnızca inek rennetinde 2.59 ± 0.007 log kob/ml toplam aerobik mezofilik bakteri tespit edilmiştir. Rekombinant inek kimozini 32 kDa, inek renneti 37 kDa, tavşan renneti ise 35 kDa molekül ağırlığında belirlenmiştir. Tavşan ve inek rennetinin proteolitik aktivitesi birbirine benzerlik gösterdiği hatta inek rennetinin tavşan rennetine göre kazeini hidroliz etmesi kısa sürede gözlemlenmiştir. Rennetin enzim aktiviteleri yarı kantitatif metot olan APIZYM kiti kullanılarak belirlenmiştir. Hem inek hemde tavşan rennetinde ortak olarak Alkalin fosfataz, Lösin arilamidaz, Asit fosfataz, Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz, ß-galaktosidaz, ß-glukuronidaz ve N-asetil-ß-glukosaminidaz aktivitelerine sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca tavşan renneti üç farklı pH' da Lipaz (C14) aktivitesi gösterirken inek rennetinin aktivite göstermediği belirlenmiştir. Son olarak rekombinant inek kimozi, inek renneti ve tavşan rennetinin inek, koyun, keçi, deve ve eşek sütlerini pıhtılaştırabildiği gözlemlenmiştir. Rekombinant inek kimozininin bu sütleri inek ve tavşan rennetine göre kısa sürede pıhtılaştırdığı belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: tavşan renneti, proteoliz, APIZYM, süt pıhtılaştırma aktivitesi, kimozin

ABSTRACT

MSc Thesis
DETERMINATION OF PHYSICOCHEMICAL, BIOCHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL PROPERTIES OF RABBİT'S (*Oryctolagus cuniculus*) RENNET

Demet EKTİREN

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet KARAASLAN
Year: 2019, Sayfa: 88

One of the dairy products with high economic value is cheese characterized by improved taste, aroma and high protein value besides a long shelf life. Cheese is made by several processes consists of many different stages such as coagulation, acidification, clot cutting, salting, molding and maturing. Coagulation of milk is considered as the most important process which is usually carried out using rennet obtained from claves' stomach. The rennet enzyme is also present in the stomach of lambs, camels, goats, buffaloes, monkeys, pigs, cattle and chicken. Apart from animal-based milk coagulation enzymes, as though microbial, recombinant and plant-derived enzymes are also highly emphasized. However, enzymes which obtained from these sources can cause undesired structure, taste, smell, low protein in cheese, and heavy losses in cheese production. Regardless of these enzymes, rennet from a rabbit can be used in cheese making, but the characteristics of rabbit rennet have not been studied. In this study, the physicochemical, microbiological, enzymatic and biochemical properties of rabbit rennet were determined in comparison with cow rennet. The total protein contents of cow and rabbit rennet were found as 2584.66±4.16, 1990.66±5.03 µg/ml and milk clotting activity as 17.44±0.35, 15.87±0.25 RU, respectively. It was determined that cow rennet was more thermostable than rabbit rennet. In addition, it was determined that milk-clotting activity of cow and rabbit rennet decreased with concentration and pH, while increased in the salt content of milk. The decrease in the clotting time of the milk was observed as the increase of enzyme concentration in both rennets. The highest milk coagulation activity of cow rennet was 66.67±0.00 RU at 50 ºC and the rabbit rennet at 55 ºC was 58.82±0.00 RU. The highest milk coagulation activity of cow was 91.41±8.34 RU in the presence of 40 mM $CaCl_2$ and the highest milk-clotting activity of rabbit rennet was 32.97±0.62 RU in the presence of 45 mM $CaCl_2$. Coliform bacteria, enterococci, staphylococci, yeast, and mold were not detected in both rennets. Only in cow rennet total aerobic mesophilic bacteria was detected as 2.59±0.007 log cfu/ml. Recombinant cow chymosin, cow rennet, and rabbit rennet were determined as 32 kDa, 37 kDa and 35 kDa, respectively. It was determined that the proteolytic activity of rabbit and cow rennet was similar and it was observed that the cow rennet hydrolyzed casein compared to rabbit rennet in a short time. The enzyme activities of rennet were determined by using a semi-quantitative method APIZYM kit. Alkaline phosphatase, Leucine arylamidase, Acid phosphatase, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, ß-galactosidase, ß-glucuronidase,and N-acetyl-ß-glucosaminidase activities were found to be common in both cow and rabbit rennet. In addition, rabbit rennet showed Lipase (C14) activity at three different pHs, whereas cow rennet did not show activity. Finally, it has been observed that recombinant cow 's chymosin, cow rennet and rabbit rennet can coagulate cow, sheep, goat, camel and donkey milk. It was determined that recombinant cow chymosin coagulated these milk according to cow and rabbit rennet in a short time.

KEYWORDS: rabbit rennet, proteolysis, APIZYM, milk clotting activity, chymosin

TEŞEKKÜR

Lisans eğitiminden yüksek lisans eğitimine kadar olan süreçte her konuda desteğini hissettiğim, her sorun yaşadığımda güler yüzünü ve samimiyetini eksik etmeyen, tez konumun seçiminde, araştırmalarımda ve laboratuvar çalışmalarımda her daim yol gösteren öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli danışman hocam Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN' a teşekkürü bir borç bilirim. Aynı şekilde çalışmam boyunca engin bilgilerinden ve nasihatlerinden sonsuz yararlandığım her daim bizlere baba gibi davranan çok kıymetli Prof. Dr. Hasan VARDİN' e, tez süreci boyunca yardımlarını esirgemeyen daima güvenen Dr. Selin ALİHANOĞLU' a, Arş. Gör. Bülent BAŞYİĞİT' e ve Dr. Öğr. Üyesi Asliye KARAASLAN' a, çok kıymetli arkadaşlarım ve meslektaşlarım olan Seba SATTAF, Mümine GURUK ve Şehriban YÜKSEKKAYA' ya teşekkür ederim.

Beni bu yaşıma kadar büyüten eğitimimin her aşamasında maddi manevi desteğini esirgemeyen en büyük destekçim olan aileme; babam Abdulkadir EKTİREN ve annem Fatime EKTİREN' e, üzerimde ailem kadar emeği olan aldığım her karara tereddütsüz destek veren şuan aramızda olmayan amcam Osman EKTİREN' e sonsuz teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Kimozinin şematik gösterimi (Mohanty ve ark., 1999) 4
Şekil 1.4. Kazeinin kimozin tarafından hidrolizi..... 5
Şekil 1.3. Sütün pıhtılaşması 5
Şekil 2.1. Farklı hayvanlara ait kazeinlerin kimozine duyarlı kazein bölgeleri..... 20
Şekil 4.1. Rennet sıcaklığının süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisinin değişimi..... 38
Şekil 4.2.Değişen süt pH' ının inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisinin değişimi 40
Şekil 4.3.Değişen süt sıcaklığının inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisisin değişimi..... 42
Şekil 4.4. İnek ve tavşan renneti konsantrasyonunun süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi 44
Şekil 4.5.Süt konsantrasyonunun inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi. 46
Şekil 4.6.$CaCl_2$ konsantrasyonunun inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi 48
Şekil 4.9. NaCl konsantrasyonuna bağlı inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi değişimi 50
Şekil 4.8. Rekombinant inek kimozini, tavşan rennetini ve inek rennetinin sds-page görüntüsü 56
Şekil 4.9. İnek tüm kazeinin rekombinant inek kimozini (a), inek renneti (b) ve tavşan renneti (c) tarafından farklı sürelerdeki hidrolizinin SDS-PAGE görüntüleri.. 59
Şekil 4.10.İnek tüm kazeinin rekombinant inek kimozini (a), inek renneti (b) ve tavşan renneti (c) tarafından farklı sürelerdeki hidrolizinin UREA-PAGE görüntüleri..... 62
Şekil 4.11.α- kazeinin rekombinant inek kimozini (a), inek renneti (b) ve tavşan renneti (c) tarafından farklı sürelerdeki hidrolizinin SDS-PAGE görüntüleri 63
Şekil 4.12.β-kazeinin rekombinant inek kimozini (a), inek renneti (b) ve tavşan renneti (c) tarafından farklı sürelerdeki hidrolizinin SDS-PAGE görüntüleri 65
Şekil 4.13.κ-kazeinin rekombinant inek kimozin (a), inek rennet (b) ve tavşan renneti (c) farklı sürelerdeki hidrolizinin SDS-PAGE görüntüleri..... 67
Şekil 4.14.İnek ve tavşan rennetinin APIZYM testi ile ölçülen enzimatik aktivite görüntüleri .. 68
Şekil 4.15.Farklı hayvansal kaynaklardan elde edilen sütlerin rekombinant İnek kimozini (C), inek renneti (İ) ve tavşan rennetinin (T) süt pıhtılaştırma aktivitesi sonucu elde edilen pıhtı görüntüleri..... 71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Bazı aspartik proteinazlar ve elde edildikleri kaynaklar 2
Çizelge 2.1. Bitkilerden izole edilen aspartik proteinaz örnekleri..... 13
Çizelge 4.1 İnek ve tavşan rennetinin protein içerikleri..... 34
Çizelge 4.2. İnek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktiviteleri(RU) 35
Çizelge 4.3. İnek ve tavşan renneti sıcaklığının süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi..... 37
Çizelge 4.4. Süt pH' ının inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesine etkisi 39
Çizelge 4.5. Süt sıcaklığının inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesine etkisi 41
Çizelge 4.6. İnek ve tavşan renneti konsanstrasyonunun süt pıhtılaştırma aktivitesine etkisi..... 43
Çizelge 4.7.Substrat konsantrasyonunun inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesine etkisi.....45
Çizelge 4.8. $CaCl_2$ konsantrasyonunun inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesine etkisi 47
Çizelge 4.9. NaCl konsantrasyonunun inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesine etkisi. 49
Çizelge 4.10. İnek ve tavşan rennetinin pH değerleri..... 51
Çizelge 4.11. İnek ve tavşan rennetinin % kuru madde değerleri 52
Çizelge 4.12. İnek ve tavşan rennetinin % kül değerleri 52
Çizelge 4.13. İnek ve tavşan rennetinin mikrobiyolojik analiz sonuçları..... 53
Çizelge 4.17. İnek ve tavşan rennetinin APIZYM testi ile ölçülen enzimatik aktivite sonuçları..... 69
Çizelge 4.18. İnek kimozin, inek rennet ve tavşan rennetinin farklı hayvansal kaynaklardan elde edilen sütler üzerindeki süt pıhtılaştırma aktivitesi 70

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat Derece
dk	Dakika
sn	Saniye
g	Gram
HCl	Hidroklorik Asit
M	Molarite
mL	Mililitre
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Didroksit
nm	Nanometre
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
UREA-PAGE	Urea Poliakrilamid Jel Elektroforezi

1.GİRİŞ

Süt yenidoğanın ihtiyaç duyduğu besin öğelerini ve bunun yanında bazı koruyucu ve fizyolojik gereksinimlerini sağlar. Mikroorganizma gelişimine uygun bileşimi ve dolayısıyla bozulabilir nitelikte olmasından dolayı işlenmemiş halde uzun süre muhafaza edilememektedir. Bu nedenle raf ömrünün uzatılabilmesi amacıyla süt ve süt ürünleri ısıl işlem uygulamaları ve kuru maddelerinin artırımı temelinde farklı ürünlere işlenmektedir. Yüksek ekonomik değere sahip olan süt ürünlerinden bir tanesi de gelişmiş tat, aroma ve yüksek protein değerine ve uzun raf ömrüne sahip peynirdir. Peynir yapımı birkaç bin yıldan beri süregelen bir işlemdir. Peynir üretimi ile ilgili kayıtlar milattan önce 6000-7000 yıllarına kadar gitmektedir (Fox, 1999). Günümüzde 2000'den fazla peynir çeşidinin üretildiği belirtilmektedir (Gunasekaran ve ark., 2003). Ülkemizde ise 50'ye yakın peynir çeşidi üretilmekte olup, ekonomik açıdan önemli bir yere sahiptir (Hayaloğlu ve ark., 2002). Peynir yapma işlemi pıhtılaşma, asitlendirme, pıhtı kesme, tuzlama, kalıplama ve olgunlaştırma gibi birçok farklı aşamayı içerir (Bennett ve Johnston, 2004). Süt pıhtılaştırılması en kritik basamak olup bu işlem tüm peynir çeşitlerinde; rennetle (yaklaşık %75), asitle (izoelektrik nokta) ve ısıl işlem-asit kombinasyonuyla pıhtılaştırma olmak üzere üç grup altında toplanır (Badgujar ve Mahajan 2014; Fox ve ark., 2015). Bu gruplar içerisinde, üzerinde en çok araştırma yapılan ve peynir üretiminde en çok kullanılan rennet (proteolitik enzim) önde gelmektedir.

Proteolitik enzimler katalitik aktiviteleri temelinde dört grupta sınıflandırılır: serin, sistein, metallo ve aspartik proteinazlardır (Kay, 1985). Aspartik proteinazlar keşfedilen ilk enzimlerdir ve aspartik proteinazların endüstriyel üretimi 1874 yılına kadar uzanmaktadır (Szecsi 1992). İlk olarak Danimarkalı bilim adamı Christian Hansen, buzağıların midelerinden kimozini izole etmiştir (Nielsen ve ark. 1994).

Aspartik proteinazlar, enzimi proteolize karşı korumak için preproenzimler (zimojen) olarak sentezlenir. Zimojen, asidik pH'da aktif enzime, sinyal peptidi (pre) ve N-terminal prosegmentinin çıkarılmasıyla otokatalitik olarak dönüştürülür (Davies, 1990). Proteolitik enzimlerin en önemli katalilik sınıflarından biri olan

aspartik proteinazların (APs; EC: 3.4.23) aktif bölgelerinde iki aspartik asit rezidüsü (Asp-32 ve Asp-215) bulunur (Tang ve ark, 1973). Aspartik proteinazlar, doğada çok geniş yayılım göstermekte olup, virüslerden yüksek bitkilere ve memelilere kadar bulunabilir. Çizelge 1.1' de birçok önemli aspartik proteinaz ve bunların elde edildiği kaynaklar listelenmektedir.

Çizelge 1.1. Bazı aspartik proteinazlar ve elde edildikleri kaynaklar

EC Numara	İsim	Kaynak
3.4.23.1	Pepsin A	Mide suyu
3.4.23.2	Pepsin B	Mide suyu
3.4.23.3	Pepsin C (gastriksin)	Mide suyu, seminal plazma
3.4.23.	Pepsin F	Mide
3.4.23.4	Kimozin	Yeni doğan memelilerin mide suyunda
3.4.23.5	Katepsin D	Hücre içi veziküller (lizozomlar, endozomlar)
3.4.23.34	Katepsin E	Mide suyu, dalak ve kan hüclereri
3.4.23.15	Renin	Böbrek; plazma
3.4.23.12	Nepenthesin I, II	Bitki
3.4.23.18	Aspergillopepsin I	*Aspergillus sp.*
3.4.23.19	Aspergillopepsin II	*Nijer var. makrosporus*
3.4.23.20	Penicillopepsin	*Penicillium janthinellus; Penicillium roqueforti*
3.4.23.21	Rhizopuspepsin	*Rhizopus chinensis*
3.4.23.22	Endothiapepsin	*Cryphonectria parasitica*
3.4.23.23	Mucorpepsin	*Rhizomucor pusillus; Rhizomucor miehei*
3.4.23.24	Candidapepsin	*Candida albicans*
3.4.23.25	Saccharopepsin	*Saccharomyces cerevisiae*

Bu enzimatik pıhtılaştırıcılar içerisinde peynir yapımında kullanılan en yaygın enzim buzağı midesinden (şirden) izole edilen rennet olarak bilinir. Bu yüzden buzağı renneti diğer enzimlere referans olarak kabul edilir (Şahan ve Konar, 1990; Üçüncü, 2013).

1.1. Kimozin

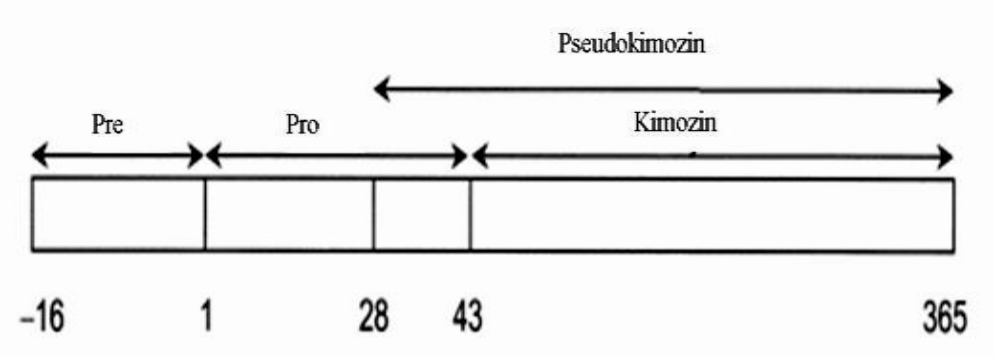
Rennet, memelilerin midelerinde üretilen birden fazla enzimin (kimozin, pepsin ve çok az miktarda gastriksin) oluşturduğu kompleks bir karışımdır. Kimozin (EC 3.4.23.4) yeni doğmuş geviş getiren hayvanların dördüncü midesinde salgılanan,

sütün pıhtılaşmasından sorumlu baskın bir aspartik proteinazdır (Fox ve McSweeney 1999).

1.1.1. Kimozin dizisi, yapısı ve sentezi

Aspartik proteinazlar, proteolize karşı koruma sağlayan, preproenzimler (zimojen) olarak sentezlenirler (Horimoto ve ark. 2009). Zimojen, N-terminal pro-segmentinin çıkarılmasıyla asidik pH'ta aktif enzime otokatalitik olarak dönüştürülür (Davies 1990). Pro-segmentin, enzimin inaktif formunun stabilize edilmesinden sorumlu olduğu ve aktif bölgenin substratrata bağlanmasını önlediği belirtilmiştir (Horimoto ve ark. 2009).

Aspartik proteinaz olan kimozin, buzağı mayasının ana enzimatik bileşenidir. Bu enzim midede preprokimozin olarak sentezlenir (Şekil 1.1.). Prokimozin sentezlenmeden önce 16 amino asitten oluşan hidrofobik lider sekans (pre) oluşur ve bu sekans 365 amino asitten oluşan 40,7 kDa moleküler ağırlığa sahip prokimozinin üretiminden sorumludur (Foltmann, 1966; Foltmann, 1970; Foltmann ve ark, 1977; Foltmann, 1993; Steiner ve ark, 1980). Lider sekans (pre), prokimozin oluşturulurken ortadan kaybolur. İnaktif formda olan prokimozin daha sonra asidik ortamda iki aktif türe ayrılır. Prokimozin pH 4.2 ortamında N-terminal bölgesinden 42 amino asidin ayrılmasıyla 35,6 kDa' luk aktif kimozine dönüşebilir. Bu 323 amino asitli polipeptit zinciri, dikarboksilik ve β- hidroksi amino asit rezidüleri bakımından zengindir (Foltmann ve ark, 1977; 1979; Harris ve ark., 1982; Moir ve ark, 1982; Hidaka ve ark., 1986). Prokimozin ayrıca pH 2.0'da 27 amino asidin ayrılması ile 338 amino asit olan aktif pseudokimozine dönüşebilir. Hem kimozin hemde pseudokimozin süt pıhtılaştırma aktivitesi göstermektedir (Pederson ve ark, 1979).



Şekil 1.1. Kimozinin şematik gösterimi (Mohanty ve ark., 1999)

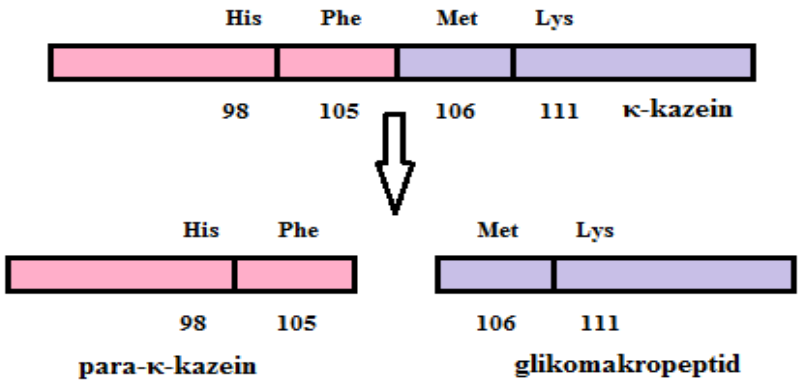
Kimozin (EC 3.4.23.4) yeni doğmuş geviş getiren hayvanların dördüncü midesinde salgılanan, sütün pıhtılaşmasından sorumlu baskın bir aspartik proteinazdır (Fox ve McSweeney 1999). Kimozin üç allelik formda, yani kimozin A, B ve C olarak bulunur. Kimozin A ve B formları arasındaki fark polipeptit zincirinde 244. (kimozin dizisinin doğal numaralandırılmasına göre) amino asidin farklı olmasından kaynaklanır. Polipeptid zincirinin 244. amino asidinin aspartat bulunmasıyla kimozin A , glisinin bulunmasıyla kimozin B olduğu bildirilmiştir (Foltmann ve ark., 1977; Pederson ve ark., 1979; Mohanty ve ark., 1999; Kumar ve ark., 2007; Sun ve ark., 2008). Kimozin C için net bir bilgiye ulaşılamamaktadır. Genel olarak kimozin C'nin, parçalanmış kimozin A olduğuna inanılmaktadır (Rampili ve ark. 2005).

1.2 Kimozinin Sütü Pıhtılaştırma Mekanizması

Karmaşık bir biyolojik sıvı olan süt, besinsel olarak önemli proteinlerin yanı sıra su, yağ, laktoz, sitrik asit ve kalsiyum fosfat gibi inorganik bileşenlerde içermektedir. Sütte, peynir altı suyu proteini(α- laktalbumin, β-laktoglobulin) ve kazein(αs1-, αs2-, β- ve κ-) olmak üzere iki grup protein bulunmaktadır. Sütte bulunan kazein proteinleri sırasıyla % 40, % 10, % 35 ve % 12 oranlarında bulunmaktadır. Kimozin varlığında, süt pıhtılaşması iki safhada gerçekleşir (Dalgleish, 1987; Erdem, 1991; Guinee ve Wilkinson, 1992).

1.Proteolitik aşama: Kimozin enzimi κ-kazeini Phe-105 ve Met-106 arasında bulunan peptid bağını kırarak para-κ-kazein ve glikomakropeptid molekülü oluşmaktadır (şekil 1.2.). Kazein misellerin yüzeyinden glikomakropeptid moleküllerinin ayrılması

sonucunda enzimatik proteoliz aşaması tamamlanmaktadır (Guinee ve Wilkinson, 1992; Metin, 1996).



Şekil 1.2. Kazeinin kimozin tarafından hidrolizi

2. Enzimatik olmayan aşama: Birinci aşamada κ-kazein proteolizi ile stabilitesi bozulan kazein miselleri, 20 °C'den yüksek sıcaklıklarda bir araya gelmektedir. κ-kazeinin %85-90' sının bozulmasıyla ve misellerin elektrostatik bağlarla tutunması sonucu gerçekleşmektedir. Misel stabilitesinde rol oynayan kolloidal kalsiyum fosfat bağlarının ayrılması ve Ca^{+2} iyonları yardımıyla αs-kazein ile β-kazeinin bağlanması sonucu aktivitesi artmaktadır. Negatif yükte ise bir azalma meydana gelmekte ve kalsiyum- para-kazeinat oluşmaktadır. Böylelikle miseller bir araya gelerek sertleşmekte ve şekil kazanarak pıhtıyı oluşturmaktadır (Guinee ve Wilkinson, 1992; Fox ve McSweeny, 1997). Şekil 1.3' de sütün pıhtılaştırılması şekilsel olarak gösterilmiştir.

Pıhtılaştırıcı enzimler

1- Kazein ⟶ Para-κ-kazein + Glikomakropeptid

Ca++, > 20 ºC

2- Para-κ-kazein miselleri ⟶ Pıhtı

Şekil 1.3. Sütün pıhtılaşması

Kimozin aracılığıyla sütün pıhtılaştırılması; pH, sıcaklık, iyonik güç, enzim konsantrasyonu ve tuzlar gibi çeşitli faktörler etkilemektedir (Foltmann, 1970; Okigbo ve ark, 1985a ; Okigbo ve ark, 1985b; Bringe ve Kinsella, 1986a; ; Bringe ve Kinsella, 1986b). Yüksek pH (6.6–6.7) pıhtılaşma süresini ve pıhtı sertliğini azaltırken, düşük pH (3-4), yüksek hidrolitik aktiviteye bağlı olarak pıhtı verimini düşürür (Okigbo ve ark, 1985a). Kimozin ve sütün kaynağının yanı sıra süt bileşenlerindeki farklılıklar ve ön muamele süreci pıhtılaşmanın başlangıç aşamasını etkileyebilir (Foltmann, 1992). Süt pıhtılaşması da kalsiyum iyonu konsantrasyonundan olumlu etkilenir (Berridge, 1952). Bununla birlikte, stronsiyum, magnezyum ve baryum iyonları da süt pıhtılaşması sürecinde olumlu etkileri bulunmaktadır (Pyne, 1955).

Gıda, yaşam bilimleri ve kimya endüstrilerinde birçok uygulama için enzimler talep edilmektedir. Enzim kullanımından yararlanan başlıca sektörler gıda, içecek, yem, deterjan, ilaç, kimya, deri, kağıt, kağıt hamuru ve ipek endüstrileridir. Proteinazlar, küresel endüstriyel enzimler pazarında geniş ürün alanı oluşturan önemli bir teknik enzim grubudur. Çok çeşitli kaynaklardan elde edilen aspartik proteinazlar peynir üretimi dışındaki farklı endüstriyel süreçlerde biyoteknolojik potansiyele sahiptir. Diğer birçok uygulama alanı vardır: baharat ürünlerinin üretimi (Kanlayakrit ve Maweang 2006), kazein hidrolizat üretimi (Phelan ve ark., 2009), ilaç tasarımı (Eder ve ark., 2007), et sektörü (Ashie ve ark., 2002), peptit sentezi (Kumar ve Bhalla 2005; Filippova ve Lysogorskaia 2003), deri işleme (Thanikaivelan ve ark., 2004) ve yem stoklarından lif hidrolizi (Abbas ve Bao 2009). Bununla birlikte, ticari olarak temin edilebilen aspartik proteinaz preparatlarının esas olarak peynir endüstrisi için formüle edildiğini belirtmek önemlidir.

2017 yılında, ülkemiz genelinde, 9 105 200 ton inek süt toplanmıştır ve bu sütün 662 213 tonu peynire işlenmiştir (TÜİK, 2018). Peynir üretiminde süt pıhtılaştırıcısı olarak rennet kullanımı dünyada büyük öneme sahiptir. Rennetler için küresel pazar yaklaşık 300 milyon € değerindedir (Fox, 2017). Peynir üretimi ve tüketimi giderek artış göstermekte fakat buzağı renneti temini giderek azalmaktadır (Shieh ve ark., 2009). Buzağı kesimine karşı çıkılması, rennetin yüksek fiyatı, diyet

(vejetaryenlik), veya rekombinant buzağı kimozininin Fransa, Almanya ve Hollanda'da yasaklanması gibi birçok neden başka kaynaklardan süt pıhtılaştırıcı enzimler aramayı teşvik etmiştir. Buzağı dışında kuzu, deve, keçi, oğlak, manda, maymun, domuz, sığır ve tavuk midesinde de kimozin enzimi bulunmaktadır. Hayvansal kaynaklı süt pıhtılaştırma enzimlerin dışında mikrobiyal, rekombinant ve bitkisel kaynaklı enzimler üzerinde de çok fazla durulmuştur. Fakat bu kaynaklardan elde edilen enzimler peynirde istenmeyen yapı, tat, aroma, proteinde azalmaya ve peynir randımanında çok ciddi kayıplara yol açabilmektedir.

Ülkemizin Mardin ili Derik ilçesine bağlı köylerde yıllardır tavşan midelerinden sıvı rennet elde ederek geleneksel olarak peynir yapmaktadırlar. Yöre insanlarının tavşan rennetiyle yapılan peynirin tat ve aromasının buzağı, kuzu ve oğlak rennetleriyle yapılan peynirlerden daha iyi olduğu ve raf ömrünün uzun olduğunu söylemektedir. Literatürde tavşan renneti ile ilgili olarak peynir yapımı için iyi bir kaynak olabileceği ve peynir üretiminde kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu öngörülmektedir (Rao ve Dutta, 1981; Nurliyani ve ark., 2013; Dobler ve ark., 2016; Alihanoğlu ve ark., 2017). Fakat tavşan rennetinin genel fizikokimyasal, enzimatik, mikrobiyolojik ve biyokimyasal bileşimi ile ilgili çalışma bulunmamaktadır.

Bu bilgilerden yola çıkarak tavşan rennetinin buzağı rennetine en iyi alternatif enzim olabileceği düşüncesini doğurmaktadır. Tavşan rennetinin tanımlanması, mikrobiyolojik, enzimatik, fizikokimyasal ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ayrıca bu özelliklerin inek rennetine karşılaştırmalı olarak ölçülmesi amaçlanmaktadır.

- Tavşan midesi ve inek şirdeninden rennet ekstraksiyonunun yapılması
- Elde edilen rennetlerin protein içeriğinin belirlenmesi ve eşit protein içeriklerine standardize edilmesi
- Rennetlerin genel fizikokimyasal ve enzimatik özelliklerinin belirlenmesi
- Rennetlerin mikroflorasının belirlenmesi
- Rennetlerin başka substratlar üzerindeki etkisinin belirlenmesi
- Rennetlerin içerdiği proteinlerin baz büyüklüğünün belirlenmesi

- Kazein ve spesifik α, β, κ-kazeinler üzerindeki proteoliz etkilerinin belirlenmesi
- Farklı sütler üzerinde süt pıhtılaştırma aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Kimozin kaynakları

Süt ile beslenen buzağıların midesinden elde edilen, peynir üretiminde kullanılan enzim rennet olarak bilinir. Peynir üretimi 1960' dan bu yana 3.5 kat artmıştır ancak buzağı kesiminin kısıtlanması ve fiyatının yüksek olmasıyla rennet tedariği azalmıştır. Bu nedenle buzağı renneti yerine geçebilecek başka aspartik preteinaz arayışına gidilmiştir. Dört temel kaynaktan izole edilen aspartik proteinazlar ticari olarak kullanılmaktadır. Aspartik proteinazlar; hayvanlardan, bitkilerden, mikroorganizmalardan ve rekombinant olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedir.

2.1.1. Hayvan kökenli aspartik proteinazlar

Rennet, memelilerin midelerinde üretilen birden fazla enzimin (kimozin, pepsin ve çok az miktarda gastriksin) oluşturduğu kompleks bir karışımdır. Rennet, kesilen hayvanların yaşına ve önceki beslenme şekline bağlı olarak kimozin ve pepsin içerir. Standart rennetin % 88-94 kimozinden oluşur, ancak olgunlaşmış hayvan rennetinde % 90-94 oranına kadar pepsin bulunurken yalnızca % 6-10' ü kimozin bulunur (Broome ve Limsowtın 1998). Bu enzimler midede preproenzim olarak sentezlenir ve daha sonra asidik ortamda aktif enzim haline dönüştürülür. Geleneksel olarak peynir üretimi için sığır renneti kullanılır.

Diğer hayvansal (kuzu, keçi, manda ve deve) rennetler de sığır rennetine alternatif olarak farklı çalışmaların odak noktası olmuştur. Sığır renneti dışında diğer hayvanlardan elde edilen rennetler üzerine yapılan detaylı yapısal çalışmalar azdır. Bu çalışmalar temel olarak enzim preparatlarının primer yapısı, saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonunun belirlenmesine odaklanmıştır.

Foltmann (1966), domuz yavrularının kimozinden yoksun olduğunu bildirmiştir ancak Foltmann ve ark. (1978) yılında yapmış oldukları çalışmada ise

yeni doğmuş domuz yavrularının, buzağı kimozinden ayırt edilemeyen bir gastrik proteinaz ürettiğini; domuz yavrularının doğumdan hemen önce ve doğumdan yaklaşık bir hafta sonra kimozin ürettiğini ancak 20 gün sonra pepsin ile yer değiştirdiğini bildirmişlerdir.

Malpress (1967), Foltmann ve Axelsen (1980) insan bebeklerin mide suyundaki aspartik proteinazları araştırmışlardır. Fakat insan bebeklerin mide suyunda kimozini tanımlayamamışlardır. Ancak Henschel ve ark. (1987) bir immünodifüzyon testi kullanarak bebeklerin kimozini salgıladığını bildirmişlerdir.

Valles ve Mocquot (1972) yapmış olduğu araştırmada buzağı midesinin kalitesi, miktarı, pH ve sıcaklığın rennet ekstraksiyonu üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda düşük pH değerlerinde rennet ekstraksiyonu ve kimozin aktivasyonunun daha başarılı olduğunu bildirmişlerdir.

Foltmann ve Axelsen (1980) genç kedilerin, köpeklerin, sıçanların ve kirpilerin mide dokusu ekstraklarının buzağı kimozine karşı oluşturulan monospesifik antiserum ile reaksiyona girdiğini bildirmişlerdir. Jensen ve ark., (1982) yeni doğmuş kedilerin gastrik mukozasından prokimozin ve kimozini izole edip kısmen karakterize etmişlerdir.

Foltmann ve ark. (1981) domuz ve sığır sütünde domuz yavrusu kimozinin ve pepsinin süt pıhtılaşma aktivitesini araştırmışlardır. Domuz yavrusu kimozini ve domuz pepsininin domuz sütü üzerinde sığır sütüne göre daha iyi pıhtılaşma aktivitesine sahip olduğunu bildirmiştir.

Shamsuzzaman ve Haard (1984) ayıbalığının mide mukozası tarafından üretilen asit proteinaz A, B, C ve D olarak adlandırdıkları dört enzim izole etmişlerdir. Proteinaz A' nın buzağı kimozinine birçok açıdan benzediğini bildirmişlerdir.

Kageyama (2000) Yeni Dünya maymunlarının mukozal dokularından Pepsinojen A, Pepsinojen B ve prokimozini izole etmişlerdir. Yeni Dünya maymunlarının başlıca zimojenlerinin kimozinden ziyade pepsinojen A ve pepsinojen B olduğunu bildirmişlerdir.

Kageyama ve ark. (2000) yeni doğmuş sıçanların midesinden prokimozin ve pepsinojen F' yi izole etmişlerdir. Ayrıca elde ettikleri prokimozinin amino asit dizisini de karakterize etmişlerdir.

Elagamy (2000) deve ve bufalo midelerinden rennet ekstraksiyonu yaparak bu rennetleri fizikokimyasal açıdan karşılaştırmıştır. Deve rennetinin bufalo rennetine göre daha termostabil olduğunu belirtmiştir. Süt pH' ı düştükçe her iki rennettinde süt pıhtılaştırma aktivitesinin arrtığını fakat süt konsantrasyonu ve NaCl konsantrasyonunun artmasıyla süt pıhtılaştırma aktivitesinin azaldığını bulmuştur. Sütte $CaCl_2$ konsantrasyonunun artmasıyla her iki rennetin de süt pıhtılaştırma aktivitelerinin arttığını bulmuştur. Ayrıca deve renneti ve bufalo renneti için optimum çalışma sıcaklığı sırasıyla 50 ve 45 ºC olarak bildirmiştir.

Mohanty ve ark. (2003) bizon kimozininin 35.6 kDa'lık bir moleküler ağırlığına sahip olduğu ve bunun N-terminal amino asit sekansının sığır kimozini ile aynı olduğu gösterilmiştir. Termostabilite çalışmaları bizon kimozininin sığır kimozinine göre daha kararlı olduğunu ortaya koymuştur.

Kumar ve ark. (2006) yapmış oldukları çalışmaya göre oğlak midesinden rennet ekstraksiyonu yaptıktan sonra saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Oğlak kimozininin yaklaşık 36 kDa bir molekül ağırlığına ve 30 ºC' de pH 5.5 değerlerinde maksimum pıhtılaşma aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Moschopoulou ve ark. (2007) yapmış oldukları çalışmada, Yunanistan'da farklı bölgede bulunan ve Feta peyniri üretimi yapan fabrikalardan 20 adet geleneksel yöntemle elde edilen sıvı rennet örneği alıp iki gruba (A ve B) ayırmışlardır. Bu rennetleri kimyasal bileşimi ve enzimatik özellikleri açısından analiz etmişlerdir.

Analizler sonucunda, rennet A'nın pH, % kuru madde, % protein, % yağ ve %tuz içerikleri sırasıyla 4.74, %12.6, %1.99, %3.65 ve %6.5; rennet B'nin ilgili değerlerini sırasıyla 4.71, %18.37, %1.5, %3.22 ve %13.46 olarak bulmuşlardır. Enzimatik özellikleri bakımından rennet A'nın ortalama sütü pıhtılaştırma aktivitesini 14,28 IMCU/ml (International Milk Clotting Units), kimozin aktivitesi toplam aktivitenin %61,91'i ve lipolitik aktivitesini 1,15 LU (Lipase Units); rennet B'nin ilgili değerlerini ise sırasıyla 8.91 IMCU/ml, %63.11 ve 0.86 LU olarak bildirmişlerdir.

Boudjenah-Haroun ve ark. (2012) Cezayir bölgesinde bulunan farklı yaşlardaki (sütle beslenen, karışık beslenen ve yetişkin) develerin (*Camelus dromedarius*) midesinden rennet eksraksiyonu yapmışlardır. Bu rennetlere ek olarak ticari sığır pepsini ve ticari rennet kullanarak deve ve sığır sütü üzerinde enzimatik ve proteolitik özelliklerini analiz etmişlerdir. Analiz sonucunda sütle beslenen, karışık beslenen ve yetişkin develerden elde edilen rennetlerin protein içerikleri sırasıyla 1.26, 1.38 ve 1.44 g/L ve süt pıhtılaştırma aktiviteleri sırasıyla 0.135, 0.255, 0. 410 RU olarak bulmuşlardır. Develerden elde edilen enzimlerin hem deve hem de sığır sütü üzerindeki proteolitik aktivitesinin ticari enzimlerden yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

2.1.2. Bitki kökenli aspartik proteinazlar

Şimdiye kadar tanımlanan tüm bitki aspartik proteinazlar, diğer aspartik proteinazlar gibi preproenzimler olarak sentezlenmiştir, ancak bitki aspartik proteinazları daha sonra olgun iki zincirli enzimlere dönüştürülürken, hayvan aspartik proteinazlar tek zincirli enzimlere dönüştürülür (Costa ve ark. 2010).

Bitki kökenli aspartik proteinazlar ile yapılan peynirler çoğunlukla Portekiz'de, İspanya'nın sınır bölgelerinde ve Batı Afrika ülkelerinde bulunur. Bu bölgelerde, peynir üretimi için yüzyıllardan beri bitki kökenli süt pıhtılaştırma enzimleri kullanılmıştır (Raposo ve Domingos 2008). Peynir yapımında bitki kökenli aspartik proteinazlarının yaygın kullanımı için başlıca sınırlamalar vardır. Bu sınırlamalar; nihai ürünün düşük verimi, çiçeklerin proteinaz profilindeki heterojenlik ve mevsimsel çiçeklenme şeklindedir. Ayrıca, bitkilerden süt pıhtılaştırıcı proteinazların ekstraksiyonu çok fazla işçilik gerektirdiğinden pahalıdır.

Bitkilerin kök, gövde, yaprak, çiçek, tohum, meyve gibi çeşitli kısımlarından süt pıhtılaştırmada kullanılan proteolitik enzimler izole edilebilmektedir (Üçüncü, 2015). Farklı bitki kaynaklarından izole edilen aspartik proteinazlar Çizelge 2.1' de belirtildiği gibi rapor edilmiştir. Süt pıhtılaştırmada kullanılan bu enzimler oluşturduğu acı tat nedeniyle peynir yapımına uygun bulunmamıştır.

Çizelge 2.2. Bitkilerden izole edilen aspartik proteinaz örnekleri

Tür	Organ Kaynağı	Referans
Cynara cardunculus	Hücre süspansiyonu	Cordeiro ve ark., (1998)
Cynara scolymus L.	Çiçek	Sidrach ve ark., (2005)
Moringa oleifera	Çiçek	Pontual ve ark., (2012)
Onopordum acanthium L.	Çiçek	Brutti ve ark., (2012)
Cirsium vulgare	Çiçek	Lufrano ve ark., (2012)
Bromelia hieronymi	Meyveler	Bruno ve ark., (2010)
Centaurea calcitrapa	Hücre süspansiyonu	Raposo ve Domingos., (2008)
Albizia lebbeck	Tohum	Egito ve ark., (2007)
Helianthus annuus	Tohum	Egito ve ark., (2007)
Silybum marianum	Çiçek	Vairo-Cavalli ve ark., (2005)
Oryza sativa	Tohum	Asakura ve ark., (1997)

Bunlara ilaveten kabak, salatalık, domates, arpa, pirinç, buğday, sorgum ve nilüfer gibi birçok bitkilerde proteinaz elde edilmiştir (Doi ve ark, 1980; Morris ve ark, 1985; Polanowski ve ark, 1985; Belozersky ve ark, 1989).

2.1.3. Mikrobiyal kökenli aspartik proteinazlar

Mikrobiyal kökenli süt pıhtılaştırma enzimleri süt endüstrisinde kimozin yerine alternatif olarak kullanılmıştır. *Rhizomucor pusillus, Rhizomucor miehei, Cryphonectria parasitica, Serratia liquifaciens, Macrococcus caseolyticus, Bacillus cereus, Bacillus polymyxa, Bacillus mesentericus, Bacillus coagulans ve Bacillus subtilis'*den izole edilen süt pıhtılaştırma enzimleri peynir yapımında önemli ölçüde kullanılmıştır (Nakayama, 1965; Puhan, 1969). Fakat mikrobiyal kökenli enzimler aşırı proteolitik aktiviteleri ve daha yüksek termostabiliteleri nedeniyle peynir yapımı için kısmen uygundur.

Ayrıca *Endotelia parasitica* (Sardinas, 1968), *Penicillium janthinellum* (Hofmann ve Shaw, 1964), *Mucor pusillus* (Arima ve ark., 1970), *Mucor miehei* (Sternberg, 1971), *Rhizopus chinensis* (Fumamoto ve ark, 1967), *Aspergillus awamori* (Ostoslavskaya ve ark., 1986), *Aspergillus niger* (Koaze ve ark., 1964), *Trichoderma reesei* (Pitts, 1992), *Saccharomyces cerevisiae* (MacKay ve ark, 1988), *Yarrowia lipolytica* (Yamada ve Ogrydziak, 1983), *Sulfolobus acidocaldarius* (Lin ve Tang, 1990) mikroorganizmalarından proteolitik enzimler izole edilip araştırılmıştır.

Areces ve ark. (1992), *Mucor bacilliformis*'den süt pıhtılaştırma aktivitesine sahip bir asit proteazı izole etmişlerdir ve amino asit kompozisyonu, diğer mikrobiyal proteinazlara çok benzer olduğunu bildirmişlerdir.

Hashem (1999), *Penicillium oxalicum* tarafından süt pıhtılaştırıcı enzim üretkenliğini optimize etmiştir ve 8 günlük statik kültürlerdeki *Penicillium oxalicum*'un bir rennin üreticisi olarak en umut verici mantar olduğunu gözlemlemiştir. Hashem (2000), *Penicillium oxalicum*'dan süt-pıhtılaştırma enzimini aseton, etanol ve metanol ile fraksiyonel çökeltme yoluyla kısmen saflaştırmıştır ve % 60-70 etanol fraksiyonunun en yüksek süt pıhtılaştırma etkinliğine sahip olduğunu bildirmiştir.

C. parasitica proteinaz, *Rhizomucor sp*.' den izole edilen süt pıhtılaştırma enzimlerine göre daha büyük bir proteolitik aktiviteye sahiptir. Mikrobik rennetler ve kimozinin aksine *C. parasitica* proteinazı sığır κ-kazeini Phe105 – Met106 bağınıı ayırmadığını, Ser104-Phe105 bağını ayırdığı bildirilmiştir (Egito ve ark. 2007). Bundan dolayı *C. parasitica* proteinaz, genellikle Emmental ve İtalyan peynir çeşitleri üretiminde kullanılan bir aspartik proteinazdır (Claverie-Martin ve Vega-Hernandez 2007).

2.1.4. Rekombinant kimozin

ABD' de Gıda ve İlaç İdaresi tarafından tescil edilen rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen gıda endüstrisinde kullanılan ilk enzim rekombinant kimozindir (Flamm 1991; Jacob ve ark, 2011). Şu anda rekombinant kimozin' in küresel rennet pazarının % 70-80'ini oluşturduğu bildirilmiştir (Johnson ve Lucey 2006; Jacob ve ark. 2011). Kimozin ekspresyonu için farklı mikroorganizmalar konak olarak kullanılmıştır.

Escherichia coli'de buzağı prokimozini üretilmiş olup ayrıca genin yapısı ve rekombinant enzimin özellikleri analiz edilmiştir. *E. coli*' de çözünmez inklüzyon cisimcikleri olarak üretilen bu proenzim, agregat oluşumu ve düşük aktivite ile sonuçlanmıştır. Bu olumsuz sonuçlara rağmen doğal buzağı kimozinden ayırt edilememiştir (Foltmann 1999). Bu karmaşık ve pahalı prosedürleri önlemek için, enzim, mayada (*S. cerevisiae ve Kluyveromyces lactis*) eksprese edilmiştir.

Mellor ve ark. (1983) kimozini pro-segment olmadan klonlamış ve kimozin genini içeren klonlardan süt pıhtılaşma aktivitesi gözlemlememiştir. Sonuçlar, pro-segmentin proteinin doğru katlanması için gerekli olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde Vallejo ve ark. (2008) bufalo kimozinini pro-segment olmadan *Pichia pastoris*'te eksprese etmiş olup elde edilen enzimin süt pıhtılaştırma aktivitesinin olmadığını gözlemlemişlerdir. Prokimozin ayrıca *Aspergillus nidulans* ve *A. niger*'de glukoamilaz-prokimozin füzyon proteini ve *Tricoderma reesei* olarak sellobiyhidrolaz I-prokimozin füzyon proteini olarak eksprese edilmiştir (Foltmann 1999). Her durumda, birincil translasyon ürünü, sığır kimozine benzer bir moleküler ağırlığa sahip olan bir polipeptide işlenmiş ve salınmış polipeptitler, enzimatik olarak sığır kimozininden ayırt edilememiştir.

Ayrıca kuzu (Rogelj ve ark. 2001), deve (Kappeler ve ark. 2006), manda (Vallejo ve ark. 2008) ve keçi (Vallejo ve ark. 2012) gibi diğer memeli hayvan kökenli kimozinler de rekombinant olarak üretilmiştir. Son zamanlarda Vallejo ve ark. (2012) 4 farklı rekombinant kimozin (*Pichia pastoris* içinde eksprese edilen keçi ve bufalo kimozinleri ve *Aspergillus niger*'de ifade edilen sığır ve deve kimozini) ile ilgili doğrudan karşılaştırmalı bir çalışma gerçekleştirmiştir. Rekombinant keçi

kimozinin, bufalo, sığır veya deve rekombinant enzimlere kıyasla en iyi katalitik etkinliği gösterdiğine işaret etmişlerdir. Ayrıca, rekombinant keçi kimozini diğer 3 enzimden daha iyi spesifik proteolitik aktivite ve daha geniş bir pH etki alanı sergilemiştir. Rekombinant keçi kimozininin, peynir yapımında kullanılmak üzere rekombinant sığır kimozine çok iyi bir alternatif oluşturduğu ileri sürülmüştür.

2.2. Kimozin Enziminin Fizikokimyasal Özellikleri

2.2.1.Moleküler ağırlık

Foltmann (1964), amino asit dizisini kullanarak kimozinin molekül ağırlığını 30.7 kDa olarak belirlemiştir. Benzer şekilde bufalo kimozin için 23 kDa, 35.6 kDa ve ~36 kDa (Rao, 1984; Mohanty ve ark, 2003; Malak ve ark., 1996), dana kimozin için 36.3–36.5 kDa (Foltmann ve ark, 1977; Kleinert ve ark, 1988), kuzu kimozini için 36 kDa ve 37.5 kDa (Baudys ve ark, 1988; Rogelj ve ark, 2001), oğlak kimozini için 44 kDa ve 36 kDa (Amourache ve Vijayalakshami, 1984; Moschopoulou ve ark, 2006; Kumar ve ark., 2006) molekül ağırlıklarında bildirilmiştir.

2.2.2. Optimum pH

Fox (1969) kazeinin kimozin tarafından parçalanması sonucu ortaya çıkan proteoliz ürünlerinin pH değerlerini 4.6-6.4 aralığında değiştiğini ve optimum pH değerinin 5.8 olduğunu bildirmiştir. Mohanty ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada bufalo kimozininin süt pıhtılaştırma aktivitesini pH 5.5'te en yüksek seviyede olduğunu gözlemlemiştir. Benzer bir çalışma Moschopoulou ve ark. (2006), keçi kimozininin maksimum süt pıhtılaşma aktivitesi pH 6.0'da gösterdiğini gözlemlemiştir. Kumar ve ark., (2006) oğlak rennetinin pH 5.5' optimum süt pıhtılaştırma aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir.

2.2.3. pH stabilitesi

Foltman (1959) yılında yaptığı çalışmada kristal halde bulunan kimozin çözeltisinin optimum çalıştığı pH değerlerinin 5.3-6.3 aralığı olduğunu pH 2 de bile

aktivitesini kısmen koruduğunu gözlemlemiştir. Asidik koşullar altında (pH 3-4) otodegredasyondan dolayı enzim aktivitesini hızla kaybettiğini, alkali pH değerlerinde (9.8'in üzerinde), kayıp geri dönüşümsüz bir konformasyon değişikliğinden kaynaklandığını bildirmiştir (Cheeseman, 1965). Foltmann (1970) ve Mezina ve ark. (2001) ayrıca sığır ve transgenik koyunlardan elde edilen süt pıhtılaşma enziminin, pH 7.0'da pıhtılaşma gözlenmediğinden, asidik pH'da stabil olduğunu bildirmiştir.

2.2.4. İzoelektrik nokta

Buzağı kimozini için izoelektrik nokta çoğu araştırmacılar tarafından 4.6 (Foltmann, 1970), 4.7 ± 0.05 (Righetti ve ark, 1977), 4.5-5.0 (Martin ve ark, 1982), 4.5-4.7 (Kleinert ve ark, 1988) ve 4.55-5.0 (Bines ve ark., 1989) olarak bildirilmiştir. Oğlak kimozinin izoelektrik noktası 6.0 (Amourache ve Vijayalakshmi 1984), 4.6-5.1(Moschopoulou ve ark., 2006) olduğu bildirilmiştir.

2.2.5. Optimum sıcaklık

Optimum sıcaklık 30-50 ° C arasında değişmektedir, ancak enzim aktivitesi 20-50 °C aralığında daha yüksektir. Berridge (1952), saflaştırılmış kimozin için optimum sıcaklığın 30 ile 40 ° C arasında olduğunu gözlemlemiştir. Shindo ve Arima (1979), Elagamy (2000), Mohanty ve ark. (2003) ve Kumar ve ark. (2006) sırasıyla sığır, deve, bufalo ve keçi kimozini için optimum sıcaklık değerlerinin benzer olduğunu rapor etmişlerdir.

2.2.6. Isı stabilitesi

Kimozin enzimi ile yapılan çalışmalarda enzim farklı sürelerde yüksek sıcaklıklara maruz bırakılarak enzimin aktivitesindeki değişimler belirlenmiştir. Foltmann (1959) kimozin enziminin oda sıcaklığına kıyasla 2 °C'de daha kararlı olduğunu bildirmiştir. Shindo ve Arima (1979), kimozinin 50 °C'nin altında nispeten stabil olduğunu gözlemlemişlerdir. Kawaguchi ve ark. (1987), sıcaklık 45 ila 55 °C arasında arttırıldığında, kimozin aktivitesinin hızlı kaybını da gözlemlemiştir.

Elagamy (2000), sığır ve bizon kimozine kıyasla deve kimozini için yüksek ısı direnci rapor etmiştir. Mohanty ve ark. (2003), bufalo kimozinin 50 °C'ye kadar stabil olduğunu ve sıcaklığın 60 °C'ye yükseltilmesi durumunda % 50' lik bir nispi süt pıhtılaştırma aktivitesini kaybettiğini gözlemlemiştir. Kumar ve ark. (2006) ayrıca, keçi kimozininin 55 °C sıcaklığa kadar stabilitesini kısmen koruduğunu bildirmişlerdir.

2.3. Kimozinin Mikrobiyolojik Özellikleri

Peynir üretim teknolojisinde önemli bir konu rennetin mikroorganizma yüküdür. Mikrorganizma yükü, hem rennetin dayanıklılığı hem de peynir üretim teknolojisi açısından önemlidir. Rennetlerin içerdiği mikroorganizmalar nedeniyle aktivitelerini kaybettikleri gibi peynir kalitesini olumsuz etkiledikleri belirtilmektedir (Koçak, 1979).

Uraz (1976) yapmış olduğu çalışmada 19 adet sıvı rennet örneğini mikrobiyolojik açıdan incelemiştir. Araştırma sonucunda total aerobik mezofil bakteri, anaerob spor oluşturan bakteri, maya ve küf ile bulaşık olduğunu ayrıca koliform grubu bakterilere rastlanmadığını bildirmiştir.

Koçak (1979) ülkemizde kullanılan sıvı rennetlerin farklı ambalaj ve depolama şartlarındaki özelliklerini araştırılmıştır. Oda sıcaklığı ve plastik ambalajın saklamaya uygun olmadığı ve bazı rennetlerin koliform grubu bakteri, anaerob spor oluşturan bakteri ,maya ve küf içerdiğini bildirmiştir.

Çakmakçı ve Boroğlu (2004) tarafından gerçekleştirilen araştırmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinde bulunan süt işletmelerinde kullanılan peynir yapımında kullanılan rennetlerin mikrobiyolojik, duyusal, fiziksel, kimyasal özellikleri ve enzim kompozisyonu incelenmiştir. Araştırma sonucunda rennetlerin çok değişik özelliklere sahip olduğu ve Peynir Mayası Standardı'na (TS 3844) birçok özellik bakımından uymadığı belirtilmiştir. Özellikle maya kuvvetlerinin etikette belirtilenden farklı olduğunu bildirmişlerdir.

Florez ve ark. (2006) dört farklı oğlak enzim (rennet 1, 2, 3, 4) ekstraktını biyokimyasal, enzimatik ve mikrobiyolojik olarak karakterize etmişlerdir. Rennetlerin pH'ı, sırasıyla 4.83, 4.10, 4.18 ve 3.78 olarak bulmuşlardır. Rennetlerde toplam aerobik mezofilik bakteriler $1{,}70 \times 10^{7}$ –$1{,}21 \times 10^{8}$ kob/ml, maya ve küf ise 1.14×10^{3}-$1.16\ 10^{5}$ kob/ml arasında bulmuşlardır. *Enterococci* sadece rennet 3' de 1.35×10^{3} kob/ml, *Staphylococci* ise rennet 1 ve rennet 3' de sırasıyla 1.61×10^{5}, 1.62×10^{2} kob/ml olarak bulunmuştur. Rennetlerin enzimatik aktivitelerini yarı kantitatif bir sistem olan API ZYM kiti ile üç farklı pH'da (6.0, 5.0 ve mevcut pH'ları) incelemişlerdir. Rennet 1' in diğer tüm rennetlerle karşılaştırıldığında yüksek alkali ve asit fosfataz aktivitesi gösterdiğini, rennet 2 ve rennet 3 ise diğer rennetlere göre daha yüksek N-asetil-β-glukozaminidaz aktivitesi göstermiştir. Artan pH' ın leucine arylamidaz, β- galaktosidaz ve β -glukosidaz' ı aktive ederken esteraz C4, esteraz-lipaz C8, sistein arilamidaz, asit fosfataz, naftol-AS-BI-fosfohidrolaz ve β-glukuronidaz enzimlerini inaktive ettiğini yada aktivitelerinin azalttığını bildirmişlerdir.

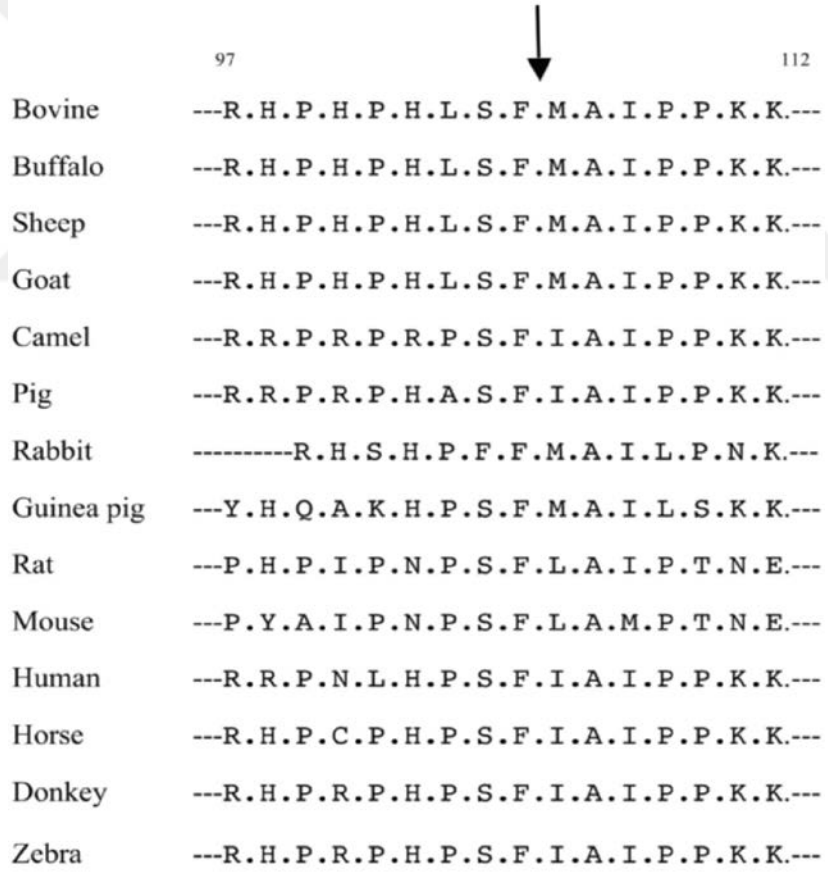
Moschopoulou ve ark. (2007) yapmış oldukları çalışmada, Yunanistan'daki iki farklı bölgede bulunan ve Feta peyniri üretimi yapan fabrikalardan 20 adet geleneksel yöntemle elde edilen sıvı rennet örneği alıp olarak iki gruba (A ve B) ayırmışlardır. Bu rennetleri mikrobiyolojik açıdan analiz etmişlerdir. Araştırmacılar, yaptıkları analizler sonucunda mikrobiyolojik kalite açısından log10 kob/ ml olarak ifade ettikleri toplam mezofilik mikroflora, koliform ve enterokokların ortalama sayısını rennet A'da 4.86, 2.61 ve 3.11; rennet B'de 4.39, 0.42 ve 2.43 olarak bulmuşlardır. Rennet örneklerinin hiçbirinde *Salmonella sp.* ve *S. aureus*'a rastlamamışlardır.

Gürses ve Çakmakçı (2009) yaptıkları çalışmada ise, Erzincan Tulum Peyniri üreten göçebelerin, kuru tuzlanmış şirdenden yaptıkları ev tipi rennetin mikrobiyolojik özelliklerini araştırmışlardır. Örneklerin toplam aerobik mezofilik bakteri ile maya ve küf sayıları sırasıyla $1{,}9 \times 10^{6}$- $9{,}0 \times 10^{6}$ ve $1{,}0 \times 10^{5}$- $3{,}6 \times 10^{6}$ kob/ml arasında değiştiğini ve örneklerin sadece 1 adedinde koliform bakteri ($1{,}2 \times$

10^3 kob/ml) olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca rennet örneklerinin hiçbirinde anaerob spor bakteri varlığı tespit edilememiştir (<1 kob/ml).

2.4. Kimozinin Kazein Hidrolizi

Martin ve ark., (2013)' de birkaç türün (bovin, bizon, koyun. keçi, deve, domuz, tavşan, kobay faresi, sıçan, fare, insan, at, eşek, zebra) κ-kazeinini izole edip ve amino asit dizisini sıralamışlardır. Bu türlerin kimozine duyarlı κ-kazein dizileri Şekil. 2.1' de verilmiştir. Gösterilen 14 türün κ-kazeinlerinde 105. pozisyonunda Phe, 107. pozisyonunda Ala bulunmaktadır. Ancak 106. pozisyonda bazı türlerde farklılık olup Met, Leu veya Ile olabilmektedir.



Şekil 2.1. Farklı hayvanlara ait kazeinlerin kimozine duyarlı kazein bölgeleri. Kimozin tarafından bölünme bölgeleri okla gösterilmiştir. A: Alanin, C: Sistein, E: Glutamik asit, F: Fenilalanin, H: Histinin, I: İzoleusin, K: Lizin, L: Leusin, M: Metionin, N: Asparajin, P: Prolin, Q: Glutamin, R: Arjinin, S: Serin, T: Threonin, Y: Tirozin harfleri amino asitleri simgelemektedir.

Mercier ve ark. (1976) memelileri κ-kazein yapısını ve kimozin ile bölünme yerine göre iki gruba ayırmışlardır. Grup I türleri (inek, keçi, koyun, hint öküzü, manda, kobay faresi, tavşan) yüksek dikarboksilik amino asit içeriğine, düşük hidrofobikliğe ve karbonhidrat içeriğine sahiptir. Ayrıca κ-kazeinin Phe105-Met106 bağları arasında parçalanma özelliğindedir. Grup II türleri (at, insan, domuz, sıçan, zebra, deve, fare) yüksek prolin içeriğine, daha az dikarboksilik amino asitlere, yüksek hidrofobikliğe ve karbonhidrat içeriğine sahiptir. Bu gruptakiler ise κ-kazeinin Phe97-Ile98 veya Phe105-Leu106 bağları arasında parçalanma özelliğine sahiptir.

κ-kazeinin Phe105-Met106 bağının hidrolizi, iki parçanın oluşumuna yol açar; para- κ -kazeini olarak anılan hidrofobik N-terminal parçası kazein misellerine bağlı kalırken, glikomakropeptit (GMP) olarak anılan hidrofilik C-terminal fragmanı süt serumu içine karışır. Para-κ-kazeinin kimozin için birçok potansiyel bölünme bölgesi vardır, ancak ya çözelti içinde ya da peynirde hidrolize edilmediği görülmektedir (Green ve Foster, 1974). Coolbear ve ark. (1996), sığır κ-kazeinin pH 6.6' da kimozin hidrolizinin para- κ -kazeine (Glu1-Phe105) ek olarak κ-kazeinin Phe18 ve Ser33'üne karşılık gelen N-terminali ile iki küçük para- κ -kazeini ürettiğini bildirmiştir.

Kimozinin κ-kazeini parçalamasının yanı sıra αs1, αs2 ve β-kazeinin bazı bağlarını hidrolize eder. Böylece kimozin dört kazeinin peptid bağlarını yavaş yavaş hidrolize ederek midede pıhtıların sindirilmesine katkıda bulunur. Kimozinin κ-, β- ve αs1-kazeini, sırasıyla Phe105-Met106, Leu192-Tyr193, ve Phe23-Phe24 bağlarını hidroliz ettiği bildirilmiştir (Carles ve Ribadeau-Dumas, 1984; Carles ve Ribadeau-Dumas, 1985).

Kimozin, αs1-kazeinini Phe23-Phe24 bağlarını kırarak (Carles ve Ribadeau-Dumas, 1985; Hill ve ark., 1974) peynirdeki starter proteinazlar tarafından hızla hidroliz edilebilen αs1-kazein (f1-23) peptidini oluşturur (Creamer ve ark., 1982; Fox ve McSweeney, 1997). Ayrıca kimozin pH 6.5' de 0.1 M fosfat tamponu içerisinde αs1-kazeini: Phe23-Phe24, Phe28-Phe29, Leu40-Ser41, Leu149-Phe150, Phe153-Tyr154, Leu156-Asp157, Tyr159-Pro160 ve Tyr164-Tyr165 bağlarını

hidroliz eder (McSweeney ve ark., 1993). pH (Mulvihill ve Fox, 1977) ve iyonik kuvveti (McSweeney ve ark, 1993; Mulvihill ve Fox, 1979a) αsl-kazeinin kimozin tarafından hidrolizini etkiler. β-kazein hidrolizinin tersine,% 5 NaCl αs1-kazeinin hidrolizini teşvik eder ve pH 5.2'de, yukarıda bahsedilen bağlara ilaveten ayrıca Leu11-Pro12, Phe32-Gly33, Leu101-Lys102, Leu142-Ala143 ve Phe179-Ser180 bağları hidrolize olur (McSweeney ve ark., 1993). Kimozin ile αs1-kazeinin belirgin hidrolizi % 20 NaCl'de bildirilmiştir (Fox ve McSweeney, 1997).

αs2-Kazeinin kimozin ile proteolizi αs1-kazeinine göre nispeten dirençli olduğu görülmektedir. αs2-kazeinin pH 6.5'de hidrolizi, proteinin hidrofobik bölgeleri ile sınırlıdır (yani 90-120 ve 160-207 tortuları). McSweeney ve ark. (1994) kimozin tarafından αs2-kazeinin hidrolizinde yedi bölünme bölgesi tespit etmiştir.Bunlar Phe88-Tyr89, Tyr95-Leu96, Gln97-Tyr98, Tyr98-Leu99, Leu99-Tyr100, Phe163-Leu164, Phe174-Ala175 ve Tyr179-Leu180 olarak bildirilmiştir.

Visser ve Slangen (1977) yapmış oldukları araştırmada, kimozinin pH 5.4'te 0.05 M sodyum asetat tamponu içinde β-kazeini 7 bölgeden ayırdığını bildirmişlerdir. β-kazeinin kimozin tarafından hidrolizi Leu192-Tyr193, Ala189-Phe190, Leu165-Ser166, Gln167- Ser168, Leu163-Ser164, Leu193-Leu194, Leu127-Thr128 bağları üzerinden meydana geldiği belirtilmiştir.

Dolezalek ve Studenousky (1978) buzağı midesinden izole edilen laktochym, *Rhizomucor michei*'den izole edilen rennilaz ve *Bacillus subtilis*'ten izole edilen mikrozym enzimlerini kullanarak sütü pıhtılaştırma özelliklerine bakmışlardır. Araştırma sonucunda üç kaynaktan izole edilen enzimlerin κ-kazein üzerindeki etkileri birbirlerinden farklı olmadığını, fakat laktochym enzimiyle bir miktar αs-kazeinde görülen parçalanma rennilaz enzimi kullanıldığında daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Trujillo ve ark. (2000) buzağı renneti, kuzu renneti, sığır kimozin, sığır pepsin, Rhizomucor miehei ve *Cryphonectria parasitica* proteinazlarının proteolitik aktivitelerini UREA-PAGE ile belirlemişlerdir. UREA-PAGE sonuçlarında tüm

enzimlerin koyun kazeinini hidroliz ettiğini ve αs1-CN ve β-CN'nin başlangıç parçalanma ürünleri olarak αs-I ve β-I oluştuğunu göstermişlerdir. Araştırma sonucunda mikrobiyal kaynaklı enzimlerin koyun tüm kazeini üzerindeki proteolitik aktivitelerinin hayvansal kaynaklı enzimlere oranla daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

2.7. Kimozinin Farklı Sütler Üstündeki Pıhtılaşma Etkinliği

Buzağı kimozinin inek, keçi, koyun, hint öküzü, manda sütlerini kolaylıkla pıhtılaştırır (Mercier ve ark., 1976). Deve kimozinin sığır sütünü kısmen pıhtılaştırabildiğini ancak sığır kimozinin deve sütünü pıhtılaştıramadığı yapılan çalışmalarla ileri sürülmüştür (Farah ve ark., 2004; Kappeler ve ark., 2007; Jensen ve ark., 2013). Sığır κ- kazein P3 pozisyonunda bir Lösin amino asidine sahipken, deve κ- kazeinin prolin amino asidine sahip olduğu ve bunun da sığır kimozinin deve κ-kazeini parçalayamadığı ileri sürülmüştür (Palmer ve ark., 2010).

Sığır kimozinin, sığır ve domuz sütü üzerinde benzer bir pıhtılaşma aktivitesine sahip olmasına rağmen, domuz kimozini domuz sütü üzerinde daha yüksek süt pıhtılaşma aktivitesine sahiptir (Foltmann, 1981b). Foltmann (1981b), küçükbaş hayvanlardan elde edilen enzimlerin ve domuz kimozinlerinin kendi türlerinin sütünü pıhtılaştırmada en verimli olduğunu bildirmiştir.

Ayrıca bufalo (Abdel Malak ve ark., 1996; Mohanty ve ark., 2003), koyun (Baudys ve ark., 1988; Rogelj ve ark., 2001), deve (Kappler ve ark., 2006; Wangoh ve ark. 1993), keçi (Kumar ve ark., 2006; Moschopoulou ve ark., 2006) ve fok (Shamsuzzaman ve Haard, 1984) kimozin elde edilmiş ve belirtilen enzimlerin süt pıhtılaştırma aktiviteleri incelenmiştir. Bu kimozinler, sığır sütü ve kendi türlerinin sütlerini pıhtılaştırabildiğini bildirilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Mide ve enzim

Bu çalışmada materyal olarak kullanılan tavşan midesi ve buzağı şirdeni Mardin' e bağlı Derik ilçesinin köylerinde yerel halktan kuru halde ve tuzlanmış şekilde, inek kimozini Chr-Hansen A/S (Hoersholm Danimarka) firmasından tedarik edilmiştir.

3.1.2. Süt ve süttozu

Çalışmada kullanılan inek, koyun, keçi, deve ve eşek sütleri Şalıurfa' ya bağlı Siverek ilçesinde bulunan yerel halktan temin edilmiştir. Pınar marka yağsız inek süttozu kullanılmıştır.

3.1.2. Kimyasal maddeler

API-ZYM , ZYM A, ZYM B kiti bioMérieux (Fransa) firmasından, Bovine serum albumin(BSA) ve Bradford Protein Assay kiti BIO-RAD (USA) firmasından ve araştırmada kullanılan diğer tüm kimyasallar Merck (Almanya) ve Sigma-Aldrich firmalarından tedarik edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1.Tavşan ve inek midelerinden rennet ekstraksiyonu

Önceden temizlenmiş ve tuzlu halde kurutulmuş tavşan midesi ve sütten kesilmemiş ineğin (buzağı) şirdeninden rennet ekstraksiyonu Wangoh ve ark., (1993)' e göre yapılmıştır. Öncelikle mide dokularını tuzdan arındırmak için dokuyu ovalamadan yıkayıp ardından tekrar kurutulmuştur. Mideler makas yardımıyla

yaklaşık 1 cm^2 parçalara bölündükten sonra % 2 borik asit içerikli % 6' lık NaCl solüsyonunda (1/10 w/v) 5 °C ' de 4 gün karıştırılarak bekletilmiştir. Karışım filtreden geçirildikten sonra elde edilen süpernatant 1500 rpm' de 15 dakika santrifüj edilmiştir. 1 N HCl yardımıyla süpernatantın pH' ı 4.7 ye ayarlandıktan sonra 25 °C de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 1 N NaOH ile süpernatantın pH 5.5' e getirilip tekrar 1500 rpm de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen özüt (rennet) 4 °C de depolanmıştır.

3.2.2. Protein içeriğinin belirlenmesi

Rennetlerin protein konsantrasyonunu belirlemek için BIO-RAD firmasından temin edilen Bradford Protein Assay kiti kullanılmıştır. Firmanın kullanıcı el kitabına göre işlemler gerçekleştirilmiştir. Öncelikle standart BSA (bovine serum albumin) farklı konsantrasyonlara (125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 µg/ml) seyreltilerek spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen değerler sonucunda kalibrasyon eğrisi çizilerek denklem elde edilmiştir (EK 1). Rennetlerin protein içerikleri bu denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.3. Süt pıhtılaştırma aktivitesinin belirlenmesi

Süt pıhtılaştırma aktivitesinin belirlenmesi Berridge (1952) yöntemine göre yapılmıştır. Öncelikle yağsız inek süt tozu (Pınar, Türkiye) kullanılarak % 10' luk (w/v), pH 6.5' e ayarlanmış 0.01 M $CaCl_2$ içerikli yeniden yapılandırılmış süt hazırlanmıştır. Hazırlanmış süte 1 ml rennet eklenip (1/10, rennet/süt) iyice karıştırıldıktan sonra 30 °C' de bir su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince sütün pıhtılaştığı ilk an kaydedilmiştir. Süt pıhtılaşma aktivitesi Berridge'in (1952) belirlemiş olduğu denklem kullanılmıştır.

$$RU = 10 \times V/T \times Q$$

RU: Rennet Birimi (Rennet Unit)
V: Standart süt miktarı(mL)

Q: Enzim miktarı(mL)

T: pıhtılaşma zamanı (sn)

3.2.4. Rennet sıcaklığının süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi

Tavşan ve buzağı renneti 30, 35, 40, 45, 50, 55 ° C' de 3 dakika bekletilerek sıcaklığın rennet üzerindeki aktivitesi incelenmiştir. Berridge (1952) yöntemine göre hazırlanan süte, belirtilen sıcaklık uygulamasından sonra rennet ilave edilmiştir. Rennetlerin süt pıhtılaştırma aktiviteleri RU cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.5. Süt pH' ının süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi

Berridge (1952) yöntemine göre hazırlanan sütün pH değerleri 0.1 M HCl kullanılarak 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8, 7.0' a ayarlanmıştır. Tavşan ve inek rennetlerinin, pH' ı değişirilmiş süte ilavesiyle pıhtılaştrma akriviteleri RU cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.6. Süt sıcaklığının süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi

Tavşan ve buzağı rennetlerinin 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 °C' deki süt sıcaklığının süt pıhtılaştırma aktiviteleri üzerinde etkisi incelenmiştir. Berridge (1952) yöntemine göre hazırlanan süte, belirtilen sıcaklık uygulamasından sonra rennet ilave edilmiştir. Rennetlerin süt pıhtılaştırma aktiviteleri RU cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.7. Enzim konsantrasyonunun süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi

Tavşan ve buzağı renneti konsantrasyonunun belirli oranda (0,01-0,3 ml) artırılmasıyla süt pıhtılaştırma aktivitesi incelenmişir. Berridge (1952) yöntemine göre hazırlanan süte, belirtilen konsantrasyonlarda rennet ilave edilmiştir. Rennetlerin süt pıhtılaştırma aktiviteleri RU cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.8. Substrat konsantrasyonunun süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi

Tavşan ve buzağı rennetlerinin aktiviteleri Berridge (1952) yönteminde belirtilen süt tozu miktarında modifikasyonlar yapılarak incelenmiştir. Rennetlerin aktiviteleri 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260 g/L substrat (süt tozu) aralığında incelenmiştir. Rennetlerin süt pıhtılaştırma aktiviteleri RU cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.9. $CaCl_2$ konsantrasyonunun süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi

Tavşan ve buzağı rennetlerinin aktiviteleri Berridge (1952) yönteminde belirtilen $CaCl_2$ miktarında modifikasyonlar yapılarak incelenmiştir. 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100 mM $CaCl_2$ konsantrasyonlarında süt hazırlanmıştır. Belirtilen konsantrasyonlarda $CaCl_2$ içerikli süte, rennet ilave edilmiştir. Rennetlerin süt pıhtılaştırma aktiviteleri RU cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.10. NaCl konsantrasyonunun süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi

Berridge (1952) yöntemine göre hazırlanan süte 0, 10, 20,30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 g/L NaCl eklenmiştir. Belirtilen NaCl içerikli sütlere tavşan ve inek rennetlerinin eklenmesiyle süt pıhtılaştırma aktiviteleri incelenmiştir. Rennetlerin süt pıhtılaştırma aktiviteleri RU cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.11 pH analizi

Rennetlerin pH içeriği önceden kalibre edilmiş cam elektrotlu Fisher sci. Model 10 (Denwer, U.S.) marka pH metre ile doğrudan ölçülmüştür.

3.2.12. % Kuru madde içeriği

Alüminyum kaplar etüvde 1 saat bekletilip darası (m) alınmıştır. Yaklaşık 3 gr kadar rennet tartılıp 105 °C' de çalışan etüvde 3 saat bekletilmiştir. Etüvde 3 saat

kurutulan rennetler desikatörde soğutulup tekrar tartılmıştır. Tekrar kurutma dolabına konulup 1 saat bekletilmiş ardından desikatöre alınıp soğutulup tartılmıştır. Bu işlem tartım sabit hale gelene kadar devam edilmiştir. Sabit hale geldiğinde % kuru madde oranı aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır .

Kuru Madde (%) = (m1-m)/(m2-m)x100
m: Kabın darası (g)
m2: Kurutmadan önceki numune ile kabın kütlesi (g)
m1: Kurutmadan sonra numune ile kabın kütlesi (g)

3.2.13. % Kül içeriği

Kalıntı içermeyen temiz krozeler kül fırınında sabit ağırlığa getirilmiştir. Desikatöre alınıp soğutulduktan sonra terazide darası alınmıştır. Krozelere yaklaşık 3 g rennet tartılmıştır. Krozelerde bulunan rennetler öncelikle etüvde kurutulmuştur. Sonra kül fırınında kademeli olarak 700 °C'ye çıkarılmıştır. Daha sonra desikatörde soğutularak tartılmıştır. Rennetlerin kül miktarı (%) aşağıda belirtilen formülle hesaplanmıştır.

%Kül = ((M2-M1)/m)x100
M2= Yakmadan sonraki kroze + kül ağırlığı
M1= Sabit tartıma getirilen krozenin ağırlığı
M = Alınan örnek ağırlığı

3.2.14. Mikrobiyolojik analizler

Mikrobiyolojik analizler için ince uzun cam tüplere 9 ml dilüsyon sıvısı (pepton water) etiketinde belirtildiği gibi hazırlanarak otoklavda 121 °C 15 dakika steril edilmiştir. Otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığına getirilen dilüsyon sıvısına steril şartlarda (steril malzeme) 1 ml rennet ilave edilerek 10^{-1}' lik dilüsyon hazırlanmıştır. Homojen dilüsyon elde etmek için tüpler vortekslenmiştir. 10^{-5}' lik dilüsyon sıvısı elde edilene kadar bir önce hazırlanan dilisyondan 1 ml alınıp 9 ml dilüsyon sıvısına aktarma işlemi yapılmıştır. Bu işlemler tavşan ve inek rennetleri

için ayrı ayrı hazırlanmıştır. Aşağıda belirtilen mikroorganizma sayılarının belirlenmesinde dilüsyon faktörü göz önünde bulundurularak hesaplama yapılmıştır. Tüm sonuçlar TS 3844 Peynir Mayası Standardı'na göre değerlendirilmiştir.

Tavşan ve inek rennetlerin toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı için PCA (Plate Count Agar, Merck) kullanılmıştır. Etiketinde belirtilen şekilde hazırlanıp 121 °C 15 dakika otoklavlanıp steril şartlarda petrilere dökülmüştür. Her dilisyondan (10^0 - 10^{-5}) 0,1 ml alınarak katılaşan besiyerine aktarılıp drigalski spatülü ile yayma kültür yöntemi uygulanmıştır. Her dilüsyondan iki paralel olarak hazırlanan petriler 30 °C'deki etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası besiyerinde oluşan koloniler sayılarak, aerobik mezofilik bakteri sayısı (log kob/ml) olarak hesaplanmıştır.

Tavşan ve inek rennetlerinde maya ve küf sayımı için YGC (Yeast-extract Glucose Chloramphenicol agar, Merck) kullanılmıştır. Etiketinde belirtilen şekilde hazırlanıp su içinde ısıtılıp eritildikten sonra 121 °C 15 dakika otoklavlanıp steril şartlarda petrilere dökülmüştür. Her dilüsyondan (10^0 - 10^{-5}) 0,1 ml alınarak katılaşan besiyerine aktarılıp drigalski spatülü ile yayma kültür yöntemi uygulanmıştır. Her dilüsyondan iki paralel olarak hazırlanan petriler 25 °C'deki etüvde 3-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sanrası besiyerinde oluşan koloniler sayılarak, maya ve küf sayısı (log kob/ml) olarak hesaplanmıştır.

Tavşan ve inek rennetlerinde Enterobakter ve koliform sayımı için VRBL (Violet Red Bile Lactose agar, Merck) kullanılmıştır. Etiketinde belirtilen şekilde hazırlanıp ısıtıcı üstünde 3 dakika kaynatılmıştır. Dökme yöntemi ile her dilüsyondan (10^0 - 10^{-5}) 1 ml alınarak steril boş petrilere aktarılıp üzerine 40-45 °C de tutulan besiyeri aktarılıp homojen karıştırılmıştır. Her dilüsyondan iki paralel olarak hazırlanan petriler 30 °C'deki etüvde 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sanrası besiyerinde oluşan koyu kırmızı-morumsu renkli koloniler sayılarak, enterobakter ve koliform sayısı (log kob/ml) olarak hesaplanmıştır.

Tavşan ve inek rennetlerinde Enterococci sayımı S-B (Slanetz ve Bartley agar, Merck) kullanılmıştır. Etiketinde belirtilen şekilde hazırlanıp su içerisinde 20 dakika

kaynatıldıktan sonra steril şartlarda petrilere dökülmüştür. Her dilüsyondan (10^0 - 10^5) 0,1 ml alınarak katılaşan besiyerine aktarılıp drigalski spatülü ile yayma kültür yöntemi uygulanmıştır. Her dilüsyondan iki paralel olarak hazırlanan petriler 44 °C'deki etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sanrası besiyerinde oluşan koloniler sayılarak, *Enterococci* sayısı (log kob/ml) olarak hesaplanmıştır.

Tavşan ve inek rennetlerinde Staphylococci sayımı için B-P(Baird Parker Agar, Merck) kullanılmıştır. Etiketinde belirtilen şekilde hazırlanıp 121 °C 15 dakika otoklavlanıp steril edildikte sonra 45-50°C sıcaklığa getirilmiştir. İçerisine önceden oda sıcaklığına getirilmiş yumurta sarısı emülsiyonu (Egg Yolk Tellürite, Merck) ilave edilmiş (950 ml B-P:50 ml Egg Yolk Tellürite) ve petrilere dökülmüştür. Her dilüsyondan (10^0 - 10^{-5}) 0,1 ml alınarak katılaşan besiyerine aktarılıp drigalski spatülü ile yayma kültür yöntemi uygulanmıştır. Her dilüsyondan iki paralel olarak hazırlanan petriler 37 °C'deki etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sanrası besiyerinde oluşan siyah ve gri renkli koloniler sayılarak, *Staphylococci* sayısı (log kob/ml) olarak hesaplanmıştır.

3.2.15. Rennetlerin polipeptit profillerinin belirlenmesi

İnek kimozin, tavşan ve inek rennetlerinin polipeptit profili Laemmli (1970) yöntemine göre belirlenmiştir. cam plaklara önce %12 lik seperasyon (ayrıştırma) jeli eklenmiştir daha sonra üzerine % 5' lik stacking (istifleme) jel eklenip tarak yerleştirilmiştir. Jel katılaştıktan sonra örnekler denatürasyon tamponu içinde su banyosunda 100 °C de 5 dakika boyunca kaynatılmıştır. Proteinler hazırlanan jele her birinden 30 µg ve 11-190 kDa aralığında değişen moleküler kütle markeri ile birlikte yüklenmiştir. Jeller yürütme tamponu (pH 8.3) içerisinde minijel tankında 150 V elektrik akımı altında ayrıştırılmıştır. Elektroforezden sonra Coomassie mavisi R-250 ile boyanmıştır. Boya asetik asit:metanol:damıtık su (10:20:70)' dan çözelti içerisinde uzaklaştırıldıktan sonra jeller mini BIS PRO (İsrail) cihazında WL ışık altında görüntüleri kaydedilmiştir. Elde edilen bantlar önceki çalışmalara dayandırılarak değerlendirilmiştir.

3.2.16. Proteolitik analizler

Protein hidrolizatlarının karakterizasyonunda çeşitli analitik teknikler yaygın olarak kullanılmıştır. Elektroforez proteolizi izlemek için en yaygın yöntemlerden biridir. Tavşan ve inek rennetlerinin proteolitik aktiviteleri elektroforetik olarak ölçülmüştür. Ayrıca proteolitik analiz için rekombinant inek kimozini Chr-Hansen A/S (Hoersholm Danimarka) kullanılmıştır.

3.2.16.1. SDS-PAGE analizi ile hidrolizin belirlenmesi

Rekombinant inek kimozin, tavşan ve inek rennetlerinin bütün kazein (inek sütü kazeini, sigma) üzerindeki hidroliz etkinliği Egito ve ark. (2007) belirlemiş oldukları yöntemde modifikasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bütün kazein (10mg/ml), %0.02 sodyum azid (w/v) içeren 100mM sodyum fosfat (pH 6.5) çözeltisinde ısıtılarak çözülmüştür. Bu çözeltiden ağzı kapalı tüplere 10 ml alınarak üzerine 150 µl protein içeriği eşitlenmiş enzimler (inek kimozin, tavşan tennet, inek rennet; 0,3 µg/ml protein) ilave edilmiştir. Enzim ilavesinden sonra tüpler farklı inkübasyon süreleri boyunca (1, 10, 40 dak, 1, 4, 6, 24, 48 saat) 37 °C inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası proteolizi engellemek için örnekler -20°C ye alınmıştır. SDS-PAGE analizi Laemli (1970) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir.

3.2.16.2. UREA-PAGE analizi ile hidrolizin belirlenmesi

İnek kimozin, tavşan ve inek rennetlerinin bütün kazein (inek sütü kazeini, sigma) üzerindeki hidroliz etkinliği Awad ve ark. (1999) belirlemiş oldukları yöntemde modifikasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bütün kazein (20mg/ml), 200mM sodyum asetat (pH 5.4) çözeltisinde ısıtılarak çözülmüştür. Bu çözeltiden ağzı kapalı tüplere 10 ml alınarak üzerine 150 µl protein içeriği eşitlenmiş enzimler (inek kimozin, tavşan tennet, inek rennet; 0,3 µg/ml protein) ilave edilmiştir. Enzim ilavesinden sonra tüpler farklı inkübasyon süreleri boyunca (1, 10, 40 dak, 1, 4, 6, 24, 48, 72 saat) 30 °C inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 1 N HCl ile çözeltinin pH değeri 4.6' ya ayarlanıp 4°C 10 dakika 15000 g' de santrifüj edilmiştir.

Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Proteolizi engellemek için peletler -20°C ye alınmıştır. UREA-PAGE analizi ile proteoliz belirlenmiştir.

3.2.16.3. Enzimlerin spesifik α, β, κ- kazein hidrolizi

Rekombinant inek kimozin, tavşan ve inek rennetlerinin α, β, κ- kazein (inek sütü kazeini, sigma) üzerindeki hidroliz etkinliği Wang ve ark. (2015) belirlemiş oldukları yönteme göre gerçekleştirilmiştir. α, β, κ- kazein (0,05mg/ml), 10 mM potasyum fosfat (pH 5.4) çözeltisinde ısıtılarak çözülmüştür. Bu çözeltiden ağzı kapalı tüplere 200µl alınarak üzerine 1.5 µl protein içeriği eşitlenmiş enzimler(inek kimozin, tavşan tennet, inek rennet; 0,3 µg/ml protein) ilave edilmiştir. Enzim ilavesinden sonra tüpler farklı inkübasyon süreleri boyunca (1, 10, 40 dak, 1, 2, 4, 6, 24 saat) 37 °C inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası proteolizi engellemek için örnekler -20°C ye alınmıştır. SDS-PAGE analizi Laemli (1970) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir.

3.2.17. Rennetlerin enzimatik aktivitelerinin belirlenmesi

APIZYM ® enzim test kiti, fosfataz, amino peptidaz, lipaz, esteraz ve karbonhidrat hidrolaz dahil olmak üzere enzimatik aktivitenin hızlı bir şekilde saptanması için tasarlanmış yarı kantitatif bir mikromethod sistemidir. APIZYM ® enzim test kitleri, 1977'den beri, klinik önemi olan, mikroorganizmaları karakterize etmek için başarıyla kullanılmıştır. Mikroorganizmalar dışında hücre süspansiyonları, dokular ve biyolojik sıvılar gibi örneklere de uygulanabilir.

Tavşan ve inek rennetlerinin enzim etkinlikleri APIZYM ® enzim test kiti (bioMérieux, Fransa) kullanılarak değerlendirilmiştir. İnek ve tavşan renneti üç farklı pH (kendi pH' ları, pH 5 ve pH 6) değerlerinde analiz edilmiştir. Rennetlerin pH 5' e ayarlamak için 0.1N HCl, pH 6' ya ayarlamak için 0.1 N NaOH kullanılmıştır. Rennetlerin pH değerleri ayarlandıktan sonra 1 saat bekletilmiştir. Rennet ekstraksiyonundan 65 µl alınarak bir API-ZYM küpülünün oyuklarına inoküle edilip 30 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her küpüle bir damla ZYM

A(bioMérieux, Fransa, ref. 70494) ve bir damla ZYM B (bioMérieux, Fransa, Ref. 70493) reaktifi eklenmiştir. Reaktifler eklendikten sonra oluşan rengin tonuna göre 0-5 arasında puanlama yapılmıştır. Burada 0 negatif reaksiyonu, 5 ise maksimum reaksiyonu gösterirken 1, 2, 3 veya 4 değerleri ise ara reaksiyon olarak kabul edilir.

3.2.18. Farklı sütler üzerinde süt pıhtılaştırma aktivitesi

Bu araştırmada inek, koyun, keçi, deve ve eşek sütleri kullanılmıştır. Pıhtılaştırma aktivitesi için 10 ml süte (0,01M $CaCl_2$ içerikli) 1 ml rennet ilave edildikten sonra 30 °C' ye ayarlı su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince görülen ilk pıhtı zamanı kaydedilmiştir. Tavşan ve inek rennetlerinin bu sütler üzerindeki pıhtılaşma aktiviteleri RU olarak ifade edilmiştir (Berridge 1952).

3.2.19. İstatistiksel analiz

Analizler sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 22 paket programı (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanılmıştır. Tavşan ve inek rennetlerinin kendi içlerinde değerlendirilmesi One-Way ANOVA kullanılmıştır. Tavşan ve inek renneti arasındaki farklılıkları değerlendirmek için Independent-Samples T-Testi kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Protein İçeriğinin Belirlenmesi

İnek ve tavşan rennetinin Bradford protein assay kiti ile yapılan toplam protein sonuçları Çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1. İnek ve tavşan rennetinin protein içerikleri

Örnek	Protein Konsantrasyonu (µg/ml)
İnek Rennet	2584.66±4.16^{A}
Tavşan Rennet	1990.66±5.03^{B}

Çizelgede verilen değerler ortalama ± standart sapma şeklindedir
^{A,B} Aynı sütunda bulunan farklı harfler inek ve tavşan rennetinin protein içeriğinin (µg/ml) farklılığını göstermektedir ($p<0.05$)

Yapılan toplam protein analizi sonucunda Çizelge 4.1' de görüldüğü gibi inek ve tavşan rennetinin toplam protein içeriklerinde istatistiksel olarak fark olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Boudjenah-Haroun ve ark. (2012) Cezayir bölgesinde bulunan farklı yaşlardaki (sütle beslenen, karışık beslenen ve yetişkin) develerin (*Camelus dromedarius*) midelerinden elde ettikleri rennetin protein içeriğine bakmışlardır. Analiz sonucunda sütle beslenen, karışık beslenen ve yetişkin develerden elde edilen rennetlerin protein içeriği sırasıyla 1.26, 1.38 ve 1.44 µg/ml bulmuşlardır ve yaş ilerledikçe protein içeriğinin arttığını belirtmişlerdir. Aynı türe ait farklı yaşlardaki hayvanlardan elde edilen protein miktarında bile farklılık gözlemlenebilmektedir. Yapılan çalışmada inek ve tavşan rennetlerinin toplam protein içerikleri sırasıyla 2584.66±4.16, 1990.66±5.03 µg/ml değerinde belirlenmiştir.

4.2.Süt Pıhtılaştırma Aktivitesinin Belirlenmesi

Peynir üretiminde kullanılan enzimlerin en önemli özelliği süt pıhtılaştırma aktivitesidir yani κ-kazeini parçalayabilme yeteneğidir. Süt pıhtılaştırma aktivitesini ölçmek için birkaç analitik yöntem mevcuttur. Geleneksel peynir yapımında hala kullanılan Soxhlet yöntemi, bir peynir mayası preparatının toplam süt pıhtılaştırma

aktivitesini belirlemek için gelenelsel bir yöntemi temsil etmektedir. İnek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktiviteleri (RU) Çizelge 4.2' de verilmiştir.

Çizelge 4.2. İnek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktiviteleri (RU)

Örnek	Süt Pıhtılaştırma Aktivitesi (RU)
İnek Rennet	17.44 ± 0.35^{A}
Tavşan Rennet	15.87 ± 0.25^{B}

Çizelgede verilen değerler ortalama ± standart sapma şeklindedir
^{A,B} Aynı sütunda bulunan farklı harfler inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitelerinin farklılığını göstermektedir ($p<0.05$)

Yapılan analiz sonucunda Çizelge 4.2' de görüldüğü gibi inek ve tavşan rennetlerinin süt pıhtılaştırma aktiviteleri (RU) arasında istatistiksel olarak fark olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Boudjenah-Haroun ve ark. (2012) Cezayir bölgesinde bulunan farklı yaşlardaki, sütle beslenen, karışık beslenen ve yetişkin develerden elde edilen rennetlerin süt pıhtılaştırma aktivitesi sırasıyla 0.135, 0.255, 0.410 RU olarak bulmuşlardır. Isselnane ve ark. (2016) deve rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesini 3.91 RU olarak bulmuşlardır.

Çizelge 4.2' de görüldüğü gibi inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi sırasıyla 17.44±0.35, 15.87±0.25 RU olarak bulunmuştur. Belirli hacim süte aynı miktarda inek ve tavşan renneti (200 µg/ml protein) eklendiği halde tavşan rennetinin inek sütünü pıhtılaştırma aktivitesi inek rennetine kıyasla daha düşük bulunmuştur. Foltmann (1981b), hayvanlardan elde edilen enzimlerin ve domuz rennetinin kendi türlerinin sütünü diğer türlerin sütüne kıyasla daha verimli pıhtılaştırabildiğini bildirmiştir. İnek ve tavşan rennetlerinin inek sütü üzerindeki süt pıhtılaştırma aktivitesi sonuçları değerlendirildiğinde inek rennetinin tavşan rennetine oranla yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen süt pıhtılaştırma aktivitesi sonuçları Foltmann (1981b) yapmış olduğu çalışmayı desteklemektedir.

İnek ve tavşan rennetlerinin protein oranları eşitlendikten sonra yapılan süt pıhtılaştırma aktivitesi sonuçları, Boudjenah-Haroun ve ark. (2012) ve Isselnane ve

ark. (2016) tarafından gerçekleştirilen deve rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitelerinden daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Geleneksel yöntemlerle elde edilen rennetlerin süt pıhtılaştırma aktiviteleri için kesin bir sonuca varılamamaktadır. Literatüre bakıldığında aynı türdeki hayvanların süt pıhtılaştırma aktivitelerinde farklılık görülmektedir. Hayvanın yaşı, beslenme şekli ve rennet ekstraksiyon koşulları (midesin eksraksiyon çözeltisine oranı, ekstraksiyon süresi, pH, vb) gibi faktörler rennette protein oranını etkiler ve böylelikle süt pıhtılaştırma aktivitesinde farklılıklara neden olmaktadır.

4.3. Rennet Sıcaklığının Süt Pıhtılaştırma Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzimler protein yapıda olduklarından yüksek sıcaklıklara maruz kaldıklarında denatüre olup etkinliklerini kaybetmektedirler. Enzimlerin denatürasyonu yalnızca sıcaklığa bağlı değil aynı zamanda enzimin cinsine ve sıcaklığa maruz kaldıkları süreye göre değişiklik göstermektedirler. Sıcaklık direnci yüksek enzimlerin peynir yapımında kullanılması tavsiye edilmez. Çünkü peynir olgunlaşması sırasında yapıda aktif halde bulunan enzimler peyniri proteolize uğratıp protein kaybına, istenmeyen tat ve koku gelişimine sebep olmaktadır. Peynir pastörize edilirken enzimlerin inaktif olması istenmektedir. Aslında mikrobiyal kaynaklı süt pıhtılaştırma enzimleri yüksek sıcaklıklarda inaktif olamadıklarından proteolize neden olmaktadır ve bu yüzden peynir yapımında kullanılmaları uygun görülmemektedir.

Rennet sıcaklığının süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi ayrıca termostabilite olarak adlandırılmaktadır. İnek ve tavşan rennetinin belirli sıcaklıklarda (30-55 ºC) 3 dakika bekletildikten sonra elde edilen süt pıhtılaştırma aktiviteleri Çizelge 4.3' de verilmiştir.

Çizelge 4.3. İnek ve tavşan renneti sıcaklığının süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi

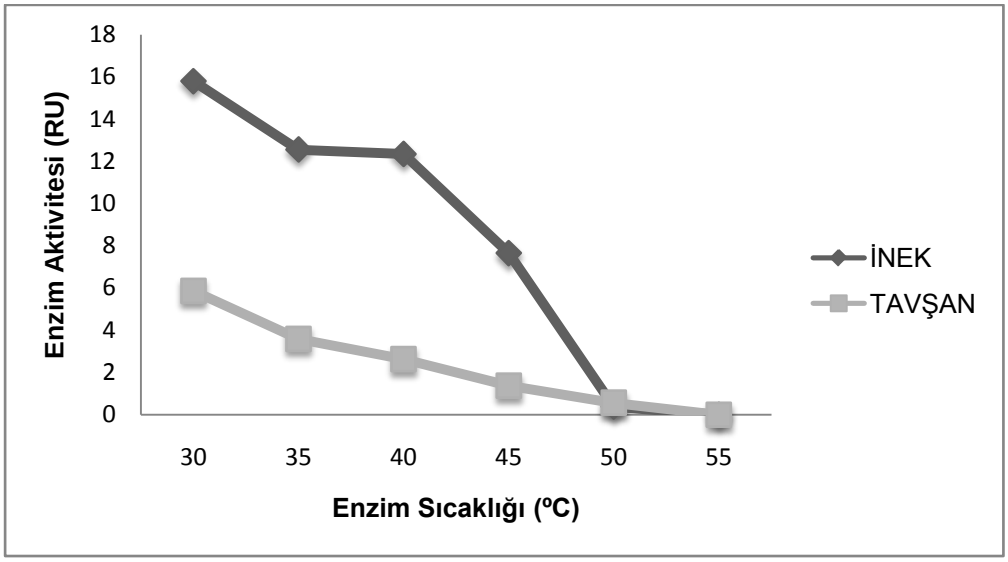
	Süt Pıhtılaşma Aktivitesi RU	
Rennet Sıcaklığı° C	**İnek Rennet**	**Tavşan Rennet**
30	15.79±0.29^{aA}	5.86±0.04^{aB}
35	12.56±0.24^{bA}	3.59±0.01^{bB}
40	12.35±0.15^{bA}	2.63±0.00^{cB}
45	7.65±0.07^{cA}	1.38±0.00^{dB}
50	0.38±0.00^{dA}	0.56±0.00^{eB}
55	0.00±0.00^{dA}	0.00±0.00^{fA}

Çizelgede verilen değerler ortalama ± standart sapma şeklindedir

^{a,b,c,d,e,f} Aynı sütunda bulunan farklı harfler inek ve tavşan rennetinin farklı sıcaklıklardaki süt pıhtılaştırma aktivitesinin kendi içlerindeki farklılığını göstermektedir.

^{A,B} Aynı satırda bulunan farklı harfler inek ve tavşan rennetinin farklı sıcaklıklardaki süt pıhtılaştırma aktivitesinin enzim kaynağına göre farklılığını gösterir.

Çizelge 4.3' de görüldüğü gibi inek rennetinin sıcaklığı değiştikçe yalnızca 35 ve 40ºC' de süt pıhtılaştırma aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir ($p>0.05$). Tavşan rennetinde ise sıcaklığın artmasıyla süt pıhtılaştırma aktiviteleri arasında istatistiksel olarak fark olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Yapılan benzer çalışmalarda Shindo ve Arima (1979), kimozinin 50 ° C' ye kadar süt pıhtılaştırma etkinliğini koruduğunu, Kawaguchi ve ark. (1987), sıcaklık 45 ile 55 °C arasında arttırıldığında, kimozin aktivitesinin hızlı kaybını da gözlemlemiştir. Elagamy (2000), deve rennetinin bufalo kimozinine kıyasla daha yüksek ısı direnci olduğunu, Mohanty ve ark. (2003) yapmış olduğu çalışmada ise bufalo kimozinin 50 °C'ye kadar stabil olduğunu ve sıcaklığın 60 ° C'ye yükseltilmesi durumunda % 50'lik nispi süt pıhtılaştırma aktivitesini kaybettiğini gözlemlemişlerdir. Kumar ve ark. (2006) ayrıca, keçi kimozininin 55 °C sıcaklığa kadar stabilitesini kısmen koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.1. Rennet sıcaklığının süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisinin değişimi

Şekil 4.1' de görüldüğü gibi sıcaklık arttıkça inek ve tavşan rennetlerinin süt pıhtılaştırma aktivitelerinde ciddi bir düşüş meydana gelmektedir. Özellikle inek renneti tavşan rennetine göre ısıya daha dayanıklı olduğu yani daha termostabil olduğu belirlenmiştir. Her iki rennette görüldüğü gibi 50 ºC' ye kadar sütün pıhtılaştığ fakat 55 ºC' de pıhtılaştırma aktivitelerini tamamen kaybettikleri gözlemlenmiştir.

4.4. Süt pH' ının Süt Pıhtılaştırma Aktivitesi Üzerine Etkisi

Süt pH' ındaki farklılıklar enzimlerin sütü pıhtılaştırma aktivitesini etkilemektedir. Yüksek pH da (pH 6.6-6.7) süt pıhtılaşma aktivitesi ve pıhtı sertliği azalır, düşük pH' da (pH 3-4) süt pıhtılaşma aktivitesi yüksek olmasına rağmen hidrolitik aktivite yüksek olduğundan pıhtı veriminde azalma meydana gelmektedir (Okigbo ve ark., 1985a). Genellikle enzimlerle sütün pıhtılaştırma işlemi pH 5.5-6.3 arasında gerçekleştirilir. Süt pH' ının değiştirilmesiyle inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırılma aktivitesi üzerine etkisinin sonuçları Çizelge 4.4' de verilmiştir.

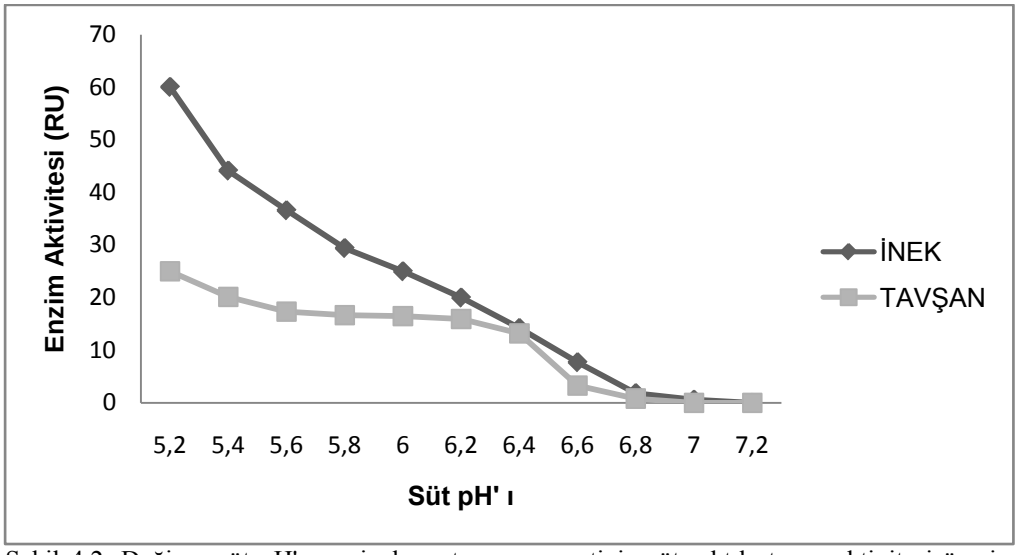
Çizelge 4.4. Değişen süt pH' ının inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi

	Süt Pıhtılaşma Aktivitesi RU	
Süt pH' ı	**İnek Rennet**	**Tavşan Rennet**
5,2	60.05±2.12^{aA}	25.00±0.00^{aB}
5,4	44.14±1.14^{bA}	20.15±0.63^{bB}
5,6	36.60±0.76^{cA}	17.34±0.17^{cB}
5,8	29.41±0.00^{dA}	16.67±0.00^{dA}
6	25.00±0.00^{eA}	16.48±0.16^{deB}
6,2	20.00±0.00^{fA}	15.96±0.15^{eB}
6,4	14.22±0.12^{gA}	13.22±0.10^{fB}
6,6	7.71±0.09^{hA}	3.29±0.02^{gB}
6,8	1.83±0,00^{iA}	0.82±0.00^{hB}
7	0.59±0.01^{iA}	0.00±0.00^{iB}
7,2	0.00±0.00^{iA}	0.00±0.00^{iA}

Çizelgede verilen değerler ortalama ± standart sapma şeklindedir
$^{a, b, c, d, e, f, g, h, ı}$ Aynı sütunda bulunan farklı harfler süt pH ' ının inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesinin kendi içlerindeki farklılıkları göstermektedir.
$^{A, B}$ Aynı satırda bulunan farklı harfler süt pH ' ının inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesinin enzim kaynağına göre farklılıkları göstermektedir.

Yapılan analiz sonucunda Çizelge 4.4' de görüldüğü gibi süt pH' ının değişmesiyle inek rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitelerinde pH 6.8-7.0 arasında istatistiksel olarak fark olmadığı görülmektedir ($p>0.05$). Tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi sonuçlarında ise yalnızca pH 5.8, 6.0, 6.2 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Süt pH' ının değişimiyle rennetlerdeki aktivite değişikliği ayrıca Şekil 4.2' de verilmiştir.

Fox (1969) yaptığı çalışmada tüm kazeinin kimozinle proteolizi sonucunda ortaya çıkan proteoliz ürünlerin pH değerlerini 4.6-6.4 aralığında değiştiğini ve optimum pH değerinin 5.8 olduğunu belirtmişti. Mohanty ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada bufalo kimozininin süt pıhtılaştırma aktivitesini pH 5.5'te en yüksek seviyede olduğunu gözlemlemiştir. Benzer bir çalışma Moschopoulou ve ark. (2006), keçi kimozininin maksimum süt pıhtılaşma aktivitesi pH 6.0' da gösterdiğini gözlemlemiştir.



Şekil 4.2. Değişen süt pH' ının inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisinin değişimi

Şekil 4.2. incelendiğinde pH yükseldikçe hem inek renneti hemde tavşan rennetinin süt pıhtılaşma aktivitelerinde düşme meydana gelmektedir. İnek ve tavşan rennetini en yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesi pH 5.2' de sırasıyla 60.05±2.12 ve 25.00±0.00 RU olarak belirlenmiştir. pH 7.0' de tavşan renneti aktivitesini tamamen kaybederken inek renneti ,aktivitesini çok düşük de olsa göstermektedir. Fakat pH 7.2' de inek rennetinin de aktivitesini tamamen kaybettiği belirlenmiştir. Araştırmamıza benzer şekilde Elagamy (2000)' de deve ve bufalo midelerinden rennet ekstraksiyonu yaparak bu rennetleri fizikokimyasal açıdan karşılaştırmıştır. Analizler sonucundan süt pH' ı yükseldikçe her iki rennettinde süt pıhtılaştırma aktivitesinin azaldığını gözlemlemiştir.

4.5. Süt Sıcaklığının Süt Pıhtılaştırma Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzimlerin hızını ve aktivitesini etkileyen diğer bir faktör sıcaklıktır. Süt pıhtılaşma hızı, enzim ve süt bileşenleri sabit olduğu sürece sıcaklık arttıkça artar (Berridge, 1942). Enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık dereceleri birbirinden farklılık göstermektedir. Çizelge 4.5' de değişen süt sıcaklığının süt pıhtılaştırma aktivitesi sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.5. Değişen süt sıcaklığının inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi

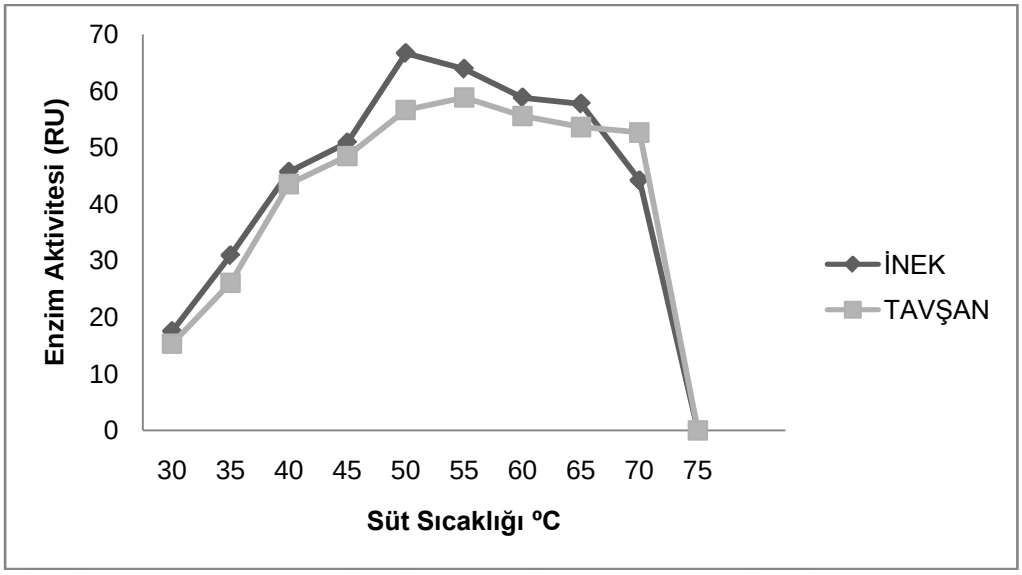
	Süt Pıhtılaşma Aktivitesi RU	
Süt Sıcaklığı (ºC)	**İnek**	**Tavşan**
30	17.55±0.31^{gA}	15.31±0.13^{gB}
35	30.93±0.55^{fA}	26.09±0.39^{fB}
40	45.71±4.17^{deA}	43.53±1.89^{eA}
45	50.88±1.52^{dA}	48.48±2.62^{dA}
50	66.67±0.00^{aA}	56.64±1.89^{abB}
55	63.89±2.41^{abA}	58.82±0.00^{aA}
60	58.82±0.00^{bcA}	55.56±0.00^{abcA}
65	57.73±1.89^{cA}	53.61±1.69^{bcA}
70	44.19±2.19^{eA}	52.63±0.00^{cB}
75	0.00±0.00^{hA}	0.00±0.00^{hA}

Çizelgede verilen değerler ortalama ± standart sapma şeklindedir

^{a,b,c,d,e,f,g,h} Aynı sütunda bulunan farklı harfler süt sıcaklığının inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesinin kendi içlerindeki farklılıkları göstermektedir

$^{A, B}$ Aynı satırda bulunan farklı harfler süt sıcaklığının inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesinin enzim kaynağına göre farklılıkları göstermektedir.

Yapılan analiz sonucunda Çizelge 4.5' de görüldüğü gibi süt sıcaklığının değişmesiyle inek rennetinin süt pıhtılaştırma aktivite sonuçlarında 40-45 ºC, 50-55 ºC, 55-60 ºC ve 60-65 ºC dereceler arasında istatistiksel olarak fark olmadığı görülmektedir ($p>0.05$). Tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi sonuçlarında ise 50-55-60 ºC, 50-60 ºC, 60-65-70 ºC arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p>0.05$) diğer sonuçlar arasında istatistiksel fark olduğu görülmektedir ($0<0.05$). Süt sıcaklığının inek ve tavşan renneti arasındaki süt pıhtılaştırma aktivitesinin 40, 45, 55, 60, 65 ºC' deki değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemektedir ($p>0.05$). Süt sıcaklığının inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi Şekil 4.3' de verilmiştir.



Şekil.4.3. Değişen süt sıcaklığının inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisisin değişimi

Şekil 4.3. incelendiğinde sıcaklığın 30 ºC' den 50 ºC' ye artmasıyla inek rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesinde artış görülmektedir. İnek renneti için aktivite 50 ºC' den sonra düşmekte ve 75 ºC' de tamamen aktivitesini kaybettiği görülmektedir. Tavşan rennetinde ise süt pıhtılaşma aktivitesi 30 ºC' den 55 ºC' ye kadar artış görülmekte olup 55 ºC' den sonra aktivitesiinde düşüş görülmektedir. Tavşan renneti de inek rennetinde görüldüğü gibi 75 ºC' de aktivitesini tamamen kaybetmektedir.

Berridge (1952), sıcaklık etkisinin saflaştırılmış kimozin enzimi üzerine süt pıhtılaştırma aktivitesi araştırmaları yapmıştır. Araştırmalar sonucunda kimozin enziminin süt pıhtılaştırma aktivitesi için optimum sıcaklığın 30-40 ° C arasında olduğunu gözlemlemiştir. Shindo ve Arima (1979), Mohanty ve ark. (2003) ve Kumar ve ark. (2006) sırasıyla sığır, bufalo ve keçi kimozininin süt pıhtılaştırma aktivitesi için optimum sıcaklık değerlerinin benzer olduğunu rapor etmişlerdir. Elagamy (2000)' de deve ve bufalo midelerinden elde ettiği rennetlerin en yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesi gösterdiği optimum sıcaklık değerlerini sırasıyla 50 ve 45 ºC olarak bildirmişlerdir. Bizim çalışmamız ise inek rennetinin en yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesi 50 ºC' de 66.67±0.00 RU, tavşan rennetinin ise 55 ºC' de 58.82±0.00 RU olarak belirlenmiştir.

4.6. Enzim Konsantrasyonunun Süt Pıhtılaştırma Aktivitesi Üzerine Etkisi

Sabit koşullarda inek ve tavşan renneti konsantrasyonunun arttırılması durumunda süt pıhtılaştırma aktivitelerindeki sonuçlar Çizelge 4.6' da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Değişen inek ve tavşan renneti konsanstrasyonunun süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi

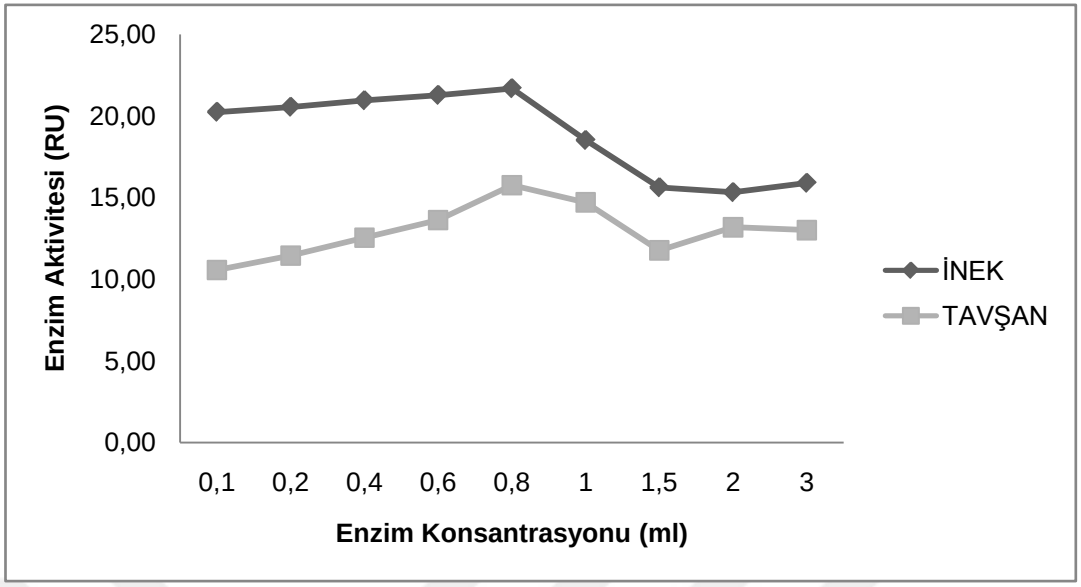
	Süt Pıhtılaşma Aktivitesi RU	
Enzim Konsantrasyonu (ml)	**İnek Rennet**	**Tavşan Rennet**
0.1	20.24±0.14^{bA}	10.56±0.01^{gB}
0.2	20.55±0.25^{abA}	11.44±0.07^{fgB}
0.4	20.95±0.20^{abA}	12.54±0.07^{deB}
0.6	21.28±0.16^{abA}	13.62±0.13^{cB}
0.8	21.69±0.58^{aA}	15.76±0.11^{aB}
1	18.52±0.00^{cA}	14.71±0.22^{bB}
1.5	15.63±0.21^{dA}	11.77±0.24^{efB}
2	15.63±0.22^{dA}	13.18±0.69^{cdA}
3	15.63±0.23^{dA}	13.00±0.57^{cdA}

Çizelgede verilen değerler ortalama ± standart sapma şeklindedir

^{a,b,c,d,e,f,g} Aynı sütunda bulunan farklı harfler inek ve tavşan renneti konsantrasyonunun süt pıhtılaştırma aktivitesinin kendi içlerindeki farklılıkları göstermektedir

$^{A, B}$ Aynı satırda bulunan farklı harfler süt sıcaklığının inek ve tavşan rennetini konsantrasyonunun süt pıhtılaştırma aktivitesinin enzim kaynağına göre farklılıkları göstermektedir

Çizelge 4.6' da süte 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 ml - 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ml - 1.5, 2, 3 ml inek renneti eklenmesiyle elde edilen süt pıhtılaştırma aktivitesi sonuçları arasında istatistiksel olarak fark olmadığı görülmektedir ($p>0.05$). Aynı şekilde süte 0.1, 0.2, - 0.2, 1.5 ml - 0.4, 2, 3 ml- 0.4, 1.5ml - 2, 3 ml tavşan renneti eklenmesiyle elde edilen süt pıhtılaştırma aktivitesi sonuçları arasında istatistiksel olarak fark olmadığı görülmektedir ($p>0.05$). Rennet konsantrasyonunun değişimiyle, inek ve tavşan renneti arasındaki süt pıhtılaştırma aktivitesi değerlerinde ise 2ml ve 3ml rennet kullanımıyla elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemektedir ($p>0.05$). İnek ve tavşan renneti konsantrasyonunun süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi Şekil 4.4' de grafik şeklinde verilmiştir.



Şekil 4.4. İnek ve tavşan renneti konsantrasyonunun süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi

Şekil 4.4. incelendiğinde hem inek renneti hemde tavşan rennetinde 0.1-0.8 ml enzim kullanıldığında süt pıhtılaşma aktivitesinde artış görülmektedir. Her iki rennet için enzim konsantrasyonu 0.8ml' den 1.5ml' ye çıkarıldığında ise süt pıhtılaşma aktivitesinde düşüş meydana geldiği görülmektedir. Süte 1.5 ml ve daha yüksek konsantrasyonda hem inek hemde tavşan renneti ilave edilmesiyle ölçülen süt pıhtılaştırma aktivitesi değerlerinin sabitlendiği görülmektedir. Berridge (1955) inek sütünün pıhtılaşma süresinin kullanılan buzağı rennetinin miktarı ile ters orantılı olduğunu bildirmiştir. Benzer şekilde Bringe ve Kinsella (1986a), yapmış olduğu çalışmaya göre sütün pıhtılaşması için geçen süre enzim konsantrasyonuyla ters orantılı olduğunu fakat pıhtı yapısının değişmediğini bildirmiştir. Bizim çalışmamızda inek ve tavşan rennetlerinin konsantrasyonu arttıkça sütün pıhtılaşma süresinde azalma görülmüştür. Berridge (1952)' de belirtilen denklemine göre süre azaldığı halde süt pıhtılaştırma aktivitesinde doğrusal bir artış görülmemektedir. Bu sebeple enzim konsantrasyonu ile süt pıhtılaşma aktivitesi arasında doğrusal bir değişim görülmemektedir.

Yaptığımız çalışmada süte 0.8 ml hem inek hemde tavşan renneti eklenmesiyle en yüksek süt pıhtılaşma aktivitesi değerleri elde edilmiştir. Bu değerler inek ve tavşan renneti için sırasıyla 21.69±0.58 RU ve 15.76±0.11 RU olarak belirlenmiştir.

4.7. Substrat Konsantrasyonunun Süt Pıhtılaştırma Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzim konsantrasyonunu sabit tutarak substrat (yağsız süttozu) konsantrasyonunun değiştirilmesiyle inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktiviteleri ölçülmüştür. İnek ve tavşan rennetinin değişen substrat konsantrasyonu üzerindeki süt pıhtılaştırma aktivitesi sonuçları Çizelge 4.7' de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Değişen substrat konsantrasyonunun inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi

	Süt Pıhtılaşma Aktivitesi RU	
Substrat Konsantrasyonu (g/L)	**İnek Rennet**	**Tavşan Rennet**
40	46.97 ± 2.62^{aA}	47.69 ± 2.27^{aA}
60	38.46 ± 0.00^{bA}	37.04 ± 0.00^{bA}
80	22.22 ± 0.00^{cA}	21.43 ± 0.27^{cA}
100	17.45 ± 0.36^{dA}	16.22 ± 0.41^{dA}
120	15.31 ± 0.13^{deA}	13.16 ± 0.17^{eB}
140	13.16 ± 0.00^{eA}	12.40 ± 0.09^{eB}
160	11.49 ± 0.00^{fA}	11.03 ± 0.07^{fB}
180	9.80 ± 0.00^{fgA}	8.57 ± 0.08^{fB}
200	7.69 ± 0.00^{ghA}	7.46 ± 0.00^{ghA}
220	$6.87\pm0.03^{h'A}$	$6.58\pm0.00^{gh'B}$
240	$6.17\pm0.00^{'A}$	$6.15\pm0.02^{h'A}$
260	$5.39\pm0.02^{'A}$	$5.45\pm0.03^{'A}$

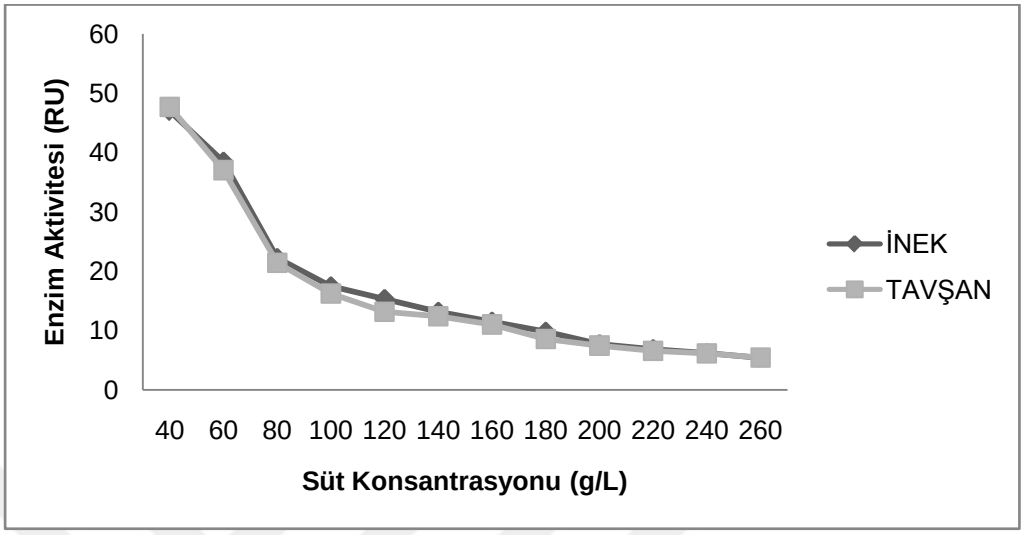
Çizelgede verilen değerler ortalama ± standart sapma şeklindedir

^{a,b,c,d,e,f,g,h,ı} Aynı sütunda bulunan farklı harfler inek ve tavşan rennetinin farklı substrat konsantrasyonunda süt pıhtılaştırma aktivitesinin kendi içlerindeki farklılığını göstermektedir

^{A,B} Aynı satırda bulunan farklı harfler inek ve tavşan rennetinin farklı substrat konsantrasyonunda süt pıhtılaştırma aktivitesinin enzim kaynağına göre farklılığını gösterir

Yapılan analiz sonucunda Çizelge 4.7' de görüldüğü gibi inek renneti konsantrasyonu sabit tutulup substrat (yağsız süt tozu) konsantrasyonunun artırılmasıyla süt pıhtılaştırma aktivitesi sonuçları arasında istatistiksel olarak fark olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Aynı şekilde tavşan renneti konsantrasyonu sabit tutularak substrat (yağsız süt tozu) konsantrasyonunun artırılmasıyla süt pıhtılaştırma aktivitesi sonuçları arasında istatistiksel olarak fark olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Substrat konsantrasyonu 120, 140, 160, 220 g/L de inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi değerleri arasında istatistiksel olarak fark görülmektedir

($p<0.05$). İnek ve tavşan rennetinin değişen substrat konsantrasyonlarında süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi Şekil 4.5.' de verilmiştir.



Şekil 4.5. Süt konsantrasyonunun inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi

Şekil 4.5. incelendiğinde hem inek renneti hemde tavşan rennetinde substrat konsantrasyonunun (40-260 g/L) artmasıyla süt pıhtılaştırma aktivitelerinde azalma meydana geldiği görülmektedir. En yüksek süt pıhtılaşma aktivitesi inek ve tavşan rennetinde 40g/L süt tozu konsantrasyonunda sırası ile 46.97±2.62 RU ve 47.69±2.27 RU olarak belirlenmiştir. Düşük substrat konsantrasyonlarında tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi inek rennetine göre yüksek olduğu belirlenmiştir. Her iki rennette de substrat konsantrasyonu arttıkça pıhtılaşma için geçen sürenin uzadığı görülmektedir. Elagamy (2000) deve ve bufalo midelerinden elde ettiği rennetleri değişen substrat konsantrasyonuna göre aktivitelerini incelemiştir. Analiz sonucunda süt konsantrasyonun artmasıyla süt pıhtılaştırma aktivitesinin azaldığını bulmuştur.

4.8. $CaCl_2$ Konsantrasyonunun Süt Pıhtılaştırma Aktivitesi Üzerine Etkisi

Süt pıhtılaşma aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerden biri de kalsiyum iyonlarıdır. Sütün pıhtılaşması bilindiği gibi iki aşamada meydana gelmektedir. Bu

aşamalardan ilki kimozin enzimi tarafından κ -kazein Phe-105 ve Met-106 arasında bulunan peptid bağını kırarak para-κ-kazein ve glikomakropeptid molekülü oluşmaktadır. İkinci aşamada ise ortamda Ca^{+2} iyonları varlığında para-κ-kazein biraraya gelerek pıhtıyı oluşturur. Sütün enzimle pıhtılaştırılma işleminde Ca^{+2} iyonları önem teşkil eder. Sütün doğal formunda zaten Ca^{+2} bulunmaktadır fakat süte uygulanan ısıl işlem sonucunda bu iyonların miktarı azalarak çözünmüş formda bulunan Ca^{+2} iyonları çözünmez bileşiklere dönüşmektedir. Bundan dolayı peynir yapma proseslerinde pıhtı oluşumunu kolaylaştırmak için kalsiyum eklenmektedir. $CaCl_2$ konsantrasyonunun inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi sonuçları Çizelge 4.8' de verilmiştir.

Çizelge 4.8. $CaCl_2$ konsantrasyonunun inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi

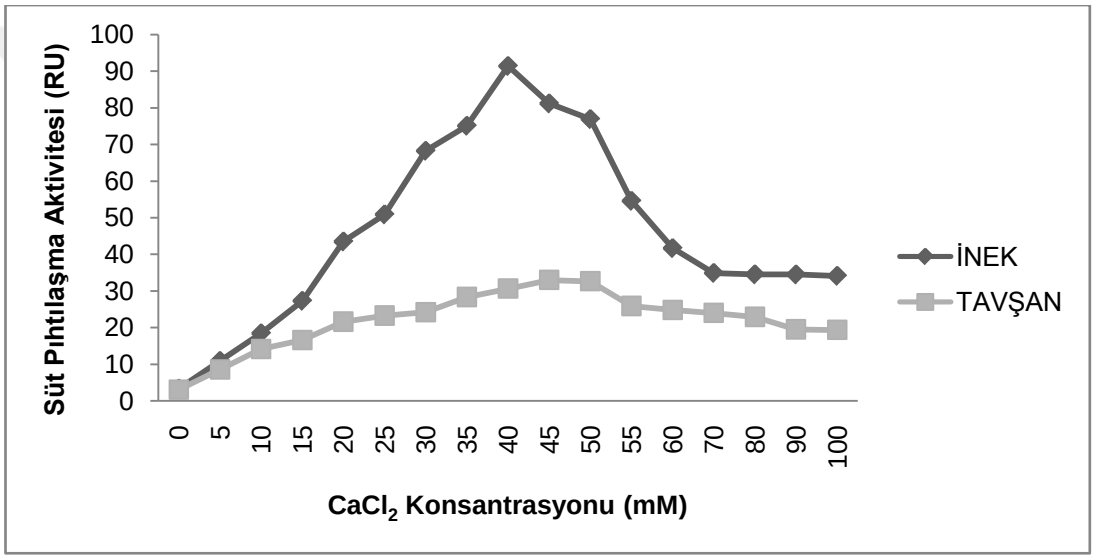
	Süt Pıhtılaşma Aktivitesi RU	
$CaCL_2$ (mM)	**İnek Rennet**	**Tavşan Rennet**
0	3.31 ± 0.01^{iA}	3.06 ± 0.01^{kB}
5	10.87 ± 0.00^{iiA}	8.52 ± 0.08^{jB}
10	18.41 ± 0.19^{iiA}	14.15 ± 0.23^{iB}
15	27.28 ± 0.43^{hA}	16.58 ± 0.16^{lB}
20	43.48 ± 0.00^{efA}	21.58 ± 0.27^{gB}
25	50.88 ± 1.52^{deA}	23.26 ± 0.00^{fB}
30	68.25 ± 2.75^{cA}	24.20 ± 0.34^{efB}
35	75.09 ± 3.17^{bcA}	28.31 ± 0.46^{cB}
40	91.41 ± 8.34^{aA}	30.64 ± 1.06^{bB}
45	81.20 ± 3.70^{bA}	32.97 ± 0.62^{aB}
50	76.92 ± 0.00^{bA}	32.62 ± 0.62^{aB}
55	54.58 ± 1.69^{dA}	25.87 ± 0.39^{dB}
60	41.67 ± 0.00^{fgA}	24.80 ± 0.35^{deB}
70	34.89 ± 0.71^{ghA}	24.00 ± 0.34^{efB}
80	34.51 ± 1.19^{ghA}	22.90 ± 0.31^{fB}
90	34.48 ± 0.00^{ghA}	19.49 ± 0.44^{hB}
100	34.10 ± 0.66^{ghA}	19.36 ± 0.22^{hB}

Çizelgede verilen değerler ortalama ± standart sapma şeklindedir

^{a,b,c,d,e,f,g,h,i,ij,k} Aynı sütunda bulunan farklı harfler inek ve tavşan rennetinin farklı $CaCl_2$ konsantrasyonunda süt pıhtılaştırma aktivitesinin kendi içlerindeki farklılığını göstermektedir.

^{A,B} Aynı satırda bulunan farklı harfler inek ve tavşan rennetinin farklı $CaCl_2$ konsantrasyonunda süt pıhtılaştırma aktivitesinin enzim kaynağına göre farklılığını gösterir.

Yapılan analiz sonucunda Çizelge 4.8' de görüldüğü gibi inek renneti özellikle 15, 70, 80, 90, 100 mM $CaCl_2$ varlığında süt pıhtılaştırma aktiviteleri istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır ($p>0.05$). Aynı şekilde tavşan renneti 25, 30, 70, 80 mM $CaCl_2$ varlığında süt pıhtılaştırma aktivitesi sonuçları arasında istatistiksel olarak fark olmadığı görülmektedir ($p>0.05$). İnek ve tavşan renneti arasındaki süt pıhtılaştırma aktivitelerinde $CaCl_2$ konsatrasyonu değişse bile elde edilen sonuçlarda istatistiksel olarak fark olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Değişen $CaCl_2$ konsantrasyonunun inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisinin değişimi Şekil 4.6' de grafik şeklinde verilmiştir.



Şekil 4.6. $CaCl_2$ konsantrasyonunun inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi

Şekil 4.6. incelendiğinde $CaCl_2$ konsantrasyonundan en çok etkilenen enzimin inek renneti olduğu belirlenmiştir. İnek ve tavşan rennetinde görüldüğü gibi $CaCl_2$ konsantrasyonunun artmasıyla süt pıhtılaştırma aktivitesi belirli bir değere kadar artmış daha sonra azaldığı görülmüştür. Pıhtılaştırılacak sütte $CaCl_2$ olmaması durumunda hem inek rennetinin hemde tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesinde ciddi bir azalma meydana gelmiştir. İnek renneti için en yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesi 40 mM $CaCl_2$ varlığında 91.41±8.34 RU olarak tespit edilmiştir. Tavşan rennetinde ise en yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesi 45 mM $CaCl_2$ varlığında 32.97±0.62 RU olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 60 mM $CaCl_2$' den sonra her iki enzimin süt pıhtılaştırma aktivitelerinde ciddi bir değişim görülmemektedir.

Yapılan benzer bir çalışmada McMahon ve ark. (1984) kimozin enziminin, 40 mM $CaCl_2$ konsantrasyonuna kadar süt pıhtılaştırma aktivitesinin arttığını 40 mM'dan yüksek konsantrasyonlarda ise aktivitenin azaldığını gözlemlemiştir. Elagamy (2000) buzağı ve deve rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitelerinde $CaCl_2$ konsantrasyonunun artmasıyla arttığını ve buzağı rennetinin deve rennetine kıyasla $CaCl_2$' ye daha duyarlı olduğunu gözlemlemiştir. Tavşan renneti inek rennetine göre daha yüksek $CaCl_2$ konsantrasyonlarında süt pıhtılaştırma aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

4.9. NaCl Konsantrasyonunun Süt Pıhtılaştırma Aktivitesi Üzerine Etkisi

Süt pıhtılaştırma aktivitesinde pH, sıcaklık, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, $CaCl_2$ gibi faktörlere ek olarak NaCl' de önemli bir faktördür. Değişen NaCl konsantrasyonunun inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi Çizelge 4.9' da verilmiştir.

Çizelge 4.9. NaCl konsantrasyonunun inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi

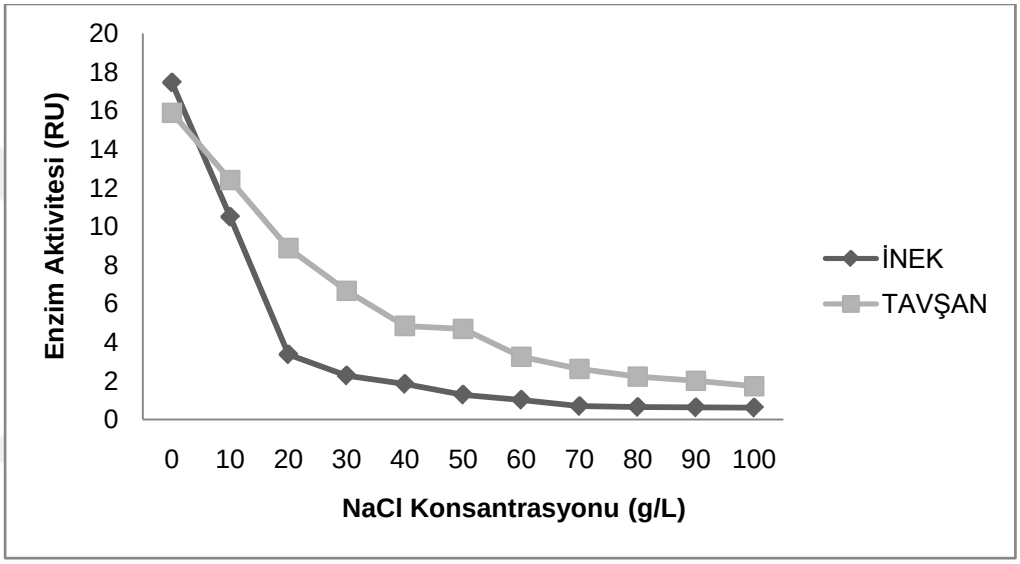
	Süt Pıhtılaşma Aktivitesi RU	
NaCl (g/L)	**İnek Rennet**	**Tavşan Rennet**
0	17.45±0.36^{aA}	15.88±0.25^{aB}
10	10.49±0.13^{bA}	12.40±0.09^{bB}
20	3.36±0.01^{cA}	8.88±0.09^{cB}
30	2.27±0.00^{dA}	6.67±0.00^{dB}
40	1.83±0.00^{eA}	4.85±0.01^{eB}
50	1.28±0.00^{fA}	4.69±0.03^{eB}
60	1.01±0.00^{fgA}	3.25±0.00^{fB}
70	0.68±0.00^{ghA}	2.62±0.00^{gB}
80	0.64±0.00^{hA}	2.22±0.00^{hB}
90	0.62±0.00^{hA}	2.01±0.00^{hB}
100	0.61±0.00^{hA}	1.73±0.00^{iB}

Çizelgede verilen değerler ortalama ± standart sapma şeklindedir

^{a,b,c,d,e,f,g,h,ı} Aynı sütunda bulunan farklı harfler inek ve tavşan rennetinin farklı NaCl konsantrasyonunda süt pıhtılaştırma aktivitesinin kendi içlerindeki farklılığını göstermektedir

^{A,B} Aynı satırda bulunan farklı harfler inek ve tavşan rennetinin farklı NaCl konsantrasyonunda süt pıhtılaştırma aktivitesinin enzim kaynağına göre farklılığını gösterir

Çizelge 4.9' da görüldüğü gibi 70, 80, 90, 100 g/L NaCl varlığında inek rennetinin süt pıhtılaştırma aktiviteleri istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır ($p>0.05$). Aynı şekilde 80.90 g/L NaCl varlığında tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktiviteleri istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır ($p>0.05$). Ortamda NaCl konsatrasyonu artmasıyla inek ve tavşan renneti arasındaki süt pıhtılaştırma aktivite değerleri istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p<0.05$). NaCl konsantrasyonunun inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerine etkisi Şekil 4.7' de verilmiştir.



Şekil 4.9. NaCl konsantrasyonuna bağlı inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi değişimi

Şekil 4.7. incelendiğinde NaCl konsantrasyonundan en çok etkilenen enzimin inek renneti olduğu belirlenmiştir. Pıhtılaştırılacak süt içerisinde NaCl bulunmaması durumunda inek rennetinin tavşan rennetine göre daha yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Fakat ortama tuz eklenmesiyle inek rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesinde hızlı bir düşüş gözlemlenmiştir. Her iki rennette de NaCl konsantrasyonunun artmasıyla süt pıhtılaştırma aktivitelerinde düşüş meydana gelmiştir. Substrat içerisinde 100 g/L NaCl varlığında bile tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesi inek rennetine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Elagamy (2000) 0-100 g/L NaCl konsantrasyonları arasında buzağı ve deve rennetlerinin süt pıhtılaştırma aktivitelerini incelemiştir. NaCl

konsantrasyonunun artmasıyla hem buzağı hemde deve rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitelerinde azalma gözlemlemiştir. Ayrıca düşük NaCl seviyelerinde deve rennetinin buzağı rennetine göre daha çok etkilendiğini bildirmiştir. Bizim çalışmamızda tavşan renneti inek rennetine göre NaCl varlığında daha stabil olduğu belirlenmiştir.

4.10. pH Analizi

Bir rennet ekstraktının pH değeri kullanılan midenin türüne, depolama koşullarına ve ekstrak hazırlama prosedürüne göre değişiklik gösterebilir. Çizelge 4.10' da inek ve tavşan rennetinin pH değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.10. İnek ve tavşan rennetinin pH değerleri

Enzim	PH
İnek rennet	5.41±0.01
Tavşan rennet	5.36±0.01

Çizelgede verilen değerler ortalama ± standart sapma şeklindedir

Çizelge 4.10' da görüldüğü gibi inek ve tavşan rennetlerinin pH değerleri sırasıyla 5.41±0.01 ve 5.36±0.01 olarak belirlenmiştir. Wangoh ve ark. (1993) rennet ekstraksiyonu işlemine göre son pH değerleri 5.5' e ayarlanmış olmasına rağmen inek ve tavşan rennetlerinin pH değerlerinin değiştiğini gözlemlenmiştir. Florez ve ark. (2006) Cabrales peynir üreticisinden peynir altı suyuyla ekstrakte edilen dört farklı oğlak rennetlerinin pH değerlerini 4.83, 4.10, 4.18 ve 3.78 değerlerinde çok asidik olarak bildirmişlerdir. Moschopoulou ve ark. (2007) Feta peynirinde kullanılan kuzu ve oğlak sıvı rennetlerinin başlangıç pH' larını 5.5'e ayarlamış olmalarına rağmen daha sonra rennetlerin pH'ı 4.74 ve 4.71 değerlerine düştüğünü bildirmişlerdir.

4.11. % Kuru Madde İçeriği

İnek ve tavşan midelerinden % 2 Borik asit içeren % 6 NaCl solüsyonu içerisinde elde edilen sıvı rennetlerin % kuru madde içerikleri Çizelge 4.11' de verilmiştir.

Çizelge.4.11. İnek ve tavşan rennetinin %kuru madde değerleri

Enzim	% Kuru Madde
İnek Rennet	11.12±0.34
Tavşan Renet	10.74±0.05

Çizelgede verilen değerler ortalama ± standart sapma şeklindedir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde inek ve tavşan rennetinin % kuru madde içeriği sırasıyla % 11.12±0.34 ve % 10.74±0.05 olarak belirlenmiştir. Moschopoulou ve ark. (2007) yapmış oldukları çalışmada, Yunanistan'daki iki farklı bölgede bulunan ve Feta peyniri üretimi yapan fabrikalardan 20 adet geleneksel yöntemle elde edilen sıvı rennet örneği alıp olarak iki gruba (A ve B) ayırmışlardır. Rennet A ' nın ortalama kuru madde değerlerini % 12.6±2.14, Rennet B ' nin ortalama kuru madde değerlerini ise % 18.37±5.5 olarak bildirmişlerdir.

4.12. % Kül İçeriği

İnek ve tavşan midelerinden % 2 Borik asit içeren % 6 NaCl solüsyonu içerisinde elde edilen sıvı rennetlerin % kül içerikleri Çizelge 4.12' de verilmiştir.

Çizelge.4.12. İnek ve tavşan rennetinin %kül değerleri

Enzim	% Kül
İnek Rennet	8.42±0.05
Tavşan Renet	8.44±0.07

Çizelgede verilen değerler ortalama ± standart sapma şeklindedir

Sonuçlar değerlendirildiğinde inek ve tavşan rennetinin % kül içeriği sırasıyla % 8.42±0.05 ve % 8.44±0.07olarak belirlenmiştir.

4.13. Mikrobiyolojik Analizler

Peynir üretim teknolojisinde önemli bir konu rennetin mikroorganizma yüküdür. Mikrorganizma yükü, hem rennetin dayanıklılığı hem de peynir üretim teknolojisi açısından önemlidir. Moschopoulou (2011) hammadde katitesi, hazırlama prosedürü ve saklama koşullarının rennetlerin mikrobiyolojik kalitesini etkilediğini belirtmiştir. Ayrıca rennet, içerdiği mikroorganizmalar nedeniyle aktivitesini kaybettiği gibi peynir kalitesini olumsuz etkilediği belirtilmektedir (Koçak, 1979). İnek ve tavşan rennetinin bazı mikrobiyolojik analiz sonuçları Çizelge 4.13' de verilmiştir.

Çizelge 4.13. İnek ve tavşan rennetinin mikrobiyolojik analiz sonuçları

	Mikroorganizma sayısı log kob/ml				
Enzim	Toplam aerobik mezofilik bakteri	Maya ve küf	Enterobakter ve koliform	*Enterococci*	*Staphylococci*
İnek Rennet	2.59 ± 0.007	<1	<1	<1	<1
Tavşan Rennet	<1	<1	<1	<1	<1

Çizelgede verilen değerler ortalama ± standart sapma şeklindedir

4.13.1. Toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı

Çizelge 4.13' de görüldüğü gibi tavşan rennetinde toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı tespit edilebilir sınırın altında (<1) bulunmuştur. İnek rennetinde ise toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı 2.59±0.007 log kob/ml ($3.9x10^2$ kob/ml) olarak tespit edilmiştir. Rennet örneklerinde TS 3844 Peynir Mayası Standardı'na göre en fazla 10^3 kob/ml toplam aerobik mezofilik bakteri bulunmasına izin verilmektedir. Bu durumda inek ve tavşan renneti 10^3 kob/ml sınırının altında olduğundan TS 3844 Peynir Mayası Standardı'na uygun olduğu belirlenmiştir. Uraz (1976) yapmış olduğu çalışmada 19 adet sıvı rennet örneğinin toplam aerobik mezofilik bakteri populasyonunun yoğun olduğunu bildirmiştir. Çakmakçı ve Boroğlu (2004) tarafından gerçekleştirilen araştırmada ise Türkiye'nin farklı bölgelerinde bulunan süt işletmelerinde bulunan 25 rennetin 5' inde toplam aerobik mezofilik bakteri sayısının 10^3 kob/ml' den fazla olduğu bildirmişlerdir. Florez ve ark. (2006) Cabrales peynir üreticisinden peynir altı suyuyla ekstrakte edilen dört

farklı oğlak midesinden elde edilen enzim ekstraktlarının (rennet 1, 2, 3, 4) toplam aerobik mezofilik bakteri sayısını 1.70×10^7 –1.21×10^8 kob/ml arasında olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Gürses ve Çakmakçı (2009) da Erzincan Tulum Peyniri üreten göçebelerin, kuru tuzlanmış şirdenden yaptıkları ev tipi rennetin toplam aerobik mezofilik bakteri sayılarını 1.9×10^6- 9.0×10^6 arasında değiştiğini ve bu değerlerin TS 3844 Peynir Mayası Standardı'na uygun olmadığını bildirmiştir.

Sonuç olarak tavşan rennetinin tespit edilebilir sınırın altında (<1) ve inek rennetinin ise TS 3844 Peynir Mayası Standardı'nın belirlediği sınırın altında toplam aerobik mezofilik bakteri sayısının olması, rennetlerin peynir üretimine uygun olduğunu göstermektedir.

4.13.2. Maya ve küf sayımı

Çizelge 4.13' de sonuçlar incelendiğinde hem inek hemde tavşan rennetinin maya ve küf sayıları görüldüğü gibi tespit edilebilir sınırın altında (<1) olduğu belirlenmiştir. Rennet örneklerinde TS 3844 Peynir Mayası Standardı'na göre en fazla 10^2 kob/ml maya ve küf bulunmasına izin verilmektedir. Bu durumda inek ve tavşan renneti 10^2 kob/ml sınırının altında olduğundan TS 3844 Peynir Mayası Standardı'na uygun olduğu belirlenmiştir. Çakmakçı ve Boroğlu (2004) tarafından gerçekleştirilen araştırmada süt işletmelerinde kullanılan 25 adet rennetin 3' ünde 10 kob/ml maya ve küf olduğunu bildirmişlerdir. Florez ve ark. (2006) Cabrales peynir üreticisinden peynir altı suyuyla ekstrakte edilen dört farklı oğlak midesinden elde edilen enzim ekstraktlarının (rennet 1, 2, 3, 4) maya ve küf sayılarını 1.14×10^3-1.16 10^5 kob/ml arasında bulmuşlardır. Ayrıca Gürses ve Çakmakçı (2009) da Erzincan Tulum Peyniri üreten göçebelerin, kuru tuzlanmış şirdenden yaptıkları ev tipi rennetin maya ve küf sayılarını 1.0×10^5- 3.6×10^6 kob/ml arasında değiştiğini ve bu değerlerin TS 3844 Peynir Mayası Standardı'na uygun olmadığı bildirilmiştir.

4.13.3. Enterobakter ve koliform sayımı

Çizelge 4.13' deki sonuçlar incelendiğinde hem inek hemde tavşan rennetinin enterobakter ve koliform sayıları görüldüğü gibi tespit edilebilir sınırın altında (<1)

olduğu belirlenmiştir. TS 3844 Peynir Mayası Standardı'na koliform grubu bakteriler rennet örneklerinde bulunmasına izin verilmemektedir. Bu durumda inek ve tavşan rennetinde TS 3844 Peynir Mayası Standardı'nda belirtildiği gibi enterobakter ve koliform grubu bakterilere rastlanmadığı belirlenmiştir. Çakmakçı ve Boroğlu (2004) farklı bölgelerden alınan ve süt işletmelerinde kullanılan 25 adet rennetin hiçbirinde koliform grubu bakteri olmadığı bildirilmiştir. Florez ve ark. (2006) Cabrales peynir üreticisinden peynir altı suyuyla ekstrakte edilen dört farklı oğlak midesinden elde edilen enzim ekstraktlarının (rennet 1, 2, 3, 4) sadece rennet 1' de koliform grubu bakteriye (6.55 log kob/ml) rastladıklarını bildirmişlerdir. Gürses ve Çakmakçı (2009) da Erzincan Tulum Peyniri üreten göçebelerin, kuru tuzlanmış şirdenden yaptıkları ev tipi rennetlerin sadece 1 tanesinde koliform grubu bakteri ($1,2\times10^3$ kob/ml) olduğunu bildirmişlerdir.

Moschopoulou ve ark. (2007) koliform grubu bakterilerin asitliğe duyarlı olduklarını ve düşük pH değerlerine sahip rennetlerde genellikle bulunmadıklarını bildirmiştir. Ancak inek ve tavşan rennetinin pH değeri çok düşük olmamasına rağmen koliform grubu bakterilere rastlanılmadığı belirlenmiştir.

4.13.4. *Enterococci* sayımı

Çizelge 4.13' de sonuçlar incelendiğinde hem inek hemde tavşan rennetinin enterococci sayıları görüldüğü gibi tespit edilebilir sınırın altında (<1) olduğu belirlenmiştir. Bu durumda çalışmamızda yer alan inek ve tavşan rennetleri TS 3844 Peynir Mayası Standardı'na göre uygun bulunmuştur. Florez ve ark. (2006) Cabrales peynir üreticisinden peynir altı suyuyla ekstrakte edilen dört farklı oğlak midesinden elde edilen enzim ekstraktları (rennet 1, 2, 3, 4) içerisinde *Enterococci* mikroorganizmalarını sadece rennet 3 örneğinde 1.35×10^3 kob/ml olarak bulunmuştur.

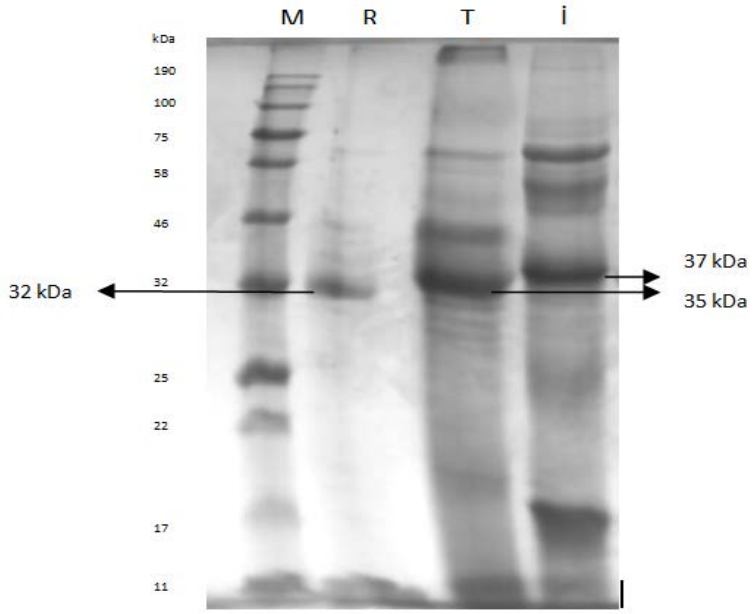
4.13.5. *Staphylococci* sayımı

Çizelge 4.13' de sonuçlar incelendiğinde hem inek hemde tavşan rennetinin staphylococci sayıları görüldüğü gibi tespit edilebilir sınırın altında (<1) olduğu

belirlenmiştir. Bu durumda çalışmamızda yer alan inek ve tavşan rennetleri TS 3844 Peynir Mayası Standardı'na göre uygun bulunmuştur. Çalışmamıza benzer şekilde Tekinşen ve ark. (2006) mikrobiyolojik açıdan inceledikleri 20 adet rennetin hiçbirinde staphylococci' ye rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Ancak Florez ve ark. (2006) Cabrales peynir üreticisinden peynir altı suyuyla ekstrakte edilen dört farklı oğlak midesinden elde edilen enzim ekstraktları (rennet 1, 2, 3, 4) içerisinde *Staphylococci* mikroorganizmalarını rennet 1 ve rennet 3 örneklerinde sırasyla 1.61×10^5 ve 1.62×10^2 kob/ml olarak bulunmuştur.

4.14. Rennetlerin Polipeptit Profillerinin Belirlenmesi

Rennet, memelilerin midelerinde üretilen birden fazla enzimin (kimozin, pepsin ve çok az miktarda gastriksin) oluşturduğu kompleks bir karışım olduğu bilinmektedir. İnek ve tavşan midelerinden sıvı ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen rennetlerin içerdikleri proteinlerin görüntüleri Şekil 4.8' de verilmiştir. Elde edilen jel görüntüsü incelendiğinde rekombinant inek kimozini, inek renneti ve tavşan rennetinin içerdikleri proteinlerin birbirinden farklı büyüklüklere sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 4.8. Rekombinant inek kimozini, tavşan rennetini ve inek rennetinin sds-page görüntüsü M: Marker(11-190 kDa standart protein), R: rekombinant inek kimozini, T: Tavşan renneti, İ: İnek renneti

Foltmann (1964), amino asit dizisini kullanarak kimozinin molekül ağırlığını 30.7 kDa olarak belirlemiştir. Benzer şekilde bufalo kimozin için 23 kDa, 35.6 kDa ve ~36 kDa (Rao, 1984; Mohanty ve ark., 2003; Malak ve ark., 1996), dana kimozin için 36.3–36.5 kDa (Foltmann ve ark., 1977; Kleinert ve ark., 1988), kuzu kimozini için 36 kDa ve 37.5 kDa (Baudys ve ark., 1988; Rogelj ve ark., 2001), oğlak kimozini için 44 kDa ve 36 kDa (Amourache ve Vijayalakshami, 1984; Moschopoulou ve ark., 2006; Kumar ve ark., 2006) molekül ağırlıklarında bildirilmiştir. Araştırmalarda görüldüğü gibi kimozinin molekül ağırlığı hayvanların türüne göre değişiklik göstermektedir.

Yaptığımız araştırmada ise SDS-PAGE gel görüntüsü (Şekil 4.8.) incelendiğinde rekombinant inek kimozini 32 kDa olarak tespit edilmiştir. İnek rennetinde belirgin olan 11-75 kDa arasında değişen 7 bant görüntülenmiştir. Foltmann ve ark., (1977) ve Kleinert ve ark., (1988) da çalışmalarında dana kimozininin molekül ağırlığını 36.3–36.5 kDa olarak belirlemiştir. Benzer şekilde bizde inek rennetinde bulunan kimozin enziminin molekül ağırlığını ~37 kDa civarında tespit ettik. Tavşan rennetinin protein profiline baktığımızda 11-75 kDa arasında değişen 6 bant görüntülenmiştir. Tavşan rennetinde bulanan ~35 kDa molekül ağırlığında bir bant görüntülenmiştir ve bu bandın tavşan kimozini olduğu düşünülmektedir. Rekombinant inek kimozin, inek rennet ve tavşan rennetinin molekül ağırlıkları sırasıyla 32, 37 ve 35 kDa olarak belirlenmiştir.

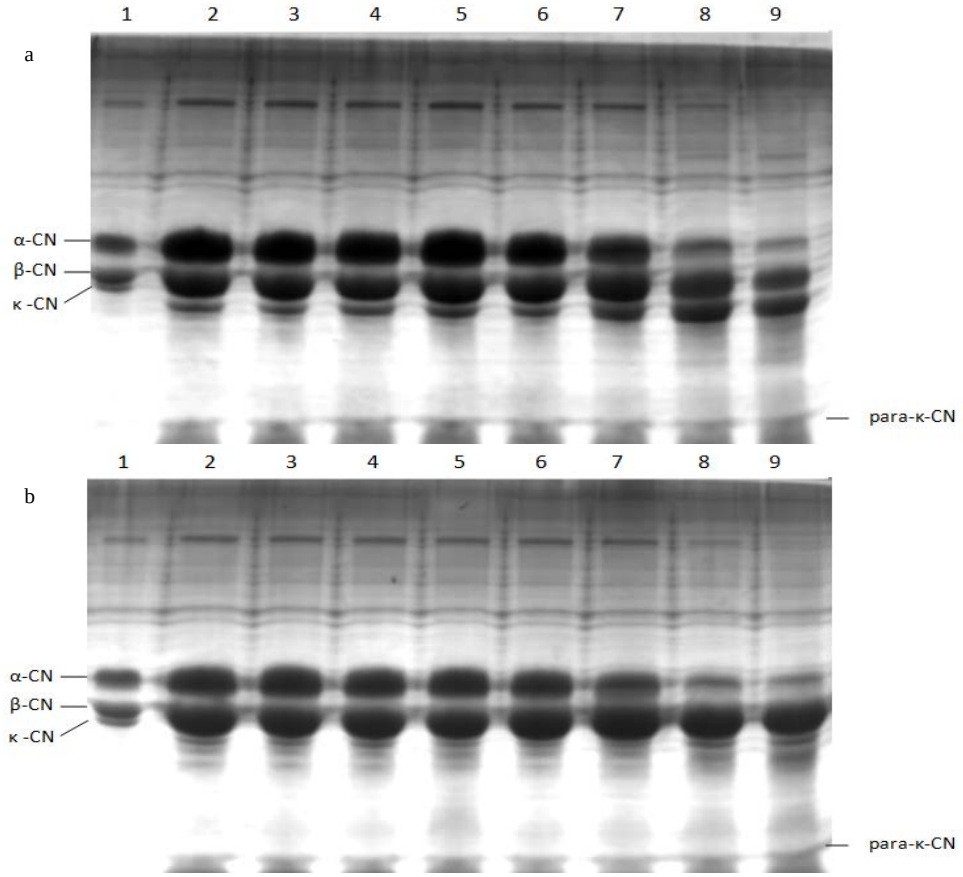
4.15. Proteolitik Analizler

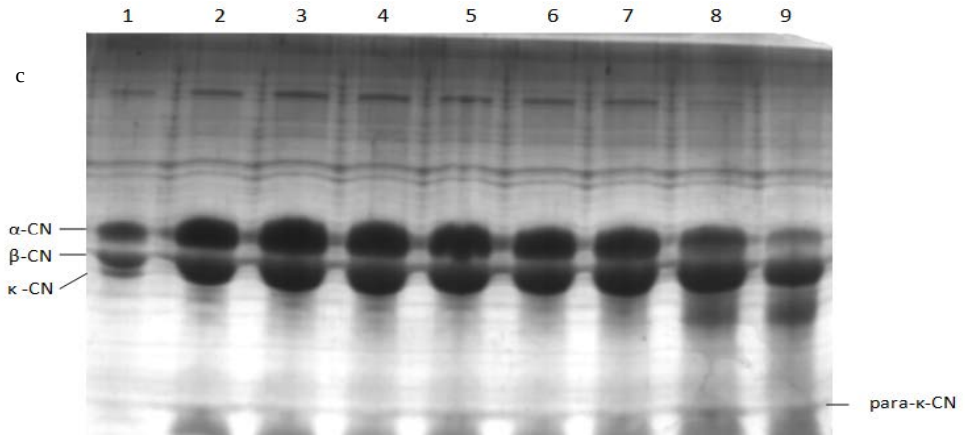
Proteoliz, proteinlerin ve peptitlerin daha küçük peptitler veya amino asitler halinde parçalanması olayıdır. Proteinlerin peptit bağının proteolitik enzimler, proteinazlar, proteazlar veya peptidazlar adı verilen enzimlerle parçalanmasıyla proteoliz gerçekleşir. Proteoliz mineral asitlerin, güçlü alkalilerin veya ısının etkisi gibi enzimatik olmayan yollarla da meydana gelebilir. Protein hidrolizatlarının karakterizasyonunda çeşitli analitik teknikler yaygın olarak kullanılmıştır. Elektroforez proteolizi izlemek için en yaygın yöntemlerden biridir. Tavşan ve inek

rennetleri ve rekombinant inek kimozininin proteolitik aktiviteleri elektroforetik olarak ölçülmüştür.

4.15.1. SDS-PAGE analizi ile hidrolizin belirlenmesi

Rekombinant inek kimozini, tavşan ve inek rennetlerinin, % 0.02 sodyum azid (w/v) içeren 100mM sodyum fosfat (pH 6.5) ile hazırlanan bütün kazein (inek sütü kazeini) üzerindeki farklı sürelerde (1, 10, 40dak, 1, 4, 6, 24, 48 saat) hidroliz etkinliği SDS-PAGE kullanılarak belirlenmiştir. Hidroliz sonucu oluşan bantların görüntüleri Şekil 4.9' da verilmiştir.





Şekil 4.9. İnek tüm kazeinin rekombinant inek kimozini (a), inek renneti (b) ve tavşan renneti (c) tarafından farklı sürelerdeki hidrolizinin SDS-PAGE görüntüleri ; Şerit 1: standart protein, 2: 1 dakika, 3: 10 dakika, 4: 40 dakika, 5: 1 saat, 6: 2 saat, 7: 6 saat, 8: 24 saat, 9. 48 saat sonraki hidrolizi göstermektedir.

İnek kazeinin rekombinant inek kimozini, inek renneti ve tavşan renneti tarafından gerçekleştirilen hidrolizin SDS-PAGE görüntüleri (Şekil.4.9.) incelendiğinde sonuçların birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir. Her üç enzimin inek kazeini üzerindeki hidroliz etkinliğinin zaman ilerledikçe arttığı belirlenmiştir. Kazein rekombinant inek kimozini, inek renneti ve tavşan renneti ile hidroliz edildiğinde ilk dakikada para-k-kazein bandının oluştuğu görülmektedir (Şekil 4.9.a, b, c). pH 6.5' de kazeinin enzimlerle parçalanması sonucu oluşan para-κ-kazein bandının 48 saatte dahi stabilitesini koruduğu belirlenmiştir. Fakat α ve β kazein için aynı durum söz konusu değildir.

Şekil 4.9.a' da görülen α-kazeinin rekombinant inek kimozini tarafından parçalandığı görülmektedir. α-kazein 2 saate kadar stabilitesini korurken daha sonra rekombinant inek kimozini tarafından hızlıca hidroliz edildiği görülmektedir. Ayrıca β-kazein rekombinant inek kimozini tarafından parçalandığı belirlenmiştir. β-kazein in hidrolizi ise 24 saatten sonra bandının inceldiği belirlenmiştir. Rekombinant inek kimozini en çok α-kazeini hidroliz ettiği belirlenmiştir.

Şekil 4.9.b' de görülen α-kazeinin inek renneti tarafından parçalandığı görülmektedir. α-kazein 2 saate kadar rekombinant inek kimozinde olduğu gibi stabilitesini korurken daha sonra inek renneti tarafından hızlıca hidroliz edildiği görülmektedir. Şekil 4.15.1.b' de görülen β-kazein bandının 48 saate kadar

incelmediği belirlenmiştir. İnek rennetinin en çok α-kazeini hidroliz ettiği belirlenmiştir.

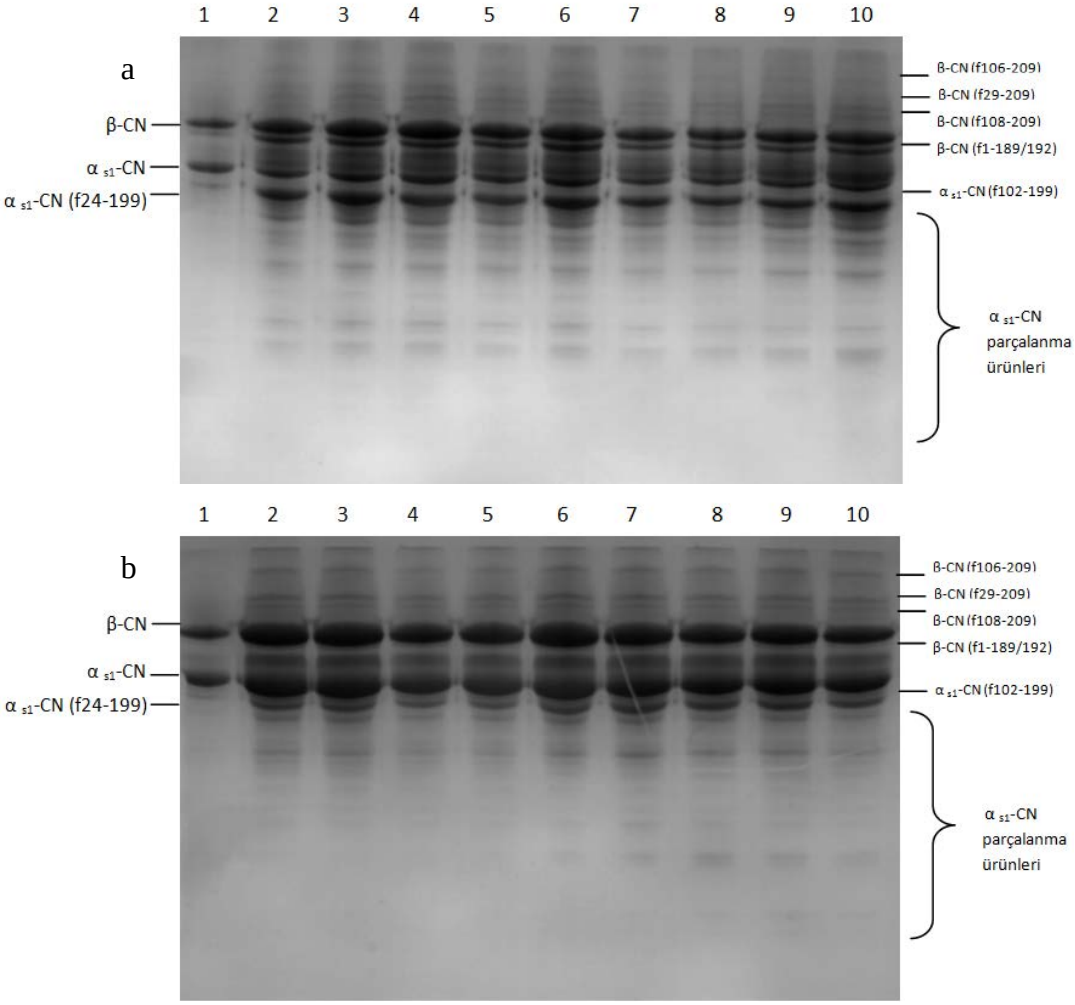
Şekil 4.9.c' de görülen α-kazeinin tavşan renneti tarafından parçalandığı görülmektedir. α-kazein' in rekombinant inek kimozini ve inek renneti tarafından hidrolizi tavşan rennetine göre daha erken sürede gerçekleştiği belirlenmiştir. Çünkü tavşan rennetinde α-kazeinin hidrolizi 6 saatten sonra görülmektedir. Tavşan rennetinin β-kazein hidrolizi rekombinant inek kimozinine göre daha geç inek rennetine göre ise daha erken sürede hidroliz ettiği belirlenmiştir.

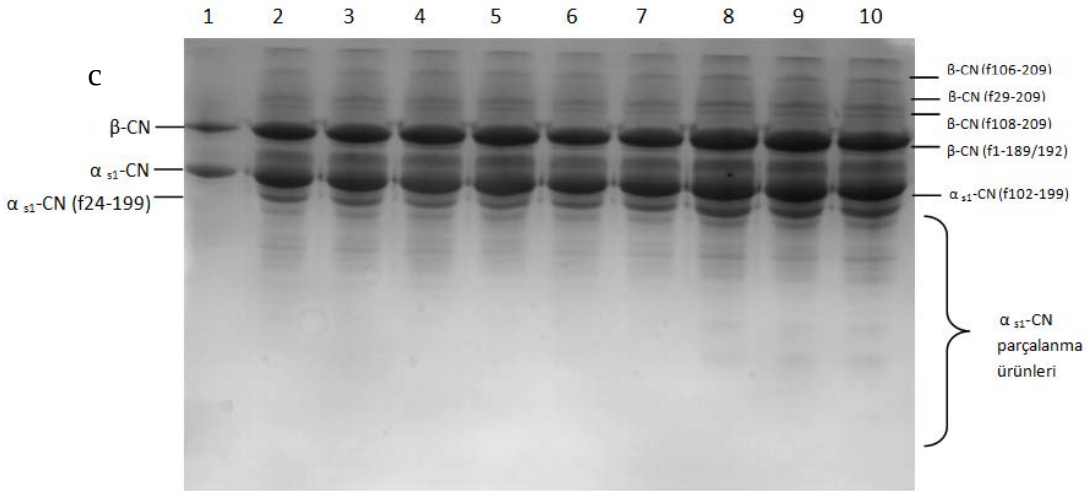
4.15.2. UREA-PAGE analizi ile hidrolizin belirlenmesi

Rekombinant inek kimozini, tavşan ve inek rennetlerinin, 200mM sodyum asetat (pH 5.4) ile hazırlanan bütün kazein (inek sütü kazeini) üzerindeki farklı sürelerde (1, 10, 40 dakika, 1, 4, 6, 24, 48, 72 saat) hidroliz etkinliği UREA-PAGE kullanılarak belirlenmiştir. Hidroliz sonucu oluşan bantların görüntüleri Şekil 4.10' da verilmiştir.

Yapılan analiz sonucunda inek kazeinin rekombinant inek kimozini, inek renneti ve tavşan renneti tarafından gerçekleştirilen hidrolizin UREA-PAGE görüntüleri (Şekil 4.10.) incelendiğinde parçalanmanın arttığı görülmektedir. Kazein rekombinant inek kimozini, inek renneti ve tavşan renneti ile hidroliz edildiğinde ilk dakikada bile β-CN'in temelde (f29-209), (f106-209), (f108-209) fraksiyonlarına hidroliz olduğu belirlenmiştir. para-κ-kazein bandının oluştuğu görülmektedir (Şekil 4.10.a, b, c). Üç enzimde de parçalanan β-CN fraksiyonlarının 72 saate doğru bantların kalınlaştığı yani zamanla β-CN'in hidroliz olduğu belirlenmiştir. β-CN'in hidroliziyle oluşan bir diğer β-CN (f1-189/192) bandı ise rekombinant inek kimozininin kazeini parçalamaya başladığı ilk dakikada belirlenmiştir (Şekil 4.10.a). Bu bant inek ve tavşan rennetinde ise 24 saatten sonra çok ince bir çizgi olarak görülmektedir (Şekil 4.10.b, c). Ayrıca her üç enzimde α_s1-CN' in parçalanmasıyla oluşan α_s1-CN (f24-199) ve α_s1-CN (f102-199) bantları tespit edilmiş olup daha önce yapılan çalışmalarda bu bantların varlığından bahsedilmiştir (Bansal ve ark., 2009; Marcos ve ark., 1979; McSweeney ve ark., 1994). Parçalanma sonucu oluşan α_{s1}-CN

(f24-199) bandın rekombinanat inek kimozinin ilk dakikasında bile belirginken inek ve tavşan rennetinde bu bandın zamanla kalınlaştığı belirlenmiştir. Kazeinin rekombinant inek kimozini ile parçalanma sonucu oluşan α_s1-CN parçalanma ürünleri ilk dakikada bile belirginken, inek rennetinde 6 saat, tavşan rennetinde ise 24 saatten sonra belirmeye başlamıştır.





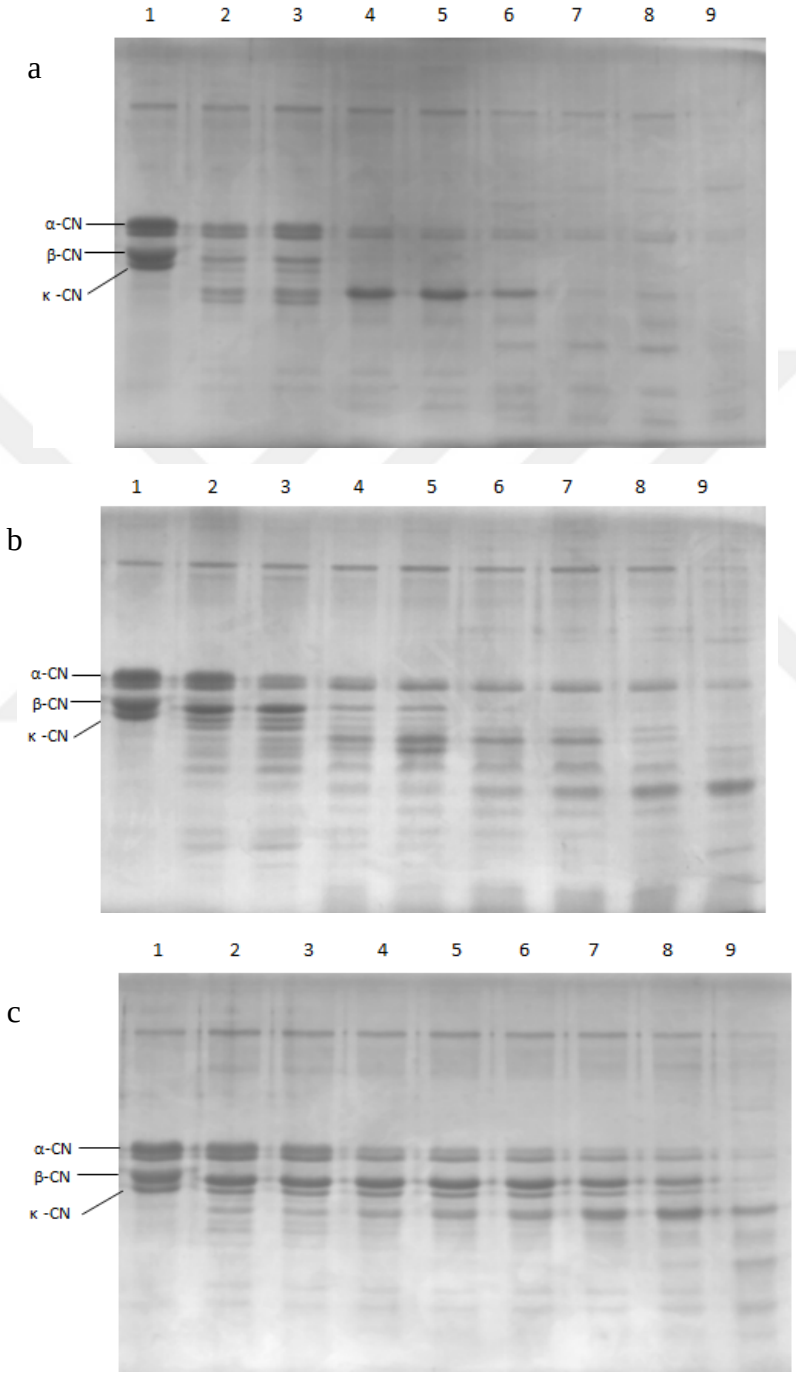
Şekil 4.10. İnek tüm kazeinin rekombinant inek kimozini (a), inek renneti (b) ve tavşan renneti (c) tarafından farklı sürelerdeki hidrolizinin UREA-PAGE görüntüleri ; Şerit 1: standart protein, 2: 1 dakika, 3: 10 dakika, 4: 40 dakika, 5:1 saat, 6: 2 saat, 7: 6 saat, 8: 24 saat, 9: 48 saat, 10: 72 saat sonraki hidrolizi göstermektedir.

Benzer şekilde Trujillo ve ark. (2000) buzağı renneti, kuzu renneti, sığır kimozin, sığır pepsin, *Rhizomucor miehei* ve *Cryphonectria parasitica* proteinazlarının proteolitik aktivitelerini UREA-PAGE ile belirlemişlerdir. Araştırma sonucunda mikrobiyal kaynaklı enzimlerin koyun tüm kazeini üzerindeki proteolitik aktivitelerinin hayvansal kaynaklı enzimlere oranla daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise rekombinant inek kimozininin inek tüm kazein üzerindeki protrolitik etkisi inek ve tavşan rennetine göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Tavşan rennetinin proteolitik etkisi inek rennetine benzediği hatta α_s1-CN üzerindeki proteolitik aktivitenin daha yavaş olduğu belirlenmiştir.

4.15.3. Enzimlerin α, β, κ- kazein hidrolizi

Kimozinin κ-kazeini parçalamasının yanı sıra αs1, αs2 ve β-kazeinin bazı bağlarını hidrolize eder. Böylece kimozin dört kazeinin peptid bağlarını yavaş yavaş hidrolize ederek midede pıhtıların sindirilmesine katkıda bulunur. Rekombinant inek kimozini, tavşan ve inek rennetlerinin, 10 mM potasyum fosfat (pH 5.4) tamponu ile hazırlanan spesifik α, β, κ- kazein üzerindeki farklı sürelerde (1, 10, 40 dakika, 1, 2, 4, 6, 24 saat) hidroliz etkinliği SDS-PAGE kullanılarak belirlenmiştir. Üç enzim

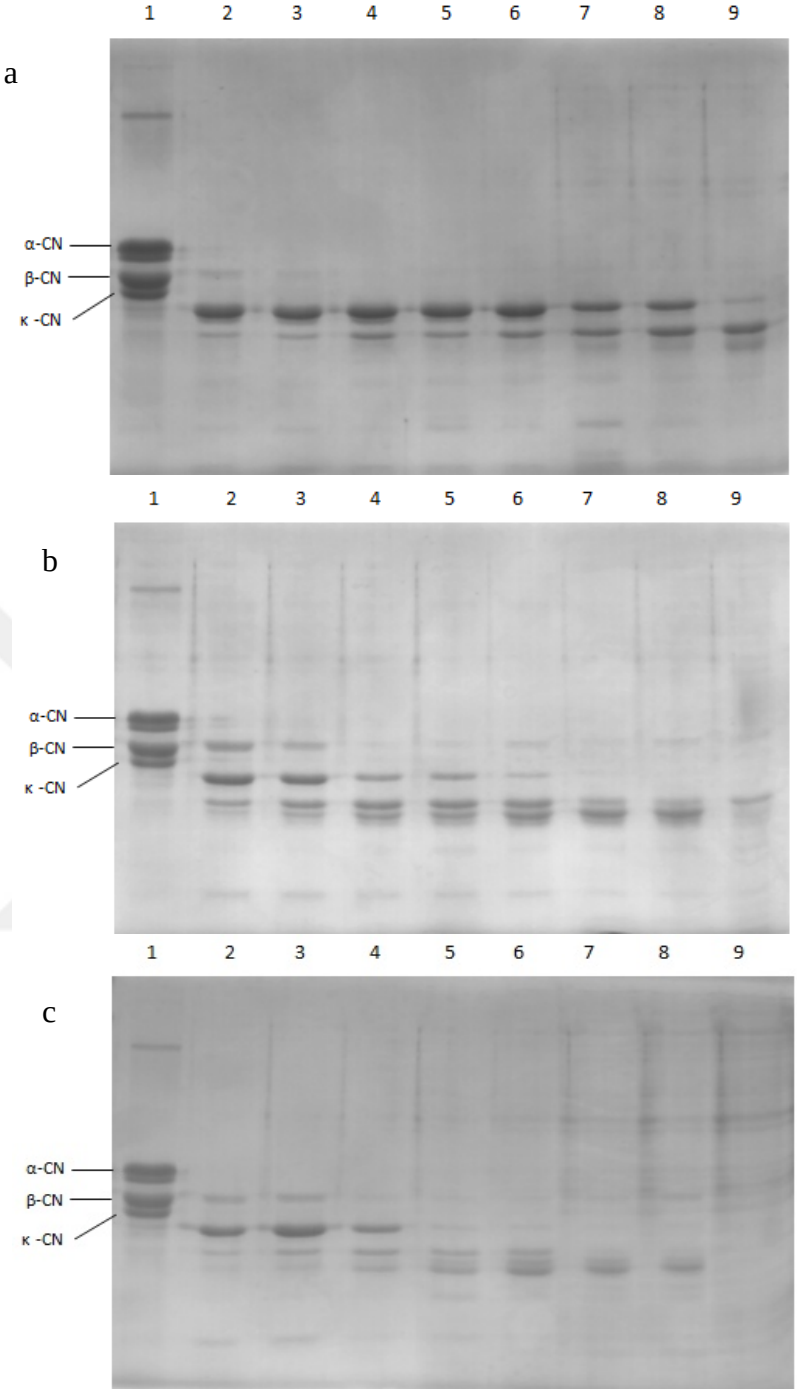
tarafından gerçekleştirilen αs-CN hidrolizi sonucu oluşan bantların görüntüleri Şekil 4.16.1' de, β-CN hidrolizi sonucu oluşan bantların görüntüleri Şekil 4.16.2 ve κ-CN hidrolizi sonucu oluşan bantların görüntüleri Şekil 4.11' de verilmiştir.



Şekil 4.11. α- kazeinin rekombinant inek kimozini (a), inek renneti (b) ve tavşan renneti (c) tarafından farklı sürelerdeki hidrolizinin SDS-PAGE görüntüleri ; Şerit 1:standart protein, 2: 1 dakika, 3: 10 dakika, 4: 40dakika, 5:1 saat, 6: 2 saat, 7: 4 saat, 8: 6 saat, 9: 24 saat sonraki hidrolizi göstermektedir.

Şekil 4.11.a' da görülen α-kazeinin rekombinant inek kimozini tarafından parçalandığı görülmektedir. α-kazein 10 dakikaya kadar stabilitesini korurken daha sonra rekombinant inek kimozini tarafından hızlıca hidroliz edildiği ve 24 saat sonra çok ince bir bant şeklinde görülmektedir. Ayrıca α-kazeinin hidrolizi sonucu 1 ve 10. dakikada oluşan bazı bantların 40. dakikada rastlanmamaktadır. Buda hidroliz sonucu oluşan bantların tekrar parçalandığını göstermektedir. Şekil 4.11.b.' de görülen α-kazeinin inek renneti tarafından parçalandığı görülmektedir. α-kazein 10 dakikaya kadar stabilitesini korurken daha sonra inek renneti tarafından hızlıca hidroliz edildiği görülmektedir. İnek rennetinin α-kazein' i parçalama hızı rekombinant inek kimozinine göre daha yavaş gerçekleşmiştir. Şekil 4.11.c.' de görülen α-kazeinin tavşan renneti tarafından parçalandığı görülmektedir. α-kazein rekombinant inek kimozini ve inek renneti tarafından hidrolizi tavşan rennetine göre daha erken sürede gerçekleştiği belirlenmiştir. Çünkü tavşan rennetinde 24 saate kadar geçen sürede α-kazein bandı kalınlığı diğer iki enzime göre daha kalın olduğu görülmektedir.

McSweeney ve ark. (1993), kimozin pH 6.5' de 0.1 M fosfat tamponu içerisinde αs1-kazeini: Phe23-Phe24, Phe28-Phe29, Leu40-Ser41, Leu149-Phe150, Phe153-Tyr154, Leu156-Asp157, Tyr159-Pro160 ve Tyr164-Tyr165 bağlarını hidroliz ettiğini yani 8 yerden kestiğini bildirmiştir. McSweeney ve ark. (1994) kimozin tarafından αs2-kazeinin hidrolizinde yedi bölünme bölgesi tespit etmiştir.Bunlar Phe88-Tyr89, Tyr95-Leu96, Gln97-Tyr98, Tyr98-Leu99, Leu99-Tyr100, Phe163-Leu164, Phe174-Ala175 ve Tyr179-Leu180 olarak bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmada ise rekombinant inek kimozin, inek rennet ve tavşan rennetinin αs-kazeini hidroliz etmesi sonucu hepsinde 8' den fazla bant oluştuğu belirlenmiştir.

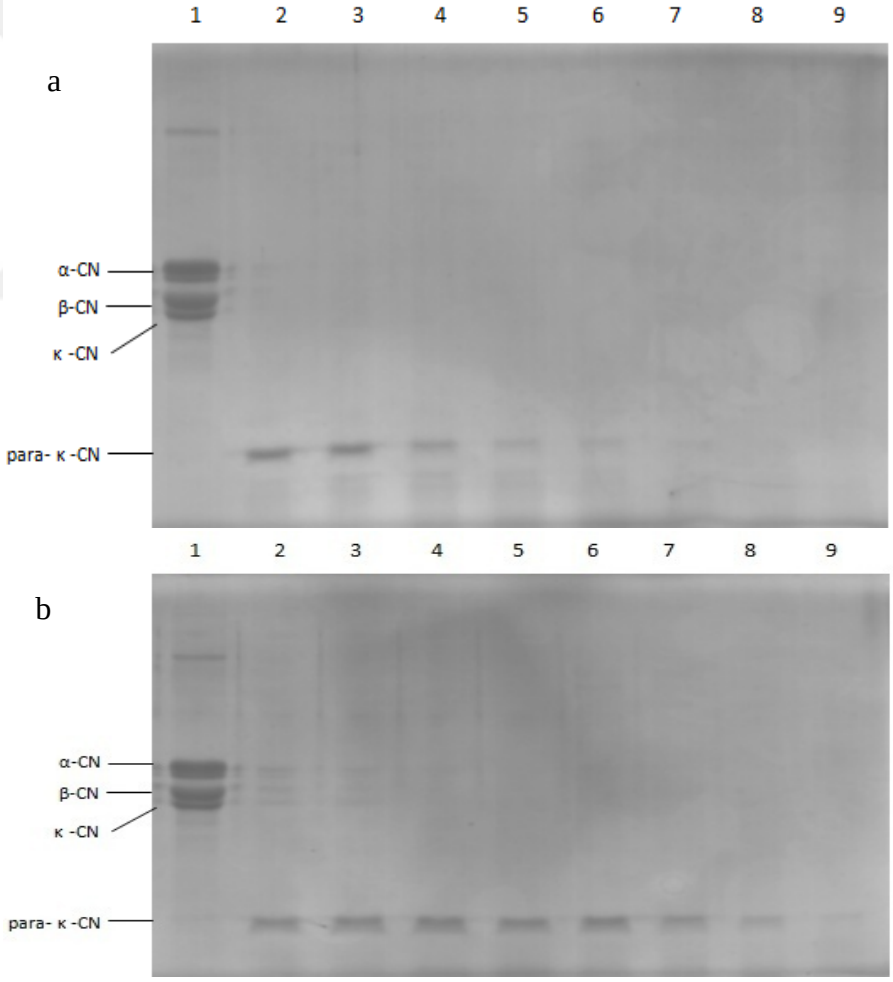


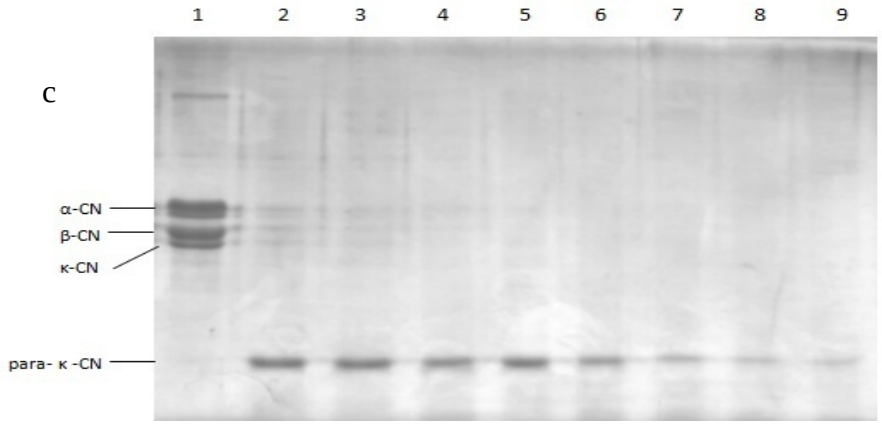
Şekil 4.12. β-kazeinin rekombinant inek kimozini (a), inek renneti (b) ve tavşan renneti (c) tarafından farklı sürelerdeki hidrolizinin SDS-PAGE görüntüleri ; Şerit 1:standart protein, 2: 1 dakika, 3: 10 dakika, 4: 40 dakika, 5: 1 saat, 6: 2 saat, 7: 4 saat, 8: 6 saat, 9: 24 saat sonraki hidrolizi göstermektedir.

Şekil 4.12.a' da β-kazeinin rekombinant inek kimozini tarafından hidrolizi ilk dakikada hızlı bir şekilde parçalandığı görülmektedir. β-kazeinin 10. dakikadan sonra rekombinant inek kimozini tarafından tamamen parçalandığı belirlenmiştir. Şekil

4.12.b' de β-kazeinin inek renneti tarafından hidrolizi ilk dakikada hızlı bir şekilde parçalandığı, 24 saat sonra tamamen parçalanmadığı belirlenmiştir. Şekil 4.12.c.' de ise tavşan rennetinin β-kazeinin hidrolizi 10. dakikaya kadar yavaşken sonrasında rekombinant inek kimozini ve inek rennetine göre daha hızlı olduğu belirlenmiştir.

Visser ve Slangen (1977) yapmış oldukları araştırmada, kimozinin pH 5.4'te 0.05 M sodyum asetat tamponu içinde β-kazeini 7 bölgeden ayırdığını bildirmişlerdir. β-kazeinin kimozin tarafından hidrolizi Leu192-Tyr193, Ala189-Phe190, Leu165-Ser166, Gln167- Ser168, Leu163-Ser164, Leu193-Leu194, Leu127-Thr128 bağları olarak belirtilmiştir. Yaptığımız çalışmada ise rekombinant inek kimozini β-kazeini 7, inek ve tavşan kimozini ise 6 yerden kestiği belirlenmiştir.





Şekil 4.13. κ-kazeinin rekombinant inek kimozin (a), inek rennet (b) ve tavşan renneti (c) farklı sürelerdeki hidrolizinin SDS-PAGE görüntüleri ; Şerit 1:standart protein, 2: 1 dakika, 3: 10 dakika, 4: 40dakika, 5: 1 saat, 6: 2 saat, 7: 4 saat, 8: 6 saat, 9: 24 saat sonraki hidrolizi göstermektedir.

κ-kazeinin Phe105-Met106 bağının hidrolizi, iki parçanın oluşumuna yol açar. Birincisi para-k-kazein olarak anılan hidrofobik N-terminal parçası kazein misellerine bağlı kalırken parçalanma sonucu oluşan ikinci bant glikomakropeptit (GMP) olarak anılan hidrofilik C-terminal fragmanı süt serumu içine karışır. Para-k-kazeinin kimozin için birçok potansiyel bölünme bölgesi vardır, ancak ya çözelti içinde ya da peynirde hidrolize edilmediği görülmektedir (Green ve Foster, 1974). κ-Kazein rekombinant inek kimozini, inek renneti ve tavşan renneti ile hidroliz edildiğinde ilk dakikada para-k-kazein bandının oluştuğu görülmektedir (Şekil 4.13.a, b, c). κ-Kazeinin rekombinant inek kimozini tarafından hizrolizinde 2 saatten sonra para-κ-kazein bandının yok olduğu görülmektedir. İnek ve tavşan rennetinde ise para-κ-kazein bandının zamanla inceldiği görülmektedir. Sonuç olarak inek renneti ve tavşan renneti κ-kazein üzeinde benzer proteolitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Coolbear ve ark. (1996), sığır k-kazeinin pH 6.6'da kimozin hidrolizinin para-κ-kazeine (Glu1-Phe105) ek olarak κ-kazeinin Phe18 ve Ser33'üne karşılık gelen N-terminali ile iki küçük para-κ-kazeini ürettiğini bildirmiştir. Bu durum oluşan para-κ-kazeinin zamanla parçalanmasına açıklık getirmektedir.

4.17. Rennetlerin Enzimatik Aktivitelerinin Belirlenmesi

APIZYM ® enzim test kiti 19 enzimatik aktivitenin hızlı bir şekilde saptanması için tasarlanmış yarı kantitatif bir mikrometot sistemidir. İnek ve tavşan rennetinin APIZYM enzim kiti kullanılarak üç farklı pH değerlerindeki enzimatik aktivite görüntüleri Şekil 4.14' de verilmiştir.



Şekil 4.14. İnek ve tavşan rennetinin APIZYM testi ile ölçülen enzimatik aktivite görüntüleri A: İnek rennet (pH 5.4) B: İnek rennet (pH 5) C: İnek rennet (pH 6) D: Tavşan rennet (pH 5.35) E: Tavşan rennet (pH 5) F: Tavşan rennet (pH 6)

Şekil 4.14' de görüldüğü gibi rennetlerin enzim aktivitelerine göre oluşan renklerin değerleri Çizelge 4.17' de verilmiştir. Puanlama tedarikçinin belirlemiş olduğu renk tablosuna göre yapılmıştır.

Çizelge 4.17. İnek ve tavşan rennetinin APIZYM testi ile ölçülen enzimatik aktivite sonuçları

	İnek			Tavşan		
Enzim	pH 5	pH 5,4	pH 6	pH 5	pH 5,35	pH 6
Kontrol	0	0	0	0	0	0
Alkaline phosphatase	3	3	3	3	3	3
Esterase (C 4)	0	0	1	1	1	1
Esterase Lipase (C 8)	1	1	1	1	1	1
Lipase (C 14)	0	0	0	3	3	3
Leucine arylamidase	3	3	3	3	3	3
Valine arylamidase	3	3	1	0	0	0
Cystine arylamidase	0	0	0	0	0	0
Trypsin	0	0	0	0	0	0
α-chymotrypsin	0	0	0	0	0	0
Acid phosphatase	5	5	5	5	5	5
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	5	5	4	5	5	5
α-galactosidase	0	0	0	0	0	0
ß-galactosidase	4,5	5	4,5	4	5	4
ß-glucuronidase	4,5	5	4,5	4	4	4,5
α-glucosidase	1	1	1	1	1	1
ß-glucosidase	0	0	0	0	0	0
N-acetyl-ß-glucosaminidase	5	5	3	5	5	5
α-mannosidase	0	0	0	0	0	0
α-fucosidase	1	1	1	1	1	1

Çizelge 4.16' da verilen sonuçlar incelendiğinde hem inek renneti hem tavşan rennetinde Alkaline phosphatase, Cystine arylamidase, Trypsin, α-chymotrypsin, α-galactosidase, ß-glucosidase ve α-mannosidase aktivitesi olmadığı belirlenmiştir. Her iki rennette de ortak olarak Alkalin fosfataz, Lösin arilamidaz, Asit fosfataz, Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz, ß-galaktosidaz, ß-glukuronidaz ve N-asetil-ß-glukosaminidaz aktivitelerine sahip olduğu belirlenmiştir. İnek renneti en iyi pH 5 ve pH 5.4' te Valin arilamidaz aktivitesini gösterirken tavşan rennetinin aktivite göstermediği belirlenmiştir. Ayrıca tavşan renneti üç farklı pH' da Lipaz (C14) aktivitesi gösterirken inek rennetinin aktivite göstermediği belirlenmiştir. İnek renneti en yüksek ß-galaktosidaz ve ß-glukuronidaz aktivitelerini pH 5.4 ' de gösterirken tavşan rennetinin en yüksek aktivitesi sırasıyla pH 5.35 ve pH 6 da göstermiştir. Çalışmamıza benzer şekilde Florez ve ark. (2006) Cabrales peynir üreticisinden peynir altı suyuyla ekstrakte edilen dört farklı oğlak midesinden elde edilen enzim

ekstraktlarının(rennet 1,2,3,4) ekstraktlarının enzimatik aktivitelerini yarı kantitatif bir sistem olan API ZYM kiti ile üç farklı pH'da (6.0, 5.0 ve mevcut pH'ları) incelemişlerdir. Rennet 1' in diğer tüm rennetlerle karşılaştırıldığında yüksek alkali ve asit fosfataz aktivitesi gösterdiğini, rennet 2 ve rennet 3' ün ise diğer rennetlere göre daha yüksek N-asetil-β-glukozaminidaz aktivitesi gösterdiğini belirtmiştir. Artan pH' ın leucine arylamidaz, β- galaktosidaz ve β -glukosidaz' ı aktive ederken esteraz C4, esteraz-lipaz C8, sistein arilamidaz, asit fosfataz, naftol-AS-BI-fosfohidrolaz ve β-glukuronidaz enzimlerini inaktive ettiğini yada aktivitelerinin azalttığını bildirmişlerdir.

4.18. Rennetlerin Farklı Hayvansal Kaynaklı Sütler Üzerine Pıhtılaştırma Aktivitesi

İnek kimozin, inek rennet ve tavşan rennetinin inek, koyun, keçi, deve ve eşek gibi farklı hayvansal kaynaklardan elde edilen sütler üzerindeki süt pıhtılaştırma aktivitesi sonuçları Çizelge verilmiştir.

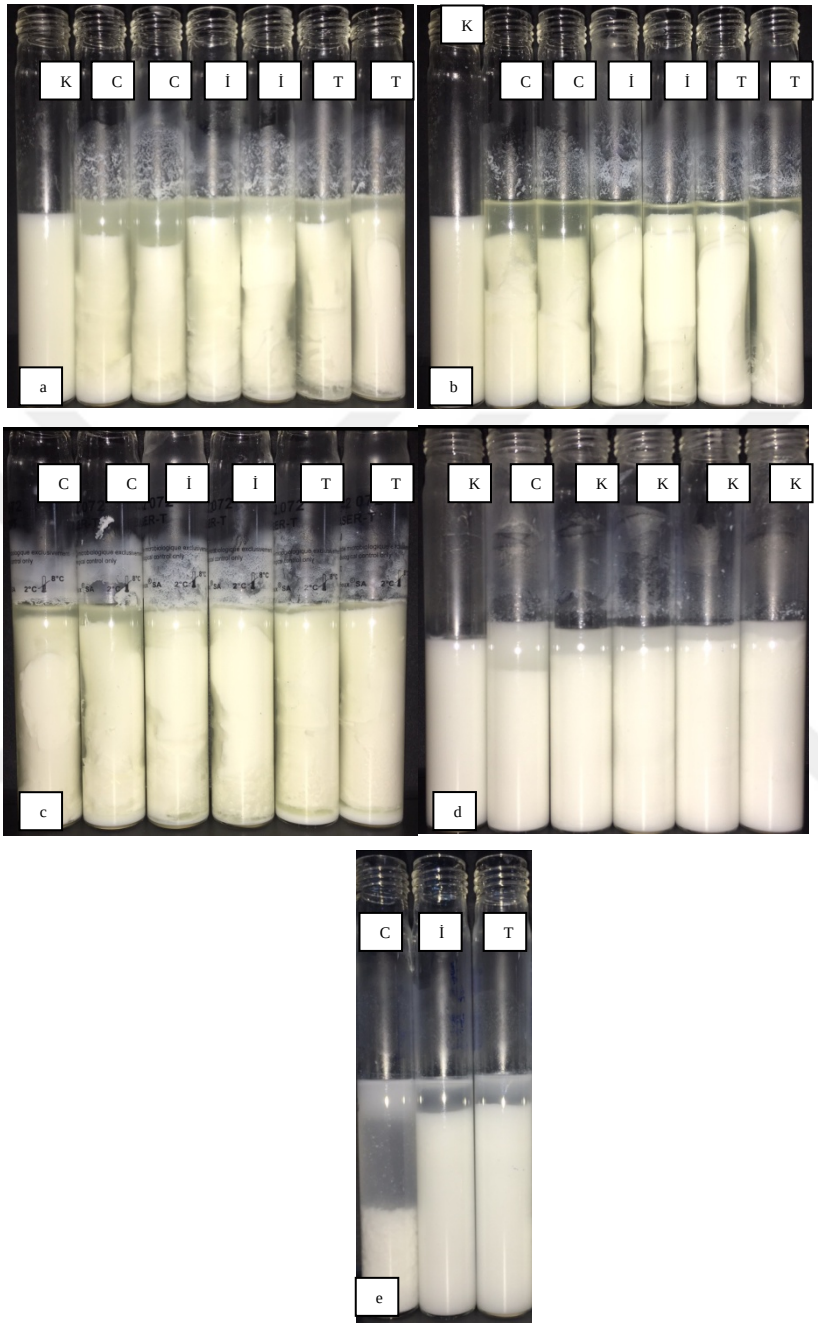
Çizelge 4.18. İnek kimozin, inek rennet ve tavşan rennetinin farklı hayvansal kaynaklardan elde edilen sütler üzerindeki süt pıhtılaştırma aktivitesi

	Süt Pıhtılaşma Aktivitesi RU		
Süt	**İnek Kimozin**	**İnek Rennet**	**Tavşan Rennet**
İnek	200.00±0.00^{a}	19.49±0.44^{b}	22.22±0.00^{a}
Koyun	83.33±0.00^{c}	7.81±0.00^{d}	4.70±0.01^{d}
Keçi	111.11±0.00^{b}	20.98±0.26^{a}	17.86±0.00^{b}
Deve	15.54±0.14^{e}	10.07±0.12^{c}	5.95±0.00^{c}
Eşek	25.21±0.37^{d}	2.95±0.01^{e}	3.89±0.02^{e}

Çizelgede verilen değerler ortalama ± standart sapma şeklindedir
^{a,b,c,d,e} Aynı sütunda bulunan farklı harfler inek kimozin, inek rennet ve tavşan rennetinin farklı hayvansal kaynaklı sütler üzerindeki süt pıhtılaştırma aktivitesinin kendi içlerindeki farklılığını göstermektedir.

Çizelge 4.18' de görüldüğü gibi inek kimozin, inek rennet ve tavşan rennetinin inek, koyun, keçi, deve ve eşek gibi farklı hayvansal kaynaklardan elde edilen sütler üzerindeki süt pıhtılaştırma aktivitesi sonuçlarında istatistiksel olarak fark olduğu görülmektedir ($p<0.05$). İnek kimozin, inek rennet ve tavşan renneti belirtilen tüm

sütleri pıhtılaştırdığı belirlenmiştir. Süt pıhtılaştırma aktivitesi sonrası elde edilen pıhtı görüntüleri Şekil 4.15' de verilmiştir.



Şekil 4.15. Farklı hayvansal kaynaklardan elde edilen sütlerin rekombinant İnek kimozini (C), inek renneti (İ) ve tavşan rennetinin (T) süt pıhtılaştırma aktivitesi sonucu elde edilen pıhtı görüntüleri a: inek sütü, b:koyun sütü, c: keçi sütü, d: deve sütü, e: eşek sütü

Mercier ve ark. (1976) buzağı kimozininin, inek, keçi, koyun, hint öküzü, manda sütlerini kolaylıkla pıhtılaştırdığını bildirmiştir. Deve kimozinin sığır sütünü kısmen pıhtılaştırabildiğini ancak sığır kimozinin deve sütünü pıhtılaştıramadığı yapılan çalışmalarla ileri sürülmüştür (Farah ve ark., 2004; Kappeler ve ark., 2007; Jensen ve ark., 2013). Yaptığımız çalışmada inek kimozi, inek renneti ve tavşan rennetinin deve sütünü pıhtılaştırabildiğini ve inek kimozininin diğer rennetlere göre deve sütünü pıhtılaştırma aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. İnek kimozini inek, koyun, keçi ve eşek sütlerinide rennetlere göre pıhtılaştırma aktiviteesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Sığır kimozinin, sığır ve domuz sütü üzerinde benzer bir pıhtılaşma aktivitesine sahip olmasına rağmen, domuz kimozini domuz sütü üzerinde daha yüksek süt pıhtılaşma aktivitesine sahip olduğu Foltmann, (1981b) tarafından bildirilmiştir. Ayrıca Foltmann (1981b), küçükbaş hayvanlardan elde edilen enzimlerin ve domuz kimozinlerinin kendi türlerinin sütünü pıhtılaştırmada en verimli olduğunu bildirmiştir. Ayrıca bufalo (Abdel Malak ve ark., 1996; Mohanty ve ark., 2003), koyun (Baudys ve ark., 1988; Rogelj ve ark., 2001), deve (Kappler ve ark., 2006; Wangoh ve ark. 1993), keçi (Kumar ve ark., 2006; Moschopoulou ve ark., 2006) ve fok (Shamsuzzaman ve Haard, 1984) kimozininlerinin sığır sütünü ve kendi türlerinin sütünü pıhtılaştırabildiğini bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmada tavşan renneti inek rennetine göre inek ve eşek sütlerini üzerindeki pıhtılaştırma aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Peynir üretiminde süt pıhtılaştırıcısı olarak rennet kullanımı dünyada büyük öneme sahiptir. Peynir üretimi ve tüketimi giderek artış göstermekte fakat buzağı renneti temini giderek azalmaktadır. Buzağı kesimine karşı çıkılması, rennetin yüksek fiyatı, diyet (vejetaryenlik), veya rekombinant buzağı kimozininin Fransa, Almanya ve Hollanda'da yasaklanması gibi birçok neden başka kaynaklardan süt pıhtılaştırıcı enzimler aramayı teşvik etmiştir. Buzağı dışında kuzu, deve, keçi, oğlak, manda, maymun, domuz, sığır ve tavuk midesinde de kimozin enzimi bulunmaktadır. Hayvansal kaynaklı süt pıhtılaştırma enzimlerin dışında mikrobiyal, rekombinant ve bitkisel kaynaklı enzimler üzerinde de çok fazla durulmuştur. Fakat bu kaynaklardan elde edilen enzimler peynirde istenmeyen yapı, tat, aroma, proteinde azalmaya ve peynir randımanında çok ciddi kayıplara yol açabilmektedir.

Literatürde tavşan renneti ile ilgili olarak peynir yapımı için iyi bir kaynak olabileceği ve peynir üretiminde kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu öngörülmektedir (Rao ve Dutta, 1981; Nurliyani ve ark., 2013; Dobler ve ark., 2016; Alihanoğlu ve ark., 2017). Bu bilgilerden yola çıkarak tavşan rennetinin buzağı rennetine en iyi alternatif enzim olabileceği düşüncesi ile çalışma gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle uygun yöntem ile tavşan ve inek midelerinden sıvı rennet ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen rennetin öncelikle fizikokimyasal özellikleri hesaplanmıştır. İnek ve tavşan rennetinin toplam protein içerikleri sırasıyla 2584.66±4.16, 1990.66±5.03 µg/ml, süt pıhtılaştırma aktivitesi sırasıyla 17.44±0.35, 15.87±0.25 RU olarak bulunmuştur. Tavşan rennetinin inek rennetiyle karşılaştırmalı olarak optimum süt pıhtılaştırma aktivitesi gösterdiği koşullar belirlenmiştir. Çalışmalar sonucunda inek rennetinin tavşan rennetine göre daha termostabil olduğu belirlenmiştir. Ayrıca sütün konsantrasyonu, pH' ı ve içindeki tuz miktarının artmasıyla inek ve tavşan rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesinde azalma olduğu belirlenmiştir. Enzim konsantrasyonu her iki rennettede arttıkça sütün pıhtılaşma süresinde azalma görülmüştür. İnek rennetinin en yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesi 50 ºC' de 66,67±0,00 RU, tavşan rennetinin ise 55 ºC' de 58.82±0.00 RU olarak belirlenmiştir. İnek renneti için en yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesi 40 mM

CaCl2 varlığında 91.41±8.34 RU, tavşan rennetinde ise en yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesi 45 mM CaCl2 varlığında 32.97±0.62 RU olarak tespit edilmiştir.

TS 3844 Peynir Mayası Standardı' na göre inek ve tavşan rennetlerin mikrobyolojik açıdan güvenli olduğu belirlenmiştir. Her iki rennettede koliform grubu bakteri, *Enterococci, Staphylococci*, maya ve küf tespit edilememiştir. Yalnızca inek rennetinde 2.59 ± 0.007 log kob/ml toplam aerobik mezofilik bakteri tespit edilmiştir.

Yaptığımız araştırmada SDS-PAGE analizi ile rennetlerin polipeptit profilleri incelendiğinde rekombinant inek kimozini 32 kDa, inek renneti ~37 kDa, tavşan renneti ise ~35 kDa molekül ağırlığında belirlenmiştir.

Peynir teknolojisinde en önemli konulardan biri olan proteoliz çalışmamızın da bir parçası olmuştur. Rekombinant inek kimozini, inek renneti ve tavşan rennetinin tüm k-kazein ve spesifik α, β, κ- kazein hidrolizi değerlendirilmiştir. Rekombinant inek kimozini, inek ve tavşan rennetine göre daha proteolitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Tavşan ve inek rennetinin proteolitik aktivitesi birbirine benzerlik gösterdiği hatta tavşan rennetinin bazı yerlerde inek rennetine göre daha iyi olduğu gözlemlenmiştir.

Bildiğimiz gibi rennet yüzyıllar boyunca peynir yapımında kullanılmaktadır. Rennette bulunan kimozinin κ- kazeini spesifik olarak kesip peynir yapımının ilk aşamasını gerçekleştirmektedir. Rennet kimozin dışında başka enzimlerinde var olduğu ve bunlarında sütte bulunan proteinleri parçaladığı bilinmektedir. Rennetin süt proteini dışındaki başka substratlar üzerinde enzim aktivitelerinin olup olmadığı yarı kantitatif metot olan APIZYM kiti kullanılarak belirlenmiştir. Hem inek hemde tavşan rennetinde ortak olarak Alkalin fosfataz, Lösin arilamidaz, Asit fosfataz, Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz, ß-galaktosidaz, ß-glukuronidaz ve N-asetil-ß-glukosaminidaz aktivitelerine sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca tavşan renneti üç farklı pH' da Lipaz (C14) aktivitesi gösterirken inek rennetinin aktivite göstermediği belirlenmiştir.

Son olarak rekombinant inek kimozi, inek renneti ve tavşan rennetinin inek, koyun, keçi, deve ve eşek sütlerini pıhtılaştırabildiği gözlemlenmiştir. Rekombinant inek kimozininin bu sütler üzerindeki pıhtılaştırma aktivitesi inek ve tavşan rennetine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Tavşan rennetinin tanımlanması, mikrobiyolojik, enzimatik, fizikokimyasal ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve bu özelliklerin inek rennetine karşılaştırmalı olarak ölçülmüştür. Sonuç olarak tavşan rennetinin inek rennetine göre daha çok avantajı olduğu belirlenmiştir.

Tavşan rennetinin inek kazeini dışında başka kazeinler üzerindeki proteolitik aktivitesi araştırılabilir. Rennetlerin başka substratlar üzerinde aktiviteleri olduğu APIZYM testindeki sonuçlar göz önünde bulundurularak süt dışında ilgili enzimlerin kullanıldığı sektörlerdede araştırma yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

ABBAS, C. A., and BAO, W. L., 2009. Increased Fiber Hydrolysis by Protease Addition. U.S. Patent 0098638 A1.

ABDEL-MALAK, C. A., ABOU, E. L., ADAB, I. F. G., VUKASHİNOVİC, V., ZALUNİN, I. A., TİMOKHİNA, E. A., LAVRENOVA, G. I., and STEPANOV, V. M., 1996. Buffalo (Bos buffali L., sic) Chymosin Purification and Properties. Comp. Biochem. Physiol. B. 113:57–62.

ALİHANOĞLU, S., EKTİREN, D., AKBULUT ÇAKIR, Ç., VARDİN, H., KARAASLAN, A., and KARAASLAN, M., 2018. Effect of *Oryctolagus cunicul*us (rabbit) Rennet in The Texture, Rheology, and Sensory Properties of White Cheese. Food Science & Nutrition, 6(4): 1100-1108.

AMOURACHE, L., and VIJAYALAKSHMI M. A., 1984. Affinity Chromatography of Kid Chymosin on Histidyl-Sepharose.Journal of Chromatography A, 303:285–290.

ARECES, L. B., BONİNO, M. B., PARRY, M. A., FRAİLE, E. R., FERNÁNDEZ, H. M., and CASCONE, O., 1992. Purification and Characterization of a Milk Clotting Protease from *Mucor Bacilliformis*. Appl Biochem Biotechnol 37:283–294.

ARİMA, K., Y,U., J. and LWASAKİ, S., 1970. Milk-clotting Enzyme from *Mucor pusillus var*. Methods in Enzymology 19:446-459.

ASAKURA, T., WATANABE, H., ABE, K., and ARAİ, S., 1997. Oryzasin as an Aspartic Proteinase Occurring in Rice Seeds: Purification, Characterization and Application to Milk Clotting. J. Agr. Food Chem. 45:1070–1075.

ASHİE, I. N. A., SORENSEN, T. L., and NİELSEN, P. M., 2002. Effects of Papain and a Microbial Enzyme on Meat Proteins And Beef Tenderness. J Food Sci 67:2138–2142.

AWAD, S. L. U., THI-PENG, Q. Q., and PUHAN, Z., 1999. Proteolytic Activities of Suparen and Rennilase on Buffalo, Cow, and Goat Whole Casein and b-casein. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47:3632–3639.

BADGUJAR, S. B., MAHAJAN, R. T., 2014. Nivulian-II A New Milk Clotting Cysteine Protease of Euphorbia Nivulia Latex. International Journal of Biological Macromolecules. 70:391–398.

BANSAL, N., DRAKE, M. A., PİRAİNO, P., BROE, M. L., HARBOE, M., FOX, P. F. and MCSWEENEY, P. L. H., 2009. Suitability of Recombinant Camel (*Camelus dromedarius*) Chymosin as a Coagulant for Cheddar cheese. International Dairy Journal, *19*(9): 510-517.

BAUDYS, M., ERDENE, T. G., KOSTKA, V., PAVLIK, M., and FOLTMAN, B., 1988. Comparison Between Prochymosin and Pepsinogen from Lamb and Calf. Comparative Biochemistry and Physiology –Part B: Biochemistry & Molecular Biology, 89:385–391.

BELOZERSKY, M. A., SARBAKANOVA, S. T. and DUNAEVSKY, Y. E., 1989. Aspartic Proteinase from Wheat Seeds: İsolation, Properties and Action on Gliadin. Planta, 177:321-326.

BENNETT, R. J., and JOHNSTON, K. A., 2004. General Aspects of Cheese Technology. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, ve T. P. Guinee (Eds.), Major cheese groups (3rd ed.)..Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, London, UK: Elsevier Academic Press. Vol. 2 23-50.

BERRIDGE, N. J. 1955. Purification and Assay of Rennin. Methods in Enzymology 2:69-77.

BERRİDGE, N. J., 1942. The Second Phase of Rennet Coagulation. Nature 149: 149-194.

BERRİDGE, N. J., 1952. Some Observations on The Determination of The Activity of Rennet. Analyst, 77: 57-60.

BERRİDGE, N. J., 1952. An Improved Method of Observing The Clotting of Milk Clotting Rennin. J Dairy Res, 19: 328–332.

BINES, V. E., YOUNG, P., and LAW, B. A., 1989. Comparison of Cheddar Cheese Made With A Recombinant Calf Chymosin and With Standard Calf Rennet. J Dairy Res, 56: 657–664.

BOUDJENAH-HAROUN, S., LALEYE, C. L., CODJO, L., SENOUSSİ, C., MOULTİ-MATİ, F., AHMED, S. S., and MATİ. A., 2012. Coagulation of Camel Milk Using Dromedary Gastric Enzymes As a Substitute of The Commercial Rennet. Am. J. Food Technol, 7: 409-419.

BRINGE, N. A. and KINSELLA, J. E., 1986b. Influence of Calcium Chloride on The Chymosin Initiated Coagulation of Casein Micelles. Journal Dairy Res, 53:371-379.

BRINGE, N. A. and KİNSELLA, J. E., 1986a. Use of Pletelet Aggrerometer to Monitor The Chymosin-İnitiated Coagulation of Casein Micelles. Journal Dairy Res, 53: 359-370.

BROOME, M. C., and LIMSOWTIN, G. K. Y., 1998. Milk Coagulants. The Australian Journal of Dairy Technology, 53(3): 188-190.

BRUNO, M. A., LAZZA, C. M., ERRASTİ, M. E., LÓPEZ, L. M. I., CAFFİNİ, N. O., and PARDO, M. F., 2010. Milk Clotting and Proteolytic Activity of an Enzyme Preparation from Bromelia Hieronymi Fruits. LWT Food Sci Technol, 43: 695–701.

BRUTTI, C. B., PARDO, M. F., CAFFİNİ, N. O., and NATALUCCİ, C. L., 2012. *Onopordum acanthium L*. (Asteraceae) Flowers as Coagulating Agent for Cheesemaking. LWT - Food Sci Technol, 45:172–179.

CARLES, C., and RİBADEAU-DUMAS, B., 1984. Kinetics of Action of Chymosin (rennin) on Some Peptide Bonds of Bovine β-casein. Biochem, 23: 6839–6843.

CARLES, C., and RİBADEAU-DUMAS, B., 1985. Kinetics of Action of Chymosin (rennin) on a Peptide Bond of Bovine αs1-casein: Comparison of The Behaviour of This Substrate withTthat of β-caseins k-caseins. FEBS Lett, 185: 282–286.

CHEESEMAN, G. C., 1965. Denaturation of Rennin: Effect on Activity and Molecular Configuration. Nature, 205:1011-1012.

CLAVERİE-MARTİN, F., VEGA-HERNANDEZ, M. C., 2007. Aspartic Proteases in Cheese Making. In: Polaina J, Maccabe AP (eds) Industrial Enzymes. Springer, Netherlands, 207–219.

COOLBEAR, K. P., ELGAR, D. F., COOLBEAR, T., AYERS, J. S., 1996. Comparative Study Methods for The İsolation and Purification of Bovine k-Casein and İts Hydrolysis by Chymosin. J. Dairy Res, 63: 61–71.

CORDEİRO, M. C., PAİS, M. S., and BRODELİUS, P. E., 1998. *Cynara cardunculus subsp.* Flavescens (cardoon): in Vitro Culture, and The Production of Cyprosins (Milk-clotting Enzymes). In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer, Heidelberg, 132–153.

COSTA, D. S., PEREİRA. S., MOORE, I., and PİSSARRA, J., 2010. Dissecting Cardosin B Trafficking Pathways in Heterologous Systems. Planta, 232: 1517-1530.

CREAMER, L. K., ZOERB, H. F., OLSON, N. F., and RİCHARDSON, T., 1982. Hydrophobicity of αs1-I, αs1-casein A and B and Its Implications in Cheese Structure. J. Dairy Sci, 65: 902–906.

ÇAKMAKÇI, S., and BOROĞLU, E., 2004. Some Quality Characteristics of Commercial Liquid Rennet Samples. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 28: 501-505.

DALGLEISH, D. G., 1987. The Enzymatic Coagulation of Milk. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology Ed. P.F. Fox. Volume I. Elsevier Applied Science. London and New York, 63-96.

DAVİES, D. R., 1990. The Structure and Function of Aspartic Proteinases. Annu. Rev. Biophys.Biophys. Chem, 19: 189-215.

DOBLER-LÓPEZ, J., ESPINOSA-AYALA, E., HERNÁNDEZ-GARCIAP, A., LÓPEZ-MARTÍNEZ, L. X., and MÁRQUEZ-MOLİNAO., A., 2016. Mılk Coagulant Extract from Stomach of Rabbıt (*Oryctolagus cuniculu*s sp.)Agrociencia, 50: 583-593.

DOİ, E., SHİBATA, D., MATOBA, T. and YONEZAWA, D., 1980. Characterization of Pepstatin Sensitive Acid Protease in Resting Rice Seeds. Agric. Biol. Chem. 44: 741-747.

DOLEZALEK, L., and STUDENOVSKY, J., 1978. The Influence of Microbial Rennet on Changes in Casein Fractions During the Coagulation of Milk. 20th International Dairy Congress, 449 p.

EDER, J., HOMMEL, U., CUMİN, F., MARTOGLİO, B., and GERHARTZ, B., 2007. Aspartic Proteases in Drug Discovery. Curr Pharm Des 13(3):271–285.

EGİTO, A. S., GİRARDET, J. M., LAGUNA, L. E., POİRSON, C., MOLLE, D., MİCLO, L., HUMBERT, G., and GAİLLARD, J.L., 2007. Milk-clotting Activity of Enzyme Extracts from Sunflower and Albizia Seeds and Specific Hydrolysis of Bovine κ-casein. Int Dairy J, 17:816–825.

ELAGAMY, E.I., 2000. Physicochemical, molecular and immunological characterization of camel calf rennet: a comparison with buffalo rennet. J Dairy Res 67: 73–81.

ERDEM, Y.K., 1991. Sütün Rennet ile Pıhtılaşma Süreci. Gıda, 16 (4): 259-263.

FARAH, Z., KAPPELER, S., BRUNTSE, A., and MERTZ, L., 2004. Milk Products. In: farah, z., fischer, a. (eds.), Milk and Meat From The Camel: Handbook on Products and Processing, vdf Hochschulverlag AG, Zurich. pp. 29–50.

FİLİPPOVA, I. Y., and LYSOGORSKAİA, E. N., 2003. Modified Proteinases in Peptide Synthesis in Organic Media. Russ J Bioorganic Chem, 29:544–550.

FLAMM, E. L., 1991. How FDA Approved Chymosin: A Case History. Biotechnol, 9:349–351.

FLÓREZ, A. B., HERNÁNDEZ-BARRANCO, A. M., MARCOS, I., MAYO, B., 2006. Biochemical and Microbiological Characterization of Artisan Kid

Rennet Extracts Used for Cabrales Cheese Manufacture. LWT Food Sci Technol, 39:605–612.
FOLTMANN, B., 1959. Studies on Rennin. II. On the Crystallization, Stability and Proteolytic Activity of Rennin. Acta Chem Scand, 13: 1927–1935.
FOLTMANN, B., 1964. Studies on Rennin. VII. On The Amino Acid Composition of Prorennin, Rennin and of Peptides Liberated During The Activation of Prorennin. Compt Rend Des Trav Du Lab Carl, 34: 275–280.
FOLTMANN, B., 1966. A Review on Prorennin and Rennin. Compt Rend Des Trav Du Lab Carl, 35: 143–231.
FOLTMANN, B., 1970. Prochymosin and Chymosin (Prorennin and Rennin). Methods Enzymol, 19: 421–436.
FOLTMANN, B., 1981b. A developmental Analysis of The Production of Chymosin and Pepsin in Pigs. Comp. Biochem. Physiol., B 68: 9–13.
FOLTMANN, B., 1992. Chymosin: A Short Review on Foetal and Neonatal Gastric Proteases. Scand. Journal Clin. Lab. Invest. 52(S210): 65-79.
FOLTMANN, B., 1993. General and Molecular Aspects of Rennets. In Fox PF. (eds), Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, London: Elsevier, 37–88.
FOLTMANN, B., 1999. General and Molecular Aspects of Rennets. In: Fox PF (ed) Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Aspen Publication Inc, Gaithersburg, pp 37–68.
FOLTMANN, B., and AXELSEN, N. H., 1980. Gastric Proteinases and Their Zymogens. Phylogenetic and Developmental aspects. In: Mildner, P., Ries, B. (Eds.), Enzyme Regulation and Mechanism of Action. Pergamon Press, Oxford, 271–280.
FOLTMANN, B., JENSEN, A. L., LONSLAD, P., SMİDT, E., and AXELSEN, N. H., 1981. A Developmental Analysis of The Production of Chymosin and Pepsin in Pigs. Comp. Biochem. Physiol. 68: 9-13.
FOLTMANN, B., LONBLAD, P., and AXELSEN, N. H., 1978. Demonstration of Chymosin (EC 3.4.23.4) in The Stomach of Newborn Pig. Biochem. Journal 160, 425-427.
FOLTMANN, B., PEDERSEN, V. B., JACOBSEN, H., KAUFFMAN, D., and WYBRANDT, G., 1977. The Complete Amino Acid Sequence of Prochymosin. Proceedings of the National Academy of Sciences, 74(6): 2321-2324.
FOLTMANN, B., PEDERSEN, V. B., KAUFFMAN, D., WYBRANDT, G., 1979. The Primary Structure of Calf Chymosin. J Biol Chem 254: 8447–8456.
FOX, P. F., 1969. Milk-clotting and Proteolytic Activities of Rennet and of Bovine Pepsin and Porcine Pepsin. J. Dairy Res, 36: 427-433.
FOX, P. F., 1999. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 2, Apsen Publication, Inc. Gaithersburg, Maryland, 577 p.
FOX, P. F., 2017. Chymosin, Pepsins and Other Aspartyl Proteinases: Structures, Functions, Catalytic Mechanism and Milk-Clotting Properties. Chemistry, Physics and Microbiology Pages 69-113.
FOX, P. F., and McSWEENEY, P. L. H., 1997. Rennets: Their in Milk Coagulation and Cheese Ripening. Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk (Ed:B.A. Law), Chapman and Hall, London, 1- 40.
FOX, P. F., and MCSWEENEY, P. L. H., 1999. Rennets: Their Role in Milk Coagulation and Cheese Ripening. In: Law BA (ed) Microbiology and

Biochemistry of Cheese and Fermented ilk. Blackie Academic and Professional, London, 1-49.
FOX, P. F., UNİACKE-LOWE, T., MCSWEENEY, P. L. H., and O'MAHONY, J. A., 2015. Chemistry and Biochemistry of Cheese.. Dairy chemistry and biochemistry. Springer International Publishing. Switzerland, Chapter 12.
FUMAMOTO, J., TSURU, D., and YAMAMOTO, T., 1967. A Renin-like Enzyme from Rhizopus Chinensis. Agri. Biol. Chem. 31: 710-717.
GREEN, M. L., FOSTER, P. D. M., 1974. Comparison of The Rate of Proteolysis During Ripening of Cheddar Cheeses Made With Calf Rennet and Swine Pepsin as Coagulants. J. Dairy Res, 41: 269–282.
GUINEE, T. P., and WILKINSON, M. G., 1992. Rennet Coagulation and Coagulants in Cheese Manufacture. International Journal of Dairy Technology, 45(4): 94-104.
GUNASEKARAN, S., and AK, M. M., 2003. Cheese Rheology and Texture, CRC Press, Florida, USA, 437.
GÜRSES, M., ve ÇAKMAKÇI, S., 2009. Şirdenden Geleneksel Olarak Üretilen Sıvı Peynir Mayalarının Bazı Kalite Özellikleri. II. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, Van, 881-884.
HARRİS, T. J., LOWE, P. A., LYONS, A., THOMAS, P. G., EATON, M. A., MİLLİCAN, T. A., PATEL, T. P., BOSE, C. C., CAREY, N. H., DOEL, M. T., 1982. Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of cDNA Coding for Calf Preprochymosin. Nucleic Acids Res, 10: 2177–2187.
HASHEM, M. A., 1999. Optimization of Milk Clotting Enzyme Productivity by Penicillium Oxalicum. Bioresource Technol, 70: 203–207.
HASHEM, M. A., 2000. Purification and Properties of a Milk Clotting Enzyme Produced by *Penicillium oxalicum*. Bioresource Technol, 75: 219–222.
HAYALOĞLU, A. A., GÜVEN, M., and FOX, P. F., 2002. Microbiological, Biochemical and Technological Properties of Turkish White Cheese "Beyaz Peynir". International Dairy Journal, 12(8): 635-648.
HENSCHEL, M., NEWPORT, M.J., and PARMAR, V., 1987. Gastric Proteinases in the Human Infant. Biol. Neonate 52: 268–272.
HİDAKA, M., SASAKİ, K., UOZUMİ, T., and BEPPU, T., 1986. Cloning and Structural Analysis of The Calf Prochymosin Gene. Gene 43: 197–203.
HİLL, R. D., LAHAV, E., and GİVOL, D., 1974. A Rennin-Sensitive Bond in αs1-casein. J. Dairy Res, 41: 147–153.
HOFMANN, T. and SHAW, R., 1964. Proteolytic Enzymes of *Penicillium janthinellum*: I Purification and Properties of a Trypsinogen-activation Enzyme (Peptidase A). Biochim Biphys Acta 92: 543-557.
HORİMOTO, Y., DEE, D. R., YADA, R. Y., 2009. Multifunctional Aspartic Peptidase Prosegments. New Biotechnol 25(5):318–324.
ISSELNANE, S., BOUDJENAH-HAROUN, S., NOUANİ, A., AHMED-ZENNİA, S. S. I., BOUAZZA, B., YABRİR, B., and MATİ, A., 2016. Molecular Characterization of Crude Enzymatic Extract from Algerian Camel Abomasum (*Camelus dromedarius*). Emirates Journal of Food and Agriculture, 28(3): 217-223.
JACOB, M., JAROS, D., and ROHM, H., 2011. Recent Advances in Milk Clotting Enzymes. Int J Dairy Technol 64:14–33.

JENSEN, J. L., MOLGAARD, A., POULSEN, J. C. N., HARBOE, M. K., SİMONSEN, J. B., LORENTSEN, A. M., HJERNO, K., VAN DEN BRİNK, J. M., QVİST, K. B., and LARSEN, S., 2013. Camel and Bovine Chymosin: The Relationship Between Their Structures and Cheese-Making Properties. Acta Crystallogr, 69: 901–913.

JENSEN, T., AXELSEN, N. H., and FOLTMANN, B., 1982. Isolation and Partial Characterization of Prochymosin and Chymosin from Cat. Biochim Biophys Acta, 705:249–256.

JOHNSON, M.E., LUCEY, J.A., 2006. Major technological advances and trends in cheese. J Dairy Sci 89:1174–1178.

KAGEYAMA, T., 1995. Procathepsin E and Cathepsin E. Methods in Enzymology 248: 120-136.

KAGEYAMA, T., 2000. New World Monkey Pepsinogens A and C, and Prochymosins. Purification, Characterization and Enzymatic Properties, cDNA Cloning, and Molecular Evolution. J. Biochem. 127: 761–770.

KAGEYAMA, T., ICHİNOSE, M., TSUKADA-KATO, S., OMATA, M., NARİTA, Y., MORİYAMA, A., and YONEZAWA, S., 2000. Molecular Cloning of Neonatal İnfant-Specific Pepsinogens from Rat Mucosa and Expressional Change During Development. Biochem. Biophys. Res Commun, 267:806–812.

KANLAYAKRİT, W., and MAWEANG, M., 2006. Production of Seasoning "Mirin" from Thai Rice by Fermentation. Kasetsart J, 40:39–46.

KAPPELER, S. R., FARAH, Z., VAN DEN BRİNK, H. M., RAHBECK-NİELSEN, H., and BUDTZ, P., 2007. Method of Producing Non-Bovine Chymosin and Use Hereof. US Patent Application US, 07:270-989.

KAPPELER, S. R., VAN DEN BRİNK, H. M., RAHBECK-NİELSEN, H., FARAH, Z., PUHAN, Z., BECH-HANSEN, E., and JOHANSEN, E., 2006. Characterization of Recombinant Camel Chymosin Reveals Superior Properties for The Coagulation of Bovine and Camel Milk. Biochem Biophys Res Commun, 342:647–654.

KAWAGUCHİ, T., YANAGİDA, N., UOZUMİ, T., and BEPPU, T., 1986. Improved Direct Expression of Prochymosin cDNA Through Changing The SD-ATG Codon Length. Agric Biol Chem, 50: 499–500.

KAWAGUCHİ, Y., KOSUGİ, S., SASAKİ, K., UOZUMİ, T., and BEPPU, T., 1987. Production of Chymosin in *Escherichia coli* Cells nnd Its Enzymatic Properties. Agric. Biol. Chem, 51: 1871-1877.

KAY, J., 1985. Aspartic Proteinases and Their Inhibitors. Biochem Soc Trans, 13:1027-1029.

KLEİNERT, T. H., LANGE, I., RÖSİCKE, B., HONİG, A., and SCHLEUSENER, R. 1988. Characterization and Preparation of Chymosin from Calf Rennet Samples by Means of Isoelectric Focusing. Engineering in Life Sciences, 8(4):367-375.

KOAZE, Y., GOİ, H., EZAWA, K., YAMADA, Y., and HARA, T., 1964. Fungal Proteolytic Enzymes. Part 1. Isolation of Two Kinds of Acid-Proteases Excreted by *Aspergillus niger var. macrosporus*. Agri Biol Chem, 28-216.

KOÇAK, C., 1979. Türkiyede Kullanılan Sıvı Şirden Mayalarının Değişik Saklama Koşullarında Dayanıklılığı Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Ankara.

KUMAR, A., SHARMA, J., GROVER, S., MOHANTY, A. K. and BATİSH, V. K. 2007. Molecular Cloning and Expression of Goat (*Capra hircus*) Prochymosin in *E. coli*. Food Biotechnol 21: 57–69.

KUMAR, A., SHARMA, J., MOHANTY, A. K., GROVER, S. and BATİSH, V. K. 2006. Purification and Characterization of Milk Clotting Enzyme from Goat (*Capra hircus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 145(1): 108-113.

KUMAR, D., BHALLA, T. C., 2005. Microbial Proteases in Peptide Synthesis: Approaches and Applications. Appl Microbiol Biotechnol, 68:726–736.

LAEMMLI, U. K.,1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. nature, 227(5259): 680.

LİN, X., and TANG, J., 1990. Purification, Characterization and Gene Cloning of Thermopepsin, a Thermostable Acid Protease from Sulfolobus Acidocaldarius. Journal Biol. Chem. 265:1490-1495.

LUFRANO, D., FARO, R., CASTANHEİRA, P., PARİSİ, G., VERÍSSİMO, P., VAİRO-CAVALLİ, S., SİMÕES, I., and FARO, C., 2012. Molecular Cloning and Characterization of Procirsin, an Active Aspartic Protease Precursor from Cirsium vulgare (Asteraceae). Phytochem 81:7–18

MACKAY, V. L., WELCH, S. K., INSLEY, M. Y., MANNEY, T. R., HOLLY, J., SAARİ, G. C. and PARKER, M. L., 1988. The *Saccharomyces cerevisiae* BAR1 Gene Encodes an Exported Protein with Homology to Pepsin. Proc Natl Acad Sci USA, 85: 55-59.

MALAK, C. A., ABOU, E. L., ADAB, I. F., VUKASHİNOVİC, V., ZALUNİN, I. A., TİMOKHİNA, E. A., LAVRENOVA, G. I., STEPANOV, V. M., 1996. Buffalo (*Bos buffali L*) Chymosin Purification and Properties. Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol, 113: 57–62.

MALPRESS, F. H., 1967. Rennin and Gastric Secretion of Normal Infants. Nature 215: 855–857.

MARCOS, A., ESTEBAN, M. A., LEON, F., and FERNANDEZ-SALGUERO, J., 1979. Electrophoretic Patterns of European Cheeses: Comparison and Quantitation. Journal of Dairy Science, 62(6):892–900.

MARTİN, P., CEBO, C., and MİRANDA, G., 2013. Interspecies Comparison of Milk Proteins: Quantitative Variability And Molecular Diversity. In: McSweeney, P. L. H., Fox, P. F. (Eds.), Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1A, Proteins: Basic Aspects. fourth ed. Springer, New York, 387–429.

MARTİN, P., TRİEU-CUOT, P., COLLİN, J. C. and RİBADEAU D. B., 1982. Purification and Characterization of Bovine Gastricsin. Eur J Biochem, 122: 31–39.

MCSWEENEY, P. L. H., and O'MAHONY, J. A., 2015. Advanced Dairy Chemistry, Proteins: Applied Aspects. Springer, New York, Vol 1B

MCSWEENEY, P. L. H., OLSON, N. F., FOX, P. F., and HEALY, A., 1994. Proteolysis of Bovine αs2-casein by Chymosin. Z. Lebensm. Unters Forsch, 119: 429–432.

MCSWEENEY, P. L. H., OLSON, N. F., FOX, P. F., HEALY, A., and HØJRUP, P., 1993. Proteolytic Specificity of Chymosin on Bovine αs1-casein. J. Dairy Res, 60: 401–412.

MELLOR, J., DOBSON, M. J., ROBERTS, N. A., TUİTE, M. F., EMTAGE, J. S., WHİTE, S., LOWE, P. A., PATEL, T., KİNGSMAN, A. J., and KİNGSMAN,

S.M., 1983. Efficient Synthesis of Enzymatically Active Calf Chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 24:1–14.

MERCİER, J. C., CHOBERT, J. M., and ADDEO, F., 1976. Comparative Study of The Amino Acid Sequences of the Caseinomacropeptides from Seven Species. FEBS Lett. 72: 208–214.

METİN, M., 1996. Süt Teknolojisi. I Bölüm. Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları No: 33: 623.

MEZINA, M. N., LAVRENOVA, G. I., PROKOF'EV, M. I., STAROVOITOVA, V. V., ERMOLAEV, V. I., CHERNYH, V. Y., and DEMIDOVICH, S. S., 2001. Isolation of Milk-Clotting Enzyme from Transgenic Sheep Milk and Its Comparison with Calf Chymosin. Biochemistry (Moscow), 66(4):378-383.

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): 205-217.

MOHANTY, A. K., MUKHOPADHYAY, U. K., KAUSHİK, J. K., GROVER, S., and BATİSH, V. K., 2003. Isolation, Purification and Characterization of Chymosin from Riverine Buffalo (Bubalos Bubalis). J. Dairy Res, 70: 37–43.

MOHANTY, AK., MUKHOPADHYAY, U.K., KAUSHİK, J.K., GROVER, S., BATİSH, V.K., 2003. Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (Bubalos bubalis). J Dairy Res 70: 37–43.

MOİR, D., MAO, J., SCHUMM, J. W., VOVİS, G. F., ALFORD, B. L., and TAUNTON-RİGBY, A., 1982. Molecular Cloning and Characterization of Double-stranded cDNA Coding for Bovine Chymosin. Gene 19: 127–138.

MORRİS, P. C., MİLLER, R. C. and BOWLES, D. J., 1985. Endopeptidase Activity in Dry Harvestripe Wheat and Barley Grains. Plant Science 39: 121-124.

MOSCHOPOULOU, E., KANDARAKİS, I., and ANİFANTAKİS, E., 2007. Characteristics of Lamb and Kid Artisanal Liquid Rennet Used for Traditional Feta Cheese Manufacture. Small Ruminant Research, 72: 237–241.

MOSCHOPOULOU, E. E., KANDARAKIS, I. G., ALICHANIDIS, E. and ANIFANTAKIS, E. M., 2006. Purification and Characterization of Chymosin and Pepsin from Kid. J Dairy Res, 73: 49-57.

MULVİHİLL, D. M., and FOX, P. F., 1977. Proteolysis of αs1-Casein by Chymosin: Influence of pH and Urea. J. Dairy Res, 44: 533–540.

MULVİHİLL, D. M., and FOX, P. F., 1979a. Proteolytic Specificity of Chymosin on Bovine αs1-Casein. J. Dairy Res, 46: 641–651.

NAKAYAMA, T., 1965. A Method of Cheese Manufacture Using *Bacillus coagulans*. Jap Pat: 6387.

NİELSEN, P. H., MALMOS, H., DAMHUS, T., DİDERİCHSEN, B., NİELSEN, H. K., SİMONSEN, M., SCHİFF, H. E., OESTERGAARD, A., OLSEN, H. S., EİGTVED, P., and NİELSEN, T. K., 1994. Enzyme Applications (industrial). In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, vol. 9, 4th edn. Wiley, New York, 567–620.

NURLIYANI, N., INDRATININGSIH, I., and MUFTITRI, M., 2013. Qualıty of Rennet from Rabbıt Stomach Durıng Cold and Frozen Storage. 3rd International Seminar and 9th Biennial Meeting of AINI 24-25, Padang, 304-310

OKİGBO, L. M., RİCHARDSON, G. H., BROWN, R. J. and ERNSTROM, C. A., 1985a. Efect of pH, Calcium Chloride, and Chymosin Concentration on

Coagulation Properties of Abnormal and Normal Milk. Journal Dairy Sci, 68: 2527-2533.

OKİGBO, L. M., RİCHARDSON, G. H., BROWN, R. J. and ERNSTROM, C. A., 1985b. Interaction of Calcium, pH, Temperature and Chymosin During Milk Coagulation. Journal Dairy Sci, 68: 3135-3142.

OSTOSLAVSKAYA, V. I., REVİNA, L. P., KOTLOVA, I. A., LEVİN, E. D., TİMOKHİNA, E. A. and STEPANOV, V. M., 1986. Bioorg Khim, 8: 1030-1047.

PALMER, D. S., CHRİSTENSEN, A. U., SØRENSEN, J., CELİK, L., QVİST, K. B., and SCHİØTT, B., 2010. Bovine Chymosin: A Computational Study of Recognition and Binding of Bovine k-Casein. Biochemistry 49: 2563–2573.

PEDERSEN, V. B., CHRİSTENSEN, K.A., and FOLTMANN, B., 1979. Investigations on the Activation of Bovine Prochymosin. Eur J Biochem, 94: 573–580.

PHELAN, M., AHERNE, A., FİTZGERALD, R. J., O'BRİEN, N. M., 2009. Casein-derived Bioactive Peptides: Biological Effects, İndustrial Uses, Safety Aspects and Regulatory Status. Int Dairy J, 19:643–654.

PİTTS, J. E., 1992. Crystallization by Centrifugation. Nature 355: 117.

POLANOWSKİ, A., WİLUSZ, T., KOLACZKOWSKA, M. K., WİECZOREK, M. and WİLİMOWSKA-PELC, A., 1985. Purification and Characterisation of Aspartic Proteinases from *Cucumis sativus* and *Cucurbita maxima* Seeds. In Aspartic Proteinases and Their Inhibitors ed. V. Kostka. Walter de Gruyter & Co., Berlin, 49-52.

PONTUAL, E. V., CARVALHO, B. E. A., BEZERRA, R. S., COELHO, L. C. B. B., NAPOLEÃO, T. H., PAİVA, P. M. G., 2012. Caseinolytic and Milk-Clotting Activities from Moringa Oleifera Flowers. Food Chem, 135:1848–1854.

PUHAN, Z., 1969. Protease Composition of a Rennet Substitute from *Bacillus subtilis* and Properties of Its Component Proteases. J Dairy Sci, 52: 1372–1378.

PYNE, G. T., 1955. The Chemistry of Casein: A Review of the Literature. Dairy Sci. Abstr, 17:532-553.

RAMPİLİ, M., LARSEN, R., and HARBOE, M., 2005. Natural Heterogeneity of Chymosin and Pepsin in Extracts of Bovine Stomachs. Int. Dairy J, 15.

RAO, S., 1984. Extraction and Purification of Chymosin from Buffalo Calves. Ph.D. Thesis. National Dairy Research Institute, Karnal, India.

RAO, S., and DUTTA, S.M., 1981. Extraction of Rennet from Abomasum of Suckling Buffalo Calves. Ind J Dairy Sci, 34 (2): 235–237.

RAPOSO, S., and DOMİNGOS, A., 2008. Purification and Characterization Milk-Clotting Aspartic Proteinases from Centaurea Calcitrapa Cell Suspension Cultures. Process Biochem, 43:139–144.

RIGHETTI, P. G., MOLINARI, B. M. and MOLINARI, G., 1977. Isoelectric Focusing of Milk-clotting Enzymes. J Dairy Res, 44: 69–72.

ROGELJ, I., PERKO, B., FRANCKY, A., PENCA, V., and PUNGERCAR, J., 2001. Recombinant Lamb Chymosin as an Alternative Coagulating Enzyme in Cheese Production. J Dairy Sci, 84: 1020–1026.

SARDİNAS, J. L., 1968. Rennin Enzymes of *Endothia parasitica*. Appl Microbio, 16: 248-253.

SHAMSUZZAMAN, K., and HAARD, N. F., 1984. Purification and Characterization of a Chymosin-like Protease from the Gastric Mucosa of Harp Seal (*Pagophilus groenlandicus*). Can J. Biochem, Cell Biol, 62: 699–708.

SHİEH, C. J., THİ, L. A. P., SHİH, I. L., 2009. Milk-Clotting Enzymes Produced by Culture of *Bacillus subtilis* Natto. Biochemical Engineering Journal, 43: 85–91.

SHİNDO, K., and ARİMA, S., 1979. Studies on the Immobilized Chymosin Part Ⅱ: Preparation and Properties of Immobilized Chymosin by DEAE-Sephadex A-25, Amberlite IR-45, Controlled Pore Glass (CPG-10) and Polyacrylamide Gel. Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University, 59(3): 284-293.

SİDRACH, L., GARCÍA-CÁNOVAS, F., TUDELA, J., and RODRÍGUEZ-LÓPEZ, N.J., 2005. Purification of Cynarases from Artichoke (*Cynara scolymus L.*): Enzymatic Properties of Cynarase A. Phytochem, 66:41–49.

STEİNER, D. F., QUİNN, P. S., CHAN, S. J., MARSH, J., and TAGER, H. S., 1980. Processing Mechanisms in the Biosynthesis of Proteins. Ann N Y Acad Sci, 343: 1–16.

STERNBERG, M. Z., 1971. Crystalline Milk-Clotting Protease from *Mucor miehei* and Some of Its Properties. Journal Dairy Sci, 54: 159-167.

SUN, D. Q., JİANG, Y. J., HAN, X. Y., QU, Y. Y., Bİ, Y. H., ZHANG, G. H., 2008. Cloning and Phylogenetic Analysis of Bovine Prochymosin Gene. Yi Chuan, 30: 863–869.

SZECSİ, P.B., 1992. The Aspartic Proteases. Scand J Clin Lab Invest, 210:5–22.

ŞAHAN, N., ve KONAR, A., 1990. Peynir Üretiminde Sütü Pıhtılaştırmada Kullanılan Proteolitik Enzimler. Ç.Ü.Z.F. Dergisi, 5(4): 129-140.

TANG, J., SEPULVEDA, P., MARCİNİSZYN, J., CHEN, K. C. S., HUANG, W. Y., TAO, N., LİU, D., and LANİER, J. P., 1973. Amino-Acid Sequence of Porcine Pepsin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3437±3439.

TEKİNŞEN, K. K., UÇAR, G., ve KÖSEOĞLU, İ. E., 2006. Hayvansal Peynir Mayalarının Bazı Kalite Nitelikleri. Avrasya Veteriner Bilimleri Dergisi, 4: 69-73.

THANİKAİVELAN, P., RAO, J. R., NAİR, B. U., and RAMASAMİ, T., 2004. Progress and Recent Trends in Biotechnological Methods for Leather Processing. Trends Biotechnol, 22(4):181–188.

TRUJİLLO, A. J., GUAMİS, B., LAENCİNA, J., and LÓPEZ, M. B., 2000. Proteolytic Activities of Some Milk Clotting Enzymes on Ovine Casein. Food Chem, 71. 449–457.

TS 3844 PEYNİR MAYASI STANDARDI, 1996. Türk Standartları Enstitüsü, Necati Bey Cad. No: 112, Bakanlıklar, Ankara.

TÜİK., 2017. www.tuik.gov.tr. Süt Ve Süt Ürünleri Üretim Miktarı ve Değişim Oranları.

URAZ, T., 1976. Türkiye Peynirciliğinde Kullanılan Mayalar ve Bunların Elde Edildiği Şirdenler Üzerinde Araştırmalar. (Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 625s.

ÜÇÜNCÜ, M., 2015. Süt ve Mamulleri Teknolojisi. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi. 192s

ÜÇÜNCÜ, M., 2013. Süt ve Mamülleri Teknolojisi. Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir. S.1-28.

VAİRO-CAVALLİ, S., CLAVER, S., PRİOLO, N., and NATALUCCİ, C., 2005. Extraction and Partial Characterization of a Coagulant Preparation from *Silybum marianum* Flowers. Its action on bovine caseinate. J Dairy Res, 72(3):271–275.

VALLEJO, J. A., AGEİTOS, J. M., POZA, M., and VİLLA, T. G., 2008. Cloning and Expression of Buffalo Active Chymosin in *Pichia pastoris*. J Agric Food Chem, 56:10606–10610.

VALLEJO, J. A., AGEİTOS, J. M., POZA, M., and VİLLA, T. G., 2012. A comparative Analysis of Recombinant Chymosins. J Dairy Sci, 95(2):609–613.

VALLES, E., and MOCQUOT, G., 1972. Technique of Rennet Preparation Used in the Traditional Manufacture of Gruyerede Comte and Emmental Cheeses. Lait, 52:259-282.

VİSSER, S., and SLANGEN, K. J., 1977. On the Specificity of Chymosin (rennin) in Its Action on Bovine β-casein. Neth. Milk Dairy J, 31: 16–30.

VİSSER, S., VAN ROOİJEN, P. J., SCHATTENKERK, C., KERLİNG, K. E. T., 1977. Peptide Substrates for Chymosin (rennin). Kinetic Studies with Bovine k-Casein (103–108)-Hexapeptide Analogues. Biochim. Biophys. Acta, 481: 171-176.

WANGOH, J., FARAH, Z., and PUHAN, Z., 1993. Extraction of Camel Rennet and Its Comparison with Calf Rennet Extract. Milchwissenschaft, 48: 322-325.

WANGOH, J., FARAH, Z., PUHAN, Z., 1993. Extraction of camel rennet and its comparison with calf rennet extract. Milchwissenschaft 48, 322–325.

YAMADA, T. and OGRYDZİAK, D. M., 1983. Extracellular Acid Proteases Produced by *Saccharomycopsis lipolytica*. Journal Bacteriology, 154: 23-31.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Demet EKTİREN
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi: DERİK 01/12/1993
Telefon : 05075785151
e-mail : demetektiren@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İl, İlçe	Bitirme Yılı
Lise	Derik Lisesi, Mardin, Derik	2011
Üniversite	Harran Üniversitesi, Şanlıurfa	2016
Yüksek Lisans	Harran Üniversitesi, Şanlıurfa	2019

EKLER

EK 1 BSA Protein Standardı

