

## PEYNİR YAPIMINDA KULLANILAN SÜT PIHTILAŞTIRICI ENZİMLER VE BUNLARIN BAZI ÖZELLİKLERİ

### MILK-CLOTTING ENZYMES USED IN CHEESEMAKING AND THEIR PROPERTIES

Nihat AKIN

S.Ü.Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü. Konya

**ÖZET:** Peynir üretiminde büyük bir artışa karşın hayvansal kaynaklı peynir mayası üretiminde aynı miktarda bir artış sağlanamamıştır. Bu durum araştırmacıları mikrobiyel ve bitkisel kaynaklı peynir mayası geliştirme ve bunların kullanımı konusunda yoğun çalışmaya yöneltmiştir. Bu çalışmada farklı kaynaklardan üretilip kullanılan peynir mayalarına ait üretim metodları ve peynircilikte kullanımı ile ilgili karşılaştırmalı çalışmalar özetlenmiştir.

**ABSTRACT:** Declining calf slaughter has resulted in a world-wide shortages of stomach as a raw material for rennet production. These factors contribute of the world-wide research for animal rennet substitutes of microbial or plant origin. In this study, some work of rennet from different origin have been reviewed the commercial importance, recent technical developments and future of the major coagulating enzymes in cheesemaking.

#### GİRİŞ

Peynir mayaları sütü pıhtılaştırıcı bitkisel, hayvansal ve mikrobiyel kaynaklı asit proteazlardır. Optimum aktiviteleri pH 2-5 arasında değişmektedir. "Fransız eczacı Deschamps (1840) ilk defa Yunanca kelime olan gastrik sıvısı "cymos" dan cymosini türetmiş ve kullanmıştır. Bundan 50 yıl sonrada Lea ve DICKINSON (1890) tarafından peynir rennetinden türetilmiş olan rennin ismini cymosinle aynı anlamda kullanmıştır" (FOLTMAN, 1971). Cymosin kelimesi Avrupa literatürlerinde uzun yıllar kullanılmıştır. Fakat İngilizce yayımlanan literatürlerde fazla kabul görmemiştir. 1961 yılında, enzim komisyonu tarafından cymosin olarak bilinen enzime rennin isminin verilmesi olarak kabul edilmiştir (ANON, 1984).

Peynir mayası sağlamadaki güçlüklerle karşılık peynir üretiminde her yıl önemli artışlar gözlenmektedir. Bundan dolayı peynir mayasına, pıhtılaştırma yeteneği ve üretim maliyetleri düşük olan diğer bazı (pepsin gibi) pıhtılaştırıcı enzimler ilave edilmektedir. Dünya peynir üretimindeki artışa paralel olarak buzağı renneti üretiminde yeterli artış olmamıştır. Bunun sebebi, son yıllarda teknolojik gelişmelerden dolayı buzağı kesimi azalmış, bunun sonucu buzağı rennetinin temininde güçlüklerle karşılaşmıştır. Bütün bunların sonucu olarak, araştırmacılar mikrobiyel veya bitkisel kaynaklı rennet üretimi için yoğun araştırmalar yapmaya yönelmiştir. Son 20-30 yıllık dönemde genetik mühendisliğindeki çok önemli gelişmelerin etkisi ile mikrobiyel kaynaklı peynir mayası üretiminde önemli gelişmeler sağlanmıştır. Bu gelişmelerin sonucu olarak peynir mayası sıkıntısı büyük ölçüde giderilmiştir. Bu makalede bu konularda yapılan çalışmaların bazıları özetlenmiştir.

#### Peynir mayası olarak kullanılan süt pıhtılaştırıcılarının temel üretim kaynakları

##### A) Bitkisel kaynaklı süt pıhtılaştırıcıları

Bitkisel kaynaklı proteolitik enzimlerin çoğu sütü pıhtılaştırabilmektedir. Bu enzimler her zaman bitkilerin muhtelif kısımlarında bulunabilirler. Örneğin; sap, yaprak çiçek, tohum, kök ve meyveler. Bitkisel kaynaklı proteolitik enzimlerle ilgili olarak bazı çalışmalar yapılmıştır (GREENBERG, 1955; DEWANE, 1960; BABBAR ve ark., 1965; SARDINAS, 1969; BURNETT 1976). Bu çalışmaların bir çoğunda 20 civarında bitki türünde proteolitik enzime rastlandığı ve bu konuda daha çok çalışmanın gerektiği vurgulanmıştır. Bu bitkilerden çok popüler olan bazılarının biyolojik adları şu şekilde özetlenebilir. -*Carica papaya*, *Cucurbita pepo*, *Ananas comosus*, *Asclepias*, *Colotropis procera*, *Benincase cerifera*, *Cyanera cordunculus*, *Ficus carica*, *Glicina max*:

WALTI (1983), ilk defa incir sütünden "Ficin" denilen proteolitik enzimi kristalize ederek peynir yapımında kullanmıştır. Daha sonraki yıllarda inançlarından dolayı buzağı renentini kullanmayan Hindistanlı Budistler bitkisel kaynaklı pıhtılaştırıcılar kullanmışlar ve bunlar üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Ancak, bitkisel kaynaklı proteolitik enzimlerin proteolitik aktivitelerinin fazla olmasından dolayı bazı tip peynirlerin yapımına uygun olmadığı belirtilmiştir (GREEN, 1977). Buna rağmen bazı ülkelerde geleneksel olarak bazı geleneksel peynirlerin üretilmesinde bu enzimler kullanılmaktadır. Örneğin Portekizde *Cyonara cardunculus* (carda)'un çiçeğinden elde edilen bir proteolitik pıhtılaştırıcı koyun sütünden yapılan "serra" peynirinin yapımında yıllardan beri geleneksel olarak kullanılmaktadır. VIEIRA de SA ve BARBOSA (1972) bitkisel kaynaklı pıhtılaştırıcı kullanarak Roquofort ve Edam peynirleri üzerine çalışmalar yapmışlar ve sonuçta Roquofort peyniri yapımında *Cyonara cardunculus*'un çiçeğinden elde edilen bir proteolitik pıhtılaştırıcının kullanılabileceğini, ancak Edam peyniri üretimi için fazla proteolitik aktiviteden dolayı peynir kalitesinin düşük olduğunu belirtmişlerdir.

ESKIN ve LANDMAN (1975) *Benincase cerifera* (kül kabağı) denilen bitkiden elde edilen proteolitik süt pıhtılaştırıcısının bazı karakteristik özelliklerini araştırmışlardır. Sonuçta bitkiden elde edilen proteolitik süt pıhtılaştırıcı enzimin proteolitik aktivitesinin buzağı rennininden fazla olduğunu gözlemişlerdir. Ancak, yine de bu enzimi Cheddar peyniri yapımında kullanarak peynir yapılabileceğini göstermişlerdir. Fakat bu peynirin yapım aşamalarında bazı değişikliklerin yapılmasının gerekliliğine işaret etmişlerdir. GUPTA ve ESKIN (1977), aynı bitkiden sağlanan proteolitik enzimi kullanarak Cheddar peynirinin olgunlaşma süresi ile ilgili benzer bir çalışmada olgunlaşma süresinin çok kısa olduğunu belirtmişlerdir.

Bazı Afrika ülkelerinde geleneksel peynir üretiminde Sodam elması (*Caloropsis procera*) adlı bir bitkinin yapraklarından üretilen özsu kullanılmaktadır (OGUNDIWIN ve OKE, 1983, AWORTH ve NAKAI, 1986). Bu bitkinin yapraklarından sağlanan özsu ile ilgili olarak AWORTH ve Muller (1987) detaylı bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada buzağı renneti ve adı geçen bitkinin özsu kullanılarak peynir üretilmiş ve bu peynirlerin bazı özellikleri karşılaştırılmıştır. Ancak, denemelerde kullanılan üretim aşamalarında bazı küçük değişiklikler (pH ve pişirme sıcaklıkları gibi) yapılmıştır. Sonuçlar özet olarak, bitkisel kaynaklı pıhtılaştırıcı kullanarak üretilen peynirlerde, proteolitik aktivitenin yükseğe olmasına rağmen peynir altı suyundaki serbest azot oranı düşük çıkmıştır. Ayrıca buzağı rennetine nazaran bitkisel kaynaklı pıhtılaştırıcı kullanarak üretilen peynirler daha sert ve kaynaşma oranı daha az olduğu ve sakımsı bir yapının bulunduğu belirtilmiştir. Peynirin yapısındaki bu farklılıklara rağmen bu bitkiden elde edilen pıhtılaştırıcı öz suyun önemli bir potansiyel oluşturduğu da ayrıca vurgulanmıştır.

*Cucurbita pepo*'dan (helvacı kabağı) üretilen proteolitik enzimin peynir üretiminde kullanılabileceği belirtilmiştir (BERKOWITZ-HUNDERT ve ark., 1965). Günümüze kadar, bitkilerden üretilip ticari olarak piyasada yaygın olarak satılan bir peynir pıhtılaştırıcısına rastlanmamıştır. Ancak, bunun üretilip satılmaması için hiç bir kesin nedenin olmadığı belirtilmektedir (ESKIN ve LANDMAN 1975).

## B) Hayvansal kaynaklı süt pıhtılaştırıcıları

Hayvansal kaynaklı peynir mayası kimozen veya rennin enzimi peynir yapımında kullanımını uzun zamandan beri bilinmekte ve süt emmekte olan buzağı, koyun veya keçi yavrularının dördüncü midesi olan şirdenden elde edilmektedir. Süt emmekte olan buzağılardan üretilen buzağı renneti % 70-95 rennin enzimi ve % 5-30 pepsin enzimi içerebilir. Eğer bu yavru hayvanlar süttten başka gıdalarla beslenmeye başlarsa pepsin enzimi oranında artış olmakta (BERRIDGE, 1954) ve gelişmiş buzağılardan sağlanan rennetler %90-70 pepsin ve % 10-30 rennin enzimi içerir (PEPLER ve REED, 1986). Bunlara ilave olarak diğer bazı hayvanların midelerinde rennin enzimi bulunabilir, örneğin domuz, manda, tavuk ve tavşan (DEWANE, 1960; ALAIS ve ark., 1968). Bazı hayvanlarda rennin enzimine ilave olarak birçok hayvansal proteaz mevcuttur. Bunlar kimotripsin, gastrisin, pepsin ve tripsindir. Trypsin ve kimotripsinle yapılan çalışmalardan iyi sonuçlar alınmadığından bunlarla ilgili olarak bu amaç için çalışmalara rastlanmamıştır. Peynir yapımı için daha uygun olduğu düşünülen pepsinle ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır (DEWANE, 1960; ALAIS ve ark., 1968).

### a. Rennin

Buzağı kaynaklı peynir mayası birçok çeşit peynirin yapılmasında geleneksel olarak kullanılan bir süt pıhtılaştırıcı olup, çoğunlukla rennin enzimi içerir. Rennin protein yapısında bir proteolitik enzimdir. Molekül ağırlığı yaklaşık 30000 dir. Kazeini hidrolize eder (endopeptidaz olarak). Kazeinin hidrolizasyonunda farklı aşamalarda farklı aktivite gösterirler. Koagülasyon fazı esnasında misellerin destabilizasyonuna öncülük eden k-kazein üzerinde yüksek aktivite ve olgunlaşma esnasında ortamda yeralan farklı kazein fraksiyonları üzerinde düşük proteolitik aktivite gösterir. Ham peynir mayasının hazırlanması için kurutulmuş şirdenin içerdiği rennin enzimi % 5-10'luk NaCl çözeltisine geçirilmesi gerekmektedir. Bunun için uygun şartlarda temizlenip kurutulan (kurutma tuzlanarak veya dondurularak yapılabilir) şirdenler küçük parçalara kesilerek tuz çözeltisi içinde bir süre maserasyon işlemine tabi tutulur. Bu esnada ortamın pH'sı 5,0-5,8'e ayarlanır. Çünkü bu pH aralığında enzim stabilitesini korumak için en uygun olduğu bildirilmiştir (FOLTMAN, 1970; RICHARDSON, 1975). Bu işlemin amacı prokimozin aktivasyonuna yardımcı olmaktır. Maserasyon işleminden sonra oluşan enzimli çözelti temizlenir. Temizlik işleminde santrifuj veya filtre kullanılabilir. Filtrasyon ile hem ortamdaki partiküller ayrılır hemde bakteri popülasyonunda azalma sağlanabilir. Son olarak maya kuvveti, pH ve NaCl konsantrasyonu standardize edilir ve bunlarla birlikte ortama uygun olan koruyucular ve renklendiriciler ilave edilir.

Peynir sanayiinde rennet, süt emmekte olan buzağuların dördüncü midesi olan şirdenden elde edilen enzim ekstraktı anlamındadır ve peynirüretimi için sütün koagülasyonunda kullanılır. İçerisinde "chymosin" veya aynı anlamda kullanılan rennin enzimi vardır. Çoğunlukla herhangi bir süt pıhtılaştırıcı enzim preparatına rennet denilmesi uygun görülmektedir. Bu enzimler bazende bunların üretim kaynaklarının ismi ile adlandırılmaktadır. Örneğin buzağı renneti, mikrobiyel rennet gibi, piyasada ticari olarak satılan peynir mayaları genellikle sıvı preparatlar olup bunların maya kuvvetleri çok değişik gösterebilir. Buzağı rennini sınırlı proteolitik aktivite göstererek yüksek oranda kazeini koagüle etme özelliği gösterir. Eğer proteolitik aktivite fazla olursa, ürün miktarında azalmaya ve bazı acı tad oluşturan peptidlerin birikmesine sebep olabilirler (EMSTROM, 1972; FOX, 1971; FOX, 1981; GREEN, 1984).

### b. Pepsin

Pepsin bir asit proteazdır. Optimum pH 2,0 civarındadır. İzoelektrik pH 1.08'in altında ve molekül ağırlığı yaklaşık 34000'dir. Pepsin enziminin aktivitesi alkali veya nötr çözeltilerde hızla kaybolur ve ortamın asitliği pH 6,0'nın altındaki değerlerde aktivite önemli ölçüde sabit kalabilir (TANG, 1970). Bazı yönlerden pepsin, buzağı rennine benzemekle beraber, peynir yapımında buzağı renninine yerine yüzde yüz olarak kullanımı sınırlıdır (EMMONSON ve ark., 1971). FOX, (1969) pepsinler üzerine yaptığı çalışmada sığırlardan üretilen pepsinin domuzlardan üretilenlere nazaran daha üstün özelliklere sahip olduğunu vurgulamıştır. Sığır pepsini ile ilgili çalışmalar KESSEL ve MELTNER (1970) tarafından yapılmıştır. Pepsinin rennine nazaran dezavantajları şöyle özetlenebilir. Sütü pıhtılaştırma zamanı uzundur, pıhtı sert değildir, peynir suyu ile kayıplar fazladır, peynirde tat kusurları olabilir ve pepsin bazı tip (İsviçre tipi peynir) peynirlerin üretimi için uygun değildir. Ancak ticari olarak pepsin ve buzağı renninin karışımı peynir mayası olarak kullanılmaktadır (REIMERDER, 1990). Tavuklardan sağlanan süt pıhtılaştırıcı enzim 1970 yılından beri İsrail'de üretilmekte ve bu ülkenin kanunlarına göre peynir üretimi için uygun görülmektedir (GUTFELD ve ROSENFELD 1975). ancak, GREEN ve ark. (1984)'de yaptıkları çalışmada tavuk pepsininin Cheddar peyniri yapımı için uygun olmadığını belirtmişlerdir. Çünkü, tavuk pepsini rennine nazaran daha proteolitik ve daha az ısıya dayanıklı olduğu belirtilmiştir (GORDIN ve ROSENTHAL, 1978).

### C. Mikrobiyal kaynaklı süt pıhtılaştırıcıları

Peynir yapımında mikrobiyel kaynaklı pıhtılaştırıcı enzim içeren peynir mayası, hayvansal kaynaklı süt pıhtılaştırıcısı yerine kullanımı uzun zamandan beri devam etmektedir (SARDINAS, 1972; MEYRATH, 1975; STERNBERG, 1976; VISSER 1981; WARD, 1983; OUTTRUP ve BOYCE, 1990). Ancak, bu proteolitik enzimlerin kullanımı ilk yıllarda peynirlerde erime, acı tad oluşumu gibi bir takım problemler

oluşmasına sebep olmuştur. Bununla ilgili olarak çalışmalar devam etmiş ve 1960 yılının sonlarına doğru bu mikrobiyel enzimlerden fungal kaynaklı proteolitik enzimlerin kullanımının daha uygun olduğu belirlenmiş ve bu enzimin kullanımı ve üretimi yaygınlaşmaya başlamıştır (AUNSTRUP, 1980).

Dünyada kullanılan mikrobiyel kaynaklı enzimlerin çoğu *Endothia parasitica*, *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* var. Lindt. gibi mikroorganizmalar kullanılarak üretilmektedir. Ticari olarak üretilip satılan mikrobiyel kaynaklı süt pıhtılaştırıcı enzimlere ait bazı bilgiler değişik kaynaklarda özet olarak verilmiştir (SARDINAS, 1972; STERNBERG, 1976). Mikrobiyel kaynaklı enzimlerin değişik özellikleri ile ilgili olarak literatür özeti şeklinde çeşitli bilimsel makalalar ve patentlerde açıklamalar yapılmıştır (ARIMA ve IWASAKI, 1964; SARDINAS, 1966; AUNSTRUP, 1968, WHITAKER, 1971; GREEN 1977; FELDMAN, 1979; AUNSTRUP 1979a,b; FRAILL ve ark., 1981; WARD 1983; CHEN ve ark., 1984; HAYENGA ve ark., 1984; VOESLUY ve KUONG, 1985; FROST ve MOSS, 1987; BRUMNER ve GUNZER, 1987).

*M. pusillus* hariç, peynir mayası üretiminde kullanılan diğer bütün mikroorganizmalar "daldırma yöntemi" olarak bilinen fermentörler kullanılarak üretilmektedir (STERNBERG, 1976). Fermentasyon ortamına temelde soya, glukoz, hidrolize edilmiş nişasta, mineral tuzları ve bazen de nadir olarak peynir suyu ve yağsız süt tozu gibi besin maddeleri ilave edilmektedir. *M. pusillus* ise kepek gibi fermentasyon ortamlarında fermentörün yüzeyinde geliştikleri belirtilmektedir (HUANG, 1970; CSERHATI ve HOLL, 1972; KRAYUSHKINA ve ark., 1973; POZSAR-HAJNAL ve ark., 1974). Ancak bazı araştırma sonuçlarına göre *M. pusillus* derin fermentasyonda da gelişebilmiştir fakat bu şartlarda proteolitik enzimlerle birlikte fazla miktarda lipaz enzimi de üretilmiştir (SOMKUTI ve BABEL, 1967; POZSAR-HAJNAL ve ark., 1974). Bu çalışmalarda kullanılan fermentasyon ortamının içeriği % 5 suda eritilmiş buğday kepeğine %5 bakteri kültürü inoküle edilmiştir. İnokülasyonda kullanılan starter kültürler 24 saat öncesinden taze olarak hazırlandığı belirtilmiş ve fermentasyonunun başlamasında 48 saat sonra 860 ünitelik bir pıhtılaştırma gücü sağlanmıştır. Fakat proteolitik aktivite çok yüksek olduğu için bu çalışmadan elde edilen enzim kullanılarak yapılan peynirlerde bazı problemlerin olduğu gözlemlenmiştir. Daha sonra aynı teknik kullanılarak fermentasyon şartları değiştirilerek üretilen enzimlerde de proteolitik aktivitenin pıhtılaştırma oranını düzenleyememiştir (POZSAR-HAJNAL ve HEGEDUN-VOLGYES (1975), *M. pusillus*'un derin fermentasyon tekniği kullanılarak ürettiği süt pıhtılaştırıcı proteolitik enzimin aynı mikroorganizmanın yüzey fermentasyonu ile ürettiği proteolitik enzimle farklı olduğu elektrofokusin analiz tekniği kullanılarak gösterilmiştir. Çoğu ticari peynir mayası birden fazla proteolitik enzim içerir. Fakat peynir mayasının içerisinde esas proteolitik enzimden başka süt pıhtılaştırıcı enzimin bulunması peynir üzerinde olumlu etkiler yapabilir. Bundan dolayı mikrobiyel kaynaklı peynir mayalarının daha fazla saflaştırma işlemine tabi tutulması gerekir. Çünkü fermentasyon esnasında renninden farklı diğer süt pıhtılaştırıcı enzimler üretilir. Bunun önlenmesi veya miktarının düşük tutulması içinde fermentasyon şartlarının ve kullanılacak mikroorganizmaların çok iyi seçilmesi gerekmektedir. HESBERGER ve STERNBERG (1974) *M. miehei* ve *M. miehei* var. *Lint'* kullanarak elde ettikleri mikrobiyel renneti geri dönüşümlü bir çökelme tekniği olan polyanionik polimerler metodu kullanarak saflaştırmışlardır. Bu metod genel protein saflaştırma metodunun bir bölümü olan poliakrylik asit metodudur. Bu metodda ham mikrobiyel rennetin poliakrylik veya poliethylenemalik asitlerin işlemi rennetle belirteç arasında suda çözünmeyen bir kompleks ürün oluşturmuştur. Filtrasyondan sonra elde edilen filtratta çözünmeyen bu bileşik CaCO<sub>3</sub> ile reaksiyona sokularak yapı değiştirilmiştir. Bu işlemler sonunda belirteçle CaCO<sub>3</sub> reaksiyona sokularak suda çözünmeyen belirteçin Ca-tuzu oluşur ve sonuçta mikrobiyel rennet, lipaz, mineral maddeler ve enzim olmayan proteinler birbirinden başarılı bir şekilde ayrılmış olur. Ayrıştırma işlemleri için tabiki farklı metodlar mevcut olabilir. SOMKUTI (1974) mikrobiyel renneti saflaştırmak için ortamdaki lipaz enziminin farklı bir metod kullanarak ayırtmıştır. Bunun için ortamdaki mikroorganizma popülasyonu filtre edildikten sonra ham mikrobiyel rennete amonyum sulfat ilave edilerek lipaz çöktürülmüştür. Daha sonra, jel filtrasyonu (Sephadex G75 veya G100) ile lipazı ortamdaki ayırtmıştır. Aynı çalışmada lipaz enziminin peynirin olgunlaşmasına yardımcı olabileceği üzerinde durulmuştur.

Mikrobiyel rennetin aşırı proteolitik aktivitesi süt proteinlerin fazla parçalanması sonucu peynir randımanında azalmaya ve acı tadın oluşmasına sebep olur. Proteolitik aktivite enzimin saflaştırılması ile yakından ilişkilidir. Eğer ham mikrobiyel rennet içerisinde fazla miktarda diğer proteolitik enzimler varsa proteolitik aktivite ve pıhtılaştırma zamanı pıhtılaştırıcının içerdiği proteolitik enzimlerin aktivitesine bağlı

olarak farklılık gösterecektir (STERNBERG, 1971; EDELSTEN ve ark., 1972). Fermantasyonda *M. mihei* ve *E. parasitica* kültürleri kullanılarak üretilen mikrobiyel rennetlerin silikatlarla işlemleri pıhtılaştırma gücünü etkilemeden proteolitik aktivitenin düşmesine sebep olabileceği bildirilmiştir (Organon Laboratories, 1971). MORVAI-RACZ (1974) *M. pusillus* var. *Lint* kullanarak elde ettiği fermantasyon ürünü ham mikrobiyel rennetten mikroorganizmaları filtre ettikten sonra amonyum sülfat ve iyon değiştiriciler kullanarak ham mikrobiyel renneti saflaştırmıştır. Sonuçta saflaştırılmış mikrobiyel rennetin pıhtılaştırma/proteolitik aktivite oranının saflaştırılmamış mikrobiyel rennete oranına 2,8 kat arttığı belirtilmiştir. Yapılan çalışmaların çoğunda peynir yapımı için kullanılacak mikrobiyel rennetin saflaştırılması gerektiği önerilmiştir.

### 3. Farklı kaynaklı pıhtılaştırıcı kullanılarak üretilen peynirlerin bazı niteliklerinin karşılaştırılması

Günümüzde mikrobiyel kaynaklı peynir mayası ile yapılan peynirlerin tüketiciler tarafından kabul gördüğü bir gerçektir. Çünkü, birçok Avrupa ülkesinde vejeteryanlar için üretilen peynirlerin yapımında mikrobiyel pıhtılaştırıcıların kullanıldığı belirtilmektedir. Buzağı renneti kullanılarak yapılan peynir üretim teknolojisi ile mikrobiyel kaynaklı rennet kullanılarak yapılan peynir üretim teknolojisi arasında kesin bir farklılık yoktur (FOX, 1981). Peynircilikte, önceleri mikrobiyel kaynaklı rennet yarı yarıya buzağı renneti ile karıştırılarak kullanılmaktaydı. Daha sonraları mikrobiyel kaynaklı rennet üretiminde yapılan yoğun çalışmalar sonucu günümüzde mikrobiyel kaynaklı rennet tek başına kullanılmaya başlanmıştır (STERNBERG, 1976).

DINESEN ve ark. (1975) *M. mihei* kullanılarak üretilen mikrobiyel kaynaklı rennet ile buzağı renneti kullanarak Cheddar peyniri yapmışlardır. Bu araştırmanın sonuçlarına göre 15 aydan sonra her iki rennet enzimi kullanılarak yapılan Cheddar peyniri örneklerinde benzer aroma ve tad gözlenmiştir. Mikrobiyel kaynaklı rennet kullanılarak yapılan peynirin peynir suyunda protein olmayan azotlu madde miktarı buzağı renneti kullanılarak yapılan peynirlerin peynir suyunda daha fazla bulunmuştur. Bu sonuçlardan mikrobiyel kaynaklı rennet proteolitik aktivitesinin daha fazla olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca buzağı rennet kullanarak Cheddar peynirlerinin ilk üçüncü ve altıncı aylarında mikrobiyel kaynaklı renneti kullanılarak yapılan peynirlere nazaran tat ve aroma yönünden üstün olduğu fakat altıncı aydan sonra farklılığın ortadan kalktığı açıklanmıştır.

Buzağı renneti ve Pepsin içeren süt pıhtılaştırıcı kullanılarak yapılan 173 tekne peynirden alınan peynir suyu örneklerinde ortalama yağ miktarı % 0,32 iken *M. pusillus* renneti kullanılarak yapılan 157 tekne peynirden alınan peynir suyu örneklerinde ortalama yağ oranı % 0,39 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre elde edilen ürünlerde yağ kaybından kaynaklanan farklılığın önemli olmadığı vurgulanmıştır (NELSON, 1975).

Saflaştırılmış mikrobiyel rennet ve buzağı renneti kullanılarak yapılan karşılaştırmalı bir başka çalışmada sütün pıhtılaştırma mekanizmasında çok büyük benzerlikler gözlenmiştir. Ancak ticari olarak üretilip, satılan mikrobiyel kaynaklı rennet birden fazla proteolitik enzim ve diğer enzimleride içerdiğinden yapılan peynir kalitesini olumsuz etkilemektedir. *M. pusillus* var. *Lint* kullanılarak üretilen rennetten kristalize edilmiş rennet kullanılarak yapılan peynir örnekleri ham mikrobiyel rennet kullanılarak yapılan peynir örneklerine nazaran daha az acı tada sahip olduğu belirtilmiştir (YU ve ark., 1971).

Peynir üreticisi genellikle peynir yapım işleminde hiçbir değişiklik yapmadan buzağı renneti yerine aynı pıhtılaştırma etkisine sahip renneti kullanmayı ister. Ancak bu durumu gerçekleştirmek her zaman mümkün değildir. Bundan dolayı peynir mayası üreticisi firmaların peynir üreticilerini uyarması gerekmektedir. Aksi halde peynir üreticisi firmalar peynir üretiminde problemlerle karşılaşabilirler, iyi kalitede peynir üretemeyebilirler (SCOTT, 1986).

Pıhtılaştırma zamanının  $Ca^{++}$  iyonlarının konsantrasyonuna bağlı olduğu bütün mikrobiyel kaynaklı peynir mayalarında gösterilmiştir (HOUINS ve ark., 1973). Sütte, *E. parasitica* dan elde edilen mikrobiyel rennetin buzağı rennetine nazaran pıhtılaştırma aktivitesinin  $Ca^{++}$  iyonlarının değişimine daha hassas olduğu, ancak en hassas *M. mihei*den elde edilen rennetin olduğu belirtilmiştir (ALAIS, 1971). Sütte pH 6,33-6,57'de  $Ca^{++}$  iyonu konsantrasyonuna en hassas *M. pusillus*'dan elde edilen mikrobiyel rennetin olduğu belirtilmiştir (ALAIS ve LAGRANG, 1972). BRINKMAN ve DUIVEN (1972) de *M. pusillus*'un sütteki  $Ca^{++}$  iyonu konsantrasyonuna buzağı rennetine nazaran daha hassas olduğunu vurgulamıştır. Çünkü ortamdaki  $Ca^{++}$

iyonları konsantrasyonu arttığında pıhtılaştırma aktivitesi artmaktadır. *M. pusillus* dan elde edilen mikrobiyel rennetin pıhtılaştırma aktivitesi pH 5,3-6,0 aralığındaki değişimlerden etkilenmediği ancak, pH 6,0-6,3 arazide azaldığı belirtilmiştir. *M. mihei* ve *E. parasitica* kullanılarak elde edilen rennetler ile buzağı renneti arasında karşılaştırmalı olarak yapılan bir çalışmada, kullanılan farklı rennetler arasında benzerlikler olduğu ve onların pıhtılaştırma aktivitesi pH 5,3-6,3 aralığında azalmış ve pH'nun üzerindeki değerlerde onların pıhtılaştırma aktivitesi *M. pusillus* dan elde edilen mikrobiyel rennetin aktivitesine nazaran daha hızla azalmıştır (HOUINS ve ark., 1973). Pıhtılaşma zamanındaki değişimler pH 5,55-6,55 aralığında pratik olarak buzağı renneti ve *M. mihei* kullanılarak elde edilen rennet arasındaki farklılığın ayırt edilebilecek kadar büyük olduğu belirtilmiştir (ALAIS ve LAGRANG, 1972).

Belirli düzeydeki proteolitik aktivite peynirde istenilen bir faaliyettir. Fakat bunun seviyesi fazla olduğu zaman üründe acılaşıma, yapıda yumuşama, ürün kaybı gibi kusurlara sebep olabilir. Mikrobiyel rennetle buzağı renneti karşılaştırıldığında, mikrobiyel rennetin daha fazla proteolitik aktiviteye sahip olduğu ve proteolitik aktivite sonucunda daha fazla protein olmayan azotlu maddeler açığa çıktığı çeşitli araştırma sonuçlarında belirtilmiştir (ALAIS ve LAGRANG, 1972; VANDERPOORTEN ve WECKLUX, 1972; HOUINS ve ark., 1973). Özet olarak bir çok peynir çeşidinin mikrobiyel rennet kullanılarak yapıldığı ve genelde buzağı renneti kullanılarak yapılan peynirlerle benzerlik gösterdiği söylenebilir.

Sonuç olarak, son yıllarda mikrobiyel kaynaklı peynir mayasının kullanımında diğer kaynaklı peynir mayalarına nazaran kıyaslanamayacak oranda artışlar gözlenmiştir. Çünkü üretim maliyeti çok düşük ve hayvansal kaynaklı buzağı rennetin üretimindeki azalma mikrobiyel kaynaklı peynir mayasının önemini artırmıştır. Her ne kadar mikrobiyel kaynaklı peynir mayasının kullanımı yaygınlaşmış ise de buzağı renneti ile kıyaslandığında hala bilinmeyen bir çok yön mevcuttur. Ticari mikrobiyel kaynaklı peynir mayaları hayvansal kaynaklı peynir mayalarına nazaran sıcaklığa daha fazla dayanıklıdır. Bundan dolayı mikrobiyel kaynaklı peynir mayası kullanılarak üretilen peynirlerin peynir altı suyu tozunun gıda sanayiinde kullanımında bazen problemlerle karşılaşmaktadır. Mikrobiyel rennet üretim esnasında fermentasyon şartlarına bağlı olarak mikroorganizmaların mutasyona uğrama şanslarının mevcut olduğu dikkate değer bulunmuş ve bu konuda dikkatli olunması gerekmektedir. Böyle bir durumda üretilen mikrobiyel rennetin kalitesinin veya aktivitesinin değişebileceği bilinmelidir.

## KAYNAKLAR

- ALAIS, C. and NOVAK, G. 1968. Study of a microbial coagulating enzyme produced by *Endothia parasitica*, 1. Biochemical properties of Pfriizer coagulating enzyme and rheological properties of curds formed in the milk. *Lait*, 48: 393-418.
- ALAIS, C. and LAGRANG, A. 1972. *Lait*, 52: 407-427.
- ANONYMOUS, 1984. IBU Enzyme Nomenclature Recommendations 1984. *Euro. J. Biochem.*, Suppl.-1, 1986. 157:1.
- ARIMA, K. and IWASAKI, S. 1964. Milk coagulation composition "Microbial Rennet and Method of preparation Thereof". U.S. Patent 3 151 039.
- ARIMA, K., IWASAKI, S. and TAMURA, G. 1967. Milk-clotting enzyme from microorganisms. Part 1. Screening test and identification of the potent fungus. *Agic. Biol. Chem.*, 31: 540.
- ARIMA, K., YU, J. and IWASAKI, S. 1971. Milk-clotting enzyme from *M. pusillus* var. Lindt "in, *Methods in Enzymeology*, Vol. 19, Eds G.E. Perinon and L. Lorund", Academic Press, N. York, 446-458 s.
- AUNSTRUP, K. 1968. Improvements in or Relating to a milk coagulating Enzymes. U.K. Patent 1 108 287.
- AUNSTRUP, K. 1979a. Production of microbial enzymes. "in, *Microbial Technology-Microbial Processes*, Vol. 1, Eds H.J. Pepler and D. Perlman", Academic Press, New York, 282-310 s.
- AUNSTRUP, K. 1979b. Production, Isolation and economics of extra cellular enzymes. "in, *Applied Biochemistry and Bioengineering*. Vol. 2, Eds L. Wingard, E. Katchalaski-Katzır and L. Goldstein", Academic Press, New York, 27-69 s.
- AUNSTRUP, K. 1980. Proteinases, Economic Microbiology. "in, *Microbial Enzymes and Bioconversions*. Vol. 5, Ed A.H. Rose" Academic Press, New York, 49-114 s.
- AWORTH, O.C. and NAKAI, S. 1986. Extraction of milk clotting enzyme from Sodom apple (*Colotropis procerat*). *J. Food Science*. 51: 1569.
- AWORTH, O.C. and MULLER, H.C. 1987. Cheese making properties of vegetable rennet from Sodom apple (*Colotropis procerat*). *Food Chemistry*. 26: 71.
- BABBAR, I., SRINIVASON, A., CHAKRAVORTY, S.C., KRISHNAIYENGAR, M.K., DUDANI, A.T. ve IYA, K.K. 1964. Indian Patent 86 317.
- BABEL, F.J. and SOMKUTI, G.A. 1968. *Mucor pusillus* protease as milk coagulant for cheese manufacture. *J. Dairy Science*, 51: 937.
- BERKOWITZ-HUNDERT, R., ILANY-FEIGNENBAUM, J. ve LEIBOWITZ, J. 1965. *Enzymologia* 29: 98-100.

- BERRIDGE, N.J. 1954. Rennin and the clotting of milk. "in, *Advances in Enzymology*, vol: 15, Ed E.F. Nord "Intereesteinece Publishers, New York, 423-449 s.
- BROWN, J.R. and ERNSTROM, C.A. 1988. Milk clotting enzymes and chees chemistry part 1-milk clotting enzymes. "in, *Fundamental of Dairy Chemistry*. Ed N.D. Wong, Won Nostrand Reinhold Co., New York, 609-633 s.
- BRUMNER, W. ve GUNZER, G. 1987. Laboratory Techniques of enzyme recover. "in, *Biotechnology*, vüol: 7a, Eds H.-J. Rehm ve G. Reed" VCH Publisher, Germany, 213-277 s.
- BRINKMAN, D. and DUIVEN, M: 1972. *Ind. Aliment. Agric.*, 89: 1755-1758.
- BURNETT, J. 1976. A brief survey of plant coagulants. *Dairy Ind. Int.* 41: 162-164.
- CHARLES, R.L., ERTZMAN, D.P. and MELE-CHUURIS, N. 1970. Milk-Clotting Enzymes products and process Thereof. U.S. Patent 3 549 390.
- CHEN, M.C.Y.-Y., HAYENGA, K.J., LAWLIS, V.B. and SNEDECO, B.R. 1984. Microbially Produced Rennet. "in, *Methods for its production and Plasmid used for its Production*", Euro. Patent 116 778.
- DINESEN, N., EMMONS, D.B., BECKETT, D., REISER, B., LAMMAN, E. and IRVING, D.M.J. 1975. *J. Dairy Sci.*, 58: 795
- ESKIN, N.A.M. and LANDMAN, A.D. 1975. Study of milk clotting by an enzyme from ash gourd (*Bemincasa cerifera*). *J. Food Sci.* 40, 413-414.
- FELDMAN, L.I. 1979. Microbial Rennin. U.S. Patent 4 136 201.
- FOLTMANN, B. 1971. The biochemistry of Prorennin (prochymosin) and rennin (chymosin), "in, *Milk Proteins Chemistry and Molecular Biology*, Vol. 2, Ed H.A. McKenzie", Academic Press, New York.
- FOLTMANN, B. 1970. Prochymosin and chymosin (Prorennin and Rennin), "in, *Method in Enzymology*. Vol. 19, Eds G.e. Perimann and L. Lorand", Academic Press, New York, 421-436 s.
- FOLTMANN, B. 1981. Mamalian milk-clotting proteases: structure, function, evolution and development. *Neth. Milk Dairy J.* 35: 323-366.
- FOX, P.F. and WALLEY, B.F. 1971. Bovine pepsin: Preliminary cheese making experiment. *Irsh. J. Agr. Res.* 10: 358-360.
- FOX, P.F. 1981. Protomases in dairy technology. *Neth. Milk Dairy J.* 35: 233-253.
- FRAILLE, E.R., MUSE, J.O. and BERNARDINELLI, S.E. 1981. Milk-Clotting enzyme from *M. bacilliformis*. *European J. Microbiol. Biotechnology.* 13: 191-193.
- FROST, G.M. and MOSS, D.A. 1987. Production of enzymes by fermentation. "in, *Biotechnology*, Vol: 7a, Eds H.-J. Rehm ve G. Reed", VCH Publisher, Germany, 65 s.
- GORDIN, S. and ROSTENTHAL, I. 1978. Efficacy of chicken pepsin as a milk clotting enzyme. *J. Food PRot.* 41: 684.
- GREEN, M.L. 1977. Review of the progress of dairy science: Milk coagulants., *J. Dairy Science*, 44: 159-188.
- GREENBERG, D.M. 1955. *Methods in Enzymology*. Vol. 2, Eds S.P. Colwick and N.O. Kaplan. Academic Press, New York, 54-64 s.
- GUINEE, T.P. and WILKINSON, M.G. 1992. Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. *J. Soc. of Dairy Techno.* 45(4) 94.
- GUPTA, C.B. and ASKIN, N.A.M. 1977. Potential use of vegetable rennet in the production of cheese. *Food Technology*, 31: 62-64.
- HAYENGA, K.J., LAWLIS, V.B. and SNEDECOR, B.R. 1984. Microbially produced Rennet. "in, *Methods for its production and Reactivation, Plasmid used for its PRoduction, and its use in Cheesemaking*", Euro. Patent 114 507.
- HOUINS, G., BEROANNE, C. and COPPENS, R. 1973. *Lait*, 53: 610-663.
- HESHBERGER, O.F. and STERNBERG, M. 1974. *German Offen.* 2 419 232.
- LAW, B.A. and GOODENOUGH, P.W. 1991. Enzymes in milk and cheese production. "in, *Enzymes in Food Processing*, Eds G.A. Tucker and C.F.J. Woods", Blackie Glasgow, 99 s.
- KHAN, M.R., BLAIN, J.A. and PATTERSON, J.D. 1979. Extracellular proteases of *M. Pusillus*. *Appl. Enviro. Microbiol.* 37: 719.
- MEYRATH, J. and VOLAVSEK, G. 1975. Production of microbial enzymes. "in, *Enzymes in Food PRocessing*, Ed G. Reed", Academic Press, New York, 225 s.
- NELSON, J.H. 1975. Impact of new milk clotting enzymes. *J. Dairy Sci.*, 11: 1739-1750.
- ORGANON LABORATORIES, 1971. Netherlands Patent, 1 249 636.
- OUTTRUP, H. and BOYCE, C.O.L. 1990. Microbial proteinases and Biotechnology. "in, *Microbial enzymes and Biotechnology*, Eds W.M. Fogarty and C.T. Kelly", Elsevier Appl. Sci. London.
- PEPLER, H.J. and REED G. 1986. Enzymes in food and feed processing. "in, *Biotechnology*, Vol: 7a, Eds H.-J. Rehm ve G. Reed", VCH Publisher, Germany, 547-603 s.
- POZSAR-HAJNAL, K. and HEGEDUN-VOLGYES, E. 1975. *Acta Aliment. Acad. Sci. Hung.* 4: 63-79.
- RAMET, J.P. 1986. The agentsz of milk convevrsion. "in, *Cheesemaking Science and Technology*. Ed A. Eck", Lavoisier Publisher Inc. New York. 101-125 s.
- REIMERDER, E.H. 1990. Industrial use of enzymes. "in, *Enzyme In Industry Production and application*, Ed W. Gerhartz", VCH Publisher, Germany, 20-123 s.
- RICHARDSON, G.H. 1975. Dairy industry. "in, *Enzymes in Food Processing*, Ed. G. Reed", Academic PRess, New York.
- SARDINAS, J.L. 1966. Milk-Curdling Enzyme Elaborated by *E. parasitica*. U.S. Patent 3 275 453.
- SARDINAS, J.L. 1969. Rennin enzyme of *E. parasitica*. *Applied Microbiologg*, 16, 248.
- SARDINAS, J.L. 1972. Microbial rennets. *Advances in Applied Microbiology*, 15: 39-73, Academic Press, New York.
- SCOTT, R. 1986. *Cheesemaking Practice*. 2nd ed, Elsevier Applied Sci. London.
- SOMKUTI, G.A. and BABEL, F.J. 1967. Conditrions influencing the synthesis of acid protease by *M. pusillus* Lindt. *Applied Microbiology* 15, 1309.

- STRENBORG, M. 1972. Bond specificity active site and milk clotting mechanisms of *M. miehei* protease. *Biochim. Biophys. Acta*, 285: 383.
- STERNBERG, M. 1976. Microbial rennets. *Advances in Applied Microbiology*. 20: 135-157. Academic Press, New York.
- VANDERPOORTEN, R. and WECKX, M. 1972. Breakdown of casein by rennet and microbial milk clotting enzymes. *Neth. Melk-Zuiveltijdschr*, 26: 47-59.
- VIEIRA DE SA, F. and BARBOSA, M. 1972. Cheese-making with a vegetable rennet from *Cardo* (*Cyanara cardunculus*). *J. Dairy Res.* 39, 335.
- VISSER, S. 1981. Proteolytic enzymes and their action on milk proteins. A review. *Neth. Milk Dairy J.* 35, 65-88.
- VOLESKY, B. and LUONG, J.H.T. 1985. Microbial Enzymes; Production, Purification and Isolation, C.R.C. Critical Reviews in Biotechnology. 2(2) 119-146.
- WALTI, A. 1938. Crystalline Ficine. *J. American Chem. Soc.* 60, 493.
- WARD, O.P. 1983. Microbial enzymes and Biotechnology. Applied Science Publisher. London.
- WHITAKER, J.R. 1971. Protease of *Endothia parasitica*. *Method in Enzimology*, Vol. 19, 436-445.
- WHITAKER, J.R. 1972. *J. Dairy Science*, 55: 719-725.
- YU, J., TAMURA, G. and ARIMA, K. 1971. *Agric. Biol. Chem.*, 35: 1195-1199.