

PEYNİRİN OLGUNLAŞMASINDA ENZİMLERDEN KAYNAKLANAN PROTEOLİZ

Nihat AKIN*

ÖZET

Peynirin olgunlaştırılmasında etkili olan proteoliz, glikoliz ve lipoliz gibi üç önemli olaydan en karmaşık olanı proteolizdir. Proteoliz üzerinde etkili olan bir çok faktör bulunmakta olup, bunlardan biri enzimlerdir. Bu çalışmada peynir olgunlaşmasında etkili olan proteolizle ilgili genel bir özet yapılarak, kimoziin, pepsin, fungal proteinazlar, doğal süt proteinazları gibi enzimlerin proteolizle ilgili genel özellikleri açıklanmıştır. Anahtar kelimeler: Proteoliz, kimoziin, pepsin, fungal proteinazlar, doğal süt proteinazları.

SUMMARY

Proteolysis from Enzymes in Cheese during Ripening

Proteolysis, lipolysis, glycolysis are important in cheese ripening and proteolysis is the most complex biochemical and some chemical events. Proteolysis can be affected many different factors that enzymes are one of them. In these study proteolysis has been summerised and reviewed for enzymes such as kimoziin, pepsine, fungal proteinase and indigenus milk proteinases in cheese ripening.

Key words: Proteoliz, kimoziin, pepsine, fungal proteinases, indigenus milk proteinases.

1. GİRİŞ

Dünyada yılda yaklaşık 14×10^6 ton peynir üretildiği belirtilmektedir. Bu miktarın yaklaşık % 75'i 3 hafta ile 2 yıl arasında değişen sürelerde olgunlaşma periyodu içermektedir. Olgunlaşma, her bir peynir çeşidinin karakteristik lezzet aroma ve yapısının oluşmasına öncülük eden kompleks biyokimyasal olaylar zincirleridir. Proteolizin peynir olgunlaştırılmasındaki önemi gözardı edilemez. Peynir olgunlaşmasında çok önemli üç olaydan (glikoliz, lipoliz ve proteoliz) en kompleksi proteolizdir. Bu konuyla ilgili olarak bir çok araştırmacı (Rank ve ark., 1985; Grappin ve ark., 1985; Fox, 1989; Fox ve Law 1991; Fox ve ark., 1996; Akın, 2002 a, b) literatür özeti şeklinde yayınlar yapmışlardır.

Peynirde proteolitik aktivitenin oluşmasına katkıda bulunan maddeler, aşağıda belirtilen kaynaklardan gelen enzimler tarafından katabolize edilir. Bu enzimlerin kaynağı; i) süt pıhtılaştırıcıları (kimoziin, pepsin veya fungal asit proteaz), ii) sütte bulunan doğal plazmini veya katapsin-D ve diğer somatik hücre proteinazları, iii) starter bakteriler, iv) starter olmayan tesadüfe bağlı kontaminant mikroflora, v) bazı tür peynirler için ikincil inokulum, örneğin *P. roqueforti*, *P. camamberti*, *B. linens*, *Lactobacillus spp.*, vi) eksojen proteinazlar ve peptidazlar veya zayıflatılmış bakteri hücreleri olgunlaştırmanın hızlandırılması veya önemli aroma maddelerinin açığa çıkartılması anlamında son zamanlarda üzerinde önemle durulan çalışmalardır.

Belirtilen bu kaynaklardan gelen proteolitik enzimlerin relatif katkıları enzimin açığa çıktığı kaynaklara bağlı olup kontrollü mikrobiyolojik şartlarda peynir üretiminde belirlenmiştir (Fox ve ark., 1993).

Çoğu olgunlaştırılmış peynirlerde proteolizle ilgili gelişmeler şu şekilde özetlenebilir. Kazein fraksiyonlarının başlangıçtaki hidrolizasyonu pıhtılaştırıcı enzimlerden peynirde kalan kısmı ve daha az etkili olan plazmin ve katapsin - D ve diğer somatik hücre proteinazları tarafından öncelikle katalize edilip, büyük ve orta büyüklükteki peptidlerin oluşmasıyla sonuçlanır. Proteolizle ilgili bu genel özetle peynir üretimindeki farklılığa bağlı olarak değişiklikler olabilir. Mozzarella, Kaşar ve diğer yüksek haşlama sıcaklığı uygulanan peynir çeşitlerinde peynir mayasından gelen rennin enziminin büyük bir kısmı veya tamamı sıcaklığın etkisiyle denatüre olur. Bunun için peynirde süt kaynaklı olarak bulunan plasmin proteolize önemli katkıda bulunur.

Bu literatür özeti çalışmasında peynirin olgunlaşmasında etkili olan başlıca proteolitik enzimlerin temel özellikleri ve fonksiyonları üzerinde durulacaktır.

2. PEYNİRLE İLİŞKİLİ PROTEİNAZLARIN ÖZELLİKLERİ

Aşağıdaki açıklamalarda model sistemlerde peynirde bulunan her bir kazein fraksiyonu üzerine ayrı ayrı aktivite gösteren başlıca proteinazların özellikleri belirlenerek tanımlanmıştır.

2.1. Pıhtılaştırıcı enzimler

Kimozin (EC 3.4.23.4), geleneksel peynir yapımı için kullanılan peynir mayasında bulunan temel proteinaz (Rothe ve ark., 1977) olup, genç memeli hayvanlar tarafından salgılanan gastirik orijinli bir aspartil proteazdır. Peynir yapımında kimozinin ana rolü protein, κ -kazein, misellerini stabilize eden Phe₁₀₅-Met₁₀₆ bağıını özel olarak hidrolize eder. Misellerin koloidal stabilitesinin bozulması sonucunda 20°C sıcaklıkta jelleşmeye başlar. Sütün enzimatik koagulasyonu ile ilgili olarak çok sayıda literatür özeti şeklinde (Fox, 1984; Fox ve Mulvihill, 1990; Dagleish, 1992 ve 1993) çalışma yapılmıştır. Peynir sütüne ilave edilen peynir mayası içerisindeki enzim çoğu peynir altı suyuna geçer. Fakat bir kısımda taze peynirin pıhtısı içerisinde kalır ve kalan miktar bir çok peynir çeşidinde bulunan kazeinin başlangıçtaki proteolizinde önemli rol oynar. Tipik olarak, peynir sütüne ilave edilen kimozinin yaklaşık %6'sı taze peynir pıhtısında kalır. Fakat, pH değeri arttığında peynir suyunun ayrılması azalacağından pıhtıda kalan pıhtılaştırıcı enzim miktarı artar (Holmes ve ark., 1977; Creamer ve ark., 1985). Pepsin çeşitleri, özellikle domuz pepsini, pH değişimine karşı kimozine göre daha hassastır. Bunun için, bu pıhtılaştırıcı enzimin peynir pıhtısında kalan miktarı pH değişimlerine bağlı olarak aktivitesini kaybeder. Bu tür pepsinin bu özelliğinden yararlanılarak pıhtılaşmadan sonra telemenin pH'sı yaklaşık 7 civarına ayarlanıp enzim aktivitesi ortadan kaldırılarak enzim aktivitesinin olmadığı bir peynir elde edilebileceği belirtilmiştir (O'Keeffe ve ark., 1977 ve 1978). Sadece %2-3 Mucor kaynaklı pıhtılaştırıcı enzim peynir pıhtısında kalır ve pH 'dan bağımsız olarak aktivite gösterir (Creamer ve ark., 1985). Pıhtısına yüksek sıcaklıkta haşlama uygulanan peynir çeşitlerinde, (örneğin Emmantel, Kaşar vb) peynir telemesinde kalan kimozin enziminin büyük bir kısmı denatüre olmakta (Matheson, 1981; Singh ve Creamer, 1990; Boudjellab ve ark., 1994) ve sonuçta bu tip peynirin olgunlaşmasına pıhtılaştırıcı enzimlerin katkısı ya çok az olmakta yada hiç olmamaktadır (Lane ve ark., 1997).

Kimozinin Özellikleri: İnsülin B zinciri üzerine kimozin aktivitesi onun hidrofobik ve aromatik aminoasit kalıntısı için özel olduğunu göstermiştir. Kimozin bir çok diğer proteinazla ilişkili olup zayıf proteolitik özellik gösterir ve bunun için peynir yapımında kullanılmak üzere proteinaz seçiminde kimozinin göz önünde bulundurulmuş karakteristik özelliklerinden biridir (Fox, 1989; Dagleish, 1993).

Süt protein sisteminde proteinlerin asıl parçalanmış bağları, süt proteinlerinden diğer bağlara nazaran çoğu zaman kimozine karşı daha hassas olan, κ -kazeindeki Phe₁₀₅-Met₁₀₆ bağıdır. κ -kazeindeki Phe₁₀₅-Met₁₀₆ bağıının parçalanmasıyla para- κ -kazein (κ CN f 1-105) ve (gliko) makropeptidler (GMP; κ -CN f 106-169) açığa çıkarılır. Gliko makropeptidlerin (GMP) çoğu peynir suyuna geçer. Fakat para- κ -kazein, kazein misellerine bağlanarak ortamda kalır ve böylece ham peynir içerisine dahil edilmiş olur. α_1 - ve α_2 - ve β -kazein fraksiyonları sütün pıhtılaşması esnasında hidrolize olmazlar. Ancak peynirin olgunlaştırılması esnasında hidrolize olabilirler.

Bir çok araştırmacı (Pelissier ve ark., 1974; Creamer, 1976; Viser ve Slagen, 1977; Carles ve Ribadeau-Dumas, 1984) kimozinin etkisiyle β -kazeinin hidrolizini araştırmışlardır. 0.05 M sodyum asetat buffer çözeltisi içerisinde, pH 5.4'de kimozin etkisiyle β -kazeini yedi yerinden parçalamıştır. Bu bağların Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ > Ala₁₈₉-Phe₁₉₀ > Leu₁₆₅-Ser₁₆₆ > Gln₁₆₇-Ser₁₆₈ > Leu₁₆₃-Ser₁₆₄ > Leu₁₃₉-Leu₁₄₀ > Leu₁₂₇-Thr₁₂₈ olduğu tesbit edilmiştir (Visser ve Slagen, 1977). Kimozinin Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ bağı üzerine göstermiş olduğu aktivitenin parametreleri; misellar β -kazeinin için K_m 0.075 mM ve k_{cat} 1.54 sn⁻¹ iken, bu parametreler monomerik protein için K_m 0.007 mM ve k_{cat} 0.56 sn⁻¹ dir (Carles ve Ribadeau-Dumas, 1984). NaCl kimozin enziminin β -kazeini hidrolize etme aktivitesini inhibe eder. Bu inhibisyon etkisi ortamın pH'sına bağlı olarak değişim göstermekte olup; %5 tuz konsantrasyonunda hidrolizi kuvvetli

bir şekilde inhibe ederken %10 tuz konsantrasyonu hidrolizi tamamen inhibe ettiği belirtilmiştir (Mulvihill ve Fox, 1978).

α_{s1} -kazein fraksiyonu üzerine kimozinin etkisinin esasen Phe₂₃-Phe₂₄ bağı üzerine olduğu açıklanmıştır (Hill ve ark., 1974; Carles ve Ribadeau-Dumas, 1985, McSweeney ve ark., 1993a). Bu bağı parçalanması peynirin yapısının yumuşamasından sorumlu olacağı belirtilmekte (de Jong, 1976; Creamer ve Olson, 1982) ve bu küçük zincir yapılı peptidin (α_{s1} -CN f1-23) starter kültürlerin sentezlediği proteinazlar tarafından hızlı bir şekilde hidrolize edilebileceği belirtilmiştir. Çözeltide α_{s1} -kazein üzerine kimozinin etkisi Pelissier ve ark.(1974), Mulvihill ve Fox (1979), Pakkala ve ark. (1989), McSweeney ve ark. (1993a) gibi araştırmacılar tarafından çalışılmış olup, pH 6.5'da 0.1M fosfatlı buffer çözeltisi içerisindeki α_{s1} -kazein fraksiyonu üzerine kimozin enziminin etkisiyle Phe₂₃-Phe₂₄, Phe₂₈-Pro₂₉, Leu₄₀-Ser₄₁, Leu₁₄₉-Phe₁₅₀, Phe₁₅₃-Tyr₁₅₄, Leu₁₅₆-Asp₁₅₇, Tyr₁₅₉-Pro₁₆₀, ve Trp₁₆₄-Tyr₁₆₅ bağları parçalanır (McSweeney ve ark., 1993b). Bu bağlar ayrıca pH 5.2 ve %5 NaCl (peynirde) şartlarında hidrolize olmuş ve yukardaki parçalanmış bağlara ilave olarak Leu₁₁-Pro₁₂, Phe₃₂-Gly₃₃, Leu₁₀₁-Lys₁₀₂, Leu₁₄₂-Ala₁₄₃ ve Phe₁₇₉-Ser₁₈₀ bağları da parçalanmıştır. Bu bağların çoğundaki hidrolizasyon oranı iyonik kuvvet ve pH değerine bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Özellikle Leu₁₀₁-Lys₁₀₂ bağı düşük pH değerinde daha hızlı parçalanır. Kimozin enziminin α_{s1} -kazeinin Phe₂₃-Phe₂₄ bağına hidrolizi için göstermiş olduğu aktivitenin parametreleri; K_m 0.37 mM ve k_{cat} 0.7 sn⁻¹ olduğu belirlenmiştir (Carles ve Ribadeau-Dumas, 1985). Kimozin enziminin etkisiyle α_{s1} -kazeinin hidrolizi pH ve iyonik kuvvetin etkisiyle değişiklik gösterir (Mulvihill ve Fox, 1979, 1980).

Kimozin enziminin etkisiyle α_{s1} -kazein fraksiyonu proteolize karşı kısmen dayanıklıdır. Bağların parçalanmış kısımları molekülün hidrofobik bölgesiyle sınırlı olup (sıralar 90-120 ve 160-207 dir), örneğin; Phe₈₈-Tyr₈₉, Tyr₉₅-Leu₉₆, Gln₉₇-Try₉₈, Try₉₈-Leu₉₉, Phe₁₆₃-Leu₁₆₄, Phe₁₇₄-Ala₁₇₅, Tyr₁₇₉-Leu₁₈₀ bağlarıdır (McSweeney ve ark., 1994a). para- κ -kazeinin bazı potansiyel kimozinle parçalanmış kısımları olmasına rağmen peynirde veya çözeltide hidrolizasyon oluşmamıştır (Green ve Foster, 1974). Tahminen bu durum κ -kazeinin diğer kazein fraksiyonlarıyla karşılaştırıldığında ikincil yapısına kısmen yüksek seviyede yansıtacağı belirtilmiştir (Swaisgood, 1992). Üre'nin yüksek konsantrasyonlarda (Pepsin 8M ürede aktiftir) kimozin ve pepsin tarafından para- κ -kazeini hidrolizasyonunun araştırılmasıyla bu konudaki bazı belirgin olmayan bilgiler daha da aydınlanacaktır.

Kazein fraksiyonları üzerine Pepsin enziminin spesifik etkileri: Buzağı kaynaklı peynir mayası genellikle yaklaşık %10 pepsin (EC.3.4.231) içerir (Rothe ve ark. 1977). Ancak bazı buzağı kaynaklı peynir mayası % 50' ye varan oranlarda sığır kaynaklı pepsin içerir. Bilindiği kadarıyla inek sütü kazein fraksiyonları üzerine domuz veya sığır pepsininin etkisinin özellikleri tam olarak belirlenmemiş olmasına rağmen, sığır pepsiniyle Na-kazeinattan üretilen proteolitik ürün kimozin kullanılarak üretilen proteolitik ürünle benzerlik göstermektedir (Fox, 1969). Ancak Mulvihill ve Fox (1979) inek, koyun, keçi sütlerinden elde ettikleri β -kazein fraksiyonu üzerine aynı hayvanlardan elde ettikleri kimozin ve pepsinin hidrolizasyon etkisini araştırmışlardır. Çalışmada üre-PAGE yöntemi kullanılarak hidrolizasyon ürünleri belirlenmiştir. Çalışmada küçük zincir yapılı peptidlerde (pH 4.6'da çözünen) farklılıklar görülmesine rağmen, kimozin için genellikle benzer spesifik özellikler gösteren büyük zincirli peptidlerin açığa çıktığı belirlenmiştir. Çalışmada üre-PAGE'le belirlenen büyük peptidler üretilmiştir. Bazı küçük zincir yapılı peptidler üretilmişlerse de genellikle kimozinle pepsinin özelliklerinin benzer olduğu belirtilmiştir. Pepsin enziminin belirtilen kimozin enziminin daha proteolitik özellikler taşıdığı belirtilmiştir. Rekombinant buzağı kimozinleri *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, veya *E. coli* son zamanlarda peynir yapımında kullanıma sunulmuş ve gıda üretiminde çoğu ülkede kanun ve tüzük hazırlayan yetkililer tarafından kullanımı kabul edilmiştir. Bunlar günümüzde bir çok ülkede yaygın olarak kullanılmaktadır. Birçok çeşit peynir yapımında buzağı kaynaklı peynir mayasıyla rekombinant kimozin arasında küçük farklılıklar belirlenmiştir (Green ve ark., 1985; Hicks ve ark., 1988; Bines ve ark., 1989; van den Berg ve de Koning, 1990; O'Sullivan ve Fox, 1991; Nunez ve ark., 1992). Buzağı kaynaklı peynir mayası kimozinin üç genetik varyantını (A,B,C) ve bir miktar pepsin içerirken (Foltmann,1966) rekombinant kimozinin sadece bir genetik varyantını içerebileceği belirtilmiştir (Harboe, 1992). Sonuçta, buzağı kaynaklı peynir mayasını, çok benzer olarak, simule etmek için bazı peynir mayası üreticileri tarafından az bir miktar sığır pepsini rekombinant kimozin enzim çözeltisi içerisine ilave edilerek farklılık aza indirgenebilmektedir.

Fungal Kaynaklı Pıhtılaştırıcılar: Bir süredir buzağı kaynaklı peynir mayasında ihtiyacı karşılamada yetersizlikler nedeniyle peynir yapımında kullanılacak buzağı kaynaklı peynir mayasının yerine geçebilecek uygun peynir mayası üretimi için yoğun çalışmalar başlatılmış ve bu konudaki yoğun çalışmalar devam etmektedir (Akin, 1996). Bazı proteinazlar belirlenmiş olmakla birlikte sadece sığır pepsini ve *Rhizomucor pusillus*, *R. miehei* ve *Cryphonectria parasitica*' dan sağlanan proteinazlar ticari olarak yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Phelani 1985; van den Berg, 1992). *Rhizomucor pusillus*'den elde edilen peynir mayası çeşitli ticari isimler altında çok yaygın bir şekilde günümüzde kullanılmakta ve genellikle başarılı sonuçlar vermektedir. Orijinal *R. miehei* proteinazı kimozin enzimine nazaran ısıl işleme daha dayanıklıdır. Bunun için bu tip peynir mayası kullanılarak yapılan peynirlerin peynir sularından üretilen yan ürünler gıda sanayiinde katkı olarak kullanıldığında bazı olumsuzluklara neden olmaktadır. Son zamanlarda *Rhizomucor* proteinazı kullanılarak üretilen peynir mayası kimyasal modifikasyonla (methionin oksidasyonu) ısıya dayanıklılığı azaltılmıştır. *R. miehei* proteinazı için gerekli gen *A. oryzae*' ya kolonlanmış ve sonuçta elde edilen peynir mayasında daha az kontamine proteolitik enzim içermiştir. Bu peynir mayası Cheddar peyniri yapımı için çok uygun bulunmuştur (Chen ve ark., 1996). *C. parasitica* proteinazı kimozin enziminden önemli miktarda daha proteolitik bulunmuştur (Tan ve Whitaker, 1972), özellikle β -kazein üzerine etkisinin fazla olmasından dolayı peynir yapımında fazla kullanılmamakta, fakat yüksek sıcaklık derecelerinde pıhtısı haşlanan peynirlerde (İsveç tipi peynirler) kullanılması önerilmektedir. Çünkü haşlama esnasında pıhtılaştırıcıların tamamı veya tamamına yakın bir kısmı ısıl işlemin etkisiyle denatüre olarak aktivitesini kaybedecektir.

Bu enzimlerin çoğunun insülinin oksidaz B-zinciri üzerine spesifik özellikleri Green (1977) tarafından özetlenmiştir. Fungal kaynaklı peynir mayalarının Na-kazeinatı hidrolizi üzerine çalışmalar Tan ve Whitaker (1972) tarafından yapılmış ve daha sonra Phelan (1985) tarafından belirtilmiştir. Kimozin enziminin etkisiyle Na-kazeinatın hidrolizi, *R. miehei* proteinazı, ve *Cryphonectria parasitica*' dan elde edilen proteinazların etkileri Rattary ve ark., (1996) tarafından karşılaştırılmıştır. Bu üç enzimin özelliklerinin açık olarak farklı olduğu ortaya koyulmuştur (*Cryphonectria parasitica*' dan elde edilen enzim β -kazein üzerinde aktiftir) Ancak, fungal proteinazlar tarafından parçalanmış bağlar belirtilmemiştir. [*Cryphonectria parasitica*' dan proteinazı κ -kazeinin asıl parçalanması Phe₁₀₅-Met₁₀₆ yerine Ser₁₀₄-Phe₁₀₅ bağlarında olmuştur. Phe₁₀₅-Met₁₀₆ bağlarındaki parçalanma kimozin ve *R. miehei* proteinazı tarafından açığa çıkartılmıştır (Drohse ve Foltmann, 1989)].

2.2. Doğal Süt Proteinazları

Plazmin: Plazmin (fibrinolisin, EC 3.4.21.7) bir çok çalışmanın konusunu oluşturmuştur (Grufferty ve Fox, 1988). Plazminin fizyolojik rolü fibrin pıhtısının sıvılaştırılmasıdır. Bu aktif enzimleri içeren kompleks sistemin bileşenleri; zymojen, zymojen aktivatörleri ve enzimlerin inhibitörleridir. Bunların hepsi sütte mevcuttur. Plazmin, plazminojen ve plazmin gen aktivatörleri sütte kazein miselleri ile birlikte bulunur. Buna karşın inhibitörler serum fazda bulunur.

Plazmin, tripsin benzeri bir serin proteinazdır. Yaklaşık pH 7.5 ve 37 °C'de optimum aktivite gösterir. Peptid bağları için çok özeldir. Özellikle lizin ve daha az bir oranda arjinin için ve karboksil grubuna katkıda bulunur. Plazminin bütün kazein tipleri için aktif olduğu belirtilmiştir. Fakat özellikle α ₂- ve β -kazein üzerinde daha fazla etkilidir. β -kazein fraksiyonunda asıl parçalanmış bağlar: Lys₂₆-Lys₂₉, Lys₁₀₅-His₁₀₆ ve Lys₁₀₇-Glu₁₀₈ polipeptidlerin oluşmasıyla, β -kazein f29-209 (g1-CN), f106-209 (g2-CN) ve f108-209 (g3-CN), β -CN f1-105 ve f1-107 (proteoz-pepton 5), β -CN f29-105 ve f 29-107 (proteoz-pepton 8-yavaş), ve β -CN f1-28 (proteoz-pepton 8-hızlı) dir (Eigel ve ark., 1984). Bu parçalanmış bağlara ilave olarak Lys₁₁₃-Try₁₁₄ ve Arg₁₈₃-Asp₁₈₄ bağlarında varlığı belirlenmiştir (Fox ve ark., 1994). Plazmin α ₂-kazeini peynirde parçaladığı belirtilmiştir. Parçalanmış bu bağlar; Lys₂₁-Gls₂₂, Lys₂₄-Asn₂₅, Arg₁₁₄-Asn₁₁₅, Lys₁₄₉-Lys₁₅₀, Lys₁₅₀-Thr₁₅₁, Lys₁₈₁-Thr₁₈₂, Lys₁₈₈-Aln₁₈₉ ve Lys₁₉₇-Thr₁₉₈ (Visser ve ark., 1989; Le Bars ve Gripon, 1989) ve sonuçta üç tanesi potansiyel olarak acı tatlı (α ₂-CN f198-207, f182-207 ve f 189-207) 14 peptid açığa çıkardığı belirtilmiştir (Le Bars ve Gripon, 1989). Plazminin α ₂- ve β -kazeine nazaran α ₁-kazein üzerinde daha az aktivite göstermesine rağmen κ -kazein, minör kazein bileşikleri oluşmuş α ₂-kazein üzerindeki aktivitesinden kaynaklandığı belirtilmiştir.

(Armutis ve Eigel, 1982). Çözeltide α_{s1} - kazein üzerine plazminin spesifik özellikleri Le Bars ve Gripon (1989) ve McSweeney (1993b) tarafından açıklanmıştır. Buna göre plazminin α_{s1} -kazeinin bağlarını koparma şeklinde açıklanmıştır. Bu bağlar; Arg₂₂-Phe₂₃, Arg₉₀-Try₉₁, Lys₁₀₂-Lys₁₀₃, Lys₁₀₃-Try₁₀₄, Lys₁₀₅-Val₁₀₆, Lys₁₂₄-Glu₁₂₅ ve Arg₁₅₁-Gln₁₅₂ dir.

Bir çok lisin kalıntısı içermesine rağmen κ -kazein üzerine plazminin aktivitesi çok düşüktür. Eigel (1977) α_{s1} -kazeinin hidrolizi için uygun şartlar altında α - kazeinin hidrolizasyonunun olmadığını belirtmiştir. Ancak, Andrews ve Alichanidis (1983) yaptıkları çalışma sonucunda κ -kazeinden orijinenen PAGE'le belirlenen ve 27 °C'de 7 gün depolanan pastörize sütlerde sütün doğal enzimi olan plazminin %4 oranında peptid ürettiği belirlenmiştir. Plazminin κ - kazein üzerine spesifik etkileri belirlenmemiştir.

Katepsin-D: Sütteki bu doğal asit proteinaz araştırmacıların çok fazla ilgisini çekmemiştir. Bu enzimin aktivitesi ilk defa Kaminogawa ve Yamauchi (1972) tarafından belirlenmiştir. Bu çalışmada adı geçen enzim izole edilip özellikleri belirlenmiş ve katepsin-D (EC 3.4.23.5)'nin lizozomal asit proteinazla benzer özellikler gösterdiği üzerinde durulmuştur. Sütte prokatepsin-D'nin bulunduğu belirtilmiştir (Larsen ve ark., 1993). Katepsin - D kısmen ısıya dayanıklı (70 °C'de 10 dakikada tamamen inaktive olur) ve optimum pH'sinin 4.0 olduğu Kaminogawa ve Yamauchi (1972) tarafından yapılan çalışmada belirlenmiştir. Sütün asit proteinazı (Kaminogawa ve Yamauchi,1972) veya kimozin ile benzer özellikler gösteren katepsin D (McSweeney ve ark., 1995) ile ilgili yapılan çalışmalarda bu enzimlerin ilave edildiği ortamlardaki kazein fraksiyonunun elektroforetogram sonuçlarında, kazein fraksiyonları üzerine katepsin-D'nin etkisi belirlenmemiş ve bu enzimin pHTılaştırma aktivitesinde çok düşük olduğu gözlemlenmiştir (McSweeney ve ark., 1995).

Diğer doğal süt proteinazları: Sütte bulunan diğer minör proteolitik enzimlerin (trombin ve lösin amino peptidaz dahil) varlığından bahsedilmiştir (Reimerdes, 1983) katepsin-D ve ilave olarak somatik hücrelerden gelen diğer proteolitik enzimler peynirde proteolize katkıda bulunurlar. Verdi ve Barbano, (1988) somatik hücreler veya plazminlerin sütteki kazein fraksiyonlarının parçalanması üzerine yaptıkları araştırmada somatik hücre proteinazı ve plazminin kesinlikle farklı peptid açığa çıkardığını belirtmiş ve plazmin inhibitör 6 - aminoheksanoik asidin plazminden etkilenmeksizin somatik hücre proteinazının aktivitesini belirlemeye uygun olduğu belirtmiştir. Somatik hücre proteinazları plazminojeni aktive edebilme yeteneğinde olduğu ve bu durumun peynirde farklı seviyelerde proteolizi etkileyebileceği belirtilmiştir (Verdi ve Barbano 1991a). Lökosit proteinazlarının β -kazein üzerine pH 6.6'da pH 5.2'den daha aktif olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, daha düşük pH'da onların aktivitesi peynir olgunlaşması esnasında daha aktif olabileceği düşünülmektedir (Verdi ve Barbano,1991b). Suzuki ve Katoh (1990) sütte iki farklı sistein proteinazının olduğunu (45kDa ve >150kDa) belirlemiştir. Bu araştırmacılar belirledikleri bu proteinazları somatik hücrelerden kaynaklandığını ve mastitisli sütlerde bunların miktarının arttığını belirlemişlerdir.

Grieve ve Kitchen (1985) lökosit proteinazları plazmin ve bazı psikrotrofik proteinazların kazeinler üzerine etkisini karşılaştırmışlardır. Lökosit ekstraktı kazeinleri $\alpha_{s1}>\beta$ - κ -kazein sırasıyla hidrolize etmiştir. Lökositlerden gelen nötral proteinazlar (kandan izole edilmiştir) sütün proteolizinde çok önemli gibi gözükmele birlikte bazı araştırmacılar tarafından kandan izole edilen lökositlerin süttten izole edilenlere oranla çok düşük proteolitik aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Verdi ve Barbano,1991b; Kelly, 1995). Kelly ve ark. (1995), aynı somatik hücre sayısı içeren ve farklı polimornükleer (PMN) lökosit sayısı içeren sütlerden yapılan Gouda peynirlerinin proteoliz seviyelerini karşılaştırmışlardır. Sonuçta, yüksek PMN seviyeli sütlerden yapılan peynirlerde α_{s1} -I-kazein (α_{s1} -CN f24-199) ve toplam serbest amino asitlerin daha hızlı açığa çıktığını belirlemişlerdir.

Sonuç olarak, bazı tip peynir çeşitlerinde (Cheddar ve Duch tip peynirlerde) temel proteolitik enzimlerin özellikleriyle ilgili önemli bilgiler mevcuttur. Bu proteolitik olayın tamamındaki amacın peynir kalitesine olumlu ve olumsuz yönden katkılarının belirlenmesidir. Peynir olgunlaşmasında çeşitli enzimler, proteolizde anahtar bir rol oynarsa da peynir kalitesine katkısı tam olarak bilinmemektedir. Olumsuz yönden bakıldığında aşırı proteolizden dolayı acılık ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca peynirin yapısının proteolizle açık olarak ilgisinin olduğu bilinmektedir. Ancak bu konuda yeterli çalışmanın olmadığı bilinmektedir.

3. KAYNAKLAR

- AİMUTUS, W.R. and Eigel, W.N., 1982. Identification of casein as plasmin - derived fragments of bovine κ 1-casein, *J.Dairy Sci.*, 65,175-181.
- AKIN, N., 1996. Peynir Yapımında Kullanılan Süt Pıhtılaştırıcı Enzimler ve Bunların Bazı Özellikleri. *Gıda*, 21(6) 435-442.
- AKIN, N., 2002, a. Peynirin Olgunlaşmasında Starter Kültürlerden Kaynaklanan Proteoliz. Türkiye 7. Gıda Kongresi 22-24 Mayıs 2002, Ankara. 829 - 838s.
- AKIN, N., 2002, b. Peynirin Olgunlaşmasında Starter Olmayan Laktik Asit Bakterilerinden Kaynaklanan Proteolizin. Türkiye 7. Gıda Kongresi 22-24 Mayıs 2002, Ankara. 839-846s.
- ANDREWS, A.T. and Alichanidis, E.1983. Proteolysis of Caseins and the Proteose Pepton Fraction of Bovine Milk, *J.Dairy Res.*, 50, 275-290.
- BİNES, V. B., Young, P., and Law, B. A., 1989. Comparison of Cheese Made with a Recombinant Calf Chymosin and with Standard Calf Rennet, *J. Dairy Res.*, 56, 657-664.
- BOUDJELLAB, N., Rolet - Repecaud, O., and Collins, J. - C., 1994. Detection of Residual Chymosin in Cheese by an Enzyme-linked Immunosorbent Assay, *J. Dairy Res.*, 61,101-109
- CARLES, C., and Ribadeau - Dumas, B., 1984. Kinetics of Action of Chymosin (rennin) on some Peptide Bonds of Bovine -casein, *Biochemistry*, 23,6839-6843.
- CARİES, C., and Ribadeau-Durnas, B., 1985. Kinetics of the Action of Chymosin (rennin) on a Peptide Bond of Bovine κ 1-casein: Comparison of the Behaviour of this Substrate with that of -caseins and -caseins, *FEBS Lett.*, 185, 282-286.
- CHEN, C. M., Jaeggi, S. S., and Johnson, M. E., 1996. Study of Cheddar Cheese Making and Yield Using a Protease from *Rhizomucor Miehei* Expressed in *Aspergillus oryza*, *J. Dairy Sci.*, 79,1210-1214.
- CREAMER, L. K., 1976. A further study of the action of rennin on β -casein, *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 11, 30-39.
- CREAMER, L. K. and Olson, N.F., 1982. Rheological Evaluation of Matureing Cheddar Cheese. *J. Food Sci.*, 41, 631-636,46.
- CREAMER, I. K., Lawrence, R. C., and Qilles, J., 1985. Effect of Acidification of Cheese Milk on the Resultant Cheddar Cheese, *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 20, 185-203.
- DALGLEİSH, D.G., 1992. The Enzymatic Coagulation of Milk, in "Advanced Dairy Chemistry," Vol.1 (P.F. Fox, ed.), Elsevier Applied Science, London, pp. 579 - 619.
- DALGLEİSH, D. G.1993. The Enzymatic Coagulation of Milk, in "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology," Vol. 1,2nd ed. (P. F. Fox, ed.), Chapman & Hall, London, pp.69-100.
- de JONG, L. 1976., Protein Breakdown in Soft Cheese and its Relation to Consistency. I. Proteolysis and Consistency of "Noordhollandse Meeshanger" Cheese. *Neth. Milk Dairy J.*, 30, 242-253
- DROHSE, H. B., and Foltmann, B., 1989. Specificity of Milk-Clotting Enzymes Towards Bovine κ -casein, *Biochim. Biophys. Acta*, 995, 221-224.
- EİGEL, W. N., 1977. Effect of Bovine Plasmin on α _{s1}-B and κ -A caseins, *J. Dairy Sci.*, 60,1399-1403.
- EİGEL, W. N., Butler, S. E., Ernstrorn, C. A., Farrell, H. M., Sr., Harwalkar, V. R., Jenness. R., and Whitney, R. McL., 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision, *J. Dairy Sci.*, 67, 1599-1631.
- FOLTRNANN, B., 1966. A Review on Prorennin and Rennin, *C.R. Trav. Lab. Carlsberg*, 35, 143-231.
- FOX, P. F., 1969. Milk-Clotting and Proteolytic Activities of Rennet and of bovine pepsin and porcine pepsin, *J. Dairy Res.*, 36, 427433.
- FOX, P. F., 1984. Proteolysis and protein-protein interactions in cheese manufacture, in "Developments in Food Proteins-3" (B. 3. F. Hudson, ed.), Elsevier Applied Science Publishers, London, pp.69-112.
- FOX, P. F., 1989. Proteolysis during cheese manufacture and ripening, *J. Dairy Sci.*, 72,1379-1400.
- FOX, P. F., and Mulvihill, D. M., 1990. Casein, in "Food Gels" (P. Harris, ed.), Elsevier Applied

- Science, London, pp.121-173.
- FOX, P. F., and Law, J., 1991. Enzymology of cheese ripening, *Food Biotechnol.*, 5, 239-262.
- FOX, P. F., Law, J., McSweeney, P. L. H., and Wallace, J., 1993. Biochemistry of cheese ripening, in "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology," Vol.I (P. F. Fox, ed.), Chapman & Hall, London, pp.389-438.
- FOX, P. F., Singh, T. K., and McSweeney, P. L. H., 1994. Proteolysis in cheese during ripening, in "Biochemistry of Milk Products" (A. T. Andrews and J. Varley, eds.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp.1-31.
- FOX, P. F., O'Connor, I. P., McSweeney, P. L. H., Guinee, T. P., and O'Brien, N.M., 1996. Cheese: Physical, chemical, biochemical and nutritional aspects, *Adv. Food Nutr. Res.*, 39, 163-328.
- GRAPPIN, R., Rank, T. C., and Olson, N. F., 1985. Primary proteolysis of cheese proteins during ripening, *J. Dairy Sci.*, 68, 531-540.
- GREEN, M. L., and Foster, P.O. M., 1974..Comparison of the rates of proteolysis during ripening of Cheddar cheeses made with calf rennet and swine pepsin as coagulants, *J. Dairy Res.*, 41, 269-282.
- GREEN, M. L., 1977. Reviews on the progress of dairy science: Milk coagulants, *J. Dairy Res.*, 44, 159-188.
- GRIEVE, P. A., and Kitchin, B. J., 1985. Proteolysis in milk: The significance of proteinases originating from milk leucocytes and a comparison of the action of leucocyte, bacteria and natural milk proteinases on the caseins, *J. Dairy Res.*, 52, 101-112.
- GRUFFERTY, M. B., and Fox, P. F., 1988. Milk alkaline proteinase: A review, *J. Dairy Res.*, 55, 609-630.
- HARBOE, M. K., 1992. Chymogen, a chymosin rennet manufactured by fermentation of *Aspergillus niger*, in Bulletin 269, International Dairy Federation, Brussels, pp. 3-7
- HICKS, C. L., O'Leary, S., and Bucy, J. 1988. Use of recombinant chymosin in the manufacture of Cheddar and Colby cheese, *J. Dairy Sci.*;71,1127-1131.
- HILL, R. D., Lahav, E., and Givol, D., 1974. A rennin-sensitive bond in α_{s1} - β -casein, *J. Dairy Res.*, 41, 147-153.
- HOLMES, D. G., Duersch, S. N., and Ernstrom, C. A., 1977. Distribution of milk clotting enzymes between curd and whey and their survival during Cheddar cheese making, *J. Dairy Sci.*, 60, 862 - 869.
- KAMINOGAWA, S., and Yamauchi, K., 1972. Acid protease of bovine milk, *Agric. Biol. Chem.*, 36, 2351 - 2356.
- KELLY, A. L., 1995. Variations in total and differential milk somatic cell counts and plasmin levels and their role in proteolysis and quality of milk and cheese, Ph.D. thesis, National University of Ireland, Cork.
- KELLY, A., Sheehan, S., Tiernan, D., Shattock, A., Joyce, P., and Foley, J., 1995. Bovine milk with PMN content and its effect on cheese quality, *Proc. 3rd IDF Mastitis Symp.*, Tel Aviv.
- LANE C. N.; Fox P. F.; Johnston, V. and McSweeney, P. L. H.. 1997. Contribution of Coagulant to Proteolysis and Textural Changes in Cheddar Cheese During Ripening. In *International Dairy Journal*, 7, 453-464.
- LARSEN, L. B., Boisen, A., and Petersen, T. E., 1993. Procathepsin D cannot autoactivate to cathepsin D at acid pH, *FEDS Lett.*, 319, 54-58.
- LE BARS, D., and Gripon, J.-C., 1989. Specificity of plasmin towards bovine κ 2-casein, *J. Dairy Res.* 56, 817-821.
- MATHESON, A. R., 1981. The immunochemical determination of chymosin activity in cheese, *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 16, 33-41
- McSWEENEY, P. L. H., Olson, N. F., Fox, P. F., Healy, A., and Hajrup, P., 1993a. Proteolytic specificity of chymosin on bovine α 1-casein, *J. Dairy Res.*, 60,401-412.
- McSWEENEY, P. L. H., Olson, N. F., Fox, P. F., Healy, A., and Hojrup, P., 1993b. Proteolytic specificity

- of plasmin on bovine α_{s1} -casein, *Food Biotechnol.*, 7, 143-158.
- McSWEENEY, P. L. H., Olson, N. F., Fox, P. F., and Healy, A., 1994. Proteolysis of bovine α_{s2} -casein by chymosin, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 119, 429-432.
- McSWEENEY, P. L. H. Fox, P. F. and Olson, N. F., 1995. Proteolysis of bovine caseins by cathepsin D: Preliminary observations and comparison with chymosin. *Int. Dairy J.*, 5, 321-336.
- MULVIHILL, D. M., and Fox, P. F., 1978. Proteolysis of bovine α_{s1} -casein by chymosin: Influence of pH, urea and sodium chloride, *Ir. J. Food Sci. Technol.*, 2, 135-139.
- MULVIHILL, D. M., and Fox, P. F., 1979. Proteolytic specificity of chymosin on bovine α_{s1} -casein, *J. Dairy Res.*, 46, 641-651.
- MULVIHILL, D. M., and Fox, P. F., 1980. Proteolysis of α_{s1} -casein by chymosin in dilute NaCl solutions and in Cheddar cheese, *Ir. J. Food Sci. Technol.*, 4, 13-23.
- NUNEZ, M., Medina, M., Gaye, P., Guillen, A. M., and Rodriguez-Mann, M. A., 1992. Effect of recombinant chymosin on ewes' milk coagulation and Manchego cheese characteristics, *J. Dairy Res.*, 59, 81-87.
- O'KEEFFE, A. M., Fox, P. F., and Daly, C., 1977. Denaturation of porcine pepsin during Cheddar cheese manufacture, *J. Dairy Res.*, 44, 335-343.
- O'KEEFFE, A. M., Fox, P. F., and Daly, C., 1978. Proteolysis in Cheddar cheese: Role of coagulant and starter bacteria, *J. Dairy Res.*, 45, 465-477.
- O'SULLIVAN, M., and Fox, P. F., 1991. Evaluation of microbial chymosin from genetically engineered *Kluyveromyces lactis*, *Food Biotechnol.*, 5, 1-32.
- PAHKALA, E., Pihlanto-Leppala, A., Laukkanen, M., and Antila, V., 1989. Decomposition of milk proteins during the ripening of cheese. 1 Enzymatic hydrolysis of α_{s1} -casein, *Meijeritieteenlinen Aikakauskirja*, 47, 39-47.
- PELLISSIER, J.-P., Mercier, J.-C., and Ribadeau-Dumas, B., 1974. Etude de la proteolyse des caseines α_{s1} - et β -bovines par la presure, *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 14, 343-362.
- PHELAN, J.A., 1985 Milk coagulants an evaluation of alternatives to Standard calf rennet. PhD. Thesis, National University of Ireland, Cork.
- RANK, T. C., Grappin, R., and Olson, N. F., 1985. Secondary proteolysis of cheese during ripening: A review, *J. Dairy Sci.*, 68, 801-805.
- RATTRAY, F. P., and Fox, P. F. and Healy, A., 1996. Specificity of an Extracellular Proteinase From *Brevibacterium Linens* ATCC 9174 on Bovine α_{s1} -Casein. In *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 501-506.
- REIMERDES, E. H., 1983. New aspects of naturally occurring proteases in bovine milk, *J. Dairy Sci.*, 66, 1591-1600.
- ROTHER, C. A. L., Harboc, M. K., and Martiny, S. C., 1977. Quantification of milk-clotting enzymes in 40 commercial bovine rennets, comparing rocket immunoelectrophoresis with an activity ratio assay, *J. Dairy Res.*, 44, 7-77.
- SINGH, H., and Creamer, L. K., 1990. A sensitive quantitative assay for milk coagulants in cheese and whey products, *J. Dairy Sci.*, 73, 1158-1165.
- SUZUKI, J., and Katoh, N., 1990. Cysteine protease in bovine milk capable of hydrolyzing casein as the substrate and elevation of the activity during the course of mastitis, *Japan. J. Vet. Sci.*, 52, 947-954.
- SWAISGOOD, H. E., 1992. Chemistry of the caseins. in "Advanced Dairy Chemistry-I: Proteins" (P. F. Fox, ed.), Elsevier Applied Science, London, pp.63-110.
- TAM, J.J., and Whitaker, S. R., 1972. Rates and extents of hydrolysis of several caseins by pepsin, rennin, *Endothia parasitica* proteinase and *Mucor pusillus* protease, *J. Dairy Sci.*, 55, 1523-1531.
- van den BERG, O., 1992. Fermentation-Produced Chymosin: Technological Aspects of Its Use for Cheesemaking, Bulletin 219, International Dairy Federation, Brussels, pp.13-17.
- van den BERG, O., and de Koning, P.3., 1990. Gouda cheesemaking with purified calf chymosin and

- microbiologically produced chymosin, *Neth. Milk Dairy J.*, 44, 189-205.
- VERDI, R. J., and Barbano, D. M., 1988. Preliminary investigation of the properties of somatic cell proteases, *J. Dairy Sci.*, 72, 534-538.
- VERDI, R. J., and Barbano, D. M., 1991a. Effect of coagulants, somatic cell enzymes and extracellular bacterial enzymes on plasminogen activation, *J. Dairy Sci.*, 74, 772-782.
- VERDI, R. J., and Barbano, D. M., 1991 b. Properties of proteases from milk somatic cells and blood leukocytes, *J. Dairy Sci.*, 74, 2077 - 2081.
- VISSER, S., and Slangen, K.J., 1977. On the specificity of chymosin (rennin) in its action on bovine κ -casein, *Neth. Milk Dairy J.*, 31, 16-30.
- VISSER, S., Slangen, K. I., Alting, A. C., and Vreeman, H. I., 1989. Specificity of bovine plasmin in its action on bovine κ -casein, *Milchwissenschaft*, 44, 335 - 339.