

PEYNİR YAPIMINDA KULLANILAN PIHTILAŞTIRICI ENZİMLER VE KAZEİN FRAKSİYONLARI ÜZERİNE ETKİLERİ

COAGULATING ENZYMES UTILIZED IN CHEESEMAKING AND THEIR EFFECTS ON CASEIN FRACTIONS

Muhammet DERVİŞOĞLU*, Oğuz AYDEMİR, Fehmi YAZICI

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Samsun

Geliş Tarihi: 10.11.2006

ÖZET: Peynir olgunlaşması sırasında gerçekleşen en karmaşık biyokimyasal olay proteolizdir. Pek çok peynir çeşidinde kazeinlerin başlangıç hidrolizi temel olarak pıhtılaştırıcı enzimden kaynaklanır. Sütü pıhtılaştırmak amacıyla kullanılan rennet enzimleri, seçilmiş proteinazların ham preparatlarıdır. Peynir üretiminin gittikçe artması ve hayvansal kaynaklı kimozinin bu artışa cevap verememesi sonucunda farklı pıhtılaştırıcı enzim kaynaklarına ihtiyaç duyulmuştur. Çalışmalar sığır, domuz ve tavuk pepsini; *Rhizomucor miehei*, *R. pusillus*, *Cryphonectria parasitica* ve *Cynara cardunculus* proteinazları üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmada, peynir yapımında kullanılan hayvansal, mikrobiyal, bitkisel ve rekombinant mikroorganizma kaynaklı süt pıhtılaştırıcı enzimler ve bunların kazeinler üzerine olan etkileri derlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Pıhtılaştırıcılar, proteoliz, kazein fraksiyonları

ABSTRACT: Proteolysis is the most complex biochemical event in cheese ripening. In many cheese varieties, the initial hydrolysis of caseins is mainly caused by the coagulating enzyme. Rennet enzymes used to coagulate milk are crude preparations of selected proteinases. Different coagulating enzyme alternatives are necessary as a result of the increase in cheese consumption and insufficient of animal rennet. The studies have been focused on bovine, porcine, and chicken pepsins and proteinases from *Rhizomucor miehei*, *R. pusillus*, *Cryphonectria parasitica* and *Cynara cardunculus*. In this study, the importance of animal, microbial, plant, and recombinant enzymes used in cheesemaking and their effects on caseins have been reviewed.

Key Words: Coagulants, proteolysis, casein fractions.

GİRİŞ

Proteoliz, peynirin olgunlaşması sırasında gerçekleşen üç temel biyokimyasal olaydan birisidir ve muhtemelen aroma ve tekstür gelişimi için en önemlisidir (1). Olgunlaşma sırasında önemli proteolitik enzim kaynakları; pıhtılaştırıcı, süt, starter laktik asit bakterileri (LAB), starter olmayan LAB (SOLAB), ikincil starterler ve belli durumlarda olgunlaştırmayı hızlandırmak için süte veya pıhtıya ilave edilen harici proteinaz ve peptidazlardır (2). Pek çok peynir çeşidinde kazeinlerin başlangıç hidrolizinin nedeni pıhtılaştırıcı enzim ve az da olsa plazmindir. Peynirin starter ve starter olmayan mikroflora enzimleri ile pıhtılaştırıcılar, sonradan parçalanmış büyük (suda çözünmeyen) ve orta (suda çözünür) boyutlu peptidlerin oluşumuna neden olurlar (3).

Sütü pek çok proteinaz pıhtılaştırmaya elverişlidir. Ancak bunların çoğunun süt pıhtılaştırma aktiviteleri aşırıdır. Bunlar pıhtıyı çok fazla hidrolize ederek verim kaybı ve kusurlara neden olurlar. Geleneksel olarak rennet enzimleri buzağı, kuzu ve oğlak midelerinden hazırlanır. Bu rennet enzimlerindeki başlıca proteinaz kimozindir. Dünya peynir üretimi arttığı ve beraberinde buzağı midesi azaldığından rennet tedariki yetersiz kalmıştır. Bunun dışında, sütü pıhtılaştırmaya elverişli pek çok proteinaz vardır, ancak bunlardan altı tanesi önem kazanabilmiştir. Bunlar; sığır, domuz ve tavuk pepsini; *Rhizomucor miehei*, *R. pusillus* ve *Cryphonectria parasitica* proteinazlarıdır (4).

*E-posta: mderviso@omu.edu.tr

Peynir teknolojisinde sütün enzimatik yolla pıhtılaştırılmasında hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklardan sağlanan enzimler kullanılır. Bunların tümü asit proteazlardır. Optimum aktivitelerini asit pH'larda gösterebilen bu enzimler, hem sütün pıhtılaşmasını sağlarlar, hem de peynir olgunlaşması ve kalitesini belirgin ölçüde etkilerler (5). Genetik çalışmalarda buzağı kimoziin geni, seçilmiş prokaryotik ve ökaryotik organizmalara klonlanmıştır. Böylelikle sınırsız miktarda kaliteli mikrobiyal rennet tedariki artık mümkündür (6).

Günümüzde dünya pazarında ticari olarak rekombinant kimoziin hakimken, ülkemizde ise hayvansal rennet tercih edilmektedir. Ülkemizde rekombinant kimoziin kullanımı da artmaktadır.

Hayvansal Kaynaklı Pıhtılaştırıcılar

Bu amaçla kullanılan hayvansal kaynaklı proteazlar kimoziin (rennin), pepsin, tripsin ve kimotripsindir. Tripsin ve kimotripsinin proteolitik etkileri, peynir yapım koşullarında çok aşırı olmaktadır. Peynirde çoğu kez acı peptidlerin oluşmasına neden olurlar, hatta bazen pıhtıyı tekrar parçalayabilirler. Bu nedenle en yaygın kullanılan kimoziin'dir. Buzağı şirdeninden elde edilen peynir pıhtılaştırıcıları (mayaları) genellikle %88-94 kimoziin, %6-12 pepsin içerir. Bu iki enzim dışında az miktarlarda da kimotripsin, tripsin ve lipaz enzimleri de bulunur (5).

Kimoziin, hücre içinde preprokimoziin olarak sentezlenir. Bunu 42 amino asitli pro- kısmı takip eder. Kimoziin inaktif zimojen (prokimoziin) şeklinde salgılanır. Asidik pH'da ön madde otokatalitik aktivasyonla kimoziin veya pseudokimoziine dönüşür. Hem kimoziin hem de pseudokimoziin süt pıhtılaştırıcı aktivite gösterir (7). Prokimoziin, 365 amino asitten oluşan tek zincirli bir polipeptiddir. Pepsin ile, Phe₄₂-Gly₄₃ peptid bağından parçalanarak, pH 5'in altında (8) 323 amino asitli olgun kimoziine dönüşür (9). pH 11'in üzerinde ise, biçimsel değişim nedeniyle stabilitesi bozulur. Pseudokimoziin asidik pH'da günlerce stabil kalabilirken, pH 4.5'in üzerinde hızlı bir şekilde kimoziine dönüşür (8). Kimoziin, pH 5.3-6.3 değerlerinde oldukça stabildir. Asidik koşullarda ve pH 7'nin üzerinde aktivitesi büyük ölçüde azalır. Optimum sıcaklığı 41°C'dir. 20°C'nin altında ve 50°C'nin üzerinde pıhtılaştırma gücü çok azdır (5).

Kimoziinin özgül aktiviteleri farklı üç izoenzimi (A, B, C) vardır. Kimoziinde A ve B'nin miktarı çok, C'nin ise azdır. Kimoziin A, kimoziin B'ye göre daha aktiftir (5). A ve B birbirinden bir aminoasit farklılığı gösterir. C ise üç aminoasit bölgesi eksik olan (Asp₂₄₄-Phe₂₄₆), A'nın bir parçalanma ürünü olarak görülür (4).

Pepsin, midenin alt kısmındaki mukoza hücrelerinde inaktif pepsinojen halinde bulunur. Bu hücrelerden salgılanan pepsinojen, midenin asitli ortamında, 42 aminoasit uzunluğundaki küçük bir polipeptidin kopması ile etkin şekli olan pepsine dönüşür. Pepsinin en etkin olduğu pH değeri 1.7-2.3'tür. pH 7'nin üzerinde ise hızla inaktive olur. Kimoziin enzimine göre daha düşük pH'larda aktivite gösterdiği için sütün normal pH'sında pıhtılaşma süresinin uzamasına neden olur. Buna karşın proteolitik aktivitesi yüksektir. Dolayısıyla peynirlerde olgunlaşma süresince acı tat bileşenlerinin oluşumuna yol açar. Bu durum tek başına saf kullanımını güçleştirir. Diğer taraftan peynir olgunlaşmasında ortalama pH değeri (4.9-5.2) pepsinin optimum pH değerinin (pH2) üzerinde olduğu için pepsin ile üretilen peynirler kimoziinle üretilenlere göre biraz daha yavaş olgunlaşırlar. Bu nedenle iki enzimin karışımlarının kullanılması tercih edilmektedir. Piyasada değişik oranlarda pepsin ve kimoziin karışımları içeren peynir mayaları mevcuttur (5).

İyi kaliteli buzağı renneti yaklaşık %10 pepsin içerir ve pek çok ticari buzağı renneti yaklaşık % 50 pepsin içerir. Bunun proteolitik spesifliği kimoziine benzerdir ve peynir kalitesi ve verimi yönünden iyi sonuçlar verir. Ancak bazen, pıhtılaşmanın şirden mayasına göre biraz daha yavaş, pıhtının yumuşak, peynir suyuyla yağ kaybının yüksek ve peynir yapısında farklılıkların olması mümkündür (10).

Pepsin, sığır, domuz, koyun ve tavuktan elde edilmektedir. Bu kaynaklardan elde edilen pepsinlerin pıhtılaştırma aktivitelerinin proteolitik aktivitelerine oranı, kimoziininkinden farklıdır. Örneğin domuz pepsini 6.68 pH'dan daha yüksek pH'larda çok az veya hiç aktivite göstermez. pH'ya karşı çok duyarlı olan domuz pepsini, peynir üretimi sırasında denatüre olması nedeniyle olgunlaşma süresince proteolize katkısı çok azdır. Bu olumsuz özellikleri nedeniyle domuz pepsini çoğu pazardan çekilmiştir (10).

Tavuk pepsin özütü ise sadece İsrail'de kullanılmakta ve bazı peynir çeşitlerinde iyi sonuçlar sağladığı belirtilmektedir. Fakat bu tip enzimin, olgunlaşma süresi uzun olan peynirlerde kullanımı kalite ve verim açısından pek uygun bulunmamaktadır (5). Rennet yerine kullanılan enzimlerin en uygunsuz olanlarındandır. Süt pıhtılaştırma aktivitesinin proteolitik aktiviteye oranı (SPA:PA) düşük olduğundan, Cheddar peynirinde olgunlaşma sırasında aroma, yapı ve tekstür kusurlarına yol açarak α_{s1} - ve β -kazeinlerin aşırı parçalanmasına neden olur (11). Sığır pepsini bu yönden daha kullanışlıdır (10).

Bitkisel pıhtılaştırıcılar

Pek çok aspartik ve diğer tip proteinazlar bitkilerden elde edilir. Bunların bir kısmı pıhtılaştırıcı olarak denenmiştir (*Benincasa cerifera*, *Calotropis procera*, *Dieffenbachia maculata*, *Solanum dobium*'un meyve kısımları, *Centaurea calcitrapa*, ve *Cynara cardunculus* çiçekleri) (3). İncir (*Ficus carica*, fisin), yaban enginarı – kenger otu (*Cynara cardunculus* L., kardozin), ananas (*Ananas sativa*) ve hintyağı tohumu (*Ricinus communis*) gibi bitkilerden elde edilen proteazların sütü pıhtılaştırabildiği saptanmıştır. Ancak sığır sütünden peynir yapımında kullanımları, genel olarak başarısızdır. Çünkü süt pıhtılaştırma aktiviteleri aşırı proteolitik bulunmuştur. Aşırı proteoliz peynir veriminde azalmaya ve olgun peynirde aroma (acılık) ve tekstür (yumuşama) kusurlarına neden olabilir (12).

Hayvansal ve mikrobiyal pıhtılaştırıcılar daha dengeli bir ürün oluştururlar. Aynı zamanda bitkilerin toplanması pahalı ve işgücü gerektirdiğinden bitkisel pıhtılaştırıcılara göre ucuzdurlar ve kullanımları kolaydır. Ancak dini, diyet, genetik değişiklik vb. tepkiler sonucunda hayvansal rennet sorgulanmakta, bitkisel pıhtılaştırıcılara olan ilgi artmaktadır. Bitkisel pıhtılaştırıcılar küçük mandıralar veya çiftliklerde usta yapımı peynirlerde tercih edilmekten öteye gidememiştir (13). Süt pıhtılaştırma aktivitesine sahip, *Cynara cardunculus* kurutulmuş çiçeklerinden elde edilen proteaz, diğer bitkisel proteazlardan farklı olarak, yüzyıllardır İber Yarımadası'nda La Serena, Serra da Estrela, Guia, Los Pedroches gibi geleneksel peynirlerin (3), Nijerya, Hindistan ve Sudan'da bazı yumuşak peynirlerin üretiminde kullanılmaktadır (5).

Mikrobiyal proteazlar

Sütü pıhtılaştırmak amacıyla rennet yerine kullanılan en yaygın mikrobiyal proteazlar; *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* ve *Cryphonectria parasitica* gibi kaynakların kültivasyonu ile elde edilirler ve şirden enzimine oldukça benzerler (3). Bu üç fungal rennetin α_{s1} - ve β -kazein üzerindeki spesifikliğı buzağı kimozininkinden oldukça farklı olmasına rağmen, genellikle kabul edilebilir peynirler verirler (10). Mikrobiyal rennetler hem ekonomiktir hem de şirden mayası ile üretilen peynirlere yakın özellikte ürün verirler. Bu nedenle, süt pıhtılaştırıcı olarak buzağı renneti yerine kullanılabilir uygun kaynaklardır (5).

Genetik modifiye mikroorganizma kaynaklı kimozin

Buzağı kimozin geni seçilmiş bakteri, maya ve küflere klonlanmıştır. Genetik olarak değiştirilmiş *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* (Gist-brocades), *Escherichia coli* (Pfizer) ve *Aspergillus nidulans* (Hansens)'dan elde edilen kimozinler ticari olarak bulunabilir ve çok iyi sonuçlarla yoğun bir şekilde kullanılır. Ancak bu ürünlerin kullanımlarına henüz bütün ülkelerde izin verilmemiştir. Buzağı rennetinin süt pıhtılaştırma aktivitesinin % 5-50'si pepsinden kaynaklanabilirken, mikrobiyal rekombinant kimozin preparatları pepsin içermez. Böylelikle, bu iki enzimle yapılan peynirlerin proteolizleri arasında küçük farklılıklar gözlenir. En dikkat çeken, buzağı renneti ile yapılan peynirde pepsin aktivitesi nedeniyle, α_{s1} -kazein f110-199 peptidinin oluşumudur (4).

Rekombinant kimozinin sağladığı avantajları şöyle sıralayabiliriz: (a) Artan peynir mayası ihtiyacı buzağıları kesmeden karşılanabilir, (b) büyük miktarda üretim yapılabilir, (c) standart kalite ve maksimum verim sağlanır, (d) enzim saflığı yüksek ve pepsin içermediği için olgunlaşma süreci kusursuz gerçekleşebilir, (e) Kalitesiz şirden kullanımından kaynaklanan peynir kusurlarına rastlanmaz (5).

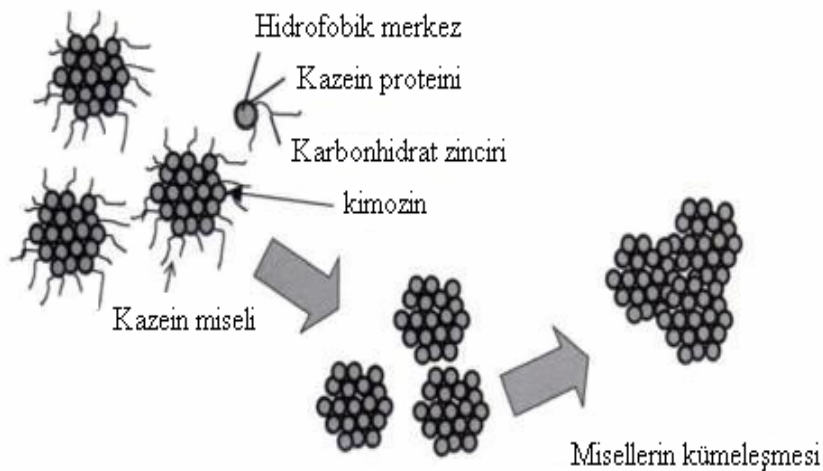
Kazein misellerinin enzimle pıhtılaşması

Sütün pıhtılaşması, kazeinlerin belli özelliklerine bağlı olarak gerçekleşir. Sığır kazeini 4 ana fraksiyondan (α_{s1} , α_{s2} , β , κ -kazein sırasıyla 40:10:35:12 ortalama oranda) oluşur. Bunlar sırasıyla 8-9, 10-13, 4-5 ve 1-2 mol P/mol içerir. Yüksek fosfat içerikleri nedeniyle, α_{s1} , α_{s2} ve β -kazeinler; Ca^{2+} ile kuvvetli bağ yaparlar ve Ca^{2+} 6 mM'dan yüksek olduğunda çökerler. κ -kazein ise Ca^{2+} ile zayıf bağ yapar ve yüksek oranda Ca^{2+} bulunduğu çözünür. κ -kazein aynı zamanda α_{s1} , α_{s2} ve β -kazeinler ile hidrofobik olarak da tepkime verebilir. κ -kazein, kalsiyuma hassas olan kazeinleri kümeleşmeye karşı korur. κ -kazein kendi ağırlığının yaklaşık 10 katı kadar diğer kazein fraksiyonlarını pıhtılaşmaya karşı koruyabilmektedir. Çoğu kazein miseli modelinde, κ -kazein genel olarak miselin dış yüzeyinde olmakla birlikte, Ca^{2+} 'a hassas α_{s1} , α_{s2} ve β -kazeinlerin miselin iç bölgelerinde yerleşim gösterecek şekilde hidrofobik olarak etkileşim gösterdikleri düşünülmektedir (4).

Enzimatik pıhtılaşma iki safhada meydana gelir. Birinci safhada, sterik engelle stabilize edilen κ -kazeinin hidrofobik tüylü yapısı, Phe₁₀₅-Met₁₀₆ bağından parçalanır. İkinci aşama, κ -kazeinin %85-90'nı parçalandığında başlar ve değişen protein misellerinin kümeleşmesine yol açar (Şekil 1). Böylece κ -kazein, arta kalan kazeinat kompleksini stabilize etme yeteneğini kaybeder. Sonuçta çözünür hidrofobik para- κ -kazein (1-105) ve glikomakropeptidler (106-169) oluşur. Kazein misellerinin kümeleşmesi devam ettiğinden, yağ globülleri, su ve suda çözünen maddeleri tutan yumuşak bir ağ oluşur. Misel üzerinde kalan para- κ -kazein, halen α - ve β -kazeine bağlı durumdadır. Ancak, yüksek derecede bazik ve hidrofobik karaktere sahip olması miselin kararlılığının bozulmasına neden olur. İkinci safhada, modifiye olan misellerin bir araya gelmesi ile gerçekleşen jel oluşumu, büyük oranda sütün sıcaklığına ve kalsiyum miktarına bağlıdır. Pıhtılaşma oranı da, büyük oranda enzim konsantrasyonu ve aktivitesine bağlıdır. Bu etkenlerin her ikisindeki artış, pıhtılaşma süresini azaltırken, pıhtı sıklığını artırır. Misellerin kümeleşme nedeni açık olmamakla birlikte, iki hipotez bulunmaktadır. Birisi, para- κ -kazeinler arasında hidrofobik bağlanma meydana gelmesi diğeri ise α - ve β -kazeinlere kalsiyum ve kalsiyum fosfat bağlanmasıdır (14).

Enzimlerin kazein fraksiyonları üzerine etkileri

Peynirde buzağı renneti etkinliği için optimum pH yaklaşık 5'tir. α_{s1} -kazein hızlı bir şekilde, β -kazein ise çok daha yavaş bir şekilde parçalanır. Suda ortalama % 4 tuz içeriği α_{s1} -kazeinin parçalanmasını desteklerken, daha yüksek tuz içerikleri yavaşlatır. β -kazein parçalanması düşük tuz içeriklerinde her zaman yavaşlar. Buzağı rennetinin yapmış olduğu proteoliz, peynir olgunlaştırma sıcaklığından çok az etkilenir. 4°C ile 14°C



Şekil 1. Kazein misellerinin kimozin etkili kümeleşmesi (15)

arasında çok fazla değişmemektedir (16). Kimozinin spesifikliği ve peptid bağlarına ulaşabilirliği, bu enzim tarafından katalizlenen proteolizin oranını etkiler. Kimozin çoğunlukla lösin-X ve fenilalanin-X bağlarını kırar. Ancak kimozin, α_{s1} -kazeini β -kazeinden daha fazla parçalamaktadır. Bunun, peynir ortamındaki protein konformasyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Peynirde bulunan NaCl, β -kazeinin topaklaşmasına neden olmakta ve enzimin hassas bağlara ulaşması muhtemelen bu şekilde zorlaşmaktadır. Peynirde nemin azalması da bu etkiyi arttırmaktadır (17).

Peynir yapımında kimozinin öncelikli görevi, miseli stabilize eden κ -kazeinin Phe₁₀₅-Met₁₀₆ bağını spesifik olarak hidrolize ederek sütü pıhtılaştırmaktır (3). Kimozinin tüm kazeinler üzerine spesifikliği bilinmektedir. Kimozin, çözelti içerisinde β -kazeini 7 bölgeden parçalar. Bu bölgelerin çoğu hidrofobik C-terminaline yakın yerdedir. Bu bölgelerin parçalanması (örn., Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃) acılığa yol açan kısa hidrofobik peptidlerin oluşumuna neden olabilir (2). Çözelti içerisindeki β -kazeinde bulunan bazı peptid bağları, sırasıyla Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃, Ala₁₈₉-Phe₁₉₀, Leu₁₆₃-Ser₁₆₄ ve Leu₁₃₉-Leu₁₄₀, kimozin tarafından çok hızlı bir şekilde hidrolize edilir. Ancak bu bağlar peynirde çok sınırlı olarak hidrolize edilir veya hiç edilmezler. Bunun nedeni muhtemelen, β -kazeinin C-terminal bölgesinin çok hidrofobik olması ve peynirde hidrofobik olarak devam eden etkileşimlere uğramasıdır. Bu etkileşimler tuzdan önemli derecede etkilenir (4). β -kazeinin, kimozin tarafından hidrolizi, %5 NaCl ile kuvvetli şekilde, % 10 NaCl ile tamamen önlenir. % 5 NaCl, pek çok peynir çeşidinin sulu fazında bulunan yaygın bir konsantrasyondur. Bu engellemenin sebebi açık değildir fakat benzer bir etki sakaroz ve gliserol tarafından da gösterilir. β -kazeinin C-terminal bölgesi çok hidrofobiktir ve sıcaklığa bağlı etkileşimlere uğrar. Bu ilişkilerin peynirde oluşması ve kimozinin, bu bölgedeki kimozine hassas bağlara ulaşamaz hale gelmesi muhtemeldir. Büyük ihtimalle bu etki su aktivitesi ile ilgilidir (1). Peynirde β -kazein hidrolizasyonunun önlenmek istenmesinin nedeni β -kazein f193-209 peptidi ve fragmentlerinin çok acı olmasıdır (4). Çözeltideki β -kazein, 192-193, 189-190, 163-164 ve 139-140 bağlarının hidrolize olması sonucunda sırasıyla β -I¹, β -I¹¹, β -II ve β -III peptidleri oluşur. 165-166 ve 167-168 bağları, β -II'den elektroforetik olarak ayırt edilemeyen peptidler oluşturacak şekilde hidrolize edilebilir. Düşük pH'da (2-3), 127-128 bağının hidrolizasyonunda, β -IV de oluşabilir (1).

Çözelti içerisindeki α_{s1} -kazein, hidrolizi pH ve NaCl'e bağlı olmakla birlikte kimozine hassas pek çok bağ içerir. β -kazeinin aksine, % 5'e kadar tuz konsantrasyonu α_{s1} -kazeinin hidrolizasyonunu destekler ve % 20 NaCl varlığında bile önemli sayılabilecek bir proteoliz gerçekleşebilir (1). Kimozinin peynirde α_{s1} -kazein üzerindeki başlıca parçalama noktaları, hızlı bir şekilde ve tamamen hidrolize edilen Phe₂₃-Phe₂₄ ve çok yoğun bir şekilde parçalanan Leu₁₀₁-Lys₁₀₂ bağıdır. Bunun yanında Phe₉₈-Gly₉₉ ve Leu₉₈-Leu₉₉ bölgeleri de belli oranda parçalanır. Sürpriz bir şekilde, çözelti içerisindeki α_{s1} -kazeinde ikinci en hassas bağ olan Trp₁₆₄-Tyr₁₆₅ bağının peynirde hidrolize olduğu görülmez. Küçük peptidler (α_{s1} -kazein f1-23) peynirde birikme göstermez, ancak suya bağlı bir spesifiklikle hücre zarı ile ilişkili lactococcal proteinazlarca hızlı bir şekilde hidrolize edilirler (4). α_{s1} -kazein ilk olarak α_{s1} -kazein (f1-23) ve α_{s1} -I (f24-199)'e, daha sonra α_{s1} -V (f30-199), α_{s1} -VII (f56-179) ve az miktarda α_{s1} -II (f24-169)'ye hidrolize olur (1).

α_{s2} -kazein, α_{s1} -kazeine göre kimozin hidrolizasyonuna karşı daha dirençlidir. Kimozinin α_{s1} -kazein üzerindeki parçalama bölgesi, molekülün hidrofobik kısımlarıyla sınırlanır (2). Bunlar Phe₈₈-Tyr₈₉, Tyr₉₅-Leu₉₆, Gln₉₇-Tyr₉₈, Tyr₉₈-Leu₉₉, Phe₁₆₃-Leu₁₆₄, Phe₁₇₄-Ala₁₇₅ ve Tyr₁₇₉-Leu₁₈₀ noktalarıdır (18).

Para- κ -kazein, kimozinle parçalanma özelliğine sahip pek çok bölgeye sahip olmasına rağmen, hem çözelti hem de peynirde hidrolize olduğu görülmez. Bu muhtemelen, diğer kazeinlere kıyasla κ -kazeinin ikincil yapısının nispeten daha fazla olduğunu gösterir (2). γ -kazeinler, β -kazeinin kimozine hassas bağlarını içermelerine rağmen, peynirde olgunlaşma sırasında artış gösterirler. Muhtemelen bu bağlar β -kazeinde olduklarından bunlara ulaşamaz (1). κ -kazein ve α_{s2} -kazein sistin içerdiklerinden sütte disüfit bağına sahip proteinlerdir. Peynirdeki redoks potansiyeli, disüfit/tiyol oranını etkilediğinden oluşan çapraz bağların miktarını ve dolaylı olarak kimozinin hassas bağlara ulaşma kapasitesini de belirlemektedir (17).

Mikrobiyal rennetle üretilen peynirde α_{s1} -I kazein birikimi görülmez (1). Trujillo ve ark. (19) koyun kazeini üzerine buzağı ve kuzu rennet enzimleri, sığır kimozin ve pepsini ile *R. meihe* ve *C. parasitica* proteazlarının etkilerini inceledikleri çalışmalarında, en düşük proteolizi kuzu renneti, en yüksek proteolizi ise *C. parasitica* proteazının gösterdiğini bildirmişlerdir. Bütün bu enzimler, α_{s1} - ve β -kazeinlerin ilk parçalanma ürünlerinin (sırasıyla α_{s1} -I ve β -I kazein) oluşumuna neden olacak şekilde koyun kazeinini hidrolize etmişlerdir. Ancak *C. parasitica*, β -kazeinden daha düşük elektroforetik hareketlilikte bir seri parçalanma ürünleri de oluşturmuştur. *C. parasitica* proteinazı β -kazeinin Phe₁₀₅-Met₁₀₆ bağından çok Ser₁₀₄-Phe₁₀₅ bağına parçalar. Phe₁₀₅-Met₁₀₆ bağına kimozin ve *R. miehei* proteinazları parçalar (3). *R. pusillus* proteazı hem buzağı renneti hem de *R. miehei* proteazından daha yüksek proteolitik etkiye sahiptir. Sütte kalsiyum konsantrasyonunun artması *R. pusillus* proteazı ile pıhtılaşma süresini kısaltır. Ancak aktivite pH'ya diğer pıhtılaştırıcılar kadar bağlı değildir. Çoğunlukla büyük peptidler oluşturur (oysa buzağı renneti çok sayıda küçük peptidler oluşturmaktadır). *R. pusillus* proteazı sert bir pıhtı oluşturduğu için peynir suyuna fazla miktarda yağ geçer; dolayısıyla randıman biraz düşer. Ancak bazı araştırmacılar gerek duysal gerekse randıman açısından önemli bir sorun bulunmadığını bildirmişlerdir (5). *R. miehei* proteazı, α_{s1} -kazeini başlıca Phe₂₃-Phe₂₄, Met₁₂₃-Lys₁₂₄ ve Tyr₁₆₅-Tyr₁₆₆, β -kazeini ise Glu₃₁-Lys₃₂, Val₅₈-Val₅₉, Met₉₃-Gly₉₄ ve Phe₁₉₀-Leu₁₉₁ noktalarından parçalar (4). *R. miehei* proteazının NaCl yokluğunda, izole edilmiş α_{s1} -kazein üzerine etkinliğinin oldukça düşük olduğu ve bu etkinliğin %2 NaCl varlığı ile önemli derecede uyarıldığı belirtilmiştir (1). *C. parasitica* proteinazı peynirde β -kazein üzerine kimozin, pepsin veya *Rhizomucor* proteinazlarından çok daha etkilidir. Ancak kazeinler üzerine spesifikliğı belirlenememiştir (4).

Cynara cardunculus'dan elde edilen ekstraktların, kardozin A ve kardozin B diye iki proteinaz içerdiğini bildirilmiştir. Kardozin A'nın kimozine, kardozin B'nin ise pepsine benzediği bildirilmiştir. *C. cardunculus*'un kurutulmuş çiçeklerinin ekstraktlarından elde edilen enzimler, κ -kazeinin Phe₁₀₅-Met₁₀₆ bağına parçalar. Macedo ve ark. (20), *C. cardunculus* proteazlarının dokuz bağı parçalayabildiğini (Phe₂₃-Phe₂₄, Tyr₁₅₃-Tyr₁₅₄, Trp₁₆₄-Tyr₁₆₅, Tyr₁₆₅-Tyr₁₆₆, Tyr₁₆₆-Val₁₆₇, Phe₁₄₅-Tyr₁₄₆, Leu₁₄₉-Phe₁₅₀, Leu₁₅₆-Asp₁₅₇ ve Ala₁₆₃-Trp₁₆₄) buna karşılık kimozinin aynı deneme koşullarında α_{s1} -kazeinin yalnızca Phe₂₃-Phe₂₄ bağına parçalayabildiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar *C. cardunculus* proteazlarının, sığır β -kazeinini altı noktadan parçaladığını ve bunların azalan hassasiyet sıralamasına göre Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃, Leu₁₉₁-Leu₁₉₂, Leu₁₆₅-Ser₁₆₆, Phe₁₉₀-Leu₁₉₁, Ala₁₈₉-Phe₁₉₀ ve Leu₁₂₇-Thr₁₂₈ bağları olduğunu bildirirlerken, Carles ve Ribadeau-Dumas (21), kimozinin aynı deneme koşullarında sadece Ala₁₈₉-Phe₁₉₀ ve Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ bağlarını parçaladığını bildirmişlerdir. Sousa ve Malcata (22), *C. cardunculus* proteazlarının, koyun ve keçi kazeinlerinde sırasıyla α_{s2} -kazeini Phe₈₈-Tyr₈₉ ve Ser₉-Ser₁₀, Phe₈₈-Tyr₈₉ ve Tyr₁₇₉-Leu₁₈₀ bağlarından parçaladığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, NaCl içermeyen 6.5 veya 5.5 pH'da ve % 5 NaCl içeren 5.2 pH'da *C. cardunculus* proteazlarının koyun β -kazeinini esas olarak Leu₁₂₇-Thr₁₂₈ ve Leu₁₉₀-Tyr₁₉₁ bağlarından, keçi kazeinini ise Glu₁₀₀-Thr₁₀₁, Leu₁₂₇-Thr₁₂₈, Leu₁₃₆-Pro₁₃₇ ve Leu₁₉₀-Tyr₁₉₁ bağlarından parçaladığını bildirmişlerdir. Kimozin, β -kazeinin aşırı hidrofobik bölgelerindeki Ala₁₈₉-Phe₁₉₀ ve Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ bağlarını ve α_{s1} -kazeinin bu bölgedeki yalnızca Trp₁₆₄-Tyr₁₆₅ bağına parçalamasına karşılık, *C. cardunculus* proteazlarının, β -kazeinin (Ala₁₈₉-Phe-Leu-Leu-Tyr₁₉₃) ve α_{s1} -kazeinin bu bölgelerindeki tüm bağları (Ala₁₆₃-Trp-Tyr-Tyr-Val₁₆₇) parçalar. Sığır β -kazeinin kimozinle hidrolizindeki gibi, *C. cardunculus* proteazlarıyla olan hidrolizinde de % 5 NaCl kuvvetli, % 10 NaCl ise tamamen engel olmaktadır (3).

O' Mahony ve ark. (23), kimozin ve kardozinlerin karışımını içeren pıhtılaştırıcı ile yapılan peynirlerin, kimozinle yapılan kontrol örneklerine göre daha yüksek seviyelerde pH 4.6'da çözünür azot içerdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca α_{s1} -kazeinin parçalanma boyutu, kardozinler ve kimozin karışımıyla yapılan peynirde daha fazladır (6). Medina ve ark. (24) rekombinant kimozin ve buzağı renneti ile yaptıkları Burgos ve Hispanico peynirleri

arasında verim, nem, pH, çözünebilir azot fraksiyonları ve tat yönünden önemli bir farklılık saptamamışlardır. Ancak araştırmacılar, rekombinant kimozi ile yaptıkları peynirlerde α_{s1} - ve β -kazein kalıntı oranlarının, buzağı renneti ile yapılan peynirlere oranla daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir (25).

Saldamlı ve Kaytanlı (26), Fromaz 46 T (*R. miehei*'den elde edilen proteinaz), Rennilaz 150 L tip t (*R. miehei*), Maxiren 50 (rekombinant kimozi: *Kluyveromyces marxianus var. lactis*) ve buzağı renneti (%90 kimozi + %10 pepsin) kullanılarak Beyaz peynir üretmişlerdir. Rekombinant kimozi ile yapılan peynirlerin olgunlaşma derecesi, proteoliz oranı ve duyusal test sonuçlarının, buzağı renneti ile yapılan peynirlerden daha yüksek, mikrobiyal rennetle yapılan peynirlerden ise daha düşük olduğunu belirtmişlerdir (25). Çizelge 1'de peynir teknolojisinde önemli bazı pıhtılaştırıcı enzimlerin kazeinleri parçaladığı tespit edilen peptid bağları verilmiştir.

Çizelge 1. Bazı önemli pıhtılaştırıcıların kazein fraksiyonları üzerinde etkiledikleri peptid bağları

Enzim	α_{s1} -kazein	β -kazein	α_{s2} -kazein	κ -kazein
Kimozin	Phe ₂₃ -Phe ₂₄ , Trp ₁₆₄ -Tyr ₁₆₅ , Leu ₁₀₁ -Lys ₁₀₂ , Phe ₉₈ -Gly ₉₉ ve Leu ₉₈ -Leu ₉₉	Leu ₁₉₂ -Tyr ₁₉₃ , Ala ₁₈₉ -Phe ₁₉₀ , Leu ₁₆₃ -Ser ₁₆₄ ve Leu ₁₃₉ - Leu ₁₄₀	Phe ₈₈ -Tyr ₈₉ , Tyr ₉₅ -Leu ₉₆ , Gln ₉₇ -Tyr ₉₈ , Tyr ₉₈ -Leu ₉₉ , Phe ₁₆₃ - Leu ₁₆₄ , Phe ₁₇₄ -Ala ₁₇₅ ve Tyr ₁₇₉ - Leu ₁₈₀	Phe ₁₀₅ - Met ₁₀₆
<i>R. miehei</i> proteazı	Phe ₂₃ -Phe ₂₄ , Met ₁₂₃ -Lys ₁₂₄ ve Tyr ₁₆₅ - Tyr ₁₆₆	Glu ₃₁ -Lys ₃₂ , Val ₅₈ -Val ₅₉ , Met ₉₃ -Gly ₉₄ ve Phe ₁₉₀ -Leu ₁₉₁		Phe ₁₀₅ - Met ₁₀₆
<i>C. cardunculus</i> proteazı	Phe ₂₃ -Phe ₂₄ , Tyr ₁₅₃ -Tyr ₁₅₄ , Trp ₁₆₄ -Tyr ₁₆₅ , Tyr ₁₆₅ -Tyr ₁₆₆ , Tyr ₁₆₆ -Val ₁₆₇ , Phe ₁₄₅ -Tyr ₁₄₆ , Leu ₁₄₉ -Phe ₁₅₀ , Leu ₁₅₆ -Asp ₁₅₇ ve Ala ₁₆₃ - Trp ₁₆₄	Leu ₁₉₂ -Tyr ₁₉₃ , Leu ₁₉₁ -Leu ₁₉₂ , Leu ₁₆₅ -Ser ₁₆₆ , Phe ₁₉₀ -Leu ₁₉₁ , Ala ₁₈₉ -Phe ₁₉₀ ve Leu ₁₂₇ - Thr ₁₂₈	Phe ₈₈ -Tyr ₈₉ ve Ser ₉ - Ser ₁₀ , Phe ₈₈ - Tyr ₈₉ ve Tyr ₁₇₉ -Leu ₁₈₀	

Pıhtılaştırıcıların karşılaştırılması

Süte eklenen buzağı rennetinin preslemeden önce yaklaşık % 30'u, preslemeden sonra ancak %5-8'i kalır. Mikrobiyal rennet enzimlerin preslenen peynirdeki kalıntı oranı % 3-5, pepsinin ise %3-8'dir (11).

κ -kazeinin Phe₁₀₅-Met₁₀₆ bağı, kimozi gibi pepsinler ile *R. miehei* ve *R. pusillus* asit proteinazları tarafından, tercihli olarak hidrolize edilir. Ancak *Cryphonectria parasitica* proteinazı tercihli olarak Ser₁₀₄-Phe₁₀₅ bağını kırar. Bununla birlikte kimozi farklı olarak, *Rhizomucor* ve *Cryphonectria parasitica* proteinazları, κ -kazeinin diğer pek çok bağını da parçalar. Ticari rennet enzimlerin SPA'sı, 28-36°C'nin arasında sıcaklıkla artış gösterir. pH 6.6'da domuz pepsini, buzağı renneti ve sığır pepsininin SPA'sı, sırasıyla 44, 45 ve 52°C'ye kadar sıcaklıkla artış gösterir. Fungal enzimler (*R. miehei*, *R. pusillus*, *C. parasitica*) sırasıyla 47, 57 ve 57°C'lerde aktivitelerini kaybederler (10). Sıcaklığa karşı hassasiyetlik sıralaması: domuz pepsini > sığır pepsini > *C. parasitica* proteazı > kimozi > *R. pusillus* proteazı > *R. miehei* proteazı (27). *R. miehei* proteazı

77°C'de pH 6'da 15 saniyede, *R. pusillus* proteazı 71°C'de pH 6'da 15 saniyede inaktif olurken, buzağı renneti, 67°C'de pH 6'da 15 saniyede inaktif hale geçer (11).

Kimozinle kıyaslandığında pepsinin, özellikle domuz pepsininin SPA'sı, pH'ya daha çok bağlıdır. Fungal rennet enzimleri ise, pH 6.2-6.8 aralığında daha az duyarlıdır. Sütün, *Cryphonectria parasitica* protezı ile pıhtılaştırılmasının, buzağı renneti ile pıhtılaştırmaya göre, eklenen Ca⁺⁺'a hasasiyeti daha azdır (10).

Proteolitik aktivite yönünden; buzağı renneti < *R. miehei* proteazı < *R. pusillus* proteazı < sığır pepsini < domuz pepsini < *C. parasitica* proteazı, duyu kalite yönünden ise; buzağı renneti > *R. miehei* proteazı > *R. pusillus* proteazı > sığır pepsini > domuz pepsini > *C. parasitica* proteazı şeklinde bir sıralama yapılabilir (11).

5. KAYNAKLAR

1. Fox PF, Law J, McSweeney PLH and Wallace J. 1993. Biochemistry of cheese ripening. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology-Vol. 1*, P.F. Fox (eds), pp. 389–438, Chapman and Hall, London.
2. McSweeney PLH. 2004. Biochemistry of cheese ripening. *Int. J. Dairy Tech.*, 57 (2/3): 127–144.
3. Sousa MJ, Ardö Y and McSweeney PLH. 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.*, 11: 327–345.
4. Fox PF. 2002. Exogenous enzymes in dairy technology. In *Handbook of Food Enzymology* JR Whitaker, AGJ Voragen and DWS Wong (eds), pp. 209–301, Marcel Dekker Inc., New York, USA.
5. Üçüncü M. 2004. *A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi-Cilt 1*. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, 543 s, İzmir.
6. Stepeniak L. 2004. Dairy enzymology. *Int. J. Dairy Tech.*, 57 (2/3): 153–171.
7. Mohanty AK, Mukhopadhyay UK, Grover S, Batish VK. 1999. Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotech. Advances*, 17: 205–217.
8. Chitpinitiyol S and Crabbe MJC. 1998. Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chem.*, 61: 395–418.
9. Whitaker JR. 2002. Proteolytic enzymes. In *Handbook of Food Enzymology*, JR Whitaker, AGJ Voragen and DWS Wong (eds), pp. 993–1018, Marcel Dekker Inc., New York, USA.
10. Fox PF, McSweeney P, Cogan TM, Guinee TP. 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publishers Inc., USA.
11. Scott R. 1998. *Cheesemaking Practice*. Third edition. Kluwer Academic/Plenum Publishers, Great Britain.
12. Low YH, Agboola S, Zhao J and Lim MY. 2006. Clotting and proteolytic properties of plant coagulants in regular and ultrafiltered bovine skim milk. *Int. Dairy J.*, 16, 4: 335–343.
13. Roseiro LB, Barbosa M, Ames JM and Wilbey RA. 2003. Cheesemaking with vegetable coagulants—the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *Int. J. Dairy Tech.*, 56 (2): 76–85.
14. Gunasakaran S ve Ak MM. 2002. *Cheese Rheology and Texture*. CRC Press LLC, 439 p, USA.
15. Johnson-Green P. 2002. *Introduction to Food Biotechnology*. CRC press, 293p, USA.
16. Walstra P, Geuris TJ, Noomen A, Jellema A and van Boekel MAJS. 1999. *Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes*. Marcel Dekker Inc. 727p, New York, USA.
17. Tunçtürk Y ve Yarımbatman S. 2005. Peynirde proteoliz tipine ve oranına etki eden faktörler. *Gıda*, 30: 9–14.
18. McSweeney PLH, Olson NF, Fox PF and Healy A. 1994. Proteolysis of bovine α_{s2} -casein by chymosin. *Z. Lebensm. Unters Forsch.*, 119: 429–432.
19. Trujillo AJ, Guamis B, Laencina J and Lopez MB. 2000. Proteolytic activities of some milk clotting enzymes on ovine casein. *Food Chem.*, 71: 449–457.
20. Macedo IQ, Faro CJ and Pires EV. 1996. Caseinolytic specificity of cardosin, an aspartic protease from the cardoon *Cynara cardunculus L.*: Action on bovine α_s - and β -casein and comparison with chymosin. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 42–47.
21. Carles C and Ribadeau-Dumas B. 1984. Kinetics of action of chymosin (rennin) on some peptide bonds of bovine β -casein. *Biochem.*, 23: 6839–6843.
22. Sousa MJ and Malcata FX. 1998. Proteolysis of ovine and caprine caseins in solution by enzymatic extracts of *Cynara cardunculus* cheese. *Enzyme Microbiol. Tech.*, 22: 305–314.

23. O'Mahony JA, Sousa MJ and McSweeney PLH. 2003. Proteolysis in miniature Cheddar-type cheeses made using blends of chymosin and *Cynara cardunculus* proteinases as coagulant. *Int. J. Dairy Tech.*, 53: 52–58.
24. Medina M, Gaya P, Guillen AM and Nunez M. 1992. Characteristics of burgos and hispanico cheeses manufactured with calf rennet or with recombinant chymosin. *Food Chem.*, 45 (2): 85–89.
25. Güler Akın MB, Akın MS ve Çepođlu F. 2003. Peynir üretiminde rekombinant kimozin kullanımı. SEYES 2003, Süt Endüstrisinde Yeni Eđilimler Sempozyumu, 22–23 Mayıs 2003, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü, İzmir, 315-318.
26. Saldamlı İ and Kaytanlı M. 1998. Utilisation of fromase, maxiren and rennilase as alternative coagulating enzymes to rennet in Turkish white cheese production. *Milchwissenschaft*, 53: 22-25.
27. Aehle W. 2004. *Enzymes in Industry*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Second edition, Weinheim.