

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**

**ÜLKEMİZDE KULLANILAN TİCARİ SIVI PEYNİR
MAYALARININ (RENNET) BAZI MİKROBİYOLOJİK,
DUYUSAL VE TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİ İLE ENZİM
KOMPOZİSYONUNUN TESPİTİ**

Elif BOROĞLU

Yönetici : Doç. Dr. Songül ÇAKMAKÇI

Yüksek Lisan Tezi

58454

ÖZET

Ülkemizin değişik bölgelerinde bulunan süt işletmelerinden temin edilen peynir mayalarının (rennet) mikrobiyolojik, duyuşal, fiziksel, kimyasal özelliklerinin ve enzim oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

İncelenen 25 adet sıvı peynir mayası örneğinde $<1-2,5 \times 10^6$ CFU/ml arasında total aerobik mezofilik bakteri; $< 1-10$ CFU/ml arasında maya ve küf; $< 1-35$ CFU/ml arasında ise anaerob spor olduğu saptanmıştır. Örneklerin hiçbirinde koliform grubu bakteriye rastlanmamıştır.

Duyuşal analiz sonuçlarına göre, 15 adet örnek tortusuz, berrak ve kendine has kokuya sahip olup Peynir Mayası Standardı TS-3844'e uygun; 10 örnek ise uygun bulunmamıştır. 25 adet örneğin pH değerlerinin 5-6 arasında, klorür miktarlarının % 4,83 - 14,05 arasında ve maya kuvvetlerinin 1/5670 ile 1/45450 arasında değiştiği belirlenmiştir.

Yapılan biyokimyasal analizler sonucunda incelenen peynir mayası örneklerinin % 40,9-100 arasında rennin enzimi, % 0-59 arasında pepsin enzimi içerdiği ortaya konulmuştur.

Araştırma sonuçlarına göre, Türkiye piyasalarında bulunan peynir mayalarının çok değişik mikrobiyolojik, duyuşal, teknolojik ve enzim kompozisyonuna sahip olduğu ve Peynir Mayası Standardı'na çoğu özellikler bakımından uymadığı belirlenmiştir. Peynircilik problemlerinin çözümüne katkı açısından bu araştırma temel teşkil edecek şekilde konu ile ilgili araştırmalara devam edilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

SUMMARY

To determine the enzyme ratio, microbiological, physical, chemical and sensorial properties of the rennet (cheese enzymes) collected from different regions of this country were investigated in this study.

Total 25 liquid rennet samples were tested and the results showed that there was $<1-2,5 \times 10^6$ CFU/ml total aerobic mezophilic bacteria while no samples contained coliform group bacteria.

Sensory analyses result showed that 15 out of 25 samples had pure clear conditions and peculiar smellings and accorded with Turkish Standarts (TS-3844) related to rennets while rest of the samples were not suitable in this respect.

In the physical and chemical analyses of 25 samples, the tested pH values were ranging between 5,0 - 6,0 , total chlorates 4,83 - 14,05 % and milk clotting activity 1/5670 - 1/45450. Also, biochemical analyses for the enzyme ratio indicated that the rennet samples contained about 40,9 - 100 % rennin and 0 - 59 % pepsin enzymes.

Results of this research demonstrated the most of the rennet samples had different physical, chemical, microbiological, sensorial and compositional properties and not accorded with the Turkish Standarts. In conclusion, it can be suggested that this type of research should proceed by basing this work to resolve the problems of Turkish cheese industry.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması, yürütülmesi ve yazılmasında değerli katkıları ile en büyük desteği gördüğüm, saygıdeğer hocam Sayın Doç. Dr. Songül ÇAKMAKÇI' ya teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarımın biyokimyasal analizleri kısmında gerekli tüm yardımları ve kolaylığı gösteren Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyelerinden Sayın Yrd. Doç.Dr. Nazan DEMİR'e, Fen Edebiyat Fakültesi Biyokimya Bölümü elemanlarına, her türlü yardım ve manevi destek gördüğüm Gıda Mühendisliği Bölümü elemanlarına, bu tezin bilgisayarla yazımını titizlikle yapan sayın Mansur TİKİCİ'ye ve bu araştırmayı maddi olarak destekleyen Atatürk Üniversitesi Rektörlük Araştırma Fonu Yetkililerine ayrı ayrı teşekkür ederim.

Erzurum, 1997

Elif BOROĞLU

İÇİNDEKİLER

	SAYFA NO
ÖZET	i
SUMMARY	ii
TEŞEKKÜR	iii
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE METOT	10
2.1. Materyal	10
2.1.1. Araştırmada Kullanılan Ticari Sıvı Peynir Mayalarının (Rennet) Temini	10
2.1.2. Araştırmada Kullanılan Standartların Temini	10
2.2 Metot	10
2.2.1 Mikrobiyolojik Analizler	10
2.2.1.1. Total Aerobik Mezofilik Bakteri Sayımı	10
2.2.1.2. Koliform Grubu Bakteri Sayımı	11
2.2.1.3. Maya ve Küf Sayımı	11
2.2.1.4. Anaerob Spor Sayımı	12
2.2.2. Duyusal, Fiziksel ve Kimyasal Analizler	12
2.2.2.1. Duyusal Analizler	12
2.2.2.2. Fiziksel ve Kimyasal Analizler	12
2.2.2.2.1. pH Tayini	12
2.2.2.2.2. Klorür Miktarı Tayini	13
2.2.2.2.3. Maya Kuvvetinin Belirlenmesi	13
2.2.3. Biyokimyasal Analizler	14
2.2.3.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler	14
2.2.3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	14
2.2.3.3. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması	15
2.2.3.3.1. Dengeleme Tamponu (0,025 M NaCl Tamponu)	15

2.2.3.3.2. Elüsyon Tamponları	15
2.2.3.3.3. Sodyumdodesilsülfat (SDS)-Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Kullanılan Numune Tamponu	16
2.2.3.3.4. SDS-Elektroforezinde Kullanılan Yürütme Tamponu	16
2.2.3.4. Rennetteki Rennin ve Pepsinin Saflaştırılması	16
2.2.3.4.1. İyon Değişim Kolonunun DEAE-Selüloz Matriksi Üzerinde Hazırlanması	16
2.2.3.4.2. Rennetin Hazırlanması	17
2.2.3.4.3. Rennetin İyon Değişim Kolonuna Uygulanması	17
2.2.3.5. Protein Tayini	18
2.2.3.5.1. Kalitatif Protein Tayini	18
2.2.3.5.2. Coomassie-Blue Yöntemi	19
2.2.3.6. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Enzim Saflığının Kontrolü	20
3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	23
3.1. Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları	23
3.1.1. Total Aerobik Mezofilik Bakteri Sayısı	23
3.1.2. Koliform Grubu Bakteri Sayısı	24
3.1.3. Maya ve Küf Sayısı	25
3.1.2. Anaerob Spor Sayısı	25
3.2. Duyusal, Fiziksel ve Kimyasal Analiz Sonuçları	28
3.2.1. Duyusal Analiz Sonuçları	28
3.2.2. Fiziksel ve Kimyasal Analiz Sonuçları	29
3.2.2.1. pH Değerleri	29
3.2.2.2. Klorür Miktarları (%)	31
3.2.2.3. Maya Kuvveti (Pıhtılaştırma Gücü)	34
3.3. Biyokimyasal Analiz Sonuçları	37

3.3.1. Rennet Örneklerinden Rennin ve Pepsin Enzimlerinin İyon Değişim Kolonundan Saflaştırılması	37
3.3.2. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğriler	41
3.3.3. Peynir Mayası (Ticari ve Standart Rennet), Rennin ve Pepsinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi	46
3.3.3.1 Standart Rennet ve Ticari Rennetin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez Fotoğrafi	46
3.3.3.2. İyon Değişim Kolonundan Alınan Rennin ve Pepsine Ait SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez Fotoğrafi	47
3.3.3.3. İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırılan Rennin ve Standart Rennin ile Saflaştırılan Pepsin ve Standart Pepsine Ait SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez Fotoğrafları	50
4. GENEL SONUÇ VE ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR	58

1. GİRİŞ

Peynir teknolojisi, oldukça değişik teknolojik işlemleri gerektiren bir süt endüstrisi dalı olup peynir kalitesi; hammadde, uygulanan teknoloji ve kullanılan peynir mayasına (rennet) önemli derecede bağlı bulunmaktadır. Bunlar arasında özellikle kullanılan peynir mayası elde edilecek peynirin randımanı dahil bütün nitelikleri üzerine büyük etki yapmaktadır (Eralp, 1974). Örneğin; pratikte çok çeşitli sayıda ve düzeylerde karşılaşılan kusurların en yaygınlarından gözenekli ve çatlak yapı ile fenolik, putrik ve acı tadın kullanılan mayadan ileri gelebildiği belirtilmektedir (Koçak, 1979).

Bugün dünyada üretilen peynirlerin hemen hemen tamamına yakını sütün, pıhtılaştırıcı bir enzimle yani peynir mayası ile pıhtılaştırılıp elde edilen pıhtının değişik şekillerde işlenmesi ile üretilmektedir. Belirli süre ve şartlarda bir olgunlaşma devresi geçirip çeşidine özgü tat, aroma, yapı vb. özellikler kazanan bu peynirlerin hem tüketici tercihi hem de daha uzun süre tüketim imkanı sağlaması gibi avantajları vardır. Nadiren de organik asitle pıhtılaştırılarak üretilen peynirler, raf ömrünün kısa olması nedeniyle olgunlaşmaya tabi tutulmadan tüketilmekte ve bu nedenle de üretim miktarları çok sınırlı kalmaktadır (Uraz vd., 1983; Öztekin, 1991; Çakmakçı, 1996).

Peynir teknolojisinde sütün enzimatik yolla pıhtılaştırılmasında bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı proteazlar kullanılmaktadır. Optimum aktivitelerini asit pH'larda gösteren bu enzimler, hem sütün pıhtılaşmasını sağlarlar hem de peynir olgunlaşması ve kalitesini önemli ölçüde etkilerler (Öztekin, 1981; Rauch et al., 1988; Akın, 1996; Üçüncü, 1996). Ancak bir enzimin peynir mayası olarak kullanılabilmesi için pıhtılaştırma aktivitesinden başka proteolitik aktivitesinin de dikkate alınması gerekmektedir. Bitkisel kaynaklı

proteazların proteolitik aktivitelerinin pıhtılaştırma aktivitelerine oranla çok daha fazla olması nedeniyle peynir yapımında kullanımları çok sınırlıdır (Green, 1977; Öztekin, 1981; Koçak, 1991; Akın, 1996). Belirli düzeydeki proteolitik aktivite peynirde istenen bir özelliktir. Ancak, fazlası üründe acı tat, yapıda yumuşama ve randıman düşmesi gibi olumsuzluklara neden olabilmektedir (Öztekin, 1981; Koçak, 1991; Çakmakçı ve Şengül, 1995; Akın, 1996).

Peynir teknolojisinde, süt pıhtılaştırma ajanları olarak kullanılan buzağı ve yetişkin sığır rennetleri, ana proteolitik aktivite ögeleri olarak chymosin (rennin) ve sığır pepsin A içermektedir (Sicho ve Husek, 1974; Anon., 1987; Visser et al., 1988; Berankova et al., 1989). Sığır pepsin B'nin katkısı çok az olduğundan ($\leq 3\%$) ihmal edilebilmektedir (Rothe et al., 1976; Visser et al., 1988). Hem rennin hem de pepsin kazein misellerini kalsiyum iyonlarının etkisi altında flokulasyondan koruyan k-kazeinin Phe (105)-Met(106) nolu peptid bağına kırarak sütün pıhtılaştırma olayını başlatır (di Gregorio et al., 1979; Fennema, 1985; Topal, 1988; Visser et al., 1988). Bununla birlikte her iki süt pıhtılaştırma enzimi k-kazeinin spesifik hidrolizinde farklı reaksiyon hızı ve peynir olgunlaşma süresince de proteolitik aktivite de tamamen farklı etkiler gösterir. İyi kalitede bir peynir üretebilmek için işlem parametrelerinin ve son peynir kalitesinin rennetin enzim kompozisyonu tarafından önemli derecede etkilendiği belirtilmektedir. Peynir üreticileri yalnızca toplam pıhtılaştırma aktivitesiyle değil, rennin ve pepsinin toplam pıhtılaştırma gücüne ayrı ayrı katkılarıyla da ilgilenirler (di Gregorio et al., 1979; Visser et al., 1988).

Süt emme devresinde bulunan geviş getiren hayvanların şirdenlerinden hazırlanan peynir mayası (rennet) rennin enzimi bakımından zengindir. Hayvanın katı yemlerle beslenmeye geçmesinden sonra yani süttan kesilmesini takiben bu enzim yerini pepsine bırakmaktadır (Eralp,

1974; Sicho ve Husek, 1974; Rothe et al., 1976; Uraz, 1976; Koçak, 1979; Öztekin, 1981; Topal, 1985; Anon., 1989; Kurt, 1990; Akın, 1996). Hayvansal kaynaklı peynir mayası (rennet) süt emme devresinde bulunan özellikle buzağı ile koyun ve keçi yavrularının dördüncü midesi olan şirdenden elde edilmektedir. Süt emmekte olan buzağılardan üretilen buzağı rennetinin %70-95 rennin enzimi ve % 5-30 pepsin enzimi içerebildiği; bu hayvanlar süttten başka gıdalarla beslenmeye başladıkları zaman da pepsin enzimi miktarının arttığı, %70-90 pepsin ve % 10-30 rennin enzimi içerdiği belirtilmektedir (Akın, 1996). Ayrıca domuzun da doğumun ilk haftalarında mide sıvısında fazla miktarda, daha sonraları ise az miktarda rennin enzimi bulunduğu ve giderek yerini pepsine bıraktığı belirtilmektedir (Nielsen ve Foltmann, 1995).

Bir asit proteaz olan rennin, H^+ iyonları tarafından hızlandırılan otokatalitik aktivasyon olayı ile aktif olmayan prorenninden teşekkül eden bir enzimdir (Koçak, 1991; Üçüncü, 1996). Kazeini hidroliz ederek sütün pıhtılaşmasını ve peynir yapısına dönüşmesini sağlamada esas görevi üstlenmektedir. Bunu belirli şartlar altında yapar. Kazeini hidroliz eden bir endopeptidazdır (Uraz vd., 1983; Topal, 1985; Akın, 1996). Olgunlaşma sırasında da düşük proteolitik aktivitesini devam ettirmektedir (Anon., 1989). Kristal olarak elde edilmesi mümkün olan renninin molekül ağırlığı 30000-31000 civarındadır. pH değişimlerine karşı çok duyarlıdır. Proteolitik aktivitesini asit ortamda korur. Fakat pH 4,8'in altında az dayanıklıdır. Katıldığı süt hafif alkali özellik gösterdiğinde (pH 7,4'e doğru) pıhtılaşma hiç olmaz ve pH 8,0'da tekrar aynı hale dönemeyecek derecede inaktif hale gelir (Topal, 1985; Kurt, 1990). Optimum pH'sı 3-4 dolayındadır (Kurt,1990; Koçak, 1991). Rennin bu yaygın ismi yanında bazı kaynaklarda Kimozin, Rennase, Lab., Abomasal enzim, Lab. ferment gibi değişik isimlerle de anılmaktadır (Topal, 1985).

Rennin yerine ve onunla birlikte kullanılabilen en yaygın proteaz pepsindir. Molekül ağırlığı 34000 civarındadır (Akın, 1996). Bu enzim de midede inaktif olarak salgılanan pepsinojenin H^+ iyonları ile etkilenmesi sonucunda aktivite kazanır. Yalnız pH değişimlerine karşı renninden daha duyarlıdır. PH 6,6-6,7'nin üzerinde pıhtılaşma sağlamaz (Koçak, 1991). Optimum pH'sı 1,8-2'dir (Fennema, 1985; Akın, 1996). Birçok benzer taraflarının olmasına rağmen özellikle teknolojik özellikler bakımından renninden birtakım farklılıklar gösterir (Uraz, 1976; Akın, 1996). Molekül ağırlığı daha düşük peptidlerin hidrolizinde rol oynar (Fennema, 1985). Pepsin sadece protein yapısında olup aktif hale gelebilmesi için başka maddelere ihtiyaç duymaz (Metin, 1996). Rennine nazaran birtakım dezavantajları vardır. Sütü pıhtılaştırma zamanı uzundur, pıhtı sert değildir, peynir suyu ile kayıplar fazladır, peynirde tat kusurları olabilir ve pepsin bazı tip peynirlerin (İsviçre tipi peynir) üretimi için uygun değildir. Ancak ticari olarak pepsin ve buzağı rennininin karışımı peynir mayası olarak kullanılmaktadır.

Rennetlerde enzimlerin miktarlarını tespit etmek için çeşitli metodlar kullanılmaktadır (Garnot et al.,1972; de Koning and Draaisma, 1973; Rothe et al.,1976; Rothe et al., 1977; di Gregorio et al., 1979; Collin et al., 1981; Rauch et al., 1988; Visser et al., 1988; Berankova et al., 1989). Bunlardan başlıcaları: 1. Selektif Denatürasyon, 2. İmmunokimyasal Teknikler, 3. DEAE Selüloz Kromatografisi, 4. Spektrofotometrik Metot, 5. Poliakrilamid Jel Elektroferez, 6. İzoelektrik Odaklama'dır.

Bu metotlardan Garnot et al.(1972) tarafından tanımlanan DEAE Selüloz iyon değişim kromatografisi Uluslararası Süt Federasyonu (IDF) tarafından standart metot olarak kabul edilmiştir (Anon, 1987).

O'leary ve Fox (1974), ticari rennetlerdeki *Mucor miehei* ve *Mucor pusillus*'dan elde edilen proteazlar, domuz pepsini, sığır pepsini ve renninin saflaştırılmasını DEAE Selüloz iyon değişim kromatografisi ile yapmışlar ve bu enzimlerin rennet içindeki miktarlarını belirlemişlerdir. Buna göre standart rennet % 45-60 domuz pepsini içerirken, ticari rennetlerde bu oran % 20-25 rennin, %25-30 sığır pepsini ve % 50 domuz pepsini olarak saptanmıştır.

Sicho ve Husek (1974), rennetteki pepsini ribonükleazın geriye dönüşümsüz inaktivasyonuna dayanarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada 7 toz ve 2 sıvı rennet örneğindeki pepsin miktarı araştırılmıştır. Toz rennet örneklerinde rennet çözeltisinin 0,2 ml' sindeki pepsin miktarının 3,8'den 6,5 mg'a kadar değiştiği, buna karşın aynı miktar sıvı rennet örneğindeki pepsinin 8,28 ile 12,1 mg arasında olduğu bulunmuştur.

Rothe et al.(1977), roket immunoelektroforez ile 40 ticari rennet örneğinin sığır pepsin A, sığır pepsin B ve chymosin (rennin) içeriğini incelemişlerdir. Bu enzimlerin konsantrasyon aralıklarını; chymosin (rennin) 0-1208 mg/l; sığır pepsin A 359-3818 mg/l; sığır pepsin B 0-320 mg/l olarak bulmuşlardır.

Garnot ve Molle (1982), roket immunoelektroforez ile chymosin ve pepsin miktarını ölçmede inaktivasyon derecesi ve tipinin etkisini incelemişlerdir. Sonuçlar enzime ve inaktivasyon derecesine göre belirgin farklılıklar göstermiştir.

Visser et al. (1988), sığır ve buzağı rennetlerinde rennin ve pepsinin belirlenmesi için spektrofotometrik yöntemle bir çalışma yapmışlardır. Kullanılan metot pH 2'de 4,6 M üre içeren bir tamponda renninin seçici inaktivasyonunu kapsamaktadır. Bu inaktivasyon basamağının

öncesinde ve sonrasında, enzimin sentetik Leu-Ser-Phe-Nle-Ala-IleOMe hegzapeptit üzerindeki proteolitik aktivitesi 230 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen saf enzimlerin spesifik aktiviteleri kullanılarak rennet içerisinde bulunan her iki enzimin ağırlık olarak miktarları bulunmuştur.

Rauch et al. (1988), rennetlerin enzim kompozisyonunu belirlemek için yüksek performanslı iyon değişim kromatografisi metodunu kullanmış ve bunun en hızlı analitik metot olduğunu öne sürmüşlerdir.

Peynir teknolojisi açısından diğer bir önemli faktör de mayaların pıhtılaştırma güçleridir (maya kuvveti). İmalat sırasında yapılan hatalar, maya kuvvetinin hesaplanmasında yapılan hatalar, ambalajlama ve depolama sırasındaki olumsuzluklar maya kuvvetini değiştirebilmektedir. Öyleki çoğu zaman mayanın etiketinde belirtilen maya kuvveti ile sonradan ölçülen maya kuvveti birbirini tutmamaktadır.

İyi kaliteli bir peynir mayasının pıhtılaştırma gücünün (maya kuvveti) sabit olması ve bünyesinde renninden başka enzimler ile peynirde çeşitli kusurlara neden olan mikroorganizmaları bulundurmaması gerekir. Pıhtılaştırma gücünün düşmesi peynir mayalarının teknolojik özelliğini zayıflatır, kaybolması ise ortadan kalkmasına neden olur (Koçak, 1979). Çoğu kez maya kuvveti olarak da bilinen sütü pıhtılaştırabilme yeteneği onların içerdiği enzim miktarı hakkında bir bilgi verdiği gibi genellikle peynir yapımında büyük önem gösteren pıhtının sertliği, yumuşaklığı vb. teknolojik özelliklerinin düzenlenmesinde de yardımcı olmaktadır (Uraz, 1979).

Son yıllarda beyaz peynire işlenen sütler yüksek derecede ısıl işleme tabi tutularak peynir suyu proteinlerinin pıhtıda kalması sağlanmaktadır. Bu gibi sütlerden işlenebilir bir pıhtı elde edebilmek

için mayalama sıcaklığı yüksek tutulduğu gibi fazla miktarda starter kültür ve peynir mayası katılmaktadır. Çeşitli kademelerde peynir olgunlaştırma sıcaklığının yüksek tutulmasıyla maya içinde bulunan pepsinin aktivitesi artmakta ve bunun sonucu olarak peynir suyu proteinleri parçalanarak peynirde yumuşamalara ve erimelere neden olmaktadır. Ayrıca pepsin ile pıhtılaştırma sonucu peynire fazla miktarda suda çözünebilir süt proteinleri geçtiğinden peynirde tat hataları da meydana gelmektedir (Koçak, 1979; Kurt, 1990; Gönç, 1991; Öztekin, 1991).

Yukarıda belirtilen bu olumsuzluklar ve farklılıklar gözönüne alındığında rennetteki enzim kompozisyonunun önemi daha iyi anlaşılmaktadır. Rennet içerisindeki rennin/pepsin oranı peynir teknolojisi açısından büyük önem taşımaktadır (Visser et al.,1988; Koçak, 1991).

Peynir teknolojisinde dikkate alınması gereken diğer bir husus da mayanın mikroorganizma yüküdür. Mayanın mikroflorası hem mayanın dayanıklılığı hem de peynir teknolojisi bakımından önem taşımaktadır. Mayalar içerdiği mikroorganizmaların faaliyeti sonunda aktivitelerini kaybedebilecekleri gibi peynirde çok çeşitli kusurlara da neden olmaktadır (Koçak, 1979). *Aerobacter aerogenes* ve *Escherichia coli* (koliform grup) gibi bakteriler çok kuvvetli gaz oluşturduğundan peynirlerde erken şişme denilen bozukluğa neden olur. Telemede, peynir imalinin baskı veya salamura evrelerinden başlayarak çok sayıda küçük delikler oluşur. Bu delikler devamlı büyüyerek peynire süngere benzer bir görünüm kazandırır (Tunail ve Köşker, 1986; Gönç, 1991). Koliform bakteriler asetik asit ve formik asit oluşturmalarından ve proteinleri kuvvetle parçalamalarından dolayı peynirlerde kokuşma ve aroma bozuklukları meydana getirirler. Ayrıca bazı koliform bakteriler patojen özellik gösterebildiklerinden örneğin

enteropatojenik *E.coli* , insan sağlığı açısından son derece önemlidir. Ender olarak insanlarda özellikle idrar yolları, safra kesesi hastalıklarına neden olabilirler (Tunail ve Köşker, 1986). Dolayısıyla süt, peynir üretimi için pastörize edildikten sonra eğer bu mikroorganizmalarca kontamine olmuş rennet ile pıhtılaştırılırsa pastörizasyonun bir anlamı kalmayacak ve belirtilen olumsuzluklar ortaya çıkacaktır.

Uraz (1976), 19 peynir mayası örneğinin total aerobik mezofilik bakteri, maya-küf ve anaerob spor oluşturan bakteriler ile bulaşık olduğunu saptamıştır. Aynı araştırıcı 19 örneğin hiçbirinde koliform grubu bakteriye rastlamamıştır.

Koçak (1979), Türkiye'de kullanılan sıvı şirden mayalarının değişik saklama koşullarında dayanıklılığı üzerinde çalışmıştır. Oda sıcaklığı ve plastik ambalajın saklamaya uygun olmadığını ve bazı peynir mayalarının istenmeyen mikroorganizmalarca (maya ve kf, anaerob spor ve koliform) bulaşık olduğunu saptamıştır.

Puhan (1968), değişik marka 28 toz ve 25 sıvı şirden mayasının kuvvetleri üzerinde bir araştırma yapmış ve örneklerin 3/4'ünün kuvvetini etiketinde belirtilen kuvvetten düşük bulmuştur.

Türkiye'de rennetlerin enzim kompozisyonu üzerinde şimdiye kadar yapılan bir araştırmaya literatürde rastlanmamıştır. Türk Standartları Enstitüsü tarafından ıkarılan Peynir Mayası Standardı'nda TS- 3844 (Anon., 1982) bu konuda tatminkar bir analiz metodu bulunmayıp, sadece maya gruplarında bulunması gereken pepsin sınırları verilmiştir.

Türkiye peynirciliğinde kullanılan mayalar hakkında diğer özellikler bakımından da geniş ölçüde ve etraflı bilgi verebilecek fazla çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu araştırmayla peynir kalitesini önemli derecede etkileyen, ancak peynir üretimi ve olgunlaştırılması ile ilgili karşılaşılan problemlerin çözümünde üzerinde hemen hemen hiç durulmayan piyasadaki peynir mayalarının enzim kompozisyonunun belirlenmesi ve sonuçların peynircilik problemlerine katkısının ortaya konulması amaçlanmıştır.

Ayrıca peynir mayalarının duyuşal özellikleri (renk, koku ve görünüş), total aerobik mezofilik bakteri sayıları ve peynir teknolojisinde sorun çıkaran bazı mikroorganizma içerikleri (koliform, maya-küf, anaerob spor) ile pH, tuz ve pıhtılaştırma gücü gibi teknolojik bazı özellikleri belirlenerek Peynir Mayası Standardı TS-3844 (Anon., 1982) ile karşılaştırılması hedeflenmiştir. Daha da önemlisi bu araştırma sonuçlarından yola çıkarak mayanın enzim kompozisyonu ve peynir kalitesi arasındaki ilişki, mayanın elde edildiği hammaddenin (domuz, sığır) belirlenmesi ve standartlarımıza daha pratik sonuçların elde edilmesini sağlayacak metotların ilave edilmesi gibi çok sayıda yeni araştırmaya yön vermek amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1 Araştırmada Kullanılan Ticari Sıvı Şirden Mayalarının (Rennet) Temini

Araştırmada kullanılan 25 adet peynir mayası örneği (rennet) Türkiye'nin değişik bölgelerindeki süt işletmelerinden usulüne uygun olarak temin edilmiştir.

Örnekler mikrobiyolojik analizler için steril cam kavanozlara; duyuşal, fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal analizler için de temiz cam kavanozlara olmak üzere 2'şer adet alınmış ve alüminyum folyo ile kaplanmıştır. En kısa sürede bölüm laboratuvarına getirilen örnekler analizler süresince buzdolabı şartlarında (4 ± 1 °C) muhafaza edilmiştir.

2.1.2. Araştırmada Kullanılan Standartların Temini

Araştırmada kullanılan standart bovine serum albumin Merck'den, standart rennin (R-4879), standart pepsin A (P-7197) ve standart rennet (R-5876) ile Protein standardı MWSDS 70-(10000-70000) Sigma Chemical Comp.'dan sağlanmıştır.

2.2. Metot

2.2.1. Mikrobiyolojik Analizler

2.2.1.1. Total Aerobik Mezofilik Bakteri Sayımı

Rennet örneklerinde ön denemelerle belirlenen dilüsyonlardan steril 2'şer petri kutusuna steril pipetlerle 1'er ml alınmış ve önceden 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiş, su banyosunda 45-50 °C'ye soğutulmuş Plate Count Agar'dan (PCA) (Merck) 15 ml kadar ilave

edilmiştir. Dikkatli bir şekilde dairesel hareketlerle dilüsyon ve besiyerinin iyice karışması sağlanmıştır. Besiyeri katılaştıktan sonra petri kutuları ters çevrilerek 32 ± 1 °C'de 48 ± 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra petri kutularında oluşan koloniler sayılmış ve iki petri kutusundaki koloni sayısının ortalaması alınmıştır (Speck, 1976; Anon., 1982).

2.2.1.2. Koliform Grubu Bakteri Sayımı

Hazırlanan dilüsyonlardan 2'şer adet steril petri kutusuna 1'er ml ekim yapılmış ve üzerine taze hazırlanmış ve 45-50 °C ye soğutulmuş 15 ml kadar Violet Red Bile Agar (VRBA) (Merck) ilave edilmiştir. Besiyeri katılaştıktan sonra üzerine aynı besiyerinden 10-12 ml daha ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan petri kutuları besiyeri katılaştıktan sonra ters çevrilmiş ve 37 ± 2 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her iki petri kutusundaki 0,2 mm ve daha büyük çaptaki koloniler sayılmış ve ortalaması alınmıştır (Speck, 1976; Anon., 1982).

Örneklerin hiç birinde koliform grubu bakteriye rastlanmadığından *Escherichia coli* aranmasına gerek kalmamıştır.

2.2.1.3. Maya ve Küf Sayımı

Hazırlanan dilüsyonlardan 2'şer petri kutusuna 1'er ml alınmış ve üzerine 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiş ve %10'luk steril tartarik asit ile pH'sı 3,5'a ayarlanmış Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck) ilave edilerek dökme plak yöntemine göre ekim yapılmıştır. Petri kutuları 21 ± 2 °C'de 5 gün süre ile inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda oluşan koloniler sayılarak ortalaması alınmıştır (Hausler, 1974; Anon.,1992).

2.2.1.4. Anaerob Spor Sayımı

Gerekli dilüsyonlar 80 °C'de 10 dakika ısıtılma tabii tutulmuştur. Daha sonra Differential Reinforced Clostridium Medium (DRCM buyyon) (Merck) tarifine uygun şekilde hazırlanmıştır. Sayım dökme plak yöntemiyle yapıldığından DRCM buyyona %1,5 agar agar ilave edilerek 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

45 °C'ye soğutulan DRCM besiyerinden, ekimi yapılan 2'şer steril petri kutusuna 15-20 ml ilave edilmiştir. Dairesel hareketlerle besiyeri ve dilüsyonun iyice karışması sağlanmış ve petri kutuları anaerobik kavanozlara (Anaerocult A, Merck) konulduktan sonra oluşturulan anaerobik ortamda 30 °C'de 72 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda oluşan siyah renkli koloniler sayılarak ortalaması alınmıştır (Baumgart et al., 1986).

2.2.2. Duyusal, Fiziksel ve Kimyasal Analizler

2.2.2.1. Duyusal Analizler

Rennet örneklerinin duyusal özellikleri (renk, koku, görünüş) Peynir Mayası Standardı TS-3844 (Anon., 1982)'e göre yapılmıştır.

2.2.2.2. Fiziksel ve Kimyasal Analizler

2.2.2.2.1. pH Tayini

Rennet örneklerinin pH değerleri direkt olarak pH metrede (Perkin-Elmer, Coleman 28 c Metrion IV pH meter) okunarak belirlenmiştir.

2.2.2.2.2. Klorür Miktarı Tayini

Peynir mayası örneklerinin klorür miktarı TS-3844 (Anon., 1982)'de verilen metotla saptanmıştır.

Bunun için saf su ile peynir mayası örnekleri 1/100 oranında sulandırılmış ve iki erlene 25'er ml alınmıştır. Üzerlerine % 10'luk potasyum kromat çözeltisinden 2 damla damlatılarak 0,1 N'lik gümüş nitrat (AgNO_3) ile tuğla kırmızısı renk oluşuncaya kadar titre edilmiştir. Harcanan AgNO_3 miktarı formülde yerine konularak örneklerin klorür miktarı hesaplanmıştır.

$$\text{Cl (\%)} = \frac{0,355 \times A}{0,25}$$

formülde;

A= Titrasyonda sarf edilen 0,1 N AgNO_3 miktarı (ml) dir.

2.2.2.2.3. Maya Kuvvetinin Belirlenmesi

Peynir mayalarının kuvveti, TS-3844 (Anon.,1982)'de verilen metoda göre belirlenmiştir. Bunun için bir erlenmayere taze çiğ inek sütünden (pH 6,6) 50 ml alınmış, 35 °C'ye kadar ısıtılmış ve aynı derecedeki su banyosunda sıcaklık sabit tutulmuştur. Peynir mayası örneği 1/10 oranında sulandırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan peynir mayası örneğinden 1 ml alınarak, 35 °C'deki süte karıştırılmış, aynı anda da kronometre çalıştırılmıştır. Spatülün süte batırılıp çıkarılmasıyla pıhtılaşma kontrol edilmiştir. Spatülün üzerinde küçük pıhtı tanecikleri

görüldüğü an kronometre durdurulmuştur. Pıhtılaşma süresi saniye olarak kaydedilmiştir.

Maya kuvveti aşağıda verilen formülle hesaplanmıştır.

$$\text{Maya kuvveti} = \frac{2400 \times S}{Z \times M}$$

formülde ;

S= süt miktarı (50 ml)

Z= Pıhtılaşma süresi (sn)

M= maya miktarı (0,1 ml)

2.2.3. Biyokimyasal Analizler

2.2.3.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Araştırmada kullanılan DEAE-selüloz, Piperazine, Standart Serum Albumin, N,N,N',N' Tetrametiletilediamin (TEMED) ve Diyaliz Torbaları, Sigma Chemical Comp.'dan; Triclorasetikasit (TCA), Trihidroksimetilaminometan (Tris), Sodyum Klorür ve Sodyum Hidroksit Merck'ten; Akrilamid, N, N' Metilen Bisakrilamid, Coomassie Brilliant Blue G ve Coomassie Brilliant Blue R, Rie del de Haen firmasından sağlanmıştır. Kullanılan çözeltilerin hepsi saf su ile hazırlanmıştır.

2.2.3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmalar sırasında aşağıda isimleri verilen alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Soğutmalı santrifüj (Heraus Sepatech), Santrifüj (IEC Clinical centrifuge USA.), Spektrofotometre (LKB-Biochrom, ULTROSPEC - 11 Model 4050), pH metre (Perkin Elmer, Coleman 28 C Metrion IV pH meter), Elektroforez tankı (Hoefer, HSI), Peristaltik pompa (Pharmacia fine Chemicals, Uppsala (İsveç)), Karıştırıcı (Vortex-Gerie, Model K-55:-GE, Sci. Ind. Inc. Spring field, Mass. 01103 (A.B.D), Hassas terazi (Mettler H 51 supplied By Gallenkamp), Kromatografi kolonu (Pharmacia Fine Chemicels. Uppsala (İsveç)), Kronometre (Hanhard, elektronische igital-stoppuhr-Germany), Oto-matik pipetler (Fischer), Çalkalayıcı (GFL), Mağnetik karıştırıcı (IKA Combimag RCO).

2.2.3.3. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

Araştırmada kullanılan tampon çözeltilerin kullanım amacı ve hazırlanış şekilleri aşağıda verilmiştir.

2.2.3.3.1. Dengeleme Tamponu (0,025 M Piperazine Tamponu)

Bir beher içinde 4,85 g piperazine tartılmıştır. Başka bir beher içerisinde de 42,8 g HCl tartılmıştır. Daha sonra HCl, piperazine içeren behere aktarılmıştır. Çözünene kadar mağnetik karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra saf suyla 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Ph, NaOH ile yaklaşık 5,30'a ayarlanmıştır.

2.2.3.3.2. Elüsyon Tamponları

1) **0,20 M NaCl Tamponu:** 1000 ml Piperazine tamponu içerisinde 11,7 g NaCl çözündürülerek hazırlanmıştır.

2) 0,50 M NaCl Tamponu: 1000 ml piperazine tamponu içerisinde 29,2 g NaCl çözündürülerek hazırlanmıştır.

Her iki tamponun da içerisine thymol kristalleri atılarak 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.3.3.3. Sodyumdodesilsülfat (SDS)- Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Kullanılan Numune Tamponu

0,65 ml 1 M HCl (Tris-HCl, pH=6,8), 3 ml % 0,1 lik SDS, 1 ml % 100'lük gliserin ve 1 ml % 0,1'lik brom timol mavisi karıştırılmış ve hacimleri saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Kullanılmadan hemen önce mililitresine 50 µl β-mercapto etanol ilave edilmiştir.

2.2.3.3.4. SDS- Elektrofrezinde Kullanılan Yürütme Tamponu

1,5 g Tris ve 7,2 g gliserin 50 ml saf suda çözündürülerek üzerine 5 ml % 0,1'lik SDS ilave edilmiştir. Daha sonra toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.

2.2.3.4. Rennetteki Rennin ve Pepsinin Saflaştırılması

2.2.3.4.1. İyon Değişim Kolonunun DEAE-Selüloz Matriksi Üzerinde Hazırlanması

İyon değişim kolonunun DEAE selüloz matriksi üzerinde hazırlanması işlemi International Dairy Federation-IDF (Anon., 1987) standardı esas alınarak yapılmıştır.

a) Selüloz en az 30 dakika 0,5 N HCl çözeltisi ile karıştırılmış (15 kısım 0,5 N HCl içinde 1 kısım kuru selüloz olacak şekilde) sonra filtre edilerek, effluentin pH'sı 4'e yaklaşıncaya kadar saf su ile durulanmıştır.

b) Selüloz en az 30 dakika 0,5 NaOH çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra (15 kısım 0,5 N NaOH içinde 1 kısım selüloz olacak şekilde) filtre edilerek, effluentin pH'sı 7'ye yaklaşıncaya kadar saf suyla durulanmıştır. Selüloz en az 30 dakika 0,1 N HCl-%25 NaCl çözeltisiyle karıştırılmış (15 kısım çözeltiliye karşı 1 kısım kuru selüloz olacak şekilde), sonra filtre edilerek, selülozun pH'sı 6'ya yaklaşıncaya kadar saf su ile durulanmıştır.

Elde edilen DEAE-selüloz bir kaç defa dengeleme tamponuyla, effluentin pH'sı dengeleme tamponunun pH'sına yaklaşıncaya kadar (pH 5,30) yıkanmıştır. Daha sonra da hazırlanan selüloz dengeleme tamponu içerisinde 4 ± 1 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.3.4.2. Rennetin Hazırlanması

Materyal ve Metot Bölümünün Materyal kısmında (2.1.1) anlatıldığı şekilde temin edilen rennet numuneleri kolona tatbik edilmeden önce 2-5 saat süre ile her 15 dakikada değiştirilmek üzere önce saf suya sonra 3 saat süre ile dengeleme tamponuna karşı diyalizlenmiştir (Anon., 1987).

2.2.3.4.3. Rennetin İyon-Değişim Kolonuna Uygulanması

Rennetin İyon-değişim kolonuna uygulanması O'leary ve Fox (1974), IDF standardı (Anon., 1987) ve Nielsen ve Foltman (1995) tarafından verilen metot modifiye edilerek aşağıdaki sıra takip edilerek yapılmıştır.

Özel Kromatografi kolonu peristaltik pompaya bağlandıktan sonra dengeleme tamponu içerisindeki DEAE selüloz, dikkatlice kolona

boşaltılmıştır. Pompanın akış hızı 80 ml/saat'e ayarlandıktan sonra kolon dengeleme tamponuyla 3-5 saat dengelenmiştir. Dengelenen kolona belli miktarda diyalizlenmiş örnek (2 ml) tatbik edildikten sonra kolon 3 defa 1'er ml dengeleme tamponuyla yıkanmıştır. Son olarak bir kez daha 1 ml dengeleme tamponu geçirildikten sonra, kolona rennini elüe etmek için 0,20 M NaCl tamponu ilave edilmiştir. Pompanın çıkış tüpünden her bir tüpe 5'er ml olacak şekilde elüentler alınmış ve elüentlerin absorbansları 280 nm'de okunmuştur. Rennin için absorbans sıfırlandıktan sonra, kolona pepsini elüe etmek için 0,50 M NaCl tamponu tatbik edilmiştir. Pepsin için de absorbanslar sıfırlandıktan sonra kolon dengeleme tamponuyla, dengelemeye bırakılmıştır.

Her iki enzim için de en yüksek absorbans veren tüpler protein tayini ve elektroforez için ayrılmıştır.

2.2.3.5. Protein Tayini

2.2.3.5.1. Kalitatif Protein Tayini

Kalitatif protein tayini 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır. Rennet örneklerinde, kromatografi işlemlerinde eşit hacimde alınan (5 ml) bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini Segel (1968) ile Robyt ve White (1990) tarafından verilen metotla aşağıdaki gibi yapılmıştır.

Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak absorbansları spektrofotometrede köre karşı okunmuştur. Örneğin, rennetin kolona uygulanması ve yıkama işleminin tamamlanmasından sonra, rennin ve pepsini elüe etme sırasında kullanılan tamponlar (0,20 M NaCl

tamponu ve 0,50 M NaCl tamponu) enzimin kalitatif tayininde kör olarak kullanılmıştır.

2.2.3.5.2. Coomassie -Blue Yöntemi

İyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisindeki protein miktarları bu yöntemle belirlenmiştir. Bu yöntem proteine coomassie brilliant blue G-250'nin bağlanması esasına dayanmaktadır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbanans gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir (ortalama 2 dakika). Protein-boya kompleksi çözeltiye uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford,1976).

Tayin işlemlerinde aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.

1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alınmış, saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlanmıştır. 5 ml coomassie reaktifi tüplere ilave edildikten sonra vortex de karıştırılmıştır. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbanans değerleri okunmuştur.

Kör olarak 0,1 ml aynı tampon (rennin standardı için 0,20 M NaCl tamponu ve pepsin standardı için 0,50 M NaCl tamponu) ve 5 ml coomassie reaktifinden oluşan karışım kullanılmıştır. Absorbanans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik halinde verilmiştir.

İyon değişim kolonundan elüe edilen rennin ve pepsinden üç ayrı tüpe 0,1'er ml alınarak üzerlerine 5'er ml reaktif ilave edilmiştir. Vortexde karıştırılıp 10 dakika sonra 595 nm'de absorbanans ölçülmüştür. Üç

ölçümün ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı, standart grafik yardımıyla okunmuştur.

Bu deneyde kullanılan renk reaktifi şu şekilde hazırlanmıştır. 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml % 95'lik etil alkolde çözülmüş, bu çözeltiliye 100 ml % 95'lik fosforik asit ilave edilmiştir. Çözeltinin son hacmi saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

2.2.3.6. SDS -Poliakrilamid Jel Elektrofrez ile Enzim Saflığının Kontrolü

Enzim saflaştırılmasından sonra % 3-10 kesikli (SDS)-poliakrilamid jel elektrofrez Laemmli (1970) tarafından verildiği gibi yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edilmiştir.

Bunun için elektrofrez plakaları önce saf su, sonra alkol ile iyice yıkandıktan sonra plakaları birleştiren mikalara ince tabaka halinde vazelin sürülmüştür. İki cam plaka birbiri içine konulup kısıkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına yerleştirilmiştir. Cam plakaların altı kaynama sıcaklığına getirilerek çözümlenip, daha sonrada 40-50 °C'ye soğutulmuş agar dökülerek kapatılmıştır. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektörle dökülmüş ve hava almamasına dikkat edilmiştir. Jel yüzeyinin düzgün olması için % 0,1 lik SDS ile ince bir tabaka oluşturulmuştur. Katılaşmaya kadar (yaklaşık yarım saat) beklenilmiş ve üstündeki % 0,1'lik SDS dökülmüştür. Daha sonra hazırlanan yığılma jeli üst yüzeye kadar ilave edildikten sonra üzerine tarak dikkatlice yerleştirilmiştir. Tarağın üstü nemli süzgeç kağıdı konularak bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektrofrez tankına yerleştirilmiştir. Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü önce saf su sonra da tampon çözelti ile

yıkanmıştır (pH 6,8). Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konulmuştur.

Numuneler herbirinde 20 µg/ml protein olacak şekilde hazırlanmıştır. Toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldıktan sonra 3 dakika 100 °C'de kaynatılarak proteinler denatüre edilmiştir. Numuneler soğutulurken elektroforeze çok ince bir enjektör yardımıyla uygulanmıştır. Tank kapağı kapatılarak alt tarafından (+) kablo (anod) üstten (-) kablo (katod) yerleştirilmiştir. Önce 80 voltda yarım saat, daha sonra 150 volta ayarlanarak 4-5 saat oda sıcaklığında tatbik edilmiştir. Akım kesilerek cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarılmıştır. Yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere özel kabına aktarılmıştır. Jel özel kabına konularak, üstünü örtünceye kadar renklendirme çözeltisi doldurulmuştur. 1,5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldıktan sonra renklendirme çözeltisinden çıkarılarak, renksizleştirme çözeltisi içine alınmıştır. Belirli aralarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içinde çalkalanmıştır.

Renksizleştirme çözeltisi, aktif karbon üzerinden geçirilerek tekrar tekrar kullanılmıştır. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekilmiştir.

Çözeltiler ve jeller aşağıda anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

- a) Renklendirme çözeltisi; 0,66 g coomassie blue R-250 120 ml metanolde çözülmüş ve bunun üzerine 24 ml saf asetik asit ile 120 ml saf su ilave edilmiştir.
- b) Renksizleştirme çözeltisi; 7,5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87,5 saf su ile hazırlanmıştır.

- c) Ayırma jeli; 15 ml 1M Tris-HCl (pH 8,8) 13,2 ml, % 30'luk akrilamid- % 0,8'lik bisakrilamid, 0,61 ml % 0,1 lik SDS, 0,4 ml % 5'lik TEMED (N,N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin) ve 9,4 ml saf su karıştırıldıktan sonra bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 ml % 1,5'lik amonyum persülfat ((NH₄)₂S₂O₈)(PER) ilave edilmiştir. Burada kullanılan PER, kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlanmıştır.
- d) Yığıma Jeli; 1 M Tris-HCl (pH 6,8)'den 1,24 ml, % 30'luk akrilamid-% 0,8'lik bisakrilamid'den 1 ml, % 0,1 lik SDS'den 0,1 ml, % 5'lik TEMED'den 0,1 ml ve saf sudan 7,36 ml alınarak karıştırılmıştır. Son olarak günlük hazırlanmış % 1,5'lik PER'den 0,20 ml ilave edilmiştir.

3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

3.1 Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

Sıvı peynir mayalarında bulunan mikroorganizmalar hem mayanın dayanıklılığını hem de peynir kalitesini etkilemektedirler. Peynir mayaları içerdikleri mikroorganizmaların faaliyeti sonucunda aktivitelerini kaybedebilecekleri gibi çok çeœitli peynir kusurlarının da ortaya çıkmasına neden olabilmektedirler (Koçak, 1979). Bu nedenle bu bölümde bazı mikrobiyolojik analiz sonuçları verilmiştir.

3.1.1. Total Aerobik Mezofilik Bakteri Sayısı

Peynir mayası örneklerinin total aerobik mezofilik bakteri sayıları Tablo 3.1'de verilmiştir. Tablonun incelenmesinden de görüleceği gibi 5 örnekte total aerobik mezofilik bakteriye rastlanmazken (<1 CFU / ml), diğer 20 örnekte $1,0 \times 10^1$ CFU / ml ile $2,5 \times 10^6$ CFU / ml arasında total aerobik mezofilik bakteri olduğu tespit edilmiştir.

TS-3844 Peynir Mayası Standardı'nda total aerobik mezofilik bakteri sayısının en fazla 500 adet/ml bulunabileceği hükmü vardır (Anon., 1982). Buna göre 20 örnek (% 80) standartta belirtilen maksimum değerden az total areobik mezofilik bakteri içerirken, yani standarda uygunken, 5 örnek (5, 9, 12, 13 ve 17. örnekler) standarda uygun bulunmamıştır (Tablo 3.1). Özellikle 9. örneğin kontamine riskinin çok fazla olması nedeniyle peynir yapımında kullanılması kesinlikle risklidir.

Hammaddenin kalitesizliği ve üretim hataları nedeniyle peynir mayalarında fazla sayıda total aerobik mezofilik bakteri bulunabileceği belirtilmektedir (Davis, 1965).

Koçak (1979), Türkiye’de kullanılan 13 adet sıvı şirden mayası örneğinde en az 41 adet / ml, en çok 65000 adet / ml total aerobik mezofilik bakteri olduğunu saptamıştır. Ayrıca aynı araştırmacı 7 örnekte 1000 adet / ml’den az, 4 örnekte ise 15000 adet / ml total aerobik mezofilik bakteri olduğunu tespit etmiştir.

Özer (1969), 60 adet peynir mayası örneğinde en az 16 adet / ml, en çok 2100 adet / ml total aerobik mezofilik bakteri bulmuştur. Uraz (1976), ise incelediği 19 adet peynir mayası örneğinde en az 20 adet / ml, en çok 30000 adet / ml total aerobik mezofilik bakteriye rastlamıştır.

3.1.2. Koliform Grubu Bakteri Sayısı

Araştırma materyali olan 25 adet ticari sıvı peynir mayası örneğinin, peynir teknolojisinde istenmeyen bu grup mikroorganizmalar bakımından ortaya konulan durumu oldukça sevindiricidir. Zira incelenen hiçbir peynir mayası örneğinde koliform grubu mikroorganizmaya rastlanmamıştır (< 1 CFU / ml) (Tablo 3.1). Peynir mayalarında bulunmaması gereken söz konusu mikroorganizmalara, ülkemizde daha önce yapılan 2 araştırmada rastlanmazken (Özer, 1969; Uraz, 1976; Koçak, 1979) tarafından yapılan araştırmada 19 örnekten sadece 2 adedinde koliform grubu mikroorganizmaya rastlanmıştır. Araştırmacı şirdenlerden mayaya geçen bu mikroorganizmaların buzdolabı sıcaklığında saklanması durumunda daha uzun süre dayandıklarını da saptamıştır.

TS-3844 Peynir Mayası Standardı’nda da peynir mayalarında koliform grubu bakteri bulunmaması gerektiği hükmü vardır (Anon., 1982).

Dolayısıyla bu araştırmada incelenen tüm örnekler standarda uygunluk göstermiştir (Tablo 3.1).

Bu araştırma kapsamında koliform grubu bakteriye rastlanamadığından *Escherichia coli* aranmasına gerek kalmamıştır.

3.1.3 Maya ve Küf Sayısı

Peynir mayası örneklerinde yapılan maya ve küf sayımına ait sonuçlar Tablo 3.1'de verilmiştir. Tablonun incelenmesinden de anlaşılacağı gibi incelenen 25 adet örneğin sadece 3 adedinde 10 CFU / ml maya ve küf bulunmuştur (Tablo 3.1).

Peynir mayalarında bulunması hiç istenmeyen bu mikroorganizmalar (Anon., 1982; Koçak, 1991) üzerine araştırma yapan Özer (1969), incelediği 60 örneğin hiçbirinde maya ve küfe rastlamadığını belirtirken; Uraz (1976), 19 örneğin 7 adedinde, Koçak (1979) ise 13 adet örneğin 5 adedinde söz konusu mikroorganizmaya rastladığını belirtmiştir.

Peynir Mayası Standardı TS-3844 (Anon., 1982) ile karşılaştırıldığında 22 örneğin (% 88) standarda uygunluk gösterdiği tespit edilmiştir.

3.1.4. Anaerob Spor Sayısı

Peynirlerde gaz ve asit oluşturarak tat ve koku bozukluğu, kokuşma, çatlama ve şişkinlik gibi büyük problemlere neden olan bu grup mikroorganizmaların (Cankara ve Karacaoğlu, 1983; Ergüllü, 1983; Tunail ve Köşker, 1986) peynir mayalarında bulunmaması gerekmektedir. Pastörizasyonla da imha edilmeleri mümkün olma-

dığından sütte bulunmaları kesinlikle istenmemekte, peynir mayası vasıtasıyla peynire işlenecek sütlerin bu sporlarla kontamine olmaları çok sakıncalı sayılmaktadır (Koçak, 1979; Cankara ve Karacaoğlu, 1983).

Bu nedenlerle incelenen 25 adet peynir mayası örneğinde 4 adedi hariç (4, 8, 12 ve 19. örnekler) anaerob spor bulunmamıştır (Tablo 3.1). En fazla anaerob spor 35 CFU / ml ile 8. örnekte bulunurken en az (7 CFU/ ml) 12. örnekte rastlanmıştır, 4. örnekte 13 CFU / ml, 19. örnekte de 30 CFU / ml olarak saptanmıştır. Peynir Mayası Standardı TS-3844 (Anon., 1982) de peynir mayalarında hiç anaerob spor (Clostridium) bulunmaması gerektiği hükmü gereğince bu hükme örneklerin % 84'ü uymaktadır.

Ülkemizde daha önce yapılan araştırma sonuçlarında; Özer (1969), 60 adet peynir mayası örneğinde anaerob spor sayısını 0-460 adet/ml arasında bulmuştur. Uraz (1976), 19 örnekten 18'inde anaerob spor olduğunu; Koçak (1979) ise 13 maya örneğinin anaerob spor sayısını En Muhtemel Sayı (E.M.S.) metoduna göre vermiş ve 2 örneğin en az (<18 E.M.S./ 100 ml), 2 örneği en çok (<16000 E.M.S./100 ml), diğerlerinin ise bu aralıklarda anaerob spor içerdiğini tespit etmiştir.

Tablo 3.1. Peynir Mayası Örneklerinde Belirlenen Bazı Mikro-
organizma İçerikleri

Örnek No	Total Aerobik Mezofilik Bakteri Sayısı (CFU / ml)	Koliform Grubu Bakteri Sayısı (CFU / ml)	Maya ve Kif Sayısı (CFU / ml)	Anaerob Spor Sayısı (CFU / ml)
1	<1	<1	30	<1
2	<1	<1	<1	<1
3	10×10^1	<1	<1	<1
4	12×10^1	<1	10	13
5	16×10^3	<1	<1	<1
6	<1	<1	<1	<1
7	11×10^1	<1	<1	<1
8	13×10^3	<1	<1	35
9	25×10^6	<1	10	<1
10	$1,0 \times 10^1$	<1	<1	<1
11	$1,0 \times 10^1$	<1	<1	<1
12	62×10^2	<1	<1	7
13	$1,8 \times 10^3$	<1	<1	<1
14	$1,0 \times 10^1$	<1	<1	<1
15	$2,2 \times 10^1$	<1	<1	<1
16	$4,8 \times 10^1$	<1	<1	<1
17	$5,8 \times 10^2$	<1	10	<1
18	$2,0 \times 10^2$	<1	<1	<1
19	<1	<1	<1	30
20	$4,0 \times 10^1$	<1	<1	<1
21	$3,2 \times 10^1$	<1	<1	<1
22	$1,2 \times 10^1$	<1	<1	<1
23	$1,5 \times 10^2$	<1	<1	<1
24	<1	<1	<1	<1
25	$5,0 \times 10^1$	<1	<1	<1
En Düşük	<1	<1	<1	<1
En Yüksek	$2,5 \times 10^6$	<1	30	35

3. 2. Duyusal, Fiziksel ve Kimyasal Analiz Sonuçları

3.2.1. Duyusal Analiz Sonuçları

Türkiyenin değişik bölgelerinde faaliyette bulunan peynir işletmelerinden temin edilen 25 adet ticari sıvı peynir mayası (rennet) örneğinde belirlenen duyusal analiz sonuçları tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. Peynir Mayası (Rennet) Örneklerinin Duyusal Analiz Sonuçları

Örnek No	Özellikler		
	Renk	Görünüş	Koku
1	Karamel	Berrak, tortusuz	Kendine has
2	Karamel	Berrak, tortusuz	Kendine has
3	Çok açık sarı	Berrak, tortusuz	Kendine has
4	Çok açık sarı	Berrak, tortusuz	Yabancı koku
5	Çok açık sarı	Berrak, tortusuz	Kendine has
6	Açık sarı	Berrak, tortusuz	Kendine has
7	Koyu karamel	Berrak, tortusuz	Yabancı koku
8	Karamel	Berrak, tortusuz	Kendine has
9	Açık sarı	Berrak, tortusuz	Yabancı koku
10	Karamel	Berrak, tortusuz	Kendine has
11	Karamel	Berrak, tortusuz	Kendine has
12	Açık sarı	Berrak, tortusuz	Kendine has
13	Çok açık sarı	Hafif tortulu	Kendine has
14	Karamel	Berrak, tortusuz	Yabancı koku
15	Açık sarı	Berrak, tortusuz	Kendine has
16	Açık sarı	Berrak, tortusuz	Kendine has
17	Açık Sarı	Berrak, tortusuz	Yabancı koku
18	Açık sarı	Berrak, tortusuz	Yabancı koku
19	Koyu karamel	Berrak, tortusuz	Yabancı koku
20	Sarı	Bulanık	Kendine has
21	Açık sarı	Berrak, tortusuz	Kendine has
22	Karamel	Berrak, tortusuz	Kendine has
23	Açık sarı	Berrak, tortusuz	Kendine has
24	Karamel	Berrak, tortusuz	Yabancı koku
25	Karamel	Berrak, tortusuz	Kendine has

Tablonun incelenmesinden de anlaşılacağı gibi Türkiye piyasalarında bulunan peynir mayalarında renk, görünüş ve koku bakımından büyük farklılıklar vardır. Bu da mayanın elde edildiği hammaddenin temizliği ve işleme teknolojisindeki farklılıklardan kaynaklanmış olabilir. Elde edilen bulgular Peynir Mayası (Rennet) Standardı TS-3844 (Anon.,1982) ile karşılaştırıldığında 15 örneğin tortusuz, berrak ve kendine has kokusu olduğu, 1 örneğin bulanık ve 1 örneğin tortulu olduğu görülmüştür. 11 örnekte karamel renk görülürken, diğer 14 örnekte açık sarı renk gözlenmiştir. 17 örnek peynir mayasına has bir kokuya sahipken 8 örnekte yabancı koku hissedilmiştir (Tablo 3.2).

Herne kadar TS-3844 Peynir Mayası Standardı'nda (Anon., 1982) peynir mayaları renk, görünüş ve koku açısından karşılaştırılıyor gibi görünüyorsa da aslında renk ve koku ile ilgili açıklayıcı bir bilgi bulunmamaktadır. Eralp, (1974) sıvı şirden mayalarının berrak olması ve yabancı koku taşımaması gerektiğini belirtmektedir. Buna göre incelenen peynir mayalarından 15 örneğin istenen bu özellikte olduğu belirlenmiştir.

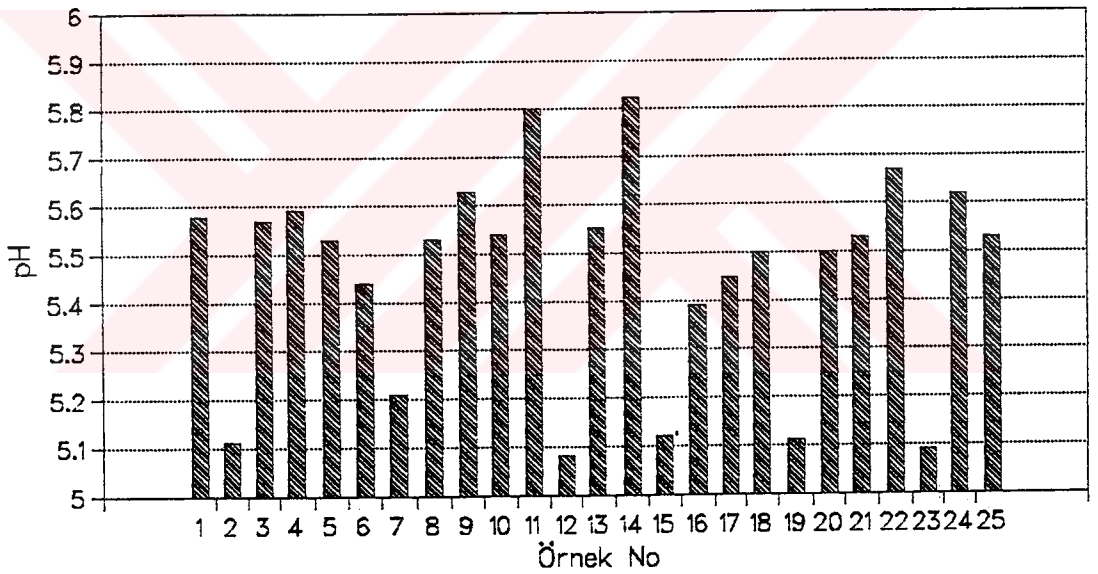
3.2.2. Fiziksel ve Kimyasal Analiz Sonuçları

3.2.2.1. pH Değerleri

Araştırmada incelenen 25 adet sıvı peynir mayası örneğinde belirlenen pH değerleri Tablo 3.3'de toplu halde verilmiştir. Tablodan da görüleceği gibi peynir mayalarında pH değerleri 5,08 ile 5,82 arasında değişmiş ve ortalama 5,46 olarak bulunmuştur. TS-3844 Peynir Mayası Standardı'nda (Anon., 1982) saf ve karışık peynir mayalarında pH'nın $5,8 \pm 0,2$ arasında olabileceği belirtilmiştir. Davis (1965), peynir mayasındaki rennin enziminin doğal özelliğinden dolayı gösterdiği dayanıksızlığın nedenini mikroorganizmalar ve birlikte bulunan diğer enzimlerce parçalanarak hızlandığına bağlamaktadır.

Dayanıklılık üzerinde pH'nın önemli derecede rolü olduğunu ve peynir mayalarının pH 5,8'de en fazla dayanıklılık gösterdiğini belirtmektedir. Peynir Mayası Standardın'da TS-3844 (Anon., 1982) aynı değer ($5,8 \pm 0,2$) verilmiş olup, incelenen örneklerin büyük bölümü bu değer altında bir pH'ya sahiptir.

Uraz (1976), Türkiye peynirciliğinde kullanılan sıvı şirden mayaları üzerinde yaptığı araştırmada 19 örnekten sadece 5 örneğin pH'sını 5'in üzerinde bulmuştur. Bu araştırmada ise incelenen 25 adet örneğin hepsinde pH 5'den yukarı bulunmuştur (Tablo 3.3 ve Şekil 3.1).



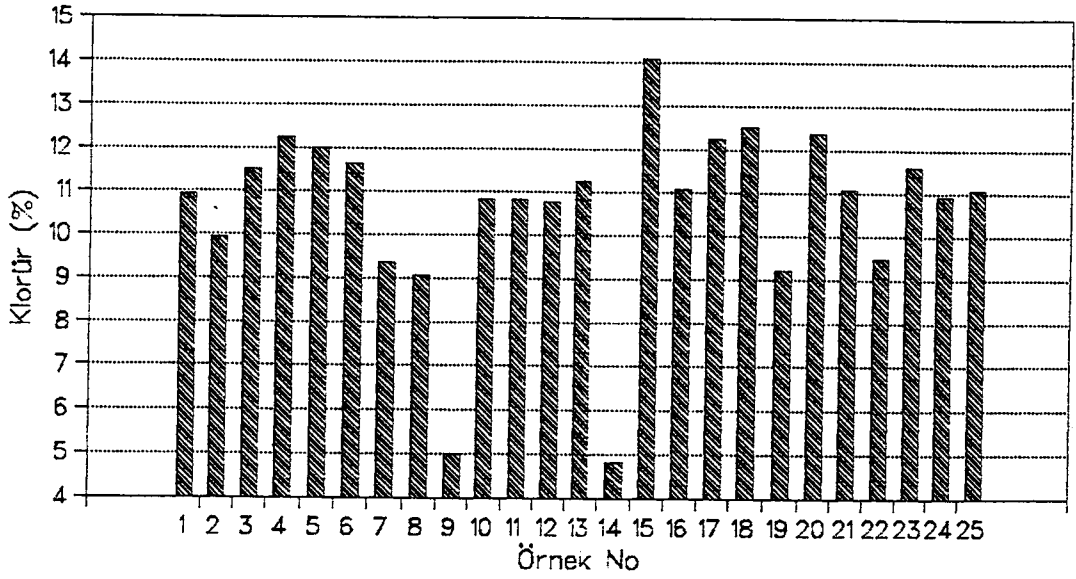
Şekil 3.1. Peynir mayası örneklerinin pH değerleri

Koçak (1979), sıvı şirden mayalarının en fazla 5-6 pH sınırları içinde dayanıklı olduğunu, en uygun 5,5-5,7 pH civarında olması gerektiğini belirtmektedir. Buna göre de araştırdığı 13 sıvı şirden mayası örneğinde pH'nın 4,05 ile 5,30 değerleri arasında değiştiğini; 3 örneğin 5-6 pH aralığında bulunduğunu ve 5,5-5,7 pH değerleri arasında ise hiçbir örneğin bulunmadığını saptamıştır. Bu araştırma da ise incelenen 25 adet sıvı şirden mayası örneğinin hepsinde pH değeri 5-6 arasında

bulunmuş; 14 örnekte pH 5,5-5,7 değerleri arasında; 2 örnekte de pH 5,7'nin üzerinde tespit edilmiştir (Tablo 3.3). Dolayısıyla bulunan bu değerler daha önce yapılmış araştırmaların sonuçları ile karşılaştırıldığında (Özer, 1969; Uraz, 1976; Koçak, 1979) farklı bir durum ortaya çıkmış ve piyasada son zamanlardaki sıvı şirden mayalarının pH değerlerinin 5'in üzerinde bulunduğu ve uygun pH sınırlarına yakın olduğu saptanmıştır.

3.2.2.2. Klorür Miktarları (%)

Peynir mayası örneklerinin klorür miktarları Tablo 3.3'de toplu olarak verilmiştir. İncelenen örneklerin klorür miktarları % 4,83 ile % 14,05 arasında değişmiş ve ortalama % 10,62 olarak bulunmuştur. Tablo 3.3 ve Şekil 3.2'den de görüleceği gibi örneklerin klorür miktarları arasında büyük farklılık vardır. Bu sonuçlar peynir mayası hazırlanırken tuz miktarının tesadüfi olarak ilave edildiğini göstermektedir. Şirdenden peynir mayası hazırlanırken, rennin enziminin ekstraksiyonunu kolaylaştırmak ve mayanın dayanıklılığını artırmak amacıyla değişik oranlarda çeşitli katkı maddelerinden yararlanıldığı, bunlardan en önemlisinin sodyum klorür (NaCl) olduğu belirtilmektedir (Kurt, 1990). Koçak (1979) 13 adet sıvı şirden mayasında tuz oranının % 3,802 ile % 18,720 arasında dağılım gösterdiğini, 2 örneğin % 10'dan az, 10 örneğin % 10-15 arasında ve 1 örneğin de % 15'den yüksek bir değer gösterdiğini saptamıştır.



Şekil 3.2. Peynir mayası örneklerinin klorür miktarları

Ülkemizde üretilen sıvı şirden mayalarının bazı özelliklerini araştıran Özer (1969), örneklerin tuz miktarlarını en az % 8,658, en çok % 23,400 ve ortalama % 14,721 olarak bulmuştur. Bu araştırma-da bulunan en az, en çok ve ortalama % tuz miktarlarının Özer (1969)'in sonuçlarından oldukça farklı; Koçak (1979)'in sonuçlarına ise benzer olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen değerler Peynir Mayası Standardı TS-3844 (Anon.,1982) ile karşılaştırıldığında 18 adet (% 72) örneğin standartta istenen değerden fazla olduğu, 7 adet (% 28) örneğin standarda uygun olduğu saptanmıştır.

Tablo 3.3. Peynir Mayası Örneklerinde Belirlenen Bazı Fiziksel ve Kimyasal Analiz Sonuçları

Örnek No	pH	Klorür %	Maya Kuvveti	
			Etikette Belirtilen	Laboratuvarında Saptanan (Soxhlet metodu)
1	5,58	10,93	12000	9520
2	5,11	9,94	15000	14280
3	5,57	11,5	50000	45450
4	5,59	12,21	12000	14590
5	5,53	11,99	12000	15270
6	5,44	11,64	12000	9850
7	5,21	9,37	6000	6450
8	5,53	9,08	10000	9850
9	5,63	4,9	12000	19610
10	5,54	10,79	12000	15500
11	5,80	10,79	12000	15750
12	5,08	10,77	12000	9760
13	5,55	11,22	50000	44440
14	5,82	4,83	15000	10000
15	5,12	14,05	15000	14600
16	5,39	11,07	50000	41670
17	5,45	12,21	15000	12600
18	5,50	12,50	12000	9760
19	5,11	9,23	12000	12820
20	5,50	12,35	5000	8690
21	5,53	11,07	12000	9660
22	5,67	9,51	3500	5670
23	5,09	11,6	5000	5850
24	5,62	10,94	12000	6600
25	5,53	11,07	5000	6040
En düşük	5,08	4,83	3500	5670
En yüksek	5,82	14,05	50000	45450
Ortalama	5,46	10,62	-	-

3.2.2.3. Maya Kuvveti (Pıhtılaştırma Gücü)

Maya kuvveti, kısaca belli bir miktar peynir mayasının 35 °C'da 40 dakikada pıhtılaştırdığı taze sütün aynı birim üzerinden miktarıdır (Anon., 1982).

Pıhtılaştırma gücü peynir mayasının içerdiği enzim konsantrasyonuna bağlı bir değer olup mayanın kullanım miktarını etkiler (Koçak, 1991). Bu nedenle mayalar, bu özelliklerine göre az kuvvetli, orta kuvvetli ve çok kuvvetli gibi sınıflara ayrılmaktadır (Anon., 1982; Koçak, 1991). Pıhtılaştırma gücünün teknolojik açıdan önemi ise mayanın içerdiği enzim ya da enzimlere bağlı olarak sıcaklık, pH ve Ca^{+2} gibi faktörlerden etkilenecek şekilde mayalama koşullarına bağlı olarak değişkenlik göstermesidir (Koçak, 1991). Bunun saptanması için çeşitli yöntemler (Soxhlet, Fleischmann, Berridge v.b.) kullanılmakta ise de sonuçlarının bazı farklılıklar gösterdiği belirtilmektedir (Berridge, 1952; Puhan, 1968; Eralp, 1974; Koçak, 1979; Uraz, 1979). Genellikle sütün her zaman aynı kalitede olmaması nedeniyle bu durumun ortaya çıktığı ve bu sakıncanın azaltılması için, pıhtılaştırma güçlerinin yağsız sütün tozundan yararlanılarak yapılması gerektiği belirtilmektedir (Berridge, 1952).

Ülkemizde mayaların pıhtılaştırma gücü 1/10000, 1/12000 veya 10000, 12000 vb. gibi değerlerle belirtilmektedir. Bu değerlerin anlamı bir kısım mayanın 35 °C sıcaklıktaki taze ve normal inek sütünün 40 dakika içinde 10000 veya 12000 kısmını pıhtılabileceğidir.

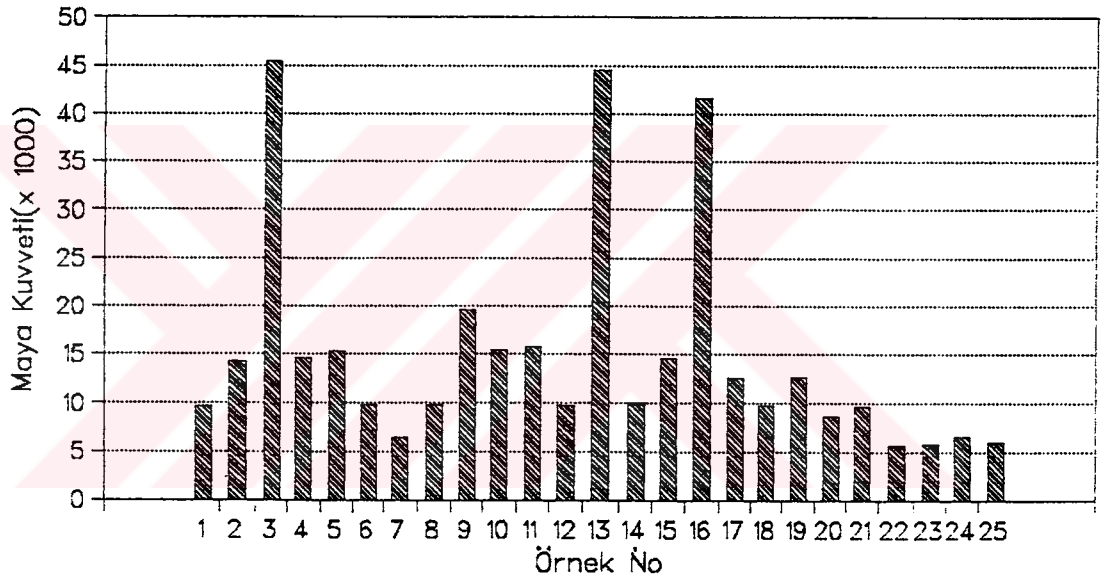
Bu araştırmada incelenen örneklerin pıhtılaştırma gücü Peynir Mayası Standardı TS-3844 (Anon.,1982)'de verilen yöntemle belirlenmiştir.

Koçak (1979), yurdumuzda maya üreten işletmelerden elde edilen pıhtılaştırma gücü düşük ürünlerin, genellikle mandıralar dışındaki kullanımlarda yararlanılmak üzere piyasaya sunulduğunu ve küçük ambalajlarda (60,100 ve 125 ml) ve ancak pıhtılaştırma gücü yüksek olanlardan farklı bir isimle satıldığını belirtmektedir. Çoğunlukla şirdenlerden ilk elde edilen ürünlerden sonra aynı hammaddeden ikinci kez yararlanılarak üretilen bu mayaların ayrı bir isimle satılması ve üreticiler tarafından da hangi markanın ikinci ürün olduğunun belirtilmemesi, araştırmada incelenen örneklerin hepsinin maya kuvvetinin saptanması gereğini ortaya koymuştur.

Bu amaçla incelenen 25 adet sıvı peynir mayası örneğinin maya kuvveti değeri sonuçları gerek etikette belirtilen değer, gerekse laboratuvarında tespit edilen değerler olarak Tablo 3.3'de toplu halde verilmiş ve ayrıca Şekil 3.3'de gösterilmiştir. Tablo ve Şekilden de anlaşılacağı gibi maya kuvveti değerleri en düşük 1/5670 ve en yüksek 1/45450 arasında değişmiştir. Dolayısıyla örneklerin maya kuvvetleri birbirinden çok farklı bulunmuştur. Ayrıca hiçbir örneğin etiketinde belirtilen maya kuvveti ile bu araştırmada belirlenen maya kuvvetleri aynı bulunmamıştır. İncelenen örneklerden 11 adedinin maya kuvvetleri etiketinde belirtilenden daha yüksek bulunmuştur (Tablo 3.3).

Koçak (1979), incelediği 13 adet sıvı şirden mayası örneğinin maya kuvveti değerini 2 örnekte 5000'den az; 4 örnekte 5000-10000 arasında ve 2 örnekte de 15000'den fazla bulunmuştur. Bu değerlerden en düşüğünün 4510, en yüksekinin ise 20839 olduğunu saptamıştır. Özer (1969), ülkemizde üretilen sıvı şirden mayalarının niteliklerini araştırmış ve maya kuvvetinin en az 1/1100, en çok 1/12000 ve ortalama 1/3800 olarak bulmuştur. Uraz (1979), ise 20 hafta boyunca sıvı şirden mayasının kuvvetini taze süt kullanarak belirlemiş ve en

düşük değeri 3440, en yüksek değeri 6140 ve ortalama değeri de 4595 olarak saptamıştır. Gerek Koçak (1979), gerek Özer (1969) ve gerekse Uraz (1979)'un sonuçları ile karşılaştırıldığında; bu araştırmada bulunan en düşük (1/5670) ve en yüksek (1/45450) maya kuvveti değerleri oldukça yüksektir.



Şekil 3.3. Peynir mayası örneklerinde belirlenen maya kuvveti değerleri

Peynir Mayası Standardı TS-3844 (Anon., 1982) ile karşılaştırıldığında incelenen 25 adet ticari sıvı peynir mayası örneğinin 13 adedinin orta kuvvetli (1/5000 - 1/10000) ve 12 adedinin çok kuvvetli (1/10000 ve daha fazla) olduğu; hiçbirinin az kuvvetli (1/3000 - 1/5000) olmadığı tespit edilmiştir. Ancak şu anda Türkiye piyasalarında kuvveti birbirinden çok farklı peynir mayalarının bulunduğu da ortaya konulmuştur (Tablo 3.3 ve Şekil 3.3). Bu durum konunun başında da

belirtildiği gibi kullanılan hammaddenin kademeli olarak peynir mayasına işlenmesi gerçeği ile ilgili olabildiği gibi hammadde farkı, işleme teknolojisi, mayaların depolama şartlarındaki farklılık (ambalaj, sıcaklık vb) ve üretim ile kullanım arasındaki sürenin hangi aşamasında olduğunun bilinmemesi gibi nedenlerden kaynaklanmış olabilir.

Bu sonuçtan hareketle örneklerde aynı metotla tespit edilen maya kuvvetlerinin bu kadar farklı olması peynir üreticilerinin kuvvet tespiti yapmadan kullanacakları peynir mayası miktarını ayarlamalarının mümkün olmadığı; aksi halde elde edilen peynirlerde gerek üretim gerekse olgunlaşma sırasında çeşitli problemlerle karşılaşacaklarını bilmeleri gerektiğini vurgulamak yerinde olacaktır.

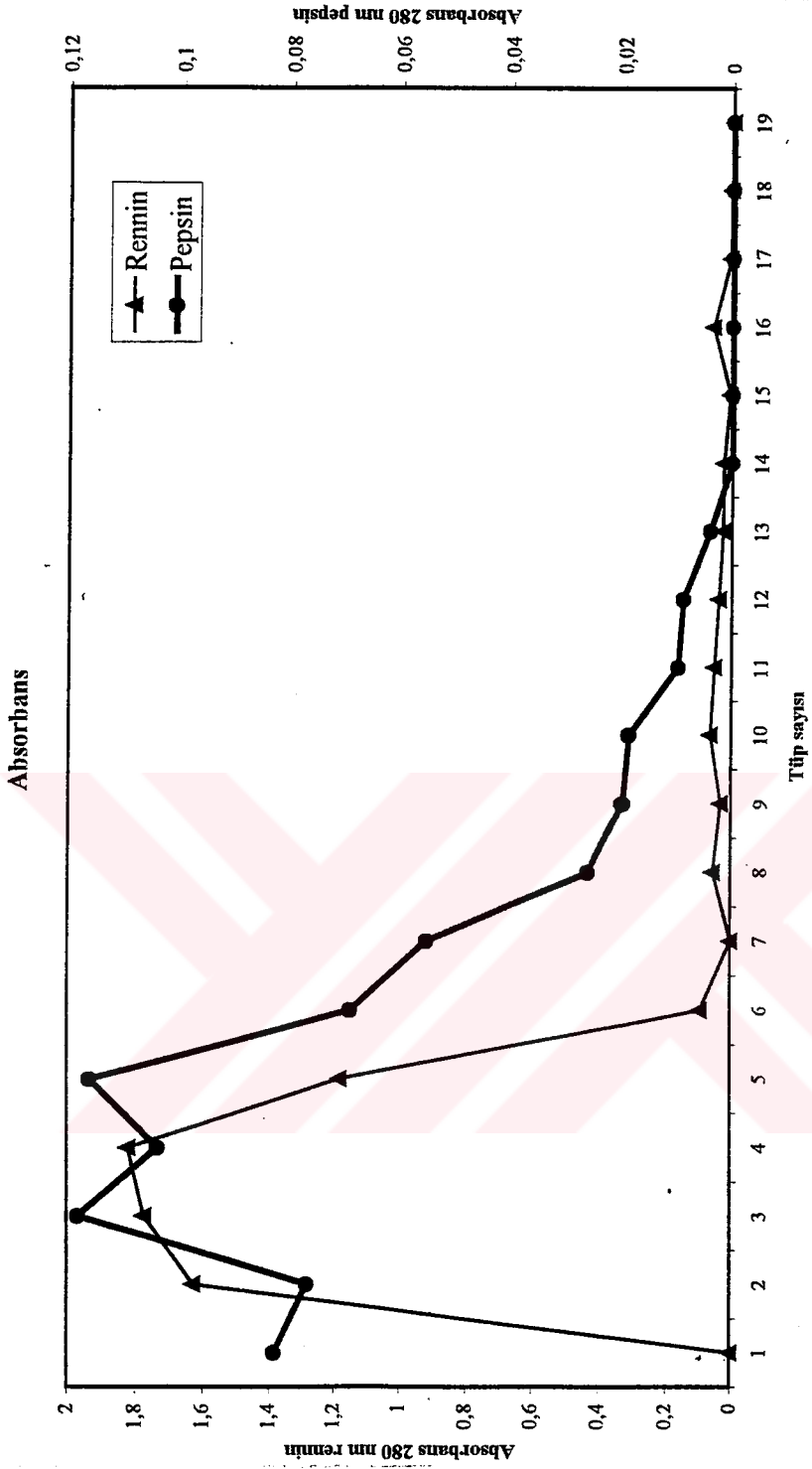
3.3. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

3.3.1. Rennet Örneklerinden Rennin ve Pepsin Enzimlerinin İyon Değişim Kolonundan Saflaştırılması

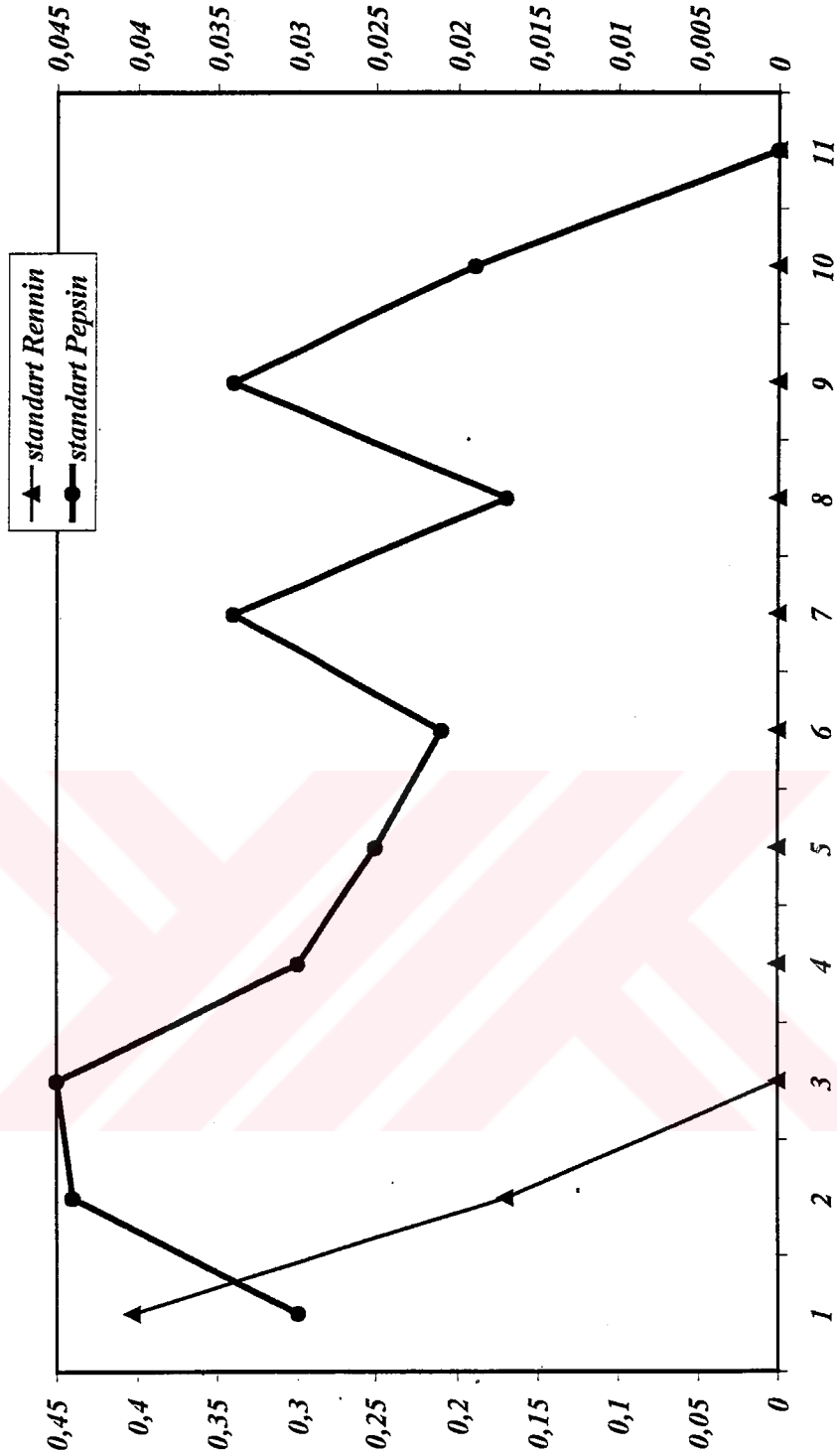
Rennet örnekleri, rennin ve pepsin enzimlerini saflaştırmak üzere kolona verilmeden önce diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. Rennet örnekleri berraklaştırılmak amacıyla önce, her 15 dakikada değiştirilmek üzere 2-5 saat saf suya, sonra da 3 saat süreyle dengeleme tamponuna karşı diyalizlenmiştir. Diğer taraftan jelin kolona yerleştirilmesi ve tamponla dengelenmesi işlemlerinden sonra diyalizlenmiş rennet örnekleri 2'şer ml'lik birimler halinde kolona tatbik edilerek rennin (0,20 M NaCl tamponu ile) ve pepsin (0,50 M NaCl tamponu ile) elüe edilmiştir. Elüatlar 5'er ml'lik fraksiyonlar halinde toplanarak, her tüpteki numune için 280 nm'de kalitatif protein tayini yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 3.4'de gösterilmiştir.

Bulunan sonuçların mukayesesi amacıyla Standart Rennet numunesi de aynı kolonda, aynı tamponlarla saflaştırma işlemine tabi tutulmuştur. Absorbans veren tüpler 280 nm’de izlenmiştir (Şekil 3.5). Şekilden de görüleceği gibi standart rennette protein içeriği çok yüksek değildir. Bunun nedenleri olarak; enzimlerin çevre şartlarına, özellikle sıcaklığa karşı hassasiyetleri ve buna bağlı olarak da laboratuvara ulaşınca kadar soğuk zincirde kalıp kalmadığını bilinmemesi gösterilebilir. Ayrıca standart örneklerin (standart rennin, pepsin, rennet) etiket bilgilerinin eksik olması gerçeğini de vurgulamak gerekir.





Şekil 3.4. İyon değişim kolonundan rennin enziminin (0,20 M NaCl tamponu) ve pepsin enziminin (0,50 M NaCl tamponu) 280 nm'deki absorbans değerleri. Kolon: 1,3 cm² x 30 cm, Jel yüksekliği: 15 cm, Elüsyon hızı: 80 ml/h ve Fraksiyon hacmi: 5ml



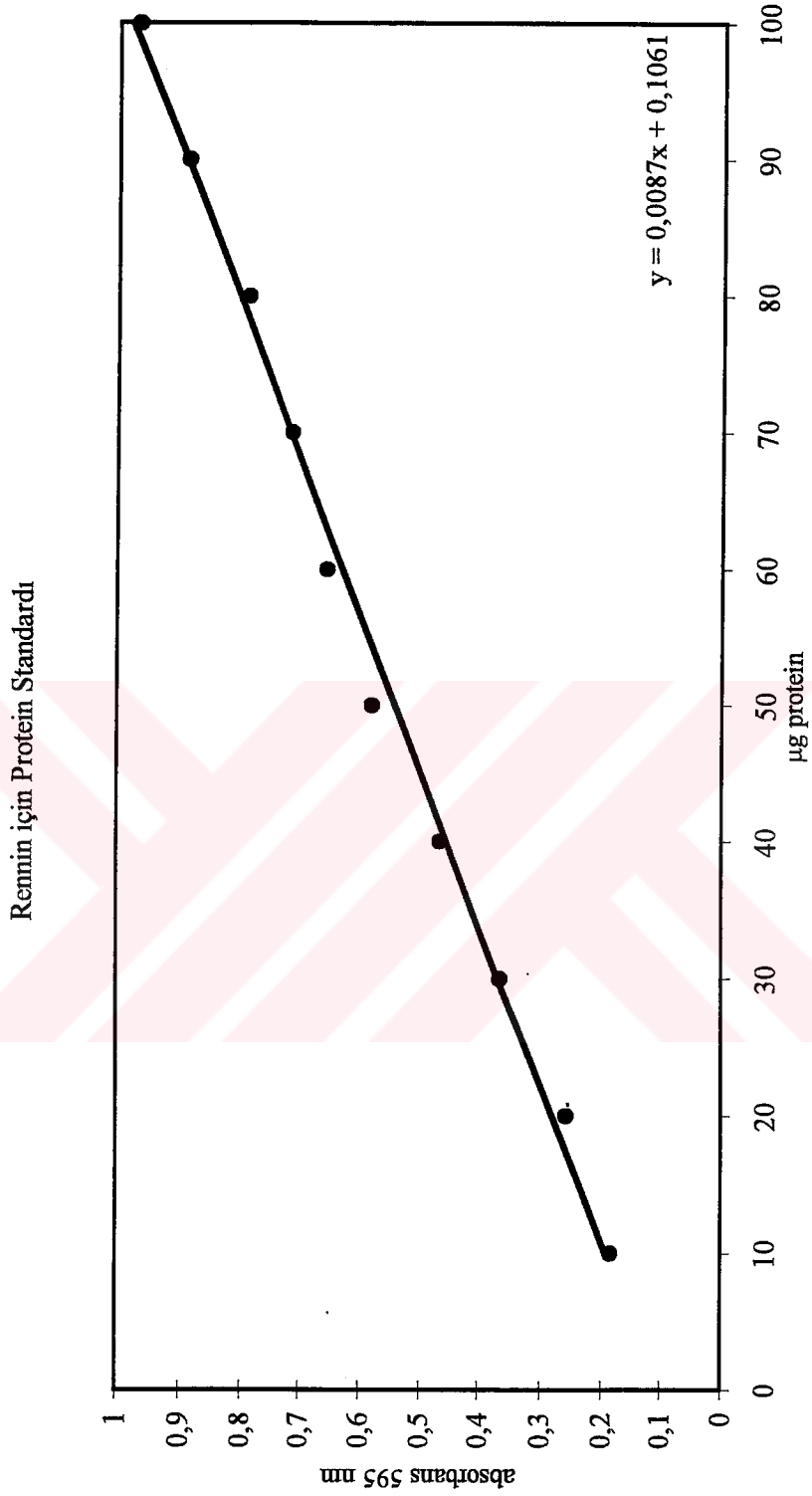
Şekil 3.5. Stardart rennetten iyon değişim kromatografisi ile saflaştıırılan rennin (0,20 M NaCl tamponu ile) ve pepsin (0,50 M NaCl tamponu ile) enzimlerinin 280 nm'deki absorbans değerleri. Kolon: 1,3 cm² x 30 cm, Jel yüksekliği: 15 cm, Elüsyon hızı: 80 ml/h ve Fraksiyon hacmi: 5 ml.

3.3.2 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğriler

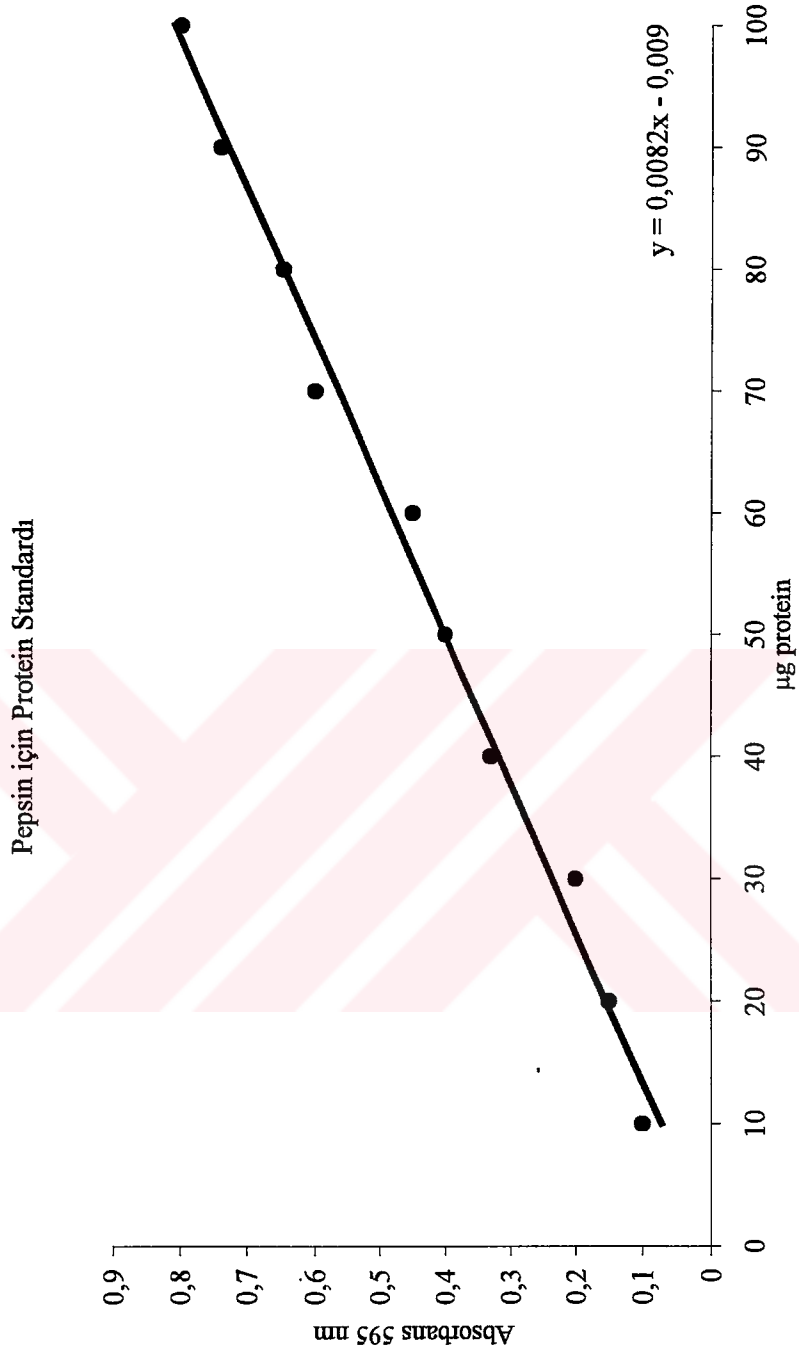
Kantitatif protein tayinininde Coomassie Blue Yöntemi kullanılmıştır. Rennet örneklerinden saflaştırılan rennin ve pepsin çözeltilerinin protein miktarı bu yöntemle belirlenmiştir. Elüsyon tamponları farklı olduğundan rennin ve pepsin için ayrı ayrı standart eğriler hazırlanmıştır.

3.3.2.a Rennet örneklerinden saflaştırılan rennin miktarını belirlemek için protein tayininde kullanılmak üzere rennini elüe etmek için kullanılan tamponla bir standart eğri hazırlanmıştır. Bunun için standart olarak bovine serum albumin kullanılmış, standart çözeltideki μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 3.6'da gösterilmiştir. Bu eğriden faydalanılarak örneklerdeki rennin miktarı (mg/l) % olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.4).

3.3.2.b Rennet örneklerinden saflaştırılan pepsin miktarını belirlemek içinde pepsini elüe etmekte yararlanılan tampon kullanılmak kaydıyla standart olarak yine bovine serum albumin kullanılmış ve farklı bir standart eğri hazırlanmıştır. Standart çözeltideki μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 3.7'de gösterilmiştir. Bu eğriden faydalanılarak örneklerdeki pepsin miktarı (mg/l) % olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.4).



Şekil 3.6. Coomassie blue yöntemiyle rennin miktarlarının belirlenmesinde bovine serum albumin kullanılarak elde edilen standart grafik.



Şekil 3.7. Coomassie blue yöntemiyle pepsin miktarlarının belirlenmesinde bovine serum albumin kullanılarak elde edilen standart grafik.

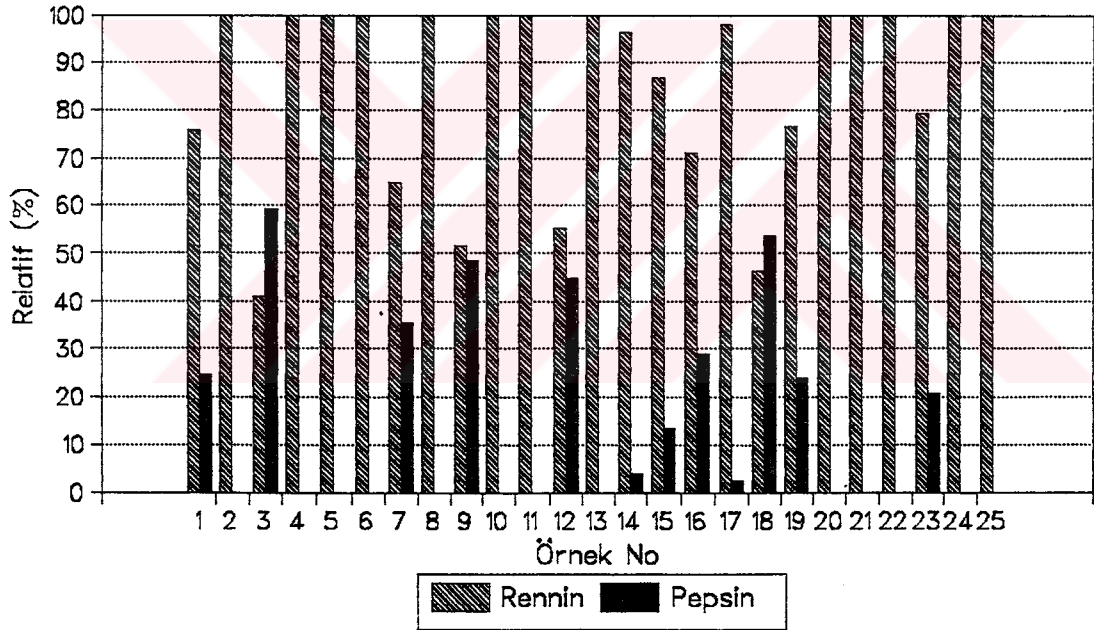
Tablo 3.4. İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırılan Peynir Mayası Örneklerinin Rennin ve Pepsin Miktarları (%).

Örnek No	Peynir Mayasındaki Toplam Enzimler (%)		Örnek No	Peynir Mayasındaki Toplam Enzimler (%)	
	Rennin (%)	Pepsin (%)		Rennin (%)	Pepsin (%)
1	75,4	24,6	14	96,0	4,0
2	100	0,0	15	87,1	12,9
3	40,9	59,0	16	71,1	28,9
4	100	0,0	17	97,0	3,0
5	100	0,0	18	46,2	53,8
6	100	0,0	19	76,5	23,5
7	64,6	35,4	20	100	0,0
8	100	0,0	21	100	0,0
9	52,0	48,0	22	100	0,0
10	100	0,0	23	79,6	20,4
11	100	0,0	24	100	0,0
12	55,3	44,7	25	100	0,0
13	100	0,0			

En Düşük : Rennin % 40,9 - Pepsin % 0,0

En Yüksek : Rennin % 100 - Pepsin % 59,0

Tablo 3.4'den de görüleceği gibi incelenen 25 adet ticari sıvı peynir mayası örneğinin rennin enzim miktarları % 40,9 ile % 100 arasında; pepsin enzimi miktarları da % 0- 59 olarak saptanmıştır (Şekil 3.8). Rothe et al. (1977)'de roket immunoelktroforez ile 40 ticari sığır renneti örneğinde % 1,3 - 90,0 arasında rennin enzimi, % 10,0 - 98,7 pepsin A olduğunu belirlemiştir. Visser et al. (1988) ise 9 adet sıvı buzağı ve sığır renneti örneğinde rennin ve pepsin yüzdelerini sırasıyla % 12-89 ve % 11-88 olarak bulmuşlardır. Adı geçen araştırmacıların hem buzağı hem de sığırlardan elde edilen rennetlerin incelemesi nedeniyle



Şekil 3.8 Peynir mayalarında belirlenen rennin ve pepsin oranları

Bu araştırmada ise temin edilen örneklerin hangi yaştaki hayvanlardan elde edildiğinin bilinmemesi nedeniyle bu açıdan yorum yapmak doğru değildir. Ancak şu da bir gerçektir ki halihazırda Türkiye piyasalarında bulunan peynir mayalarının rennin ve pepsin miktarının oldukça farklı düzeyde olduğu ortaya konulmuştur (Tablo 3.4). Özellikle rennini yüksek buzağı şirdeninden peynir mayası üretiminin

ekonomik olmaması (buzağı kesimi nedeniyle) ve bu nedenle her yaş-taki hayvan şirdeninden faydalanılması bu farka neden olmuş olabilir.

Peynir Mayası Standardı TS-3844'de (Anon, 1982) saf peynir mayalarında en çok % 3; karışık peynir mayalarında ise en çok % 50 pepsin olabileceği hükmü vardır. Bu araştırma sonuçları standart ile karşılaştırıldığında 25 adet ticari sıvı peynir mayası örneğinin 14 adedi saf peynir mayası sınıfına ve 9 adedi ise karışık peynir mayası sınıfına (% 4- % 48) dahil olmaktadır. 2 örnek ise % 50'den fazla pepsin içerdiğinden standarda uymamaktadır. Ancak önemle vurgulamak gerekir ki; Peynir Mayası Standardı'nda (Anon. 1982) saf ve karışık peynir mayası %'si olarak "en çok pepsin" ifadesi kullanılmış olup, bu araştırma da toplam enzimlerin %'si verilmiştir. Tam olarak kıyaslama yapılabilmesi ve bundan emin olunabilmesi için Peynir Mayası Standardı'nda pepsin miktarının hangi cinsden verildiğinin açıkça belirtilmesi gerekir.

3.3.3. Peynir Mayası, (Ticari ve Standart Rennet) Rennin ve Pepsinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez

İyon değişim kolonundan saflaştırılan rennin ve pepsin enzimleri ile ticari ve standart rennet örneklerinin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez yapılmıştır.

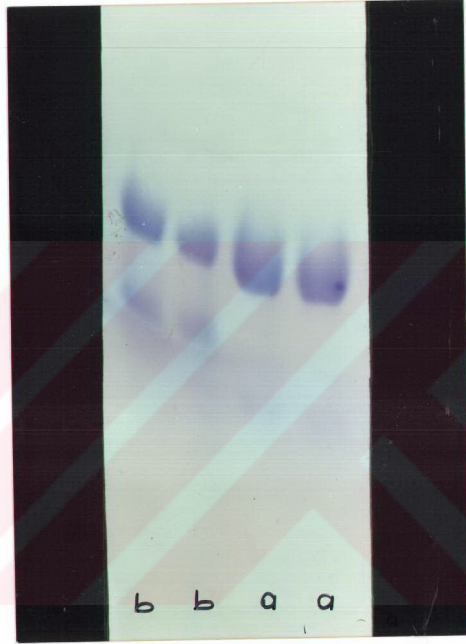
3.3.3.1. Standart Rennet ve Ticari Rennetin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez Fotoğrafı

Piyasadan temin edilen ticari rennet ile standart rennet (4 mg/ml) elektroforetik olarak mukayese edilmiş ve içeriklerinin benzeyip benzemediği belirlenmeye çalışılmıştır (Şekil 3.9). Fotoğraftan da görüleceği gibi ticari rennet diye adlandırılan ve piyasadan temin

edilen peynir mayası örneklerinde tek bant, standart rennette ise iki farklı bant görülmüştür. Standart rennetteki farklı bantın safsızlık olduğu akla gelmektedir.

3.3.3.2. İyon Değişim Kolonundan Alınan Rennin-Pepsine Ait SDS-Jel Elektroforez Fotoğrafı

Saflaştırma işleminin, yani rennetten rennin ve pepsinin ayrılıp ayrılmadığının kontrol edilmesi amacıyla saflaşmadan önceki numune ve saf enzimler SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezine tabi tutulmuştur (Şekil 3.10). Fotoğraf, ticari rennete ait kalın bantların yanında görülen, rennin ve pepsine ait 3'er adet tek bant çok temiz bir şekilde enzimlerin saflaştığını ve kesin olarak birbirinden ayrıldığını göstermektedir. Fotoğrafta görülen diğer bir dikkat çeken nokta ise iki enzimin molekül ağırlıklarının birbirine çok yakın olduğunun anlaşılmasıdır (Topal, 1985; Kurt, 1990; Akın, 1996).



a: Ticari rennet

b: Standart rennet

Şekil 3.9. Ticari ve standart rennete ait SDS-jel elektroforez fotoğrafı.



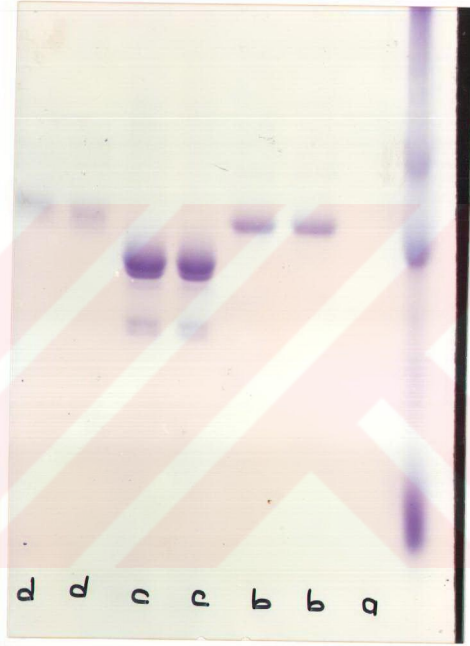
a: Safılaştırılan pepsin b: Safılaştırılan rennin
c: Ticari rennet

Şekil 3.10. İyon değişim kolonundan alınan rennin ve pepsine ait SDS-jel elektroforez fotoğrafı.

3.3.3.3. İyon Değişim Kromatografisi İle Saflaştırılan Rennin ve Standart Rennin İle Saflaştırılan Pepsin ve Standart Pepsine Ait SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez Fotoğrafları

Ticari rennet örneklerinden saflaştırılan rennin ve pepsin enzimleri, Sigma Comp.'dan saf olarak elde edilen rennin ve pepsine karşı yürütülmüş elde edilen fotoğraflar topluca (Şekil 3.11) ve ayrı ayrı gösterilmiştir (Şekil 3.12 ve Şekil 3.13).

Fotoğraflardan da görüldüğü gibi standart pepsin protein içeriğinin çok düşük olması nedeniyle hiç protein bantı vermemiştir. Ticari rennetlerden saflaştırılan pepsinlerde de durum aynı olduğundan (3. ve 18. örnekler hariç), % 25'lik TCA ile çökdürmek suretiyle elektroforetik olarak gözlemek mümkün olmuştur. Ancak standart olarak temin edilen pepsin aynı işlemlerle de gözlenememiştir.



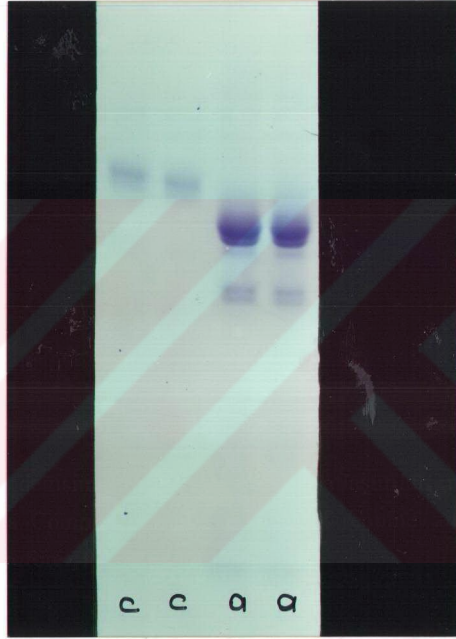
a: Standart pepsin

b: Saflaştırılan pepsin

c: Standart rennin

d: Saflaştırılan rennin

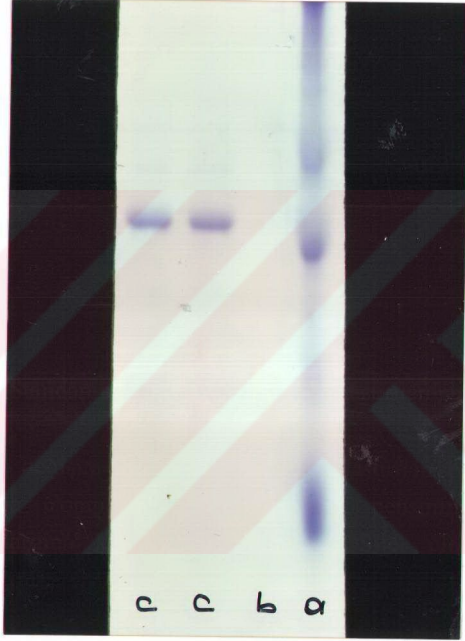
Şekil 3.11. İyon değişim kolonundan saflaştırılan rennin ve pepsine ait SDS-jel elektroforez fotoğrafı



a: Standart rennin

b: Saflaştırılan rennin

Şekil 3.12. İyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan rennin ile Sigma Comp.'dan temin edilen saf rennine ait SDS-jel elektroforez fotoğrafı



a: MWSDS 70 protein standardı

b: Standart pepsin

c: Saflaştırılan pepsin

Şekil 3.13. İyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan pepsin ile Sigma Comp.'dan elde edilen saf pepsinin protein standardına karşı (MWSDS-70) SDS-jel elektroforez fotoğrafı.

4. GENEL SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırma, Türkiye'nin değişik bölgelerinde faaliyette bulunan süt işletmelerinden temin edilen 25 adet sıvı peynir mayasının mikrobiyolojik, duyuşal, fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal özelliklerinin tespiti amacıyla planlanmış ve yürütülmüştür. Araştırma sonucunda saptanan bulguların değerlendirilmesi ve tartışılması sonucunda belirlenen genel sonuç ve öneriler aşağıda sıralanmıştır.

1. Peynir mayası örneklerinde total aerobik mezofilik bakteri sayısı $<1-2,5 \times 10^6$ arasında bulunmuştur. Örneklerin 20 adedi (% 80) TS-3844 Peynir Mayası Standardı'nda belirtilen en fazla 500 adet/ml total aerobik mezofilik bakteri bulunabilir hükmüne uygunluk gösterirken, 5 örnek standart dışı bulunmuştur.
2. Peynir mayası örneklerinin maya ve küf sayıları $<1-10$ CFU/ml arasında bulunmuştur. Peynir Mayası Standardı'nda TS-3844, peynir mayalarında hiç maya ve küf bulunmaması hükmü vardır. Araştırmanın sonuçlarına göre örneklerin 22 adedi (%88) bu hükme uygunken, diğer 3 örneğin standart dışı olduğu bulunmuştur.
3. Peynirlerde gaz, asit, tat ve koku bozukluğu ve şişkinlik gibi büyük problemlere neden olan anaerob sporların Peynir Mayası Standardı'na göre peynir mayalarında hiç bulunmaması gerektiği belirtilirken incelenen 25 adet örneğin 4 adedinde (% 16) anaerob spor olduğu tespit edilmiştir ($<1-35$ CFU/ml).
4. İncelenen hiçbir peynir mayası örneğinde koliform grubu mikroorganizmaya rastlanmamıştır (<1 CFU/ml). Bu durum Türkiye peynir teknolojisinde oldukça sevindiricidir. Zira TS-3844 Peynir

Mayası Standardı peynir mayalarında koliform gurubu mikroorganizma bulunmamasını hükme bağlamaktadır.

5. Duyusal analiz sonuçlarına göre 15 adet örneğin tortusuz, berrak ve kendine has kokuya sahip olarak Peynir Mayası Standardı TS-3844'e uygun olduğu, 10 örneğin gerek koku gerekse renk ve bulanıklık bakımından standart dışı olduğu bulunmuştur.
6. Peynir mayalarında pH değerleri 5,08-5,82 arasında değişmiş ve örneklerin ancak % 8'i TS-3844'e uygunluk göstermiştir.
7. İncelenen peynir mayası örneklerinin klorür miktarları %4,83 ile % 14,05 arasında değişmiştir. Peynir Mayası Standardı TS-3844 ile karşılaştırıldığında örneklerin % 72'sinin standartta istenen en yüksek değerden fazla klorür içerdiği saptanmıştır.
8. Peynir mayalarında pıhtılaştırma gücü 1/5670 ile 1/45450 arasında değişmiştir. Dolayısıyla Türkiye piyasalarında bulunan peynir mayalarının birbirinden çok farklı pıhtılaştırma gücünde olduğu ortaya çıkmıştır. Peynir Mayası Standardı ile karşılaştırıldığında örneklerin hepsinin orta veya çok kuvvetli peynir mayası sınıfına girdiği belirlenmiştir. Ayrıca hiçbir örneğin, etikette belirtilen maya kuvveti ile bu araştırmada belirlenen maya kuvvetleri aynı bulunmamış ancak genellikle benzer bulunmuştur. Maya kuvvetleri ile ilgili sonuçlardan; aynı metotla tespit edilen maya kuvveti değerlerinin bu kadar farklı olması, peynir üreticilerinin kuvvet tespiti yapmadan kullanacakları peynir mayası miktarını ayarlamalarının mümkün olmadığını, aksi halde elde edilen peynirlerde gerek üretim gerekse olgunlaşma sırasında çok çeşitli problemlerle karşılaşabileceklerini bilmeleri gerektiği ortaya çıkmıştır.

9. Peynir mayası örneklerinde yapılan biyokimyasal analizler sonucunda örneklerde % 40,9-100 arasında rennin enzimi, % 0-59 arasında da pepsin enzimi bulunduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla Türkiye piyasalarında bulunan peynir mayalarının enzim kompozisyonunun oldukça farklı düzeyde olduğu ortaya çıkmıştır. İyi bir peynir mayasındaki enzimlerin tamamının rennin olması gerektiği, pepsin miktarı arttıkça peynirlerde, özellikle olgunlaşma aşamasında yumuşaklık, erime, acılık vb. problemler olabileceği bilindiğine göre Türkiye peynirlerinde (özellikle beyaz salamura peynir) görülen bu tip bozuklukların nedeninin kullanılan peynir mayasının enzim kompozisyonunun farklılığından ve özellikle bazılarının pepsin içeriğinin yüksekliğinden kaynaklanmış olabileceği ortaya konulmuştur.
10. İncelenen 25 adet peynir mayası örneğinin 14 adedi istenen enzim kompozisyonuna sahip peynir mayası özelliğinde bulunmuştur (TS-3844'e göre pepsin en çok % 3 olarak değerlendirildiğinde). Ancak Peynir Mayası Standardı'nda (TS-3844) saf ve karışık peynir mayası %' si olarak "en çok pepsin" ifadesi kullanılmış olup, bu araştırmada toplam enzimlerin %'si verilmiştir. Tam olarak kıyaslama yapılabilmesi ve bundan emin olunabilmesi için Peynir Mayası Standardı'nda pepsin miktarının hangi cinsten verildiğinin açıkça belirtilmesi gerekmektedir.
11. Ticari rennetlerdeki iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan enzimlerin saflık kontrolü SDS-Jel elektroforezinde kontrol edilmiş ve saf olduklarından emin olunmuştur.
12. Tüm araştırma sonuçları dikkate alındığında insan beslenmesinde oldukça önemli bir yer tutan peynirin (özellikle olgunlaştırılan) kaliteli ve standart olarak üretilebilmesi için kullanılan peynir

mayasının standart özelliklerde olması gerektiği, enzim kompozisyonunun bu araştırma temel teşkil edecek şekilde daha detaylı araştırmalarla belirlenmesi ve pratiğe aktarılması sonucuna varılmıştır.



KAYNAKLAR

Akın, N., 1996, Peynir Yapımında Kullanılan Süt Pıhtılaştırıcı Enzimler ve Bunların Bazı Özellikleri. Gıda, 21 (6): 435-442

Anonymous, 1982, Peynir Mayası. TS-3844. TSE, Ankara.

Anonymous, 1987, Calf Renet and Adult Bovine Renet: Determination of Chymosin and Bovine Pepsin Contents (Chromatographic method). International Dairy Federation (IDF) Standart 110A. Belgium.

Anonymous, 1989, Enzymes at Work. NOVO -Nardisk a/s Bagsvaerd, Denmark.

Anonymous, 1992, Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3 th Ed. Ed. By Vanderzant, C. and Splitts Toesser, D.F. American Public Health Association, Washington D.C. USA.

Baumgart, J., Firnhaber, J., Spicher, G., 1986, Microbiologische Untersuchung von Lebensmitteln, Behr's Verlag Hamburg, Germany.

Berankova, E., Rauch, P. and Kas, J., 1989, Determination of Chymosin and Bovine Pepsin A Activity in Combined Rennets on the Basis of Immunochemical Inhibiton. J. Dairy Res. 56(4): 631-637.

Berridge, N.J., 1952, Some Observations on the Determination of the Activity of Renet. The Analyst 77(2): 52-62.

- Bradford, M.M., 1976, A Rapid and Sensitive Method for the Quatitation of Microgram Quantites of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal, Biol. Chem. 72, 248.
- Cankara, M., Karacaoğlu, V., 1983, Beyaz Peynir Yapımında Sütün Standardizasyonu ve Pasatorizasyonunun Önemi. Beyaz Peynir Sempozyumu. Karınca Matbaacılık, İzmir.
- Collin, J.J., Marthin, P., Garnot, P., Ribadeau Dumos, B. and Macquot, G., 1981, Detarmination of Chymosin and Bovine Pepsin A in Commercial Bovine Rennets and Pepsins. Milchwissenschaft, 36(1): 32-35.
- Çakmakçı, S. ve Şengül, M., 1995, Peynirde Acı Tat Oluşumu, Etki Eden Faktörler ve Kontrolü. Atatürk Üni. Ziraat Fak. Derg. 26(3): 385-399.
- Çakmakçı, S., 1996, Peynir Lezzeti ve Oluşumu I., Gıda, 21(4): 261-268.
- Davis, J.G., 1965, Cheese, Vol: 1, Basic Technology. J. and A.Churchill Ltd. London. 4635. (Koçak, 1979'dan alınmıştır).
- de Koning, P.J., Draaisma, J.Th.M., 1973, Identification of Diffeerent Types of Rennet By Means of İsoelectric Focusing. Neth. Milk Dairy J.27:368-378.
- di Gregorio, F., Sisto, R. and Morisi, F., 1979, Biospecific Chromatography of Chymosin on Quinonated Sephorose and its Aplication to Enzyme Content Determination in Rennets. J. Dairy Res., 46(4):673-680.

- Eralp, M. 1974, Peynir Teknolojisi. Ankara Üni. Ziraat Fak. Yayınları No: 533, Ankara, s.331.
- Ergüllü, E., 1983, Standart Beyaz Peynir Yapımı İçin Öneriler. Beyaz Peynir Sempozyumu, Karınca Matbaacılık, İzmir.
- Fennema, O.R., 1985, Food Chemistry. Marcel Dekker, Inc. Newyork.
- Garnot, P., Thapone. J.L., Mathieu, J.M., Maubois, J.L. and Dumas Ribadeau, B., 1972, Determination of Rennin and Bovine Pepsins in Commercial Rennets and Abomasal Juices. J. Dairy Sci., 55(12):1641-1650.
- Garnot, P. and Molle, D., 1982, Influence of Type and Degree of Inactivation on Chymosin and Bovine Pepsin Quatification by Rocket Immunoelectrophoresis. Le Lait, 62(621/622): 671-680.
- Gönç, S., 1991, Beyaz Peynirde Görülen Hata ve Bozuklukların Nedenleri ve Önleme Yolları. II. Milli Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu. Trakya Üni. Tekirdağ Ziraat Fak. Yayınları No: 125, Tekirdağ.
- Green, M.L., 1977, Review of the Progress of Dairy Science : Milk Coagulants. J. Dairy Sci. 44: 159-188.
- Hausler, W.J. Jr., 1974, Standart Methods for the Examination Dairy Products. American Public Health Association, 1015 Eighteenth Street NW. Washington.

- Koçak, C., 1979, Türkiye’de Kullanılan Sıvı Şirden Mayalarının Değişik Saklama Koşullarında Dayanıklılığı Üzerinde Araştırmalar Doktora Tezi (Yayımlanmamış), Ankara Üni. Ziraat Fak., Ankara.
- Koçak, C. 1991, Peynir Yapımında Kullanılan Mayalar ve Özellikleri. II. Milli Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu. Trakya Üni. Tekirdağ Ziraat Fak. Yayın No:125, Tekirdağ.
- Kurt, A., 1990, Süt Teknolojisi, Atatürk Üni. Yayınları No: 573, Ziraat Fak. Yayınları No: 257, Erzurum, s.398.
- Laemmli, D.K., 1970, Cleavage of Structural Protein in Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature (London),227.
- Metin, M., 1996, Süt Teknolojisi. I. Bölüm. Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. E.Ü. Müh.Fak. Yayınları No:33, İzmir.
- Nielsen, P.K. and Foltmann, H., 1995, Purification and Characterization of Porcine Pepsinogen B and Pepsin. Arch. Biochem. and Biophysic. 322(2):417-422.
- O’leary, P.A. and Fox, P.F., 1974, A Method for the Quantitative Analysis of the Enzyme Complement of Commercial Rennets. J. Dairy, Res., 41, 381-387.
- Özer, I., 1969, Yerli Peynir Mayalarının Teknolojik ve Bakteriyolojik Nitelikleri Üzerine Araştırmalar. Türk. Vet. Hekiml. Dern.Derg. 39(8): 17-24.

- Öztek, L., 1981, *Mucor miehei* Küf Mantarından Elde Edilen Mikrobiyal Maya "Hannilase"nın Beyaz Peynir ve Kaşar Peyniri Yapımında Kullanılması Üzerinde Araştırmalar. Doçentlik Tezi (Yayımlanmamış). Atatürk Üni., Erzurum, s. 147.
- Öztek, L.,1991, Peynirde Olgunlaşma ve Buna Etkili Olan Faktörler. II. Milli Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu (12-13 Haziran 1991), Trakya Üni. Tekirdağ Ziraat Fak. Yayınları No: 125, Tekirdağ.
- Puhan, Z., 1968, Labstarke derim Handel vorkommenden Labproparatesch weiz. Milchzetg. 94(19):141-142 (Koçak 1979'dan alınmıştır).
- Rauch, P., Berankova, E., Valentova, O., Jajdok, J., Kas, J., 1988, High-performance Anion-exchange Chromatography of Rennet Enzymes. J. Chromatography, 438: 451-453.
- Robyt, J.F. and White, B.J., 1990, Biochemical Techniques- Theory and Practice, Naveland Press, Inc. Illinois. USA.P.407.
- Rothe, G.A.L., Axselsen, N.H., Johnk, P., Foltmann, B., 1976, İmmunochemical, Chromatografic and Milk-clotting Activity Measurements for Quantification of Milk-clotting Enzymes in Bovine Rennets. J.Dairy Res., 43,85-95.
- Rothe, G.A.L.,Harboe, M.K. and Martiny, S.C., 1977, Quatifcaiton of Milk-clotting Enzymes in 40 Commercial Rennets. Compering Rocket-immunoelectrophoresis with an Activity Ratio Assay. J.Dairy Res.,44(1): 73-77.

- Segel, I.A., 1968, Biochemical Calculations. John Wiley and Sons, Inc., Newyork, P 403.
- Sicho, V. And Husek, V., 1974, Determination of Pepsin itself Rennets. Milchwissenschaft, 29(11):668-673.
- Speck, M.L., 1976, Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Ass. Inc. 1015 Eighteenth Street N.W. Washington, b.c., USA, p 701.
- Topal, Ş., 1985, Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Renninin Yeri. Gıda. 10(1):25-37.
- Topal, Ş., 1988, Mikrobiyal Enzimler ve Biyoteknolojik Yolla Rennin Üretimindeki Gelişmeler. Gıda, 13(3):181-190.
- Tunail, N., Köşker, Ö., 1986, Süt Mikrobiyolojisi. Ankara Üni. Ziraat Fak. Yayınları No: 966. Ofset Basım Ders Notu: 17, Ankara.
- Uraz, T., 1976, Türkiye Peynirciliğinde Kullanılan Mayalar ve Bunların Elde Edildiği Şirdenler Üzerinde Araştırmalar. (Doktora Tezi). Ankara Üni. Ziraat Fak. Yayınları No: 625, Ankara.
- Uraz, T., 1979, Peynir Mayalarında Pıhtılaşma Gücünün (Kuvvet) Saptanması Üzerine Bir Araştırma. Gıda, 4(3):103-109.
- Uraz, T., Koçak, C., Alper, O., 1983, Beyaz Peynir Yapımında Peynir Mayası, Sütü Mayalama Sıcaklığı ve Pıhtılaşma Süresinin Önemi, Beyaz Peynir Sempozyumu. Karınca Matbaacılık, İzmir.

Üçüncü, M.L., 1996, Süt Teknolojisi. II. Bölüm. E.Ü. Müh. Fak.
Yayınları No: 32. İzmir.

Visser, S., Rollema, H.S., Friedenthal, M.K. and van Alebeek, G.J.,
1988, Spectrophotometric Method for the Determination of
Chymosin and Pepsin in Calf and Adult Bovine Rennets. Neth.
Milk and Dairy J., 42:221-232.

