

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MELATONİN VE SALİSİLİK ASİT UYGULAMALI ENGİNAR
(*CYNARA SCOLYMUS L.*) PİSTİL HÜCRE KÜLTÜRLERİNDEN
ÜRETİLEN ASPARTİK PROTEAZ İLE PIHTILAŞTIRILAN TAZE
KOYUN VE KEÇİ SÜTÜ PEYNİRLERİNİN İNCELENMESİ**

Özlem ÇAYIR

**Danışman
Pro. Dr. Bedia ŞİMŞEK**

**II. Danışman
Doç. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY**

**DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2024**

© 2024 [Özlem ÇAYIR]

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Peynirlerde Kullanılan Enzimler	4
2.1.1. Bitkisel kaynaklardan aspartik proteaz eldesi.....	5
2.1.2. Bitki doku kültürü	7
2.1.3. Süspanse (sıvı) hücre kültürü	9
2.1.4. Enginar ve enzimleri	13
2.1.5. Enginardan elde edilen enzimlerle üretilen koyun ve keçi peynirlerinin özellikleri.....	15
2.1.6. Salisilik asitin etkileri.....	25
2.1.7. Melatoninin etkileri	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM	33
3.1. Materyal.....	33
3.1.1. Enginar.....	33
3.1.2. Çiğ süt.....	33
3.1.3. Mezofilik starter kültür	34
3.1.4. Kalsiyum klorür (CaCl ₂) ve tuz (NaCl)	34
3.2. Metot.....	34
3.2.1. Doku kültürünün hazırlanması	34
3.2.2. Kallus kültürü geliştirme çalışmaları.....	35
3.2.3. Süspansiyon hücre kültürü geliştirme çalışmaları	35
3.2.4. Kaba ekstraktların hazırlanması	36
3.3. Enzimlere Uygulanan Analizler	37
3.3.1. Hücre büyüme kinetiğinin belirlenmesi	37
3.3.2. Süt pıhtılaşma aktivitesi testi.....	37
3.3.3. Toplam protein ve proteolitik aktivite analizi.....	37
3.4. Keçi ve Koyun Peyniri Üretimi.....	38
3.4.1. Çiğ süt örneklerine uygulanan kimyasal analizler	40
3.4.1.1. Özgül ağırlık değeri	40
3.4.1.2. pH değeri.....	40
3.4.1.3. Titrasyon asitliği değeri	40
3.4.1.4. Kurumadde değeri	40
3.4.1.5. Yağ ve kurumaddede yağ değeri.....	40
3.4.1.6. Kül değeri.....	41
3.4.1.7. Toplam azot değeri	41
3.5. Keçi ve Koyun Peyniri Analizleri.....	41
3.5.1. pH tayini	41
3.5.2. Titrasyon asitliği tayini.....	41
3.5.3. Kurumadde oranı.....	42

3.5.4. Yağ oranı	42
3.5.5. Tuz oranı	42
3.5.6. Su aktivitesi.....	42
3.5.7. Toplam azot analizi	42
3.5.8. Suda çözünen azot analizi	43
3.5.9. Olgunlaşma oranı.....	43
3.5.10. Tekstür analizi.....	43
3.5.11. Renk analizi	45
3.5.12. Üre-poliakrilamid jel elektroforez (Urea-PAGE) ile kazein fraksiyonlarının belirlenmesi	45
3.5.13. SEM (Taramalı Elektron Mikroskopu) analizi	49
3.5.14. Mikrobiyolojik analizler	50
3.5.14.1. Toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı.....	50
3.5.14.2. Laktobasillerin sayımı.....	50
3.5.14.3. Laktokokların sayımı.....	51
3.5.15. İstatistiksel analiz	51
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	52
4.1. Süspansiyon Kültürlerin Hücre Büyüme Kinetiğinin Belirlenmesi.....	52
4.2. Süspansiyon Kültür Ekstraktlarının Süt Pıhtılaştırma Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	53
4.3. Süspansiyon Kültür Ekstraktlarının Protein Miktarlarının Belirlenmesi ..	55
4.4. Süspansiyon Kültür Ekstraktlarının Proteolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	56
4.5. Enzimlerin Üre-PAGE Analiz Sonuçları	57
4.5.1. α_s -kazein hidrolizi	57
4.5.2. β -kazein hidrolizi	59
4.5.3. κ -Kazein hidrolizi.....	62
4.6. Keçi Peyniri Analiz Sonuçları	63
4.6.1. Çiğ süt analiz sonuçları.....	63
4.6.2. Keçi peyniri pH analiz sonuçları	64
4.6.3. Keçi peyniri titrasyon asitliği analizi sonuçları.....	65
4.6.4. Keçi peyniri kuru madde analiz sonuçları	68
4.6.5. Keçi peyniri yağ analizi sonuçları.....	69
4.6.6. Keçi peyniri tuz analiz sonuçları.....	71
4.6.7. Keçi peyniri toplam azot değeri sonuçları	72
4.6.8. Keçi peyniri suda çözünür azot değeri sonuçları	73
4.6.9. Keçi peyniri olgunlaşma indeksi sonuçları	75
4.6.10. Keçi peyniri renk analizi sonuçları.....	76
4.6.10.1. Keçi peyniri L* değeri sonuçları.....	76
4.6.10.2. Keçi peyniri a* değeri sonuçları	78
4.6.10.3. Keçi peyniri b* değeri sonuçları.....	79
4.6.11. Keçi peynirinin tekstür profil analizleri.....	80
4.6.11.1. Sertlik değerleri.....	80
4.6.11.2. Dış yapışkanlık değerleri	81
4.6.11.3. Esneklik değerleri	83
4.6.11.4. İç Yapışkanlık.....	84
4.6.11.5. Sakızımsılık	85
4.6.11.6. Çiğnenebilirlik.....	86
4.6.11.7. Elastikiyet değeri	87

4.6.12. Keçi Peynirlerinin Üre-Page Analizi Sonuçları	88
4.6.13. Keçi Peynirlerinin SEM analizi	90
4.6.14. Mikrobiyolojik Analizler	92
4.6.14.1. Toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı	92
4.6.14.2. Laktokokların sayısı	94
4.6.14.3. Laktobasil bakteri sayısı	95
4.7. Koyun Peyniri Analiz Sonuçları	97
4.7.1. Çiğ koyun sütü analiz sonuçları	97
4.7.2. Koyun peyniri pH analiz sonuçları	98
4.7.3. Titrasyon asitliği analizi sonuçları	99
4.7.4. Kuru Madde Analizi Sonuçları	101
4.7.5. Yağ Analizi Sonuçları	102
4.7.6. Tuz analizi sonuçları	103
4.7.7. Toplam azot analizi sonuçları	104
4.7.8. Suda çözünen azot analizi sonuçları	106
4.7.9. Olgunlaşma indeksi sonuçları	107
4.7.10. Renk analizi sonuçları	108
4.7.10.1. L* değerleri	108
4.7.10.2. a* değerleri	109
4.7.10.3. b* değerleri	110
4.7.11. Koyun peynirinin tekstür profil analizleri	111
4.7.11.1. Sertlik değeri	111
4.7.11.2. Dış Yapışkanlık	113
4.7.11.3. Esneklik değeri	114
4.7.11.4. İç yapışkanlık	115
4.7.11.5. Sakızımsılık	116
4.7.11.6. Çiğnenebilirlik	117
4.7.11.7. Elastikiyet değeri	118
4.7.12. Koyun peynirlerinde Üre- PAGE analizi	119
4.7.13. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) analizi sonuçları	121
4.7.14. Mikrobiyoloji analizi sonuçları	123
4.7.14.1. Toplam aerobik mezofilik bakteri	123
4.7.14.2. Laktobasil sayısı	125
4.7.14.3. Laktokok Sayısı	126
5. SONUÇ	128
KAYNAKLAR	133
ÖZGEÇMİŞ	156

ÖZET

Doktora Tezi

MELATONİN VE SALİSİLİK ASİT UYGULAMALI ENGİRAR (*Cynara scolymus* L.) PİSTİL HÜCRE KÜLTÜRLERİNDEN ÜRETİLEN ASPARTİK PROTEAZ İLE PIHTILAŞTIRILAN TAZE KOYUN VE KEÇİ SÜTÜ PEYNİRLERİNİN İNCELENMESİ

Özlem ÇAYIR

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bedia ŞİMŞEK

II. Danışman: Doç. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY

Bu çalışmada enginar çiçek ekstraktı, salisilik asit (50 µM) ve melatonin (5µM) uygulanmış enginar suspansiyon hücre kültür ekstaktları, salisilik asit veya melatonin uygulaması yapılmamış kültür ekstraktı (kontrol) ve rennin enzimi ilavesiyle geleneksel taze koyun ve keçi peynirleri üretilmiştir. Bu araştırmada; enginar (*Cynara scolymus* L.) çiçeklerinden geliştirilen kallus hücre kültürü suspansiyonlarının süt pıhtılaştırma ve proteolitik aktivite özellikleri belirlenmesiyle birlikte; melatonin (5µM ve 10µM) ve salisilik asit (50µM ve 100µM) uygulamalarının enginar çiçeği pistil suspansiyon kültürlerinde aspartik proteaz elde edilmesindeki etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Enzimlerin süt pıhtılaştırma aktivite değerleri 0.52 – 0.74 aralığında ölçülmüştür. Proteolitik aktivitesi en yüksek enzimler sırasıyla melatonin ilaveli (5µM) ve *Cynara scolymus* L. kallus yapısından elde edilen salisilik asit (50mM) ilaveli enzimler olarak belirlenmiştir. Süspanse hücre kültür yöntemi ile geliştirilen enzimlerin etkisi keçi ve koyun peynirlerinin titrasyon asitliği, suda çözünen azot, olgunlaşma indeksi değerleri üzerinde önemli düzeyde etkili bulunmuştur (p<0.05).

Üre-Page sonuçları incelendiğinde; sıvı hücre kültüründen elde edilen enzimlerin keçi ve koyun peynirlerinde αs-kazeinler ve β-kazein üzerinde ayrıca diğer parçalanma ürünleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli (p<0.05) olduğu bulunmuştur. Parçalanma düzeyi γ – kazein ve diğer peptitler için en yüksek (her iki tür peynirde) melatonin ilaveli enzim ile üretilen peynirde gözlenirken bunu salisilik asit ilaveli enzim ile üretilen peynirler izlemiştir. Keçi peynirlerine ait sertlik değerleri 18.88 – 97.68 N aralığında tespit edilmiştir. Koyun peynirlerinde bu değer 33.46 – 111.95 N olarak belirlenmiştir. Keçi ve koyun peynirlerinde tekstür profil analizi sonucu elde edilen değerlerin tümünün rennin enzimi ile üretilen peynirlerden istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edilmiştir. Süspanse hücre kültürleri ile hazırlanan enzimler her iki peynir türünde de L*, a* ve b*

değerlerinin önemli bir seviyede etkilenmesine sebep olmuştur ($p<0.05$). Bununa birlikte her iki peynir grubunda da toplam mezofilik aerobik bakteri, laktobasil ve laktokok sayılarının salisilik asit ve melatonin ilave edilen enzimlerin kullanıldığı örneklerde önemli ölçüde diğer peynir gruplarından daha düşük seviyelerde olduğu gözlenmiştir.

Araştırmada, süspanse hücre kültür işlemi sırasında uygulanan melatonin ve salisilik asidin gerek enzimin özellikleri üzerine gerekse peynir nitelikleri üzerine analizlerde istatistiksel açıdan farklılıklar tespit edilmekle birlikte olumlu yönde çok az da olsa bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Enginar kaynaklı süspanse hücre kültür yöntemi ile elde edilen enzimlerin hayvansal kaynaklı enzimler kadar kimyasal, tekstürel ve biyokimyasal açıdan başarılı peynir üretimi gerçekleştiremediği, keçi ve koyun sütü ile üretilen peynirlerin daha yumuşak yapıda daha az asidik ve daha az olgun olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Enginar, Melatonin, Keçi Peyniri, Suspansiyon hücre kültürü, Salisilik Asit.

2024, 157 sayfa

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

INVESTIGATION OF FRESH SHEEP AND GOAT MILK CHEESE COAGULATED WITH ASPARTIC PROTEASE PRODUCED FROM ARTICHOKE (*CYNARA SCOLYMUS L.*) PISTIL CELL CULTURES WITH MELATONIN AND SALICYLIC ACID TREATMENT

Özlem ÇAYIR

Süleyman Demirel University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bedia ŞİMŞEK

Co-Supervisor: Doç. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY

In this study, traditional fresh sheep and goat cheeses were produced by adding artichoke flower extract, artichoke suspension cell culture extracts treated with salicylic acid (50 µM) and melatonin (5 µM), culture extract without salicylic acid or melatonin application (control) and rennin enzyme. In this study, along with the determination of milk clotting and proteolytic activity properties of callus cell culture suspensions developed from artichoke (*Cynara scolymus L.*) flowers; it was aimed to examine the effectiveness of melatonin (5µM and 10µM) and salicylic acid (50 µM and 100 µM) applications in obtaining aspartic protease in artichoke flower pistil suspension cultures.

Milk coagulation activity values of the enzymes were measured in the range of 0.52 - 0.74. The enzymes with the highest proteolytic activity were determined as melatonin supplemented (5µM) and *Cynara scolymus L.* callus with salicylic acid (50 µM) enzymes, respectively. The effect of enzymes developed by suspended cell culture method was found to be significantly effective on titratable acidity, water soluble nitrogen, ripening index values of goat and sheep cheeses ($p<0.05$).

When the urea-Page results were analysed, it was found that the enzymes obtained from liquid cell culture had a statistically significant ($p<0.05$) effect on α s-casein and β -casein in goat and sheep cheeses and the difference between other degradation products. The highest degradation level for γ - casein and other peptides (in both types of cheese) was observed in cheese produced with melatonin added enzyme, followed by cheese produced with salicylic acid added enzyme. Hardness values of goat cheeses were determined in the range of 18.88 - 97.68 N. In sheep cheeses, this value was determined as 33.46 - 111.95 N. It was determined that all of the values obtained as a result of texture profile analysis in goat and sheep cheeses were statistically different from the cheeses produced with rennin enzyme. The enzymes prepared with suspended cell cultures caused

a significant effect on L*, a* and b* values in both cheese types ($p < 0.05$). However, total mesophilic aerobic bacteria, lactobacilli and lactococci counts in both cheese groups were significantly lower than the other cheese groups in the samples in which salicylic acid and melatonin added enzymes were used.

In the study, it was determined that melatonin and salicylic acid applied during the suspended cell culture process had a slight positive effect on both the properties of the enzyme and the cheese qualities, although statistical differences were determined in the analyses. It was determined that the enzymes obtained by artichoke-derived suspended cell culture method could not produce cheese as successful as animal-derived enzymes in terms of chemical, textural and biochemical properties, and the cheeses produced with goat and sheep milk were softer, less acidic, and less mature.

Keywords: Artichoke, Melatonin, Goat Cheese, Suspension cell culture, Salicylic Acid.

2024, 157 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, her zaman kendime idol olarak aldığım, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan, destek ve emeklerini esirgemeyen, beni yüreklendiren, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Bedia ŞİMŞEK'e teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarımda harcadığı zaman, emek, akademik gelişimim için sağladığı tüm imkanlar ve tüm desteği için kıymetli hocam Doç. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY'a, kıymetli bilgileriyle yolumu aydınlatan, görüş ve önerilerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Seyhan ULUSOY ve Doç. Dr. Banu Özden TUNCER'e, bu çalışma sürecinde bana ilham olan, cesaret veren ve her daim yanımda olan değerli Abdurrahman DEMİRHAN, Sema ASLAN, Çağlar GÖKIRMAKLI, Mehmet Onur KARTAL, Duygu ZEHİR ŞENTÜRK ve enginar temininde yardımcı olan Dr. Levent KESKİN'e teşekkür ederim.

FDK-2020-7450 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince 100/2000 YÖK doktora projesi kaspamında burs desteği sağlayan Yükseköğretim Kuruluna sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca beni destekleyen, sevinç ve üzüntülerimi paylaşan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Özlem ÇAYIR
ISPARTA, 2024

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1. <i>Cynara scolymus</i> 'e ait eksplantların katı ortamda kallus elde edilmesi amacıyla kültüre alınmasını takiben gösterdikleri gelişmeler kallus örneği görüntüleri	35
Şekil 3.2. Süspansiyon hücre kültürü örnekleri.....	36
Şekil 3.3. Enzimlerle üretilen keçi ve koyun peyniri üretimi akış diyagramı.....	39
Şekil 3.4. Üre-page jellerinde bant kalınlık yüzdelerinin belirlenme grafiklerine bir örnek.....	49
Şekil 4.1. Enzimlerin alfa kazein degradasyonu (1. Na kazeinat standardı, 2. Rennin enzimi, 3. Kontrol, 4. Enginar 5.M5, 6. M10, 7.SA 100, 8.SA 50, 9. Alfa kazein standardı).....	58
Şekil 4.2. Enzimlerin β -kazein degradasyonu (1. Na kazeinat standardı, 2. Rennin enzimi, 3. Kontrol, 4. Enginar 5.M5, 6. M10, 7.SA 100, 8.SA 50, 9. β -kazein standardı)	60
Şekil 4.3. Enzimlerin kappa kazein degradasyonu (1. Na kazeinat standardı, 2. Rennin enzimi, 3. Kontrol, 4. Enginar 5.M5, 6. M10, 7.SA 100, 8.SA 50, 9. Kappa kazein standardı).....	62
Şekil 4.4. Farklı enzimlerle üretilen Keçi peynirlerinin görünüşleri (A. Rennin enzimi, B. Kontrol, C. Enginar D.M5, E.SA 50)	63
Şekil 4.5. Farklı enzimlerle keçi sütünden üretilen peynirlerin üre-page görünüşleri (1. Na kazeinat standardı, 2. Rennin enzimi, 3. Enginar, 4. Kontrol 5.M5, 6. SA 50 7. Na kazeinat standardı).....	89
Şekil 4.6. Keçi peynirlerinin SEM mikrografi (x 1500) a) R:Rennin enzimi, b) K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim c) E: <i>Cynara scolymus</i> L. Kallus yapısından elde edilen enzim, d) SA 50: 50 μ M Salisilik asit içeren enzim, e) M 5: 5 μ M Melatonin içeren enzim ile üretilen keçi peynirlerine ait SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) görüntüleri	91
Şekil 4.7. Farklı enzimlerle üretilen Koyun peynirlerinin görünüşleri (A. Rennin enzimi, B. Kontrol, C. Enginar D. M5, E. SA 50).....	97
Şekil 4.8. Farklı enzimlerle koyun sütünden üretilen peynirlerin üre-page görünüşleri (1. Na kazeinat standardı, 2. Rennin enzimi, 3. Kontrol, 4. Enginar 5.M5, 6. SA 50 7. Na kazeinat standardı).....	119
Şekil 4.9. (a) R:Rennin enzimi, (b) K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, (c) E: <i>Cynara scolymus</i> L. Kallus yapısından elde edilen enzim, (d) SA 50: 50 μ M Salisilik asit içeren enzim, (e) M 5: 5 μ M Melatonin içeren enzim ile elde edilen koyun peynirlerinin SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) görüntüleri (x 1500)	122

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 4.1. Süspansiyon kültürlerin hücre büyüme kinetiği	53
Çizelge 4.2. Enzimlerin Süt Pıhtılaşma aktiviteleri.....	55
Çizelge 4.3. Enzimlerin toplam protein miktarları (µg/mL).....	56
Çizelge 4.4. Enzimlerin proteolitik aktiviteleri (Ukazein*/mg protein);	57
Çizelge 4.5. Enzimlerin Üre page α-kazein parçalanma oranları (%)	58
Çizelge 4.6. Enzimlerin Üre page β-kazein parçalanma oranları (%)	60
Çizelge 4.7. Çiğ keçi sütünün bazı fizikokimyasal analiz sonuçları (n:3)	63
Çizelge 4.8. Keçi peyniri örnekleri için pH değerleri	64
Çizelge 4.9. Keçi peyniri örnekleri için laktik asit değerleri (%)	66
Çizelge 4.10. Keçi peyniri örnekleri için kuru madde değerleri (%)	68
Çizelge 4.11. Keçi peyniri örnekleri için yağ değerleri (%).....	70
Çizelge 4.12. Keçi peyniri örnekleri için tuz değerleri (%)	71
Çizelge 4.13. Keçi peyniri örnekleri için toplam azot ve protein değerleri (%)..	72
Çizelge 4.14. Keçi peyniri örnekleri için suda çözünen azot değerleri (%)	74
Çizelge 4.15. Keçi peyniri örnekleri için olgunlaşma indeksi değerleri (%)	75
Çizelge 4.16. Keçi peyniri örnekleri için L* değerleri (%)	77
Çizelge 4.17. Keçi peyniri örnekleri için a değerleri (%)	78
Çizelge 4.18. Keçi peyniri örnekleri için b değerleri (%)	79
Çizelge 4.19. Keçi peyniri örnekleri için sertlik sonuçları	80
Çizelge 4.20. Keçi peyniri örnekleri için yapışkanlık sonuçları.....	82
Çizelge 4.21. Keçi peyniri örnekleri için esneklik değeri sonuçları	83
Çizelge 4.22. Keçi peyniri örnekleri için iç yapışkanlık sonuçları	84
Çizelge 4.23. Keçi peyniri örnekleri için sakızimsılık değerleri.....	85
Çizelge 4.24. Keçi peyniri örnekleri için çiğnenebilirlik sonuçları	87
Çizelge 4.25. Keçi peyniri örnekleri için elastikiyet değeri sonuçları	88
Çizelge 4.26. Keçi peyniri üre-page jel kazein parçalanma oranları (%)	89
Çizelge 4.27. Keçi peyniri örnekleri için Toplam Aerob Mezofilik Bakteri sayısı sonuçları (log kob/g) (n=3)	93
Çizelge 4.28. Keçi peyniri örnekleri için Laktokok bakteri sayısı sonuçları (log kob/g) (n=3)	94
Çizelge 4.29. Keçi peyniri örnekleri için Laktobasil sayısı sonuçları (log kob/g) (n=3).....	96
Çizelge 4.30. Çiğ koyun sütünün bazı fizikokimyasal analiz sonuçları (n:3)	97
Çizelge 4.31. Koyun peyniri örnekleri için pH değerleri	98
Çizelge 4.32. Koyun peyniri örnekleri için laktik asit değerleri (%)	100
Çizelge 4.33. Koyun peyniri örnekleri için kuru madde değerleri.....	101
Çizelge 4.34. Koyun peyniri örnekleri için % yağ değerleri.....	102
Çizelge 4.35. Koyun peyniri örnekleri için tuz değerleri.....	104
Çizelge 4.36. Koyun peyniri örnekleri için toplam azot (%) değerleri	105
Çizelge 4.37. Koyun peyniri örnekleri için suda çözünen azot değerleri.....	106
Çizelge 4.38. Koyun peyniri örnekleri için olgunlaşma indeksi değerleri.....	107
Çizelge 4.39. Koyun peyniri örnekleri için L* değerleri.....	109
Çizelge 4.40. Koyun peyniri örnekleri için a* değerleri.....	110
Çizelge 4.41. Koyun peyniri örnekleri için b* değerleri.....	111
Çizelge 4.42. Koyun peyniri örnekleri için sertlik değerleri	112
Çizelge 4.43. Koyun peyniri örnekleri için dış yapışkanlık değerleri.....	113

Çizelge 4.44. Koyun peyniri örnekleri için esneklik değerleri	114
Çizelge 4.45. Koyun peyniri örnekleri için iç yapışkanlık değerleri	115
Çizelge 4.46. Koyun peyniri örnekleri için sakızımsılık değerleri	116
Çizelge 4.47. Koyun peyniri örnekleri için çiğnenebilirlik sonuçları	117
Çizelge 4.48. Koyun peyniri örnekleri için elastikiyet değerleri sonuçları	118
Çizelge 4.49. Koyun peyniri üre-page jel kazein parçalanma oranları (%)	119
Çizelge 4.50. Koyun peyniri örnekleri için Toplam Aerob Mezofilik Bakteri sayısı sonuçları (log kob/g) (n=3)	124
Çizelge 4.51. Koyun peyniri örnekleri için <i>Lactobacillus spp.</i> Bakteri sayısı sonuçları (log kob/g) (n=3)	125
Çizelge 4.52. Koyun peyniri örnekleri için <i>Lactococcus spp.</i> bakteri sayısı sonuçları (log kob/g) (n=3)	127



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AgNO ₃	Gümüş Nitrat
APS	Amonyum Persülfat
a _w	Su aktivitesi
CN	Kazein
dk	Dakika
g	Gram
g.sn	Gram.saniye
H ₂ SO ₄	Sülfürik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
kg	Kilogram
kob (cfu)	Koloni Oluşturan Birim (Colony Forming Unit)
KOH	Potasyum Hidroksit
L	Litre
LA	Laktik Asit
LAB	Laktik Asit Bakterileri
log	Logaritma
M	Molarite
mA	Miliamper
mg	miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
MRS	de Man, Rogosa ve Sharpe Agar
N	Newton
N	Normalite
N.sn	Newton.saniye
NaCN	Sodyum kazeinat
NaOH	Sodyum Hidroksit
PCA	Plate Count Agar
ppm	Milyonda bir
s	Saniye
SÇA	Suda Çözünen Azot
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)
SH	Soxhelet henkel derecesi
ss	Standart sapma
TCA	Trikloroasetik Asit
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
TPA	Tekstür profil analizi (Texture Profile Analysis)
Urea-PAGE	Üre-Poliakrilamid Jel Elektrophorez (Urea-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
V	Volt
α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre

1. GİRİŞ

Peynir, starter kültür ve peynir mayası kullanılarak sütün kazeininin çöktürülmesiyle üretilen bir süt ürünüdür. Genellikle inek, manda, keçi, koyun veya deve sütü gibi çeşitli sütlerden elde edilmektedir. Çok miktarda A, B₁₂, çinko ve fosfor gibi vitaminleri içermektedir. Peynir aynı zamanda dişler ve beyin için gerekli olan esansiyel yağ asitlerini sağlamakta ve sağlıklı kemik gelişimi için önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Peynirde tat, doku ve yapısal özellikler, starter kültür, sütün türü, olgunlaşması ve üretim koşulları gibi parametrelerle ilişkilidir (Hammam vd., 2020).

Pıhtılaştırıcı enzimler olgunlaşmış peynir çeşitlerinin üretimi için mutlak bir gerekliliktir. Enzimler tarafından etkilenen madde substrat olarak bilinmekle beraber; tepkime sonucunda ürünler oluşmaktadır. Enzim substrat ilişkisi anahtar kilit uyumuna benzemektedir. Enzim molekülleri aktif bölge olarak adlandırılan özel bir bölüm içermektedir. Enzim substratına geçici olarak aktif bölgeden bağlanarak substrat-enzim bileşiği meydana getirmektedir. Bunun ardından; substrat ürüne ya da ürünlere parçalanmaktadır. Enzimler reaksiyondan değişmeden çıktıkları için tekrar tekrar kullanılabilme özelliğine sahiptir (MEGEP, 2011). Peynirlerde olgunlaşma aşamasında proteoliz önemli bir görev taşımaktadır. Proteinlerin parçalanması sonucunda tekstür, tat ve aroma oluşumu gerçekleşmektedir (Oysun ve Demet Karaman, 2006). Dünya peynir üretimi 1961'den bu yana yaklaşık 3.5 kat artmıştır. Bununla beraber buzağı midelerinin sınırlı mevcudiyeti nedeniyle bu durum rennet için ikame arayışını zorunlu kılmıştır. Pıhtılaştırıcı enzimlere olan talep neredeyse 50 yıl önce başlamış olup; bugün bu enzimlerin sadece %20-30'unu buzağı rennet'i karşılayabilmektedir. En önemli rennet ikameleri arasında mikrobiyal kökenli enzimler, genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalardan elde edilen enzimler ve bitkisel proteazlar bulunmaktadır. Tarihsel olarak, peynir üretimi için kullanılan çoğu enzim preparatı buzağının mide özlerinden elde edilirken, bitkilerden üretilen pıhtılaştırıcıların çok daha erken tarihlerde kullanıldığı ifade edilmektedir (Jacob vd., 2011). Peynir teknolojisinde hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklı pek çok enzim, sütü pıhtılaştırmak için kullanılmaktadır.

Günümüzde rennin enzimi peynir yapımında en çok kullanılan pıhtılaştırıcı olarak bilinmektedir. Ancak rennin enzimi veriminin az oluşu, bu enzimin pahalı olması, peynir tüketimi ve üretimindeki artış, rennin ile üretilen ürünlerin vejetaryen beslenme alışkanlıklarına uymaması, rennin kullanımındaki kısıtlamalar ve dini faktörler gibi etkenlerden dolayı ilave enzim ikameleri gereksinimi ortaya çıkmıştır (Eroğlu ve Özcan, 2018). Bu bakımdan peynir üretiminin gerekliliklerini yerine getiren en önemli ikameler içerisinde bitki bazlı enzimler yer almıştır. Bitkisel kaynaklı çeşitli proteinazlar süt pıhtılaştırma özelliği taşımaktadır. Bitkisel pıhtılaştırıcılar düşük maliyetli proteaz üretimini sağlamaktadır. *Cynara cardunculus*, *Calotropis procera*, *Solanum dubium*, *Carica papaya*, *Ananas comosus*, *Ficus carica*, *Albizia julibrissin* ve *Lactuca sativa*'dan elde edilen proteazlar peynir üretiminde en çok kullanılan bitkisel pıhtılaştırıcılardır. Portekiz ve İspanya'da Serra da Estrela, La Serena veya Serpa gibi geleneksel peynir üretiminde yüzyıllardır yabani enginar (*Cynara cardunculus* L.) kullanılmaktadır. Aynı zamanda yemeklik bir tür olan *C. scolymus* (enginar) çiçekleri de peynir yapımında pıhtılaştırıcı olarak değerlendirilmektedir (Roseiro vd., 2003).

Bitki hücre ve dokularının kültüre aktarılması, farklı sekonder metabolitlerin, kontrollü koşullar altında elde edilmesini teşvik ederek bitkilerin karmaşık metabolitlerinin oluşturmalarını mümkün kılmaktadır. *Cynara* spp. çiçeği yüksek oranda proteolitik enzimler içermektedir. *Cynara cardunculus* L. çiçeklerinin boyuncuk ve tepelik bölümlerinden elde edilen "Cardosin A" ve "Cardosin B" pıhtılaştırıcıları kimozen gibi aspartik proteazlar olarak adlandırılmaktadır (Chazarra vd., 2007). Bitkisel aspartik proteazlar bitki yaşlanması, biyotik ve abiyotik stres yanıtları, programlanmış hücre ölümü ve üreme sırasında ortaya çıkan bozulma ve proteolitik işlem de dahil olmak üzere bir biyolojik fonksiyonda etkili hale gelmiştir. Bu bağlamda bitkisel kaynaklı çeşitli proteinazların süt pıhtılaştırma özelliğine sahip olduğu görülmüştür. Yabani enginar (*Cynara cardunculus* L.) çiçek ekstraktları kullanılarak, çeşitli Akdeniz ülkelerinde uzun yıllardır peynir eldesi gerçekleştirilmektedir (Raccuia ve Melilli, 2007). *Cynara scolymus*'tan elde edilen bir aspartik proteaz olan sinaraz enzimi de koyun ve keçi sütlerinden üretilen peynirlerin üretiminde kullanılmaktadır (Shah vd., 2014).

Bu tez çalışmasında, enginar (*Cynara scolymus L.*) çiçeklerinden yapraklardan geliştirilen kallus hücre kültürü suspansiyonlarının süt pıhtılaştırma ve proteolitik etkinlikleri belirlenmiştir. Hücre süspansiyon kültür ekstraktları enginar bitkisinin dişi organlarından temin edilerek karma aspartik proteaz aktivitesi tespit edilmiştir. Bu aktivite süt pıhtılaştırma verimi ve kazein yapılarındaki proteolitik etki baz alınarak saptanmıştır. Bu çalışmanın birincil amacı melatonin ve salisilik asit bileşenlerinin enginar pistil suspansiyon kültürlerinde aspartik proteaz elde edilmesindeki etkinliğini araştırmaktır. Pistil dokularından hücre kültürlerinin geliştirilmesini takiben, melatonin ve salisilik asit ilavesini içeren iki farklı uygulamayla aspartik proteaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Proteolitik aktiviteler, ticari buzağı renneti ve bütün enginar çiçeklerinden hazırlanan ekstraktlarla kıyaslanmış ve bu bağlamda optimum aktiviteye sahip hücre kültürü saptanmıştır. Ayrıca enginar çiçeklerinin dişi organlarından hazırlanan hücre suspansiyon kültür ekstraktlarındaki aspartik proteaz aktivitesi de, süt pıhtılaştırma verimliliği ve kazein üzerindeki proteolitik aktiviteleri bakımından tespiti gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında yapılan çalışmanın ikinci aşaması koyun ve keçi sütleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Geleneksel anlamda farklı ülkelerde bitkisel proteazlar genellikle koyun ve keçi sütü peynirlerinde kullanılmaktadır. Pek çok yönden birbirinden farklı özelliklere sahip sütler üretildikleri peynirlerde de farklılıklara neden olmaktadır. Elde edilen enzimlerin bu iki farklı süt türündeki etkisini gözlemleyerek peynir özellikleri üzerine etkisini belirlemekte çalışmanın diğer amacını oluşturmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Peynirlerde Kullanılan Enzimler

Yeni duyusal ve dokusal özelliklere sahip ürünlerin geliştirilmesi, peynir yapımında ana yenilik alanlarından biridir. Günümüzde, peynir endüstrisi toplam dört kaynak kullanmaktadır. En yaygın kullanılan peynir mayası, peynir üretimi için en verimli olan hayvansal kaynaklı kimoindir. Bu sınıflandırma, κ -kazein için yüksek özgülüğe ve diğer süt proteinlerine karşı düşük genel proteolitik aktiviteye, genellikle daha güçlü bir pıhtı ve optimal lezzet ile ilişkilendirilen özelliklere dayanmaktadır (Kumar vd., 2010).

Mikrobiyal süt pıhtılaşma enzimleri yaygın olarak *Rhizomucor* spp., *Mucor* spp. ve *Bacillus* spp.'nin kültür süpernatantından elde edilmektedir. Daha az spesifik proteazların varlığı ile karakterize edilseler de (genellikle peynir yapma işlemi sırasında düşük pıhtı verimi ve nihai ürünlerde acı tat ile ilişkili) bu peynir mayası kimozin ikamesi olarak kullanılmaktadır (Dutt vd., 2009; Shieh vd., 2009; Yeğin vd., 2011).

Sentetik kimozinler günümüzde *Kluyveromyces lactis* veya *Aspergillus niger*'den üretilmekte ve sırasıyla MaxiRen® (DSM, Heerlen, Hollanda) ve Chy-Max® (CHR Hansen, Hørsholm, Danimarka) ticari markaları altında pazarlanmaktadır. Bu kimozinin, peynir mayası için küresel pazar payının %80'ine sahip olduğu tahmin edilmektedir (Johnson ve Lucey, 2006). Ayrıca peynir üretimindeki artış, hayvansal rennetin azalması, alternatif süt pıhtılaştırıcı enzim kaynaklarına olan talebi artırmaktadır. Sütün pıhtılaşması için çok çeşitli bitkisel kaynaklı proteinazlar mevcut olmasına rağmen, bunların aşırı proteolitik yapıları hem peynir verimini düşürmekte hem de peynirde acı tat algısını artırarak üretimde çeşitli sorunlara yol açabilmektedir. Bununla beraber; *Cynara cardunculus*'dan elde edilen bitkisel enzim olarak kullanılmasının peynirlere yeni dokusal ve duyusal özellikler sağladığı da bildirilmektedir (García vd., 2012).

Ancak bitkisel pıhtılaştırıcı ile yapılan peynirler duyuusal düzeyde daha düşük puanlar elde etmişlerdir. Bu enzimlerin peynire uygun olmasını sağlamak için starter kullanmak veya olgunlaşma süresini artırmak gibi farklı teknolojik stratejilerin gerekli olduğu belirtilmektedir (García vd., 2014a).

2.1.1. Bitkisel kaynaklardan aspartik proteaz eldesi

Bitkisel bazlı çeşitli proteazların süt pıhtılaştırma özelliği gösterdiği bilinmektedir. Bitkisel pıhtılaştırıcıların uygulanması hayvansal rennetin kullanımı ile oluşan sorunların iyileştirilmesine yardımcı olmaktadır (Gupta ve Eskin, 1977). Bunun dışında bazı bitkisel enzimlerin peynirlerde acı tat oluşumuna neden olduğu da bilinmektedir (Lo Piero, 2002). Bitkisel proteazlar, hidrolitik işlem esnasında kullanılan katalitik mekanizmaya göre birkaç grup içinde yer almaktadır. Sütü pıhtılaştırmak adına uygulanan birçok enzim aspartik proteazları kapsamaktadır (García-Gómez vd., 2019). Aspartik proteinazlar, bazı bitkilerde bulunabilmektedir. Bitkilerden üretilen aspartik proteinazların çoğu hidrofobik yapılar arasında birbirleri ile olan ilişkileri, bir asit pH optimumuna sahip olmaları ve pepstatin tarafından inhibe edilmeleri yönüyle benzer özellik taşımaktadır. Bazı bitki aspartik proteinazlarının amino asit dizileri çıkarılmıştır (Faro vd., 1999). Aspartik proteazlar katalitik bölgede iki aspartik asit kalıntısına sahiptir. Bunlar hidroliz reaksiyonunda nükleofil görevi gören bir su molekülü içerirler. Çoğu aspartik proteaz, moleküler ağırlığı yaklaşık 35 kDa ve uzunluğu yaklaşık 330 amino asit olan tek zincirli enzimlerden oluşur (Davies, 1990). Bu tip proteazlar en çok asit pH'da (pH değeri 3-5) aktiftir. Aspartik proteazlar neredeyse tamamen β -sheet ve minimal olarak α -helix'ten oluşan bir yapıya sahiptirler. En yaygın ve kullanılan aspartik proteazlar kesinlikle *C. cardunculus*'tan elde edilen kardosinlerdir (Verissimo vd., 1990; Nicosia vd., 2022). Bitkisel aspartik proteazlar bitki yaşlanması, biyotik ve abiyotik stres yanıtları, programlanmış hücre ölümü ve üreme sırasında ortaya çıkan bozulma ve proteolitik işlem de dahil olmak üzere birçok biyolojik fonksiyonlarda etkin görevler üstlenmektedir (Pimentel vd., 2007). Aspartik proteazlar asidik proteaz olarak da ifade edilen endopeptidazlar olarak bilinmektedirler. Aspartik proteazların en çok asidik pH'da aktif olduğu görülmektedir (Domingos vd.,

2000). Bu proteazlar, katalitik aktivite meydana getirmek için aspartik asit rezidülerine gereksinim duymaktadırlar. Aspartik proteazlar pepsin, retropepsin ve pararetrovirüslerden üretilen enzimler olmak üzere üç temel grup içinde bulunmaktadır (Rao vd., 1998).

Bitkilerde aspartik proteaz varlığı dört farklı şekilde isimlendirilir. Bunlar kardosin A, B, C ve D olarak bilinmektedir. Kardosin aynı zamanda siprosin veya kinaraz olarak da ifade edilmektedir (Sidrach vd., 2005). Kardosinler, İspanya'da ve Portekiz'de uzun yıllar boyunca süt pıhtılaşma aktivitesine sahip enginar (*Cynara cardunculus L.*'nin) çiçeklerinden yaprak ve pistillerinden üretilen aspartik proteazlardır (Cordeiro vd., 1992; Verissimo vd., 1996).

Enginarın doğrudan tohumla üretiminin son 10 yılda yaygın hale geldiği bilinmektedir. Tohumla üretilen çeşitler hasat kolaylığı sağlamasının yanı sıra yüksek verim gibi özellikler bakımından da öne çıkmaktadır. Ancak tüm bunların yanında, Türkiye'de dahil olmak üzere birçok ülkede enginar, vejetatif yollarla üretilmekte ve bu durum halen büyük ölçüde geçerliliğini devam ettirmektedir (Uğur, 2005). Vejetatif üretimde kullanılan materyallere bakıldığında ise bunların; rizom, ovulil (yarı dormant dip sürgünleri), dip sürgünleri ve bu materyallerin köklendirme ortamlarında geliştirilmeleri ile elde edildikleri ifade edilmektedir (Eser vd., 2006).

Türkiye'de enginar bitkilerinden bahar dönemlerinde (ilkbahar ve sonbahar) alınan dip sürgünleri ile yapılan çoğaltma tekniği yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemin yanı sıra yarı dormant bitki materyalleri de çoğaltımda uygulanmakta fakat bununla beraber çoğaltım hızı ve katsayısı bakımından istenilen verileri vermediği için diğer yöntemle göre daha az ilgi görmektedir (Uğur, 2005).

Enginarın üretim yöntemleri üzerinde yapılmış olan pek çok çalışmada, farklı vejetatif üretim yöntemlerinde çevre şartlarının ve özellikle de sıcaklığın belirleyici etkisi olduğu ileri sürülmüştür. Enginar bitkisi büyük ölçüde klasik vejetatif yöntemle üretilen bir bitki olarak bilinmektedir. Fakat, bununla birlikte

bu üretim şeklinde çoğaltma katsayısı düşük olup; materyal temininde büyük zorluklar meydana gelmektedir (Rossi ve De Paoli, 1992). Geleneksel olarak uygulanan vegetatif üretimle birlikte birçok araştırmacının da belirttiği üzere birtakım güçlükler görülmektedir. Bunların arasında çoğaltma amacıyla kullanılan ana materyal aracılığıyla bazı hastalık ve zararlıların taşınması, yetiştirme dönemi süresince çoğaltma katsayısının düşük olması ve bu durumun dolaylı olarak genetik ve agronomik gelişimi engellemesi, aynı ana bitkiden alınmasına rağmen sürgünler arasında fizyolojik farklılıkların görülmesi sayılabilmektedir. Bu noktada geleneksel çoğaltım metotlarına karşı alternatif yöntemlerin kullanımı ön plana çıkmakta olup, bunların başında ise *in vitro* tekniklerin geldiği bilinmektedir. Bundan ötürü enginar üretiminde *in vitro*, yani doku kültürü ile çoğaltım tekniği anahtar bir görev görmektedir. Doku kültürü kısaca, kontrollü laboratuvar koşullarında yeni bitkilerin elde edilmesi ile tanımlanmaktadır. Bunun için, bitkilerden alınmış olan organ veya doku parçaları yüzey sterilizasyonu işleminden geçirilerek aseptik koşullarda hazırlanmış olan besi ortamlarında kültüre alınmaktadır (Yalçın, 1992). Enginarda *in vitro* çoğaltım tekniği ilk olarak Toponi tarafından 1960 yılında uygulanmıştır (Özsan, 2019).

2.1.2. Bitki doku kültürü

Bitki doku kültürü; tamamen steril koşullar altında, tüm bir bitkinin, bitkilerden alınan çeşitli dokuların veya apikal meristem, kök vb. organların ya da hücrelerin, hazırlanan yapay besi ortamlarında kültüre alınarak bu bitki kısımlarından yeni doku, bitki ya da metabolitler gibi bitkisel ürünlerin elde edilmesi olarak açıklanmaktadır (Babaoğlu vd., 2001). Bitki doku kültürü teknikleri arasında 'mikroçoğaltım' yöntemi birçok bitkide uygulanmakta ve başarılı sonuçlar görülmektedir. Bitkilerin sahip oldukları gizli güç 'totipotensi' özelliği (her canlı hücrenin tam bir organizma oluşturma potansiyeline sahip olması) sayesinde, *in vitro* koşullar altında kültüre alınan tohum, sürgün, kök, gövde, kallus, hücre ya da embriyo gibi herhangi bir kısımdan çok sayıda birbirinin aynısı olan yeni bitkilerin hızlı bir şekilde üretilmesi 'mikroçoğaltım' tekniğinin tanımını içermektedir (Mansuroğlu ve Gürel, 2001).

Mikroçoğaltım tekniği uygulanmaya başlaması bitki doku kültürünün tarihsel kronolojisinde ilk sıralarda yer almış, bu teknik botanikçi Haberlandt tarafından ilk kez 1902 yılında kullanılmıştır. Sağlıklı bitkilerin klonal çoğaltımını sağlayan mikroçoğaltım tekniği yetiştiricilik ve genetik açıdan birtakım avantajlar taşımaktadır (Özsan, 2019). Bu avantajlar; hastalık ve zararlılardan sağlıklı bitki materyalinin elde edilmesi, çoğaltımı yapılan bitkilerde hem fenotipik hem de genotipik açıdan homojenite sağlanmasını içermektedir. Ayrıca üretimin hızlı oluşu, çoğaltıma verdiği tepki zor olan bitkilerin daha kolay üretilmesi, ıslah çalışmaları sonucunda elde edilen üstün genotiplerin daha hızlı üretilmesi, kısıtlı materyalle çoğaltım yapılabilmesi ve yeni genotiplerin elde edilmesi şeklindedir (Mansuroğlu ve Gürel, 2001).

Birçok bitki doku kültürü tekniğinde olduğu gibi, başarılı bir mikroçoğaltım tekniği uygulanırken genellikle beş basamaklı aşamadan geçmektedir. Hazırlık aşamasında; başlangıç materyalinin genotipi, sağlık durumu, fizyolojik durumlarını etkileyen beslenme, ışık, sıcaklık gibi yetiştirilme koşullarının uygunluğu önem taşımaktadır. Kültür başlangıç aşamasında birçok faktörün etkisi altındadır. Bu faktörler; uygun eksplantın seçimi, eksplantların sterilizasyonu, uygun başlangıç ortamının belirlenmesi, kültür odasının uygun fiziksel çevreye (sıcaklık, ışık ve nem) sahip olması olarak ifade edilmektedir (Debergh ve Read, 1993). Sürgün çoğaltım aşamasında farklı besi ortamları kullanılabileceği gibi, başlangıç ortamı olarak uygun görülen besi ortamı da kullanılabilmektedir. Çoğaltma amacıyla kullanılacak olan tür ya da çeşide bağlı olarak kallus oluşumu, adventif tomurcuk oluşumu ya da yapraklarda bulunan aksiller tomurcuk oluşumu ile sürgün çoğaltımı gerçekleştirilmektedir. Sürgün gelişimi ve bunu takiben köklendirme aşamasında ise; bir önceki aşamada elde edilen sürgünler belirli bir yapıya ulaştıktan sonra köklenmelerini sağlamak amacıyla farklı kompozisyonlarda bitki büyüme düzenleyicilerini içeren besi ortamlarına transfer edilmektedir (Mansuroğlu ve Gürel, 2001). Aklimatizasyon (dış koşullara alıştırma) aşaması ise, *in vitro* koşullarda çoğaltılan bitkilerin *ex vitro* koşullara transfer edilmesi şeklinde açıklanmaktadır. Kontrollü koşullardaki (steril ortam, düşük ışık yoğunluğu, yüksek nem içeriği, ihtiyaç duyulan tüm besin elementlerinin mevcut olduğu) bitkilerin dış koşullara (steril

olmayan, yüksek ışık yoğunluğu, düşük nem) aktarılmalarını takip eden birkaç gün *in vitro* bitkiler için oldukça hayati öneme sahiptir. Bununla birlikte, bu süreçte yüksek nemde tutulmaları önemlidir (Özsan, 2019).

2.1.3. Süspanse (sıvı) hücre kültürü

Hücre kültürlerinin kullanım alanları *in vitro* seleksiyon, protoplast kültürlerinin elde edilmesi ve sekonder metabolit üretilmesi olarak ifade edilmektedir. Hücre kültürlerinde seleksiyon yöntemi; hücrelerin herhangi bir kimyasalın veya herhangi bir patojenik toksik maddenin toksik etki gösteren konsantrasyonu içeren besi ortamlarında kültür edilmesi şeklinde bilinmektedir. Hücre kültürleri protoplast izolasyonu için başlangıç materyalini meydana getirerek; hücre kültürlerinden izole edilen protoplastlar somatik melezleme ve gen transferi gibi tekniklerin uygulanması açısından kolaylık sağlamaktadır. Hücre kültürlerinin bilinen kullanım alanlarından birisi de tıp ve endüstrinin değişik alanlarında kullanılan alkaloidler, glikozidler, eterik yağlar, steroidler, terpenoidler, fenolikler gibi birçok sekonder bitki metabolitlerinin (bitkinin ürettiği fakat direkt olarak kullanmadığı metabolitler) *in vitro* kültür yoluyla biyosentezi şeklindedir. (Yarar vd., 2018). *In vitro* hücre kültürü laboratuvarı araştırmacılara hücre içi ve hücreler arası biyokimyasal olayların moleküler düzeyde değerlendirilmesi için devamlı olarak hücrelerin eldesi ve hücrelere istenilen deneysel tekniklerin gerçekleştirilmesi için gereklidir. Bu bağlamda; hücre kültürü çalışmalarıyla *in vitro* toksikoloji ile kanser araştırmaları, sitogenetik, biyokimyasal, moleküler biyolojik çalışmalar, hastalıkların tanı ve araştırılması, doku ve deri mühendisliği, aşı üretimi, kök hücre, tüp bebek ve kısırlık tedavileri ve farmasötik proteinlerin temin edilmesi sağlanmaktadır (Çoban, 2014).

Bitkiler primer ve sekonder metabolit şeklinde isimlendirilen çok çeşitli organik bileşikler oluşturmaktadır. Primer metabolitler; fitosteroller, açıl lipidler, nükleotidler, proteinler, karbonhidratlar ve amino asitler olup büyüme, gelişme, fotosentez ve solunum gibi birçok aşamada anahtar bir görev taşımaktadır (Crozier vd., 2006; Ramawat, 2007).

Başlıca doku kültürü yöntemleri içerisinde kök, sürgün, embriyo, kallus ve hücre süspansiyon kültürü teknikleri yer almaktadır. Kalluslar ana bitkiden kesilip ayrılan, bölünme özelliğine sahip organ veya doku parçalarının karbon kaynağı ve bitki büyüme düzenleyicileri bulunduran yarı katı besi ortamında geliştirilmesi maksadıyla morfolojik düzensizliğe sahip yapılar şeklinde belirtilmiştir. Hücre süspansiyon kültürleri ise tek hücrelerin veya küçük çapta hücre gruplarının sıvı büyüme ortamında oluşturulduğu bitki hücre kültürü yöntemi olarak bildirilmiştir (Karataş vd., 2016). Başka bir deyişle; süspansiyon hücre kültürleri, üreyebilmeleri için bir zemine tutunma gereksinimleri olmayan, gaz alışverişinin ve besin transferinin yeteri kadar sağlanabildiği bir besiyeri içinde üreyebilen kültürlerdir. Süspansiyon hücrelerinin üremelerini kontrol etmek mümkündür. Bu hücrelerin pasajlanmaları için basit bir dilüsyon yeterlidir. Bu kültürler hücrelerin bir defada ve büyük miktarlarda üretilmesinde kullanılmaktadır. Kan, dalak, kemik iliği kültürleri ve olgunlaşmamış hücreler bu şekilde kültüre edilir (Tiryaki, 2010). Hücre süspansiyon kültürleri, çalkalanmakta olan sıvı bir ortamda dağılmış ve büyümekte olan hücreler ile hücre kümelerinden (agregat) elde edilmektedir. Bu inkübasyon sırasında hücre materyali belli bir süre için artmakta ve maksimum seviyeye çıkmaktadır. Eğer, kültür bu noktada geriye (başlangıç hücre seviyesine) seyreltilirse (altkültür), bunu takip eden benzer inkübasyon döneminde, aynı şekilde büyüyerek aynı miktarda hücre materyalini oluşturmaktadır. Kültürlerin bu özelliği *in vitro* şartlarda bitkisel ürünleri kararlı bir şekilde üretmek için büyük bir avantaj olarak görülmektedir (MEGEP, 2015).

Hücre süspansiyon kültürlerinde biyolojik aşamada mikroorganizmalar yerine bitki hücrelerinin yer alması anahtar noktadır. Bu hücreler tarafından meydana getirilen maddelerin bir kısmı ortama salgılanırken bir kısmı hücre bazında depolanabilme özelliği taşımaktadır. Bitki hücre süspansiyon kültürü ile kozmetik ürünler, aromatik maddelerle birlikte baharatların eldesi gerçekleştirilmektedir. Süspansiyon kültürlerinin eldesi için hipokotil veya kotiledon gibi farklılaşmış bitkisel materyalden elde edilen bir eksplant kaynağı uygulanabileceği gibi, farklılaşma göstermeyen bir doku kitlesi olan kallustan alınan bir parçanın da kullanılabileceği ileri sürülmektedir. Farklılaşmış doku

parçasından hücre süspansiyonuna geçiş, kallustan temin edilene göre daha uzun süre gerektirmesi bakımından, hücre süspansiyon kültürlerini başlatmak için daha çok kallusların tercih edildiği bilinmektedir (Akçam Oluk, 2006). Süspansiyon hücre kültürü; süspansiyon hücreler ortamda asılı durmuş şekilde büyümektedir. Bu hücrelerin, kültür şişesine bağlanmadan hayatta kalabildiği ve çoğalabildiği bilinmektedir. Süspansiyon içindeki hücreler küçük toprak şeklinde görünmekle beraber; süspansiyon büyümenin avantajı çok sayıda hücreyi büyütebilmek ve kolayca kültürden toplayabilmek olarak ifade edilmektedir. Süspansiyon hücrelerin küresel olduğu buna karşın; bazı hücrelerin yüzeye tutunmuş olduğu izlenmiştir (Tufan, 2011).

Enginar (*Cynara scolymus*) yapraklarındaki fenoliklerin kuvvetli antioksidan olduğu ve genotipin temel olarak bir donör bitkiden doku kültürü yapılan bitki türlerine kadar korunduğu ifade edilmektedir. Üstün metabolit profilleri ile homojen bitki materyalinin daha yüksek değerlerde olması için, bitki doku kültürünün uygulanması amacıyla enginarının *in vitro* yaprak eksplantlarından kallus ve hücre süspansiyon kültürleri kullanılmıştır. Bitkilerdeki fitokimyasallar hem biyotik hem de abiyotik faktörlere göre değişiklik gösterdiğinden, *in vitro* türevli materyalleri bir antioksidan bileşik kaynağı olarak kullanma potansiyeli incelenmiştir. Antosiyanin üreten süspansiyon kültürler, antosiyanin üretmeyen süspansiyon kültürleriyle mukayese edildiğinde çok güçlü bir serbest radikal olan DPPH serbest radikal yakalama aktivitesi ve indirgeme gücüne sahip olmuştur. Sonuçlar; enginar süspansiyon kültürlerinin umut verici bir antioksidan fenolik bileşik kaynağı olabileceğine dair ilk somut kanıt olarak değerlendirilmiştir (Pandino vd., 2017).

Süspansiyon hücre kültürü kullanılarak enginar üzerine yapılan çalışmalardan bazıları aşağıda verilmiştir.

Sampaio vd. (2010), *Cynara cardunculus* süspansiyon hücrelerinin, siprosin B'yi kodlayan *cypro11* genini ifade etmek için çalışmalarında *mgfp4* - *ER* geni aracılığıyla görsel raportör olarak kullanılan yeşil flüoresan proteini, antibiyotiklerin hücre ölümüne neden olduğu ilk aşamalarında transgenik

hücrelerin taranmasını kolaylaştırmak amacıyla kullanılmıştır. Bir biyoreaktörde büyütülen seçilmiş hücreler, 3.8 g dcw l⁻¹ biyokütle, 80 mg l⁻¹ toplam protein ve 2.060 U ml⁻¹ enzimatik aktivite göstermiştir. Buradan hareketle deneysel sonuçlar, *Cynara cardunculus* hücrelerinde *cypro11* geninin aşırı ekspresyonunu teşvik ederek biyoreaktörde yüksek verimde siprosin B üretimine yol açmıştır. Test edilen koşullar altında, hücre kültürü yaklaşık 10 günlük bir gecikme fazı göstermiş; biyokütlenin ise yaklaşık 2 g dcwl⁻¹'e ulaştığı tespit edilmiştir. Bu uzun “gecikme” fazının hücre adaptasyonundan kaynaklandığı bununla birlikte *C. cardunculus* özütünden elde edilen kallusun hücre metabolizması büyüme koşullarından etkilendiği sonucuna ulaşılmıştır.

Meneghini vd. (2015), yaptıkları çalışmanın amacı, *in vitro* olarak enginardan (*Cynara scolymus*) biyoaktif bileşikler üretme olasılığının araştırılmasıdır. Bu kapsamda, biyokimyasal olarak karakterize edilmiş genotipin yaprak eksplantları kullanılarak enginar hücre kültürlerinin üretilmesi için deneysel koşullar geliştirilmiştir. Çalışmada geleneksel olarak yetiştirilen 'Romaneschi' grubundan izole edilen ve daha sonra karakterize edilen agronomik (yetiştirme tekniği) açıdan ilginç üç enginar *in vitro* klonu (C3, Campagnano, Grato1) kallus indüklemeye kapasiteleri açısından test edilmiş ve ardından yüksek üretim kallus/hücre hatları izole edilerek seçilmiştir. (Lombardo vd., 2009).

Enginarın (*Cynara scolymus* L.) beslenme stresine maruz bırakıldığı bir araştırmada enginar hücre kültürlerinin, enginar yapraklarında ve baş kısımlarında (kapitula) fenolik sekonder metabolitleri biriktirdiği rapor edilmiştir. Bitki dokularındaki fenolik bileşikler, bitkiyi zararlı UV radyasyonlarından korumanın yanı sıra zararlılara ve mantar patojenlerine karşı savunmayla birlikte tozlaşan böcekleri çekmek için sinyal bileşikleri görevi üstlenmektedir. Yapılan çalışma, beslenme stresi altındaki hem kallus hem de hücre süspansiyon kültürlerinin fenolik bileşiklerle birlikte prolin biriktirdiğini, bunun dışında biyokütle üretiminin besin eksikliğinden olumsuz etkilendiğini ortaya çıkarmıştır. Bitki dokularının besin yoksunluğuna, büyüme ve adaptif tepki arasında bir savunma mekanizmasıyla yanıt verdiği öngörülmüştür. Ayrıca, araştırma sonuçları incelendiğinde, abiyotik stres algısının ve artan fenolik

metabolitlerin, hücre içi serbest prolin ve oksidatif pentoz fosfat yolunu da içeren bir dizi biyokimyasal süreçle bağlantılı olduğu kanıtlanmıştır. Çalışmada bir diğer nokta ise kalli ve hücre süspansiyon kültürlerinin besin eksikliğine yanıt vererek; hücrelerde birincil metabolizma (büyüme) ve ikinci metabolizma (savunma bileşikleri) arasında negatif bir korelasyon bulunduğu gözlenmiştir (Lattanzio vd, 2018).

2.1.4. Enginar ve enzimleri

Enginar (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.), Asteraceae familyasından olup; Akdeniz orijinli besin değeri yüksek bir bitki olarak tanımlanmaktadır. Enginar %86.5 su, %2.3-3 protein, %0.2-0.3 lipid ve %7.8 karbonhidrat ve çeşitli mineraller (K, P, Fe, Na ve Ca), vitaminler (A, B1, B2, B6, ve C) ve fenolik bileşikler içermektedir (Lattanzio vd., 2009).

Ülkemizdeki enginar üretimi vejetatif yöntemlerle yapıldığından özellikle Sakız ve Bayrampaşa çeşitleri üzerinde yoğunluk görülmektedir. Enginarın ülkemizde İzmir, Bursa ve İstanbul yörelerinde yetiştirilen bir bitki çeşidi olarak bilindiği ifade edilmiştir. Bununla beraber; Akdeniz bölgesinde sadece belirli mikroklima alanlarında enginar yetiştiriciliği yer almaktadır. Enginar, özellikle Akdeniz ülkelerinin tarım alanlarında geniş bir yere sahiptir. Enginar toprak altı gövdesi çok yıllık, toprak üstü organları tek yıllık olan bir bitkidir. Enginarın yenilen kısmı açmamış çiçeklerinin geniş ve etli çiçek tablası ile brakte olarak adlandırılan enginar başındaki etli dip kısımlarını kapsamaktadır (ANONİM, 2006). Enginar yaprakları rozet şeklinde olup, çeşide bağlı olarak farklı yapılarda (dilimli ya da dilimsiz) gözlenmektedir. Bununla beraber, yaprakların birleştiği noktada büyüme ucu yer almakta ve uygun hava sıcaklığında (13-17°C) çiçek sapı oluşumu meydana gelmektedir. Oluşan bu çiçek sapının en ucunda bir tane ana baş, nispeten daha alt kısımlarında ise yan başlar görülmektedir (Macit ve Şalk, 1970; Ekbiç, 2005). Enginar bitkisinin baş kısmı biyoaktif fenolik bileşikler, inülin, lif ve mineraller açısından zengin olması bakımından önem taşımaktadır. Enginar yapraklarının da önemli miktarda fenolik bileşik (klorojenik asit, 1,5- ve 3,4-di-kafeoilkinik asitler ve sinarin) içerdiği bilinmektedir (Lattanzio vd., 2009).

Enginardan enzim eldesinde çiçek özleri, olgun yaprak kısımları ve olgunlaşmamış çiçek özleri kullanılmaktadır (Llorente vd., 2004). Enzim aktivitesinin sadece çiçekte olduğunu ve aktivitesinin 70°C'ye kadar olan sıcaklıklarda muhafaza edildiği gözlenmiştir. Enzim aktivitesi çiçek salkımının stiletlerine kadar takip edilmiştir (Roseiro vd., 2003).

Enginar hem generatif hem de vejetatif yöntemlerle çoğaltılabilmekle birlikte, heterozigot yapı göstermesinden ötürü daha çok tercih edilen çoğaltım şekli vejetatif çoğaltım olarak ifade edilmektedir. Vejetatif yöntem zararlıların ve hastalıkların taşınmasının önüne geçen, üstün verim ve kalite özelliklerine sahip olmakla birlikte çoğaltım hızının artmasını sağlayan alternatif bir metottur (Foury ve Martin, 1974; Macua vd., 2000; Ekbiç, 2005).

Günümüzde üretim amacıyla ağırlıklı olarak vejetatif çoğaltımın kullanıldığı ifade edilmektedir. Çoğaltma materyalleri olarak rizom, yarı dormant dip sürgünleri (ovoli), halk arasında 'piç' olarak da bilinen dip sürgünlerinden yararlanıldığı bilinmektedir (Eser vd., 2006; Alp, 2008). Ülkemizde ise enginar bitkilerinden bahar dönemlerinde (ilkbahar ve sonbahar) alınan dip sürgünleri ile yapılan çoğaltma tekniğinin yaygın olarak uygulandığı bir gerçektir (Abak, 1987; Ekbiç, 2005). Bu yöntemin dışında dormant bitki materyalleri de çoğaltım amaçlı uygulanmaktadır. Bununla beraber, çoğaltım hızı ve katsayısı bakımından istenilen sonuçları vermediği için bu yöntem diğer yöntemlere göre daha az tercih edilir niteliktedir (Uğur, 2005).

Cynara L. cinsinin, zeytin ağacına çok benzer bir dağılımda ve Akdeniz florasına özgü olduğu bilinmektedir. Bu cins Asteraceae-Cardueae familyasına ait olup sekiz türe ayrılır. İyi bilinen enginar ve yabani enginar da dahil olmak üzere dört alt tür içermektedir. Cinsin taksonomik revizyonu, morfolojisi, anatomisi ve dağılımı dahil olmak üzere en son ve kapsamlı çalışması yapılmıştır. Kültürü yapılan enginar (eski adıyla *Cynara scolymus*) ve cardoon (*C. cardunculus*) artık *C. cardunculus*'a dahil edilmiştir ve bir tür olan *Cynara tournefortii* hariç tutulmuştur. *Cynara* ile *Silybum* (*S. marianum*'u içerir) ve *Cirsium* (deve diken) gibi diğer cinsler arasında çeşitli benzerlikler öne sürülmüş, ancak dış gruplar

olarak kabul edilmiştir. *Cynara* spp. (esas olarak *Cynara cardunculus* ve *Cynara humilis*) geleneksel olarak peynir yapımında pıhtılaştırıcı olarak kullanıldığı rapor edilmiştir. *Cardunculus*, *Cynara humilis* ve *Cynara algarbiensis*'in Portekiz ve İspanya'da pıhtılaştırıcı olarak kullanıldığı bilinmektedir. Normalde, pıhtılaştırıcı ve proteolitik enzimler, bu cinsin karakteristik mor çiçeklerinde bulunmaktadır (Roseiro vd., 2003).

Yapılan bir çalışmada yabani *Cynara cardunculus* çiçeklerinin pistilleri gözlemlenerek enzimatik içerikleri incelenmiştir. Kardosin olarak bilinen süt pıhtılaşma enzimleri daha önce tüm *C. cardunculus* hücrelerinde ve dokularında tespit edilmiştir. Ancak özellikle çiçeklerin pistillerinden önemli bir ölçüde bulunmaktadır (Faro vd., 1995; Faro vd., 1999).

Enginar çiçekleri peynir yapımında sütün pıhtılaşması için kullanılmakla beraber, üründe yumuşak dokusal özelliklere sahip kremi bir yapı meydana getirmektedir (Barbosa vd., 2020).

Kardosin A'nın kappa- kazeinin peptid bağını (Phe105-Met106) parçalayarak, kinetik parametreler ve özgüllük açısından kimozine benzer bir aspartik proteaz olduğu tespit edilmiştir (Amira vd., 2017). Kardosin A'nın aksine, kardosin B, hücre duvarı ve doku iletiminin hücre dışı matriksi içinde yer aldığı görülmüştür (Viera vd., 2001).

2.1.5. Enginardan elde edilen enzimlerle üretilen koyun ve keçi peynirlerinin özellikleri

Günümüzde peynir teknolojisinde sütü pıhtılaştırmak adına hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklı pek çok enzim kullanılmaktadır. Süt pıhtılaşma enzimleri peynir üretiminde birincil aktif ajanlar olarak adlandırılmaktadır. Rennin peynir mayası ilk ve hala en yaygın bilinen süt pıhtılaşma enzim preparatıdır (Chazarra vd., 2007). Peynir eldesinde en önemli ikameler, izole edilmiş ve üzerine çalışmalar yapılmış mikrobiyal, rekombinant ve bitkisel bazlı enzimler olarak bilinmektedir (Shah vd., 2014).

Tarihsel olarak, Akdeniz bölgesi keçi ve koyunların en çok yetiştirildiği önemli bir bölge olarak tanımlanmaktadır. Üretimdeki bu artış, keçi sütünün inek sütüne göre daha yüksek sindirilebilir özellikte olması ve daha düşük alerjen kapasitesine sahip olması şeklinde açıklanmaktadır. Keçi sütü ve ürünlerinin tüketiminde büyümedeki en belirleyici faktörlerden biri insan sağlığı üzerindeki faydalı etkilerin bilimsel değerler ölçüsünde kabul edilebilir olmasından ileri gelmektedir (García vd., 2014a). Sütün bileşenlerinin (yağ, protein, laktoz) yanı sıra içinde yaygın olarak bulunan mikro bileşikler, örneğin mineraller, vitaminler, kolesterol ve terpenler bunların arasındadır (Morand-Fehr vd., 2007). Keçi, koyun ve inek sütlerinin pıhtılaşma süreleri arasındaki farklılıklar, sütlerin kompozisyonlarından ve kazein yapısındaki misel farklılığından kaynaklanabilmektedir. Koyun sütü, β -kazein ve kazein arasındaki orandan dolayı peynir mayası için çok hassas bir yapıdadır. Böylece pıhtılaşma inek sütüne göre daha hızlı gerçekleşmektedir. Aynı pıhtılaşma süresini elde etmek için inek sütüne göre daha az peynir mayasına gereksinim duyulmaktadır (Alichanidis ve Polychroniadou, 1996).

Keçi sütü peyniri beyaz renkli, zayıf, sert dokulu ve daha az acımsı olarak nitelendirilmektedir. Keçi peynirinin yüzeyi oldukça düzgün bir görünümle karakterize edilmektedir. (Hayaloğlu ve Karagül-Yüceer, 2011; Milani ve Wendorff, 2011; Xu vd., 2012). Keçi sütünde protein ve yağ içeriği kalite açısından önemli teknolojik kriterlerdir (Raynal-Ljutovac vd., 2005).

Çiğ ve pastörize keçi sütüyle yapılan peynirler, Akdeniz bölgesindeki olgunlaşmış peynirlerin önemli bir bölümünü temsil etmektedir (Trujillo vd., 2002). Bu peynirlerin güvenlik ve organoleptik özellikleri büyük önem taşımakta olup, keçi sütü ürünlerinin üretim ve tüketiminin artırılması için çalışmalar önemlidir. Keçi sütü, süt ürünleri üretimi sırasında mikrobiyolojik güvenliğini sağlamak için farklı ön işlemlere tabi tutulmaktadır. Peynir yapımı söz konusu olduğunda, bu işlemlerin herhangi birinin peynirin duysal ve teknolojik özellikleri üzerinde olumlu veya olumsuz etkileri olabilmektedir (Walstra vd., 1993).

Süt enzimi pıhtılaşmasının misel agregasyon fazı, protein ve mineral elementler, özellikle iyonik formdaki kalsiyum açısından sütün bileşimine bağlı bir dizi reaksiyon olmakla birlikte, pıhtılaştırıcı enzimlere doğrudan bağlı olmayan bir dizi reaksiyon şeklindedir. Bununla beraber, pıhtılaştırıcının türü, protein üzerinde görülen proteolitik etki sebebiyle dolaylı olarak etkin bir rol üstlenmekte, hızlı bir jel oluşumuna ve jel sertliğine yol açmaktadır. *Cynara cardunculus* özütü içeren enzimler kimozen ve hatta pepsin yüzdesi içeren peynir mayası ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek bir proteolitik aktivite/pıhtılaştırıcı aktivite oranına (P/C oranı) sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak bu proteolitik aktivite/pıhtılaştırıcı aktivite oranının etkisi koyun sütüyle karşılaştırıldığında inek sütünde daha az belirgin halde tespit edilmiştir (Cordeiro vd., 1992).

Bununla birlikte, koyun sütü ile incelenen tüm pH seviyeleri için Martinez ve Estebán (2017) *Cynara cardunculus* özütünün hayvansal rennetten daha etkili olduğu bildirilmiş ve pıhtılaştırıcıların arasındaki farkların inek sütüne göre çok daha belirgin halde gözlendiğini ifade etmiştir. Hayvansal kökenli pıhtılaştırıcıların sütün pH değişkenliğine daha duyarlı olduğu ve bu durum yüksek pH'lı (6.7–6.8) koyun sütünün pıhtılaşmasını güçleştirdiği de belirtilirken, araştırmacılar tarafından *C. humilis* ekstraktları için benzer sonuçlar elde edilmiş, koyun sütünde ortak pH aralığı için, bitkisel ekstraktların pıhtılaştırıcı etkisi rennet aktivitesine göre daha az etkili olarak bildirilmiştir.

Koyun sütü, inek veya keçi sütünden daha yüksek protein, yağ ve mineral içeriğine sahiptir. Bu yüksek besin değeri peynirlere kadar uzanmaktadır. Büyükbaş hayvan sektörünün aksine, küçükbaş sütünün bileşimi büyük ölçüde yılın mevsimine bağlıdır. Koyun sütü bileşimini, koyunun genetik yapısını, mevsimsel faktörler, yaş, laktasyon dönemi, beslenme ve sağım koşulları gibi fizyolojik faktörlerle birlikte kimyasal ve mikrobiyolojik etkenler büyük ölçüde etkilemektedir. Bu etmenler nihai ürün dokusu ve aromasında önemli farklılıklara neden olmaktadır (Bencini ve Pulina, 1997; Park vd., 2007).

Hayvan genetiği (cins ve genotip) sütün kalitesi ve veriminde en belirleyici faktördür. Genellikle, daha yüksek süt üretimine sahip koyun ırkları, daha düşük protein ve yağ içeriğine sahip süt meydana getirmektedir. Daha yüksek yağ ve protein içeriğine sahip sütün kullanılması, beslenme özellikleri üzerinde olumlu bir etkiye sahip olup bu durum nihai duyuşsal özellikleri etkilemektedir (Bencini ve Pulina, 1997).

Özellikle İber Yarımadası'nda, genellikle çiğ koyun sütüyle birlikte bitkisel pıhtılaştırıcı kullanılarak üretilen peynirler talep görmektedir. Bu peynirler, karakteristik yumuşak kremi bir dokuya sahip olup, tat özellikleri gelişmiştir. Bu tür peynirlerin hafif acımsılıkla beraber, daha olgun olduğunda keskin bir tat özelliğinin de olduğu bilinmektedir (Roseiro ve Barbosa, 1996). *Cynara* sp. özütü, yüzyıllardır geleneksel Portekiz ve İspanyol koyun sütü peynirlerini yapmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Enginar özütü ile yapılan peynirlerde hafif buruk bir tat olduğu bildirilmiş ve bu özüt ile yapılan Edam peynirinin daha yumuşak bir dokuya sahip olduğu gözlemlenmiştir. Rokfor peynirinde gösterilen ana farklar, daha güçlü proteolizle birlikte daha az verim ortaya çıkarması yönündedir. Ayrıca daha yüksek proteolitik aktiviteye rağmen, özellikle Serra da Estrela ve Rokfor gibi yumuşak yapıda peynirlerde, *Cynara* özütünün hayvansal peynir mayası yerine kullanabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle, enzimlerinin yüksek proteolitik aktivitesinin neden olduğu doku ve lezzet kusurları ve sonuçta ortaya çıkan verim kaybı nedeniyle, enginar çiçeği özütü, özellikle inek sütünden yapılan peynirlerde, hayvansal rennet için iyi bir ikame gibi görünmediği bildirilmiştir. Koyun sütünden yapılan peynirler için bu etkiden söz edilmemiştir (Roseiro vd., 2003).

Cynara cardunculus L. koyun ve keçi sütü ile kullanılarak, Los Pedroches, La Serena, Torta del Casar (koyun sütünden), Los Ibores (keçi sütünden) gibi Geleneksel peynirlerin üretilmesinde de kullanılmaktadır (Shah vd., 2014). Bununla beraber bu amaç doğrultusunda inek sütünün kullanıldığı da bilinmektedir (Llorente vd., 2014). Koyun ve inek sütü karışımından üretilen Flor de Guía peyniri de bu şekilde üretilen başka bir peynir çeşididir (Shah vd., 2014). Yabani enginar özütü peynir yapmak adına proteolitik bileşiklerin çözünmesi için

ilk önce birkaç saat boyunca oda sıcaklığında su içinde bekletilmektedir. Daha sonra koagülasyonun gerçekleşmesi amacıyla ideal olarak 35-40 °C sıcaklık aralığında ılık süt içine ilavesi sağlanmaktadır. Burada elde edilen peynirler yumuşak tereyağımsı bir dokuya ve hafif acımsı bir tada sahiptir (Gostin ve Waisundara, 2019).

Olgunlaşma boyunca hidrofobik peptitlerin oluşumu ve oranı (hidrofobik/hidrofilik peptitler), *Cynara cardunculus* ile yapılan peynirlerde hayvansal peynir mayası ile yapılanlara göre daha yüksektir (Conceição vd., 2018).

Enginar çiçeği, geleneksel olarak Akdeniz havzasında, koyun peynirlerinin imalatında, çeşitli peynirlerin üretimi için zorunlu bir pıhtılaştırıcı olarak kullanılmaktadır (Almeida ve Simoes, 2018). *Cynara cardunculus* L. çiçeğinin süt pıhtılaşma aktivitesi, sırasıyla kimozen ve pepsine aktivite ve özgüllük açısından benzer olarak iki aspartik proteaz olan kardosin A ve B'nin aktivitesine bağlıdır. *Cynara cardunculus* L. çiçek aktivitesinin başlıca etkenleri, çiçeğin genotipi, çiçeğin kullanılan kısmı, fizyolojik olgunluk aşaması ve çiçeğin kuruma süresi gibi parametrelerdir (Fogeiro vd., 2020).

Üreticiye bağlı olarak, bitkisel pıhtılaştırıcı hazırlama önemli ölçüde farklılık gösterebilmekte, farklı hazırlama yöntemleriyle birlikte, kuru çiçek özütünün de kullanıldığı bilinmektedir (Roseiro vd., 2003). Enginar çiçeklerinden elde edilen sulu ekstrakt, morumsu veya kahverengi bir renge sahiptir. Proteolitik enzimlere ek olarak, filtrelenmiş enginar özütü, sütün pıhtılaşması veya peynir yapımı sürecinde yer almayan ancak olgunlaşma işlemi sırasında enzimatik aktiviteleri etkileyen fenolik bileşikler gibi diğer bileşenlere sahiptir (Conceição vd., 2018).

Enginar özlerinden elde edilen proteazlar, diğer süt pıhtılaşma enzimleri gibi, sığır κ -kazeinin Phe 105–Met 106 bağı için spesifik bir aktiviteye sahiptir. (Barros ve Malcata, 2004). Bununla birlikte *Solanum dubium*'dan elde edilen proteaz κ -kazeinin Ser₁₀₄- Phe₁₀₅ bağından, *Actinidia chinensis*'den elde edilen aktinidin proteaz ise Arg₉₇-His₉₈ ya da Lys₁₁₁-Lys₁₁₂ bağlarından hidrolize eder (Ahmed vd.,

2010; Piero vd., 2011). *C. cardunculus*'dan elde edilen Kardosin A ise α_{s1} -kazeinin Phe₂₄-Phe₂₅, Arg₁₀₀-Leu₁₀₁, Phe₁₅₃- Tyr₁₅₄, Trp₁₆₄-Tyr₁₆₅ ve Tyr₁₆₅-Tyr₁₆₆, β -kazeinin ise Leu₁₂₇-Thr₁₂₈, Leu₁₆₅-Ser₁₆₆ ve Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ bağlarından hidrolize etmektedir (Cavalli vd., 2013). Bu nedenle farklı bitkisel kaynaklı enzimlerin peynir üretimindeki ve ürün reolojik özellikleri, tat ve renk üzerine etkisi değişebilmektedir (Nicosia vd., 2022). Ayrıca, peynir yapımında kullanılan proteaz miktarı çok önemlidir, çünkü yetersiz miktarlar peynirin daha yumuşak kıvamlı olmasına yol açarken, fazla proteaz ikincil proteolize ve dolayısıyla acı tatların gelişmesine neden olur (Liu vd., 2021). Sığır κ -kazeininde başka hiçbir bağ bölünmemekle birlikte; bitkisel enzim sığır sütündeki κ -kazein ile ilgili olarak diğer pıhtılaştırıcılara benzer şekilde özellik göstermektedir. Bununla birlikte, enginar özütleri daha geniş bir özgüllük göstererek kazeinlerdeki diğer peptid bağlarını hidrolize etmektedir. Oksitlenmiş insülin B'nin (bir model substrat olarak kullanılan bir protein) *Cynara cardunculus* proteaz tarafından sindirilmesi, bu proteazın ayrıca insülin B zincirinin N-terminaline doğru bir ekzopeptidaz aktivitesi sergilediğini ve tercihen hidrofobik tortular arasında bölündüğünü ortaya çıkarmıştır. Kardosin B, kardosin A'dan daha geniş bir özgüllük sunmakla beraber, her iki kardosin de tercihen hidrofobik yan zincirlerle hidrolize peptid bağları yapmıştır (Roseiro vd., 2003).

Cynara cardunculus çiçek özü, tipik lezzeti ve pürüzsüz dokusu nedeniyle tercih edilen Akdeniz Menşei Korumalı koyun peynirlerinin üretiminde de kullanmıştır. Toplamda 6 enginar bitkisinden (1M–6M) çiçekler, kromatografik ve elektroforetik analiz kullanılarak karakterize edilmiştir. Enginar çiçek özleri, biyokimyasal profil ile kazein yapıları, pıhtılaşma özellikleri ve peynir dokusu üzerindeki proteolitik aktivite arasındaki ilişkiyi araştırmak için incelenmiştir. Geleneksel Serra da Estrela peynirleri kardosin A prevalansına; (κ -kazein ile proteolitik etkiye ve en düşük pıhtılaşma süresine) sahip 4M, 5M ve 6M bitkilerinin daha sıkı bir yapıda peynirler verdiği görülmüştür. Kardosin A'nın bulunmadığı 1M, 2M ve 3M bitkileri, β -kazein ile proteolitik etkiden olumsuz etkilenerek, topaklanmayı ve jel kıvamını başlatmıştır. Bitki 3M, süt pıhtılaşması sırasında yavaş bir misel agregasyon oranı ve düşük jel sertliği göstererek; pürüzsüz bir doku meydana getirmiştir (Barracosa vd., 2021).

Cynara cardunculus ile üretilen bir koyun peyniri olan Queijo de Azeitao peynirinde yapılan bir çalışmada kimyasal ve mikrobiyolojik analizlerin yanısıra aroma analizleri de gerçekleştirilmiştir. Portekiz’de yerleşik üç farklı üreticiden dokuz peynir örneği toplanmıştır. Analiz sonuçlarında önemli farklılıklar gözlenmemiştir. Ayrıca analiz edilen peynirlerin mikrobiyotasıyla ilgili olarak, alfa çeşitlilik indeksi, mikrobiyal popülasyonun bileşimi ve karmaşıklığı açısından üç üretici arasında önemli bir fark göstermemiştir. Uçucu profil analizi sonucunda, 24 farklı bileşik tanımlanmıştır; bunlar 7 asit, 7 ester, 4 alkol, 3 keton, 2 aromatik hidrokarbon ve 1 aldehit olarak ifade edilmiştir. En çok tanımlanan uçucu organik bileşikler 2-bütanon, bütanoik asit ve heksanoik asittir (Cardinali vd., 2021).

Yapılan bir başka çalışmada, Serra da Estrala peyniri üretmek için incelenen iki adet 3 M ve 6 M yabani enginar çiçek türleriyle birlikte ticari bir enginar çiçeği kullanılmıştır. Araştırmacılar kardosin profillerinde bulunan farklılıkların, pıhtılaştırıcının jelleşme özelliklerini etkileyebilmekte olduğunu, böylece peynir özelliklerinin de değiştiğini bildirmişlerdir. Sonuçta bu farklılıkların, peynirin yağ ve kabuk rengini etkilediği belirtilmiştir. Yapılan çalışma, koyun sütündeki mevsimsel değişikliklerin peynir özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte; enginar özütü peynirin duyuşal özelliklerinin geliştirilmesine de yardımcı olmuştur (Fogeirol vd., 2020).

Süt Pıhtılaşma Enziminin (MCE), enginarın (*Cynara cardunculus* spp. *scolymus*) çiçeğinden izole edilerek saflaştırılması sağlanmıştır. Saf MCE’nin, pH 6.5’te optimum aktivite gösterdiği ifade edilmiştir. Özellikle saf MCE ile pıhtılaştırılmış peynire iyi bir lezzet sağlarken, saflaştırılmış MCE, peynir depolama süresi esnasında diğer ticari peynir mayasına lezzet açısından yakın değerde olarak saptanmıştır. Çalışmada *C. scolymus* aspartik proteaz aktivitesi çiçek dokusunda, olgunlaşmamış çiçek ve yaprakta sırasıyla %100, %9 ve %5 olarak tespit edilmiş, kök ve rizomlarda ise aktivite bulunamamıştır. Enginar çiçeklerinden elde edilen MCE’nin, üretilen peynirde herhangi bir kusur olmaksızın duyuşal özelliklerinin geliştirilmesinde yararlı olduğu görüşüne varılmıştır (Llorente vd., 2014).

Yapılan bir başka çalışmada, rennet pıhtılaşması ile karşılaştırıldığında, *Cynara cardunculus* özü ile pıhtılaştırılmış süt için misel agregasyon hızının ve jel sertliğinin daha düşük olduğu ortaya çıkmış; misel agregasyon fazı doğrudan pıhtılaştırıcı enzimler tarafından etkilenmediğinden, bu davranışın bir kısmı *C. cardunculus*'nin proteazlarının yüksek proteolitik aktivitesine atfedilmiştir (Alves vd., 2004).

Peynirdeki acılık çoğunlukla hidrofobik peptitlerden kaynaklanmakta ve genellikle bir kusur olarak kabul edilebilmektedir. Bununla birlikte, bu acılık olgun peynirlerin arzu edilen lezzetine katkıda da bulunabilmektedir. Hayvansal rennet ile yapılan Murcia al Vino peynirlerinin duysal yönleri üzerine yapılan bir çalışmada, bu peynirlerin bitkisel rennet ile yapılan peynirlere kıyasla önemli ölçüde daha sert, daha pürüzlü ve daha az kremi yapıda olduğu ortaya çıkmıştır. Bitkisel enzim ile yapılan peynirlerdeki yoğun proteoliz, kazein ağını parçalayarak daha homojen bir yapıya yol açarak peynirin kremi yapısını ve yumuşamasını arttırdığı bildirilmiştir (Tejada vd., 2008).

Yapılan bir çalışmada, enginar çiçeklerinden elde edilen bir bitki pıhtılaştırıcısı (*Cynara scolymus*) ile yapılan Murciano-Granadina keçi peynirlerinin olgunlaşması sırasında meydana gelen değişiklikler incelenmiş; sonuçlar, olgunlaşma sırasında fizikokimyasal bileşimin diğer peynirlere benzer şekilde geliştiğini göstermiştir. İki haftalık depolamada örneklerde nem, su aktivitesi, protein, yağ, kuru maddede yağ, kabuk rengi değeri, suda eriyen azot analiz sonuçları sırasıyla %48.5, 0.974, %13.7, %30.3, %58.9, 7 ve %16.2 şeklinde bulunmuştur. Bitkisel pıhtılaştırıcılarla hazırlanan peynirlerin olgunlaşması sırasında acı bir tat oluşması yaygın olmasına rağmen, enginarla yapılan peynirlerde acılık çok düşük puanlanmıştır. Araştırmacılar bu nedenle bu peynirlerin pazarlamaya uygun olduğunu belirtmişlerdir (García vd., 2016).

Yabani enginardan (*Cynara cardunculus*) elde edilen toz haline getirilmiş bitkisel pıhtılaştırıcı (PPC), olgunlaşma boyunca proteolizdeki fark belirlenerek keçi sütü peyniri üretimi için buzağı peynir mayası (CR) ile karşılaştırılmıştır. İki tür pıhtılaştırıcı kullanılarak yapılan peynirlerin bileşimleri arasında önemli

farklılıklar görülmemiştir. Bununla birlikte, PPC ile üretilen peynirler, CR kullanılarak yapılan peynirlerden daha yüksek pH seviyeleri sergilemiştir. Üre-PAGE ile ölçülen α_s -kazeinin parçalanma derecesi incelendiğinde, PPC kullanılarak yapılan peynirde, CR kullanılarak yapılan peynirden daha fazla parçalanma derecesi fazlalığı ortaya çıkmıştır. PPC ile yapılan peynirlerde olgunlaşma boyunca hidrofobik peptit oluşumu ve hidrofobik/hidrofilik peptit oranı CR ile yapılan peynirlere göre daha yüksek bulunmuştur. İki peynir türü arasında çeşitli peptitlerdeki nicel farklılıklar belirgin halde gözlenmiştir (Pino vd., 2009).

Tejada vd. (2008) tarafından yapılan çalışmanın amacının, birincil proteoliz, ikincil proteoliz veya bitkisel pıhtılaştırıcı (*C. cardunculus*) ve buzağı peynir mayası (AR) ile üretilmiş bir keçi sütü peynirinin (Murcia al Vino) olgunlaşması sırasında hidrofilik (HI) ve hidrofobik (H₂O) peptitlerdeki değişiklikleri incelemek olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, Murcia al Vino peynirinde, olgunlaşma sırasında yoğun preteolitik aktivite meydana geldiği tespit edilmiştir. Hayvansal peynir mayası ile yapılan peynirlerin 60 günlük olgunlaşma süresinden sonra pH 4.6'da suda çözünür azot (WSN) değeri, protein olmayan azot (NPN), amonyak azotu (NH₃N) ve amino asit azotu (AAN) için değerler sırasıyla %19.04, %9.61, %0.55 ve %0.66 şeklinde belirlenmiştir. Bitkisel rennet ile üretilen peynirlerde proteoliz daha yoğun olmuş ve 60 günlük olgunlaşma sonrasında WSN, NPN, NH₃N ve AAN için %34.79, %11.16, %0.59 ve %0.88 değerleri elde edilmiştir. Hayvansal enzim ile üretilenlere kıyasla bitkisel rennet ile üretilen peynirlerde kazein (CN) proteolizi daha yoğun gözlenmiştir. Hayvansal rennet ile üretilen peynirlerde β -kazein parçalanma ürünleri daha yüksek bulunmuştur. Keçi peyniri üretiminde bitkisel enzim kullanımı olgunlaşmayı hızlandırabilmekte ve böylece artan siprosin proteolitik aktivitesinin neden olduğu farklı duyuşal özelliklere sahip bir peynir elde edilebilmektedir (Tejada vd., 2008).

Torta del Casar peynirinde, yapılan bir çalışma enginar özütü peynirlerinde olgunlaşmanın ilk 30 gününde zayıf, 30 ila 60 gün arasında daha yoğun, ancak 60 ila 90 günlük olgunlaşma arasında önceki günlere kıyasla fark olmayan bir

proteoliz özelliği gösterdiğini ifade etmiştir. Kazein matrisi oranı, olgunlaşma boyunca peynir dokusunun değişmesiyle, peynirlerin sertliğini ve kıvamını azaltmasıyla ve yapışkanlıklarını artırmasıyla ilişkili olarak bildirilmiştir. Torta del Casar peynirinin hafif acı tadı, özellikle hidrofobik olan kazeinlerdeki belirli dizilere bağlı olabilmekte ve proteinazlar tarafından kesildiğinde acılığa neden olabilmektedir (Delgado vd., 2011).

Serpa peyniri için, pıhtılaştırıcı olarak *Cynara cardunculus*'un hayvansal veya mikrobiyal peynir mayası ile değiştirilmesinin etkisi karşılaştırılmıştır. *C. cardunculus* ile yapılan peynirlerde pH 4.4'de çözünür nitrojen, hayvansal peynir mayası ve mikrobiyal peynir mayası ile üretilen peynirler için trikloroasetik asitte çözünür nitrojen ve fosfotungstik asitte çözünür nitrojen miktarları önemli ölçüde daha yüksek ölçülmüştür. Bununla birlikte, 60 günlük olgunlaşmada önemli farklılıklar gözlemlenmiştir. Analizler sonucunda α s₁-kazeinin proteolizi, β -kazeinden daha hızlı gerçekleşmiş, α s₁-kazein olgunlaşmanın sonunda tamamen bozunmuştur. Peynirler 90 günlük olgunlaşmadan sonra β -kazein, ilk 30 günlük dönemde α s₁-kazein ile karşılaştırıldığında daha düşük bir proteoliz seviyesi göstermiştir. Ancak daha hızlı bir bozunma ortaya çıkmıştır. Olgunlaşmanın sonuna kadar, β -kazein seviyeleri sabit kalmıştır (Roseiro vd., 2003).

Jben, Maghnia ve Nadrouma'da, doğu ve batı Cezayir'in sınırlı bir bölgesinde küçük çapta üretilen geleneksel bir taze peynir olarak bilinmektedir. Bu peynir yabani enginar *Cynara cardunculus* L.'nin kurutulmuş çiçekleri ile pıhtılaştırılmış koyun, inek veya keçi sütlerinden üretilmektedir. Yapılan çalışmada, Jben, mikrobiyolojik kaliteyi arttırmak için pastörize edilmiş inek ve keçi sütleri kullanılarak üretilmiştir. Elde edilen peynirler, *Cynara cardunculus* L. kurutulmuş çiçeklerinin ham enzimatik özütünün sütü pıhtılaştırmasıyla elde edilmiştir. Peynire daha iyi bir organoleptik özellik sağlamak adına, geleneksel peynirlerden izole edilen laktik asit bakteri suşları süte ilave edilerek uygulanmıştır. Üretilen keçi peynirlerinin kuru madde miktarı 27.98 g/100g ile 34.61 g/100 g aralığında değişirken, pH değerleri 4.76 – 4.81 aralığında tespit edilmiştir. Elde edilen peynirlerde fizikokimyasal ve mikrobiyolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Keçi

sütüyle daha iyi organoleptik kalite ve daha yüksek peynir verimi sağlanmıştır (Benheddi ve Hellal, 2019).

2.1.6. Salisilik asitin etkileri

Salisilik asit (SA), genellikle bir hidroksil grubu ya da onun fonksiyonel türevini taşıyan, aromatik bir halkaya sahip bitki fenoliklerinin bir grubudur. Bitkilerde salisilik asit etkileri ile ilgili yapılan çalışmalarda diğer birçok fenolik bileşik gibi, bitki büyümesinin düzenlenmesi, gelişimi ve diğer organizmalarla etkileşiminde salisilik asitin önemli bir rol oynadığı görülmüştür (Özeker, 2005). Ayrıca Salisilik asidin, süspansiyon kültürlerinde, l-aminosiklopropan-l-karboksilik asit'in etilene dönüşümünü engelleyerek, etilen biyosentezini bloke ettiği saptanmıştır (Leslie ve Romani, 1988).

Yapılan çalışmalara göre salisilik asitin abiyotik ve biyotik strese verilen cevaplarda ultraviyole ışık, kuraklık, tuz ve ısı gibi etkenler üzerine kadar büyük rolü olduğu tespit edilmiştir (Wang ve Li, 2006).

Farhan vd. (2018), yaptıkları *Cynara scolymus* üzerine araştırmalarında, enginar yapraklarında en yüksek konsantrasyonda salisilik asit (526.182 µg/ml) tespit edilmiş; kompakt kallus yapıları ise 129.68 µg/ml salisilik asit ile en düşük konsantrasyonda ölçülmüştür. Kırılgan kallusta ise 275.997 µg/ml salisilik asit saptanmıştır. Ayrıca Magied vd. (2016), fenolik bileşik olan salisilik asidin enginar yapraklarında ve başlarında bulunduğunu ifade etmişlerdir.

Zengin bir antioksidan bileşik kaynağı olan enginarın (*Cynara scolymus L.*) biyokimyasal özelliklerinden dolayı; fenoller, flavonoidler gibi antioksidan bileşiklerdeki *in vitro* değişiklikleri ve uyarıcı olarak salisilik asit kullanılmasıyla birlikte ekstraktın radikal süpürücü özellikleri incelenmiştir. Enginar numuneleri, farklı konsantrasyonlarda salisilik asit (0, 25, 50, 100, 200 µM) içeren katı bir MS (Murashige ve Skoog) ortamına aktarılmış daha sonra alt kültürden 28 gün sonra biyokimyasal bileşikler araştırılmıştır. Sonuçlar, salisilik asidin ölçülen tüm parametreleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu

göstermiştir. En yüksek fenol ve kallus flavonoid içeriği 200 µM salisilik asit ile muamele edilen örneklerde gözlenmiştir. En yüksek radikal temizleme yüzdesi 100 µM salisilik asit ile muamele edilen numunelerden elde edilmiştir (Tanoori vd., 2015).

Bekheet vd. (2014), tarafından salisilik asit (SA) enginar yaprak eksplantlarından elde edilen kallusların büyüme parametreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. En etkili SA seviyesi, en yüksek kallus taze ağırlığı (2.55 g) ve kuru maddenin (%10.58) kaydedildiği 75 µM olarak saptanmıştır. Bu olumlu sonuç muhtemelen SA'nın bitki hücrelerinin büyümesinde önemli bir rol oynayan bir sinyal molekülü olduğu gerçeğiyle ilişkilidir. Çalışmada enginar kallus kültürlerinin ekstraktlarının *in vitro* hipolipidemik etkileri de araştırılmıştır. Enginar kallus ekstraktları, doza bağlı bir şekilde hipolipidemik canlılık etkileri göstermiş; enginar özleri, standarda kıyasla güçlü antioksidan etkiler kaydetmiştir. Gözlemler ışığında, kallus gelişimindeki değişikliklerin kültür ortamında SA'nın varlığı ile ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur. Kallus, çok kompakt olmayan, gevşek dokuda belirgin proliferatif kapasiteye sahip bir hücre kütlesi olarak ortaya çıkmıştır. SA, bitki büyüme ve gelişiminin düzenlenmesinde önemli rolü olan hormon benzeri bir maddedir. Ayrıca SA, patojen saldırısının neden olduğu sistemik kazanılmış dirençte esas olup; patogenezele ilgili proteinlerin sentezine yol açmaktadır. Bu bağlamda, SA'nın eksojen uygulaması sadece bitkileri strese karşı korumakla kalmayıp, aynı zamanda büyümelerini ve üretkenliklerini de artırmıştır. SA'nın fizyolojik süreçler üzerindeki etkisinin konsantrasyon, bitki türleri, gelişim evreleri ve çevre koşulları gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişken olduğu ifade edilmiştir.

El-Abagy vd. (2010), salisilik asit konsantrasyonlarının *Cynara scolymus L.* vejetatif büyümesi üzerine yaptıkları araştırmalarında enginarın önemli ölçüde etkilendiğini belirlemişlerdir. Enginar bitkisine 200 ppm ve 400 ppm SA püskürtme işlemi uygulandığında, önemli ölçüde daha kısa bitkiler üretilirken, 100 ppm SA uygulaması kontrol ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek seviyede enginar (94 cm) üretmiştir. Bu arada yaprak sayısı, uygulanan tüm maddelerin düşük konsantrasyonlarından önemli ölçüde etkilenmiştir.

Klorofil ve karoten içerikleri üzerindeki üstün etki, 100 ppm konsantrasyonlarda SA uygulamalarında elde edilmiştir. Çalışmada 100 ppm SA için diğer konsantrasyonlar ve kontrol örneklerinden daha yüksek enginar verileri elde edilmiş olup, erken çiçek verimi, toplam çiçek verimi, çiçek sayısı için toplam verim ve çiçek sayısı için erken verim değerleri sırasıyla 1.534 kg, 6.323 kg, 17.2 kg ve 4.2 kg şeklinde belirtilmiştir. Erken çiçek verimi kontrolden önemli ölçüde farklı olmamakla birlikte SA 200 ppm hariç tüm yaprak uygulamalarına olumlu ve anlamlı yanıt vermiştir. Bu arada, toplam çiçek sayısı SA 200 ppm hariç uygulanan tüm işlemlere pozitif anlamlı yanıt vermiş ve her bir maddenin konsantrasyonu arttıkça meyve sayısı ve veriminde azalma eğilimi olmuştur. 100 ppm SA ilavesi, taze ağırlık 368.3 g, ürünün çapı (8.7 cm) ve kalınlığı (11.2 cm) açısından olumlu yanıt vermiştir.

El-Zohiri (2009), salisilik asit (SA) püskürtme yönteminin, enginar (*Cynara scolymus* L.) yaprakları üzerindeki etkisini araştırmak adına farklı konsantrasyonlarda 50 ve 100 ppm salisilik asit uygulamıştır. Bitki boyu, yaprak ve sürgün sayısı/bitki ile yaprak alanı (cm²) olarak ifade edilen vejetatif büyüme parametreleri üzerindeki etkisi ve kuru madde yüzdesi, kontrol uygulamasıyla karşılaştırıldığında salisilik asidin ve askorbik asidin pozitif etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu bağlamda, enginar bitkilerinin 100 ppm salisilik asit ile püskürtülmesi çalışmanın her iki mevsiminde en yüksek büyüme değerlerini yansıtmıştır. Özellikle 100 ppm'de salisilik asit uygulaması erken ve toplam verimde en yüksek artışları sağlamıştır. Yapraklarda püskürtme şeklinde kullanıldığında salisilik asidin en yüksek kullanılan konsantrasyona (100 ppm) kadar artması nedeniyle enginarın baş kısmında üretim proteini ve inülin yüzdesi önemli ölçüde artmıştır. Öte yandan, baş enginarındaki ham lif, test edilen diğer işlemlere kıyasla kontrol işleminde önemli ölçüde artarken, 100 ppm'de yaprağa salisilik asit spreyleme yapılması, çalışmanın her iki mevsiminde en düşük ham lif değerlerini ortaya çıkarmıştır. Salisilik asit (100 ppm) uygulanan örneklerde bitki yüksekliği, yaprak sayısı, sayısı, bitki yaprak alanı, yapraklardaki kuru madde değerleri en yüksek seviyede bulunmuş olup bu değerler sırasıyla %97 cm, 42.3, 3.33, 540 cm² ve %15.57 olarak belirlenmiştir. Ayrıca 100 ppm salisilik

asit püskürtme işleminde baş için çap ve uzunluk oranları maksimum değerler olup sırasıyla 10.1 cm ve 14.2 cm şeklindedir.

Salisilik asit gibi bileşiklerin kullanımı, tuzluluğu kontrol etmenin ve tuzluluğun bitkiye verdiği zararı azaltmanın yollarından biridir. Salisilik asit, bitkileri streslere karşı korumak için bitki tolerans sisteminde sinyal molekülü olarak rol oynayan bir fenolik bileşiktir. Yapılan bir çalışmada, tuzluluğun (0, 5, 50, 100 ve 200 mM) ve salisilik asidin (0, 100, 200 ve 300 μ M) enginar kallusunun morfolojik değişiklikleri ve fotosentetik pigment konsantrasyonu üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, tuzluluk ile salisilik asidin etkileşim etkisi kallusun büyüme özellikleri ve fotosentetik pigmentleri üzerinde önemli etkiye sahip bulunmuştur. Enginar kallusu, kallus taze ağırlığı, kuru ağırlık, klorofil ve karotenoid birikimi miktarındaki önemli artışın eşlik ettiği tuz stresine karşı nispi bir tolerans göstermiştir. Maksimum büyüme hızı ve ağırlık, 200 mM tuz ve 100 μ M salisilik asit içeren kültürde gözlenmiştir. Kallusun fotosentetik pigmentlerinin birikimi, hücre stres koşullarına uyum sağladığını gösteren salisilik asit varlığında yüksek tuzluluk konsantrasyonunda artmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, tuzluluk ve salisilik asidin büyüme özellikleri, fotosentetik bileşikler ve kallusun biyokimyasal bileşikleri üzerindeki olumlu etkisinden dolayı, bunların uygun konsantrasyonları (tuzluluk ve salisilik asit) kullanılarak kallus bileşiklerinde verim artırılmıştır (Zamani vd., 2018).

Rajabi vd. (2013), tuzluluk ve salisilik asit uygulamalarının *Cynara scolymus L.* tohum çimlenme özelliklerine etkisini saptamak için yaptıkları değerlendirmede analizler üç tekerrürlü olarak uygulanmıştır. Birinci faktör 4 seviyede (0, 0.5, 1 ve 1.5 mM) salisilik asit, ikinci faktör ise 4 seviyede (0, 50, 100 ve 150 mM) sodyum klorür (NaCl) çözeltisi şeklinde uygulanmıştır. Ekimden önce tohumlar salisilik asit solüsyonunda 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra tohumlar, 5 ml sodyum klorür çözeltisi içeren steril Petri kaplarına ekilmiştir. Enginar tohumu çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu, sürgün uzunluğu, kök ve sürgün kuru ağırlığı gibi çimlenme parametreleri değerlendirilmiştir. Sonuçlar, farklı uygulamalarda NaCl konsantrasyonunun artmasıyla tohum çimlenmesinin, kök ve sürgün uzunluklarının ve fidelerin yaş ve kuru ağırlıklarının azaldığını göstermiştir. Bu

nedenle, 150 mM NaCl konsantrasyonu, kontrol uygulamasına kıyasla çimlenme yüzdesini (%84.58) azaltmıştır. Ayrıca salisilik asit, fidelerde tuzluluk gerilimini ayarlayarak çimlenme yüzdesi ve biyokütle üzerinde olumlu etki yapmıştır. Salisilik asit ön işlemi kontrole göre kök ve sürgün uzunluklarını azaltırken kök ve sürgün kuru ağırlıklarını arttırmıştır.

Daghaghian vd. (2017), enginarın (*Cynara scolymus* L.) fizyolojisinin değiştirilerek tuzluluk stresinin hafifletilmesi ve salisilik asit (SA) kullanılması üzerine yaptıkları çalışmalarının amacı SA'nın enginar özelliklerini etkileyerek tuzluluğun olumsuz etkilerini hafifletip hafifletemeyeceğini belirlemek olmuştur. Tuzlu su (kontrol, 8 dS/m ve 14 dS/m) ve SA'nın yapraklara uygulanmasının (kontrol, 0.1, 1 mM) faktöriyel kombinasyonu test edilmiştir. Tuzluluk klorofil a ve toplam klorofil seviyelerini yükseltmiş; ancak orta düzeyde SA'da klorofil a oranı düşmüştür. Artan tuzluluk ve SA, toplam fenolik içeriğini azaltmıştır. Artan tuzluluk, bitki prolinini ve iyonik sızıntıyı artırmıştır. Ayrıca SA, kontrol ile karşılaştırıldığında iyonik sızıntıyı önemli ölçüde düşürmüştür. SA'nın, farklı tuzluluk seviyelerinde prolin üretimini artırdığı ortaya çıkmıştır. 0.1 mM'de SA, tuzluluk stresi altında en uygun ve etkili yöntem olarak değerlendirilmiştir. Uygun SA konsantrasyonu kullanılarak bitki fizyolojisini değiştirerek tuzluluğun enginar büyümesi üzerindeki stresini hafifletmek mümkün hale gelmiştir.

2.1.7. Melatoninin etkileri

Melatonin (MEL); bakteri, mantar, bitki, omurgasız ve omurgalı gibi organizmalarda ve canlı organizmalar tarafından sentezlenen oldukça koruyucu bir molekül olarak adlandırılmaktadır. Bitkilerde melatonin içeriği türlerin ve hatta çeşitlerin bir özelliği olarak açıklanmaktadır. Genetik gelişim sürecinde değişerek, farklı organlarda (tohumlar, yapraklar, kökler, çiçekler ve diğerleri gibi) çeşitlilik sağlamaktadır. Melatonin miktarı, çevre koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Melatoninin bitki stres savunmasında etkin özellikte olduğu tespit edilmekle birlikte melatonin bakımından zengin çeşitli bitki türlerinin stres toleransı için daha yüksek kapasite gösterdiği ortaya çıkmıştır. Melatonin ve antosiyaninlerin bitkilerde antioksidanlarla benzer rollere sahip olduğu

görüşü ifade edilmiştir. Bitkilerde MEL'in en belirgin rolleri sirkadiyen ritmi, büyüme ve gelişmeyi düzenlemek ve çok çeşitli çevresel stres faktörlerine toleransı arttırmaktır (Kaur vd., 2015).

Melatonin, hayvanlar ve insanlar için ucuz ve güvenli olarak nitelendirilmiştir. Melatoninin *Cynara scolymus* başta olmak üzere bitkilerde gerçekleştirdiği birçok işlev arasında, bir antioksidan ve büyüme destekleyicisi olarak rolü deneysel olarak desteklenmiştir (Ezzo vd., 2019).

El-Naby vd. (2019), ifade ettiği üzere; melatonin'in yapraktan uygulama işlemi gibi uygun çeşit ve yetiştirme yönetimi kullanılarak yüksek verimlilik elde edilebilmektedir. Bununla beraber; melatonin uygulaması iklim değişikliğinin bitki verimliliği üzerindeki olumsuz etkisini önlemektedir.

Endojen bir nörohormon olan melatoninin (N-asetil-5-metoksitriptamin), serotonin yoluyla triptofandan (TRP) indirekt olarak sentezlendiği bilinmektedir. Amfifilik doğası nedeniyle melatonin tüm hücrelere ve dokulara nüfuz ederek çoğu serbest radikalle reaksiyona girmektedir (Triantafillidis ve Triantafillidis, 2009). Melatonin oluşum hızı, arilalkilamin-N-asetiltransferaz (AANAT) ve daha az ölçüde triptofan hidroksilaz (TPH) enzimlerinin aktivitesine bağlıdır. Bazı gıda maddeleri, özellikle yenilebilir bitkiler, melatonin ve onun öncüsü TRP'yi de içermektedir. Bitkilerde melatonin içeriği bitki dokusunun gramı başına pikogramdan mikrograma kadar çok çeşitli konsantrasyonlarda mevcuttur (Peuhkuri vd., 2012). Melatonin, bitki türünün yapraklarında, köklerinde, sürgünlerinde, soğanlarında ve tanelerinde yer almaktadır (Sangsopha vd., 2020). Bitkilerde sentezden sonra melatonin, oksidatif hasara karşı hücre koruması için germ ve kepek tabakası dokularına taşınmaktadır. Bu durum; bitkinin hayatta kalmasını sağlayarak bitki neslinin korunmasına yardımcı olmaktadır (Arnao ve Hernández-Ruiz, 2013). Bitkilerdeki melatonin konsantrasyonunun; büyüme oranları, tür, işleme ve analiz teknikleri gibi çeşitli faktörlerin yanı sıra yüksek sıcaklık ve radyasyon gibi çevresel koşullara bağlı olduğu bilinmektedir (Arnao ve Hernández-Ruiz, 2013; Pothinuch ve Tongchitpakdee, 2011).

Melatonin salgılanması, karanlığın süresi ile güçlü bir şekilde bağlantılıdır. Melatonin sentezinin, bir öncü olarak triptofanın yanı sıra, önce serotonin ve ardından birkaç enzim bazlı reaksiyonun aşamalarını gerektirdiği ifade edilmektedir. Birkaç vitamin ve mineral bu aşamalarda yardımcı faktör ve aktivatör olarak görev üstlenmektedir (Peuhkuri vd., 2012). Moussaoui ve Bendriss (2014), daha düşük sıcaklıklarda saklanan solüsyonlarla karşılaştırıldığında, 50 °C'de saklanan melatonin solüsyonunun ısıya maruz kaldığında gözle görülür bozulmaya uğradığını bildirmiştir. Çalışmada melatoninin 6 gün boyunca stabil olduğu ve 32 °C, 4 °C, 25 °C ve 50 °C'de havasız açık ve karanlık koşullara maruz kaldığında 13. güne kadar önemli ölçüde azalmadığı belirtilmiştir. Diğer faktörlerle birlikte oksijene maruz kalmanın yüksek bozunma ile sonuçlandığını bildirmişlerdir.

Melatonin doğrudan bir antioksidan görevi görmekte; ayrıca, süperoksit dismutaz, katalaz, askorbat peroksidaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz dahil olmak üzere birçok antioksidan enzimin aktivitelerini de düzenlemektedir. Hücre kültürü ortamında melatoninin kantitatif tayini için veriler belirlenmiştir. Bu tahlilde geniş bir çalışma yapılmış ve melatonin konsantrasyon aralığının, yüksek hassasiyet ve doğrusallık ve düşük çapraz reaktivite içeren toplu numune ölçümleri için uygun olduğu öne sürülmüştür (Li ve Cassone, 2015). Melatonin uygulamasının antosiyanin üretimini etkilediği bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada farklı melatonin konsantrasyonları uygulanmıştır. Melatoninin tetiklediği antosiyanin biyosentezinin ışığından bağımsız olduğu gösterilmiş melatoninin crabapple bitkilerine uygulanmasının proantosiyaninlerin (PA) ve flavonollerin birikimini de arttırdığı gözlemlenmiştir (Chen vd., 2019).

Yapılan başka bir çalışmada fenolik bileşiklerin birikimindeki değişimleri ve biberiye (*Rosmarinus officinalis L.*) yaprak eksplantlarının aromatik içeriğini hücre kültürü ortamında incelemek için farklı melatonin konsantrasyonları (MEL) (0, 100 ve 200 µM) kullanılmıştır. Rosmarinik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, hesperidin ve kırk beş farklı aromatik bileşik gibi fenolik bileşikler, biberiye yaprağından tanımlanarak sırasıyla HPLC ve GC/MS ile tespit edilmiştir (Coşkun

vd., 2019). Son alışmalar melatoninin bitki fizyolojisinde önemli bir molekül olduğunu ileri sürmektedir.

Cynara scolymus L. vejetatif kısımlarının kullanılmasıyla ilgili yapılan çalışmada tohumla çoğaltılan iki enginar çeşidinde 50 ppm melatonin uygulanmıştır. Sonuçlar, enginar çeşidi olan Imperial Star'ın Romanesco çeşidine kıyasla daha yüksek vejetatif büyüme, verim üretkenliği ve kimyasal içerik değerleri ürettiğini göstermiştir. Melatonin kullanımının her iki enginar eşidinin (Imperial star ve Romanesco) retimi için uygun olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Elde edilen sonuçlar Imperial Star eşidi Romanesco eşidi ile karşılaştırıldığında bitki boyu, bitki başına yaprak sayısı, yaprak ağırlığı, yaprak taze ağırlığı ve yaprak kuru ağırlığının yanısıra, klorofil içeriği gibi tüm bitki büyüme karakterlerinin en yüksek değerleriyle sonuçlandığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde melatonin uygulamaları için tüm vejetatif büyüme karakterleri üzerinde olumlu etkiler izlenmiştir. Melatonin püskürtme işlemine tabi tutulan Imperial Star eşidi, ikinci büyüme mevsimi boyunca en yüksek yaprak taze ağırlığıyla birlikte; yaprak kuru ağırlığına sahip olmuştur. Bunun dışında; herhangi bir uygulamaya maruz kalmayan Romanesco eşidi için değerler her iki büyüme mevsimi boyunca tüm vejetatif büyüme oranlarının en düşük seviyeleriyle sonuçlanmıştır. Melatoninin, her iki yapraktan uygulama işlemleri kontrole kıyasla enginar bitkilerinin erkenci ve baş verimini iyileştirmiş hem erken verim hem de toplam enginar baş veriminin artmasına katkıda bulunmuştur. Bu kapsamda, melatonin uygulamaları kontrole kıyasla, iki büyüme mevsimi boyunca enginar başlarının ağırlık, uzunluk, çap ve yenilebilir kısmın ağırlığı açısından gelişme gösterdiğini doğrulamıştır. Melatonin ayrıca iki büyüme mevsimi boyunca ana ve ikincil enginar başlarının tüm fiziksel ölçümlerini arttırmıştır. Melatonin uygulması daha yüksek K ve Ca içeriğine neden olurken, ikinci sezonunda ise K, Fe, Mn ve Zn'nin daha yüksek içerikleri melatonin uygulması ile ilgili bulunmuştur. En önemlisi, melatonin etkinliğinin oksidatif stresi ortadan kaldırması ve ayrıca bitki stres reaksiyonunu indüklemesi ve farklı savunma stratejilerini (nleyici ve müdahaleci eylemleri) başlatması gibi pek çok olumlu etkisi de olduğu belirtilmiştir (Ezzo vd., 2019).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Enginar (*Cynara scolymus*) çiçeklerinin yapraklarından geliştirilerek, sekonder metabolit üretimini etkileyen melatonin ve salisilik asit bileşenlerine tabi tutularak hücre süspansiyonları oluşturulmuş ve süt pıhtılaştırma özelliği ve proteolitik aktivitesi belirlenmiştir. Melatonin (5 μ M ve 10 μ M) ve salisilik asit (50 μ M ve 100 μ M) uygulaması iki farklı yoğunlukta uygulanmıştır. Uyarıcı kültür ortamında üretilen aspartik proteaz aktivitesi, kontrol grubuna (uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen süspansiyon kültürler), doğal pistil ekstraktlarına ve rennete karşı değerlendirilmiştir. Toplam 5 süspansiyon kültür örneği ve 1 doğal pistil ekstraktı üzerinden çalışmanın gerçekleştirilmesi sağlanmıştır. Kullanılan oranlar bu kapsamdaki literatür dikkate alınarak ön denemeler ışığında belirlenmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Enginar

Olgunluk safhasına yaklaşmış enginar tomurcukları, doku kültürü çalışmalarının başlatılması amacıyla Batı Akdeniz Araştırma Enstitüsü-Antalya'dan alınarak Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü laboratuvarına buz aküleriyle soğutulmuş büyük hacimli termoslar içerisinde tutularak (buzla temasları kesilip) en kısa sürede taşınmıştır. Tomurcukların bir kısmından dişi organ dokuları ayrılarak sıvı azot içerisinde dondurma işlemine tabi tutulmuş ve derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Tomurcukların kalan kısmı +4 °C'da tutularak takip eden 24 saat içinde dişi organ dokularından doğrudan süspansiyon kültür oluşturulması için kallus kültürüne transfer edilmiştir.

3.1.2. Çiğ süt

Çalışmada peynir üretiminde kullanılan keçi ve koyun sütleri Isparta Çünür bölgesi içerisindeki yerel keçi ve koyun yetiştiricilerinden temin edilmiştir.

3.1.3. Mezofilik starter kültür

Peynir üretimlerinde Chr Hansen A/S (Danimarka) firması tarafından üretilen FD-DVS R-707 mezofilik starter kültür (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) kullanılmıştır.

Liyofilize mezofilik starter kültürlerden işletme kültürü elde edilmesinde süt tozu (Pınar Süt A.Ş.) ile hazırlanan %12 yağsız kurumaddeli süttten yararlanılmıştır. Otoklavlanabilir şişeler içinde hazırlanan rekonstitüe sütler, 110 °C'de 15 dk sterilize edilmiştir. Sterilize sütler starter kültür gelişimi için 30 °C'ye soğutulmuştur. Mezofilik starter kültürler sütte $>10^7$ kob/mL olacak şekilde aktifleştirilmiştir. Kültür pH'sı yaklaşık 4.5-4.6'ya düşünceye kadar bekletilmiştir. Daha sonra soğuk ortamda $+4\pm1$ °C'de muhafaza edilmiştir (Yerlikaya, 2012).

3.1.4. Kalsiyum klorür (CaCl_2) ve tuz (NaCl)

Kalsiyum klorürden (Tekkim, Türkiye) %40'lık çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiden %0.1 oranında peynir sütüne ilave edilmiştir. Peynirlerin tuzlanmasında Tuz Tebliği'ne uygun Bisalt markalı iyotsuz Çankırı kaya tuzu (Kartuz Gıda Sanayi ve Tic. Ltd. Şti., Yenimahalle/Ankara) kullanılmıştır.

3.2. Metot

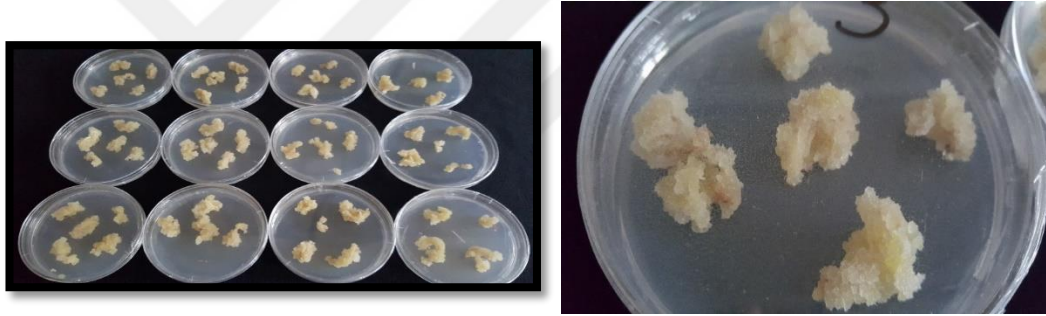
3.2.1. Doku kültürünün hazırlanması

Dokular kültüre hazırlanırken, tomurcuklardan izole edilen pistiller öncelikle %70 oranda etil alkol içeren çözeltiyle anlık olarak çalkalanmış, bunu takiben %5'lik sodyum hipoklorit çözeltisiyle 10 dakika yıkanmış ve steril distile suyla 3 kez durulanmışlardır. Steril filtre kağıtları üzerinde kurutulan pistiller, sterilizasyon sırasında zarar gören bölgelerinden ayrılarak kültür ortamlarına yerleştirilmiştir (Özsan, 2019).

3.2.2. Kallus kültürü geliştirme çalışmaları

Doku kültürü çalışmalarında MS (Murashige ve Skoog) besin ortamı (pH 5.7), Gamborg vitaminleri ile birlikte kullanılmış, hazırlanan besin ortamı karbon kaynağı olarak %3 oranda sukroz içermiş, katılaştırıcı olarak ise %0.8 oranda agar kullanılmıştır. Besin ortamlarına bitki büyüme düzenleyicilerinden tidiazuron ve zeatin sırasıyla 0.5 mg/L ve 0.1 mg/L yoğunlukta olacak şekilde eklenmiştir (Akçay, 2012; Özsan, 2019).

Toplam 200 adet besin ortamı içeren petri kabına yerleştirilen ve 10 farklı enginar tomurcuğundan izole edilen pistil dokularından, bitki büyütme kabini içinde 27 °C'de ve karanlıkta kallus kültürleri geliştirilmiştir. Katı ortamda geliştirilen kallus kültürü örneklerinin görüntüleri Şekil 3.1'de sunulmuştur. Bu işlemi takiben; süspansiyon kültür elde etme çalışmalarına başlanmıştır.

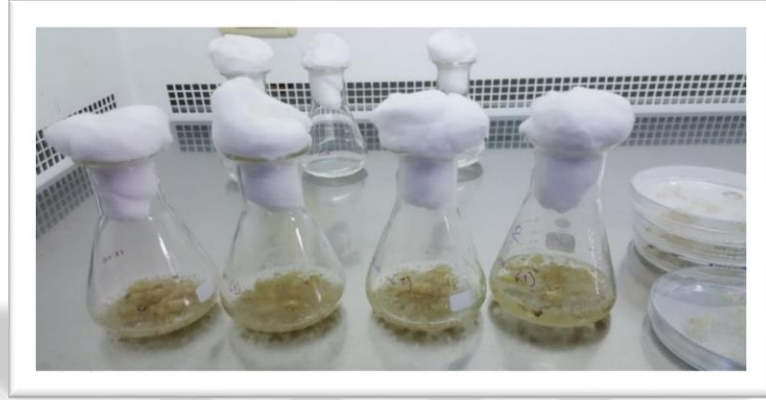


Şekil 3.1. *Cynara scolymus*'e ait eksplantların katı ortamda kallus elde edilmesi amacıyla kültüre alınmasını takiben gösterdikleri gelişmeler kallus örneği görüntüleri

3.2.3. Süspansiyon hücre kültürü geliştirme çalışmaları

Katı ortamda geliştirilen kültürlerden 1 g (0.25 g kuru ağırlık) ağırlığındaki kallusların steril kabin içinde tartılarak Gamborg vitaminleri, 0.5 mg/L tidiazuron ve 0.1 mg/L zeatin içeren 10 ml sıvı MS besin ortamına aşılmasıyla süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasına başlanmıştır. Daha sonra 27 °C'de karanlıkta, 100 rpm devirle çalkalanarak geliştirilen süspansiyon kültürlerin, on beş günlük adaptasyon ve bölünme sürecinin ardından 2 ml sıvı kültürün melatonin ve salisilik asit bulunan 10 ml sıvı kültür ortamlarına aktarılmasıyla elisitör (özel sekonder metabolitler olan fitoaleksinlerin savunma mekanizması olup, kimyasalların üretilmesinde önemlidir) uygulamaları başlatılmıştır.

Analizler için yeterli miktarda süspansiyon hücre kültürü toplanana kadar katı ortamdan sıvıya aktarım ve elisitör içeren sıvı ortamlarda alt kültür alınması sürdürülmüştür. Şekil 3.2’de katı ortamdan geliştirilen süspansiyon kültür örnekleri gösterilmektedir.



Şekil 3.2. Süspansiyon hücre kültürü örnekleri

3.2.4. Kaba ekstraktların hazırlanması

Melatonin (5 μ M ve 10 μ M) ve Salisilik asit (50 μ M ve 100 μ M) içeren besiyerlerinde geliştirilmiş süspansiyon hücre kültürleriyle birlikte; kontrol grubu (uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen süspansiyon kültürler) ve enginar pistil hücre kültürlerini içeren örnekler hazırlanmıştır.

Karşılaştırma amacıyla kullanılmak üzere enginar çiçeklerinden de ayrıca kaba ekstraktlar hazırlanmıştır. Bitkisel pıhtılaştırıcı ekstraktının hazırlanması için bir mahsul alanından hasat edilen enginar çiçekleri (*Cynara scolymus L.*) kullanılmıştır. Öğütülmüş kallus enginar çiçeği (25 g), 50 mL 50 mM sodyum sitrat içerisinde ekstrakte edilmiştir. Daha sonra sıvı azot içerisinde tutularak dondurulma işlemi uygulanmıştır. Elde edilen ekstrakt öğütme işlemi için mikserden geçirilmiştir ve santrifüjleme işlemine tabi tutularak çöktürülme işlemi gerçekleştirilmiştir. Süpernatant Whatman no 1 filtre kağıdından süzölmüştür ve kullanıma kadar -18 °C’de saklanmıştır (Llorente vd., 2004).

Chr Hansen A/S (Danimarka) tarafından üretilen ticari buzağı renneti (Naturen® Mandra 175) de çalışmalara dahil edilmiştir.

3.3. Enzimlere Uygulanan Analizler

3.3.1. Hücre büyüme kinetiğinin belirlenmesi

Hücre büyüme hızı, kültür gelişiminin 5, 10 ve 15. günlerinde hücrelerin distile suyla yıkanmasının ardından; 40 °C'de 5 gün süreyle kurutulması ve kuru ağırlıklarının ölçülmesiyle saptanmıştır (Akçay vd., 2012).

3.3.2. Süt pıhtılaşma aktivitesi testi

Berridge (1952), tarafından belirtilen metot, Collin (1977), tarafından modifiye edildiği şekliyle uygulanmıştır. Yağsız süt tozu, kurumaddesi %10 (ağırlık/hacim) olacak şekilde %0.01 CaCl₂ içeren su içerisinde çözündürülmüştür. Elde edilen bu sütün (pH 6.4) 15ml alınarak sıcaklığı 35°C olan su banyosu içerisinde 2.5ml ekstrakt eklenmesinin ardından, kısa aralıklarla karıştırılarak pıhtılaşma süresi 3.1'deki formülle belirlenmiştir.

$$RU = 10 \times V / T \times Q \quad (3.1)$$

RU: Rennet Birimi (Rennet Unite)

V: Süt miktarı (ml)

T: Pıhtılaşma zamanı (saniye)

Q: Enzim miktarı (ml)

3.3.3. Toplam protein ve proteolitik aktivite analizi

Eksraktlar içindeki toplam protein miktarı Bradford (1976), analizi ile bovine serum albümini (Sigma) kullanılarak saptanmıştır. Coomassie Brilliant Blue G-250 (100 mg), 50 ml %95 etanol içerisinde çözündürülmüştür. Bu çözeltiye 100 ml %85 (ağırlık/hacim) fosforik asit ilave edilerek, nihai çözelti, 1 litrelik nihai hacme kadar seyreltilmiştir. Reaktifteki son konsantrasyonlar %0.01 (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, %4.7 (w/v) etanol ve %8.5 (w/v) fosforik asit olmuştur. Protein tahlili (standart yöntem)için 0.1 ml'ye kadar bir hacimde 10 ila 100 µg protein içeren protein çözeltisi, 12 x 100 mm'lik test tüplerine pipetlenmiştir. Test tüpünün hacmi uygun buffer ile 0,1 ml'ye ayarlanmıştır. Test

tüpüne beş mililitre protein reaktifi ilave edilmiş ve vorteksleme yoluyla karıştırılmıştır. Spektrofotometrede (UV-Visible -Schimadzu, UV-1601, Japonya) 595 nm'deki absorbans, 0.1 ml buffer ve 5 ml protein reaktifinden hazırlanan kimyasal körüne (Reagent Blank) karşı 3 ml'lik küvetlerde 2 dakika sonra ve 1 saat önce ölçülmüştür. Absorbansa karşılık gelen proteinin ağırlığı grafiğe geçirilmiş, sonuçta bilinmeyen örneklerde proteini belirlemek için kullanılan standart bir eğri elde edilmiştir.

3.4. Keçi ve Koyun Peyniri Üretimi

Peynirlerin üretimleri Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği bölüm laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Enginar genotipinden elde edilen doku kültürüyle kallus yapıları oluşturulup kallus yapılarından 0.1 g tartılarak Gamborg vitaminleri, 0.5 mg/L tidiazuron ve 0.1 mg/L zeatin içeren 10 ml sıvı MS besin ortamına aşılama ile süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasına başlanmıştır. Daha sonra 27 °C'de karanlıkta, 100 rpm devirle çalkalanarak geliştirilen süspansiyon kültürlerin, on beş günlük adaptasyon ve bölünme sürecinin ardından 2 ml sıvı kültürün melatonin ve salisilik asit bulunan 10 ml sıvı kültür ortamlarına aktarılmasıyla elisitör işlemi gerçekleştirilmiştir. Karşılaştırma amacıyla kullanılmak üzere enginar çiçeklerinden de ayrıca kaba ekstraktlar hazırlanmıştır. Bitkisel pıhtılaştırıcı ekstraktının hazırlanması için bir mahsul alanından hasat edilen enginar çiçekleri (*Cynara scolymus L.*) kullanılmıştır. Öğütülmüş kallus enginar çiçeği (25 g), 50 mL 50 mM sodyum sitrat içerisinde ekstrakte edilmiştir. Daha sonra elde edilen bu enzimlerden peynir üretimleri gerçekleştirilmiştir.

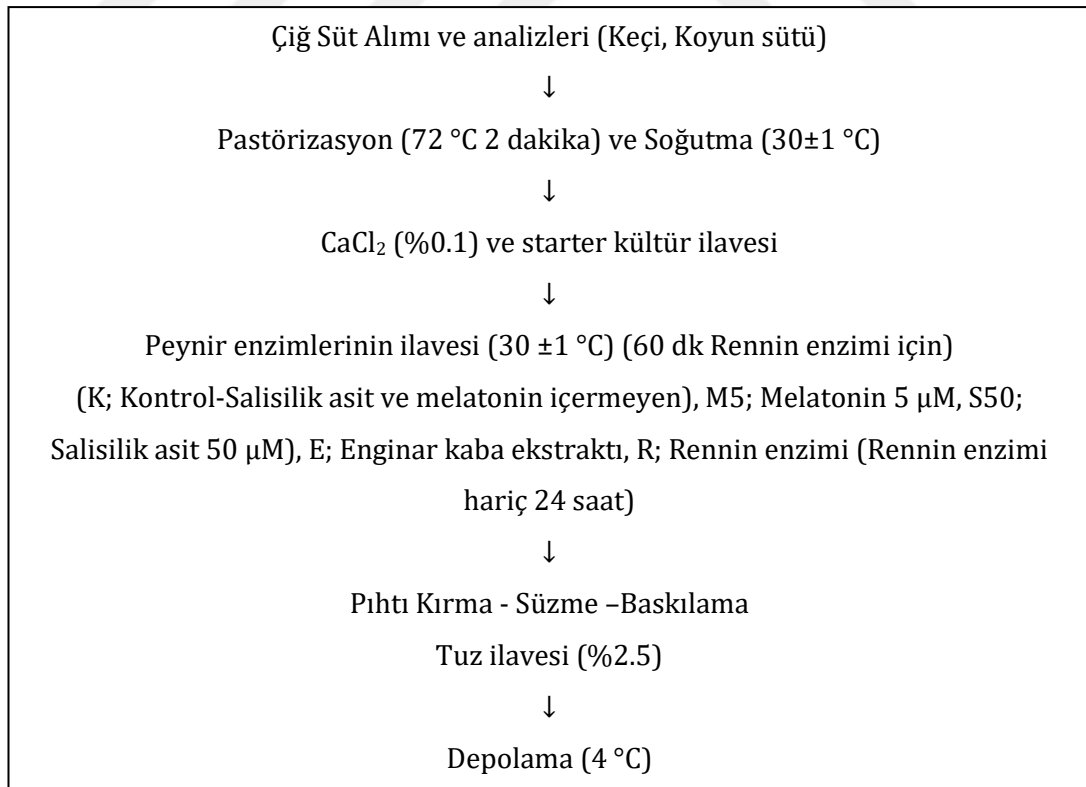
Keçi ve koyun sütleri 72 °C'de 2 dakika pastörize edilmiştir. İlk olarak, 30±1 °C'deki pastörize edilmiş keçi sütüne %0.1 CaCl₂ çözeltisinden ve %2 starter kültür (Mezofilik Homofermantatif Kültür) eklenmiştir. Daha sonra bu karışımdan 600 ml'lik 5 adet kap içerisine ayrılmıştır. İlk kap içine rennin (R) enziminden 30±1 °C'de 60 dakikada pıhtılaşma olacak şekilde rennin enzimi ilave edilmiştir. Kalan diğer örneklere sırasıyla (10 ml) kontrol (K), enginar (E),

Melatonin(M5) 5 µM, Salisilik asit (S50) 50 µM enzim örneklerinden eklenerek karıştırılmıştır. Örneklerin pıhtı oluşumu işlemi 30±1 °C'de gerçekleştirilmiştir.

Pıhtı oluşumunu takiben, 1 cm³ küpler halinde pıhtı kesimi gerçekleştirilmiştir. 5–10 dk kendi haline bırakılan pıhtıda peynir suyunun bir kısmının yüzeye çıkması sağlanmıştır. Oluşan pıhtı, içlerinde cendere bezi bulunan kalıplara aktararak 30 dk kadar kendi haline bırakılmıştır.

Enzim ilavesi sonrası (rennin enzimi ile olan örnek hariç) pıhtı kesim ve süzülme işlemleri ile peynir üretimi yaklaşık 24 saatte tamamlanmıştır. Daha sonra buzdolabı sıcaklığında 4 °C'de tüm örnekler muhafaza edilmiştir. Peynir örneklerine %2.5 oranında tuz ilavesi (kuru tuzlama) yapılmıştır.

Elde edilen peynirlerin 1. günde analizleri gerçekleştirilmiştir. Peynir üretimleri üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Rennin enzimi ile üretilen peynirler ve diğer peynirler birbirleri ile özellikleri istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.3. Enzimlerle üretilen keçi ve koyun peyniri üretimi akış diyagramı

3.4.1. Çiğ süt örneklerine uygulanan kimyasal analizler

3.4.1.1. Özgöl ağırlık değeri

Çiğ süt örneklerinin özgöl ağırlıkları laktodansimetre kullanılarak ölçülmüştür. Sütün sıcaklığı 15 °C' ye getirilerek laktodansimetre ile okuma yapılmıştır. Okunan değerin başına 1.0 eklenerek özgöl ağırlık sonucu belirlenmiştir (TSE, 1981).

3.4.1.2. pH değeri

Çiğ süt pH değeri, WTW pH 315(Weilheim, Almanya) pH metre yardımıyla tespit edilmiştir.

3.4.1.3. Titrasyon asitliği değeri

Çiğ süt örneklerinin titrasyon asitliği tayini için, 25 mL çiğ süt örneği alınarak üzerine 2-3 damla %1' lik fenolftalein indikatörü damlatılarak; 0.25 N NaOH ile açık pembe renk elde edilinceye kadar titrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Öner ve Alaoğlu, 2018).

3.4.1.4. Kurumadde değeri

Çiğ süt örneklerinde kurumadde değeri, gravimetrik yöntem kullanılarak tespit edilmiştir. Yaklaşık 3-5 g örneğin 105±1 °C' de sabit tartıma gelinceye kadar kurutulması işlemi gerçekleştirilmiştir. Örneklerde son tartım alınarak % kuru madde miktarı belirlenmiştir (TSE, 1981; AOAC, 1997).

3.4.1.5. Yağ ve kurumaddede yağ değeri

Çiğ süt örneklerinde yağ değeri Gerber metodu kullanılarak ölçülmüştür. Süt bütirometrelerine 10 ml sülfirik asit, 11 ml süt ve 1 ml amil alkol ilave edilmiştir. Bütirometreler tıpası kapatıldıktan sonra yavaşça ters düz edilmiştir. Ardından bütirometreler, Gerber santrifüjünde 5 dakika santrifüj işlemine tabi

tutulmuştur. Sonuçlar % olarak verilmiştir (TSE, 1981; AOAC, 1997). Kurumaddede yağ, 3.2’de verilen formülden yararlanılarak belirlenmiştir.

$$\% \text{ Kurumaddede yağ} = \% \text{ yağ} \times 100 / \% \text{ kuru madde} \quad (3.2)$$

3.4.1.6. Kül değeri

Çiğ süt örneklerinde kül değeri, kül fırınında yakma işlemiyle beraber gravimetrik yöntemle tespit edilmiştir. Kroze kaplarına alınan 10 g numunenin etüvde yaklaşık 1-2 saat kurutulmasının ardından kül fırınında 550 °C’de yakılması sağlanmıştır. Geri kalan kül miktarından % kül oranı hesaplanmıştır (AOAC, 1997).

3.4.1.7. Toplam azot değeri

Süt örneklerinde toplam azot miktarı, mikro Kjeldahl yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır (AOAC, 1997).

3.5. Keçi ve Koyun Peyniri Analizleri

3.5.1. pH tayini

Peynirlerin pH değeri, WTW pH 315 (Weilheim, Almanya) dijital pH metre yardımıyla tespit edilmiştir.

3.5.2. Titrasyon asitliği tayini

Keçi ve koyun peyniri örneklerinden bir havanın içerisine 2.5 g tartılarak üzerine 3-4 damla saf su ilave edilerek ezilmiştir. Üzerine 2-3 damla %1’lik fenolftalein indikatörü damlatılarak °SH büretinde 0.25 N NaOH ile açık pembe renk elde edinceye kadar titre edilmiştir. Harcanan NaOH miktarından °SH değerleri tespiti sağlanmıştır. Peynirlerin titrasyon asitliği AOAC (1997)’e göre tespit edilmiştir. Sonuçlar daha sonra % laktik asit olarak hesaplanmıştır.

3.5.3. Kurumadde oranı

Yaklaşık 3 gr peynir numunesi paslanmaz çelik kroze tartıldıktan sonra, 105 ± 1 °C etüvde sabit tartıma gelinceye kadar kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. İki tartım arasındaki fark 0.5 mg değerinden düşük olana kadar ölçüm işlemi devam etmiştir. Kuru madde oranı gravimetrik metotta belirtilen formülle hesaplanmıştır (AOAC, 1997).

3.5.4. Yağ oranı

Örneklerin yağ oranları, 0-40 taksimatlı gerber peynir bütirometreleri kullanılarak Gerber metoduna göre tespit edilmiştir (Marshall, 1992).

3.5.5. Tuz oranı

Peynir örneklerinin tuz oranları Mohr titrasyon yöntemine göre, hazırlanan örneğin ayarlı 0.1 N AgNO_3 ile titrasyon sonucu ile belirlenmiştir (AOAC, 1997). Sonuçlar % olarak ifade edilmiştir.

3.5.6. Su aktivitesi

Su aktivitesi ölçümü için su aktivitesi ölçer (Novasina Lab–Swift Aw, Lachen-İsviçre) kullanılmış olup çiğlenme noktası higrometresi ile ölçümler alınmıştır.

3.5.7. Toplam azot analizi

Toplam azot oranları yaş yakma işlemi uygulanan numunelerde mikro-Kjeldahl metodu ile gerçekleştirilmiştir.

Peynir örneği 10 gr alınarak 40 ml 0.5 M trisodyum sitrat çözeltisinde çözündürülüp 200 ml'ye hacmi tamamlanmıştır. Elde edilen 200 ml çözeltiden 150 ml'si suda çözünen azot için ayrıldıktan sonra geri kalan çözeltiden 2 ml alınarak mikro-Kejeldhal yöntemi ile toplam azot oranı hesaplanmıştır (Gripon vd., 1975).

3.5.8. Suda çözünen azot analizi

Suda çözünen azotlu madde oranını belirlemek için Gripon vd. (1975)'de belirtilen metoda göre suda çözünen azotlu maddelerin ayrılması sağlanmıştır. 0.5 M trisodyum sitrat çözeltisinde eritilen peynir örneğinin pH'ı 1 N HCl ile 4.4'e düşürülmüş, kazein pıhtılaştıktan sonra süzölmüş (Whatman No. 42) elde edilen süzöntüden Mikro Kjeldhal düzeni ile suda çözünen azot bulunmuştur. Örneklerin suda çözünen azot miktarları 3.3'teki formöl ile hesaplanmıştır.

$$\text{Suda çözünen azot (\%,w/w)} = [1.4 \times (V1-V0) \times N \times F] / m \quad (3.3)$$

V1: Örnek için harcanan HCl, ml

V2: Kör denemede harcanan HCl, ml

N: HCl'nin standart volumetrik çözeltisinin normalitesi

F: HCl çözeltisinin faktörü

m: Örnek miktarı, g

3.5.9. Olgunlaşma oranı

Suda çözünen azot değeriinin toplam azota oranı olarak ifade edilebilen olgunlaşma derecesi 3.4'teki formöl yardımı ile belirlenmiştir (Uraz ve Şimşek, 1998).

$$\text{Olgunlaşma Oranı} = \% \text{SudaÇözünenAzot} \times 100 / \% \text{ToplamAzot} \quad (3.4)$$

3.5.10. Tekstür analizi

Peynir örneklerinin dokusal özellikleri TA-XT Plus Texture Analyser doku ölçüm cihazı (TA-XT Plus, İngiltere) kullanılarak Ahmed vd. (2005)'da verilen metoda göre tespit edilmiştir. Analiz edilecek örnekler için baskıda P36 kodlu 3 cm çapında alüminyum silindirik başlık kullanılmıştır. Sıkıştırma hızı 1 mm/sn toplam işlem süresi 10 sn olarak ayarlanarak sıkıştırma işlemi örneklerin orijinal boyutunun %25'i sıkıştırılacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Doku profil analiz

teknikğine göre, iki ardışık sıkıştırma uygulanan örneklerin doku profil parametreleri belirlenmiştir.

Bu parametreler:

Sertlik (Hardness): İlk sıkıştırmada uygulanan maksimum kuvvet olarak tanımlanmaktadır. Kg, g ve N olarak ifade edilebilmektedir.

Dış yapışkanlık (Adhesiveness): Gıda ve diğer yüzey arasındaki çekim kuvvetinin üstesinden gelmek için gereksinim duyulan iş olarak tanımlanmaktadır. Bu değer birinci sıkıştırma sırasındaki negatif kuvvet alanıdır (A3). Bu değer g.sn ve cm² cinsinden ifade edilmektedir.

Esneklik (springiness): Dilden damak ya da dişler arasında kısmi sıkıştırma yapıldıktan sonra ürünün orijinal boyutuna / şekline dönme derecesidir. Bu değer, birinci sıkıştırma sonundaki yükseklik ile ikinci sıkıştırmaya başlama yüksekliği arasındaki mesafedir (X2- X1).

İç yapışkanlık (Cohesiveness): Gıda maddesinin ağızda parçalanmasından önceki deforme olma derecesi olarak tanımlanmaktadır. Bu değer ikinci sıkıştırmadaki pozitif alanın birinci sıkıştırmadaki pozitif alana oranı olup cm² cinsinden ifade edilmektedir (A2/A1).

Sakızımsılık (Gumminess): Yarı katı bir gıdayı yutulmaya hazır hale getirmek için gerekli parçalama kuvveti olarak tanımlanmaktadır. Sertlik ve iç yapışkanlık değerlerinin çarpımıdır. Kg ve N cinsinden ifade edilmektedir.

Çiğnenebilirlik (Chewiness): Katı bir gıdanın yutulmaya hazır hale getirmek için gerekli çiğneme kuvveti olarak tanımlanmaktadır. Sakızımsılık ve elastikiyet değerlerinin çarpımıdır. Kg cinsinden ifade edilmektedir.

Elastikiyet (Resilience): Numunenin hem hız hem de farklı kuvvetlerde deformasyondan nasıl kurtulduğunun bir ölçümüdür. İlk baskının maksimumdan

dönme noktasındaki alanının, probun geri dönmeye başladığı ve ilk kuvvet noktasına ulaştığındaki alanın birbirine oranıdır.

Örneklere (TPA) García vd. (2014b), prosedürü uygulanarak; doku profili analizi gerçekleştirilmiştir. Testten üç saat önce, numuneler üç paralel olacak şekilde hazırlanmış ve 20 ± 0.5 °C'de dengelenmiştir. Farklı doku değişkenleri ölçülmüştür.

3.5.11. Renk analizi

Kalibrasyon Şartları: Cihaz beyaz monitörlü alanda yüzeye okutulmaktadır. Ekranda görülen C bölümünde x için 0.3135, y için 0.3193 ve Y için 92.7 değerlerine ulaşıldığında ve des bölümünde x için 0.3321, y için 0.3160 ve Y için 92.7 değerleri gözlemlendiğinde kalibrasyon sağlanmıştır.

Renk tayin cihazı Minolta Chroma Meter (CR-400, Konica-Minolta Corporation, Japan) ile L^* , a^* , b^* değerlerinin saptanması şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.5.12. Üre-poliakrilamid jel elektroforez (Urea-PAGE) ile kazein fraksiyonlarının belirlenmesi

Biyokimyasal analizler, kazein fraksiyonları ile α_1 -kazein ve β -kazeinin hidroliz durumunu saptamak amacıyla Urea-PAGE ile yapılmıştır. Hayaloğlu (2021)'de belirtilen yöntemle göre olgunlaşmanın 1., 30., günlerinde Urea-PAGE kullanılarak kazein fraksiyonları tespit edilmiştir. Bu amaçla, keçi ve koyun peyniri örnekleri aşağıda açıklandığı şekilde analizlere hazırlanmıştır ve analizleri yapılmıştır.

a) Stok çözeltilerin hazırlanması

Akrilamid çözeltisi (%40, w/v): Akrilamid çözeltisi için 40 g akrilamid (Merck, Almanya), 40-50 mL saf su içinde çözündürülmüş ve 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. Daha sonra Whatman No. 1'den filtre edilmiş ve hazırlanan solüsyon karanlıkta ve $+4 \pm 1$ °C'de muhafaza edilmiştir.

Amonyum persülfat (%10, w/v): Amonyum persülfattan (APS, Merck, Almanya) 10 g tartılarak saf suda çözündürülmüş ve 100 mL'ye tamamlanmıştır. Analizin yapılacağı sırada taze olarak hazırlanmıştır.

Örnek hazırlama tamponu (pH 7.6, Çift etkili 2x): Tampon için 1.5 g Tris (Trizma base, Tris (hidroksimetil) amino-metan), 49 g üre (Sigma-Aldrich, Almanya), 0.4 mL konsantre HCl (%37) 30-40 mL saf suda çözündürülmüş ve 2 N HCl kullanılarak pH'ı 7.6'ya ayarlanmıştır. Bu çözeltiye 2 mL 2-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, Almanya), 0.15 g bromfenol mavisi (Merck, Almanya) eklenmiştir ve 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.

Sıralama jeli (stacking) tamponu (pH 7.6): Tris (Merck, Almanya)'den 4.15 g tartılarak, 150 g üre ve 2.2 mL konsantre HCl (%37) yaklaşık 250-300 mL saf suda çözündürülmüş ve 500 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. Çözeltinin pH'ı 2 N HCl ile 7.6'ya ayarlanmıştır.

Ayırma jeli (seperating) tamponu (pH 8.9): Ayırma jeli tamponu 32.15 g Tris, 192.85 g üre, 2.86 mL konsantre HCl (%37) 250-300 mL saf su içinde çözündürülmüş ve 500 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. HCl (2 N) kullanılarak pH'ı 8.9'a ayarlanmıştır.

Elektrot tamponu: Elektrot tamponu için 15 g Tris, 73 g glisin, saf su içinde çözündürülmüş ve saf su ile 5 L'ye tamamlanmıştır. Analizin yapılacağı sırada taze olarak hazırlanmıştır.

Boyama çözeltisi: Coomassie Brilliant Blue G250 (Merck, Almanya), %0.2 (w/v) konsantrasyonda hazırlanmıştır. Daha sonra eşit hacimde 1 M H₂SO₄ ilave edilmiştir. Bu karışım manyetik karıştırıcı (Wisd WiseStir MSH-20A) ile bir gece sürekli karıştırılarak bekletilmiştir. Ardından Whatman No. 113 kullanılarak filtre edilmiş ve stok çözelti elde edilmiştir. Hazırlanan stok çözeltiden 300 mL alınmıştır, 35 mL 10 N KOH ve 50 mL %12'lik trikloroasetik asit (TCA, w/v) çözeltileri ilave edilmiştir. Karışım iyice karıştırıldıktan sonra Whatman No. 113

filtre kağıdından süzölmüştür. Hazırlanan boya çözeltisi oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Boya giderme çözeltisi: Boya giderme çözeltisi, %50 metanol ve %10 asetik asitin son hacim 500 mL olacak şekilde karıştırılması ile hazırlanmıştır.

b) Örneğin hazırlanması

Peynir örneğinden 0.4-0.5 g alınarak, 10 mL örnek tamponu içinde 10 000 dev/dk'da 4 °C'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Çözeltinin orta kısmından 8 µl alınarak kullanılmıştır.

Standart olarak Na-kazeinat (Casein sodium salt from bovine milk, CAS: 9005-46-3, Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılmıştır. Standarttan 0.3 g alınıp 10 mL örnek tamponu içinde 10 000 dev/dk'da 4 °C'de 10 dk santrifüj edilerek çözöndüröldükten sonra orta kısmından 4 µl alınarak kullanılmıştır.

c) Jel çözeltilerinin hazırlanması

Sıralama jeli çözeltisi: Sıralama jeli çözeltisi öncelikle 5 mL akrilamid çözeltisi, 45 mL sıralama jeli tamponu ve 0.1 g N,N,N',N'-metilenbisakrilamid (Merck, Almanya)'in temiz bir beher içinde tamamen çözöünönceye kadar karıştırılması ile hazırlanmıştır. Daha sonra (Jelin elektroforez ünitesinde cam plakalar arasına dökölmesinden hemen önce) karışım 25µl TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilediamin, Merck, Almanya) ve 300 µl APS ilave edilmiştir.

Ayrırma jeli çözeltisi: Ayrırma jeli çözeltisi ilk olarak 22.5 mL akrilamid çözeltisi, 52.5 mL ayırma jeli tamponu ve 0.375 g N,N,N',N'-metilenbisakrilamid'in temiz bir beher içinde tamamen çözöünönceye kadar karıştırılması ile hazırlanmıştır. En son aşamada (jelin elektroforez ünitesinde cam plakalar arasına dökölmesinden hemen önce) karışım 37.5 µl TEMED ve 290 µl APS eklenmiştir.

d) Elektroforezin uygulanması

Çift jel dikey elektroforez sistemi (Thermo Scientific™ OWL™ P8DS-2), üretici firmanın önerdiği şekilde hazırlanmıştır ve jel tarakları yerleştirilmiştir. Hazırlanan ayırma jeli çözeltisine TEMED ve APS eklendiğinde polimerleşme başladığı için solüsyon hızlı bir şekilde ve hava kabarcığı oluşturmada iki cam arasına dökülmüştür (ayırma jeli seviyesi, jel taraklarının uç kısmından yaklaşık 1 cm aşağıda olacak şekilde ayarlanmıştır). Jel tamamen polimerize oluncaya kadar 30 dk beklenilmiştir. Aynı şekilde sıralama jeli çözeltisine TEMED ve APS ilave edildikten hemen sonra tarakların uç kısımlarında hava kabarcığı oluşturmada iki cam arasına dökülmüştür ve tarakların ara kısımlarının dolması sağlanmıştır. Jelin tamamen polimerleşmesi için 30 dk beklenilmiştir ve polimerleşme sonrasında taraklar dikkatlice çıkarılmıştır.

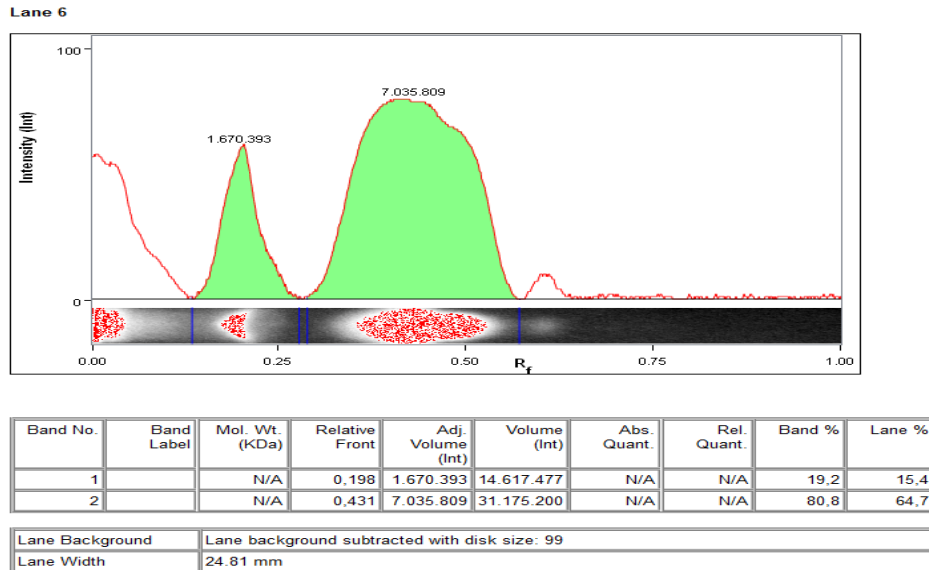
Hazırlanan jeller, jel ünitesine yerleştirilmiştir ve jellerin üzerini geçecek şekilde elektrot tamponu eklenmiştir. Daha sonra peynir örneklerinden 10 µl (7-15 µl) ve Na-kazeinat standardından 7 µl alınıp jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Örnekler jele yüklendikten sonra jeller, jel ünitesine bağlanmıştır. Ünite belirtilen seviyede elektrot tamponu eklenmiştir. Örnekler, sıralama jeli boyunca 30 dk 280 V sabit voltaj ve 50 mA sabit akımda yürütülmüştür. Daha sonra ayırma jeli boyunca 300 V sabit voltaj ve 60 mA sabit akım uygulanmıştır. Elektroforez içerisinde yürütülen örnekler, boya izinin jel ünitesinin dip kısmına gelinceye kadar sürdürülmüştür.

e) Jelin boyanması

Ayırım tamamlandıktan sonra elde edilen jeller, hazırlanan jel boyama çözeltisine daldırılmıştır ve burada bir gece bekletilmiştir. Bu sürede jelde bulunan proteinlerin yoğunluklarına göre boya ile kompleks oluşturmaları sağlanmıştır. Protein bantları boyandıktan sonra, jeller boya giderme çözeltisine daldırılmış ve bant dışında kalan kısımlardaki boyanın giderilmesi sağlanmıştır.

f) Kantitatif belirleme

Elektroforetogramların fotoğrafları dijital bir fotoğraf makinesi (Nikon D7100 DSLR, Japonya) kullanılarak çekilmiştir. Fotoğrafların düzenlenmesi için kamuya açık <http://imagej.nih.gov/ij/> internet adresinde bulunan ImageJ Software Version 1.53t yazılımı kullanılmıştır. Elektroforetik bantların yoğunluğu, Image Lab™ Version 6.0.1 build 34 Standard Edition (© 2017, Bio-Rad Laboratories, Inc.) yazılımı yardımıyla tespit edilmiştir. Elektroforetik bantlarının kalınlıkları % olarak oranlanarak ifade edilmiştir (Şekil 3.4). Örneklerin kazein fraksiyonları ile bunların ilgili fragmentleri ve standart olarak kullanılan Na-kazeinat bantlarının yeri Hayaloğlu vd. (2004) ve Hayaloğlu vd. (2021)'de belirtildiği şekilde saptanmış ve bu bantlar dansitometrik integrasyonlar kullanılarak kantitatif olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.4. Üre-page jellerinde bant kalınlık yüzdelerinin belirlenme grafiklerine bir örnek

3.5.13. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) analizi

SEM analizleri peynirlerde Oluk vd. (2014), tarafından belirtilen yöntemin modifiye edilmesi ile belirlenmiştir. Keçi ve koyun peynirlerinin 1. ve 30. günlerindeki mikroyapıları, alan emisyon tabancası (FEG) sistemini içeren Taramalı Elektron Mikroskobu (FEI Quanta FEG 250) ile incelenmiştir. Öncelikle

peynir örnekleri -20 ± 1 °C'de dondurulmuştur ve daha sonra dondurularak kurutulmuştur (XO-10N Freeze Dryer, Çin). SEM'de düşük vakum modu kullanılarak 10 kV'de ölçümler yapılmıştır. Her bir örneğin farklı büyütme oranları (600-10000 kez yakınlaştırma) ile mikrofotografı görüntülenmiştir. Yapılan incelemelerde 600x, 800x, 1000x, 1500x, 5000x ve 10000x büyütme oranları kullanılarak görüntüler sağlanmıştır.

3.5.14. Mikrobiyolojik analizler

Mikrobiyolojik analizler için peynir örneklerinden steril bir bıçak yardımıyla numune alınarak steril numune kaplarında ve soğuk depolama koşullarında ($+4\pm1$ °C) muhafaza edilmiştir. Peynir örneklerinden 10 g alınarak 90 mL steril ringer (1/10) çözeltisi (Biokar diagnostics, BR00108, Ringer's solution 1/4 strenght) içine aseptik ortamda ilave edilmiştir. Bu seyreltmeden aseptik ortamda 1 mL örnek alınıp 9 mL steril ringer çözeltisi içine aktarılmış ve dilüsyon serisi hazırlanmıştır. İnkübasyondan sonra petri plaklarında gelişen 30-300 arası koloniler sayılmıştır. Sayım sonuçları, ilgili dilüsyon faktörü hesaplanarak ve koloni oluşturan birimin logaritması alınarak log kob/g olarak ifade edilmiştir.

3.5.14.1. Toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı

Toplam aerobik mezofil bakteri sayısı, yayma plak yöntemi kullanılarak Plate Count Agar (PCA) (Merck, Almanya) ile tespit edilmiştir. Örnekten hazırlanan dilüsyonlardan çift paralel olacak şekilde 100'er µl petri kutularına ilave edilmiştir. Petriler aerobik ortamda 30 °C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır (Anonymous, 1987).

3.5.14.2. Laktobasillerin sayımı

Laktobasillerin sayımı yayma plak yöntemiyle MRS agar (Merck, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Örnekten hazırlanan dilüsyonlardan çift paralel olacak şekilde 100'er µl petri kutularına ilave edilmiştir. Petri kapları anaerobik jar (Merck, Almanya) içinde 37 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir (Yerlikaya, 2012).

Anaerobik ortam, Merck (Almanya) firmasından sağlanan Anaerocult® anaerobik kitler yardımıyla sağlanmıştır.

3.5.14.3. Laktokokların sayımı

Laktokokların sayısı, yayma plak yöntemi kullanılarak M17 agarda (Merck, Almanya) belirlenmiştir. Örnekten hazırlanan dilüsyonlardan yine çift paralel olacak şekilde 100'er µl petri kutularına eklenmiştir. Petrilerin 37 °C'de 48 saat süren aerobik inkübasyonundan sonra laktokokların sayımı gerçekleştirilmiştir (Gardini vd., 1999; Yerlikaya, 2012).

3.5.15. İstatistiksel analiz

Çalışma ön denemeler sonunda üç tekerrür uygulanmıştır. Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizi, SPSS (Ver. 23.0) istatistik programı kullanılarak tespit edilmiştir. Araştırmada varyans analizi (General Linear Model) tekniği kullanılmıştır. Gruplar arası farklılığın belirlenmesinde Duncan testinden yararlanılmıştır ($p<0.05$) (Hertzler ve Clancy, 2003).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Süspansiyon Kùltürlerin Hücre Büyüme Kinetiğinin Belirlenmesi

Farklı elisitör maddelere maruz bırakılan süspansiyon kùltür hücrelerinin gelişim hızları uygulamalara göre farklılıklar göstermiştir (Çizelge 4.1). İlk beş gün boyunca tüm uygulamalar için hücreler bir adaptasyon süreci göstermekle birlikte, biyokùtle artışları ancak 10. ve 15. günlerde belirgin hale gelmiştir. En düşük gelişim hızları, uygulanan 5 µM ve 10 µM melatonin konsantrasyonlarında saptanmıştır. Anlamlı biyokùtle artışları 10. günde, 50 µM ve 100 µM yoğunlukta salisilik asit eklenen ve 5 µM melatonin eklenen kùltür ortamlarında tespit edilmiş olup, 15. günün sonunda kontrole kıyasla daha fazla biyokùtle artışı gösteren uygulamalar 50 µM ve 100 µM salisilik asit uygulanan örnekler olmuştur. Uygulamalar arasında istatistiksel fark bulunmamıştır. Ancak zamanlar arasındaki istatistiksel fark önemlidir ($p < 0.05$). Bu hücre kùltürleri için 0. gün hücre kùltürü kuru ağırlığı 1.2 g olarak ölçülmüştür.

Ezzo vd. (2019), tarafından yapılan çalışmada başka bir bitki büyüme düzenleyicisi olan melatonin 50 ppm oranında *Cynara scolymus L.* ile kullanıldığında bitkisel verimin arttığı gözlenmiştir. Szepesi vd. (2008), yaptıkları çalışma, salisilik asit (SA) uygulamasının, bitki büyüme ve gelişiminin düzenlenmesinde önemli rolü olan hormon benzeri bir madde olduğunu göstermiştir. Bekheet vd. (2014), yaptıkları çalışmada farklı konsantrasyonlarda ekledikleri salisilik asitin enginarının kallus gelişimi üzerinde etkilerini değerlendirmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgulara göre, 5 haftalık hücre kùltürü uygulaması süresince kuru ağırlık değerleri 50 µM salisilik asit eklendiğinde 10.50 g iken; 75 µM salisilik asit eklendiğinde 10.58 g olup, 100 µM salisilik asit içeren kùltürlerde ise 10.45 g şeklinde belirlenmiştir. Bu bağlamda; 75 µM salisilik asit ile elde edilen kallusların büyüme değerleri ideal bulunmuştur. Kallus büyüme ve gelişimindeki değişikliklerin kùltür ortamında salisilik asit varlığı ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir. Kallus, belirgin proliferatif kapasiteye sahip, gevşek bir dokuyla birlikte çok kompakt olmayan bir hücre kütlesi olarak gözlenmiştir. Ayrıca salisilik asit sistemik kazanılmış dirençte

önemli bir anahtar görevi üstlenmektedir. Bu kapsamda salisilik asit patojen saldırısı ile indüklenerek patogenezele ilgili proteinlerin sentezine yol açmaktadır. Çalışmalarda bulunan kuru ağırlık değerlerinin Bekheet vd. (2014)'nin, verilerinden düşük olduğu saptanmıştır. Salisilik asit içeren hücre kültürü örnekleri melatonin içeren örneklerle mukayese edildiğinde daha yüksek biyokütle artışı göstermesi bitki büyümesine daha etkin bir katkı sağladığını göstermektedir. Bu bağlamda bu görüşlere paralel olarak, Lopez-Orenes vd. (2013), tarafından yapılan çalışmada, salisilik asit eksojen uygulamasının sadece bitkileri strese karşı korumakla kalmayıp, aynı zamanda büyümelerini ve üretkenliklerini de arttırdığı açıklanmıştır. Bunun dışında El-Mergawi ve Abdel-Wahed (2004), yaptıkları çalışmada salisilik asitin fizyolojik süreçler üzerindeki etkisinin konsantrasyon, bitki türü, gelişim aşamaları ve çevre koşullarına bağlı olarak değiştiğini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.1. Süspansiyon kültürlerin hücre büyüme kinetiği

Örnekler	Hücre Kültürü Kuru Ağırlığı (g)		
	5.gün	10.gün	15.gün
K	1.32 ± 0.17 ^b	3.41 ± 0.23 ^{ab}	4.76 ± 0.29 ^a
SA50	1.37 ± 0.11 ^b	3.75 ± 0.28 ^{ab}	4.82 ± 0.32 ^a
SA100	1.33 ± 0.12 ^b	3.72 ± 0.26 ^{ab}	4.87 ± 0.37 ^a
M5	1.56 ± 0.13 ^b	3.57 ± 0.29 ^{ab}	4.27 ± 0.28 ^a
M10	1.49 ± 0.19 ^b	3.44 ± 0.21 ^{ab}	4.80 ± 0.34 ^a

*a-c: Farklı harfler gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R: Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, SA 100: 100 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzimi, M 10: 10 µM Melatonin içeren enzim.

4.2. Süspansiyon Kültür Ekstraktlarının Süt Pıhtılaştırma Aktivitelerinin Belirlenmesi

Rennin ve süspanse hücre kültür yöntemi ile üretilen enzimlerin süt pıhtılaştırma aktivite değerleri Çizelge 4.2'de sunulmuştur. Enzim örneklerinin gruplar arasındaki pıhtılaşma aktivite değişim oranı istatistiksel açıdan önemlidir (p<0.05). Rennin dışında enzimlerin süt pıhtılaştırma aktivite değerleri 0.52 – 0.74 aralığında ölçülmüştür. En düşük pıhtılaşma aktivitesi değeri SA 100 enzimi (0.52±0.05) için belirlenmiş, en yüksek pıhtılaşma aktivitesi değeri M5 enzimi (0.74±0.05) için bulunmuştur. Kullanılan bitkisel enzimlerden M10 ve SA 100'ün

süt pıhtılaştırma aktivite değerlerinin kontrolden daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Rennin enzimi sütü koagüle etmenin yanı sıra özellikle peynirin olgunlaşma sırasında proteoliz yardımı ile tat ve aroma geliştirilmesine de katkı sağlamaktadır (Bansal vd., 2009). Bu anlamda peynir yapım endüstrisinde kimozen en yaygın kullanılan ve en etkili enzimdir (Wang vd., 2015). Kappeler vd. (2006), sığır kimozeninin pıhtılaşma aktivitesini %100, deve kimozeninin pıhtılaşma aktivitesini %170, domuz kimozenini %25, *Mucor pusillus* proteazını %33, sığır pepsin A'nın ise %124 olduğunu bildirmiştir. Akçay (2012), yaptıkları çalışmada, enginar pistil ekstraktı için süt pıhtılaştırma aktivite değerini, 1.5 RU şeklinde belirlemiştir. Bekheet vd. (2014), yaptıkları çalışmada bitki büyüme düzenleyicisi olarak 50µM ve 100µM oranlarında salisilik asit kullanıldığında enginar kallus yapılarında verimin arttığını ve bu durumun enzim aktivitesi ile pıhtılaşma yapısını desteklediği belirtilmiştir.

Enzim eldesinde salisilik asit ve melatonin ilavesi bu veriler ışığında uygulanarak değerlendirildiğinde 5 µM Melatonin ve 50 µM Salisilik asit içeren enzimlerin süt pıhtılaşma aktiviteleri ve proteolitik aktiviteleri diğer enzimlere göre daha yüksek ve rennin enziminin özelliklerine daha yakın değerlerde olduğu için peynir üretiminde kullanılmak üzere seçilmişlerdir. Örneklerde ayrıca uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen süspansiyon kültürden elde edilen enzim (K) ve enginar (*Cynara scolymus L.*) kallus yapısından elde edilen bitkisel enzimlerde (E) peynir üretiminde kullanılmak üzere seçilmiştir.

Çizelge 4.2. Enzimlerin Süt Pıhtılaşma aktiviteleri

Enzim Örnekleri**	Enzimlerin Süt Pıhtılaşma Aktiviteleri (RU)
R	9.25±0.10 ^a
K	0.61±0.04 ^c
E	0.66 ± 0.04 ^c
M5	0.74±0.05 ^b
M10	0.53 ± 0.04 ^{cd}
SA 50	0.71±0.04 ^b
SA 100	0.52 ± 0.05 ^{cd}

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, SA 100: 100 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim, M 10: 10 µM Melatonin içeren enzim.

4.3. Süspansiyon Kültür Ekstraktlarının Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Sıvı hücre kültürü yöntemiyle elde edilen enzimlerin protein değerleri Çizelge 4.3'te verilmiştir. Enzimlerin grupları arasındaki protein miktarlarının değişimi istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (p<0.05). Enzimlerin protein değeri 54 µg/mL – 228 µg/mL aralığında ölçülmüştür. En düşük protein değeri SA 100 enzimi (54±5 µg/mL) için gözlenmiş, en yüksek protein değeri rennet enzimi (228±8 µg/mL) için tespit edilmiştir. Kullanılan bitkisel enzimlerde protein değerleri hayvansal enzime göre daha düşük saptanmıştır. M10, SA 50 ve SA 100 enzimleri protein bakımından kontrol grubundan düşük tespit edilmiş; M5, E ve rennet ile elde edilen sonuçlar kontrol grubundan daha yüksek değerde gözlenmiştir. Akçay (2012), tarafından yapılan çalışmada, enginar pistil ekstraktı için protein miktarı 832±32 µg/mL olarak ifade edilmiştir.

Cynara scolymus yapraklarından elde edilen protein miktarı 3.56 mg/mL olarak ifade edilmiştir (Esposito vd., 2016). Çalışmada bulunan protein değeri Akçay (2012) ve Esposito vd. (2016), tarafından verilen protein değerlerinden düşük olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Enzimlerin toplam protein miktarları (µg/mL)

Enzim Örnekleri**	Toplam Protein Miktarları (µg/mL)
R	228 ± 8 ^a
K	149 ± 7 ^c
E	155 ± 3 ^c
M5	181 ± 8 ^b
M10	145 ± 13 ^c
SA 50	63 ± 4 ^d
SA 100	54 ± 5 ^d

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, SA 100: 100 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim, M 10: 10 µM Melatonin içeren enzim.

4.4. Süspansiyon Kültür Ekstraktlarının Proteolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Rennin ve diğer enzimlerin proteolitik aktivite (Ukazein*/mg protein), değerleri Çizelge 4.4'te görülmektedir. Enzim örneklerinin gruplar arasındaki proteolitik aktivite varyasyonu önemli olarak görülmüştür (p<0.05). Enzimlerin proteolitik aktivite değerleri 0.283 – 2.211 Ukazein/mg protein aralığında bulunmuştur. En düşük proteolitik aktivite değeri SA 100 enzimi (0.283±0.02 Ukazein/mg protein) için bulunmuş, en yüksek proteolitik aktivite değeri Rennin enzimi (2.211±0.02) için gözlenmiştir. Kullanılan bitkisel kaynaklı enzimlerin proteolitik aktivite değeri hayvansal enzime göre daha düşüktür. SA 100 enzimi proteolitik aktivitesinin kontrol grubundan düşük olduğu belirlenmiş; diğer enzimler ile elde edilen sonuçlar kontrol grubundan daha yüksek değerlerde saptanmıştır. Akçay (2012), yaptığı çalışmada, enginar pistil ekstraktı için proteolitik aktivite değeri 0.263±0.03 Ukazein/mg protein şeklinde belirlemiştir. *Cynara scolymus L.* 'in farklı bölgelerinden elde edilen (kök, yaprak, çiçek vb.) ekstraktların proteolitik aktivitesi 0.26 – 5.45 Ukazein/mg protein olarak belirlenmiştir (Llorente vd., 2004). Elde edilen veriler çalışmanın verileri ile benzerlik göstermektedir.

Çizelge 4.4. Enzimlerin proteolitik aktiviteleri (Ukazein*/mg protein);

Enzim Örnekleri**	Proteolitik Aktivite (Ukazein*/mg protein)
R	2.211 ± 0.02 ^a
K	0.366 ± 0.03 ^{de}
E	0.441 ± 0.04 ^c
M5	0.508 ± 0.02 ^b
M100	0.415 ± 0.01 ^d
SA 50	0.507 ± 0.03 ^b
SA 100	0.283 ± 0.02 ^{de}

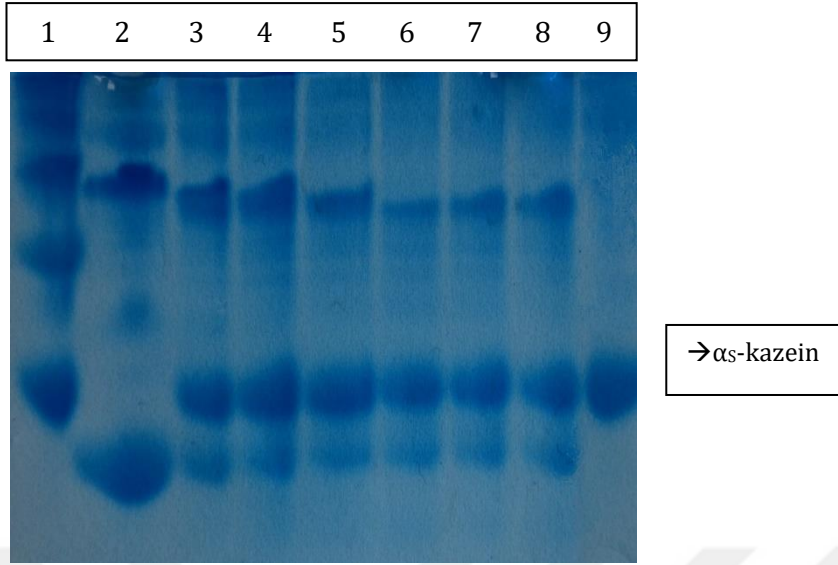
*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, SA 100: 100 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim, M 10: 10 µM Melatonin içeren enzim.

4.5. Enzimlerin Üre-PAGE Analiz Sonuçları

4.5.1. α_s-kazein hidrolizi

Süspanse hücre kültür yöntemi ile elde edilen enzimlerin α_s-kazeinini indirgeyebilme özelliklerini belirleyebilmek amacı ile yapılan Üre-PAGE analizleri doğrultusundaki elde edilen jel Şekil 4.1’de gösterilmiş, hidrolize edilen α_s-kazeinlerin hesaplanmış parçalanma (%) oranları ise Çizelge 4.5’te verilmiştir. Enzim örnekleri arasındaki istatistiksel farkın önemli olduğu tespit edilmiştir. E ve SA100 örneklerinin α_s-kazein için benzer sonuçlar verdiği de gözlemlenmiştir.



Şekil 4.1. Enzimlerin alfa kazein degradasyonu (1. Na kazeinat standardı, 2. Rennin enzimi, 3. Kontrol, 4. Enginar 5.M5, 6. M10, 7.SA 100, 8.SA 50, 9. α S-kazein standardı)

Cynara scolymus'dan sıvı hücre kültür yöntemi ile elde edilen enzimlerin α s-kazein üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapılan üre-PAGE analizinde veriler incelendiğinde, en yüksek değerin K örneğine (%67.10) ait olduğu belirlenmiştir. En düşük α s-kazein değeri M5 (%48.15) enzimlerinde izlenmiştir. R enzimi içeren örnekte ilgili bandın %100 indirgendiği kabul edilerek değerlendirilmiştir. Diğer α s-kazein oranları incelendiğinde α s-kazeini en iyi indirgeyen enzimin M5 örneği (51.85) olduğu bunu SA50 (47.05) örneğinin izlediği görülmektedir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Enzimlerin Üre page α -kazein parçalanma oranları (%)

	α s-kazein	Diğer kazeinler
K	67.10±0.40 ^a	32.90±0.40 ^e
E	61.40±0.30 ^b	38.60±0.30 ^d
M5	48.15±0.65 ^e	51.85±0.65 ^a
M10	56.10±0.40 ^c	43.90±0.40 ^c
SA 50	52.95±0.35 ^d	47.05±0.35 ^b
SA 100	61.90±0.40 ^b	38.10±0.40 ^d

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara scolymus* L. Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 μ M Salisilik asit içeren enzim, SA 100: 100 μ M Salisilik asit içeren enzim, M5: 5 μ M Melatonin içeren enzim, M10: 10 μ M Melatonin içeren enzim.

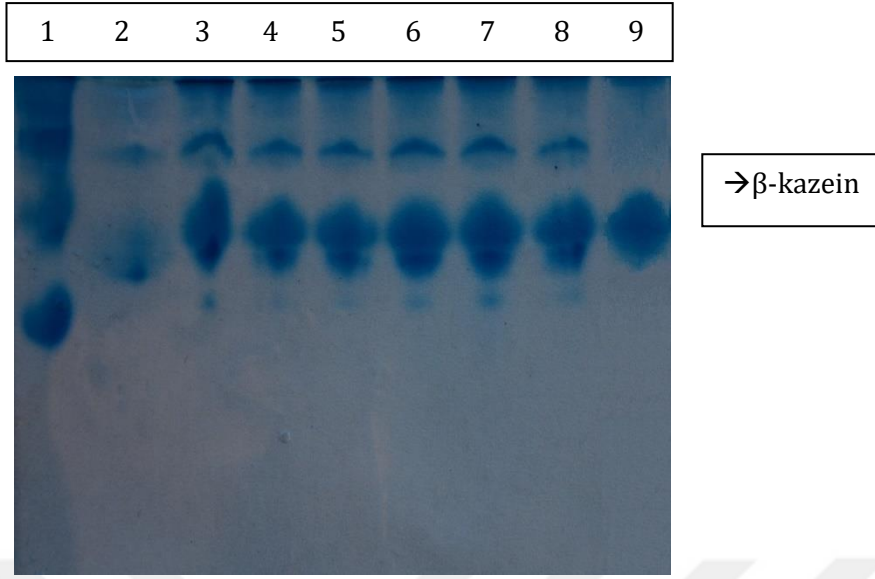
Yapılan araştırmalarda, α_s -kazeinlerin β -kazeinlerden daha hızlı hidrolize edildiği, 1 dakikada sırasıyla %76 ve %52'lik bozunma y zdelatine ulaştığı belirtilmiştir. Ayrıca α_s -kazeinlerde hidrolizle ortaya çıkan 3 bant elde edildiği bildirilmiştir (Silva ve Malcata, 1999).

Ramalho-Santos vd. (1996), tarafından enginar özütünden temin edilen kardosin A ve B'nin sığır α_{s1} -kazein üzerindeki bağımsız etkisi incelenmiş ve her iki enzimin de Phe₂₃-Phe₂₄'  tercih ettiği, ancak daha düşük derecelerde olsa da Trp₁₆₄-Tyr₁₆₅, Tyr₁₆₅-Tyr₁₆₆ ve Phe₁₅₃-Tyr₁₅₄ bağlarını par alayabildiğini gözlemlenmiştir. Phe₂₃-Phe₂₄ ayrıca pH 2.2-7.0 aralığında kimozinin etkisine en kararsız peptit bağlarından biri olarak belirlenmiştir.

Silva vd. (2002), tarafından yapılan çalışmada *Cynara cardunculus*'dan elde edilen enzimin, sığır α_s -kazeini hidrolizinin yaklaşık ilk 30 dakika ile tamamlandığı bildirilmiştir. Elde edilen peptit bantlarından birinin, α_{s1} -I kazein şeklinde ayrıldığı vurgulanmıştır. Bu peptitlerin daha sonra elektrik alan altında birbirine yakın g   eden daha küçük peptitlere indirgendiği bildirilmiştir.

4.5.2. β -kazein hidrolizi

şekil 4.2'de *Cynara scolymus* kaynaklı sıvı kültürlerde geliştirilmiş enzimlerin β -kazein hidrolizine ait  re-PAGE jel görüntüsü sunulmuştur. β -kazein jellerinden elde edilen bant kalınlıklarına ilişkin oranlar  izelge 4.6'da yer almaktadır. R enzimiyle β -kazeine ait bant kaybolurken (%100 parçalanma olduğunda); K, E, M5, M10, SA 100 ve SA 50 pıhtılaştırıcılarında ise bu bant %48.35-67.90 aralığında enzimlerde tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. Enzimlerin β -kazein degradasyonu (1. Na kazeinat standardı, 2. Rennin enzimi, 3. Kontrol, 4. Enginar 5.M5, 6. M10, 7.SA 100, 8.SA 50, 9. β -kazein standardı)

β -kazein hidrolizi ile jel görünümülerinden elde edilen hesaplamalarda bant kalınlıkları incelendiğinde, hidrolizi en düşük oranda gerçekleştiren enzimin kontrol grubuna ait olduğu anlaşılmaktadır. En iyi hidroliz oranı β -kazein için M5 (%48.60) ve SA 50 (%48.35) örneklerinde gözlenmiştir (Çizelge 4.6). Örnekler arasındaki istatistiksel farkın da önemli olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

Çizelge 4.6. Enzimlerin Üre page β -kazein parçalanma oranları (%)

	β - kazein	Diğer kazeinler
Kontrol	67.90 $\pm$ 0.20 ^a	32.10 $\pm$ 0.20 ^e
Enginar	49.30 $\pm$ 0.40 ^d	50.70 $\pm$ 0.40 ^b
M5	48.60 $\pm$ 0.30 ^e	51.40 $\pm$ 0.30 ^a
M10	52.75 $\pm$ 0.35 ^b	47.25 $\pm$ 0.35 ^d
SA 50	48.35 $\pm$ 0.15 ^e	51.65 $\pm$ 0.15 ^a
SA 100	51.80 $\pm$ 0.30 ^c	48.20 $\pm$ 0.30 ^c

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p < 0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara scolymus* L. Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 μ M Salisilik asit içeren enzim, SA 100: 100 μ M Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 μ M Melatonin içeren enzim, M 10: 10 μ M Melatonin içeren enzim.

Silva ve Malcata (1999), *Cynara cardunculus* enziminden elde edilen Kardosin B tarafından β -kazeinlerin indirgenmesine ilişkin olarak yaptıkları çalışmalarında

Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ ve Ala₁₈₉-Phe₁₉₀'ın hassas bölgelerinden indirgenerek sığır β -I kazein oluştuğuna dair bilgiler paylaşmıştır.

Silva ve Malcata (1998), yaptıkları Üre-PAGE analizlerinde, hızla kaybolan β -kazein bölgesinden daha yüksek elektroforetik mobiliteye sahip iki banda yol açtığı 10 saatlik inkübasyonla kaybolan bir bant bulunurken, geçen hidroliz süresiyle daha yüksek hareketliliğe sahip iki ayrı bantın daha yoğun halde ortaya çıktığı bildirilmiştir. β -kazeinlerin hidrolizinin %75.9 oranında meydana gelmiş olduğu ve ayrıca hidrolizin hızlı olarak gerçekleştiği bildirilmiştir.

Kardosin B'nin ayrılmış sığır β -kazeinleri üzerindeki etkisini kapsayan çalışmada, Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ bağının yanı sıra Leu₁₂₇-Thr₁₂₈ ve Leu₁₆₅-Ser₁₆₆ bağlarının da ayrıldığı gösterilmiştir (Simões, 1998).

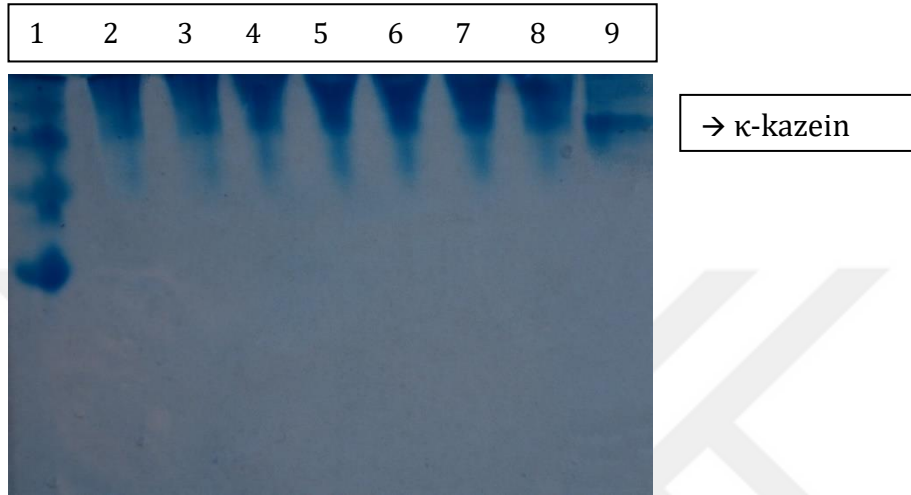
Silva ve Malcata (1999), enginardan temin edilen kardosin B aspartik proteazının β -kazein üzerindeki etkisini inceledikleri araştırmalarında, koyun β -kazeininde karşılık gelen parçalanma bölgelerinin Leu₁₉₀-Tyr₁₉₁ ve Ala₁₈₇-Phe₁₈₈ olduğu da belirtilmiştir.

Silva vd. (2002), *Cynara cardunculus* hidrolizatlarında, β -I-kazein olarak gösterilen bant için, muhtemelen sığır β -kazeininde bulunan Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ bağının parçalanması ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir.

Sousa ve Malcata (1998 a, b), göre; kardosin (A ve B)'nin faaliyetine en duyarlı olan saf sığır β -kazeini, β -I-kazein, β -II- ve β -III-kazeine hidrolize edilmektedir. Sousa ve Malcata (1998), kimozin tarafından saf β -kazeinin hidroliziyle β -I-kazein (f1-189/192), β -II-kazein (f1-163/165/167), ve β -III-kazein (f1-127/139) peptillerinin optimum oluşumunun gerçekleştiğini rapor etmişlerdir. Bunun yanı sıra; *C. cardunculus* çiçeklerinden elde edilen proteinazların ve kimozinin etkisine en duyarlı sığır β -kazeindeki bağların (Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ ve Ala₁₈₉-Phe₁₉₀ olarak bilinen) hidrolizi β -I-kazein ürününü vermiştir.

4.5.3. κ -Kazein hidrolizi

Cynara scolymus kaynaklı sıvı kültürlerde geliştirilmiş enzimlerin Şekil 4.3’de κ -kazein hidrolizine ait Üre-PAGE jel görüntüsü sunulmuştur. Jel görünümü incelendiğinde tüm enzimlerin κ -kazeini indirgediği gözlenmektedir.



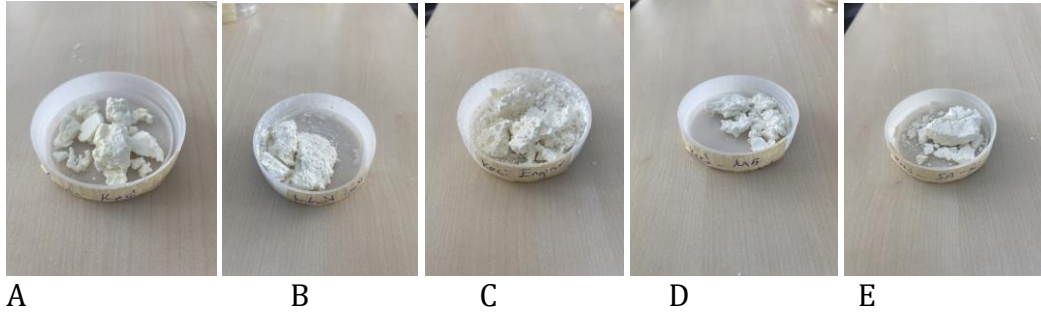
Şekil 4.3. Enzimlerin kappa kazein degradasyonu (1. Na kazeinat standardı, 2. Rennin enzimi, 3. Kontrol, 4. Enginar 5.M5, 6. M10, 7.SA 100, 8.SA 50, 9. Kappa kazein standardı)

Llorente vd. (2014), tarafından da belirtilen rapora paralel olarak; *C. scolymus* özünden izole edilen aspartik proteazın, κ -kazein Phe₁₀₅-Met₁₀₆ bağınyı hidrolize ettiği bildirilmiştir. Macedo vd. (1993), tarafından *Cynara cardunculus L.* proteazının sığır κ -kazein üzerindeki etkisi, yapılan çalışmada Phe₁₀₅-Met₁₀₆ dışında hiçbir bağ hidrolize edilmediği yönünde olmuştur. κ -kazein inkübe edildiğinde Phe₁₀₅-Met₁₀₆ dışında bir bölünme bölgesi olduğuna dair başka bir raporunda bulunmamakta olduğu da belirtilmiştir. Dolayısıyla, κ -kazein bölünme bölgesi söz konusu olduğunda, *C. cardunculus L.* proteazının, diğer süt pıhtılaşma enzimlerine benzer şekilde davrandığı bildirilmiştir. Ayrıca bu davranışın, hem enzimlerin özgüllüğü hem de κ -kazeinin üç boyutlu moleküler yapısı tarafından kaynaklandığı sonucuna bağlanmıştır.

Cynara scolymus kaynaklı sıvı kültürlerde geliştirilen enzimlerde elde edilen üre-PAGE görüntüleride κ -kazein için araştırmacıların verileri ile benzer nitelikler göstermektedir.

4.6. Keçi Peyniri Analiz Sonuçları

Seçilen enzimlerle (R, K, E, SA50 ve M5) laboratuvar koşullarında minyatür ölçekte üretilen keçi peynirlerine ait görünüm Şekil 4.4’de verilmiştir.



Şekil 4.4. Farklı enzimlerle üretilen Keçi peynirlerinin görünümleri (A. Rennin enzimi, B. Kontrol, C. Enginar D. M5, E. SA 50)

4.6.1. Çiğ süt analiz sonuçları

Keçi sütü için pH, titrasyon asitliği (% Laktik asit; LA), yağ (%), kuru madde (%), protein (%) ve özgül ağırlık (g/cm³) değerleri Çizelge 4.7’de görülmektedir.

Çizelge 4.7. Çiğ keçi sütünün bazı fizikokimyasal analiz sonuçları (n:3)

Kimyasal Analizler	Ortalama±SS
pH	6.52 ± 0.05
Laktik asit (%)	0.19 ± 0.01
Yağ (%)	4.25 ± 0.36
Kuru Madde (%)	14.38 ± 0.20
Kurumadde de yağ (%)	29.55 ± 0.40
Protein (%)	4.09 ± 0.08
Özgül Ağırlık (g/cm ³)	1.032 ± 0.001

SS: Standart sapma

Benheddi ve Hellal (2019), tarafından enginar özütü ile elde edilen keçi sütü çalışmasında çiğ sütteki % yağsız kuru madde oranını, % yağ değerini ve % protein değerini sırasıyla 7.54 ± 0.32 , 3.56 ± 0.23 ve 2.86 ± 0.13 şeklinde bulmuşlardır. García vd. (2016), tarafından yapılan çalışmada keçi sütü için ortalama protein, yağ ve kuru madde değerleri sırasıyla 3.14 ± 0.07 , $5.40 \pm$

0.06 ve %13.4 $\pm$ 0.09 olarak belirlenmiştir. TKG tarafından keçi sütü için protein oranı (%), en az), asitlik (%), yoğunluk (m/v) ve yağsız kuru madde (%) verileri sırasıyla 3, 0.15, 1.026 ve 8.5 olacak şekilde belirtilmiştir. Bu çalışmada elde edilen değerler, TKG (TKG, 2019) ve önceki çalışma verileri ile uyumludur.

4.6.2. Keçi peyniri pH analiz sonuçları

Süt ürünlerinde mikrobiyolojik, kimyasal ve biyokimyasal değişimlerin tespitinde asitliğin belirlenmesi önemli bir anahtar nokta olarak görülmektedir. Bundan ötürü, ortamdaki serbest hidrojen iyonları konsantrasyonunun etkinliğinin saptanması maksadıyla pH değerleri belirlenmiştir (Kavas, 2011).

Cynara scolymus L.'den sıvı hücre kültür tekniği ile üretilen enzimler ile yapılan keçi peynirlerinin pH oranlarındaki değişimler Çizelge 4.8'de verilmiştir. Peynir örneklerinin arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Ancak rennin enzimi ile üretilen peynirler dışındaki tüm örneklerin pH değerlerinin benzer olduğuda gözlemlenmiştir. Keçi peynirlerinin pH değeri 4.18 – 4.30 aralığında belirlenmiştir. pH değerlerinin rennin enzimi ile üretilen peynirlerden daha yüksek pH değerine sahip oldukları da gözlenmiştir. pH değerinin değişimi mayalama süresinin uzun olmasına bağlı olarak özellikle laktik asit bakteri sayısı ve oluşan laktik asit oranı ile ilişkilendirilebilir.

Çizelge 4.8. Keçi peyniri örnekleri için pH değerleri

Peynir Örnekleri**	pH değerleri
R	4.18 $\pm$ 0.07 ^a
K	4.28 $\pm$ 0.01 ^b
E	4.30 $\pm$ 0.03 ^b
SA 50	4.29 $\pm$ 0.01 ^b
M5	4.27 $\pm$ 0.01 ^b

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p < 0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 μ M Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 μ M Melatonin içeren enzim.

García vd. (2016), keçi sütü ve *C. scolymus* özütü kullanılarak elde edilen 15 günlük peynir için pH değerinin 5.63 şeklinde tespit edildiğini bildirmiştir. Pino vd. (2009), yaptıkları hayvansal enzim ve *Cynara cardunculus* özütü içeren keçi peyniri çalışmasında pH değerlerini sırasıyla 5.19 ± 0.15 ve 5.09 ± 0.11 olarak belirlemiştir. Her iki pıhtılaştırıcı ile yapılan peynirlerde pH değerleri arasında anlamlı bir farklılık gözlenmediği bildirilmiştir. Bununla beraber bitkisel enzim içeren peynirlerde olgunlaşma sırasında pH değerleri ilk 15 günde 5.63'lük nihai bir değere ulaşmıştır. Çalışmalarda bulunan pH değerlerinin García vd. (2016) ve Pino vd. (2009), tarafından verilerinden düşük olduğu görülmektedir. Farklı bir çalışmada hayvansal enzim kullanılarak elde edilen geleneksel Gökçeada keçi peynirinde 3.75 ile 6.26 arasında değişen ve ortalama değeri 4.71 ± 0.66 olan pH değerleri gözlenmiştir (Hayaloğlu vd., 2013). Peynir pH'sının gelişiminde, çiğ sütteki veya pastörize süte ilave edilen starter kültürdeki mikroorganizma türü ve sayısı, mayalama sıcaklığı ve süresi, baskıya alma sıcaklık ve süresi gibi birçok parametre etkili olmaktadır (Hayaloğlu ve Özer, 2011).

Pinho vd. (2004), peynirlerde laktik asit bakterilerinin baskınlığının oluşan laktik asit üretimi nedeniyle pH değerlerini düşürdüğünü belirtmektedir. Bunun dışında; García vd. (2014b), enginar özütü (*Cynara cardunculus*) ile yaptıkları keçi peyniri çalışması göstermiştir ki; termofilik kültürlerle hazırlanan peynirlerde pıhtının pH'sı pratik olarak sabit kalmış, karışım ve mezofilik kültürlerle üretilen peynirlerde pıhtının pH'sı belirgin şekilde düşmüştür. Bununla birlikte, pıhtılaşma sırasında telemenin maruz kaldığı asitlenme, uzun süreli pıhtılaşma ve peynir altı suyu drenaj işlemleri pH oranının düşmesinde etken parametreler olarak görev taşımaktadır (El Galio vd., 2015). pH değişimi, ayrıca protein miktarından dolayı tamponlama kapasitelerine de bağlıdır. Ayrıca mineraller, amonyum oluşumu ve/veya laktik asit katabolizması da pH'yı etkilemektedir (Lemes vd., 2016).

4.6.3. Keçi peyniri titrasyon asitliği analizi sonuçları

Peynirlerde oluşan asitliğin en önemli kısmı mikroorganizmalar tarafından laktozun fermentasyonu ile oluşmaktadır. Mikroorganizmalar laktik asit dışında

asetik asit, formik asit, bütirik asit vb asitler oluşturarak titrasyon asitliğinin yüksek olmasını sağlamakta bu bağlamda keçi peynirlerinin titrasyon asitliğinde artış gözlenmektedir (Öner ve Sarıdağ, 2019).

Keçi peynirleri örneklerine ait titrasyon asitliği (% laktik asit) değerleri Çizelge 4.9'da görülmektedir. Peynir örneklerinin gruplar arasındaki % laktik asit değerleri değişimi istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Keçi peynirlerinin titrasyon asitliği değeri %0.88 – 1.67 aralığında ölçülmüştür. Peynirlerde birinci gün olgunlaşma koşulları altında en düşük titrasyon asitliği SA 50 enzimi ilave edilerek üretilen peynir örneği için %0.88 olarak bulunmuştur. En yüksek titrasyon asitliği değeri ise rennin enzimi ilave edilen peynir örneklerinde %1.67 olarak saptanmıştır. Ayrıca, SA 50 ve M5 enzim ilaveli örneklerde laktik asit oranlarının birbirine yakın olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.9. Keçi peyniri örnekleri için laktik asit değerleri (%)

Peynir Örnekleri**	Laktik asit değerleri (%)
R	1.67 ± 0.01 ^a
K	0.93 ± 0.03 ^b
E	0.97 ± 0.04 ^b
SA 50	0.88± 0.01 ^c
M5	0.90 ± 0.01 ^c

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p<0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara scolymus* L. Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzimi.

Tejada vd. (2008), yaptıkları çalışmada, Murcia Al Vino keçi peynirlerinde 2 günlük depolama koşullarında *Cynara carduculus* içeren peynir örneğinde titrasyon asitliği oranı %1.64 olarak belirlenirken, hayvansal maya ile üretilen peynirde ise titrasyon asitliği %1.47 şeklinde ifade edilmiştir. Conceição vd. (2018), yaptıkları çalışmada, peynir üretimi sırasında pıhtılaşma enzimi ve laktik asit bakterilerinin birleşik etkisi altında pıhtılaşma meydana geldiğinde pıhtılaşma etkisinin arttığını belirtirken, keçi kaynaklı süt ve aynı miktarda *Cynara scolymus* kallus yapısından elde edilen bitkisel enzim ile peynir üretmiştir.

Bu çalışmada elde edilen % laktik asit verileri Tejada vd. (2008) ve Conceição vd. (2018), tarafından elde edilen bulgulara benzerdir.

Islam vd. (2021), farklı pıhtılaştırıcıların taze süttten yapılan keçi peynirinin kimyasal ve mikrobiyolojik kalitesi açısından etkinliğinin belirlendiği araştırmalarında taze peynir dört farklı şekilde elde edilmiştir. Bunlar mikrobiyal peynir enzimi (%0.7), laktik asit (%1.5), papaya ekstraktı 100 mL suya 5 damla) ve rennin enzimi (100 g buzağı abomasum 1000 mL 3:1 oranında su ve süt karışımı) şeklinde yer almıştır. Bu kapsamda, % asitlik değerleri laktik asit ile üretilen peynirlerde %0.83, hayvansal enzim numunesinde %0.72 ve papaya ekstraktı bulunan peynirde %0.79 olarak incelenmiştir. Abdeen vd. (2021), taze keçi peynirlerinde rennin ile üretilen peynirlerde asitlik değeri %0.18 şeklinde tespit edilmiştir. Ayrıca, çalışmada *Moringa oleifera* bitki pıhtılaştırıcısı ile üretilen örneklerin pH değerlerinde ticari enzimle pıhtılaştırılmış olanlardan biraz daha yüksek olduğu ortaya çıktığı da bildirilmiştir. Nasr (2017), çeşitli enzimlerle yapmış olduğu keçi peyniri numunelerine ait çalışmasında 0. gün depolama koşullarında *H. annuus* bitkisel enzim bazlı keçi sütü peynirinde titre edilebilir asitlik %0.82 olarak bulunmuş, hayvansal maya peynirinde ise % 0.79 şeklinde saptanmıştır. Hayvansal enzim kullanılarak elde edilen geleneksel Gökçeada keçi peynirinde peynir örneklerinin titre edilebilir asitlik ortalama değerleri %1.34 laktik asit olarak izlenmiştir (Hayaloğlu vd., 2013).

Çalışmada % laktik asit değerleri incelendiğinde K, E, SA 50 ve M5 ile üretilen peynirlerin asitliğinin hayvansal rennet ile elde edilen peynirlere göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bunun sebebinin kaba ekstrakt hazırlama aşamasında kullanılan sodyum sitrattan (50mM) kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Sodyum sitrat bakteriyostatik etki gösterdiği bilinen bir maddedir. Aynı zamanda asitlik düzenleyici olarak gıda katkı maddesi olarak kullanılır (Saldamlı, 1985). Sallam (2005), dilimlenip soğutulmuş somon balıklarının depolanması sırasında ilave edilen organik asitlerin antimikrobiyal etkileri üzerine yaptığı bir araştırmada %2.5 sodyum sitrat, laktik asit bakteri sayılarında artma gözlenmesine karşın bu artışın az miktarda olduğuna vurgu yapmıştır. Ayrıca M5 ve SA50 örneklerinin de diğer peynir örneklerinden daha

düşük bir oranda asitlik içerdiği de gözlenmiştir. Burada elde edilen veriler kullanılan salisilik asit ve melatoninin bir miktar asitlik üzerinde etkili olduğunu düşündürmüştür.

4.6.4. Keçi peyniri kuru madde analiz sonuçları

Keçi peyniri örneklerdeki kuru madde (%) değerleri Çizelge 4.10'da gösterilmiş olup; peynir örnekleri arasındaki kuru madde farklılık oranlarının anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır ($p<0.05$). Keçi peynirlerinin en düşük kuru madde oranı K peynir örneği (%28.65) için bulunmuş, en yüksek kuru madde değeri R peynir örneğinde (%44.65) tespit edilmiştir. Süspanse hücre kültür yöntemi ile elde edilen enzimlerden üretilen keçi peynirlerinin kuru madde (%) değerleri istatistiksel olarak benzerlik göstermektedir.

Çizelge 4.10. Keçi peyniri örnekleri için kuru madde değerleri (%)

Peynir Örnekleri**	Kuru madde değerleri (%)
R	44.65 ± 0.33 ^a
K	28.65 ± 2.01 ^b
E	28.92 ± 2.76 ^b
SA 50	30.06 ± 0.78 ^b
M5	29.04 ± 2.581 ^b

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p<0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara scolymus* L. Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim.

Benheddi ve Hellal (2019), tarafından *Cynara cardunculus* L. kullanılarak yapılan çalışmada elde edilen keçi peynirlerinde kuru madde seviyelerinin %27.98'den %34.61'a değişmekte olduğunu belirtmiştir. Pino vd. (2009), yaptıkları çalışmada 2 günlük olgunlaşma seviyesinde kuru madde değerlerini hayvansal rennet ve enginar enzimi içeren keçi peynirleri için sırasıyla %51.86 ve %50.63 şeklinde belirlemiştir. García vd. (2016), yaptıkları *Cynara scolymus* özütü kullanılarak Murciano-Granadina keçi sütünden üretilen peynirlerde kuru madde değerleri farklı zamanlarda önemli ölçüde değişim gösterdiğini, ancak ortalama %48.5 şeklinde belirlendiğini belirtmiştir. *Helianthus annuus* enzimi içeren keçi sütü

peynirindeki toplam kuru madde içeriği %34.60 olup, hayvansal maya içeren numunelerde ise %45.80 olarak bulunmuştur (Nasr, 2017).

Ergül (2015), buzağı renneti ve çeşitli enzimler aracılığıyla yaptığı beyaz peynir çalışmasında farklı kuru madde içeriklerini enzimlerden kaynaklı peptid bağlarının parçalanması sonucu yeni iyonik grupların oluşması ve bu iyonik grupların çevresindeki suyu çekerek nem oranının yükselmesine neden olduğu şeklinde açıklamıştır.

Çalışmalarda bulunan kuru madde değerlerinin Pino vd. (2009) ve García vd. (2016), verilerinden düşük olup; Benheddi ve Hellal (2019), verilerine yakın olduğu sonucuna varılmıştır. Kuru maddede düşük değerler peynir yapımı sırasında sınırlı peynir altı suyu drenajının bir göstergesidir çünkü pıhtının süzülme işlemi genellikle basınçsız olarak uygulanmaktadır. Kuru madde içeriklerindeki farklılıkların, peynir altı suyu drenajının yoğunluğundaki farklılıklardan ileri geldiği ifade edilmektedir (El Galiou vd., 2015).

Bu çalışmada bitkisel kaynaklı kültür ortamında geliştirilen enzimlerle yapılan peynirlerde kuru madde içeriği hayvansal kaynaklı enzime göre düşük olarak tespit edilmiştir. Bunun enzimlerin proteolitik özellikleri ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda olgunlaşmayı hızlandırmak amacıyla peynire proteolitik enzim ilavesinin randımanı düşürdüğü, bunun özellikle peyniraltı suyuna geçen azot miktarının artması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Law, 2001, El-Soda, 2003)

4.6.5. Keçi peyniri yağ analizi sonuçları

Keçi peynirlerinde belirlenen yağ değerleri Çizelge 4.11’de gösterilmiştir. Peynir örneklerinin yağ oranları arasındaki değişim miktarı istatistiksel olarak önemli seviyede izlenmiştir ($p < 0.05$). Örneklerle ait yağ oranı % 16.00– 26.25 aralığında ölçülmüştür. Peynirlerin, en yüksek yağ oranı rennin enzimi ilave edilerek üretilen peynir örneği (%26.25) için tespit edilmekle birlikte, en düşük yağ oranı M5 enzimi ile üretilen peynir örneğinde (%16.00) gözlenmiştir. Peynir

kitlesindeki yağ miktarı, süt yağının pıhtıda tutulma oranı ile paralellik göstermektedir. Yumuşak tip peynirlerde süttten pıhtıya geçiş oranı %93-94 düzeyinde olmaktadır.

Çizelge 4.11. Keçi peyniri örnekleri için yağ değerleri (%)

Peynir Örnekleri**	Yağ Değerleri (%)
R	26.25 ± 0.25 ^a
K	16.87 ± 1.13 ^b
E	17.38 ± 1.13 ^b
SA 50	16.13± 1.13 ^b
M5	16.00 ± 1.50 ^b

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim.

Peynir örnekleri arasında rennin enzimi ile üretilen örnek dışında kalan diğer tüm peynir örneklerinde yağ oranları benzer olarak belirlenmiştir. Ertürkmen vd. (2022) farklı enzimler (hayvansal, mikrobiyal, bitki kaynaklı) ile yaptıkları çalışmada rennin enzimi ile üretilen peynirlerin diğerlerinden daha yüksek yağ oranına sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Benheddi ve Hellal (2019), tarafından yaptıkları, *Cynara cardunculus L.* özütünden üretilen farklı starter kültürler içeren keçi peynirlerinde % yağ değerleri %10 – 14 aralığında saptanmıştır. García vd. (2016), yaptıkları çalışmada *C. scolymus* özütü içeren Murciano-Granadina keçi sütü peynirinde olgunlaşmada 15 günlük depolama koşullarında yağ değeri %30.3 olarak belirlemiştir. Çalışmalarda elde edilen yağ değerleri Benheddi ve Hellal (2019), verilerinden yüksek, García vd. (2016), verilerinden ise düşük değerlerde gözlenmiştir. Elde edilen yağ değerleri sütün yağ içeriği ve peynir üretim yöntemlerindeki farklılıklara bağlı olarak değişkenlik göstermiştir. İslam vd. (2021), keçi peynirinin kimyasal ve mikrobiyolojik kalitesini belirledikleri çalışmalarında yağ içeriğini %21.6 – 22 arasında değiştiğini bildirmiştir. Wibowo

vd. (2020), yaptıkları çalışmada keçi peyniri örneklerinde yağ oranlarını sırasıyla %19.95 ile 26.49 arasında değerlerde olarak elde edildiğini bildirmiştir.

4.6.6. Keçi peyniri tuz analiz sonuçları

Farklı enzimlerle üretilen keçi peynirlerinde elde edilen % tuz verileri Çizelge 4.12’de gösterilmiştir. Örneklerdeki tuz değerlerindeki farklılık gözlemlenmiş ve bu farkın rennin enzimi ilaveli örnek dışında diğer tüm örneklerde istatistiksel olarak benzer olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Keçi peynirlerinin tuz oranları %2.70 – 2.82 aralığında hesaplanmıştır. Bunun yanı sıra; kontrol grubu dikkate alındığında R enzimi katkılı örneklerin tuz değerlerinin daha düşük, M5, E ve SA 50 pıhtılaştırıcıları ile elde edilen örneklerin tuz oranının yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.12. Keçi peyniri örnekleri için tuz değerleri (%)

Peynir Örnekleri**	Tuz Değerleri (%)
R	2.70 ± 0.03 ^b
K	2.78 ± 0.05 ^a
E	2.79 ± 0.06 ^a
SA 50	2.80 ± 0.06 ^a
M5	2.82 ± 0.04 ^a

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: Cynara Scolymus L. Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim.

Peynirlerde tuzun, peynirin kendine has aromasını elde etmek, kitledeki suyun ayrılmasını sağlamak, mikroorganizma gelişmesini kontrol altında tutarak olgunlaşmayı düzenlemek gibi görevleri vardır. Ayrıca, peynirin su aktivitesi üzerinde ve peynirin olgunlaşma süresi boyunca biyokimyasal reaksiyonların oluşumunda da rol oynadığı bilinmektedir (Kavas, 2011).

Pino vd. (2009), yaptıkları çalışmada; *Cynara Cardunculus* özütü kullanılarak elde edilen bitkisel enzim (PPC) ve hayvansal kaynaklı enzimle (CR) yapılan keçi peynirlerinde olgunlaşma periyodu boyunca yüzde tuz miktarlarını sırası ile

%1.82±0.54 ve %2.20±0.47 şeklinde belirlemiştir. Peynir tebliğinde tuz oranının taze beyaz peynirler için kuru maddede en fazla % 6.5 olabileceği belirlenmiştir. (TGK, 2015). Hayvansal kaynaklı maya kullanılarak elde edilen geleneksel Gökçeada keçi peynirinde tuz %2.84 olarak bulunmuştur. Özellikle geleneksel peynir üretiminde belirli bir standart tuz kullanımının olmadığı ve farklı peynir çeşitlerinde tuz oranının değişken olduğu bildirilmiştir (Hayaloğlu vd., 2013; Yıldız Geren, 2023).

4.6.7. Keçi peyniri toplam azot değeri sonuçları

Peynirlerde toplam azot değerleri hem protein miktarlarının hesaplanmasında hem de proteoliz düzeyinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Kavas, 2011). Çizelge 4.13'te keçi peynirlerindeki toplam azot değerlerine ait sonuçlar yer almaktadır.

Çizelge 4.13. Keçi peyniri örnekleri için toplam azot ve protein değerleri (%)

Peynir Örnekleri**	Toplam Azot (%)
R	2.205 ± 0.105 ^a
K	1.092 ± 0.007 ^b
E	1.057 ± 0.006 ^b
SA 50	1.113 ± 0.007 ^b
M5	1.160 ± 0.002 ^c

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara scolymus* L. Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim.

Peynir örneklerinin toplam azot değerleri istatistiksel açıdan ele alındığında görülmüştür ki, peynir örneklerinin gruplar arasındaki varyasyonu önemlidir (p<0.05). Keçi peynirlerinin toplam azot değerlerinin %1.057 – %2.205 aralığında olduğu, en yüksek toplam azot miktarının rennin enzimi ile üretilen örneklerde (%2.205), en düşük toplam azot değerinin ise E örneğinde (%1.057) olduğu tespit edilmiştir.

Abdeen vd. (2021), tarafından yapılan çalışma verileri baz alındığında; keçi peyniri örneklerine ait hayvansal peynir mayası ile üretilen peynirlerde toplam azot değeri %2.11 düzeyinde belirtilmiştir. Wibowo vd. (2020), hayvansal enzim ve %5, %10 ve %15 konsantrasyonlarındaki bitkisel enzim ile elde ettikleri keçi peynirlerinde üretimden hemen sonra sırasıyla protein değerlerini %20.38, %22.93, %24.44 ve %21.59 olarak tespit etmişlerdir. Kavas (2011), tarafından yapılan bir araştırmada, *Bifidobacterium longum* ve *Lactobacillus paracasei* içeren Ca-alginat mikrokapsüller ile *Bifidobacterium longum* ve *Lactobacillus paracasei* ve fruktooligosakkarit içeren sinbiyotik mikrokapsüller kullanılarak keçi peyniri üretimi gerçekleştirilmiştir. Keçi sütünden üretilen peynirlerde toplam azot değerleri, 1. gün sonunda %2.53 ile %3.07, protein değerleri ise %16.20 ile %19.54 aralığında saptanmıştır. Çalışmada depolama süresi boyunca tüm peynirlerin toplam azot değerleri ve protein miktarında meydana gelen azalmaların, kazeinin enzimatik reaksiyonlarla parçalanması sonucunda gözlenen suda çözünen peptid ve aminoasitlerin salamurağa geçmesi nedeniyle gerçekleştiği gözlenmiştir. Bontinis vd. (2008), hayvansal rennin enzimini kullandığı keçi peynirlerinde olgunlaşma sırasında protein içeriğinin benzer değerlere sahip olduğunu ve önemli bir değişiklik görülmediğini belirtmiştir. Galan vd. (2008), enginar özütünden elde edilen peynirler üzerine yaptıkları çalışmalarında bitkisel kaynaklı enzim miktarındaki artışa bağlı olarak peynirdeki tüm azotlu fraksiyonlar üzerindeki proteolitik etkinin de artış gösterdiğini tespit etmişlerdir.

4.6.8. Keçi peyniri suda çözünür azot değeri sonuçları

Peynirin suda çözünür azot fraksiyonunun, kazein olmayan proteinleri, kazeinden türetilmiş peptitleri, amino asitleri, aminleri veya amonyağı içerdiği bilinmektedir (Hayaloğlu vd., 2011). Suda çözünür azotlu maddeler olgunlaşma sürecinde proteolize bağlı olarak gelişen peynir tekstürü, tat, koku ve yapısı bakımından anahtar rol taşımaktadır (Uzkuç, 2014).

Keçi peynirlerindeki suda çözünen azot değerleri Çizelge 4.14'te verilmiştir. İstatiksel açıdan örneklerin gruplar arasındaki değişiminin önemli olduğu

($p<0.05$) görülmektedir. Farklı özelliklerde enzimlerle üretilen peynirlerin suda çözünen azot değeri %0.098 – 0.349 aralığında saptanmıştır. En düşük suda çözünen azot değeri K örneğinde (%0.098) izlenmiş; en yüksek suda çözünen azot değeri R grubu örneklerde (%0.349) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.14. Keçi peyniri örnekleri için suda çözünen azot değerleri (%)

Peynir Örnekleri**	Suda Çözünen Azot (%)
R	0.349 ± 0.004 ^a
K	0.098 ± 0.001 ^c
E	0.114 ± 0.001 ^b
SA 50	0.122 ± 0.002 ^b
M5	0.133 ± 0.001 ^c

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p<0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim.

Taze olarak üretilen bu çalışmadaki peynirlerde rennin enzimi ile üretilen peynirlerin suda çözünen azot değerlerinin belirgin bir şekilde diğerlerinden fazla olması doğrudan enzimin proteolitik aktivitesi ile ilişkilendirilebilir. Bitkisel kaynaklı süspanse hücre kültür yöntemi ile üretilen enzimlerin peynirlerinin proteolitik aktiviteleri düşük olduğu için bu değerinde daha düşük tespit edilmesine neden olduğu düşünülmektedir.

García vd. (2016), *C. scolymus* özütünün Murciano-Granadina keçi sütü peyniri üzerine etkisinin incelendiği araştırmalarında suda çözünür azot oranı %16.2±0.20 şeklinde tespit etmişlerdir. Kavas (2011), tarafından yapılan çalışmada *Bifidobacterium longum* ve *Lactobacillus paracasei* içeren Ca-alginat mikrokapsülleri içeren peynir ile *Bifidobacterium longum* ve *Lactobacillus paracasei* ve fruktooligosakkarit içeren sinbiyotik mikrokapsülleri içeren keçi peynirlerinde suda çözünen azot değerlerinin, 1. gün sonunda 0.325 ile 0.405 aralığında olduğu tespit edilmiştir. Pino vd. (2009), tarafından yapılan araştırma verileri ışığında, rennin enzimi kullanılarak üretilen keçi peynirlerinde olgunlaşma dönemi boyunca suda çözünür azot miktarının artış gösterdiği ifade

edilmektedir. Sidrach vd. (2005), tarafından değerlendirildiği üzere olgunlaşmanın erken aşamalarında gözlenen suda çözünen azot değerlerindeki hızlı artış, bitkisel enzimlerin kalıntı aktivitesi ile açıklanabilmekte, sinaraz A için maksimum kalıntı aktivitesi, 5.5 ile 6 arasındaki pH değerlerinde meydana gelmektedir. Aynı şekilde, García vd. (2014b), yaptıkları çalışmalarında keçi peynirinde olgunlaşma ilerledikçe çözünür azotun arttığını ifade etmiştir. Peynir yapımında bitkisel pıhtılaştırıcı etkisiyle bağlantılı olarak artış görüldüğünde ifade edilmiştir. Tejada vd. (2008), *C. cardunculus* özü ile üretilen peynirler üzerine yapılan araştırmalarında siprosinin yoğun proteolitik etkisinden kaynaklı olgunlaşmanın erken aşamalarında yüksek suda çözünür azot seviyeleri belirlemişlerdir.

4.6.9. Keçi peyniri olgunlaşma indeksi sonuçları

Farklı enzimlere ait olgunlaşma indeksi sonuçları Çizelge 4.15'te sunulmuştur. Peynir grupları arasındaki farklılığın istatistiksel olarak önemli olduğu sonucuna varılmıştır ($p<0.05$). Keçi peynirlerinde olgunlaşma indeksi değerleri %9.05 – 15.84 aralığında belirlenmiştir. En düşük olgunlaşma indeksi oranı K örneğinde (%9.05) bulunurken; en yüksek olgunlaşma indeksi oranı ise R enzimi ilave edilen örneklerde (%15.84) gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.15. Keçi peyniri örnekleri için olgunlaşma indeksi değerleri (%)

Peynir Örnekleri**	Olgunlaşma İndeksi
R	15.84 ± 0.57 ^a
K	9.05 ± 0.11 ^d
E	10.73 ± 0.07 ^c
SA 50	11.00 ± 0.24 ^c
M5	11.46 ± 0.21 ^b

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p<0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus* L. Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim.

Tejada vd. (2008), tarafından yapılan araştırmalar doğrultusunda suda çözünür azot oranının toplam azota oranı geleneksel olarak peynir için bir “olgunlaşma indeksi” olarak kabul edilmekle birlikte; olgunlaşmanın başında mevcut olan pıhtılaştırıcı enzimlerin ve süt proteazlarının etkisiyle ortaya çıkan kazein hidrolizinin bir göstergesi şeklinde tanımlanmaktadır. Araştırmacılar *C. cardunculus* özü ile üretilen peynirlerde 2 günlük olgunlaşma boyunca olgunlaşma indeksi değerlerini bitkisel enzim ve hayvansal enzim için sırasıyla 18.70 ± 5.84 ve 10.55 ± 1.07 olarak ölçüldüğünü bildirmiştir. Tejada vd. (2008), çalışmasında ortaya çıkan veriler, süspanse hücre kültür yöntemi ile elde edilen enzimlerle üretilen bu çalışmadaki peynirlerin olgunlaşma indeksi verilerinin üstünde tespit edilmiştir. E, SA 50 ve M5 örneklerinin olgunlaşma indeksi değerlerinin R örneğine göre düşük seviyede olması pıhtılaştırıcı enzimlerin ve süt proteazlarının aktivitesiyle ilişkili olup kazein hidrolizinin daha az olmasından kaynaklandığı düşünölmektedir. Peynir çeşidine göre olgunlaşma indeksi %10-60 arasında değişmekte (Renner, 1983), olgunlaşma indeksi %33’ün altında olan peynirler az olgun peynir olarak tanımlanmaktadır (Gün, 2012).

4.6.10. Keçi peyniri renk analizi sonuçları

4.6.10.1. Keçi peyniri L* değerleri sonuçları

Renk, tüketicinin ürünün kabul edilebilirliğini değerlendirdiği, ilk bakışta fark edilen en önemli kalite özelliklerinden biridir (Kajak-Siemaszko vd., 2022). Rennin ve süspanse hücre kültür yöntemi ile üretilen enzimler kullanılarak elde edilen enzimlerle elde edilen keçi peynirlerinin sırasıyla L*, a* ve b* değerleri tespit edilmiştir. Renk koordinatları açısından değerlendirildiğinde; L* parlaklığı [0 (koyuluk) ile 100 (beyaz) arasında değişen] temsil ederken; a* negatif değerler için yeşile ve pozitif değerleri için kırmızıya yönelmekte, bununla beraber; b* değerleri negatif olduğuunda mavi rengi ve pozitif olduğuunda sarı rengi belirtmektedir (Bayram ve Tarakçı, 2020).

Çizelge 4.16’da peynir örneklerinin renk analiz verilerine ait L* değerleri ifade edilmektedir. Peynir örneklerinin gruplar arasındaki L* değerleri için değişiminin

istatistiksel olarak önemli olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Keçi peynirlerinin L^* değeri en düşük R pıhtılaştırıcısı kullanılan örnekte (86.60) en yüksek L^* değeri SA 50 örneklerinde (92.77) tespit edilmiştir. L^* değerlerinin R örneğinde E, K, SA 50 ve M5 örneklerine göre daha düşük oranda olduğu değerlendirilmiştir. Melatonin ilavesi ile hazırlanan kültür ortamındaki enzimden elde edilen (M5) örnek rennin enzimi ile hazırlanan örneğe en yakın olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.16. Keçi peyniri örnekleri için L^* değerleri (%)

Peynir Örnekleri**	L^* Değerleri
R	86.60 ± 0.70^d
K	91.13 ± 2.54^{ab}
E	89.10 ± 0.42^{bc}
SA 50	92.77 ± 0.66^a
M5	88.48 ± 0.11^{cd}

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p<0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus* L. Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 μ M Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 μ M Melatonin içeren enzimi

Benheddi ve Hellal (2019), *Cynara cardunculus* L. özütünden üretilen Jben peyniri araştırmalarında farklı suşlar (*L. lactis subsp. lactis* S7, *L. lactis subsp. lactis* S20, *Lactococcus raffinolactis* S19, *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides* S8, *Lactococcus lactis ssp. lactis* S20) ve süt türlerini (keçi ve inek) incelemişlerdir. Elde edilen peynir numunelerinde L^* (parlaklık) değerinin zamanla arttığı saptanmıştır. Tejada vd. (2007), enginar eksraktı ile yapılan farklı tür peynirlerin, rennin ile yapılanlara göre istatistiksel olarak önemli farklılığının bulunmadığını açıklamıştır. Kajak-Siemaszko vd. (2022), tarafından üç tür peynir çeşidi elde edilmiştir. Bunlar; peynir altı suyu ve rennin enzimi ile üretilen keçi peyniri, *L. brevis* B1 ile elde edilen keçi peyniri ve *L. plantarum* ile üretilen keçi peyniri olup, üretim sonrası L^* değerleri sırasıyla 82.14, 84.60 ve 84.50 şeklinde belirlenmiştir.

4.6.10.2. Keçi peyniri a* değeri sonuçları

Çeşitli enzimler için a* değerlerine ait sonuçlar Çizelge 4.17’de sunulmuştur. Peynir örneklerinin a* renk değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli olarak tanımlanmıştır (p<0.05).

Çizelge 4.17. Keçi peyniri örnekleri için a değeri (%)

Peynir Örnekleri**	a* Değerleri
R	-3.96 ± 0.14 ^c
K	-3.11 ± 0.10 ^b
E	-3.04 ± 0.11 ^b
SA 50	-3.24 ± 0.12 ^{bc}
M5	-2.96 ± 0.04 ^a

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim.

Keçi peynirlerinin a* değerinin -2.96 ile -3.96 aralığında olduğu görülmüştür. Rennin enzimi ilavesiyle elde edilen örneklerde a* değerlerinin diğer örneklerin değerlerinin altında olduğu saptanmıştır. Oluşan farklılıkta rennin enzimi ile peynirin kuru maddesi ve peynirin yapısında tutulan yağ oranının etkili olduğu düşünülmüştür.

Guiné vd. (2016), enginar özütü üzerine yapılan farklı peynir türünde yaptıkları araştırma sonuçlarıyla paralel sonuçlar göstermiştir. Delgado vd. (2011), çiğ keçi sütü ve ticari hayvansal maya kullandıkları peynirlerde *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ve *L. lactis* subsp. *lactis* ile peynirler üretmiştir. Olgunlaşmanın ilk günününe göre peynirlerde a* değerlerinin Ibores peynirinin olgunlaşması boyunca sarılığını kaybettiği gözlemlenmiştir. Kajak-Siemaszko vd. (2022), keçi peynirleri üzerine yaptıkları çalışmalarında üretimden hemen sonrası için a* değerlerinin -1.39 ile -1.97 aralığında belirlendiğini bildirmiştir. Depolama süresince tüm örneklerde bu değerin önemli düzeyde değişmediği de

belirtilmiştir. Araştırmacıların bulguları ile oluşan farklılığın süt özellikleri ve yağ oranları ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

4.6.10.3. Keçi peyniri b* değeri sonuçları

Keçi peynirlerinde b* değerleri için analiz verileri Çizelge 4.18’de gösterilmiştir. Peynirlerin b* (mavi/sarı) değerleri sonucunda örnekler arasındaki fark önemli olmuştur ($p<0.05$). İstatistiksel olarak K, SA 50 ve M5 örneklerinin b* değeri sonuçlarının benzer olduğu izlenmiştir.

Çizelge 4.18. Keçi peyniri örnekleri için b değerleri (%)

Peynir Örnekleri**	b* Değerleri
R	10.21 ± 0.72 ^a
K	3.25 ± 1.26 ^c
E	5.93 ± 0.50 ^b
SA 50	4.25 ± 0.60 ^c
M5	3.72 ± 0.21 ^c

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p<0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: Cynara Scolymus L. Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzimi, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzimi.

Keçi peynirlerinin b* değeri 3.72 – 10.21 aralığında tespit edilmiştir. Rennin enzimi ile üretilen peynirlerin b* değeri diğer örneklerden yüksek, E örneğine diğerlerine kıyasla en yakın belirlenmiştir.

Ramírez-Lopez ve Vélez-Ruiz (2018), inek ve keçi sütünden ürettikleri peynirlerin 1. gününde b* değerlerini 5.14 ile 6.04 aralığında tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Uzkuç vd. (2014), keçi peynirlerinde b* değerinin, peynir kalitesinin belirlenmesinde önemli olduğunu vurgulayarak, depolamanın 1. gününde peynirlerin b* değerlerinde istatistiksel olarak önemli bir farklılık olmadığını belirlemişlerdir. Bu bağlamda, kontrol peynirlerinde (enzim veya kültür ilavesi yapılmaksızın) b* değeri ortalama olarak 7.51±0.01 olarak ifade edilmiştir.

Peynirlerde b^* değerlerindeki zamanla oluşan artış, proteoliz ile ilişkilendirilmiştir (Ramírez-López ve Vélez-Ruiz, 2018). Ayrıca, keçi ve koyun sütünün β -karoten içermediği, sadece retinol ve ksantofiller içerdiği için, keçiler ve koyunlardan elde edilen peynirlerin rengi inek sütü peynirlerine göre daha beyaz algılanmaktadır (Raynal vd., 2008).

4.6.11. Keçi peynirinin tekstür profil analizleri

4.6.11.1. Sertlik değerleri

Farklı enzimlerle üretilen keçi peyniri örneklerine ait sertlik değerleri Çizelge 4.19’da verilmiş olmakla birlikte, istatistiksel sonuçlar incelendiğinde örnekler arasında farkın önemli olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Keçi peynirlerine ait sertlik değerlerinin 18.88 – 97.68 N aralığında tespiti gerçekleştirilmiştir. R örneği diğerleriyle karşılaştırıldığında; K, E, SA 50 ve M5 enzimleri ile üretilen peynirlerde değerlerin daha düşük olduğu izlenmiştir. Ayrıca, M5 grubu örneğinin diğer üretilen örneklerden daha yüksek sertlik değerinde olduğu da ortaya çıkmıştır.

Çizelge 4.19. Keçi peyniri örnekleri için sertlik sonuçları

Peynir Örnekleri**	Sertlik Değerleri (N)
R	97.68 $\pm$ 8.47 ^a
K	21.01 $\pm$ 0.11 ^c
E	18.88 $\pm$ 0.06 ^c
SA 50	30.26 $\pm$ 0.67 ^{bc}
M5	55.10 $\pm$ 3.73 ^b

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p<0.05$)

**R: Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 μ M Salisilik asit içeren enzimi, M 5: 5 μ M Melatonin içeren enzimi.

García, vd. (2016), *C. scolymus* enzim etkisini Murciano-Granadina keçi sütü peynirlerinde değerlendirmek üzere yaptıkları araştırmalarında, 15 günlük depolama koşulları altında peynirlerin sertlik değerini 7.7 $\pm$ 0.3 N şeklinde rapor etmişlerdir. García vd. (2014b), *Cynara cardunculus* özütünün Murciana-

Granadina keçi sütü peyniri üzerine etkisinin inceledikleri araştırmalarında örnekler için 1. gün olgunlaşma boyunca sertlik verileri 5.09 – 7.20 N aralığında saptanmıştır.

Proteaz kaynaklı bitki ekstraktı ile yapılan peynir daha homojen olup; hayvansal kaynaklı maya ile elde edilen peynir yapıları ile mukayese edildiğinde daha yumuşak yapıya sebep olmuştur (Waheed vd., 2017). Bitkisel enzimlerle elde edilen peynirlerde gözlenen bu yumuşak yapının del Rocío Martínez-Ruiz vd. (2013), tarafından bildirdikleri çalışmada peynirlerin su içeriği ve proteoliz sebebiyle gerçekleştiği ileri sürülmüştür. Benzer şekilde Dimitreli ve Thomareis (2007), örneklerin daha sert şekilde elde edilmesinin nedenini üç boyutlu protein matrisi içindeki su moleküllerinin ağ yapısını zayıflatması, böylece su içeriği azaldığında matris proteininin kıvamının artmasına neden olması şeklinde yorumlamışlardır. Bu çalışmada bitkisel kaynaklardan sağlanan dokuların süspanse hücre kültür yöntemi ile elde edilen enzimlerle üretilen peynirlerde protein yapısının rennin enzimi ile üretilen peynir örneğine oranla su moleküllerini daha fazla tuttuğunu ve yapının rennin enzimine göre daha yumuşak olmasına neden olduğunu söyleyebiliriz. Rennin enzimi ile üretilen peynirdeki sertliğe en yakın sonucu süspanse hücre kültür ortamına melatonin ilavesi elde edilen enzimin verdiği de görülmektedir.

4.6.11.2. Dış yapışkanlık değerleri

Keçi peyniri örneklerinde dış yapışkanlık verileri Çizelge 4.20’de sunulmuştur. Yapılan istatistiksel değerlendirmede örnekler arasında önemli bir farklılığın olduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$). Keçi peyniri örneklerinin dış yapışkanlık oranlarının -12.37 – -28.09 Ns aralığında saptandığı görülmektedir. Enzimlerin dış yapışkanlık üzerine etkisine bakıldığında; R peynir örneğinin (-28.09 Ns) en yüksek değerde olduğu belirlenirken, diğer peynir örneklerinin birbirine benzer sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.20. Keçi peyniri örnekleri için yapışkanlık sonuçları

Peynir Örnekleri**	Dış Yapışkanlık Değeri (Ns)
R	-28.09 ± 1.38 ^a
K	-12.37 ± 0.07 ^b
E	-13.89 ± 0.65 ^b
SA 50	-12.47 ± 2.24 ^b
M5	-14.33 ± 2.18 ^b

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim.

García vd. (2016), tarafından yapılan çalışmada, *C. scolymus* ile üretilen Murciano-Granadina keçi sütü peynirinin dış yapışkanlık değerleri 15 günlük depolama için -1.9 ± 3.6 Ns şeklinde gözlenmiştir. Hatipoğlu ve Çelik (2020), peynirlerde lipoliz sonucu yağ oranının azalması ile yapışkanlık değerinin de azaldığını, ayrıca yapışkanlığın peynirin asitliği, proteoliz düzeyi, protein ve yağ fraksiyonlarının polar karakteristikleri ile ilişkili olduğunu bildirmektedir. Bu çalışmada değerlendirilen farklı enzimlerle üretilen peynirlerde dış yapışkanlık açısından rennin enzimi ile üretilen peynir hariç diğer enzim grupları için benzer etkilerin görüldüğü anlaşılmaktadır. Dış yapışkanlık için bu benzerlik ya da rennin enzimi için görülen bu farklılığın peynirlerin nem içeriği ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Nitekim Abdeen vd. (2021), bitkisel ve hayvansal enzimlerle ürettiği peynirlerde elde edilen dış yapışkanlık için farklı sonuçları benzer şekilde nem içeriği ile ilişkilendirmiştir. Gürkaynak (2023), tarafınca yapılan araştırma süresince, süt protein konsantresi, yağsız süt tozu, peynir altı suyu protein konsantresi olmak üzere farklı süt tozları kullanılarak yapılan labne peynirlerinde raf ömrünün başlangıcında taze süt tozu ile hazırlanan örneklerde dış yapışkanlık değerleri -4.08 ile -13.19 mJ aralığında değişmiştir. Aydınol Sönmez (2019) tarafından yapılan Labne peynirlerine ait çalışmada depolamanın birinci günü protein katkılı yağı azaltılmış Labne peynirlerine ait dış yapışkanlık değerleri -11.08 ile -106.64 (N.s) aralığında olup, diyet lifi katkılı yağı azaltılmış Labne peynirlerinde ise dış yapışkanlık değerleri -8.33 ile -33.16 (N.s) aralığında değişim göstermiştir.

4.6.11.3. Esneklik değerleri

Farklı enzim türlerinden elde edilen keçi peyniri numuneleri esneklik düzeyleri Çizelge 4.21’de verilmiştir. Örnekler arasında istatistiksel olarak esneklik değerleri bakımından herhangi bir farklılık elde edilmemiştir. Keçi peyniri numunelerine ait esneklik değerleri 1.08 – 1.74 aralığındadır.

Çizelge 4.21. Keçi peyniri örnekleri için esneklik değeri sonuçları

Peynir Örnekleri**	Esneklik Değerleri
R	1.08 ± 0.10 ^b
K	1.45 ± 0.47 ^a
E	1.46 ± 0.23 ^a
SA 50	1.45 ± 0.05 ^a
M5	1.74 ± 0.74 ^a

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzimi.

Esneklik, ilk sıkıştırma işleminden sonra incelenen örneğin ilk haline geri dönme oranı olarak ifade edilmektedir (Tulukoğlu vd., 2020). Kısaca peynirin ısırılma işlemi aşamasında ilk şekline geri dönme ölçüsü olarak ifade edilebilir (Zheng vd., 2016).

Abdeen vd. (2021), keçi peyniri numunelerinde gözlemledikleri esneklik değeri 0.641 – 0.742 aralığında saptanmış, hayvansal enzim kullanılarak elde edilen peynirlerde esneklik değeri 0.667 şeklinde ortaya çıkmıştır. García vd. (2014b), tarafından yapılan araştırmada birincil proteolizden sorumlu pıhtılaştırıcıdan kaynaklı protein zincirlerinin gevşeyerek peynirde esnekliği arttırdığı bildirilmiştir. Benzer proteolitik aktivite gösterdiği gözlenen süspanse hücre kültür yöntemi ile elde edilen enzimlerde benzer esneklik verileri elde edilmiştir.

4.6.11.4. İç Yapışkanlık

Keçi peynirlerinin farklı enzim türleri ile elde edilmesi sonucu belirlenen iç yapışkanlık değerleri Çizelge 4.22’de ifade edilmiştir. İncelenen örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). Peynirlerin iç yapışkanlık değerleri incelendiğinde; R peynir örneği (0.39) en düşük değerde olup; SA 50 ve M5 enzimi ile elde edilen peynir örneği (0.93) ise en yüksek değerde izlenmiştir.

Çizelge 4.22. Keçi peyniri örnekleri için iç yapışkanlık sonuçları

Peynir Örnekleri**	İç Yapışkanlık Değerleri
R	0.39 ± 0.27^b
K	0.89 ± 0.25^a
E	0.89 ± 0.02^a
SA 50	0.93 ± 0.06^a
M5	0.93 ± 0.08^a

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p<0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 μ M Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 μ M Melatonin içeren enzimi.

İç yapışkanlık, peynirin çiğneme ile parçalanmadan önceki deformasyon miktarı ya da peynirin 3 boyutlu protein-yağ matriksinin oluşumunda görev alan iç bağların kuvvetini göstermektedir (Karaman ve Akalın, 2013; Ahmed vd., 2016). Başka bir ifadeyle, iç yapışkanlık ürünün partiküllerinin birbirine yapışma fonksiyonu olarak bilinmekle beraber, depolama süresine bağlı olarak değişmektedir (Esen vd., 2020).

García vd. (2014b), Murciano-Granadina keçi sütü, *Cynara cardunculus* özütü ve üç tip ticari starter ile elde ettikleri peynir yapılarında 1. gün olgunlaşma için iç yapışkanlık miktarları 0.320 – 0.48 şeklinde ortaya çıkmıştır. Aldiab (2021), tarafından yapılan araştırmada inek sütüyle birlikte *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* karışımındaki kültürden %3 olacak şekilde eklenerek; tuz, kırmızı pul biber ve nane ilavesiyle labne peynirleri elde edilmiştir. Peynir örneklerinin 1 günlük depolama koşullarında iç yapışkanlık

değerleri 0.55 - 0.89 g olarak belirlenmiştir. Bu bağlamda, elde edilen bulgular Aldiab (2021) verileriyle uyumlu olup, García vd. (2014b), değerlerinden daha yüksek bulunmuştur. Delgado vd. (2011), peynir örneklerinde lipoliz ve proteoliz seviyelerinde gözlenen artışla beraber iç yapışkanlık değerinde azalma olduğunu bildirmiştir. Ayrıca Çelebi ve Şimşek (2020), yaptıkları çalışmalarında peynirlerin nem içeriği ile iç yapışkanlık miktarları arasında pozitif yönde bir korelasyon olduğunu belirtmişlerdir.

4.6.11.5. Sakızımsılık

Sakızımsılık, peynir örneğinin yutmaya hazır hale gelmesi esnasında parçalanması için gereken enerji miktarı şeklinde bildirilmiştir. Sertlik ve iç yapışkanlık verilerinin çarpımı ile hesaplanması sebebiyle sertlik ve iç yapışkanlığı etkileyen parametrelerin sakızımsılık değerini de etkilediği bilinmektedir (Aydemir ve Kurt, 2020).

Peynir örneklerinin sakızımsılık değerleri Çizelge 4.23'te sunulmuştur. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu kanısına varılmıştır ($p < 0.05$). Sakızımsılık için en yüksek değerin R örneklerine (114.25) ait olduğu görülmekle beraber, en düşük miktar ise SA 50 (16.23) pıhtılaştırıcılarına aittir.

Çizelge 4.23. Keçi peyniri örnekleri için sakızımsılık değerleri

Peynir Örnekleri**	Sakızımsılık Değerleri
R	114.25 ± 19.02 ^a
K	16.57 ± 0.67 ^{bc}
E	20.73 ± 0.67 ^b
SA 50	16.23 ± 0.65 ^{bc}
M5	17.96 ± 0.69 ^{bc}

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p < 0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim.

Medina ve Nunez (2017), tarafından da ifade edildiği üzere, hayvansal enzim kaynaklı keçi peynirlerinde sakızımsılık değeri 90 günlük depolama sürecinde 7.4 değerine ulaştığı bildirilmiştir. Abdeen vd. (2021), yaptıkları analiz sonuçları doğrultusunda keçi peynirlerinde sakızımsılık değerlerini 2.513 – 2.726 aralığında rapor etmişlerdir. Peynir tekstürü üzerinde etkili olan en önemli maddelerin başında üretimde kullanılan enzim çeşidi, enzimin konsantrasyonu, mayalama sıcaklığı ve pıhtılaşma süresi olduğu ifade edilmektedir (Esteves vd., 2003; Eren-Vapur ve Ozcan, 2012). Koyun, keçi ve inek sütü Beyaz peynirleri üzerine yapılan tekstür verilerinin incelendiği bir çalışmada, keçi sütü peynirlerinin sakızımsılık değerlerinin inek sütü peynirlerinden daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Ayrıca düşük pH değerindeki peynirlerin, özellikle kazein izoelektrik noktasına yakın olanların, yüksek sakızımsılık değerleri verdiği pH değeri yükseldikçe peynirlerin daha plastik bir yapı göstermeye başladığı Bhaskaracharya ve Shah (2001), tarafından ifade edilmiştir. Bir diğer sakızımsılık üzerine etkili parametre ise peynirlerin nem içeriğidir. Buriti vd. (2005), yüksek başlangıç neminin peynir matriksini yumuşatarak protein ağını zayıflattığını bildirmiştir. Rennin enzimi ile üretilen peynirlerin diğer örneklerle oranla daha yüksek nem içermesi ve örneklerin pH değerleri arasındaki farklılıkların sakızımsılık değerleri üzerinde etki ettiği ve farklılıklara sebep olduğunu düşündürmüştür.

4.6.11.6. Çiğnenebilirlik

Farklı enzim örnekleri ilavesi ile üretilen keçi peynirlerinin çiğnenebilirlik sonuçları Çizelge 4.24'te gösterilmiştir. Rennin enzimi ile üretilen peynir örneği dışında diğer peynir örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmadığı gözlenmiştir. R örneği (100.30) en yüksek çiğnenebilirlik değerine sahipken; en düşük çiğnenebilirlik değerine ise M5 grubu (13.95±0.70) örneğinde ulaşılmıştır.

Çizelge 4.24. Keçi peyniri örnekleri için çiğnenebilirlik sonuçları

Peynir Örnekleri**	Çiğnenebilirlik
R	100.30 ± 6.98 ^a
K	15.67 ± 0.05 ^{bc}
E	15.04 ± 0.37 ^{bc}
SA 50	18.05 ± 0.19 ^b
M5	13.95 ± 0.70 ^{bc}

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim.

Garcia vd. (2014b), Murciano-Granadina keçi sütü, *Cynara cardunculus* ekstraktının keçi peyniri özelliklerine etkisi üzerine yaptıkları araştırmalarında 1 günlük olgunlaşma aşamasında çiğnenebilirlik verileri 22.97 – 38.40 aralığında bulmuşlardır. Rosario vd. (2023), tarafından vurgulandığı şekilde; çiğnenebilirlik değerleri sertlik değerleriyle uyum içerisinde olup; kazeinlerin su tutma kapasitesinin azalmasıyla sertlik değeri artmakta, bu durum da pıhtının çiğnenebilirlik değerlerini artırmaktadır. Bu nedenle R örneğinin diğer örneklerden daha yüksek sertlik değerinde olması ve kazein yapısındaki düşük su kapasitesinden kaynaklı çiğnenebilirlik seviyesi daha yüksek olarak tespit edilmiş olabileceği düşünülmüştür.

4.6.11.7. Elastikiyet değeri

Örnekler için yapılan tekstürel analizler kapsamında elastiklik değerine ait veriler Çizelge 4.25'te ifade edildiği gibidir. İstatistiksel olarak bitkisel kaynaklardan elde edilen enzimler benzer özellikler gösterirken, rennin enzimi ile üretilen peynirlerin elastiklik değerleri önemli derecede farklı tespit edilmiştir (p<0.05). Elastikiyet değerlerinin örneklerde 0.08 – 0.51 aralığında olduğu saptanmıştır. En düşük değer R örneğinde 0.08 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.25. Keçi peyniri örnekleri için elastikiyet değeri sonuçları

Peynir Örnekleri**	Elastikiyet değeri
R	0.08 ± 0.04 ^b
K	0.51 ± 0.43 ^a
E	0.38 ± 0.26 ^a
SA 50	0.31 ± 0.03 ^a
M5	0.30 ± 0.20 ^a

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

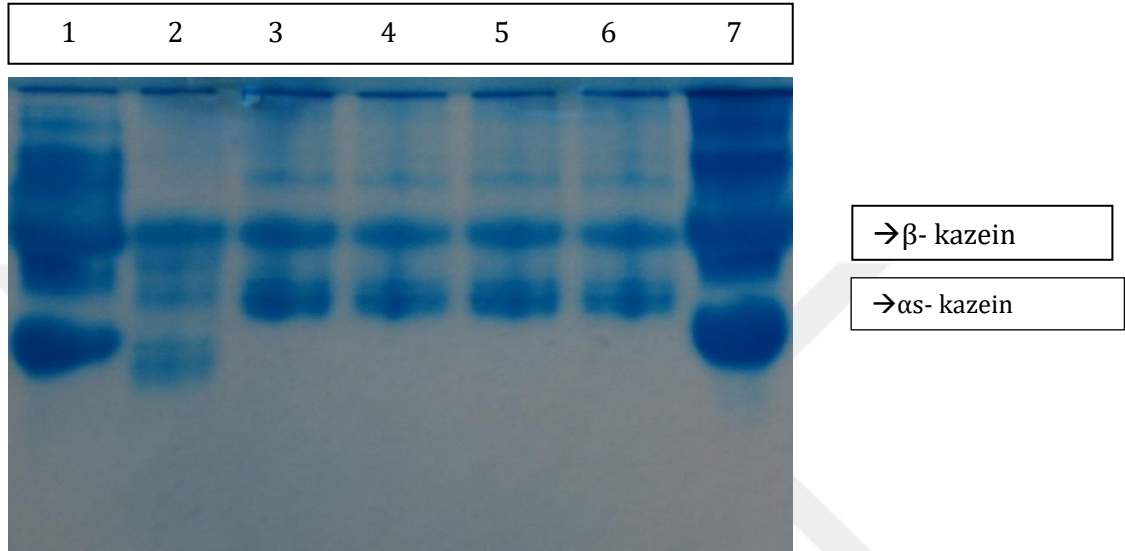
**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim.

Elastikiyet değerlerinin farklı baharatlarla üretilen Beyaz peynirlerde 0.07±0.01 ile 0.28±0.18 arasında değişim gösterdiği bildirilmiştir (Deveci, 2016). Abd El-Montaleb vd. (2022), ultrafiltrelenmiş manda sütünden elde ettikleri Labne peynirlerinde yaptıkları çalışmada, numunelerinin hazırlanması için brokoli ezmesi %5, %10 ve %15 oranlarında eklenirken, kontrol numunesi brokoli eklenmeden hazırlanmıştır. Tüm numunelere %3 *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus casei* ile aşılansmıştır. Bir haftalık depolama süresince Labne peynirlerinin elastikiyet değerleri 0.27 – 0.65 mm aralığında bulunmuştur. Ancak Van Hekken vd. (2007), vurguladığı üzere peynirin yağ ve protein miktarının numunelerin dokusunu etkilediği bildirilmiştir. Yıldırım (2017), peynirde gerçekleşen biyokimyasal olayların (süt asidindeki artış, lipoliz ve proteolizin) peynirin esnekliğinin azalmasına sebep olduğunu bildirmektedir.

4.6.12. Keçi Peynirlerinin Üre-Page Analizi Sonuçları

Keçi sütü peynirlerinin Üre-PAGE elektroforetogramları Şekil 4.5'te gösterilmektedir. Çizelge 4.26'da Keçi peyniri üre-page jeli için kazein oranları sunulmuştur. Adı geçen çizelge incelendiğinde bitkisel kaynaklı enzimlerle üretilen peynirlerin kendi aralarında αs-kazeinler (αs-CN) ve β-kazein (β-CN) ve diğer parçalanma ürünleri arasında istatistiksel olarak önemli (p<0.05) farklılıklar görüldüğü tespit edilmiştir. Peynirlerde αs-kazein oranı %42.06 ile %45.90 aralığında tespit edilmiştir. Rennin enzimi ile üretilen peynirde αs-CN'in

%23.46 gibi diğer peynirlerden oldukça farklı bir oranda belirlenmiştir. β -CN içeriği bakımından M5 örneğinin (%28.40) ve SA 50 (%31.36) örneğinin diğer örneklerle kıyasla daha yüksek düzeyde bir indirgenme meydana getirdiği gözlenmektedir. γ -CN ve diğer kazeinlerin oranı da bu indirgenme düzeyini destekler niteliktedir.



Şekil 4.5. Farklı enzimlerle keçi sütünden üretilen peynirlerin üre-page görünüşleri (1. Na kazeinat standardı, 2. Rennin enzimi, 3. Enginar, 4. Kontrol 5.M5, 6. SA 50 7. Na kazeinat standardı)

Çizelge 4.26. Keçi peyniri üre-page jel kazein parçalanma oranları (%)

	α s - kazein	β - kazein	γ - kazein ve diğer peptitler
R	23.46 $\pm$ 2.03 ^c	20.53 $\pm$ 1.31 ^c	56.01 $\pm$ 2.77 ^a
K	45.90 $\pm$ 0.30 ^a	34.40 $\pm$ 0.50 ^a	19.70 $\pm$ 0.40 ^d
E	43.20 $\pm$ 0.60 ^{ab}	33.80 $\pm$ 0.30 ^a	23.00 $\pm$ 1.25 ^c
SA 50	43.93 $\pm$ 0.61 ^{ab}	31.36 $\pm$ 0.61 ^{ab}	24.70 $\pm$ 0.80 ^c
M5	42.06 $\pm$ 0.20 ^b	28.40 $\pm$ 1.25 ^b	29.53 $\pm$ 2.05 ^b

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 μ M Salisilik asit içeren enzimi, M 5: 5 μ M Melatonin içeren enzimi.

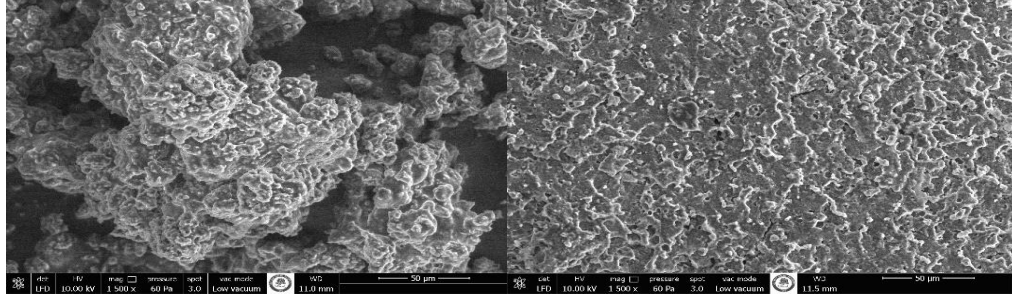
Almeida vd. (2015), farklı sütler kullanarak (koyun, keçi) *Cynara cardunculus* çiçeklerinden yararlanarak rekombinant enzim teknolojisi yardımı ile enzimin özelliklerini inceledikleri çalışmalarında, α s-CN ve β -CN'in her ikisinin de üretilen enzimle başarılı bir şekilde indirgendiğini, ilk 72 saat süresince kademeli olarak

indirgenmenin SDS-PAGE ile takip edildiğini bildirmişlerdir. Bitkisel kaynaklardan elde edilen enzimlerin peynirlerde acılaşma üzerine önemli etkiler yarattığı ve bu acılaşmanın enzimin kazein üzerinde meydana getirdiği indirgenme nedeni ile oluştuğu üzerine çalışmalar bulunmaktadır (Sousa ve Malcata, 1997; 2002; Roseiro vd., 2003; Agboola vd., 2004).

Keçi peyniri üretiminde *C. cardunculus*'dan elde edilen proteaz ve rennin enziminin proteoliz düzeylerinin incelendiği bir çalışmada, bitki enzimleri için olgunlaşma sırasında özellikle α -kazeinlerde hızlı bir hidroliz görüldüğü bildirilmiştir (Tejada vd., 2008; Pino vd., 2009). Ancak bu çalışmada gerek enzim üretim yöntemlerinden gerekse enginar türünün farklı olmasından dolayı hidroliz olayı β -kazein üzerinde daha belirgin bir şekilde gerçekleşmiştir. Rennin enzimi ile gerçekleşen indirgenme düzeyi ile süspanse hücre kültürü yöntemi ile üretilen enzimler arasında α -CN için yaklaşık iki kat düzeyinde bir fark tespit edilmiştir. Süspanse hücre kültürü örnekleri arasında ise benzer sonuçlar gözlenmiştir.

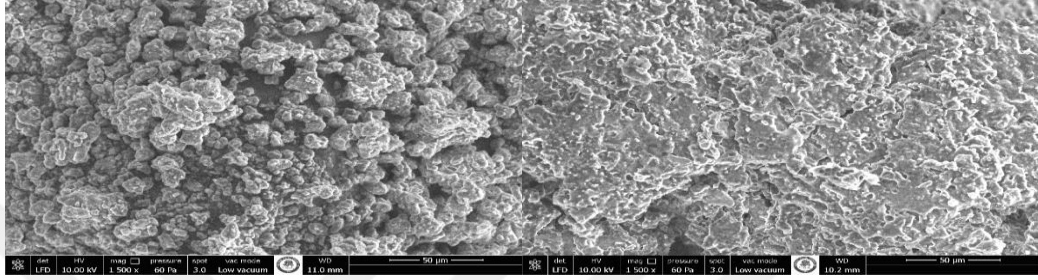
4.6.13. Keçi Peynirlerinin SEM analizi

Peynirin özelliklerinin belirlenmesi ve depolama sırasında çeşitli bileşenlerin etkileşim ilişkilerinin anlaşılması peynir mikroyapısının incelenmesi ile daha iyi anlaşılabilir (El-Bakry ve Sheehan, 2014). Şekil 4.6'da farklı enzimler ile üretilen peynirlerin SEM mikrografları gösterilmiştir.



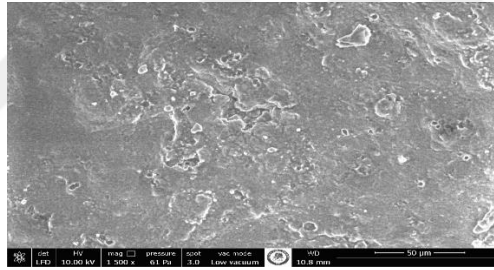
a)

b)



c)

d)



e)

Şekil 4.6. Keçi peynirlerinin SEM mikrofrafı (x 1500) a) R:Rennin enzimi, b) K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim c) E: *Cynara scolymus* L. Kallus yapısından elde edilen enzim, d) SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, e) M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim ile üretilen keçi peynirlerine ait SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) görüntüleri

Rennin enzimi ilavesi ile üretilen keçi peynirlerinde (Şekil 4.5a) bir arada topaklaşmış kazein kümeleri göze çarpmaktadır. Benzer yapılar E örneğinde de kısmen gözlenmektedir (c). Şekil 4.5’de verilen diğer örneklerin (b, d, e) daha homojen görünümde bir kazein matriksine sahip olduğu ve daha az kümeleşme oluşturduğu gözlenmektedir.

Tavaria vd. (2001), peynirlerde pıhtı boyunca eşit olmayan daha kısa açık alanlara sahip daha kapalı bir mikro yapı göstermiş yapılar bulunduğunu

bildirmiştir. Ayrıca, peynir protein ağı içinde büyük boşluklar tespit etmiştir. Peynirlerin bu mikroskobik gözlemlerinin, çok heterojen bir matris ortaya koyduğu da belirtilmiştir. Parker vd. (1998), enginar eksrakı içeren farklı tür peynirlerde benzer şekilde; peynirlerde yağ kristallerinin mevcut olduğunu belirterek, özellikle peynirin dış bölgesine uzanan çatlaklar halinde genellikle pıhtı birleşme çizgisini takip ederek bakteriler tarafından kolonize edildiğinden söz etmiştir.

4.6.14. Mikrobiyolojik Analizler

4.6.14.1. Toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı

Keçi peynirlerine ait toplam aerobik mezofilik bakteri sayım (TMAB) değerleri Çizelge 4.27’de verilmiştir. Peynir örneklerinin gruplar arasındaki TMAB sayısı değerlerinin istatistiksel farkının önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Olgunlaşmanın 1. günü keçi peynirlerinin aerobik bakteri sayısı aralığı 2.75 – 8.34 log kob/g olarak belirlenmiştir. En düşük bakteri sayısına SA 50 enzimi içeren örnekte (2.75 log kob/g) rastlanmış, en yüksek bakteri sayısı ise R örneğinde (8.34 log kob/g) tespit edilmiştir. Bitkisel kaynaklardan süspanse hücre kültür yöntemi ile elde edilen enzimlerin sonuçlarının birbirine yakın olduğu gözlenmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda bitkisel kaynaklı enzimle üretilen peynirlerin TMAB sayılarının rennin enzimi ile üretilen peynirlerden çok düşük olduğu da görülmektedir. Ayrıca en düşük TMAB sayısı sonuçları salisilik asit ilavesi ile üretilen enzimlerin peynirlerinden elde edilmiştir.

Çizelge 4.27. Keçi peyniri örnekleri için Toplam Aerob Mezofilik Bakteri sayısı sonuçları (log kob/g) (n=3)

Peynir Örnekleri**	Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri Sayısı (log kob/g)
R	8.34 ± 0.05 ^a
K	3.24 ± 0.55 ^b
E	3.17 ± 0.09 ^b
SA 50	2.75 ± 0.04 ^c
M5	2.81 ± 0.11 ^c

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzimi.

Bu çalışmada elde edilen toplam aerobik bakteri verileri arasındaki farklılıkların özellikle sıvı kültür elde etme yöntemleri sırasında kullanılan kimyasallarla ve salisilik asit ile ilişkili olabileceği düşündürmüştür.

Lahrech vd. (2018), keçi sütünün *Cynara cardunculus* ile pıhtılaşması üzerine yaptıkları araştırma sonuçlarına göre enginar ekstraktı ile hazırlanan Arbia keçisi sütü peynirlerinde 2.10×10^4 kob/g ve 2.31×10^4 kob/g sayısı ile iyi bir mikrobiyolojik kalite sergilediği gösterilmiştir. Benheddi ve Hellal (2019), enginar *Cynara cardunculus L.* özütü içeren keçi peyniri çalışmasına göre üretilen peynirlerde Toplam Aerob Mezofilik Bakteri sayısı 24 h depolama sonucunda < 30 kob/g, 1 haftalık depolama sonrası ise 189 kob/g olarak tespit edilmiştir. Roseiro vd. (2003), enginar özütü içeren peynir üzerine yaptıkları çalışmaları sırasında farklı örnek gruplarında 8.6×10^6 ve 1.4×10^5 cfu·mL⁻¹ şeklinde sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada *Cynara scolymus L.*'nin baş kısımlarındaki bağlı ve serbest fonelik bileşiklerin Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğu gözlenmiştir. Bağlı fenoller Gram negatif bakterilere karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu 312 ve 486 µg/ml ve Gram pozitif bakterilere karşı 486 µg/ml aralığında iken, enginarın baş kısmındaki serbest fenollerin, Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizmalar için en düşük minimum inhibisyon konsantrasyonu (204 ile 206 µg/mL) gösterdiği belirtilmiştir (Gaafar ve Salama, 2013). Yapılan başka bir çalışmada bitkisel enzimlerde kaba ekstrakt aşamasında kullanılan sodyum sitratın antimikrobiyal

etkileri, (aşılanmış beyin kalp infüzyonu) sıvı besiyerinde ve dana kıymada Toplam Aerobik Bakteri sayısı, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus*'un azaltılması açısından değerlendirilmiş, %4.8 sodyum sitrat içeren BHI sıvı besiyerindeki *E. coli*, kontrole kıyasla 4 güne kadar 3-4 log cfu/mL kadar önemli ölçüde azalma gösterdiği belirtilmiştir ($p<0.05$). Dana Kıymaya %4,8 ile sodyum sitrat uygulaması Toplam Aerobik Bakteri sayımı ve *E. coli* 'yi sırasıyla 2.1 ve 2 log cfu/g oranında belirgin şekilde azaltmıştır (Ryu ve Fung, 2010).

4.6.14.2. Laktokokların sayısı

Çizelge 4.28'de hayvansal ve bitkisel enzimlerin keçi peynirinin Laktokok bakterileri sayım sonuçları yer almaktadır. Örnekler arasındaki laktokok sayısı farkı istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$). Peynirler de depolamanın 1. gününde, Laktokok sayısı 2.36 – 8.32 log kob/g aralığında belirlenmiştir. En düşük laktokok bakteri sayısı SA 50 örneğinde (2.36 log kob/g) saptanmış olup, en yüksek Laktokok bakteri sayısı R örneğinde (8.32 log kob/g) tespit edilmiştir. Bu çalışmada salisilik asit ve melatonin ilavesinin ayrıca kültür oratmı hazırlanırken kullanılan kimyasalın bakteri sayıları üzerinde olumsuz yönde önemli düzeyde etkili olduğu da gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.28. Keçi peyniri örnekleri için Laktokok bakteri sayısı sonuçları (log kob/g) (n=3)

Peynir Örnekleri**	Laktokok sayısı (log kob/g)
R	8.32 ± 0.02 ^a
K	3.07 ± 0.14 ^b
E	2.71 ± 0.02 ^c
SA 50	2.36 ± 0.16 ^d
M5	2.58 ± 0.16 ^c

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p<0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzimi, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzimi.

Öner ve Sarıdağ (2019), tarafından yapılan araştırmada olgunlaşmanın 1. gününde hayvansal maya kullanılarak üretilen keçi beyaz peynirlerinin Laktokok bakteri sayısı 7.39 ± 0.28 log kob/g olarak belirlenmiştir. Olgunlaştırılmış peynirlerdeki en önemli mikroorganizma grubu laktik asit bakterileridir (LAB). Hayvansal rennet katkılı keçi peynirlerinde 6. gün depolama koşullarında LAB sayısı 8.58 log kob/g olarak tespit edilmiştir (Kováčová vd. 2021). Süspansiyon hücre kültürlerinde kaba ekstrakt aşamasında kullanılan Sodyum sitratın *Streptococcus pneumoniae*'ye ve *Fusobacterium nucleatum* ve *Streptococcus mutans* gibi çeşitli oral bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu, ayrıca %4 konsantrasyondaki sodyum sitratın, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*'nin biyofilm oluşumunu engellediği ifade edilmiştir. Bununla birlikte; *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı %4 ve %5 konsantrasyonlarında antibiyofilm ve antivirölans aktiviteleri değerlendirilmiş; sodyum sitratın bakteriyel biyofilm oluşumunu önemli ölçüde inhibe ettiği görülmüştür (Khayat vd., 2022). Bununla beraber, sodyum sitratın (%4) *Klebsiella pneumoniae* biyofilmlerinin oluşumunu %46.5 oranında engelleyebildiği rapor edilmiştir [Chu vd., 2020].

4.6.14.3. Laktobasil bakteri sayısı

Farklı tür enzimlerden elde edilen keçi peynirlerine ait laktobasil sayısı Çizelge 4.29'da ifade edilmiştir. Örneklerde gruplar arasındaki istatistiksel farklılık laktobasil sayısı için önemli olarak belirlenmiştir ($p < 0.05$). Keçi peynirlerinin en düşük Laktobasil sayısı M5 grubu enzimi örneğinde (2.60 log kob/g) gözlenerek; en yüksek laktobasil sayısı ise R pıhtılaştırıcı örneğinde (7.78 log kob/g) tespit edilmiştir. Çalışmada süspanse kültür ortamı ve kullanılan salisilik asitin ve melatonin ilavesinin laktobasiller üzerinde negatif yönde bir etki gösterdiği istatistiksel olarak da gözlenmiştir. Salisik asitin antimikrobiyel etkisi diğer gıdalarda incelenmiştir. Konu ile ilgili olarak köfte üzerine yapılan bir araştırmada, bakteri içeriğinin kontrol örneğine göre 2 log kadar azaldığı görülmüştür (Demirhan ve Kasap, 2019). *Cynara scolymus* yaprakları ve başlarının mono ve dikaffeoilkinik bileşiklerle flavonoidler açısından zengin olduğu bununla birlikte, *C. scolymus* yaprağı, başı ve sapından alınan CHCl_3 , EtOH

ve EtOAc bölümlerinin mantarlar için minimum inhibisyon değerlerinin 2.5 mg/ml veya altında iken, bakteriler için ise 2.5 mg/ml veya üzerinde olduğu ifade edilmiştir (Kukic vd., 2008). Mossi ve Echeverrigaray (1995), 5 mg/ml konsantrasyondaki CH₂Cl₂ *C. scolymus* yaprak ekstraktının *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ve *B. subtilis* üzerinde bakterisidal etki ile büyümeyi tamamen inhibe ettiğini bulmuşlardır.

Çizelge 4.29. Keçi peyniri örnekleri için Laktobasil sayısı sonuçları (log kob/g) (n=3)

Peynir Örnekleri**	Laktobasil (kob/g)
R	7.78 ± 0.02 ^a
K	3.01 ± 0.08 ^b
E	3.11 ± 0.18 ^b
SA 50	2.70 ± 0.11 ^c
M5	2.60 ± 0.13 ^c

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: Cynara Scolymus L. Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim.

Öner ve sarıdağ (2019), yaptıkları araştırma sonuçlarına göre; olgunlaşmanın 1. gününde hayvansal maya kullanılarak üretilen keçi beyaz peynirlerinin 6.88 log kob/g olan laktobasil sayısı olgunlaşma boyunca artış göstermiştir. Nasr (2017), tarafından yapılan çalışmada pıhtılaştırıcı tipinin, beyaz peynirin Laktobasil sayısını önemli ölçüde etkilemediği gözlenmiş, bununla birlikte; bitkisel enzim ve rennet kullanılarak yapılan keçi peynirlerinde laktobasil sayısı sırasıyla 12.35 log kob/ml ve 11.87 log kob/ml olarak kaydedilmiştir.

4.7. Koyun Peyniri Analiz Sonuçları

Seçilen enzimlerin koyun sütünü pıhtılaştırma kabiliyeti değerlendirilerek, üretilen peynirin özelliklerine enzimin etkileri bu bölümde değerlendirilmiştir. Elde edilen koyun peynirlerine ait görünüm Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7. Farklı enzimlerle üretilen Koyun peynirlerinin fotoğrafları (A. Rennin enzimi, B. Kontrol, C. Enginar D. M5, E. SA 50)

4.7.1. Çiğ koyun sütü analiz sonuçları

Koyun sütüne ait pH, titrasyon asitliği (% Laktik asit; LA), yağ (%), kuru madde (%) ve özgül ağırlık (g/cm^3) değerleri Çizelge 4.30’da görülmektedir.

Çizelge 4.30. Çiğ koyun sütünün bazı fizikokimyasal analiz sonuçları (n:3)

Kimyasal Analizler	Ortalama $\pm$ SS
pH	6.52 $\pm$ 0.05
Titrasyon asitliği (%LA)	0.19 $\pm$ 0.01
Yağ (%)	6.00 $\pm$ 0.36
Kuru Madde (%)	17.08 $\pm$ 0.20
Kurumadde de yağ (%)	38.71 $\pm$ 0.35
Protein (%)	5.69 $\pm$ 0.08
Özgöl Ağırlık (g/cm^3)	1.034 $\pm$ 0.001

SS: Standart sapma

Louro ve Brito (2021), tarafından koyun sütü için pH değeri 6.62 ± 0.05 olarak saptanmıştır. Barracosa vd. (2021), enginar ekstraktının koyun peynirlerindeki etkisini inceledikleri araştırmalarında çiğ sütteki % yağ değeri, % protein değeri, %kuru madde değeri ve pH değerlerinin sırasıyla %8.1, %5.3, %17.1 ve 6.7

şeklinde ölçüldüğünü bildirmiştir. Inácio vd. (2021), *C. cardunculus* özütünden elde ettikleri Serra da Estrela koyun peynirlerinde koyun sütü için pH, titrasyon asitliği, % yağ, % protein ve nem miktarı sırasıyla 6.46, 0.33 g laktik asit/ kg, 79.3 g/ kg, 58.3, 808 g/kg olarak belirlenmiştir. Fogueiro vd. (2020), tarafından yapılan enginar enzimi ilave edilmiş koyun peyniri çalışmalarında, koyun sütü için % kuru madde ve kuru maddedeki % protein değerleri sırasıyla % 16.30 ve % 32.57 olarak bulunmuştur. TKG koyun sütü için protein (%), en az), asitlik (%), yoğunluk (g/cm³, en az) ve yağsız kuru madde (%), en az) değerleri sırasıyla 4.0, 0.16 – 0.35, 1.030 ve 10.0 olarak belirtmiş olup; çalışma sonuçları bu veriler açısından uygundur (TKG, 2019).

4.7.2. Koyun peyniri pH analiz sonuçları

Bilindiği üzere, pH değişimleri esas olarak laktik asit bakterilerinin ve diğer mikroorganizmaların metabolizmasının bir sonucu olarak laktik asit oluşumundan ileri gelmektedir (Inácio vd., 2020). Ayrıca buna ilave olarak, peynir pH değerleri değişimlerinin, muhtemelen alt miseller arasındaki hidrofobik ve elektrostatik etkileşimlerin zayıflamasının bir sonucu olarak, kolloidal kalsiyum fosfatın çözünmesiyle de ilişkili olduğu bildirilmiştir (Inácio vd., 2021). Hayvansal enzim ve enginar bazlı enzimler ile elde edilen koyun peynirlerine ait pH değerleri Çizelge 4.31’de sunulmuştur.

Çizelge 4.31. Koyun peyniri örnekleri için pH değerleri

Peynir Örnekleri**	pH Değerleri
R	4.35 ± 0.07 ^b
K	4.49 ± 0.01 ^a
E	4.48 ± 0.02 ^a
SA 50	4.47 ± 0.02 ^a
M5	4.49 ± 0.01 ^a

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim.

Peynir örneklerindeki pH değeri için belirlenen farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Koyun peynirlerinin pH değeri 4.35 – 4.47 aralığında belirlenmiştir. Depolamanın birinci gününde en düşük pH değeri rennin enzimi ilave edilerek üretilen peynir örneği (4.35) için belirlenmiştir. Diğer örnekler arasında benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Crespo vd. (2022), enginar ekstraktının Torta del Casar ve Queso de la Serena peynirleri üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında pH oranlarını sırasıyla 5.8 ve 5.4 olarak bildirmişlerdir. Inácio vd. (2021), Serra da Estrela koyun sütü peynirinde *C. cardunculus* özütünün etkisi üzerine yaptıkları araştırmalarında 60 günlük olgunlaşmada pH değeri 5.16 olarak saptanmıştır. Dias vd. (2021), yaptıkları enginar özütünden elde edilen koyun peyniri araştırmalarında pH oranını 6.23 – 6.79 aralığında bulmuştur. Carvalho vd. (2020), tarafından yapılan *Cynara cardunculus* L. özütü ilaveli Évora koyun peyniri araştırmasında pH oranı 5.0 olarak belirlenmiştir.

4.7.3. Titrasyon asitliği analizi sonuçları

Çizelge 4.32’de farklı enzimlerden yararlanılarak üretilen koyun peynirlerine ait titrasyon asitliği değerleri görülmektedir. Numunelerin gruplar arasındaki titrasyon asitliği (% laktik asit) için aralarındaki fark anlamlı olarak belirlenmiştir ($p<0.05$). Koyun peynirlerinin titrasyon asitliği değeri (% laktik asit) %0.93 – 1.71 aralığında ölçülmüştür. Analiz sonuçları incelendiğinde, en düşük titrasyon asitliği değeri SA 50 örneği (0.93) için bulunmuştur.

Çizelge 4.32. Koyun peyniri örnekleri için laktik asit değerleri (%)

Peynir Örnekleri**	Laktik asit değerleri (%)
R	1.71 ± 0.02 ^a
K	0.97 ± 0.03 ^b
E	1.01± 0.03 ^b
SA 50	0.93 ± 0.01 ^c
M5	0.95 ± 0.01 ^c

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzimi.

Cardinali vd. (2022), yaptıkları araştırmada *Cynara cardunculus L.* ekstraktı kullanılarak üretilen Queijo da Beira Baixa koyun sütü peynirinde laktik asit içeriği değerleri 0.64 ile 1.95 g.100 g⁻¹ arasında ölçmüştür. Cardinali vd. (2021), yaptıkları çalışmada, *Cynara Cardunculus L.* içeren üç ayrı üretici için *Queijo de Azeitão* koyun peyniri örneklerinde titrasyon asitliği değerleri 0.08 – 0.488 g. 100g⁻¹ aralığında belirlenmiştir. Prados vd. (2007), yaptıkları çalışmada, 2 günlük depolama koşullarında Manchego cinsi koyun peynirlerinde hayvansal maya ile elde edilen peynirlerde titrasyon asitliği değeri %0.56 laktik asit iken, *C. cardunculus* ile elde edilen peynirde ise %0.65 olarak bu değer bulunduğunu bildirmiştir. Farklı enzimler kullanılarak üretilen koyun peynirlerinde laktik asit içerikleri arasında önemli bir ilişkinin olduğu görülmektedir. Araujo-Rodrigues vd. (2022), olgunlaşma fazının ilk evreleri sırasında, kalıntı laktoz içeriğinin ve mikrobiyal metabolizma gibi metabolik reaksiyonlarda rol oynayan bazı önemli temel etmenlerin laktik aside dönüşüm aşamasında da önemli olduğunu belirtmiştir. Peynir enzimleri olgunlaşmaya katkı sağlayan bakteriyel florayı desteklemekle birlikte, peynirde bulunan laktik asidi kullanarak pH değerini arttırmaktadırlar (Karabıyıklı ve Erdoğan, 2019). Nasr (2017), bitkisel kaynaklı enzim ve hayvansal maya ile üretilen peynirlerde titre edilebilir asitlik oranının pıhtılaştırıcı türünden önemli ölçüde etkilendiğini tespit etmiştir. Abdeen vd. (2021), bitkisel enzim ve hayvansal maya kullanarak elde ettikleri

geleneksel peynirlerde asitliğin yüksek olmasını enzimin proteolitik aktivitesiyle de ilişkilendirmişlerdir.

4.7.4. Kuru Madde Analizi Sonuçları

Koyun peynirlerindeki kuru madde değerlerine ait sonuçlar Çizelge 4.33'te bildirilmiştir. Peynir örneklerinin arasındaki kuru madde değişim oranı istatistiksel açıdan önemli olarak belirlenmiştir ($p<0.05$). Koyun peynirlerinin kuru madde değeri en düşük E peynir örneği (%32.85) için saptanmış, en yüksek kuru madde değeri R peynir örneğinde (%45.22) gözlenmiştir. Kuru madde değeri açısından süspanse hücre kültür yöntemi ile pıhtılaştırılan peynirlerde istatistiksel olarak benzer değerler elde edilmiştir. Bu değerler rennin enzimi ile pıhtılaştırılan peynirlerde anlamlı olarak farklıdır ($p<0.05$).

Çizelge 4.33. Koyun peyniri örnekleri için kuru madde değerleri

Peynir Örnekleri**	Kuru Madde Değerleri
R	45.22 ± 0.10 ^a
K	32.93 ± 0.58 ^b
E	32.85 ± 0.57 ^b
SA 50	33.01 ± 0.42 ^b
M5	32.98 ± 0.60 ^b

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p<0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim.

Enginardan elde edilen enzimle meydana gelen koyun peynirleri üzerine yapılan çalışmalarda; nem oranını Correia vd. (2021), %62.2 olarak, Dias vd. (2021), %49.40 – 60.33 şeklinde, Carvalho vd. (2020) ise %53.3 olarak belirtmişlerdir. Kuru madde açısından çalışmadaki sonuçların Correia vd. (2021), Dias vd. (2021), Carvalho vd. (2020) verilerinden daha düşük değerlerde elde edilmiş olduğu görülmektedir. Burada her ne kadar farklı peynir çeşitlerinin farklı kurumaddeler içereceği düşünülse de bitkisel kaynaklı enzimle üretilen peynirlerin kuru madde içeriklerinin geleneksel koyun peynirleri verilerine göre çok düşük olduğu da dikkat çekmektedir. Enzimlerin pıhtılaşma aktivitelerinin

rennin enzimine kıyasla çok düşük olması kuru madde üzerinde önemli bir etki yaptığını göstermektedir (Garcia vd., 2016). Ben Amira vd. (2021), enginar enzimi ile elde edilen farklı tür peynirlerde yüksek nem içeriğini, muhtemelen kalan pıhtılaştırıcı enzim (kardosinler) ve adventif mikroflora etkisine bağlamakla birlikte kazein proteolizi ile de ilgili olabileceğini belirtmiştir. Rita vd. (2021), hayvansal peynir mayası ile yapılan koyun peynirinde, *C. cardunculus* özü ile yapılan kıyasla daha yüksek nem içeriği gözlemlendiğini ifade etmişlerdir.

4.7.5. Yağ Analizi Sonuçları

Çizelge 4.34'te ifade edildiği şekliyle, peynir numunelerindeki % yağ analizi değerleri gösterilmektedir. Örneklerin gruplar arasındaki değişimi incelendiğinde, bu farkın önemli olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Koyun peynirlerinin yağ analizi değeri %21 - 25.75 aralığında bulunmuştur. Bununla beraber, en yüksek yağ değeri R enzimi ilave edilen örneklerde (%25.75) belirlenmiş, en düşük yağ değerleri ise E peynir örneklerinde (%21.00) gözlenmiştir.

Çizelge 4.34. Koyun peyniri örnekleri için % yağ değerleri

Peynir Örnekleri**	% Yağ Değerleri
R	25.75 $\pm$ 0.25 ^b
K	21.00 $\pm$ 0.25 ^a
E	21.00 $\pm$ 0.25 ^a
SA 50	21.50 $\pm$ 0.25 ^a
M5	21.25 $\pm$ 0.25 ^a

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p<0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 μ M Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 μ M Melatonin içeren enzim.

Enginar özü ile üretilen koyun peynirlerinde Crespo vd. (2022), yağ oranını iki farklı peynir türü için %25.6 ve %25.3 şeklinde bulduklarını bildirirken Fogueiro vd. (2020), Serra da Estrala koyun peynirinde enginar çiçeği (*Cynara cardunculus*) temelli mayanın kullanıldığı peynirlerde kuru maddede yağ değerlerini %38.64 ve %41.67 aralığında belirlemişlerdir. Tejada ve Ferna'ndez-

Salguero (2003), tarafından yapılan koyun peyniri çalışmasında ise *C. cardunculus L.* ve hayvansal rennet için 2. gün sırasıyla yağ değerleri %27.55 ve %27.50 olarak belirlendiği belirtilmiştir. Analiz için ortaya çıkan verilerin Crespo vd. (2022), değerlerine yakın olup; diğer araştırmacıların verilerinden düşük değerlerde olduğu gözlenmiştir.

Bu hayvansal kaynaklardan üretilen peynirin kuru madde içeriğinin de yüksek oluşu ile ilişkilendirilebilir. Garcia vd. (2016), tarafından yapılan çalışmada bu duruma benzer olarak belirtildiği üzere bitkisel bazlı peynirlerde yağ miktarının olgunlaşma sırasında arttığı, bu artışın peynir matrisinde tutulan su miktarındaki azalmadan kaynaklandığı bildirilmiştir.

4.7.6. Tuz analizi sonuçları

Peynir aroması üzerine tuz (NaCl) ilavesinin önemli katkılarının olduğu bilinmektedir (Carvalho vd., 2020). Bununla birlikte Guinee vd. (2004), peynirdeki NaCl konsantrasyonunun starter bakteri faaliyetlerini kısmen durdurduğuna veya yavaşlattığına dair görüşler bildirmiştir. Inhyu vd. (2017), NaCl içeriğinin peynirin dokusal yönleri üzerinde etki gösterdiğini, yüksek konsantrasyonlarda kazein hidrasyonunda bir azalma meydana getirdiğini ve peynir matrisini etkilediğini belirtmişlerdir. Tuz ilavesi ile ilişkili olarak peynir yapısının daha sıkı ve daha sert hale geldiği de bilinmektedir. Dolayısıyla, peynir çeşidine göre tuzun koruyucu, nem dengeliyici, yapı düzenleyici veya kabuk oluşturucu etkisinin önemli olduğu görülmektedir (Hayaloğlu ve zer, 2011).

Çizelge 4.35’de koyun peynirlerine ait % tuz değerleri gösterilmiştir. Peynir rneklerinin hayvansal içerikli enzim ile bitkisel orjinli enzimle üretilenleri arasında % tuz içeriği bakımından önemli bir fark görülmektedir ($p < 0.05$). Örneklerin süspanse kültür metodu ile üretilenleri arasında benzer sonuçlar elde edilmiştir. Koyun peynirlerinin tuz oranı %2.80 – 2.87 aralığında belirlenmiştir.

Çizelge 4.35. Koyun peyniri örnekleri için tuz değerleri

Peynir Örnekleri**	Tuz Değerleri
R	2.80 ± 0.05 ^b
K	2.87 ± 0.05 ^a
E	2.87 ± 0.05 ^a
SA 50	2.86 ± 0.01 ^a
M5	2.86 ± 0.01 ^a

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim.

Inácio vd. (2020), yaptıkları koyun peyniri çalışmalarında enginar özütü içeren örnekler için tuz içeriğinin %1.10 ile %3.05 arasında ortalama değerlerde olduğunu, Fox vd. (2017), enginar ekstraktının koyun peyniri üzerine etkisi üzerine yaptıkları çalışmalarında peynirde tuz konsantrasyonu %0.7 ile %7 arasında değiştiğini ifade etmiştir. Analiz için elde edilen tuz oranlarının; Inácio vd. (2020), Fox vd. (2017)'un verilerine yakın olduğu görülmektedir. Rennin enzimi ile üretilen peynirlerde tuz içeriğindeki miktarın daha düşük tespit edilmesi kuru madde içeriği ve sertlik değerinin bu peynirlerde daha yüksek olması ile açıklanabilir. Conceição vd. (2018), tarafından yapılan araştırmada, hayvansal enzimin aksine, enginar özünün süte tuz eklenmesiyle pıhtılaşma süresinin ve jel sertliğinin neredeyse hiç etkilenmediği ifade edilmiştir.

4.7.7. Toplam azot analizi sonuçları

Olgunlaşmanın ilk gününde koyun peyniri örneklerinin toplam azot değerleri incelendiğinde (Çizelge 4.36) örnekler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir (p<0.05). Koyun peynirlerinde toplam azot değeri en düşük SA 50 örneğinde (0.97) gözlenmekle beraber, en yüksek toplam azot değeri R örneğinde (2.08±0) elde edilmiştir.

Çizelge 4.36. Koyun peyniri örnekleri için toplam azot (%) değerleri

Peynir Örnekleri**	Toplam Azot Değerleri
R	2.08 ± 0.02 ^a
K	1.02 ± 0.02 ^b
E	0.98 ± 0.01 ^b
SA 50	0.97 ± 0.02 ^b
M5	1.03 ± 0.03 ^b

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim

Crespo vd. (2022), *Cynara cardunculus* ile üretilen koyun peynirleri üzerine yaptıkları çalışmalarında Torta del Casar peynirleri için toplam protein değerleri %20.2 – 22.5 aralığında iken; Queso de la Serena peynirlerinde ise toplam protein oranı %20.4 – 22.6 şeklinde bildirmiştir. Peynirin nihai özelliklerinin gelişiminde protein belirleyici unsurlar arasında yer almaktadır. Fogueiro vd. (2020), yaptıkları çalışmada; ticari farklı enginar kaynaklı enzimlerle üretilen peynirlerin protein değerlerinin %47.35 – 49.76 aralığında olduğunu belirlemiştir. Guine vd. (2016), Serra da Estrela koyun peyniri değerlendirmelerinde yüzde protein miktarını 12.97 – 21.90 aralığında rapor etmiştir. Fernãdez-Salgueroa ve Sanjuaân (1999), yaptıkları çalışmada koyun peynirlerinde toplam azot değerleri depolamanın 2. gününde *Cynara cardunculus* ve hayvansal maya için sırasıyla %2.9 ve %3 olarak belirlenmiştir.

Araştırmacıların verileri ile süspanse hücre kültür yöntemi ile elde edilen enzimlerin kullanıldığı peynirlerde toplam azot içerikleri arasında bazı farklılıklar tespit edilmiştir. Bu farklılığın peynir üretim yöntemleri ve koyun sütünün özellikleriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Üretilen peynirlerde hayvansal kaynaklı enzim kullanılarak üretilen peynirin toplam azot içeriği diğerlerinden çok daha yüksek olarak belirlenmiştir. Burada kurumadde içerikleri arasındaki farklılığında etkili olduğu zannedilmektedir. Nitekim Galan vd. (2012), koyun sütünden farklı enzimlerle peynir ürettikleri çalışmalarında protein miktarında artış ile peynirin kuru madde içeriği arasında ilişkinin

olduğunu nem içeriğindeki kayıp arttıkça protein oranının yükseldiğini bildirmişlerdir.

4.7.8. Suda çözünen azot analizi sonuçları

Suda çözünür azot oranı olgunlaşma başlangıcında süt proteazları ve enzimler tarafından oluşan kazein hidrolizinin göstergesi olarak kabul edilmektedir (Tejada vd., 2008). Farklı enzimlerden üretilen koyun peynirlerinin % suda çözünen azot oranları Çizelge 4.37’de verilmiştir. Peynir örneklerine ait % suda çözünen azot içerikleri için gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Koyun peynirleri için suda çözünen azot değeri %0.113 – %0.292 aralığında saptanmıştır.

Çizelge 4.37. Koyun peyniri örnekleri için suda çözünen azot değerleri

Peynir Örnekleri**	Suda Çözünen Azot Değerleri
R	0.292 ± 0.005 ^a
K	0.113 ± 0.001 ^c
E	0.114 ± 0.001 ^c
SA 50	0.129 ± 0.008 ^b
M5	0.127 ± 0.003 ^b

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p<0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim.

Galán vd. (2012), yaptıkları araştırmada, buzağı renneti (CR), *Cynara cardunculus*'tan elde edilen toz bitki pıhtılaştırıcısı (PPC) veya 50:50 PPC ve CR karışımı ile üretilen koyun peynirlerinde; PPC ve CR/PPC ile üretilen peynirlerde hayvansal maya ile elde edilenlere kıyasla daha yüksek değerlerde çözünür azot meydana gelmiştir. Depolamada (240 gün) CR ile yapılan peynirde suda çözünür azot miktarı %0.281 olup, bu seviye hem CR/PPC hem de PPC peynirlerinde 90 günlük depolama boyunca sırasıyla %0.333 ve 0.342 değerleriyle aşılmıştır. Galán vd. (2008), tarafından yapılan koyun peynirlerinde çalışmada, *Cynara cardunculus* ile üretilen peynirlerde (%0.105), hayvansal enzim kullanılanlara oranla (%0.042) iki katından fazla oranda suda çözünen azot içeriği saptanmıştır.

Araştırmacılar bunun nedenini *C. cardunculus* özü ile yapılan peynirlerde bitkisel pıhtılaştırıcıdaki siprosinin proteolitik etkisinden kaynaklanmasına bağlamışlardır.

4.7.9. Olgunlaşma indeksi sonuçları

Olgunlaşma indeksi, esas olarak pıhtılaştırıcı enzimlerin, doğal süt proteinazlarının neden olduğu ve doğrudan veya dolaylı mikrobiyal aktivite ile daha az ilişkili olan birincil proteoliz ile ilgili bir orandır (Araujo-Rodrigues vd., 2022).

Koyun peynirlerinde belirlenen olgunlaşma indeksi verileri Çizelge 4.38’de gösterilmektedir. Örnekler arasındaki olgunlaşma indeksi için istatistiksel fark önemli olarak belirlenmiştir ($p<0.05$). En düşük olgunlaşma indeksi oranı verilen K örneklerinde (11.12 ± 0.08) bulunmuş, en yüksek olgunlaşma indeksi değerinin ise rennin enzimi ile üretilen koyun peynirlerinde (14.05 ± 0.29) belirlenmiştir. Salisilik asit ve melatonin ilavesi olgunlaşma üzerinde olumlu yönde bir etki yapmış ve elde edilen veriler rennin enzimi ile üretilen peynirlerin verilerine en yakın değerde olarak kaydedilmişlerdir.

Çizelge 4.38. Koyun peyniri örnekleri için olgunlaşma indeksi değerleri

Peynir Örnekleri**	Olgunlaşma indeksi
R	14.05 ± 0.29^a
K	11.12 ± 0.08^{bc}
E	11.61 ± 0.10^{bc}
SA 50	12.30 ± 0.14^b
M5	12.24 ± 0.13^b

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p<0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 μ M Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 μ M Melatonin içeren enzim

Imaiaa (2022), tarafından yapılan *Cynara cardunculus L.* içeren çiğ koyun sütü peyniri olan Serpa peynirindeki çalışmaya göre; Serpa PDO peynir

yönetmeliğinde belirlenen çözünür azot (WSN) ve toplam azot (TN) arasındaki orana karşılık gelen olgunlaşma indeksi 30 günlük peynirlerde en az %45 olarak belirtilmiştir. Araújo-Rodrigues vd. (2022), üretimden 30 gün sonra analiz ettikleri Serpa koyun peynirlerinde olgunlaşma indeksini %33.81- 41.86 şeklinde tespit etmişlerdir. Alvarenga vd. (2011), enginar özütü içeren Serpa koyun peynirlerinde 28 günlük depolama koşullarında olgunlaşma indeksinin %30-35 arasında değerler gösterdiğini kaydetmişlerdir.

Bu çalışmada üretilen koyun peynirlerinde olgunlaşma işlemi gerçekleştirilmediği için elde edilen olgunlaşma indeksi değerleri araştırmacıların bulgularından daha düşük olarak tespit edilmiştir. Lucey vd. (2003), enginar özütü ve hayvansal pıhtılaştırıcı arasındaki en önemli farklardan birinin, bitkisel pıhtılaştırıcılar tarafından üretilen peynirlerde olgunlaşma indeksinin daha yüksek seviyelerde oluşu şeklinde ifade etmişlerdir. Süspanse kültür yöntemi ile geliştirilen enzimlerde proteolitik aktivitenin de düşük olmasına bağlı olarak diğer bitkisel ve hatta hayvansal enzimlerin olgunlaşma indekslerine göre depolama başlangıcında daha düşük seviyelerde indeks değerleri belirlenmiştir.

4.7.10. Renk analizi sonuçları

4.7.10.1. L* değerleri

Koyun peyniri örnekleri için L değerleri verileri Çizelge 4.39'da sunulmuştur. L* değeri için örnekler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Ancak bitkisel kaynaklı süspanse kültür yöntemi ile elde edilen enzimlerle üretilen peynirlerde önemli bir fark tespit edilmemiştir. Koyun peynirlerinin L* değeri hayvansal bir pıhtılaştırıcı ile üretilen örnekler için 87.28 olarak belirlenmiştir. Diğer enzimler ile üretilen peynirlerin L* değerleri bu değerden daha yüksek olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.39. Koyun peyniri örnekleri için L* değerleri

Peynir	L*
Örnekleri**	
R	87.28 ± 1.79 ^b
K	93.36 ± 0.50 ^{ab}
E	91.15 ± 1.05 ^a
SA 50	91.64 ± 1.74 ^a
M5	91.09 ± 1.94 ^a

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim

Cynara cardunculus L. özü kullanılarak üretilen Queijo da Beira Baixa koyun peynirlerinde; numunelerin parlaklığı (L*) 79.35 ile 88.02 arasında değişmiştir (Cardinali vd., 2022). Fogueiro vd. (2020), Serra da Estrala koyun peynirinde L* değerleri sırasıyla 80.11, 81.98 ve 79.94 olarak rapor edilmiştir. Analiz için elde edilen bulgularda L* değerlerinin Cardinali vd. (2022) ve Fogueiro vd. (2020), verilerinden yüksek olduğu gözlenmiştir. R örneği ile mukayese edildiğinde; E, SA 50 ve M5 pıhtılaştırıcıları aracılığıyla elde edilen peynir örneklerinde L* (parlaklık) değerinin daha yüksek tespit edildiği görülmektedir. Ben Amira vd. (2021), *C. cardunculus*'dan elde edilen enzimin bir renginin olduğu kullanım oranına bağlı olarak peynir renginin bundan etkilendiğini ifade etmektedirler. Bu çalışmada kullanılan enzimlerde belirgin bir renk değişiminin olmaması peynir rengi üzerinde de bir değişikliğe sebep olmamıştır. Rennin enzimi ile üretilen peynirlerin diğerlerine oranla kurumadde içeriklerinin farklı olması parlaklık açısından da bir miktar yüksek sonuçlar elde edilmesine neden olmuş olabileceğini düşündürmüştür. Bu değişim, bileşimde yer alan kalsiyum kazeinat ve yağ içeriğinden kaynaklanabilmektedir.

4.7.10.2. a* değerleri

Çizelge 4.40'da peynir örneklerinin a* değerlerine ait sonuçları gösterilmiştir. Örneklerin arasındaki a* değeri için istatistiksel farklılığın önemli olduğu tespit edilmiştir (p<0.05). Koyun peynirlerinin a* değerinin -3.91 ile -4.30 aralığında

olduğu görülmüştür. Rennin enzimi ile elde edilen peynirlerde a* değerlerinin diğer örneklerin değerlerinden farklı olduğu belirlenmiştir. Bu değere en yakın sonuçlar SA50 ve M5 örneklerinde gözlenmiştir.

Çizelge 4.40. Koyun peyniri örnekleri için a* değerleri

Peynir Örnekleri**	a*
R	-3.91 ± 0.18 ^a
K	-4.23 ± 0.34 ^b
E	-4.30 ± 0.39 ^b
SA 50	-4.11 ± 0.20 ^{ab}
M5	-4.15 ± 0.41 ^{ab}

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim.

Cardinali vd. (2022), *Cynara cardunculus L.* ile elde edilen koyun peynirlerine ait araştırmalarında -2.71 ile -4.87 arasında değişen (a*) değeri bulgularından söz etmiştir. Correia vd. (2021), Serra da Estrela koyun peynirleri üzerine yaptıkları incelemeler ışığında, *Cynara cardunculus* bitkisel enziminin kullanıldığı örneklerde 0. gün depolama sürecinde a* değerleri ortalaması yaklaşık -4 olarak değerlendirilmiştir. Analiz için elde edilen a* değerleri, Cardinali vd. (2022) ve Correia vd. (2021), verileriyle karşılaştırıldığında uyumludur.

4.7.10.3. b* değerleri

Örneklerdeki b* değerlerine ait bulgular Çizelge 4.41'de gösterilmiştir. Peynirlerin b* değerlerine ait veriler için istatistiksel fark önemli olarak belirlenmiştir (p<0.05). Koyun peynirlerinin b* değeri 7.43 – 12.21 aralığında ifade edilmiştir. En düşük b* değeri M5 grubu enzimi örneklerine (7.43±3.12) ait olup, en yüksek b* değeri R örneklerinde (12.21±0.52) elde edilmiştir.

Çizelge 4.41. Koyun peyniri örnekleri için b* değerleri

Peynir Örnekleri**	b* değerleri
R	12.21 ± 0.52 ^a
K	9.24 ± 0.98 ^{ab}
E	7.79 ± 2.77 ^b
SA 50	8.22 ± 1.92 ^{ab}
M5	7.43 ± 3.12 ^b

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim.

Araújo-Rodrigues vd. (2022), *Cynara cardunculus L.* kullanılarak üretilen Serpa koyun peynirlerinin iç kısımları için b* değerini 16.86 – 22.40 aralığında ifade etmiş, kabuk için ise b* değerlerini 14.38 – 15.20 arasında saptamıştır. Fogueiro vd. (2020), yaptıkları çalışmada, Serra da Estrela peynirlerinde (kabuk) b* değerlerini 22.06 – 20.80 arasında belirlemişlerdir. Bu peynirlerin iç kısımlarından elde edilen b* değerleri daha düşük olarak (18.33±4.70, 16.05±5.50 ve 17.81±4.59) tespit edilmiştir. Ayrıca peynir üretiminde ticari enginar tipinin kullanılmasının, incelenen diğer enginar türleriyle üretilenlere göre peynir renginin daha sarımsı olmasına neden olduğu gözlemlenmiştir. Balthazar vd. (2017), koyun sütünde bulunan yüksek yağ miktarıyla birlikte kazein yapısının peynirde ton farklılığının sarıya doğru değişmesine neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, yeşil otlarda lutein ve zeaksantin yüksek miktarda bulunur ve bunlar koyun sütünde asimile olarak sarımsı renge neden olabilir (Nozière vd., 2006). R örneğine kıyasla E, SA 50 ve M5 enzimi ile elde edilen peynir örneklerinde b* (sarı renk) değeri daha düşük yani daha açık bir renkte beirlenmiştir.

4.7.11. Koyun peynirinin tekstür profil analizleri

4.7.11.1. Sertlik değeri

Çizelge 4.42’de koyun peynirlerine ait sertlik değerleri verilmiştir. Elde edilen veriler ışığında, istatistiksel olarak peynirler arasındaki sertlik değeri için

değişim oranı önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Koyun peynirlerinin tekstür analiz değerleri incelendiğinde sertlik değeri 33.46 – 111.95 N aralığında izlenmiştir. SA 50 (45.52 N) ve M5 (56.64 N) enzim örneklerinin diğer örneklerle göre daha yüksek sertlik değerine sahip olduğu da gözlenmiştir.

Çizelge 4.42. Koyun peyniri örnekleri için sertlik değerleri

Peynir Örnekleri**	Sertlik Değerleri (N)
R	111.95 ± 5.26 ^a
K	38.84 ± 0.33 ^{bc}
E	33.46 ± 0.16 ^c
SA 50	45.52 ± 0.31 ^b
M5	56.64 ± 0.17 ^b

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p<0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara scolymus* L. Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim.

Cardinali vd. (2022), Queijo da Beira Baixa koyun sütü peynirinde *Cynara cardunculus* L. özütünün, tekstür profili yapıları açısından değerlendirilmesi esaslı araştırmalarında, peynir örneklerinin sertlik miktarları 38.3±9.6 N ile 68.55±7.5 N arasında değişmiştir. Barracosa vd. (2021), (*Cynara cardunculus*) bitkisinden (1M–6M) elde edilen koyun peynirlerine yönelik araştırmalarında 3M, 5M ve 6M enginar tipleri için sırasıyla kabuk sertliği (N) değerleri 5.3±0.7, 5.0±0.7 ve 4.0±0.8 şeklinde bildirmiştir. Correia vd. (2021), tarafından yapılan çalışmada *Cynara cardunculus* ekstraktından yapılan çiğ koyun sütü peyniri olan yarı yumuşak tipteki Serra da Estrela peyniri örneklerinde 0. günde 84.47 N ortalama sertlik değeri belirledikledilerini rapor etmişlerdir.

Süspanse kültür yöntemi ile üretilen enzimlerle yapılan bu çalışmada hayvansal enzimlere göre örneklerde sertlik değeri düşük bulunmuştur. Kendi içlerinde bitkisel kaynaklı enzimlerde ise SA 50 ve M5 enzimlerinin diğerlerinden daha belirgin farklılıkta sertlik değerine sahip olduğu görülmektedir. Enzimlerin proteolitik aktiviteleri SA 50 ve M5 için değerlendirildiğinde diğer benzer örneklerden daha yüksek olduğu aynı zamanda elde edilen peynir kuru maddelerinin de daha fazla olduğu anlaşılmaktadır. Kuru madde ve yüksek

proteolitik aktivitenin sertlik üzerinde önemli bir etki göstermiş olabileceği düşünülmektedir. Nitekim Galán vd. (2008), *Cynara cardunculus*'tan elde edilen farklı miktarlarda toz haline getirilmiş bitkisel pıhtılaştırıcıyı hayvansal maya ile üretilen koyun sütü peynirlerindeki tekstür değerleri ile karşılaştırdığı değerlendirmede bitkisel enzim örneklerinin hayvansal rennet örneğine göre önemli ölçüde daha yumuşak olduğunu belirlemişlerdir ($p<0.05$). Bitkisel pıhtılaştırıcı ile yapılan peynirlerde kazeinlerin parçalanmasındaki daha yüksek proteolitik aktivitenin özellikle depolama sürecinde daha yumuşak ve kremi bir dokunun oluşumuna neden olabileceği de belirtilmiştir. Tejada vd. (2007)'de, hayvansal peynir mayası ile yapılan peynirlerin sertliğini bitkisel pıhtılaştırıcı ile yapılan peynirlerden önemli ölçüde daha yüksek bulunduğunu benzer şekilde belirtmiştir ($p<0.05$). Zikiou ve Zidoune (2019), bitkisel pıhtılaştırıcılar aracılığıyla temin edilen peynirlerin kremi ve yumuşak yapıda olduğunu, kazein ağını parçalayan ve daha homojen bir yapıya yol açan yoğun proteoliz tarafından etkilendiğini ifade etmişlerdir.

4.7.11.2. Dış Yapışkanlık

Çalışma kapsamında farklı pıhtılaştırıcılarla üretilen koyun peyniri örneklerinin dış yapışkanlık verileri Çizelge 4.43'te sunulmuştur. Analiz sonuçları baz alındığında; örnekler arasında dış yapışkanlık değeri için istatistiksel olarak farkın önemli olduğu ($p<0.05$) ortaya çıkmıştır.

Çizelge 4.43. Koyun peyniri örnekleri için dış yapışkanlık değerleri

Peynir Örnekleri**	Dış Yapışkanlık Değerleri (Ns)
R	-39.81 ± 1.83 ^a
K	-14.75 ± 1.53 ^b
E	-19.00 ± 1.61 ^{bc}
SA 50	-16.46 ± 0.06 ^b
M5	-16.07 ± 1.63 ^b

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p<0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara scolymus* L. Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim.

Koyun peyniri örneklerinin dış yapışkanlık değerlerinin -14.75 – -39.81 Ns aralığında olduğu görülmektedir. K, SA 50 ve M5 pıhtılaştırıcılarından elde edilen peynirlerin dış yapışkanlık verilerinin benzer nitelikte olduğu, tüm örneklerin R örneklerinden düşük seviyede olduğu izlenmiştir. Dias vd. (2021), *C. cardunculus L.* içeren Queijo de Nisa koyun peynirlerinde peynir kalitesini incelediklerinde olgunlaşmanın ilk günü dış yapışkanlık değerlerinin -3.41– -11.96 (N.s) aralığında olduğunu rapor etmişlerdir. Barracosa vd. (2021), Serra da Estrela koyun peyniri dış yapışkanlık oranlarını -4.5 ± 2.5 ile -11 ± 3 (Ns) aralığında belirlemişlerdir. R enzimi örneğinin dış yapışkanlık oranının, diğer örneklerden yüksek değerde gözlenmesinin sebebini kuru madde içeriği ile ilişkilendirebiliriz, nitekim Correia vd. (2021), dış yapışkanlığın muhtemelen daha az nem kaybına uğrayan peynirlerde daha yüksek seviyede olmasıyla yani kuru madde içeriği ile ilişkilendirilmiştir. Ärdo vd. (2017), ise kazein molekülleri arasındaki yapısal düzenleme, suyun yoğunluğu ve kazein matrisine bağlı olarak peynir dokusunun değişmesinden ileri geldiğini bildirmiştir.

4.7.11.3. Esneklik değeri

Çizelge 4.44'te koyun peyniri örneklerine ait esneklik değerleri gösterilmekle birlikte, yapılan incelemeye göre bulgular arasında istatistiki olarak önemli farklılıklar tespit edilmiştir ($p > 0.05$).

Çizelge 4.44. Koyun peyniri örnekleri için esneklik değerleri

Peynir Örnekleri**	Esneklik Değerleri
R	0.85 ± 0.03^{cd}
K	1.12 ± 0.12^b
E	1.45 ± 0.05^a
SA 50	0.98 ± 0.01^c
M5	0.96 ± 0.02^c

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p < 0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 μ M Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 μ M Melatonin içeren enzim

Peynirler esneklik açısından değerlendirildiğinde en yüksek oranın E peynir örneğinde (1.45) görüldüğü, en düşük oranın ise R enzimi örneğinde (0.85) olduğu saptanmıştır. Ayrıca R grubu örneğe en yakın esneklik verilerinin SA 50 ve M5 enzim örneklerinde görüldüğü gözlenmiştir.

Cardinali vd. (2022), Queijo da Beira Baixa koyun peynirlerinde yaptıkları incelemelerinde esneklik verilerinin 0.198 – 0.356 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada belirlenen sonuçlar Cardinali vd. (2022), değerlerine yakındır. Ong vd. (2017), tarafından yapılan araştırmalarında ifade ettikleri gibi, peynirdeki su içeriği yüksek olduğunda, protein parçacıkları daha fazla şişmekte ve deformasyona karşı daha az direnç göstermektedir. Bunun nedeni denatüre serum proteinlerinin su tutma kapasitesinin artması olmakla birlikte, bu da daha yüksek esneklik değerlerine neden olmaktadır. Jalilzadeh vd. (2018), esnekliğin protein ağ yapısı ile ilişkili olduğunu belirtmiştir.

4.7.11.4. İç yapışkanlık

Çalışmada iç yapışkanlık değerleri Çizelge 4.45'te ifade edilmiş olup, incelenen örnekler arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0.05$). Koyun peyniri örneklerinin iç yapışkanlık verilerinin 0.49 – 0.93 arasında olduğu belirlenmiştir. R peynir örneği (0.49) en düşük değerde olmakla birlikte; SA 50 ve M5 örnekleri bu değere en yakın sonuçlarda izlenmiştir.

Çizelge 4.45. Koyun peyniri örnekleri için iç yapışkanlık değerleri

Peynir Örnekleri**	İç Yapışkanlık Değerleri
R	0.49 ± 0.03^d
K	0.85 ± 0.01^b
E	0.93 ± 0.06^a
SA 50	0.84 ± 0.01^b
M5	0.72 ± 0.01^c

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p<0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 μ M Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 μ M Melatonin içeren enzim.

Cardinali vd. (2022), *Cynara cardunculus L.* enzimi ile üretilen koyun peynirlerine ait çalışmada iç yapışkanlık değerlerinin 0.199 – 0.282 aralığında olduğu bildirilmiştir. El-Sayed vd. (2022), Labne peynirlerinin tekstürel özelliklerini inceledikleri çalışmalarında örneklerde iç yapışkanlık değerlerini 0.54 – 0.70 olarak belirlemiştir. Analiz bulguları Cardinali vd. (2022), verilerinden daha yüksek seviyede gözlenmiş olup, El-Sayed vd. (2022) verileriyle uyumlu bulunmuştur. Carvalho vd. (2020), peynir matriksi ile kazeinin bileşimi arasındaki ilişkiden dolayı peynirin yapışkanlık özelliğinin etkilendiğini bildirmiştir.

4.7.11.5. Sakızımsılık

Çizelge 4.46'da peynir örnekleri için sakızımsılık değerleri yer almakta olup; örnekler arasında sakızımsılık değeri için istatistiksel farklılığın önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Örnekler için belirtilen sakızımsılık verilerinin 12.66 – 96.19 aralığında olduğu saptanmıştır. En yüksek sakızımsılık değerleri R enzimi bazlı örneklerde (96.19) mevcutken, onu sırayla M5, SA 50, E ve K örnekleri izlemiştir.

Çizelge 4.46. Koyun peyniri örnekleri için sakızımsılık değerleri

Peynir Örnekleri**	Sakızımsılık Değerleri
R	96.19 ± 2.72 ^a
K	12.66 ± 0.20 ^e
E	16.44 ± 0.40 ^d
SA 50	24.68 ± 0.20 ^c
M5	33.12 ± 0.14 ^b

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p<0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim.

Inácio vd. (2023), *Cynara cardunculus* ile üretilen Serra da Estrela koyun peyniri örneklerinde üretimden hemen sonra sakızımsılık değerini 1.1 şeklinde bulmuşlardır. Bununla beraber, Karahan vd. (2022) hayvansal kaynaklı enzim

katkılı Adıyaman koyun peynirlerinde sakızimsılık değerlerini 488.96 ile 23346.58 aralığında tespit etmişlerdir. Aydemir ve Kurt'un (2020), rapor ettikleri şekilde sertliği etkileyen faktörlerin çiğnenebilirlik değerini de etkilediğinden bahsederek sertlik değeri sakızimsılık gibi alt parametrelerin belirlenmesine yardımcı olmaktadır diye belirtmiştir. Dolaylı olarak bu değerlerde oluşan değişikliklerin sakızimsılık değerini de etkilediği söylenmiştir.

4.7.11.6. Çiğnenebilirlik

Çiğnenebilirlik verileri koyun peynirleri için Çizelge 4.47'de gösterilmiştir. Peynir örneklerine ait sonuçlar istatistiksel olarak incelendiğinde çiğnenebilirlik değerleri için farkın önemli olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). Koyun peynirleri için çiğnenebilirlik değerleri 13.79 – 91.96 aralığında bulunmuştur. K ve E örnekleri istatistiksel olarak benzer çiğnenebilirlik özellikleri göstermiştir. İlgili çizelge incelendiğinde R örneğinin çiğnenebilirlik değerlerine en yakın sonuçları M5 ve SA 50 örneklerinin aldığı gözlenebilmektedir.

Çizelge 4.47. Koyun peyniri örnekleri için çiğnenebilirlik sonuçları

Peynir Örnekleri**	Çiğnenebilirlik Değerleri
R	91.96 ± 6.33 ^a
K	13.79 ± 0.08 ^d
E	14.62 ± 0.24 ^d
SA 50	16.19 ± 0.38 ^c
M5	23.49 ± 0.23 ^b

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p<0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara scolymus* L. Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim

Hatipoğlu ve Çelik (2020), taze peynirlerin elastikiyet, iç yapışkanlık ve çiğnenebilirlik değerleri arasında pozitif bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Rampanti vd. (2023), 4 ayrı üreticiden temin edilen *Cynara cardunculus* L. kaynaklı Queijo Serra da Estrela koyun peyniri örneklerinde çiğnenebilirlik verilerini 0.65 – 6.79 şeklinde rapor etmişlerdir. Cardinali vd. (2022), *Cynara cardunculus* L. ile elde edilen Queijo da Beira Baixa koyun peynirleri için

çiğnenebilirlik oranlarını 2.3 ± 0.1 ile 4.9 ± 3.0 aralığında belirlemişlerdir. Guiné vd. (2019), tarafından bildirildiği üzere; *Cynara cardunculus* ile hazırlanan 6 farklı tür Serra da Estrela koyun peynirlerinde çiğnenebilirlik değerleri üst bölüm için 8.29 – 56.68 iken, alt bölüm için 8.08 – 80.66 aralığında saptanmıştır.

4.7.11.7. Elastikiyet değeri

Çizelge 4.48’de elastikiyet değeri sonuçları örnekler için sunulmuştur. Örneklerde elastikiyet oranlarının arasındaki istatistiksel farklılığın önemli olduğu görülmektedir ($p < 0.05$). Elastiklik değerleri 0.06 – 0.14 aralığında belirlenmiştir. Elastikiyet açısından en düşük değeri R örneği alırken, onu sırasıyla M5 ve SA 50 izlemiştir.

Çizelge 4.48. Koyun peyniri örnekleri için elastikiyet değerleri sonuçları

Peynir Örnekleri**	Elastikiyet Değerleri
R	0.06 ± 0.01^{bc}
K	0.13 ± 0.01^a
E	0.14 ± 0.02^a
SA 50	0.10 ± 0.02^b
M5	0.09 ± 0.01^b

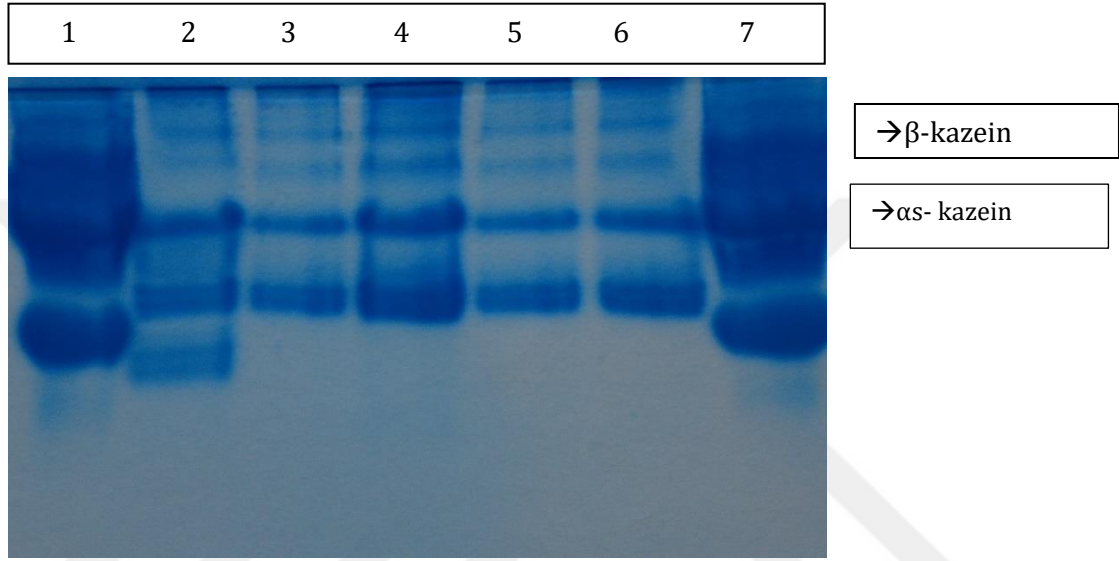
*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p < 0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara scolymus* L. Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 μ M Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 μ M Melatonin içeren enzim

Cardinali vd. (2022), *Cynara cardunculus* L. ile hazırladıkları Queijo da Beira Baixa koyun peynirlerinde yaptıkları araştırmalarında elastiklik değerini 0.088 - 0.152 aralığında tespit etmişlerdir. Analiz verileri Cardinali vd. (2022), sonuçlarıyla uyumludur. Örnekler arasında gözlemlenen farklılıklar kurumadde ve pH içerikleri ile ilişkilendirilebilir. Nitekim Bayram ve Tarakçı (2020), peynir neminin yüksek veya düşük olmasının elastik değerlerini etkilediğini bildirmiştir. Pamuksuz vd. (2020), peynirin pH değeri, elektrostatik etkileşimleri değiştirerek elastikiyetini güçlü bir şekilde etkilemektedir diye bildirmiştir.

4.7.12. Koyun peynirlerinde Üre- PAGE analizi

Koyun peynirlerinin depolamanın ilk gününde Üre-PAGE elektroforetogramları Şekil 4.8'de gösterilmektedir. Çizelge 4.49'da ise koyun peynirine ait adı geçen şekildeki jelin (Şekil 4.6) kazein parçalanma oranları % olarak hesaplanarak verilmiştir.



Şekil 4.8. Farklı enzimlerle koyun sütünden üretilen peynirlerin üre-page görünümleri (1. Na kazeinat standardı, 2. Rennin enzimi, 3. Kontrol, 4. Enginar 5.M5, 6. SA 50 7. Na kazeinat standardı)

Çizelge 4.49. Koyun peyniri üre-page jel kazein parçalanma oranları (%)

	α- kazein	β- kazein	γ-kazein ve diğer peptitler
R	30.86±0.55 ^d	18.80±0.70 ^c	50.33±0.15 ^a
K	42.90±0.30 ^a	24.70±0.50 ^a	32.70±0.44 ^e
E	40.20±0.96 ^{bc}	23.80±0.30 ^a	36.00±1.25 ^d
SA 50	40.93±0.61 ^b	21.36±0.61 ^b	37.70±0.80 ^c
M5	39.73±0.50 ^c	19.06±0.71 ^c	41.20±1.12 ^b

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim

Koyun peynirlerinde αs-kazein oranları en düşük R (%30.86) örneği için gözlenmiştir. Diğer örnekler içinde en yüksek αs-kazein değeri %42.90 ile K örneğine aittir. Genel olarak değerlendirdiğimizde αs-kazein oranları örnekler

arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde farklı olarak tespit edilmişlerdir ($p<0.05$). Rennin enzimi ile kıyaslandığında gözle görülür nitelikte daha az bir indirgenme sergiledikleri anlaşılmaktadır (Şekil 4.6).

Ferna'ndez-Salguero ve Sanjua'n (1999), yaptıkları çalışmalarında koyun peynirlerinde olgunlaşma boyunca α s-kazein azalırken, β -kazeinin sadece biraz azaldığını ve bunun enzim hidrolizine karşı daha büyük direnci doğruladığını, bitkisel enzim bazlı siprosinlerin proteolitik etkisine α s-kazeinin, β -kazeinden daha fazla duyarlı olduğunu bildirmiştir.

Peynir örneklerinde β -kazein için elde edilen veriler incelendiğinde en yüksek değerin K örneğinde %24.70 oranında tespit edildiği, bunu E örneğinin %23.80 ile izlediği belirlenmiştir. Çalışma içerisinde süspanse kültür ortamına ilave edilen melatonin ve salisilik asit ilavesinin enzimin proteolitik aktivitesini arttırdığı, β -kazeinin indirgenmesi üzerine de diğer örneklerle kıyasla peynirlerde daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bu değerleri peynirlerde belirlenen olgunlaşma indeksi verileri de destekler niteliktedir.

Araştırmacılar enginardan elde edilen enzimlerin β -kazein üzerinde farklı indirgenme tepkileri meydana getirdiklerini belirtmişlerdir. Bazı araştırmacılar β -kazeinin çok düşük düzeyde indirgendiğini bildirirken (Ferna'ndez-Salguero ve Sanjua'n, 1999), bazı araştırmacılar ise β -kazeinin daha yüksek indirgenme gösterdiklerini (Lucey vd., 2003; Francisco-José vd., 2010) bildirmişlerdir. Oluşan farklı sonuçların enzimin elde edilme yöntemleri ve proteolitik aktiviteleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Koyun peynirlerinde γ -kazein ve diğer parçalanma ürünleri Çizelge 4.51'de verilmiştir. Koyun peynirlerine ait diğer peptitlerin oranı peynir grupları arasında en fazla rennin (%50.33) ile üretilenlerde belirlenmiştir. Bu peyniri sırasıyla M5, SA 50, E ve K peynir örnekleri izlemiştir. Parçalanma ürünlerindeki artış diğer kazein gruplarının (α s-kazein ve β -kazein) üre-page jeli üzerinde bant kalınlıklarının azalması ile yani % oranlarının azalması ile ilişkilendirilebilir. Bir

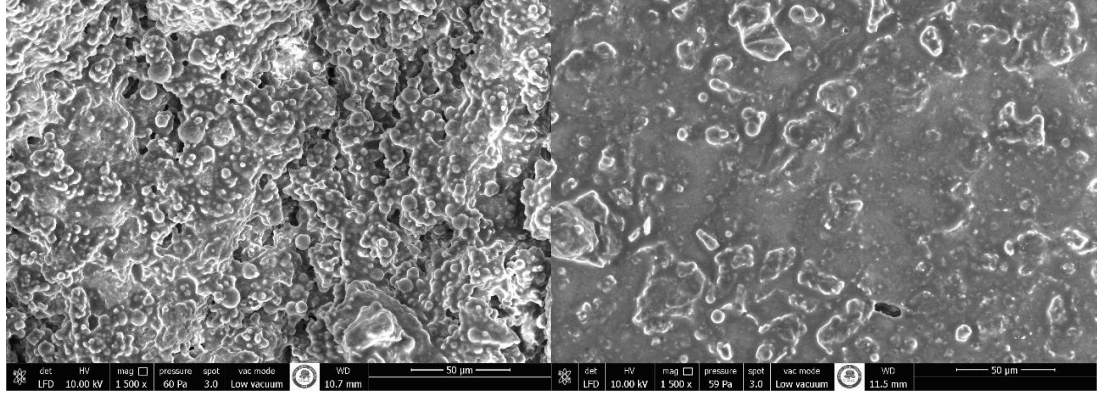
başka deyişle proteoliz oranı arttıkça γ -kazein ve diğeri parçalanma ürünlerinin % oranı artış göstermektedir.

Koyun ve inek sütleri ile üretilen Karın kaymağı peynirlerinin üre-page ile incelendiğı çalışmada peynirlerin olgunlaşması sırasında, kazein fraksiyonlarının proteolitik enzimler etkisi ile hidrolize olması sonucu bazı ileri parçalanma ürünlerinin de meydana geldiğinden söz edilmiştir. Araştırmacı peynir örneklerindeki parçalanma ürünlerinin miktarının olgunlaşma süresince artış gösterdiğini de belirtmiştir (Karagöl, 2017).

Koyun peyniri örneklerinde olgunlaşma süresi değerlendirilmemiştir. Ancak farklı enzimlerin proteolitik özelliklerinin karşılaştırıldığı bu çalışmada kazeinler üzerinde en yüksek proteolitik etkiyi rennin enzimi gösterirken ona en yakın sonucu M5 örneği ve daha sonra ise SA 50 örneği göstermiştir.

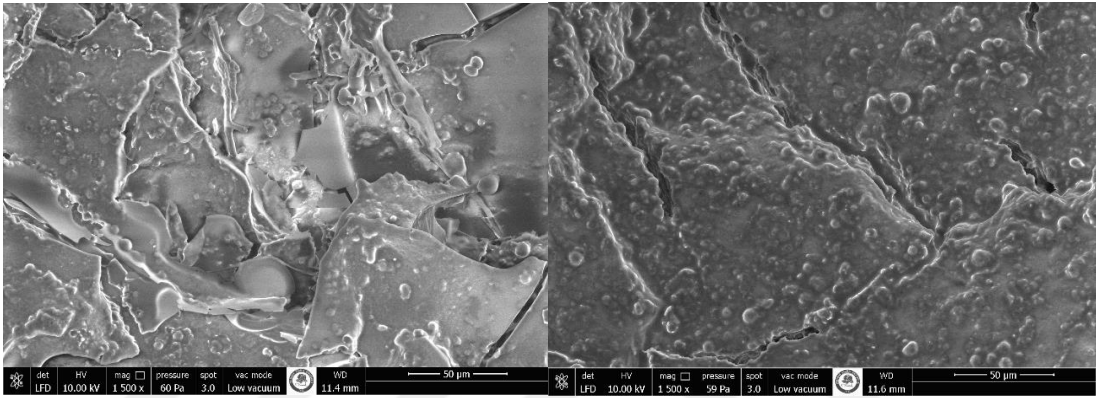
4.7.13. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi sonuçları

Şekil 4.9'da koyun peyniri örneklerinin depolamanın ilk günündeki SEM mikrogramları (x1500) sunulmuştur. Adı geçen mikrogramlar incelendiğinde rennin enzimi ile pıhtılaştırılan peynirlerin protein matriksinin tanecikli bir görünüm sergilediğı, yer yer boşlukların yer aldığı bir yapının bulunduğu anlaşılmaktadır. Bu yapıya en yakın görünüm M5 örneklerinde rastlanmaktadır. Diğeri peynir gruplarında ise bünyede bulunan peynir altı suyunun daha fazla tutulmasına bağılı olarak yapının daha düz ve daha pürüzsüz olduğı (E) dikkat çekmektedir.



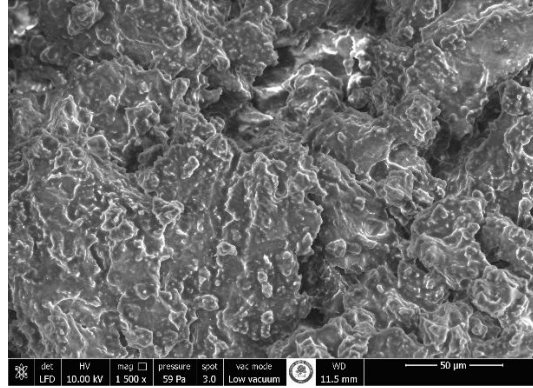
a)

b)



c)

d)



e)

Şekil 4.9. (a) R:Rennin enzimi, (b) K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, (c) E: *Cynara scolymus* L. Kallus yapısından elde edilen enzim, (d) SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, (e) M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim ile elde edilen koyun peynirlerinin SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) görüntüleri (x 1500)

Olgunlaşmanın ilk gününde Hemmatian vd. (2015), tarafından bildirilen koyun peynirlerinde, peynir dokularının kazein ağı ve birkaç gözenekten oluştuğu belirlenmiştir. Buna ek olarak; protein ağının yoğunluğundaki artış tuz ve su ile ilişkilendirilirken, gözenek boyutundaki artış laktik asit bakterisi fermantasyonuyla ilişkilendirilmiştir. Tavaría vd. (2006), Serra da Estrela koyun peyniri üzerine yaptıkları çalışmalarında, peynir matrisi üzerinde homojen olarak dağılmış küçük ve büyük boşluklar gözlemlemiş, matris içindeki yağ globüllerinin eşit olarak dağıldığını belirterek, kompakt proteinli bir yapının, enzimatik pıhtılaşmaya özgü olduğunu bildirmiştir. Parker vd. (1998), enginar özütü kullanarak elde ettikleri Serra koyun peynirleri çalışmalarında benzer olarak yumuşak yapılarda geç sineresize ve peynir altı suyunun atılma oranına göre pürüzsüz ve daha pürüzlü yüzeyler görüntülemişlerdir. Ayrıca protein açısından zengin pıhtı bağlantılarının görünümünü göstererek hem yumuşak hem de sert peynirlerin yüzey kabuklarında önemli miktarda mikroorganizma alanları da saptamışlardır.

4.7.14. Mikrobiyoloji analizi sonuçları

4.7.14.1. Toplam aerobik mezofilik bakteri

Koyun peynirleri örneklerinde saptanan toplam aerobik mezofilik bakteri sayım değerleri Çizelge 4.50'de gösterilmiştir. Örnekler arasındaki bu değerin istatistiksel olarak farklılığının önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Koyun peynirlerinin aerobik bakteri sayısı aralığı 3.09 – 6.74 log kob/g olarak hesaplanmıştır. Rennin enzimi ile üretilen örnek dışında diğer örnekler karşılaştırıldığında K grubu örneklerin TAMB sayılarının diğer örneklerden daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle üretiminde salisilik asit kullanılan peynir grubunda (3.09 log kob/g) en düşük sonuç görülmüştür. Melatonin ilavesi ise örneklerde kendi grubu içerisinde değerlendirildiğinde ikinci en düşük (3.26 log kob/g) sonucu vermiştir.

Çizelge 4.50. Koyun peyniri örnekleri için Toplam Aerob Mezofilik Bakteri sayısı sonuçları (log kob/g) (n=3)

Peynir Örnekleri**	Toplam Aerob Mezofilik Bakteri Sayısı (log kob/g)
R	6.74 ± 0.61 ^a
K	3.75 ± 0.30 ^b
E	3.34 ± 0.02 ^{bc}
SA 50	3.09 ± 0.16 ^c
M5	3.26 ± 0.23 ^{bc}

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim

Endojen bir molekül olan melatonin oldukça pleiotropiktir. Yapılan çalışmalara göre melatoninin salisilik asit gibi antibakteriyal özelliğinin olduğu bilinmektedir. Özellikle *S. aerous*, *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi birçok türe karşı etkisinin olduğu bildirilmektedir (He vd., 2021).

Crespo vd. (2022), *Cynara cardunculus L.* ile temin edilen Torta del Casar” ve “Queso de la Serena” peynirleri için toplam mezofilik aerob değerlerini sırasıyla 8.6±0.4 ve 8.8±0.2 log cfu g⁻¹ olarak bildirmiştir. Cardinali vd. (2021), yaptıkları çalışmada, üç farklı üreticiden alınan koyun sütü örneklerinden elde edilen *Cynara cardunculus* özütü içeren Queijo de Azeitao peynirlerinde sırasıyla TAMB değerleri ise 8.71 ± 0.16, 8.01 ± 1.36 ve 8.72 ± 0.06 log cfu/g şeklinde hesaplanmıştır. Ordiales vd. (2013), tarafından yapılan çalışmada Torta Del Casar koyun peynirlerinde 2 günlük depolama koşulları altında 8.92 log cfu/g değeri elde ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacıların sonuçları Crespo vd. (2022), Cardinali vd. (2021), Ordiales vd. (2013), enzimlerin üretim yöntemleri ve peynirlerin benzer yapım özellikleri göstermemesinin burada elde edilen bakteri sayıları üzerinde farklılıklarla karşılaşılmamasına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Aydın (2008), *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Y. Enterocolitica* ve *S. aureus* gibi mikroorganizmaların üzerine farklı antimikrobiyal özellikler gösteren bitki ve asit kombinasyonlarını kullandığı çalışmasında test ettiği değerlerle salisilik asitin etkilerini de karşılaştırmalı olarak araştırmıştır. Salisilik asitin bu patojen

gruplar üzerinde önemli bir yıkıcı etkisinin olduğunu diğer asit ve bitkilerle test grupları içine dahil edildiğini bildirmiştir.

He vd. (2021), melatoninin bakteristatik etkisi üzerine yaptığı çalışmada melatoninin sadece klasik gram-negatif ve pozitif bakteriler üzerinde değil, aynı zamanda *Mycobacterium tuberculosis* gibi diğer bakteri gruplarının üyeleri üzerinde de antibakteriyel aktiviteler gösterdiğini bildirmiştir.

4.7.14.2. Laktobasil sayısı

Yapılan analizler doğrultusunda peynirlerindeki laktobasil sayıları Çizelge 4.51’de sunulmuştur. İstatiksel açıdan peynir örneklerinin laktobasil sayıları arasındaki farklılığın anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır ($p<0.05$). Koyun peyniri örneklerinde bu değer 3.01 – 4.34 log kob/g şeklinde belirlenmiştir. En düşük *Lactobacillus spp.* sayısı SA 50 örneğinde (3.01 ± 0.95 log kob/g) gözlenirken, en yüksek bakteri sayısının ise R örneğinde (4.34 ± 0.08 log kob/g) olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.51. Koyun peyniri örnekleri için *Lactobacillus spp.* Bakteri sayısı sonuçları (log kob/g) (n=3)

Peynir Örnekleri**	Laktobasil (log kob/g)
R	4.34 ± 0.08^a
K	3.53 ± 0.36^{ab}
E	3.17 ± 0.70^b
SA 50	3.01 ± 0.95^c
M5	3.06 ± 0.37^c

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. ($p<0.05$)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim.

Laktik asit bakterileri (LAB), peynir yapımında anahtar mikroorganizmaları temsil etmektedir. Peynir pıhtısında LAB, asetik asit gibi organik asitler, CO₂ ve etanol ile ana metabolit olarak laktik asit oluşumunu gerçekleştirmektedir (Cardinali vd., 2022). LAB tarafından peynir olgunlaşması sırasında uygulanan

enzimatik protein ve peptit parçalanması; aromatik, kükürt içeren ve dallı zincir katabolizmasından türetilen aroma bileşiklerinin ortaya çıkmasına yol açmaktadır (Steele vd., 2013).

Inácio vd. (2023), Serra da Estrela koyun peynirlerinde laktobasil sayısını 8.37 log cfu g⁻¹ şeklinde belirtmişlerdir. Inácio vd. (2021), Serra da Estrela koyun peynirleri üzerinde *Cynara cardunculus* enziminin mikrobiyolojik özelliklerini gözlemledikleri çalışmalarında bu değeri 8.62±0.18 log cfu g⁻¹ şeklinde bildirmişlerdir. Macedo vd. (2004), laktobasil sayılarının peynirlerde 1 hafta boyunca sabit kalarak sonrasında azalma eğilimi gösterdiğini rapor etmiştir. Çalışma bulguları Inácio vd. (2023) ve Inácio vd. (2021), sonuçlarından daha düşük oranda tespit edilmiştir. Melatonin ve salisilik asit içeren örnekler benzer sonuçlar vermiştir.

4.7.14.3. Laktokok Sayısı

Laktokoklar laktik asit bakterileri arasında peynir pıhtısında laktik asit üretiminden sorumlu başlıca türler arasındadır. Bu laktik asit bakterisi; kazein parçalanmasında, bakteriyofaj direncinde, bakteriyosinlerde ve ekzopolisakkarit üretiminde rol oynayan genleri barındırdığı için peynirdeki diğer birçok aktiviteden de sorumludur. Laktokokların peptidazları peynirde uçucu aroma bileşiklerini meydana getirmektedir (Cardinali vd., 2022).

Çizelge 4.52'de koyun peynirlerine ait laktokok değerleri yer almaktadır. Laktokok sayıları arasında görülen istatistiksel fark peynir grupları için önemlidir (p<0.05). Örneklerdeki laktokok bakteri sayısı 3.09 – 5.56 log kob/g arasında saptanmıştır. En yüksek laktokok sayısı R örneğinde (5.56 ± 0.32 log kob/g) gözlenmiştir.

Çizelge 4.52. Koyun peyniri örnekleri için *Lactococcus spp.* bakteri sayısı sonuçları (log kob/g) (n=3)

Peynir Örnekleri**	Laktokok sayısı (log kob/g)
R	5.56 ± 0.32 ^a
K	4.41 ± 1.10 ^b
E	3.36 ± 0.20 ^{bc}
SA 50	3.09 ± 0.08 ^c
M5	3.26 ± 0.13 ^{bc}

*Harf gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. (p<0.05)

**R:Rennin enzimi, K: Uyarıcı madde kullanılmadan geliştirilen enzim, E: *Cynara Scolymus L.* Kallus yapısından elde edilen enzim, SA 50: 50 µM Salisilik asit içeren enzim, M 5: 5 µM Melatonin içeren enzim

Rocha vd. (2021), koyun sütü peynirlerinde genel olarak *L. lactis*'in yüksek bir oranda starter kültür olarak yer aldığını bildirmiştir. Macedo vd. (2004), yaptıkları analizde, enginar özütü içeren Serra da Estrela koyun peynirinde, laktokok sayılarını 7 – 9 log cfu g⁻¹ olarak bildirmişlerdir. Cardinali vd. (2022), Queijo da Beira Baixa peynirlerinde bu bakteri grubunu 6.32 – 9.07 log cfu/g olarak elde etmişlerdir. Analiz verileri araştırmacıların değerlerinden daha düşük seviyededir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada, *Cynara Scolymus L.* 'den süspanse hücre kültür yöntemi ile salisilik asit ve melatonin de ilave edilerek enzimler üretilmiştir. Elde edilen enzimlerin bazı özellikleri belirlenerek en iyi pıhtılaşma ve proteolitik aktivite gösteren enzimler seçilmiş ve onlardan keçi ve koyun peynirleri üretilmiştir. Peynirler R, K, E, SA 50 ve M 5 enzimleri seçilerek keçi ve koyun sütünden üretilmiştir. Elde edilen enzimlerin ve üretilen koyun ve keçi peynirlerinin özellikleri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Farklı elisitör maddelere maruz bırakılan süspansiyon kültür hücrelerinin gelişim hızları ilk beş gün boyunca tüm uygulamalar için hücreler bir adaptasyon süreci göstermekle birlikte, biyokütle artışları ancak 10. ve 15. günlerde belirgin halde izlenmiştir. En düşük gelişim hızları, uygulanan 5 µM ve 10 µM melatonin konsantrasyonlarında tespit edilmiştir. Anlamlı biyokütle artışları 10. günde, 50 µM (3.75 g) ve 100 µM (3.72 g) yoğunlukta salisilik asit eklenen ve 5 µM (3.57 g) melatonin eklenen kültür ortamlarında tespit edilmiş olup, 15. günün sonunda kontrole kıyasla daha fazla biyokütle artışı gösteren uygulamalar 50 µM (4.82 g) ve 100 µM (4.87 g) salisilik asit uygulanan örnekler olmuştur.

Rennin ve süspanse hücre kültür yöntemi ile üretilen enzim örneklerinin gruplar arasındaki pıhtılaşma aktivite değişim oranı 0.52 – 0.74 aralığında belirlenmiştir. Enzimlerin protein 54 µg/mL – 228 µg/mL aralığında ölçülmüştür. Kullanılan bitkisel enzimlerde protein değerleri hayvansal enzime göre daha düşük bir şekilde saptanmıştır.

Enzimlere ait proteolitik aktivite miktarları 0.283 – 2.211 Ukazein/mg protein aralığında gözlenmiş olup en yüksek proteolitik aktivite değeri Rennin enzimi (2.211 ± 0.02 Ukazein/mg protein) için kaydedilmiştir. Bitkisel kaynaklı enzimlerin proteolitik aktivite değeri hayvansal enzime göre daha düşük olarak belirlenmiştir.

Enzim eldesinde salisilik asit ve melatonin uygulaması değerlendirildiğinde 5 μ M Melatonin ve 50 μ M Salisilik asit içeren enzimlerin süt pıhtılaşma aktiviteleri ve proteolitik aktiviteleri diğer enzimlere göre daha yüksek ve rennin enziminin özelliklerine daha yakın değerlerde olduğu için peynir üretiminde kullanılması uygun görülmüştür.

Enzimlerin üre-page analizi ile α_s -kazein oranları incelendiğinde α_s -kazeini en iyi indirgeyen enzimin M5 örneği olduğu, β -kazein için en iyi indirgenmeyi M5 (%48.60) ve SA 50 (%48.35) enzimlerinin sağladığı gözlenmiştir.

Keçi peynirlerinde; seçilen enzimlerin (K, E, SA50, M5) ve rennin enzimi ile üretilen peynirlerin titrasyon asitliği değerleri incelendiğinde örnekler arasındaki istatistiksel farkın önemli ($p<0.05$) olduğu görülmüştür. Bitkisel enzim ilave edilen örneklerde % kurumadde oranları daha düşük olarak tespit edilmiştir. Kullanılan bitkisel kaynaklı enzimlerin birbirine yakın su aktivitesi, % kurumadde, % yağ ve % tuz oranları gösterdikleri de belirlenmiştir.

Örneklerde (keçi peyniri) süspanse hücre kültürü ilavesinin toplam azot, suda çözünen azot ve olgunlaşma derecesi değerleri üzerine etkisi önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. En yüksek olgunlaşma derecesi SA50 ve M5 örneklerinde gözlenmiştir.

Gruplar arasındaki L^* , a^* ve b^* değeri için, keçi peyniri örneklerinde değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Analiz için elde edilen sonuçlar doğrultusunda bitkisel enzim kaynaklı örneklerde L^* değerlerinin yüksek olduğu, a^* değerlerinin negatif değerler göstererek, negatif yöne doğru azaldığı gözlenmiş, b^* (sarı renk) değerleri rennin enzimi ile üretilen peynire göre daha düşük düzeyde belirlenmiştir.

Keçi peyniri örneklerinde sertlik değerleri en yüksek rennin enzimi ile üretilen peynirlerde gözlenmiş bunu M5 ve SA50 örnekleri takip etmiştir. Süspanse hücre kültür yöntemi ile üretilen peynirlerin dış yapışkanlık, esneklik, iç yapışkanlık ve elastiklik değerleri arasında istatistiksel olarak benzerlik bulunmuştur.

Sakızımsık ve çiğnenebilirlik değerleri ise örnekler arasında istatistiksel olarak değişkenlik göstermiştir.

Bitkisel kaynaklı enzim ilaveli keçi peynirlerinde toplam mezofilik aerobik bakteri sayıları, laktokok ve laktobasil sayıları rennin enzimi ile üretilen peynirden çok daha düşük saptanmıştır. Bu bakteriler salisilik asit ve melatonin ilavesi ile hazırlanan süspanse hücre kültürü yöntemi ile üretilen peynirlerde en düşük düzeyde elde edilmiştir. Bu durum salisilik asitin ve melatoninin bakteri gelişimi üzerinde olumsuz bir etkisinin olabileceği durumunu düşündürmüştür.

Keçi peyniri örneklerinde üre-PAGE analizi sonuçları kapsamında, bitkisel kaynaklı enzimlerin peynirlerde α s-kazeinler (α s-CN), β -kazein (β -CN) ve diğer parçalanma ürünleri arasında istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) farklılıklar görüldüğü tespit edilmiştir. Rennin enzimi ile meydana gelen indirgenme düzeyi ile süspanse hücre kültürü yöntemi ile üretilen enzimler arasında α s-CN için yaklaşık iki kat düzeyinde bir fark elde edilmiştir.

Keçi peyniri örneklerinde yapılan SEM analizi incelemelerinde sıvı hücre kültürü örneklerinin daha homojen görünümde bir kazein matriksine sahip olduğu daha az boşluk barındırdığı sonucuna ulaşılmıştır.

Koyun peynirlerinde sıvı hücre kültür yöntemi ile üretilen enzimler arasında titrasyon asitliği açısından farklılık önemli olarak tespit edilirken, % kuru madde, % yağ, % tuz, su aktivitesi ve % toplam azot değerlerini önemli derecede etkilememiştir ($p<0.05$).

Koyun peynirlerinde % suda çözünen azot değeri en yüksek oranda rennin enzimi ile üretilen örnekten sonra SA50 ve M5 örneklerinde gözlenmiştir. En düşük olgunlaşma indeksi oranı verilen K örneğinde (%11.12) bulunmuştur. Enzimlere salisilik asit ve melatonin ilavesinin elde edilen verilere göre olgunlaşma indeksi üzerinde olumlu yönde etkisi olduğu söylenebilir.

Koyun peynirlerinde belirlenen renk analiz sonuçlarına göre L* değerleri en düşük rennin enzimi ile üretilen örneklerde görülmüş E, SA50 ve M5 örneklerinde birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir. Koyun peynirlerinde a* ve b* değerleri istatistiksel olarak ilave edilen enzim türüne göre önemli derecede farklı olarak tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Süspanse hücre kültürleri ile hazırlanan enzim ilaveli koyun peyniri örneklerinde sertlik değeri SA50 (45.52 N) ve M5 (56.64 N) örneklerinde daha yüksek oranlarda tespit edilmiştir. Dış yapışkanlık, esneklik, iç yapışkanlık sakızimsılık, çiğnenebilirlik, elastiklik değerleri arasında örnekler arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Koyun peynirlerinin Üre-PAGE elektroforetogramları baz alındığında, α s-kazein ve β - kazein oranlarının süspanse hücre kültür yöntemi ile elde edilen enzimler için en iyi indirgenmeyi M5 örneğinde gözlemlendiğini bunu SA 50 örneğinin izlediği belirlenmiştir.

Koyun peynirlerinde SEM analiz sonuçları ışığında, peynir matrisi üzerinde homojen olarak dağılmış küçük ve büyük boşluklar gözlemlenmiş olup, kompakt proteinli bir yapının, enzimatik pıhtılaşmaya özgü olduğu görülmüştür. Böyle bir mikro yapının, bitkisel enzimden üretilen peynir gruplarına daha düzgün, pürüzsüz ve kremsi bir doku kazandırdığı açığa çıkmıştır. Rennin enzimi ile üretilen peynirlere en yakın görünüm M5 örneğinde gözlenmiştir.

Uygulanan enzim ilavesi, toplam mezofilik aerob bakteri, laktobasil ve laktokok sayılarını önemli ölçüde etkilemiştir ($p<0.05$). Melatonin ve salisilik asit ilavesi ile hazırlanan enzimlerde toplam mezofilik bakteri sayılarının diğer örneklerden önemli derecede düşük olduğu tespit edilmiştir.

Koyun ve keçi sütü kullanılarak elde edilen peynirlerde enzimler benzer nitelikte proteolitik etki göstermiştir. Her iki grup sütte de peynirlerin rennin enzimi ile elde edilen peynirlerden belirgin derecede farklı sonuçlar verdiği daha yumuşak karakterde daha az asidik ve alışıldık peynir yapısından bir miktar uzak daha az

olgun peynirler elde edildiği belirlenmiştir. Suspende hücre kültür hazırlama işlemi sırasında denemede kullanılan Salisilik asit ve Melatonin ilavesinin bir miktar enzim özelliklerini iyileştirdiği peynirlerde daha iyi bir proteolitik etkinin oluşmasına neden olduğu ancak starter kültür gelişimi üzerinde bazı olumsuz etkiler meydana getirdiği söylenebilir.



KAYNAKLAR

- Abak, K., 1987. Enginar ve Kuşkonmaz Yetiştiriciliği. Tav. Yayın, 15, 3-29.
- Abd El-Montaleb, H.S., Abbas, K.A.E., Mwaheb, M.A., & Hamdy, S.M., 2022. Production and Characteristic Quality of Probiotic Labneh Cheese Supplemented with Broccoli Florets. British Food Journal, 124(11), 3666-3679.
- Abdeen, E.S., Ibrahim, O.A., Kholif, A.M., 2021. Utility of Moringa Oleifera Waste as a Coagulant in Goat Soft Cheese Production. Heliyon, 7, e07536.
- Agboola, S., Chen, S., Zhao, J.Z., 2004. Formation of Bitter Peptides During Ripening of Ovine Milk Cheese Made with Different Coagulants. Lait, 84,567-578.
- Ahmed, N.H., El Soda, M., Hassan, A.N., Frank, J., 2005. Improving the Textural Properties of an Acid-Coagulated (Karish) Cheese Using Exopolysaccharide Producing Cultures. LWT-Food Science and Technology, 38(8), 843-847.
- Ahmed, I.A.M., Babiker, E.E., Mori, N., 2010. pH Stability and Influence of Salts on Activity of a Milk-Clotting Enzyme from Solanum dubium Seeds and Its Enzymatic Action on Bovine Caseins. LWT Food Sci. Technol., 43, 759-764.
- Ahmed, S.A., Wehaidy, H.R., Ibrahim, O.A., Abd El Ghani, S., El-Hofi, M.A., 2016. Novel Milk-Clotting Enzyme from Bacillus Stearothermophilus as a Coagulant In UF-White Soft Cheese. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 7, 241-249.
- Akçam Oluk, E., 2006. Bitki Hücre Süspansiyon Kültürleri ve Sekonder Metabolit Üretimi.
- Akçay, U., 2012. Enginar (Cynara scolymus L.) Süspansiyon Hücre Kültürlerinde Aspartik Proteaz Üretimi, Proje No: 1090594, 41s, Kasım, Isparta.
- Aldiab, N., 2021. Nane ve Kırmızı Pul Biber İlavesinin Labne'nin Özelliklerine Etkisi. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 63s, Şanlıurfa.
- Alichanidis, E., Polychroniadou, A., 1996. Special Features of Dairy Products from Ewe and Goat Milk From the Physicochemical and Organoleptic Point of View. In Production and Utilization of Ewe and Goat Milk, International Dairy Federation, 19-21 October, Crete, Greece.

- Almeida, C.M., Gomes, D., Faro, C., Simões, I., 2015. Engineering a Cardosin B-Derived Rennet for Sheep and Goat Cheese Manufacture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 269-281.
- Almeida, C.M., Simões, I., 2018. Cardoon-Based Rennets for Cheese Production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(11), 46754-686.
- Alp, H.A., 2008. Enginar da Doku Kültürü Koşullarının İyileştirilmesine Yönelik Çalışmalar. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 82 s, İzmir.
- Alvarenga, N., Sousa, I., 2011. Effect of Freezing on the Rheological, Chemical and Colour Properties of Serpa Cheese. *Journal of Dairy Research*, 78(1), 80-87.
- Alves, S.M.P., Martins, A.P.L., Mourato, M.P., Vasconcelos, M.M., Fontes, A.M.L., 2004. Effect of technological parameters on coagulation properties of sheep milk. In: Symposium Internacional "El Futuro de los Sectores Lecheros ovino y caprino" (FIL/IDF, CIHEAM), 28-30 October, Zaragoza, 4-22.
- Amira, A. B., Bauwens, J., De Pauw, E., Besbes, S., Attia, H., Francis, F., Blecker, C., 2017. Identification of Proteins from Wild Cardoon Flowers (*Cynara Cardunculus* L.) by a Proteomic Approach. *Journal of Chemical Biology*, 10(1), 25-33.
- ANONİM, 2006. Enginar Yetiştiriciliği ve Enginarın Sağlık Açısından Önemi, *Hasad Dergisi*.
- Anonymous, 1987. Milk and Milk Products Enumeration of Microorganisms-Colony Count at 30°C. International Dairy Federation Standard 100A, Brussels.
- Ardö, Y., McSweeney, P. L., Magboul, A. A., Upadhyay, V. K., Fox, P. F. (2017). Biochemistry of Cheese Ripening: Proteolysis. In *Cheese* (pp. 445-482). Academic Press.
- AOAC. (Association of Official Analytical Chemists), 1997. Official Methods of Analysis, pp. 16-17 (Chapter 16).
- Araújo-Rodrigues, H., Martins, A. P., Tavaría, F. K., Santos, M. T. G., Carvalho, M. J., Dias, J., ... Pintado, M. E., 2022. Organoleptic Chemical Markers of Serpa PDO Cheese Specificity. *Foods*, 11(13), 1898.
- Arnao, M. B., Hernández-Ruiz, J., 2013. Growth Conditions Influence the Melatonin Content of Tomato Plants. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1212-1214.
- Aydemir, O., Kurt, A., 2020. Farklı Pastörizasyon Koşullarının Beyaz Peynirin Reolojik, Tekstürel Ve Duyusal Özelliklerine Etkisi. *Gıda*, 45(6), 1083-1096.

- Aydın, B.D., 2008. Bazı Tıbbi Bitki ve Baharatların Gıda Patojenleri Üzerine Antibakteriyal Etkisinin Araştırılması. Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dergisi,14(1):83-87.
- Aydınoğlu Sönmez, P., 2019. Yağı Azaltılmış Labne Peynirinin Tekstürel Özelliklerinin Geliştirilmesi. Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 150s, Bursa.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., 2001. Bitki Biyoteknolojisi Cilt I - Doku Kültürü ve Uygulamaları. S. Ü. Vakfı Yayınları, Konya, 374 s.
- Balthazar, C.F., Pimentel, T.C., Ferrão, L.L., Almada, C.N., Santillo, A., Albenzio, M., ... Cruz, A. G., 2017. Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance For Functional Food Development. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 16(2), 247-262.
- Bansal, N., Drake, M.A., Piraino, P., Broe, M.L., Harboe, M., Fox, P. F., 2009. Suitability of Recombinant Camel (*Camelus Dromedarius*) Chymosin as a Coagulant for Cheddar Cheese. International Dairy Journal, (19), 510-517.
- Barbosa, C.H., Andrade, M.A., Vilarinho, F., Castanheira, I., Fernando, A. L., Loizzo, M. R., Sanches Silva, A., 2020. A New Insight on Cardoon: Exploring New Uses Besides Cheese Making with a View to Zero Waste. Foods, 9(5), 564.
- Barracosa, P., Simões, I., Martins, A. P., Barros, M., Pires, E., 2021. Biochemical Diversity of Cardoon Flowers (*Cynara cardunculus* L.): Predicting PDO Mediterranean Cheese Textures. Food Bioscience, 39, 100805.
- Barros, R.M., Malcata, F.X., 2004. A Kinetic Model for Hydrolysis of Whey Proteins by Cardosin A Extracted from *Cynara Cardunculus*. Food chemistry, 88(3), 351-359.
- Bayram, U., Tarakçı, Z., 2020. Farklı Meyve Tozları İlave Edilen Kaşar Peynirlerinin Renk Değerleri ve Tekstürel Özellikleri Üzerine Olgunlaşmanın Etkilerinin Belirlenmesi. Akademik Ziraat Dergisi, 9(2), 363-372.
- Ben Amira, A., Arias, A.A., Fickers, P., Attia, H., Besbes, S., Blecker, C., 2021. Effect of Brine Concentration on Physico-Chemical Characteristics, Texture, Rheological Properties and Proteolysis Level of Cheeses Produced by an Optimized Wild Cardoon Rennet. Journal of Food Science And Technology, 58, 1331-1340.
- Bencini, R., Pulina, G., 1997. The Quality of Sheep Milk: A Review. Australian Journal of Experimental Agriculture, 37(4), 485-504.
- Bekheet, S.A., El-Bahr, M.K., Ali, S.A., Hamed, M.A., 2014. Callus Production of Globe Artichoke and Milk Thistle: In Vitro Hypolipidemic And Antioxidant Activities. World J Pharma Res, 3, 1-71.

- Benheddi, W., Hellal, A., 2019. Technological Characterization and Sensory Evaluation of a Traditional Algerian Fresh Cheese Clotted with *Cynara Cardunculus L.* Flowers and Lactic Acid Bacteria. *Journal Of Food Science And Technology*, 56(7), 3431-3438.
- Berridge, N.J., 1952. 488. An Improved Method of Observing the Clotting of Milk Containing Rennin. *Journal of Dairy Research*, 19(3), 328-329.
- Bhaskaracharya, R.K., Shah, N.P., 2001. Texture and Microstructure of Skim Milk Mozzarella Cheeses Made Using Fat Replacers. *Australian Journal of Dairy Technology*, 56:1-9.
- Bontinis, T.G., Mallatou, H., Alichanidis, E., Kakouri, A., Samelis, J., 2008. Physicochemical, Microbiological and Sensory Changes During Ripening and Storage of Xinotyri, a Traditional Greek Cheese from Raw Goat's Milk. *International Journal of Dairy Technology*, 61(3), 229-236.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Buriti, F.C.A., DaRocha, J.S. and Saad, S.M.I., 2005. Incorporation of *Lactobacillus Acidophilus* in Minas Resh Cheese and its Implications for Textural and Sensorial Properties During Storage. *International Dairy Journal*, 15, 1279-1288.
- Cardinali, F., Ferrocino, I., Milanović, V., Belleggia, L., Corvaglia, M. R., Garofalo, C., ... Aquilanti, L., 2021. Microbial Communities and Volatile Profile of Queijo De Azeitão PDO Cheese, a Traditional Mediterranean Thistle-Curdled Cheese from Portugal. *Food Research International*, 147, 110537.
- Cardinali, F., Foligni, R., Ferrocino, I., Harasym, J., Orkusz, A., Franciosa, I., ... Aquilanti, L., 2022. Microbial Diversity, Morpho-Textural Characterization, and Volatilome Profile of the Portuguese Thistle-Curdled Cheese Queijo Da Beira Baixa PDO. *Food Research International*, 157, 111481.
- Carvalho, G.P., Santos, R., Fino, A., Ferreira, P., Rodrigues, F.M., Dias, J., 2020. Evolution During Three Ripening Stages of Évora Cheese. *Foods*, 9(9), 1140.
- Cavalli, S.V., Lufrano, D., Colombo, M.L., Priolo, N., 2013. Properties and Applications of Phytins from Thistle Flowers. *Phytochemistry*, 92, 16-32.
- Chazarra, S., Sidrach, L., Lopez-Molina, D., Rodríguez-López, J.N., 2007. Characterization of the Milk-Clotting Properties of Extracts from Artichoke (*Cynara Scolymus, L.*) Flowers. *International Dairy Journal*, 17(12), 1393-1400.

- Chen, L., Tian, J., Wang, S., Song, T., Zhang, J., Yao, Y., 2019. Application of Melatonin Promotes Anthocyanin Accumulation in Crabapple Leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 142, 332-341.
- Chu, L., Zhou, X., Shen, Y., Yu, Y., 2020. Inhibitory Effect of Trisodium Citrate on Biofilms Formed by *Klebsiella Pneumoniae*. *J. Glob. Antimicrob Resist.*, 22, 452-456.
- Collin, J.C., Grappin, R., Legraet, Y., 1977. Study of the Measuring Method, According to Berridge, of the Clotting-Time of Milk to Which Has Been Added an Enzymatic Solution 2. *Revue Laitiere Francaise (France)*.
- Conceição, C., Martins, P., Alvarenga, N., Dias, J., Lamy, E., Garrido, L., ... Duarte, M. F., 2018. *Cynara cardunculus*: Use in cheesemaking and pharmaceutical applications. *Technological approaches for novel applications in dairy processing*, 73-107.
- Cordeiro, M., Jakob, E., Puhon, Z., Pais, M.S., Brodelius, P.E., 1992. Milk Clotting and Proteolytic Activities of Purified Cynarases from *Cynara Cardunculus*-A Comparison to Chymosin. *Milchwissenschaft*, 47, 683-687.
- Correia, P., Guiné, R., Rodrigues, M. C., Mendes, R., 2021. Influence of Temperature and Packaging Materials in Ewe's Cheeses Storage. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 34, 31-38.
- Coskun, Y., Duran, R. E., Kilic, S., 2019. Striking Effects of Melatonin on Secondary Metabolites Produced by Callus Culture of Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.). *Plant Cell, Tissue And Organ Culture (PCTOC)*, 138(1), 89-95.
- Crespo, A., Jiménez, A., Ruiz-Moyano, S., Merchán, A. V., Galván, A. I., Benito, M. J., Martín, A., 2022. Low-Frequency Ultrasound as a Tool for Quality Control of Soft-Bodied Raw Ewe's Milk Cheeses. *Food Control*, 131, 108405.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. N., 2006. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H., (Ed.), *Phenol, Polyphenols and Tannins : An Overview*, (1), 1-24. Blackwell publishing, 353p., UK.
- Çelebi, M., Şimşek, B., 2020. Taze ve Olgunlaşmış Kaşar Peynirlerinde Bazı Kimyasal ve Tekstürel Özelliklerin Belirlenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25(2), 64-74.
- Çoban, C.Ç., 2014. Sirna Yüklü Nanopartiküllerin in Vitro Ortamda Mda-Mb-231 Kanserli Hücre Hattına Aktarılarak Bcl-2 Geninin Sessizleştirilmesi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 80s, Kırıkkale.
- Daghaghian, H., Mortazaie Nejad, F., Bahreininejad, B., 2017. Physiological Response of the Medicinal Plant Artichoke (*Cynara Scolymus* L.) to

- Exogenous Salicylic Acid Under Field Saline Conditions. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 92(4), 389-396.
- Davies, D.R., 1990. The Structure and Function of the Aspartic Proteinases. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 19, 189-215.
- Debergh, P.C., Read, P.E., 1993. Micropropagation. In Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. (Ed.), *Micropropagation - Technology and Application*, (1-15). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holland.
- del Rocío Martínez-Ruiz, N., Enriquez, S. F., Vázquez-Nájera, R. E., López-Díaz, J. A., 2013. Microbiological Quality of Asadero Cheese Manufactured with a Plant Based Coagulant from *Solanum Elaeagnifolium*.
- Delgado, F.J., González-Crespo, J., Cava, R., Ramírez, R., 2011. Changes in the Volatile Profile of a Raw Goat Milk Cheese Treated by Hydrostatic High Pressure at Different Stages of Maturation. *Int. Dairy J.* 21, 135-141.
- Demirhan, B., Kasap, E.N., 2019. Evaluation of the Antimicrobial Effect of Salicylic Acid on Meatballs. *Gazi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 4(3), 20-27.
- Deveci, F., 2016. Beyaz Peynir Üretiminde Kullanılan Farklı Baharat Türlerinin Olgunlaşmaya Etkilerinin Araştırılması. Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 116s, Ordu.
- Dias, J., Lage, P., Garrido, A., Machado, E., Conceição, C., Gomes, S., ... Alvarenga, N., 2021. Evaluation of gas Holes in “Queijo de Nisa” PDO Cheese Using Computer Vision. *Journal of Food Science and Technology*, 58, 1072-1080.
- Dimitreli, G., Thomareis, A.S., 2007. Texture Evaluation of Block-Type Processed Cheese as a Function of Chemical Composition and in Relation to its Apparent Viscosity. *Journal of Food Engineering*, 79(4), 1364-1373.
- Domingos, A., Cardoso, P.C., Xue, Z.T., Clemente, A., Brodelius, P.E., Pais, M.S., 2000. Purification, Cloning and Autoproteolytic Processing of an Aspartic Proteinase from *Centaurea Calcitrapa*. *European Journal of Biochemistry*, 267(23), 6824-6831.
- Dos Santos, M.T.P.G., Benito, M.J., de Guía Córdoba, M., Alvarenga, N., de Herrera, S.R. M.S., 2017. Yeast Community in Traditional Portuguese Serpa Cheese by Culture-Dependent and-Independent DNA Approaches. *International Journal of Food Microbiology*, 262, 63-70.
- Dutt, K., Gupta, P., Saran, S., Misra, S., Saxena, R.K., 2009. Production of milkclotting protease from *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 158,761-77.
- Ekbiç, E., 2005. Sakız Enginar Çeşidinde Meydana Gelen Dönüşüm Üzerinde Araştırmalar. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 87s, Adana.

- El-Abagy, H.M.H., El-ShM, R., Abdel-Mawgoud, A.M.R., El-Greadly, N.H., 2010. Physiological and Biochemical Effects of Some Bioregulators on Growth, Productivity and Quality of Artichoke (*Cynara Scolymus L.*) Plant. Res. J. Agric. Biol. Sci, 6, 683-690.
- El-Bahr, M.K., Bekheet, S.A.E., Gabr, A.M.M., El-Shenawy, R., El-Abd, Y.S., 2018. Accumulation of Cynarin, the Hepatoprotective Compound, in Ethephon Treated Callus Cultures of Globe Artichoke (*Cynara Scolymus L.*). Journal of Biological Sciences, 18(5), 243-250.
- El-Bakry, M., Sheehan, J., 2014. Analysing Cheese Microstructure: A Review of Recent Developments. Journal of Food Engineering, 125, 84-96.
- El Galiou, O., Zantar, S., Bakkali, M., Laglaoui, A., Centeno, J. A., Carballo, J., 2015. Chemical and Microbiological Characteristics of Traditional Homemade Fresh Goat Cheeses from Northern Morocco. Small Ruminant Research, 129, 108-113.
- El-Mergawi, R.A., Abdel-Wahed, M.S.A., 2004. Diversity in Salicylic Acid Effects on Growth Criteria and Different Indole Acetic Acid Forms Among Faba Bean and Maize. Egyptian Journal of Agronomy, 26, 49-61.
- El-Naby, A., Abdelkhalek Ahmed Mohamed, M., El-Naggar, Y. I. M., 2019. Effect of Melatonin, GA3 and NAA on Vegetative Growth, Yield and Quality of 'Canino' apricot Fruits. Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus, 18(3).
- El-Sayed, H.S., Elaaser, M., El-Shafei, K., Mabrouk, A.M., Kassem, J.M., Assem, F., ... Effat, B.A., 2022. A Comprehensive Study of Carbonated Probiotic UF-Labneh Cheese as a Novel Product. Egyptian Journal of Food Science, 50(1), 127-143.
- El-Soda, M., 2003. Accelerated Cheese Ripening. (J. W. Fuquay, P. F. Fox, editor), Encyclopedia of Dairy Science, Vol: 1, Paris, Academic Press, p:327-329.
- El-Zohiri, S.S.M., 2009. Role of the Salicylic and Ascorbic Acid on the Control of Growth, Flowering and Yield of Globe Artichoke. Annals of Agricultural Science Moshtohor Journal, 47(3), 393.
- Eren-Vapur, U., Ozcan, T., 2012. Determination of Free Amino Acids in Whole-Fat Turkish White Brined Cheese Produced by Animal and Microbial Milk-Clotting Enzymes with and without the Addition of Starter Culture. Mljekarstvo: Časopis Za Unaprjeđenje Proizvodnje I Prerade Mlijeka, 62(4), 241-250.
- Ergül, S., 2015. Beyaz Peynir Üretiminde ve Olgunlaştırılmasında Deve Kimozininin Kullanım Olanaklarının Araştırılması ve Buzağı Renneti ile Karşılaştırılması. İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 89s, Kayseri.

- Eroğlu, E., Özcan, T., 2018. Sütün Enzimatik Koagülasyonu ve Peynir Üretiminde Bitkisel Pıhtılaştırıcılar.
- Ertürkmen, P., Akbal, S., Arısoy, Z. 2022. The Physico-Chemical and Microbial Content of White Cheese Obtained Using Plant-based, Animal and Microbial Enzymes. Turkish Journal of Agriculture -Food Science and Technology,10(11): 2252-2262.
- Esen, B.N., Güneşer, O., Akyüz, S., 2020. Bitkisel ve Süt Bazlı Protein Kaynaklarından Üretilen Analog Peynirlerin Fiziko-Kimyasal, Mikrobiyolojik ve Duyusal Özellikleri ile Aroma Profilleri Değerlendirilmesi. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 26(7), 1214-1222.
- Eser, B., İlbi, H. ve Uğur, A., 2006. Enginar Yetiştiriciliği. Hasat Yayıncılık Ltd. Şti., 64 s, İstanbul.
- Esposito, M., Di Pierro, P., Dejonghe, W., Mariniello, L., Porta, R., 2016. Enzymatic Milk Clotting Activity in Artichoke (*Cynara Scolymus*) Leaves and Alpine Thistle (*Carduus Defloratus*) Flowers. Immobilization of Alpine Thistle Aspartic Protease. Food Chemistry, 204, 115-121.
- Esteves, C. L., Lucey, J.A., Hyslop, D. B., Pires, E.M., 2003. Effect of Gelation Temperature on the Properties of Skim Milk Gels Made from Plant Coagulants and Chymosin. International Dairy Journal, 13(11), 877-885.
- Ezzo, M.I., Saleh, S.A., Abd El-Naby, S.K., Khalifa, R.K., 2019. Response of Two Seed-Grown Artichoke Cultivars to GA 3 and Melatonin Treatments. Bulletin of the National Research Centre, 43(1), 1-10.
- Farhan, M.M., Hassawi, D. S., Ibraheem, N.K., 2018. Polyphenols Compounds Investigation of Leaves and Callus Artichokes (*Cynara Scolymus*). Plant Archives, 18(2), 2629-2635.
- Faro, C., Veríssimo, P., Lin, Y., Tang, J., Pires, E., 1995. Cardosin A and B, Aspartic Proteases from the Flowers of Cardoon. Aspartic Proteinases: Structure, Function, Biology, and Biomedical Implications, 373-377.
- Faro, C., Ramalho-Santos, M., Vieira, M., Mendes, A., Simões, I., Andrade, R., Veríssimo, P., Lin, X., Tang, J., Pires, E., 1999. Cloning and Characterization of Cdna Encoding Cardosin a, an RGD-containing Plant Aspartic Proteinase. Journal of Biological Chemistry, 274, 28724-28729.
- Fernández-Salguero, J., Sanjuán, E., 1999. Influence of Vegetable and Animal Rennet on Proteolysis During Ripening in Ewes' Milk Cheese. Food Chemistry, 64(2), 177-183.
- Fogeiro, É., Barracosa, P., Oliveira, J., Wessel, D.F., 2020. Influence of Cardoon Flower (*Cynara Cardunculus L.*) and Flock Lactation Stage in PDO Serra Da Estrela Cheese. Foods, 9(4), 386.

- Foury, C. and Martin, F. 1974. Etude des Possibilites de Creation Et D'utilisation de Varietes D'artichaut Issues de Semences. Atti 2. Cong. Int. Sul Carciofo, Bari. 667-669.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L., 2017. *Fundamentals of Cheese Science* (Vol. 1, p. 271). Boston, MA, USA:: Springer.
- Francisco-José, D., Joaquín, R. P., José, G. C., Ramírez, R., Isidro, R., 2010. Proteolysis and Texture Changes of a Spanish Soft Cheese ("Torta Del Casar") Manufactured with Raw Ewe Milk and Vegetable Rennet During Ripening. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(3), 512-519.
- Gaafar, A.A., Salama, Z.A., 2013. Phenolic Compounds from Artichoke (*Cynara Scolymus* L.) by-Products and Their Antimicrobial Activities. *J. Biol. Agric. Healthc*, 3(1), e6.
- Galan E., Prados F., Pino A., Tejada L., Fernandez-Salguero J., 2008. Influence of Different Amounts of Vegetable Coagulant from Cardoon *Cynara Cardunculus* and Calf Rennet on the Proteolysis and Sensory Characteristics of Cheeses Made with Sheep Milk. *International Dairy Journal*, 18(1), 93-98.
- Galán, E., Cabezas, L., Fernández-Salguero, J., 2012. Proteolysis, Microbiology and Sensory Properties of Ewes' Milk Cheese Produced with Plant Coagulant from Cardoon *Cynara Cardunculus*, Calf Rennet or A Mixture Thereof. *International Dairy Journal*, 25(2), 92-96.
- García, V., Rovira, S., Teruel, R., Boutoial, K., Rodríguez, J., Roa, I., López, M.B., 2012. Effect of Vegetable Coagulant, Microbial Coagulant and Calf Rennet on Physicochemical, Proteolysis, Sensory and Texture Profiles of Fresh Goats Cheese. *Dairy Science & Technology*, 92, 691-707.
- García, V., Rovira, S., Boutoial, K., López, M. B., 2014a. Improvements in Goat Milk Quality: A Review. *Small Ruminant Research*, 121(1), 51-57.
- García, V., Rovira, S., Boutoial, K., Ferrandini, E., Lopez Morales, M. B., 2014b. Effect of Starters and Ripening Time on the Physicochemical, Nitrogen Fraction and Texture Profile of Goat's Cheese Coagulated with a Vegetable Coagulant (*Cynara Cardunculus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(3), 552-559.
- García, V., Rovira, S., Boutoial, K., Ferrandini, E., López, M.B., 2016. Physicochemical, Microbiological, Textural and Sensory Changes During the Ripening of Pasteurised Goat Milk Cheese Made with Plant Coagulant (*Cynara Scolymus*). *International Journal of Dairy Technology*, 69(1), 96-102.
- García-Gómez, B., Vázquez-Odériz, M.L., Muñoz-Ferreiro, N., Romero-Rodríguez, M.Á., Vázquez, M., 2019. Interaction Between Rennet Source and

Transglutaminase in White Fresh Cheese Production: Effect on Physicochemical and Textural Properties. LWT, 113, 108279.

- Gardini, F., Lanciotti, R., Guarzoni, M.E., Torriani, S., 1999. Evaluation of Aroma Production and Survival of *Streptococcus Thermophilus*, *Lactococcus Delbrueckii Subsp. Bulgaricus* and *Lactobacillus Acidophilus* in Fermented Milks. International Dairy Journal, 9, 125-134.
- Gonçalves, M.T.P., Benito, M.J., Córdoba, M.D.G., Egas, C., Merchán, A.V., Galván, A.I., Ruiz-Moyano, S., 2018. Bacterial Communities in Serpa Cheese by Culture Dependent Techniques, 16S rRNA Gene Sequencing and High-Throughput Sequencing Analysis. Journal of Food Science, 83(5), 1333-1341.
- Gostin, A.I., Waisundara, V.Y., 2019. Edible Flowers as Functional Food: A Review on Artichoke (*Cynara Cardunculus L.*). Trends in Food Science and Technology, 86, 381-391.
- Gripon, J.C., Desmazeaud, M.J., Le Bars, D., Bergere, J.L., 1975. Etude Du Rôle Des Micro-Organismes Et Des Enzymes Au Cours de La Maturation Des Fromages. II.-Influence De La Présure Commerciale. Le Lait, 55(548), 502-516.
- Guinee, T.P., 2004. Salting And the Role of Salt in Cheese. International Journal of Dairy Technology, 57(2-3), 99-109.
- Guiné, R. P., Tenreiro, M. I., Correia, A. C., Correia, P. M., Barracosa, P., 2016. Analysis of Factors Influencing the Physical, Chemical and Sensorial Properties of Serra Da Estrela Cheeses. Journal of Food Measurement and Characterization, 10(3), 643-657.
- Guiné, R.P., Fontes, L., Lima, M.J., 2019. Evaluation of Texture in Serra Da Estrela Cheese Manufactured in Different Dairies. Open Agriculture, 4(1), 475-486.
- Gupta, C.B., Eskin, N.A.M., 1977. Potential Use of Vegetable Rennet [From *Ficus Carica*, *Ricinus Communis*, *Benincasa Cerifera*] in the Production of Cheese. Food Technology.
- Gün, İ., 2012. Alternatif Kılıf Uygulamalarının Tulum peynirinin Bazı Nitelikleri Üzerine Etkileri. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 280s, Isparta.
- Gürkaynak, D., 2023. Effect of Different Storage Conditions on the Stability and Functionality of Dairy Powders: A Case Study with Labneh Production. İzmir Institute of Technology, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 171s, İzmir.
- Hallaç, B., Güçer, Y., Kılınççeker, O., Poyrazoğlu, E.S., 2021. Geleneksel Siirt Peynirlerinin Mikrobiyolojik, Kimyasal ve Fiziksel Özelliklerinin

Belirlenerek Halk Sağlığı Açısından Değerlendirilmesi. *Adyutayam Dergisi*, 9(1), 61-72.

Hammam, A.R.A., Metzger, L.E., 2020. Manufacture of İmitation Mozzarella Cheese without Emulsifying Salts Using Acid Curd and Micellar Casein Concentrate.

Hatipoğlu, A., Çelik, Ş., 2020. Geleneksel Diyarbakır Örgü Peynirinin Tekstürel Özellikleri ve Mikrobiyal Florasının Depolama Periyodu Boyunca Değişimi. *Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 24(3), 609-617.

Hayaloglu, A.A., Guven, M., Fox, P.F., Hannon, J.A., McSweeney, P.L.H., 2004. Proteolysis in Turkish White-Brined Cheese Made with Defined Strains of *Lactococcus*. *International Dairy Journal*, 14(7), 599-610.

Hayaloglu, A.A., Karagül-Yüceer, Y., 2011. Utilization and Characterization of Small Ruminants' Milk and Milk Products in Turkey: Current Status and New Perspectives. *Small Ruminant Research*, 101, 73-83.

Hayaloğlu, A.A., Özer, B., 2011. Peynir Biliminin Temelleri. Sidas Medya Ltd. Şti, 680s, İzmir.

Hayaloglu, A. A., Yaşar, K., Tolu, C., Şahingil, D., 2013. Characterizing Volatile Compounds and Proteolysis in Gökçeada Artisanal Goat Cheese. *Small Ruminant Research*, 113(1), 187-194.

Hayaloğlu, A.A., Topcu, A., Koca, N., 2021. Peynir Analizleri. Hayaloğlu, A.A., Özer, B. (Ed.), *Peynir Biliminin Temelleri (617-710)*, Nobel Yayın Dağıtım, 812s, Ankara.

He, F., Wu, X., Zhang, Q., Li, Y., Ye, Y., Li, P., ... Xia, Y., 2021. Bacteriostatic Potential of Melatonin: Therapeutic Standing and Mechanistic Insights. *Frontiers in Immunology*, 12, 683879.

Hemmatian, M., Aminifar, M., & Attar, F., 2015. Characterization of Poosti Cheese, a Traditional Raw Sheep Cheese During Ripening: Physicochemical, Microbial and Micro-Structural Aspects.

Hertzler, S.R., Clancy, S.M., 2003. Kefir Improves Lactose Digestion And Tolerance in Adults with Lactose Maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*, 103(5), 582-587.

IMAIAA. Regras de Produção do Queijo Serpa. Available, Erişim Tarihi:06.03.2022. <https://ec.europa.eu/geographical-indications-register/eambrosia-public/api/v1/attachments/59825>

Inácio, R.S., Gomes, A. M., Saraiva, J. A., 2020. Serra da Estrela Cheese: A Review. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(5), e14412.

- Inácio, R.S., Pinto, C.A., Saraiva, J. A., Gomes, A.M., 2021. Effect of High Pressure Pre-Treatment on Raw Ewes' Milk and on Subsequently Produced Cheese Throughout Ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(9), 3975-3980.
- Inácio, R.S., Monteiro, M.J., Lopes-da-Silva, J.A., Gomes, A.M., Saraiva, J.A., 2023. Comparing Different Packaging Conditions on Quality Stability of High-Pressure Treated Serra da Estrela Cheeses During Cold Storage. *Foods*, 12(10), 1935.
- Inhyu, B., Jorng-Hyun, P., Hee-Young, C., Hoo-Kil, J., 2017. Emerging Innovations to Reduce the Salt Content in Cheese; Effects of Salt on Flavor, Texture, and Shelf Life of Cheese and Current Salt Usage: A Review. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37(6), 793-798.
- Islam, M.A., Basunia, M.H.K., Rahman, A., Bari, M.S., Rahman, M.F., Mannan, M.A., Datta, T.K., 2021. Effect of Coagulants on the Chemical And Microbial Quality of Fresh Cheese. *Bangladesh Journal of Animal Science*, 50(2), 73-79.
- Jacob, M., Jaros, D., Rohm, H., 2011. Recent Advances in Milk Clotting Enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 14-33.
- Jalilzadeh, A., Hesari, J., Peighambaroust, S.H., Javidipour, I., 2018. The Effect of Ultrasound Treatment on Microbial and Physicochemical Properties of Iranian Ultrafiltered Feta-Type Cheese. *Journal of Dairy Science*, 101(7), 5809-5820.
- Johnson, M.E., Lucey, J.A., 2006. Major Technological Advances and Trends in Cheese. *Journal of Dairy Science*, 89, 1174-1178.
- Kajak-Siemaszko, K., Zielińska, D., Łepecka, A., Jaworska, D., Okoń, A., Neffe-Skocińska, K., ... Kołożyn-Krajewska, D., 2022. Effect of Lactic Acid Bacteria on Nutritional and Sensory Quality of Goat Organic Acid-Rennet Cheeses. *Applied Sciences*, 12(17), 8855.
- Kappeler, S.R., van den Brink, H.J., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puan, Z., Hansen, E.B., Johansen, E., 2006. Characterization of Recombinant Camel Chymosin Reveals Superior Properties for the Coagulation of Bovine and Camel Milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342(2), 647-654.
- Karabıyıklı, Ş., Erdoğan, S., 2019. Peynir Üretiminde Mikroorganizmaların Rolü ve Önemli Mikroorganizma Grupları. *Journal of New Results in Engineering and Natural Sciences*, (9), 35-45.
- Karagöl, M.A., 2017. Koyun ve İnek Sütlerinden Üretilen Karın Kaymağı Peynirinin Olgunlaştırılmasıyla Meydana Gelen Değişikliklerin Araştırılması. Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 86s, Ordu.

- Karahan L., Çelikel, A., Akın, M., Akın, M., Ceylan, H.G., 2022. Determination of Quality Properties of Traditional Adıyaman Cheese Produced from Sheep Milk. *Adıyaman Üniversitesi, Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 9(16), 117-128.
- Karaman, A.D., Akalın, A.S., 2013. Improving Quality Characteristics of Reduced and Low Fat Turkish White Cheeses Using Homogenized Cream. *LWT-Food Science and Technology*, 50(2), 503-510.
- Karataş, İ., Karataş, R., & Elmastaş, M., 2016. Antosiyaninlerin Kallus ve Hücre Süspansiyon Kültürüyle Üretimi. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, (12), 80-91.
- Kaur, H., Mukherjee, S., Baluska, F., Bhatla, S.C., 2015. Regulatory Roles of Serotonin and Melatonin in Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Plant Signaling & Behavior*, 10(11), E1049788.
- Kavas, N., 2011. Fonksiyonel Keçi Peyniri Üretiminde Sinbiyotik Mikrokapsüllerin Kullanımı ve Canlılıklarının İncelenmesi. *Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, 238s, İzmir.
- Khayat, M.T., Ibrahim, T.S., Khayyat, A.N., Alharbi, M., Shaldam, M.A., Mohammad, K. A., ... Abbas, H.A., 2022. Sodium Citrate Alleviates Virulence in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Microorganisms*, 10(5), 1046.
- Kováčová, M., Výrostková, J., Dudriková, E., Zigo, F., Semjon, B., Regecová, I., 2021. Assessment of Quality and Safety of Farm Level Produced Cheeses from Sheep and Goat Milk. *Applied Sciences*, 11(7), 3196.
- Kukić, J., Popović, V., Petrović, S., Mucaji, P., Ćirić, A., Stojković, D., & Soković, M., 2008. Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Cynara Cardunculus* Extracts. *Food Chemistry*, 107(2), 861-868.
- Kumar, A., Grover, S., Sharma, J., Batish, V.K., 2010. Chymosin and Other Milk Coagulants: Sources and Biotechnological Interventions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(4), 243-258.
- Lahrech, A., Hamidi, M., Choukri, A., Ancer, B., 2018. Microbiological Quality of Milk and Cheese of Arbia Goat: Coagulation with *Cynara Cardunculus*. *Livestock Research for Rural Development*, 30(4).
- Lattanzio, V., Kroon, P. A., Linsalata, V., Cardinali, A., 2009. Globe Artichoke: A Functional Food and Source of Nutraceutical Ingredients. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 131-144.
- Lattanzio, V., Caretto, S., Linsalata, V., Colella, G., Mita, G., 2018. Signal Transduction in Artichoke [*Cynara cardunculus L. subsp. scolymus (L.) Hayek*] Callus and Cell Suspension Cultures Under Nutritional Stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 127, 97-103.

- Law, B. A., 2001. Controlled and Accelerated Cheese Ripening: The Research Base for New Technologies. *International Dairy Journal*, 11: 383-398.
- Lemes, A. C., Pavón, Y., Lazzaroni, S., Rozycki, S., Brandelli, A., Kalil, S.J., 2016. A New Milk-Clotting Enzyme Produced by *Bacillus Sp. P45* Applied in Cream Cheese Development. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 217-224.
- Leslie, C.A., Romani, R.J., 1988. Inhibition of Ethylene Biosynthesis by Salicylic Acid. *Plant Physiology*, 88(3), 833-837.
- Li, Y., Cassone, V.M., 2015. A Simple, Specific High-Throughput Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Quantitative Determination of Melatonin in Cell Culture Medium. *International Immunopharmacology*, 28(1), 230-234.
- Liu, X., Wu, Y., Guan, R., Jia, G., Ma, Y., Zhang, Y., 2021. Advances in Research on Calf Rennet Substitutes and Their Effects on Cheese Quality. *Food Res. Int.*, 149, 110704.
- Llorente, B.E., Brutti, C. B., Caffini, N.O., 2004. Purification and Characterization of a Milk-Clotting Aspartic Proteinase from Globe Artichoke (*Cynara Scolymus L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8182-8189.
- Llorente, B.E., Obregón, W.D., Avilés, F.X., Caffini, N.O., Vairo-Cavalli, S., 2014. Use of Artichoke (*Cynara Scolymus*) Flower Extract as a Substitute for Bovine Rennet in the Manufacture of Gouda-Type Cheese: Characterization of Aspartic Proteases. *Food Chemistry*, 159, 55-63.
- Lo Piero, A.R., Puglisi, I., Petrone, G., 2002. Characterization of "Lettucine," a Serine-Like Protease from *Lactuca Sativa* Leaves, as a Novel Enzyme for Milk Clotting. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 2439-2443.
- Lombardo, S., Pandino, G., Mauro, R., and Mauromicale, G., 2009. Variation of Phenolic Content in Globe Artichoke in Relation to Biological, Technical and Environmental Factors. *Italian Journal of Agronomy*, 4 (4), 181-189
- Lopez-Orenes, A., Martinez-Moreno, J.M., Calderon, A.A., Ferrer, M.A., 2013. Changes in Phenolic Metabolism in Salicylic Acid-Treated Shoots of *Cistus Heterophyllus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 113, 417-427.
- Louro, P., Brito, L., 2021. Time and Temperature of Refrigeration Affect the Coagulation Properties of the Milk For the Production of Raw Ewe's Milk Cheese. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, 6(1), 24-36.
- Lucey, J.A, Johnson, M.E., Horne, D.S., 2003. Invited Review: Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese. *Journal of Dairy Science*, 86(9), 2725-2743.

- Macedo, I.Q., Faro, C.J., Pires, E.M., 1993. Specificity and Kinetics of the Milk-Clotting Enzyme from Cardoon (*Cynara Cardunculus L.*) Toward Bovine Kappa-Casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(10), 1537-1540.
- Macedo, A.C., Tavares, T.G., Malcata, F.X., 2004. Influence of Native Lactic Acid Bacteria on the Microbiological, Biochemical and Sensory Profiles of Serra da Estrela Cheese. *Food Microbiology*, 21(2), 233-240.
- Macit, F., Şalk, A., 1970. Enginar. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Teknik Bülten, (14).
- Macua, J.I., Lahoz, I., Santos, A., 2000. Agronomic and Qualitative Influence of Different Artichoke Cultivars in Sucker Fields with One-Year and Multi-Year Crops. In IV International Congress on Artichoke, 17-21 October, Valenzano- Bari, Italy.
- Magied, M.A., Hussien, S.E.D., Zaki, S.M., Said, R.M.E., 2016. Artichoke (*Cynara Scolymus L.*) Leaves and Heads Extracts as Hypoglycemic and Hypocholesterolemic in Rats. *Journal of Food and Nutrition Research*, 4(1), 60-68.
- Mansuroğlu, S., Gürel, E., 2001. Mikroçoğaltım. In: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. (Ed.), *Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları* (262-281). Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.
- Marshall R.T., 1992. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. American Public Health Association, 546p, USA.
- Martinez E, Esteban MA., 1980. Actividad Coagulante Del Extracto Del Cardo *Cynara Humilis L.* *Archivos de Zootecnia*, 29, 107-116.
- Medina, M., Nuñez, M., 2017. Cheeses from ewe and goat milk: In *Cheese*. Academic Press., 1069-1091.
- MEGEP (2011). Milli Eğitim Bakanlığı Enzimlerin Özellikleri, 541GI0010: Gıda Teknolojisi.
- MEGEP (2015). Milli Eğitim Bakanlığı Hücre Kültürü: Laboratuvar Hizmetleri.
- Meneghini, M., Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., Tavazza, R., 2015. Exploration to Use of Globe Artichoke Cell Cultures as Bioactive Compounds Production. In IX International Symposium on Artichoke, Cardoon and Their Wild Relatives, September, 1147, 413-420.
- Milani, F.X., Wendorff, W.L., 2011. Goat and Sheep Milk Products in the United States (USA). *Small Ruminant Research*, 101, 134-139.
- Morand-Fehr, P., Fedele, V., Decandia, M., Le Frileux, Y., 2007. Influence of Farming and Feeding Systems on Composition and Quality of Goat and Sheep Milk. *Small Ruminant Research*, 68, 20-34.

- Mossi, A.J., Echeverrigaray, S., 1999. Identification And Characterization of 389 Antimicrobial Components in Leaf Extracts of Globe Artichoke (*Cynara Scolymus* L.). 390 Acta Horticulturae, 501, 111-114.
- Moussaoui, N. E., Bendriss, A., 2014. The Influence of Storage Conditions on Melatonin Stability. Int J Eng Res Technol, 3, 2243-2246.
- Nasr, A.I.A.M., 2017. Effect of Sun flower Seeds' Extract and Milk Source on Rennet Coagulation Time, Yield and the Quality of White Cheese during Storage. Sudan University of Science And Technology, Doctoral Dissertation, 162p, Sudan.
- Nicosia, F.D., Puglisi, I., Pino, A., Caggia, C., Randazzo, C.L., 2022. Plant Milk-clotting Enzymes for Cheesemaking. Foods, 11(6), 871.
- Nozière, P., Graulet, B., Lucas, A., Martin, B., Grolier, P., Doreau, M., 2006. Carotenoids for Ruminants: From Forages to Dairy Products. Animal Feed Science and Technology, 131(3-4), 418-450.
- Ordiales, E., Benito, M.J., Martin, A., Fernández, M., Hernández, A., de Guia Córdoba, M., 2013. Proteolytic Effect of *Cynara Cardunculus* Rennet for Use in the Elaboration of 'Torta Del Casar' Cheese. Journal of Dairy Research, 80(4), 429-438.
- Oluk, A.C., Güven, M., Hayaloglu, A.A., 2014. Proteolysis Texture and Microstructure of Low-Fat Tulum Cheese Affected by Exopolysaccharide-Producing Cultures during Ripening. International Journal of Food Science & Technology, 49(2), 435-443.
- Ong, L., Lawrence, R.C., Gilles, J., Creamer, L.K., Crow, V.L., Heap, H.A. Honoré, C.G., ... Samal, P.K., 2017. Cheddar Cheese and Related Dry-Salted Cheese Varieties, in, Vol. 2, 4th Edn, In Mcsweeney P, Fox P, Cotter P And Everett D. (Ed.), Cheese: Chemistry, Physics And Microbiology (829-863). Academic Press, Cambridge, MA.
- Oysun, G., Demet Karaman, A., 2006. Peynir Teknolojisinde Ticari Enzim Kullanımı. Akademik Gıda, 4(4), 21-26.
- Öner, Z., Şanlıdere-Aloğlu, H., 2018. Süt ve Süt Ürünleri Analiz Yöntemleri. Sidas Medya Ltd. Şti., Çankaya, İzmir.
- Öner, Z., Sarıdağ, A.M., 2019. Keçi Sütünden Üretilmiş Beyaz Peynirlerde Olgunlaşma Süresince Meydana Gelen Değişimler. Gıda, 44(3), 523-533.
- Özeker, E., 2005. Salisilik Asit ve Bitkiler Üzerindeki Etkileri. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 42(1), 213-223
- Özsan, 2019. Bazı Enginarların (*Cynara Scolymus* L.) in Vitro Çoğaltımı, Kallus ve Hücre Süspansiyon Kültürleri Yardımıyla Elisitör Kullanımının Sekonder Metabolit İçerikleri Üzerine Etkisinin Tespiti. Akdeniz Üniversitesi, Fen

Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 224s, Antalya.

- Özzambak, E.,Yoltaş, T., 1988. Enginar (*Cynara scolymus* L. Cv. "Sakız") Yetiştiriciliğinde Uygulanan Yeni Üretim Yöntemleri. E.Ü: Ziraat Fakültesi Dergisi, 25(1), 342-351.
- Pamuksuz, T., Bulduk, K., Ozturk, M., 2020. Effect of Packing Ph Values on the Crumbliness of Fresh Turkish White Cheese. Journal of Dairy Science, 103(11), 9860-9867.
- Pandino, G., Lombardo, S., Antonino, L.M., Ruta, C., Mauromicale, G., 2017. In Vitro Micropropagation and Mycorrhizal Treatment Influences The Polyphenols Content Profile of Globe Artichoke Under Field Conditions. Food Research International, 99, 385-392.
- Park, Y.W., Juarez, M., Ramos, M., Haenlein, G.F.W., 2007. Physico-Chemical Characteristics' of Goat and Sheep Milk. Small Ruminant Research, 68(1), 88-113.
- Parker, M.L., Gunning, P.A., Macedo, A.C., Malcata, F.X., Brocklehurst, T.F., 1998. The Microstructure and Distribution of Micro-Organisms within Mature Serra Cheese. Journal of Applied Microbiology, 84(4), 523-530.
- Perreault, V., Rémillard, N., Chabot, D., Morin, P., Pouliot, Y., Britten, M., 2017. Effect of Denatured Whey Protein Concentrate and Its Fractions on Cheese Composition and Rheological Properties. Journal of Dairy Science, 100(7), 5139-5152.
- Peuhkuri, K., Sihvola, N., Korpela, R., 2012. Dietary Factors and Fluctuating Levels of Melatonin. Food & Nutrition Research, 56(1), 17252.
- Piero, A.R.L., Puglisi, I., Petrone, G., 2011. Characterization of the Purified Actinidin as a Plant Coagulant of Bovine Milk. Eur. Food Res. Technol., 233, 517-524.
- Pinho, O., Mendes, E., Alves, M., Ferreira, I., 2004. Chemical, Physical, and Sensorial Characteristics of "Terrincho" Ewe Cheese: Changes during Ripening and Intravarietal Comparison. Journal of Dairy Science, 87, 249-257.
- Pino, A., Prados, F., Galán, E., McSweeney, P.L., Fernández-Salguero, J., 2009. Proteolysis during the Ripening of Goats' Milk Cheese Made with Plant Coagulant or Calf Rennet. Food Research International.
- Pimentel, C., Van Der Straeten, D., Pires, E., Faro, C., Rodrigues-Pousada, C., 2007. Characterization and Expression Analysis of the Aspartic Protease Gene Family of *Cynara Cardunculus* L. FEBS Journal, 274, 2523-2539.
- Pothinuch, P., Tongchitpakdee, S., 2011. Melatonin contents in mulberry (*Morus spp.*) leaves: Effects of Sample Preparation, Cultivar, Leaf Age and Tea Processing. Food Chemistry, 128(2), 415-419.

- Prados, F., Pino, A., Fernández-Salguero, J., 2007. Effect of a Powdered Vegetable Coagulant from Cardoon *Cynara Cardunculus* in the Accelerated Ripening of Manchego Cheese. *International Journal of Food Science & Technology*, 42(5), 556-561.
- Raccuia, S.A., Melilli, M.G., 2007. Biomass and Grain Oil Yields in *Cynara cardunculus* L. Genotypes Grown in a Mediterranean Environment. *Field Crops Research*, 101(2), 187-197.
- Rajabi, M., Ahmadian, M., Kalvandi, R., 2013. Effects of Salinity and Salicylic Acid Pretreatment on Germination and Seedling Growth of Artichoke (*Cynara Scolymus* L.). *Caspian Journal of Applied Sciences Research*, 2(11).
- Ramalho-Santos, M., Veríssimo, P., Faro, C., Pires, E., 1996. Action on Bovine α 1-Casein of Cardosins A and B, Aspartic Proteinases from the Flowers of the Cardoon *Cynara Cardunculus* L. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1297(1), 83-89.
- Ramawat, K. G., 2007. Secondary Metabolites, Secondary plant products in nature Ramawat. In K. G., Merillon, L.M. (Ed.), *Biotechnology* (2), 21.
- Ramírez-López, C., Vélez-Ruiz, J.F., 2018. Effect of Goat and Cow Milk Ratios on the Physicochemical, Rheological, and Sensory Properties of a Fresh Panela Cheese. *Journal of Food Science*, 83(7), 1862-1870.
- Rampanti, G., Ferrocino, I., Harasym, J., Foligni, R., Cardinali, F., Orkusz, A., ... Aquilanti, L., 2023. Queijo Serra da Estrela PDO Cheese: Investigation into Its Morpho-Textural Traits, Microbiota, and Volatilome. *Foods*, 12(1), 169.
- Rao, M.R., Tankasale, A.M., Ghatgeand, M.S., Deshpande, V.V., 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597-635.
- Raynal L.K., Lagiffoul G., Paccard P., Guillet I., Chillaiard Y., 2008. Composition of Goat and Sheep Milk Products. An Update. *Small Ruminant Res.* 79, 57-72.
- Raynal-Ljutovac, K., Gaborit, P., Lauret, A., 2005. The Relationship Between Quality Criteria of Goat Milk, Its Technological Properties and the Quality of the Final Products. *Small Ruminant Research*, 60(1-2), 167-177.
- Renner, E., 1983. *Milk and Dairy Products in Human Nutrition*. VV-GmbH Volkswirtschaftlicher Verlag, 450p, Munich.
- Rocha, R., Vaz Velho, M., Santos, J., Fernandes, P., 2021. Serra da Estrela Pdo Cheese Microbiome as Revealed by Next Generation Sequencing. *Microorganisms*, 9(10), 2007.
- Rosario, I.L.D.S., Vieira, C.P., Barreto, L.S.M., Monteiro, N.B., Moreira, R.V.D.B.P., Salim, A. P., ... Costa, M.P.D., 2023. Artisanal Goat Coalho Cheese with Cachaça as Flavoring Agent. *Foods*, 12(10), 1945.

- Roseiro, M.L.B, Barbosa, M., 1996. Portuguese Artisanal Cheeses. In Artisanal European Cheeses, 79–92. Brussels: European Commission Science Research Development.
- Roseiro, L.B., Barbosa, M., Ames, J.M., Wilbey, R.A., 2003. Cheesemaking with Vegetable Coagulants—the Use of *Cynara L.* for the Production of Ovine Milk Cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 56(2), 76-85.
- Rossi, V., De Paoli, G., 1992. Micropropagation of Artichoke (*Cynara scolymus*), In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol 19. HighTech and Micropropagation III* (118-134). Springer- Verlag, Berlin Heidelberg, Germany.
- Ryu, S.H., Fung, D.Y., 2010. Antimicrobial Effect of Buffered Sodium Citrate (BSC) on Foodborne Pathogens in Liquid Media and Ground Beef. *Journal of Food Science and Nutrition*, 15(3), 239-243.
- Saldamlı, İ., 1985. Gıda katkı Maddeleri ve Ingrediyeñler. Y.y, 197s, Ankara.
- Sallam, KI., Ishioroshi, M., Samejima, K., 2003. Antioxidant and Antimicrobial Effects of Garlic in Chicken Sausage. *NIH Public Acces.*, 37 (8), 849-855.
- Sampaio, P. N. D. S., Neto, H., Poejo, P., Serrazina, S. M. T., & Pais, M. S. S. (2010). Overexpression and characterization of cyprosin B in transformed suspension cells of *Cynara cardunculus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 101, 311-321.
- Sangsopha, J., Johns, N.P., Johns, J., Moongngarm, A., 2020. Dietary Sources of Melatonin and Benefits from Production of High Melatonin Pasteurized Milk. *Journal of Food Science and Technology*, 57, 2026-2037.
- Shah, M.A., Mir, S.A., Paray, M.A, 2014. Plant Proteases as Milk-Clotting Enzymes in Cheesemaking: A Review. *Dairy Science and Technology*, 94(1), 5-16.
- Shieh, C.J., Phan, Thi, L.A., Shih, I.L., 2009. Milk-Clotting Enzymes Produced by Culture of *Bacillus subtilis* Natto. *Biochemical Engineering Journal*, 43(1), 85-91.
- Sidrach, L., García-Cánovas, F., Tudela, J., Rodríguez-López, J. N., 2005. Purification of Cynarases from Artichoke (*Cynara Scolymus L.*): Enzymatic Properties of Cynarase A. *Phytochemistry*, 66(1), 41-49.
- Silva, S.V., Malcata, F.X., 1998. Proteolysis of Ovine Caseins by Cardosin A, an Aspartic Acid Proteinase from *Cynara Cardunculus L.* *Le Lait*, 78(5), 513-519.
- Silva, S.V., Malcata, F.X., 1999. On the Activity and Specificity of Cardosin B, A Plant Proteinase, on Ovine Caseins. *Food Chemistry*, 67(4), 373-378.

- Silva, S.V., Barros, R.M., Malcata, F.X., 2002. Hydrolysis of caseins by extracts of *Cynara cardunculus* precipitated by ammonium sulfate. *Journal of Food Science*, 67(5), 1746-1751.
- Simões, I. I. G., 1998. Caracterização Molecular da Acção das Cardosinas A e B Sobre Caseínas β e κ Bovinas. Universidade de Coimbra, M.Sc. Thesis, Coimbra, Portugal.
- Sousa, M., Malcata, F., 1997. Comparison of Plant and Animal Rennets in Terms of Microbiological, Chemical, and Proteolysis Characteristics of Ovine Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(1), 74-81.
- Sousa, M.J., Malcata, F.X., 1998a. Proteolysis of Ovine and Caprine Caseins in Solution by Enzymatic Extracts from Flowers of *Cynara Cardunculus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(5), 305-314.
- Sousa, M.J., Malcata, F.X., 1998b. Identification of Peptides from Ovine Milk Cheese Manufactured with Animal Rennet or Extracts of *Cynara Cardunculus* as Coagulant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4034-4041.
- Sousa, M.J., Malcata, F.X., 2002. Advances in the Role of a Plant Coagulant (*Cynara Cardunculus*) in Vitro and during Ripening of Cheeses from Several Milk Species. *Le Lait*, 82(2), 151-170.
- Steele, J., Broadbent, J., Kok, J., 2013. Perspectives on the Contribution of Lactic Acid Bacteria to Cheese Flavor Development. *Current Opinion in Biotechnology*, 24, 135-141.
- Szepesi, Á., Csiszár, J., Gallé, Á., Gémes, K., Poór, P., Tari, I., 2008). Effects of Long-Term Salicylic Acid Pre-Treatment on Tomato (*Lycopersicon Esculentum* Mill. L.) Salt Stress Tolerance: Changes in Glutathione S-Transferase Activities and Anthocyanin Contents. *Acta Agronomica Hungarica*, 56(2), 129-138.
- Tanoori, A., Ghasemnezhad, A., Alizadeh, M., 2015. In Vitro Estimation of Antioxidant Compounds of Artichoke (*Cynara Scolymus* L.) as Affected by Methyl Jasmonate and Salicylic Acid. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(12), 991-996.
- Tarakçı, Z., Bayram, U., 2020. Farklı meyve türleri ilaveli Kaşar Peynirlerinin renk değerleri ile tekstürel özelliklerinin olgunlaşmaya etkilerinin araştırılması. *Akademik Ziraat Dergisi*, 9(2), 363-372.
- Tavaria, F.K., Reis, P.M., Malcata, F.X., 2001. Microstructural and Microbiological Relationships in Matured Serra da Estrela Cheese.
- Tavaria, F.K., Reis, P.J.M., Malcata, F.X., 2006. Effect of Dairy Farm and Milk Refrigeration on Microbiological and Microstructural Characteristics of Matured Serra da Estrela Cheese. *International Dairy Journal*, 16(8), 895-902.

- Tejada, L., Fernandez-Salguero, J., 2003. Chemical and Microbiological Characteristics of Ewe Milk Cheese (Los Pedroches) Made with a Powdered Vegetable Coagulant or Calf Rennet. *Italian Journal of Food Science*, 15(1), 125-132.
- Tejada, L., Gomez, R., Fernández-Salguero, J.O.S.É., 2007. Sensory Characteristics of Ewe Milk Cheese Made with Three Types of Coagulant: Calf Rennet, Powdered Vegetable Coagulant and Crude Aqueous Extract from *Cynara Cardunculus*. *Journal of Food Quality*, 30(1), 91-103.
- Tejada, L., Abellan, A., Prados, F., Cayuela, J.M., 2008. Compositional Characteristics of Murcia Al Vino Goat's Cheese Made with Calf Rennet and Plant Coagulant. *International Journal of Dairy Technology*, 61(2), 119-125.
- TGK, 2015. Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği. Resmi Gazete No: 29261, Ankara.
- TGK İçme Sütleri Tebliği, 2019. Resmi Gazete No: 30699. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ankara.
- Tiryaki, M.K., 2010. Hücre Kültürü Uygulamalarında Temel Prensipler. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Yüksek Lisans Tezi, 46s, Kayseri.
- Triantafillidis, A., Triantafillidis, J.K., 2009. Melatonin: A Potent Antioxidant Agent with Anti-Inflammatory and Anti-Apoptotic Effects That Might Be Useful in the Treatment of IBD Patients. *Annals of Gastroenterology*, 10-12.
- Trujillo, A.J., Buffa, M., Casals, I., Fernández, P., Guamis, B., 2002. Proteolysis in Goat Cheese Made from Raw, Pasteurised or Pressure-Treated Milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(4), 309-319.
- TSE, 1981. Çiğ Süt Standardı. TS 1018, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, 11s.
- Tufan, T., 2011. Deneysel Çalışmaların Vazgeçilmezleri: Hücre Hattı Nedir? Erişim Tarihi 11.04.2011. <https://evrimagaci.org/deneysel-calismalarin-vazgecilmezleri-hucre-hatti-nedir-20>
- Tulukoglu, G.B., Akan, E., Kınık, Ö., 2020. İzmir Tulum Peyniri Üretiminde Peynir Altı Suyu Kültürü Kullanımı. *Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 57(3), 441-453.
- Uğur, A., 2005. Enginarın hızlı çoğaltılmasında bazı vegetatif yöntemlerin kullanılma imkânlarının araştırılması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 197s, İzmir.
- Uraz, T., Şimşek, B., 1998. Ankara Piyasasında Satılan Beyaz Peynirlerin Proteoliz Düzeylerinin Belirlenmesi. *Gıda*, 23, 371-375.

- Uzkuç, H., 2014. Keçi peynirinin Bazı Kalite Kriterleri Üzerine Hızlı Olgunlaştırmanın Etkileri. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 73 s, Çanakkale
- Van Hekken, D.L., Tunick, M.H., Malin, E.L., Holsinger, V.H., 2007. Rheology and Melt Characterization of Low-Fat and Full Fat Mozzarella Cheese Made from Microfluidized Milk. LWT-Food Science and Technology, 40(1), 89-98.
- Verissimo, P., Esteves, C., Faro, C., Pires, E., 1995. The Vegetable Rennet of *Cynara cardunculus* L. Contains Two Proteinases with Chymosin and Pepsin-like Specificities. Biotechnol. Lett., 17, 621-626.
- Verissimo, P., Faro, C., Moir, A. J., Lin, Y., Tang, J., Pires, E., 1996. Purification, Characterization and Partial Amino Acid Sequencing of Two New Aspartic Proteinases from Fresh Flowers of *Cynara Cardunculus* L. European Journal of Biochemistry, 235(3), 762-768.
- Vieira, M., Pissarra, J., Verissimo, P., Castanheira, P., Costa, Y., Pires, E., Faro, C., 2001. Molecular Cloning and Characterization of Cdna Encoding Cardosin B, an Aspartic Proteinase Accumulating Extracellularly in the Transmitting Tissue of *Cynara Cardunculus* L. Plant Molecular Biology, 45, 529-539.
- Waheed, M., Hussain, M. B., Majeed, M., Rehman, T. U., Khan, M. U., Shariati, M. A., ... Glinushkin, A.P., 2017. Quality Evaluation of Cheese Prepared by Plant Coagulants: Carica Papaya and Moringa Oleifera Leaves. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences, 64(4), 232-239.
- Walstra, P., Noomen, A., Geurts, T.J., 1993. Dutch-type varieties. In: Fox, P.F. (Ed.), Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology (39-82). Vol. 2. Major Cheese Groups. , 2nd ed. Chapman & Hall, London.
- Wang, L.J., Li, S.H., 2006. Salicylic Acid-Induced Heat or Cold Tolerance in Relation to Ca²⁺ Homeostasis and Antioxidant Systems in Young Grape Plants. Plant Science, 170(4), 685-694.
- Wang, N., Wang, K.Y., Li, G.Q., Guo, W.F., Liu, D.H., 2015. Expression and Characterization of Camel Chymosin in *Pichia Pastoris*. Protein Expression and Purification 111, 75-81.
- Wibowo, M. D., Wahyuni, T. H., Ginting, N., Sepriadi, S., 2020. The Effect of Lemon (*Citrus Limon*) as a Coagulant on Fresh Cheese Chemical Composition and Storage. Jurnal Peternakan Integratif, 8(2), 70-80.
- Xu, J., Yin, W., Zhang, Y., Yi, J., Meng, M., Wang, Y., Xue, H., Zhang, T., Xi, R., 2012. Establishment of Magnetic Beads-Based Enzyme Immunoassay for Detection of Chloramphenicol in Milk. Food Chemistry, 134, 2526-2531.
- Yalçın, N.Y., 1992. Enginarın in Vitro Çoğaltılmasında Besin Ortamına Katılan NAA, IBA, Riboflavin ve Aktif Karbonun Köklenme Üzerine Etkileri.

Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 47s, Adana.

Yarar, A.E., Atalay, K., Yayla, M., Sefer, H.E., Kendir, M., 2018. Bitki Doku Kültürü Hücre ve Protoplast Kültürü, Tarımsal Biyoteknoloji, Ondokuz Mayıs Üniversitesi.

Yegin, S., Fernandez-Lahore, M., Jose Gama Salgado, A., Guvenc, U., Goksungur, Y., Tari, C., 2011. Aspartic Proteinases from *Mucor Spp.* in Cheese Manufacturing. Applied Microbiology and Biotechnology, 89, 949-960.

Yerlikaya, O., 2012. Çiğ Süt ve Geleneksel Süt Ürünlerinden Probiyotik Özellikteki *Enterococcus* Türlerinin İzolasyonu, Tanılanması ve İzmir Tulum Peyniri Üretiminde Destek Kültür Olarak Kullanım Olanaklarının Araştırılması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 184s, İzmir.

Yıldırım, G., 2017. *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum* Türlerinin Manda ve İnek Sütünden Elde Edilmiş Mozzarella Peynirlerinin Kalite Özellikleri Üzerine Etkisi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 171s, Afyon.

Yıldız Geren, Ü., 2023. Farklı Ambalajlama Metotları ile Muhafaza Edilen Geleneksel Höşmerim Peynirinin Bazı Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hayvansal Ürünler Hijyen ve Teknolojisi ABD, Yüksek Lisans Tezi, 107s, Burdur.

Zamani, S., Ghasemnezhad, A., Alizadeh, M., Aalami, M., 2018. Effect of Salinity and Salicylic Acid on Morphological and Photosynthetic Pigments Changes of Callus of Artichoke (*Cynara scolymus L.*).

Zheng, Y., Liu, Z., Mo, B., 2016. Texture Profile Analysis of Sliced Cheese in Relation to Chemical Composition and Storage Temperature. Journal of Chemistry, 1-10.

Zikiou, A., Zidoune, M.N., 2019. Enzymatic Extract from Flowers of Algerian Spontaneous *Cynara Cardunculus*: Milk-Clotting Properties and Use in the Manufacture of a Camembert-Type Cheese. International Journal of Dairy Technology, 2019, 72(1), 89-99.