

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

**YOĞURTTAN BİYOAKTİF PEPTİT ELDESİ VE BU PEPTİTLERİN
ANTİMİKROBİYEL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ**

Hatice ŞANLIDERE ALOĞLU

Danışman: Doç. Dr. Zübeyde ÖNER

**DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2010**

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1. Süt Proteinleri.....	4
2.1.1. Kazein.....	4
2.1.2. Serum proteinleri.....	5
2.2. Yoğurdun Tarihçesi ve Önemi.....	7
2.2.1. Yoğurdun tarihçesi.....	7
2.2.2. Yoğurdun beslenmedeki rolü ve önemi.....	8
2.2.3. Geleneksel yöntemle yoğurt üretimi.....	9
2.3. Biyoaktif Peptidler.....	12
2.3.1. Biyoaktif peptidlerin sağlık üzerine etkileri.....	15
2.3.1.1. Yüksek tansiyonu önleyici peptitler.....	16
2.3.1.2. Damar tıkanıklığı önleyici (antitrombotik) peptitler.....	20
2.3.1.3. Rahatlatıcı/uyarıcı etki gösteren peptitler.....	21
2.3.1.4. Bağışıklık sistemini uyarıcı peptitler.....	22
2.3.1.5. Antimikrobiyel aktivite gösteren peptitler.....	23
2.3.1.6. Antioksidan aktivite gösteren peptitler.....	29
2.3.2. Biyoaktif peptitlerin beslenme üzerine etkileri.....	30
2.3.2.1. Fosfopeptitler.....	30
2.3.2.2. Glikomakropeptitler.....	31
2.3.3. Biyoaktif peptitlerin fonksiyonel özellikleri.....	31
2.4. Biyoaktif Peptitlerin Oluşumu.....	32

2.4.1. Enzimatik hidroliz ile biyoaktif peptit oluşumu.....	32
2.4.2. Mikrobiyel fermentasyon ile biyoaktif peptit oluşumu.....	33
2.4.2.1. Yoğurt bakteriler tarafından proteinlerin kullanımı.....	35
2.4.2.2. Yoğurt bakterileri tarafından peptitlerin kullanımı.....	35
2.4.3. Proteolitik enzimlerin inhibisyonu.....	36
2.4.4. Sütte biyoaktif peptitlerin oluşumunu sağlayan mikroorganizmalar ve fermente ürünler.....	37
2.5. Biyoaktif Peptidlerin Ayrılması ve Zenginleştirilmesi.....	39
2.6. Biyoaktif Peptitlerin Teknolojik Olarak Önemi.....	42
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	45
3.1. Materyal.....	45
3.2. Yöntem.....	45
3.2.1. Yoğurt üretimi.....	45
3.2.2. Fiziko-kimyasal analizler.....	45
3.2.2.1. Toplam kurumadde tayini.....	45
3.2.2.2. Titrasyon asitliği tayini.....	46
3.2.2.3. pH tayini.....	47
3.2.2.4. Yağ tayini.....	47
3.2.2.5. Protein miktarı tayini.....	47
3.2.2.5.1. Kjeldahl yöntemi ile protein tayini.....	47
3.2.2.5.2. Lowry yöntemi ile protein tayini.....	48
3.2.3. Mikrobiyolojik analizler.....	49
3.2.4. Yoğurtların proteoliz düzeyinin belirlenmesi.....	50
3.2.5. Aroma maddelerinin belirlenmesi.....	50
3.2.6. Biyoaktif peptitlerin eldesi.....	51
3.2.6.1. Yoğurt örneklerinin hazırlanması.....	51
3.2.6.2. Antimikrobiyel aktivite tayini.....	51
3.2.6.3. Antioksidan aktivite tayini.....	52
3.2.6.3.1. ABTS ^{•+} radikal giderme yöntemi ile antioksidan aktivite tayini.....	52
3.2.6.3.2. DPPH serbest radikalleri giderme yöntemi ile antioksidan aktivite tayini.....	53
3.2.7. HPLC metodu ile peptit profilinin belirlenmesi.....	54
3.2.8. İstatistiksel değerlendirme.....	56

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	57
4.1. Fiziko-kimyasal Analizler.....	57
4.1.1. Yoğurtların kurumadde değerleri.....	57
4.1.2. Yoğurtların titrasyon asitlik değerleri.....	60
4.1.3. Yoğurtların pH değerleri.....	62
4.1.4. Yoğurtların yağ ve kurumadde % yağ değerleri.....	65
4.1.5. Yoğurtların Kjeldahl yöntemi ile protein değerleri.....	69
4.2. Mikrobiyolojik Analizler.....	72
4.2.1. Koliform grubu bakterilerin sayım sonuçları.....	72
4.2.2. Maya-küf sayım sonuçları.....	75
4.2.3. Toplam mezofilik aerobik mikroorganizmaların sayım sonuçları.....	78
4.2.4. MRS Agar sayım sonuçları.....	80
4.2.5. M17 Agar sayım sonuçları.....	82
4.3. Yoğurtların Proteolitik Aktivite Sonuçları.....	85
4.4. Yoğurtların Uçucu Aromatik Bileşenlerinin Belirlenmesi.....	90
4.5. Liyofilize Yoğurt Serumlarında Lowry Yöntemi ile Protein Tayini.....	94
4.6. Liyofilize Yoğurt Serumlarının Antimikrobiyel Özelliklerinin Belirlenmesi.....	95
4.7. Liyofilize Yoğurt Serumlarının Antioksidan Aktivite Miktarlarının Belirlenmesi.....	97
4.7.1. ABTS yöntemi ile toplam antioksidan aktivite tayini.....	97
4.7.2. DPPH yöntemi ile toplam antioksidan aktivite tayini.....	101
4.8. Yoğurtların Liyofilize Serumlarından Ters faz-HPLC ile Peptit Eldesi.....	105
4.8.1. Peptitlerin antimikrobiyel özelliklerinin belirlenmesi.....	110
4.9. Seçilen yoğurt örnekleri ile ileri fraksiyonlama denemesi.....	111
4.9.1. Y3, Y11, Y13 ve TY2 yoğurtlarının HPLC fraksiyonlarının ABTS yöntemi ile toplam antioksidan aktivite tayini.....	113
5. SONUÇ.....	118
6. KAYNAKLAR.....	121
EKLER.....	145
EK1. Besiyerlerinin hazırlanması.....	145
EK2. Çözeltilerin hazırlanması.....	149
ÖZGEÇMİŞ.....	151

ÖZET

Doktora Tezi

YOĞURTTAN BİYOAKTİF PEPTİT ELDESİ VE BU PEPTİTLERİN ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Hatice ŞANLIDERE ALOĞLU

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Zübeyde ÖNER

Bu çalışmada geleneksel yöntemle ve ticari kültürle üretilen yoğurtların biyoaktif peptit oluşumu incelenmiş ve depolama süresi boyunca süt proteinlerinde meydana gelen proteolizin biyoaktif peptitlerin oluşumu üzerine etkisi irdelenmiştir. Ayrıca ters faz-HPLC ile ayrımları gerçekleşen peptitlerin antioksidatif ve antimikrobiyel aktiviteleri araştırılmıştır.

Araştırmada öncelikle geleneksel ve ticari yoğurt örneklerinin 4 haftalık depolama süresince fizikokimyasal ve mikrobiyolojik analizleri yapılmıştır. Fizikokimyasal analizlerden % kurumadde, titrasyon asitliği, pH tayini, % yağ, kurumaddede % yağ, % protein değerleri belirlenmiştir. Mikrobiyolojik analizlerden koliform grubu, maya-küf, toplam mezofilik aerobik bakteri, *Laktobasil* ve *Streptokok* sayımları yapılmıştır. Yoğurt örneklerinin uçucu aromatik bileşenlerinin belirlenmesi amacıyla depolanmalarının birinci günlerinde gaz kromatografisinde aroma maddeleri tayini yapılmıştır. Ayrıca yoğurt örneklerinin depolanması sırasında meydana gelen proteolizin belirlenmesi amacıyla proteolitik aktivite tayini yapılmıştır.

Liyofilize yoğurt serumları ve HPLC fraksiyonlarından elde edilen peptitlerin *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* ya karşı antimikrobiyel aktivitesi araştırılmıştır. Kuyucuk difüzyon testi sonucunda herhangi bir zon elde edilememiştir. Yoğurt fermantasyonu sırasında meydana gelen proteolitik parçalanmanın antimikrobiyel peptitlerin oluşumu için yetersiz olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca liyofilize yoğurt serumları ve HPLC fraksiyonlarından elde edilen peptitlerin ABTS ve DPPH yöntemi ile antioksidan aktivite değerleri belirlenmiştir. Geleneksel yoğurtların liyofilize serumlarının antioksidan aktivitesi ticari yoğurtların liyofilize serumlarından daha yüksek bulunmuştur. Ticari örneklerde ortalama 7.697-8.739 mM troloks/g olarak değişen bu değer geleneksel örneklerde 10.115-13.182 mM troloks/g arasında değişmiştir. Seçilen yoğurt örneklerinin HPLC' de fraksiyonlarına ayrılması ile elde edilen peptitlerin antioksidan aktivite değerleri yaklaşık 10-200 kat arasında

artmıştır. Yoğurt örneklerinin tamamında en yüksek antioksidan aktiviteyi F2 fraksiyonu göstermiştir. Seçilen yoğurt örneklerinde F2 fraksiyonunun gösterdiği antioksidan aktivite değeri 2436.62-2782.40 mM troloks/g arasında değişmiştir.

TY2 yoğurt örneğinin ileri fraksiyonlanması ile F2.2, F2.3, F2.5, F3.4, F3.7, F4.3 ve F4.4 olarak kodlanmış fraksiyonların antioksidan aktivitesi yüksek bulunmuştur. Bu değerler sırasıyla 2812.992, 2463.892, 1615.899, 1501.643, 1783.261, 2157.346 ve 1986.675 mM troloks/g' dır. Yoğurtlarda görülen düşük antioksidan aktivitenin artırılması, fraksiyonlara ayrılma ile mümkün olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Yoğurt, biyoaktif peptitler, antioksidan aktivite, antimikrobiyel aktivite.

2010, 152 sayfa

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

IDENTIFICATION OF BIOACTIVE PEPTIDES OBTAINED FROM YOGURT AND DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THESE PEPTIDES

Hatice ŞANLIDERE ALOĞLU

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

Supervisor: Assoc Prof. Dr. Zübeyde ÖNER

The objectives of the study are to isolate and characterize of bioactive peptides from traditional and commercial yogurts which were produced with starter culture and to investigate the effect of proteolysis on bioactive peptides release during the stages of storage. Also, antioxidant and antimicrobial activities of these peptides isolated by RP-HPLC were investigated.

Firstly, traditional and commercial yogurt samples physico-chemical and microbiological properties were determined during 4 week storage period. Physico-chemical analyses were total solids, titration acidity, pH, fat, fat in solids, and protein. Microbiological analyses were coliform bacteria, yeast-mold, total mesophilic aerobic bacteria, *Lactobacillus* and *Streptococcus* microorganisms counts. The volatile aromatic components of yogurt samples analysed by gas chromatography. Also, during the storage period yogurt samples proteolytic activity were determined.

Peptides released from lyophilized serum of yogurt and its HPLC fractions's antimicrobial activity were investigated against *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, and *Yersinia enterocolitica*. Well-diffusion assay was performed but no zone was observed on the agar plates. Proteolytic activity during the yogurt fermentation was not enough for occurrence of antimicrobial peptides.

Peptides released from lyophilized serum of yogurt and its HPLC fractions's antioxidant activity were determined by ABTS and DPPH methods. Lyophilized serum of traditional yogurts's antioxidant activity was greater than lyophilized serum of commercial yogurts's antioxidant activity. These values means were changed between 7.697 and 8.739 mM trolox/g in commercial yogurts, 10.115 and 13.182 mM trolox/g in traditional yogurts. Antioxidant activity of peptides released from HPLC fractions of selected yogurt samples were increased 10-200 times. In all the yogurt samples the greatest antioxidant activity was shown in F2 fraction. Antioxidant activity values of F2 fractions of the selected yogurt samples were changed between 2436.62 and 2782.40 mM trolox/g.

After further fractionisation of TY2 yogurt sample the fractions coded as F2.2, F2.3, F2.5, F3.4, F3.7, F4.3, and F4.4 were shown the highest antioxidant activity value. These values were 2812.992, 2463.892, 1615.899, 1501.643, 1783.261, 2157.346, and 1986.675 mM trolox/g, respectively. Enhancement of low antioxidant activity in yogurts were achieved by fractionisation.

Key Words: Yogurt, bioactive peptides, antioxidant activity, antimicrobial activity

2010, 152 Pages

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin her aşamasında bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren, yardım ve desteğini her zaman hissettiğim danışman hocam Sayın Doç. Dr. Zübeyde ÖNER' e, çalışmam sırasında öneri ve bakış açılarıyla önemli katkılarda bulunan Tez İzleme Komitesinin değerli üyeleri Sayın Prof. Dr. Aynur Gül KARAHAN ve Sayın Prof. Dr. Özer KINIK' a, manevi desteğini her zaman hissettiğim Sayın Prof. Dr. Sami ÖZÇELİK' e,

Çalışmalarım sırasında her konuda yardımlarını gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Hakan KULEAŞAN ve Yrd. Doç. Dr. Gülcan ÖZKAN' a, analiz sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesinde bana yol gösteren Yrd. Doç. Dr. Özgür KOŞKAN' a, her konuda destekleri ve yardımlarını gördüğüm arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Hülya GÜL' e, Arş. Gör. Buket ERBAY' a, Öğr. Gör. Arzu KART' a,

1580-D-07 No' lu proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı' na,

Hayatımın her aşamasında yanımda olan ve beni destekleyen canım annem Fatime ŞANLIDERE' ye, babam M. Ali ŞANLIDERE' ye ve kardeşim M. Tevfik ŞANLIDERE' ye,

Her türlü desteği ile yanımda olan eşim Alparslan ALOĞLU' na ve değerli ailesine, en değerli varlıklarım kızlarım Eslem ve Dilem' e sevgi ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hatice ŞANLIDERE ALOĞLU
ISPARTA, 2010

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Proteinlerin hidrolize olması ile peptitlerin oluşumu.....	14
Şekil 2.2. Biyoaktif peptitlerin fizyolojik fonksiyonları.....	15
Şekil 2.3. Antimikrobiyel peptitlerin farklı yapıları.....	24
Şekil 2.4. Antimikrobiyel peptitlerin bakteri dış ve sitoplazma membranından geçişi.....	25
Şekil 2.5. Proteinler ve içerdikleri biyoaktif peptitlerin haritası.....	34
Şekil 2.6. İki basamaklı filtrasyon sisteminin şematik olarak gösterimi.....	40
Şekil 2.7. NF uygulamasının şematik olarak gösterimi.....	41
Şekil 2.8. İyon değiştirme kromatografisinin şematik olarak gösterimi.....	42
Şekil 2.9. β -Lg.'nin teorik olarak tripsin ve kimotripsin ile kesim noktalarını gösteren amino asit dizilimi.....	44
Şekil 4.1. Yoğurt örneklerinin % kurumadde değerlerinin karşılaştırılması.....	57
Şekil 4.2. Yoğurt örneklerinin titrasyon asitliği değerlerinin karşılaştırılması.....	60
Şekil 4.3. Yoğurt örneklerinin pH değerlerinin karşılaştırılması.....	63
Şekil 4.4. Yoğurt örneklerinin % yağ değerlerinin karşılaştırılması.....	66
Şekil 4.5. Yoğurt örneklerinin kurumadde % yağ değerlerinin karşılaştırılması....	68
Şekil 4.6. Yoğurt örneklerinin % protein değerlerinin karşılaştırılması.....	69
Şekil 4.7. Yoğurt örneklerinin toplam mezofilik aerobik bakteri sayım sonuçlarının karşılaştırılması.....	78
Şekil 4.8. Yoğurt örneklerinin MRS Agar sayım sonuçlarının karşılaştırılması.....	80
Şekil 4.9. Yoğurt örneklerinin M17 Agar sayım sonuçlarının karşılaştırılması.....	82
Şekil 4.10. Y1-Y5 yoğurtlarının depolama süresince proteolitik aktivite değerleri.....	86
Şekil 4.11. Y6-Y10 yoğurtlarının depolama süresince proteolitik aktivite değerleri.....	86
Şekil 4.12. Y11-Y15 yoğurtlarının depolama süresince proteolitik aktivite değerleri.....	86
Şekil 4.13. TY1, TY2 ve TY3 yoğurtlarının depolama süresince proteolitik aktivite değerleri.....	87
Şekil 4.14. Standarda ait kromatogram.....	93
Şekil 4.15. Numuneye ait kromatogram.....	93

Şekil 4.16. <i>M. luteus</i> 'e karşı kloramfenikolün oluşturduğu inhibisyon zonu.....	95
Şekil 4.17. <i>M. luteus</i> 'e karşı yoğurt örneklerine ait kuyucuklar.....	95
Şekil 4.18. Liyofilize yoğurt serumlarının ABTS yöntemi ile antioksidan aktivite sonuçlarının karşılaştırılması.....	99
Şekil 4.19. HPLC analizinden elde edilen kromatogramların kodlanması.....	105
Şekil 4.20. Y13 yoğurdunun 4. hafta örneğine ait kromatogram.....	106
Şekil 4.21. Skim milk' e ait kromatogram.....	106
Şekil 4.22. Y1 örneğinin 1. gün ve 4.haftasına ait kromatogram.....	107
Şekil 4.23. Y1 örneğinin 1. gün ve 4.haftasına ait kromatogram.....	107
Şekil 4.24. Y7 örneğinin 1. gün ve 4.haftasına ait kromatogram.....	107
Şekil 4.25. Y7 örneğinin 1. gün ve 4.haftasına ait kromatogram.....	108
Şekil 4.26. β -laktoglobuline ait kromatogram.....	108
Şekil 4.27. α -laktalbumine ait kromatogram.....	108
Şekil 4.28. κ -kazeine ait kromatogram.....	108
Şekil 4.29. β -kazeine ait kromatogram.....	108
Şekil 4.30. α -kazeine ait kromatogram.....	109
Şekil 4.31. β -laktoglobuline, α -laktoalbumine, κ -kazeine, β -kazeine, α -kazeine ait kromatogramların gösterimi.....	109
Şekil 4.32. Agar difüzyon yöntemi ile antimikrobiyel deneme.....	110
Şekil 4.33. Kuyucuk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyel deneme.....	110
Şekil 4.34. Geleneksel ve ticari yoğurt örneklerinin kümeleme analizine ait dendrogram.....	111
Şekil 4.35. Y3, Y11, Y13 ve TY2 yoğurtlarının liyofilize serumlarına ait kromatogramların gösterimi.....	112
Şekil 4.36. Y3, Y11, Y13 ve TY2 yoğurtlarının liyofilize serumlarına ait kromatogramların toplu gösterimi.....	112
Şekil 4.37. Kümeleme analizi sonrasında seçilen yoğurt örnekleri Y3, Y11, Y13 ve TY2' nin liyofilize serumlarının ABTS yöntemi ile antioksidan aktivite değerlerinin depolama süresince değişimi.....	113
Şekil 4.38. Y3, Y11, Y13 ve TY2 yoğurtlarının HPLC fraksiyonlarının (F1-F6) antioksidan aktivite değerlerinin grafik ile gösterimi.....	114

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Süt proteininin fraksiyonları ve bazı özellikleri.....	6
Çizelge 2.2. Yoğurdun bileşimi.....	10
Çizelge 2.3. Türk Gıda Kodeksi Fermente Sütler Tebliği ve TSE TS 1330 Yoğurt Standardı' na göre yoğurdun mikrobiyolojik ve kimyasal bileşimi.....	11
Çizelge 2.4. Süt proteinlerinden elde edilen peptitlerin biyoaktivitesi.....	16
Çizelge 2.5. Süt proteinlerinden elde edilen antimikrobiyel peptitler.....	28
Çizelge 2.6. Süt proteinlerinden, çeşitli mikroorganizmalar ve mikrobiyel enzimler kullanılarak elde edilen biyoaktif peptitlere örnekler.....	34
Çizelge 2.7. Sağlık üzerine etkileri veya fonksiyonel özellikleri bulunan biyoaktif peptitleri içeren ticari süt ürünleri ve katkıları.....	39
Çizelge 3.1. Örneklere uygulanan gradient programı.....	55
Çizelge 3.2. HPLC cihazının özellikleri ve kromatografi koşulları.....	55
Çizelge 4.1. Yoğurtların kurumadde içerikleri.....	58
Çizelge 4.2. Kurumadde miktarlarına ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları...	59
Çizelge 4.3. Yoğurt örneklerinin titrasyon asitliği değerleri.....	61
Çizelge 4.4. Titrasyon asitliği değerlerine ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	61
Çizelge 4.5. Yoğurtların pH değerleri.....	64
Çizelge 4.6. pH değerlerine ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	64
Çizelge 4.7. Yoğurtların % yağ değerleri.....	66
Çizelge 4.8. % Yağ değerlerine ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	67
Çizelge 4.9. Yoğurtların kurumaddede % yağ değerleri.....	68
Çizelge 4.10. Kurumaddede % yağ değerlerine ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	69
Çizelge 4.11. Yoğurtların % protein değerleri.....	70
Çizelge 4.12. % Protein değerlerine ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	71
Çizelge 4.13. Yoğurtların koliform grubu bakteri sayım sonuçları.....	73
Çizelge 4.14. Koliform grubu bakteri sayımına ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	74
Çizelge 4.15. Yoğurtların maya-küf sayım sonuçları.....	76
Çizelge 4.16. Maya-küf sayımına ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	76

Çizelge 4.17. Yoğurtların toplam mezofilik aerobik mikroorganizma sayım sonuçları.....	79
Çizelge 4.18. Toplam mezofilik aerobik mikroorganizma sayımına ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	79
Çizelge 4.19. Yoğurtların MRS Agar sayım sonuçları.....	81
Çizelge 4.20. MRS Agar sayımına ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	82
Çizelge 4.21. Yoğurtların M17 Agar sayım sonuçları.....	83
Çizelge 4.22. M17 Agar sayımına ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	84
Çizelge 4.23. Proteolitik aktivite değerlerine ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	87
Çizelge 4.24. Yoğurtların aroma maddeleri.....	92
Çizelge 4.25. Standartlara ait alıkonma zamanları ve grafiklere ait değerler.....	93
Çizelge 4.26. Liyofilize yoğurt serumlarına ait protein değerleri.....	94
Çizelge 4.27. Liyofilize yoğurt serumlarının antioksidan aktivite değerleri.....	98
Çizelge 4.28. Antioksidan aktivite değerlerine ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	99
Çizelge 4.29. Liyofilize yoğurt serumlarının depolama süresince inhibisyon değerleri.....	102
Çizelge 4.30. Liyofilize yoğurt serumlarının depolama süresince IC ₅₀ (mg/mL) değerlerindeki değişim.....	103
Çizelge 4.31. Y3, Y11, Y13 ve TY2 yoğurtlarının HPLC fraksiyonlarının (F1-F6) ABTS yöntemi ile antioksidan aktivite değerleri.....	114
Çizelge 4.32. TY2 yoğurdunun liyofilize serumunun ileri fraksiyonlanması ile elde edilen peptitlerin ABTS yöntemi ile antioksidan aktivite değerleri...	115

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μ	: mikro
μg	: mikrogram
μL	: mikrolitre
μm	: mikrometre
μM	: mikromolar
$\alpha\text{-La}$: alfa-laktalbumin
$\beta\text{-Lg}$: beta-laktoglobulin
$^{\circ}\text{C}$: santigrat derece
ABTS	: 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)
ABTS ⁺	: 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) radikal çözeltisi
ACE	: Angiotensin-I çevirici enzim
ANOVA	: varyans analizi
Da	: dalton
dk	: dakika
DNA	: deoksiribo nükleik asit
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
EMS	: en muhtemel sayı
f	: fragment
g	: gram
HCl	: hidroklorik asit
H ₂ SO ₄	: sülfirik asit
He	: helyum
HPLC	: yüksek performanslı sıvı kromatografi
IC ₅₀	: % 50' sini azaltmak için gerekli miktar
Ig	: immünoglobulin
kg	: kilogram
KM	: kurumadde
kn	: kazein
kob	: koloni oluşturma birimi
L	: litre

l.a.	: laktik asit
Lb	: <i>Lactobacillus</i>
Lc	: <i>Lactococcus</i>
LDL	: düşük yoğunluklu lipoprotein
LF	: laktoferrin
mg	: miligram
mL	: mililitre
mm	: milimetre
mm Hg	: milimetre civa
mM	: milimolar
M	: molar
NaOH	: sodyum hidroksit
NF	: nanofiltrasyon
nm	: nanometre
OPA	: o-phthaldialdehyde
ORAC	: oksijen radikal absorban kapasitesi
PAS	: peyniraltı suyu
pH	: hidrojen iyonu konsantrasyonu
ppm	: milyonda bir
ssp.	: alt tür
TCA	: trikloroasetik asit
TEAC	: troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
TFA	: trifluoroasetik asit
TGK	: Türk Gıda Kodeksi
TMAB	: Toplam mezofilik aerobik bakteri
TSE	: Türk Standartları Enstitüsü
TS	: Türk standardı
UV	: ultra violet
X-pro-DPAP	: X-propil-dipeptidilaminopeptidaz

1.GİRİŞ

Süt, bebekler ve yetişkinler için önemli besin elementlerini içeren, bağışıklık sistemini koruyucu, biyolojik olarak aktif bileşenlerin kaynağı olan bir gıda maddesidir (Clare and Swaisgood, 2000). İnsan beslenmesinde önemli bir yeri olan süt proteinleri son 20 yıl içinde yapılan çalışmalar sonucunda çeşitli fizyolojik fonksiyonlara sahip peptitlerin ortaya çıkmasıyla daha da önem kazanmıştır. Bu durum, sütün sadece bir gıda olarak değil, aynı zamanda biyoaktif bileşenlerin bir kaynağı olarakda ortaya çıkmasına neden olmuştur (Dağdemir vd., 2003).

Sütün temel bileşenleri; kazein (α , β , κ , γ), α -laktalbumin (α -La), β -laktoglobulin (β -Lg), immunoglobulin, laktoferrin, proteoz-pepton, transferin ve kan serum albumindir. Bu protein fraksiyonlarından kaynaklanan peptitler sinir sistemini düzenleyici (opioid), damar tıkanıklığını önleyici (antitrombotik), yüksek tansiyon önleyici (antihipertansif), bağışıklık sistemini düzenleyici, antimikrobiyel ve mineral taşıyıcı özelliklere sahiptirler (Clare and Swaisgood, 2000; Tokatlı vd., 2005; Çelikel et al., 2005; Korhonen and Pihlanto, 2006; Ong et al., 2007; Haque et al., 2009).

Süt ürünlerinde starter mikroorganizmalar olarak kullanılan laktik asit bakterileri (veya sütün doğal florası) içerdikleri proteinaz ve peptidazlar ile bazı biyoaktif peptitlerin oluşumuna katkıda bulunmaktadırlar (Chianese et al., 1997; Smacchi and Gobbetti, 2000; Gobbetti et al., 2002; Algaron et al., 2004).

Fermente ürünlerde, laktik asit ve aroma bileşenlerinin oluşumunun yanı sıra proteoliz de en önemli biyokimyasal basamaklardan birisidir. Bu aşamada hücre dışı proteinazları öncelikle kazeinlerin parçalanmasını sağlar ve açığa çok sayıda oligopeptit çıkar. Sonrasında da hücre içi peptidazlar ile ileri kırılmalar meydana gelerek sağlık ve beslenme için yararlı amino asit ve peptitler açığa çıkar. (Yamamoto et al., 1994; Kunji et al., 1996; Christensen et al., 1999; Yamamoto et al., 1999; Donkor et al., 2007a; Donkor et al., 2007b).

Bu açıdan fermente süt ürünleri, besin elementleri ve enerji sağlamalarının yanı sıra biyoaktif peptitlerin de kaynağını oluşturur. Őimdiye kadar yapılan çalışmalarda fermente süt ürünlerinden çok sayıda biyoaktif peptit elde edilmiştir. Elde edilen bu peptitler antimikrobiyel, (Minervini et al., 2003), antikanser (MacDonald et al., 1994; Ganjam et al., 1997) bağışıklık sistemini düzenleyici, mineral bağlayıcı, sinir sistemini düzenleyici (Shah, 2000; Silva and Malcata, 2005) ve yüksek tansiyon nleyici (FitzGerald et al., 2004; Muguerza et al., 2006) zellikler göstermektedirler. Biyoaktif zellik gösteren peptitlerden en çok çalışılanlar yüksek tansiyon önleyici ya da Angiotensin-I evirici enzim inhibitörü (ACE-I converting enzyme) peptitlerdir. (Mullally et al., 1997; Sipola, 2002; Muguerza et al., 2006; Donkor, 2007; Donkor et al., 2007a; Chen et al., 2007).

Fermente bir süt ürünü olan yoğurt, diğer ülkelerde genellikle son yüzyıl içinde tanınmış ve tüketimi hızla artmaya başlamıştır. Özellikle insan ömrünü uzattığı ve bazı hastalıkları iyileştirdiği bilimsel olarak açıklanınca yoğurda olan ilgi artmış ve yoğurt tüketimi dünyada yaygınlaşmaya başlamıştır. Bugün yoğurt, dünyanın her yerinde bilinen, çeşitli tat ve özellikte yapılan, her ülkede tüketimi hızla artan değerli bir yiyecek haline gelmiştir (Yaygın, 1999).

Yoğurt, termofilik starter bakteriler tarafından laktozun laktik asite dnşm ile meydana gelen bir üründür. Bu nedenle pıhtısı zayıf, viskoelastik bir asit jelinden oluşmuştur (zer ve Atamer, 1994; Pereira et al., 2006; Xu et al., 2008; Ramchandran and Shah, 2008a). Kazein ve serum proteinleri, yoğurt jelinin oluşumu içerisinde önemli etkiye sahiptirler. Yoğurdun tüketici tarafından kabul görmesi için aroması kadar yapısal özelliklerinin de önemli olduğu bilinmektedir (Pereira et al., 2006; Xu et al., 2008; Ramchandran and Shah, 2008a).

Diğer biyolojik aktiviteler ile karşılaştırıldığında (rneğin yüksek tansiyon önleyici peptitler) süt ve süt ürünlerinden özellikle de yoğurtlardan elde edilen antimikrobiyel peptitler ile ilgili çok az sayıda çalışma bulunmaktadır (Rizzello et al., 2005).

Yoğurdun besin değerinin yüksek olması dışında *in vitro* olarak, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *E. coli*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Brucella*, *Vibrio*, *Klebsiella*, *Mycobacterium* gibi birçok mikroorganizmaya karşı inhibitör etki yaptığı gösterilmiştir. Patojenik enterik mikroorganizmalardan *Salmonella typhosa*, *Shigella dysenteria*, *Vibrio cholerae*'nin ise üç saat içinde yoğurtta öldüğü belirtilmektedir. Yoğurdun *in vivo* etkisinde ise yapılan hayvan çalışmaları yoğurdun gastrointestinal enfeksiyonların giderilmesinde etkin olduğunu düşündürmektedir. Yoğurtta bulunan laktozun bağırsak florası tarafından fermentasyona uğratılması sonucu ortaya çıkan laktik asit ve diğer organik asitlerin zararlı bakteriler üzerine etkisi bulunmaktadır. Bunun yanısıra fermente süt ürünleri ve yoğurtta bulunan laktik asit bakterilerinin de bu süreçte etkisi olmaktadır (Özden, 2009).

Yoğurdun antimikrobiyel etkisinin olduğu bilinmektedir ve süt proteinlerinin laktik asit bakterileri tarafından fermentasyonu sırasında açığa çıkan, fizyolojik olarak aktif peptitleri içermesi nedeni ile de önemli bir süt ürünüdür (Ramchandran and Shah, 2008b). Süt proteinlerinin proteolizi ile açığa çıkan ve farklı biyoaktif özellikler gösteren peptitlerden en çok çalışılanlar ACE inhibitör peptitleridir (López-Fandiño et al., 2006; Ramchandran and Shah, 2008b; Ramchandran and Shah, 2009). Ayrıca fermente süt ürünleri tüketiminin antioksidatif etki yarattığı hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Pihlanto, 2006).

Yapılan kaynak araştırmasında yoğurtlardan elde edilen peptitlerin ACE inhibitör etkilerinin yoğun olarak çalışıldığı fakat diğer fermente süt ürünlerinde belirlenmiş olan antioksidatif ve antimikrobiyel aktivite gösteren peptitler ile ilgili kapsamlı bir çalışma yapılmadığı görülmüştür. Bu nedenle bu çalışmada geleneksel yöntemle ve ticari kültürle üretilen yoğurtların biyoaktif peptit oluşumu incelenmiş ve depolama süresi boyunca süt proteinlerinde meydana gelen proteolizin biyoaktif peptitlerin oluşumu üzerine etkisi irdelenmiştir. Son yıllarda doğal kaynaklardan antioksidan ve antimikrobiyel bileşikler elde etme ile ilgili çalışmalar ilgi kazanmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada elde edilen peptitlerin antioksidatif ve antimikrobiyel aktiviteleri araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Süt Proteinleri

Süt proteini, tek bir homojen protein olmayıp, farklı niteliklerde proteinlerin karışımıdır ve 30'dan fazla fraksiyondan oluşmaktadır. Ancak bunlar, kazeinler ve serum proteinleri olmak üzere 2 grup altında toplanabilir. Süt proteinleri, biyolojik olarak aktif peptitlerin zengin bir kaynağını oluşturur (Ong et al., 2007).

2.1.1. Kazein

Doğada sadece sütte bulunan kazein, süt proteinlerinin en önemli fraksiyonu olup, yaklaşık % 80' ini oluşturur. Kazein, sütte misel adı verilen parçacıklar halinde bulunur. Kazein misellerinin yaklaşık % 93'ü kazein ve geriye kalan kısmı; kalsiyum, magnezyum, sodyum, fosfat ve sitrat gibi maddelerden oluşur. Miktar açısından en fazla olanı kalsiyum ve fosfattır ve bunlar koloidal kalsiyum fosfat formunda bulunurlar. Kazein söz konusu bu maddelerle bir kompleks oluşturur ve bu kompleks, kalsiyum kazeinat-fosfat veya kalsiyum-fosfokazeinat şeklinde anılır. Bu nedenle bir fosfoprotein olarak kabul edilir (Metin, 2003).

Bir kazein miseli, Çizelge 2.1.'de görülebileceği gibi; α_s -kazein, β -kazein, κ -kazein ve γ -kazein gibi bileşenlerden meydana gelir (Üçüncü, 2005). Kazeinlerin fosfat grupları önemli ölçüde kalsiyum bağlar. Bunlar kalsiyum misellerinin yapısı için önemlidir. Kazeinin, kalsiyum bağlaması onun fosfat içeriği ile orantılıdır. α_{s1} - ve α_{s2} -Kazein kalsiyuma karşı çok hassastır. α_s -Kazein 3-8 mM kalsiyum (Ca^{+2}) konsantrasyonunda, β -kazein 8-15 mM Ca^{+2} konsantrasyonunda çökmektedir. κ -Kazein ise kalsiyumun her seviyesinde çözünür durumdadır. κ -Kazein sadece kalsiyum içinde çözünür kalmaz aynı zamanda α_{s1} - ve β -kazeinin stabilizasyonunu sağlamaktadır (Marth and Steele, 2001). Bu kazein türevlerinin çok değişik fonksiyonel özelliklere sahip olmaları fırıncılık ürünleri, et ürünleri, çorba ve soslarda kullanılmalarını sağlamaktadır. Kazeinler, vücutta çinko, kalsiyum, bakır, demir ve fosfat iyonlarını taşıma gibi çeşitli biyoaktiviteler göstermelerinin yanı sıra, bir kısım

biyoaktif peptitlerin ön maddesi olarakda işlev görmektedirler (Tunçtürk, 2003). Ayrıca kazeinin hidroliz olması ile açığa çıkan peptitler (Schmelzer et al., 2007), ACE inhibisyon aktivitesi, antioksidan aktivite, prolil endopeptitaz inhibisyon aktivitesi ve antimikrobiyel aktivite gibi çoklu fonksiyonel özellikler göstermektedirler (López-Expósito et al., 2007; Contreras et al., 2009; Srinivas and Prakash, 2010).

2.1.2. Serum proteinleri

Yağsız sütte kazein uzaklaştırıldığında, geriye kalan kısmına “süt serumu” denir ve içerisinde yaklaşık % 0.7 oranında protein bulunur. Süt serumu içerisinde, pek çok fraksiyondan oluşan bu proteinlere, serum proteinleri veya peynir üretimi sırasında peynir suyunda kaldıkları için “peyniraltı suyu proteinleri” denir (Üçüncü, 2005). Süt proteinlerinin yaklaşık olarak % 20’ sini oluşturan serum proteinleri, hem fonksiyonel açıdan hem de besin açıdan proteinlerin mükemmel bir karışımıdır (Tunçtürk, 2003).

Serum proteinleri; β -Lg, α -La, sığır serum albumini ve immunoglobulindir. β -Lg, en fazla bulunan serum proteindir ve serum proteininin % 50’ sini oluşturur. β -Lg’ nin 8 genetik varyasyonu vardır. Bunlar; A, B, C, D, E, F, G ve Dr’ dir. A ve B genetik varyantlar en yaygın olanlarıdır. β -Lg, 18 000 Da mol ağırlığındadır ve iki disülfid bağına ve bir adet serbest tiol bağına sahiptir. Bu bağlar ısıtma sırasında sütte oluşan değişimler açısından önemlidir (Marth and Steele, 2001).

α -La, serum proteinlerin %20’ sini oluşturur. Üç bilinen genetik varyantı vardır. α -La, 14 000 Da mol ağırlığındadır. Dört iç zincir disülfid bağı içerir ve iki kalsiyum atomunu kuvvetlice bağlayabilir. Bu atomlar kaldırıldığı zaman denaturasyona hassasiyet artmaktadır. Serum albumin, toplam serum proteinin % 5’ ini oluşturur. Bu protein karaciğerde sentezlenir ve süte kazandırılır. Bir serbest tiol ve onyedisi disülfid bağı vardır. Serum albumin küçük moleküllerin taşıyıcısı (yağ asidi gibi) olarak görev yapar (Marth and Steele, 2001).

İmmunoglobulinler, serum proteinlerin %10' unu oluşturur. Hafif mol ağırlığı 22 400 Da, ağır mol ağırlığı 50 000–60 000 Da' dur. 4 tip immünoglobulin vardır. Bunlar, IgM, IgA, IgE ve IgG' dir. Serumda düşük miktarlarda birkaç protein daha bulunur. Bunlar β -mikroglobulin, laktoferrin (bunların her ikisi de demir bağlar) proteoz, pepton ve asil glikoproteinlerdir (Marth and Steele, 2001).

Serum proteinleri, vücuda direnç sağlayan antimikrobiyel maddelerin de kaynağıdır. Aynı zamanda süt ve süt ürünlerinin raf ömrünün uzatılmasında ve patojenlerin kontrolünde de etkili olmaktadır (Tunçtürk, 2003). α -La, antitümör, apoptozis, antiülseratif, bağışıklık sistemini düzenleyici, antimikrobiyel, antiviral, yüksek tansiyon önleyici, sinir sistemini düzenleyici, mineral bağlayıcı ve antioksidatif biyoaktiviteler gösteren peptitlerin kaynağıdır ve fonksiyonel gıdaların üretiminde kullanılmaktadır (Kamau et al., 2010). Çizelge 2.1.'de serum proteinleri ve bazı özellikleri görülmektedir.

Çizelge 2.1. Süt proteininin fraksiyonları ve bazı özellikleri (Üçüncü, 2005).

Protein fraksiyonları	Süt proteinindeki payı (%)	İzoelektrik noktası (pH)	Molekül ağırlığı (Dalton)
Kazeinler	79	4.6	$2-18 \cdot 10^8$
α_s -kazein	45-55	5.1	22 500
β -kazein	23-35	5.3	24 000
κ -kazein	8-15	4.1-4.5	19 000
γ -kazein	3-7	5.8-6.4	$11-20 \cdot 10^3$
Serum Proteinleri			
β -laktoglobulin	7-12	5.2	18 300
α -laktalbumin	2-5	5.1	14 000
Serum albumini	0.7-1.3	4.8	69 000
İmmünoglobulinler	1.9-3.3	4.6-6.0	$15-100 \cdot 10^4$
Proteoz ve peptonlar	2-6	3.7	$4-40 \cdot 10^3$

2.2. Yoğurdun Tarihçesi ve Önemi

Yoğurt; *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* bakterilerinin laktik asit fermentasyonu ile meydana gelen koagüle bir süt ürünüdür (Rasic and Kurman, 1978; Anonim, 1999a; Anonim, 2009; Shah, 2003).

2.2.1. Yoğurdun tarihçesi

Yoğurt ve yoğurt benzeri fermente süt ürünlerinin üretiminin ilk kez ne zaman, nerede ve kimler tarafından gerçekleştirildiği henüz tam olarak aydınlatılmamıştır (Özer, 2006).

Yoğurdun ilk defa nasıl yapıldığına dair elde yeterli bilgi olmamakla beraber Kaşgarlı Mahmut tarafından 10. asırda yazılan Divan-u Lugat-i Türk ve Balasagunlu Yusuf Hacıp tarafından yazılan Kutadgu Bilig adlı eserlerde yoğurt kelimesine bugünkü anlamda rastlanılmaktadır (Özer, 2006).

Yoğurdun Avrupa'da yayılışıyla ilgili ilk bilgiye Fransız tıp tarihinde rastlanmaktadır. 16. asırda Fransa kralı 1. Fransuva ateşli ishal hastalığına yakalanır. 1. Fransuva' ya tedavi amacıyla Türkler tarafından yoğurt götürülür ve yemesi tavsiye edilir. Bu suretle dünyada yoğurt üretimi birden bire artmaya başlar. O tarihte yoğurt Fransa' da daha ziyade ilaç olarak tanınmıştır. Yoğurdun esas yayılması ve geniş çapta Türk sınırlarını aşması 20. yüzyılın başlarına rastlar. Yoğurt, Amerika' da yaklaşık olarak 45-50 yıl önce tanınmıştır. Eski dünyadan Asya ve Afrika' da yoğurdun yayılışı Türklerin vasıtasıyla olduğu söylenebilir (Özer, 2006).

Yirminci yüzyılın başında Rus bilim adamı Metchnikoff (1845-1916), gözlemlerine dayanarak yoğurt tüketen toplumların daha uzun ömürlü olduğunu gündeme getirmiştir. Metchnikoff 'a göre "sütün fermentasyonu sonucu oluşan yoğurttaki laktik asit ve diğer ürünler, kalın bağırsaktaki sporlaşabilen anaerobik bakterilerin gelişimini inhibe etmektedir. Bu anaerob bakteriler gastrointestinal kanaldaki putrefaksiyondan sorumludur ve yan ürün olarak birçok toksik madde açığa

çıkarmaktadır. Bu otoendotoksikasyon sonucu da yaşam kısalmaktadır” fikrini ileri süren Metchnikoff ’un teorisi toplumu önemli derece de etkilemiş ve yoğurdu popüler hale getirmiştir. O zaman yoğurt bakterilerinden *Lb. bulgaricus*’ un kalın bağırsakta koloni oluşturarak putrefaksiyondan sorumlu bakterilerin çoğalmasını zorlaştırdığı ve inhibe ettiği öngörülmektedir. Zamanla *Lb. bulgaricus*’ un kalın bağırsakta koloni oluşturabilme yetisine sahip olmadığı ortaya konunca bu teorinin doğruluğu konusunda endişeler artmıştır. Yoğurdun tedavi edici ve önleyici etkisinin de abartıldığı bildirilmiştir. Fakat her şeye rağmen bu teori kitleleri etkilemiştir (Flora, 1996; Özden, 2009).

2.2.2. Yoğurdun beslenmedeki rolü ve önemi

Yoğurt, zengin bir karbonhidrat (laktoz), protein, yağ, vitamin, kalsiyum ve fosfor kaynağıdır. Kimyasal bileşimi üretimde kullanılan çiğ sütün bileşimine ve laktik asit fermentasyonu sırasında süt bileşenlerinde meydana gelen gelişmelere bağlıdır. Yoğurt yapımı sırasında sütün bileşimini etkileyen faktörler yağ ve kurumadde standardizasyonları ile ısı işlemidir (Yaygın, 1999).

Sütte bulunan ve hayati öneme sahip besin maddeleri eksiksiz, hatta daha zengin bir şekilde yoğurta bulunmaktadır. Yoğurdun üretiminde, özellikle ısı işlem sırasında B grubu (B1, B6, B12 ve folik asit) ve C gibi sıcaklığa hassas bazı vitaminler zarar görse de, yoğurt bakterilerinin faaliyeti sonucu özellikle B12 vitamininin sentezi meydana gelmektedir (Demirci ve Şimşek, 1997).

Laktik asit fermentasyonu esnasında laktoz içeriği azalmakta, oldukça fazla laktik asit oluşmakta, değişik yapıda organik asitler, serbest peptit, amino asit ve yağ asitleri miktarı artmakta, bazı vitaminlerde azalış veya artışlar meydana gelmektedir. Yoğurdun kalori değeri, laktozun laktik aside dönüşmesine bağlı olarak % 3-4 oranında azalmaktadır. Laktoz intoleransı olan insanlar tarafından rahatlıkla tüketilebilen bir ürün niteliğini kazanmaktadır. Sindirimi daha kolay olduğu gibi sindirim sistemini düzenleyici etkiye de sahiptir. Ayrıca yağ içeriği düşürülmüş yoğurtlar zayıflamak için uygun bir besin kaynağı olmaktadır. Fermantasyon

sırasında meydana gelen organik asitler ürünün aromasını iyileştirmekle birlikte doğal koruyucu maddeler olarak görev yapmaktadırlar (Rasic ve Kurman, 1978, Akalın vd., 1998).

Yoğurt bakterileri; intestinal patojen ve saprofit mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmektedir. Ayrıca yoğurdun kolestrolü düşürücü, antitümör ve antikolesterolemik özelliklerinin yanında, hazmı kolay olan bir yiyecek olmasından dolayı doyurucu ve tatmin edici özelliği ile bağırsak hareketlerini düzenleyici etkileri de bulunmaktadır. Yoğurttaki süt asidi bağırsak mukozasına tesir ederek bağırsağın peristaltik hareketi hafifletmekte ve bağırsaktaki ifrazat ve elektrolit kaybını, dolayısıyla gıda sarfiyatını azaltmaktadır (İnal, 1990; Demirci ve Şimşek, 1997; Tekinşen, 2000).

2.2.3. Geleneksel yöntemle yoğurt üretimi

Geleneksel olarak üretilen yoğurtların kendilerine özgü tat ve aromaları hammadde kalitesinden etkilenmekle beraber büyük ölçüde, sahip oldukları mikrofloradan kaynaklanmaktadır. Mikroorganizmaların yoğurt oluşumu sırasında meydana getirdiği kimyasal ve fiziksel değişiklikler yoğurdun tadını, aromasını ve yapısını belirlemektedir (Herdem, 2006).

Genellikle ülkemizde evlerde geleneksel yöntemlerle yoğurt üretimi ve tüketimi daha yaygındır. Fakat endüstriyel yoğurt üretim teknolojisi ile üretilen yoğurtların tüketimi de son yıllarda artış göstermeye başlamıştır.

Yoğurt, Türkiye’de geleneksel beslenme alışkanlıklarımızın önemli bir parçasını oluşturmaktadır (Demirci ve Şimşek, 1997; Tekinşen, 2000; Özer, 2006). Çok uzun yıllardan beri sevilerek tüketilmesine rağmen, kişi başına yoğurt tüketim oranı diğer ülkelere nazaran çok düşüktür. Ev koşullarında yoğurt üretimi son derece yaygın olduğundan istatistiksel olarak gerçek anlamda yoğurt tüketim verilerine ulaşmak mümkün olmamaktadır. Kişi başına yıllık yoğurt tüketimi Bulgaristan’da 35 kg, Fillandiya’da 40 kg, Yunanistan’da 89 kg ve Amerik Birleşik Devletleri’nde 113 kg’

dır (Demirci ve Şimşek, 1997; Akın, 2006). Ülkemizde kişi başına düşen yoğurt tüketiminin 23 kg dolayında olduğu tahmin edilmektedir (Özer, 2006).

Geleneksel yoğurt üretimi; halk arasında daha önceden yapılmış olan yoğurttan bir miktar alınarak başlangıç kültürü olarak süte ilave edilmesiyle yapılmaktadır. Bu üretim şeklinde yoğurt sütünün soğutulması, ilave edilen maya miktarı ve inkübasyon kontrolsüz şartlarda olmaktadır. Yoğurt üretiminde, kaynatılan çiğ süt, mayalama sıcaklığına kadar soğutulmaktadır. İçerisine daha önceden üretilmiş olan yoğurt ilave edilerek karıştırılmakta ve sıcaklığını muhafaza edecek şekilde 3-4 saat bekletilmektedir. Genellikle de yoğurt inkübasyonu mayalanan sütün bir gece bekletilmesi şeklinde olmaktadır.

Yoğurt, eski geçmişi ve önemli bir gıda maddesi olmasına rağmen, ülkemiz yoğurtçuluğunun istenilen seviyeye erişmediği, dolayısıyla üretilen yoğurtların büyük bir kısmının kalite ve standardizasyondan yoksun olduğu bir gerçektir. Piyasaya arz edilen yoğurtların çoğu yağsız, doğal yoğurt aromasından yoksun, yavan, ekşi, görünüş ve kıvamı bozuk, hijyenik kalitesi düşük, ambalaj durumu yetersiz ve dayanıksızdır (Yaygın, 1999; Tekinşen, 2000; Hisoğlu, 2007).

Çizelge 2.2.' de yoğurdun bileşimi, Çizelge 2.3.' de ise Türk Gıda Kodeksi (TGK) Fermente Sütler Tebliği (Anonim, 2009) ve TSE TS 1330 Yoğurt Standardı' na (Anonim, 1999a) göre yoğurdun mikrobiyolojik ve kimyasal bileşimi görülmektedir.

Çizelge 2.2. Yoğurdun bileşimi (Demirci ve Şimşek, 1997)

Bileşen	Oranı
Su	% 80-86
Kurumadde	%14-20
Yağ	%2-8
Protein	%4-8
Süt şekeri	%2-5
Mineral madde	%0.8-1.2

Çizelge 2.3. Türk Gıda Kodeksi Fermente Sütler Tebliği (Anonim, 2009) ve TSE TS 1330 Yoğurt Standardı' na (Anonim, 1999a) göre yoğurdun mikrobiyolojik ve kimyasal bileşimi

Özellik	TGK Fermente Sütler Tebliği	TSE TS 1330 Yoğurt Standardı
Koliform grubu bakteri	En fazla 95 EMS/g	En fazla 10 adet/g
<i>E. coli</i>	< 3 EMS/g	Bulunmamalı
<i>S. aureus</i> (kob/g)	-	Bulunmamalı
Maya	10 ² -10 ³ kob/g	-
Küf	10 ² -10 ³ kob/g	-
Maya-küf	-	1.0x10 ² kob/g
<i>Salmonella</i> spp.	-	Bulunmamalı
Tam yağlı(m/m)	En az % 3.80	En az % 3.80
Yağlı(m/m)	-	En az % 3.00
Yarım yağlı(m/m)	En az % 1.50	En az % 1.50
Yağsız (yavan)(m/m)	En fazla % 0.50	% 1.50'den az
Yağsız kurumadde (m/m)	-	En az % 12.00
Protein	En az % 3.00	-
Titre edilebilir asitlik (% l.a.)	0.60-1.50	0.80-1.60
Peroksidaz	-	Negatif

2.3. Biyoaktif Peptidler

Gıda kaynaklı proteinlerin *in vitro* veya *in vivo* şartlarda hidrolizi ile üretilen biyolojik fonksiyonları veya fizyolojik etkileri olan peptitler **biyoaktif peptitler** olarak adlandırılır (Smacchi and Gobetti, 2000). Biyoaktif peptitler genellikle 3-20 amino asit içeren kısa zincirlerdir. Yumurta, fasulye, balık ve mısır gibi farklı birçok gıdada bulunmasına rağmen en önemli kaynağını süt proteinleri oluşturur (Narva, 2004; Kavas vd., 2007a, b; Ahn et al., 2009; Majumder and Wu, 2009). Kaynağı olan protein dizisinde inaktif halde bulunan biyoaktif peptitler;

- Sindirim sistemi enzimleri ile sütün sindirimi sırasında,
- Proteolitik starter kültürler ile sütün fermentasyonu yoluyla,
- Mikroorganizma veya bitkilerden elde edilen enzimler aracılığı ile açığa çıkarlar (Schanbacher et al., 1997; Schanbacher et al., 1998; Smacchi and Gobetti, 2000; Tunçtürk, 2003; Tokatlı vd., 2005; Korhonen and Pihlanto, 2006; Roufik et al., 2006; Möller et al., 2008).

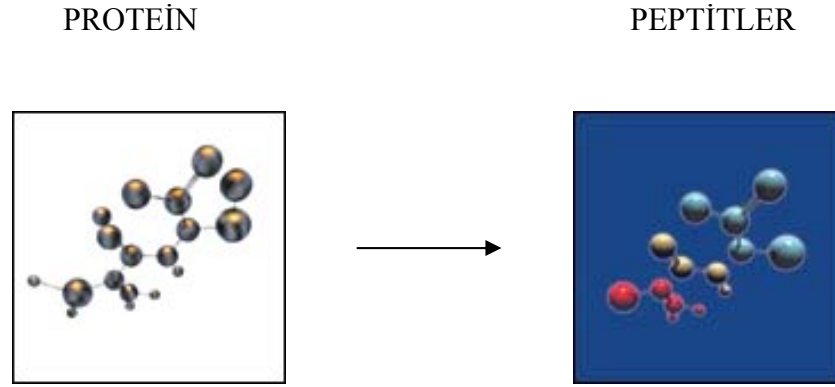
Biyoaktif peptitler ilk defa 1979 yılında tespit edilmesini takiben artan bir şekilde araştırılmaya devam edilmiş ve kazeinden tripsin enzimi ile hidrolize edilerek üretilen Kazein D; yüksek tansiyon önleyici gıda bileşeni olarak Japonya' da satışa sunulmuştur (Dağdemir vd., 2003).

Biyoaktif peptitlerin çeşitli fizyolojik fonksiyonlar göstermeleri hormon veya ilaç benzeri aktiviteye sahip olmalarından kaynaklanmaktadır (Clare and Swaisgood, 2000; FitzGerald and Murray, 2006). Biyoaktif peptitlerin, çoğu gıda proteinlerinin sindirim sisteminde sindirimi sırasında veya gıda maddelerinin laktik asit bakterileri ile fermentasyonu yoluyla üretildiği belirlenmiştir. Son yıllarda biyoaktif peptitlerin üretimi ve özellikleri ile ilgili birçok çalışma yapılmaktadır (Chabance et al., 1998; Korhonen and Pihlanto, 2006).

Biyoaktif peptitler, vücut fonksiyonu ve sağlığı olumlu yönde etkileyen spesifik protein fragmentleri olarak da belirtilebilir. Ağız yolu ile alınan biyoaktif peptitler

bütün vücut sistemini etkileyen amino asit dizileridir. Bu sonuçtan yola çıkarak farklı peptit dizilerinin diyetle beraber alınması kronik hastalıkların riskini azaltarak ya da doğal bağışıklık sistemine destek olarak insan sağlığını olumlu yönde etkilemektedir. Bu durum da bilim adamlarının ilgisini bu bileşikler üzerine çekmektedir. Bu yararlı etkileri bilinen peptit dizilerinin antimikrobiyel, antioksidatif, antitrombotik, yüksek tansiyon önleyici ve bağışıklık sistemini düzenleyici hareketlerinden kaynaklandığını göstermektedir. Bu aktivitenin yapılarında var olan amino asit kompozisyonu ve diziliminden kaynaklandığı düşünülmektedir (Korhonen and Pihlanto, 2006).

Peptitler, 2 ile 20 amino asit arasında çeşitlilik gösterir (Korhonen and Pihlanto, 2006; Donkor et al., 2007a) ve çoğu peptidin birden fazla fonksiyel özellik gösterdiği bilinmektedir. Bugün, süt proteinleri biyoaktif peptitlerin en önemli kaynağı olarak düşünülmektedir ve süt proteinlerinin hidroliz edilmesi ile elde edilen ve fermente süt ürünlerinden tanımlanan biyoaktif peptitlerin sayısı giderek artmaktadır (Korhonen and Pihlanto, 2006; Korhonen, 2009). Bunlara ilave olarak bazı amino asitlerinde fizyolojik olarak yararlı etkilerinin bulunduğu örneğin çeşitli biyokimyasal yollara katıldıkları ve bazı aktif metabolitlerin ön maddeleri oldukları bilinmektedir. Fizyolojik olarak yararlı etkileri olduğu bilinen amino asitlere arjinin, glutamin, histidin, lizin, taurin, tirozin, triptofan örnek olarak verilebilir. Bu amino asitlerin en önemli kaynakları et, yumurta ve süt ürünleridir. Gıdaların işlenmeleri sırasında oluşan lisinoalanin, D-amino asitler ve biyojen aminler gibi birçok amino asit türevlerinin vücutta istenmeyen metabolik veya toksik etkiye sebep oldukları bilinmektedir. Şekil 2.1.' de proteinlerin hidrolize olması ile peptitlerin oluşumu görülmektedir.



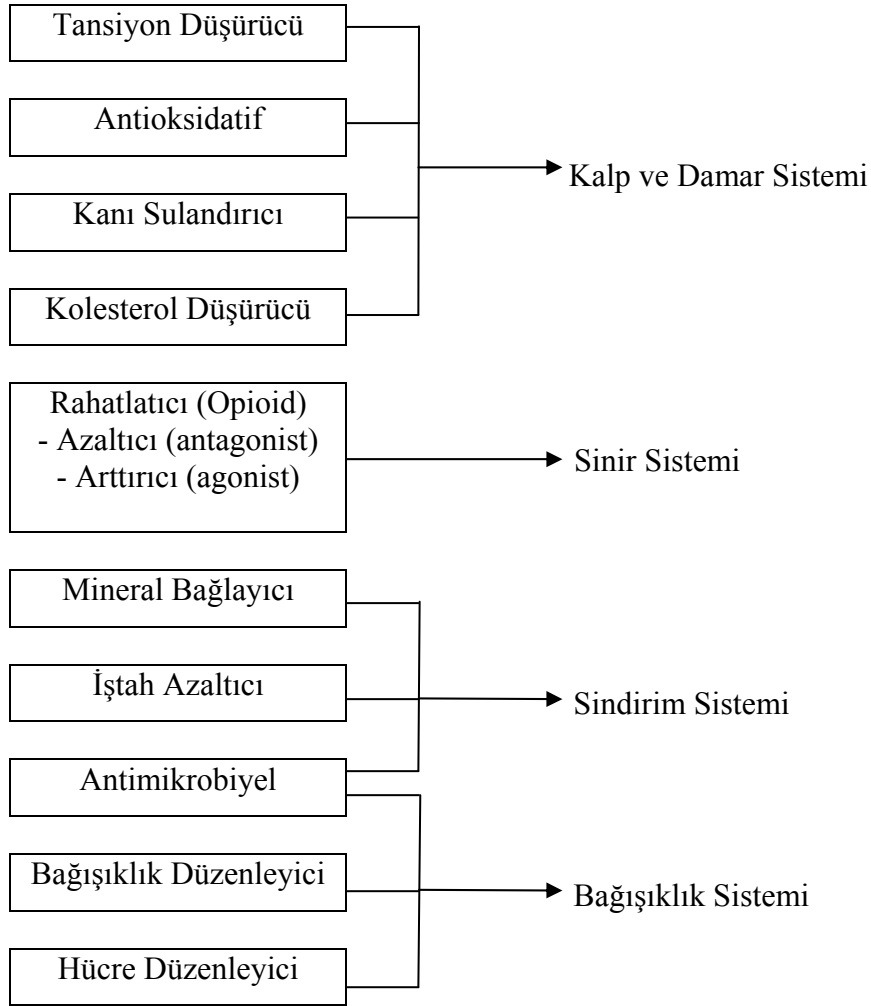
Şekil 2.1. Proteinlerin hidrolize olması ile peptitlerin oluşumu (Advitech, 2006)

Yapılan çalışmalar sonucunda süt ve diğer gıda proteinlerinden 527 tane biyoaktif peptit içeren bir veritabanı oluşturulmuştur. Bu veri tabanının yeni biyoaktif peptitlerin araştırılmasında kolaylık sağlayacağı belirtilmiştir (Gobbeti et al., 2002). Ayrıca web kaynaklı yaklaşık 1100 dizilim içeren farklı kaynaklardan elde edilen biyoaktif peptit veritabanı bulunmaktadır (Shi et al., 2004).

Biyoaktif peptitler, amino asit zincirlerinin kimyasal hidrolizi ile sentetik olarakda üretilbilirler. Süt proteinlerinden oluşan peptitlerin, *in vivo* koşullarda yapılan çalışmalarda, sindirim, kalp-damar, bağışıklık ve sinir sistemi üzerine olumlu etkileri olduğu tespit edilmiştir (Clare and Swaisgood, 2000).

2.3.1. Biyoaktif peptidlerin sağlık üzerine etkileri

Biyoaktif peptitler vucuda alındiklarinda kalp ve damar, sinir, sindirim ve bağışıklık sistemini etkilerler. Şekil 2.2.'de biyoaktif peptitlerin fizyolojik fonksiyonları gürmektedir.



Şekil 2.2. Biyoaktif peptitlerin fizyolojik fonksiyonları
(Korhonen and Pihlanto, 2006)

Çizelge 2.4.' te biyoaktif peptitlerin gürdükleri biyolojik aktiviteler ve peptitlerin elde edildikleri ön maddeler gürmektedir.

Çizelge 2.4. Süt proteinlerinden elde edilen peptitlerin biyoaktivitesi
(Gobbetti et al., 2002)

Biyolojik Aktivite	Ön Madde	Biyoaktif Peptitler
Tansiyon Önleyici	α -, β -Kazein	Kazokininler
	α -Laktalbumin, β -Laktoglobulin	Laktokininler
Antimikrobiyel	Laktoferrin	Laktoferrisin B
	α_{s1} -Kazein	İsrasidin
Kazokinler	α_{s2} -Kazein	Kazosidin
Antitrombotik	κ -Kazein	Kazoplatelin
Bağışıklık Düzenleyici	α -, β -Kazein, β -Laktoglobulin	İmmünopeptitler
Mineral Bağlayıcı	α -, β -Kazein	Fosfopeptitler
Rahatlatici Etki	α -, β -Kazein	Kazomorfinler
	α -Laktalbumin	α -Laktorfinler
	β -Laktoglobulin	β -Laktorfinler
Uyarıcı Etki	Laktoferrin	Laktoferroksinler
	κ -Kazein	Kazoksinler

2.3.1.1. Yüksek tansiyonu önleyici peptitler

Yüksek tansiyon önleyici peptitlerin biyokimyasal yapıları, fizyolojik aktiviteleri ve inhibisyon mekanizmaları hakkında çok fazla bilgi bulunmaktadır. Bu peptitler, ACE'yi inhibe ederler (Gobbetti et al., 2002; Gobbetti et al., 2004; Jauhiainen, 2007; Jäkälä and Vapaatalo, 2010).

Yüksek tansiyon, kan basıncının artmasına neden olan bir rahatsızlıktır ve koroner kalp yetmezliği, kalp krizi ve kalp rahatsızlıkları gibi kardiyovasküler hastalıklarda önemli bir faktördür (Otte et al., 2007a). İnsan meabolizmasında kan basıncı farklı biyokimyasal yollar kullanılarak düzenlenir. Bu yollardan bir tanesi rennin angiotensin aldosteron sistemidir. ACE bu yoldaki anahtar enzimdir (Haque and Chand, 2008; Lignitto et al., 2010).

ACE, substratlarının peptit bağlarını hidroliz eden bir peptidilipeptitazdır ve kan basıncını düzenleyen renin-anjiyotensin sistemi ile ilgilidir. Angiotensin I' i damarların daralmasına neden olan angiotensin II' ye dönüştürür ve damarların genişlemesini sağlayan bradikininini inaktif hale getirerek kan basıncının artmasına neden olur (Haeileselessie et al., 1999; Schmidl and Labuza, 2000; Kavas ve Kınık, 2001; Gobbetti et al., 2002; Séverin and Wenshui, 2005; Donkor et al., 2007a; Ong et al., 2007; Pihlanto et al., 2010; Jäkälä and Vapaatalo, 2010; Madureira et al., 2010). ACE inhibitörleri, ACE' ye yarışmalı olarak bağlanarak enzimin etkisini bloke ederler ve yüksek tansiyon oluşumunu engellerler. ACE inhibitörü peptitlerin yapıları ve aktiviteleri arasındaki ilişki tam olarak bilinmemesine rağmen, ACE inhibitörlerinin hidrofobik amino asit kalıntıları içeren peptitleri substrat olarak daha fazla tercih ettiği ve özellikle C terminal bölgesinde prolin, lisin ve arjinin amino asitlerini içeren peptitlerin kuvvetli yüksek tansiyon önleyici etkilerinin olduğu belirlenmiştir (Clare and Swaisgood, 2000).

ACE inhibitör peptitleri, genellikle 2 ile 20 amino asit içerir. Ancak 27 amino asit içeren peptitler de bulunmuştur (Lignitto et al., 2010). İlk bulunan ACE inhibitör peptitleri yılan zehirinden elde edilmiştir (Chobert et al., 2005; Ong et al., 2007). Diğer ACE inhibitörleri ise bitki, diğer gıda proteinleri ve özellikle süt proteinlerinin enzimatik hidrolizi ile elde edilmektedir (Gibbs, 1999; Gibbs et al., 2004; Kusump, 2006; Ong et al., 2007; Nakajima et al., 2009; Rho et al., 2009). Peynir, fermente süt ve yoğurt gibi fermente süt ürünlerinden ACE inhibitör peptitlerin elde edilmesi ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Nakamura et al., 1995a, b; Saito et al., 2000; Gobbetti et al., 2000; Murakami et al., 2004; FitzGerald and Murray, 2006; Quirós et al., 2006; Donkor et al., 2007a; Ong et al., 2007; Walther et al., 2008; Ong and Shah, 2008). Bu biyolojik aktif peptitler daha sağlıklı ve doğal bir yaşam için ACE inhibitör ilaçlarına alternatif olmaktadır (Donkor et al., 2007a; Hong et al., 2008).

Klinikte yüksek tansiyon hastalarına ağız yoluyla verilen bir bileşik olan Kaptopril, sentetik bir peptittir. Bu sentetik ACE inhibitörlerinin, öksürük, kaşıntı, deride kızarıklıklar gibi bir takım yan etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, çeşitli gıda proteinlerinde doğal olarak bulunan ve yan etkisi daha az olan ACE

inhibitörleri daha da önem kazanmaya başlamıştır (Dağdemir vd., 2003). Fermente süt ürünlerinden elde edilen ACE inhibitör peptitleri yüksek tansiyon hastalarına kullanılan ilaçlar kadar etkili olmasa da herhangi bir yan etkileri bulunmamıştır. (Haque et al., 2009).

Kazein ve peyniraltı suyu proteinlerinin (özellikle α -La ve β -Lg) hidrolizi sonucu açığa çıkan kazokin ve laktokinler bu ACE inhibitör aktiviteyi göstermektedirler. Kazein kaynaklı ACE inhibitör peptitleri yada kazokinler, insan β - ve κ -kazeininden elde edildikleri gibi sığır α_{s1} - ve β -kazeininin triptik sindirimi ile de meydana gelebilmektedirler (Clare and Swaisgood, 2000).

Yapılan bir çalışmada, peyniraltı suyu proteinleri 7 farklı proteaz enzimi ile (tripsin, proteinaz K, aktinaz E, termolis, papain, pepsin ve kemotripsin) hidrolize edilmiştir. Sonuçta, proteinaz K tarafından hidrolize edilen proteinlerin yüksek tansiyonlu farelere verildikten (2mg/kg) 6 saat sonra kan basıncını 55 mm Hg düşürdüğü belirlenmiştir (Abubakar et al., 1998). Benzer şekilde β -kazeinin hidrolizi ile elde edilen peptitlere eşdeğer 7 tane amino asit içeren bir peptit sentetik olarak üretilmiştir. Bu peptitler, yüksek tansiyonlu farelere ağız yolu ile verildikten 8 saat sonra tansiyonlarında düşme gözlenmiştir (Silva and Malcata, 2005). Yapılan başka bir çalışmada araştırmacılar, tripsin enzimi kullanarak hidrolize ettikleri α_{s2} -kazeinden izole edilen 43 adet peptidin yüksek tansiyon önleyici etkileri ile IC₅₀ (ACE enziminin %50' sinin inhibisyonu için gerekli peptit miktarı) miktarları incelenmiş ve sadece 7 tanesinin yüksek tansiyon önleyici etki gösterdiği, bu peptitlerden 4'ünün IC₅₀ değerinin 20 μ M' dan daha az olduğunu bildirmişlerdir (Dağdemir vd., 2003).

Sentetik olarak elde edilen β -Lg' den (f 102-105, f 146-149) ve α -La' den (f50-53) elde edilen peptitlerin ACE inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu peptitler doğal olarak serum proteinlerinin ticari enzimlerle hidrolizi sonrasında elde edilmektedirler. Otte et al., (2007a, b) süt proteinlerinin termolis ile katalizi sonrasında biyoaktif peptitlerin oluştuğunu bulmuşlardır. Yaptıkları çalışmalarında hidrolize kazein ve serum proteinlerinin IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 45-83 μ g/mL ve 90-400 μ g/mL olduğunu ve α -La' nin en yüksek inhibitör etkiyi gösterdiğini belirtmişlerdir.

Özellikleri en iyi belirlenen ACE inhibitör peptitleri Val-Pro-Pro ve Ile-Pro-Pro' dur. Bu peptitler fermente süt ve süt ürünlerinde bulunurlar. Yapılan çalışmalarda bu iki peptidin sistolik ve diastolik kan basıncını düşürdüğü belirlenmiştir (Nakamura et al., 1995a; Pripp, 2008; Bütikofer et al., 2008; Usinger et al., 2009; Meyer et al., 2009; Jäkälä et al., 2009; Turpeinen et al., 2009; Pihlanto et al., 2010).

ACE inhibitör etkisine sahip peptitlerin oluşumunda ve aktif hale gelmesinde enzimler ile hidrolizin yanı sıra *Lb. helveticus* gibi bazı laktik asit bakterileri de etkili olmaktadır (Maeno et al., 1996; Clare and Swaisgood, 2000; Seppo et al., 2003; FitzGerald and Murray, 2006).

Laktik asit bakterileri tarafından sütün fermentasyonu sırasında kazeinin hidrolizi ile elde edilen ve ACE inhibitör etki gösteren peptitlerin fermentasyonun ilerlemesiyle ortaya çıktıkları belirtilmiştir. Özellikle α_{s1} -kazeinden kaynaklanan peptitlerin yüksek aktiviteye sahip oldukları belirtilmiştir.(Korhonen et al., 1998; Silva and Malcata, 2005)

Yüksek tansiyonu düşürücü peptitler, kazeinin yanı sıra peyniraltı suyu proteinlerinden (Belem et al., 1999; Pihlanto-Leppälä et al., 2000; Gerdes et al., 2001; Hernández-Ledesma et al., 2002; Didelot et al., 2006) fermente süttten, yağsız süttten ve olgunlaştırılmış peynirlerden önemli ölçüde izole edilmektedir (Séverin and Wenshui, 2005).

Süt proteinlerinden elde edilen ACE inhibitör peptitleri kazeinin fragmenti ise kazokininler, peyniraltı suyu proteinlerinin fragmenti ise laktokininler olarak adlandırılmaktadırlar (Chobert et al., 2005; Kesler et al., 2008).

Meisel et al., pastörize süt, yoğurt, kuark, taze ve olgunlaştırılmış peynir gibi çeşitli süt ürünlerinde ACE inhibitör aktiviteyi ölçmüşlerdir. Çalışma sonucunda yoğurt, kuark ve taze peynir gibi düşük proteoliz derecesi bulunan ürünlerde bu aktivitenin düşük olduğu bulunmuştur. Olgunlaştırılmış peynirlerde olgunlaşma derecesine bağlı olarak aktivitenin yüksek olduğu fakat ileri olgunlaşma derecelerinde ise bu

aktivitenin düştüğü belirtilmiştir. Bu açıdan süt ürünlerinin doğal fonksiyonel ürünler olarak kullanılmasının kan basıncının düşürülmesinde etkili olduğu belirtilmiştir (Sverin and Wenshui, 2005).

2.3.1.2. Damar tıkanıklığı önleyici (antitrombotik) peptitler

Kimozinin κ -kazeini hidrolize edip sütü pıhtılaştırması ile trombinin fibrinojeni hidrolize edip kanı pıhtılaştırması arasında benzerlik bulunmaktadır. Bu benzerlik nedeniyle trombositler üzerindeki reseptörlere peptitler bağlanarak kanın pıhtılaşması engellenmektedir (Clare and Swaisgood, 2000; Smacchi and Gobbetti, 2000; Sverin and Wenshui, 2005; Silva and Malcata, 2005; Haque et al., 2009). κ -Kazeinden elde edilen kazoplatelinler antitrombotik etki göstermektedirler (Fiat et al., 1993; Gobbetti et al., 2002; Haque et al., 2009).

Yapılan bir çalışmada inek sütü esaslı mamalarla ve anne sütü ile beslenen bebeklerin kan plazmalarında, κ -kazeinden kaynaklanan antitrombotik peptitlere rastlanmıştır (Smacchi and Gobbetti, 2000; Silva and Malcata, 2005). κ -Kazeinin tripsin ile hidrolizi sonrası elde edilen kazopiastrin (f 106-110) fibrinojenin bağlanmasını inhibe ederek antitrombotik etki göstermektedir. κ -Kazeinin 103-111 arasındaki fragmentleri ise trombositlerin birleşmesini önlemekte fakat trombositlerin reseptörlere fibrinojenin bağlanmasını etkilememektedirler.

Antitrombotik peptitler, çeşitli hayvan türlerinden izole edilen κ -kazeinoglikopeptitlerden de elde edilmektedir. İnsan κ -kazeinoglikopeptitlerinden elde edilen antitrombotik bir peptide 5 günlük bebeklerin emzirme sonrası kan plazmalarında rastlanmıştır (Clare and Swaisgood, 2000; Silva and Malcata, 2005). Bu peptitlerin antitrombotik aktivite açısından eczacılıktaki önemi ile ilgili çok fazla bilgi bulunmamaktadır (Sverin and Wenshui, 2005).

2.3.1.3. Rahatlatıcı/uyarıcı etki gösteren peptitler

Gece yatarken bir bardak süt içmenin uyumayı kolaylaştırdığı ve bebeklerin emzirmeden sonra sakinleştiği herkes tarafından bilinen bir durumdur. Son yıllarda yapılan çalışmalar, süt ürünlerindeki peptitlerin sinir sisteminde aktif bir rol oynadığını göstermiştir. Bu peptitler “opioid peptitler” olarak bilinirler (Silva and Malcata, 2005; Tokatlı vd., 2005). Rahatlatıcı etkiye sahip peptitler morfin benzeri uyuşturucu bir etki gösterirlerken, uyarıcı peptitler ise bu etkiyi azaltıcı ve engelleyici yönde davranırlar (Séverin and Wenshui, 2005).

Kazein kaynaklı peptitlerden kazokinler uyarıcı, ekzorfın ve α - ve β -kazomorfinler ise rahatlatıcı etkiye sahiptirler (Schanbacher et al., 1997). Kazomorfinler, sosyal davranışın düzenlenmesi, ağrının giderilmesi, sindirim sistemi boşalım hızının azaltılması, ishalin önlenmesi, amino asit transferinin düzenlenmesi ve insülin salgılanmasını arttırmaktadır. Bu peptitler, sindirim sistemini geçtikten sonra μ - ve δ -tip reseptörleri ile reaksiyona girer ve sindirim sistemi ile beyine yerleşirler (Smacchi and Gobetti, 2000; Gobetti et al., 2002). Bitri (2004), yaptığı çalışmada kazeinin asit hidrolizi ile opioid peptitlerin açığa çıktığını belirlemiştir.

β -kazomorfinler, gıda proteinlerinden elde edilen ilk opioid peptitlerdendir. Dolayısıyla diğer opioid peptitlere göre yapıları ve açığa çıkmaları ile ilgili daha fazla bilgi bulunmaktadır (Coste and Tomé, 1991; Pihlanto-Leppälä, 2001; De Noni, 2008).

Serum proteinlerinin opioid peptit dizilerini içerdikleri bilinmektedir. Bu peptitlerden α -La' nin pepsin ile hidrolizi sonrası α -laktorfın, β -Lg' nin pepsin ve sonrasında tripsin veya tripsin + kimotripsin ile sindirimi sonrası β -laktorfın oluşmaktadır (Pihlanto-Leppälä, 2001).

Pseudomonas aeruginosa ve *Bacillus cereus* gibi proteoliz gücü yüksek olan bakterilerin sütün içine inoküle edilip, gelişmeleri ile yüksek miktarda β -kazomorfin oluşturdukları belirlenmiştir (Clare and Swaisgood, 2000).

Uyarıcı etkiye sahip peptitler ise rahatlatıcı etki gösteren enkepalini baskırlar. Bu peptitlerden kazein kaynaklı kazokinlerin yanı sıra laktoferrinin pepsin ile sindirimi sonucu açığa çıkan laktoferroksinler de uyarıcı etki göstermektedirler. (Schanbacher et al., 1997; Schanbacher et al., 1998; Clare and Swaisgood, 2000; Silva and Malcata, 2005).

2.3.1.4. Bağışıklık sistemini uyarıcı peptitler

İnsan vücudunun yabancı unsurlara karşı göstermiş olduğu savunma mekanizması oldukça karmaşıktır. Bu bakımdan beslenme, söz konusu sistem üzerine önemli bir etkiye sahiptir. Peptitlerin bağışıklık ile ilgili aktiviteleri temel olarak antimikrobiyel etki ve bağışıklık sisteminin uyarılması şeklinde gerçekleşmektedir. (Tokatlı vd., 2005). Bağışıklık sistemi, bakteri, virüs ve parazit gibi patojen enfeksiyonlarına karşı vücudu korumak ile sorumludur (Bendich, 1993).

Anne sütü ile beslenme, yeni doğanların bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı direncini etkileyen çok fonksiyonlu biyolojik faktörler yardımıyla pasif bağışıklığın fiziksel iletimini sağlamaktadır. Kazeinler bu faktörler arasında yer almaktadır ve süt kazeinlerinin enzimatik hidrolizi esnasında bağışıklık sistemini düzenleyici peptitler açığa çıkmaktadır (Tokatlı vd., 2005).

Yapılan çalışmalarda, yoğurt ve laktik asit bakterilerinin bağışıklık sistemini de içeren terapötik etkilerine değinilmektedir. Bu etki yoğurt tüketiminden kaynaklanan sindirim sistemi mikroekolojisindeki değışikliklerden kaynaklanmaktadır. Bağırsaklarda laktik asit bakterilerinin miktarının artması patojen bakterilerin gelişimini baskılamakta ve dolayısıyla enfeksiyon riski düşmektedir. Bu nedenle yoğurt tüketimi ile sağlanan laktik asit bakterilerinin varlığı bağışıklık sistemi için yararlıdır. Fakat yoğurdun bakteriler dışında içerdığı serum proteinleri, kısa zincirli peptitler ve konjuge linoleik asit gibi diğler bileşenleri de yararlı etkiler göstermektedir (Meisel and Schlimme, 1990; Meydani and Ha, 2000).

Yoğurt içinde bulunan biyoaktif peptitler, IEC-6 ve Caco-2 hücrelerinin çoğalmasını azaltmaktadır. Bu sonuçlar ise yoğurt tüketiminin bağırsak kanseri riskini azaltıcı etkisinin bulunması ile ilgili ilişkisini kısmen açıklayabilmektedir. Kayser ve Meisel' da süt kaynaklı peptitlerin insan lenfositleri üzerine bağışıklığı canlandırıcı ve baskılayıcı etkileri olduğunu belirtmişlerdir (Clare and Swaisgood, 2000). LeBlanc et al. (2002) yüksek proteolitik aktivite yeteneği nedeniyle *Lb. helveticus* ile sütün fermentasyonu sırasında, Mercier et al. (2004) peyniraltı suyu proteinlerinin enzimatik hidrolizi ile açığa çıkan peptitlerin insan bağışıklık sistemi üzerine olumlu etkileri olduğunu belirlemişlerdir. Fiat et al. (1993) ise κ -kazeinden elde edilen bir tripeptitin insan kan lenfositlerinin çoğalmasını *in vivo* olarak önemli ölçüde arttırdığını bulmuşlardır.

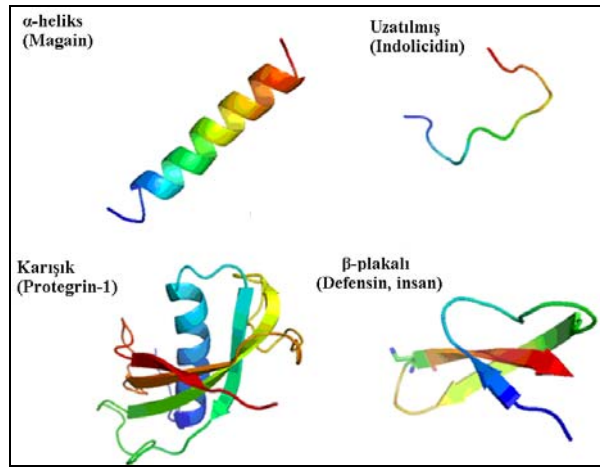
β - ve α_{S1} -kazeinden ve α -La' den elde edilen immunopeptitler, insan makrofajlarının fagositik aktivitesini teşvik etmekte ve farelerde *Klebsiella pneumoniae*' ya karşı koruyucu etki göstermektedir (Tomé and Debabbi, 1998; Smacchi and Gobetti, 2000; Gobetti et al., 2002).

2.3.1.5. Antimikrobiyel aktivite gösteren peptitler

Antimikrobiyel peptitler, canlıların çevrede bulunan mikroorganizmalarla meydana gelebilecek infeksiyonlarına karşı en etkili silahlarındandır ve doğal bağışıklık sisteminin bir parçasıdır. Bu peptitlerin yapıları, primer ve sekonder yapılar olmak üzere iki kısımda incelenebilir. Primer yapısı, genellikle 12-50 aminoasit uzunluğunda, yaklaşık % 50 oranında hidrofobik aminoasit içeren ve sahip oldukları bazik yapıdaki lizin ve arjinin aminoasitlerinin etkisiyle pozitif yüklü bir yapıdır. Bu pozitif yük genellikle +2 veya daha fazla olabilmektedir. Sekonder yapısı, içerdikleri disülfid bağlarının yardımıyla veya bakteri membranına temas etmeleri sonucunda kendi üzerlerine katlanarak üç boyutlu amfipatik yapıların oluşması suretiyle meydana gelir. Bu yapılar hem polar pozitif yüklü aminoasitlerden oluşan bir hidrofilik kısım, hem de non-polar nötral aminoasit yan zincirlerini içeren bir hidrofobik kısımdan oluşmaktadır. Peptitlerin bu yapıları ile hidrofobik bir iç kısım

ve negatif yüklü hidrofilik dış grupları bulunan bakteri membranıyla çok iyi ilişki kurabilmektedir.

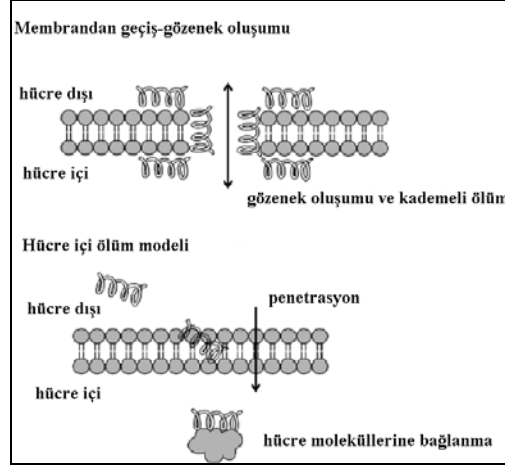
Birçok antimikrobiyel peptit uzun amino asit zincirine ve α -heliks yapısına sahiptir. Biyoaktif peptitlerin özellikle α -heliks ve β -plakadaki halkalı yapısının mikroorganizmaların mekanizmasını etkilediği belirtilmektedir (Daoud et al., 2005; Nedjar-Arroume et al., 2006). Şekil 2.3.'te antimikrobiyel peptitlerin farklı yapıları görülmektedir.



Şekil 2.3. Antimikrobiyel peptitlerin farklı yapıları (Wikipedia, 2010)

Antimikrobiyel peptitler ile sağlanan koruma sisteminin diğer sistemlerden en önemli ayırıcı özelliği bakteri öldürme hızının yüksek olmasıdır. Bakteriler her 20 dakikada sayılarını iki katına çıkarırlar. Yaşayan bir canlının koruma sisteminin enfekte eden canlının çoğalma gücünden daha hızlı olması gerektiği çok açıktır. Antimikrobiyel peptitler ise bu açıdan önemlidirler (Boman, 2003). Antimikrobiyel peptitlerin pozitif yüklü ve hidrofobik olması bu maddelerin bakteri membranıyla etkileşime girmeleri için çok önemlidir. Birçok antimikrobiyel peptidin bakteriler üzerindeki öldürücü etkisinin yapısına, hidrofobikliğine, büyüklüğüne veya amino asitlerinin dizilişlerine bağlı olmaktadır. Hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler için asıl öldürücü olan peptitlerin negatif yüklü sitoplazma membranı ile elektrostatik olarak etkileşmesinden kaynaklanmaktadır. Bu olay sırasında peptitlerin hidrofilik grupları ile membran fosfolipitlerinin hidrofobik zincirleri karşı karşıya gelmekte, peptitler

membrana paralel bir konum alarak membranın bütünlüğünü bozan kanalların oluşmasına yol açmaktadırlar (Wikipedia, 2010). Şekil 2.4.'te antimikrobiyel peptitlerin bakteri dış ve sitoplazma membranından geçişi şematik olarak görülmektedir.



Şekil 2.4. Antimikrobiyel peptitlerin bakteri dış ve sitoplazma membranından geçişi (Wikipedia, 2010)

Antibiyotiklerle karşılaştırıldığında, antimikrobiyel peptitler hedef hücreyi hızlıca öldürebilme yeteneğine ve geniş spektrumlu bir etkiye sahiptir. Ayrıca antibiyotiklere dirençli patojenler üzerine gösterdikleri etki de önemlidir (Pihlanto and Korhonen, 2003).

Son yıllarda yapılan araştırmalar, gıda proteinlerinin antimikrobiyel peptitlerin ön maddeleri olduğunu ve patojenlere karşı organizmaların koruyucu mekanizmalarına destek olduklarını göstermektedir (López-Expósito et al., 2006 a,b). Bu nedenle antimikrobiyel peptitlerin doğal kaynaklardan elde edilmesi ile ilgili çalışmalar artmaktadır (Haque and Chand, 2008). Yapılan çalışmalarla yumurta, ıspanak, arı sütü, çeşitli deniz mahsülleri, soya, kazein, buğday ve balık proteinleri gibi çeşitli biyolojik kaynaklardan antimikrobiyel peptitler elde edilmiş ve tanımlanmıştır (Park et al., 1996; Park et al., 1997; Parish et al., 2001; Froidevaux et al., 2001; Nedjar-Arroume et al., 2006; López-Expósito et al., 2006a,b; Nedjar-Arroume et al., 2008).

Süt ise antimikrobiyel peptit eldesinin en fazla yapıldığı kaynaktır (Losito et al., 2006). Sütün antimikrobiyel aktivitesi içerdiği immunoglobulinlere, laktoferrine, laktoperoksidaz ve lizozime bağlanmakta ve antimikrobiyel özelliği uzun yıllardır araştırılmaktadır. Sütten elde edilen ve laktoferrisin olarak adlandırılan antimikrobiyel peptit katyoniktir ve molekülün N-terminal bölgesinden elde edilmiştir (Bellamy et al.,1992a; Tomita et al., 1994; Dionysius and Milne, 1997). Laktoferrisin B, hücrelerin yapısal bileşenlerinin içine işleyerek Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere, mayalara ve küflere önemli zararlar vermektedir. Örneğin *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis*' in yüzeyine bağlanmakta ve normal membran geçirgenliği zarar görmektedir (Clare et al., 2003).

Kazein, enzimatik olarak hidrolize edilerek veya sütün fermentasyonu sırasında biyolojik olarak parçalanması sonucu aktif peptitlerin ortaya çıktığı bir kaynaktır. Kazein'in kimozin ile hidrolizi sonucu oluşan "kazesidin" ilk saflaştırılan antimikrobiyel peptittir. *Staphylococcus* spp., *Sarcina* spp., *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* ve *Streptococcus pyogenes*' e karşı antimikrobiyel aktivite göstermektedir. α_{s2} -Kazein kaynaklı kazosidin-I, *E. coli* ve *Staphylococcus carnosus*' un gelişimini önlemektedir. α_{s1} -Kazein kaynaklı israsidin ise, koyun ve inekleri mastitis hastalığına karşı koruyabilmekte, *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans*' a etki göstermektedir (Meisel, 1998; Clare and Swaisgood, 2000). Lahov and Regelson (1996) israsidinin *in vivo* aktivitesinin bakterilere karşı *in vitro* aktivitesinden çok daha etkili olduğunu belirlemişlerdir. İsrasidin, farelerde *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogens* and *Staphylococcus aureus*' a karşı koruyucu etki göstermiş ve mastitisli ineklerde kronik streptokok enfeksiyonlarında % 80 oranında başarı sağlamıştır (Haque and Chand, 2008).

Hayes et al. (2006), sodyum kazeinatın *Lb. acidophilus* DPC6026 ile fermente edilmesi ile açığa çıkan üç peptidin patojenik suşlar *Enterobacter sakazakii* ATCC 12868 ve *E. coli* DPC5063' e karşı antimikrobiyel etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln-Glu, Val-Leu-Asn-Glu-Asn-Leu-Leu-Arg ve Ser-Asp-Ile-Pro-Asn-Pro-Ile-Gly-Ser-Glu-Asn-Ser-Glu-Lys olarak tanımlanan bu peptitlerin α_{s1} -kazein kaynaklı olduğu ve bebek mamalarında *E. sakazakii*

infeksiyonuna karşı biyo-koruyucu olarak kullanılabileceklerini belirtmişlerdir. Zucht et al. (1995) ise α_2 -kazeinden (f 165-203) *E. coli*, and *Staphylococcus carnosus*' un gelişimini inhibe eden 39 amino asitten oluşan bir peptit bulmuş ve tanımlamışlardır.

Laktoferrin, çoğu memelilerin vücut sıvılarında bulunan demir bağlayıcı bir glikoproteindir ve konukçularını mikrobiyel enfeksiyonlara karşı korur. Süt serum proteinlerinden olan laktoferrinden antimikrobiyel özellik gösteren peptitler elde edilebilmektedir (Tomita et al., 1991; Dionysius and Milne, 1997; Recio and Visser, 2000; Gobbetti et al., 2002; Chobert, 2003). Sığır ve insan laktoferrininin pepsin ile sindirimi sonrası elde edilen peptitlerin laktoferrine göre 100-1000 kat daha fazla bakteri öldürücü etkisi bulunmaktadır (Gobbetti et al., 2002).

Üretim teknolojisi, süt çeşidi, starter kültürü ve depolama süreleri birbirinden farklı dokuz İtalyan peynir çeşidinin suda çözünen ekstraktlarından antimikrobiyel peptit elde edilmiş ve tanımlanmıştır. Parmigiano, Reggiano, Fossa ve Gorgonzola peynirlerinin suda çözünür ekstraktları antimikrobiyel peptit içermezken, Pecorino Romano, Canestrato Pugliese, Crescenza ve Caprino del Piemonte peynirlerinin peptitleri birbirleri ile benzerlik göstermiş, Caciocavallo ve Mozzarella peynirlerinin fraksiyonların da da antimikrobiyel peptitler tespit edilmiştir (Rizzello et al., 2005; Losito et al., 2006).

Çizelge 2.5.'te süt proteinlerinden elde edilen antimikrobiyel aktivite gösteren peptitlere örnekler verilmiştir.

Çizelge 2.5. Süt proteinlerinden elde edilen antimikrobiyel peptitler
(Haque and Chand, 2008)

Öncü Protein	Fragment	Açığa çıkma şekli	Referans
Laktoferrin	inek LF f(17–41/42), insan LF f(1–11)S-S(12–47), keçi LF f(14–42)	Pepsin ve kimotripsin	Bellamy et al., 1992b
α -Laktalbumin	α -La f(1–5), α -La f(17–31)S-S(109–114)	Tripsin	Pellegrini et al., 1999
α -Laktalbumin	α -La f(61–68)S-S(75–80)	Kimotripsin	Pellegrini et al., 1999
β -Laktoglobulin	β -Lg f(15–20), f(25–40), f(78–83), f(92–100)	Tripsin	Pellegrini et al., 2001
α_{S1} -Kazein	α_{S1} -kazein f(1–23)	Kimozin	Hill et al., 1974
α_{S1} -Kazein	α_{S1} -kazein f(99–109)	Pepsin	McCann et al., 2006
α_{S2} -Kazein	α_{S2} -kazein f(150–188)	Isıtma ve sütü asitlendirme	Zucht et al., 1995
α_{S2} -Kazein	α_{S2} -kazein f(164–179)	Pepsin	Recio and Visser, 1999a
α_{S2} -Kazein	α_{S2} -kazein f(183–207), f(164–207), f(175–207), f(181–207)	Kimozin	McCann et al., 2005
κ -Kazein	κ -kazein f(106–169)	Kimozin	Malkoski et al., 2001
κ -Kazein	κ -kazein f(18–24), f(30–32), f(139– 146)	Peptik enzim	López-Expósito et al., 2006b
κ -Kazein	insan κ -kazein f(43–97)	Pepsin	Liepke et al., 2001
β -Kazein	β -kazein f(184–210)	<i>Lb. helveticus</i> PR4 proteinazı ile	Minervini et al., 2003

Son yıllarda, nano-enkapsülasyon ve nano-emülsiyon teknolojisindeki gelişmeler antimikrobiyel aktivite gösteren biyoaktif peptitlerin kullanımında kolaylıklar sağlamıştır (Silva and Malcata, 2005; Phelan et al., 2009).

2.3.1.6. Antioksidan aktivite gösteren peptitler

Süperoksit radikal, hidroksil radikal, hidrojen peroksit ve peroksit radikali gibi reaktif oksijen molekülleri sadece gıdalarda oksidatif zarara sebep olmaz aynı zamanda canlılar üzerinde de olumsuz etkiler yaratırlar (Liu et al., 2005; Kavas vd., 2007c). Antioksidanlar, serbest radikallerin, hidrojen peroksitin veya diğer peroksitlerin oluşumunu önleyici özelliğe sahiptirler. Biyomoleküllerin oksidatif etkisini önleyerek yaşlanma, kanserin yanı sıra kalp krizi ve damar sertliği gibi kalp rahatsızlıklarına karşı koruyucudurlar (Gupta et al., 2009). Bu nedenle gıdalardan doğal antioksidan bileşikler elde etmek için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu antioksidanların gıdalardaki lipid oksidasyonunu önlediği gibi insan vücudunda da serbest radikallerin etkisinden, bazı kronik rahatsızlıkların oluşmasından koruyacağı düşünülmektedir (Liu et al., 2005).

Doğal antioksidanlardan rosemarinik asit, kateşin, tokoferoller, askorbat ve bitkilerden elde edilen çeşitli fenolik ekstraktların gıda işlemede geniş bir kullanım alanı vardır. Doğal antioksidanların geleneksel kaynaklardan elde edilmesi ile ilgili araştırmalar yoğun olarak yapılmaktadır. Yapılan araştırmaların çoğunda bitki ve hayvan kaynaklı peptit ve hidrolize proteinlerin önemli antioksidan aktiviteler gösterdiği belirlenmiştir (Xue et al., 2009). Doğal kaynaklardan elde edilen antioksidanlar kimyasal yolla elde edilenlerden daha fazla tercih edilmektedir. Çünkü sentetik antioksidanların bazılarının kanserojenik etkileri bulunmaktadır (Liu et al., 2005).

Biyoaktif peptitler, sağlık üzerine olumlu etkileri nedeni ile gıdaların bileşiminde kullanılması ile fonksiyonel gıdalar üretilmektedir (Park et al., 2008). Bu amaçla farklı kaynaklardan ve farklı işlemler uygulanarak elde edilen peptitlerin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi önemlidir (Park et al., 2007). Özellikle gıdalarda amino asitler, peptitler ve proteinlerin antioksidan olarak kullanılması yönünde talepler düşük maliyetleri, güvenilirlikleri ve yüksek besinsel değerleri nedeniyle artmaktadır (Park et al., 2008).

Songisepp et al. (2004), peynir üretimi sırasında kullanılan starter kültürlerine ilave olarak probiyotik *Lb. fermentum* suşunu kullanmışlar ve peynirlerin antioksidan aktivitesindeki değişikliği çalışmışlardır. Bu çalışmada ve depolama süresince antioksidan aktivitenin arttığını belirtmişlerdir. Peynirlerin depolanması sırasında kazeinin proteolizi ile çok sayıda peptit açığa çıkmıştır. Probiyotik bakteriler kullanılarak üretilen peynirlerde proteolitik aktivitenin değişmesi nedeniyle açığa çıkan peptit miktarı daha fazla olmuştur.

Kullisaar et al. (2003), fermente keçi sütü tüketiminin bireylerin kalp sağlığını olumlu yönde etkilediğini belirtmişlerdir. Bu durumun fermente keçi sütünün içerdiği antioksidan peptitlerin, lipoprotein fraksiyonlarının oksidasyona direncini artırma, peroksitlenmiş lipoprotein miktarını azaltma, LDL' yi oksitleme ve toplam antioksidan aktiviteyi artırma özelliklerinden kaynaklandığını belirtmişlerdir.

2.3.2. Biyoaktif peptitlerin beslenme üzerine etkileri

2.3.2.1. Fosfopeptitler

Fosfopeptitler, α_{s1} -, α_{s2} -, β -kazeininin *in vivo* ve *in vitro* koşullarda enzimatik hidrolizi ile açığa çıkmaktadır. Kazeinofosfopeptitler, kalsiyumun bağırsaklarda emilimini artırmakta ve bağırsakta gerçekleşen proteolize dayanıklı olduklarından kalsiyum ile çözünür kompleksler oluşturarak kalsiyum-fosfat şeklinde çökmeyi engellemektedir. Demirin fosfopeptitler tarafından bağlanması, daha zor emilen demir hidroksitlerin oluşumunu engelleyerek demir eksikliğini ortadan kaldırmaktadır. Ayrıca kazeinofosfopeptit eklenmiş diş macunları mine tabakasındaki aşınmaları engellemekte ve çürük önleyici etki yapmaktadır (Smacchi and Gobbetti, 2000; Gobbetti et al., 2002; Manso and López-Fandiño, 2004; Thomä-Worringer et al., 2006; Ferrazzano et al., 2008).

Kazeinofosfopeptitler, sulu ve lipid emülsiyonlarında, demir iyonlarını tutarak ve serbest radikallerin ortaya çıkmasını engelleyerek antioksidan aktivite özelliği de göstermektedirler (Kitts, 2005).

2.3.2.2. Glikomakropeptitler

Glikomakropeptitler, peynir üretimi sırasında oluşmaktadır. Kimozin enzimi, κ -kazeinin 105. ve 106. kalıntıları arasındaki peptit bağı hidrolize ederek bu molekülü oluşturmaktadır. Glikomakropeptitler, peyniraltı suyu ile uzaklaşmaktadırlar ve özellikle beslenme açısından yararlı etkilere sahiptirler. Glikomakropeptitler ile zenginleştirilmiş ürünler bağırsaklarda yararlı mikrofloranın gelişmesine katkıda bulunmaktadır. Bu peptitler bifidobakteriler ile laktobasillerin gelişmelerini teşvik ederek bazı enterik enfeksiyonlara karşı bariyer de oluşturmaktadır. κ -Kazeinden elde edilen glikomakropeptitlerin antimikrobiyel etkisi bulunduğu ve bazı karaciğer hastalıklarının kontrolünde de yararlı etkilerinin olduğu belirtilmektedir (Hoerr and Bostwick, 2000; Karagözlü ve Bayarer, 2004; Silva and Malcata, 2005; Tokatlı vd., 2005; Yetişmeyen ve Yıldız, 2008).

2.3.3. Biyoaktif peptitlerin fonksiyonel özellikleri

Çoğu biyoaktif peptidin birden fazla fonksiyonel özelliği bulunmaktadır (Srinivas and Prakash, 2010). Örneğin β -kazomorfın ve kazokininler hem yüksek tansiyon düşürücü etki hemde bağışıklık sistemini uyarıcı etki göstermektedirler. Ayrıca α - ve β -laktorfınler hem opioid hemde ACE inhibitör etkiler göstermektedirler (Smacchi and Gobbetti, 2000; Gobbetti et al., 2002).

Çoğu süt proteini kaynaklı peptitlerin de birden fazla fonksiyonel özelliği bulunmaktadır. Örneğin β -kazeinin 60-70 fragmentinden elde edilen peptitler sinir sistemini düzenleyici, bağışıklık sistemini teşvik edici ve ACE inhibitör aktivite özelliği göstermektedir. Ayrıca α_{s1} -kazein 194-199 fragmenti bağışıklık sistemini düzenleyici ve ACE inhibitör aktivite, opioid peptitlerden α ve β -laktorfın ise ACE inhibitör aktivite göstermektedir (Haque and Chand, 2008).

Süt proteinlerinden elde edilen farklı biyolojik fonksiyonları bulunan biyoaktif peptitler çeşitli fonksiyonel ürünlerin üretilmesinde, nutrasötiklerde ve ilaçlarda katkı maddesi olarak kullanılabilir (Haque et al., 2009).

2.4. Biyoaktif Peptitlerin Oluşumu

2.4.1. Enzimatik hidroliz ile biyoaktif peptit oluşumu

Biyoaktif peptit üretiminde temel yol büyük protein molekülünün enzimatik olarak hidrolizidir. Çoğu biyoaktif peptidin üretiminde bilinen pepsin ve tripsin gibi sindirim sistemi enzimleri kullanılmaktadır (Hernández-Ledesma et al. 2007a). Özellikle ACE inhibitör peptitleri ve kalsiyum bağımlı fosfopeptitler tripsin enzimi kullanılarak üretilen peptitlere örnek olarak verilebilir. Diğer sindirim enzimleri ve alkalaz, kimotripsin, pankreatin, pepsin ve termolisin gibi çeşitli proteinazların yanı sıra bakteriyel ve fungal kaynaklardan elde edilen enzimler çeşitli proteinlerden biyoaktif peptit üretiminde kullanılmaktadır.

Peptitlerin doğal protein kaynaklarından geleneksel yollarla üretilmesinin yanı sıra rekombinant DNA teknikleri ile özel peptitler ya da ön maddelerinin mikroorganizmalar kullanılarak üretilmesi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Kim vd. α_{s1} -kazeinini rekombinant *E. coli*' de üretmeyi başarmış ve saflaştırmışlardır. Bu proteininin tripsin ile parçalanması sonrasında çeşitli ACE inhibitör peptitleri içerdiği belirlenmiştir (Korhonen and Pihlanto, 2006).

Hashimoto et al. (2006), gıda proteinlerinden enzimatik hidroliz ile elde edilen peptitlerin fraksiyonlanmasında ticari kullanımı olabilecek ve peptitlerin amfoterik yapılarına bağlı olarak suda çözünmelerini temel alan izoelektrik odaklanma cihazı geliştirmişlerdir. Bu işlem "otoodaklanma" olarak tanımlanmış ve fonksiyonel ürünler ile nutrasötikler için aktif peptit fraksiyonlarının hazırlanmasında kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Park et al. (2008), otooklanma sistemi ile elde edilen fraksiyonların birleştirilmesi ile elde edilen fraksiyonunun, linoleik asit oksidasyonuna karşı otooklanma kullanılmadan elde edilen hidrolizatlara göre daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Böylece otooklanma sistemi ile gıdalarda bulunan

peptitlerin antioksidan aktivitesinin arttırılabilmesi ile, peptit bazlı gıda katkılarının oksidasyonun önlenmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

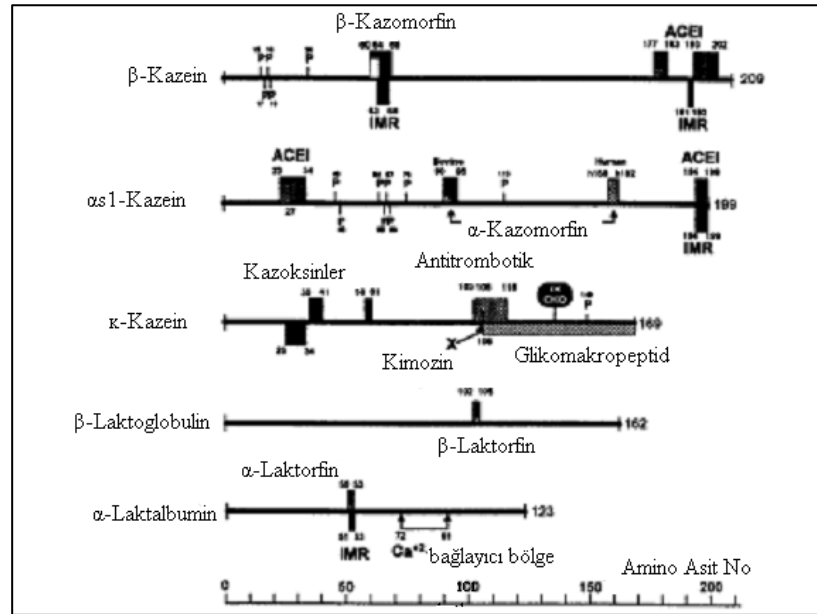
2.4.2. Mikrobiyel fermentasyon ile biyoaktif peptit oluşumu

Biyoaktif peptitler, starter ya da starter olmayan bakteriler tarafından fermente süt ürünleri üretiminde oluşabilmektedirler. Endüstriyel olarak yararlanılan ve çoğu süt ürünleri için kullanılan starter kültürlerin, biyoaktif peptit üretiminde önemli bir özellik olan proteolitik aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir. *Lc. lactis*, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* gibi laktik asit bakterilerinin proteolitik sistemleri detaylı bir şekilde incelenmiştir (Gobbetti et al., 2002; FitzGerald and Murray, 2006). Bu sistem hücre membranına bağlı proteinazlardan endopeptidaz, aminopeptidaz, tripeptidaz ve dipeptidazlar gibi farklı hücre içi peptidazlardan kaynaklanmaktadır (Macedo et al., 2000). Son yıllarda bu enzimlerin biyokimyasal ve genetik karakterizasyonunu açıklamak için hızlı gelişmeler meydana gelmektedir. Peptidazların aktivitelerinin gelişme koşullarından etkilenmesi peptitlerin oluşumu üzerinde birtakım değişikliklerin yapılmasını olanaklı kılmaktadır (Gobbetti et al., 2002; FitzGerald and Murray, 2006). Çizelge 2.6' da sütün proteolitik mikroorganizmalar ya da mikroorganizmalardan elde edilen proteolitik enzimler kullanılarak fermente edilmesi sonucu ortaya çıkan biyoaktif peptitler görülmektedir.

Son yıllarda, mikrobiyel proteoliz yolu ile süt proteinlerinden çeşitli biyoaktif peptitlerin üretimi ile ilgili yapılan çalışmaları içeren birçok derleme yapılmaktadır (Gobbetti et al., 2002; FitzGerald and Murray, 2006). Bu çalışmaların çoğunda ACE inhibitör ya da yüksek tansiyon önleyici peptitler, bağışıklık sistemini düzenleyici, antioksidatif ve antimikrobiyel peptitlerin tanımlandığı belirtilmektedir. *Lb. helveticus* Emmental peyniri gibi geleneksel fermente süt ürünlerinin üretiminde starter kültür olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir ve yüksek proteolitik aktiviteye sahip bu suşların ACE inhibitör peptitlerini oluşturdukları ile ilgili çok çalışma bulunmaktadır (FitzGerald and Murray, 2006). Şekil 2.5.' te büyük protein molekülü ve birincil amino asit dizisindeki biyoaktif peptitler görülmektedir.

Çizelge 2.6. Süt proteinlerinden, çeşitli mikroorganizmalar ve mikrobiyel enzimler kullanılarak elde edilen biyoaktif peptitlere örnekler (Korhonen and Pihlanto, 2006)

Mikroorganizma	Ön Protein	Peptit	Biyoaktivite
<i>Lb. helveticus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	β -kn, κ -kn	Val-Pro-Pro, Ile-Pro, Pro	ACE inhibitörü,
<i>Lactobacillus</i> GG enzimleri+pepsin ve tripsin	β -kn, α_{s1} -kn	Try-Pro-Phe-Pro, Ala-Val-Pro-Try-Pro-Gln-Arg, Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp	Rahatlatıcı, ACE inhibitörü, Bağışıklık düzenleyici
<i>Lb. helveticus</i> CP90 proteinaz	β -kn	Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro(Glu)	ACE inhibitörü
<i>Lb. helveticus</i> CPN 4	PAS protein	Try-Pro	ACE inhibitörü
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> SS1, <i>Lc.</i> <i>lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> FT4	β -kn, κ -kn	Çeşitli Fragmentler	ACE inhibitörü
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> IFO13953	κ -kn	Ala-Arg-His-Pro-His-Pro-His- Leu-Ser-Phe-Met	Antioksidatif
<i>Lb. rhamnosus</i> + pepsin ile sindirimi ve Korolaz PP	β -kn	Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe, Try-Gln-Glu-Pro-Val-Leu Val-Lys-Glu-Ala-Met-Ala-Pro- Lys	ACE inhibitörü Antioksidatif
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	β -kn	Ser-Lys-Val-Try-Pro-Phe-Pro- Gly Pro-Ile	ACE inhibitörü
<i>S. thermophilus</i> + <i>Lc.lactis</i> ssp <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	β -kn	Ser-Lys-Val-Try-Pro	ACE inhibitörü
<i>Lb.helveticus</i> ICM 1004 hücre içermeyen ekstraktı	Hidrolize yağsız süt	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro	ACE inhibitörü



Şekil 2.5. Proteinler ve içerdikleri biyoaktif peptitlerin haritası (Schanbacher et al., 1997; 1998)

2.4.2.1. Yoğurt bakterileri tarafından proteinlerin kullanımı

Laktik asit bakterilerinin inorganik azot kaynaklarını kullanarak amino asit sentezleme yetenekleri sınırlıdır. Bu nedenle gelişme ortamlarında bulunan amino asitleri azot kaynağı olarak kullanırlar. Bu amaçla ortamda bulunan protein veya peptitleri metabolik aktiviteleri ile amino asitlere dönüştürürler (Donkor, 2007).

Süt proteinleri (özellikle kazeinler) yoğurt bakterileri için temel azot kaynağıdır. Yoğurt bakterileri tarafından gerçekleştirilen kazein hidrolizinin birinci basamağı, hücre duvarında yer alan ekzoselüler proteinazlar, hücre membranına bağlı aminopeptidazlar ve hücre içi peptidazlar aracılığı ile gerçekleşmektedir. *S. thermophilus* ve *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*' un birçok suşu proteinaz aktivitesine sahiptir. *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* kökenli proteinazlar metallo enzim grubuna dahildir ve 45-55°C' de ve pH 5.2-5.8 aralığında optimum aktivite göstermektedir. Bu enzimler serum proteinlerine oranla β -kazein ve α_s -kazein üzerinde daha etkilidirler. *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* kökenli proteinazların kazeinler üzerindeki proteolitik etkisi pH' daki azalmaya bağlı olarak artış göstermektedir. β -Kazein yoğurt bakterileri tarafından diğer kazein fraksiyonlarından daha hızlı hidrolize uğramaktadır. Serum proteini fraksiyonlarından β -Lg, yoğurt fermentasyonu sırasında hidroliz olmazken, α -La sınırlı düzeyde proteolize uğramaktadır. *S. thermophilus*' un kazeinler üzerindeki proteolitik etkisi genelde zayıftır. Bazı *S. thermophilus* suşları proteinaz aktivitesine sahip değilken, bazı suşlar yüksek proteolitik aktivite göstermektedir (Özer, 2006).

2.4.2.2. Yoğurt bakterileri tarafından peptitlerin kullanımı

Yoğurt bakterileri gelişimleri için gerekli azot kaynağını genellikle düşük molekül ağırlıklı peptitlerden karşılamaktadırlar. *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* tarafından sentezlenen proteazlar tarafından açığa çıkarılan oligopeptitler, endo-, ekzopeptidazlar aracılığı ile düşük molekül ağırlığına sahip peptitlere ve amino asitlere parçalanmaktadır ve bu azotlu bileşikler *S. thermophilus* tarafından gelişim

faktörü olarak kullanılmaktadır. Bu olay iki yoğurt bakterisi arasındaki simbiyotik ilişkinin temelini oluşturmaktadır (Özer, 2006).

S. thermophilus tarafından sentezlenen ekzopeptidazlar, peptitler üzerine *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* tarafından sentezlenen ekzopeptidazlardan daha aktiftir. Buna karşın, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* daha yüksek endopeptidaz aktivitesine sahiptir ve kazein hidrolizinden endopeptidazlar sorumludur. *S. thermophilus* zayıf proteinaz aktivitesine karşın orta düzeyde peptidaz ve aminopeptidaz aktivitesine sahiptir (Özer, 2006).

Lb. delbrueckii ssp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus*' un hemen tüm suşları X-propil-dipeptidilamino-peptidaz (X-pro-DPAP) aktivitesine sahiptir. X-pro-DPAP özellikle, kazein hidrolizi için anahtar enzim rolündedir ve yoğurta dipeptit oluşumundan birinci derecede sorumludur. Bunun nedeni, X-pro-DPAP enziminin substrat olarak prolini kullanması ve kazeinin prolin açısından zengin bir kaynak olmasıdır (Özer, 2006).

2.4.3. Proteolitik enzimlerin inhibisyonu

Gıda proteinlerinden kaynaklanan biyoaktif peptitler sindirim sistemi enzimlerini etkilemelerinin yanı sıra gıdaların bozulmalarına yol açan enzimler için de spesifik inhibitörler olabilirler. Bu biyoaktif peptitler gıdaların üretimi sırasında gerçekleştirilmesi gereken enzimatik reaksiyonlar üzerinde de etkili olabilirler. Laktik asit bakterilerinden kaynaklanan proteolitik enzimler bazı süt ürünlerinde biyoaktif peptitlerin oluşumunu sağlayabilirler. Oluşan bu biyoaktif peptitler aynı zamanda ürünlerde mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen biyokimyasal reaksiyonların ilerleyişini de etkileyebilirler (Smacchi and Gobetti, 2000; Silva and Malcata, 2005; Tokatlı vd., 2005).

Laktik asit bakterilerinin enzimleri veya dış kaynaklı enzimlerin aktivitesi sonucu üretilen biyoaktif peptitler olgunlaşma esnasında seçici bir şekilde mikrobiyel proteolizi inhibe etmektedir. Laktik asit bakterilerinin hücre içi peptidazlarına etki

gösteren biyoaktif peptitler Çedar ve bazı İtalyan peynirlerinden (Parmesan. Mozzarella) izole edilmiştir. Çedar peynirinin olgunlaşması sırasında açığa çıkan β -kazomorfin laktik asit bakterilerinin endopeptitaz ve aminopeptitazlarını inhibe etmektedir (Smacchi and Gobbetti, 2000).

Laktik asit bakterilerinin bu duyarlılığı tür ve suş düzeyinde değişiklik göstermektedir. Bu farklılığın ise enzimlerinin amino asit dizilişlerindeki küçük farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

İtalyan peynirlerinde izole edilen ACE-inhibitör peptitleri, UHT sütlerde acılığa sebep olan psikrotrofik *P. fluorescens*' in ısıya dayanıklı proteinazlar gibi mikrobiyel bozulma enzimlerini inhibe etmektedir. Bu proteolitik enzimlerin kontrolü süt ürünlerinin bozulmasının önlenmesi için büyük öneme sahiptir (Smacchi and Gobbetti, 2000).

2.4.4. Sütte biyoaktif peptitlerin oluşumunu sağlayan mikroorganizmalar ve fermente ürünler

Laktik asit bakterileri ile fermentasyon sırasında biyoaktif peptitlerin oluşumu, sütün fermentasyonu ile elde edilen peptitlerin tanımlanması ve özelliklerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar yoğun biçimde yapılmaktadır (Sipola et al., 2002; Gómez-Ruiz et al., 2002; Fugland et al., 2003; Quiros et al., 2005; FitzGerald and Murray, 2006; Korhonen and Pihlanto, 2006; Bütikofer et al., 2007; Donkor et al., 2007a).

Nakamura et al. (1995a, b) özellikleri en iyi bilinen ACE inhibitör peptitlerini (Val-Pro-Pro ve Ile-Pro-Pro) sütü *Lb. helveticus* ile fermente ederek elde etmeyi başarmışlardır. Yüksek tansiyon hastaları üzerine yapılan çalışmada *Lb. helveticus*' un kazeini hidrolize etmesi ile açığa çıkan tansiyon düşürücü özelliği olduğu belirlenmiş bu iki tripeptiti (Val-Pro-Pro ve Ile-Pro-Pro) içeren fermente sütü tansiyon hastalarının günlük olarak tüketmesi istenmiştir. Hastaların kan basıncında 4 ve 8 hafta sonra önemli bir düşüş gözlenmiştir. (ACE inhibisyon ≥ 70 , IC₅₀ 100-500mmol/L). Bu içecek ile günlük alınan peptit miktarı 1.2-1.6 mg arasında

değişmiştir. Sonuçta süt ürünlerinden sağlanan peptitler tansiyon ilaçları kadar güçlü etki göstermese de doğal fonksiyonel gıdalar olarak günlük diyetinde alınması tavsiye edilmiştir.

Meisel et al. yüksek tansiyonu düşürücü etki gösteren biyoaktif peptitleri Gouda peynirinde incelemişler, biyoaktif peptit oluşumunun olgunlaşma süresince arttığını fakat proteoliz belli bir düzeye geldikten sonra düşüşe geçtiğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde yoğurt, taze peynir gibi proteolizin düşük olduğu ürünlerde ise bu aktivitenin düşük olduğu gözlemlenmiştir (FitzGerald and Murray, 2006).

Probiyotik etki gösterdiği kanıtlanmış *Lactobacillus* cinsi mikroorganizmalar ile fermente edilmiş sütlerde farklı düzeylerde biyoaktif peptitlerin varlığı saptanmıştır (Gobbetti et al., 2002; FitzGerald and Murray, 2006).

Meisel and Bockelmann (1999), *in vitro* olarak *Lactococcus lactis*' in hücre duvarı proteinazlarını saflaştırmış ve bu proteinazlar ile β - ve α -kazeini hidroliz ederek kazomorfin, kazokinin ve immünopeptit yapısında oligopeptitler elde etmişlerdir.

Mikroorganizmaların genleri ile oynanarak belli bir biyoaktif peptitin üretiminin artırılması sağlanabilmektedir. Örneğin β -kazomorfin ile zenginleştirilmiş süt mutant *Lb. helveticus* suşu kullanılarak elde edilebilmiştir (Matar and Goulet, 1996).

Kazein veya peyniraltı suyu proteinlerinden kaynaklanan özel biyoaktif peptitler içeren katkıların sayısı giderek artmakta ve son yıllarda marketlerde yerini almaktadır. Diğer taraftan gıda şirketleri tarafından üretim yöntemleri geliştirilmektedir. Bu peptitlerin sağlık açısından yararlı etkileri olduğu bilinmektedir. Bu ticari katkılara ve uygulama alanlarına ait bazı örnekler Çizelge 2.7.' de verilmiştir.

Çizelge 2.7. Sağlık üzerine etkileri veya fonksiyonel özellikleri bulunan biyoaktif peptitleri içeren ticari süt ürünleri ve katkıları (Korhonen and Pihlanto, 2006)

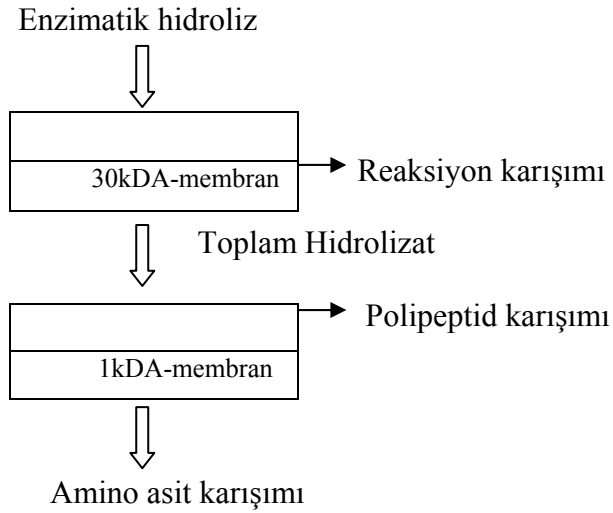
Marka	Ürün Tipi	Fonksiyonel BP	Etkisi	Üretici Firma
Calpis	Fermente Süt	Val-Pro-Pro, Ile-Pro, Pro	Kan basıncını düşürücü	Calpis Co., Japonya
Evolus	Kalsiyum zenginleştirilmiş fermente süt	Val-Pro-Pro, Ile-Pro, Pro	Kan basıncını düşürücü	Valio Oy., Finlandiya
BioZate	Hidrolize PAS proteinleri	β -Lg fragmentleri	Kan basıncını düşürücü	Davisco, ABD
BioPURE-GMP	Hidrolize PAS proteinleri	κ -kn f(106-169)	Diş çürüklerine virüs ve bakteriler karşı koruyucu, kanın pıhtılaşması üzerine etkili	Davisco, ABD
Prodiat F200	Aromalı süt	α_{s1} -kn f(91-100) Tyr-Leu-Gly Try-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg	Stres azaltıcı	Ingredia, Fransa
Festivo	Yarım Yağlı Peynir	α_{s1} -kn f(1-9), α_{s1} -kn f(1-7), α_{s1} -kn f(1-6)	Belirlenmemiş	MTT, Finlandiya
Cysteine Peptide	Katkı Maddesi	Süt protein peptitleri	Uyku getirici	DMV, Hollanda
C12	Katkı Maddesi	Kazein peptitleri	Kan basıncını düşürücü	DMV, Hollanda
Capolac	Katkı Maddesi	Kazeinofosfopeptit	Mineral emilimi	Arla Food, İsviçre
PeptoPro	Katkı Maddesi	Kazein peptitleri	Kas geliştirici	DSM, Hollanda
Vivinal Alpha	Katkı Maddesi	PAS peptitleri	Rahatlatıcı	BDI, Hollanda

2.5. Biyoaktif Peptidlerin Ayrılması ve Zenginleştirilmesi

Süt proteinlerinden biyoaktif peptitlerin geniş ölçekte ticari olarak üretimi, uygun teknolojilerin eksikliği nedeniyle sınırlıdır. Günümüzde belirli bir molekül ağırlığı aralığındaki peptitlerin zenginleştirilmesi için en uygun yol, membran ayırma tekniğidir (Korhonen and Pihlanto, 2006). Ultrafiltrasyon ise, hidrolize proteinlerden elde edilen biyoaktif peptitlerin zenginleştirilmesinde yoğun olarak kullanılmaktadır (Poulin et al., 2006). Enzimatik hidrolizin, geleneksel kesikli hidroliz veya ultrafiltrasyon membran sistemlerinin beraber kullanılması ile sürekli hidroliz şeklinde üretim sağlanabilmektedir. Enzimatik membran reaktörleri kullanılarak sürekli sistemle özel peptit dizilerinin üretimi 1990' lar da başlamıştır (Korhonen and Pihlanto, 2006).

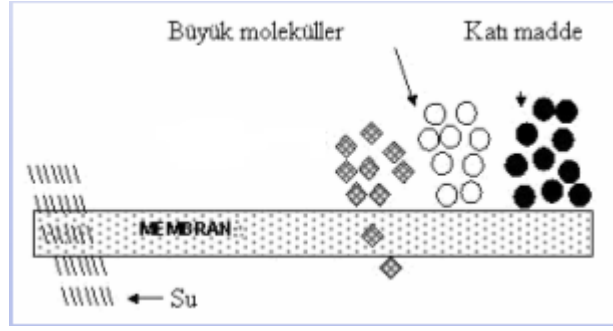
Gauthier and Pouliot (2003), enzimatik hidroliz ile ultrafiltrasyon tekniklerini beraber kullanarak β -Lg' den peptit üretebilmişlerdir.

Bordenave et al., ultrafiltrasyon reaktörü ile keçi sütünden elde edilen peyniraltı suyu proteinlerinden sürekli sistemle α -laktorfin elde etmeyi başarmışlardır. Bazı çalışmalarda, iki basamaklı filtrasyon sistemi kullanılarak biyoaktif peptitlerin zenginleştirilmesinin sağlanabildiği belirtilmektedir. Şekil 2.6.'da iki basamaklı filtrasyon sisteminin şematik olarak gösterimi bulunmaktadır (Gauthier and Pouliot, 2003).



Şekil 2.6. İki basamaklı filtrasyon sisteminin şematik olarak gösterimi (Gauthier and Pouliot, 2003)

Biyoaktif peptitlerin zenginleştirilmesinde kullanılan yöntemlerden bir tanesi de peptitlerin yükü ve büyüklüğüne göre ayrılmalarını sağlayan Nanofiltrasyon (NF) tekniğidir. Bu teknikte pH ve iyonik güç önemli olmaktadır. Pouliot et al. (1999) β -Lg' in tripsin ile hidrolizi sonrası açığa çıkan peptitlerin NF membranları kullanarak ayrılmasında pH 9 ve 0.5 M NaCl ilavesinin membran seçiciliğini arttırdığını belirtmişlerdir. Şekil 2.7.'de NF uygulamasının şematik olarak gösterimi bulunmaktadır.



Şekil 2.7. NF uygulamasının şematik olarak gösterimi (Cartwright, 2006)

Çeşitli kaynaklarda sağlanan gıda proteinlerinin besleyici ve fonksiyonel özelliklerini geliştirmek amacıyla yapılan bu işlemlerin geniş bir uygulama alanı bulunmaktadır. Bu amaç için özellikle süt proteinleri kullanılmaktadır. Son yıllarda iyon değişirici kromatografik metotların da bu peptitlerin zenginleştirilmesinde kullanılabileceği belirtilmektedir. Fakat bu yöntemin sanayi maliyetinin yüksek olması, büyük hacimli üretimi sınırlı kılmaktadır (Korhonen and Pihlanto, 2006).

Ellegård et al. (1999) yüksek saflıkta kazeinofosfopeptit üretimini;

Asit çöktürmesi



Diafiltrasyon

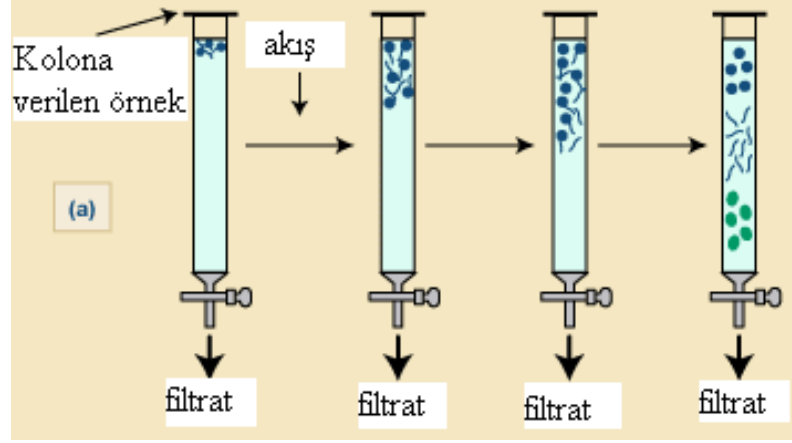


İyon-değişirme kromatografisi;

yöntemlerini kullanarak gerçekleştirmiştir.

Recio and Visser (1999b), enzim ile muamele sonrası oluşan biyoaktif peptitleri iyon değişiriciden geçirmişler; laktoferrin ve α_{s2} -kazein' den katyonik antimikrobiyel peptitler, β -kazein' den ise negatif yüklü fosfopeptitleri ayırmayı başarmışlardır. Bu yöntemin avantajı kullanılan protein çeşidinin önemli olmaması ve enzimin geri kazanılabilmesidir. Bu yöntem düşük moleküler ağırlıklı bu peptitlerin zenginleştirilmesinde yeni teknolojilerin kullanımı açısından önemlidir (Korhonen

and Pihlanto, 2006). Şekil 2.8.' de iyon değiştirme kromatografisinin şematik olarak gösterimi bulunmaktadır.



Şekil 2.8. İyon değiştirme kromatografisinin şematik olarak gösterimi
(Seidman and Mowery, 2006)

2.6. Biyoaktif Peptitlerin Teknolojik Olarak nemi

Biyoaktif peptitler sadece fonksiyonel açıdan değil teknolojik açıdan da önemlidirler. Peyniraltı suyu proteinlerinin enzimatik hidrolizi ile elde edilen peptitler, gıdalarda birtakım teknolojik özelliklere de katkıda bulunmaktadır (Gauthier et al., 1993). Doğal proteinlerle karşılaştırdıklarında peptitler genelde;

- znrlğ arttırır,
- vizkoziteyi düşürür,
- köpük oluşumu, jelleşme, emulsiyon oluşturma özelliklerinde önemli değişikliklere neden olmaktadır.

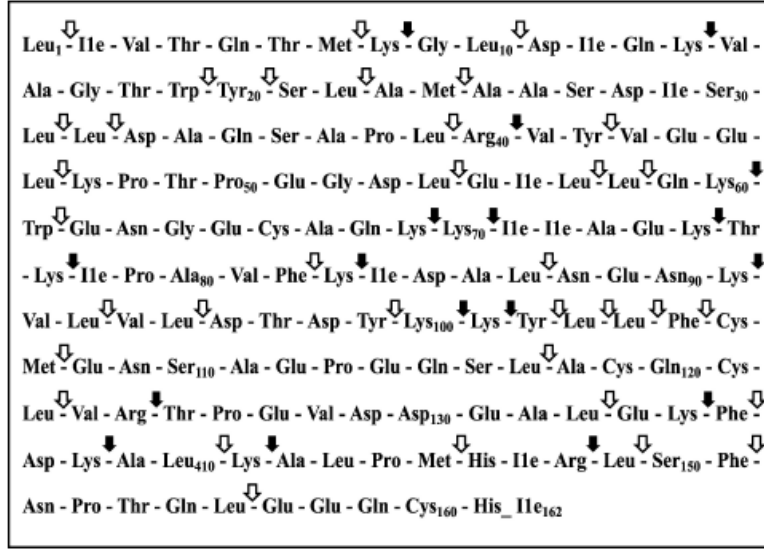
Teknolojik özelliklerde meydana gelen bu değişiklikler, düşük moleküler ağırlıklarına, hidrofobik grupların ortaya çıkışına ve iyonik grupların artışına bağlıdır.

Ayrıca hidrolize olmuş proteinlerin gösterdikleri özellikler birtakım parametrelere bağlıdır. Bunlar;

- protein substratının saflığı,
- protein substratına uygulanan ön işlemler,
- proteolizde kullanılan enzim,
- pH, sıcaklık, iyon gücü, aktivatör gibi hidroliz sırasındaki fizikokimyasal koşullar,
- hidroliz derecesi,
- enzimlerin inaktivasyonunda kullanılan teknik (örneğin; sıcaklık uygulaması, asitlik uygulaması, membran filtrasyon uygulamaları gibi),
- hidroliz sonrası uygulamalar (serbest amino asitler için adsorbentler, membran seperasyon gibi) dır.

Araştırmacılar, koyulaştırılmış süt bazlı bebek mamalarında depolama süresince emulsiyon yapının korunmasını (6 ay 25° C), sağlamak amacıyla ilave edilen kalsiyum karragenan (13.3 mg/100 mL) yerine peyniraltı suyu proteinlerinin tripsin ile hidrolize edilmesi ile elde edilen peptitleri kullanmışlardır (5mg/100mL). Özellikle negatif yüklü β -Lg (f41-60 ve f61-69+149-162)' nin yüksek emulsiyon kapasitesinin bulunduğunu belirtmişlerdir. Negatif yüklü peptitler yağ globüllerinin içine yapışarak itici bir elektrostatik ortam yaratmakta ve kolloid sistemin yapısının bozularak topaklanması önlenmektedir şeklinde hipotez öne sürmüşlerdir (Gauthier and Pouliot, 2003).

β -Lg' den elde edilen triptik peptitler mayonez benzeri ürünlerde 6 ay oda sıcaklığında depolamada yapının bozulmadan kalmasını sağlarken, kimotripsin ile elde edilen peptitler aynı özelliği gösterememişlerdir (Gauthier and Pouliot, 2003). Şekil 2.9.' da β -Lg' nin teorik olarak tripsin ve kimotripsin ile kesim noktalarını gösteren amino asit dizilimi görülmektedir.



Şekil 2.9. β -Lg.'nin teorik olarak tripsin (■) ve kimotripsin (□) ile kesim noktalarını gösteren amino asit dizilimi (Gauthier and Pouliot, 2003)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırma materyali olarak Isparta ve Burdur yöresindeki farklı üreticilerden ticari kültür kullanılmadan geleneksel yöntemlerle evde yapılmış 15 adet yoğurt örneği toplanmış ve yoğurt örnekleri; Y1' den Y15' e kadar kodlanmıştır. Yoğurt örnekleri 4 hafta süresince 4° C' de muhafaza edilmiş ve 1. gün, 1. 2. 3. ve 4. haftalarda analizleri yapılmıştır.

Ticari kültürle üretimi gerçekleştirilen yoğurtlar, Süleyman Demirel Üniversitesi Ünsüt İşletmesi' nden üretimlerinin 1. günlerinde temin edilmiştir. Ünsüt işletmesinde yoğurt üretimi 3.2.1.'de belirtildiği şekilde yapılmaktadır. Deneme 3 tekerrürlü yapılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Yoğurt üretimi

Çiğ süt gerekli ön işlemler yapıldıktan sonra (asitlik kontrolü, mastitis kontrolü, antibiyotik varlığının kontrolü, koruyucu madde varlığı kontrolü) 90° C' de 10 dakika süresince tutulmakta ve % 16 kurumadde oranına kadar suyu evapore edilmektedir. Koyulaştırılmış süt 44-45°C' ye soğutulduktan sonra ticari yoğurt kültürü (Chr. Hansen, YC 350) ile % 2 oranında aşılansaktadır. Starter kültür ile aşılansan süt, 44° C' de 4.6 pH değerine ulaşınca kadar 3-4 saat inkübasyona bırakılmakta, soğutma işleminden sonra depolanmaktadır.

3.2.2. Fiziko-kimyasal analizler

3.2.2.1. Toplam kurumadde tayini

Yoğurt örneklerinde toplam kurumadde tayini gravimetrik yöntemle TSE TS 1330' a göre yapılmıştır. Kurutma kapları 103±2°C' ye ayarlanmış etüve konarak, sabit ağırlığa gelmesi sağlanmış ve desikatörde soğutulduktan sonra daraları belirlenmiştir.

Homojen hale getirilen yoğurt örneğinden kurutma kabına 5 g numune tartarak örneğin kaba yayılması sağlanmıştır. Numune içeren kaplar $103\pm 2^{\circ}\text{C}$ ' ye ayarlanmış etüve konarak tartımlar arasındaki fark 0.5 mg' dan az oluncaya kadar kurutulmuştur. Desikatörde soğutulduktan sonra tartımı yapılmıştır. Deney paralel yürütülmüş ve hesaplamada paralellerin ortalaması alınarak yüzde kurumadde miktarı aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır (Anonim, 1999a).

$$\% \text{ Kurumadde} = \frac{m_1 - m}{m_2 - m} \times 100 \quad (3.1)$$

m :Kurutma kabının kütlesi g olarak,

m_1 :Kurutma kabı ve örneğin kurutma sonrası tartımı g olarak,

m_2 :Kurutma kabı ve örneğin kurutma öncesi tartımı g olarak ifade edilmiştir.

3.2.2.2. Titrasyon asitliği tayini

Yoğurt örneklerinde titrasyon asitliği tayini % laktik asit (% l.a.) cinsinden belirlenmiş ve TSE TS 1330'a göre yapılmıştır. Erlen içersine 10 g örnek tartılmış üzerine kaynatılarak 40°C 'ye kadar soğutulmuş damıtık sudan 10 mL ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. 0.5 mL fenolftaleyn (Merck) belirteç çözeltisi (%96' lık etil alkolde %1' lik çözelti) eklendikten sonra 0.1 N NaOH (Merck) çözeltisi ile en az 30 saniye kalıcı pembe renk elde edilinceye kadar titre edilmiştir. Kütlece % süt asidi cinsinden asitlik aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Anonim, 1999a).

$$A = \frac{S \times f \times 0,009}{m} \times 100 \quad (3.2)$$

A : Titre edilebilir asitliği süt asidi cinsinden kütlece % olarak,

S : Titrasyonda harcanan 0.1 N NaOH çözeltisinin miktarını mL olarak,

m : Titrasyonda kullanılan örnek miktarını g olarak,

f : NaOH çözeltisinin faktörünü simgelemektedir.

3.2.2.3. pH tayini

Yoğurtların pH değerlerinin belirlenmesinde inolab WTW dijital pH metre kullanılmıştır (Dave and Shah, 1997).

3.2.2.4. Yağ tayini

Yoğurt örneklerinin yağ tayinleri TS 8189'a göre Gerber yöntemiyle yapılmıştır. Homojen hale getirilmiş yoğurt örnekleri 1:1 oranında damıtık su ile sulandırılmıştır. Sırasıyla bütirometrelerin içine 10 mL H₂SO₄ (Merck) sonra 20°C' ye ayarlanmış 11 mL sulandırılmış yoğurt ve son olarak da 1 mL amil alkol ilave edilmiştir. Gerekliyse damıtık su ile seviye tamamlaması yapılmıştır. Bütirometrelerin tıkaçları kapatıldıktan sonra çalkalanıp alt üst edilmiş ve Gerber santrifüjüne yerleştirilmiştir. 5 dk. süreyle örnekler santrifüj edilmiş ve süre sonunda skaladaki değer okunarak, 2 ile çarpılmış ve değerler % yağ miktarı olarak ifade edilmiştir (Anonim, 1990a).

Kurumaddede % yağ miktarı ise aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Kurumaddede \% yağ} = \frac{\% \text{ Yağ} \times 100}{\% \text{ KM}} \quad (3.3)$$

3.2.2.5. Protein miktarı tayini

3.2.2.5.1. Kjeldahl yöntemi ile protein tayini

Yoğurt örneklerinin protein miktarları Kjeldahl yöntemiyle tespit edilmiştir (Anonim, 1990b). Yakma tüpü içersine 3 g homojen hale getirilmiş yoğurt örneği tartılmıştır. Her tüpün içersine 2 adet Kjeldahl tableti (Merck) ve 25 mL H₂SO₄ ilave edilmiştir. Tüpler yakma ünitesine yerleştirilmiş ve kademeli olarak sıcaklık yükseltilmiştir. Yakma işlemi bittikten sonra destilasyon işlemine geçilmiş 50 mL borik asit (Merck) (%4' lük) içersine destilat toplanmıştır. Toplanan destilat 0.1 N HCl (Merck) ile gri-

leylek renk elde edilinceye kadar titre edilmiş ve % azot değeri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\%Azot = \frac{(S - S_{\text{tanık}}) \times F \times 0.0014}{\text{Örnek miktarı (g)}} \times 100 \quad (3.4)$$

Burada;

S=Titrasyonda harcanan 0.1 N HCl miktarını (mL),

F=HCl çözeltisinin faktörünü simgelemektedir.

Bulunan değer 6.38 faktörü ile çarpılarak yoğurt örneklerinin protein miktarları belirlenmiştir.

3.2.2.5.2. Lowry yöntemi ile protein tayini

Liyofilize yoğurt serumlarında protein tayini Lowry yöntemi ile yapılmıştır (Lowry, 1951).

Kullanılacak ayraç ve gereçlerin hazırlanması:

Çözelti – 1: Bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Merck) çözeltisi, %1

Çözelti – 2. Na-K-tartarat (Merck) çözeltisi, %1

Çözelti –3: Sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisi, %2. Bu çözelti, sodyum karbonatın, 0,1 M NaOH çözeltisinde çözündürülmesiyle hazırlanmıştır. (Merck)

Çözelti – 4: Folin – Ciocalteu ayraç. (Merck)

Analizin yapılacağı gün Çözelti – 1 ve Çözelti – 2, eşit hacimlerde (1:1) karıştırılmıştır. Bu karışımdan 2 hacim alınıp üzerine 98 hacim Çözelti – 3 eklenmiştir. Böylece Çözelti – A hazırlanmıştır. Çözelti – 4 ise damıtık su ile 1:1 oranında seyreltilerek Çözelti – B hazırlanmıştır.

Liyofilize yoğurt serumları 0,05/4mL oranında 0.1 M tuzlu fosfat tampon çözeltisi içerisinde çözündürülmüştür. Bundan 0.2 mL alınmış ve üzerine 2.1 mL Çözelti – A

eklenmiş ve 10 dk. kendi haline bırakılmıştır. Bu süre sonunda 0.2 mL Çözelti – B eklenip karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 1 saat süreyle bekletilmiş ve süre sonunda 750 nm’ de şahide karşı absorpsiyon değerleri Shimadzu UV-1601 model spektrofotometrede okunmuştur. Şahit için örnek yerine 0.2 mL tuzlu fosfat tampon çözeltisi ilave edilmiş, diğer işlem basamakları aynı tutulmuştur. Standart kurvenin hazırlanması için sığır serum albumini kullanılmıştır. 50-750 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda sığır serum albumini içeren standart çözeltiler kullanılarak hazırlanmıştır.

3.2.3. Mikrobiyolojik analizler

Yoğurt örneklerinden 10’ ar gram steril şartlarda tartılmış ve 90 mL ¼ kuvvetinde Ringer çözeltisi (Merck) ilave edilerek homojen hale getirilmiş ve uygun seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Yoğurt örneğinden doğrudan 0.1 mL veya 10⁻¹ dilüsyonundan 0.1 mL alınarak drigalski spatülü kullanılarak besiyerlerine yayılmıştır (Anonymous, 1992).

Koliform grubu bakterilerin analizi için Eosin Metilen Blue Agar’ a (EMB) (Merck) ekim yapılmış, 37°C’ de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Maya ve küf sayımı için pH’ sı % 10’ luk laktik asit (Merck) ile 3.5’ e ayarlanmış Potato Dekstrose Agar’ a (PDA) (Merck) ekim yapılmış, 25°C’ de 4 gün inkübasyona bırakılmıştır.

Toplam mezofil aerob bakteri (TMAB) sayımı için Plate Count Skim Milk Agar’ a (PCSMA) ekim yapılmış, 35°C’ de 24-48 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır.

Laktik asit bakterilerinin sayımı, M17 (Merck) ve MRS Agar (Merck) besiyerlerinde yapılmış ve plaklar 37°C’ de 48-72 saat inkübe edilmiştir (de Man et al., 1960; Terzaphi and Sandine, 1975; Özçelik, 1992; Anonim, 1999b; Lourens-Hattingh and Viljoen, 2001; Karahan vd., 2002; Çağlayanlar et al., 2009).

3.2.4. Yoğurtların proteoliz düzeyinin belirlenmesi

Yoğurt örneklerinin proteoliz düzeyinin belirlenmesi için *o*-phthaldialdehyde (OPA) metodu kullanılmıştır. Yoğurt örneği 15.000 x g' de 4° C' de 30 dk. süresince Sigma 3K30 model santrifüj kullanılarak santrifüj edilmiş ve süpernatantı ayrılmıştır. 3 mL süpernatant üzerine 3 mL %1' lik (ağırlık/hacim) trikloroasetikasit (TCA) ilave edilerek karışım 1 dakika süresince vortekslenmiştir. Whatman 1 filtre kağıdından vakum ile süzöldükten sonra 150 µL filtrat 3 mL OPA çözeltisi üzerine ilave edilmiştir. 2 dk. sonra, oda sıcaklığında (20°C) 340 nm' de çözeltinin absorbansı spektrofotometrede ölçülmüştür. % 10' luk skim milk kontrol olarak kullanılmıştır. Proteoliz derecesi işlem görmemiş süt ile fermente süt arasındaki serbest amino grubu artışı olarak belirlenmiştir (Nielsen et al., 2001; Donkor et al., 2007a).

3.2.5. Aroma maddelerinin belirlenmesi

Yoğurtların aroma bileşenleri gaz kromatografisi ile analiz edilmiştir (Perkin Elmer Otosistem x L). Sistem 50 m CP WAX 52 kapiler kolon içeren alev iyonlaştırıcı dedektör (Perkin Elmer)' den oluşmaktadır. Kromatograf otomatik bir head-space (Model: Turbo Matrix 16, Perkin Elmer) ile bağlantılıdır (Sakata et al., 2004).

Gaz kromatografisinde CP WAX (50 m X 0.32 i.d) kolon kullanılmıştır. Enjektör sıcaklığı 180°C, dedektör sıcaklığı 200°C' dir. Fırın sıcaklık programı ise 35°C' de 2 dk. bekledikten sonra 240°C sıcaklığa ulaşılmış ve 20 dk. beklenmiştir. Taşıyıcı gaz olarak helyum (He/ 25 psi) kullanılmıştır.

Head-space şartları:

Head-space şartları; iğne 90°C, transfer çizgisi, 120°C, vial fırın sıcaklığı: 85°C, termostat zamanı 5 dk, basınç altında tutma zamanı 0.5 dk, enjeksiyon zamanı 0.08 dk, geri çekme zamanı 0.5 dk, head basıncı, 27 psi' dir.

3.2.6. Biyoaktif peptitlerin eldesi

3.2.6.1. Yoğurt örneklerinin hazırlanması

Yoğurt örneklerinin hazırlanması Donkor et al. (2007a)'e göre yapılmıştır. Yoğurt örnekleri 15.000 x g' de 4° C' de 30 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant 0.45 µm çaplı membran filtreden (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Germany) geçirilmiş ve VirTis benchtop-SLC model liyofilizatör kullanılarak liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen örnekler HPLC analizine geçmeden önce antimikrobiyel aktivite ve antioksidan aktivite değerleri belirlenmiştir. Örnekler -25 °C' de depolanmıştır.

3.2.6.2. Antimikrobiyel aktivite tayini

Antimikrobiyel aktivitenin belirlenmesi amacıyla, Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilen; *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* ve *Yersinia enterocolitica* kullanılmıştır.

Liyofilize yoğurt serumları ve bu yoğurt serumlarından elde edilen peptit fraksiyonlarının antimikrobiyel aktivitesini belirlemek amacıyla kuyucuk difüzyon testi kullanılmıştır (Daoud et al., 2005).

Mikroorganizmalar -25°C' de gliserol içeren Nutrient Broth' da muhafaza edilmişlerdir. Antimikrobiyel aktivitenin belirlenmesi amacıyla kültürler iki defa Mueller-Hinton besiyerinde geliştirilmişlerdir. Aerobik bir mikroorganizma olan *M. luteus* 30°C' de 60 rpm' de çalkalamalı inkübatörde diğer mikroorganizmalar ise 37° C' de geliştirilmiştir. Bakteri hücreleri 2 kere 10 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6.5) ile yıkanmış 0.5 McFarland bulanıklığında 10 mL besiyerine ilave edilmiş ve petri kutusuna dökülmüştür. Bu besiyeri *M. luteus* için % 1 agar, 21 g/L oranında Mueller-Hinton diğer mikroorganizmalar için ise % 1 agaroz, % 0.02 Triton x 100, %0.02 sığır serum albumin içermektedir.

M. luteus için tek tabaka besiyeri, diğer mikroorganizmalar için ise iki tabaka besiyeri kullanılmıştır.

Liyofilize yoğurt serumları (25 mg/mL) ve liyofilize peptit fraksiyonları (10 mg/mL) 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6.5) içerisinde çözülmüş ve 20 µL - 100 µL kuyucuklara ilave edilmiştir. *M. luteus* 4°C’ de, diğer mikroorganizmalar 30°C’ de 3 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 10 mL % 1 agar, 42 g/L oranında Mueller-Hinton üst tabaka olarak ilave edilmiştir. Petriler 37°C’ de 24 saat inkübe edilmiştir. *M. luteus* için ise üst tabaka dökülmemiş ve 30°C’ de 24 saat süresince inkübe edilmiştir.

Antimikrobiyel aktivite oluşan zonların ölçümü ile belirlenmiştir. Kloramfenikol (100 µg/mL) pozitif kontrol, sodyum fosfat tamponu ise negatif kontrol olarak değerlendirilmiştir.

3.2.6.3. Antioksidan aktivite tayini

3.2.6.3.1. ABTS^{•+} radikal giderme yöntemi ile antioksidan aktivite tayini

2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) (ABTS) saf su içerisinde çözülmektedir. 2.45 mM potasyum persülfat içeren 7 mM’lık ABTS çözeltisi oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 12-16 saat süresince bekletilerek ABTS^{•+} radikal çözeltisinin oluşması sağlanmıştır. Hazırlanan bu radikal çözeltisi 2-3 gün stabil kalabilmektedir. Bu çözelti analiz esnasında 734 nm’ de 30°C’ de 0.7 (±0.02) absorbans verecek şekilde 0.1 M tuzlu fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) ile seyreltilmiştir. Mikro küvet içersine seyreltilmiş ABTS^{•+} radikal çözeltisinden 1 mL alınmış üzerine 10 µL örnek veya standart eklenerek kronometre çalıştırılmış ve toplam 6 dakika boyunca 30°C’ de 1’er dakika ara ile absorbans değerleri okunarak kaydedilmiştir. 3 farklı örnek hacminde çalışılarak örnek miktarına bağlı inhibisyon oranları belirlenmiştir. Yüzde inhibisyon değerleri örnek miktarlarına karşı grafiğe

aktarıp linear regresyon analizi uygulanmak suretiyle, örneğe ilişkin eğriye ve bu eğriyi tanımlayan eşitliğe ulaşılmıştır.

Absorbanstaki azalma troloks eşdeğeri (TEAC) olarak hesaplanmıştır. Troloks standartları, son konsantrasyonları 0,625-10µM arasında değişen miktarlarda hazırlanmıştır (Re et al., 1999; Cemeroğlu, 2007). Analiz her örnek için 3 paralel olacak şekilde yapılmıştır. İnhibisyon yüzdesi ve TEAC değeri aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_{734} \text{ kontrol} - A_{734} \text{ örnek}) / A_{734} \text{ kontrol} \times 100 \quad (3.5)$$

$$\text{TEAC (mM troloks/ g örnek)} = (\text{Örneğe ait inhibisyon eğrisinin eğimi} / \text{Troloks standart eğrisinin eğimi}) \times \text{Seyreltme Faktörü} \quad (3.6)$$

3.2.6.3.2. DPPH serbest radikalleri giderme yöntemi ile antioksidan aktivite tayini

Serbest radikalleri tutma prensibine bağlı olarak belirlenen antiradikal aktivitesi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Peptit fraksiyonları % 1 oranında Triton X-100 içeren 0.1 M tuzlu fosfat tampon çözeltisi (pH 7.0) içersinde çözülmüştür. DPPH, 100 µM oranında metanol içersinde hazırlanmıştır. 1.5 mL peptit çözeltisi, 1.5 mL DPPH çözeltisi ile karıştırılarak karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 30 dakika süresince bekletilmiş ve süre sonunda çözeltinin 517 nm' deki absorbansı kaydedilmiştir. Kontrol olarak tuzlu fosfat tampon çözeltisi kullanılmış ve aynı işlemler tekrarlanmıştır. % Antiradikal aktivitesi farklı iki konsantrasyonda aşağıda verilen formülden yararlanarak belirlenmiştir:

$$\% \text{ Antiradikal aktivitesi} = (\text{Kontrol absorbansı} - \text{Örnek absorbansı} / \text{Kontrol absorbansı}) \times 100 \quad (3.7)$$

Peptit konsantrasyonlarının % 50 inhibisyonunu sağlayan miktarı (IC₅₀) ise, peptit konsantrasyonlarına karşı antiradikal aktivite (%) değerlerinin yerleştirilmesi ile elde edilen grafik kullanılarak hesaplanmıştır ve sonuçlar IC₅₀ = mg/ml olarak verilmiştir. (Aluko and Monu, 2003, Farzamirad and Aluko, 2008).

3.2.7. HPLC metodu ile peptit profilinin belirlenmesi

Yoğurtlardaki suda ozünen peptitlerin ve skim milk' in analizinde ters faz Shimadzu LC-20 AT serisi HPLC, Zorbax 300 SB-C8 monomerik kolon (250 x 9.4 mm i.d., 6.5  m partikül büyüklüğü, 300 A  por apı, Agilent, Waldbronn, Almanya) ve Zorbax 300 SB-C3 guard kolon (9.4 x 15 mm i.d., 7.0  m partikül büyüklüğü, 300 A  por apı, Agilent, Waldbronn, Almanya) ile birlikte kullanılmıştır. Liyofilize edilmiş yoğurt serumları 2.5g/5mL oranında, % 0.1 trifluoroasetik asit (TFA) (% 0.1 TFA deiyonize su) içersinde, 14.000 x g' de 30 dk. süresince santrifüj edilmiş ve 0.45  m çaplı membran filtreden (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Germany) geçirilerek HPLC kolonuna 750  L enjekte edilmiştir. 10 dk. aralıkla elde edilen fraksiyonlar Shimadzu FRC-10A model fraksiyon kolektör kullanılarak yaklaşık 10mg/mL oranında örnek elde edilecek miktarda toplanmış ve liyofilize edilmiştir (Donkor et al., 2007a).

HPLC analizinde kullanılacak mobil faz ozelteleri:

(A): %0,1 (v/v) trifluoroasetik asit (TFA, yüksek saflıkta) deiyonize suda

(B):%0,1(v/v) TFA (%90 v/v Asetonitril deiyonize suda)

Örneklere uygulanan gradient programı izelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Örneklere uygulanan gradient programı

Zaman	Mobil faz	Değer
10	B	0
20	B	10
30	B	20
40	B	30
50	B	50
60	B	70
70	B	100
80	B	0

Peptitlerin analizinde kullanılan HPLC cihazının özellikleri ve kromatografi koşulları Çizelge 3.2.' de verilmiştir.

Çizelge 3.2. HPLC cihazının özellikleri ve kromatografi koşulları

HPLC	SHIMADZU, LC-20 AT (Kyoto-JAPAN)
Kolon fırını	Shimadzu, CTO-10AS, Sıcaklık 20° C
Kolon	Zorbax 300 SB-C8 monomerik kolon 250 x 9.4 mm i.d., 6.5 µm partikül büyüklüğü, 300 Å por çapı, Agilent, Waldbronn, Almanya
Guard kolon	Zorbax 300 SB-C3 guard kolon 9.4 x 15 mm i.d., 7.0 µm partikül büyüklüğü, 300 Å por çapı, Agilent, Waldbronn, Almanya
Pompa	LC 20 AT dördü gradient pompa
Degazör	Shimadzu, DGA-20A ₅
Dedektör	214 nm, PDA (Photo Diode Array) SPD-20A, pik saflığının kontrol edilmesi için 190-340 nm arasında spektrum taramalı, bant genişliği= 1,2 nm
Sistem kontrol	Shimadzu, CBM-20A
Mobil Faz	Linear gradient; %100'den %0' ya %0.1 TFA (suda); %0.1 TFA (%90 asetonitril suda)
Akış Hızı	3 mL/dk
Enjeksiyon	750-1000 µL
Basınç	100-110 psi
Analiz süresi	80 dk

3.2.8. İstatistiksel değerlendirme

Denemede üzerinde durulan özellikler bakımından elde edilen gözlemler faktöriyel düzende tekrarlanan ölçümlü varyans analizi tekniği ile SPSS 17.0 programı kullanılarak analiz edilmiştir (Repeated measurement ANOVA). Denemede yoğurt tipi faktörünün geleneksel ve ticari olmak üzere 2 seviyesi, zaman faktörünün de 1. gün, 1. hafta, 2. hafta, 3. hafta ve 4. hafta olmak üzere 5 seviyesi mevcuttur. Tekrarlanan ölçümler zaman faktörünün seviyelerinde gerçekleştirilmiştir. Grup ortalamaları arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Tukey testi kullanılmıştır. Her bir denemede elde edilen rakamlarda özellikler arasındaki doğrusal ilişkinin varlığı korelasyon katsayıları hesaplanarak irdelenmiştir. Ayrıca denemede kimyasal özellikler bakımından elde edilen değerler her bir zaman faktörü için ayrı bir şekilde kümeleme (Cluster) analizine tabi tutularak her bir yoğurt örneğinin adım adım birbirine en çok benzeyenden başlayarak kümelemesi dendrogram yardımıyla gösterilmiştir. Bu analiz neticesinde elde edilen dendrogram yardımıyla (ve mikrobiyolojik kriterler göz önüne alınarak) birbirine en az benzeyen 4 adet yoğurt örneği seçilmiş HPLC' de ileri fraksiyonlama analizlerine bu yoğurt örnekleri kullanılarak devam edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

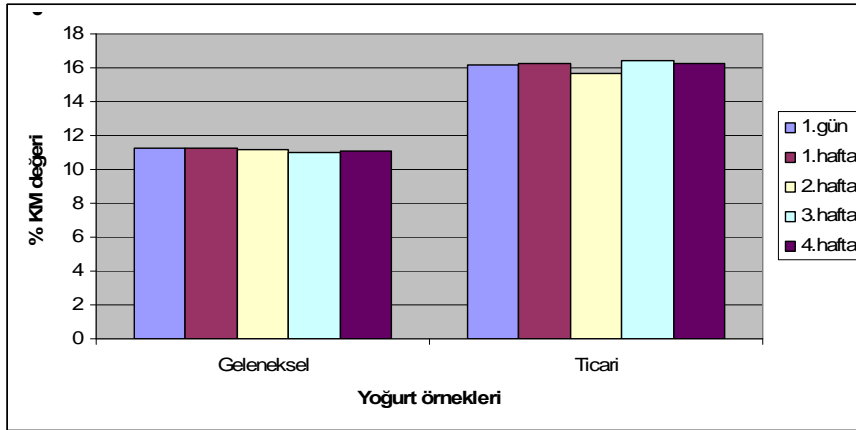
4.1. Fiziko-kimyasal Analizler

Bölüm 3.1.' de gösterildiği şekilde kodlanan ve depolama işlemi gerçekleştirilen yoğurt örneklerinin fiziko-kimyasal analizleri 3.2.2.'de belirtildiği şekilde yapılmıştır.

4.1.1. Yoğurtların kurumadde değerleri

Yoğurdun kalitesi, kıvamı, bileşimi, dayanma süresi ve besin değeri üzerine etkili olan en önemli faktörlerin başında kurumadde gelmektedir. İyi kalitede bir yoğurdun, toplam kurumaddesinin %15.5–16.0 olduğu bildirilmiştir (Yaygın, 1999).

Yoğurt örneklerinin % kurumadde miktarları, en yüksek ve en düşük değerleri Çizelge 4.1.' de, ortalama değerlerine göre geleneksel ve ticari yoğurt örneklerinin karşılaştırmaları ise Şekil 4.1.' de sunulmuştur.



Şekil 4.1. Yoğurt örneklerinin % kurumadde değerlerinin karşılaştırılması

Şekil 4.1.'de görüldüğü gibi, ticari kültürle üretilen yoğurt örneklerinin kurumadde değerleri yüksek, geleneksel yöntemle üretilen yoğurt örneklerinin kurumadde değerleri ise daha düşüktür. Bu farklılık geleneksel ev tipi yoğurtlarda kaynatma dışında herhangi bir kurumadde arttırımının yapılmamasından ve süt yağının belli bir kısmının alınmasından kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.1. Yoğurtların kurumadde içerikleri

Yoğurt	1. gün	1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta
Y1	12.23±0.00	12.20±0.35	11.77±0.07	11.75±0.10	11.72±0.21
Y2	9.44±0.02	9.60±0.09	9.74±0.03	9.05±0.31	8.91±0.34
Y3	10.77±0.02	10.40±0.02	10.04±0.03	10.00±0.17	10.28±0.02
Y4	10.73±0.06	10.41±0.05	9.64±0.02	9.67±0.03	9.82±0.03
Y5	12.52±0.03	12.63±0.13	12.81±0.07	11.03±0.12	12.89±0.07
Y6	11.65±0.46	11.54±0.09	11.42±0.07	10.97±0.07	11.46±0.22
Y7	11.28±0.04	11.18±0.05	11.66±0.97	10.63±0.07	11.22±0.15
Y8	10.51±0.06	10.42±0.03	10.12±0.33	10.46±0.14	10.25±0.07
Y9	12.44±0.02	12.35±0.01	12.04±0.57	12.33±0.01	11.92±0.02
Y10	11.35±0.08	11.12±0.03	11.07±0.03	11.04±0.13	11.02±0.03
Y11	11.22±0.44	10.89±0.15	11.25±0.22	11.28±0.36	11.42±0.11
Y12	10.78±0.09	11.79±0.05	11.35±0.15	11.77±0.10	11.09±0.07
Y13	11.28±0.04	11.60±0.26	11.43±0.18	11.29±0.04	11.22±0.06
Y14	11.66±0.15	11.70±0.00	11.92±0.06	11.75±0.16	11.80±0.00
Y15	11.49±0.08	11.42±0.04	11.42±0.13	11.41±0.32	11.28±0.04
TY1	16.53±0.06	16.53±0.05	15.54±0.08	16.20±0.00	16.54±0.02
TY2	16.25±0.05	16.54±0.00	15.91±0.04	16.39±0.01	16.87±0.00
TY3	15.60±0.06	15.61±0.41	15.51±0.10	16.66±0.27	15.32±0.04
En yüksek	16.53±0.06	16.54±0.00	15.91±0.04	16.66±0.27	16.87±0.00
En düşük	9.44±0.02	9.60±0.09	9.64±0.02	9.05±0.31	8.91±0.34

Yapılan varyans analizi sonucunda, geleneksel ve ticari yoğurtların % kurumadde değerlerinin birbirlerinden önemli derecede farklı olduğu görülmüştür ($p<0.01$). Yoğurtların 4 haftalık depolama süresince % kurumadde değerlerindeki değişim ise istatistik olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Varyans analizi sonuçları ve Tukey çoklu karşılaştırma testinin sonuçları Çizelge 4.2.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Kurumadde miktarlarına ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları

Yoğurt Örnekleri	% Kurumadde değerleri				
	1.GÜN	1.HAFTA	2.HAFTA	3.HAFTA	4.HAFTA
Geleneksel	11.290±0.198aB*	11.283±0.207aB	11.179±0.221aB	10.963±0.213aB	11.087±0.243aB
Ticari	16.130±0.442aA	16.234±0.463aA	15.659±0.494bA	16.417±0.477aA	16.250±0.544aA

*Yoğurt tipi arasındaki farklılık büyük harfle, zamanlar arasındaki farklılık küçük harfle gösterilmiştir. Aynı harfle işaretlenmiş olan ortalamalar istatistik olarak birbiri ile aynıdır ($p>0.05$).

Hisoğlu (2007), yaptığı çalışmada Ağrı ilindeki bakkal ve marketlerde satışa sunulan, evlerde, mandıralarda ve modern işletmelerde üretilen yoğurtların mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesini araştırmıştır. Bu çalışmada evlerde üretilen yoğurt numunelerinde kurumadde miktarlarının %11.09-19.10 arasında, mandıralarda üretilenlerde %10.37-19.10 arasında ve modern işletmelerde üretilen yoğurt numunelerinde ise kurumadde miktarlarının %12.90-20.10 arasında değiştiğini tespit etmiştir.

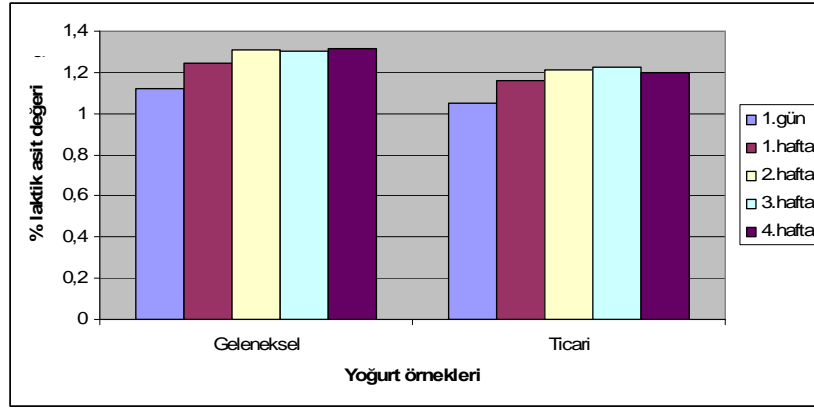
Herdem (2006), farklı yörelerden toplanan ve geleneksel yöntemle üretilen 50 adet yoğurt numunesinin kimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşal özelliklerinin belirlediği çalışmada yoğurt örneklerinin %42' sinin kurumadde değerlerinin standarda uymadığını, sadece %10' unun "iyi yoğurt" tanımlamasına dahil edilebileceğini belirtmiştir. Farklı illerinden toplanan yoğurt örneklerinin ortalama kurumadde değerleri %9.25-15.07 arasında değişmiştir.

Geleneksel yoğurtların kurumadde değerleri Türkoğlu vd. (2003) tarafından elde edilen değerlerle benzerlik göstermekte iken (%9.30-13.03), Öz (1990) tarafından elde edilen değerlerle arasında farklılıklar bulunmaktadır (% 10.47-18.83).

4.1.2. Yoğurtların titrasyon asitlik değerleri

Titrasyon asitlik değeri, yoğurdun tat ve aroması ile ilgili bir kalite kriteridir. İyi bir yoğurt aroması için bu değerin belirli bir düzeyde olması gerekmektedir. Ayrıca yoğurdun tüketilebilme özelliğini kaybetmeden saklanabileceği sürenin belirlenmesinde de son derece etkili bir faktördür (Herdem, 2006). Kokuşmaya ve çürümeye neden olan bakterilerin gelişmesini engelleyerek yoğurda dayanıklılık kazandırmaktadır. Ancak asitliğin aşırı gelişmesi yoğurda özgü aromanın maskelenmesine neden olabilmektedir (Türkoğlu vd., 2003).

Yoğurt örneklerinin titrasyon asitlik (% l.a. cinsinden) miktarları, en yüksek ve en düşük değerleri Çizelge 4.3.'de, ortalama değerlerine göre geleneksel ve ticari yoğurt örneklerinin karşılaştırmaları ise Şekil 4.2.' de sunulmuştur.



Şekil 4.2. Yoğurt örneklerinin titrasyon asitliği değerlerinin karşılaştırılması

Yapılan varyans analizi sonucunda, geleneksel ve ticari yoğurtların birbirlerinden istatistik olarak farklı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Yoğurtların 4 haftalık depolama süresince titrasyon asitlik değerlerinde ilk haftada meydana gelen değişim önemli bulunurken ($p<0.01$), depolama süresince değişim olmamıştır. Varyans analizi sonuçları ve Tukey çoklu karşılaştırma testinin sonuçları Çizelge 4.4.' de sunulmuştur.

Çizelge 4.3. Yoğurt örneklerinin titrasyon asitliği değerleri (% laktik asit)

Yoğurt	1. gün	1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta
Y1	1.36±0.01	1.61±0.00	1.65±0.01	1.63±0.02	1.64±0.02
Y2	0.98±0.02	1.26±0.00	1.28±0.02	1.30±0.00	1.24±0.02
Y3	1.04±0.00	1.39±0.00	1.50±0.00	1.49±0.00	1.45±0.01
Y4	1.26±0.00	1.46±0.01	1.54±0.00	1.59±0.01	1.60±0.00
Y5	1.41±0.01	1.92±0.01	1.85±0.00	1.89±0.02	2.04±0.00
Y6	1.20±0.00	1.16±0.00	1.23±0.01	1.21±0.00	1.31±0.00
Y7	1.20±0.00	1.22±0.02	1.23±0.01	1.23±0.00	1.31±0.01
Y8	1.31±0.00	1.35±0.00	1.34±0.01	1.36±0.01	1.42±0.01
Y9	0.87±0.01	0.90±0.01	0.92±0.02	0.91±0.02	0.93±0.01
Y10	0.91±0.01	0.90±0.02	1.13±0.00	1.02±0.00	1.05±0.02
Y11	0.91±0.02	0.90±0.00	1.22±0.01	1.04±0.01	1.07±0.00
Y12	0.84±0.03	0.90±0.01	0.93±0.01	0.92±0.02	0.94±0.01
Y13	1.41±0.00	1.45±0.00	1.49±0.02	1.55±0.01	1.51±0.01
Y14	1.05±0.00	1.08±0.01	1.17±0.01	1.22±0.01	1.13±0.02
Y15	1.08±0.01	1.13±0.03	1.18±0.01	1.18±0.01	1.10±0.01
TY1	1.05±0.01	1.10±0.02	1.20±0.02	1.19±0.00	1.17±0.03
TY2	1.10±0.00	1.26±0.00	1.23±0.00	1.31±0.01	1.28±0.00
TY3	1.01±0.02	1.13±0.01	1.20±0.00	1.17±0.01	1.14±0.01
En yüksek	1.41±0.01	1.92±0.01	1.85±0.00	1.89±0.02	2.04±0.00
En düşük	0.84±0.03	0.90±0.00	0.92±0.02	0.91±0.02	0.93±0.01

Çizelge 4.4. Titrasyon asitliği değerlerine ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları

Yoğurt Önekleri	Titrasyon asitliği (% laktik asit)				
	1.GÜN	1.HAFTA	2.HAFTA	3.HAFTA	4.HAFTA
Geleneksel	1.122±0.048bA*	1.242±0.072aA	1.311±0.062aA	1.303±0.069aA	1.316±0.073aA
Ticari	1.053±0.108bA	1.163±0.161aA	1.210±0.138aA	1.223±0.153aA	1.197±0.164aA

*Yoğurt tipi arasındaki farklılık büyük harfle, zamanlar arasındaki farklılık küçük harfle gösterilmiştir. Aynı harfle işaretlenmiş olan ortalamalar istatistik olarak birbiri ile aynıdır (p>0.05).

TGK Fermente Sütler Tebliği (Anonim, 2009)'nde yoğurdun titrasyon asitlik değerinin laktik asit (l.a.) olarak ağırlıkça 0.60-1.50 olması gerektiği belirtilmiştir. Çizelge 4.3.' te görüldüğü gibi yoğurtların bir kısmı titrasyon asitlik değerleri yönünden tebliğe uygun bulunmamıştır. TSE TS 1330 Yoğurt Standardı (Anonim, 1999a)'nda ise titrasyon asitlik değerinin % 0.8-1.6 l.a. arasında olması gerektiği belirtilmektedir. Buna göre Y1 ve Y5 yoğurdu dışındaki yoğurtlar titrasyon asitlik değeri açısından standarda uygun bulunmuştur. Ticari yoğurtların % titrasyon asitlik sonuçları TGK Fermente Sütler Tebliği (Anonim, 2009) ve TSE TS 1330 Yoğurt Standardı (Anonim,1999a)' na uygun bulunmuştur.

Hisoğlu (2007), evlerde üretilen yoğurtların titrasyon asitlik değerini en az %0.67 l.a., en çok %1.81 l.a. ve ortalama %1.24 l.a. olarak, mandıralarda üretilen yoğurtların titrasyon asitlik değerini en az %0.77 l.a., en çok %1.9 l.a. ve ortalama %1.39 l.a. olarak, modern işletmelerde üretilen yoğurtların titrasyon asitlik değerini ise en az %0.70 l.a., en çok %1.84 l.a. ve ortalama %1.28 l.a. olarak tespit etmiştir.

Geleneksel yoğurtların titrasyon asitlik değerlerini Türkoğlu vd. (2003) ortalama % 1.25 ve Dayısoylu (1992) ort. % 1.26 olarak belirlemişlerdir. Sonuçlar bu çalışmadaki değerlerle benzerlik göstermekte iken Öz (1990) ve Yazıcı (1991) tarafından elde edilen değerler sırasıyla %1.44 ve %1.40 olarak tespit edilmiştir.

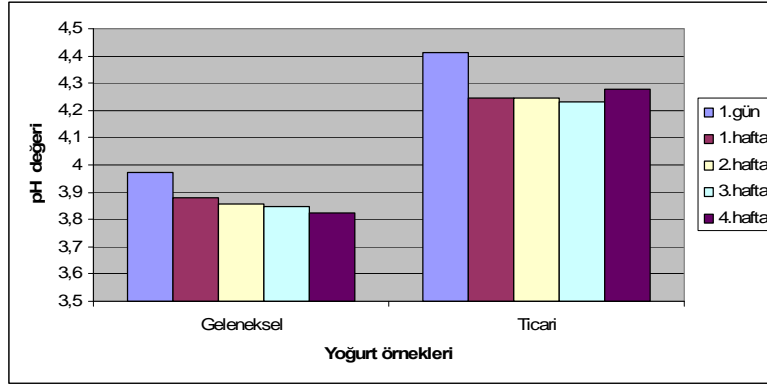
Yoğurt örneklerinin asitlik değerinin standartta istenen değerlerden daha yüksek olmasının nedeni geleneksel yoğurtlarda maya olarak bir önceki günün yoğurdunun kullanılmasıdır. Ayrıca maya miktarı, mayanın asitliği, inkübasyon sıcaklığı ve süresi, yoğurdun uygun bir şekilde soğutulmaması, inkübasyondan sonra muhafaza sıcaklığının yüksek olması asitliği etkileyen faktörlerdir.

4.1.3. Yoğurtların pH değerleri

pH ölçümü ile serbest hidrojen iyonu konsantrasyonu, titrasyon asitliği tayini ile toplam organik asit miktarı ölçülmektedir. Her iki ölçüm de yoğurt fermentasyonunda

önemlidir, çünkü yoğurt üretiminde asit oluşumu en önemli mekanizmadır (Zainoldin and Baba, 2010).

Yoğurt örneklerinin pH ölçüm sonuçları, en yüksek ve en düşük pH değerleri Çizelge 4.5.' te, ortalama değerlerine göre geleneksel ve ticari yoğurt örneklerinin karşılaştırmaları Şekil 4.3.' te sunulmuştur.



Şekil 4.3. Yoğurt örneklerinin pH değerlerinin karşılaştırılması

Yapılan varyans analizi sonucunda, geleneksel ve ticari yoğurtların pH değerlerinin birbirlerinden önemli derecede farklı olduğu görülmüştür ($p<0.01$). Ayrıca 4 haftalık depolama süresince yoğurtların pH değerlerindeki değişim de önemli bulunmuştur. ($p<0.01$). Varyans analizi sonuçları ve Tukey çoklu karşılaştırma testinin sonuçları Çizelge 4.6.' da sunulmuştur.

Yoğurt örneklerinin pH değeri açısından görülen farklılıkları titrasyon asitliği (4.1.2) bölümünde de belirtildiği gibi üretim aşamasındaki farklılıklardan ve kullanılan mayanın özelliklerinden kaynaklanmaktadır.

Geleneksel olarak üretilen yoğurtların pH değerleri Herdem (2006)' in farklı yörelerden topladığı geleneksel yolla üretilen yoğurt örneklerinin pH değerleri (3.72-4.67) ile benzerlik göstermektedir. Bu benzerlik özellikle Isparta, Konya, Mersin, Sivas ve Urfa illerinden elde ettikleri yoğurtlarda çok daha yüksektir.

Çizelge 4.5. Yoğurtların pH değerleri

Yoğurt	1. gün	1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta
Y1	3.85	3.76	3.70	3.63	3.73
Y2	3.96	3.75	3.75	3.67	3.78
Y3	3.93	3.58	3.58	3.53	3.59
Y4	3.74	3.62	3.62	3.62	3.62
Y5	3.74	3.64	3.70	3.65	3.72
Y6	3.94	3.86	3.83	3.86	3.73
Y7	3.94	3.99	3.94	3.96	3.81
Y8	3.76	3.81	3.79	3.79	3.68
Y9	4.27	4.23	4.16	4.22	4.07
Y10	4.20	4.13	4.06	4.09	3.97
Y11	4.20	4.10	4.04	4.05	3.91
Y12	4.11	4.01	4.00	4.01	3.89
Y13	3.90	3.80	3.78	3.77	3.83
Y14	4.06	3.98	3.97	3.96	4.05
Y15	3.98	3.93	3.91	3.91	4.00
TY1	4.41	4.30	4.20	4.24	4.26
TY2	4.40	4.20	4.29	4.23	4.27
TY3	4.43	4.24	4.25	4.23	4.31
En yüksek	4.43	4.30	4.29	4.24	4.31
En düşük	3.74	3.58	3.58	3.53	3.59

Çizelge 4.6. pH değerlerine ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları

Yoğurt Önekleri	pH değerleri				
	1.GÜN	1.HAFTA	2.HAFTA	3.HAFTA	4.HAFTA
Geleneksel	3.972±0.041aB*	3.879±0.047cB	3.855±0.042bB	3.848±0.049bB	3.825±0.037bB
Ticari	4.413±0.091aA	4.247±0.106cA	4.247±0.093bA	4.233±0.109bA	4.280±0.082bA

*Yoğurt tipi arasındaki farklılık büyük harfle, zamanlar arasındaki farklılık küçük harfle gösterilmiştir. Aynı harfle işaretlenmiş olan ortalamalar istatistik olarak birbiri ile aynıdır (p>0.05).

Geleneksel yoğurtların pH değerleri, Türkoğlu vd. (2003) tarafından elde edilen değerlerden yüksek (ort. pH 3.68), Öz (1990) tarafından elde edilen değerlerden (ort. pH 4,09) düşüktür.

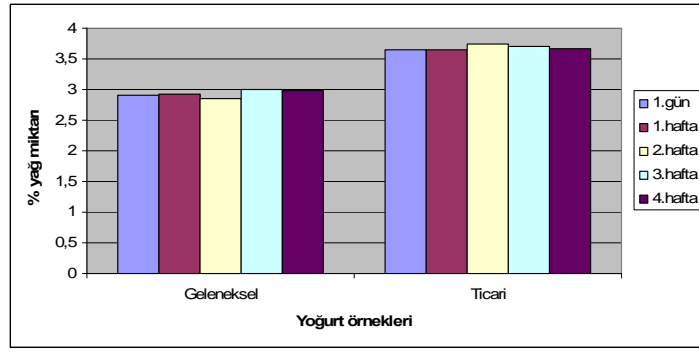
Depolama süresince yoğurt örneklerinin laktik asit içeriği arttıkça pH değerleri azalmıştır. Akalin et al. (2004), depolama sırasında pH' da küçük bir düşüşün bile canlılığı etkilediğini belirtmiştir. Shah (2000), *Lb. acidophilus* ve *Bf. bifidum* içeren ticari probiyotik yoğurtlarda pH' da benzer şekilde düşüş gözlemiş fakat asitlikteki bu artışın *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *S.thermophilus*' un gelişimine bağlı olduğunu belirtmiştir. Yapılan çalışmalar yoğurt bakterilerinin depolama süresince canlılıklarını devam ettirdiklerini göstermektedir (Rohm et al., 1990; Akalin et al., 2004; Donkor, 2007).

Yoğurtta istenen kalitenin sağlanmasında inkübasyona son verme anının doğru olarak saptanması çok önemlidir. Ülkemizde geleneksel yoğurtların fermentasyon sürelerinin bitimine kimi zaman gözle kontrol edilerek, kimi zaman da belirli sürenin dolması beklenerek karar verildiği bilinmektedir. Bunun doğal sonucu olarak üretilen yoğurtların kalite özelliklerinde belirgin bozukluklar ortaya çıkmaktadır (Atamer ve Sezgin, 1987).

4.1.4. Yoğurtların yağ ve kurumadede % yağ değerleri

Yoğurt kurumadesinde en önemli bileşenlerden olan yağ, yoğurdun tat ve aromasını iyileştirir, besleyicilik değerini artırır ve vizkozitesi üzerine etki ederek yapıyı düzeltir. Yoğurtta yağ oranı arttıkça vizkozite de artmaktadır (Yaygın, 1999).

Yoğurt örneklerinin yağ miktarları, en yüksek ve en düşük değerleri Çizelge 4.7.'de, ortalama değerlerine göre geleneksel ve ticari yoğurt örneklerinin karşılaştırmaları ise Şekil 4.4.'de sunulmuştur. Geleneksel yoğurt örneklerinde homojenizasyon işlemi yapılmadığı için kaymak tabakasının dağılımı örnekler arasında eşit olmamıştır. Bu nedenle Çizelge 4.7.'de görüldüğü gibi bazı yoğurt örneklerinde depolama sırasında yağ değerlerinde değişkenlikler görülmektedir.



Şekil 4.4. Yoğurt örneklerinin % yağ değerlerinin karşılaştırılması

Çizelge 4.7. Yoğurtların % yağ değerleri

Yoğurt	1. gün	1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta
Y1	4.00±0.00	4.00±0.14	4.00±0.00	4.00±0.14	4.00±0.00
Y2	1.80±0.00	1.80±0.28	1.80±0.28	1.80±0.00	1.80±0.00
Y3	3.00±0.00	3.00±0.28	3.00±0.00	3.30±0.14	3.40±0.00
Y4	2.40±0.00	2.40±0.00	2.00±0.00	2.40±0.00	2.80±0.00
Y5	4.00±0.70	3.60±0.00	3.20±0.00	3.00±0.00	4.00±0.14
Y6	2.40±0.00	3.60±0.00	3.40±0.07	3.40±0.07	3.60±0.00
Y7	3.00±0.14	3.00±0.00	2.80±0.00	3.20±0.07	3.00±0.07
Y8	2.60±0.00	2.40±0.00	2.40±0.00	3.00±0.07	3.00±0.00
Y9	3.20±0.00	3.40±0.00	3.30±0.07	3.30±0.07	3.00±0.07
Y10	3.00±0.00	2.40±0.00	2.80±0.07	3.00±0.07	2.40±0.00
Y11	3.40±0.14	3.00±0.07	3.20±0.00	3.20±0.00	3.20±0.00
Y12	3.60±0.00	3.90±0.07	3.40±0.00	4.00±0.07	3.00±0.00
Y13	1.50±0.14	1.80±0.00	1.60±0.00	1.70±0.07	1.70±0.07
Y14	2.70±0.14	2.70±0.00	2.80±0.14	2.80±0.00	2.80±0.00
Y15	3.00±0.00	3.00±0.00	3.00±0.07	3.00±0.00	3.00±0.07
TY1	3.60±0.00	3.80±0.02	4.00±0.00	3.85±0.21	3.80±0.00
TY2	3.50±0.14	3.25±0.14	3.30±0.14	3.35±0.07	3.30±0.14
TY3	3.85±0.21	3.90±0.14	3.90±0.14	3.90±0.14	3.90±0.14
En yüksek	4.00±0.70	4.00±0.14	4.00±0.00	4.00±0.14	4.00±0.14
En düşük	1.50±0.14	1.80±0.00	1.60±0.00	1.70±0.07	1.70±0.07

Hisoğlu (2007), evlerde üretilen yoğurt numunelerinde yağ miktarlarını % 1.60-4.90 arasında; mandıralarda üretilen yoğurt numunelerinde yağ miktarlarını % 2.40-3.80 arasında ve modern işletmelerde üretilen yoğurt numunelerinde yağ miktarlarını % 2.80-4.70 arasında tespit etmiştir.

Geleneksel yoğurtların % yağ değerleri, Yazıcı (1991) tarafından elde edilen değerlerden (ort. %2.51) yüksek, Türkoğlu vd. (2003) tarafından elde edilen değerlerle (ort. %2.93) benzer ve Öz (1990) tarafından elde edilen değerlerden (ort. %3.84) düşük bulunmuştur.

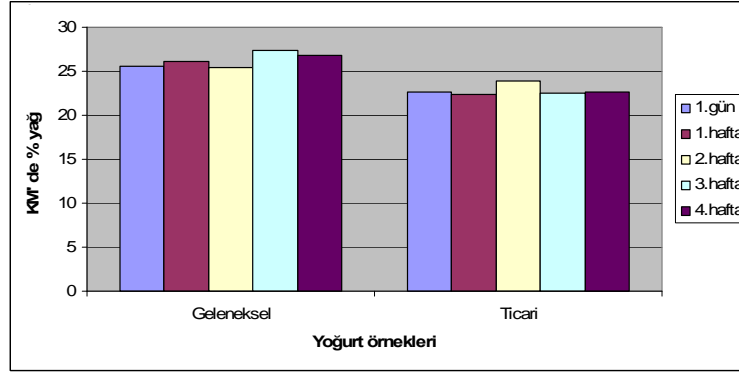
Ticari kültürle üretilen yoğurt örneklerinin yağ değerleri geleneksel yöntemle üretilen yoğurt örneklerinin yağ değerlerinden daha yüksek görünse de (Şekil 4.4.) yapılan varyans analizi sonucunda, yoğurt örnekleri arasında ve 4 haftalık depolama süresince (Çizelge 4.8.) yağ değerlerindeki değişim istatistik olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$).

Çizelge 4.8. % Yağ değerlerine ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları

Yoğurt Önekleri	% Yağ değerleri				
	1.GÜN	1.HAFTA	2.HAFTA	3.HAFTA	4.HAFTA
Geleneksel	2.907±0.173aA*	2.933±0.170aA	2.847±0.162aA	3.007±0.160aA	2.980±0.162aA
Ticari	3.650±0.386aA	3.650±0.380aA	3.733±0.362aA	3.700±0.357aA	3.667±0.363aA

*Yoğurt tipi arasındaki farklılık büyük harfle, zamanlar arasındaki farklılık küçük harfle gösterilmiştir. Aynı harfle işaretlenmiş olan ortalamalar istatistik olarak birbiri ile aynıdır ($p>0.05$).

Yoğurt örneklerinin kurumadede yağ miktarları, en yüksek ve en düşük değerleri Çizelge 4.9.'da, ortalama değerlerine göre geleneksel ve ticari yoğurt örneklerinin karşılaştırmaları Şekil 4.5.'te sunulmuştur. Yapılan varyans analizi sonucunda geleneksel ve ticari yoğurt örnekleri arasında ve 4 haftalık depolama süresince kurumadede yağ değerlerindeki değişim istatistik olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$).



Şekil 4.5. Yoğurt örneklerinin kurumaddede % yağ değerlerinin karşılaştırılması

Çizelge 4.9. Yoğurtların kurumaddede % yağ değerleri

Yoğurt	1. gün	1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta
Y1	32.71	32.79	33.98	34.04	34.12
Y2	19.07	22.92	18.48	19.89	20.20
Y3	27.86	28.85	29.88	33.00	33.07
Y4	22.37	23.05	20.75	24.81	28.51
Y5	31.95	28.50	24.98	27.20	31.03
Y6	20.60	31.19	29.77	30.99	31.41
Y7	26.60	26.83	24.01	30.10	26.74
Y8	24.74	23.03	23.71	28.68	29.26
Y9	25.72	27.53	27.41	26.76	25.17
Y10	26.43	21.58	25.29	27.17	21.78
Y11	30.30	27.55	28.44	28.37	28.02
Y12	33.40	33.08	29.96	33.98	27.05
Y13	13.30	15.51	14.00	15.06	15.15
Y14	23.16	23.09	23.47	23.83	23.73
Y15	26.11	26.27	26.26	26.29	26.59
TY1	21.77	22.98	25.74	23.76	22.97
TY2	21.53	19.66	20.74	20.43	19.56
TY3	24.67	23.59	25.14	23.40	25.45
En yüksek	33.40	33.08	33.98	34.04	34.12
En düşük	13.30	15.51	14.00	15.06	15.15

Çizelge 4.10. Kurumaddede % yağ değerlerine ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları

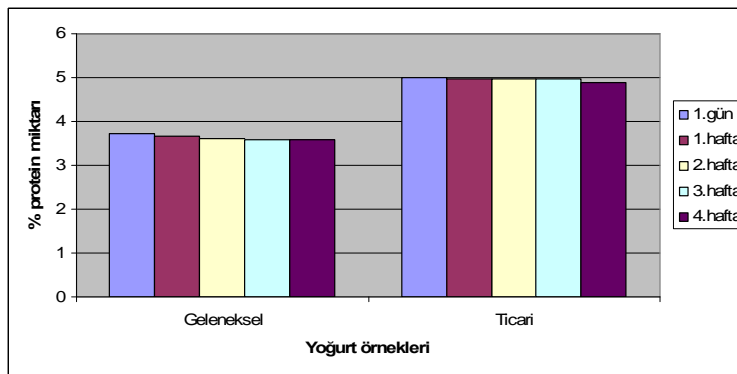
Yoğurt Örnekleri	KM' de % yağ değerleri				
	1.GÜN	1.HAFTA	2.HAFTA	3.HAFTA	4.HAFTA
Geleneksel	25.621±1.328aA*	26.118±1.159aA	25.360±1.243aA	27.343±1.255aA	26.789±1.253aA
Ticari	22.663±2.969aA	22.370±2.591aA	23.867±2.779aA	22.537±2.806aA	22.657±2.802aA

*Yoğurt tipi arasındaki farklılık büyük harfle, zamanlar arasındaki farklılık küçük harfle gösterilmiştir. Aynı harfle işaretlenmiş olan ortalamalar istatistik olarak birbiri ile aynıdır (p>0.05).

4.1.5. Yoğurtların Kjeldahl yöntemi ile protein değerleri

Protein miktarı, yoğurdun besleyici değeri üzerinde önemli bir rol oynamakla birlikte yoğurdun yapısı üzerinde de büyük bir etkiye sahiptir. Protein oranı yüksek sütlerle yapılan yoğurtlarda kıvam artar, serum ayrılması azalır. Sütün kurumadde oranının artırılması temel olarak protein oranının artırılması esasına dayanır (Herdem, 2006).

Yoğurt örneklerinin % protein miktarları, en yüksek, en düşük değerleri Çizelge 4.11.'de, ortalama değerlerine göre geleneksel ve ticari yoğurt örneklerinin karşılaştırmaları ise Şekil 4.6.'da sunulmuştur. Şekilde görüldüğü gibi, ticari kültürle üretilen yoğurt örneklerinin % protein miktarları daha yüksek, geleneksel yöntemle üretilen yoğurt örneklerinin % protein miktarları ise daha düşüktür.



Şekil 4.6. Yoğurt örneklerinin % protein değerlerinin karşılaştırılması

Çizelge 4.11. Yoğurtların % protein değerleri

Yoğurt	1. gün	1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta
Y1	4.037±0.05	3.791±0.04	3.556±0.03	3.537±0.02	3.502±0.03
Y2	2.963±0.01	2.834±0.05	2.822±0.03	2.822±0.03	2.858±0.04
Y3	3.360±0.06	3.035±0.05	3.035±0.04	2.947±0.04	3.005±0.05
Y4	3.468±0.05	3.415±0.00	3.402±0.00	3.225±0.04	3.142±0.05
Y5	4.044±0.04	4.068±0.01	4.068±0.00	4.040±0.05	3.979±0.06
Y6	4.466±0.03	4.297±0.03	4.421±0.01	4.378±0.05	4.378±0.06
Y7	3.749±0.04	3.714±0.03	3.728±0.02	3.728±0.07	3.716±0.00
Y8	3.735±0.04	3.726±0.03	3.728±0.03	3.706±0.08	3.671±0.01
Y9	4.090±0.07	4.070±0.04	4.028±0.04	4.015±0.00	3.989±0.02
Y10	3.502±0.06	3.590±0.04	3.487±0.00	3.487±0.05	3.445±0.03
Y11	3.272±0.05	3.225±0.05	3.272±0.01	3.269±0.00	3.329±0.08
Y12	3.402±0.05	3.394±0.05	3.359±0.01	3.468±0.01	3.728±0.05
Y13	4.019±0.04	3.979±0.06	3.979±0.02	3.998±0.03	3.828±0.05
Y14	4.257±0.04	4.249±0.06	3.891±0.02	3.677±0.03	3.677±0.04
Y15	3.673±0.01	3.673±0.04	3.5374±0.03	3.454±0.04	3.441±0.03
TY1	5.010±0.03	4.961±0.03	4.961±0.03	4.961±0.02	4.898±0.02
TY2	5.000±0.02	4.990±0.04	4.961±0.03	4.960±0.00	4.890±0.02
TY3	5.010±0.01	4.990±0.04	4.960±0.03	4.960±0.03	4.898±0.04
En yüksek	5.010±0.03	4.990±0.04	4.961±0.03	4.961±0.02	4.898±0.04
En düşük	2.963±0.01	2.834±0.05	2.822±0.03	2.822±0.03	2.858±0.04

Yapılan varyans analizi sonucunda, geleneksel ve ticari yoğurtların % protein miktarlarının birbirlerinden önemli derecede farklı olduğu görülmüştür ($p<0.01$). Yoğurtların 4 haftalık depolama süresince % protein değerlerindeki değişim ise istatistik olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Varyans analizi sonuçları ve Tukey çoklu karşılaştırma testinin sonuçları Çizelge 4.12.' de sunulmuştur.

Çizelge 4.12. % Protein değerlerine ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları

Yoğurt Örnekleri	% Protein değerleri				
	1.GÜN	1.HAFTA	2.HAFTA	3.HAFTA	4.HAFTA
Geleneksel	3.718±0.101aB*	3.671±0.104aB	3.621±0.102aB	3.584±0.102aB	3.580±0.096aB
Ticari	5.007±0.226aA	4.980±0.233aA	4.961±0.227aA	4.960±0.228aA	4.895±0.216aA

*Yoğurt tipi arasındaki farklılık büyük harfle, zamanlar arasındaki farklılık küçük harfle gösterilmiştir. Aynı harfle işaretlenmiş olan ortalamalar istatistik olarak birbiri ile aynıdır (p>0.05).

TGK Fermente Sütler Tebliği' ne göre (Anonim, 2009) yoğurtların % protein miktarı en az % 3.00 olarak belirtilmiştir. Bu açıdan geleneksel ve ticari yoğurt örneklerinin protein değerlerinin ortalamaları (Çizelge 4.12.) tebliğe uymaktadır.

Elde edilen bu veriler Herdem (2006)' in Antalya ilinden topladığı geleneksel yoğurt örneklerinin ortalama protein değerleri (ort. % 3.66) ile benzerlik göstermektedir.

Hisoğlu (2007), evlerde, mandıralarda ve modern işletmelerde üretilen yoğurt numunelerinde % protein miktarlarını sırasıyla % 3.13-5.75, % 3.17-5.38, % 3.87-6.75 olarak tespit etmiştir. Türkoğlu vd. (2003) ise % protein miktarlarını %, 2.24-5.44 arasında bulmuşlardır.

Çizelge 4.12.' de görüldüğü gibi yoğurt örneklerinin % protein miktarlarındaki değişim istatistik olarak önemsiz olsa da hafif bir düşüş gözlenmiştir. Bu proteinlerin hidrolizinin çok düşük olduğunu göstermektedir. Bu durum biyoaktif peptitlerin oluşumu ve saflaştırılması açısından önemlidir.

4.2. Mikrobiyolojik Analizler

Bölüm 3.1.'de gösterildiği şekilde kodlanan ve depolama işlemi gerçekleştirilen yoğurt örneklerinin mikrobiyolojik analizleri 3.2.3.'te belirtildiği şekilde yapılmıştır.

4.2.1.Koliform grubu bakterilerin sayım sonuçları

Üründe koliform bakteriler fekal bulaşıklığın göstergesidir. Yoğurt örneklerinin koliform grubu bakteri sayım sonuçları, en yüksek ve en düşük değerleri Çizelge 4.13.'te sunulmuştur. Ticari yoğurt örneklerinde koliform grubu bakteri tespit edilmediği için grafik üzerinde karşılaştırma yapılmamıştır.

TGK Fermente Sütler Tebliği (Anonim, 2009) ' ne göre yoğurtlarda koliform grubu bakteri sayısı en fazla 95 EMS/g ve *E. coli* sayısı < 3 EMS/g olarak belirtilmiştir. TS 1330 Yoğurt Standardı' na göre (Anonim, 1999a) ise yoğurtlarda koliform grubu bakteri sayısı en fazla 10 adet/g olarak belirtilmiş, *E. coli*' nin ise bulunmaması gerektiği ifade edilmiştir. Buna göre geleneksel yoğurt örneklerinin 5 tanesi hariç (Y10, Y11, Y13, Y14, Y15) diğerleri standardın çok üzerinde koliform grubu bakteri içermektedir. Koliform grubu bakteri içeren yoğurt örneklerinin hepsinde *E. coli*' de bulunmaktadır. Yapılan varyans analizi sonucunda ticari yoğurt örneklerinde koliform grubu bakteri tespit edilmediği için yoğurt örnekleri arasındaki farklılık istatistik olarak önemli ($p < 0.01$), 4 haftalık depolama sürecindeki değişim ise önemsiz ($p > 0.05$) bulunmuştur. Geleneksel yoğurt örneklerinde pH değerinin düşük olmasına karşın depolama süresince koliform grubu bakteriler üzerine etkisi olmamıştır.

Çizelge 4.13. Yoğurtların koliform grubu bakteri sayım sonuçları
(log kob₁₀/g)

Yoğurt	1. gün	1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta
Y1	3.00±0.33	6.82±0.01	7.20±0.17	6.65±0.04	6.70±0.12
Y2±	4.77±0.16	6.20±0.05	6.86±0.01	6.30±0.24	6.30±0.24
Y3	6.48±0.07	7.26±0.08	6.82±0.11	6.87±0.05	6.93±0.15
Y4	6.00±0.24	7.11±0.17	6.43±0.12	6.75±0.09	6.62±0.34
Y5	6.48±0.07	7.13±0.08	6.75±0.08	6.71±0.06	6.95±0.08
Y6	7.37±0.17	6.79±0.18	7.07±0.27	6.73±0.21	6.62±0.13
Y7	6.68±0.31	5.58±0.09	5.93±0.34	5.26±0.07	4.92±0.27
Y8	7.26±0.07	7.00±0.24	7.54±0.06	6.65±0.12	6.67±0.08
Y9	5.62±0.07	4.30±0.43	5.21±0.15	5.27±0.03	5.74±0.12
Y10	<10*	<10*	<10*	<10*	<10*
Y11	<10*	<10*	<10*	<10*	<10*
Y12	5.12±0.17	5.98±0.15	5.97±0.02	5.40±0.05	5.37±0.08
Y13	<10*	<10*	<10*	<10*	<10*
Y14	<10*	<10*	<10*	<10*	<10*
Y15	<10*	<10*	<10*	<10*	<10*
TY1	<10*	<10*	<10*	<10*	<10*
TY2	<10*	<10*	<10*	<10*	<10*
TY3	<10*	<10*	<10*	<10*	<10*
En yüksek	7.37±0.17	7.26±0.08	7.54±0.06	6.87±0.05	6.95±0.08
En düşük	<10*	<10*	<10*	<10*	<10*

* Bu plaklarda üreme gözlenmemiş ve ortalama hesaplanırken değerleri sıfır olarak alınmıştır.

Hisoğlu (2007), incelediği toplam 260 adet yoğurt numunesinin tamamının koliform grubu bakteri ve *E. coli* sayısı yönünden TGK Fermente Sütler Tebliği (Anonim, 2009)' nde belirtilen değerlere uygun olduğunu belirtmiştir. TSE TS 1330 Yoğurt Standardı (Anonim, 1999a)' na göre *E. coli* sayısı yönünden incelenen numunelerin evlerde, %14.95'si, mandıralarda %22.50' si uygun bulunmamıştır. Modern işletmelerde üretilen yoğurt numuneleri ise standarda göre *E. coli* sayısı yönünden uygun bulmuştur.

Kırdar ve Gün (2001), Burdur’da tüketime sunulan 40 adet süzme yoğurt örneğinin kalite kriterleri üzerine yaptıkları araştırmada numunelerin 4’ünde *E. coli* belirlendiğini ve Keleş (2003), Konya’da taze ev üretimi yoğurt üzerine yaptığı araştırmada sadece bir numunede *E. coli* belirlendiğini bildirmişlerdir. Atasoy vd. (2003) inceledikleri 20 örnekten sadece bir tanesinde 2×10^3 kob/g oranında koliform grubu bakteriye rastlamışlardır. Duru ve Özgüneş (1981) ise inceledikleri yoğurt örneklerinin % 35’inde koliform grubu bakteri bulmuşlardır. Bu araştırmada elde edilen bulgularla araştırmacıların bulguları arasında kısmen benzerlik bulunmakla birlikte, *E. coli* sayısı literatürdeki verilerden daha yüksek oranda tespit edilmiştir.

Çizelge 4.14. Koliform grubu bakteri sayımına ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları

Yoğurt Örnekleri	Koliform grubu bakteri (log kob ₁₀ /g)				
	1.GÜN	1.HAFTA	2.HAFTA	3.HAFTA	4.HAFTA
Geleneksel	3.919±0.738aA*	4.278±0.777aA	4.385±0.787aA	4.173±0.749aA	4.188±0.753aA
Ticari	<10aB	<10aB	<10aB	<10aB	<10aB

*Yoğurt tipi arasındaki farklılık büyük harfle, zamanlar arasındaki farklılık küçük harfle gösterilmiştir. Aynı harfle işaretlenmiş olan ortalamalar istatistik olarak birbiri ile aynıdır (p>0.05).

4.2.2. Maya-küf sayım sonuçları

Maya-küf sayısı, yoğurdun mikrobiyolojik kalitesini belirlemede en önemli kriterlerden biridir. Yüksek sayıda maya-küf içeriği, üretim sırasında hijyenik koşullara özen gösterilmediğinin ve üretimden sonra yeteri derecede soğuk ortamlarda muhafaza yapılmadığının göstergesidir. Bu mikroorganizmalar yüksek proteolitik ve lipolitik faaliyetlerinden dolayı yoğurtlarda istenmeyen tat ve aroma oluşumuna neden olabilirler (Herdem, 2006).

Yoğurt örneklerinin maya-küf sayım sonuçları, en yüksek ve en düşük değerleri Çizelge 4.15.'te sunulmuştur.

Ticari yoğurt örneklerinde maya-küf tespit edilmediği için grafik üzerinde karşılaştırma yapılmamıştır. Yapılan varyans analizi sonucunda, geleneksel ve ticari yoğurtların maya-küf sayım sonuçlarının birbirlerinden farklı olduğu ($p < 0.05$), depolama süresince ise maya-küf sayım sonuçlarındaki değişimin ise önemsiz olduğu ($p > 0.05$) belirlenmiştir. Varyans analizi sonuçları ve Tukey çoklu karşılaştırma testinin sonuçları Çizelge 4.16.'da sunulmuştur.

TGK Fermente Sütler Tebliği (Anonim, 2009)'ne göre yoğurtlarda bulunabilecek maya-küf sayısı 10^2 - 10^3 kob/g olarak, TSE TS 1330 Yoğurt Standardı (Anonim, 1999a)'na göre ise en fazla 2 log kob/g olmalıdır. Çizelge 4.16.'da görüldüğü gibi geleneksel yoğurtlardan elde edilen maya-küf sayım sonuç ortalamaları tebliğde ve standartta izin verilen değerlerin çok üstünde çıkmıştır.

Bu sonuçlara göre geleneksel yoğurtların mikroflorasının normal yoğurt mikroflorasına uymadığı, pıhtı oluşumunda laktik asit bakterileri dışında özellikle mayalar gibi başka mikroorganizmaların etkili olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.15. Yoğurtların maya-küf sayım sonuçları
(log kob₁₀/g)

Yoğurt	1. gün	1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta
Y1	3.00±0.05	6.77±0.04	7.11±0.04	6.45±0.08	6.58±0.15
Y2	4.74±0.07	7.02±0.14	6.65±0.07	6.00±0.24	6.18±0.38
Y3	6.37±0.47	7.16±0.03	6.60±0.11	6.65±0.12	6.90±0.02
Y4	5.82±0.17	6.97±0.05	6.62±0.02	6.80±0.12	6.45±0.12
Y5	6.52±0.13	7.09±0.02	6.54±0.06	6.68±0.11	6.89±0.07
Y6	7.26±0.20	6.82±0.17	7.37±0.46	6.92±0.17	6.48±0.14
Y7	6.92±0.17	5.58±0.11	5.77±0.13	5.12±0.10	4.70±0.21
Y8	7.50±0.17	6.68±0.17	6.70±0.05	6.60±0.11	6.79±0.04
Y9	4.00±0.05	3.92±0.17	4.98±0.08	4.75±0.04	5.50±0.10
Y10	<10*	<10*	3.85±0.16	4.40±0.27	5.73±0.10
Y11	<10*	<10*	<10*	<10*	<10*
Y12	4.88±0.05	4.81±0.13	5.82±0.04	6.22±0.07	5.26±0.21
Y13	3.00±0.24	2.92±0.17	2.70±0.12	4.02±0.06	4.99±0.07
Y14	<10*	<10*	<10*	2.70±0.05	2.82±0.17
Y15	<10*	<10*	3.34±0.05	3.65±0.04	3.56±0.03
TY1	<10*	<10*	<10*	<10*	<10*
TY2	<10*	<10*	<10*	<10*	<10*
TY3	<10*	<10*	<10*	<10*	<10*
En yüksek	7.50±0.17	7.16±0.03	7.37±0.46	6.80±0.12	6.90±0.02
En düşük	<10*	<10*	<10*	<10*	<10*

* Bu plaklarda üreme gözlenmemiş ve ortalama hesaplanırken değerleri sıfır olarak alınmıştır.

Çizelge 4.16. Maya-küf sayımına ait Tukey çoklu karşılaştırma
test sonuçları

Yoğurt Örnekleri	Maya-küf (log kob ₁₀ /g)				
	1.GÜN	1.HAFTA	2.HAFTA	3.HAFTA	4.HAFTA
Geleneksel	4.001±0.738aA*	4.383±0.749aA	4.937±0.614aA	5.131±0.495aA	5.255±0.483aA
Ticari	<10aB	<10aB	<10aB	<10aB	<10aB

*Yoğurt tipi arasındaki farklılık büyük harfle, zamanlar arasındaki farklılık küçük harfle gösterilmiştir. Aynı harfle işaretlenmiş olan ortalamalar istatistik olarak birbiri ile aynıdır (p>0.05).

Yoğurt, düşük pH'sı nedeniyle maya-küflerin gelişmesi için selektif bir besiyeri niteliğindedir. Depolama sıcaklıklarında maya-küfler gelişebilmekte ve lipolitik ve proteolitik bozulmayı teşvik ederek yoğurtların kalitesini olumsuz yönde etkilemektedirler (Hisoğlu, 2007). Yoğurt örneklerinin maya-küf sayısının yüksek olmasında yoğurt yapımı sırasında ve sonrasında temizlik şartlarına yeteri kadar dikkat edilmemesi yoğurt mayası olarak bir gün önceden veya daha da önceden üretilmiş yoğurtların kullanılması ve muhafaza şartlarına gereken hassasiyetin gösterilmemesinin etkili olduğu düşünülmektedir.

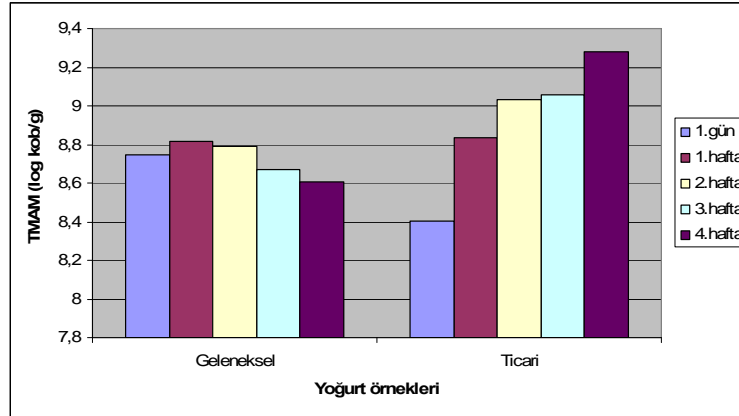
Herdem (2006), farklı yörelerden toplanan ve geleneksel yöntemle üretilen 50 adet yoğurt numunesinin kimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşal özelliklerinin belirlediği çalışmada Isparta, Konya, Mersin, Sivas ve Urfa illerinden elde edilen yoğurt örneklerinin maya-küf sayım değerlerinin standartta ve mevzuatta izin verilen değerin ve literatürde verilen değerlerin çok üstünde çıktığını belirlemiştir.

Benzer şekilde Hisoğlu (2007), evlerde üretilen yoğurt numunelerinde maya-küf sayısını $<1.00-4.78$ logkob/g arasında; mandıralarda üretilen yoğurt numunelerinde $<1.00-4.48$ log kob/g ve modern işletmelerde üretilen yoğurt numunelerinde ise $<1.00-2.40$ log kob/g olarak tespit etmiştir.

Duru ve Özgüneş (1981), analiz ettikleri yoğurtların % 55'inde 10×10^5 adet/g' dan fazla, Dayısoylu (1992), 2.224×10^5 adet/g, Kırdar ve Gün (2001), $1.5 \times 10^2-1.1 \times 10^7$ adet/g, Keleş (2003), 3.00×10^4 kob/g ve Atasoy vd. (2003), $1.50 \times 10^4-3.60 \times 10^6$ adet/g maya-küf bulunduğunu bildirmişlerdir.

4.2.3. Toplam mezofilik aerobik bakteri sayım sonuçları

Yoğurt örneklerinin TMAB sayım sonuçları, en yüksek ve en düşük değerleri Çizelge 4.17.'de ortalama değerlerine göre geleneksel ve ticari yoğurt örneklerinin karşılaştırmaları ise Şekil 4.7.'de sunulmuştur.



Şekil 4.7. Yoğurt örneklerinin toplam mezofilik aerobik bakteri sayım sonuçlarının karşılaştırılması

Yoğurtta mikrobiyal kaliteyi belirlerken mikroorganizmalar obligat flora (kullanılan yoğurt starter kültürleri) ve yabancı flora (mezofilik ve psikrotrofik bakteri, patojenler, maya ve küfler) olmak üzere 2 grupta incelenmektedir. Toplam aerob mezofilik bakteri sayısı içerisinde yoğurt starteri olarak kullanılan laktik asit bakterileri de sayıldığı için, genelde laktik asit bakterileri gelişimine bağlı olarak toplam bakteri sayım sonuçları da değişmektedir. Toplam aerob mezofilik yabancı flora sayısı, yoğurtta fazla veya düşük asitliğin yanı sıra, mukoz oluşması, istenmeyen tat, patojen varlığı ve genel kirlilik hakkında bilgi vermesi açısından sayım sonuçları dikkate alınmakta ve $<10^3$ mL iyi, 10^3 - $5,0 \times 10^4$ mL yeterli ve $>5,0 \times 10^4$ mL ise kötü kalite olarak değerlendirilmektedir (Weber, 1996).

Yapılan varyans analizi sonucunda TMAB değerleri açısından geleneksel ve ticari yoğurtların istatistik olarak birbirinden farklı ($p < 0.05$), 4 haftalık depolama süresince meydana gelen değişim ise geleneksel yoğurtlarda önemsiz ($p > 0.05$), ticari yoğurt örneklerinde ise önemli ($p < 0.05$) bulunmuştur.

Çizelge 4.17. Yoğurtların toplam mezofilik aerobik bakteri sayım sonuçları
(log kob₁₀/g)

Yoğurt	1. gün	1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta
Y1	9.09±0.07	9.06±0.06	8.58±0.09	8.34±0.30	8.43±0.12
Y2	8.37±0.27	8.34±0.12	7.86±0.12	7.04±0.01	7.31±0.09
Y3	8.90±0.10	8.50±0.10	8.62±0.13	8.54±0.11	8.78±0.23
Y4	8.78±0.15	8.77±0.22	8.81±0.03	8.58±0.09	8.50±0.15
Y5	9.18±0.15	8.47±0.04	8.67±0.21	8.54±0.12	8.00±0.24
Y6	8.70±0.48	8.82±0.10	8.62±0.17	8.54±0.10	8.37±0.18
Y7	8.49±0.03	8.81±0.20	8.81±0.08	8.60±0.11	8.37±0.18
Y8	8.86±0.06	9.09±0.12	9.08±0.11	8.73±0.10	8.37±0.30
Y9	8.75±0.34	8.75±0.17	8.52±0.26	8.83±0.15	8.99±0.07
Y10	8.18±0.15	9.01±0.07	8.87±0.13	9.15±0.10	9.14±0.12
Y11	7.82±0.17	9.12±0.01	8.99±0.14	9.11±0.18	9.01±0.03
Y12	8.97±0.11	8.48±0.07	9.29±0.03	8.88±0.05	8.64±0.14
Y13	9.12±0.31	8.95±0.07	8.88±0.31	9.26±0.05	9.24±0.12
Y14	8.74±0.03	9.01±0.23	9.18±0.10	8.96±0.05	9.05±0.17
Y15	9.22±0.19	9.02±0.17	9.07±0.04	8.99±0.13	8.86±0.09
TY1	8.36±0.10	8.36±0.15	8.30±0.22	8.45±0.07	9.02±0.04
TY2	8.39±0.21	8.73±0.34	9.42±0.20	9.42±0.32	9.54±0.06
TY3	8.45±0.04	9.39±0.30	9.35±0.18	9.28±0.24	9.27±0.44
En yüksek	9.22±0.19	9.39±0.30	9.42±0.20	9.42±0.32	9.54±0.06
En düşük	7.82±0.17	8.34±0.12	8.30±0.22	7.04±0.01	7.31±0.09

Çizelge 4.18. Toplam mezofilik aerobik bakteri sayımına ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları

Yoğurt Örnekleri	Toplam mezofilik aerobik bakteri(log kob ₁₀ /g)				
	1.GÜN	1.HAFTA	2.HAFTA	3.HAFTA	4.HAFTA
Geleneksel	8.745±0.095aA*	8.813±0.078aA	8.790±0.101aA	8.673±0.136aA	8.604±0.124aB
Ticari	8.406±0.212bA	8.833±0.175abA	9.029±0.227abA	9.054±0.303abA	9.282±0.277aA

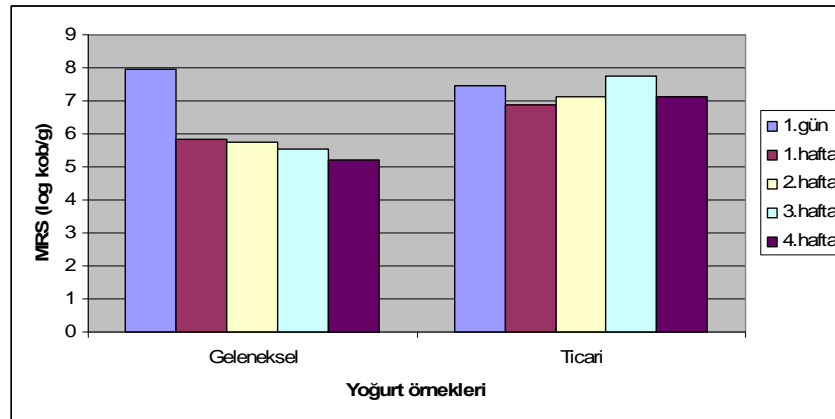
*Yoğurt tipi arasındaki farklılık büyük harfle, zamanlar arasındaki farklılık küçük harfle gösterilmiştir. Aynı harfle işaretlenmiş olan ortalamalar istatistik olarak birbiri ile aynıdır (p>0.05).

Atasoy vd. (2003), Şanlıurfa ilinde üretilen ve satışa sunulan yoğurt örneklerinin bazı mikrobiyolojik özelliklerini belirlediği çalışmalarında TMAB sayım sonuçlarının 5.50×10^5 - 2.40×10^7 kob/g arasında değiştiğini belirtmişlerdir.

4.2.4. MRS Agar sayım sonuçları

Yoğurdun oluşumu, laktik asit bakterilerinin gerçekleştirdiği laktoz fermentasyonu sonucu gerçekleşir. Laktik asit bakterileri yoğurdun oluşumunda, tat ve aromasının meydana gelmesinde rol oynarlar. Yoğurt oluşumunda esas rol alan laktik asit bakterileri, “yoğurt bakterileri” olarak da adlandırılan *S. thermophilus* ve *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* bakterileridir. Dolayısıyla yoğurtta bu iki bakteri dışında başka canlı mikroorganizma bulunmaması gerekmektedir. Nitekim araştırma sonuçları da yoğurt yapımında sadece bu iki bakterinin gerekli olduğunu, diğer mikroorganizmaların yoğurdun tat, aroma, yapı ve görünüşünü bozduklarını, kısa zamanda ekşimesine neden olduklarını, raf ömrünü kısalttıklarını göstermiştir.

Laktobasil sayımı için 3.2.3.’ te belirtildiği şekilde kullanılan MRS Agar besiyerinden elde edilen sayım sonuçları, en yüksek ve en düşük değerleri Çizelge 4.19.’da, ortalama değerlere göre geleneksel ve ticari yoğurt örneklerinin karşılaştırmaları ise Şekil 4.8.’ de sunulmuştur.



Şekil 4.8. Yoğurt örneklerinin MRS Agar sayım sonuçlarının karşılaştırılması

Yapılan varyans analizi sonucunda, geleneksel ve ticari yoğurtların MRS Agar besiyerindeki sayım sonuçlarının birbirlerinden istatistik olarak farklı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Yoğurtların 4 haftalık depolama süresince laktobasil sayısındaki değişim istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Varyans analizi sonuçları ve Tukey çoklu karşılaştırma testinin sonuçları Çizelge 4.20.' de sunulmuştur.

Çizelge 4.19. Yoğurtların MRS Agar sayım sonuçları
(log kob₁₀/g)

Yoğurt	1. gün	1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta
Y1	8.54±0.05	6.78±0.03	7.27±0.08	7.27±0.11	7.29±0.09
Y2	9.15±0.05zayıf	<10*	<10*	<10*	<10*
Y3	8.01±0.02	8.07±0.10	8.45±0.20	7.26±0.24	7.07±0.10
Y4	8.52±0.05	8.48±0.26	8.40±0.29	9.05±0.10	7.62±0.17
Y5	8.17±0.05	8.16±0.09	7.77±0.02	7.50±0.10	6.70±0.05
Y6	7.67±0.10	8.32±0.14	7.70±0.08	7.12±0.15	7.56±0.20
Y7	8.19±0.10	8.20±0.08	8.22±0.07	7.40±0.17	5.22±0.05
Y8	8.37±0.48	8.89±0.05	8.86±0.11	8.22±0.42	7.92±0.12
Y9	6.52±0.23	7.52±0.03	7.56±0.08	7.40±0.18	6.70±0.21
Y10	6.52±0.05	7.82±0.04	7.39±0.01	7.30±0.27	7.52±0.28
Y11	7.61±0.03	7.82±0.08	6.82±0.17	7.34±0.25	7.75±0.09
Y12	7.26±0.24	7.45±0.12	7.52±0.18	7.12±0.31	6.92±0.12
Y13	7.63±0.22	çok zayıf	çok zayıf	çok zayıf	çok zayıf
Y14	8.48±0.24	çok zayıf	çok zayıf	çok zayıf	çok zayıf
Y15	8.60±0.05	çok zayıf	çok zayıf	çok zayıf	çok zayıf
TY1	8.30±0.24	8.25±0.12	7.33±0.05	8.27±0.45	6.50±0.10
TY2	7.85±0.04	4.81±0.33	7.61±0.07	7.92±0.27	7.82±0.10
TY3	6.22±0.05	7.54±0.27	6.44±0.08	7.10±0.35	7.09±0.12
En yüksek	9.15±0.05	8.89±0.05	8.86±0.11	9.05±0.10	7.92±0.12
En düşük	6.22±0.05	<10*	<10*	<10*	<10*

* Bu plaklarda üreme gözlenmemiş ve ortalama hesaplanırken değerleri sıfır olarak alınmıştır.

Çizelge 4.19.' da görüldüğü gibi bazı geleneksel yoğurt örneklerinde 1. günlerinden sonra petri kutularında hiç üreme görülmemiştir. Benzer sonuçlar Herdem (2006)' in yaptığı çalışma da da görülmektedir. Araştırmacı yaptığı çalışmada Antalya ilinden toplanan geleneksel yoğurtların hiçbirinde, Mersin ilinden toplanan yoğurt örneklerinin bazılarında MRS Agar üzerinde üreme gözlemlenmediğini belirtmiştir. Çalışmasında MRS Agar sayım sonuçları $<100-6.11 \times 10^8$ kob/g arasında değişmiştir. Marth and Steele, (2001) pH 4.6' nın altında laktik asit bakterilerinin zarar gördüğünü bu nedenle besiyerinde sayım sırasında sıkıntı yaşandığını belirtmiştir.

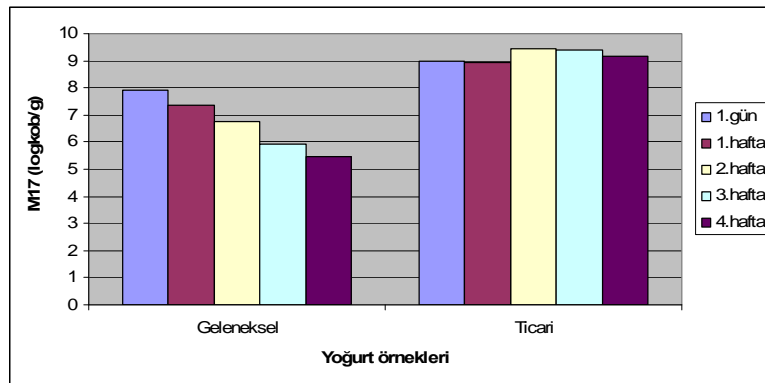
Çizelge 4.20. MRS Agar sayımına ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları

Yoğurt Örnekleri	MRS Agar sayımı (log kob ₁₀ /g)				
	1.GÜN	1.HAFTA	2.HAFTA	3.HAFTA	4.HAFTA
Geleneksel	7.949±0.208aA*	5.834±0.903aA	5.731±0.874aA	5.532±0.844aA	5.218±0.804aA
Ticari	7.459±0.465aA	6.872±2.018aA	7.131±1.955aA	7.768±1.888aA	7.140±1.797aA

*Yoğurt tipi arasındaki farklılık büyük harfle, zamanlar arasındaki farklılık küçük harfle gösterilmiştir. Aynı harfle işaretlenmiş olan ortalamalar istatistik olarak birbiri ile aynıdır (p>0.05).

4.2.5. M17 Agar sayım sonuçları

Streptokokların sayımı 3.2.3.'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. M17 Agar besiyerinde sayılan mikroorganizma sonuçları Çizelge 4.21.'de, ortalama değerlere göre yoğurt örneklerinin karşılaştırmaları ise Şekil 4.9.'da sunulmuştur.



Şekil 4.9. Yoğurt örneklerinin M17 Agar sayım sonuçlarının karşılaştırılması

Yapılan varyans analizi sonucunda, geleneksel ve ticari yoğurtların M17 Agar besiyerindeki sayım sonuçlarının birbirlerinden istatistik olarak farklı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Yoğurtların 4 haftalık depolama süresince streptokok sayısındaki değişim istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Varyans analizi sonuçları ve Tukey çoklu karşılaştırma testinin sonuçları Çizelge 4.21.' de sunulmuştur. Herdem (2006), yaptığı çalışmasında yoğurtlarda M17 Agar sayım sonuçlarının 1.06×10^5 - 4.3×10^7 kob/g arasında değiştiğini belirtmiştir.

Çizelge 4.21. Yoğurtların M17 Agar sayım sonuçları
(log kob₁₀/g)

Yoğurt	1. gün	1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta
Y1	8.00±0.06	7.18±0.15	5.70±0.10	3.62±0.12	<10*
Y2	8.68± 0.08zayıf	<10*	<10*	<10*	<10*
Y3	6.70±0.12	7.00±0.24	5.70±0.05	<10*	<10*
Y4	7.79±0.11	6.70±0.37	<10*	<10*	<10*
Y5	8.93±0.15	7.18±0.35	5.70±0.15	5.70±0.23	6.18±0.22
Y6	8.34±0.21	8.26±0.20	8.40±0.21	8.34±0.21	6.52±0.05
Y7	7.85±0.07	8.13±0.06	7.87±0.15	7.58±0.11	7.18±0.34
Y8	7.45±0.12	7.95±0.08	7.95±0.07	6.82±0.12	6.82±0.21
Y9	6.52±0.32	7.92±0.27	8.26±0.07	7.50±0.17	7.40±0.03
Y10	7.73±0.21	8.41±0.08	8.18±0.05	8.12±0.17	7.70±0.21
Y11	6.82±0.33	8.70±0.18	8.75±0.21	7.65±0.15	7.07±0.32
Y12	8.26±0.42	8.29±0.09	8.33±0.04	6.82±0.33	6.22±0.32
Y13	8.79±0.02	7.54±0.10	8.88±0.02	9.00±0.02	9.00±0.05
Y14	8.18±0.21	8.52±0.28	8.88±0.14	8.88±0.06	8.85±0.05
Y15	8.95±0.11	8.95±0.11	9.03±0.01	8.95±0.06	8.95±0.07
TY1	9.58±0.10	9.54±0.10	9.47±0.18	9.34±0.10	8.66±0.06
TY2	9.54±0.12	8.12±0.40	9.49±0.19	9.47±0.07	9.36±0.27
TY3	7.82±0.06	9.06±0.30	9.32±0.05	9.43±0.04	9.42±0.06
En yüksek	9.58±0.10	9.54±0.10	9.49±0.19	9.47±0.07	9.42±0.06
En düşük	6.52±0.32	<10*	<10*	<10*	<10*

* Bu plaklarda üreme gözlenmemiş ve ortalama hesaplanırken değerleri sıfır olarak alınmıştır.

Çizelge 4.22. M17 Agar sayımına ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları

Yoğurt Örnekleri	M17 Agar sayımı (log kob ₁₀ /g)				
	1.GÜN	1.HAFTA	2.HAFTA	3.HAFTA	4.HAFTA
Geleneksel	7.933±0.211aA*	7.382±0.523aA	6.775±0.722aA	5.932±0.813aA	5.459±0.852aA
Ticari	8.984±0.473aA	8.914±1.169aA	9.434±1.613aA	9.418±1.817aA	9.155±1.905aA

*Yoğurt tipi arasındaki farklılık büyük harfle, zamanlar arasındaki farklılık küçük harfle gösterilmiştir. Aynı harfle işaretlenmiş olan ortalamalar istatistik olarak birbiri ile aynıdır (p>0.05).

Yoğurt bakterilerinin, yoğurt üretiminde tek başlarına kullanıldıklarında çoğalma ve laktik asit oluşturma yeteneklerinin, birlikte kullanılma durumundaki çoğalma ve laktik asit oluşturma yeteneklerinden daha zayıf olduğu ve bu iki bakteri arasında simbiyotik ilişki olduğu bilinmektedir (Tamime and Deeth, 1980). *S. thermophilus* optimum pH 6.5' de gelişim gösterirken, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*' un optimum gelişim pH' sı 5.8' dir (Özer, 2006). *S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'tan daha hızlı gelişerek laktozdan laktik asit oluşumu yanında ürenin üreaz tarafından parçalanmasıyla süte CO₂ ve genellikle formik asidin salınmasını sağlar. Böyle bir ortam *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'un gelişimini ve metabolizmasını teşvik eder. Bundan sonra *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* kazeinin bir kısmını hidrolize ederek ve peptidaz aktivitesi ile her iki türün gelişimi için gerekli olan aminoasitleri açığa çıkarır. Kazein fraksiyonlarından açığa çıkardığı özellikle lösin, lisin, aspartik asit, histidin, valin, metionin ve glutamik asit gibi serbest amino asitler ile *S. thermophilus*' un gelişimini teşvik etmekte; *S. thermophilus*' da oluşturduğu peptitler, pürin, pirimidin, CO₂, formik asit, okzalasetik asit ve fumarik asit ile *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*' un gelişimini teşvik etmektedir (Abu-Tarboush, 1996).

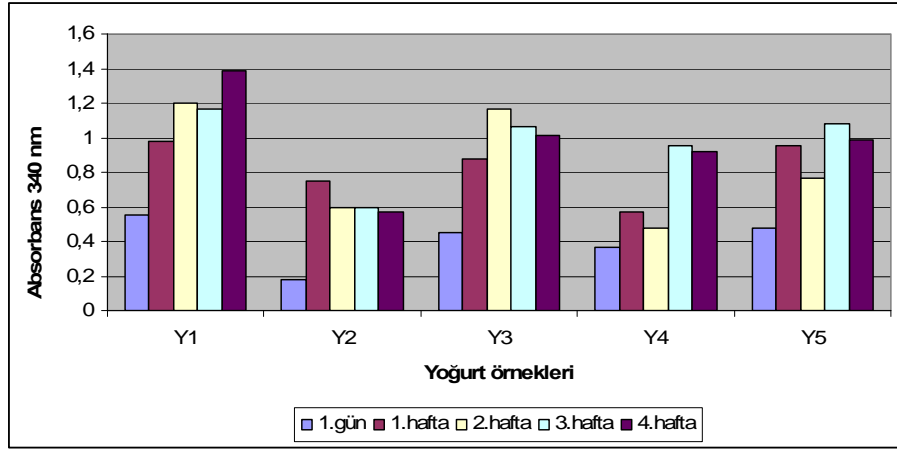
4.3. Yoğurtların Proteolitik Aktivite Sonuçları

Proteoliz, büyük ve kompleks proteinlerin daha küçük ve basit peptitlere parçalanmasıdır. Çeşitli fonksiyonel, biyoaktif peptit ve amino asitler laktik asit bakterilerinin proteinaz ve peptidaz enzimlerinin proteolitik aktivitesine bağlı olarak açığa çıkmaktadır. Proteinaz aktivitesi açığa çıkan peptit miktarı olarak ifade edilebilmektedir (Zainoldin and Baba, 2010).

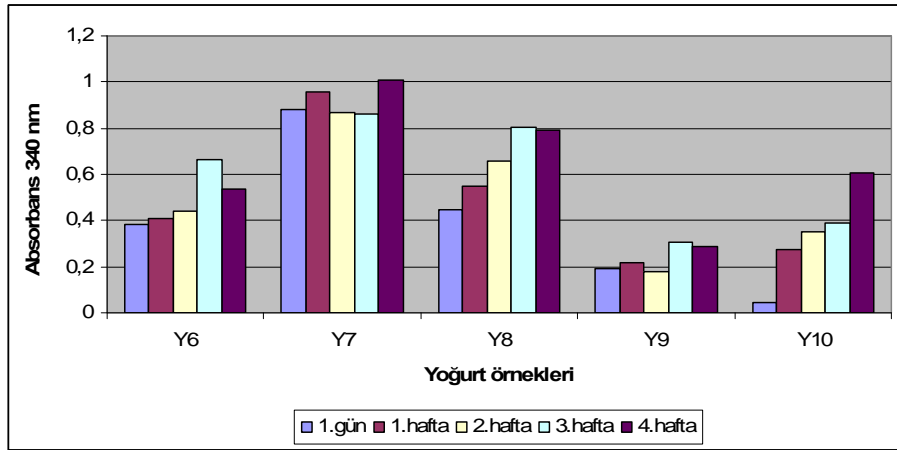
Fermentasyon sırasında süt proteinleri laktik asit bakterileri tarafından üretilen proteinazlar ile hidrolize olarak serbest amino grubunda artışa neden olurlar (Law and Haandrikman, 1997; Shihata and Shah, 2000; Donkor et al., 2006; Donkor, 2007).

Yoğurtta proteoliz, fermentasyon ve depolama sırasında yapıyı, tat ve aromayı etkileyen bir faktör olduğu için önemli bir kriterdir. Yoğurdun yapısındaki değişiklikler protein ağının kırılmasına bağlı olarak meydana gelmektedir. Ayrıca proteoliz, peptitlerin ve serbest amino asitlerin oluşumuna katkı sağlayarak, tat ve aromayı doğrudan etkilediği gibi bu bileşenlerin ileri katabolik tepkimeleri ile uçucu aroma bileşenlerinin de açığa çıkmasında etkilidir (Zainoldin and Baba, 2010).

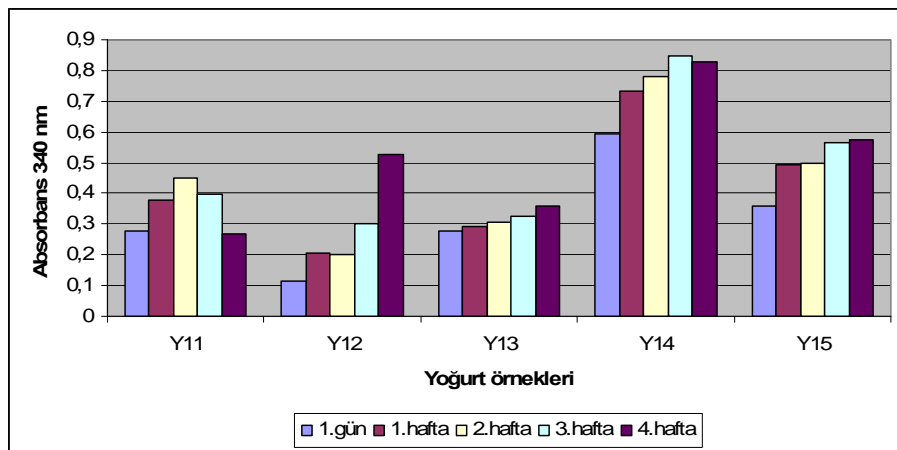
Bu çalışmada, serbest amino grubundaki artış 3.2.4.' te anlatıldığı gibi OPA metodu ile belirlenmiştir. Şekil 4.10, 4.11. 4.12.' de geleneksel yoğurt örneklerinin depolama süresince gözlenen göstermiş olduğu proteolitik aktivite düzeyi, Şekil 4.13.' te ticari kültürle üretilen yoğurt örneklerinde belirlenen proteolitik aktivite değerleri görülmektedir. Bütün yoğurt örneklerinde kontrol olarak kullanılan skim milk'e kıyasla proteolitik aktivite değerleri daha yüksektir. OPA metodu ile serbest amino gruplarının açığa çıkmasıyla belirlenen proteoliz depolama süresince istatistik olarak önemli düzeyde artış göstermiştir ($p < 0.01$). Bununla beraber geleneksel ve ticari yoğurt örnekleri arasında proteolitik aktivite açısından önemli bir farklılık görülmemiştir ($p > 0.05$). Varyans analizi sonuçları ve Tukey çoklu karşılaştırma testinin sonuçları Çizelge 4.23.' te sunulmuştur.



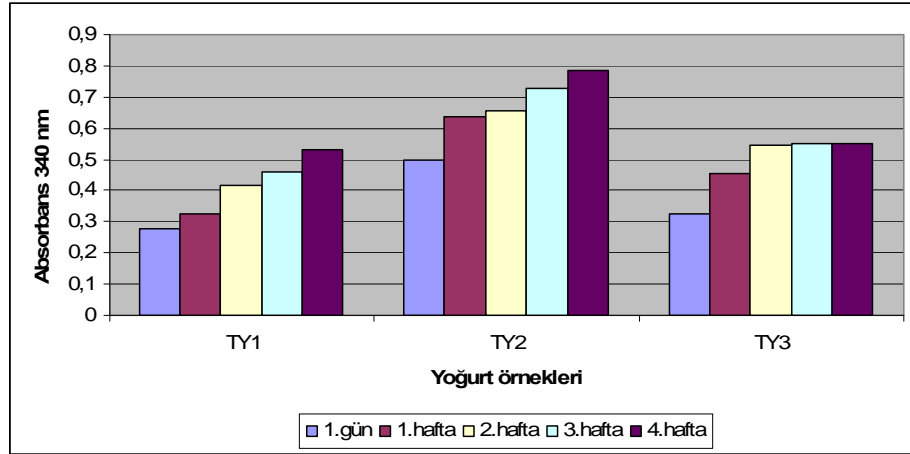
Şekil 4.10. Y1-Y5 yoğurtlarının depolama süresince proteolitik aktivite değerleri



Şekil 4.11. Y6-Y10 yoğurtlarının depolama süresince proteolitik aktivite değerleri



Şekil 4.12. Y11-Y15 yoğurtlarının depolama süresince proteolitik aktivite değerleri



Şekil 4.13. TY1, TY2 ve TY3 yoğurtlarının depolama süresince proteolitik aktivite değerleri

Çizelge 4.23. Proteolitik aktivite değerlerine ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları

Yoğurt Örnekleri	Proteolitik aktivite (Absorbans 340 nm)				
	1.GÜN	1.HAFTA	2.HAFTA	3.HAFTA	4.HAFTA
Geleneksel	0.372±0.052cA*	0.576±0.069bA	0.595±0.077abA	0.689±0.075abA	0.712±0.077aA
Ticari	0.368±0.117cA	0.493±0.154bA	0.540±0.171abA	0.579±0.167abA	0.623±0.172aA

*Yoğurt tipi arasındaki farklılık büyük harfle, zamanlar arasındaki farklılık küçük harfle gösterilmiştir. Aynı harfle işaretlenmiş olan ortalamalar istatistik olarak birbiri ile aynıdır ($p>0.05$).

Her ne kadar geleneksel ve ticari yoğurt örneklerinin proteolitik aktivite değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık bulunmasa da 4.2.1. ve 4.2.2.' de görüldüğü gibi geleneksel yoğurt örneklerinin koliform grubu bakteri ve maya-küf içeriği ticari yoğurt örneklerine göre yüksektir. Proteolitik aktivite değerleri ile koliform grubu bakteri ve maya-küf sayım sonuçları arasında pozitif bir korelasyon ($p<0.01$), pH değeri ile arasında negatif korelasyon bulunmaktadır ($p<0.01$). Ayrıca yoğurt örneklerinde proteolitik aktivite değerleri ile antioksidan aktivite değerleri arasında korelasyon tespit edilmiştir ($p<0.01$).

Çalışmanın proteolitik aktivite değişimi Donkor (2007) ve Donkor et al. (2007a) ile benzerlik göstermektedir. Shihata and Shah (2000), *Lb. delbruekii* ssp. *bulgaricus* suşunun proteolitik aktivitesinin *S. thermophilus* suşundan daha düşük olduğunu belirtmiş ve çalışmalarında yoğurt bakterilerinin (*Lb. delbruekii* ssp. *bulgaricus* ve *S.*

thermophilus) proteolitik aktivitesinin probiyotik bakterilerden (*Lb. acidophilus* ve *Bifidobacterium* sp.) daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Yapılan çalışmalarda proteolitik aktivitedeki değişikliğin pH' ya ve suşlara bağlı olduğu görülmektedir (Shihata and Shah, 2000; Özer, 2006; Donkor, 2007).

Papadimitriou et al. (2007), yoğurt kültürü ve yoğurt kültürüne ilave olarak probiyotik *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* DC412 suşunu içeren geleneksel ve probiyotik koyun yoğurdu yapmışlar ve bu yoğurtların 26 günlük depolanması sırasında proteolitik aktivite, peptit miktarındaki değişim ve elde edilen peptitlerdeki ACE inhibitör etkiyi belirlemişlerdir. Sonuçta 26. günde hesaplanan proteoliz derecesinin her iki yoğurtta da benzer olduğunu, 1. günden depolama sonuna kadar geçen süreçte peptit konsantrasyonundaki artışın her iki yoğurtta % 50' ye yakın olduğunu bulmuşlardır. Peptit konsantrasyonundaki artışa rağmen 26. günde hidroliz olan süt proteini oranı düşük kalmıştır. Suda çözünen azot miktarı ise yoğurdun toplam azot içeriğinin yaklaşık % 10' unu içermiştir.

Yüksek proteolitik aktivite gösteren suşlarda ACE inhibitör etki de yüksek olmaktadır. Özellikle *Lc. lactis* suşlarında ACE inhibitör etki ve yüksek tansiyon önleyici peptitlerin oluşumu proteolitik aktivite ile doğrudan ilişkilidir. Yapılan çalışmalar, ticari starter suşların düşük proteolitik aktiviteye sahip olduğunu ve ACE inhibitör peptitlerin üretilmediğini, fakat fermente ürünlerin üretiminde kullanılan bu suşların sindirim sistemi enzimleri ile sindirim sonrasında açığı çıkabilecek peptitlerin öncülerinin oluşmasında etkili olduklarını göstermektedir (Pihlanto-Leppälä et al., 1998; Hernández-Ledesma et al., 2004; Pihlanto et al., 2010).

Nielsen et al. (2009) 4 farklı laktik asit bakterisi türü (4 adet *Lc. lactis*, 8 adet *Lb. helveticus*, 1 adet *Lb. acidophilus*, 1 adet *S. thermophilus*) ile sütü pH 4.6' ya kadar fermente etmişler ve oluşan peptitler ve fermente süt örneklerinin ACE inhibitör aktivitelerini çalışmışlardır. Sonuçta çalışılan dört farklı *Lc. lactis* suşunun proteolitik aktivite değerleri benzer sonuçlar vermiş ve yüksek ACE inhibitör aktivite göstermiştir. En yüksek proteolitik aktiviteyi *Lb. helveticus* suşları gösterirken, *S. thermophilus* ve *Lb. acidophilus*' un gösterdiği aktivite düşük olmuştur. *S.*

thermophilus kullanılarak üretilen fermente sütte sadece bir peptidin açığa çıktığı, HPLC analizindeki peptit alanının çok düşük olduğu ve farklı çeşitte birçok proteolitik enzim içermesine rağmen fermentasyonda sınırlı bir proteolitik aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Benzer şekilde Bertrand-Harb et al. (2003)' da laktik asit bakterilerinin yoğurt gibi fermente süt ürünlerinde sınırlı bir proteolitik aktivite gücüne sahip olduğunu belirtmektedir. Bianchi-Salvadori et al. (1995)' da ticari yoğurtlardan ve endüstriyel peynirlerden izole edilen *S. thermophilus* ve *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*' tan elde edilen enzimlerin aktivitelerinin birbirlerinden farklı olduğunu bulmuşlardır. *S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*' tan daha yüksek ekzopeptitaz aktivitesi gösterirken sınırlı bir endopeptitaz aktivitesi göstermiştir. *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*' un kazeinleri hidroliz etme yeteneği, endopeptitaz aktivitenin laktobasillerde daha yüksek olduğu bilgisini kuvvetlendirmektedir.

Bertrand-Harb et al. (2003), yoğurt fermentasyonu aşamalarında β -Lg ve α -La miktarlarındaki değişimi incelemişler ve fermentasyon sırasında bu proteinlerin miktarlarının sabit kaldığını belirlemişlerdir. Ayrıca yaptıkları çalışmada suşları tek tek veya birlikte β -Lg ve α -La ile inkübe etmişlerdir. Sonuçta β -Lg' nin proteoliz olması için gereken sürenin yoğurt fermentasyon süresinden daha uzun olduğunu, α -La' nin proteolize daha duyarlı olduğunu ve özellikle *S. thermophilus*' tan etkilendiğini belirlemişlerdir. Farklı araştırmacılar tarafından da belirtilmiş olan yeterli proteoliz sistemlerinin bulunmasına rağmen yoğurt üretiminde kullanılan suşların serum proteinlerini parçalamada zayıf oldukları sonucuna varmışlardır.

Bu konu ile ilgili çalışmalardan bir tanesi de El-Zahar et al. (2003) tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar, Bianchi-Salvadori et al. (1995) ve Bertrand-Harb et al. (2003) ile benzer sonuçları bulmuşlar ve suşların proteolitik aktivitelerinin farklı olmasının yoğurtların fizikokimyasal ve reolojik özellikleri üzerinde etkili olduğunu belirtmişlerdir.

4.4. Yoğurtların Uçucu Aromatik Bileşenlerinin Belirlenmesi

Yoğurdun karakteristik tat/aroması, ağırlıklı olarak, *S. thermophilus* ve *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* tarafından sentezlenen laktik asit başta olmak üzere asetaldehit, aseton, diasetil gibi karbonil bileşikleri ile pürivik, oksalik ve süksinik asit gibi uçucu olmayan asitlerden kaynaklanmaktadır. *Lb. bulgaricus* ve *S. thermophilus*' un ortak etkileri yoğurtta arzu edilen lezzetin oluşması için gereklidir (Yalçın, 1985). Karbonil bileşiklerin ve laktik asitin yoğurdun tat/aroma dengesinin oluşmasındaki rolü birincil öneme sahiptir (Özer, 2006).

Yoğurtta karbonil bileşiklerin % 90' ını asetaldehit oluşturduğu için, yoğurt diğer fermente süt ürünlerinden farklı bir laktik tat ve aromaya sahiptir (Yalçın, 1985). Asetaldehit, yoğurdun temel aroma bileşenidir ve normal koşullarda yoğurtta 200-800 µmol/L düzeyinde bulunmaktadır. Karakteristik yoğurt tat/aromasının oluşması için ideal asetaldehit konsantrasyonu 10-25 ppm arasında değişmektedir. 4 ppm' in altındaki asetaldehit konsantrasyonlarında klasik yoğurt tat/aroması oluşmamaktadır. Buna karşın, çok yüksek asetaldehit konsantrasyonlarında yoğurtta anormal tat/aroma oluşumu gözlemlenmektedir (Özer, 2006).

Asetaldehidin oluşum oranı, büyük ölçüde ürünün asitlik seviyesine bağlıdır. Asetaldehit, pH 5.0' de oluşmaya başlamakta; miktarı pH 4.4-4.3' e kadar hızlı (42°C' de yaklaşık 3 saatte), daha sonra yavaş yavaş artarak pH 4.0 civarında sabitlenmektedir. Aynı zamanda, asetaldehit içeriğinin, asitliğin laktik asit cinsinden % 1.148' in üzerinde olması halinde azaldığı tespit edilmiştir (Yalçın, 1985).

Bills vd. % 8 veya daha fazla sakkaroz içeren ortamda asetaldehit oluşumunun azaldığını belirlemişlerdir. Ayrıca, yoğurt yapımında kullanılan sütün çeşidi, yoğurt bakterilerinin özellikleri, süte yüksek ısı işlem uygulanması, yağsız süttozu ilavesi veya sütün konsantre edilmesi ile kurumadde miktarının artırılmasının asetaldehit oluşumunu etkilediğini belirtmişlerdir (Yalçın, 1985). Kınık ve Akbulut (1996), inek sütüne soya sütü karıştırarak yaptıkları yoğurtlarda asetaldehit miktarının inek sütünden yapılan yoğurtlara göre daha düşük olduğunu belirlemişlerdir.

Groux, asetaldehit çok az miktarda bulunduğu zaman diasetil ve hatta asetoinin kısmen asetaldehidin yerine geçebildiğini ve böylece tipik yoğurt lezzetinin muhafaza edildiğini belirtmiştir (Yalçın, 1985).

Diasetil bir diğer karbonil bileşenidir. Dengeli yoğurt tat/aromasının oluşumu için asetaldehit ile diasetil arasında 1:1 oranının veya asetaldehit ile aseton arasında 2.8:1 oranının oluşması gerektiği ileri sürülmektedir (Özer, 2006).

Aroma maddeleri tayini 3.2.5.'te belirtildiği gibi yapılmıştır. Çizelge 4.24.'te görüldüğü gibi geleneksel yoğurt örneklerinin asetaldehit, diasetil, aseton, etanol değerleri sırasıyla 1.75-14.42 ppm; 0-1.51 ppm; 0-0.64 ppm ve 1.27-789.04 ppm arasında değişmektedir. Ticari yoğurt örneklerinde ise bu değerler sırasıyla 11.32-23.06 ppm; 0.66-1.03 ppm; 0-0.12 ppm ve 2.58-5.23 ppm arasında belirlenmiştir. Yoğurt örneklerinin uçucu aroma bileşenlerindeki bu farklılığın mikroorganizma içeriğindeki değişikliklerden ve üretim-depolama koşullarındaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Y5, Y6 ve Y8 yoğurtlarında görülen yüksek miktardaki alkol miktarı yoğurdun florasında bulunan koliform ve maya küf sayısı ile ilişkili bulunmuştur ($p < 0.01$). Yoğurtlarda alkol oluşumu yoğurt kültüründe yer alan bakterilerin özelliklerine bağlı olduğu kadar kullanılan sütün bileşimine de bağlı olarak değişmektedir (Kınık ve Akbulut, 1996). Oymael ve Us (2008), yaptıkları çalışmada depolama sıcaklığının yoğurdun aroma bileşenleri üzerinde etkili olduğunu belirtmişlerdir.

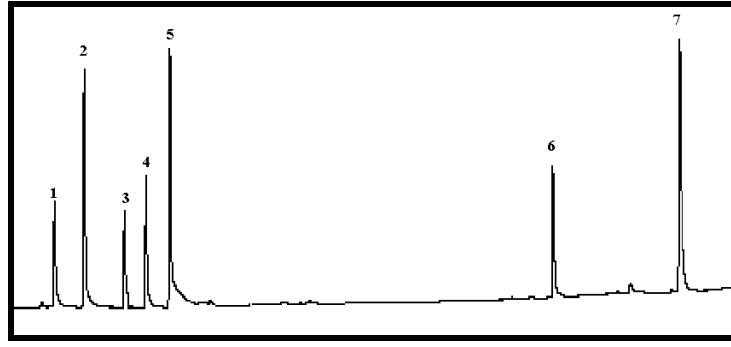
Geleneksel yoğurtlar için en önemli tat-koku ve aroma belirleyici olan asetaldehit miktarı, çalışılan yoğurtlarda genel olarak literatürde belirtilen değerlerden daha düşük olarak saptanmıştır. Ticari yoğurtlarda ise bu rakam belirtilen değerler arasında bulunmuştur. Aseton yoğurt örneklerinde oldukça düşük miktarda belirlenmiştir. Yoğurtta bulunan aseton genellikle süttten kaynaklanmış olsa da, yoğurt bakterileri tarafından bir miktar oluşturulmaktadır (Yalçın, 1985).

Çizelge 4.24. Yoğurtların aroma maddeleri

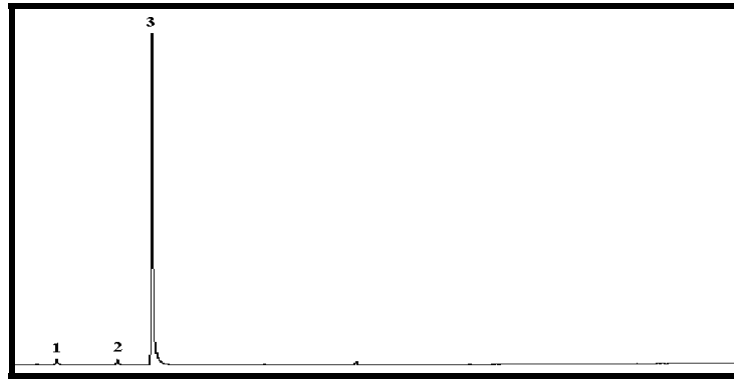
Yoğurt Örneği	Asetaldehit (ppm)	Aseton (ppm)	Etanol (ppm)	Diasetil (ppm)
Y1	7.63	*	1.46	*
Y2	7.23	0.01	3.84	*
Y3	12.59	0.07	23.85	*
Y4	10.94	0.10	25.62	*
Y5	9.59	0.64	98.05	0.25
Y6	6.12	*	789.04	*
Y7	13.69	*	1.56	*
Y8	1.75	0.45	198.93	*
Y9	10.11	*	1.77	0.43
Y10	8.99	0.07	1.71	1.51
Y11	9.99	0.12	2.16	1.34
Y12	9.25	*	1.60	0.44
Y13	7.48	*	1.27	0.45
Y14	12.99	0.17	2.83	1.28
Y15	14.42	0.01	1.62	*
TY1	11.32	*	2.58	1.02
TY2	23.06	0.12	5.23	1.03
TY3	13.82	*	4.13	0.66

*, tespit edilememiştir.

Şekil 4.14.' te gaz kromatografisinden elde edilen standarda ait kromatogram, Şekil 4.15.' te ise numuneye ait kromatogram görülmektedir. Standartlara ait alıkonma zamanları Çizelge 4.25.' te sunulmuştur.



Şekil 4.14. Standarda ait kromatogram 1) Asetaldehit, 2) Aseton, 3) Metanol, 4) Etanol, 5) Diasetil, 6) Asetik asit 7) Butirik asit



Şekil 4.15. Numuneye ait kromatogram 1) Asetaldehit, 2) Aseton, 3) Etanol

Çizelge 4.25. Standartlara ait alıkonma zamanları ve grafiklere ait değerler

Bileşen	R _t (dk.)	y=a+bx	R	SD
Asetaldehit	2.40	y=-3839+1201x	0.9989	4748.5
Aseton	3.48	y=5722+2223x	0.9997	3106.3
Metanol	4.96	-	-	-
Etanol	5.78	y=-6950+6760x	0.9983	4825.0
Diasetil	6.68	y=-858.5+8508x	0.9992	7649.5
Asetik asit	20.91	y=3347+34x	0.9991	682.8
Butirik asit	25.61	y=6387+236.7x	0.9994	866.5

Gürsoy-Balcı (2008), Farklı kültür kullanılarak koyun, keçi sütleri ve bunların karışımından üretilen yoğurtların depolama sırasında uçucu bileşenler ve serbest yağ asitlerinde meydana gelen değişimleri incelediği çalışmasında, depolama süresi, kültür ve zaman x kültürün ortak etkileşiminin asetaldehit miktarını önemli düzeyde etkilediğini belirtmiştir.

4.5. Liyofilize Yoğurt Serumlarında Lowry Yöntemi ile Protein Tayini

Liyofilize yoğurt serumlarının protein değerleri 3.2.2.5.2.'de belirtildiği gibi hassas ve küçük hacimlerde kullanıma uygun bir metot olması nedeniyle Lowry yöntemi ile yapılmıştır. Geleneksel ve ticari liyofilize yoğurt serumlarının protein değerleri (mg/mL) Çizelge 4.26.'da sunulmuştur.

Yapılan varyans analizi sonucunda, geleneksel ve ticari liyofilize yoğurt serumlarının protein miktarlarının birbirlerinden farklı olmadığı ($p>0.05$) ve 4 haftalık depolama süresince protein değerlerindeki değişimin istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur ($p>0.05$). Kırdar ve Gün (2007), yaptıkları süzme yoğurt çalışmasında serum protein içeriğinin 0.17-0.44 mg/mL arasında değiştiğini belirtmişlerdir.

Çizelge 4.26. Liyofilize yoğurt serumlarına ait protein değerleri (mg/mL)

Yoğurt	1.gün	1.hafta	2.hafta	3.hafta	4.hafta
Y1	0.528±0.01	0.555±0.01	0.620±0.02	0.684±0.00	0.652±0.03
Y2	0.356±0.03	0.386±0.00	0.355±0.03	0.376±0.00	0.611±0.07
Y3	0.289±0.04	0.349±0.08	0.364±0.00	0.386±0.01	0.396±0.06
Y4	0.290±0.03	0.323±0.02	0.326±0.01	0.356±0.02	0.333±0.03
Y5	0.343±0.03	0.338±0.03	0.389±0.00	0.384±0.00	0.404±0.00
Y6	0.372±0.00	0.345±0.00	0.400±0.00	0.435±0.01	0.373±0.00
Y7	0.343±0.01	0.364±0.01	0.385±0.00	0.350±0.03	0.383±0.00
Y8	0.365±0.01	0.401±0.07	0.407±0.01	0.416±0.05	0.406±0.01
Y9	0.394±0.02	0.418±0.02	0.343±0.30	0.373±0.07	0.437±0.01
Y10	0.321±0.00	0.329±0.01	0.329±0.10	0.362±0.02	0.349±0.00
Y11	0.326±0.00	0.346±0.03	0.351±0.02	0.365±0.04	0.356±0.03
Y12	0.385±0.00	0.359±0.04	0.371±0.01	0.418±0.00	0.438±0.01
Y13	0.251±0.05	0.314±0.02	0.314±0.10	0.316±0.00	0.325±0.00

Çizelge 4.26. (devam)

Y14	0.333±0.05	0.331±0.01	0.343±0.05	0.383±0.04	0.376±0.00
Y15	0.336±0.08	0.376±0.00	0.303±0.07	0.303±0.10	0.334±0.20
TY1	0.289±0.00	0.289±0.15	0.316±0.01	0.256±0.01	0.296±0.01
TY2	0.344±0.01	0.362±0.04	0.435±0.01	0.345±0.00	0.350±0.01
TY3	0.284±0.02	0.327±0.03	0.290±0.01	0.360±0.01	0.334±0.07
En yüksek	0.528±0.01	0.555±0.01	0.620±0.02	0.684±0.00	0.652±0.03
En düşük	0.251±0.05	0.289±0.15	0.290±0.01	0.256±0.01	0.296±0.01

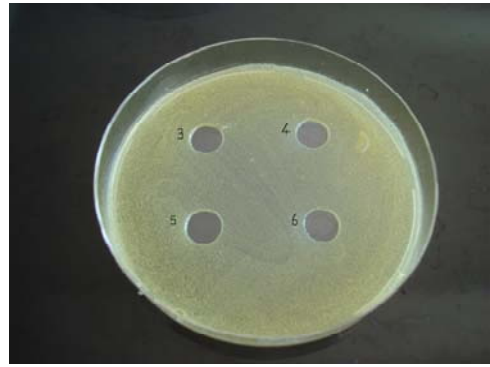
4.6. Liyofilize Yoğurt Serumlarının Antimikrobiyel Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.6.2.'de belirtildiği gibi antimikrobiyel aktivitenin belirlenmesi amacıyla indikatör ve patojen mikroorganizmalar seçilmiş ve liyofilize yoğurt serumlarının antimikrobiyel aktivitesini belirlemek amacıyla kuyucuk difüzyon testi kullanılmıştır.

Şekil 4.16.'da *M. luteus*'e karşı kloramfenikolün oluşturduğu inhibisyon zonu, Şekil 4.17.'de ise *M. luteus*'e karşı yoğurt örneklerine ait kuyucuklar görülmektedir.



Şekil 4.16. *M. luteus*'e karşı kloramfenikolün oluşturduğu inhibisyon zonu



Şekil 4.17. *M. luteus*'e karşı yoğurt örneklerine ait kuyucuklar

Geleneksel ve ticari yoğurtların liyofilize serumlarına uygulanan antimikrobiyel aktivite testi sonucunda herhangi bir zon tespit edilmemiştir.

Bölüm 4.3.'te belirtilen proteolitik aktivite değerleri ve 4.5.'te belirtilen protein tayin sonuçları göz önüne alındığında yoğurt fermentasyonu sırasında meydana gelen proteolizin antimikrobiyel aktivite gösteren peptitlerin açığa çıkmasını sağlayacak kadar yüksek olmadığını göstermektedir.

Tzvetkova et al. (2007), farklı sütlerden yapılan balkan ev tipi yoğurtlarından 21 adet *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* izole etmiş ve bu suşların α -La, β -Lg ve kazein üzerine etkilerini araştırmışlardır. Test edilen suşların proteolitik aktiviteleri yüksek olmasına rağmen bakteriyel gelişme düşük bulunmuştur. İlk 72 ve 96 saatlik inkübasyonda β -kazeinin %80-90' ı tükenmiştir. α -La miktarı ise kullanılan suşa göre %5-55 oranında azalmıştır. Suşların β -Lg' ni hidroliz etme kapasitesi ise α -La' ne göre daha düşük olmuştur. Kazeinin hidroliz olması ile açığa çıkan peptitlerin *Escherichia coli* ATCC 25922 üzerine antibakteriyel etkisi bulunmuştur. Çalışmada süt proteinlerinin suşlar ile ancak 24 saatlik inkübasyondan sonra açığa çıkan peptitlerin *E. coli* ATCC 25922 üzerine antimikrobiyel etki gösterdiği belirtilmiştir.

Erdoğrul ve Erbilir (2006), çeşitli gıdalardan izole edilen *Lb. bulgaricus* suşlarının *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Klebsiella pneumonia* ATCC 18833, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Enterobacter cloacae* ATCC 3047 üzerine antimikrobiyel etkisini araştırmışlardır. Sonuçta bu mikroorganizmalar üzerine *Lb. bulgaricus* izolatların antimikrobiyel etkisinin zayıf olduğunu bulmuşlardır.

Aslım ve Beyatlı (2000) tarafından yapılan çalışmada, literatür bilgilerinden farklı olarak laktik asit bakterilerinin oluşturduğu diasetil, asetaldehit ve hidrojen peroksitin inhibisyon etkilerinin olmadığı inhibisyon etkinin genellikle laktik asitten kaynaklandığı belirtilmiştir. Bunun haricinde laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosin benzeri metabolitlerin de inhibisyon etkilerinin olabileceği ifade edilmiştir.

Nurhajati et al. (2008), *Lb. bulgaricus*, *S. thermophilus* ve karışık kültürlerini kullanarak soya sütünden ayrı ayrı yoğurt (soygurt) yapmışlardır ve fermentasyonun 3., 12. ve 21. saatlerinde *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, ve *Salmonella typhimurium* üzerine antimikrobiyel etkisini araştırmışlardır. Sonuçta 21. saatte karışık kültürden elde edilen soya yoğurdunun 12 mm inhibisyon çapı ile en yüksek aktiviteyi verdiğini belirtmişlerdir.

4.7. Liyofilize Yoğurt Serumlarının Antioksidan Aktivite Miktarlarının Belirlenmesi

4.7.1. ABTS yöntemi ile toplam antioksidan aktivite tayini

Antioksidanların en önemli özelliği serbest radikalleri yakalamalarıdır. Tepkimeye girme özellikleri yüksek olan serbest radikaller ve oksijen molekülleri biyolojik sistemlerde bulunmaktadır. Bu serbest radikaller, nükleik asitleri, proteinleri, lipidleri ve DNA' yı oksitleyebilmekte ve birtakım hastalıkların oluşmasına öncül olabilmektedirler (Zainoldin and Baba, 2010).

ABTS yöntemi ile antioksidan aktivite tayini 3.2.6.3.1.'de belirtildiği gibi yapılmıştır. Çizelge 4.27.'de geleneksel ve ticari yoğurt örneklerinin liyofilize serumlarının depolama süresince toplam antioksidan aktivite değerleri, ortalama değerlerine göre karşılaştırmaları ise Şekil 4.18.'de sunulmuştur.

Yapılan varyans analizi sonucunda, geleneksel ve ticari yoğurtlardan elde edilen liyofilize serumların birbirlerinden istatistik olarak farklı olduğu ($p < 0.01$) ve 4 haftalık depolama süresince ise troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) değerlerindeki değişimin önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0.01$). Varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma testinin sonuçları Çizelge 4.28.'de sunulmuştur. Yoğurtların depolanması sırasında açığa çıkan peptit miktarına bağlı olarak antioksidan aktivitenin arttığı görülmektedir.

Antioksidan aktivite ile proteolitik aktivite karşılaştırıldığında liyofilize yoğurt serumlarında proteolizin yani çözünür peptitlerin oluşum hızıyla antioksidan

aktivitedeki değişimin benzer olduğu ve aralarında pozitif bir korelasyon olduğu görülmektedir ($p<0.01$).

Laktik asit bakterileri tarafından sütün fermente olması ile açığa çıkan antioksidan peptitlerin araştırıldığı çalışmalarda radikal giderme aktivitesinin suşa bağlı özellik olduğu ve bu durumun proteolizle ilişkili olduğu belirtilmektedir (Kudoh et al., 2001; Ryhänen et al., 2001; Hernández et al., 2005; Virtanen et al., 2007; Gupta et al., 2009).

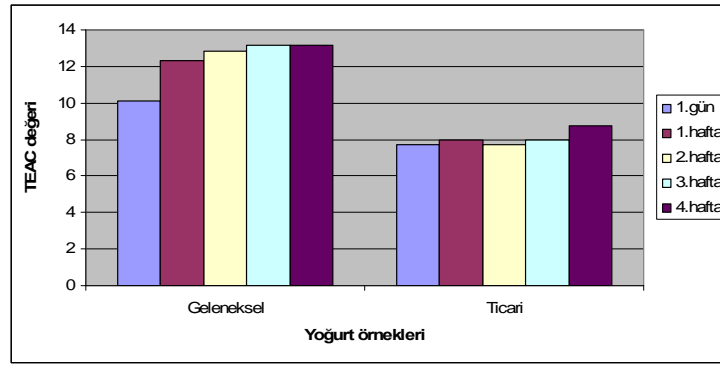
Çizelge 4.27. Liyofilize yoğurt serumlarının antioksidan aktivite değerleri (mM troloks/g liyofilize örnek)

Yoğurt	1.gün	1.hafta	2.hafta	3.hafta	4.hafta
Y1	9.518±0.04	11.820±0.06	12.210±0.12	11.617±0.32	12.159±0.32
Y2	11.106±0.03	15.851±0.09	14.607±0.21	15.170±0.56	17.333±0.31
Y3	13.446±0.10	15.508±0.13	17.166±0.10	15.595±0.12	16.825±0.35
Y4	10.582±0.12	12.996±0.15	13.895±0.09	14.981±0.32	15.075±0.09
Y5	10.223±0.07	16.296±0.10	15.790±0.05	16.228±0.12	19.316±0.12
Y6	10.660±0.04	11.827±0.11	14.896±0.05	14.901±0.32	14.896±0.21
Y7	10.716±0.02	12.319±0.12	10.388±0.09	12.648±0.54	11.101±0.32
Y8	11.707±0.14	13.527±0.21	14.408±0.22	17.288±0.32	14.981±0.23
Y9	7.637±0.13	11.832±0.04	12.103±0.20	14.521±0.43	12.159±0.22
Y10	10.269±0.03	10.175±0.31	10.175±0.10	9.715±0.12	10.681±0.32
Y11	6.880±0.06	11.084±0.23	11.898±0.12	11.119±0.23	11.011±0.10
Y12	10.713±0.14	12.355±0.21	13.643±0.07	12.579±0.32	13.482±0.32
Y13	7.937±0.15	9.242±0.15	9.242±0.06	8.779±0.51	8.304±0.09
Y14	9.451±0.24	8.482±0.09	12.291±0.14	13.030±0.32	10.099±0.07
Y15	10.864±0.16	11.813±0.17	9.546±0.07	9.546±0.21	9.812±0.05
TY1	6.783±0.09	6.890±0.09	7.346±0.09	6.639±0.11	6.787±0.09
TY2	9.108±0.05	9.651±0.06	10.051±0.04	8.917±0.12	10.010±0.19
TY3	7.199±0.09	7.369±0.08	5.729±0.08	8.315±0.09	9.418±0.21
En yüksek	13.446±0.10	16.296±0.10	17.166±0.10	17.288±0.32	19.316±0.12
En düşük	6.783±0.09	6.890±0.09	5.729±0.08	6.639±0.11	6.787±0.09

Çizelge 4.28. Antioksidan aktivite değerlerine ait Tukey çoklu karşılaştırma test sonuçları

Yoğurt Örnekleri	ABTS (mM troloks/ g liyofilize örnek)				
	1.GÜN	1.HAFTA	2.HAFTA	3.HAFTA	4.HAFTA
Geleneksel	10.115±0.41Ba*	12.342±0.56aA	12.818±0.60aA	13.182±0.64aA	13.149±0.78aA
Ticari	7.697±0.93aB	7.970±1.25aB	7.709±1.35aB	7.958±1.43aB	8.739±1.74aB

*Yoğurt tipi arasındaki farklılık büyük harfle, zamanlar arasındaki farklılık küçük harfle gösterilmiştir. Aynı harfle işaretlenmiş olan ortalamalar istatistik olarak birbiri ile aynıdır (p>0.05).



Şekil 4.18. Liyofilize yoğurt serumlarının antioksidan aktivite sonuçlarının karşılaştırılması

Gupta et al. (2009), peynirlerde antioksidan aktivitenin belli bir aşamaya kadar proteolizin derecesine bağlı olduğunu ve kullanılan starter kültürün tipine göre değiştiğini belirtmişlerdir.

Ong et al. (2007)' da benzer şekilde peynirlerde ACE inhibitör aktivite gösteren biyoaktif peptit oluşumunun süt ürününün çeşidine ve kullanılan suşların proteolitik aktivitesine göre değiştiğini belirtmişlerdir. Yapılan farklı çalışmalarda da ACE inhibitör aktivite gösteren peptitlerin farklı peynirlerde bulunduğu ve bu farklılığın da starterin tipine ve depolama koşullarındaki farklılığa bağlı olduğunu belirlemişlerdir (Gouldsworthy et al., 1996; Hailellassie, 1999; Hailellassie et al., 1999; Saito et al., 2000; Ryhänen et al., 2001; Gupta et al., 2009).

Geleneksel yoğurt örnekleri ile ticari yoğurt örnekleri arasında 4.2.1. ve 4.2.2.'de belirtildiği gibi mikrobiyolojik yük açısından çok büyük farklılık bulunmaktadır.

Özellikle geleneksel yoğurt örneklerinin koliform grubu bakteri ve maya-küf içeriği ticari yoğurt örneklerine göre çok yüksektir. Mikroorganizma içeriğine paralel olarak antioksidan aktivite ile koliform grubu bakteri ve maya-küf sayım sonuçları arasında korelasyon bulunmuştur ($p<0.01$). Ayrıca 4.1.3' te de görüldüğü gibi geleneksel yoğurt örneklerinin pH değerleri ticari yoğurt örneklerine oranla daha düşüktür. Buna bağlı olarak antioksidan aktivite ile pH değeri arasında negatif, % laktik asit değeri (4.1.2.) ile pozitif korelasyon tespit edilmiştir ($p<0.01$).

Virtanen et. al. (2007), farklı laktik asit bakteri kullanılarak fermente edilen sütlerde antioksidan aktivite gelişimini inceledikleri çalışmalarında radikal giderme aktivitesi ile proteolitik aktivite ve bakteriyel gelişme (*Lb. acidophilus* ve *Lb. helveticus*) arasında pozitif bir korelasyon bulmuşlardır. *Leuc. cremoris*, *Lc. lactis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. jensenii* ve *Lb. helveticus* suşlarının radikal giderme aktivitelerinin olduğunu ve lipid peroksidasyonunu önlediklerini, ABTS radikal giderme aktivitenin proteolizin ilerlemesi ile artış gösterdiğini ve genellikle fermentasyon süresince aktivitenin arttığını bulmuşlardır. Ayrıca peptid profilleri karşılaştırıldığında 4-20 kDa arasındaki bileşenlerin ABTS denemesinde daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. *Lb. jensenii*' nin süt içerisinde hızlı geliştiğini ve diğer bakterilerden daha önce yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca en düşük proteolitik aktivite değerine sahip (hidroliz derecesi %8) olan *Lb. lactis* ile fermente olan sütün ABTS denemesinde de en düşük antioksidan aktiviteye sahip olduğu (0,16 mmol/L) ve benzer şekilde yüksek proteolitik aktivite gösteren *Lb. jensenii* ve *Leuc. cremoris* suşlarının (hidroliz derecesi %13 ve %12) gösterdiği antioksidan aktiviteninde yüksek olduğunu bulmuşlardır. Bununla beraber *Lb. helveticus* en yüksek proteolitik aktiviteye sahip olmasına rağmen orta derecede antioksidan aktivite göstermiştir. Bu sonuçta radikal giderme aktivitesinin, fermente ürünün yüksek proteolitik durumundan daha çok bakterilerin kendine özgü proteolitik enzimlerine bağlı olduğunu göstermektedir.

4.7.2. DPPH yöntemi ile toplam antioksidan aktivite tayini

DPPH stabil, serbest bir radikaldır ve 517 nm' de kuvvetli absorbands verir (Szabo et al., 2007; Zhang et al., 2008; Park et al., 2008). DPPH radikali indirgendiği zaman absorbands azalır. DPPH yöntemi ile toplam antioksidan aktivite tayininde, sonuçlar örnek yok iken DPPH radikalinin gösterdiği absorbandsın örnek ilave edildikten sonra meydana gelen renk indirgenmesine göre hesaplanır (Bandoniené and Murkovic, 2002).

Bu çalışmada peptitlerin antioksidan aktivite değerlerinin belirlenmesinde 3.2.6.3.'te belirtildiği gibi literatürde en sık kullanılan DPPH ve ABTS yöntemi kullanılmıştır. DPPH ile ABTS yöntemlerinin radikal giderme kapasiteleri arasındaki farklılık kısmen radikallerin çözünürlüğü ve reaksiyon ortamındaki yayılma güçleri arasındaki farklılığa bağlıdır. DPPH yöntemi, doğal gıdalarda antioksidan aktivitenin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir metot olmasına rağmen hidrofilik antioksidanların aktivitesinin belirlenmesinde bir sınırlama bulunmaktadır. Çünkü DPPH sadece organik çözücüler içerisinde çözünebilmekte sulu ortamlarda çözünmemektedir (özellikle alkol içeren ortamlar). ABTS⁺⁺ ise organik çözücülerde çözünmesinin yanı sıra sulu ortamlarda da çözünebilmektedir. Böylece ABTS⁺⁺ ile hem hidrofilik hem de lipofilik bileşenlerin radikal giderme aktiviteleri ölçülebilmektedir (Tang et al., 2010). Bu çalışmada elde edilen veriler de ABTS⁺⁺ metodunun suda çözünen protein ve peptitlerin antioksidan aktivitesinin ölçülmesinde DPPH yöntemine göre daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Çizelge 4.29 ve 4.30 incelendiğinde % inhibisyon ve IC₅₀ değerleri arasında 4 haftalık depolama periyodunda bazı değerlerde oransız değişimler görülmektedir. Bu durum analiz sırasında meydana gelen bulanıklıktan kaynaklanmıştır. Bu bulanıklıktan dolayı görülen sapmalar nedeni ile peptit analizlerinde sadece ABTS yöntemi kullanılmış DPPH yönteminin uygun olmadığı belirlenmiştir. Chen et al. (2003), az yağlı süt fraksiyonlarında, süt ve peyniraltı suyu proteinlerinin toplam antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde ABTS yönteminin daha kullanışlı olduğunu belirtmişlerdir.

Çizelge 4.29.' da geleneksel ve ticari yoğurt örneklerinin depolama süresince DPPH yöntemi ile toplam antioksidan aktivitesine ait inhibisyon değerleri görülmektedir.

Çizelge 4.29. Liyofilize yoğurt serumlarının depolama süresince inhibisyon değerleri (%)

Yoğurt	mg/mL	1.gün	1.hafta	2.hafta	3.hafta	4.hafta
Y1	12.5	43.478±1.42	45.085±1.62	49.244±0.99	47.732±0.12	46.597±0.85
	6.25	38.280±2.18	40.170±2.12	30.435±5.57	39.981±1.67	32.703±6.87
Y2	12.5	42.155±3.56	47.448±1.21	44.802±2.24	54.820±6.36	20.000±5.95
	6.25	31.002±1.23	32.703±0.87	14.367±3.89	25.520±2.67	15.208±5.86
Y3	12.5	75.047±1.76	84.877±3.89	84.688±2.86	83.554±1.94	75.803±3.73
	6.25	41.210±0.43	39.887±0.34	44.423±0.79	32.514±3.86	25.142±4.25
Y4	12.5	58.601±7.34	75.803±5.86	70.888±1.67	75.803±3.23	74.480±5.23
	6.25	34.594±3.23	37.240±1.43	22.117±7.21	27.032±4.23	39.698±2.56
Y5	12.5	62.533±6.32	68.242±3.12	79.962±3.12	81.664±2.11	89.036±3.11
	6.25	40.076±0.92	41.966±2.32	45.558±2.44	50.095±1.23	28.922±5.32
Y6	12.5	55.388±3.12	44.234±2.13	44.612±3.11	52.552±3.23	45.747±1.22
	6.25	34.972±1.11	26.465±2.56	27.221±2.43	25.142±1.11	36.673±1.45
Y7	12.5	42.911±2.34	39.509±0.67	40.643±0.34	43.667±0.12	45.369±0.34
	6.25	28.922±0.45	27.599±0.99	28.922±0.67	27.788±0.56	27.977±0.43
Y8	12.5	65.217±0.89	67.297±0.56	63.894±0.56	66.163±0.94	66.352±0.78
	6.25	40.454±0.67	40.265±0.65	36.673±1.78	33.648±3.45	41.021±2.56
Y9	12.5	58.223±4.23	52.741±2.45	50.675±3.12	44.991±5.33	49.716±3.56
	6.25	34.405±5.32	25.142±1.23	24.768±0.56	26.465±2.13	27.599±2.15
Y10	12.5	65.406±4.59	49.338±1.13	49.346±1.57	50.851±2.13	57.656±3.45
	6.25	36.295±4.56	25.520±1.57	25.468±1.34	27.977±1.36	28.166±1.59
Y11	12.5	41.777±2.45	32.514±1.35	24.764±1.45	31.191±0.94	43.856±1.23
	6.25	31.947±0.45	20.435±5.32	11.928±5.89	20.794±2.12	20.416±2.35
Y12	12.5	55.009±0.69	51.796±0.48	35.728±4.78	40.832±3.69	56.522±0.23
	6.25	27.788±2.45	39.698±5.34	25.142±2.34	30.246±4.69	29.490±2.13
Y13	12.5	38.185±4.25	40.265±4.23	38.347±2.69	29.868±1.23	39.112±1.98
	6.25	32.703±1.34	27.410±1.99	25.564±1.66	15.142±1.59	26.922±0.55
Y14	12.5	32.325±0.12	30.435±0.57	44.423±0.97	28.733±2.45	31.002±2.34
	6.25	28.733±2.39	20.605±3.78	26.654±0.34	22.495±0.70	5.860±3.89
Y15	12.5	35.539±3.45	38.941±2.56	50.851±1.68	50.756±0.90	50.657±0.59
	6.25	24.197±1.67	20.794±0.97	25.898±0.78	25.675±0.99	25.789±1.49

Çizelge 4.29. (devam)

TY1	12.5	27.032±0.68	25.343±1.48	26.465±1.59	34.405±4.54	27.788±2.48
	6.25	12.854±0.57	12.656±0.68	11.720±4.59	23.062±1.59	15.142±1.80
TY2	12.5	42.533±2.59	42.911±4.32	50.473±3.59	53.119±1.20	47.070±2.10
	6.25	28.355±0.12	25.456±3.49	32.703±1.39	27.221±3.11	29.112±1.11
TY3	12.5	39.698±0.90	43.667±0.65	43.856±0.39	38.941±0.40	42.911±1.49
	6.25	27.032±0.79	28.544±0.59	27.221±0.99	28.355±0.40	26.465±1.33

Liyofilize yoğurt serumlarına ait IC₅₀ (mg/mL) değerleri Çizelge 4.30.'da sunulmuştur.

Çizelge 4.30. Liyofilize yoğurt serumlarının depolama süresince IC₅₀ (mg/mL) değerlerindeki değişim

Yoğurt	1.gün	1.hafta	2.hafta	3.hafta	4.hafta
Y1	20.340	18.750	12.751	14.329	14.030
Y2	16.896	13.582	13.567	11.472	13.567
Y3	7.874	7.655	7.116	8.391	9.317
Y4	10.261	8.318	9.823	9.193	8.101
Y5	9.012	8.161	7.057	6.231	8.441
Y6	10.851	14.528	14.436	11.918	15.430
Y7	15.667	18.006	17.490	14.993	14.164
Y8	8.650	8.501	9.310	9.393	8.466
Y9	10.342	11.879	14.461	14.190	12.580
Y10	9.192	12.673	12.673	12.268	10.877
Y11	17.728	21.547	24.788	23.807	14.138
Y12	11.350	11.573	20.926	17.912	10.992
Y13	25.971	17.233	18.197	21.044	17.690
Y14	43.254	24.940	14.461	33.807	17.223
Y15	20.469	16.309	12.287	12.287	15.194
TY1	22.625	22.625	22.476	21.094	23.477
TY2	15.792	15.038	12.334	11.747	13.520
TY3	17.584	15.117	14.808	19.029	15.194

Nishino et al. (2000), ısı uygulamasının yağsız sütün DPPH radikal giderme aktivitesini artırdığını ve *Lb. casei* Shirota suşu ile fermente edilmesi ile aktivitenin daha da arttığını bulmuşlardır. Fermentasyon sırasında kazeinin hidroliz olmasının radikal giderme aktivitesinin artmasına neden olan faktörlerden bir tanesi olduğunu belirtmişlerdir.

Kudoh et al. (2001), yaptıkları bir çalışmada *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ile fermente edilmiş sütte κ -kazein kaynaklı peptitlerde DPPH serbest radikal giderme aktivitesine rastlamışlardır. Bu peptit κ -kazeinin 96–106 fragmenti olup, amino asit dizilimi Ala–Arj–His–Pro–His–Pro–His–Leu–Ser–Phe–Met’ dir.

Liu et al. (2005), fermente olmuş soya sütünün DPPH radikal giderme aktivitesinin fermente olmamış süte oranla daha yüksek olduğunu ve bu sütlere kefir taneleri ilave edilip fermente edildiğinde DPPH radikal giderme aktivitesinin arttığını, kefir tanelerinin aktivitesi sonrasında süte ve soya sütüne antioksidan özellikler gösteren bileşiklerin geçtiğini belirtmişlerdir. McCue and Shetty (2005) ise benzer şekilde soya sütünden kefir taneleri kullanarak yoğurt üretmişler ve DPPH radikal giderme aktivitesindeki artışı fenolik bileşenlerdeki hareketliliğe bağlamışlardır (Smet et al., 2008).

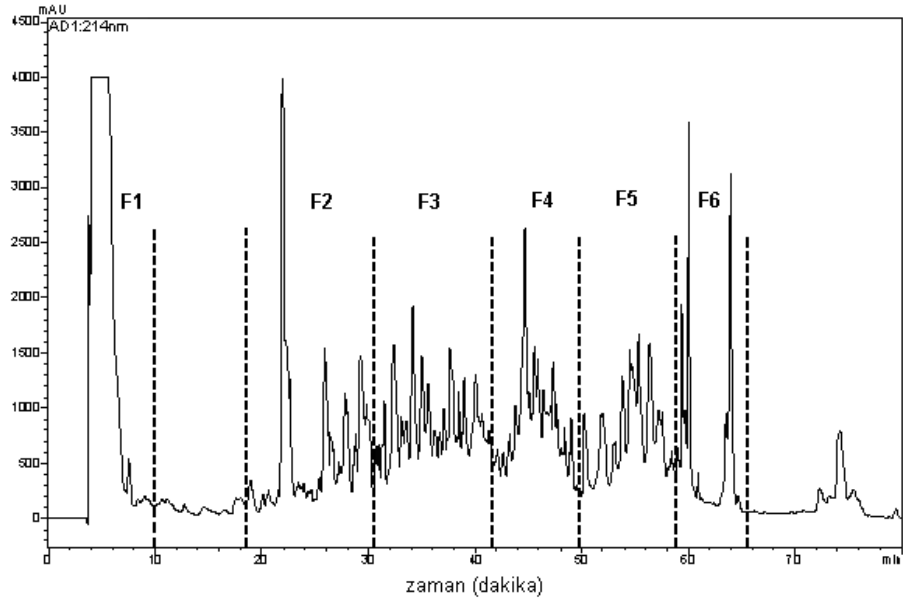
Gómez-Ruiz et al. (2008), koyun sütünün kazein fraksiyonlarında sindirim sistemi enzimleri ile sindirim öncesi ve sonrasında antioksidan aktivite miktarlarındaki değişimi belirlemişlerdir. Bütün fraksiyonlarda (özellikle κ -kazein fraksiyonunda) enzimatik hidrolizin antioksidan aktiviteyi artırdığını bulmuşlardır. κ -Kazein fraksiyonunun hidrolizi ile elde edilen His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser-Phe (f 98-105) olarak tanımlanan peptidin özellikle bu aktiviteden sorumlu olduğunu belirtmişlerdir.

Zainoldin and Baba (2010), sade yoğurdu farklı meyvelerle zenginleştirmişler ve DPPH yöntemi ile toplam antioksidan aktivite miktarlarını tespit etmişlerdir. Çalışmada meyve ile zenginleştirilmiş yoğurtların kontrol (sade) yoğurduna göre inhibisyon değerlerinin daha yüksek olduğunu, meyveli yoğurtların inhibisyon

değerlerinin %19.16-45.74 arasında değiştiğini ve en yüksek etkiyi dragon meyvesinin gösterdiğini belirtmişlerdir.

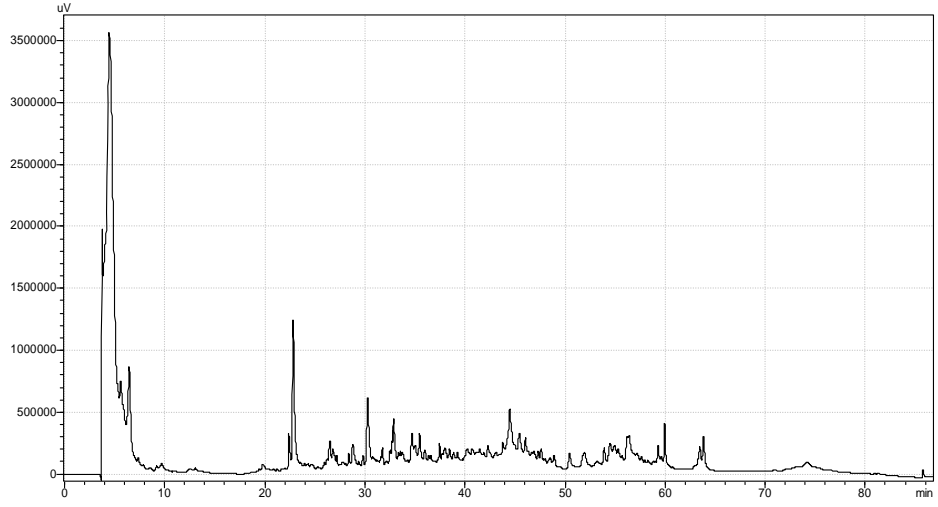
4.8. Yoğurtların Liyofilize Serumlarından Ters faz-HPLC ile Peptit Eldesi

Liyofilize yoğurt serumları 3.2.6.1.'de belirtildiği gibi HPLC analizi için hazırlanmıştır. Fraksiyonlar Şekil 4.19.'da görüldüğü gibi kodlanmıştır. En yüksek aktiviteyi gösteren fraksiyonlar daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.



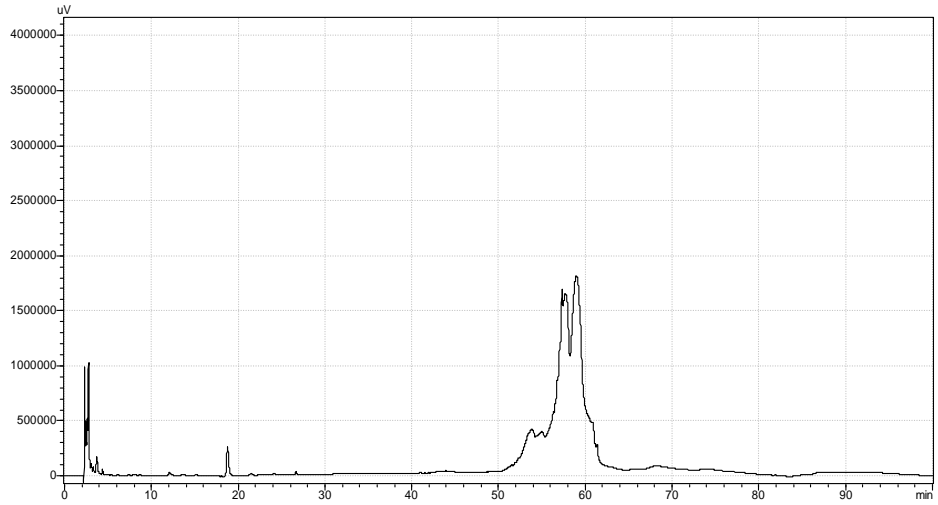
Şekil 4.19. HPLC analizinden elde edilen kromatogramların kodlanması

Şekil 4.20.' de Y13 yoğurdunun 4. hafta örneğine ait kromatogram görülmektedir.



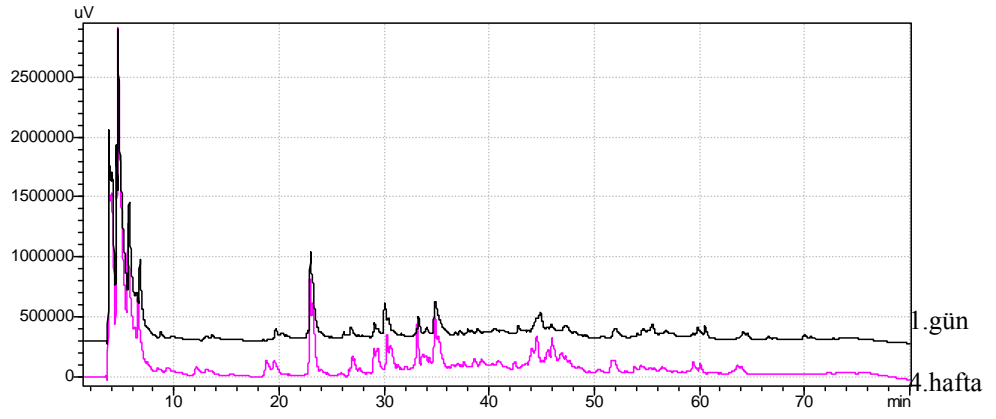
Şekil 4.20. Y13 yoğurdunun 4. hafta örneğine ait kromatogram

Yoğurtların serumları ile skim milk arasındaki farklılığı görebilmek amacı ile % 10' luk skim milk hazırlanmış, 0.45 µm çaplı filtreden geçirilerek HPLC kolonuna aynı şartlarda enjekte edilmiştir. Skim milk' e ait kromatogram Şekil 4.21.' de görülmektedir.

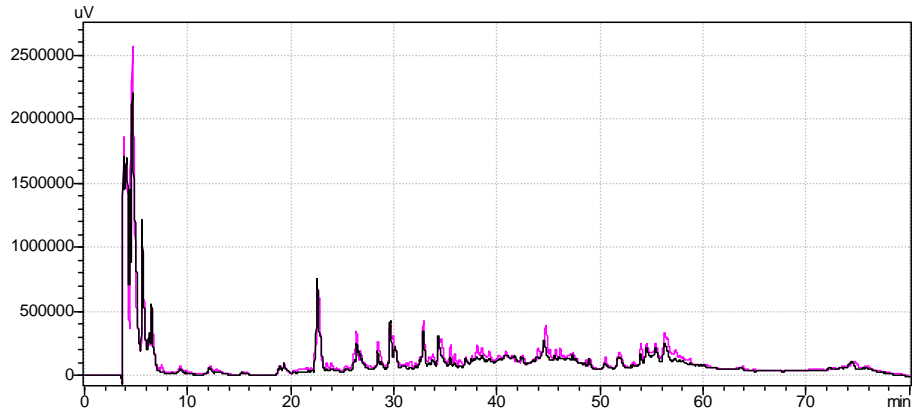


Şekil 4.21. Skim milk' e ait kromatogram

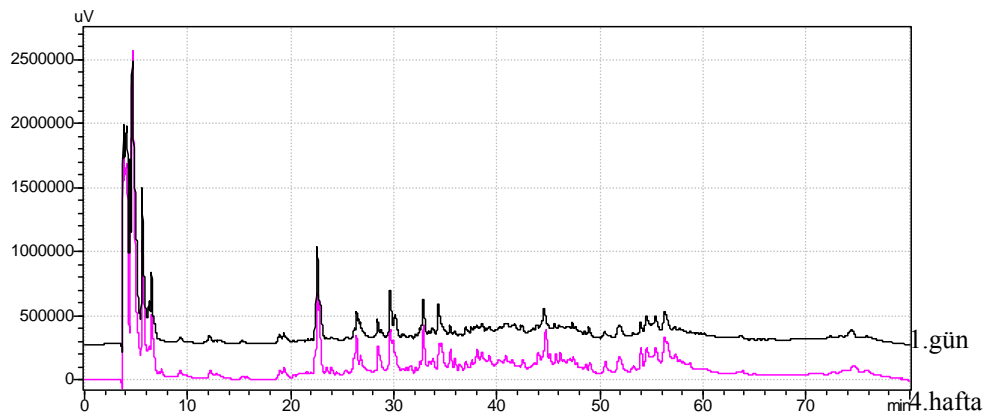
Liyofilize yoğurt serumlarının depolama süresince peptit profillerinde meydana gelen değişimi görebilmek amacı ile 1. gün ve 4. haftasına ait örnekler HPLC analizine tabi tutulmuşlardır. Şekil 4.22. ve Şekil 4.23.' te Y1 örneğinin, Şekil 4.24. ve Şekil 4.25.' te Y7 örneğinin 1. gün ve 4. haftasına ait kromatogramlar görülmektedir.



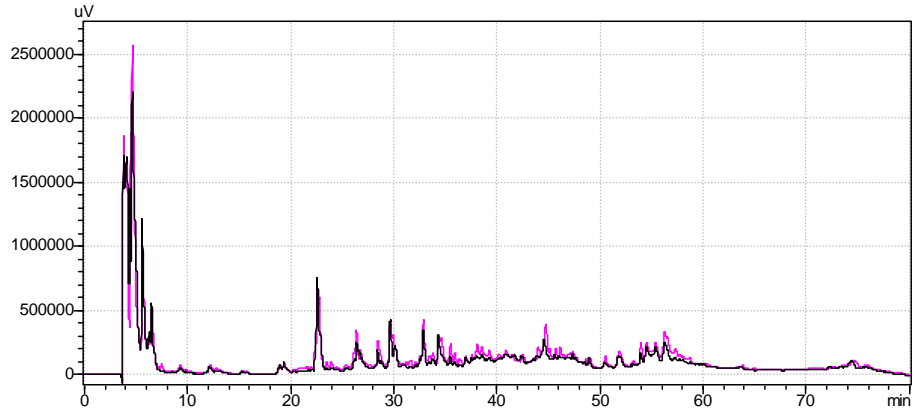
Şekil 4.22. Y1 örneğinin 1. gün ve 4.haftasına ait kromatogram



Şekil 4.23. Y1 örneğinin 1. gün ve 4.haftasına ait kromatogram

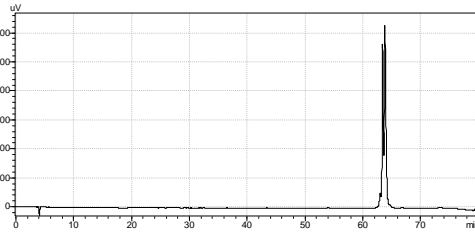


Şekil 4.24. Y7 örneğinin 1. gün ve 4.haftasına ait kromatogram

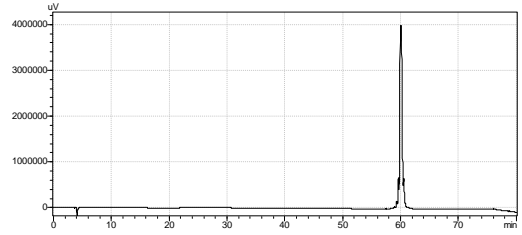


Şekil 4.25. Y7 örneğinin 1. gün ve 4.haftasına ait kromatogram

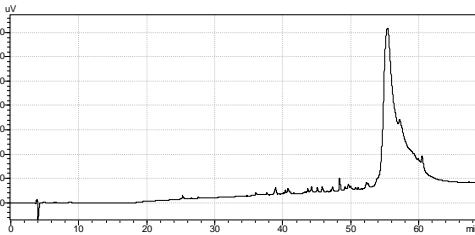
Kazein ve serum proteinlerinin 3.2.7.' de belirtilen HPLC şartlarında alıkonma sürelerinin belirlenmesi için β -Lg (Sigma), α -La (Sigma), κ -kazein (Sigma), β -kazein (Sigma), ve α -kazein (Sigma) standartları HPLC analizine tabi tutulmuştur. Şekil 4.26.-Şekil 4.31.' de standartlara ait kromatogramlar görülmektedir.



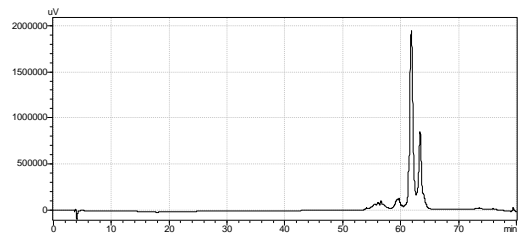
Şekil 4.26. β -laktoglobuline ait kromatogram



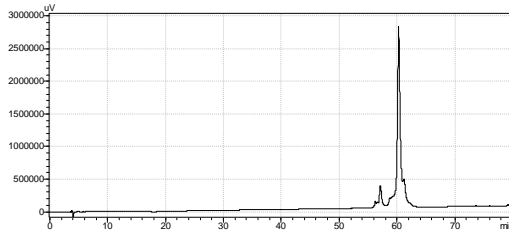
Şekil 4.27. α -laktalbumine ait kromatogram



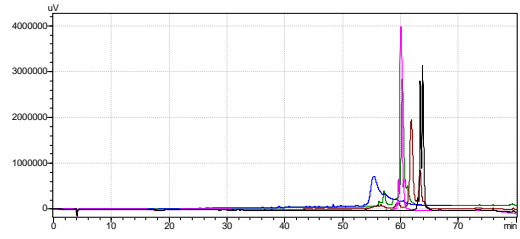
Şekil 4.28. κ -kazeine ait kromatogram



Şekil 4.29. β -kazeine ait kromatogram



Şekil 4.30. α -kazeine ait kromatogram



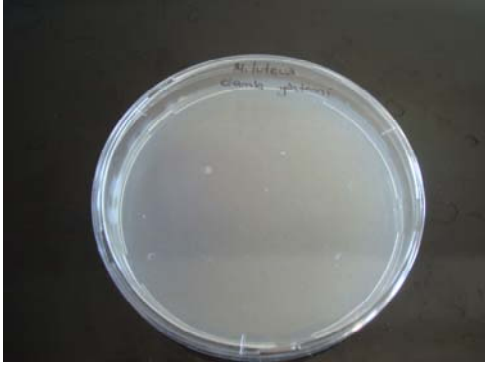
Şekil 4.31. β -laktoglobuline (siyah), α -laktoalbumine (pembe), κ -kazeine (mavi), β -kazeine (kahve), α -kazeine (yeşil) ait kromatogramların gösterimi

Liyofilize yoğurt serumlarının depolanma sürecinde % laktik asit (4.1.2.), pH (4.1.3.), proteolitik aktivite (4.3.) ve antioksidan aktivite (4.7.) değerlerinde değişimler gözlenirse de yoğurt örnekleri arasındaki kromatogramların benzer olduğu, depolama süresince değişimin pik alanlarında kantitatif farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

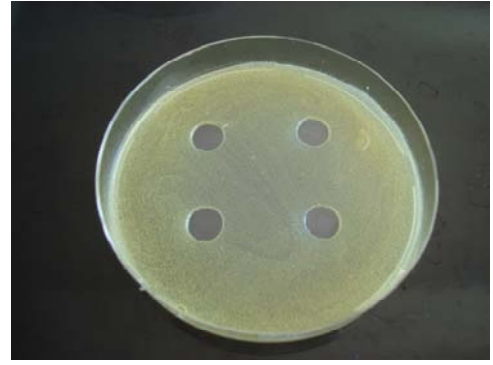
Papadimitriou et al. (2007), yoğurt kültürü ve yoğurt kültürüne ilave *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* DC412 suşunu içeren geleneksel ve probiyotik koyun yoğurdunu 26 günlük depolanması sırasında inceledikleri çalışmalarında yoğurt örneklerinin suda çözünür ekstraktlarının peptit profilinin birbiri ile benzer olduğunu, fakat bazı piklerin alanlarında kantitatif farklılıkların gözlendiğini belirtmişlerdir. Ayrıca probiyotik yoğurdun suda çözünür ekstraktında çoğu pikin depolamanın ikinci gününde olduğunu belirtmişlerdir. Depolama süresince piklerin yüksekliği artmış fakat kromatografik profilde önemli bir değişiklik görülmemiştir.

4.8.1. Peptitlerin antimikrobiyel özelliklerinin belirlenmesi

Peptitlerin antimikrobiyel özelliklerinin belirlendiği ön denemelerde agar difüzyon ve kuyucuk difüzyon testleri kullanılmış. Yöntemler arasında farklılık görülmemesi nedeniyle kuyucuk difüzyon yöntemi tercih edilmiştir. 4.6.' da belirtildiği gibi liyofilize yoğurt serumlarında antimikrobiyel aktivite tespit edilmemesine rağmen örnekler 4.8.' de gösterildiği gibi fraksiyonlanmış ve elde edilen peptit fraksiyonlarına 3.2.6.2.' de belirtildiği gibi antimikrobiyel deneme yapılmıştır. Şekil 4.32.'de ve 4.33.'te antimikrobiyel deneme yöntemlerine ait fotoğraflar sunulmuştur.



Şekil 4.32. Agar difüzyon yöntemi ile antimikrobiyel deneme



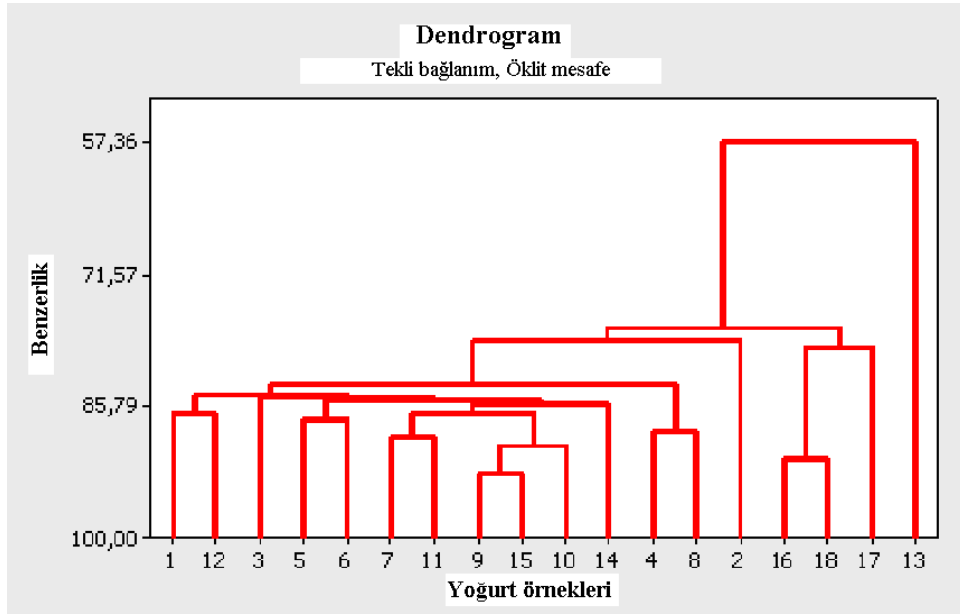
Şekil 4.33. Kuyucuk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyel deneme

Chatterton et al. (2006), β -Lg' nin tripsin ile proteolitik olarak parçalanması ile açığa çıkan 4 peptidin (f15-20, f25-40, f78-83 ve f92-100) Gram-pozitif bakterilere karşı antimikrobiyel etkisi olduğunu belirlemişlerdir. Peptitlerin amino asit kompozisyonununun değişmesi ile bakterisit etkinin arttığı ve Gram-negatif (Örn: *E.coli*) mikroorganizmalar üzerinde de etkili olduğunu ifade etmişlerdir. Araştırmacılar, β -Lg' nin *in vivo* koşullarda pankreas endopeptidazları ile kısmi sindirimi sırasında da bu antimikrobiyel etkinin görülebileceğini belirtmişlerdir.

Yapılan farklı çalışmalarda benzer antimikrobiyel etkinin α -La ve β -Lg' nin pepsin, tripsin, kimotripsin gibi enzimler ile parçalanması sonrasında da görüldüğü belirtilmektedir (Pihlanto-Leppälä et al., 1999; Pellegrini et al., 1999, 2001).

4.9. Seçilen yoğurt örnekleri ile ileri fraksiyonlama denemesi

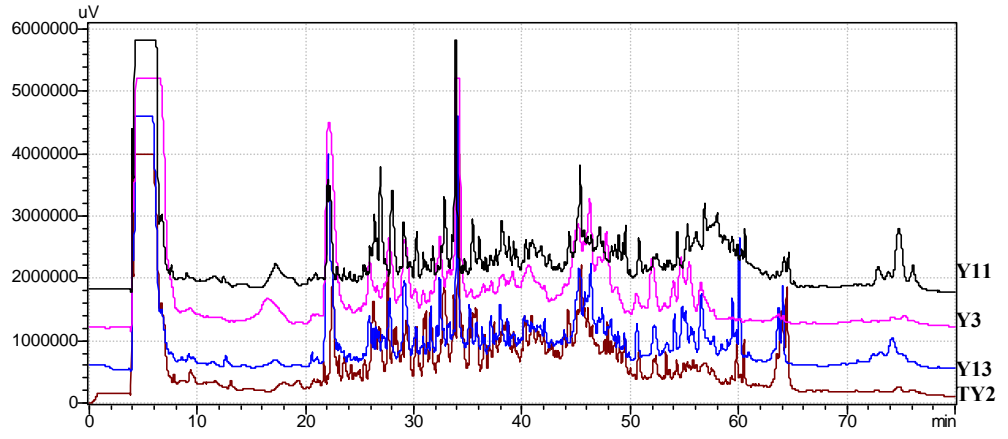
Bölüm 3.2.8.' de belirtildiği gibi yoğurt örnekleri kümeleme analizine tabi tutulmuştur. Şekil 4.34.' te kümeleme analizine ait dendrogram görülmektedir. Burada 1'den 15' e kadar numaralanan yoğurt örnekleri sırasıyla Y1' den Y15' e kadar geleneksel yoğurt örneklerini, 16' dan 18' e kadar numaralanmış örnekler ise sırasıyla TY1, TY2 ve TY3' e ait ticari yoğurt örneklerini simgelemektedir.



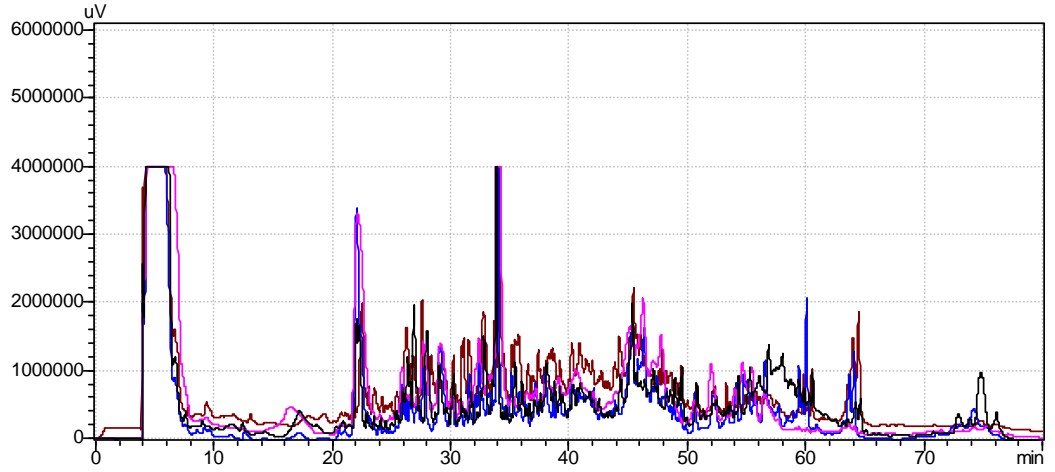
Şekil 4.34. Geleneksel ve ticari yoğurt örneklerinin kümeleme analizine ait dendrogram

Kümeleme analizi sonrasında Y3, Y11, Y13 ve TY2 olarak kodlanmış yoğurt örnekleri seçilmiş ve ileri fraksiyonlama ve antioksidan aktivite denemelerine bu örneklerde devam edilmiştir.

Şekil 4.35. ve Şekil 4.36.'da Y3, Y11, Y13 ve TY2 yoğurtlarının liyofilize serumlarına ait kromatogramlar görülmektedir. Şekil 4.36.' da görüldüğü gibi yoğurtların liyofilize serumları görsel olarak birbirine çok benzemektedir.

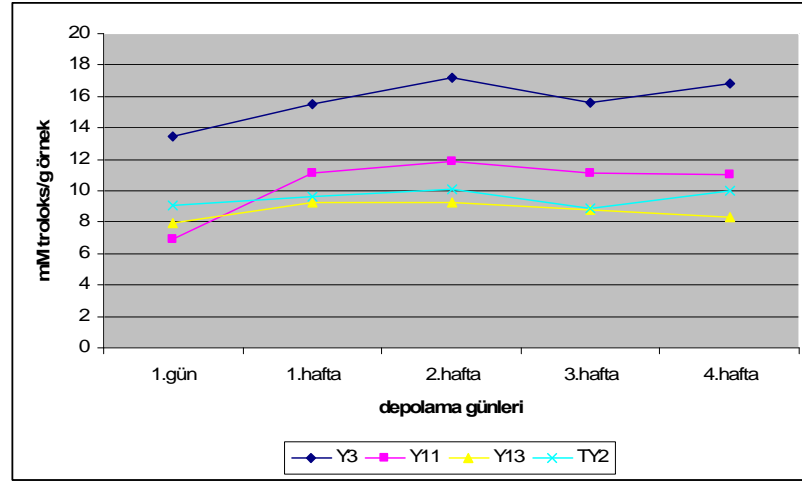


Şekil 4.35. Y3, Y11, Y13 ve TY2 yoğurtlarının liyofilize serumlarına ait kromatogramların gösterimi



Şekil 4.36. Y3 (pembe), Y11 (siyah), Y13 (mavi) ve TY2 (kahve) yoğurtlarının liyofilize serumlarına ait kromatogramların toplu gösterimi

Y3, Y11, Y13 ve TY2 yoğurtlarının 4 haftalık depolanması süresince ABTS yöntemi ile antioksidan aktivitedeki değişim Şekil 4.37.'de görülmektedir.



Şekil 4.37. Kümeleme analizi sonrasında seçilen yoğurt örnekleri Y3, Y11, Y13 ve TY2' nin liyofilize serumlarının ABTS yöntemi ile antioksidan aktivite değerlerinin depolama süresince değişimi (mM troloks/g örnek)

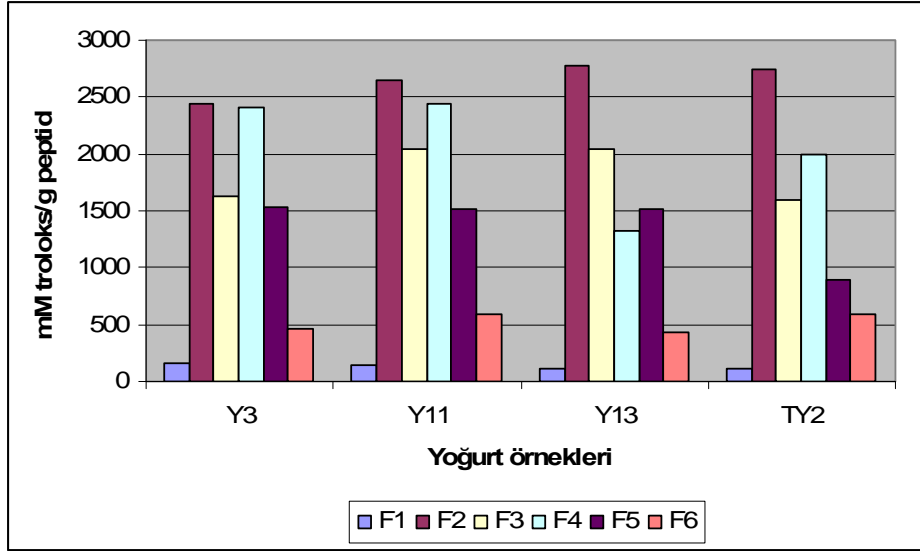
4.9.1. Y3, Y11, Y13 ve TY2 yoğurtlarının HPLC fraksiyonlarının ABTS yöntemi ile toplam antioksidan aktivite tayini

Y3, Y11, Y13 ve TY2 yoğurtlarının HPLC fraksiyonlarının (F1-F6) ABTS yöntemi ile antioksidan aktivite değerleri Çizelge 4.31.' de bu değerlere ait grafik gösterimi ise Şekil 4.38.' de sunulmuştur.

Çizelge 4.31.' de ve Şekil 4.38.'de görüldüğü gibi antioksidan aktivite açısından F2 kodlu fraksiyonun en yüksek değere sahip olduğu görülmektedir. F3, F4 ve F5 kodlu fraksiyonlarda da antioksidan aktivite nispeten yüksek bulunmuştur. Bu fraksiyonlardaki en yüksek aktiviteye sahip peptidin belirlenebilmesi amacıyla aktif fraksiyonlar HPLC' de tekrar analize alınmıştır. Bu amaçla toplam kromatogramın 20-60 dakikalar arası 1,33' er dakika aralıklarla ileri fraksiyonlanmış ve liyofilize edilmiştir. Liyofilize örneklere 3.2.6.3.1.' de belirtildiği gibi ABTS yöntemi ile antioksidan aktivite tayini yapılmıştır. Çizelge 4.32.' de TY2 örneğine ait fraksiyonların antioksidan aktivite değerleri görülmektedir.

Çizelge 4.31. Y3, Y11, Y13 ve TY2 yoğurtlarının HPLC fraksiyonlarının (F1-F6) ABTS yöntemi ile antioksidan aktivite değerleri (mM troloks/g liyofilize örnek)

	mM troloks / g örnek			
Fraksiyon	Y3	Y11	Y13	TY2
F1	154.11±5.12	136.24±12.21	109.15±13.21	105.47±12.21
F2	2436.62±4.25	2648.32±6.32	2782.40±15.68	2741.95±13.12
F3	1622.28±12.22	2036.18±5.27	2050.10±20.45	1594.30±32.12
F4	2416.88±32.44	2434.04±13.67	1318.58±12.46	2001.22±23.42
F5	1532.30±23.21	1523.50±24.64	1517.59±34.39	896.38±23.56
F6	460.72±12.21	597.23±23.56	425.25±20.18	594.99±12.34



Şekil 4.38. Y3, Y11, Y13 ve TY2 yoğurtlarının HPLC fraksiyonlarının (F1-F6) antioksidan aktivite değerlerinin grafik ile gösterimi

Çizelge 4.32. TY2 yoğurdunun liyofilize serumunun ileri fraksiyonlanması ile elde edilen peptitlerin ABTS yöntemi ile antioksidan aktivite değerleri (mM troloks / g örnek)

Fraksiyon	(mM troloks / g örnek)	Fraksiyon	(mM troloks / g örnek)
F2.1	349.784±23.12	F3.1	980.104±12.46
F2.2	2812.992±12.35	F3.2	667.654±11.10
F2.3	2463.892±24.21	F3.3	1063.386±12.13
F2.4	666.028±23.57	F3.4	1501.643±32.67
F2.5	1615.899±20.54	F3.5	1477.628±16.43
F2.6	838.182±12.45	F3.6	1251.694±17.54
F2.7	463.841±19.43	F3.7	1783.261±23.54
F2.8	273.462±16.23	F3.8	1763.297±22.23
Fraksiyon	(mM troloks / g örnek)	Fraksiyon	(mM troloks / g örnek)
F4.1	419.399±23.11	F5.1	1045.588±12.34
F4.2	561.897±14.43	F5.2	457.595±22.56
F4.3	2157.346±32.22	F5.3	710.949±22.32
F4.4	1986.675±23.65	F5.4	368.745±15.32
F4.5	1388.014±22.22	F5.5	514.837±24.45
F4.6	1473.179±23.25	F5.6	719.420±32.12
F4.7	705.615±10.15	F5.7	219.271±11.34

Çizelge 4.32.' de belirtilen veriler doğrultusunda F2.2, F2.3, F2.5, F3.4, F3.7, F4.3 ve F4.4 olarak kodlanmış fraksiyonların antioksidan aktivitesi yüksek bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda; *Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *Bf. longum* gibi laktik asit bakterilerinin antioksidan aktivitesinin bulunduğu ve bu mikroorganizmaların reaktif oksijen moleküllerini giderme ve indirgeme yeteneklerinin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yoğurt bakterileri olan *S. thermophilus* and *Lb. delbrueckii ssp.bulgaricus*' un linoleik asit peroksidasyonunu önleyerek antioksidan etki gösterdiği ve *in vivo* koşullarda düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir (Lin and Yen,1999; Jiménez et al., 2008).

Tsai et al. (2008), sütü *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* ile 5 saat süresince 43°C' de fermente ettikleri çalışmalarında, fermentasyonun başlangıcında bir proteaz olan flavorzim enzimi ilave etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda 5 saatlik fermentasyon

süresince çözünür protein miktarı 4,9' dan 57,4 mg/g' a; peptit içeriği 2,1'den 32,8 mg/g'a artmış; ACE inhibitör aktiviteye ait IC₅₀ 0,708' den 0,266 mg/mL' ye düşmüştür. ACE inhibitör aktiviteyi gösteren peptidin amino asit dizilimi Tyr-Pro-Tyr-Tyr ve IC₅₀' değeri 90,9 µM' olarak belirlenmiştir.

Fermente süt ürünlerinin antikarsinojenik aktivitesinin laktik kültürlerin antimutajenik bileşenler üretmesine bağlı olduğu düşünülmektedir. *Lb. bulgaricus* 1FO 3533, *Lc. lactis* 1FO 12546 kullanılarak yapılan çalışmalarda bu mikroorganizmalarla fermente olan sütlerin antimutajenik etkisi bulunduğu belirlenmiştir. Fermentasyon sırasında oluşan metabolitlerin antioksidan gibi davrandığı ve mutajen etkiyi kimyasal antagonizm ilişkisi içerisinde indirgediği düşünülmektedir. Benzer çalışmalar da sütün fermentasyonu sırasında antimutajenik bileşenlerin üretildiğini göstermektedir (Bodana and Rao, 1990).

De Noni and Cattaneo (2010), ticari süt ürünlerinde β-kazomorfin 5 ve β-kazomorfin 7' nin varlığını ve sonrasında *in vitro* sindirim sistemi denemesi ile parçalanma düzeylerini araştırdıkları çalışmalarında süt ürünlerinin hiçbirinde β-kazomorfin 5' e rastlamamışlardır. β-kazomorfin 7 ise bazı peynir çeşitlerinde mevcutken diğerlerinde sindirim sistemi denemesinden sonra ortaya çıkmıştır. Çalışmada 2 yoğurt örneği üretimlerinin 30. gününde analize alınmıştır. Yoğurt örneklerinin üretiminde kullanılan *Lb. delbruekii* ssp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* karışık kültürünün proteolitik aktivitesinin yüksek olmasına rağmen her iki yoğurt örneğinde de β-kazomorfin 5 ve β-kazomorfin 7' ye rastlanmamıştır. Benzer sonuçlar Kahala et al., (1993)' un çalışmalarında da görülmüştür.

Fermente sütün insan hayatını olumlu olarak etkilediğine dair yapılan klinik bir çalışmada keçi sütü *Lb. fermentum* ME-3 ile fermente edilmiş ve sağlıklı bireylerin bir kısmı günde 150 g fermente olmamış sütü bir kısmı ise fermente sütü 21 gün süresince tüketmişlerdir. Sonuçta fermente süt tüketiminde kanın antioksidan aktivitesinin arttığı görülmüştür. Ayrıca lipoprotein fraksiyonlarının oksidasyona dayanıklılığı artmış, peroksit lipoproteinlerinin, LDL kolesterolünün miktarı ve glutation redoks oranı azalmıştır (Kullisaar et al., 2003).

Candida cardunculus' dan elde edilen proteazlar ile üretilen peynirlerde ACE inhibitör ve antioksidan aktivite gösteren peptitlere rastlanmıştır. Bu peptitlerden β -kazeinden elde edilen; Tyr-Gln-Glu-Pro, Val-Pro-Lys-Val-Lys, Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro ve α_{s1} -kazeinden elde edilen; Arg-Pro-Lys, Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His ACE-inhibitör aktivite gösterirken; β -kazeinden elde edilen Tyr-Gln-Glu-Pro-antioksidan aktivite göstermiştir (Silva et al., 2006).

Hernández-Ledesma et al. (2007b), β -Lg türevli peptitlerin tamamında antioksidan özelliklere rastlamış ve oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC) değerlerinin 4.45 ile 7.67 μmol troloks eşdeğeri/ μmol peptit arasında değiştiğini bulmuşlar ve antioksidan aktivite özelliğinden Trp, Tyr, ve Met amino asitlerinin pozisyonunun etkili olduğunu belirtmişlerdir.

5. SONUÇ

Bu araştırmada elde edilen sonuç ve öneriler;

1-Ülkemizde geleneksel olarak üretilen yoğurtlar yaygın biçimde tüketilmektedir. Ancak çalışmamızda geleneksel yoğurt örneklerinin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik açıdan yetersiz olduğu standarda ve kodekse uygun olmadığı belirlenmiştir. Özellikle maya-küf ve koliform grubu bakteriler izin verilen sınırların üzerinde tespit edilmiştir. Ticari yoğurtlar ise standarda ve kodekse uygun bulunmuştur.

Öneri: Yoğurt üretimi sırasında hijyenik kaliteye gereken özen gösterilmelidir. Üretim sırasında mayalama sıcaklığı, inkübasyon sıcaklığı ve süresi, muhafaza ve depolama şartlarına özen gösterilmesi gerekmektedir. Ayrıca biyoaktif peptit üretme özelliğine sahip suşların yoğurt üretiminde starter olarak kullanılması besleyici değeri yüksek olan yoğurdun fonksiyonel özelliğinin artmasını sağlayacaktır.

2- Yapılan çeşitli araştırmalarda *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* ve *S. thermophilus*' un proteoliz sistemleri ayrıntılı olarak incelenmiş ve suştan suşa proteolitik aktivitenin değiştiği belirlenmiştir. Bu çalışmada yoğurt fermantasyonu sırasında meydana gelen proteolitik parçalanmanın antimikrobiyel peptitlerin oluşumu için yetersiz olduğu belirlenmiştir.

Öneri: Sütün, proteolitik mikroorganizmalar ya da mikroorganizmalardan elde edilen proteolitik enzimler kullanılarak fermente edilmesi sonucu biyoaktif peptitler ortaya çıkmaktadır. Bu açıdan süt ürünlerinde kullanılacak starter kültürlerin proteoliz metabolizmalarının araştırılması gerekmektedir.

3-Liyofilize yoğurt serumları ve HPLC fraksiyonlarından elde edilen peptitlerin *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*' ya karşı antimikrobiyel aktivitesi araştırılmış, fakat kuyucuk difüzyon testi sonucunda herhangi bir zon elde edilememiştir. Yoğurt fermantasyonu sırasında meydana gelen proteolitik parçalanmanın antimikrobiyel peptitlerin oluşumu için yetersiz olduğu belirlenmiştir.

Öneri: Yoğurttan antimikrobiyel peptit eldesi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan çalışmaların çoğunda süt proteinlerinin enzimatik olarak hidroliz edilmesi ile peptitlerin açığa çıkması sağlanmış ve özellikleri belirlenmiştir. Yoğurttan antimikrobiyel peptit elde edebilmek için enzimatik bir reaksiyon gerçekleşmesi gereklidir. Bu nedenle yoğurdun gastrointestinal sistemde olduğu gibi sindirim sistemi enzimleri ile hidroliz edilerek antimikrobiyel peptit oluşup oluşmadığı belirlenmelidir. Laktik asit bakterileri üretmiş oldukları çeşitli metabolitler nedeni ile gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır. Bu bakterilerin koruyuculuk özelliği oluşturdukları organik asit, diasetil, asetoin, hidrojen peroksit, antibakteriyel peptitler ve bakteriyosinler gibi çok çeşitli antimikrobiyal bileşikler üretebilme kapasitesine sahip olmalarından kaynaklanmaktadır (Dinçer vd., 2010). Yoğurtlarımızda antimikrobiyel özelliğin oluşmaması kullanılan suşların bakteriyosin üretim yetenekleri ve diğer metabolit ürün miktarlarının yeterli olup olmamasına bağlıdır. Bu nedenle starter olarak kullanılacak suşların bu özelliklerinin belirlenmesi gereklidir.

Son yıllarda üzerlerinde yoğun olarak çalışılmaya başlanan ve antibiyotiklere dirençli birçok mikroorganizmaya karşı etkili bulunan antimikrobiyel peptitlerin gelecekte yeni ve etkili bir antibiyotik grubu olarak diğerlerinin arasında ilk sıralarda yer alacağı düşünülmektedir. Ayrıca gelecekte fermente süt ürünlerinden biyoaktif peptitlerin, membran teknolojileri ve kromatografik yöntemler ile zenginleştirilip ayrılması bunların fonksiyonel gıdaların içinde katkı olarak kullanılabilmesi açısından da önemli bir alan olacaktır.

4-Çalışmada liyofilize yoğurt serumları ve HPLC fraksiyonlarından elde edilen peptitlerin antioksidan aktivite değerleri belirlenmiştir. Geleneksel yoğurtların liyofilize serumlarının antioksidan aktivitesi ticari yoğurtların liyofilize serumlarından daha yüksek bulunmuştur. Ticari örneklerde ortalama 7.697-8.739 mM troloks/g olarak değişen bu değer geleneksel örneklerde 10.115-13.182 mM troloks/g arasında değişmiştir. Seçilen yoğurt örneklerinin HPLC' de fraksiyonlarına ayrılması ile elde edilen peptitlerin antioksidan aktivite değerleri yaklaşık 10-200 kat arasında

artmıştır. Yoğurt örneklerinin tamamında en yüksek antioksidan aktiviteyi F2 fraksiyonu göstermiştir. Seçilen yoğurt örneklerinde F2 fraksiyonunun gösterdiği antioksidan aktivite değeri 2436.62-2782.40 mM troloks/g arasında değişmiştir.

İleri fraksiyonlama denemesi ile F2.2, F2.3, F2.5, F3.4, F3.7, F4.3 ve F4.4 olarak kodlanmış fraksiyonların antioksidan aktivitesi yüksek bulunmuştur. Bu değerler sırasıyla 2812.992, 2463.892, 1615.899, 1501.643, 1783.261, 2157.346, 1986.675 mM troloks/g' dır.

Öneri: Yoğurtlarda görülen düşük antioksidan aktivitenin artırılması, fraksiyonlara ayrılma ile mümkün olmuştur. Düşük moleküler ağırlıklarına bağlı olarak peptitler proteinlerden daha reaktiftir ve gıdaların içeriğinde bulunan diğer bileşenlerle reaksiyona girebilmekte ve antioksidan özellikler göstermektedirler. Antioksidan aktivitesi yüksek olan bu fraksiyonlardan elde edilen peptitlerin fonksiyonel ürün geliştirmek üzere gıda katkı maddesi olarak kullanılabilceği düşünülmüştür.

6. KAYNAKLAR

- Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh, T., 1998. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinaz K digestion. *Journal of Dairy Science*, 81, 3131-3138.
- Abu-Tarboush, H.M., 1996. Comparison of growth and proteolytic activity of yogurt starters in whole milk from camels and cows. *Journal of Dairy Science*, 79, 366-371.
- Advitech, 2006. <http://www.advitech.com/en/technologies.php#1> Erişim tarihi: 22.05.2006
- Ahn, J.E., Park, S.Y., Atwal, A., Gibbs, B.F., Lee, B.H., 2009. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey fermented by lactobacillus species. *Journal of Food Biochemistry*, 33, 587-602.
- Akalın, A.S., Kınık, Ö., Gönç, S., 1998. Yoğurt üretimi ve depolama sırasında organik asitlerin belirlenmesi. *Gıda*, 23 (1), 59-65.
- Akalın, A.S., Fenderya, S., Akbulut, N., 2004. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharids during refrigerated storage. *International Journal of Food Science*, 39, 613-621.
- Akın, N., 2006. Modern Yoğurt Bilimi ve Teknolojisi, Damla Ofset, Konya.
- Algaron, F., Miranda, G., Le Bars, D., Monnet, V., 2004. Milk fermentation by *Lactococcus lactis* with modified proteolytic systems to accumulate potentially bio-active peptides. *Lait*, 84, 115-123.
- Aluko, R.E., Monu, E., 2003. Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates. *Journal of Food Science*, 68 (4), 1254-1258.
- Anonim. 1990a. Türk Standartları Enstitüsü, TS 8189, Sütte Yağ Tayini-Gerber Metodu.
- Anonim. 1990b. AOAC, 1990. In: hortwitz, W. (Ed). *Official Methods of Analysis*. Association Official Analysis Chemistry, Washington, DC.
- Anonim. 1999a. Türk Standartları Enstitüsü, TS 1330, Yoğurt Standardı, Ankara.

- Anonim. 1999b. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Armoni Matbaacılık Ltd. Şti., 296 s, Ankara.
- Anonim. 2009. Tarım ve Köyişleri ve Sağlık Bakanlığında Türk Gıda Kodeksi Fermente Sütler Tebliği (TebliğNo: 2009/25) Resmi Gazete; sayı: 27143.
- Anonymous. 1992. Milk and Milk Products Preparation of Sample and Dilutions for Microbiological Examination. IDF Standard 112B, pp 4, Belgium.
- Aslım, B., Beyatlı, Y., 2000. Yoğurt starter kültür metabolitlerinin inhibisyon etkisi. Turkish Journal of Biology, 24, 65-78.
- Atamer, M., Sezgin, E., 1987. İnkübasyon sonu asitliğinin yoğurt kalitesi üzerine etkisi. Gıda, 12 (4), 213-220.
- Atasoy, F. A., Türkoğlu, H., Özer, B.H., 2003. Şanlıurfa ilinde üretilen ve satışa sunulan süt, yoğurt ve urfa peynirlerinin bazı mikrobiyolojik özellikleri. Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 7 (3/4), 77-83.
- Bandonienè, D., Murkovic, M., 2002. The detection of radical scavenging compounds in crude extract of borage (*Borago officinalis* L.) by using an on-line HPLC-DPPH method. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 53, 45-49.
- Belem, M.A.F., Gibbs, B.F., Lee, B.H., 1999. Proposing sequences for peptides derived from whey fermentation with potential bioactive sites. Journal of Dairy Science, 82, 486-493.
- Bellamy, W., Takase, M., Wakabayashi, H., Kawase, K., Tomita, M., 1992a. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. Journal of Applied Bacteriology, 73, 472-479.
- Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., Tomita, M., 1992b. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. Biochimica et Biophysica Acta, 1121 (1-2), 130-136.
- Bendich, A., 1993. Symposium: Antioxidants, immune response, and animal function: Physiological role of antioxidants in the immune system. Journal of Dairy Science, 76 (9), 2789-2794.
- Bertrand-Harb, C., Ivanova, I.V., Dalgalarondo, M., Haertlé, T. 2003. Evolution of β -lactoglobulin and α -lactalbumin content during yoghurt fermentation. International Dairy Journal, 13, 39-45.
- Bianchi-Salvadori, B., Camaschella, P., Cislighi, S., 1995. Rapid enzymatic method for biotyping and control of lactic acid bacteria used in the production of

- yoghurt and some cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 27, 253-261.
- Bitri, L., 2004. Optimization study for the production of an opioid-like preparation from bovine casein by mild acidic hydrolysis. *International Dairy Journal*, 14, 535–539.
- Bodana, A.R., Rao, D.R., 1990. Antimutagenic activity of milk fermented by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Dairy Science*, 73, 3379-3384.
- Boman, H.G., 2003. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine*, 254, 197–215.
- Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R., Wechsler, D., 2007. Quantification of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in hard, semi-hard and soft cheeses. *International Dairy Journal*, 17, 968-975.
- Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R., Walther, B., Wechsler, D., 2008. Occurrence of the angiotensin-converting enzyme–inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in different cheese varieties of Swiss origin. *Journal of Dairy Science*, 91, 29–38.
- Cartwright, P.S., 2006. Membrane Technologies for Wastewater Reuse: The challenges of oily waste fouling. (<http://biomininc.com/tech23.htm>).
- Cemeroğlu, 2007. Gıda Analizleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, No:34. 535 s. Ankara.
- Chabance, B., Marteau, P., Rambaud, J.C., Migliore-Samour, D., Boynard, M., Perrotin, P., Guillet, R., Jollès, P., Fiat, A.M., 1998. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie*, 80, 155-165.
- Chatterton, D.E.W., Smithers, G., Roupas, P., Brodkorb, A., 2006. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin: Technological implications for processing. *International Dairy Journal*, 16, 1229–1240.
- Chen, J., Lindmark-Månsson, H., Gorton, L., Åkesson, B., 2003. Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and amperometric methods. *International Dairy Journal*, 13, 927-935.
- Chen, G.W., Tsai, J.S., Pan, B.S., 2007. Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. *International Dairy Journal*, 17, 641–647.

- Chianese, L., Caira, S., Ferranti, P., Laezza, P., Malorni, A., Mucchetti, G., Garro, G., Addeo, F., 1997. The oligopeptides of sweet and acid cheese whey. *Lait*, 77, 699-715.
- Chobert, J.M., 2003. Milk protein modification to improve functional and biological properties. *Advances in Food and Nutrition Research*, 47, 1-71.
- Chobert, J.M., El-Zahar, K., Sitohy, M., Dalgalarondo, M., Métro, F., Choiset, Y., Haertlé, T., 2005. Angiotensin I-converting-enzyme (ACE)-inhibitory activity of tryptic peptides of ovine β -lactoglobulin and of milk yoghurts obtained by using different starters. *Lait*, 141–152.
- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steele, J.L., 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 217-246.
- Clare, D.A., Swaisgood, H.E., 2000. Bioactive milk peptides: A prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83, 1187-1195.
- Clare, D.A., Catignani, G.L., Swaisgood, H.E. 2003. Biodefense properties of milk: The role of antimicrobial proteins and peptides. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1239-1255.
- Contreras, M., Carrón R., Montero, M.J., Ramos, M., Recio, I., 2009. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19, 566–573.
- Coste, M., Tomé D., 1991. Milk peptides with physiological activities. II. Opioid and immunostimulating peptides derived from milk proteins. *Lait*, 71, 241-247.
- Çağlayanlar, G.E., Kunduhoğlu, B. Çoksöyler, N., 2009. Comparison of the microbiological quality of packed and unpacked ice creams sold in Bursa, Turkey. *Journal of Arts and Sciences*, 12, 93-102.
- Çelikel, N., Gürsoy, O., Kavas, G., Kımık, Ö., 2005. Bioactive properties and physiological role of lactoferrin. *Tübitak 1. International Food and Nutrition Congress*. 15-18 June, Istanbul.
- Dağdemir, E., Özdemir, C., Özdemir, S., 2003. Süt ürünlerinde bulunan antihipertansif peptidler ve etki mekanizmaları. *Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu*, 22-23 Mayıs, İzmir.
- Daoud, R., Dubois, V., Bors-Dodita, L., Nedjar-Arroume, N., Krier, F., Chihib, N.E., Mary, P., Kouach, M., Briand, G., Guillochon, D., 2005. New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin. *Peptides*, 26, 713-719.

- Dave, R.I., Shah, N.P., 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, 7, 31-41.
- Dayısoylu, K.S., 1992. Van piyasasında üretilen ve satışa sunulan yoğurtların fiziksel, kimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşsal özellikleri üzerine bir araştırma. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van.
- De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E., 1960. Medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130-138.
- Demirci, M., Şimşek, O., 1997. Süt İşleme Teknolojisi, Hasad Yayıncılık Ltd.Şti., İstanbul.
- De Noni, I., 2008. Release of β -casomorphins 5 and 7 during simulated gastro-intestinal digestion of bovine β -casein variants and milk-based infant formulas. *Food Chemistry*, 110, 897-903.
- De Noni, I., Cattaneo, S., 2010. Occurrence of β -casomorphins 5 and 7 in commercial dairy products and in their digests following *in vitro* simulated gastro-intestinal digestion. *Food Chemistry*, 119, 560-566.
- Didelot, S., Bordenave-Juchereau, S., Rosenfeld, E., Fruitier-Arnaudin, I., Piot, J.M., Sannier, F., 2006. Preparation of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory hydrolysates from unsupplemented caprine whey fermentation by various cheese microflora. *International Dairy Journal*, 16, 976-983.
- Dinçer, E., Kıvanç, M., Karaca, H., 2010. Biyokoruyucu olarak laktik asit bakterileri. *Gıda*, 35 (1), 55-62.
- Dionysius, D.A. Milne, J.M., 1997. Actibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization. *Journal of Dairy Science*, 80, 667-674.
- Donkor, O.N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., Shah, N.P., 2006. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 16, 1181-1189.
- Donkor, O.N., 2007. Influence of Probiotic Organisms on Release of Bioactive Compounds in Yoghurt and Soy Yoghurt. School of Molecular Sciences, Faculty of Health, Engineering and Science, Victoria University, PhD Thesis, 253 p, Australia.
- Donkor, O.N., Henriksson, A., Singh, T.K., Vasiljevic, T., Shah, N.P., 2007a. ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*, 17, 1321-1331.

- Donkor, O.N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., Shah, N.P., 2007b. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and *in vitro* angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Lait*, 86, 21–38.
- Duru, S., Özgüneş, H., 1981. Ankara piyasasında satılan ayran ve yoğurt örneklerinin hijyenik kaliteleri üzerinde araştırmalar. *Gıda*, 6 (4), 19-23.
- Ellegård, K.H., Gammelgård-Larsen, C., Sørensen, E.S., Fedosov, S., 1999. Process scale chromatographic isolation, characterization and identification of tryptic bioactive casein phosphopeptides. *International Dairy Journal*, 9, 639-652.
- El-Zahar, K., Chobert, J.M., Sitohy, M., Dalgalarondo, M., Haertlé, T., 2003. Proteolytic degradation of ewe milk proteins during fermentation of yoghurts and storage. *Nahrung/Food*, 47 (3), 199-206.
- Erdoğan, Ö., Erbilir, F., 2006., Isolation and characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from various foods. *Turkish Journal of Biology*, 30, 39-44.
- Farzamirad, V., Aluko, R.E., 2008. Angiotensin-converting enzyme inhibition and free-radical scavenging properties of cationic peptides derived from soybean protein hydrolysates. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59 (5), 428-437.
- Ferrazzano, G.F., Cantile T., Quarto, M., Ingenito, A., Chianese, L., Addeo, F., 2008. Protective effect of yogurt extract on dental enamel demineralization *in vitro*. *Australian Dental Journal*, 53 (4), 314-319.
- Fiat, A.M., Migliore-Samour, D., Jollés, P., 1993. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *Journal of Dairy Science*, 76, 301-310.
- FitzGerald, R.J., Murray, B.A., Walsh, D.J., 2004. Hypotensive peptides from milk proteins. *The Journal of Nutrition, The Emerging Role of Dairy Proteins and Bioactive Peptides in Nutrition and Health*, 134, 980S–988S.
- FitzGerald, R.J., Murray, B.A., 2006. Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 59 (2), Conference Contribution. 118-125.
- Flora, R., 1996. *Yogurt Forever: The Yogurt Encyclopaedia*, 4.0 version, 45 sayfa.
- Froidevaux, R., Krier, F., Nedjar-Arroume, N., Vercaigne-Marko, D., Kosciarz, E., Ruckebusch, C., Dhulster, P., Guillochon, D., 2001. Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. *FEBS Letters*, 491, 159-163.

- Fugland, A., Nilsson, D., Nyborg, N.C.B., 2003. Characterization of new milk-derived inhibitors of angiotensin converting enzyme *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 18, 407-412.
- Ganjam, L.S., Thornton, W.H., Jr., Marshall, R.T., MacDonald R.S. 1997. Antiproliferative effects of yogurt fractions obtained by membrane dialysis on cultured mammalian intestinal cells. *Journal of Dairy Science*, 80, 2325–2329.
- Gauthier, S.F., Paquin, P., Pouliot, Y., Turgeon, S., 1993. Surface activity and related functional properties of peptides obtained from whey proteins, *Journal of Dairy Science*, 76, 321-328.
- Gauthier, S.F., Pouliot, Y., 2003. Functional and biological properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 86 (E. Suppl.), E78-E87.
- Gerdes, S.K., Harper, W.J., Miller, G., 2001. Bioactive components of whey and cardiovascular health. (<http://www.innovatewithdairy.com/NR/rdonlyres/565F445D-3682-46A8-913D-49D9DD305C3/0/G4ApplicMonogCardio.pdf>)
- Gibbs, B.F., 1999. Production and Characterization of Bioactive Peptides from Soy Fermented Foods and Their Hydrolysates. Department of Food Science and Agricultural Chemistry, McGill University, PhD thesis, 203 p, Montreal, Quebec, Canada.
- Gibbs, B.F., Zougman, A., Masse, R., Mulligan, C., 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research International*, 37, 123–131.
- Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F., Addeo, F., 2000. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (9), 3898–3904.
- Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R., 2002. Latent bioactive peptides in milk proteins: Proteolytic activation and significance in dairy processing, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42 (3), 223-239.
- Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzello, C.G., 2004. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57 (2/3), 173-188.

- Gómez-Ruiz, J.A., Ramos, M., Recio, I., 2002. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *International Dairy Journal*, 12, 697-706.
- Gómez-Ruiz, J.A., López-Expósito, I., Pihlanto, A., Ramos, M., Recio, I., 2008. Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *European Food Research and Technology*, 227, 1061-1067.
- Gouldsworthy, A.M., Leaver, J., Banks, J.M., 1996. Application of a mass spectrometry sequencing technique for identifying peptides present in Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 6, 781-790.
- Gupta, A., Mann, B., Kumar, R., Sangwan, R.B., 2009. Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 62 (3), 339-347.
- Gürsoy Balcı, A.C., 2008. Farklı Kültür Kullanılarak Koyun, Keçi Sütleri ve Bunların Karışımından Üretilen Yoğurtların Depolama Sırasında Uçucu Bileşenler ve Serbest Yağ Asitlerinde Meydana Gelen Değişimler. Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 86 s. Antakya, Hatay.
- Haileselassie, S.S.B., 1999. Production of enzyme-modified cheese and bioactive peptides by *Lactobacillus* and commercial enzymes. Department of Food Science and Agricultural Chemistry, McGill University, MS thesis, 105 p, Montreal, Quebec, Canada.
- Haileselassie, S.S., Lee, B.H., Gibbs, B.F., 1999. Purification and identification of potentially bioactive peptides from enzyme-modified cheese. *Journal of Dairy Science*, 82, 1612-1617.
- Haque, E., Chand, R., 2008. Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. *European Food Research and Technology*, 227, 7-15.
- Haque, E., Chand, R., Kapila, S., 2009. Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin. *Food Reviews International*, 25, 28-43
- Hashimoto, K., Sato, K., Nakamura, Y., Ohtsuki, K., 2006. Development of continuous type apparatus for ampholyte-free isoelectric focusing (autofocusing) of peptides in protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 650-655.
- Hayes, M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Hill, C., Stanton, C., 2006. Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (3), 2260-2264.

- Herdem, A., 2006. Farklı Yörelere Toplanan Geleneksel Yöntemle Üretilen Yoğurt Örneklerinin Bazı Niteliklerinin Belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 85 s, Konya.
- Hernández-Ledesma, B., Recio, I., Ramos, M., Amigo, L., 2002. Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *International Dairy Journal*, 12, 805-812.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., Recio, I., 2004. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52, 1504-1510.
- Hernández-Ledesma, B., Miralles, B., Amigo, L., Ramos, M., Recio, I., 2005. Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 85, 1041-1048.
- Hernández-Ledesma, B., Quirós, A., Amigo, L., Recio, I., 2007a. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal*, 17, 42-49.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Recio, I., Bartolomé, B., 2007b. ACE-inhibitory and radical-scavenging activity of peptides derived from β -lactoglobulin f(19-25) interactions with ascorbic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3392-3397.
- Hill, R.D., Lahov, E., Givol, D., 1974. A rennin-sensitive bond in α_{s1} β -casein. *Journal of Dairy Research*, 41, 147-153.
- Hisoğlu, E.G., 2007. Ağrı İlinde Tüketime Sunulan Yoğurtların Kimyasal Ve Mikrobiyolojik Kalitesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 93 s, Van.
- Hoerr, R.A., Bostwick, E.F., 2000. Bioactive proteins and probiotic bacteria: Modulators of nutritional health. *Nutrition*, 16, (7/8), 711-713.
- Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, Wu., Chi, L., 2008. The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs? *Peptides*, 29, 1062-1071.
- İnal, T., 1990. Süt ve Süt Ürünleri Hijyen ve Teknolojisi, Final Ofset AŞ, İstanbul.
- Jäkälä, P., Hakala, A., Turpeinen, A.M., Korpela, R., Vapaatalo, H., 2009. Casein-derived bioactive tripeptides Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro attenuate the

- development of hypertension and improve endothelial function in salt-loaded Goto–Kakizaki rats. *Journal of Functional Foods* 1, 366-374.
- Jäkälä, P., Vapaatalo, H., 2010. Antihypertensive peptides from milk proteins. *Pharmaceuticals*, 3, 251-272.
- Jauhiainen, T., 2007. Blood Pressure Lowering Effects of *Lactobacillus helveticus* Fermented Milk Containing Bioactive Peptides Ile-Pro-Pro And Val-Pro-Pro: Mechanistic, Kinetic and Clinical Studies. Department of Medicine, Institute of Biomedicine, Pharmacology, University of Helsinki, PhD thesis, 100 p, Helsinki, Finland.
- Jiménez, A.M., Murcia, M.A., Parras, P., Martínez-Tomé, M., 2008. On the importance of adequately choosing the ingredients of yoghurt and enriched milk for their antioxidant activity. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 1464–1473.
- Kahala, M., Pahkala, E., Pihlanto, A., 1993. Peptides in fermented Finnish milk products. *Agricultural and Food Science in Finland*, 2, 379–386.
- Kamau, S.M., Cheison, S.C., Chen, W., Liu, X.M., Lu, R.R., 2010. Alpha-Lactalbumin: Its Production Technologies and Bioactive Peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 197-212.
- Karagözü, C., Bayarer, M., 2004. Peyniraltı suyu proteinlerinin fonksiyonel özellikleri ve sağlık üzerine etkileri. *Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 41 (2), 197-207.,
- Karahan, A.G., Cicioğlu Arıdoğan, B., Çakmakçı, M.L., 2002. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Kılavuzu. Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayın No:24, Isparta.
- Kavas, G., Kınık, Ö., 2001. Süt orijinli peptitler ve kan basıncı. *Dünya Gıda Dergisi*, 6, 87-89.
- Kavas, G., Kavas, N., Kınık, Ö., 2007a. Soya kaynaklı biyoaktif peptitler ve insan sağlığı. *Dünya Gıda Dergisi*, 6, 98.
- Kavas, G., Kavas, N., Kınık, Ö., 2007b. Antihipertensif ve antikanserojenik bitkisel kaynaklı biyoaktif peptitler. *Dünya Gıda Dergisi*, 7, 98.
- Kavas, G., Kavas, N., Kınık, Ö., 2007c. Süt serum proteinlerinin antioksidan etkileri. 5. Gıda Mühendisliği Kongresi, 08-10 Kasım, Ankara.
- Keleş, F., 2003. Konya Yöresi Taze Ev Yapımı Yoğurtların Mikrobiyolojik Özelliklerinin Araştırılması. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Konya.

- Kesler, Y., Doğan, M., Karaman, S., Kayacıer, A., 2008. Kan basıncını dışurıcı sıt kaynaklı peptidler. Tırkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs, Erzurum.
- Kınık, ., Akbulut, N., 1996. Soya sıtından yararlanarak elde edilen yoğurtların aroma maddeleri ve duyuşal özellikleri üzerinde bir araştırma. Gıda, 21 (1), 59-63.
- Kırdar, S.S., Gün, ., 2001. Burdur’da sızme yoğurt üretimi teknolojisine üzerine bir araştırma. Gıda, 26 (2), 99-107.
- Kırdar, S.S., Gün, ., 2007. Sızme yoğurt üretiminde elde edilen serumun bazı zellikleri. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11 (1), 26-28.
- Kitts, D.D., 2005. Antioxidant properties of caseinphosphopeptides. Trends in Food Science and Technology, 16, 549–554.
- Korhonen, H., Pihlanto-Leppälä, A., Rantamki, P., Tupasela, T., 1998. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. Trends in Food Science and Technology, 9, 307-319.
- Korhonen, H., Pihlanto, A., 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. International Dairy Journal, 16, 945-960.
- Korhonen, H., 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. Journal of Functional Foods 1, 177-187.
- Kudoh, Y., Matsuda, S., Igoshi, K., Oki, T., 2001. Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO13953. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi, 48, 44-55.
- Kullisaar, T., Songisepp, E., Mikelsaar, M., Zilmer, K., Vihalemm, T., Zilmer, M., 2003. Antioxidative probiotic fermented goats’ milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. British Journal of Nutrition, 90, 449-456.
- Kunji, E.R.S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., Konings, W.N., 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 70, 187-221.
- Kusump, S., 2006. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides Released from the Hydrolysate of Casein and the Milk Fermented by *Lactobacillus casei* ADA03. Food Science and Technology, Department of Agricultural, Food and Nutritional Science, University of Alberta, PhD thesis, 184 p, Edmonton, Alberta.

- Lahov, E., Regelson, W., 1996. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: Casecidin, isracidin peptides. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 131-145.
- Law, J., Haandrikman, A., 1997. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 7, 1-11.
- LeBlanc, J.G., Matar, C., Valdéz, J.C., LeBlanc, J., Perdigon, G. 2002. Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science*, 85 (11), 2733-2742.
- Liepke, C., Zucht, H.D., Forssmann, W.G., Ständker, L., 2001. Purification of novel peptide antibiotics from human milk. *Journal of Chromatography B*, 752, 369-377.
- Lignitto, L., Cavatorta, V., Bazlan, S., Gabai, G., Galaverna, G., Novelli, E., Sforza, S., Segato, S., 2010. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of water-soluble extracts of Asiago d'allevo cheese. *International Dairy Journal*, 20, 11-17.
- Lin, M.Y., Yen, C.L., 1999. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1460-1466.
- Liu, J.R., Chen, M.J., Lin, C.W., 2005. Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2467-2474.
- López-Expósito, I., Gómez-Ruiz, J.A., Amigo, L., Recio, I., 2006a. Identification of antibacterial peptides from ovine α_{s2} -casein. *International Dairy Journal*, 16, 1072-1080.
- López-Expósito, I., Minervini, F., Amigo, L., Recio, I., 2006b. Identification of antibacterial peptides from bovine κ -casein. *Journal of Food Protection*, 69, 2992-2997.
- López-Expósito, I., Quirós, A., Amigo, L., Recio, I. 2007. Casein hydrolysates as a source of antimicrobial, antioxidant and antihypertensive peptides. *Lait*, 87, 241-249.
- López-Fandiño, R., Otte, J., van Camp, J., 2006. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, 16, 1277-1293.
- Losito, I., Carbonara, T., De Bari, M.D., Gobbetti, M., Palmisano, F., Rizzello C.G., Zambonin, P.G., 2006. Identification of peptides in antimicrobial fractions of cheese extracts by electrospray ionization ion trap mass spectrometry coupled

- to a two-dimensional liquid chromatographic separation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20, 447-455.
- Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B.C., 2001. Yogurt as probiotic carrier food, *International Dairy Journal*, 11, 1-17.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193 (1), 265-275.
- MacDonald, R.S., Thornton, W.H., Jr, Marshall, R.T., 1994. A cell culture model to identify biologically active peptides generated by bacterial hydrolysis of casein. *Journal of Dairy Science*, 77, 1167-1175.
- Macedo, A.C., Vieira, M., Poças, R., Malcata, F.X., 2000. Peptide hydrolase system of lactic acid bacteria isolated from Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal*, 10, 769-774.
- Madureira, A.R., Tavares, T., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E., Malcata, F.X., 2010. Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 93, 437-455.
- Maeno, M., Yamamoto, N., Takano, T., 1996. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 79, 1316-1321.
- Majumder, K., Wu, J., 2009. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from simulated *in vitro* gastrointestinal digestion of cooked eggs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (2), 471-477.
- Malkoski, M., Dashper, S.G., O'Brien-Simpson, N.M., Tablo, G.H., Macris, M., Cross, K.J., Reynolds, E.C., 2001. A novel antibacterial peptide from bovine milk, Kapacin, Ser(P)¹⁴⁹ κ-Casein (106-169). *Journal of Antimicrobial and Chemotherapeutic Agents*, 45 (8), 2309-2315.
- Manso, M.A., López-Fandiño, R., 2004. K-Casein macropeptides from cheese whey: physicochemical, biological, nutritional, and technological features for possible uses. *Food Reviews International*, 20 (4), 329-355.
- Marth, E.H., Steele, J.L., 2001. *Applied Dairy Microbiology*. Second Edition, Marcel, Dekker, Inc., New York, 744 p.
- Matar, C., Goulet, J., 1996. β-casomorphin 4 from milk fermented by a mutant of *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal*, 6, 383-397.
- McCann, K.B., Shiell, B.J., Michalski, W.P., Lee, A., Wan, J., Roginski, H., Coventry, M.J., 2005. Isolation and characterisation of antibacterial peptides

- derived from the f(164-207) region of bovine α_{s2} -casein. *International Dairy Journal*, 15, 133-143.
- McCann, K.B., Shiell, B.J., Michalski, W.P., Lee, A., Wan, J., Roginski, H., Coventry, M.J., 2006. Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine α_{s1} -casein. *International Dairy Journal*, 16, 316-323.
- McCue, P.P., Shetty, K., 2005. Phenolic antioxidant mobilization during yogurt production from soymilk using kefir cultures. *Process Biochemistry*, 40, 1791-1797.
- Meisel, H., 1998. Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal*, 8, 363-373.
- Meisel H, Schlimme, F., 1990. Milk proteins: precursors of bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 1, 41-45.
- Meisel, H., Bockelmann, W., 1999. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 207-215.
- Mercier, A., Gauthier, S.F., Fliss, I., 2004. Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests. *International Dairy Journal*, 14, 175-183.
- Metin, M., 2003. *Süt Teknolojisi: Sütün Bileşimi ve İşlenmesi*. Ege Üniversitesi Basımevi, 5. baskı, 802 s., Borvova, İzmir.
- Meydani, S.N., Ha, W.K., 2000. Immunologic effects of yogurt. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 861-872.
- Meyer, J., Bütikofer, U., Walther, B., Wechsler, D., Sieber, R., 2009. Hot topic: Changes in angiotensin-converting enzyme inhibition and concentrations of the tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro during ripening of different Swiss cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 92 (3), 826-836.
- Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C.G., Fox, P.F., Monnet, V., Gobbetti, M., 2003. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase hydrolyzed caseins of milk from six species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5297-5305.
- Möller, N.P., Scholz-Ahrens, K.E., Roos, N., Schrezenmeir, J., 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur J Nutr*, 47, 171-182.
- Muguerza, B., Ramos, M., Sanchez, E., Manso, M.A., Miguel, M., Aleixandre, A., Delgado, M.A., Recio, I., 2006. Antihypertensive activity of milk fermented

- by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. International Dairy Journal, 16, 61-69.
- Mullally, M.M., Meisel, H., FitzGerald, R.J. 1997. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. International Dairy Journal, 7, 299-303.
- Murakami, M., Tonouchi, H., Takahashi, R., Kitazawa, H., Kawai, Y., Negishi, H., Saito, T., 2004. Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (β -lactosin B) isolated from a commercial whey product. Journal of Dairy Science, 87 (7), 1967-1974.
- Nakajima, K., Yoshie-Stark, Y., Ogushi, M., 2009. Comparison of ACE inhibitory and DPPH radical scavenging activities of fish muscle hydrolysates. Food Chemistry, 114, 844-851.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., Takano, T., 1995a. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. Journal Dairy Science, 78, 777-783.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Takano, T., 1995b. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. Journal of Dairy Science, 78, 1253-1257.
- Narva, M., 2004. Effects of *Lactobacillus helveticus* fermented milk and milk-derived bioactive peptides (CPP, IPP and VPP) on calcium and bone metabolism, PhD Thesis, Institute of Biomedicine, Pharmacology, University of Helsinki, Helsinki, 83 p. (unpublished).
- Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Miloudi, K., Daoud, R., Krier, F., Kouach, M., Briand, G., Guillochon, D., 2006. Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. Peptides, 27, 2082-2089.
- Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Adje, E.Y., Traisnel, J. Krier, F., Mary, P., Kouach, M., Briand, G., Guillochon, D., 2008. Bovine hemoglobin: An attractive source of antibacterial peptides. Peptides, 29, 969-977.
- Nielsen, P.M., Petersen, D., Dammann, C., 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. Journal of Food Science, 66 (5), 642-646.
- Nielsen, M.S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K.I., Otte, J., 2009. Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. International Dairy Journal, 19, 155-165.
- Nishino, T., Shibahara-Sone, H., Kikuchi-Hayakawa, H., Ishikawa, F., 2000. Transit of radical scavenging activity of milk products prepared by Maillard reaction

- and *Lactobacillus casei* strain Shirota fermentation through the hamster intestine. Journal of Dairy Science, 83, 915-922.
- Nurhajati, J., Chrysanti, Indrawati, I., Syaftika, N., 2008. Antibacterial activity of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* soygurt cultures. Proceedings of the 1st ASEAN Congress of Tropical Medicine and Parasitology, 3, 51-58.
- Ong, L., Henriksson, A., Shah, N., 2007. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. Lait, 87, 149-165.
- Ong, L., Shah, N.P., 2008. Release and identification of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. LWT - Food Science and Technology, 41, 1555-1566.
- Otte, J., Shalaby, S.M., Zakora, M., Pripp, A.H. El-Shabrawy, S.A., 2007a. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: Effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis. International Dairy Journal, 17, 488-503.
- Otte, J., Shalaby, S.M., Zakora, M. Nielsen, N.S., 2007b. Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from α -lactalbumin and β -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. International Dairy Journal, 17, 1460-1472.
- Oymael, B., Ferhunde, Us., 2008. Kaymaklı ve homojenize yoğurtların uçucu aromatik bileşen içeriklerinin depolama sıcaklığıyla değişimi. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs, Erzurum.
- Öz, K., 1990. Konya’ da Tüketime Sunulan Yoğurtların Kalitesi. Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 40 s.Konya.
- Özçelik, S., 1992. Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuar Kılavuzu, Fırat Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Yayın No: 1, 135 s, Elazığ.
- Özden, A., 2009. İnsan beslenmesinde yoğurdun yararlı etkileri. Güncel Gastroenteroloji, 13 (4), 227-232.
- Özer, H.B., Atamer, M., 1994. Yoğurt jelinin oluşumunda serum proteinlerinin rolü. Gıda, 19 (3), 155-159.
- Özer, B., 2006. Yoğurt Bilimi ve Teknolojisi, Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Sidas Yayınları, 483 s, Şanlıurfa.

- Papadimitriou, C.G., Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., Silva, S.V., Gomes, A.M., Malcata, F.X., Alichanidis, E., 2007. Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Food Chemistry*, 105, 647-656.
- Parish, C.A., Jiang, H., Tokiwa, Y., Berova, N., Nakanishi, K., McCabe, D., Zuckerman, W., Xia, M.M., Gabay, J.E., 2001. Broad spectrum antimicrobial activity of hemoglobin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 9, 377-382.
- Park, C.B., Kim, M. S. Kim, S.C., 1996. A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 218, 408-413.
- Park, C.B., Lee, J.H., Park I.Y., Kim, M.S., Kim, S.C., 1997. A novel antimicrobial peptide from loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *FEBS Letters*, 411, 173-178.
- Park, Y.W., Juárez, .M., Ramos, M., Haenlein, G.F.W., 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 88-113.
- Park, E. Y., Morimae, M., Matsumura, Y., Nakamura, Y., and Sato, K., 2008. Antioxidant activity of some protein hydrolysates and their fractions with different isoelectric points. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (19), 9246-9251.
- Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Hunziker, P., von Fellenberg, R., 1999. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine alpha-lactalbumin molecule. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1426, 439-448.
- Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U., Hunziker, P., 2001. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1526 (2), 131-140.
- Pereira, R., Matia-Merino, A., Jones, F., Singh, H., 2006. Influence of fat on the perceived texture of set acid milk gels: a sensory perspective. *Food Hydrocolloids*, 20, 305-313.
- Phelan, M., Aherne, A., FitzGerald, R.J., O'Brien, N.M., 2009. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*, 19, 643-654.
- Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T., Korhonen, H., 1998. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International Dairy Journal*, 8, 325-331.
- Pihlanto-Leppälä, A., Marnila, P., Hubert, L., Rokka, T., Korhonen, H.J., Karp, M., 1999. The effect of α -lactalbumin and β -lactoglobulin hydrolysates on the

- metabolic activity of *Escherichia coli* JM103. *Journal of Applied Microbiology*, 87 (4), 540-545.
- Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T., Korhonen, H., 2000. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*, 67, 53-64.
- Pihlanto-Leppälä, A., 2001. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides, *Trends in Food Science and Technology*, 11, 347-356.
- Pihlanto, A., Korhonen, H., 2003. Bioactive Peptides and Proteins. *Advances in Food and Nutrition Research*, 47, 175-276.
- Pihlanto, A., 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16, 1306-1314.
- Pihlanto, A., Virtanen, T., Korhonen, H., 2010. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal*, 20, 3-10.
- Poulin, J.F., Amiot, J., Bazinet, L., 2006. Simultaneous separation of acid and basic bioactive peptides by electrodialysis with ultrafiltration membrane. *Journal of Biotechnology*, 123, 314-328.
- Pouliot, Y., Wijers, M.C., Gauthier, S.F., Nadeau, L., 1999. Fractionation of whey protein hydrolysates using charged UF/NF membranes. *Journal of Membrane Science*, 158, 105-114.
- Prupp, A.H., 2008. Effect of peptides derived from food proteins on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Food and Nutrition Research*, 52, 1-9.
- Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L., Recio, I., 2005. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *Journal of Dairy Science*, 88 (10), 3480-3487
- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Martín-Alvarez, P. J., Aleixandre, A., Recio, I., 2006. Determination of the antihypertensive peptide LHLPLP in fermented milk by high-performance liquid chromatography–Mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 89, 4527-4535.
- Ramchandran, L., Shah, N.P., 2008a Effect of addition of Versagel® on microbial, chemical, and physical properties of low-fat yogurt. *Journal of Food Science*, 73 (7), 360-367.

- Ramchandran, L., Shah, N.P., 2008b. Growth, proteolytic, and ACE-I activities of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* and rheological properties of low-fat yogurt as influenced by the addition of Raftiline HP[®]. *Journal of Food Science*, 73 (7), 368-374.
- Ramchandran, L., Shah, N.P., 2009. Effect of exopolysaccharides on the proteolytic and angiotensin-I converting enzyme-inhibitory activities and textural and rheological properties of low-fat yogurt during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, 92, 895-906.
- Rasic, J.L., Kurman, J.A., 1978. *Yoghurt*, Technical Dairy Publishing House Jyllingevej 39, DK 2720 Vanlose, Copenhagen, Denmark.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9/10), 1231-1237.
- Recio, I., Visser, S., 1999a. Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine α_2 -casein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1428, 314-326.
- Recio, I., Visser, S., 1999b. Two ion-exchange methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin-in situ enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane. *Journal of Chromatography*, 831, 191-201.
- Recio, I., Visser, S., 2000. Antibacterial and binding characteristics of bovine, ovine and caprine lactoferrins: a comparative study. *International Dairy Journal*, 10, 597-605.
- Rho, S.J., Lee, J.S., Chung, Y.I., Kim, Y.W., Lee, H.G., 2009. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from fermented soybean extract. *Process Biochemistry*, 44, 490-493.
- Rizzello, C.G., Losito, I., Gobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M.D., Zambonin, P.G., 2005. Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 88, 2348-2360.
- Rohm, H., Lechner, F., Lehner, M., 1990. Microflora of australian natural-set yoghurt. *Journal of Food Protection*, 53, 478-480.
- Roufik, S., Gauthier, S.F., Turgeon, S.L., 2006. *In vitro* digestibility of bioactive peptides derived from bovine β -lactoglobulin. *International Dairy Journal*, 16, 294-302.
- Ryhänen, E.L., Pihlanto-Leppälä, A., Pahkala, E., 2001. A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *International Dairy Journal*, 11, 441-447.

- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh T., 2000. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, 83, 1434-1440.
- Sakata, S.K., Taniguchi, S., Rodrigues, D.F., Urano, M.E., Wandermüren, M.N., Pellizari, V.H., Comasseto, J.V., 2004. Development of a static headspace gas chromatographic/mass spectrometric method to analyze the level of volatile contaminants biodegradation. *Journal of Chromatography A*, 1048 (1), 67-71.
- Schanbacher, F.L., Talhouk, R.S., Murray, F.A., 1997. Biology and origin of bioactive peptides in milk. *Livestock Production Science*, 50, 105-123.
- Schanbacher, F.L., Talhouk, R.S., Murray, F.A., Gherman, L.I., Willett, L.B., 1998. Milk-borne bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 8, 393-403.
- Schmelzer, C.E.H., Schöps, R., Reynell, L., Ulbrich-Hofmann, R., Neubert, R.H.H., Raith, K., 2007. Peptic digestion of β -casein: Time course and fate of possible bioactive peptides. *Journal of Chromatography A*, 1166, 108-115.
- Schmidl, M., Labuza, T., 2000. *Essentials of Functional Foods*, Apsen Publishers, Inc., 395 p. Gaithersburg, Maryland.
- Seidman, L., Mowery, J., 2006. Ion Exchange Chromatography, Section 4.4. http://matchmadison.edu/biotech/resources/proteins/labManual/chapter_4/section4_4.htm. Erişim tarihi:19.06.2006
- Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., Korpela, R., 2003. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 326-330.
- Séverin, S., Wenshui, X., 2005. Milk biologically active components as nutraceuticals: Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 645-656.
- Shah, N.P., 2000. Effect of milk-derived bioactives: An overview. *British Journal of Nutrition*, 84 (Suppl. 1), 3-10.
- Shah, N., 2003. Yogurt: The Product and Its Manufacture. In: Caballero B, Trugo LC, Finlas PM, editors. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. New York: Academic Press. 6252-6259p.
- Shi, L., Zhang, Q., Rui, W., Lu, M., Jing, X., Shang, T., Tang, J., 2004. BioPD: a web-based information center for bioactive peptides. *Regulatory Peptides*, 120, 1-3.
- Shihata, A., Shah, N.P., 2000. Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 10, 401-408.

- Silva, S.V., Malcata, F.X., 2005. Caseins as a source of bioactive peptides, *International Dairy Journal*, 15, 1-15.
- Silva, S.V., Pihlanto, A., Malcata, F.X., 2006. Bioactive peptides in ovine and caprine cheeselike systems prepared with proteases from *Cynara cardunculus*. *Journal of Dairy Science*, 89 (9), 3336-3344.
- Sipola, M., 2002. Effects of Milk Products and Milk Protein-Derived Peptides on Blood Pressure and Arterial Function in Rats. Institute of Biomedicine Pharmacology, University of Helsinki, PhD Thesis, 85 p. Helsinki.
- Sipola, M., Finckenberg, P., Korpela, R., Vapaatalo, H., Nurminen, M.L., 2002. Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *Journal of Dairy Research*, 69, 103-111.
- Smacchi, E., Gobetti, M., 2000. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology*, 17, 129-141.
- Smet, K., Raes, K., De Block, J., Herman, L., Dewettinck, K., Coudijzer, K., 2008. A change in antioxidative capacity as a measure of onset to oxidation in pasteurized milk. *International Dairy Journal*, 18, 520-530.
- Songisepp, E., Kullisaar, T., Hutt, P., Elias, P., Brilene, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., 2004. A new probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial activity. *Journal of Dairy Science*, 87, 2017-2023.
- Srinivas, S., Prakash, V., 2010. Bioactive peptides from bovine milk α -casein: isolation, characterization and multifunctional properties. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 16, 7-15.
- Szabo, M.R., Idițoiu, C., Chambre, D., Lupea, A.X., 2007. Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. *Chemical Papers*, 61 (3), 214-216.
- Tamime, A.Y., Deeth, H.C., 1980. Yogurt: Technology and Biochemistry. *Journal of Food Protection*, 43, 939.
- Tang, X., He, Z., Dai, Y., Xiong, Y. L., Xie, M., Chen, J., 2010. Peptide fractionation and free radical scavenging activity of zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 587-593.
- Tekinşen, O.C., 2000. Süt Ürünleri Teknolojisi, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.
- Terzaghi, B.E., Sandine, W.E., 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29 (6), 807-813.

- Thomä-Worringer, C., Sørensen, J., López-Fandiño, R., 2006. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *International Dairy Journal*, 16, 1324-1333.
- Tokatlı, M., Yıldırım, M., Yıldırım, Z., 2005. Kazein türevli biyoaktif peptidler. 4. Gıda Mühendisliği Kongresi, 29 Eylül-1 Ekim, Ankara.
- Tomé, D., Debabbi, H., 1998. Physiological effects of milk protein components. *International Dairy Journal*, 8, 383-392.
- Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., 1991. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *Journal of Dairy Science*, 74, 4137-4142.
- Tomita, M., Takase, M., Bellamy, W., Shimamura, S., 1994. A review: the active peptide of lactoferrin. *Acta Paediatrica Japonica*, 36 (5), 585-591.
- Tsai, J.S., Chen, T.J., Pan, B.S., Gong, S.D., Chung, M.Y., 2008. Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk. *Food Chemistry*, 106, 552-558.
- Tunçtürk, Y., 2003. Sütte Bulunan Biyoaktif Proteinler ve Peptidler. Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu, 335-340 s, 22-23 Mayıs, İzmir.
- Turpeinen, A.M., Kumpu, M., Rönnback, M., Seppo, L., Kautiainen, H., Jauhiainen, T., Vapaatalo, H., Korpela, R., 2009. Antihypertensive and cholesterol-lowering effects of a spread containing bioactive peptides IPP and VPP and plant sterols. *Journal of Functional Foods* 1, 260-265.
- Türkoğlu H., Atasoy, F., Özer, B., 2003. Şanlıurfa ilinde üretilen ve satışa sunulan süt, yoğurt ve urfa peynirlerinin bazı kimyasal özellikleri. *Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 7 (3/4), 69-76
- Tzvetkova, I., Dalgalarondo, M., Danova, S., Iliev, I., Ivanova, I., Chobert, J.M., Haertlé, T., 2007. Hydrolysis of major dairy proteins by lactic acid bacteria from bulgarian yogurts. *Journal of Food Biochemistry*, 31 (5), 680-702.
- Usinger, L., Ibsen, H., Jensen, L.T., 2009. Does fermented milk possess antihypertensive effect in humans. *Journal of Hypertension*, 27, 1115-1120.
- Üçüncü, M., 2005. Süt ve Mamülleri Teknolojisi, Meta Basım, İzmir, 571 s.
- Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen S., Korhonen, H., 2007. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 106-115.

- Walther, B., Schmid, A., Sieber, R., Wehrmüller, K., 2008. Cheese in nutrition and health. *Dairy Science and Technology*, 88, 389-405.
- Weber, H., 1996. *Mikrobiologie der Lebensmittel Milch und Milchprodukte*. Behr's Verlag, Hamburg, 373 p.
- Wikipedia, 2010. http://en.wikipedia.org/wiki/Antimicrobial_peptides. Erişim Tarihi: 18.03.2010.
- Xu Z.M., Emmanouelidou, D.G., Raphaelides, S.N., Antoniou, K.D., 2008. Effect of heating temperature and fat content on the structure and development of set yogurt. *Journal of Food Engineering*, 85 (4), 590-597.
- Xue, Z., Yu, W., Liu, Z., Wu, M., Kou, X., Wang, J., 2009. Preparation and antioxidative properties of a rapeseed (*Brassica napus*) protein hydrolysate and three peptide fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5287-5293.
- Yalçın, S., 1985. Yoğurtta aroma ve lezzet bileşiklerinin oluşumu. *Ankara Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 32 (2), 237-249.
- Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T., 1994. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 77, 917-922.
- Yamamoto, N., Maeno, M., Takano, T., 1999. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yoghurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *Journal of Dairy Science*, 82, 1388-1393.
- Yaygın, H., 1999. *Yoğurt Teknolojisi*. Akdeniz Üniversitesi Basımevi, Antalya.
- Yazıcı, F., 1991. Samsun İlinde Tüketime Sunulan Yoğurtların Duyusal, Fiziksel, Kimyasal ve Mikrobiyolojik Nitelikleri Üzerinde Bir Araştırma. Ondakuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri. Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Samsun.
- Yetişmeyen, A., Yıldız, F., 2008. Süt teknolojisinde kazeinomakropeptidlerin önemi ve elde edilmesi. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*; 21-23 Mayıs, Erzurum.
- Zainoldin, K.H., Baba, A.S., 2010. The Effect of *Hylocereus polyrhizus* and *Hylocereus undatus* on physicochemical, proteolysis, and antioxidant activity in yogurt. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, 1 (2), 93-98.
- Zhang, S.B., Wang, Z., Xu, S.Y., 2008. Antioxidant and Antithrombotic Activities of Rapeseed Peptides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, 521-527.

Zucht, H.D., Raida, M., Adermann, K., Mägert, H.J., Forssmann, W.G., 1995. Casocidin-I: a casein α_{s2} derived peptide exhibits antibacterial activity. FEBS Letters, 372, 185-188.

EKLER

EK1. Besiyerlerinin hazırlanması

¼ kuvvetinde Ringer çözeltisi (Merck):

NaCl	: 2,25 g
KCl	: 0,105 g
susuz CaCl ₂	: 0,06 g
NaHCO ₃	: 0,05 g
Destile su	: 1000 mL

121 C°' de 15 dakika steril edilir.

Eosin Metilen Blue (EMB) Agar (Merck):

Pepton	: 10,0 g
K ₂ HPO ₄	: 2,0 g
Laktoz	: 5,0 g
Sukroz	:5,0 g
Eosin Y sarısı	: 0,4 g
Metilen mavisi	: 0,07 g
Agar agar	: 13,5 g
Destile su	: 1000,0 mL
pH 7,1±0,2	

Maddeler destile suda çözülür, 121°C' de 15 dakika sterilize edilir ve 45-50°C' ye soğuduğunda steril petri kutularına dökülür.

Patates Dekstroz Agar (PDA) (Merck):

Patates özü	: 4,0 g
-------------	---------

D (+) glukoz	: 20,0 g
Agar agar	: 15,0 g
Destile su	: 1000,0 mL
pH 5,6±0,2	

Maddeler destile suda çözülür, 121°C' de 15 dakika sterilize edilir, besiyeri pH' sını 3,5' e ayarlamak için litreye 14 mL % 10' luk steril laktik asit çözeltisi besiyeri sıcaklığı 45-50°C' ye soğuduğunda katılır ve steril petri kutularına dökülür.

Plate Count Skim Milk Agar (PC SMA):

Kazein peptonu	: 5,0 g
Maya ekstraktı	: 2,5 g
Skim milk tozu (inhibitör içermeyen)	: 1,0 g
D (+) glukoz	: 1,0 g
Agar agar	: 10,5 g
Destile su	: 1000,0 mL
pH 7,0±0,2	

Maddeler destile suda çözülür, 121°C' de 15 dakika sterilize edilir ve 45-50°C' ye soğuduğunda steril petri kutularına dökülür.

M17 Agar (Merck):

Soya peptonu	: 5,0 g
Et peptonu	: 2,5 g
Kazein peptonu	: 2,5 g
Maya ekstraktı	: 2,5 g
Et ekstraktı	: 5,0 g
Laktoz mono-hidrat	: 5,0 g
Askorbik asit	: 0,5 g

Sodyum β -gliserofosfat	: 19,0 g
Magnezyum sülfat	: 0,25 g
Agar agar	: 12,75 g
Destile su	: 1000,0 mL
pH	7,2 \pm 0,2

Maddeler destile suda çözülür, 121°C' de 15 dakika sterilize edilir ve 45-50°C' ye soğuduğunda steril petri kutularına dökülür.

MRS Agar (Merck):

Kazein peptonu	: 10,0 g
Et ekstraktı	: 10,0 g
Maya ekstraktı	: 4,0 g
D (+) glukoz	: 20,0 g
K ₂ HPO ₄	: 2,0 g
Tween 80	: 1,0 g
Diamonyum hidrojen sitrat	: 2,0 g
Sodyum asetat	: 5,0 g
MgSO ₄	: 0,2 g
MnSO ₄	: 0,04 g
Agar agar	: 14,0 g
Destile su	: 1000,0 mL
pH	5,7 \pm 0,2

Maddeler destile suda çözülür, 121°C' de 15 dakika sterilize edilir ve 45-50°C' ye soğuduğunda steril petri kutularına dökülür.

Nutrient Broth (Merck):

Et peptonu	: 5,0 g
Et ekstraktı	: 3,0 g

Destile su : 1000,0 mL
pH 7,0±0,2

Maddeler destile suda çözülür, 121°C' de 15 dakika sterilize edilir ve 45-50°C' ye soğuduğunda steril petri kutularına dökülür.

Mueller-Hinton Broth (Merck):

Et infüzyonu : 2,0 g
Hidrolize kazein : 17,5 g
Nişasta : 1,5 g
Destile su : 1000,0 mL
pH 7,4±0,2

Maddeler destile suda çözülür, 121°C' de 15 dakika sterilize edilir ve 45-50°C' ye soğuduğunda steril petri kutularına dökülür.

EK2. Çözeltilerin hazırlanması

OPA çözeltisi

7.620 g di sodyum tetra borat dekahidrat ve 200 mg sodyum dodesil sülfat 150 mL deiyonize suda çözülmüştür. Öncelikle bütün maddelerin çözünmesi sağlanmıştır. 160 mg OPA (Sigma) 4 mL etanol içerisinde çözülmüştür. Yukarıda bahsedilen iki çözelti birbiri ile karıştırılmıştır. Karışıma 176 mg dithiothreitol (DTT) (Sigma) su ekleyerek ve çalkalayarak ilave edilmiştir. Çözelti hacmi 200 mL' ye tamamlanmıştır.

50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6,5)

A: Stok alkali tamponu (50 mM)

Na₂HPO₄ (susuz) : 1.4196 g

Destile su : 200mL

B:Stok asit tamponu (50 mM)

NaH₂PO₄ (susuz) : 1.1998 g

Destile su : 200mL

A ve B çözeltileri ayrı ayrı hazırlanır. 50 mL, 50mM NaH₂PO₄ çözeltisi içersine pH metrenin ucu yerleştirilir ve pH 6.5 oluncaya kadar 50mM Na₂HPO₄ çözeltisi ilave edilerek hazırlanmıştır.

10 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6,5)

A: Stok alkali tamponu (10 mM)

Na₂HPO₄ (susuz) : 0.2839 g

Destile su : 200mL

B:Stok asit tamponu (10 mM)

NaH₂PO₄ (susuz) : 0.2399 g

Destile su : 200mL

A ve B çözeltileri ayrı ayrı hazırlanır. 50 mL, 10mM NaH₂PO₄ çözeltisi içersine pH metrenin ucu yerleştirilir ve pH 6.5 oluncaya kadar 10mM Na₂HPO₄ çözeltisi ilave edilerek hazırlanmıştır.

ABTS^{•+} radikal çözeltisi

2.45 mM potasyum persülfat (Merck) içeren 7 mM'lık ABTS (Amresco) çözeltisi hazırlamak için; 0.0384 g ABTS tartılır, bir miktar damıtık su içinde çözündürülerek kayıpsız şekilde 10 mL'lik ölçü balonuna aktarılır. 12.25 mM'lık potasyum persülfat çözeltisinden 2 mL alınarak ABTS üzerine eklenir ve destile su ile balon hacmine tamamlanır. Bu çözelti, oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda en az 12-16 saat bekletilerek ABTS^{•+} radikal çözeltisinin oluşması sağlanır. Bu şekilde hazırlanan radikal çözeltisi 2-3 gün stabil kalmaktadır.

0.1 M tuzlu fosfat tampon çözeltisi (PBS) (pH 7.4)

0.1 M fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) hazırlamak için, 19 mL 0.2 M monobazik soydu fosfat çözeltisi ile 81 mL 0.2 M dibazik sodyum fosfat çözeltisi karıştırılarak üzerine 8.77 g NaCl eklendikten sonra hacmi destile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ



Adı Soyadı :Hatice ŞANLIDERE ALOĞLU
Doğum Yeri ve Yılı :Vize, 1979
Medeni Hali :Evli
Yabancı Dili :İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise :Beşiktaş Atatürk Anadolu Lisesi, 1994-1997
Lisans :Uludağ Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 1997-2001
Yüksek Lisans :Süleyman Demirel Üni., Gıda Müh. Anabilim Dalı, 2001-2005

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Araştırma Görevlisi; 2002-....

Yayınları (SCI ve diğer makaleler):

- 1- Öner, Z., Şanlıdere-Aloğlu, H., Dedebaş, T., 2010. Determination of antioxidant capacity in milk from various animals and human. *Milchwissenschaft*. (Basımda)
- 2- Karahan, A.G., Başyigit Kılıç, G., Kart Gündoğdu, A., Şanlıdere Aloğlu, H., Öner, Z., Aydemir, S., Erkuş, O., Harsa, Ş., 2010. Genotypic identification of some lactic acid bacteria by AFLP and investigation of their usage possibility as starter culture combinations on Beyaz Cheese manufacture. *Journal of Dairy Science*, 93 (1), 1-11.
- 3- Gurbuz, F., Sanlidere, H., Karahan, A.G., 2008. Microbial growth inhibition by bioactive compounds found in algae. *Fresenius Environmental Bulletin*, 17 (8A), 962-968.
- 4-Öner, Z., Karahan, A.G., Aydemir, S., Şanlıdere, H., 2008. Effect of transglutaminase on physicochemical properties of set-style yoghurt. *International Journal of Food Properties*, 11 (1), 196-205.

- 5-Aloğlu, H., Öner, Z., 2006. Assimilation of cholesterol in broth, cream, and butter by probiotic bacteria. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108, 709-713.
- 6-Öner, Z., Karahan, A.G., Aloglu, H., 2006. Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal Turkish White cheese during ripening. *LWT-Food Science and Technology*, 39 (5), 449-576.
- 7-Öner,Z., Aloglu, H., 2004. Some characteristics of Mihalic, A Traditional Turkish cheese. *Milchwissenschaft*, 59 (11/12), 628-631.
- 8-Öner, Z., Şanlıdere Aloğlu, H., Sarıoğlu, T., Dedebaş, T., 2010. Yalvaç'ta üretilen kaymakların özelliklerinin belirlenmesi. *Süt Dünyası*, 5 (27), 60-63.
- 9-Şanlıdere Aloğlu, H., Öner, Z., 2010. Peyniraltı suyu proteinlerinin mikroenkapsülasyon teknolojisinde kullanım olanakları. *Akademik Gıda*, 8 (3);38-42
- 10-Zübeyde Öner, Aynur Gül Karahan, Hatice Şanlıdere Aloğlu, Gülден Başığıt Kılıç. 2008. Farklı Starter Kültürlerin Mihalıç Peyniri Üretiminde Kullanılması. *Hasad Gıda Eylül-Ekim 2008 Yıl:24 Sayı:280*
- 11-Şanlıdere, H., Öner, Z. Süt Ürünlerinde Bulunan Biyoaktif Peptidler ve Fonksiyonları. *Gıda Dergisi*, Sayı:6, 311-317, Kasım-Aralık, 2006
- 12-Öner, Z., Karahan, A.G., Aloğlu, H. Starter Kültür Kullanılarak Yapılan Tulum Peynirlerinin Bazı Özellikleri. *Gıda Dergisi*, Sayı:1 57-62,2005.