

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**KEFİR İÇECEĞİNİN BİYOAKTİF BİLEŞENLERİNİN *İN*
VİTRO GASTROİNTESTİNAL SİMÜLASYON İLE
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANIL ŞEKER

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2017

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**



**KEFİR İÇECEĞİNİN BİYOAKTİF BİLEŞENLERİNİN İN
VİTRO GASTROİNTESTİNAL SİMÜLASYON İLE
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANIL ŞEKER

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

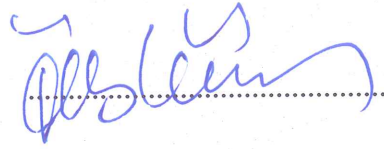
Anıl ŞEKER tarafından hazırlanan “KEFİR İÇECEĞİNİN BİYOAKTİF BİLEŞENLERİNİN *İN VİTRO* GASTROİNTESTİNAL SİMÜLASYON İLE BELİRLENMESİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 25.08.2017 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

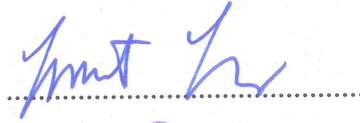
Danışman

Yrd. Doç. Dr. Özlem AYTEKİN



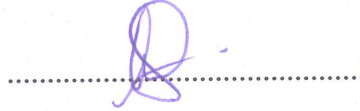
Üye

Prof. Dr. Yusuf YILMAZ

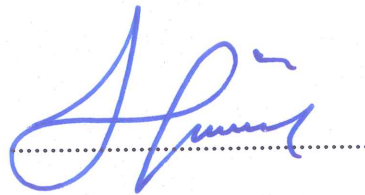


Üye

Doç. Dr. Seher ARSLAN



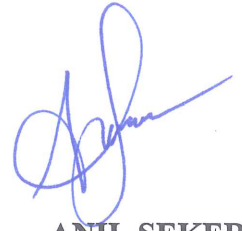
Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20/09/2017 tarih ve ...37/30... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Uğur YÜCEL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.



ANIL ŞEKER

ÖZET

KEFİR İÇECEĞİNİN BİYOAKTİF BİLEŞENLERİNİN *İN VİTRO* GASTROİNTESTİNAL SİMÜLASYON İLE BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANIL ŞEKER

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI:YRD. DOÇ.DR. ÖZLEM AYTEKİN)

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2017

Kefir, mikrobiyal çeşitliliği ve sağlık üzerine olumlu etkileri olduğu bilinen fermente bir süt içeceğidir. Kefirin *in vitro* sindirim simülasyonu ile izlenmesi; kefir içeceğinin tüketiminden hemen sonra sindirim prosesi boyunca biyoaktif moleküllerin miktarlarının nasıl değiştiğini ortaya koymuştur. Bu çalışmada kefir örneklerinin *in vitro* koşullarda sindirim simülasyonuna tabi tutulması ve kefirin; antihipertansif, antidiabetik, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Tezde örnek olarak kullanılan kefir geleneksel yöntemlerle üretilmiştir. Kefire sindirim prosesi öncesinde pH, titrasyon asitliği, yağ içeriği, azot içeriği, kuru madde içeriği ve kül içeriği analizleri yapılmıştır. Ardından kalan kefir sırası ile simüle gastrik ve intestinal faza tabi tutulmuştur. *In vitro* koşullarda gerçekleştirilen gastrik ve intestinal faz sonrasında farklı molekül büyüklüklerine sahip (3, 10, 30, 50 ve 100 kDa) ultrafiltrasyon fraksiyonlarına ACE inhibitör aktivitesi, DPPIV inhibitör aktivitesi, toplam fenolik madde miktarı tayini, DPPH aktivitesi, indirgeme gücü analizi, antimikrobiyal aktivite, protein miktarı ve SDS-jel elektroforezi analizleri uygulanmıştır.

Gastrointestinal sindirim sonrasında analiz sonuçları kefir ile karşılaştırılmış ve kefirdeki toplam fenolik madde miktarının 43,76 mg GAE/l'den 668,16 mg GAE/l'ye, DPPH aktivitesinin % 4,2'den % 63,06'ya, ACE inhibitör etkisinin % 9,91'den % 98,88'e yükseldiği görülmüştür, DPPIV inhibitör aktivitesinin % 19,91'e yükselirken indirgeme gücünün optik yoğunluğu 1,188'den 0,278'e ve protein konsantrasyonunun 101,14 mg/l'den 12,40 mg/l'ye düşmüştür. Sindirim prosesinden önce kefirde antimikrobiyal etki görülmezken, sindirim sonrası intestinal fazdan çıkan örneklerde *E.coli*'ye karşı antimikrobiyal etki görülmüştür. Bu sonuçlar gastrointestinal sindirimin kefirde bulunan biyoaktif molekül miktarlarında genel olarak artışa neden olduğunu ve bir fermente ürünün biyolojik açıdan yararlılığını tayin etmek için sindirim prosesinin gerekli bir metot olduğunu göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELELER: Kefir, Gastrointestinal Sindirim Simülasyonu, ACE İnhibitör Aktivitesi, DPPIV İnhibitör Aktivitesi, Antimikrobiyal Aktivite

ABSTRACT

DETERMINATION OF BIOACTIVE COMPONENTS OF KEFIR BEVERAGE BY IN VITRO GASTROINTESTINAL SIMULATION

MSC THESIS

ANIL ŞEKER

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

FOOD ENGINEERING

(SUPERVISOR:ASSIST. PROF. DR. ÖZLEM AYTEKİN)

DENİZLİ, AUGUST 2017

Kefir is a fermented milk known to have positive effects on microbial diversity and health. Monitoring kefir by *in vitro* digestion simulation; has revealed how the quantities of bioactive molecules change through the digestive process immediately after the consumption of kefir. In this study, it is aimed to subject kefir samples to *in vitro* digestion simulation and to compare the antihypertensive, antidiabetic, antioxidant and antimicrobial activities of kefir. Kefir is produced by traditional methods in the thesis. pH, titratable acidity, fat, amount of nitrogen, the amount of dry matter and ash analyzes were performed to undigested kefir samples. Then the rest of the kefir was subjected to gastric and intestinal phase respectively. ACE inhibitor activity, DPPIV inhibitor activity, analyse of total phenolic amount, DPPH activity, reducing power analysis, antimicrobial activity, protein amount and SDS-gel electrophoresis were applied to the gastric and intestinal phase samples and their ultrafiltration fractions.

The results of the analysis after gastrointestinal digestion were compared with kefir and it is determined that the amount of total phenolic substance in the kefir increased from 43.76 mg GAE/l to 668.16 mg GAE/li, activity of DPPH increased from 4.2% to 63.06%, ACE inhibitor effect increased from 9.91% to 98.88%. While DPPIV inhibitor activity of kefir increased to 19.91%, the optical density of the reducing power decreased from 1.188 to 0.278 and the protein amount decreased to 101.4 mg/l of 12.42 mg/l. While any antimicrobial effect was observed in undigested kefir, it was observed against *E. coli* in the digested kefir samples. These results show that kefir generally causes an increase in the amount of bioactive molecules that are released after gastrointestinal digestion, and that the digestion process is a necessary method to determine the biological capability of a fermented product.

KEYWORDS: Kefir, Gastrointestinal Digestion Simulation, ACE Inhibitor Activity, DPPIV Inhibitor Activity, Antimicrobial Activity

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Fonksiyonel Gıdalar	1
1.2 Kefirin Tanımı ve Tarihçesi	2
1.3 Kefirin Mikrobiyolojik Özellikleri.....	3
1.4 Kefirin Biyokimyasal Özellikleri	6
2. KEFİR	10
2.1 Kefirin Antioksidan Etki Mekanizması.....	10
2.2 Kefirin Antimikrobiyal Etki Mekanizması.....	13
2.3 Kefirin DPPIV İnhibitör Etkisi.....	14
2.4 Kefirin ACE İnhibitör Etkisi	17
2.5 Kefirin Sağlık Üzerine Diğer Etkileri.....	18
2.6 Kefirin Geleneksel Yöntemlerle Üretimi	21
2.7 Gıdaların Sindirimi.....	22
2.7.1 Karbonhidratların Sindirimi.....	25
2.7.2 Proteinlerin Sindirimi	25
2.7.3 Yağların Sindirimi	26
2.8 <i>In Vitro</i> Simüle Sindirim	27
3. MATERYAL METOT	29
3.1 Kefir Üretimi	29
3.2 Gastrointestinal Sindirim Simülasyonu	29
3.2.1 Gastrik Faz Simülasyonu	30
3.2.2 İntestinal Faz Simülasyonu	30
3.2.3 Santrifügal Filtrasyon	31
3.3 Kimyasal Kompozisyon	32
3.3.1 pH Ölçümü.....	32
3.3.2 Titrasyon Asitliği	32
3.3.3 Kül Tayini	33
3.3.4 Kuru Madde Tayini.....	33
3.3.5 Yağ İçeriği	34
3.3.6 Toplam Azot İçeriği Tayini (Khejdal).....	34
3.4 ACE İnhibitör Aktivitesi	35
3.5 DPPIV İnhibitör Aktivitesi.....	36
3.6 Antioksidan Madde Tayini.....	36
3.6.1 DPPH Aktivite Tayini.....	36
3.6.2 İndirgeme Gücü Antioksidan Aktivite Tayini	37
3.7 Toplam Fenolik Madde Tayini	38
3.8 Antimikrobiyal Aktivite	39
3.9 Protein Miktarı	39

3.10	Sodyum Dodesil Sülfat – Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	40
4.	BULGULAR	42
4.1	Kefirin Kimyasal Kompozisyonu	42
4.2	Santrifugal Filtrasyon	42
4.3	ACE İnhibitör Aktivitesi	44
4.4	DPPIV İnhibitör Aktivitesi	46
4.5	Antioksidan Madde Miktarı	47
4.5.1	DPPH Aktivitesi	47
4.5.2	İndirgeme Gücü	49
4.5.3	Toplam Fenol Miktarı	51
4.6	Antimikrobiyal Aktivite	53
4.7	Protein Miktarı ve SDS-PAGE Jel Görüntüsü	55
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	58
6.	KAYNAKLAR	61
7.	ÖZGEÇMİŞ	75

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Kefir danelerinin görünümü.....	2
Şekil 1.2: Kefir danelerinin elektron mikroskopundaki görüntüsü.....	5
Şekil 1.3: Embden-Meyerhof-Parness yolağı	7
Şekil 1.4: Pentozfosfat yolağı	7
Şekil 2.5: DPPIV enziminin inkretin hormonlar üzerine etkisi	15
Şekil 2.6: Arter basıncı üzerine renin-anjiyotensin mekanizması.....	17
Şekil 2.7: Kefirin geleneksel üretim proses şeması	22
Şekil 2.8: İnsan sindirim sistemi	23
Şekil 3.9: Gastrointestinal simülasyon görüntüleri	31
Şekil 3.10: Ultrafiltrasyon tüpleri	32
Şekil 4.11: Santrifügal filtrasyon işlem akış şeması	43
Şekil 4.12: Kefir ve ultrafiltrasyon örneklerin ACE inhibitör aktivitesi sonuçları(%)	44
Şekil 4.13: Kefir ve ultrafiltrasyon örneklerinin DPPIV inhibitör aktivitesi sonuçları (%)	46
Şekil 4.14: Kefir ve ultrafiltrasyon örneklerinin DPPH aktivitesinin sonuçları (%).....	48
Şekil 4.15: Kefir ve ultrafiltrasyon örneklerinin indirgeme gücü sonuçları (nm)	50
Şekil 4.16: Kefir ve ultrafiltrasyon örneklerinin toplam fenol miktarları GAE (mg/l).....	51
Şekil 4.17: Kefir ve ultrafiltrasyondan çıkan örneklerden E.coli için antimikrobiyal aktivite gösterenlerin disk görüntüleri.....	53
Şekil 4.18: Kefir, gastrik faz ve ultrafiltrasyon edilmiş gastrik fazın SDS-jel görüntüsü.....	56
Şekil 4.19: Kefir, intestinal faz ve ultrafiltrasyon edilmiş intestinal fazın SDS-jel görüntüsü	56

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Kefir danesinin mikroflorası.....	4
Tablo 1.2: Kefir tanesi, kefir kültürü ve kefirdeki mikroorganizma düzeyleri...	6
Tablo 1.3: Ürünlerine göre Laktik asit bakterisi grupları	8
Tablo 1.4: Kefirin bazı kimyasal bileşenleri ve enerji değeri	8
Tablo 2.5: Süt ve ürünlerinde antioksidan aktiviteye sahip bazı bileşenler.....	11
Tablo 2.6: Koyun kazeininin pepsin ile hidroliziyle elde edilmiş peptidlerin alt fraksiyonları	14
Tablo 3.7: Sindirim simülasyonu stok sıvıları	29
Tablo 3.8: Gallik asit standardı hazırlama tablosu.....	38
Tablo 3.9: Toplam fenol lineer regrasyon tablosu için hazırlanan çözeltiler....	38
Tablo 3.10: Ayırma Jeli Karışımları	40
Tablo 3.11: Ön ayırma jeli karışımları.....	40
Tablo 4.12: Analitik analiz sonuçları	42
Tablo 4.13: Ultrafiltrasyon sonrasında kalan örnekler ve miktarları	44
Tablo 4.14: Antioksidan madde miktarı ve toplam fenol miktarının karşılaştırılması	52
Tablo 4.15: Kefir ve ultrafiltrasyon örneklerinin protein miktarları.....	55

SEMBOL LİSTESİ

kDa	:	Kilodalton
dk	:	Dakika
GR	:	Gastrik retantat
İR	:	İntestinal retantat
GP	:	Gastrik permeat
İP	:	İntestinal permeat
ACE	:	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
DPPIV	:	Dipeptidil Peptidaz IV
DPPH	:	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
RP	:	İndirgeme gücü



ÖNSÖZ

Yüksek lisansım boyunca, tez konusunun belirlenmesinde, çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde; bilgi, deneyim ve desteğini benden esirgemeyen değerli hocam, tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Özlem AYTEKİN'e,

Çalışmam süresince bir an olsun desteğini esirgemeyen, laboratuvarında her ihtiyaç duyduğumda yanıma koşan, her türlü bilgi, birikim ve deneyimini benimle paylaşan, maddi-manevi hep yanımda olan sevgili dostum Sayın Yük. Müh. Sevdâ ARISOY'a,

Hayatımın her alanında yanımda olup maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen annem Ferah GEVREK ve babam Asil ŞEKER'e

Tezimin laboratuvar aşamasında en zor anımda, elindeki tüm imkanları benimle paylaşan değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ali Özhan AYTEKİN'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

1. GİRİŞ

1.1 Fonksiyonel Gıdalar

Fonksiyonel gıdalar, insanların temel besin ihtiyaçlarını karşılayan, vücut fonksiyonlarını olumlu yönde etkileyen, olası hastalıklardan korunmayı ve bireyin sağlığını iyileştirmede etkinlik gösteren gıda veya gıda bileşenleridir (Messina ve diğ. 2008; Hacıoğlu ve Kurt 2012). Fonksiyonel gıdalar arasında yer alan, vücuda yararlı, içerisinde canlı mikroorganizmalar barındıran gıdalar veya bu mikroorganizmalar tarafından üretilen gıdalara probiyotik gıdalar denilmektedir (Farnworth 2006). Probiyotik ürünler ve fonksiyonel gıdalar denildiğinde akla ilk gelen de fermente ürünler olmaktadır.

Fermente gıdaların tarihi antik çağlara dayanmaktadır. Gıdaları kurutma yoluyla korumanın dışında bilinen en eski yöntem gıdaların fermente edilmesidir. Fermantasyon işlemi; basit hammaddelerin çeşitli mikroorganizmaların faaliyetleri sonucu daha değerli bir ürüne dönüşmesi işlemidir (Farnworth 2009). Fermantasyon gıdaları daha dayanıklı hale getirirken aroma, koku ve tat oluşumuna da olumlu yönde katkılar sağlamaktadır (Karbancıoğlu ve Mutlu 2013). Bu nedenle yeni ürün geliştirmede üreticilerin başvurduğu bir üretim tekniği olarak bilinmektedir.

Fermantasyon teknolojisi ile et, meyve-sebze ve süt ürünleri üretilmektedir. Ülkemizde en çok tüketim olanağı bulan fermente süt ürünleri; peynir, yoğurt, ayran, tereyağı, kefir ve nadiren kıımızdır (Gaware ve diğ. 2011). Fermente süt ürünleri, süt şekerinin genellikle laktik asit bakterileri olmak üzere çeşitli mikroorganizmalar tarafından fermantasyonu sonucu elde edilen farklı aroma ve kıvama sahip ürünlerdir (Atamar ve diğ. 1988). Bunlar arasında günümüzde en yaygın olan ve en çok ilgi çeken fermente ürünlerden biri, kendine has mikroorganizmalar içeren, kompleks yapılı, yoğun kıvamlı bir içecek olan kefirdir. (Güzel-Seydim ve diğ. 2011). Kefir kendine has aromasının yanı sıra insan sağlığı üzerine olumlu etkileri nedeni ile de tüketicilerin ilgisini çekmeyi başaran bir fermente süt ürünüdür.

1.2 Kefirin Tanımı ve Tarihçesi

Kefirin ilk olarak ortaya çıktığı yer Kafkasya olup, inek, koyun, keçi, deve gibi çeşitli sütlere, kefir daneleri ilave edilerek elde edilen fermente bir süt ürünüdür (Karatepe ve diğ. 2012). Kefir yapımında inek, koyun, keçi, deve, hindistan cevizi, pirinç veya soya sütünden herhangi biri kullanılabilir (Ötleş ve Çağındı 2003).

Kefir danesinde bakteriler ve mayalar birlikte bulunur ve mikroorganizmaların metabolitlerini de içeren doğal bir probiyotik olarak kabul edilirler (Yüksekdağ ve diğ. 2004). Şekil 1.1’de görüldüğü gibi kefir danesi beyaz veya sarımsı renkte, düzensiz şekilli, küçük karnabahar görünümünde, çapı 3 ile 20 mm arasında değişen düzensiz partiküllerdir (Libudzisz ve Piatkiewicz 1990; Çağındı ve Ötleş 2003; Kesenkaş ve diğ. 2013). Sütün fermantasyonunu gerçekleştiren bu kefir daneleri, kefiran adı verilen polisakkarit matriksinin bir arada tuttuğu küçük mikroorganizma kümeleridir. Kefiran, *Lactobacillus kefiranofaciens* tarafından üretilen suda çözünabilir bir glukogalakattan’dır (Otsoa ve diğ. 2006). Kefir danesi yapısında bulunan laktik asit bakterileri (LAB) ve mayaların sütü homofermentatif ve heterofermantatif yollarla fermente etmeleri sonucu laktik asit, CO₂, az miktarda alkol ve aromatik moleküller oluşur. Oluşan bu moleküllerin hepsi kefirin kendine has duyuşsal özelliklerin gelişmesine katkı sağlar.



Şekil 1.1: Kefir danelerinin görünümü

Kefiri diğer fermente süt ürünlerinden ayıran en önemli özellik; kefir danesindeki bakteri ve mayaların simbiyotik bir şekilde çalışması sonucu laktik asit ve etil alkol fermantasyonunun aynı ortamda olmasıdır (Ünlütürk ve Turantas 1998;

Yılmaz ve diğ. 2006). Sütün fermentasyonu sonucu oluşan bu ürün; rahatlatıcı, asidik, homojen bir tekstüre sahip, yoğun kıvamlı, ve hafif maya aromasına sahiptir. Kefir içeceği; ülkemizde genellikle inek, keçi, koyun sütlerinden üretilmekle birlikte; deve sütünden de elde edilebilmektedir.

1.3 Kefirin Mikrobiyolojik Özellikleri

Resmi Gazetede yayımlanan ‘Türk Gıda Kodeksi Fermente Ürünler Süt Tebliği’ne göre (Tebliğ No: 2009/25)’kefir; fermentasyonda spesifik olarak *Lactobacillus kefiri*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* ve *Acetobacter* cinslerinin değişik suşları ile laktozu fermente eden (*Kluyveromyces marxianus*) ve etmeyen mayaları (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces exiguus*) içeren starter kültürler ya da kefir danelerinin kullanıldığı fermente süt ürünüdür.

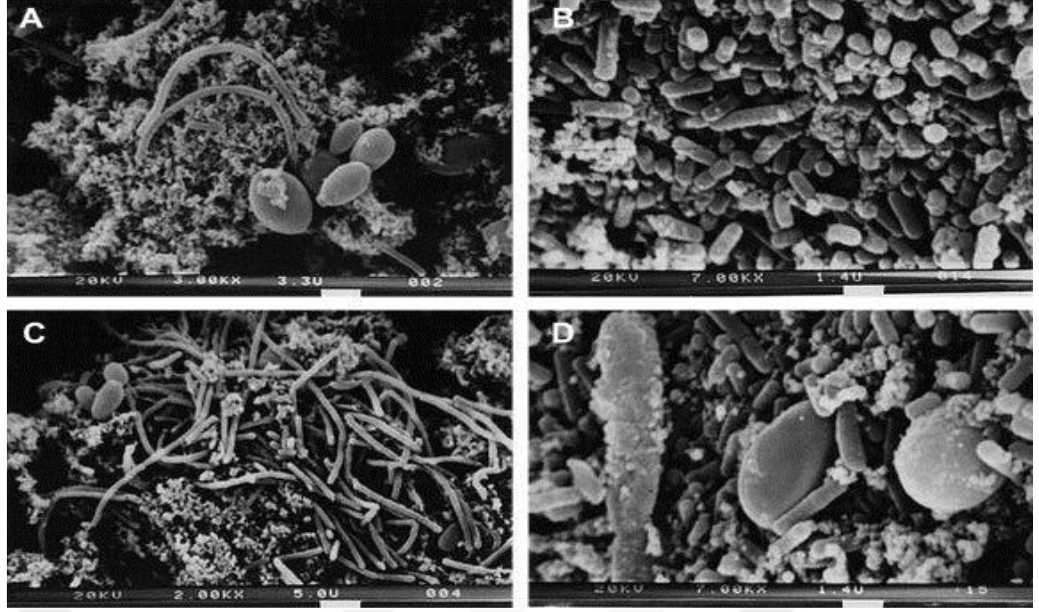
Kefir danesi, bünyesinde mayaları, laktik asit bakterileri (*lactobacilli*, *lactococci* ve *leuconostoc*) ve asetik asit bakterilerini (*acetobacter*) karışım halinde bulundurur (Terzi 2007). Chen ve diğ. (2008) Tayvan’da elde ettikleri üç farklı kefir danesi ile yaptıkları çalışmada, danelerde en baskın mikroorganizmanın her üç danede de benzer laktik asit bakterileri olduğu, bunların içinde de en yaygın olanının *Lactobacillus kefiri* olduğunu bildirmişlerdir. Güzel-Seydim ve diğ. (2011) yaptıkları derleme çalışmasında kefir danesinde bulunan mikroorganizmaları Tablo 1.1’deki gibi göstermişlerdir.

Tablo 1.1: Kefir danesinin mikroflorası (Güzel-Seydim ve diğ. 2011, adapte edilmiştir)

Lactobacilli	Lactococci	Yeast
<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus kefiranoferiens</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>Diacetylactis</i>	<i>Saccharomyces delbrueckii</i>
<i>Lactobacillus kefirgranum</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Candida kefir</i>
<i>Lactobacillus parakefir</i>		<i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	Streptococci	<i>Issatchenkia orientalis</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Saccaromyces unisporus</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Streptococcus cremoris</i> ,	<i>Saccharomyces exiguus</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Streptococcus durans</i>	<i>Saccharomyces humaticus</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces turicensis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>		<i>Pichia fermentas</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Acetic Acid Bacteria	<i>Torulopsis holmii</i>
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	<i>Acetobacter</i> sp.	<i>Candida holmii</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	<i>Torulospira delbrueckii</i>
<i>L. mesenteroides</i> , <i>L. crispatus</i>	<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Candida friedricchi</i>
<i>Lactobacillus hilgardii</i>		<i>Candida albicans</i>
<i>Lactobacillus viridescens</i>		
<i>Lactobacillus gasseri</i>		
<i>Lactobacillus fermentum</i>		

Tablo 1.1’de görüldüğü gibi kefir daneleri bünyesinde *Lactobacilli* türleri baskınken; *Lactococci*, *Streptococci* türleri de yoğun bir şekilde bulunmaktadır. Bunun yanı sıra asetik asit bakterileri ve mayaları da bünyesinde bulundurmaktadır. Ancak üretildikleri yere göre içerdikleri mikroorganizma çeşitleri ve oranları değişmektedir. Sonuç olarak kefir daneleri bakteri ve mayaların sinerjik bir şekilde çalıştığı yapılardır.

Kefir danesinin mikroskopik incelemesinde (Şekil 1.2) limon şeklinde veya uzun iplikli görünümde mayalar, koklar ve çubuk şeklinde laktobasiller bir arada görülmektedir.



Şekil 1.2: Kefir danelerinin elektron mikroskopundaki görüntüsü (A ve C kefir danesinin iç yüzeyi, B ve D kefir danesinin dış yüzeyi (Çakar 2013).

Koklar genellikle maya hücrelerinin yüzeyinde yer alırken, laktobasiller genel olarak maya hücrelerinin aralarına yerleşmiş durumdadır. Laktozu fermente edemeyen *Sacchararomyces cerevisiae* gibi mayalar danenin daha derin katmanlarında yer alırken; laktozu fermente edebilen *Torula kefir*, *Kluyveromyces lactis* ve *Kluyveromyces marxianus* gibi mayalar ise genellikle dış yüzeylere yakın bulunmaktadır. Laktik asit bakterileri ve asetik asit bakterileri de kefir danesinin en dış yüzeyinde yer almaktadırlar (Güzel-Seydim ve diğ. 2005; Otsoa ve diğ. 2006; Turan ve İlter 2007).

Yapılan bazı çalışmaların sonucunda kefir danesini oluşturan mikroorganizmalar ve oranlarını gösteren verilere göre; kefir mikroflorasının % 65-80'ini laktobasiller (homofermantatif, heterofermantatif; mezofil ya da termofil), % 20'sini streptokoklar ve % 5'ini mayaların oluşturduğu belirtilmektedir (Yıldız 2009). Kefir danesi mikroflorasında bulunan laktik asit bakterilerini homofermantatif ve heterofermantatif olmak üzere 2 gruba ayırmak mümkündür. Homofermantatiflere; *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* örnek olarak verilebilir. Heterofermantatiflere ise *Lactobacillus fermentum* ve *Leuconostoc mesenteroides* örnek verilebilir. Homofermantatifler sadece laktik asit üretimi yaparken (bkz. Şekil 1.3); heterofermantatifler laktik asit yanında CO₂, etanol ve asetik asitte (bkz. Şekil 1.4) üretirler (Karatepe ve diğ. 2012).

Farnworth (2005)'un yaptığı bir çalışmada kefir danesi, kefir kültürü ve kefir içeceğindeki mikroorganizma sayıları Tablo 1.2'de verilmiştir.

Tablo 1.2: Kefir tanesi, kefir kültürü ve kefirdeki mikroorganizma düzeyleri (log kob/mL) (Farnworth 2005)

	Laktokok	Laktobasil	Mayalar
Kefir Danesi	7,37	8,94	8,3
Kefir Kültürü	8,43	7,65	5,58
Kefir	8,54	7,45	5,24

Tablo 1.2'ye göre kefir danesinde bulunan mikroorganizma sayıları fermantasyon süresince değişim göstermekte ve bu değişimden en fazla mayalar etkilenmektedir. Laktobasiller yaklaşık 1,5 kob/mL azalırken mayalar yaklaşık 3 kob/mL azalmaktadır. Değişen pH, sıcaklık ve süre gibi etmenler mayaları etkilemektedir. Angulo ve diğ. (1993), kefir danesinde bulunan mayaların CO₂ ve etanol üretmeleri ile fermantasyonda önemli rol oynadıklarını belirtmişlerdir.

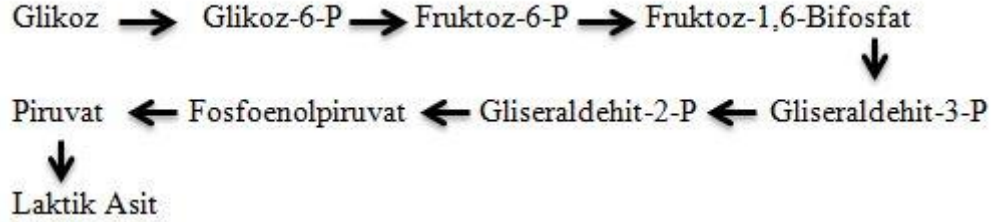
Koroleva (1988b), kefir danesinde bulunan mayaların, laktik asit bakterilerinin üremesini stimüle ettiğini belirtmektedir. Kefirin homo ve heterofermantasyonu sonucu laktik asit, asetik asit, CO₂, etil alkol, aromatik bileşikler, köpüklü bir yapı, patojenik mikroorganizmaların sütte oluşumunu engelleyen antibiyotik ve bakterilerin içerdikleri maddeler ortaya çıkmaktadır (Ötles ve Çağındı 2003; Yılmaz ve diğ. 2006).

1.4 Kefirin Biyokimyasal Özellikleri

Fermantasyon sıcaklığına, süresine ve oluşan asit miktarına bağlı olarak, laktik asit bakterilerinin etkisiyle laktik fermantasyonu; mayaların etkisiyle etil alkol fermantasyonu gerçekleşmektedir. Ayrıca fermantasyon ve saklama süresince kefir danesinde bulunan proteolitik bakteriler proteinlerin bir kısmını aminoasitlere parçalamaktadır (Metin ve Tavlas 1986).

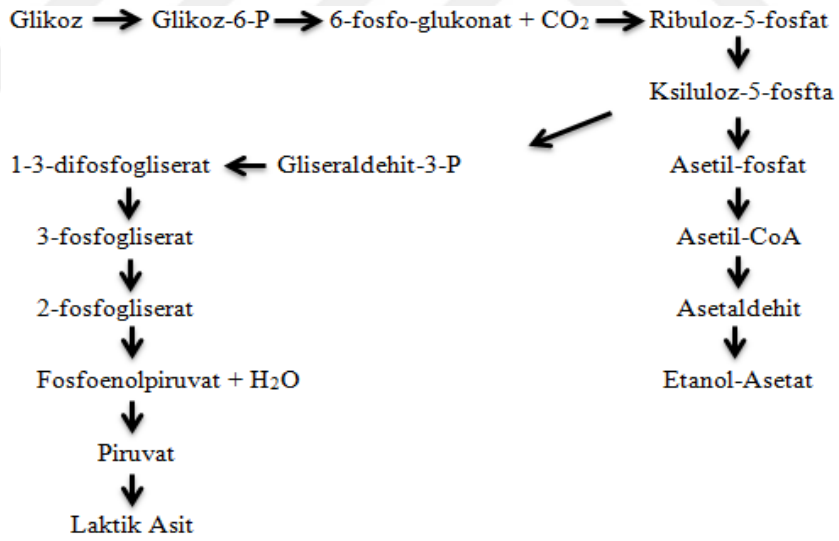
Kefirin fermantasyonu sırasında meydana gelen değişimler laktik asit fermantasyonu ile açıklanabilmektedir. Laktik asit fermantasyonu ile laktozdan laktik asit oluşumu homofermantatif ve heterofermantatif olarak gerçekleştirilir. Homofermantatif laktik asit fermantasyonunu gerçekleştiren laktik asit bakterileri

aldolaz ve hekzos izomeraz enzimlerine sahiptir ancak fosfoketolaz enzimi eksiktir. Şekil 1.3'te görüldüğü gibi bu bakteriler Embden-Meyerhof-Parness yolacağını izleyerek glikozu önce piruvata ardından laktik aside dönüştürmektedirler (Erkmen ve Bozoğlu 2016).



Şekil 1.3: Embden-Meyerhof-Parness yolu (homofemantatif laktik asit fermantasyonu)

Heterofermantatif laktik asit fermantasyonunda kullanılan yolak Pentoz fosfat (Şekil 1.4) yoladır. Kefir kültürünü oluşturan ve Tablo 1.3'te verilen bakterilerin bir kısmı bu yolu izleyerek %50 oranında laktik asit üretirken geri kalan kısmı aromayı ve tadı etkileyen CO₂, etanol ve asetik asit oluşturmaktadır.



Şekil 1.4: Pentozfosfat yolu

Bu iki fermantasyona ek olarak kefirde alkol fermantasyonu ile laktozdan piruvat, asetaldehit ve ardından etil alkol ve CO₂ oluşumu gerçekleşmektedir. Bu biyokimyasal reaksiyonların yanısıra fermantasyon esnasında sınırlı ölçüde proteinin pepton ve aminoasitlere parçalanması (yavaş proteoliz) gerçekleşmektedir.

Tablo 1.3: Ürünlerine göre laktik asit bakterisi grupları

HOMOFERMANTATİF	FAKÜLTATİF HETEROFEMANTATİF	HETEROFERMANTATİF
<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.
<i>Lac. Lactic</i> subsp. <i>Lactis</i>	<i>Lb. animalis</i>	<i>Lb. brevis</i>
<i>Lac. Lactic</i> subsp. <i>Cremoris</i>	<i>Lb. bifementans</i>	<i>Lb. buchneri</i>
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. cellobiosus</i>
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. homuhiochii</i>	<i>Lb. confusus</i>
<i>Lb. lactis</i>	<i>Lb. murinus</i>	<i>Lb. coprophilus</i>
<i>Lb. leichmannii</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. fermentum</i>
<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. pentosus</i>	<i>Lb. kefir</i>
<i>Peidococcus</i> spp.	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. reuteri</i>
<i>Ped. acidilactici</i>	<i>Lb. sake</i>	<i>Lb. sanfrancisco</i>
<i>Ped. damnosus</i>		<i>Lb. viridescens</i>
<i>Ped. pentosaceus</i>		<i>Leuconostoc</i> spp.
<i>Streptococcus</i> spp.		<i>Leu. dextranicum</i>
<i>Str. bovis</i>		<i>Leu. mesenteroides</i>
<i>Str. thermophilus</i>		<i>Leu. paramesenteroides</i>
<i>Enterococcus</i> spp.		<i>Leu. carnosum</i>
<i>Ent. faecium</i>		<i>Leu. gelidium</i>
<i>Ent. faecalis</i>		

Kefir, insan beslenmesi için gerekli olan protein, yağ, karbonhidrat, vitamin ve mineral maddeleri kimyasal bileşiminde bulundurmaktadır. Kefirin kimyasal bileşimi ve enerji değerleri Halle ve diğ. (1994) tarafından yapılan bir çalışma ile Tablo 1.4’te rapor edilmiştir.

Tablo 1.4: Kefirin bazı kimyasal bileşenleri ve enerji değeri (Halle ve diğ. 1994)

İçerik	100g	İçerik	100g	İçerik	100g
Enerji	65kcal	Treonin	0,17	Mineral (g)	
Yağ (%)	3,5	Metionin+sistin	0,12	Kalsiyum	0,12
Protein (%)	3,3	Lisin	0,27	Fosfor	0,10
Laktoz (%)	4	Valin	0,22	Mağnezyum	12,00
Su (%)	87,5			Potasyum	0,15
Süt asidi (g)	0,8	Vitaminler (mg)		Sodyum	0,05
Etil alkol (g)	0,9	A	0,06	Klorit	0,10
Laktik asit (g)	1	Karoten	0,02		
Kolesterol (mg)	13	B1	0,04	İz Elementler	
Fosfatidler (mg)	40	B2	0,17	Demir (mg)	0,05
		B6	0,05	Bakır (µg)	12,00
Esansiyel amino asitler(g)		B12	0,50	Molibden (µg)	5,50
Triptofan	0,05	Niasin	0,09	Manganez (µg)	5,00
Fenilalanin+Tirozin	0,35	C	1,00	Çinko (mg)	0,36
Lösin	0,34	D	0,08		
İsolösin	0,21	E	0,11		

Kefirin pH değeri 4,2–4,6 arasında olup, kefir kültürünü oluşturan mikroorganizmaların çeşitliliği, sütün kalitesi, kuru madde içeriği, kefirin üretimin endüstriyel veya geleneksel oluşu, sütün fermentasyon sıcaklığı ve süresi ile üretimden tüketime kadar geçen süre kefirin bileşimini etkilemektedir (Odet 1995). Tablo 1.4’de de görüldüğü gibi kefirde; laktik asit, %3,5 oranında yağ, %3,3 oranında protein, %4 laktoz ve %87,5 su; %0,6-0,8 etil alkol, farklı aldehitler ve aseton bulunmaktadır.

Mayalanmadan sonra süt içerisindeki laktoz %75 oranında azaldığı için, laktoza duyarlı kişiler kefir güvenli bir şekilde tüketebilir (Yılmaz ve diğ. 2006). Kefir tanesi kullanılarak üretilen kefirin CO₂ içeriğinin 0,85–1,05 g/l olduğu, starter kültür kullanılarak üretilen kefirin ise CO₂ miktarının 1,7 g/l olduğu bildirilmektedir (Beshkova ve diğ. 2002; Simova ve diğ. 2002).

Resmi Gazetede yayımlanan “Türk Gıda Kodeksi Fermente Ürünler Süt Tebliği”ne (Tebliğ No: 2009/25) göre kefirde; süt proteini ağırlıkça (%) en az 2,7, süt yağı ağırlıkça (%) en fazla 10, titrasyon asitliği laktik asit cinsinden ağırlıkça (%) en az 0,6, toplam spesifik mikroorganizma (kob/g) en az 10⁷, etikette belirtilen toplam ilave mikroorganizma (kob/g) en az 10⁶ ve maya (kob/g) en az 10⁴ olması gerekmektedir.

Daneler % 85-90 oranında su içermektedir. Kefir danesinin kuru madde kısmı genellikle % 57 karbonhidrat, % 33 protein, % 4 yağ ve % 6 külden oluşmaktadır (Kesenkaş ve diğ. 2013). İnsan metabolizması için gerekli olan ve esansiyel yağ asitleri ve aminoasitleri de bileşiminde bulundurulur. Biotin, folik asit, pantotenik asit ve B12 gibi B vitamini çeşitlerinin vücut tarafından emilmesine yardımcı olmaktadır. İçeriğindeki mineral maddeler sinir sisteminin işleyişinde, vitaminler böbrek, karaciğer ve sinir sisteminin işleyişinde, esansiyel aminoasitler sinir sistemi üzerine, fosfor karbonhidrat, yağ, protein ve enerji metabolizmasında rahatlatıcı etki göstermektedir (Karagözlü ve Kavas 2000, Karagözlü 2003a).

2. KEFİR

2.1 Kefirin Antioksidan Etki Mekanizması

Hücrelere dışardan alınan veya çeşitli biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda oluşan serbest radikaller pozitif ya da negatif yüke sahip olan iyonlardır. Bu iyonların sitoplazma veya reaksiyon ortamında fazla miktarda bulunması, ortamın iyonik yük dengesini bozmaktadır. Bu durum sistemde bulunan enzimlerin ya da reaktiflerin çalışmasını baskılar veya hızlandırır. Bu nedenle homeostasisi bozar. Bu kararsız reaktifler; lipid, protein, DNA ve nükleik asitlere zarar vererek başta kanser ve kronik hastalıklar olmak üzere daha birçok hastalığa neden olmaktadır (Velioğlu 2000). Vücudun, reaktif oksijen türlerine ve serbest radikallere karşı koruyucu yapı oluşturan antioksidan savunma mekanizması bulunmaktadır. Antioksidan maddeler; antibakteriyel, antikanserojen ve kalp-damar hastalıkları riskini azaltıcı etkiler göstererek son yıllarda üzerinde en fazla araştırma yapılan biyoaktif gıda bileşenleri arasına girmiştir (Lin ve Yen 1999; Kris- Etherton ve diğ. 2002; Virtanen ve diğ. 2006; Nayır 2008).

Serbest radikallerin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarları önlemek için vücutta enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan mekanizmaları gelişmiştir. Fakat bu mekanizmalar tüm hasarlardan tam anlamıyla korunabilmek için yeterli değildir. Bu yüzden, vücudumuzdaki oksidatif hasarların etkilerinden korunabilmek için günlük diyetimize antioksidatif madde miktarı yüksek gıdalar eklenmesi tavsiye edilmektedir (Lin ve Yen 1999; Mercan 2004; Virtanen ve diğ. 2006). Bu gıdalar başında, kayısı, kestane, elma, üzüm, çay, şarap, soğan, sarımsak ile süt ve süt ürünleri gelmektedir (Yılmaz 2010; Usta ve Erşan 2013) Son yıllarda süt ve yoğurt, peynir, kefir gibi fermente süt ürünlerinde doğal olarak bulunan vitaminlerin, enzimatik sistemlerin ve karotenoid gibi bileşiklerin antioksidan aktiviteleri üzerine pek çok çalışma yapılmıştır (Tablo 2.5).

Tablo 2.5: Süt ve ürünlerinde antioksidan aktiviteye sahip bazı bileşenler (Taşkın 2011, adapte edilmiştir)

ENZİMATİK OLMAYAN ANTİOKSİDAN BİLEŞENLER
Süt proteini, kazein
Peynir altı suyu proteinleri; (α - laktalbümin, β - laktoglobülin, laktoferrin)
Peptit ve aminoasitler
C vitamini,E vitamini (tokoferoller, tokotrienoller), Karotenoidler
Ürik asit
Konjuge linoleik asit
Bakteriler (laktik asit bakterileri)
ENZİMATİK ANTİOKSİDAN BİLEŞENLER
Katalaz,Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)

Süt proteini hidrolizatları ve hidrolizden sonra serbest bırakılan peptidler, radikal oluşumunu engelleyebilmekte ya da radikalleri ve hidrojen peroksit ile diğer peroksitleri uzaklaştırabilmektedir. Katalaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutasyon peroksidaz enzimatik olmayan antioksidanların sentezi ya da yenilenmesi reaksiyonlarını da katalizleyebilmektedirler.

Antioksidan aktivitesi analizleri, kimyasal reaksiyon mekanizmasına göre ikiye ayrılabilir. Bunlar; hidrojen atomu transfer (HAT) reaksiyonlarına dayanan yöntemler ve elektron transferine (ET) dayanan yöntemlerdir. Hidrojen atomu transferine dayanan metotlar serbest radikallerin antioksidan maddenin hidrojenine bağlanma miktarını belirler. Tek bir elektron transferine dayanan metotlar potansiyel antioksidanların elektron transfer etmesi ile metal, karbonil ve radikal içeren bileşiklerin indirgenmesine dayanmaktadır (Prior ve diğ. 2005). Bu tezde elektron transferine dayanan metotlardan; DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ve demir indirgeme gücü kullanılmıştır.

DPPH; koyu mor renkte, kararlı ve organik bir radikaldır. DPPH ile yapılan antioksidan madde tayininde, DPPH'in renginin antioksidanlarca giderilebilmesi özelliğinden yararlanılmakta ve basit, tekrarlanabilir bir deney olarak bilinmektedir.

Antioksidan madde DPPH'e bir hidrojen atomu verir ve mor renk, renksiz α,α -difenil- β -pikrilhidrazil molekülüne dönüşür.



DPPH radikali 517 nm’de karakteristik bir emilim gösterir ve antioksidan tarafından DPPH serbest radikaline proton transferi reaksiyonu 517nm’de absorbansın azalmasına neden olur. Sonuç olarak antioksidan miktarı arttıkça DPPH konsantrasyonu azalacaktır. İnhibe edici özelliği olduğu bilinen maddenin tam inhibisyonu sağlayacak konsantrasyonunun yarı değeri (IC₅₀); DPPH konsantrasyonunun yarıya indiği durumdaki antioksidan konsantrasyonunu gösterir (Pokorny ve diğ. 2001; Huang ve diğ. 2005; Albayrak ve diğ. 2010).

Yükseltgen maddeler oksidasyona neden olurken kendisi indirgenmektedir. Ortamdaki antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerde yükseltgen bileşikleri indirgeyebilmekte ve oksidasyonu önleyebilmektedirler. Antioksidan madde tayininde bu temel ele alınarak indirgeme gücü analizi yapılmaktadır. Bu analizde muhtemel antioksidanların, ortama ilave edilen yükseltgen bir madde olan demir (III) çözeltisini demir(II)’ye indirgeme gücü değeri ölçülmektedir. Ortamdaki indirgeyicilerin varlığı muhtemelen demir / ferrisiyanidin kompleksinin demir biçimine indirgenmesine neden olacaktır. Fe(III)’ün indirgenmesi ortamda Prusya mavisinin oluşmasına neden olur. Bu sayede 700 nm’de spektrofotometrede yapılan ölçüm değeri indirgeme potansiyelini gösterir. Absorbans değerlerindeki artış ortamdaki Fe⁺² miktarı ile doğru orantılıdır. Buna bağlı olarak yüksek absorbans, yüksek indirgeme potansiyelini gösterir (Oyaizu 1986; Meir ve diğ. 1995; Orman 2005; Mathew ve Abraham 2006).

Yapılan araştırmalara göre gıdaların fenolik madde içerikleri, sahip oldukları antioksidan aktivite ile yakından ilişkilidir (Duh ve diğ. 1998). Bu nedenle birbirini desteklediklerinden çalışmalarda toplam fenol analizlerine sıkça yer verilmektedir. Günümüzde sıklıkla, toplam fenolik madde miktarı tayininde; Singleton ve diğ. (1999) tarafından antioksidanların toplam fenol miktarlarını ölçmek için geliştirdikleri bir yöntem kullanılmaktadır. Bu analizin temeli, mevcut fenolik bileşiklerin Folin-Ciocalteu ayıracını indirgemesine ve kendilerinin oksitlenmiş forma dönüşmesine dayanmaktadır (Lussignoli ve diğ. 1999).

Yöntemin temeli kısaca fenolik bileşikler ve diğer indirgeyici bileşiklerden molibdenyum’a elektron transfer edilmesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon sonunda

mavi renkli bir kompleks oluşmakta ve 750-765 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmektedir (Albayrak 2010). Genellikle gallik asit ile standart eğri çizilmekte ve sonuçlar bu eğri yardımıyla yorumlanmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda gallik asit yerine; tannik asit, klorojenik asit, kaffeik asit, protokateşik asit, vanilik asit ve ferrulik asit de kullanılmaktadır (Prior ve diğ. 2005). Folin-Ciocalteu yöntemi, gıdaların ve bitkisel ekstraktların antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde basit, tekrarlanabilir ve güvenilir bir yöntemdir.

2.2 Kefirin Antimikrobiyal Etki Mekanizması

Süt proteinleri, gıda endüstrisinde potansiyel sağlık yararları ve uygulamaları olan; yüksek tansiyon, antimikrobiyal, antioksidan ve anti-trombiyotik gibi çeşitli özelliklere sahip etkili ve doğal bir biyoaktif peptid kaynağıdır. Peptidler, özellikle süt proteinlerinden türetilen peptitler, geniş yelpazede besleyici ve fonksiyonel özellikler ile biyolojik aktiviteler göstermektedir. Biyoaktif peptitler; peynir, kefir, süt ve yoğurt da dahil olmak üzere birçok süt ürününden izole edilebilmektedir. Bunlar, gıda özellikleri ve koşulları üzerinde olumlu etkisi olan ve sonuçta sağlığı etkileyebilen spesifik protein fragmentleri olarak tanımlanmıştır (Kitts ve Weiler 2003; Pritchard 2012).

Biyoaktif peptitlerin özelliklerini keşfetmeden önce; immünoglobülin, laktoferrin, laktoperoksidaz ve lizozim gibi bazı süt proteinlerinin antimikrobiyal aktiviteleri olduğu bilinmekteydi (Hayes ve diğ. 2007). Pritchard (2012) antimikrobiyal peptidlerin mikroorganizmaların büyümesini durdurduklarını veya baskıladıklarını ve bu peptitlerin β -laktoglobulin, α -laktalbümin, α ₁-kazein, α ₂-kazein ve κ -kazein gibi çeşitli süt proteinlerinden türediğini rapor etmiştir. Biyoaktif peptit aktivitesi, doğal aminoasit kompozisyonu ve dizilişine dayanır (Meisel ve FitzGerald 2003). Tablo 2.6’da görülen α ₂-kazeinin fraksiyonlarından biri olan f (203-208) çok işlevli bir peptidin iyi bir örneğidir, çünkü sadece antimikrobiyal aktivite göstermeyip, aynı zamanda güçlü antihipertansif ve antioksidan aktivite sergilemektedir (Sanchez ve diğ. 2005).

Tablo 2.6: Koyun kazeininin pepsin ile hidroliziyle elde edilmiş peptidlerin alt fraksiyonları (Sanchez ve diğ. 2013)

PROTEİN	SEKANS POZİSYONU	AMİNOASİT SEKANSI
αs-2 kazein	165 - 170	LKKISQ
αs-2 kazein	184 - 208	VDQHQKAMKPWTQPKTNAIPYVRYL
αs-2 kazein	165 - 181	LKKISQYYQKFAWPQYL
αs-2 kazein	165 - 180	LKKISQYYQKFAWPQY
αs-2 kazein	183 - 208	TVDQHQKAMKPWTQPKTNAI PYVRYL
αs-2 kazein	181 - 208	LKTVDQHQKAMKPWTQPKTNAIPYVRYL
αs-2 kazein	203 - 208	PYVRYL
αs-2 kazein	182 - 208	KTVDQHQKAMKPWTQPKTNAIPYVRYL
αs-2 kazein	165 - 183	LKKISQYYQKFAWPQYLKT
αs-2 kazein	172 - 208	YQKFAWPQYLKTVDQHQKAMKPW TQPKTNAIPYVRYL

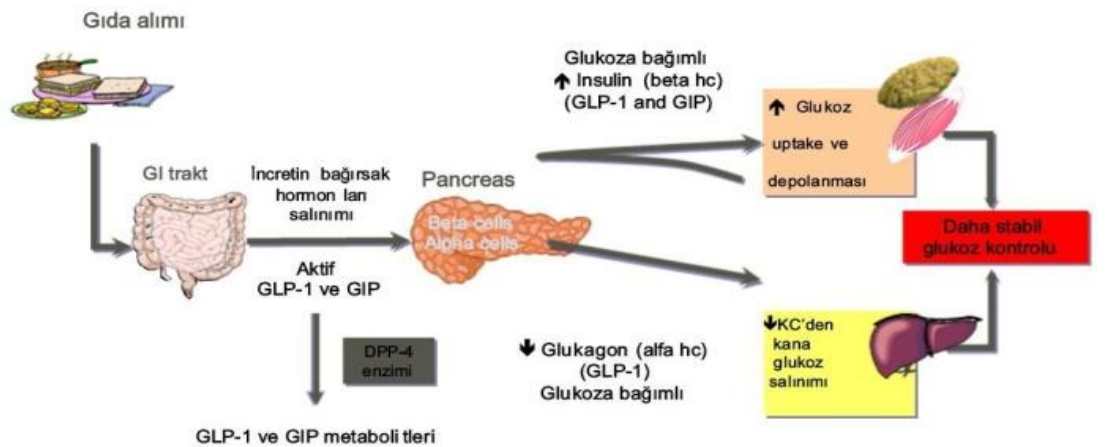
Kefir danelerindeki mikroorganizmalar; laktik asit, asetik asit, etanol, peptidler (bakteriosinler) ve patojenik mikroorganizmaların büyümesini engelleyen diğer biyoaktif bileşenleri üretebilir. Kefir içeceğinin antibakteriyel özelliği; fermantasyon sırasında üretilen organik asitler, H₂O₂, asetaldehit, CO₂ ve bakteriyosinlerin doğal etkisi dahil olmak üzere çeşitli faktörlerin kombinasyonu ile ilişkilidir (Witthuhn ve diğ. 2005; Powell 2006). Bunlar, Gram-pozitif mikroorganizmalar olan *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ve *L. monocytogenes*'e ve ayrıca Gram-negatif mikroorganizmalar olan *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus* ve *Aeromonas hydrophila*'ya karşı antimikrobiyal aktivite gösterebilmektedir (Pal ve diğ. 2005). Kefir antifungal ve antibakteriyel faaliyetleri nedeni ile bulaşıcı hastalıkların ve tümör gelişiminin önlenmesinde geniş kullanım alanı bulmuştur (Liu ve diğ. 2002).

2.3 Kefirin DPPIV İnhibitör Etkisi

Diabetes mellitus, insülin salgısı yokluğunda veya dokuların insüline duyarlılığının azalmasında ortaya çıkan bir sendromdur. 2 tip diyabetes mellitus vardır. Tip 1 diyabet; insülin salgısı yokluğuna dayanır. Tip 2 diyabet; hedef dokuların, insüline duyarlılıklarının azalmasına bağlı olarak ortaya çıkar ve insüline bağlı olmayan diyabet olarak kendini gösterir. Bu azalmış duyarlılığa insülin direnci de denir. İnsülin direnci, kanda yeterli miktarda insülin olmasına rağmen etkinliğini

gösterememesidir. Hücrelere taşınamayan şeker kanda birikir. Kan şekeri böylece yükselmiş olur. Tip 2 diyabette plazma insülin konsantrasyonu artmıştır. Bu durum; hedef dokulardaki insülin duyarlılığı azaldığı için pankreasın beta hücrelerinin yanıtı olarak görülür (De Witt ve Hirsch 2003). Tip 2 diyabetin dünya çapındaki insidansı artmaktadır. 2000 yılında 171 milyon diyabet hastası olduğu tahmin edilirken, 2030 yılı insidansının 366 milyon kişiye ulaşacağı tahmin edilmektedir (WHO 2006).

Besin maddesi vücuda alındıktan sonra glikoz bağımlı insulintropik peptid (GIP), bağırsağın üst kısımlarından ve daha özel olarak glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) gibi inkretinler ise ileum ve kolondan salgılanır. Bu inkretinler *in vivo* glukoz varlığında pankreatik beta hücrelerinden insülin sekresyonunu artırabilir. GLP-1 hormonunun insülin salgılanması üzerindeki etkisi dışında, insülin biyosentezinin uyarılması, glukagon salgılanmasını inhibe edilmesi, gastrik boşalmanın geciktirilmesi, yiyecek alımının azaltılması gibi etkileri de vardır (Mentlein 2005; Tulipano ve diğ. 2011). Dipeptidil peptidaz-IV (DPP-IV), çeşitli hücrelerde, özellikle karaciğer, böbrek ve bağırsak dahil olmak üzere epitelyal dokularda hem zar hem de çözünebilir formlarda sentezlenen bir serin proteazdır. Bununla birlikte, GLP-1 ve GIP, DPP-IV ile bozunabilir ve bu durum inkretinlerin biyoaktif özelliklerinde büyük kayıplara neden olur (Sentandreu ve Toldra 2001; Thoma ve diğ. 2003; Drucker 2006; Brandt ve diğ. 2006). Şekil 2.5’de DPP-IV enziminin inkretin hormonlar üzerine etkisi görülmektedir.



Şekil 2.5: DPP-IV enziminin inkretin hormonlar üzerine etkisi (Yılmaz, 2014)

Şekil 2.5'te DPPIV enziminin inkretin hormonlar üzerine etkisinin verildiği şemada görüldüğü gibi DPPIV enzimi GLP-1 ve GIP inkretin hormonlarının pankreas β hücrelerinden insülin salgılanmasını stimüle etmesini durdurur. Böylece β hücrelerinden insülin salgılanması düzenlenir ve bu inhibitörler Tip 2 diyabet tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır.

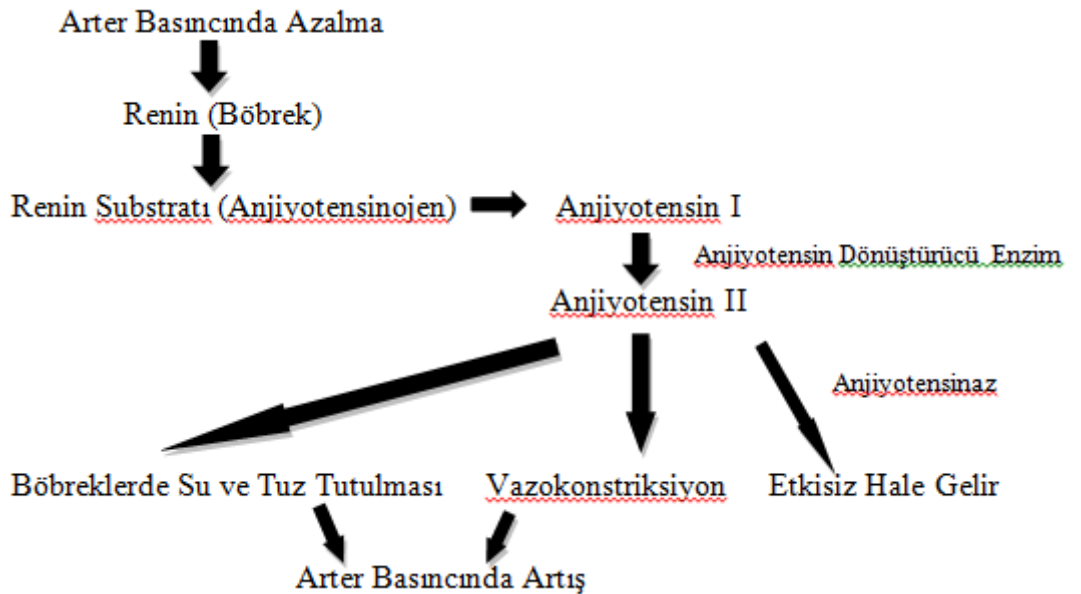
İnkretin etkisini arttırmak ve böylece insülin sekresyonunu arttırmak için iki yaklaşım uygulanabilir. Bunlardan biri GLP-1'in proteaza dirençli analoglarının intravenöz uygulanması veya bir diğeri DPP-IV inhibitörlerinin oral uygulanmasıdır. Aksi takdirde endojen GIP ve GLP-1'in hızlı inaktivasyonu gerçekleşmektedir. DPP-IV inhibitörlerinin oral olarak uygulanabileceği ve minimal yan etkilere neden olduğu bildirilmiştir (Mentlein 2005). DPP-IV inhibitörlerinin GLP-1 ve GIP'i enzimatik bozulmadan koruduğu ve dolayısıyla yarı ömrünü artıracak ve bunun da *in vivo* olarak uzun süreli bir etki yarattığı bildirilmektedir. Bununla birlikte, bazı çalışmalar, DPP-IV inhibitörlerinin insulinitropik özellikleri ile plazma GLP-1 seviyeleri arasında doğrudan bir korelasyon olmadığını gösteren çelişkili sonuçlar literatürde de bildirilmektedir. Bu, diğer inkretinlerin ve nöropeptidlerin DPP-IV inhibitörlerinin varlığında kan glikoz homeostazının düzenlenmesinde de rol oynadığını düşündürmektedir (Nauck ve El-Ouaghlidi 2005).

Geerts ve diğ. (2011), özellikle süt proteininden türetilmiş peptidler ve amino asitlerin normoglisemik ve tip 2 diyabetik kişilerde, yemek sonrası kan şekerinin düşmesi ve insülin sekresyonunun düzenlenmesiyle bağlantılı olduğunu bildirmiştir. Çeşitli gıda ürünlerinden elde edilen proteinlerin DPP-IV inhibitörlerinin öncül maddeleri olma potansiyeli hakkında yakın geçmişte yapılan bir araştırmada, süt proteinlerinin dizilerinde literatürde rapor edilen DPP-IV inhibitör peptid dizileri ile eşleşen fragmentleri içerdikleri gösterilmiştir. Bu bulgular süt ve süt ürünlerinin potansiyel bir DPPIV inhibitörü olduğunu göstermektedir (Lacroix ve Li –Chan 2012). Ayrıca, biyoaktif peptidlerin kaynağı olarak süt proteinlerini değerlendirmek için BIOPEP (Biyoaktif peptidlerin aminoasit dizilimini veren bir veritabanını kullanan bir bilgisayar destekli çalışma, süt protein dizilerinde en yüksek frekansla ortaya çıkan iki biyolojik özelliğin antihipertansif ve DPP-IV inhibe edici aktivitelerle ilişkili olduğunu göstermiştir (Dziuba ve diğ. 2009).

2.4 Kefirin ACE İnhibitör Etkisi

Böbrekler, damar içi basıncı hücre dışındaki sıvı hacmini değiştirerek kontrol edebilmektedir. Bu kontrol mekanizması dışında güçlü bir damar içi basınç kontrol sistemine de sahiptirler. Buna da renin-anjiyotensin sistemi denilmektedir. Renin enzimi arter basıncı düştüğünde böbreklerden salgılanır. Şekil 2.6’da gösterildiği gibi salgılanan bu enzim; renin substratı üzerine enzimatik bir etki göstererek 10-amino asitlik bir peptit olan anjiyotensin-I’in salgılanmasına neden olur. Renin yaklaşık 30-60 dakika kadar dolaşımda kalarak anjiyotensin-I oluşturmaya devam eder. Anjiyotensin-I, oluşumundan sonra iki amino asidini kaybederek 8 amino asitlik bir peptit olan anjiyotensin-II haline gelir. Bu dönüşüm anjiyotensin dönüştürücü enzim adlı bir enzim tarafından sağlanır. Anjiyotensin-II aşırı derecede güçlü bir damar daraltıcıdır. Ancak, dolaşımda sadece 1 ile 2 dakika kaldıktan sonra anjiyotensinazlar tarafından, etkisiz hale getirilir.

Anjiyotensin-II kan basıncını iki şekilde artırır. Bunlardan birincisi, vücudun birçok bölgesinde hızla oluşan damar daralmasıdır. Daralma atar damarlarda oldukça güçlü iken toplardamarlarda daha azdır. Bu durum toplam basıncı yükseltir. İkincisi ise böbreklerden su ve tuz atılmasının azaltılmasıyla gerçekleşir (Guyton ve Hall 1956c, Donoghue ve diğ. 2000, Jafar ve diğ 2003).



Şekil 2.6: Arter basıncı üzerine renin-anjiyotensin mekanizması (Guyton ve Hall, 1956c)

Sütün laktik asit bakterilerinin fermentasyonu ile ortaya çıkan ACE inhibitör peptidlerinin kan basıncını düşürdüğü gösterilmiştir. Bu inhibitörler, süt proteinlerinin bakteriyal proteinaz tarafından hidrolize edilmesi sonucu oluşur. Son zamanlarda araştırmacılar, ACE inhibitörlerinin, bazı *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lc. lactis ssp. cremoris*, *Lc. lactis ssp. diacetylactis* ve *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* suşları tarafından fermentasyon sırasında süt proteoliziyle salınabileceğini bildirmiştir (FitzGerald ve Murray 2006; Pihlanto ve diğ. 2010). Fermente süt ile yapılan çalışmalarda en iyi karakterize edilen ACE inhibitör peptidlerinin fermente sütte bulunan Val-Pro-Pro ve Ile-Pro-Pro olduğu rapor edilmiştir (Engebring ve diğ. 2008; Pripp 2008).

Günümüzde ACE aktivitesi ve *in vitro* inhibisyon ölçümleri için N- α -hippuril-L-histidil-L- lösin (HHL), N-[3- (2-furil)akriloyil]-L-fenilalanil-glisin (FAPGG) ve o-aminobenzoylglisinil-p-nitrofenilalanilprolin (Abz-Gly- Phe-(NO₂)-Pro; Abz) gibi sentetik substratlar kullanılmaktadır. ACE hidrolizi sonrasında ürünlerin tanımlanması için tercih edilecek yöntem, kullanılacak cihaza bağlı olarak değişmektedir. Substrat olarak HHL, FAPGG ve Abz kullanıldığında sırasıyla HPLC, spektrofotometre ve spektrofotometre gerekmektedir. Bunların dışında ACE aktivitesinin belirlenmesinde radyokimyasal ya da kapiler elektroforez yöntemleri de kullanılabilmektedir (Gürsoy ve diğ. 2015).

2.5 Kefirin Sağlık Üzerine Diğer Etkileri

Organizmada trigliserid ve kolesterolü taşıyan çok düşük yoğunluktaki lipoproteinler (VLDL), ara yoğunluktaki proteinler (IDL), düşük yoğunluktaki lipoproteinler (LDL) ve yüksek yoğunluktaki proteinler (HDL)'den oluşan endojen bir sistem vardır (Ahotupa ve diğ. 1996). Liu ve diğ. (2006)'nin süt, kefir ve soya sütünün kolesterol düşürme özelliklerini inceledikleri bir çalışmada erkek fareler %10 yağsız süt, süt-kefir, soya sütü, soya sütü-kefir karışımlarını içinde bulunduran kolesterolce zengin ve kolesterol içermeyen diyet ile 8 hafta süresince beslemişlerdir. Diyetlerin serum triaçilgliserolde, toplam kolesterolde ve karaciğerdeki kolesterol birikiminde azaltıcı etki gösterdiklerini saptamışlardır. Aynı zamanda soya sütü-kefir diyeti kontrol ile karşılaştırıldığında diğer diyetlere göre non-HDL-kolesterol ve

HDL-kolesterol'ün serum oranlarında daha fazla azalma ortaya koymuştur. Hiperkolesterolemik bireylerin damarlarında oksidatif stresin arttığı bunun yanı sıra LDL (düşük dansiteli protein) oksidasyonunun ateroskleroz gelişiminde önemli bir basamak olduğu bilinmektedir. Başka bir çalışmada 2 ay süre ile diyetlerine kolesterol ilave edilen tavşanların (%1, w/w) ağırlıkları oranında (30 ml/kg/gün) kefir tüketmesi durumunda kan lipid düzeyleri ve oksidasyon durumu incelenmiştir. Bu amaçla 56 günlük yedirme periyodu sonunda serum total kolesterol, trigliserit, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçülmüş. Kefir tüketen grup, kontrol grubuna kıyasla serum lipid ve lipid peroksidlerindeki artışı önemli düzeyde engellemiş. Sonuç olarak kefirin hipokolesterolemik etkisinde antilipidemik ve antioksidan özelliklerinin rol oynadığı görüşüne varılmıştır (Güven ve Güven 2005).

Çok sayıda sağlık sorunlarının ortaya çıkışında immun sistemin zayıflamasının önemli etkileri olmaktadır. Kefir ve immun sistem üzerine yapılan çalışmalarda; kefirin immun sistemi güçlendirici etkisinin laktik asit bakterilerinden kaynaklandığı ve laktik asit bakterilerinin, metabolizmada immun faaliyetleri arttırdığı, tümör ve enfeksiyonlara karşı spesifik olmayan direnci güçlendirdiği saptanmıştır. Kefirin fermentasyonu sırasında kazeininin proteolizi gerçekleşmekte ve çok sayıda peptid ve amino asit oluşmaktadır. Çalışmalar oluşan peptidik fraksiyonların immun sistemi düzenleyici etkilerinin olabileceğini göstermektedir (Ender 2009). Kefirdeki probiyotik mikroorganizmaların bağırsaklara olan etkisinin yanında, kefirdeki bakterilerin bazı suşları, diğer organlarda meydana gelen bakteriyel, fungal ya da viral enfeksiyonları vücudun immün sistemini uyararak yavaşlatırlar ya da tamamen engellerler (De Vrese ve Schrezenmeir 2002). Kefir ve kefirdeki lipidlerden izole edilen sifingomiyelinin, hem *in vitro*, hem de *in vivo* çalışmalarda bağışıklık sistemini uyardıkları rapor edilmiştir (Çevikbaş ve diğ. 1994). Kefir midenin hareketliliğinin artmasını ve daha hızlı boşalmasını teşvik edici etkiye sahiptir. Ancak diğer süt ve süt ürünleri (peynir, peynir altı suyu ve tereyağı) midenin hareketliliğinin artması ve hızlı boşalma üzerine inhibe edici bir etki göstermektedir (Zubillaga ve diğ. 2001).

Vücutta bağırsaklarda bulunan β -galaktosidaz (laktaz) aktivitesinin düşüklüğe bağlı olarak gıdalarla birlikte alınan laktozun, bağırsağın ilerleyen kısımlarına

ulaşmasıyla birlikte tolere edilemeyen bazı belirtiler ve rahatsızlıklar ortaya çıkardığı görülmektedir. Sindirilememiş laktoz uçucu bazı bileşikler (organik asitler, karbondioksit, metan ve hidrojen) açığa çıkarmaktadır. Yapılan çalışmalar fermente süt ürünlerinin laktoz intoleransını azaltabileceğini kanıtlamıştır (Zubillaga ve diğ. 2001). Kefirin laktoz sindirimi üzerine etkisinin incelendiği bir araştırmada; laktoza duyarlılığı olan bireylere laktoz miktarı aynı olan süt, yoğurt, kefir, aromalı yoğurt ve aromalı kefir verilmiş ve kefirin β -galaktosidaz aktivitesi sırası ile 0; 3,4; 5,4; 3,2 ve 5,2 olarak bulunmuştur. Araştırma sonuçları kefirin β -galaktosidaz aktivitesinin yoğurda oranla % 60 daha fazla olduğunu göstermektedir. Kefirdeki tüm mikroorganizmaların β -galaktosidaz aktiviteye sahip olmamalarına rağmen (örn., *Saccharomyces florentinus* gibi bir maya), hücre sayısı, β -galaktosidaz aktivitesi ve/veya diğer kültürlerin safra duyarlılığı, laktozun yüksek derecede sindirimine izin verecek şekilde yüksek kalmaktadır (Hertzler ve Clancy 2003). Mayalanmadan sonra süt içerisindeki laktoz %75 oranında azaldığı için, laktoza duyarlı kişiler kefirini güvenli bir şekilde tüketebilirler (Yılmaz ve diğ. 2006).

Kefir tüketimi hücrelerde meydana gelen mutasyon ve DNA hasarını azaltarak; β -glukuronidaz, nitroredüktaz, azoredüktaz gibi kanser oluşumuna zemin hazırlayan enzimlerin aktivitelerini düşürmektedir. Kefir, mutajenik maddeleri etkisizleştirmekte, kısa zincirli yağ asitlerinin üretimini arttırmakta ve hücrelerde asitliğin artmasını sağlayarak kanserli hücre intiharını (apoptozis) hızlandırmaktadır. Bu da kefirin antikanserojen etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Karatepe ve Yalçın, 2014). Fermente süt ürünlerinin olası inhibisyon etkisi, doğrudan bağırsak kanseri ile ilişkisi olan *Fusobacterium nucleatum*'un *in vitro* şartlarda gelişmesi üzerine incelenmiş ve kefir örnekleri, belirgin bir şekilde büyümeyi inhibe edici etki göstermiştir. En büyük ve en belirgin zon çapları doğal kefir ile ıslatılmış disk çevresinde gözlenmiştir. Daha sonra bunu probiyotik yoğurt, ticari kefir ve ticari yoğurt izlemiştir. Sonuçlar doğal kefir ve probiyotik yoğurdun, *F. nucleatum* üzerine inhibitör özelliklere sahip olabileceği hipotezini desteklemektedir (Güzel-Seydim ve diğ.2016).

Meme kanseri kadınlarda önde gelen kanserdir ve metastatik meme kanseri ile ilişkili en önemli ölüm nedenidir. Malezya'dan elde edilen kefir tanelerinden yapılan kefirin antimetastatik ve anti-anjiyojenik etkileri, 4T1 meme kanseri

hücrelerinde incelenmiştir. Kefirin 4T1 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin IC₅₀ değeri sırasıyla, 48 ve 72 saat süre ile 12.5 ve 8.33 mg/mL olmuştur. Kefir ile tedavi edilen grupta; tümör boyutu % 29,53-% 32,92 aralığında azalmış ve ağırlığında $0,9132 \pm 0.219$ önemli bir azalma meydana geldiği g r lm ştur. Yardımcı T hücreleri (5 kat) ve sitotoksik T hücrelerinde (7 kat)  nemli bir artma gözlenmiştir. Proenflamatuar ve proanjjiyojenik belirteçler anlamlı olarak azalmıştır (Zamberi ve diğ. 2016).

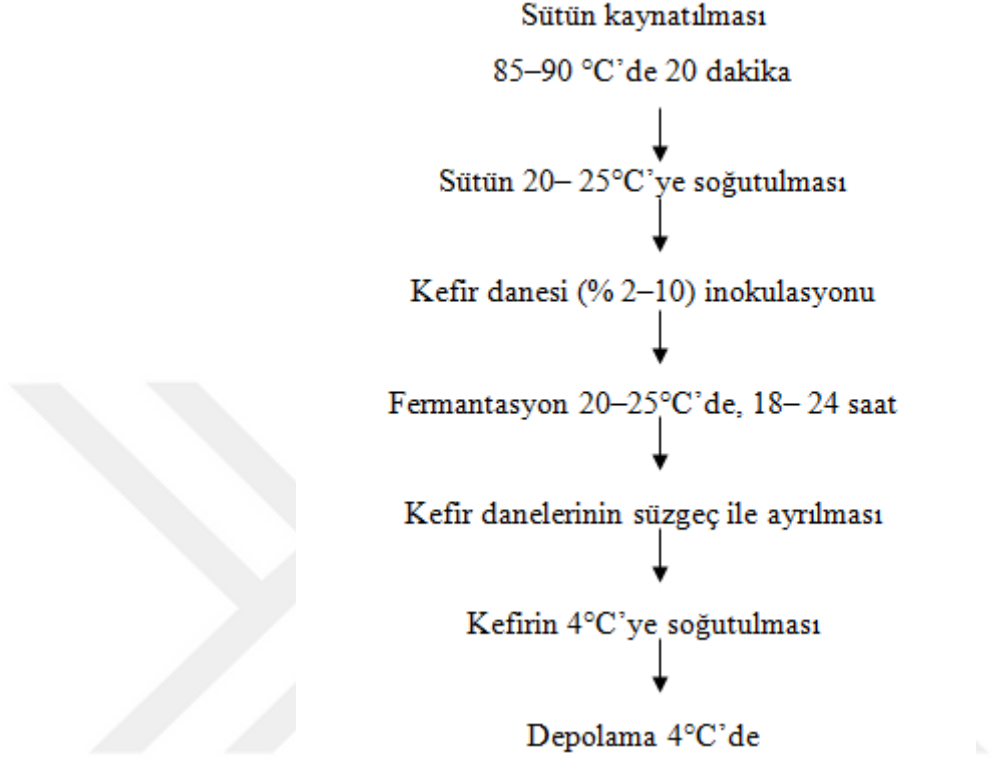
Kefir ve biranın bazı sağlığa yararlı özellikleri sergilediği bilinmektedir. Kefir ile yapılan biranın anti-inflamatuar ve anti- lserojenik aktiviteleri sıçanın pençe ödemi ve etanol kaynaklı mide ülseri modeli kullanılarak değerlendirilmiştir. Bira içerisinde bulunan polifenol içeriği HPLC ile değerlendirilirken, deney hayvanlarında serum kolestrol, triasilgliserol, HDL kolesterol, alanin aminotransferaz enzimi (ALT), aspartat aminotransferaz enzimi (AST), katalaz ve glutasyon peroksidaz, moleküler absorpsiyon ile tespit edilmiştir. Kefir birası ve sulu kefiran ile modifiye edilmiş kontrol birası ile tedavi edilen grupta, inflammatuar ve  lserojenik yanıtlarda belirgin azalmalar olmuştur (Rodrigues ve diğ. 2016).

Akut eritrolösemi, akut miyeloid löseminin (AML) nadir bir alt tipidir ve AML'nin kötü prognozu olarak kabul edilir. Yoğun kemoterapi tedavinin ilk hattıdır. Akut eritrolösemi hücre hattı (KG-1) ve periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) kefirin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada KG-1 ve PBMC, kefir ve sütün farklı dozları ile muamele edilmiş ve toplamda üç kez inkübe edilmiştir. Sonuçlar kefirin KG-1 hücre hattında apoptoz ve nekroza neden olduğunu göstermiştir. Kefirin, eritrol seminin hücre hattında çoğalmasını azalttığı ortaya çıkmıştır. PBMC üzerinde kefirin dikkate değer bir etkisine rastlanmamıştır. Çalışma sonuçlarına göre, kefirin etkili bir eritrolösemi tedavi yöntemi olma potansiyeline sahip olabileceği düşünülmektedir (Jalali ve diğ. 2016).

2.6 Kefirin Geleneksel Yöntemlerle  retimi

Kefir  retimi günümüzde endüstriyel ve geleneksel olarak üretilmektedir. Endüstriyel  retimde farklı yöntemler kullanılmasına rağmen temelde geleneksel üretim ile aynı prensibe dayanmaktadır. Endüstriyel  retimde ısıl işleme tabi tutulan

süte kefir tanesi yerine kefir kültürü inoküle edilmekte ve fermentasyon sonunda direkt şişelenmektedir. Geleneksel kefir üretiminde ise (Şekil 2.7) kefir danesi direkt süte ilave edilerek yapılmaktadır (Halle ve diğ. 1994).



Şekil 2.7: Kefirin geleneksel üretim proses şeması (Karagözlü ve Kavas 2000; Şatır 2011)

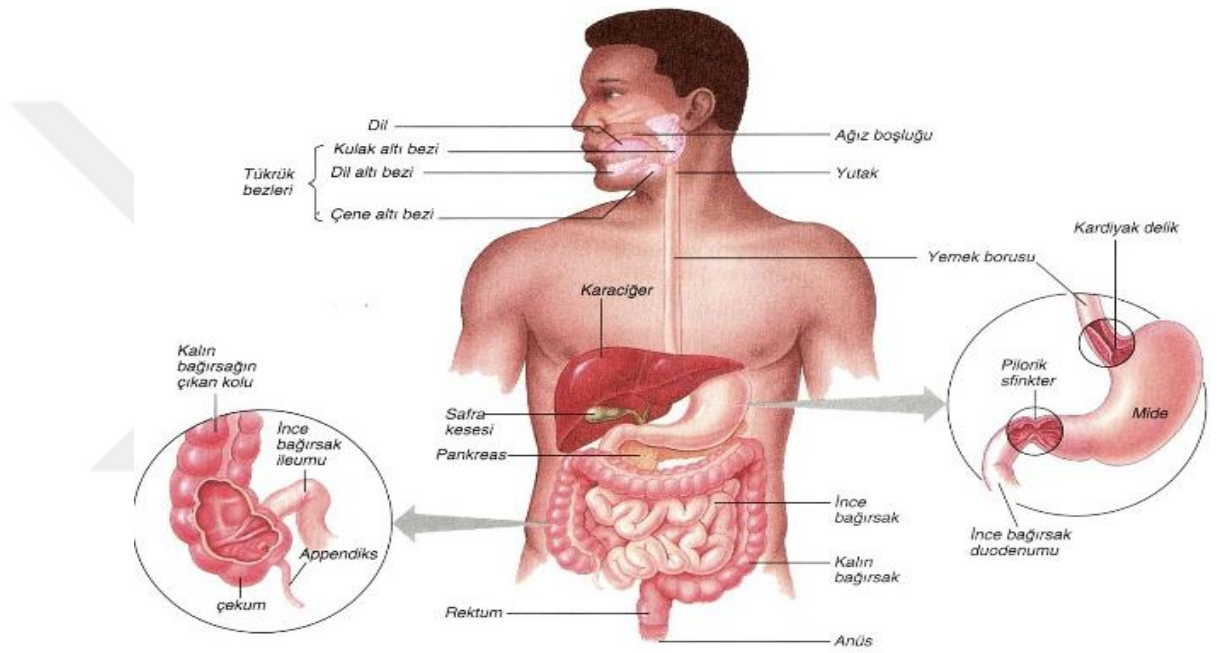
Üretilen kefir uzun süre depolanacaksa ya liyofilize edilmeli ya da dondurulmalıdır (Karagözlü ve Kavas 2000; Şatır 2011).

2.7 Gıdaların Sindirimi

Sindirim kanalları vücut içine suyun, elektrolitlerin, vitaminlerin ve besinlerin sürekli olarak aktarımını sağlar. Bunun içinde gıdaların sindirim kanalı boyunca hareket ederek sindirim salgılarının salgılanması ve gıdaların sindirilerek, suyun, çeşitli elektrolitlerin, vitaminlerin ve sindirim ürünlerinin emilimi ve taşınması için gastrointestinal organlarda kanın dolaşması ve bu işlevlerin lokal, sinirsel ve hormonal mekanizmalarla kontrolü gerekir (Guyton ve Hall 1956a).

Besinlerin sindirim kanalında en uygun şekilde işlenebilmesi ve karıştırılması için gastrointestinal kanalın her bölümünde yeterli sürede kalması gerekir. Bunun içinde çok sayıda hormon ve otonom sinir sistemi mekanizmaları bir bütün olarak çalışır (Chang 1996).

Şekil 2.8’de gıdanın ağıza alındıktan sonra izlediği yol şu şekildedir; çiğneme, yutma, yemek borusu, mide, duodenum, jejunum, ileum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon ve anüs. Sindirim salgılarında temel rol oynayan organlar ise; ağız, mide, pankreas, safra kesesi ve ince bağırsaktır.



Şekil 2.8: İnsan sindirim sistemi (Guyton ve Hall, 1956a)

Sindirimde görevli salgı bezlerinin başlıca 2 çeşit görevi vardır. Bunlardan birincisi, ağızdan ileuma kadar pek çok bölgeden sindirim enzimlerini salgılamalarıdır. İkincisi ise, ağızdan anüse kadar uzanan muköz bezlerin, sindirim kanalında gıdaların daha rahat hareketi için kayganlaştırılmasını sağlayan mukus maddesini salgılamalarıdır. Sindirim salgılarının büyük bir çoğunluğu sindirim kanalında gıda maddesi bulunması halinde salgılanır. Ayrıca salgılanan sindirim enzimlerinin tipleri ve içerikleri mevcut olan gıdanın içeriğine göre değişkenlik gösterir (Jonhson ve Gerwin 2007).

Tükürük 2 ana tip protein salgılanması içerir: (1) nişastaların sindirimini sağlayan enzim olan pityalin (α -amilaz) içeren seröz salgı ve (2) kayganlaştırıcı ve yüzey koruyucu özelliklere sahip olan mûsin içeren mukus salgısı. Tükürüğün pH'sı 6,0-7,0 arasındadır. Yüksek miktarda potasyum ve bikarbonat iyonları içerir (Guyton ve Hall 1956b). Katı gıdalar mekanik bir parçalama olan çiğneme eylemi sırasında bu enzim ve salgılar ile muamele olurlar.

Midede mukus salgılayan hücre yapılarına ek olarak iki önemli tip tübüler bez bulunur. Bunlar oksintik (mide bezleri) bezler ve pilor bezleridir. Oksintik (asit oluşturan) bezler hidroklorik asit, pepsinojen, intrensektör ve mukus salgılar. Pilor bezleri esas olarak pilor mukozasını mide asitinden koruyan mukus salgılar. Bunlar aynı zamanda gastrin hormonu da salgılar. Pepsinojen sindirme aktivitesine sahip değildir. Ancak, hidroklorik asitle aktif bir pepsin oluşturmak üzere aktifleşir. Pepsin, ortam pH'sı 1,8-3,5 iken etkin bir proteolitik enzim olarak çalışır. Ancak pH 5'den yüksek olduğunda inaktif hale gelir (Tandler ve diğ. 2001).

Pankreas asinüslerinden pankreas sindirim enzimleri salgılanırken, asinüslerden çıkan küçük kanalcıklardan ve daha büyük kanallardan bol miktarda sodyum bikarbonat salgılanır. Pankrestan salgılanan sindirim enzimleri; proteinler, karbonhidratlar ve yağların sindirimde rol alır. Bikarbonat iyonları ise mideden duodenuma boşalan asidik kimûsün nötrale edilmesinde rol oynar. Pankreastan salgılanan ve proteinleri sindiren en önemli enzimler; tripsin, kimotripsin ve karboksipolipeptidazdır. Bunlar içinde en fazla bulunanı tripsindir. Bu enzimler pankreasta sentezlendiklerinde enzimatik olarak inaktif şekillerinde bulunurlar. Bağırsak kanalına salgılandıktan hemen sonra aktifleşirler (Guyton ve Hall 1956b).

Safradaki enzimler yağ sindiriminde görev almazken; safra asitleri iki önemli etki gösterir. Bunlardan birincisi; büyük yağ partiküllerinin küçük parçalara emülsifiye edilmesine yardım ederek sindirilmesini kolaylaştırır. İkinci olarak yağların sindiriminden sonra ürünlerinin taşınmasına ve emilmesine yardım ederler. Safra kesesi depoladığı konsantre safrayı kolesistokine cevap olarak duodenuma boşaltır. Kolesistokinin salgısı ise temel olarak yağlı besinler tarafından uyarılır (Guyton ve Hall 1956b). Çalışmamızda kullanılan enzim ve salgılar metabolizmanın bu özellikleri göz önüne alınarak simüle edilmiştir.

2.7.1 Karbonhidratların Sindirimi

Yetişkin bir bireyin, günlük kalori gereksiniminin yaklaşık %40-50'si karbonhidratlardan sağlanmaktadır. Günlük diyetimizde tükettiğimiz gıdalar arasında üç büyük karbonhidrat kaynağı vardır. Bunlar; şeker kamışı olarak bilinen disakkarit sukroz, sütteki disakkarit laktoz ve nişastadır. Günde yaklaşık 300 g karbonhidrat alınır. Bunu genel olarak nişasta (~160 g), sakkaroz (~120 g), laktoz (~30 g) ve glukoz ile fruktoz (~10 g) oluşturur. Daha az olan diğer karbonhidratlar; amiloz, glikojen, pektin, dekstrin, alkol, laktik asit ve selülozdur (Guyton ve Hall 1956a; Akyüz ve diğ. 2009).

Çiğneme anında besinler tükürük sıvısında bulunan pityalin (α -amilaz) enzimi ile karşılaşır ve nişastayı maltoza ve glikoz polimerlerine dönüştürür. Gıdalar ağızda çok kısa kalmakta ve karbonhidrat sindiriminin sadece %5'i gerçekleştirilmektedir. Daha sonra amilazın aktivitesi mide salgısının asitliği nedeniyle durur. Ancak tamamen durana kadar sindirimin %40'ı gerçekleşmiş olur. Pankreas da tükürük gibi α -amilaz içermektedir. Böylece besinler mideden duodenuma boşaldıktan sonra 15-30 dakika içinde sindirilir (Adibi 2003; Akyüz ve diğ. 2009, Altınışık 2017, Lovegrove ve diğ. 2017).

2.7.2 Proteinlerin Sindirimi

70 kg ağırlığında yetişkin bir insan için yaş, cinsiyet, fiziksel aktivite vb. etmenlere bağlı olarak günde yaklaşık 75 g kadar protein gerekmektedir. Hayvansal gıdalar ve baklagiller gibi bitkisel gıdalarla alınan proteinler, midede ısı ve HCl etkisiyle denatüre olarak sindirim başlamaktadır (Altınışık 2017).

Midenin önemli enzimi olan pepsin, pH 2-3'de en aktif, pH 5'in üzerinde inaktif formdadır. Bu nedenle asidik bir ortamda oluşturmak nedeniyle mideden HCl salgılanmaktadır. Pepsin protein sindirimini başlatır ve genellikle protein sindiriminin yaklaşık %10-20'si gerçekleşir. Pepsin; proteinleri, proteoz, pepton ve polipeptidlere dönüştürür. Proteinlerin parçalanması aminoasitlerin arasındaki peptid bağlarının yıkılması ile gerçekleşir. Protein sindiriminin büyük bir kısmı üst ince bağırsak, duodenum ve jejunumda, pankreas salgısının proteolitik enzimleri sayesinde

gerçekleşir. Kısmen parçalanmış proteinler mideden ince bağırsağa geçerken; tripsin, kimotripsin, karboksipolipeptidaz ve proelastaz enzimleri ile karşılaşır. Proteinlerin son sindirimi ince bağırsak villuslarını kaplayan enterositler tarafından gerçekleştirilir. Aminopolipeptidaz ve dipeptidaz enzimleri büyük polipeptidleri; tripeptid, dipeptid ve aminoasitlere kadar parçalar (Guyton ve Hall 1956d; Akyüz ve diğ. 2009; Altınışık 2017).

2.7.3 Yağların Sindirimi

Günlük diyetimizde tükettiğimiz yağların büyük bir bölümü trigliserit olarak da bilinen nötral yağlardır. Nötral yağlar daha çok hayvan kaynaklı olup, kısmen bitkilerde de bulunabilir. Bunun yanında az miktarda kolesterol, kolesterol esterleri ve fosfolipidler de günlük diyetimizde yer almaktadır.

Eser miktarda trigliserit ağızda dilaltı bezlerinden salgılanan ve tükürükle yutulan lingual lipaz tarafından midede sindirilmektedir. Esas sindirim ince bağırsakta gerçekleşmektedir. Yağ sindirilemeye başlamadan önce parçalanması gerekmektedir (emülsiyon). Bu parçalanma işlemi midede başlar ve sonra duodenumda; safra tuzu ve fosfolipid lesitin içeren safra salgısı yardımıyla gerçekleşir. Yağ damlacıklarının ince bağırsağın karıştırıcı hareketleriyle parçalanmasını sağlamaktadır. Trigliseritlerin sindiriminde en önemli enzim, pankreastan salgılanan pankreatik lipazdır. Bu enzim trigliseritleri serbest yağ monomerleri ve 2-monogliseritlere parçalanır. Sindirilen yağların yakınlarında bu parçalanma ürünleri birikir ve trigliseritlerin sindirimini durdurur. Safra tuzları bu ürünleri taşıyıp ortamdan uzaklaştırarak, hem fırçamsı epitel hücrelerinin kenarlarında birikmesini engelleyerek, hem de emilimlerini sağlayarak trigliserit sindirimini hızlandırır (Adibi 2003; Lovegrove ve diğ. 2017; Akyüz ve diğ. 2009; Guyton ve Hall 1956d; Altınışık 2017).

2.8 *In Vitro* Simüle Sindirim

Günümüzde biyoaktif moleküllerinin insan sağlığı üzerine etkileri genellikle *in vitro* olarak çalışılmış olup, bu bileşiklerin insan vücudundaki metabolik dönüşümleri çoğunlukla göz ardı edilmiştir (Güven ve diğ. 2010).

Gıdaların biyoyararlılığı *in vivo* ve *in vitro* olarak iki yöntemle belirlenebilmektedir. Ancak *in vivo* yöntemlerin; pahalı, karmaşık ve uygulanabilirliğinin zor olması ve etik nedenler bu çalışmaların daha az ve en son tercih edilmesine neden olmaktadır. *In vitro* deneyler bu açıdan daha basit olup, tekrarlanabilirliği daha kolaydır ve daha ucuz metotlardır. Ancak *in vitro* sonuçları ile *in vivo* sonuçları birbirini desteklememektedir. Bunun başlıca sebebi insan vücudunda meydana gelen birçok biyokimyasal reaksiyondur. Bu reaksiyonlar ile gıdalar çok farklı metabolitlere dönüşmekte ve vücudun gereksinimlerine göre kana karışmakta ya da depo edilmektedir. (Bermudez-Soto ve diğ. 2004; Şengül 2013).

Son zamanlarda gastrointestinal koşulları taklit etmek amacıyla; hızlı, güvenli, *in vivo* metotlar gibi etik kısıtlaması olmayan *in vitro* sindirim ve diyaliz yöntemleri oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Kamiloğlu ve diğ. 2014). Bu konuda özellikle Minekus ve diğ. (2014) yapmış olduğu uluslararası konsensusla kabul edilen gıdaların *in vitro* simülasyonunu anlatan detaylı bir makale göze çarpmaktadır.

In vitro alternatifler, gıda ve gıda dışı ya da lipid, karbonhidrat gibi makro moleküllerin biyoerişilebilirliğinin belirlenmesinde ve bununla birlikte yeni hipotezlerin taranması ve kurulmasında önemli rol oynarlar. *In vitro* sindirim prosesleri yaygın olarak gıda veya farmasötiklerin, gastro-intestinal davranışını incelemek için kullanılır. Simüle sindirim yöntemleri tipik haliyle; ağız, mide ve ince bağırsak fazları ve zaman zaman kalın bağırsak fermantasyonu içermektedir. Çalışmamızda kullanılan bu yöntemde sindirim enzimleri, pH, sindirim süresi ve tuz konsantrasyonu varlığında, *in vivo* olarak fizyolojik koşullar taklit edilmeye çalışılmaktadır.

Mikrobiyal çeşitliliği ve sağlık üzerine olumlu etkileri olduğu bilinen ve fermente bir süt içeceği olan kefir pek çok araştırmaya konu olmuştur. Kefirin *in*

vitro sindirim simülasyonu ile izlenmesi; canlı organizmada (*in vivo*) sindirim prosesi boyunca hangi biyoaktivitelerin ne aşamada oluştuğunu ortaya koyacaktır. Bu nedenle tez konusu özgün değere sahiptir ve ilgili biyoteknoloji alanında yeni veriler elde edilebilecektir. Bu tezin amacı kefir örneklerinin öncelikle *in vitro* koşullarda sindirim simülasyonuna tabii tutulması ve sindirim prosesi süresince kefirin; antihipertensif, antidiabetik, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesidir.



3. MATERYAL METOT

3.1 Kefir Üretimi

Yerel marketten alınan pastörize edilmiş 1 litre günlük tam yağlı inek sütü üzerine, yine yerel marketten alınan Endanem marka kefir danesinden 3 g ilave edilip 25°C’de 22 saat ağzı kapalı şekilde 1 L’lik cam şişede inkübasyona bırakılmıştır. Fermantasyon sonrasında plastik süzektan plastik kaba süzme işlemi yapılarak analizlere başlanmıştır. Antimikrobiyal madde analizleri için fermantasyon işleminden önce pastörize süt kabinde açılarak kefir danesi inoküle edilmiş ve şişenin ağız kısmına kapak yerine steril pamuk yerleştirilmiştir. Fermantasyon sonrası süzme işlemi yine kabin içinde ve steril koşullarda yapılmıştır.

3.2 Gastrointestinal Sindirim Simülasyonu

Uluslararası bir konsensus referans alınarak uygulanan *in vitro* sindirim simülasyonu Tablo 3.7’de verilmiştir (Minekus ve diğ. 2014).

Tablo 3.7: Sindirim simülasyonu stok sıvıları (Minekus ve diğ. 2014)

			Simüle Gastrik Sıvı (SGF)		Simüle İntestinal Sıvı (SIF)	
			pH 3		pH 7	
BİLEŞEN	STOK KONSANTRASYONU		STOK HACMİ	SGF KONSANTRASYONU	STOK HACMİ	SIF KONSANTRASYONU
	g/L	mol/L	ml	mmol/L	ml	mmol/L
KCl	37,3	0,5	6,9	6,9	6,8	6,8
KH ₂ PO ₄	68	0,5	0,9	0,9	0,8	0,8
NaHCO ₃	84	1	12,5	25	42,5	85
NaCl	117	2	11,8	47,2	9,6	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30,05	0,15	0,4	0,1	1,1	0,33
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0,5	0,5	0,5	-	-
pH düzenleme						
	mol/L		ml	mmol/L	ml	mmol/L
NaOH	1		-	-	-	-
HCl	6		1,3	15,6	0,7	8,4
	g/L	mol/L		mmol/L		mmol/L
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	44,1	0,3		0,15 (0,075)*		0,6 (0,3)*

*Son sindirim karışımına karşılık gelen Ca konsantrasyonudur.

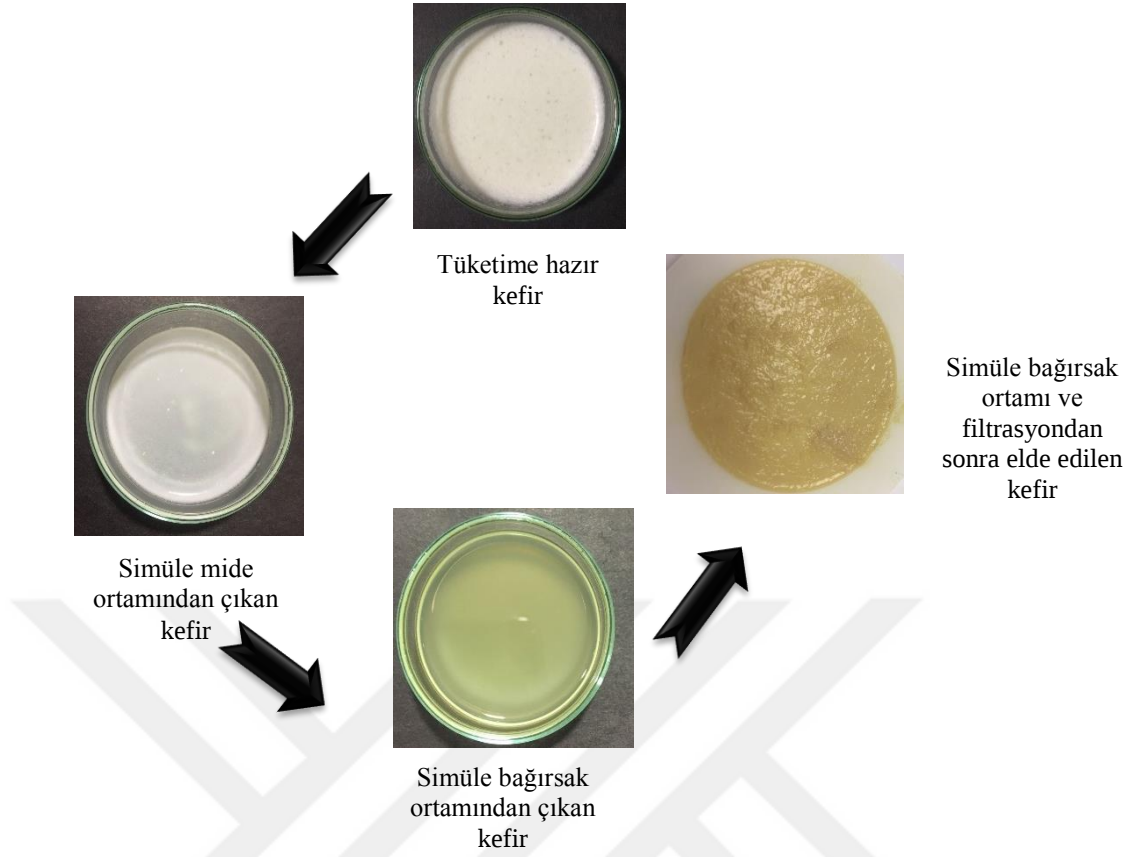
Kefir sıvı bir gıda olduğu için simölasyona oral faz dahil edilmemiş ve ilk olarak gastrik faz ile başlanmış, intestinal faz ile işleme devam edilmiştir. Bu nedenle analiz için simüle gastrik sıvı (SGS) ve simüle intestinal sıvı (SIS) Tablo 3.7’den yararlanarak hazırlanmıştır.

3.2.1 Gastrik Faz Simölasyonu

Gastrik faz için 10 mL kefir üzerine 7,5 mL SGF ve 5 µL CaCl₂ eklenip, 6 N HCl ile pH 3’e ayarlanmıştır. Son hacimde 2000 U/mL Pepsin (Sigma P7012) eklenmiştir ve toplam hacim 20 mL olacak şekilde ultrasaf su ile tamamlanmıştır. Tamamlanan karışım 150 rpm’de 37°C’de Innova 44 inkübatörde 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 4 µL Pefabloc (Sigma 76307) eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Gastrik faz sonundaki analizlerin yapılabilmesi için bu deney 2 defa tekrarlanmış olup 1 tanesi ayrılmış, diğetine intestinal faz ile devam edilmiştir.

3.2.2 İntestinal Faz Simölasyonu

Gastrik faz tamamlandıktan sonra 20 ml’lik toplam hacmin hepsi 250 ml’lik erlen içine alınmıştır. Üzerine 11 mL SIF ve 40 µL CaCl₂ eklenip, 1 M NaOH ile pH 7’ye ayarlanmıştır. Son hacimde 100 U/mL olacak şekilde pankreatin enzimi (Sigma P1750) eklenmiş ve 160 mM safra tuzu (Sigma B8631) ile karıştırılmıştır. Toplam hacim 40 ml’ye ultrasaf su ile tamamlandıktan sonra karışım 150 rpm’de 37°C’de Innova 44 inkübatörde 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 8 µL Pefabloc (Sigma 76307) eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Şekil 3.9’da gastrointestinal simölasyon görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.9: Gastrointestinal simülasyon görüntüleri

Gastrointestinal simülasyona alınan kefirin gastrik faz çıkışı, intestinal faz çıkışı ve ardından vakum altında filtrasyondan sonra geriye kalan posası Şekil 3.9’da gösterilmiştir. Gastrik faz çıkışında tipik bir bebek kusmuğu kokusu, intestinal faz çıkışında ve filtrasyon sonrası kalan posada tipik bir bebek gaita kokusu hissedilmiştir.

3.2.3 Santrifügal Filtrasyon

İntestinal faz tamamlandıktan sonra örnek vakum altında Whatman No:1 filtre kağıdından geçirilmiştir. Gastrik faz ve filtreden geçirilen intestinal faz öncelikle 100 kDa’luk ultrafiltrasyon tüpünde 10000 rpm’de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Yukarıda kalan retantat analizler için ayrılmış ve altta kalan permeat 50 kDa’luk ultrafiltrasyon tüpüne aktarılmıştır. Aynı işlem sırasıyla 50, 30, 10 ve 3 kDa’luk ultrafiltrasyon tüplerinde (Şekil 3.10) yapılmıştır. Bu tez

kapsamında tüm santrifüj işlemleri Sigma 3-18K kullanılmış olup, falconlar için rotor olarak Sigma 19776, ependorf tüpleri için Sigma 12154 kullanılmıştır.



Şekil 3.10: Ultrafiltrasyon tüpleri (<https://www.sartorius.co.uk/sartoriusUK/en/GBP/products/laboratory/lab-filtration/ultrafiltration>)

3.3 Kimyasal Kompozisyon

Kefir örnekleri *in vitro* gastrointestinal sindirim simülasyonuna girmeden önce; sütün kalitesini ortaya koymak için pH, laktik asit cinsinden titrasyon asitliği, kül içeriği, kuru madde içeriği, toplam azot ve yağ içeriği analizleri yapılmıştır.

3.3.1 pH Ölçümü

Örneklerin pH değerleri Isolab marka pH metre kullanılarak ölçülmüştür.

3.3.2 Titrasyon Asitliği

Kefirden 25 mL alınıp bir erlenmayere konulmuştur. Üzerine %2'lik fenolftalein indikatöründen pastör pipeti ile 3 damla eklenmiştir. Daha sonra 0.1 N NaOH ile doldurulmuş bir büretten damla damla erlenmayere baz ilave edilerek açık pembe renk sabitleşene kadar titrasyon yapılmıştır (AOAC 1996). Sarf edilen NaOH miktarı kaydedilerek titrasyon asitliği, denklem (3.1) ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Asitlik (g/l)} = \frac{V.N.E.1000}{M}$$

(3.1)

Denklem (3.1)'de yazan;

V: Titrasyonda harcanan alkali (ml), N: Alkalinin normalitesi, E: Organik asidin miliekivalan ağırlığı,

3.3.3 Kül Tayini

Porselen krozeler 105°C'de 24 saat etüvde bekletildikten sonra daraları alındı. Daraları alınan krozeler üzerine 2 gr kefir eklenerek 105°C'de 24 saat etüvde ön ısıtma işlemi yapılmıştır. Ardından sırasıyla 250°C'de 30dk, 350°C'de 30 dakika ve 550°C'de 4 saat kül fırınında kalacak şekilde kademeli yakma işlemi gerçekleştirilmiştir (Anonim 2005). Yakma işleminden sonra son tartım yapıp, sonuçlar denklemde (3.2) yerine konulmuştur.

$$\text{Kül İçeriği (\%)} = \frac{\text{Son Tartım} - \text{Dara}}{\text{Örnek Miktarı}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.3.4 Kuru Madde Tayini

Kurutma kapları 105°C'de 24 saat etüvde bekletildikten sonra daraları alındı. Daraları alınan kurutma kapları üzerine 5 gr kefir eklenerek sırasıyla 75°C'de, 85°C'de ve 105°C'de 24 saat kademeli olarak kurumaya bırakılmıştır (AOAC 1996). Kurutma işlemi sonrasında son tartım yapıp, sonuçlar aşağıdaki denklemde (3.3) yerine konulmuştur.

$$\text{Kuru Madde İçeriği (\%)} = \frac{\text{Son Tartım} - \text{Dara}}{\text{Örnek Miktarı}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.3.5 Yağ İçeriği

Gerber süt bütirometresinin üzerine 10 mL H₂SO₄ (d=1,82 g/mL) konulup üzerine 11 mL süt/kefir örneği eklenip 1 mL amil alkol ilave edilerek bütirometrenin ağzı lastik tıpayla kapatılıp 10 dakika süresince santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra bütirometre skalasından % olarak yağ içeriği tespit edilmiştir (Anonim 2006).

3.3.6 Toplam Azot İçeriği Tayini (Kjeldahl)

2 mL kefir kjeldahl tüplerine aktarıldı. 15 g potasyum sülfat uygun miktarda katalizör (0,3 g bakır (II) oksit), 25 mL sülfürik asit (d = 1,84 g/mL) eklenip karıştırıldı. Kjeldahl balonu 150°C'den 450°C'ye kadar kademeli olarak 3,5-4 saat boyunca ısıtıldı. Çözelti berraka yakın bir renk olduğunda iki saat daha kaynatmaya devam edildi, ardından soğumaya bırakıldı. 75 mL saf su eklenen tüpler distilasyon cihazına takıldı. Cihaza damıtma işlemi için % 40'lık NaOH ve saf su çözeltileri de yerleştirildi. Toplama beher içerisine % 4'lük borik asit hazırlandı ve azot içeren damıtığın toplama erleni içinde yoğunlaşması sağlandı. Başlangıçta pembe olan renk yeşile dönünce işlem sonlandırılır. Borik asit içine biriken azot miktarını belirlemek için 0,1 N HCl ile yeşil renk tekrar pembe rengi alıncaya kadar titrasyon yapılır (AOAC 2000). Sonuçlar denklemde (3.4) yerine konulur.

$$\text{Azot İçeriği (\%)} = \frac{(A-B).N .1,4}{W}$$

(3.4)

A: Örnek için harcanan HCl,

B: Blank için harcanan HCl,

N: HCl normalitesi

W: Örnek miktarı

Bu analizlerinin ardından örnekler *in vitro* sindirim simülasyonu ile sindirime başlatılmıştır. Sindirim prosesi uygulanırken öncelikle gastrik fazdan ardından intestinal fazdan analizler için numune alınmıştır.

3.4 ACE İnhibitör Aktivitesi

ACE inhibitör aktivitesi için; ACE Kit-WST A502 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Japonya) kullanılmıştır.

Kit içerisinde yer alan enzim B tüpü 2 mL ultrasaf su ile çözündürülerek bu solüsyondan 1,5 mL alınıp enzim A üzerine eklenerek enzim A'nın çözünmesi sağlanmıştır. Son oluşan enzim A; deneyde kullanılan enzim solüsyonu olmuştur. Kit içerisinde yer alan Enzim C ve koenzim 3 mL ultrasaf su ile ayrı ayrı çözündürülmüş ve her ikisinden de 2,8 mL alınarak indikatör solüsyonu üzerine eklenmiştir. Bu son oluşan solüsyon deneyde indikatör olarak kullanılmıştır. Analizde kullanılacak olan substrata hiçbir işlem yapılmayıp direkt kullanılmıştır.

Analizde her bir örnek için aşağıdaki gibi 3 farklı ependorf hazırlanmıştır.

$$A_{\text{Sample}} = 20 \mu\text{L örnek} + 20 \mu\text{L substrat} + 20\mu\text{L enzim}$$

$$A_{\text{Blank1}} = 20 \mu\text{L su} + 20 \mu\text{L substrat} + 20\mu\text{L enzim}$$

$$A_{\text{Blank2}} = 40 \mu\text{L su} + 20 \mu\text{L substrat}$$

Hazırlanan ependorf tüpleri 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından askıda katı maddeden kurtulmak için 12000g'de 10 dakika santifüj edildi ve her bir ependorftan yaklaşık 55 μL alınıp 96 mikropate aktarıldı. Her birinin üzerine 200 μL indikatör solüsyonu eklenip oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Okuma 450 nm'de yapıldı. Elde edilen sonuçlar denklemde (3.5) yerine konulmuştur.

$$\text{ACE inhibitör aktivitesi (\%)} = \frac{A_{\text{Blank1}} - A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Blank1}} - A_{\text{Blank2}}} \times 100 \quad (3.5)$$

3.5 DPPIV İnhibitör Aktivitesi

Öncelikle analiz süresince kullanılacak olan Tris-HCl tamponu pH 8.0 olacak şekilde hazırlandı. Analizde enzim olarak dipeptidyl peptidase IV human (DPPIV) (D4943 Sigma) kullanılırken, substrat olarak Gly-Pro p-nitroanilide hydroChloride (G0513 Sigma) kullanılmıştır. Bu analiz için Yogisha ve Raveesha (2010) referans alınmıştır. Analizin yapılabilmesi için 3 farklı ependorf hazırlandı. Bunlar;

DPPIV enzimi Tris-HCl (pH 8) ile açılıp, 5 mU/100 µL olacak şekilde pasajlanmıştır. Kullanılacak substrat yine Tris-HCl (pH 8) ile açılıp 10 mmol/100 µL olacak şekilde pasajlanmıştır.

$$A_{100} = 100 \mu\text{L enzim} + 100 \mu\text{L substrat} + 100 \mu\text{L tampon}$$

$$A_0 = 100 \mu\text{L örnek} + 200 \mu\text{L tampon}$$

$$A_S = 100 \mu\text{L örnek} + 100 \mu\text{L substrat} + 100 \mu\text{L enzim}$$

Tüm ependorflar 37°C de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda reaksiyon 100 µL asetik asitle ile durdurulmuştur. Ependorflar karıştırıldıktan sonra iyice vortekslenerek 9000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Sonrasında mikropate kuvvetlerine aktarılmış ve 405 nm’de okutulup, aşağıda yer alan denklemde (3.6) yerine konulmuştur.

$$\text{DPPIV inhibitör aktivitesi (\%)} = 1 - ((A_S - A_0)/A_{100}) \times 100 \quad (3.6)$$

3.6 Antioksidan Madde Tayini

3.6.1 DPPH Aktivite Tayini

Analize başlamadan önce sarı ışık altında metanol ile 0,02 mM DPPH çözeltisi hazırlanmıştır. Kefirden 200 µL alınıp üzerine 600 µL DPPH eklenip ependorflar içerisinde 30 dakika süresince karanlık bir ortamda oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Aynı işlem kefir yerine saf su konularak blank ölçümü için yapılmıştır. Ardından tüm ependorflar 9000 rpm’de 10 dk santrifüj edilip

süpernatantdan 200 µL ependorflardan alınıp microküvetlere aktarılarak 571 nm’de ölçümü yapıldı (Aytekin ve diğ. 2011). Hesaplama da kullanılan denklem (3.7) aşağıda yer almaktadır.

$$(\%) \text{ Aktivite} = 1 - \left(\frac{\text{Örnek Absorbansı}}{\text{Blank}} \right) \times 100 \quad (3.7)$$

3.6.2 İndirgeme Gücü Antioksidan Aktivite Tayini

Bu metodun esas ı doğal antioksidantların ve standart antioksidant maddelerin $[K_3Fe(CN)_6]$ içindeki Fe^{+3} ün Fe^{+2} ’ye indirgenmesi esasına dayanır. 50°C’de 20 dakika inkübasyondan sonra indirgeme reaksiyonu sonucu oluşan prusya mavisi renkli kompleks 700 nm’de maksimum absorbans göstermektedir. Absorbans artışı indirgeme gücünün yüksek olduğunun belirtisidir (Benzie ve Strain, 1996).

Analize başlamadan önce; sodyum fosfat tamponu (0,2 M pH 6,6), potasyum ferrisiyanidin (%1 (w/v), trikloro asetik asit (%10 (v/v) ve demir (III) klorür (% 0,1 (w/v) çözeltileri hazırlanmıştır.

1 mL kefir alınarak üzerine 1 mL sodyum fosfat tamponu eklenip, iyice karıştırılmıştır. Reaksiyonun başlaması için üzerine 1 mL potasyum ferrisiyanidin eklenmiştir. 50°C’lik sıcak su banyosunda 20 dakika bekletilmiş ve su banyosundan çıkarılan örneklere 1 mL trikloro asetik asit eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Ardından 9000 rpm 10 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve 1 mL süpernatant farklı tüplere alınıp üzerlerine 1 mL saf su eklenerek seyreltilmiş ve 0,2 mL demir (III) klorür eklenmiştir. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılarak 700 nm’de ölçümü yapılmıştır (Aytekin ve diğ. 2011).

3.7 Toplam Fenolik Madde Tayini

Folin CioCalteu (FC) yöntemi fenolik bileşiklerin molibdenyum'a elektron transfer edilmesine dayanmaktadır. Mavi renkli kompleks oluşumu 750-765 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenir. Gallik asit standart bileşik olarak sıklıkla kullanılır ve sonuçlar gallik asit eşiti (mg/L) olarak verilir. Bu yöntem fenolik madde miktarı deneylerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Albayrak ve diğ. 2010).

Folin Ciocalteu 1:10 (v/v) oranında su ile seyreltilmiştir. Ardından sodyum karbonat 75g/L olacak şekilde su ile hazırlanmıştır. Standart kalibrasyon eğrisi çiziminde kullanılacak olan gallik asit ise 500 mg/L konsantrasyonunda metanol:su (70:30; v/v) ile hazırlanmıştır.

Tablo 3.8: Gallik asit standardı hazırlama tablosu

Gallik asit miktarı (µL)	Su miktarı (µL)	Gallik Asit - Su Oranı
500	2000	1:4
400	2800	1:7
300	2700	1:9
200	3800	1:19

Hazırlanan 500 mg/L gallik asit konsantrasyonu Tablo 3.8'deki belirtilen miktarlarda su ile karıştırılarak 4 farklı oranda gallik asit- su karışımı elde edilmiştir. Hazırlanan standartlar gallik asit çözeltileri kullanılarak lineer regresyon eğrisi çizilmiştir. Buna göre Tablo 3.9'de miktarları verilen çözeltilerden önce örnek, sonra folin eklenmiştir. Yaklaşık 2 dakika sonra (en fazla 8 dakika) sodyum karbonat eklenmiştir.

Tablo 3.9: Toplam fenol lineer regrasyon tablosu için hazırlanan çözeltiler

Ayarlanan Konsantrasyon	Folin (µL)	Sodyum Karbonat (µL)
100 µL su	200	800
100 µL 1:4	200	800
100 µL 1:7	200	800
100 µL 1:9	200	800
100 µL 1:19	200	800

Tablo 3.9'e göre hazırlanan yeni tüpler vorkteslenmiş ve 2 saat boyunca karanlıkta bekletilerek reaksiyon gerçekleştirilmiştir. 2 saatin sonunda 9000 rpm'de

10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant 765nm’de okuma yapılmış ve sonuçlar ile lineer regresyon eğrisi çizilmiştir.

Kefir için 100 µL örnek, 200 µL folin ve 800 µL sodyum karbonat karıştırılmıştır. Hazırlanan örnek 2 saat karanlıkta bekletilmiş ve ardından 765nm de okuma yapılmıştır. Sonuçlar okunan değer üzerinden değerlendirilmiştir.

3.8 Antimikrobiyal Aktivite

Analizde kullanılacak olan mikroorganizmalar; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger* ve *Candida albicans*’dır. Bakteriler Nutrient Agar (NA) besiyerinde 37°C’de, maya ve küf, Potato Dextrose Agar (PDA) besiyerinde 30°C’de geliştirilmiştir.

Antimikrobiyal aktivite tayininde bakteriler için Nutrient Agar (NA), maya ve küf için Potato Dextrose Agar (PDA) hazırlanmış ve petri kabına yaklaşık 15cm kalınlığında olacak şekilde dökülerek dondurulmuştur. Petri kaplarına steril swap ile mikroorganizma inokülasyonu çizme ekim usulü yapılmıştır. Örnekler Oxoid marka blank disk üzerine aktarılmıştır. Bakteri bulunan petrilere pozitif kontrol olarak, otoklavlanmış saf su emdirilen Oxoid marka Ofloxacin disk; maya ve küf bulunan petrilere pozitif kontrol olarak, otoklavlanmış saf su emdirilen Oxoid marka Nystatin disk yerleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan zon çapları kumpas ile ölçülerek pozitif kontrol ile karşılaştırılarak antimikrobiyal aktivite belirlenmiştir (Bauer, 1996).

3.9 Protein Miktarı

Kefir ve ultrafiltrasyondan çıkan örneklerin protein kiti (Pierce BCA Protein Assay Kit) ile protein miktarları ölçülmüştür. Kit içinde bulunan solüsyon hazırlanıp, 25 µL örnek üzerine 200 µL solüsyon ilave edilerek, 37°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler 562 nm’de okunmuştur.

3.10 Sodyum Dodesil Sülfat – Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE için elektroforez camları isopropanol (2-propanol) ile temizlendikten sonra klipsleri takılmış ve stand üzerine oturtulmuştur. Klipsler ile arasında ince bir boşluk kalan bu iki elektroforez cam arasına öncelikle Tablo 3.10’da belirtilen şekilde hazırlanan ayırma jeli dökülmüştür. Ayırma jeli gradiyent olarak en alta %21’lik olacak şekilde sırasıyla %18, %15 ve %12’lik ayırma jeli dökülmüştür. Her ayırma jeli üzerine 2-propanol eklenerek polimerizasyon için 15 dk beklenmiştir. Gradiyent ayırma jeli tamamlandıktan sonra 2-propanol geri alınıp ve Tablo 3.11’de belirtilen şekilde hazırlanan ön ayırma jeli dökülmüştür. Polimerize olmadan hızlıca taraklar yerleştirilmiştir.

Tablo 3.10: Ayırma jeli karışımları

Ayırma Jeli	10%	12%	15%	18%	21%
4X ayırma tamponu (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
%30 akrilamid (ml)	3,3	4	5	6	7
H ₂ O (ml)	4,1	3,4	2,4	1,4	0,4
%10 APS (ml)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
TEMED (ml)	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005

Tablo 3.11: Ön ayırma jeli karışımları

Ön Ayırma Jeli	5 ml
4X ön ayırma tamponu (ml)	1,25
% 30 akrilamid (ml)	0,85
H ₂ O (ml)	2,85
% 10 APS (ml)	0,75
TEMED (ml)	0,005

%30’luk akrilamid karışımı için; 29 g akrilamid ve 1 g N,N’-metilen bisakrilamid 100 mL suya tamamlanmıştır. Yürütme tamponu için; 30 g trizma base, 144 g glisin, 10 g SDS karışımı 1 litre suya tamamlanmıştır. Ön ayırma jeli tamponu için; 0,5 M tris-HCl (pH 6,8) ve % 0,4 (w/v) SDS ile karıştırılmıştır. Ayırma jeli tamponu için; 1,5 M tris-HCl (pH 8,8) ve % 0,4 (w/v) SDS ile karıştırılmıştır. %10’luk APS için; 0,1 g APS tartılıp, 1 mL suda çözündürülmüştür. 4X örnek yükleme tamponu; 2 mL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,8 g SDS, 4 mL gliserol, 0,4 mL β -

mercaptaetanol, 1 mL 0,5 M EDTA, 8 mg bromophenol blue ve 2,6 mL H₂O karıştırılmıştır.

Polimerizasyon sonunda jel kasetleri yürütme tankına yerleştirilmiş ve yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Taraklar çıkarılmış ve her bir kuyuda 200 µg protein olacak şekilde örnekler yerleştirilmiştir. Örneklerin protein miktarı belirlenmiş ve 200 µg protein taşıyacak şekilde örnekten alınıp temiz bir ependorf içine pipetlenmiştir. Üzerine 24 µL'ye tamamlanacak şekilde ultrasaf su eklenmiştir. Son olarak her bir ependorfa 5 µL yükleme tamponu eklenerek 95°C'de 5 dakika denatürasyon gerçekleştirilmiş ve buz içine alınmıştır. Ardından her bir kuyuya sırasıyla örnekler yüklenmiştir. Bantlara referans olması için bir kuyuya marker (Thermo Fisher Scientific, 10-180 kDa pageruler prestained protein ladder 26616) yüklenmiştir. Yükleme işlemi tamamlandığında 80 V ile başlayıp 120 V ile bitecek şekilde elektrik akımı verilerek yürütme işlemi tamamlanmıştır.

Yürütme bittikten sonra jeller camlar arasında dikkatlice çıkarılarak fiksasyon solüsyonuna alınmıştır. Fiksasyon solüsyonu; % 10 (v/v) asetik asit, % 25 (v/v) 2-propanol ve % 65 ultrasaf su ile hazırlanmıştır. Fiksasyon için 15 dakika beklenmiştir. Ardından boyama solüsyonuna alınmış ve yaklaşık 10 dakika boyamaya tabi tutulmuştur. Boyama solüsyonu için; 1 g Coomassie blue R-250, 40 mL etanol, 10 mL asetik asit ve 50 mL ultrasaf su karıştırılmıştır. Boyama işlemi bittikten sonra yıkama solüsyonu ile boyama tamamen akıtılana kadar yıkanmıştır. Yıkama solüsyonu için; 40 mL metanol, 10 mL asetik asit ve 50 mL ultrasaf su karıştırılmıştır. Ardından jellerin görüntüsü alınmıştır (Laemmli 1970).

4. BULGULAR

4.1 Kefirin Kimyasal Kompozisyonu

Türk Gıda Kodeksi Fermente Ürünler Süt Tebliği'ne göre (Tebliğ No: 2009/25) kefirde; süt yağı ağırlıkça (%) en fazla 10, titrasyon asitliği laktik asit cinsinden ağırlıkça (%) en az 0,6 olması gerekmektedir.

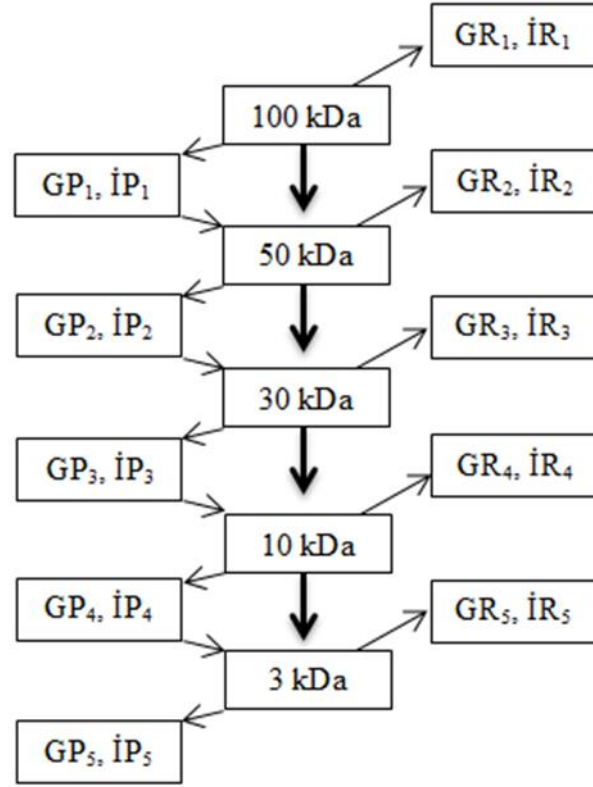
Tablo 4.12: Analitik analiz sonuçları

pH	4,59 ± 0,007
Titrasyon Asitliği (%)	0,71 ± 0,003
Kül İçeriği (%)	0,623 ± 0,001
Kuru Madde İçeriği (%)	11,1 ± 0,07
Yağ (%)	2,5 ± 0,07
Azot Miktarı (%)	0,500 ± 0,004

Tablo 4.12'de görülen çalışma sonuçlarına göre üretimi yapılan kefirin, laktik asit cinsinden yüzde titrasyon asitliği % 0,71 ve yağ miktarı %3 bulunarak kodekse uygun olduğu görülmüştür. Kefirin pH değeri 4,59, kuru maddesi %11,1, kül miktarı %0,623 ve toplam azot miktarı %0,5 olarak bulunmuştur.

4.2 Santrifugal Filtrasyon

Gastrik ve intestinal faz tamamlandıktan sonra bu örneklerden analiz için 3'er mL alınmış ve geri kalanı santrifügal filtrasyon işlemine tabi tutulmuştur. Şekil 4.11'de çalışmada kullanılan santrifügal filtrasyon işleminin akışı ve ultrafiltrasyon filtrelerinin molekül büyüklükleri ve deney içinde isimlendirilmeleri verilmiştir.



Şekil 4.11: Santrifügal filtrasyon işlem akış şeması.(GR: Gastrik retentat, GP: Gastrik permeat, İR: İntestinal retentat, İP: İntestinal permeat)

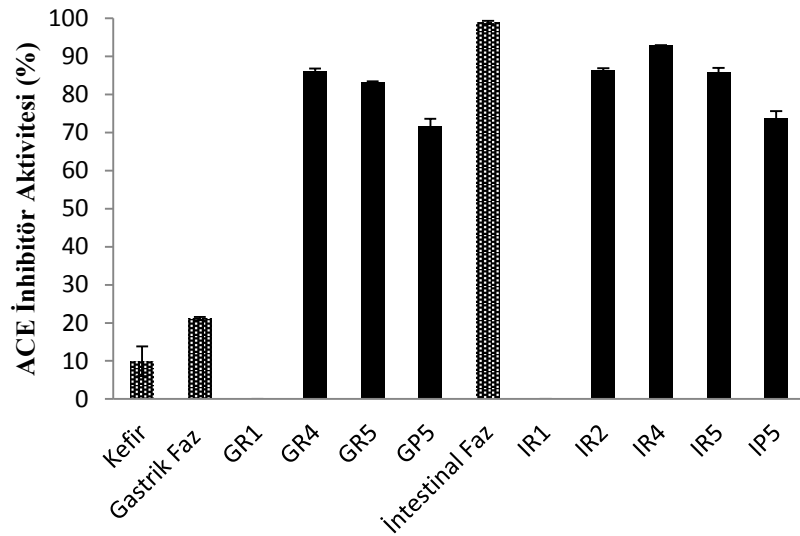
Santrifügal filtrasyon sonrası gastrik fazdan; 100 kDa üzerinde kalan retantat GR1, 50 kDa üzerinde kalan retantat GR2, 30 kDa üzerinde kalan retantat GR3, 10 kDa üzerinde kalan retantat GR4, 3 kDa üzerinde kalan retantat GR5 ve 3 kDa altında kalan permeat GP5 olarak isimlendirilmiştir. Santrifüj işlemi tamamladığında elimizde Tablo 4.13’de görüldüğü gibi GR1, GR4, GR5 ve GP5 kalmıştır. Ultrafiltrasyon sonrası intestinal fazdan; 100 kDa üzerinde kalan retantat İR1, 50 kDa üzerinde kalan retantat İR2, 30 kDa üzerinde kalan retantat İR3, 10 kDa üzerinde kalan retantat İR4, 3 kDa üzerinde kalan retantat İR5 ve 3 kDa altında kalan permeat İP5 olarak isimlendirilmiştir. Santrifüj işlemi tamamladığında elimizde İR1, İR2, İR4, İR5 ve İP5 kalmıştır (Tablo 4.13). 1 ml’den az kalan örnekler saf su ile seyreltilmiş ve analiz sonuçları seyreltme faktörü ile çarpılmıştır.

Tablo 4.13: Ultrafiltrasyon sonrasında kalan örnekler ve miktarları

Örnek		GR1 (ml)	GR4 (μ L)	GR5 (μ L)	GP5 (ml)	İR1 (ml)	İR2 (ml)	İR4 (μ L)	İR5 (μ L)	İP5 (ml)
Kalan Miktar		6	440	1030	8	10	6	550	1100	8

4.3 ACE İnhibitör Aktivitesi

Kefirin antihipertansif özelliğinin belirlenebilmesi için yapılan ACE inhibitör aktivitesinin sonuçları Şekil 4.12’de verilmiştir. Kefirin ACE inhibitör aktivitesi sindirim simülasyonuna girmeden önce %9,91 olarak bulunmuştur. Sindirim simülasyonuna tabi tutulduktan sonra gastrik faz çıkışında % 21,16 iken intestinal faz sonunda %98,88 olduğu görülmektedir. Bu durum kefirin antihipertansif etkisinin, sindirim ile arttığının bir göstergesidir. Protein sindirimi midede başlar ancak midede yapılan sindirim bağırsak sindirimine göre oldukça kısıtlıdır. ACE sonuçlarının bu durumdan etkilendiği düşünülmüştür.



Şekil 4.12: Kefir ve ultrafiltrasyon örneklerin ACE inhibitör aktivitesi sonuçları (%) (GR₁>100 kDa, GR₄=10-30 kDa, GR₅=3-10 kDa, GP₅< 3 kDa, İR₁> 100 kDa, İR₂= 50-100 kDa, İR₄=10-30 kDa, İR₅=3-10 kDa, İP₅< 3 kDa)

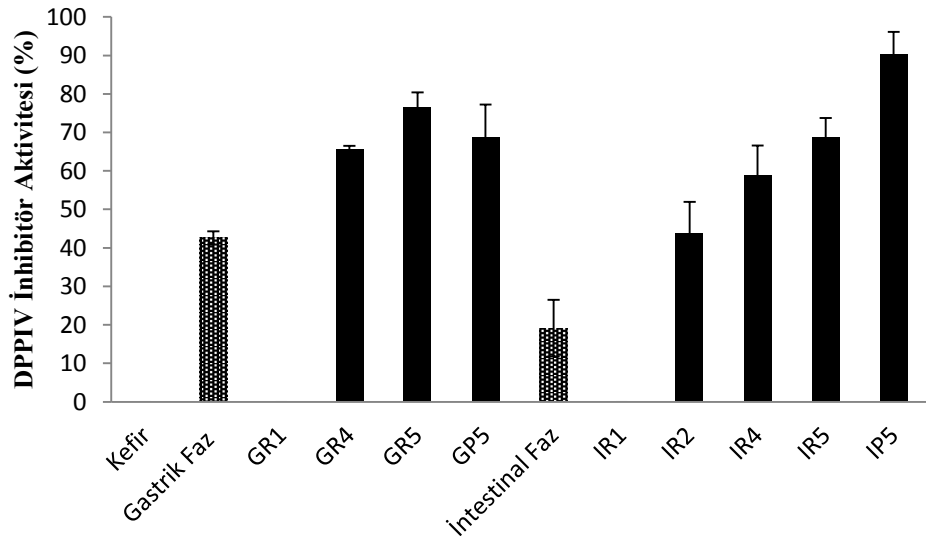
Şekil 4.12’deki sonuçlara göre kefirin antihipertansif özelliğinin büyük bir kısmının, bağırsakta pankreatin ve safra tuzu ile reaksiyonuyla açığa çıkan biyoaktif moleküllerden kaynaklandığı söylenebilir.

Ultrasantifüj sonrasında, gastrik fazda elde edilen örneğin yaklaşık %80'ni oluşturan ve 100kDa'dan büyük biyoaktif molekülleri içeren GR1 fraksiyonunda ACE inhibitör aktivitesi belirlenmemiştir. 30-10 kDa arasında kalan GR4 fraksiyonunda % 85,95 ile en yüksek değer görülürken GR5 ve GP5 fraksiyonlarında aktivitenin yaklaşık aynı değerleri verdiği gözlenmiştir. Bu durum ACE inhibitör aktivitesine sahip ve 3-30kDa molekül ağırlığı aralığındaki biyoaktif moleküllerin gastrik fazda seyreltik durumda iken konsantre olduğunu göstermektedir. Protein sindiriminin tamamlandığı yer olan bağırsakları simüle ettiğimiz intestinal fazda gastrik fazdaki toplam ACE inhibitör aktivitesinin yaklaşık 5 katı fazla bir miktar görülmektedir. İntestinal fazda elde edilen fraksiyonlarda 30-10 kDa arasında kalan IR4 örneğinde % 92,74 ile en yüksek değer görülmektedir.

Hernández-Ledesma ve diğ. (2004) simüle gastrointestinal sistem ile ACE inhibitör aktivitesini araştırmışlar ve araştırma sonuçlarına göre fermente süt ürününde sindirim olmadan önceki aktiviteyi %50'nin altında bulurken, sindirim sonrası aktiviteyi %80 bulmuşlardır. Aynı çalışmada 3 kDa büyüklüğündeki peptidler için tekrar ölçüm yapmışlar ve sindirim öncesinde aktivite % 15 civarı bulunurken, sindirim sonrası aktivitenin %80'e kadar ulaştığını rapor etmişlerdir. Abd El-Fattah ve diğ. (2017) süt proteinlerini proteaz, pepsin, tripsin ve papain kullanarak hidrolize etmiş ve bu hidrolizatlarda ACE inhibitör aktivitesini incelemişlerdir. Araştırma bulguları %0,01 konsantrasyona sahip pepsin ve tripsin ile hidrolize edilmiş örneklerde ACE inhibitör aktivitesinin yaklaşık olarak sırasıyla %80 ve %70 olduğunu göstermektedir. Yine başka bir çalışmada kefirin ACE inhibitör aktivitesi ölçülmüş ve IC_{50} değeri 0.365 ± 0.029 mg/mL olarak bulunmuştur. Aynı örnek ultrafiltrasyon işlemine tabii tutulmuş ve molekül büyüklüğü 3 kDa altında kalan permeatın IC_{50} değeri 0.380 ± 0.023 mg/mL iken retantantın 1.25 ± 0.063 mg/mL olarak bulunmuştur (Quiros ve diğ. 2005). Tagliazucchi ve diğ. (2017) keçi sütünün sindirim prosesi sonrasında ACE inhibitör aktivitesini incelemişler ve 3 kDa üzerindeki peptidlerde herhangi bir aktivite gözlenmezken, 3 kDa altında kalan peptidlerde 1156.3 ± 10.5 µg/mL bulmuşlardır. Yapılan araştırmalar ve analiz sonuçları özellikle ACE inhibitör aktivitesi gösteren biyopeptitlerin kısa peptit dizileri olabileceğini ve 3 kDa altında yoğunlaştığını göstermektedir. Gelecek çalışmalarda fraksiyonlara yapılması planlanan dizi analizleri ile peptitlerin yapısal tanımlamaları yapılarak dizileri aydınlatılacaktır.

4.4 DPPIV İnhibitör Aktivitesi

Kefirin antidiyabetik özelliğinin belirlenebilmesi için yapılan DPPIV inhibitör aktivitesinin sonuçları Şekil 4.13'te verilmiştir. Kefirin, sindirim simülasyonuna girmeden önce DPPIV inhibitör aktivitesinin ölçümü yapılmış ancak aktivite belirlenememiştir. Sindirim simülasyonuna tabi tutulduktan sonra gastrik faz çıkışında % 42,62 iken intestinal faz sonunda %19,11 olduğu görülmektedir. İntestinal fazda görülen düşüş DPPIV inhibitör aktivitesi göstermesi muhtemel biyomoleküllerin pankreatin tarafından parçalanmış olma ihtimalini düşündürmektedir. Aynı zamanda intestinal fazda ultrafiltrasyon işlemi ile 100 kDa'dan 3 kDa'a kadar gittikçe artan bir inhibitör aktivitesi görülmektedir. Bu sonuç inhibitör aktiviteye sahip biyomoleküllerin 3 kDa altında kalanlardan kaynaklanabileceğini göstermektedir. Bu nedenle ultrafiltrasyon işlemi devam ettikçe inhibitör etkinin arttığı görülmüştür.



Şekil 4.13: Kefir ve ultrafiltrasyon örneklerinin DPPIV inhibitör aktivitesi sonuçları (%) (GR₁>100 kDa, GR₄=10-30 kDa, GR₅=3-10 kDa, GP₅< 3 kDa, IR₁> 100 kDa, IR₂= 50-100 kDa, IR₄=10-30 kDa, IR₅=3-10 kDa, IP₅< 3 kDa)

Şekil 4.13'deki sonuçlara göre kefirin antidiyabetik özelliğinin büyük bir kısmının, midede pepsin ile reaksiyonuyla açığa çıkan biyoaktif peptidlerden kaynaklandığı söylenebilir. Lacroix ve diğ. (2012) süt proteini, peynir altı suyu proteini, sodyum kazeinat ve yağsız süt tozu ile yaptıkları bir çalışmada, DPPIV inhibitör aktivitesini simüle gastrointestinal sistem ile incelemişlerdir. Bu çalışma

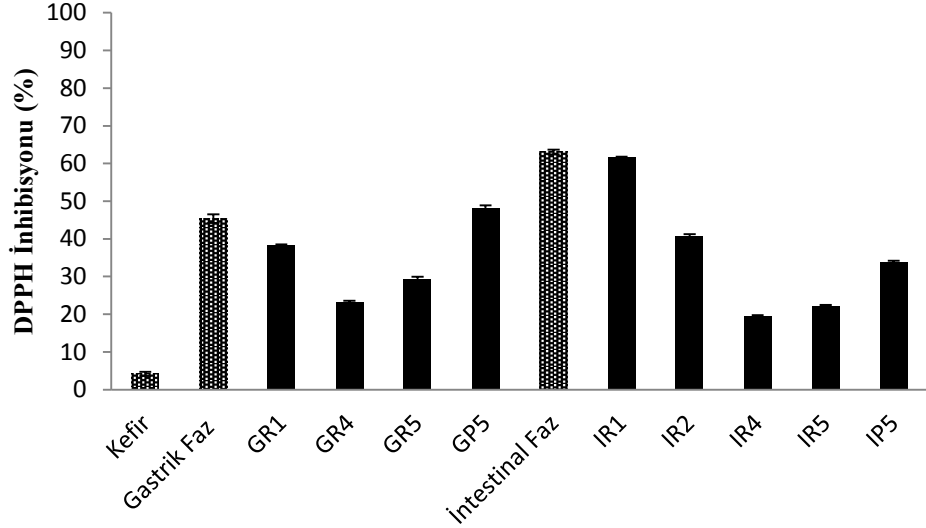
sonuçlarına göre DPPIV inhibitör aktivitesi sindirim öncesi anlamlı bir sonuç vermemiş ve gastrik faz sonunda, intestinal faza göre aktivitenin daha yüksek ya da aynı olduğu görülmüştür. Peynir altı suyunun gastrik fazda aktivitesi yaklaşık %72 iken, intestinal faz sonunda yaklaşık %60 olduğu görülmüştür. Bu durum sindirim sırasında DPPIV inhibitörlerinin pankreatin tarafından parçalanabileceği şekilde yorumlanmıştır. Nongonierma ve diğ. (2017) süt proteini izolatları ile yaptıkları çalışmada sindirilmemiş izolatlarda IC₅₀ değeri 2.7 mg/mL'den büyük bulunurken; sindirime uğramış izolatlarda bu değer 0,65 ± 0.06 mg/mL olarak bulunmuştur.

Kefirin sindirimi ile gerçekleşen protein parçalanması ve buna bağlı birçok biyoaktif bileşenin açığa çıkması; kefirin ACE inhibitör aktivitesinde olduğu gibi DPPIV inhibitör aktivitesini de arttırdığını göstermektedir. DPPIV inhibitör aktivitesi için ultrafiltrasyon sonrasında, gastrik fazda 10 - 3 kDa arasında kalan örnekte DPPIV inhibitör aktivitesi % 76,47 ile en yüksek değer olarak görülürken, intestinal fazda da 3 kDa altında kalan örnekte % 90,16 ile en yüksek değer görülmektedir. Bu sonuçlar DPPIV inhibitör aktivitesi gösteren biyoaktif moleküllerin hidrolize olmuş peptidler olabileceği ve bu peptitlerin 3 kDa altında yoğunlaşmış olabileceğini işaret etmektedir.

4.5 Antioksidan Madde Miktarı

4.5.1 DPPH Aktivitesi

Organik bir bileşik olan DPPH'in mor renginin antioksidanlar ile açılmasına dayanan bu analizde % DPPH aktivitesi Şekil 4.14'te verilmiştir.



Şekil 4.14: Kefir ve ultrafiltrasyon örneklerinin DPPH aktivitesinin sonuçları (%) (GR₁>100 kDa, GR₄=10-30 kDa, GR₅=3-10 kDa, GP₅< 3 kDa, IR₁> 100 kDa, IR₂= 50-100 kDa, IR₄=10-30 kDa, IR₅=3-10 kDa, IP₅< 3 kDa)

Şekil 4.14'deki sonuçlara göre kefirin DPPH aktivitesi gastrointestinal simülasyonu sonunda artmaktadır. Kefirin sindirim simülasyonundan önceki DPPH aktivitesinin % 4,2 iken; gastrik faz çıkışı % 45,37 ve intestinal faz çıkışı % 63,06 olarak bulunmuştur. Hogan ve diğ. (2009) süt proteini hidrolizatları ile yaptıkları çalışmada DPPH aktivitesinin 3,1 – 35,4 µmol TE (Trolox Ekuvalant)/g arasında değiştiğini ve en yüksek değerine 10-3 kDa arasındaki süt proteini izolatlarında ulaştığını gözlemlemişlerdir. Abd El-Fattah ve diğ. (2017) süt proteinlerini proteaz, pepsin, tripsin ve papain kullanarak hidrolize etmiş ve bu hidrolizatlarda DPPH aktivitesini incelemişlerdir. Araştırma bulguları %0,01 konsantrasyona sahip pepsin ve tripsin ile hidrolize edilmiş örneklerde DPPH aktivitesini sırası ile 73,43±0,81 ve 75,42±0,91 olarak bulmuşlardır. Bunun yanısıra Rodríguez-Roque ve diğ. (2013) sindirim öncesi soya sütünün DPPH aktivitesini % 17, gastrik faz sonrasını % 30 ve intestinal faz sonrasını % 13 olarak bulmuşlardır.

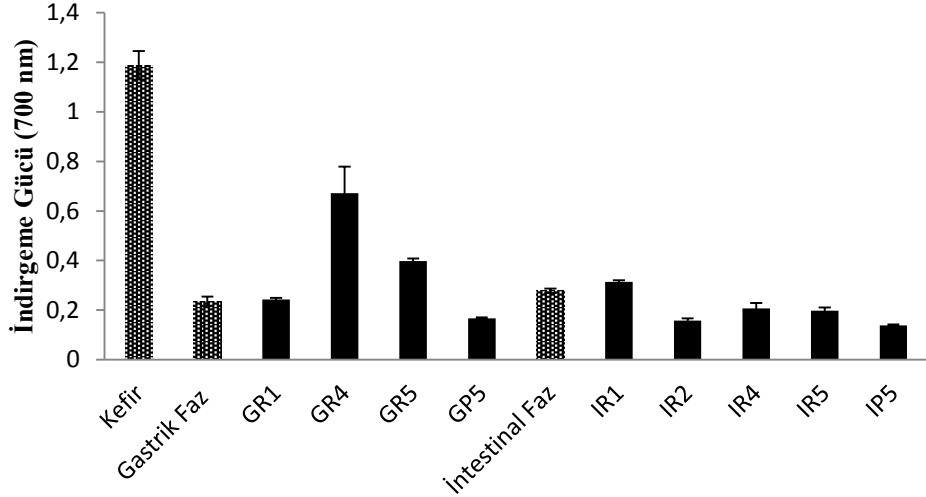
Brezilya kefirinden elde edilen *S.cerevisiae* suşlarının gastrointestinal sindirim sonrası DPPH aktiviteleri araştırılmış ve suşlara bağlı olarak %30 (ScN, ScP) ile %90 (ScJ, ScZ) arasında değişen DPPH aktivitesi görülmüştür (de Lima ve diğ. 2017).

Şekil 4.14 incelendiğinde DPPIV inhibitör aktivitesi ve ACE inhibitör aktivitesi sonuçlarından farklı olarak GR1 (%38,2) ve IR1 (%61,62) örneklerinde

dikkate değer bir oranda DPPH aktivitesi tespit edilmiştir. Büyük kısmı protein hidrolizine yönelik enzimler içeren bir gastrointestinal süreçten çıktıktan sonra bu süreçten etkilenmeden çıkabilen ve yüksek molekül ağırlığına sahip bu biyomolekülün *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*), *L. helveticus* gibi mikroorganizmalar tarafından fermentasyon esnasında üretilen ekzopolisakkaritler (EPS) olabileceği düşünülmüştür. EPS'ler suda çözünabilir ve genellikle 10 kDa ile 200 kDa arasında bulunmaktadır. Bu ürünler gastrointestinal sistemde parçalanamayıp prebiyotik özellik göstermektedir (Salazar ve diğ. 2008; Soyuçok ve diğ. 2016). Frengova ve diğ. (2002) kefir danesindeki suşların EPS sentezini incelemişler ve *L. bulgaricus* türünde yüksek oranda EPS sentezi rapor etmişlerdir. Chen ve diğ. (2015) Tibet kefiri ile yaptıkları çalışmada EPS'nin konsantrasyonunun artmasıyla (0,09-1,73 mg/mL) DPPH aktivitesinde arttığını (20-60 µmol TE/L) gözlemlemişlerdir. Bu sonuçlar kefir tarafından sentezlenen biyomoleküllerin kullandığımız dane yapısındaki mikroorganizmalara bağlı olarak farklılıklar içerebileceğini göstermektedir.

4.5.2 İndirgeme Gücü

Bu analizde muhtemel antioksidanların, ortama ilave edilen yükseltgen bir madde olan demir (III) çözeltisini demir (II)'ye indirgeme gücü değeri ölçülmektedir. Analiz sonucunda yüksek absorbans, yüksek indirgeme potansiyelini gösterir. Şekil 4.15'de kefir ve ultrafiltrasyondan çıkan örneklerin indirgeme gücü sonuçları görülmektedir.



Şekil 4.15: Kefir ve ultrafiltrasyon örneklerinin indirgeme gücü sonuçları (nm) (GR₁>100 kDa, GR₄=10-30 kDa, GR₅=3-10 kDa, GP₅< 3 kDa, IR₁> 100 kDa, IR₂= 50-100 kDa, IR₄=10-30 kDa, IR₅=3-10 kDa, IP₅< 3 kDa)

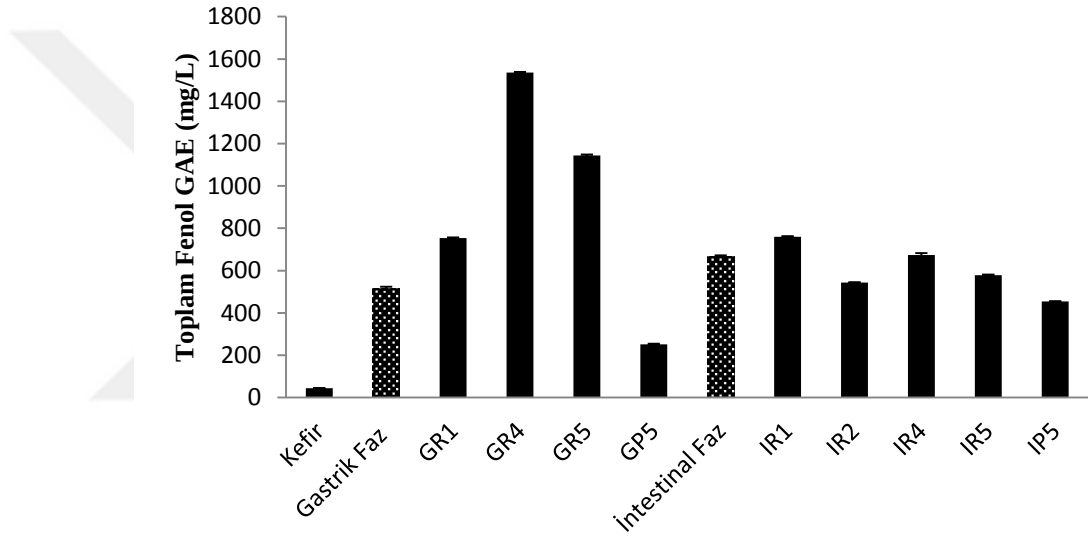
Kefirin sindirim simülasyonundan önceki indirgeme gücünün optik yoğunluğu 1,118 iken; gastrik faz çıkışı 0,235 ve intestinal faz çıkışı 0,278 olarak bulunmuştur. Abd El-Fattah ve diğ. (2017) süt proteinlerini proteaz, pepsin, tripsin ve papain kullanarak hidrolize etmiş ve bu hidrolizatlarda RP aktivitesini incelemişlerdir. Araştırma bulguları %0,01 konsantrasyona sahip pepsin ve tripsin ile hidrolize edilmiş örneklerde RP aktivitesini sırası ile $0,193 \pm 0,001$ ve $0,197 \pm 0,01$ olarak bulmuşlardır. Ultrafiltrasyon sonrası örneklere bakıldığında en yüksek indirgeme gücünün gastrik fazda 30-10 kDa arasındaki biyomoleküllerde olduğu görülmüştür. Ancak genel anlamda değerler birbirine yakın olup, kefirdeki indirgeme gücüne sahip biyomoleküllerin sindirilmenden önce yaklaşık 5 kat daha fazla olduğu görülmektedir. Sindirim süreci ile antioksidan miktarlarında görülen azalma kefirde başlangıçta elde edilen ve yüksek indirgenme gücüne sahip olduğu görülen antioksidanların sindirim ile birlikte kaybedildiğini göstermiştir. Bu bilgi kefirin biyolojik yararlılığını irdelemek için önemli bir bulgudur.

Yapılan çalışmada DPPH inhibisyonu ve indirgeme gücü arasında ters orantı olduğu görülmektedir. Zhang ve diğ. (2015) fenolik antioksidanların, DPPH ve indirgeme gücünü karşılaştırmışlar. Bu karşılaştırmada; şiringik asit (SA), tersinir bütıl hidrokinon (TBHQ) ve resveratrol (RSV)'un DPPH ve indirgeme gücü arasında diğer antioksidanlara göre ters orantı olduğu görülmüştür. Melek otu kökünün sulu ekstraktı ile yapılan diğer bir çalışmada da DPPH inhibisyonunun IC₅₀ değeri % 0,39

iken indirgeme gücü IC_{50} değeri %5,62 olarak bulunmuştur (Li ve diğ. 2009). Bu çalışmalar bazı antioksidanların aktiviteleri arasında ters bir ilişki olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızın devamında bu antioksidanların analizlerinin gerçekleştirilmesi planlanmaktadır.

4.5.3 Toplam Fenol Miktarı

Yapılan çalışmalar antioksidan miktarı ile toplam fenolik madde miktarı arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.16: Kefir ve ultrafiltrasyon örneklerinin toplam fenol miktarları GAE (mg/l) (GR₁>100 kDa, GR₄=10-30 kDa, GR₅=3-10 kDa, GP₅< 3 kDa, IR₁> 100 kDa, IR₂= 50-100 kDa, IR₄=10-30 kDa, IR₅=3-10 kDa, IP₅< 3 kDa)

Şekil 4.16'daki sonuçlara göre kefirdeki toplam fenolik madde miktarı 43,76 GAE (mg/L) olup; sindirim simülasyonu sonrası toplam fenolik miktarı artmaktadır. Gastrik faz sonrası 516,12 GAE (mg/L) olan toplam fenolik miktarı, intestinal faz sonrası 668,16 GAE (mg/L)'dır. Ultrafiltrasyon ile yapılan fraksiyonlama sonucu elde edilen en yüksek toplam fenolik madde miktarı gastrik fazda 1535,51 GAE (mg/L) olup 30-10 kDa arasındaki biyoaktif moleküllerde görülmüştür. İntestinal fazda ise 100 kDa üzerindeki biyoaktif moleküllerde 760 GAE (mg/L) olarak bulunmuştur ve fraksiyonlar arasında fark görülememektedir.

Araştırmalarda fenolik bileşiklerin büyük kısmının hücre duvarlarına özellikle antosiyaninlerin makro moleküllere bağlı olduğu ve sindirim sürecinde maruz kaldığı gastrik ve intestinal enzimlerin hidrolizi ile serbest hale geçtiği rapor edilmiştir (Chunchom ve diğ., 2017). Fernandes ve diğ. (2017) yaptıkları benzer çalışmada fermente soya sütünün toplam fenol miktarını 3.68 ± 0.05 mg GAE/g, sindirim sonrası toplam fenol miktarını ise 29.85 ± 0.09 mg GAE/g olarak bulmuşlardır. Bir diğer çalışmada da yine fermente soya sütünün toplam fenol miktarını 614 ± 1.2 mg/L, gastrik faz sonrası 703 ± 1.8 mg/L ve intestinal faz sonrasını 698 ± 1.7 mg/L olarak bulmuşlardır (Rodríguez-Roque ve diğ. 2013). Bu sonuçlar gastrik sindirimin süt matrisindeki fenolik bileşiklerin salınımını arttırdığını düşündürmektedir. Gastrik fazın pH değeri ve enzimatik aktivitesi diğer gıda bileşenlerindeki bazı bağlı fenoliklerin hidrolizinin başlamasına neden olabilir. Bu durum gastrik fazda artan toplam fenolik miktarını açıklamaktadır.

Tablo 4.14: Antioksidan madde miktarı ve toplam fenol miktarının karşılaştırılması (GR₄=10-30 kDa, GP₅< 3 kDa, IR₁> 100 kDa)

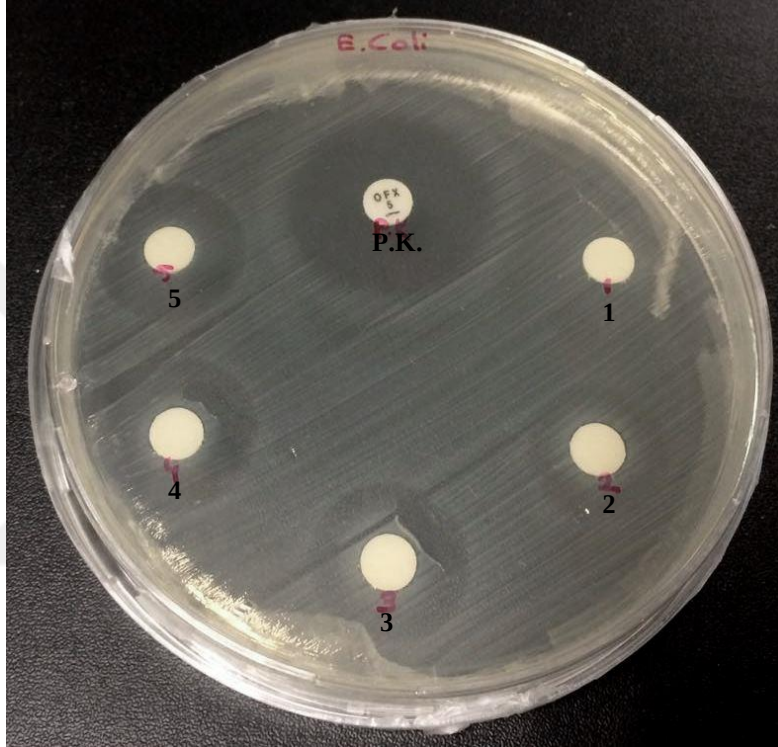
	Kefir	Gastrik faz	İntestinal faz	Ultrafiltrasyon
DPPH (%)	4,2	45,37	63,06	GP ₅ - İR ₁
İndirgeme Gücü (nm)	1,188	0,235	0,278	GR ₄ - İR ₁
Toplam Fenol	43,76	516,12	668,16	GR ₄ - İR ₁

Tablo 4.14'e bakıldığında toplam fenolik madde miktarının DPPH miktarı ile yakından ilişkili olduğu görülmektedir. Toplam fenol miktarı ve DPPH aktivitesi intestinal fazda, gastrik faza göre daha yüksek olmakla birlikte indirgeme gücü gastrointesinal süreçte aktivitesini önemli ölçüde kaybetmiştir. Ultrafiltrasyondan çıkan örnekler bakıldığında antioksidan aktivitenin; gastrik fazda 30 kDa altındaki, biyoaktif moleküllerden kaynaklandığı görülmektedir.

Baublis ve diğ. (2000), mide sindiriminin asidik koşullarının, hazır kahvaltılık tahılların suda çözünür düşük molekül ağırlıklı antioksidanların aktivitesini, kompozisyonunu ve konsantrasyonunu değiştirdiğini ve antioksidan aktivitesinde önemli bir artış meydana getirdiğini bildirmiştir. Noguer ve diğ. (2008), sindirim esnasında kırmızı şarapta, gastrik sindirimden sonra 100-1000 kat daha fazla antioksidan kapasite gözlemlemiştir. Bu sonuçlar gastrointestinal sürecin kefirin sahip olduğu antioksidan kapasitesini arttırabileceğini desteklemektedir.

4.6 Antimikrobiyal Aktivite

Antimikrobiyal aktivite *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger* ve *Candida albicans* suşları için yapılmış olup; gastrointestinal süreçten geçirilen kefir örneğinin yalnızca *Escherichia coli* için antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. İlgili örneklerin diskleri Şekil 4.17’de gösterilmiştir.



Şekil 4.17: Kefir ve ultrafiltrasyondan çıkan örneklerden E.coli için antimikrobiyal aktivite gösterenlerin disk görüntüleri (P.K: Pozitif Kontrol, 1: GR1, 2: GP5, 3: İR1, 4: İR2, 5: İP5)

Resim 4.4’de görülen disklerin çapları P.K, GP5, İR1, İR2, İP5 sırasıyla; 28, 16, 18, 19 ve 18 mm’dir. GR1 fraksiyonundan elde edilen disk için antimikrobiyal aktivite görülmemiştir. Antimikrobiyal aktivitenin özellikle intestinal fazda ve Gram-negatif bir bakteri olan *E. coli* için olduğu görülmektedir. Ancak elde edilen zon berrak bir zon değildir. Bu durum antimikrobiyal etkinin *E.coli* bakterisine bakteriosidal bir etkisinin olmadığı ancak bakteriostatik bir etki gösterdiğini işaret etmektedir. Czamanski ve diğ. (2004) kefirin, Gram-negatif organizmalara karşı yüksek bir bakteriostatik etkiye sahipken Gram-pozitif organizmalara karşı daha iyi bir bakterisidal etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Garrote ve diğ. (2000) kefirin Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler üzerindeki etkisini incelemişler ve *E.coli*’ye karşı

inhibisyon zonu görülmüş. Bu durum fermentasyon sırasında üretilen asetik asit ve laktik asitle açıklanmıştır. Kefir süpernatantları nutrient broth içinde *E.coli* büyümesine izin vermezken, yapay olarak asitlendirilmiş süt ve yoğurt süpernatantları *E.coli* gelişimine izin vermiştir. Organik asidin inhibitör etkilerden sorumlu olan tek ajan olup olmadığını değerlendirmek için yapay olarak asitlendirilmiş süpernatantlar hazırlanmış ve denenmiş ancak sadece laktik asit ile ayarlanan sütte inhibisyon görülürken, diğer asitlerde görülmemiştir. Bu nedenle pH'ın inhibisyonda bir etkisinin olmadığı öne sürülmüştür. Elde ettikleri sonuçlar kefir'in *E. coli* üzerindeki etkisinin bakteriostatik olduğunu ve esas olarak fermentasyon işlemi sırasında üretilen organik asitlerden kaynaklandığını göstermektedir. GR4, GR5 ve GP5 örneklerinde herhangi bir zon görülmemiştir. Bu durum bu örneklerde antimikrobiyal aktivite olmadığını göstermektedir.

Yapılan bir çalışmada kefir danelerinin kefirde daha yüksek antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Bu, özellikle stafilocoklar da dahil olmak üzere Gram-pozitif koklara ve Gram-pozitif basillere karşı gözlenmektedir (Farnworth 2005). Kefir danelerinin antimikrobiyal etkisi özellikle *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* ve aynı zamanda *Candida albicans* gibi mikroorganizmalar üzerinde gözlemlenmiştir (Rosa ve diğ. 2017). Ulusoy ve diğ. (2007), kefirin gıda kaynaklı patojenlere karşı antimikrobiyal etkisini araştırdıkları bir çalışmada kefirin; *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli*'ye karşı antibakteriyel etki sunduklarını gözlemlemişlerdir. En kuvvetli antimikrobiyal etkinin 21.4 ve 21.1 mm'lik etki alanı yarı çaplarıyla *Staphylococcus aureus*'a karşı olduğunu bildirmişlerdir. Silva ve diğ. (2009), çeşitli şeker çözeltileri içinde kefir fermentasyonu yapmışlar ve kefirin *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* ve *Shigella sonnei*'ye karşı antimikrobiyal aktivitesi olduğunu bildirmiştir. Hindistan cevizi sütünden yapılan kefirin antimikrobiyal etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada; hem Gram-negatif bakterilere (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*) hem de Gram-pozitif bakterilere (*Staphylococcus aureus*) karşı antimikrobiyal etki görülmüştür. Hindistan cevizi sütü kefir, 8 mm'den 39 mm'ye kadar değişen genişlikte inhibisyon zonu oluşturarak Gram-negatif bakterilere karşı daha kuvvetli

bir antimikrobiyal etki göstermiştir. Buna kıyasla, Gram-pozitif bakteriler üzerindeki anti-mikrobiyal etki, 5 mm'den 10 mm'ye kadar değişen bir inhibisyon zonu ile daha düşük bir etki göstermiştir (Lakshmi 2017).

Kefir süpernatantının organik asitler, hidrojen peroksitler, etil alkol, diasetil, peptidler ve muhtemelen bakteriosinler gibi çeşitli metabolitleri ve engelleyici bileşikleri içerdiğini göz önüne alarak, bu bileşiklerin antimikrobiyal etkilerini arttırmak veya antagonize etmek için birbirleriyle etkileşim kurdukları varsayılabilir. Örneklerde, bazı bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktiviteleri, organik asitler veya enzimatik bozunum ile inaktive olabilir. Bu nedenle kefirin antimikrobiyal aktivitesi her fermentasyon aşamasında farklı anahtar bileşiklerden türetilmekte ve zamanla tutarsız antimikrobiyal zonlar ile karşılaşmaktadır (Kim ve diğ. 2016).

4.7 Protein Miktarı ve SDS-PAGE Jel Görüntüsü

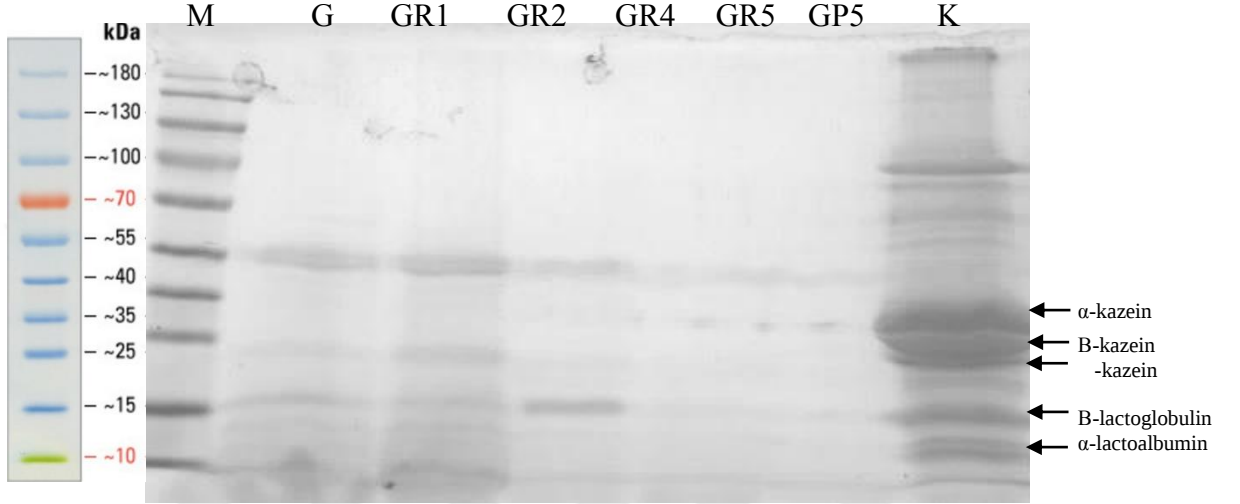
Kefir ve ultrafiltrasyon işleminden sonra elde edilen fraksiyonların protein profilini ortaya koymak için SDS-PAGE elektroforezi yapılmıştır. Elektroforeze yükleme yapmadan önce protein miktarları BCA protein kiti ile ölçülmüş ve Tablo 4.15'de verilmiştir.

Tablo 4.15: Kefir ve ultrafiltrasyon örneklerinin protein miktarları (mg/mL) (GR₁>100 kDa, GR₄=10-30 kDa, GR₅=3-10 kDa, GP₅< 3 kDa, IR₁> 100 kDa, IR₂= 50-100 kDa, IR₄=10-30 kDa, IR₅=3-10 kDa, IP₅< 3 kDa)

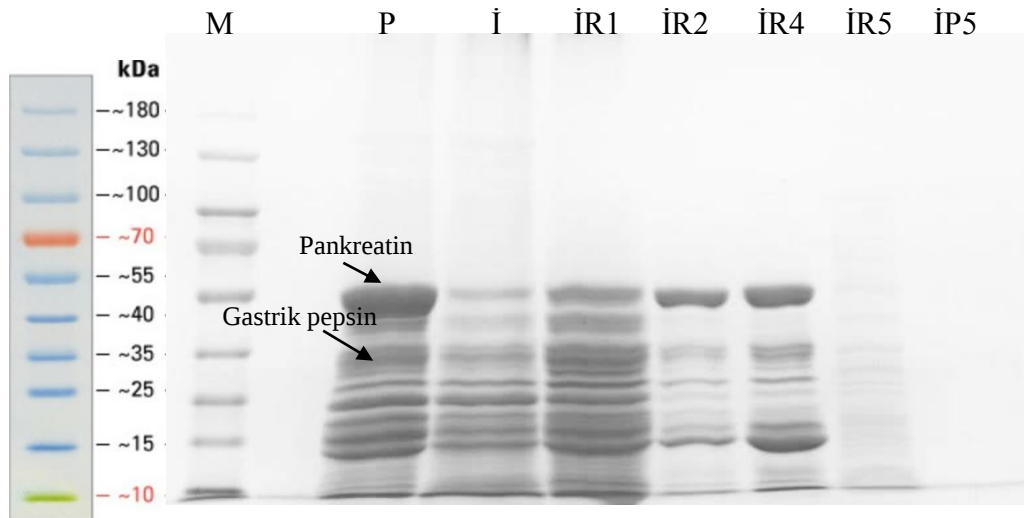
ÖRNEK	Toplam Protein Miktarı (mg)	Örnek hacmi (ml)
Kefir	1011	-
Gastrik Faz	172,4	20
GR1	138,3	6
GR4	17,20	0,44
GR5	37,51	1
GP5	25,12	8
İntestinal Faz	495,8	40
IR1	143,2	10
IR2	117	6
IR4	39,18	0,55
IR5	6,08	1,10
IP5	8,08	8

Tablo 4.15'de görüldüğü gibi sindirim prosesine girmeden önce kefirde toplam protein miktarı 1011 mg iken gastrik fazda 172,4 mg ve intestinal fazda 495,8

mg'dır. Kefirde bulunan proteinin büyük bir bölümü gastrik fazda sindirime uğramıştır. Elde edilen sonuçlarda intestinal fazda, gastrik faza göre daha fazla protein bulunmasının sebebi olarak birden fazla enzim içeren ve gastrik fazdan sonra sisteme eklenen pankreatin gösterilebilir. Kefir, gastrik faz, intestinal faz ve ultrafiltrasyon ile fraksiyonlanmış örneklerin SDS jel görüntüleri aşağıda Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.18: Kefir, gastrik faz ve ultrafiltrasyon edilmiş gastrik fazın SDS-jel görüntüsü (M: Marker, K: Kefir, G: Gastrik faz, GR₁>100 kDa, GR₂= 30-50 kDa, GR₄=10-30 kDa, GR₅=3-10 kDa, GP₅< 3 kDa)



Şekil 4.19: Kefir, intestinal faz ve ultrafiltrasyon edilmiş intestinal fazın SDS-jel görüntüsü (M: Marker, P: Pankreatin, İ: İntestinal faz, İR₁> 100 kDa, İR₂= 50-100 kDa, İR₄=10-30 kDa, İR₅=3-10 kDa, İP₅< 3 kDa)

Şekil 4.18'e bakıldığında gastrointestinal sürece girmemiş olan kefir örneğinde farklı molekül büyüklüklerinde protein bantları görülmektedir. En fazla protein yoğunluğu ise 20-30 kDa arasındadır. En yüksek protein bandı 180 kDa'da görülürken, gastrik faz sonunda en yüksek bandın 40 kDa olduğu görülmektedir. Bu sonuç protein kiti ile yapılan ölçümü desteklemekte ve proteinin parçalandığı görülmektedir.

Şekil 4.19'da görülen P sembolü pankreatin olup, intestinal faz bantlarında sadece kefirde gelen proteinlerin değil aynı zamanda pankreatinden gelen proteinlerin olduğu da gösterilmek istenmiştir. Bu nedenle gastrik faz ile karşılaştırıldığında daha büyük molekül ağırlığına sahip bantlar görülebilmektedir.

Kopf-Bolanz ve diğ. (2014) süt ürünlerinin sindirimi sonrasında açığa çıkan peptidler için SDS-Page yapmışlar ve bu çalışmada olduğu gibi bant yoğunluğunun intestinal fazda daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte 26-37 kDa arasında α -kazein, β -kazein, κ -kazein bantlarının olduğunu, 15 kDa civarında β -laktoglobulin ve α -lactalbumin olduğunu bildirmişlerdir.

El ve diğ (2015) kefirin sindirimi ile ilgili yaptıkları çalışmada aynı molekül ağırlıklarına sahip bantlar tespit etmişler ve bu bantları intestinal pankreatinden gelen amilaz lipaz ve proteaz enzimleri olduğunu bildirmişlerdir. Sanchon ve diğ. (2017), kazeinin gastrointestinal sindirimini inceledikleri bir çalışmada; pankreatinin yaklaşık 50 kDa ağırlığında net bir bant verdiğini ve kazeinin 25-37 kDa arasında bir kasis yaptığını vurgulamışlardır. Kazeine denk gelen bantlar 30 dakikalık gastrik fazdan sonra görünmez hale gelmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada geleneksel yöntemlerle kefir üretimi yapılmış ve üretim sonrası yapılan analitik analizlerde ürünün pH'sı 4,59, titrasyon asitliği %0,71, yağ içeriği %2,5, azot içeriği %0,5, kuru madde içeriği %11,1 ve kül içeriği %0,623 olarak belirlenmiştir. Bu bulguların Türk Gıda Kodeksi Fermente Ürünler Süt Tebliği'ne ve kefir ile ilgili yapılan diğer araştırmalara uygun olduğu görülmektedir.

Analitik analizlerin ardından kalan kefir *in vitro* gastrointestinal sindirim simülasyonuna tabi tutulmuştur. Gastrik ve intestinal faz sonrasında örnekler 100 kDa, 50 kDa, 30 kDa, 10 kDa ve 3 kDa'luk ultrafiltrasyon tüplerinde santrifugal filtrasyon yapılmıştır. Filtrasyon sonrasında elde edilen tüm fraksiyonlara ACE inhibitör aktivitesi, DPPIV inhibitör aktivitesi, toplam fenolik madde miktarı tayini, DPPH antioksidan aktivitesi, indirgeme gücü analizi, antimikrobiyal aktivite, protein miktarı ve SDS-jel elektroforezi uygulanarak tüketilen kefirin biyolojik yararlılığı konusunda fikir edinilmiştir.

Gastrointestinal sindirim sonrasında analiz sonuçları sindirim prosesine girmemiş tüketime hazır geleneksel kefir ile karşılaştırılmıştır. ACE inhibitör aktivitesi kefirde %3,90, gastrik faz sonrası %21,16 ve intestinal faz sonrası %98,88 olarak bulunmuştur. Kefirin antihipertansif özelliğinin büyük bir kısmının, bağırsakta pankreatin ve safra tuzu ile reaksiyonu ile açığa çıkan biyoaktif moleküllerden kaynaklandığı görülmektedir. Ultrasantifüj sonrasında, 100kDa'dan büyük biyoaktif molekülleri içeren GR1 fraksiyonunda ACE inhibitör aktivitesi belirlenmemiştir. Ancak gastrik fazda 30-10 kDa arasında kalan örnekte % 85,95 ile en yüksek değer görülmüştür. Bu biyoaktif moleküllerin gastrik fazda seyreltik durumda iken konsantre olduğunu göstermektedir. İntestinal fazda, gastrik fazdaki toplam ACE inhibitör aktivitesinin yaklaşık 5 katı fazla bir miktar görülmekte ve 30-10 kDa arasında kalan örnekte % 92,74 ile en yüksek değer görülmektedir. Bu sonuçlar yapılan literatür taraması ile birlikte ACE inhibitör aktivitesinin 30-3 kDa arasındaki biyomoleküllerden kaynaklandığını göstermektedir. Gelecek çalışmalarda yapılması planlanan dizi analizleri ile hangi peptit dizilerinin ve aminoasitlerin sorumlu olduğu belirlenecek ve bu durum aydınlatılacaktır.

DPPIV inhibitör aktivitesi sindirim prosesine girmemiş kefirde tespit edilememiştir ancak gastrik faz sonrası %42,62 ve intestinal faz sonrası %19,11 olarak bulunmuştur. Kefirin antidiyabetik özelliğinin büyük bir kısmının, midede pepsin ile reaksiyonuyla açığa çıkan biyoaktif peptidlerden kaynaklandığı söylenebilir. İntestinal fazda görülen bu düşüş sindirim sırasında DPPIV inhibitörlerinin intestinal enzimler tarafından parçalanabileceği şekilde yorumlanmıştır. Ultrafiltrasyon sonrasında, gastrik fazda 10 - 3 kDa arasında kalan örnekte DPPIV inhibitör aktivitesi % 76,47 ile en yüksek değer olarak görülürken, intestinal fazda da 3 kDa altında kalan örnekte % 90,16 ile en yüksek değer görülmektedir. Bu sonuçlar ve yapılan literatür taraması, DPPIV inhibitör aktivitesi gösteren biyoaktif moleküllerin hidrolize olmuş peptidler olabileceğini ve bu peptitlerin 3 kDa altında yoğunlaşmış olabileceğini işaret etmektedir.

Kefirdeki toplam fenolik madde miktarı 43,76 mg GAE/l, gastrik faz sonrası 516,12 mg GAE/l, intestinal faz sonrası 668,16 mg GAE/l olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar gastrik sindirimin süt matrisindeki fenolik bileşiklerin salınımını arttırdığını göstermektedir. DPPH aktivitesi kefirde %4,20, gastrik faz sonrası %45,37 ve intestinal faz sonrası %63,06 olarak bulunmuştur. Ultrafiltrasyon işlemine tabi tutulduğunda gastrik fazdaki bu yükselişin 3 kDa (GP5) altındaki biyoaktif moleküllerden kaynaklandığı ve bununla % 48,14 olduğu görülmektedir. İntestinal fazda ise 100 kDa üzerindeki biyoaktif moleküllerde (İR₁) %61,62 ile en yüksek değere ulaştığı görülmüştür. DPPIV inhibitör aktivitesi ve ACE inhibitör aktivitesi sonuçlarından farklı olarak GR1 (%38,2) ve IR1 (%61,62) örneklerinde dikkate değer bir oranda DPPH aktivitesi tespit edilmiştir. Bu biyomoleküllerin sindirimden etkilenmeyen EPS'ler olabileceği düşünülmektedir. Protein profilini ortaya koymak için yaptığımız SDS-PAGE elektroforezindeki jel görüntüleri sindirimden sonra 100kDa üzerinde protein bandı vermediği için GR1 ve IR1 örneklerinin EPS içermesi ihtimali kuvvetlenmektedir. Toplam fenol miktarındaki artışın temel nedeninin ortamdaki asitlik nedeniyle gıda matrisindeki antioksidanların serbest kalmasından dolayı olduğu çalışma sonuçlarına ve literatür taramalarına göre öne sürülmüştür. Kefirin sindirim simülasyonundan önceki indirgeme gücünün optik yoğunluğu 1,118 iken; gastrik faz çıkışı 0,235 ve intestinal faz çıkışı 0,278 olarak bulunmuştur. Ultrafiltrasyon sonrası örneklere bakıldığında en yüksek indirgeme gücünün gastrik fazda 30-10 kDa arasındaki biyomoleküllerde olduğu görülmüştür.

Yapılan çalışmada DPPH inhibisyonu ve indirgeme gücü arasında ters orantı olduğu görülmektedir. Literatür araştırması yapıldığında bazı antioksidanların ters orantıya sahip olabileceğini görülmektedir. İlerleyen çalışmalarda bu antioksidanların analizlerinin ve karşılaştırmasının yapılması konuya açıklık getirecektir.

Sindirim prosesine uğramamış kefir ve sindirim sonrası fraksiyonlarında antimikrobiyal etki araştırılmış ve elimizdeki mevcut kefirde antimikrobiyal etki görülmezken; pozitif kontrolde, 3 kDa üzerindeki GP5, 100 kDa üzerindeki İR1, 50 kDa üzerindeki İR2 ve 3 kDa altındaki İP5 fraksiyonlarında *E.coli*'ye karşı sırasıyla; 28, 16, 18, 19 ve 18 mm'lik zonlar görülmüştür. Bu zonların kefirin *E. coli* üzerine olan bakteriostatik etkisinden kaynaklandığı yapılan literatür taramasıyla belirtilmiştir.

Sindirim prosesine girmeden önce kefirde protein miktarı 101,14 mg/mL iken; gastrik fazda 8,62 mg/mL ve intestinal fazda 12,39 mg/mL'dir. Proteinlerin çok büyük bir bölümü gastrik fazda sindirime uğramıştır. İntestinal fazdaki artış birden fazla enzim içeren pankreatinden kaynaklanmaktadır.

Bu sonuçlar gastrointestinal sindirim sonrasında, açığa çıkan biyoaktif moleküllerin, sindirim öncesine göre daha aktif olduğunu ve kefirin sindirim sonrasında biyoyararlılığının genel olarak arttığını göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

Abd El-Fattah, A. M., Sakr, S. S., El-Dieb, S. M. and Elkashef, H.A.S., "Bioactive peptides with ACE-I and antioxidant activity produced from milk proteolysis", *Int. J. Food Properties*, 1-10, (2017).

Adibi, S. A., "Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease", *Am. J. of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 285(5), 779-788, (2003).

Ahotupa, M., Ruutu, M. and Mäntylä, E., "Simple methods of quantifying oxidation products and antioxidant potential of low density lipoproteins." *Clin. Biochem.*, 29(2), 139-144, (1996).

Albayrak, S., Sağdıç, O. ve Aksoy, A., "Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler", *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 26 (4), 401-409, 2010.

Altınışik, M., "Genel sindirim ve emilim. tıp fakültesi biyokimya ders notları [Online]", (22 Nisan 2017), <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-2-09.pdf>.

Angulo, L., Lopez, E. and Lema, C., "Microflora present in kefir grains of the Galician region (North-West of Spain)", *J. Dairy Res.*, 60, 263-267, (1993).

Anonim. 2005. TKB Ankara İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü 2005. Kül Tayini Döküman Kodu: Fal.MT058 /P13 11.05.2005

Anonim. 2006. Fat Content of Raw and Pasteurized Whole Milk. Methods of Analysis. No. 2000.18. AOAC International 18th Edition, Current through Revision 1. Association of Official Analytical Chemists Inc. Virginia, USA.

AOAC. Official Methods of Analysis. Washington DC, (1996).

AOAC Official methods of analysis, Gaithersburg, MD, USA (2000).

Atamar, M., Sezgin, E. ve Yetişmeyen, A., "Torba yoğurtlarının bazı niteliklerinin araştırılması", *Gıda*, 13(4), 283-288, (1988).

Aytekin, A.O., Shigeru, M. and Kenji, K., "Synthesis of chitosan–caffeic acid derivatives and evaluation of their antioxidant activities" *J. Biosci. Bioeng.* 111(2), 212-216, (2011).

Baublis, A., Decker, E. A. and Clydesdale, F. M., "Antioxidant effect of aqueous extracts from wheat based ready-to-eat breakfast cereals", *Food Chem.*, 68(1), 1-6, (2000).

Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. and Tenckhoff, M. "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method", *Am. J. Clin. Pathol.* 45, 493-496, (1996).

Benzie, I. F. and Strain, J. J., "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay", *Anal. Biochem.*, 239(1), 70-76, (1996).

Bermudez-Soto, M.J., Tomas-Barberan, F.A., "Evaluation of commercial red fruit juice concentrates as ingredients for antioxidant functional juices", *Eur. Food Res. Technol.*, 219, 133-141, (2004).

Beshkova, D.M., Simova, E.D., Simov, Z.I., Frengova, G.I. and Spasov, Z.N., "Pure cultures for making kefir", *Food Microbiol.*, 19, 537-544, (2002).

Bilge T., "Bazı fermente süt ürünlerinin antioksidan özelliklerinin araştırılması" Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa, (2011).

Chang, E.B., "Intestinal water and electrolyte absorption and secretion", *Transplantation Proceedings*, 28(5), 1996.

Chen, H.C., Wang, S.Y. and Chen, M.J., " Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods", *Elsevier Food Microbiology*, 25, 492-501, (2008).

Chen, Z., Shi, J., Yang, X., Nan, B., Liu, Y. and Wang, Z. "Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation", *Int. Dairy J.*, 43, 15-21, (2015).

Chunchom, S., Chusri T. and Sirirat D., "Antioxidant Activity, Biochemical Components and Sub-Chronic Toxicity of Different Brown Rice Kefir Powders", *Pharmacognosy J.*, 9(3), 388-394, (2017).

Czamanski, R.T., Greco, D.P. and Wiest, J.M., "Evaluation of antibacterial activity in filtrates of traditional kefir", *Rev. Hig. Alim.*, 18, 75–77, (2004).

Çakar, A., “Kefir florasındaki mikrobiyal çeşitliliğin yeni nesil dizileme yöntemi ile metagenomik olarak incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul (2013).

Çevikbaş, A., Yemni, E., Ezzedenn, F.W., Yardimici, T., Çevikbaş, U. and Stohs, S. J., “Antitumoural antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain”, *Phytother. Res.*, 8(2): 78–82, (1994).

de Lima, M.D.S.F., de Souza, K.M.S., Albuquerque, W.W.C., Teixeira, J.A.C., Cavalcanti, M.T.H. and Porto, A.L.F., “*Saccharomyces cerevisiae* from Brazilian kefir-fermented milk: An in vitro evaluation of probiotic properties”, *Microbial Pathogenesis*, (in press)(2017).

da Silva Fernandes, M., Lima, F. S., Rodrigues, D., Handa, C., Guelfi, M., Garcia, S. and Ida, E. I., “Evaluation of the isoflavone and total phenolic contents of kefir-fermented soymilk storage and after the *in vitro* digestive system simulation”, *Food Chem.*, 229, 373-380, (2017).

De Vrese, M., and Schrezenmeir, J., “Probiotics and non-intestinal infectious conditions”, *Br. J. Nutr. 88 Suppl.*, 1, 59-66, (2002).

DeWitt D.E. and Hirsch, I.B., “Outpatient insulin therapy in type 1 and 2 diabetes mellitus: Scientific Review”, *Jama* 289(17), 2254-2264, (2003).

Dojindo Laboratories. ACE Kit – WST (100 tests) technical manual, (14 Haziran 2016), https://www.dojindo.com/TechnicalManual/Manual_A502.pdf

Domínguez-González, K. N., Cruz-Guerrero, A., González-Márquez, H., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M., Jiménez-Guzmán, J. and Rodríguez-Serrano, G. “Antihypertensive and antithrombotic activities of a commercial fermented milk product made with *Lactobacillus casei* Shirota and *Streptococcus thermophilus*”, *Int. J. Dairy Technol.*, 67 (3), 358-364, (2014).

Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R.E. and Acton, S., “A novel angiotensin-converting enzyme–related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9”, *Circ Res.*, 87(5), 1-9, (2000).

Drucker D.J., “Enhancing the action of incretin hormones: A new whey forward”, *Endocrinology*, 147(7), 3171–3172, (2006).

Duh, P. D., “Antioxidant activity of burdock (*Arctium lapa* Linne): Its scavenging effect on free radical and active oxygen”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 455-465, (1998).

Dziuba, M., Dziuba, B., and Iwaniak, A. “Milk proteins as precursors of bioactive peptides”, *Acta Sci.Pol. Technol. Aliment.*, 8(1), 71-90, (2009).

El, S. N., Karakaya, S., Simsek, S., Dupont, D., Menfaatli, E. and Eker, A. T., “*In vitro* digestibility of goat milk and kefir with a new standardised static digestion method (INFOGEST cost action) and bioactivities of the resultant peptides”, *Food and Function*, 6(7), 2322-2330, (2015).

Ender, G., “Oligofruktozla zenginleştirilmiş süttten üretilen kefirlerin kalitesi üzerine tane ve kültür kullanımının etkileri”, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, (2009).

Erkmen, O. and Bozoglu, T.F, *Food Microbiology: Principles into Practice*, 2 Volume Set. John Wiley & Sons (2016).

Farnworth, E.R., “Probiotics and prebiotics”, *Handb. Nutraceutical Func. Foods*, 25, 407-422, (2001).

Farnworth, E.R., “Kefir- a complex probiotic”, *Food Sci. Technol. Bulletin: Fu.*, 2(1): 1-17, (2005).

Farnworth, E.R., “The evidence to support health claims for probiotics”, *J. Nutr.*, 138(6), 1250-1254, (2008).

Farnworth, E.R., “The history of fermented foods”, *Handbook of Fermented Func. Foods Second Edition*, (2009).

FitzGerald, R. J., and Murray, B. A., “Bioactive peptides and lactic fermentations”, *Int. J. Dairy Technol.*, 59, 118–125, (2006).

Frengova, G. I., Simova, E. D., Beshkova, D. M. and Simov, Z. I. “Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains”. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(9-10), 805-810, (2002).

Fung, W. Y. and Liong, M. T., “evaluation of proteolytic and ace-inhibitory activity of *Lactobacillus acidophilus* in soy whey growth medium via response surface methodology”, *LWT-Food Sci. Technol.*, 43 (3), 563-567, (2010).

Garrote, G.L., Abraham, A.G., and DE ANTONI, G.L. "Inhibitory power of kefir: the role of organic acids", *J. Food Protection*, 63(3), 364-369, (2000).

Gaware, V., Kotade, K. and Dolas, R., "The magic of kefir: A review", *Pharmacol.*, 1, 376-836, (2011).

Geerts, B.F., Dongen, M.G.V., Flameling, B., Moerland, M.M., Kam, M.L.D., Cohen, A.F., Romijn, J.A., Gerhardt, C.C., Kloek, J. and Burggraaf, J., "Hydrolyzed casein decreases postprandial glucose concentrations in T2DM patients irrespective of leucine content", *J. Dietary Suppl.*, 8(3), 280-292, (2011).

Guyton, C.A. and Hall, J.E., "Besinlerin Sindirim Kanalında Taşınması ve Karıştırılması", (eds: Çavuşoğlu, H., Yeğen, B.), *Tıbbi Fizyoloji*, İstanbul:Nobel Matbacılık, (1956a).

Guyton, C.A., Hall, J.E., "Sindirim Kanalının Salgı İşlevleri", (eds: Çavuşoğlu, H., Yeğen, B.), *Tıbbi Fizyoloji*, İstanbul:Nobel Matbacılık, (1956b).

Guyton, C.A., Hall, J.E., "Arter Basıncının Uzun Süreli Düzenlenmesi ve Hipertansiyonda Böbreklerin Baskın Rolü: Basınç Kontrolünde Entegre Sistem". *Tıbbi Fizyoloji*. Editör: Bozkurt, A. İstanbul: Nobel Matbacılık (1956c).

Guyton, C.A., Hall, J.E., "Gastrointestinal Kanalda Sindirim ve Emilim", (eds: Çavuşoğlu, H., Yeğen, B.), *Tıbbi Fizyoloji*, İstanbul:Nobel Matbacılık (1956d).

Guzel-Seydim, Z. B., Kok-Tas, T., Greene, A. K., and Seydim, A. C., "Review: Functional properties of kefir", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 51(3), 261-268, (2011).

Guzel-Seydim, Z.B., Dibekci, M., Cagdas, E., Seydim, A.C., "Effect of kefir on *Fusobacterium nucleatum* in potentially preventing intestinal cancer", *Funct. Foods Health Dis.*, 6(7), 469-477, (2016).

Gürsoy, O., Yazar, A. ve Yılmaz, Y. "Peynirlerde bulunan kan basıncını düşürücü biyoaktif peptidler", *Akademik Gıda*, 13 (3), 237-246, (2005).

Güven, A. ve Güven, A., "Hiperkolesterolemi oluşturulmuş tavşanlarda kefir'in total kolesterol trigliserit, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol ve lipit peroksidasyonu üzerine etkisi", 2(11), 127-131, (2005).

Güven, E.Ç, Otkun, G.T. and Boyacıoğlu, D., “Flavonoidlerin biyoyararlılığını etkileyen faktörler” *Gıda*, 35(5), 387-394, (2010).

Güzel-Seydim, Z. B., Wyffels, J. T., Seydim, A. C. and Greene, A. K. “Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscobic observation”, *Int. J. Dairy Technol.* 58 (1), 25-29, (2005).

Hacıoğlu, G. ve Kurt, G., “Tüketicilerin fonksiyonel gıdalara yönelik farkındalığı, kabulü ve tutumları: İzmir ili örneği”, *Bus. Econ. Res. J.*, 3(1): 161-171, (2012).

Hayes, M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F. and Ross, R. P., “Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: bioactive peptide functions”, *Biotech. J.*, 2(4), 435-449, (2007).

Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B. and Amigo, L., “Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS”, *J. Agric. Food Chem.*, 53(3), 588-593, (2005).

Hertzler, S.R. and Clancy, S.M., “Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion”, *J. Am. Diet. Association*, 103(5), 582-587, (2003).

Hogan, S., Zhang, L., Li, J., Wang, H. and Zhou, K., “Development of antioxidant rich peptides from milk protein by microbial proteases and analysis of their effects on lipid peroxidation in cooked beef”, *Food Chem.*, 117(3), 438-443, (2009).

Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L., “The chemistry behind antioxidant capacity assays”, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1841-1856, (2005).

Jafar, T.H., Stark, P.C., Schmid, C.H., Landa, M., Maschio, G., de Jong, P.E., de Zeeuw, D., Shahinfar, S., Toto, R. and Levey, A. S. “Progression of chronic kidney disease: the role of blood pressure control, proteinuria, and angiotensin-converting enzyme inhibition: a patient-level meta-analysis”. *Annals Int. Med.*, 139(4), 244-252, (2003).

Jalali, F., Sharifi, M. and Salehi, R., “Kefir induces apoptosis and inhibits cell proliferation in human acute erythroleukemia”, *Med. Oncol.*, 33(1), 1-9, (2016).

Johnson, L.R. and Gerwin, T.A., “Gastrointestinal physiology”, Philadelphia: Mosby Elsevier, (2007).

Kamiloğlu, S., Paslı, A. A., Çapanoğlu, E. ve Özçelik, B. “Kuru meyvelerin kuruyemişler ile birlikte tüketiminin flavonoidlerin *in vitro* biyoyararlılığına etkisinin incelenmesi” *Gıda*, 39(4), 227-233, (2014).

Karagözlü C. ve Kavas, G., “Alkollü fermente süt içecekleri : Kefir ve kımızın özellikleri ve insan beslenmesindeki önemi”. *Dünya Gıda*, 6(7), 86-93, (2000).

Karatepe, P. ve Yalçın, H., "Kefirli sağlık", *Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der.*, 4(2): 23-30, (2004).

Karatepe, P., Yalçın, H., Patır, B. ve Aydın, I., “Kefir ve kefirin mikrobiyolojisi”, *Elekt Mikrobiyol Derg*, 10(1), 1-10, (2012).

Karbancıoğlu, F. ve Mutlu, A., “Fermantasyonun mikotoksinler üzerine etkisi”, 8. *Gıda Mühendisliği Kongresi*, (2013).

Kesenkaş, H., Yerlikaya, O. and Özer, E., “A functional milk beverage: kefir”, *Agr. Food Industry Hi-Tech.*, 24 (6), 53-55, (2013).

Kim, D. H., Jeong, D., Kim, H., Kang, I. B., Chon, J. W., Song, K. Y., and Seo, K. H., “Antimicrobial activity of kefir against various food pathogens and spoilage bacteria”, *Korean J Food Sci Anim. Resour*, 36(6), 787-790, (2016).

Kitts, D. D. and Weiler, K., “Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery”, *Curr. Pharm. Design*, 9, 1309-1323, (2003).

Kopf-Bolanz, K. A., Schwander, F., Gijs, M., Vergères, G., Portmann, R. and Egger, L., “Impact of milk processing on the generation of peptides during digestion”, *Int. Dairy J.*, 35(2), 130-138, (2014).

Koroleva, N.S., “Starters for fermented milks”, *IDF Bulletin.*, 227, 35-40, (1988).

Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E. and Etherton, T.D., “Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer”, *Am. J. Med.*, 113(9), 71–88, (2002).

Kurman, J. A., Rasic, J. L. and Kroger, M., “Encyclopedia of fermented fresh milk products: an Int. inventory of fermented milk, cream, buttermilk, whey, and related products.”, Springer Sci. & Business Media, New York, (1992).

Lacroix, I. M. and Li-Chan, E. C., “Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein hydrolysates”, *Int. Dairy J.*, 25(2), 97-102, (2012).

Lacroix, I.M. and Li-Chan, E.C., “Evaluation of the potential of dietary proteins as precursors of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors by an in silico approach”, *J. Funct. Foods*, 4(2), 403-422, (2012).

Laemmli, U.K., “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature*, 227(5259), 680-685, (1970).

Lakshmi, T. S., “Anti-microbial, anti-fungal and anti-carcinogenic properties of coconut milk kefir”, *Int J. Home Sci.*, 3(1), 365-369, (2017).

Li, X., Wu, X. and Huang, L., “Correlation between antioxidant activities and phenolic contents of radix *Angelicae sinensis* (Danggui)”, *Molecules*, 14(12), 5349-5361, (2009).

Libudzisz, Z. and Piatkiewicz, A., “Kefir production in Poland”, *Dairy Ind. Int.*, 55: 31-33, (1990).

Lin, M. Y. and Yen, C. L., “Antioxidative ability of lactic acid bacteria”, *J.Agric. Food Chem.*, 47, 1460-1466, (1999).

Liu, J.R., Wang, S.Y., Lin, Y.Y. ve Lin, C.W., “Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice”, *Nutr. Cancer*, 44(2), 183-187, (2002).

Liu, J.R., Wang, S.Y., Chen, M.J., Chen, H.L., Yueh, P.Y. and Lin, C.W., “Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soymilk-kefir in cholesterol-fed hamsters”, *Br. J. Nutr.*, 95, 939-946, (2006).

Lovegrove, A., Edwards, C.H., De Noni, I., Patel, H., El, S.N., Grassby, T., Zielke, C., Ulmius, M., Nilsson, L., Butterworth P.J., Ellis, P.R. and Shewry, P.R., “Role of polysaccharides in food, digestion, and health” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 57(2), 237-253, (2017).

Lussignoli S., Fraccarolli M., Andriolli G., BroCco G. and Bellavite P., “A microplatebased colorimetric assay of the total peroxyl radical trapping capability of human plasma”, *Anal. Biochem.*, 269, 38-44, (1999).

Mathew, S. and Abraham, T.E., “Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum Verum*) bark extracts, through various *in vitro* models”, *Food Chem.*, 94, 520-528, (2006).

Meir, S., Kanner, J., Akiri, B. and Hadas, S.P., “Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves”, *J. Agric. and Food Chem.*, 43, 1813-1819, (1995).

Meisel, H. and Fitz Gerald, R. J., “Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects” *Curr. Pharm. Design*, 9, 1289-1295, (2003).

Mentlein, R., “Therapeutic assessment of glucagons-like peptide-1 agonists compared with dipeptidyl peptidase IV inhibitors as potential antidiabetic drugs”, *Expert Opin. Invest. Drugs*, 14, 57-64, (2005).

Mercan, U., “Toksikolojide serbest radikallerin önemi”, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 15(1-2), 91-96, (2004).

Messina, F., Saba, A., Turrini, A., Raats, M., Lumbers, M. “Older people's perceptions towards conventional and functional yoghurts through the repertory grid method: A cross-country study”, *Br. Food J.*, 110(8), 790-804, (2008).

Metin, M. ve Tavlas. B., “Kefir tanesi ve kefir kültürü kullanılarak üretilen kefirlerin kalitesi üzerine olgunlaşma koşullarının etkisi”, *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, 4(1): 51-68, (1986).

Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Menard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Brodkorb A., “A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus”, *Food Funct.*, 5, 1113 – 1124, (2014).

Nauck M, El-Ouaghlidi A., “The therapeutic actions of DPP-IV inhibition are not mediated by glucagon-like peptide-1”, *Diabetologia*, 48, 608–11, (2005).

Nayir, M.S., “Sütün yoğurda dönüşümü sırasında içerdiği fenolik antioksidan maddelere prebiyotik bakteri etkisinin incelenmesi”. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, (2008).

Noguer, M., Cerezo, A. B., Rentzsch, M., Winterhalter, P., Troncoso, A. M. and García-Parrilla, M. C., “Simulated digestion and antioxidant activity of red wine fractions separated by high speed countercurrent chromatography”, *J. Agric. Food Chem.*, 56(19), 8879-8884, (2008).

Nongonierma, A. B., Lalmahomed, M., Paoletta, S. and FitzGerald, R. J., “Milk protein isolate (MPI) as a source of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides”, *Food Chem.*, 231, 202-211, (2017).

Odet, G., “Fermented milks”, *IDF Bull.*, 300, 98-100, (1995).

Orman, S., “Sterilizasyon Yöntemlerinin Baharatların Antioksidan Aktiviteleri ve Renk Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa, (2005).

Otles, S. and Cagindi, O., “Kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects”, *Pak. J. of Nutrition*, 2(2), 54-59, (2003).

Otsoa, F.L., Rementeria, A., Elguezabal, N. and Garaizar, J., “Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities”, *Rev. Iberoam. Micol.*, 23: 67-74, (2006).

Oyaizu, M., “Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucose-amine”, *Jpn. J. Nutri.*, 44, 307-315, (1986).

Pal, V., Jamuna, M. and Jeevaratnam, K., “Isolation and characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria from a South Indian Special dosa (Appam) batter”, *J. Culture Collect.*, 4(1), 53-60, (2005).

Pihlanto, A., Virtanen, T. and Korhonen, H., “Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk”, *Int. Dairy J.*, 20(1), 3-10, (2010).

Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M., “*Antioxidants in food: practical applications*”, USA: CRC Press, (2001).

Powell J.E., “Bacteriocins and bacteriocin producers present in kefir and kefir grains”, Ph.D Thesis, Diss. Stellenbosch: University of Stellenbosch, (2006).

Prior, R.L., Wu, X. and Scaich, K., “Standardized methods for the determination antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements”, *J. Agric. Food Chem.*, 53 (8), 3110-3111, (2005).

Pritchard, S. R., “Isolation and characterization of bioactive peptides derived from milk and cheese”. University of Western Sydney, Australia, 123-124, (2012).

Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L. and Recio, I., “Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir”, *J. Dairy Sci.*, 88(10), 3480-3487, (2005).

Rodrigues, K.L., Araújo, T.H., Schneedorf, J.M., de Souza Ferreira, C., Moraes, G.D.O.I., Coimbra, R.S. and Rodrigues, M.R., “A novel beer fermented by kefir enhances anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities found isolated in its constituents”, *J. Func. Foods*, 21, 58-69, (2016).

Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P. and Martín-Belloso, O., “Soy milk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion”, *Food Chem.*, 136(1), 206-212, (2013).

Rosa, D. D., Dias, M. M., Grześkowiak, Ł. M., Reis, S. A., Conceição, L. L., and Maria do Carmo, G. P., “Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits”, *Nutr. Res. Rev.*, 30(1), 82-96, (2017).

Salazar, N., Gueimonde, M., Hernández-Barranco, A.M., Ruas-Madiedo, P. And Clara, G., “Exopolysaccharides produced by intestinal Bifidobacterium strains act as fermentable substrates for human intestinal bacteria” *App. Environ. Microbiol*, 74(15), 4737-4745, (2008).

Sanchón, J., Fernández-Tomé, S., Miralles, B., Hernández-Ledesma, B., Tomé, D., Gaudichon, C. and Recio, I., “Protein degradation and peptide release from milk proteins in human jejunum. Comparison with *in vitro* gastrointestinal simulation”, *Food Chem.*, 239, 486-494, (2017).

Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T.S., Frengova, G., Spasov, Z., “Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them”, *J. Ind. Mic. Biotech.*, 28, 1-6, (2002).

Silva, K.R., Rodrigues, S.A., Xavier Filho, L., and Lima, Á.S., “Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains”. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 152(2), 316-325, (2009).

Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. “Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent”, *Methods Enzymol.*, 299, 152-178, (1999).

Soyuok, A., Ekiz, T. ve Başığıit Kılın, G, “Ekzopolisakkaritlerin zellikleri ve gıda sanayindeki nemi”, *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 332-344, (2016).

Suetsuna, K., Hiroyuki, U. and Hirotomo, O., " Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein" *The J. Nutr. Biochem.*, 11(3), 128-131, (2000).

Şanlıdere Aloğlu, H., Demir zer, E., and ner, Z., “Assimilation of cholesterol and probiotic characterisation of yeast strains isolated from raw milk and fermented foods”, *Int. J. Dairy Technol.*, 69(1), 63-70, (2016).

Şatır, G., “Kefir Fermantasyonunun Keçi Sütünün Bazı Fonksiyonel zelliklerine Etkisinin Belirlenmesi”, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, (2011).

Şengül, H., “Narda bulunan antosiyaninlerin biyoyararlılığına gıda matrisi ve bileşenlerinin etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, (2013).

Tagliazucchi, D., Shamsia, S., Helal, A. and Conte, A., “Angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from goats’ milk released by in vitro gastro-intestinal digestion”, *Int. Dairy J.*, 71, 6-16, (2017).

Tandler, B., Gresik, E. W., Nagato, T. and Phillips, C. J., “Secretion by striated ducts of mammalian major salivary glands: review from an ultrastructural, functional, and evolutionary perspective”, *The Anatomical Record*, 264(2), 121-145, (2001).

Tangler, H., “Şalgam suyu üretiminde etkili olan laktik asit bakterilerinin belirlenmesi ve şalgam suyu üretim tekniğinin geliştirilmesi”, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, (2010).

Taşkın, B., “Bazı fermente süt ürünlerinin antioksidan özelliklerinin araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa, (2011).

Terzi, G., “Kefirin Bileşimi ve Beslenme Açısından nemi”, *Veteriner Hekimler Derneği*, 78(1), 23-30, (2007).

Thoma, R., Löffler, B., Stihle, M., Huber, W., Ruf, A., and Hennig, M., “Structure basis of proline-specific exopeptidase activity as observed in human dipeptidyl peptidase-IV”, *Struct.*, 11(8), 947-959, (2003).

Tulipano, G., Sibilis, V., Caroli, A.M., Cocchi, D., “Whey proteins as source of dipeptidyl dipeptidase IV (dipeptidyl peptidase-4) inhibitors”, *Pept.*, 32(4), 835–838, (2011).

Turan, I. ve Ilter, T., “Kafkas dağlarından günümüze: Kefir”, *Güncel Gastroenteroloji Dergisi*, 11(2), 65-75, (2007).

Ulusoy, B. H., Çolak, H., Hampikyan, H. and Erkan, M. E., “An *in vitro* study on the antibacterial effect of kefir against some food-borne pathogens”, *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 37(2), 103-107, (2007).

Urdaneta, E., Barrenetxe, J., Aranguren, P., Irigoyen, A., Marzo, F. and Ibanez, F.C., “Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats”, *Nutr Res.*, 27, 653–658, (2007).

Ünal, G.F., “Kuru Madde Oranları Farklı Sütlerden Starter Kültür ve Dane ile Üretilen Set Tipi Kefirlerin Duyusal, Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri”, Yüksek Lisans Tezi, *Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Antalya, (2013).

Ünlütürk, A. ve Turantaş, F., “Gıda mikrobiyolojisi”, Mengi Tan Basımevi, 1. Baskı, 467, (1998).

Velioğlu, S., "Doğal antioksidanların insan sağlığına etkileri", *J. Food*, 25(3), 167-176, (2000).

Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S. and Korhonen, H., “Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria”, *J. Appl. Microbiol.*, 102(1), 106-115, (2006).

WHO. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation; 2006.

Witthuhn, R. C., Schoeman, T. and Britz, T. J., “Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation”, *Int. Dairy J.*, 15(4), 383–389, (2005).

Yıldız, F., “Farklı yağ oranlarının ve farklı starter kültürlerin kefirin nitelikleri üzerine etkisi”, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Süt Teknolojisi, Ankara, (2009).

Yılmaz, İ., "Antioksidan içeren bazı gıdalar ve oksidatif stres", *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 17(2), 143-153, (2010).

Yılmaz, L., Özcan Yılsay, T. and Akpınar Bayızıt, A., “The sensory characteristics of berry-flavoured kefir”, *Czech J. Food Sci.*, 24, 26-32, (2006).

Yogisha, S. and Raveesha, K.A., "Dipeptidyl Peptidase IV inhibitory activity of *Mangifera indica*." *J Nat Prod*, 3, 76-79, (2010).

Yu, Y., Jin, Y., Wang, F., Yan, J., Qi, Y. and Ye, M., “Protein digestomic analysis reveals the bioactivity of deer antler velvet in simulated gastrointestinal digestion”, *Food Res. Int.*, 96, 182-190, (2017).

Yüksekdağ, Z.N., Beyatlı, Y. and Aslım, B., “Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic”. *Lebensm.-Wiss. u.- Technol.*, 37, 663-667, (2004).

Zamperi, N.R., Abu, N., Mohamed, N.E., Nordin, N., Keong, Y.S., Beh, B. K., Zakaria, Z.A.B., Rahman, N.M.A.N.A. and Alitheen, N.B., “The antimetastatic and antiangiogenesis effects of kefir water on murine breast cancer cells”, *Integr. Cancer Therapies*, 15(4), 53-66, (2016).

Zhang, Y., Shen, Y., Zhu, Y. and Xu, Z., “Assessment of the correlations between reducing power, scavenging DPPH activity and anti-lipid-oxidation capability of phenolic antioxidants”, *LWT-Food Sci. Technol*, 63(1), 569-574, (2015).

Zubillaga, M., Weill R., Postaire E., Goldman C., Caro R. and Baccio J., “Effect of probiotics and functional foods and their use in different disease”, *Nutr. Res.*, 21(3), 569-579, (2001).

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Anıl ŞEKER

Doğum Yeri ve Tarihi : Afyon - 08.08.1991

Lisans Üniversite : Pamukkale Üniversitesi

Elektronik posta : anilsekr@gmail.com

İletişim Adresi : Çamlaraltı Mah. 6047 Sok. No:16 DENİZLİ

Yayın Listesi :

• Demiray, E., **Seker, A.**, ve Tulek, Y., “Drying kinetics of onion (*Allium cepa* L.) slices with convective and microwave drying”, *Heat and Mass Transfer*, 53(5), 1817-1827, (2017).

Konferans listesi :

• **Seker, A.**, Yılmaz, T., Arısoy S. ve Aytekin, Ö., " Kefirin Antikanserojenik Aktivitesi", *Gıda, Metabolizma, Sağlık; Biyoaktif Bileşenler ve Doğal Katkılar Kongresi*, (2016).

• Yılmaz, T., **Seker, A.**, Arısoy S. ve Aytekin, Ö., " Bitkisel Gıda Kaynaklı Bazı Biyoaktif Bileşiklerin Kanser Hücreleri Üzerine Etkisi", *Gıda, Metabolizma, Sağlık; Biyoaktif Bileşenler ve Doğal Katkılar Kongresi*, (2016).

• Aytekin, Ö., Arısoy, S. and **Seker, A.**, "Angiotensin Converting Enzyme (Ace) Inhibitor Activity From Casein Generated By *Lactobacillus Kefiri*", *Food & Biosystems Engineering Conference*, (2015).

• **Seker, A.**, Demiray, E. ve Tulek, Y., "Kabin Tipi Kurutucuda Soğanın (*Allium Cepa*) Kuruma Karakteristiklerinin Belirlenmesi", *3. Pamukkale Gıda Sempozyumu*, 163, (2015).

• Laz, C., Karahaner, H., **Seker, A.** ve Tepe, T.A., "Fümelenmiş Gökkuşğı Alabalığı Filetolarının Raf Ömrünün Doğal Müdahalelerle Uzatılması" Bursa 3. Uluslararası Gıda Kongresi, (2014).

• Çelik, İ., Tepe, T.A. ve **Seker, A.** “Ege Bölgesi Geleneksel Tatlıları”, Adana 4. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 240-243, (2014).

