

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

**PEYNİRLERDEN İZOLE EDİLEN PEPTİTLERİN ACE-İNHİBİTÖR VE  
ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİ ÜZERİNE KULLANILAN ENZİMİN VE  
SÜTE UYGULANAN İŞLEMLERİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Esra UĞUR**

**Danışman  
Prof. Dr. Zübeyde ÖNER**

**DOKTORA TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI  
ISPARTA - 2023**



© 2023 [Esra UĞUR]

## İÇİNDEKİLER

|                                                                       | Sayfa |
|-----------------------------------------------------------------------|-------|
| İÇİNDEKİLER.....                                                      | i     |
| ÖZET .....                                                            | iv    |
| ABSTRACT .....                                                        | vi    |
| TEŞEKKÜR.....                                                         | viii  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                 | ix    |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                               | xi    |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....                                   | xiv   |
| 1. GİRİŞ.....                                                         | 1     |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ .....                                              | 5     |
| 2.1. Peynirin Tanımı.....                                             | 5     |
| 2.1.1. Süt proteinleri.....                                           | 6     |
| 2.1.1.1. Kazein .....                                                 | 6     |
| 2.1.1.2. Serum proteinleri.....                                       | 8     |
| 2.2. Beyaz Peynir Yapımı.....                                         | 9     |
| 2.2.1. Sütü pıhtılaştırıcı enzimler .....                             | 10    |
| 2.2.2. Pastörize süttten peynir üretimi.....                          | 13    |
| 2.2.3. Ultrafiltrasyon tekniği ile peynir üretimi.....                | 15    |
| 2.3. Peynirde Olgunlaşma .....                                        | 18    |
| 2.3.1. Proteoliz.....                                                 | 19    |
| 2.4. Biyoaktif Peptitler .....                                        | 22    |
| 2.4.1. Antihipertansif (ACE-inhibitör) peptitler .....                | 24    |
| 2.4.2. Antioksidan peptitler .....                                    | 28    |
| 2.4.3. Biyoaktif peptitlerin <i>in vitro</i> olarak sindirilmesi..... | 32    |
| 2.5. Kütle Spektrometresi .....                                       | 35    |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM .....                                           | 40    |
| 3.1. Materyal .....                                                   | 40    |
| 3.1.1. Süt.....                                                       | 40    |
| 3.1.2. Starter kültür.....                                            | 40    |
| 3.1.3. Pıhtılaştırıcı enzim .....                                     | 40    |
| 3.2. Yöntem.....                                                      | 41    |
| 3.2.1. Peynir üretimi.....                                            | 41    |
| 3.2.1.1. UF süt kullanılarak yapılan Beyaz peynir üretimi.....        | 41    |
| 3.2.1.2. Pastörize süt kullanılarak yapılan Beyaz peynir üretimi..... | 42    |
| 3.2.2. Çiğ süte yapılan fizikokimyasal analizler .....                | 43    |
| 3.2.2.1. pH .....                                                     | 43    |
| 3.2.2.2. Titrasyon asitliği.....                                      | 43    |
| 3.2.2.3. Yağ tayini .....                                             | 44    |
| 3.2.2.4. Kurumadde tayini .....                                       | 44    |
| 3.2.2.5. Protein tayini .....                                         | 44    |
| 3.2.3. Peynir örneklerinde yapılan fizikokimyasal analizler .....     | 44    |
| 3.2.3.1. pH tayini.....                                               | 44    |
| 3.2.3.2. Titrasyon asitliği.....                                      | 45    |
| 3.2.3.4. Kurumadde tayini .....                                       | 45    |
| 3.2.3.5. Yağ tayini .....                                             | 45    |
| 3.2.3.6. Tuz tayini.....                                              | 46    |
| 3.2.3.7. Protein tayini .....                                         | 47    |

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.3.8. Peynirdeki azotlu madde fraksiyonlarının ayrılması.....                                                | 48 |
| 3.2.3.8.1. Suda çözünen azot (SÇA) tayini.....                                                                  | 48 |
| 3.2.3.8.2. %12 Trikloroasetik asitte (TCA) çözünen azot tayini .                                                | 49 |
| 3.2.3.8.3. %5 Fosfotungustik asitte (PTA) çözünen azot tayini...                                                | 49 |
| 3.2.4. Peynir örneklerinde yapılan mikrobiyolojik analizler.....                                                | 50 |
| 3.2.4.1. Toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayımı.....                                                    | 50 |
| 3.2.4.2. Koliform grubu bakteri sayımı.....                                                                     | 50 |
| 3.2.4.3. Laktobasil sayımı.....                                                                                 | 51 |
| 3.2.4.4. Laktokok sayımı.....                                                                                   | 51 |
| 3.2.5. Düşük molekül ağırlıklı peptitlerin (<3kDa) elde edilmesi.....                                           | 51 |
| 3.2.5.1. Suda çözünen ekstraktın hazırlanması.....                                                              | 51 |
| 3.2.5.2. Suda çözünen ekstraktlara ultrafiltrasyon işleminin uygulanması.....                                   | 52 |
| 3.2.6. Peynir örneklerinin <i>in vitro</i> gastrointestinal sindirimi .....                                     | 52 |
| 3.2.7. Peptitlerin Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC) ile tanımlanması .....          | 54 |
| 3.2.7.1. Suda çözünen (SÇE) ve <3kDa peptit ekstraktlarının RP-HPLC için hazırlanması .....                     | 54 |
| 3.2.7.2. Kimyasalların hazırlanması ve kromatografik koşullar .....                                             | 55 |
| 3.2.8. Peptit ekstraktlarının ve sindirim örneklerinin biyoaktivitelerinin belirlenmesi .....                   | 56 |
| 3.2.8.1. ACE-inhibitör aktivitenin belirlenmesi.....                                                            | 56 |
| 3.2.8.2. ABTS radikal giderme yöntemi ile antioksidan aktivitenin belirlenmesi .....                            | 57 |
| 3.2.8.3. DPPH serbest radikalleri giderme yöntemi ile antioksidan aktivitenin belirlenmesi .....                | 59 |
| 3.2.9. Toplam serbest amino asit miktarının belirlenmesi .....                                                  | 59 |
| 3.2.10. Ekstraktların ve sindirim örneklerinin protein miktarının belirlenmesi .....                            | 60 |
| 3.2.11. SDS poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) analizi .....                                             | 61 |
| 3.2.11.1. Peynir örneklerinin hazırlanışı ve kullanılan kimyasallar                                             | 61 |
| 3.2.11.2. Elektroforez yapılışı .....                                                                           | 62 |
| 3.2.12. MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi ile peptit analizi.....                                              | 63 |
| 3.2.13. Orbitrap Fusion Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi Nano LC-MS/MS yöntemi ile peptit analizi ..... | 64 |
| 3.3 İstatistiksel Değerlendirme .....                                                                           | 66 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....                                                                         | 67 |
| 4.1. Peynir Yapımında Kullanılan Çiğ Sütün Fizikokimyasal Değerleri ....                                        | 67 |
| 4.2. Peynir Örneklerinin Fizikokimyasal Analiz Sonuçları .....                                                  | 68 |
| 4.2.1. Kurumadde değerleri.....                                                                                 | 68 |
| 4.2.2. pH değerleri.....                                                                                        | 71 |
| 4.2.3. Titrasyon asitliği değerleri .....                                                                       | 73 |
| 4.2.4. Yağ ve kurumaddede yağ değerleri .....                                                                   | 75 |
| 4.2.5. Tuz ve kurumaddede tuz değerleri .....                                                                   | 79 |
| 4.2.6. Toplam protein ve kurumaddede protein değerleri.....                                                     | 83 |
| 4.3. Üretilen Peynirlerde Meydana Gelen Proteolizin Değerlendirilmesi                                           | 87 |
| 4.3.1. Azot fraksiyonları ve olgunlaşma indeksi değerleri .....                                                 | 87 |
| 4.3.1.1. Toplam azot oranları .....                                                                             | 87 |
| 4.3.1.2. SÇA değerleri.....                                                                                     | 89 |

|                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.3.1.3. %12 TCA'da çözünen azot değerleri.....                                                                 | 92  |
| 4.3.1.4. %5 PTA'da çözünen azot değerleri .....                                                                 | 96  |
| 4.3.1.5. SÇA'ya göre olgunlaşma indeksi.....                                                                    | 98  |
| 4.3.1.6. %12 TCA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi .....                                                 | 102 |
| 4.3.1.7. %5 PTA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi .....                                                  | 104 |
| 4.3.2. Toplam serbest amino asit miktarı.....                                                                   | 106 |
| 4.3.3. SDS-PAGE jel elektroforez sonuçları.....                                                                 | 109 |
| 4.3.4. Peynirlerde RP-HPLC ile belirlenen peptit profilleri.....                                                | 113 |
| 4.3.4.1. SÇE örneklerinin RP-HPLC kromatogramı.....                                                             | 113 |
| 4.3.4.3. <3kDa peptit ekstraktlarının RP-HPLC kromatogramı .....                                                | 121 |
| 4.3.5. Peptit ekstraktlarının protein değerine ait sonuçlar.....                                                | 127 |
| 4.4. Peynir Örneklerinin Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları .....                                                  | 133 |
| 4.4.1. Toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayısı.....                                                      | 133 |
| 4.4.2. Koliform grubu bakteri sayısı.....                                                                       | 135 |
| 4.4.3. Laktik asit bakterileri (LAB) sayımı .....                                                               | 137 |
| 4.5. SÇE Örneklerinin Biyoaktif Özelliklerine Ait Sonuçlar.....                                                 | 141 |
| 4.5.1. SÇE örneklerinin ACE-inhibitör aktivitesi .....                                                          | 141 |
| 4.5.2. SÇE örneklerinin DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesi.....                                            | 145 |
| 4.5.3. SÇE örneklerinin ABTS yöntemi ile antioksidan aktivitesi .....                                           | 149 |
| 4.5.4. SÇE örneklerinin TEAC antioksidan aktivitesi.....                                                        | 154 |
| 4.6. <3kDa Örneklerinin Biyoaktif Özelliklerine Ait Sonuçlar .....                                              | 157 |
| 4.6.1. <3kDa örneklerinin ACE-inhibitör aktivitesi.....                                                         | 157 |
| 4.6.1.1. <3kDa örneklerinin fraksiyonlarına ait ACE-inhibitör aktivitesi<br>sonuçları.....                      | 161 |
| 4.6.2. <3kDa örneklerinin DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesi ....                                          | 164 |
| 4.6.3. <3kDa örneklerinin ABTS yöntemi ile antioksidan aktivitesi.....                                          | 168 |
| 4.6.4. <3kDa örneklerinin TEAC antioksidan aktivitesi.....                                                      | 173 |
| 4.7. <i>in vitro</i> Sindirim Örneklerine Ait Sonuçlar .....                                                    | 176 |
| 4.7.1. Sindirim örneklerinin protein değeri .....                                                               | 176 |
| 4.7.2. Sindirim örneklerinin ACE-inhibitör aktivitesi .....                                                     | 179 |
| 4.7.3. Sindirim örneklerinin DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesi                                            | 182 |
| 4.7.4. Sindirim örneklerinin ABTS yöntemi ile antioksidan aktivitesi.                                           | 185 |
| 4.7.5. Sindirim örneklerinin TEAC antioksidan aktivitesi .....                                                  | 190 |
| 4.8. Fraksiyonların MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi Yöntemi İle<br>Peptit Analizi .....                      | 192 |
| 4.9. Orbitrap Fusion Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi Nano<br>LC-MS/MS Yöntemi İle Peptit Analizi ..... | 199 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....                                                                                       | 207 |
| KAYNAKLAR .....                                                                                                 | 214 |
| EKLER.....                                                                                                      | 248 |
| EK A. Besiyerlerinin Hazırlanması .....                                                                         | 248 |
| EK B. Çözeltilerin Hazırlanması.....                                                                            | 249 |
| EK C. Çizelge .....                                                                                             | 252 |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                                                                                   | 260 |

## ÖZET

### Doktora Tezi

#### PEYNİRLERDEN İZOLE EDİLEN PEPTİTLERİN ACE-İNHİBİTÖR VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİ ÜZERİNE KULLANILAN ENZİMİN VE SÜTE UYGULANAN İŞLEMLERİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Esra UĞUR

Süleyman Demirel Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zübeyde ÖNER

Süt ve süt ürünleri, biyoaktif peptitlerin en iyi kaynaklarından birisi olarak bilinmektedir. Özellikle peynirlerde, olgunlaşma süresince kullanılan pıhtılaştırıcı enzimin özelliği ve peynir sütüne uygulanan işlemler sonucunda açığa çıkan biyoaktif peptit profili farklılık göstermektedir. Bu çalışmada ultrafiltrasyon (UF) ve pastörizasyon olmak üzere iki farklı proses uygulanmış sütlerin iki farklı kaynaktan elde edilen pıhtılaştırıcı enzim (mikrobiyal ve şirden) ile pıhtılaştırılması yoluyla üretilen Beyaz peynirlerin olgunlaşma sürecine ve açığa çıkan peptitlerin biyoaktif özelliklerine olan etkisi bu çalışmada birlikte değerlendirilmiştir. Peynirlerin üretimi; UF süt+mikrobiyal enzim (M-UF), UF süt+şirden mayası (Ş-UF), pastörize süt+mikrobiyal rennet (M-PAS) ve pastörize süt+şirden mayası (Ş-PAS) olmak üzere 4 farklı grupta gerçekleştirilmiş ve üretilen peynirler 4°C'de 90 günlük olgunlaşmaya bırakılmıştır.

Olgunlaşma süresi boyunca peynirlerin kurumadde (KM), titrasyon asitliği, yağ, tuz, toplam protein ve azot ile KM'de protein değerlerinin pastörize süttten üretilen peynirlerde daha yüksek olduğu ve bu sonuçlar üzerinde süttün proses farklılığı ile depolamanın önemli düzeyde etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuca benzer olarak, proteoliz nedeniyle peynirlerde olgunlaşma süresince artış gösteren suda çözünen azot (SÇA) ve SÇA'ya göre olgunlaşma indeksi ile %12 trikloroasetik asitte (TCA) çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerlerinde süttün proses farklılığı ile depolamanın etkisi önemli bulunmuştur. Toplam serbest amino asit, %12 TCA'da çözünen azot, %5 PTA'da çözünen azot ve %5 PTA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerlerinde ise depolama ve süttün proses farklılığı ile birlikte enzim farklılığının da etkisinin önemli düzeyde olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ).

SDS-PAGE jel görüntüsünde olgunlaşmanın sonunda kazein bant yoğunluklarında gözlenen azalışların, UF süttten yapılan peynirlerde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte toplam serbest amino asit ile <3kDa peptit ekstraktlarının protein değerlerindeki artışın bu peynirlerde daha fazla olduğu gözlenmiştir. Peynirlerin RP-HPLC pikleri incelendiğinde, olgunlaşma

süresinin sonunda mikrobiyal enzimin UF sütte, şirden mayasının ise pastörize sütte hem SÇE hem <3kDa peptitlere ait pikleri arttırdığı belirlenmiştir (p<0,05).

Olgunlaşma sonunda hem SÇE hem <3kDa peptitlerin ACE-inhibisyonundaki artışın, en az Ş-UF peynirinde olduğu gözlenmiştir (p<0,05). Olgunlaşma süresi boyunca <3kDa peptit ekstratlarına ait ACE-inhibitör aktivite, ABTS ve TEAC antioksidan aktivite sonuçlarının SÇE örneklerine göre daha yüksek olduğu belirlenirken, DPPH antioksidan aktivite sonuçlarının ise SÇE örneklerinde daha yüksek olduğu görülmüştür. Depolama süresi ile birlikte sütün prosesi ve enzimin farklılığının SÇE ve <3kDa peptitlerin ACE-inhibitör ve ABTS antioksidan aktivitesinde önemli etki gösterdiği belirlenmiştir (p<0,05). Fraksiyonların ACE-inhibitör aktivitelerinin %6,4–68,9 arasında değiştiği ve <3kDa ekstraktların sonuçlarına göre daha düşük olduğu gözlenmiştir.

Peynirlerin *in vitro* sindirim sonuçlarında olgunlaşma süresi boyunca, tüm peynirlerin gastrik sindiriminin ardından intestinal sindirime ait İÇ fazında ACE-inhibisyonunun düşüş gösterdiği, ABTS ve TEAC antioksidan aktivite sonuçlarının ise artış gösterdiği belirlenmiştir. Depolama ve enzim farklılığının tüm sindirim fazlarının ACE-inhibisyonunu etkilediği, sütün prosesinin ise yalnızca intestinal fazlar üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Sindirim fazlarının hem ABTS hem TEAC antioksidan aktivitesi üzerinde sütün prosesinin tüm sindirim fazlarında, enzim farklılığının SS ve DIŞ fazlarında, depolamanın ise yalnızca DIŞ fazda önemli düzeyde etki gösterdiği belirlenmiştir. DPPH antioksidan aktivitesinde ise sütün prosesinin SS ve DIŞ faza etki ettiği, İÇ fazında ise varyasyon kaynaklarının etkisinin olmadığı görülmüştür (p<0,05).

MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi sonuçlarında, M-UF ve M-PAS peynirlerine ait <3kDa fraksiyonlardan ACE-inhibisyonu yüksek iki fraksiyonun birbirine benzer peptit profili gösterdiği, M-PAS peynirinden elde edilen bir diğer fraksiyonun farklı peptit profili ve daha düşük ACE-inhibisyonu sergilediği belirlenmiştir. Orbitrap Fusion Yüksek Çözünürlüklü Nano LC-MS/MS analizi sonuçları incelendiğinde, toplam peptit sayısı ile  $\beta$ -kazein ve  $\alpha_{s1}$ -kazein türevli peptitlerin sayısının en fazla Ş-PAS peynirinde olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, M-UF ve M-PAS peynirlerinde tanımlanan peptitlerin sayısının ve profilinin birbirine benzediği anlaşılmıştır. Bu çalışma sonucunda, şirden enziminin pastörize sütte oluşan <3kDa peptitlerin sayısı ve ACE-inhibitör aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir. UF sütte şirden mayasının daha fazla proteolitik etki gösterdiği belirlenirken, TEAC ve DPPH antioksidan aktivitesinin artışında etkili olduğu görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Beyaz peynir, Proteoliz, Biyoaktif peptit, *in vitro* sindirim, Peptit tanımlama

**2023, 260 sayfa**

## **ABSTRACT**

**Ph.D. Thesis**

### **DETERMINATION OF EFFECT OF COAGULATING ENZYME AND DAIRY PROCESSING ON ACE-INHIBITOR AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PEPTIDES ISOLATED FROM CHEESE**

**Esra UĞUR**

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

**Supervisor: Prof. Dr. Zübeyde ÖNER**

Milk and dairy products are known as one of the best sources of bioactive peptides. In particular, the characteristics of the coagulating enzyme used during the ripening process of cheeses, as well as the processes applied to cheese milk, result in variations in the profile of bioactive peptides released. In this study, producing Beyaz cheese by the two different processes, ultrafiltration (UF) and pasteurization, and by coagulating with coagulating enzymes obtained from two different sources (microbial and animal-sourced) were evaluated together in Beyaz cheese on the ripening process and the bioactive properties of the peptides. Production of cheeses; UF milk and microbial enzyme (M-UF), UF milk and animal-sourced enzyme (Ş-UF), pasteurized milk and microbial enzyme (M-PAS), pasteurized milk and animal-sourced enzyme (Ş-PAS) were carried out in 4 different groups and these cheeses left to mature for 90 days at 4°C.

During the ripening period, it was determined that the dry matter, titratable acidity, fat, salt, total protein, total nitrogen, protein in dry matter content were higher in the cheese produced from pasteurized milk, and it was found that milk processing and storage significantly affected these results. Similarly, the effect of milk processing and storage on water-soluble nitrogen (WSN), ripening index relative to WSN, ripening index nitrogen soluble in 12% trichloroacetic acid (TCA) values was found to be significant due to proteolysis in cheese the ripening period during. Additionally, it was observed that the effect of storage and milk processing differences, as well as enzyme differences, was significant on the nitrogen soluble in 5% phosphotungstic acid (PTA), the ripening index relative to nitrogen soluble in 5% PTA, nitrogen soluble in 12% TCA, and total free amino acids ( $p<0,05$ ).

In SDS-PAGE gel images, it has been observed that the decrease in the density of the casein bands at the end of ripening is higher in cheese made from UF milk. However, it has been determined that the increase in total free amino acid and <3kDa peptide extracts in protein values is higher in these cheeses. In the RP-HPLC peaks of the cheeses, it was determined that the microbial enzyme in UF

milk and the rennet enzyme in pasteurized milk increased the peaks belonging to both WSE and <3kDa peptides at the end of the ripening period ( $p<0,05$ ).

It was observed that the increase in ACE inhibition of both WSE and <3kDa peptides at the end of ripening is the lowest in the Ş-UF cheese ( $p<0,05$ ). During the ripening period, it was determined that ACE inhibitor activity, ABTS and TEAC antioxidant activity results belonging to <3kDa peptide extracts were higher than WSE samples, while DPPH antioxidant activity results were higher in WSE samples. It has been determined that the process of milk and the difference in enzyme, as well as storage time, have significant effects on ACE inhibitor and ABTS antioxidant activity of WSE and <3kDa peptides ( $p<0,05$ ). It was observed that the ACE inhibitor activities of the fractions varied between 6.4-68.9% and were lower than the results of <3kDa extracts.

During the ripening period, it has been determined that all cheeses show a decrease in ACE-inhibition in the İÇ phase of intestinal digestion after gastric digestion in *in vitro* digestion results, while an increase has been observed in ABTS and TEAC antioxidant activity results. It was determined that storage and enzyme differences affected ACE inhibition of all digestion phases, and the milk process only affected the intestinal phases. It was determined that the milk process had a significant effect on both ABTS and TEAC antioxidant activities in all digestion phases, while the enzyme difference had an effect in SS and DIŞ phases, and storage had a significant effect only in DIŞ phase. On the DPPH antioxidant activity, it was observed that the process of milk had an effect on the SS and DIŞ phases, while the sources of variation had no effect on the İÇ phase ( $p<0,05$ ).

In MALDI-TOF/TOF mass spectrometry results, it has been determined that two high ACE-inhibition fractions from <3kDa fractions of M-UF and M-PAS cheeses showed similar peptide profiles, while another fraction obtained from M-PAS cheese exhibited a different peptide profile and lower ACE-inhibition. According to the results of the Orbitrap Fusion High-Resolution Nano LC-MS/MS analysis, it was observed that the total peptide count and the count of peptides derived from  $\beta$ -casein and  $\alpha_{S1}$ -casein were highest in Ş-PAS cheese. Additionally, it was observed that the number and profile of identified peptides in M-UF and M-PAS cheeses were similar to each other. In this study, it was observed that the animal-sourced enzyme increased the number of <3kDa peptides and ACE-inhibitory activity in pasteurized milk. It was determined that the animal-sourced enzyme exhibited a greater proteolytic effect in UF milk, while it was found to be effective in increasing TEAC and DPPH antioxidant activities.

**Keywords:** Beyaz cheese, UF milk, Enzyme, Proteolysis, Bioactive peptide, *in vitro* digestion, Peptide identification

**2023, 260 pages**

## TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın seçilmesinde, yürütülmesinde ve hazırlanmasında bilgisi, tecürbesi ve ilgisiyle her daim bana yol gösteren, bütün lisans ve lisansüstü eğitim hayatım boyunca desteğini benden bir an olsun esirgemeyen, kendisinden her an yeni bir şeyler öğrenerek engin tecrübelerinden yararlanma fırsatım olduğu için kendimi çok şanslı hissettiğim, her kelimesinin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım çok kıymetli Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Zübeyde ÖNER 'e,

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, bana engin bilgileri ile sürekli yol gösteren, desteklerini her zaman hissettiğim çok değerli Hocalarım Sayın Prof. Dr. Aynur Gül KARAHAN ÇAKMAKÇI ve Sayın Prof. Dr. Gülten BAŞYİĞİT KILIÇ'a,

Tez çalışmamda bana yardımlarını ve ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgisi ve deneyimlerinden yararlandığım çok değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Hakan KULEAŞAN'a,

Verilerimin istatistiksel olarak değerlendirme aşamasında bana bilgi ve tecrübeleri ile yol gösteren Sayın Doç. Dr. Erkan KARACABEY'e,

FDK-2020-8137 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na,

Tez çalışmamda bana tanıdıkları olanaklardan dolayı Cebeci Süt Ürünleri Şirketi'ne, dönemin Fabrika Müdürü Sn. İsmail ÇETİN'e, tezimin süt temini ve peynir üretimi çalışmalarındaki katkılarından dolayı Sn. Kadir KIRATLI'ya,

Çalışmamda ve doktora eğitim sürecimdeki tüm yardımları ve destekleri için Sn. Beste FIRINCIOĞULLARI, Sn. Sinan AKBAL, Sn. Pelin ERTÜRKMEN, Sn. Emel SAYIN, Sn. Oğuzhan GEDİK ve Sn. Mehmet GÜNDOĞDU'ya,

Doktora eğitimim boyunca bana olan desteklerini bir an olsun eksik etmeyen, desteğine ve dostluğuna her zaman minnettar olacağım çok değerli dostlarım Sn. Aylin KORKUT ALTINTAŞ, Sn. Merve SAVICI ve Sn. Çağlar GÖKIRMAKLI'ya

Doktoramın tüm zorlu sürecinde ilgisini ve desteğini her daim yürekten hissettiğim, beni her daim cesaretlendiren, gerektiğinde benimle birlikte çalışıp bana yardımcı olmaya gayret gösteren kıymetli Sn. Ahmet Ali GEÇER'e,

Bütün hayatım boyunca her koşul ve zorlukta yanımda olan, beni her durumda yüreklendirip arkamda duran, akademik eğitim hayatım boyunca gösterdiği ilgi, destek, sabır, anlayış ve özveri için minnettar olduğum çok sevgili canım Annem'e ve canım Babam'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Esra UĞUR  
ISPARTA, 2023

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                 | Sayfa |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 2.1. Peynir olgunlaşması sırasında proteolize uğrayan kazeinlerin parçalanması.....       | 20    |
| Şekil 2.2. Kütle spektrometresi analizinin şekilsel gösterimi.....                              | 36    |
| Şekil 3.1. UF süttten yapılan Beyaz peynir üretim akış şeması.....                              | 42    |
| Şekil 3.2. Pastörize süttten yapılan Beyaz peynir üretiminin iş akış şeması .                   | 43    |
| Şekil 3.3. Troloks standart eğrisi .....                                                        | 58    |
| Şekil 3.4. Lösin standart eğrisi.....                                                           | 60    |
| Şekil 3.5. BSA protein standart eğrisi .....                                                    | 61    |
| Şekil 4.1. Olgunlaşma süresi boyunca kurumadde miktarının değişimi.....                         | 69    |
| Şekil 4.2. Olgunlaşma süresi boyunca pH değerinin değişimi.....                                 | 72    |
| Şekil 4.3. Olgunlaşma süresi boyunca titrasyon asitliğinin değişimi.....                        | 74    |
| Şekil 4.4. Olgunlaşma süresi boyunca yağ miktarının değişimi.....                               | 76    |
| Şekil 4.5. Olgunlaşma süresi boyunca kurumaddede yağ miktarının değişimi                        | 77    |
| Şekil 4.6. Olgunlaşma süresi boyunca tuz miktarının değişimi .....                              | 80    |
| Şekil 4.7. Olgunlaşma süresi boyunca kurumaddede tuz miktarının değişimi                        | 81    |
| Şekil 4.8. Olgunlaşma süresi boyunca toplam protein miktarının değişimi .                       | 83    |
| Şekil 4.9. Olgunlaşma süresi boyunca kurumaddede protein miktarındaki değişim.....              | 85    |
| Şekil 4.10. Olgunlaşma süresi boyunca toplam azot miktarının değişimi .....                     | 88    |
| Şekil 4.11. Olgunlaşma süresi boyunca SÇA miktarının değişimi .....                             | 90    |
| Şekil 4.12. Olgunlaşma süresi boyunca %12 TCA'da çözünen azot miktarının değişimi.....          | 94    |
| Şekil 4.13. Olgunlaşma süresi boyunca %5 PTA'da çözünen azot miktarının değişimi.....           | 97    |
| Şekil 4.14. SÇA'ya göre olgunlaşma indeksi değerlerinin değişimi .....                          | 99    |
| Şekil 4.15. %12 TCA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerlerinin değişimi.....         | 103   |
| Şekil 4.16. %5 PTA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerlerinin değişimi.....          | 105   |
| Şekil 4.17. Olgunlaşma süresi boyunca toplam serbest amino asit miktarının değişimi.....        | 107   |
| Şekil 4.18. Peynir örneklerine ait SDS-PAGE elektroforegramları .....                           | 110   |
| Şekil 4.19. Peynirlerin SÇE örneklerinin 1. gün kromatogramları .....                           | 116   |
| Şekil 4.20. Peynirlerin SÇE örneklerinin 30. gün kromatogramları .....                          | 116   |
| Şekil 4.21. Peynirlerin SÇE örneklerinin 60. gün kromatogramları .....                          | 116   |
| Şekil 4.22. Peynirlerin SÇE örneklerinin 90. gün kromatogramları .....                          | 117   |
| Şekil 4.23. M-UF peynirinin SÇE örneğinin olgunlaşma boyunca belirlenen kromatogramları .....   | 117   |
| Şekil 4.24. Ş-UF peynirinin SÇE örneğinin olgunlaşma boyunca belirlenen kromatogramları .....   | 117   |
| Şekil 4.25. M-PAS peynirinin SÇE örneğinin olgunlaşma boyunca belirlenen kromatogramları .....  | 118   |
| Şekil 4.26. Ş-PAS peynirinin SÇE örneğinin olgunlaşma boyunca belirlenen kromatogramları .....  | 118   |
| Şekil 4.27. Peynirlerin <3kDa peptit ekstraktlarının 30. günde belirlenen kromatogramları ..... | 123   |

|                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 4.28. Peynirlerin <3kDa peptit ekstraktlarının 90. günde belirlenen kromatogramları .....                 | 124 |
| Şekil 4.29. M-UF peynirinin <3kDa peptit ekstraktlarının 30. gün ve 90. günde belirlenen kromatogramları .....  | 124 |
| Şekil 4.30. Ş-UF peynirinin <3kDa peptit ekstraktlarının 30. gün ve 90. günde belirlenen kromatogramları .....  | 124 |
| Şekil 4.31. M-PAS peynirinin <3kDa peptit ekstraktlarının 30. gün ve 90. günde belirlenen kromatogramları ..... | 125 |
| Şekil 4.32. Ş-PAS peynirinin <3kDa peptit ekstraktlarının 30. gün ve 90. günde belirlenen kromatogramları ..... | 125 |
| Şekil 4.33. SÇE örneklerine ait protein değerinin değişimi.....                                                 | 128 |
| Şekil 4.34. <3kDa peptit ekstraktlarına ait protein değerinin değişimi .....                                    | 130 |
| Şekil 4.35. Olgunlaşma süresince TMAB sayısının değişimi .....                                                  | 133 |
| Şekil 4.36. Olgunlaşma süresince koliform grubu bakteri sayısının değişimi                                      | 136 |
| Şekil 4.37. Olgunlaşma süresince laktobasil sayısının değişimi .....                                            | 137 |
| Şekil 4.38. Olgunlaşma süresince laktokok sayısının değişimi .....                                              | 139 |
| Şekil 4.39. SÇE örneklerinin ACE-inhibitör aktivitesinin değişimi.....                                          | 142 |
| Şekil 4.40. SÇE örneklerinin DPPH antioksidan aktivitesinin değişimi.....                                       | 146 |
| Şekil 4.41. SÇE örneklerinin ABTS antioksidan aktivitesinin değişimi.....                                       | 151 |
| Şekil 4.42. SÇE örneklerinin TEAC değerinin değişimi .....                                                      | 155 |
| Şekil 4.43. <3kDa örneklerinin ACE-inhibitör aktivitesinin değişimi .....                                       | 158 |
| Şekil 4.44. <3kDa örneklerinin DPPH antioksidan aktivitesinin değişimi ....                                     | 165 |
| Şekil 4.45. <3kDa örneklerinin ABTS antioksidan aktivitesinin değişimi ....                                     | 170 |
| Şekil 4.46. <3kDa örneklerinin TEAC değerinin değişimi.....                                                     | 174 |
| Şekil 4.47. Sindirim fazlarının protein değerlerinin değişimi .....                                             | 177 |
| Şekil 4.48. Sindirim fazlarının ACE-inhibitör aktivitesinin değişimi.....                                       | 180 |
| Şekil 4.49. Sindirim fazlarının DPPH antioksidan aktivitesinin değişimi .....                                   | 183 |
| Şekil 4.50. Sindirim fazlarının ABTS antioksidan aktivitesinin değişimi.....                                    | 187 |
| Şekil 4.51. Sindirim örneklerinin TEAC antioksidan aktivite değerlerinin değişimi.....                          | 191 |
| Şekil 4.52. M-UF F9. fraksiyonun kütle spektrum görüntüsü.....                                                  | 193 |
| Şekil 4.53. Ş-UF F9. fraksiyonun kütle spektrum görüntüsü .....                                                 | 194 |
| Şekil 4.54. M-PAS F9. fraksiyonun kütle spektrum görüntüsü .....                                                | 195 |
| Şekil 4.55. M-PAS F10. fraksiyonun kütle spektrum görüntüsü.....                                                | 196 |
| Şekil 4.56. <3kDa ekstraktlarına ait peptitlerin dağılımı .....                                                 | 200 |
| Şekil 4.57. LQYLYQGPIVLNPWDQVKR olarak tanımlanan sekans için MASCOT tarama sonuçları.....                      | 204 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                    | Sayfa |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 3.1. Denemede üretilen Beyaz peynirlerin üretim farklılıkları .....                                        | 41    |
| Çizelge 3.2. RP-HPLC cihazının özellikleri ve kromatografik koşullar.....                                          | 55    |
| Çizelge 3.3. SDS-PAGE alt ve üst jel içerikleri .....                                                              | 62    |
| Çizelge 3.4. MASCOT taramasında belirlenen parametreler.....                                                       | 65    |
| Çizelge 3.5. Analiz kapsamında kullanılan cihaz ve özellikleri .....                                               | 66    |
| Çizelge 4.1. Çiğ inek sütünün bileşimi .....                                                                       | 67    |
| Çizelge 4.2. Peynir örneklerine ait kurumadde değerleri (%).....                                                   | 68    |
| Çizelge 4.3. Kurumadde değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları .....                                           | 68    |
| Çizelge 4.4. Peynir örneklerine ait pH değerleri.....                                                              | 71    |
| Çizelge 4.5. pH değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları .....                                                  | 71    |
| Çizelge 4.6. Peynir örneklerine ait titrasyon asitliği (SH) değerleri .....                                        | 74    |
| Çizelge 4.7. Titrasyon asitliği değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları.....                                   | 74    |
| Çizelge 4.8. Peynir örneklerine ait yağ değerleri (%).....                                                         | 76    |
| Çizelge 4.9. Yağ değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları.....                                                  | 76    |
| Çizelge 4.10. Peynir örneklerine ait kurumaddede yağ değerleri (%) .....                                           | 77    |
| Çizelge 4.11. Kurumaddede yağ değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları ..                                       | 77    |
| Çizelge 4.12. Peynir örneklerine ait tuz değerleri (%).....                                                        | 79    |
| Çizelge 4.13. Tuz değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları .....                                                | 79    |
| Çizelge 4.14. Peynir örneklerine ait kurumaddede tuz değerleri (%) .....                                           | 80    |
| Çizelge 4.15. Kurumaddede tuz değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları..                                        | 80    |
| Çizelge 4.16. Peynir örneklerine ait toplam protein değerleri (%).....                                             | 83    |
| Çizelge 4.17. Toplam protein değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları.....                                      | 83    |
| Çizelge 4.18. Peynir örneklerine ait kurumaddede protein değerleri (%) ...                                         | 84    |
| Çizelge 4.19. Kurumaddede protein değerlerinin istatistiksel analiz<br>sonuçları .....                             | 85    |
| Çizelge 4.20. Peynir örneklerine ait toplam azot değerleri (%) .....                                               | 88    |
| Çizelge 4.21. Toplam azot değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları .....                                        | 88    |
| Çizelge 4.22. Peynir örneklerinin SÇA değerleri (%).....                                                           | 90    |
| Çizelge 4.23. SÇA değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları .....                                                | 90    |
| Çizelge 4.24. Peynir örneklerinin %12 TCA'da çözünen azot değerleri(%).                                            | 93    |
| Çizelge 4.25. %12 TCA'da çözünen azot değerlerinin istatistiksel analiz<br>sonuçları.....                          | 93    |
| Çizelge 4.26. Peynir örneklerinin %5 PTA'da çözünen azot değerleri(%)....                                          | 96    |
| Çizelge 4.27. %5 PTA'da çözünen azot değerlerinin istatistiksel analiz<br>sonuçları.....                           | 97    |
| Çizelge 4.28. Peynir örneklerinin SÇA'ya göre olgunlaşma indeksi<br>değerleri.....                                 | 99    |
| Çizelge 4.29. SÇA'ya göre olgunlaşma indeksi değerlerinin istatistiksel<br>analiz sonuçları .....                  | 99    |
| Çizelge 4.30. %12 TCA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi<br>değerleri(%) .....                               | 102   |
| Çizelge 4.31. %12 TCA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi<br>değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları..... | 102   |
| Çizelge 4.32. %5 PTA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi<br>değerleri(%) .....                                | 104   |

|                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Çizelge 4.33. %5 PTA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları ..... | 104 |
| Çizelge 4.34. Toplam serbest amino asit değerleri (mg Leu/g peynir) .....                                       | 106 |
| Çizelge 4.35. Toplam serbest amino asit değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları .....                       | 107 |
| Çizelge 4.36. SÇE örneklerine ait hidrofilik ve hidrofobik alanlardaki %değişim sonuçları.....                  | 114 |
| Çizelge 4.37. SÇE örneklerine ait RP-HPLC kromatogramının istatistiksel analiz sonuçları .....                  | 115 |
| Çizelge 4.38. <3kDa peptit ekstraktlarına ait hidrofilik ve hidrofoik alanlardaki %değişim sonuçları .....      | 122 |
| Çizelge 4.39. <3kDa peptit ekstraktlarına ait RP-HPLC kromatogramının istatistiksel analiz sonuçları .....      | 123 |
| Çizelge 4.40. SÇE örneklerine ait protein içeriği (mg/mL) .....                                                 | 127 |
| Çizelge 4.41. SÇE örneklerine ait protein değerinin istatistiksel analiz sonuçları .....                        | 128 |
| Çizelge 4.42. <3kDa peptit ekstraktlarına ait protein değeri (mg/mL).....                                       | 129 |
| Çizelge 4.43. <3kDa peptit ekstraktlarına ait protein değerinin istatistiksel analiz sonuçları .....            | 129 |
| Çizelge 4.44. Peynir örneklerinin TMAB sayısı (log <sub>10</sub> KOB/ g) .....                                  | 133 |
| Çizelge 4.45. TMAB sayısının istatistiksel analiz sonuçları .....                                               | 133 |
| Çizelge 4.46. Koliform grubu bakteri sayısı (log <sub>10</sub> KOB/ g) .....                                    | 135 |
| Çizelge 4.47. Koliform grubu bakteri sayısının istatistiksel analizi .....                                      | 135 |
| Çizelge 4.48. Peynir örneklerinin laktobasil sayısı (log <sub>10</sub> KOB/ g).....                             | 137 |
| Çizelge 4.49. Laktobasil sayısının istatistiksel analiz sonuçları .....                                         | 137 |
| Çizelge 4.50. Peynir örneklerinin laktokok sayısı (log <sub>10</sub> KOB/ g).....                               | 138 |
| Çizelge 4.51. Laktokok sayısının istatistiksel analiz sonuçları .....                                           | 138 |
| Çizelge 4.52. SÇE örneklerine ait ACE-inhibitör aktivite değerleri (%) .....                                    | 141 |
| Çizelge 4.53. SÇE örneklerine ait ACE-inhibitör aktivite değerlerinin istatistiksel analizi.....                | 142 |
| Çizelge 4.54. SÇE örneklerine ait DPPH antioksidan aktivite değerleri (%)                                       | 145 |
| Çizelge 4.55. SÇE örneklerine ait DPPH antioksidan aktivite değerlerinin istatistiksel analizi.....             | 146 |
| Çizelge 4.56. SÇE örneklerine ait ABTS antioksidan aktivite değerleri (%).                                      | 150 |
| Çizelge 4.57. SÇE örneklerine ait ABTS antioksidan aktivite değerlerinin istatistiksel analizi.....             | 150 |
| Çizelge 4.58. SÇE örneklerine ait TEAC değerleri (μM TEAC/mg örnek) .....                                       | 154 |
| Çizelge 4.59. SÇE örneklerine TEAC değerlerinin istatistiksel analizi .....                                     | 154 |
| Çizelge 4.60. <3kDa örneklerine ait ACE-inhibitör aktivite değerleri (%)....                                    | 157 |
| Çizelge 4.61. <3kDa örneklerine ait ACE-inhibitör aktivite değerlerinin istatistiksel analizi.....              | 158 |
| Çizelge 4.62. RP-HPLC ile toplanan fraksiyonların ACE-inhibitör aktivite değerleri (%) .....                    | 162 |
| Çizelge 4.63. <3kDa örneklerine ait DPPH antioksidan aktivite değeri (%)                                        | 164 |
| Çizelge 4.64. <3kDa örneklerine ait DPPH antioksidan aktivite değerlerinin istatistiksel analizi .....          | 165 |
| Çizelge 4.65. <3kDa örneklerine ait ABTS antioksidan aktivite değeri (%).                                       | 169 |
| Çizelge 4.66. <3kDa örneklerine ait ABTS antioksidan aktivite değerlerinin istatistiksel analizi .....          | 169 |

|                                                                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Çizelge 4.67. <3kDa örneklerine ait TEAC değerleri ( $\mu\text{M}$ TEAC/mg örnek).                                                   | 173 |
| Çizelge 4.68. <3kDa örneklerine ait TEAC değerlerinin istatistiksel analizi                                                          | 173 |
| Çizelge 4.69. 30. gün sindirim fazlarının protein değerleri (mg/mL).....                                                             | 176 |
| Çizelge 4.70. 90. gün sindirim fazlarının protein değerleri (mg/mL).....                                                             | 177 |
| Çizelge 4.71. Sindirim fazlarının protein değerlerinin istatistiksel analizi .                                                       | 177 |
| Çizelge 4.72. 30. gün sindirim fazlarının ACE-inhibitör aktivitesi(%).....                                                           | 179 |
| Çizelge 4.73. 90. gün sindirim fazlarının ACE-inhibitör aktivitesi (%).....                                                          | 179 |
| Çizelge 4.74. Sindirim fazlarının ACE-inhibitör aktivitesinin istatistiksel analizi.....                                             | 180 |
| Çizelge 4.75. 30. gün sindirim fazlarının DPPH antioksidan aktivitesi (%)..                                                          | 183 |
| Çizelge 4.76. 90. gün sindirim fazlarının DPPH antioksidan aktivitesi (%)..                                                          | 183 |
| Çizelge 4.77. Sindirim fazlarının DPPH antioksidan aktivitesinin istatistiksel analizi.....                                          | 183 |
| Çizelge 4.78. 30. gün sindirim fazlarının ABTS antioksidan aktivitesi (%)...                                                         | 186 |
| Çizelge 4.79. 90. gün sindirim fazlarının ABTS antioksidan aktivitesi (%) ..                                                         | 186 |
| Çizelge 4.80. Sindirim fazlarının ABTS antioksidan aktivitesinin istatistiksel analizi .....                                         | 187 |
| Çizelge 4.81. 30. gün sindirim fazlarının TEAC değeri ( $\mu\text{M}$ TEAC/mg örnek) .....                                           | 190 |
| Çizelge 4.82. 90. gün sindirim fazlarının TEAC değeri ( $\mu\text{M}$ TEAC/mg örnek) .....                                           | 190 |
| Çizelge 4.83. Sindirim fazlarının TEAC değerlerinin istatistiksel analizi.....                                                       | 190 |
| Çizelge 4.84. M-UF F9. fraksiyonun MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi sonuçları .....                                                | 193 |
| Çizelge 4.85. Ş-UF F9. fraksiyonun MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi sonuçları .....                                                | 194 |
| Çizelge 4.86. M-PAS F9. fraksiyonun MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi sonuçları .....                                               | 194 |
| Çizelge 4.87. M-PAS F10. fraksiyonun MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi sonuçları .....                                              | 195 |
| Çizelge 5.1. Peptitlerin biyoaktivitesi sonuçları üzerinde varyasyon kaynaklarının etkisi ve olgunlaşma sonundaki farklılıkları..... | 210 |
| Çizelge C.1. Amino asitlerin isimlerinin kısaltılması.....                                                                           | 252 |
| Çizelge C.2. M-UF peynirinin 90. gün <3kDa peptit ekstraktına ait tanımlanmış peptitler .....                                        | 253 |
| Çizelge C.3. M-PAS peynirinin 90. gün <3kDa peptit ekstraktına ait tanımlanmış peptitler .....                                       | 255 |
| Çizelge C.4. Ş-PAS peynirinin 90. gün <3kDa peptit ekstraktına ait tanımlanmış peptitler .....                                       | 257 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                                 |                                                     |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------|
| ABTS                            | 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) |
| ACE                             | Angiotensin-I Dönüştürücü Enzim                     |
| AgNO <sub>3</sub>               | Gümüş Nitrat                                        |
| ANOVA                           | Varyans Analizi                                     |
| APCI                            | Atmosferik Basıncılı Kimyasal İyonizasyon           |
| BCA                             | Bikinkoninik Asit                                   |
| BSA                             | Bovin Serum Albumin                                 |
| CaCl <sub>2</sub>               | Kalsiyum Klorür                                     |
| CdCl <sub>2</sub>               | Kadmiyum Klorür                                     |
| CI                              | Kimyasal İyonizasyon                                |
| Da                              | Dalton                                              |
| Dk                              | Dakika                                              |
| DPPH                            | 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil                        |
| EI                              | Elektron İyonizasyonu                               |
| EMB                             | Eosin Methylene-Blue Sucrose                        |
| ESI                             | Elektrosprey İyonlaştırma                           |
| FAA                             | Serbest Amino Asit                                  |
| FT-ICR                          | Fourier Dönüşümlü İyon Siklotron Rezonans           |
| g                               | Gram                                                |
| GC                              | Gaz Kromatografisi                                  |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  | Sülfirik Asit                                       |
| HCl                             | Hidroklorik Asit                                    |
| HPLC                            | Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi               |
| HTST                            | Yüksek Sıcaklık-Kısa Süre                           |
| IC <sub>50</sub>                | %50'sini Azaltmak için Gerekli Miktar               |
| ICP                             | İndüktif Olarak Birleştirilmiş Plazma               |
| K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> | Potasyum Kromat                                     |
| kDa                             | Kilo Dalton                                         |
| KM                              | Kurumadde                                           |
| kob                             | Koloni Oluşturan Birim                              |
| L                               | Litre                                               |
| LAB                             | Laktik Asit Bakterileri                             |
| LC                              | Sıvı Kromatografisi                                 |
| LDL                             | Düşük Yoğunluklu Lipoprotein                        |
| log                             | Logaritma                                           |
| m/z                             | Kütle/Yük                                           |
| mg                              | Miligram                                            |
| mL                              | Mililitre                                           |
| mM                              | Milimolar                                           |
| M                               | Molar                                               |
| MALDI                           | Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon                  |
| MRS                             | De Man, Rogosa and Sharpe                           |
| MS                              | Kütle Spektrometresi                                |
| MWCO                            | Moleküler Ağırlık Sınırı                            |
| N                               | Normailte                                           |
| NaCl                            | Sodyum Klorür                                       |
| NaHCO <sub>3</sub>              | Sodyum Bikarbonat                                   |

|                    |                                                    |
|--------------------|----------------------------------------------------|
| NaOH               | Sodyum Hidroksit                                   |
| NSLAB              | Starter Olmayan LAB                                |
| OPA                | o-phthaldialdehyde                                 |
| PA                 | Proteolitik Aktivite                               |
| PCA                | Plate Count Agar                                   |
| PTA                | Fosfotungustik Asit                                |
| pH                 | Hidrojen İyon Konsantrasyonu                       |
| RP-HPLC            | Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi |
| rpm                | Dakikadaki Devir Sayısı                            |
| SÇA                | Suda Çözünen Azot                                  |
| SÇE                | Suda Çözünen Peptit Ekstraktı                      |
| SDS-PAGE           | SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi                |
| sn                 | Saniye                                             |
| SPA                | Sütü Pıhtılaştırma Aktivitesi                      |
| SPE                | Katı Faz Ekstraksiyonu                             |
| spp.               | Alt Tür                                            |
| SS                 | Sindirim Sonrası Faz                               |
| TCA                | Trikloroasetik Asit                                |
| TEAC               | Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite              |
| TEMED              | Tetrametil Etilendiamin                            |
| TFA                | Trifluoroasetik Asit                               |
| TMAB               | Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri                   |
| TOF                | Uçuş Zamanlı Kütle Ayırıcısı                       |
| TSE                | Türk Standartları Enstitüsü                        |
| UF                 | Ultrafiltre                                        |
| UV                 | Ultra violet                                       |
| μ                  | Mikro                                              |
| μg                 | Mikrogram                                          |
| μL                 | Mikrolitre                                         |
| μm                 | Mikrometre                                         |
| μM                 | Mikromolar                                         |
| α <sub>s</sub> -CN | Alfa-s-kazein                                      |
| α-La               | Alfa-laktalbumin                                   |
| β-CN               | Beta-kazein                                        |
| β-Lg               | Beta-laktoglobulin                                 |
| °SH                | Soxhalet Henkel                                    |
| °C                 | Santigrat Derece                                   |
| %                  | Yüzde                                              |
| ~                  | Yaklaşık                                           |

## 1. GİRİŞ

Son yıllarda gıda kaynaklı biyoaktif bileşenlerin, temel beslenmeyi sağlamanın yanı sıra insan vücudu için düzenleyici bir faaliyet gösteren diyet bileşenleri olduğu düşünülmektedir. Bu bileşenlerden biri olan biyoaktif peptitler, gıdalardaki proteinlerin hidrolizi ile açığa çıkan, vücut fonksiyonlarına ve sağlığa olumlu etki eden spesifik protein fragmentleri olarak tanımlanır. Protein oranı yüksek olan ürünlerde biyoaktif peptitler, yan etkisi olmayan alternatif bir ürün olarak görülmektedir (Öner ve Sarıdağ, 2019). Biyoaktif peptitler, aktif olmayan bir formda bulunan, enzimatik hidroliz ve fermentasyon ile öncü proteinlerden üretilen amino asit dizisini içerir. Bu yöntemlerin kombinasyonu, kısa zincirli fonksiyonel peptitlerin üretilmesiyle sonuçlanır. Ayrıca peptitlerin biyoaktivitesi büyük ölçüde hidroliz için kullanılan enzimlere, işleme koşullarına ve izole edilen peptitlerin boyutuna bağlıdır (Udenigwe ve Aluko, 2012). Biyoaktif peptitler amino asit kalıntısının kompozisyonu ve dizilimine bağlı olarak vücutta antihipertansif, antioksidatif, opioid, antimikrobiyal, gastrointestinal sistemi düzenleme gibi birtakım etkilerin yanı sıra bağışıklık sistemini düzenleme gibi birçok biyolojik aktiviteye sahiptir (Dominguez-Gonzalez vd., 2014; Sánchez-Rivera vd., 2014a). Ortaya çıkan yeni araştırmalar, biyoaktif peptitlerin fizyolojik/sağlık yararlarını görmek için fonksiyonel gıda ve nutrasötiklerin gelişmesine yöneliktir (Bhandari vd., 2020).

Son yıllarda hipertansiyon, damar tıkanıklığı gibi hastalıklar artış gösterdiği için bunlara yönelik doğal kaynaklı ve alternatif tedavi yöntemleri konusunda çalışmalara olan ilgi artmıştır. Bu hastalığı önlemek veya azaltmak için başlıca üstünde durulan konulardan biri ise anjiyotensin-dönüştürücü enzimin inhibe edilmesidir. Anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ACE, EC 3.4.15.1), hipertansiyon hastalığında önemi olan ve vücutta doğal olarak bulunan bir enzimdir. Kısaca ACE ismiyle bilinen bu enzim, renin-anjiyotensin sisteminde yer alan, kan basıncının düzenlenmesinde önemli bir rolü bulunan ve yoğun olarak glikozidik bağlar içeren, membrana bağlı bir çinko metalloproteazıdır (Tikhomirova vd., 2017). ACE enzim aktivitesi vücutta birden fazla etkiye sebep olmakla birlikte asıl önemi hipertansiyon ile olan ilişkisidir. Bu nedenle ACE aktivitesini kontrol

etmek, hipertansiyonu tedavi etmek için önemli bir faktördür ve hipertansiyon hastalığında bu enzimi inhibe edici inhibitörler kullanılmaktadır. ACE-inhibitörlerinin amacı, ACE enzimini inhibe ederek damarların daralmasını önlemek ve kan basıncının yükselmesini engellemektir (Stuknyté vd., 2015). Piyasada bulunan sentetik ACE-inhibitörlerin insanlar üzerinde olumsuz etkilere sebep olduğunu yapılan çalışmalar göstermiştir (Kumar vd., 2000).

Sentetik inhibitör içeren ilaçların tedavi amaçlı kullanımı yerine doğal kaynaklı inhibitörlerin kullanımı ve bu konudaki potansiyellerin araştırılması üzerine ilgi günümüzde giderek artmaktadır. ACE-inhibitör peptitler, doğal kaynaklı ACE-inhibitör etki gösteren maddeler arasında en çok üzerinde çalışılan grup olup biyoaktif peptitler arasında da en fazla üzerinde durulan ve antihipertansif etkiye sahip olan peptitlerdir. Beslenme uzmanları, gıda matriksinde doğal olarak oluşmuş peptitlerden antihipertansif özellikler gösterenlerin, hipertansiyon hastalığının tedavisinde sentetik inhibitör içeren ilaçlara göre daha güvenli ve koruyucu bileşenler olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (Vermeirssen vd., 2004). Bu amaçla çeşitli gıdalardan elde edilen biyoaktif peptitlerin biyofonksiyonellikleri, sentetik bir ilaç ile doğal kaynaklı biyoaktif gıda bileşenleri arasında seçim yaparken onları umut verici bir alternatif haline getirmektedir.

Gıda sisteminde bulunan önemli biyoaktif peptitlerden bir diğeri olan antioksidan peptitler, serbest radikallerin oluşumunu önleyerek veya biyomoleküllerin oksidatif hasarına neden olan ve yaşlanma, kanser, kalp hastalığı, felce ve arteriyoskleroza neden olan serbest radikalleri ve aktif oksijen türlerini süpürerek antioksidan savunma sistemlerinin korunmasında hayati bir rol oynamaktadır (Gupta vd., 2009).

Günümüzde biyoaktif peptitlerin en önemli kaynağı olarak süt proteinleri kabul edilmiştir. Süt proteini hidrolizatlarında ve fermente süt ürünlerinde birçok sayıda biyoaktif peptit tanımlanmıştır. Süt kaynaklı ACE-inhibitör ve antioksidan peptitlerinin enzimatik hidroliz, süt fermantasyonu veya peynir olgunlaşması ile oluştuğu yaygın olarak bildirilmiştir (Gómez-Ruiz vd., 2007).

Fermente süt ürünlerin üretiminde kullanılan ve büyük bir kısmını laktik asit bakterilerin oluşturduğu proteolitik aktiviteye sahip çeşitli starter mikroorganizmalar biyoaktif peptitlerin oluşumunda etkili olmaktadır. Ayrıca süt ve ürünlerinde mikroorganizmaların proteolitik enzimlerinin yanı sıra sütün doğal enzimlerinin ve sütü koagüle etmek için kullanılan enzimin de proteolize sebep olduğu için biyoaktif peptitlerin açığa çıkmasını sağladıkları bilinmektedir (Gobbetti vd., 2000; şanlıdere ve ner, 2006).

Süt rnleri arasında peynir biyoaktif peptit içeriği açısından, olgunlaşma periyodu boyunca gerçekleşen proteolitik aktivite nedeniyle zengin bir kaynak olarak görülmektedir (Sánchez-Rivera vd., 2014a). Özellikle olgunlaşan peynirlerde, olgunlaşma sırasında gerçekleşen ikincil proteoliz ile biyoaktif peptitlerin oluşumunun gerçekleştiği bilinmektedir (Gobbetti vd., 2000).

Rennet ile pıhtılaştırılan olgun peynirlerde biyoaktif peptitlerin kaynağını çoğunlukla kazein proteini oluşturur (Garbowska vd., 2020). Sütü pıhtılaştıran enzimlerin hepsi asit proteaz olup hayvanlardan, bitkilerden ve mikroorganizmalardan elde edilmektedir (akmakı vd., 2017). Elde edildiği kaynağa göre pıhtılaştırıcı enzimin mayalama performansı değişmekte ve peynirin kalitesine direkt olarak etki etmektedir (Broome ve Limsowtin, 1998). Kullanılan enzimin peynir kitlesinde kalma oranı, kitlede homojen dağılımı, kitlede kalan enzimin olgunlaşma boyunca gösterdiği proteolitik aktivite gibi birçok faktör peynirin kalitesine ve bileşimine etki etmektedir. Enzimin gösterdiği proteolitik aktivite ile olgunlaşma boyunca peynirin randımanı ve kalitesinin yanı sıra açığa çıkan peptit ve serbest amino asit miktarları da değişkenlik göstermektedir. Ayrıca süt ürünlerinin mide ve bağırsaktaki enzimler ile sindirimi sırasında, inaktif öncüllerinden aktif kısımların oluşumu nedeniyle sindirim sonrasında biyoaktif peptitlerin açığa çıkması söz konusu olabilmekte veya sindirim öncesinde üründe oluşmuş biyoaktif özellikteki peptitlerin yapısı bozulabilmektedir. Bu nedenle insan vücudunda süt ürünlerinin sindirimi sonucu elde edilecek peptitlerin biyofonksiyonellikleri değişkenlik gösterebilmektedir.

Geliştirilen yeni teknolojilerden biri olan membran teknolojisine ait ultrafiltrasyon yöntemi ile sütün bileşenlerine ayrılması ve böylece protein değerinin artırılması sanayide de popülerlik kazanmaya başlayan bir yöntemdir. Ultrafiltre süt ile pastörize edilmiş sütlerin farklılıklarının, protein yapısının ve bu sütlerden yapılan peynirlerin olgunlaşma boyunca fizikokimyasal değişimleri ile birlikte sütleri pıhtılaştırmak için kullanılan enzimin (hayvansal ve mikrobiyal) farklı olması durumunda peynirin olgunlaşma sürecine ve açığa çıkan peptitlerin biyoaktif özelliklerine olan etkisi bu çalışmada birlikte değerlendirilmiştir. Peynir sütüne uygulanan farklı metotların ve farklı pıhtılaştırıcı enzimlerin etkisi ile olgunlaşma boyunca çıkan peptit profilindeki farklılıklar karşılaştırılmış ve açığa çıkan peptitlerin hem *in vitro* sindirim öncesi hem de sonrasındaki biyoaktif özellikleri araştırılmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Peynirin Tanımı

Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği'ne göre peynir; "hammaddenin uygun bir pıhtılaştırıcı kullanılarak pıhtılaştırılması ve pıhtıdan peyniraltı suyunun ayrılmasıyla ya da sütün permeatının ayrılmasından sonra pıhtılaştırılmasıyla elde edilen, farklı sertliklerde ve yağ içeriklerinde, salamura ile ya da kuru tuzlama ile tuzlanarak ya da tuzlanmadan, starter kültür kullanarak ya da kullanmadan, telemesi haşlanarak ya da haşlanmadan, çeşnili ya da çeşnisiz olarak, tekniğine uygun olarak üretilen, olgunlaştırılmadan ya da olgunlaştırıldıktan sonra tüketilen, çeşidine özgü karakteristik özellikleri gösteren süt ürünleri" olarak tanımlanmıştır (Anonim, 2015).

Hem süt hem de peynir, bir insanın elzem amino asit gereksiniminin karşılanabilmesi açısından son derece elverişli gıdalardır. Peynir, sütün konsantre olmuş hali olduğu için protein ve yağ gibi birçok besin ögesini süte göre daha fazla miktarda içermekte ve çeşidine göre değişen oranda içerdiği proteinden dolayı peynirin biyolojik değerinin son derece yüksek bir gıda olduğu bilinmektedir. Günde alınması gereken protein ihtiyacı 100 g yumuşak tip peynirle %30 – 40 oranında, 100 g sert tip peynirle de %40 – 50 oranında karşılanabilmektedir (Uraz, 1979; Üçüncü, 2020). Peynirin protein dışında yağ ve mineral maddeler yönünden de zengin olması beslenme açısından değerini arttırmaktadır. Kalsiyum, fosfor ve vitamin bakımından zengin olduğu için çocuk ve yetişkin beslenmesinde önemli bir yeri bulunmaktadır. Esansiyel amino asitleri içermesi nedeniyle hastalıklarda ve hastalık sonrası iyileşme döneminde, zayıflayan dokuların güçlendirilmesinde ve yenilenmesinde yapı maddesi olarak değer taşımaktadır (Vapur, 2010).

Peynir üretiminde ham madde olarak kullanılan sütün kimyasal, duyuşal ve mikrobiyolojik durumu, peynirin kalitesini ve niteliğini önemli ölçüde etkileyen faktörlerin başında gelmektedir. Sütün kimyasal özellikleri hayvanın türüne, ırkına, yaşına, laktasyon periyoduna, yemleme ve sağlık durumuna göre

değişkenlik göstermektedir. Sütün mikrobiyolojik özellikleri üretim koşullarına, hayvanının sağlık durumuna, sağımdan sonra depolama şartları ve nakliye sırasında soğuk zincir uygulanıp uygulanmamasına, süte uygulanan ısıl işlem normuna ve ısıtma sonrası kontaminasyon durumuna göre değişkenlik göstermektedir. Peynir üretiminde kullanılan süt dışında pıhtılaştırmak için kullanılan peynir mayasının özelliği, starter kültür tipi ve miktarı, süte uygulanan ısıl işlem normu, ısıl işlemsiz birtakım yeni teknolojiler ve uygulanan üretim yöntemi gibi birçok faktör de peynirin kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir (McSweeney, 2004; Tekinşen ve Tekinşen, 2005; Hayaloğlu ve Özer, 2011). Başta protein ve yağ miktarındaki değişimler olmak üzere peynir yapımındaki sütün bileşimindeki değişimler, son ürün bileşiminde önemli farklılıklara sebep olmaktadır.

#### **2.1.1. Süt proteinleri**

Süt proteinleri organizmada sentezi yapılamayan, gıdalar ile alınması zorunlu olan esansiyel amino asitleri yeterli miktarda içerdiğinden insan beslenmesinde fizyolojik öneme sahiptir. İnek sütünün %2,8-3,7'si süt kurumaddesinin ise yaklaşık %25'i proteindir. Sütte bulunan azotlu bileşiklerin %95'ini proteinler oluşturur (Hayaloğlu ve Özer, 2011). Süt proteinleri farklı niteliklerde proteinlerin karışımıdır ve 30'dan fazla fraksiyondan oluşmaktadır. Bunlar, kazeinler ve serum proteinleri olmak üzere 2 grup altında toplanabilir. Süt proteinleri, biyolojik olarak aktif peptitlerin zengin bir kaynağını oluşturur (Ong vd., 2007).

##### **2.1.1.1. Kazein**

Kazein proteini, doğada sadece sütün içeriğinde bulunan ve süt proteininin asit veya enzimle pıhtılaştırılan fraksiyonudur. Süt proteinlerinin en önemli fraksiyonu olup, yaklaşık %80' ini oluşturmaktadır. Farklı türlerde elde edilen sütlerde kazein oranı da farklılık göstermektedir (Hayaloğlu ve Özer, 2011). Sütte kazein, misel olarak bilinen parçalar halinde kolloidal fazda bulunur. Kazein misellerinin %93'ü kazein proteinine ait olup geri kalan kısmını kalsiyum, magnezyum, sodyum, fosfat ve sitrat gibi maddeler oluşturur.

Kalsiyum ve fosfat, kazein misellerinde en fazla bulunan mineral maddelerdir ve bunlar kolloidal kalsiyum fosfat formunda bulunurlar. Bu maddeler ile kazein bir kompleks oluşturur. Oluşan bu kompleks, kalsiyum kazeinat-fosfat veya kalsiyum-fosfokazeinat olarak bilinmektedir. Bu nedenle kazein, bir fosfoprotein olarak kabul edilmektedir (Metin, 2013).

Bir kazein miseli;  $\alpha_s$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN ve  $\gamma$ -CN gibi bileşenlerden meydana gelir (Üçüncü, 2005). Kazein miselinin yapısı için fosfat gruplarının yüksek miktarda kalsiyum bağlaması önemlidir. Kalsiyumun kazeindeki fosfat gruplarına bağlanması, fosfat miktarı ile doğru orantılıdır. Kalsiyuma karşı oldukça hassas olan  $\alpha_{s1}$ - ve  $\alpha_{s2}$ -kazein fraksiyonları 3-8 mM kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) konsantrasyonunda çökmektedir (Marth ve Steele, 2001). Kazein fraksiyonları arasında  $\alpha_{s1}$ -CN en yüksek fosfat içeriğine sahip fraksiyondur ve yaklaşık olarak 23,6 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Fosfor grupları, mono-ortofosfat ester olarak serine bağlanmıştır (Fox, 2003; Huppertz vd., 2006).  $\alpha_{s2}$  - kazein, kazein fraksiyonları arasında en düşük miktarda yer alan bir fraksiyondur. Hidrofobisite derecesi düşüktür. Molekül ağırlığı 25,2 kDa'dır. Fizyolojik ve biyokimyasal olarak  $\alpha_{s1}$ -CN'e çok benzemektedir (Fox, 2003). Bir diğer kazein fraksiyonu olan  $\beta$ -CN ise 8-15 mM  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunda çökmektedir. Hidrofobisitesi en yüksek fraksiyondur. Hidrofilik C-terminal ve hidrofobik N-terminal uçlara sahiptir. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 24 kDa'dır.  $\beta$ -CN, plazmin gibi doğal süt proteinazları tarafından kolaylıkla metabolize edilmektedir (Marth ve Steele, 2001; Fox, 2003; Huppertz vd., 2006).

Kazeinin  $\kappa$ -CN fraksiyonu, diğer fraksiyonların aksine kalsiyumun her miktarında çözünür kalmakta ve bu özelliği sayesinde  $\alpha_{s1}$ - ve  $\beta$ -CN'in stabilizasyonunu sağlamaktadır (Marth ve Steele, 2001). Diğer kazein fraksiyonlarından farklılık gösteren  $\kappa$ -CN fraksiyonu, glikolize bir fraksiyondur ve karbonhidrat grupları içermektedir.  $\kappa$ -CN molekülleri galaktozamin, galaktoz ve N-asetilnöraminik asit kalıntıları içermektedir.  $\kappa$ -CN fraksiyonu çok hidrofobik, N-terminalli bir amfipatiktir (hem hidrofobik hem de hidrofilik bölgeleri bulunan) ve kazein misellerinin stabilitesinde önemli bir rol oynayan hidrofilik C-terminal ucuna sahiptir. Peynir üretimi için gereken koagülasyon

için çok önemli bir fraksiyondur. Yaklaşık 19 kDa moleküler ağırlığına sahiptir (Fox, 2003).

#### **2.1.1.2. Serum proteinleri**

Süt proteinlerinin yaklaşık olarak %20'sini oluşturan ve süt serumu içerisinde pek çok fraksiyondan oluşan, asit veya enzimle pıhtılaştırılamayan proteinlere serum proteinleri denilmektedir. Bu proteinler, peynir yapımı esnasında peynir suyuna geçtikleri için “peyniraltı suyu proteinleri” olarak da isimlendirilmektedir (Tunçtürk, 2003; nc, 2005). pH 4,6'da ve doymuş tuz çözeltisi içinde çözünür haldedir.

Serum proteinlerinin 5 önemli fraksiyonu bulunmaktadır. Bunlar  $\beta$ -laktoglobulin ( $\beta$ -Lg),  $\alpha$ -laktalbumin ( $\alpha$ -La), sığır serum albümini, immunoglobulin ve proteoz-peptonlardır. Serum proteinlerine ait bu fraksiyonların arasında miktar olarak en fazla bulunan  $\beta$ -Lg'dir.  $\beta$ -Lg fraksiyonu iki disülfit bağı ve bir adet serbest tiol bağı içeren, molekül ağırlığı 18,3 kDa olan bir fraksiyondur.  $\beta$ -Lg'deki bu bağılar sütün ısıtılması ensasında sütte oluşan değışimler açısından önemlidir. Yüksek sıcaklık, yüksek basınç ve 6 mol/L re varlığında çözülebilmekte ve  $\alpha$ -La,  $\kappa$ -CN,  $\alpha_{s2}$  – kazein gibi gibi proteinlerle etkileşime girebilmektedir (Hayaloğlu ve zer, 2011).

Serum proteinlerinin fraksiyonlarından bir diğeri olan  $\alpha$ -La, 14,2 kDa mol ağırlığında ve dört i zincir disülfit bağı içeren bir serum proteini fraksiyonudur. İki kalsiyum atomunu kuvvetlice bağlayabilir. Bu atomlar kaldırıldığı zaman denatürasyona hassasiyet artmaktadır (Marth ve Steele, 2001).

Serum proteinlerinin bir diğer fraksiyonu olan immunoglobulinler, düşük molekül ağırlığı 22,4 kDa ile yüksek molekül ağırlığı 50–60 kDa arasında değışmektedir. İmmnoglobulinin; IgM, IgA, IgE ve IgG olmak üzere 4 tipi vardır. Kolostrumda immunoglobulin konsantrasyonu en yüksek iken laktasyon ilerledikçe sütte miktarı azalmaktadır.

Sığır serum albümini ise karaciğerde sentezlenir ve memeli dolaşım sisteminde en yüksek konsantrasyonda bulunur. Ancak sütte miktarı çok düşüktür. Serum albümin, yapısında bir serbest tiol ve 17 disülfid bağı içermekte ve küçük moleküllerin taşıyıcısı (yağ asidi gibi) olarak görev yapmaktadır.

Serum proteini fraksiyonlarından sonuncusu proteoz peptonlar, ısıtma işlemi sonucu denatüre olmayan ve %12 TCA'da çözünmeyen bir serum proteini fraksiyonu olarak tanımlanmaktadır (Marth ve Steele, 2001; Hayaloğlu ve Özer, 2011)

Süt serumunda az miktarlarda birkaç protein daha bulunmaktadır. Demir bağlama özelliğine sahip  $\beta$ -mikroglobulin ve laktoferrin ve asil glikoproteinler serumda düşük miktarda bulunan proteinler olarak bilinmektedir (Marth ve Steele, 2001).

## **2.2. Beyaz Peynir Yapımı**

Ülkemizde yerel peynir çeşitleri arasında hem üretim hem de tüketim yönünden ilk sırada bulunan peynir çeşidi Beyaz peynirdir. Genellikle teneke peyniri, salamura peynir gibi farklı isimler ile de bilinir (Üçüncü, 2020). Çiğ süttten veya pastörize edilmiş süttten üretimi mümkündür. Çiğ süt ya da termizasyon işlemi uygulanan süttlerden üretilmiş ve telemesi haşlanmamış peynirler taze olarak piyasaya satışı gerçekleşmeden Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği'nde belirtildiği üzere en az 4 ay uygun koşullarda olgunlaştırılmalıdır (Anonim, 2015). Bunun yanı sıra kalite ve randıman açısından Beyaz peynir üretiminde en avantajlı süt koyun süttüdür. Bu süte değişik oranlarda keçi ve inek süttü de karıştırılabildiği gibi sadece inek süttü de kullanılabilir (Üçüncü, 2020).

Beyaz peynir yapımında hammadde olarak kullanılan süttün hangi hayvandan elde edildiğinin önemli olmasının yanı sıra süte hangi prosesin uygulandığı da peynirin kalitesini etkileyen bir unsurdur. Günümüzde teknolojinin ilerlemesi ile birlikte geliştirilen yeni prosesler gıda sanayisinde de uygulanmakta ve klasik yöntemlerin yerini farklı üretim tekniklerinin almaya başlaması söz

konusu olmaktadır. Bu yeni tekniklerden birisi, bir membran filtrasyon tekniği olan ultrafiltrasyon (UF) teknolojisidir. Bu teknolojiye, sistem içindeki filtreler aracılığı ile belli bir basınç altında sütün içindeki yüksek molekül ağırlığındaki maddeler tutulurken su gibi düşük molekül ağırlığındaki maddeler filtrelerden geçmektedir. UF yöntemi ile sütün konsantrasyon seviyesi, peynir çeşidine bağlı olarak değişebilmektedir. Örneğin Cheddar gibi sert peynirlerde süt 1,6 ile 1,7 kat konsantre olurken, Cottage peynirde bu değer 1,2 ile 1,7'dir. Beyaz peynirlerde süt 3 kat konsantre olup, sütün toplam kurumaddesi %25-28'e ayarlanmaktadır (Mistry, 2011).

Peynir üretiminde sütün peynire işlenmesi aşamasındaki en temel işlem sütün bir pıhtılaştırıcı enzim kullanılarak pıhtılaştırılmasıdır. Kullanılan enzimin çoğu peynir altı suyuna geçse de peynir kitlesinde enzimin %0-15 kadar küçük bir bölümü kalmakta ve olgunlaşma sırasında proteolize etki etmektedir. Bu nedenle kullanılan enzimin elde edildiği kaynağa göre pıhtılaştırma aktivitesi ve proteolitik gücü önem arz etmektedir (Sousa vd., 2001; Şahan ve Yaşar, 2002). Söz konusu pıhtılaştırıcı enzimin sütü pıhtılaştırma aktivitesi (SPA) ve proteolitik aktivitesinin (PA) peynir üretimine uygun olması önemlidir. Enzimin  $\kappa$ -CN üzerindeki spesifik aktivitesi SPA olarak değerlendirilir. Bunun dışındaki aktiviteler PA olarak nitelendirilir. Peynir üretiminde kullanılacak pıhtılaştırıcı enzimde PA'nın çok yüksek olması peynirde pıhtı sıklığının azalmasına, peynir altı suyunun ayrılmasının yavaşlamasına, randımanın düşmesine ve acı tat oluşumu gibi peynir kusurlarına yol açar (Fox vd., 2000).

### **2.2.1. Sütü pıhtılaştıran enzimler**

Dünyada üretilen peynirlerin büyük bölümü, sütün bir pıhtılaştırıcı enzimle pıhtılaştırılması sonucu oluşan pıhtının değişik şekillerde işlenmesi ile elde edilmektedir. Farklı kaynaklardan elde edilebilen ve kazeini pıhtılaştırıcı enzim olarak bilinen enzimlere sütü pıhtılaştıran enzim, peynir mayası veya rennet denilir. Rennet, büyük oranda kimozen içeren ve geniş getiren genç hayvanların midelerinin şirden bölümünden elde edilen bir enzimdir. Elde edilen bu enzim ticari olarak şirden mayası olarak da bilinmektedir. Şirden mayası, süt emme

dönemindeki buzağı, kuzu ve oğlak midelerinin şirden bölümünden özütlemeye yolu ile elde edilir (Hayaloğlu ve Özer, 2011).

Şirden mayasının büyük bir çoğunluğunu oluşturan kimozen enzimi, hayvanın midesinde sütü pıhtılaştırmak amacıyla doğal olarak salgılanan bir enzim olması nedeniyle şirden mayası doğal bir enzim preparatı olarak bilinir (Ye vd., 2000). Hayvanın midesindeki şirdende kimozen ve pepsin, tripsin ve kimotripsin gibi diğer gastrik enzimler inaktif formda bulunur ve buradan elde edilir. Yeni doğmuş geviş getiren hayvanların şirdeninde baskın olan enzim kimozen iken, yetişkin olan hayvanlarda pepsin baskın durumdadır. Şirden mayaları genel olarak %88-94 oranında kimozen, %6-12 oranında pepsin içerse de doğumdan sonra geçen süreye ve beslenme durumuna göre bu oran değişebilmektedir (Dervişoğlu vd., 2007).

Kimozen (EC, 3.4.23.4), süt proteini olan  $\kappa$ -kazeini fenilalanin<sub>105</sub>(Phe<sub>105</sub>) – metionin<sub>106</sub>(Met<sub>106</sub>) peptid bağından kırar ve çözünmeyen para- $\kappa$ -kazeini oluşturur. Bu yolla sütün pıhtılaşmasını sağlar (Metin, 2013). Bu işlem için kimozen çok spesifik bir enzimdir. Bu spesifikliği sayesinde aşırı bir proteoliz oluşturmada olgunlaşma süresince peynirde acılığı önlemektedir (Tejada vd., 2008; Shamtsyan vd., 2014). Şirden mayası, peynirin olgunlaşması sırasında düşük proteolitik özelliğiyle farklı kazein fraksiyonlarını hidrolize ederek peynirin kendine has lezzetinin oluşumunda etkili olur (Metin, 2013). Şirden mayası haricinde inek, domuz ve tavuk gibi başka hayvanlardan elde edilen pepsinler de ya tek başına ya da şirden mayası ile karışım olarak kullanılmaktadır (Scott, 1981).

Dünyada peynir üretimi ve tüketimi giderek artış gösterirken, buzağıdan elde edilen şirden mayası temininin giderek azalması nedeniyle farklı kaynaklardan şirden mayası yerine kullanılabilecek enzim elde etme çalışmaları artmıştır. Peynir üretiminde şirden mayasından sonra en fazla mikrobiyal peynir mayaları kullanılmaktadır. Mikrobiyal peynir mayalarını (mikrobiyal rennet) da iki grup altında incelemek gerekir. Bunlardan birincisi, mikroorganizmalardan direkt elde edilen proteolitik enzimlerden oluşan mikrobiyal peynir mayalarıdır. İkinci

grup ise kimozen enziminde görevli genetik materyalin belirli mikroorganizmalara (*Kluyveromyces lactis*, *K. lactis*, *Aspergillus awamori*, *A. niger*, *A. oryzae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* vb.) aktarılması sonucu, bu mikroorganizmaların ürettiği kimozen enzime özdeş enzimlerden oluşan peynir mayalarıdır. Bu mayalar rekombinant rennet olarak da bilinir (Hayaloğlu ve Özer, 2011). Mikrobiyal rennetlerin ilk grubunu oluşturan mikrobiyal peynir mayaları esas olarak *Cryphonectria parasitica*, *Rhizomucor miehei*, *R. pusillus* ve *A. oryzae*'den elde edilen proteolitik enzimlerdir (Çakmakçı vd., 2017). Bunlar fungal rennet olarak da bilinir. *Bacillus* türlerinden elde edilen bakteriyel rennetlerin ise yüksek proteolitik aktiviteye sahip olmaları nedeniyle peynir mayası olarak kullanımları çok sınırlıdır. Mikrobiyal rennetlerin proteolitik aktiviteleri yüksekten düşüğe doğru *B. polymyxa*, *C. parasitica*, *R. miehei* ve *R. pusillus* olarak sıralanabilir (Fox ve McSweeney, 1997). Mikrobiyal enzimler, buzağı rennetine göre daha yüksek oranda spesifik olmayan proteolitik aktivite göster. Mikrobiyal rennetler arasında *C. parasitica*'dan elde edilen enzim en yüksek değere sahiptir (Üstünol ve Hicks, 1990; Yetişemeyen vd., 1998).

Mikrobiyal rennetlerin ikinci grubunu oluşturan rekombinant rennet, genetik olarak değiştirilen ve buzağı kimozenini geni taşıyan mikroorganizmalardan elde edilen enzim preparatlarıdır. Normalde buzağı rennetinin yani şirden mayasının süt pıhtılaştırma aktivitesinin yaklaşık %5-50'si pepsinden kaynaklanır. Ancak mikrobiyal rekombinant rennet preparatları pepsin içermediği ve gen aktarımı sayesinde mikroorganizmalar aracılığı ile elde edilmesinden dolayı saflığı yüksek olduğu için bu iki enzimle yapılan peynirlerin proteolizleri arasında farklılıklar olmaktadır (Dervişoğlu vd., 2007; Çakmakçı vd., 2017).

Hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı enzimler dışında ticari olarak satılan bitkisel kaynaklı enzimler de piyasada mevcuttur. Bitkisel kaynaklı enzimler; bitkilerde doğal olarak bulunan ve sütü pıhtılaştırma özelliğine sahip bitkilerin kök, sap, tohum, çiçek, meyve ve yaprak gibi kısımlarının kullanılmasıyla veya farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilmektedir (Say vd., 2012; Metin, 2013; Say ve Güzeler, 2016). Elde edilen bitkisel kaynaklı enzimler papain, bromelin, fisin

gibi enzimlerdir. Çoğu bitkisel enzimler kuvvetli proteolitik aktiviteye sahip olduğu için bu enzimlerin peynir üretiminde kullanılması peynir randımanında düşüş, pıhtı niteliklerinde bozulma, tekstürde yumuşama ve acı tat oluşumu gibi kusurlara neden olabilmektedir Peynirde istenmeyen randıman düşüşü ve kusurlara sebep olmaması için bitkisel kaynaklı enzim kullanımında bitki seçimi, kullanım miktarı ve mayalama süresi önemlidir (Yetişemiyen, 2007; Hayaloğlu ve Özer, 2011; Çardak, 2014; Say ve Güzeler, 2016; Çakmakçı vd, 2017).

### **2.2.2. Pastörize süttten peynir üretimi**

Ülkemizde salamura da olgunlaştırılan peynir çeşitleri arasında en yoğun tüketimi olan Beyaz peynirdir. Kısaca salamura Beyaz peynir üretimi (Kültürlü Beyaz Peynir): kazein:yağ içeriği 0,7:0,8'e ayarlanmış sütün 74°C'de 15-20 sn veya 65°C'de 20-30 dakika (Üçüncü, 2002) veya 68°C'de 10 dakika pastörize edildikten sonra 30-32°C'ye soğutulmasının ardından %1-2 düzeyinde starter kültür ilave edilerek gerçekleştirilmektedir. Klasik Beyaz peynir yapımında ise starter kültür kullanmadan üretim gerçekleştirilir ve bu nedenle süte uygulanan ısı işlem için daha düşük sıcaklık/süre normu seçilir. Klasik Beyaz peynirde olgunlaşma süreci, ısı işlem sonrasında aktif kalan bakteri ve/veya enzimler yoluyla gerçekleşir. Beyaz peynirin bileşimi üretim metoduna ve süt türüne göre değişir (Hayaloğlu ve Özer, 2011).

Beyaz peynirin başlangıçtaki su içeriği %55 -65 arasında olup, yumuşak peynir olarak sınıflandırılırken, salamura da 3 ay boyunca olgunlaşan peynir ise yarısert ya da yarı-yumuşak peynir olarak sınıflandırılır. Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği'nde belirtildiği üzere Beyaz peynirler kurumaddede yağ oranlarına göre 4 gruba ayrılmaktadır: tam yağlı (45≤ süt yağı), yarım yağlı (25≤ süt yağı <45), az yağlı (10≤ süt yağı <25), yağsız (10> süt yağı) (Anonim, 2015). Genel olarak olgunlaşmış yağlı Beyaz peynirlerin bileşimi yaklaşık olarak şu değerleri gösterir: %39-40 kurumadde, %18-19 yağ, %16-17 protein, %4,3-4,5 tuz, pH 4,9-5,1, laktik asit cinsinden titrasyon asitliği %0,90-1,0 ve %22-24 olgunlaşma indeksi (Gürsoy vd., 2001; Hayaloğlu ve Özer, 2011).

Peynir yapımında kullanılacak çiğ sütün kalitesi, elde edilen peynirin kalitesi ve olgunlaşma sürecine direkt olarak etki edeceği için çiğ sütün duysal, kimyasal, fiziksel, mikrobiyolojik ve hijyenik kalitesinin yüksek olması gerekir. Genel mikroorganizma sayısı 1 mL çiğ sütte 300.000'den fazla olmamalıdır. Peynirde erken şişme sorununa neden olan koliform bakteriler ile geç şişme sorununa neden olan *Clostridium* ve *Bacillus* türü mikroorganizmalar sütün florasında bulunmamalıdır. Bunun yanı sıra kazein oranı yüksek bir süttten elde edilecek teleme ve pıhtının sertliği yüksek olacağı için sütün kazein oranı da önemli bir faktör olarak değerlendirilir. Kullanılacak sütün asitliğinin 6,0°SH'dan az, 7°SH'dan yüksek olmaması gerekir. Ayrıca peynir mayası ile pıhtılaşma süresinde gecikme olmayan bir süt kullanılmalıdır. Bu nitelikleri sağlayan sütün Beyaz peynir üretimine kabulü gerçekleştirildikten sonra sırasıyla kaba temizliği ve klarifikatör temizliği yapıp kirlilik unsurlarının tamamen süttten temizlenmesi sağlanır. Çiğ sütün kalitesinin değerlendirilmesi ve temizlenmesi, peynirin kalitesinin ve randımanının artırılması açısından önemli bir aşamadır. Bu yolla peynire işlenecek sütün niteliği uygun şartlara getirildikten sonra yağ standardizasyonu ve pastörizasyon aşaması ile peynir üretimine süt hazır hale getirilir (Üçüncü, 2020).

Peynire işlenecek sütün pastörizasyon parametrelerinin doğru seçilmesi peynirdeki protein profilini olumsuz etkilememesi açısından önemlidir. Yüksek sıcaklık uygulaması serum proteinlerinin denatürasyonuna neden olmaktadır. Denatüre olan proteinlerle kazein miselleri, mineraller ve yağ globülleri arasında interaksiyonlar oluşur. Denatüre serum proteinleri, peynir veriminde artışa neden olmasına rağmen kazein miselleri ile aralarında oluşan interaksiyonlar nedeniyle sütün rennet enzimi ile pıhtılaşma aşamasında enzimin etki mekanizmasına olumsuz yönde etki ederek uzun bir pıhtılaşma süresi ve peynirde zayıf bir pıhtı yapısının oluşumuna neden olur (Singh ve Waungana, 2001).

Kültürlü Beyaz peynir yapımında peynir yapımında peynire işlenecek süt ön aşamalardan geçtikten sonra 74°C'de 15-20sn veya 65°C'de 20-30 dakika

pastörize edilir ve ardından 30-32°C'ye soğutulur. Starter kültür (%1-2) ilavesi ardından süte  $\text{CaCl}_2$  (%0,02) ilave edilir. Bunun nedeni ısıtma işlem sonrasında sütte iyonik kalsiyum dengesi bozulduğu için pıhtılaşmanın düzgün ve kolay gerçekleştirilmesini sağlamaktır. Starter ve  $\text{CaCl}_2$  ilavesi sonrasında, aktivitesi belirlenmiş rennet ile sütün mayalanması gerçekleştirilir. Pıhtılaşma işlemi bitip pıhtı kesim olgunluğuna gelen pıhtı kesilir ve peyniraltı suyu uzaklaştırılır. Elde edilen taze peynir %12-14 tuz içeren salamurada  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de olgunlaşmaya bırakılır. Bu yöntemde teleminin mayalanması ve baskılanması farklı yerlerde gerçekleştirilirken farklı olarak "Bulgar yöntemi" adıyla bilinen üretim şeklinde süte yüksek ısıtma işlemi ( $80-85^\circ\text{C}$ 'de 3-5 dakika) uygulanır ve işlemlerin büyük bir kısmı tek bir tekne içinde gerçekleşir. Bulgar yönteminde yüksek ısıtma işlemi uygulanması sonucu serum proteinleri peynir suyuna geçmeyip kazeinle birlikte tutulur ve böylece randıman artışı olur. Ayrıca bu yöntemde birçok işlemin tek bir tekne içinde yapılması ile araç ve iş gücü giderleri azaltılır. İlaveten tek bir teknede yapılması ile mikrobiyal bulaşı riski en alt düzeye indirilmiş olup işletmede alandan tasarruf sağlanarak aynı alanda daha fazla süt işlenebilir (Hayaloğlu ve Özer, 2011; Üçüncü, 2020).

### **2.2.3. Ultrafiltrasyon tekniği ile peynir üretimi**

Günümüzde gelişen teknoloji ve artan rekabet nedeniyle kaliteli ve düşük maliyetli ürün üretmek gıda sanayisinde önemli bir gereksinim haline gelmiştir. Bu nedenle Avrupa'da yıllardır kullanılmakta olan membran teknolojisi artık ülkemizde de gıda sektöründe üreticiler tarafından kullanılmaya başlanan yeni teknolojilerden biridir. Membran teknolojisi, uygun kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip, yarı-geçirgen özellikteki membranlar ile sıvıdaki molekülleri şekil, boyut ve kimyasal bileşimlerine göre ayırabilen bir proses olarak tanımlanmaktadır (Soltan, 2013). Membrana dayalı ayırma teknolojisi sirke, meyve suyu ve steril su gibi birçok alanda kullanılmakla birlikte özellikle süt teknolojisi alanında kullanılan evaporasyon, destilasyon ve absorpsiyon gibi diğer konsantrasyon yöntemlerinin alternatifi olarak kullanılmaktadır.

Gıda sektöründe yaygın olarak kullanımı artan membran teknolojilerden birisi olan ultrafiltrasyon teknolojisi özellikle süt sektöründe büyük bir kullanım oranına sahiptir. Ultrafiltrasyon, yarı geçirgen membran ve basınç kullanarak büyük molekül yapısına sahip bileşenleri ayrıştıran ve konsantre haline getiren bir sistemdir. Bu sistem, çözgen ve çözünmüş maddelerden 1.000-200.000 Da molekül ağırlığı arasındaki makro molekülleri seçici olarak ayırır. Sütün ultrafiltre edilmesi ile sütün içindeki su, laktoz, tuzlar ve çözünmüş mineraller, protein olmayan azotlu bileşikler ve suda çözünen vitaminler membrandan geçer ve permeatı (filtrat) oluşturur; proteinler, süt yağı ve kolloidal tuzlar membrandan geçemez ve membranda tutularak retentatı oluşturur (Fox, 1999; Üçüncü, 2020). Moleküler düzeyde bir eleme olan ultrafiltrasyon sisteminde, belli irilikte (0,5-35 nm) gözenekleri bulunan membranlar kullanılmaktadır. Filtrasyon sıvısının belli bir hızla sirkülasyonu sağlanarak belli bir basınç altında yürütülür. Ultrafiltrasyon membranlarının temelini polisülfon denilen bir polimer oluşturmaktadır. Mikroporöz bir taşıyıcı film yapıdaki polisülfon üzerine ultra incelikte ( $\sim 30\mu\text{m}$ ) bir polimer filmin yerleştirildiği sentetik olarak elde edilen bir tür asimetrik yapıdaki membranlardır (Hayaloğlu ve Özer, 2011; Üçüncü, 2020).

Süt endüstrisinde ultrafiltrasyon teknolojisinin kullanıldığı alanlara; süt tozu üretimi, sütün koyulaştırılması, protein standardizasyonu, peynir üretimi sırasında proteinlerin fraksiyonlara ayrılarak saflaştırılması örnek olarak verilebilir (Yetişemeyen ve Yıldız, 2011; Akalın, 2021). Süt endüstrisinde UF teknolojisi içme sütü, süt tozu, yoğurt, koyulaştırılmış süt, krem peyniri, Feta, Camembert, Roquefort peynirler gibi yumuşak peynirler ile Mozzarella, Cheddar gibi peynirlerin üretiminde kullanılmaktadır. Mayalanmadan önce özellikle UF ile kurumaddesi arttırılan ve ardından homojenize edilen sütün bileşimi son ürünün kimyasal kompozisyonuna benzerlik gösterebilmektedir. UF ile peynir üretimi 3 farklı yöntem ile yapılabilmektedir. İlk yöntemde düşük bir konsantrasyon ile (konsantrasyon faktörü  $CF=2$ ) süt ultrafiltre edilmekte ( $\sim 3,7-4,5$  protein) ardından geleneksel yol ile peynire işlenmektedir. Bu üretim modeli Camambert, Cheddar, Mozzarella gibi çoğu peynir çeşitlerinde uygulanabilmektedir. İkinci yöntemde orta konsantrasyon faktörü (3-6 CF) ile

süt konsantre edilmekte ve bilinen üretim yöntemi izlenerek peynire işlenmektedir. Bu yöntemde proses boyunca sinerezis devam etmektedir. Örneğin; Quark ve krem peyniri gibi olgunlaşmayan ve nem içeriği yüksek peynirlerde orta konsantrasyon faktörlü UF yöntemi tercih edilmektedir. Üçüncü yöntemde ise yüksek konsantrasyon faktörü ile çalışılan UF sisteminde süt, peynirde hedeflenen kurumadde içeriğine kadar konsantre edilmekte ve klasik üretim modellerinden tamamen farklı bir teknoloji ile peynir üretimi gerçekleştirilmektedir. Bu metotta, serum proteinlerinin peynir pıhtısında tutulma oranı yüksek olduğundan son ürün randımanı yükselmektedir. Bu 3.yöntem yaygın olarak Camambert ve Feta peyniri üretiminde uygulanmaktadır (Yetişemeyen ve Yıldız, 2011).

Süt endüstrisinde UF tekniğinden en çok peynir üretiminde yararlanılmasının sebebi klasik yöntemle peynir üretimine göre UF ile koyulaştırılmış süt kullanarak peynir üretilmesi sayesinde peynir kitlesinde serum proteinleri peynirde kalmakta ve peynirde randımanın %16-20 arasında arttığı bildirilmektedir (Mistry, 2011). Ultrafiltrasyon, özellikle sütün yağ ve protein oranı standardize edilerek mevsimsel değişimlerin dengelenmesinde ve böylece ürün kalitesinin standart olmasında, peynir sütünün ön konsantrasyonunda ve peyniraltı suyu bileşenlerinde yağ ve serum proteinlerinin ayrılması amacıyla kullanılmaktadır (Yetişemeyen ve Yıldız, 2011). Bu sistemde, konsantrasyon ve ayırma işlemi gerçekleştiğinden proses boyunca buhar tüketimi geleneksel yöntemle göre bir hayli azalmaktadır. UF sütten üretilen peynirlerin pıhtılaştırılması için kullanılan peynir mayası miktarının azalması ve proses kontrolünün kolay yapılabilmesi UF sisteminin sağladığı diğer avantajlar arasındadır. Bir diğer önemli avantajı kapalı sürekli proses olanağı sağlamasıdır. Kapalı sürekli sistem sayesinde peynir üretim hattında otomasyon arttığı için daha az işçilik gerekmekte ve böylece iş gücü maliyeti azalmaktadır. Ayrıca kapalı sürekli sistemde elle yıkama gereksinimi olmadığı için temizlik ve dezenfeksiyon doğru bir şekilde yapılabilmekte ve bu da peynirde kontaminasyonu önlemektedir. Olumlu birçok özelliğinin yanı sıra olumsuz özellikleri ise peyniraltı suyu proteinlerinin peynir kitlesinde kalmasından dolayı ürünün duyu özelliklerinin olumsuz etkilenmesi, sert ve pıhtısı

pişirilen peynirlerde yapısal ve lezzet sorunları oluşması, yatırım maliyetinin yüksek olması ile membranların temizliği ve değiştirilmesinden kaynaklanan ek gider gerektirmesi şeklinde sıralanabilir (Üçüncü 2008; Hayaloğlu ve Özer, 2011; Paksoy, 2016).

### **2.3. Peynirde Olgunlaşma**

Peynirin olgunlaşma süreci, peynir çeşidine kendine özgü tat, aroma ve yapıya neden olmakta ve bu süreç bir dizi kompleks kimyasal ve biyokimyasal olayları içermektedir (Üçüncü, 2002). Ayrıca her peynir çeşidinin kendine has renk, koku, tat, yapı, gözenek, kabuk gibi özelliklerinin oluşumunda kullanılan hammadde, uygulanan teknik ve olgunlaşma süreci önemli rol oynamaktadır (Öztek, 1991). Peynirdeki olgunlaşma sürecine sütün doğal enzimleri, kimozen ve/veya lipolitik enzimler, starter, sekonder starter veya starter olmayan bakterilerin salgıladıkları enzimler, canlı veya ölü mikroorganizmalar ve kimyasal ve fiziksel reaksiyonlar oldukça etkilidirler (Hayaloğlu ve Özer 2011). Bu süreçte gerçekleşen birtakım mikrobiyolojik, biyokimyasal ve kimyasal olaylar sonucunda bazı son ürünler oluşmaktadır. Bu olaylardan birisi olan glikoliz; laktoz, laktat ve sitrat metabolizmasını kapsar. Bir diğeri lipoliz; yağ ve serbest yağ asitlerinin katabolizmasını içerir. Son olarak ve en önemlisi proteoliz ise protein ve amino asit katabolizmasını kapsar (Fox vd., 1993). Bu biyokimyasal olaylar sonucunda peynirde ilk olarak primer parçalanma ürünleri oluşmaktadır. Daha sonraki aşamalarda ise sekonder katabolizma olayları gerçekleşerek ileri parçalanma (sekonder) ürünlerin oluşumuna neden olur. Peynirde ortaya çıkan sekonder parçalanma reaksiyonları, amino asitlerin deaminasyonunu, dekarboksilasyonunu ve desülfürizasyonunu ile yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyon tepkimeleri ve esterleşme reaksiyonlarını kapsamaktadır (Erkaya, 2014).

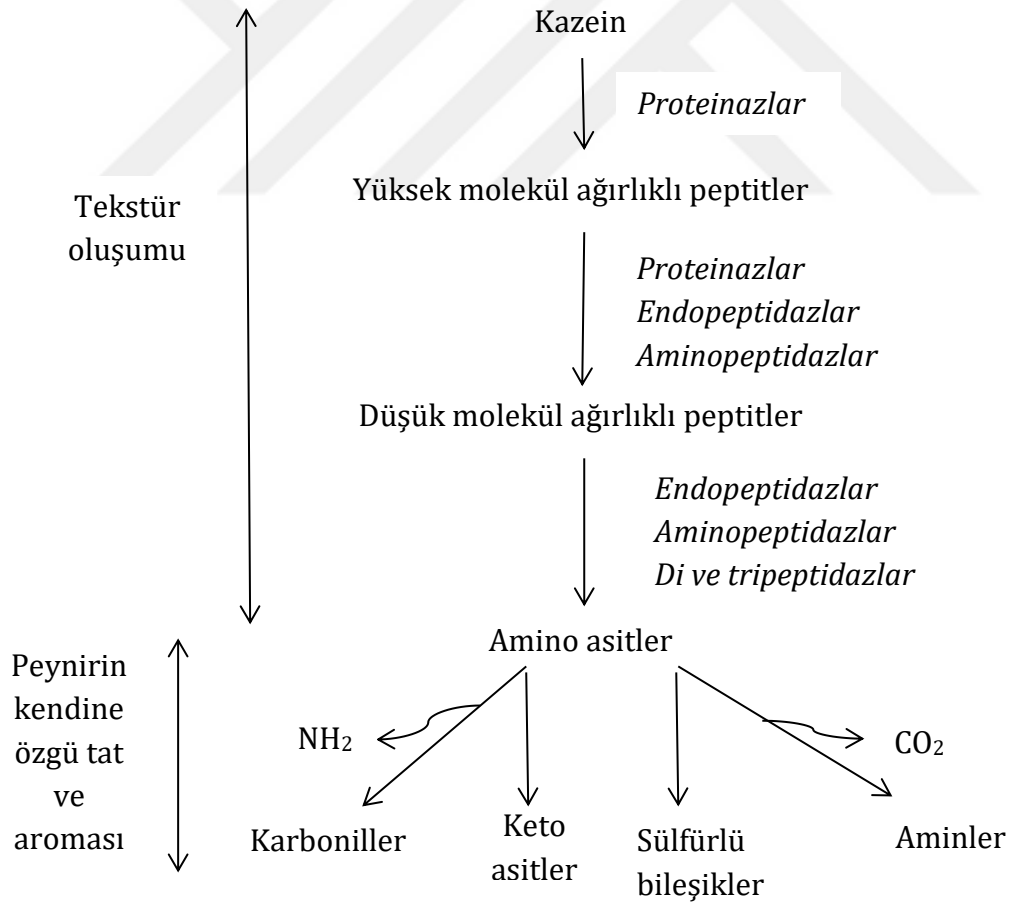
Peynirin üretim ve olgunlaşma sürecinde gerçekleşen en hızlı ve önemli biyokimyasal olaylardan biri olan glikoliz; peynir yapımı sırasında peyniraltı suyu ile uzaklaşan %98 laktoz dışında peynir kitlesinde kalan kalıntı laktozun laktik asit bakterileri (LAB) tarafından laktik asit, şekerli bileşikler ve organik

asitlere dönüştürülmesi olayıdır. Glikoliz olayı, laktoz metabolizması, laktik asit metabolizması ve sitrat metabolizması olmak üzere 3 önemli reaksiyonu kapsamaktadır. Peynirde oluşan laktoz metabolizması, laktozun LAB tarafından L-laktik asite çevrilmesini kapsamaktadır. Oluşan L-laktik asit, pH değerinin düşmesine neden olmakla birlikte kuvvetli proteolitik ve istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini önlemede etkilidir. Bunun yanı sıra L-laktik asit, peynirde hem koruyucu hem de kötü tat oluşumuna neden olabilecek kontrolsüz protein yıkımını önleyici etkiye de sebep olmaktadır (Fox vd., 1993; Hayaloğlu ve Özer, 2011; Üçüncü, 2020). Laktik asit metabolizması, LAB tarafından oluşturulan L-laktik asitin starter olmayan LAB tarafından DL-laktik aside rasemizasyonunun gerçekleştirilmesini kapsamaktadır. (McSweeney, 2004). Sitrat metabolizması ise sitrat pozitif mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilir ve daha ziyade gözlü Hollanda peynirleri için önem arz etmektedir (Hayaloğlu ve Özer, 2011). Peynirlerde lezzet için gerekli olan lipoliz, olgunlaşma sırasında lipaz ve esteraz gibi lipolitik enzimlerin etkisiyle lipidlerin hidrolizini ve bunun sonucunda gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonları kapsar. Trigliserid veya triaçilgliserol bünyesindeki yağ asidi ve gliserol arasındaki ester bağına hidrolize eden lipaz ve esteraz gibi enzimler ile gerçekleşen lipoliz sonucunda serbest yağ asitleri, mono veya digliseridler açığa çıkar (Marilley ve Casey, 2004). Peynirlerin olgunlaşma süresinde gerçekleşen biyokimyasal olaylardan en önemlisi olan proteoliz olayında, peynirin protein matriksinin hidrolizi gerçekleşir. Bu sayede proteoliz, peynir dokusunun gelişimine, ikincil katabolik değişiklikler için amino asitlerin salgılanmasına, peptidlerin ve serbest amino asitlerin (FAA) oluşumu yoluyla peynirin tadı ile birlikte lezzetine doğrudan katkıda bulunur (Fox, 1989).

### **2.3.1. Proteoliz**

Peynirde olgunlaşma esnasında gerçekleşen reaksiyonların en önemlisi olan proteoliz; süt pıhtılaştırıcı enzimler (kimozin, pepsin, bitkisel veya fungal asit proteinazları), sütün doğal proteinazları (plazmin, katepsin D ve belki diğer somatik hücre proteinleri), starter ve starter olmayan mikroorganizmalar ile sekonder mikroorganizmaların (*Penicillium camemberti*, *P. roqueforti*,

*Propionibacterium* spp., *Brevibacterium linens* vb.) salgıladıkları enzimler ve olgunlaşmayı hızlandırmak için kullanılan eksojen proteinazlar veya peptidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar zinciridir (McSweeney ve Sousa, 2000). Proteoliz esnasında, proteolitik enzimlerin, kalıntı pıhtılaştırıcı enzimin ve az da olsa plazminin etkisi ile önce yüksek moleküler ağırlıklı peptitlerden büyük ve orta molekül ağırlıklı peptitler oluşur. Daha sonra bu peptitler, starter ya da starter olmayan bakterilerin salgıladıkları enzimler vasıtasıyla daha düşük moleküler ağırlıklı peptitler ve serbest amino asitlere parçalanır (Hayaloğlu ve Özer 2011). Serbest amino asitlerin bir kısmı ileri proteolize uğrayarak transaminasyon, desülfürizasyon, demetilizasyon ve dekarboksilasyon gibi enzim-katalizör reaksiyonları sonucunda diğer bileşiklere dönüşebilir (Nout, 1994). Şekil 2.1.'de peynirde gerçekleşen proteolizin şematik görüntüsü verilmiştir.



Şekil 2.1. Peynir olgunlaşması sırasında proteolize uğrayan kazeinlerin parçalanması (Desmazeaud, 1983; Kılıç, 2001; Hutkins, 2006)

Rennet enzimi, olgunlaşma sürecinde kazeinin parçalanma mekanizmasında rol oynayan ilk proteolitik etkindir. Rennetin bu etkisi, sütün pıhtılaşması aşamasında  $\kappa$ -kazeinin Phe<sub>105</sub> – Met<sub>106</sub> arasındaki tek bir peptit bağıını hidrolize etmesinden kaynaklanır. Peynir oluşumu gerçekleşikten sonra peynir kitlesinde enzim, peynirin aroma ve tekstür oluşumunda hem olumlu hem olumsuz etkiye sahiptir. Olgunlaşmanın ilk aşamasında rennet enzimi  $\alpha_{s1}$ -kazein üzerinde etkili olur.  $\alpha_{s1}$ -kazeinin Phe<sub>23</sub>-Phe<sub>24</sub> ve Phe<sub>24</sub>-Phe<sub>25</sub> bağlarını kırması yolu ile olgunlaşmanın sonuna doğru  $\alpha_{s1}$ -kazeinin parçalanma oranı %95'e kadar çıkabilir.  $\beta$ -kazeindeki parçalanmalar üzerinde rennetin etkisi  $\alpha_{s1}$ -kazeinde olduğu kadar güçlü değildir ve  $\beta$ -kazeinin parçalanması olgunlaşmanın sonraki aşamalarında yavaş olarak gerçekleşir (Üçüncü, 2020). Bunun yanı sıra sütün doğal enzimleri olan plazmin, katepsin D gibi enzimler de kazeinin proteolizine katkı sunmaktadır. Plazmin özellikle  $\alpha_{s2}$ -kazein ve  $\beta$ -kazein başta olmak üzere tüm kazeinlere karşı aktif etki gösterir. Buna rağmen  $\alpha_{s1}$ -kazein ve  $\kappa$ -CN'e karşı sınırlı etkisi bulunur. Sütün doğal enzimleri ve kalıntı rennetin ile kazeinin proteolizi peynirde birincil proteoliz olarak isimlendirilir (Sousa vd., 2001; Hayaloğlu ve Özer, 2011).

Peynir üretiminde kullanılan starter bakterilerin, birincil proteolizde oluşan kazein türevlerini küçük peptitlere ve amino asitlere dönüştürmesi ile peynirde sekonder proteoliz olayları görülür. LAB'ların proteoliz üzerindeki etkisi, pıhtılaştırıcı enzimlere kıyaslandığında, kazeinin hidrolizinde olgunlaşmanın başlarında daha sınırlı kalmaktadır. Proteolizde LAB'ların asıl karakteristiği hücre içi proteazlara sahip olmalarından ileri gelir. Bu hücre içi proteazlar endopeptidaz, aminopeptidaz, karboksiptidaz ve dipeptidazlara kadar değişen farklı tipte proteolitik enzimleri kapsar. LAB'ların asıl etkisinin amino asit ve kısa zincirli peptitlerin oluşumuna yol açtığı ve termofil laktobasillerin proteolitik aktivitesinin mezofilik karakterde olan laktobasillerden daha fazla olduğu bilinmektedir (Üçüncü, 2020).

Peynirdeki kazeinlerin proteinazlar ile çeşitli büyüklükteki peptitlere, peptitlerin de bakteriyel peptidazlar ile amino asitlere dönüşümü ile proteoliz olayının son basamağı gerçekleşmiş olur. Bunun ilerisi olarak amino asit

katabolizması gerçekleşir. Amino asit katabolizmasında dekarboksilasyon, desülfürizasyon, deaminasyon ve transaminasyon olmak üzere 4 farklı reaksiyon görülür. Sülfür içeren amino asitlerin katabolize olması ile H<sub>2</sub>S, metantiyol, metil sülfidler ve diğer uçucu aromatik sülfür bileşikleri oluşur. Oksidatif deaminasyon ile amonyak ve keto asitlerin oluşumu gerçekleşir. Dekarboksilasyonla aminler oluşmakta ve oksidatif deaminasyon ile aldehitlere dönüşmektedir. Transaminasyon ile de amino asitlerin birbirine dönüşümleri gerçekleşmektedir (Hayaloğlu ve Özer, 2011).

Peynirlerde gerçekleşen proteoliz sayesinde ortaya çıkan orta ve küçük zincir uzunluğundaki peptitler ve serbest amino asitler, peynirin tat ve kokusunu olumlu ya da olumsuz (acılık tada neden olan peptitlerin oluşumu ile) şekilde direk olarak etkiler. Açığa çıkan amino asitlerin aminlere, asitlere, tiollere vb. katabolize olması da peynirin tat ve kokusuna katkı sağlamaktadır. Amonyak (NH<sub>3</sub>) bileşenlerinin proteoliz reaksiyonları sırasında oluşarak peynirde hem pH'yı ve hem de tat ve kokuyu etkiler (Wishah, 2007). Ayrıca proteoliz sırasında oluşan düşük molekül ağırlığındaki peptitlerin bir takım fonksiyonel özellik gösterebildiği ve proteoliz ilerledikçe oluşan peptit profillerinin ve özelliklerinin değiştiğine dair bulgular literatürde mevcuttur (Fox, ve Kelly, 2006; Erdmann vd., 2008; Harnedy ve FitzGerald, 2012; Ahtesh vd., 2017; Albenzio vd., 2017; Bhat vd., 2017; Öner ve Sarıdağ, 2018b).

#### **2.4. Biyoaktif Peptitler**

Biyoaktif peptitler; proteinlerin içinde inaktif halde bulunan ve proteolitik enzimler ile proteolize uğradıktan sonra açığa çıkan, vücuda yararı olan çeşitli fonksiyonel etkiler sağlayabilen, proteinlerin spesifik parçalanma ürünleri olarak tanımlanan peptitlere denilmektedir. Biyoaktif peptitler, genel olarak 2-20 amino asidin amid veya peptit bağı ile bağlanmasıyla oluşan organik maddelerdir. Bu maddeler insan vücudunda hormon veya ilaç benzeri aktiviteler göstererek kronik hastalık riskini azaltan potansiyel değiştiriciler olarak hareket edebilirler. Peptitler, sentetik olarak ya da gıdaların içindeki doğal proteinlerin fermentasyon ve enzimatik hidrolizi yoluyla

üretilebilmektedir (Erdmann vd., 2008; Harnedy ve FitzGerald, 2012; Bhandari vd., 2020).

Sindirim sisteminin içinde enzimatik hidroliz ile protein yapısından koparak açığa çıkan biyoaktif peptitler, kan akışı yoluyla hedef organlara ulaştıktan sonra fizyolojik olarak fayda gösterebilirler. Sindirim sistemi içinde protein gibi büyük moleküllü besinler sindirim enzimleri ile sindirildikten sonra daha küçük moleküllere parçalanarak bağırsakta absorbe edilmektedir. Ancak di- ve tri-peptit gibi kısa zincirli peptitlerin sindirim enzimleri ile hidrolize olup parçalanmalarına gerek olmadan bağırsakta absorbe edilip hedef organa ulaşmaları mümkündür (Shah, 2000). Bu kısa zincirli peptitlerin boyutlarının küçük ve hidrofobik özellikte olmaları daha kolay absorbe edilmelerini sağlar (Kınık ve Gürsoy, 2002). Biyoaktif peptitlerin amino asit dizilimi ve dizilimdeki amino asitlerin sayısı, peptidin sahip olduğu antimikrobiyal, antioksidan, antidiyabetik, antihipertansif gibi çeşitli biyoaktif özellikleri direkt olarak etkileyen bir unsurdur (Erdmann vd., 2008; Harnedy ve FitzGerald, 2012).

Süt ve süt ürünleri protein içeriği yönünden zengin olduğu için kazeindeki ana proteinler ve peynir altı suyu proteinleri, temel biyoaktif peptitlerin öncüleri olarak görülmektedir (Ahtesh vd., 2017). Taze çiğ sütte doğal olarak bulunan plazmin-plazminojen enzim sistemi ile lizozomal enzimler sütteki iki ana proteinaz sistemini oluşturur. Bununla birlikte sütte bulunan diğer proteolitik enzimler ve mikroorganizma kaynaklı enzimler, sütün salgılanması ve depolanması sırasında biyoaktif peptitlerin oluşumunda rol oynamaktadır. (Fox, ve Kelly, 2006; Albenzio vd., 2017). Literatürde farklı süt tiplerinden elde edilen biyoaktif peptitlerin yüksek bir miktarının  $\alpha_{s1}$ -CN'den, kalanının ise çoktan aza doğru  $\beta$ -kazein,  $\alpha_{s2}$ -kazein ve  $\kappa$ -CN'den türediği bildirilmiştir (Silva vd., 2019).

Starter kültür olarak kullanılan LAB ile fermente edilerek üretilmiş süt ürünleri, enerji ve besin sağlamanın yanı sıra mükemmel bir biyoaktif peptit kaynağıdır. LAB sütte fermentasyon sırasında biyoaktif peptitlerin üretilmesinden öncelikle sorumludur. Fermentasyon sürecinin antihipertansif özellikleri arttırdığına yönelik yapılmış bir çalışmada, fermente süt ürünlerinden elde edilen suda

öznen ekstraktlarda ACE-inhibitör aktivite %74,3 olarak belirlenirken pastörize süt ve UHT sütün suda çözünen ekstraktlarının ACE-inhibitör aktivitesinin %2'nin altında olduğu belirlenmiştir. Araştırıcılar bu sonuca göre fermentasyonun süt proteinlerinden ACE'yi inhibe edici peptitlerin salınmasında önemli bir rol oynadığını gösterdiği yorumunu yapmışlardır (Hernndez-Ledesma vd., 2005).

Peynirlerde proteoliz sonucu açığa çıkan biyoaktif peptitler, peynirin lezzetine ve dokusuna katkıda bulunmaya ek olarak ayrıca ACE-inhibitör, immünomodülatör, opioid, antioksidan ve antimikrobiyal dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteler gösterir (Yang vd., 2021). Peynir olgunlaşması sırasındaki ikincil proteoliz, peynirin olgunlaşma aşamasına bağlı olarak biyoaktif peptitlerin oluşumuna yol açabilir (Bhat vd., 2017). Yoğurt, taze peynir ve kuark gibi düşük proteoliz derecesine sahip ürünlerin düşük ACE-inhibitör aktivitesi sergilediği belirlenmiştir (Ryhnen vd., 2001).

Biyoaktif peptitlerin terapötik amaçlar için kullanımını belirlemek açısından peptitlerin immün sisteme karşı olan etkilerini ve toksisitesini değerlendirmek ve böylece biyoaktif peptitlerin güvenilirliğini ortaya koymak önemli bir husustur. Prehipertansif ve hipertansif insanlar ile yapılan bir çalışmada plasebo tedavisi alanlara kıyasla lakto-tripeptid (Ile-Pro-Pro) açısından zengin süt proteini hidrolizatlarına tabi tutulan hastalarda, serum biyokimyası ve farklı idrar parametreleri üzerinde hiçbir olumsuz etki gözlenmemiştir (Boelsma ve Kloek, 2010).

#### **2.4.1. Antihipertansif (ACE-inhibitör) peptitler**

Dünya çapında insan sağlığını olumsuz etkileyen en önemli kardiyovasküler hastalıklarından biri hipertansiyondur. Yüksek kan basıncı, kardiyovasküler hastalıklar için önde gelen risk faktörüdür. Hipertansiyon kalp hastalığına bağlı ölümlerin en az %45'inden ve koroner kalp hastalığına bağlı ölümlerin %51'inden sorumludur (WHO, 2020). Bu sorunun artmasıyla ilgili temel faktörler, yüksek kalorili gıdaların aşırı tüketimi ve tüketicilerin fiziksel

aktivitelerinin azalmasıdır. Dünya Sağlık Örgütü'nün bulaşıcı olmayan hastalıklara yönelik küresel hedeflerinden biri, 2010 ile 2030 yılları arasında hipertansiyon prevalansını %33 oranında azaltmaktır (WHO, 2021).

Vücutta tansiyonun düzenlenmesini kontrol eden ve buna etki eden birçok biyokimyasal mekanizma olsa da en çok bilinenlerden ilki renin-anjiyotensin sistemi ile ilişkilendirilen bir sistemdir. Bu ilk sistemde; karaciğerde üretilen ve bir plazma proteini olan anjiyotensinojen, renin enzimi ile hidrolize olur. Bunun sonucunda inaktif bir peptit olan anjiyotensin-I oluşur. Anjiyotensin- I' in karboksil ucunda bulunan 2 amino asit, ACE tarafından ayrılır ve böylece bir oktapeptit olan anjiyotensin-II meydana gelir. ACE enzimi aracılığı ile oluşan anjiyotensin-II peptidi vücutta potansiyel bir damar daraltıcı olarak görev yapar. Vücuttaki tansiyon düzenlenmesinde görev yapan ikinci önemli sistemde ise ACE, damar genişletici bir etki sağlayan bradykinin enzimini parçalar. Çinko proteaz sınıfına ait bir dipeptidil karboksipeptidaz olan ACE, plazma, akciğer, böbrek, kalp, iskelet kası, pankreas, beyin gibi dokularda bulunur (Saleh vd., 2016). Vücutta oluşturduğu damarların daralmasına neden olan aktivitesi sebebiyle ACE, kan basıncını yükseltmekte ve dolayısıyla yüksek tansiyona sebep olmaktadır. Bu enzimin aktivitesini çeşitli sentetik inhibitör içeren ilaçlarla tedavi etmek en yaygın yol olsa da bu ilaçlar hastalarda baş ağrısı, kronik kuru öksürük, anjiyonörotik ödem ve bozulmuş tat algısı gibi bazı olumsuz semptomlara neden olmaktadır (Lin vd., 2020). Bu sebeple hipertansiyonu kontrol etmek için nutrasötik alternatiflere odaklanılmıştır. Özellikle son yirmi yılda yapılan birçok çalışmada araştırmacılar, diyet proteinlerinden türetilen peptitlerin ACE'yi inhibe edici aktivitesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Yapılan birçok çalışma sonucunda elde edilen peptitlerin, *in vitro* ACE-inhibitör özellikleri ve *in vivo* antihipertansif etkiler sergilediği görülmüştür (Rai vd., 2017; Lin vd., 2020).

Antihipertansif (ACE-inhibitör) peptitler, bir kez ana proteinden salındığında renin-anjiyotensin sistemini modüle eden ve vücuttaki kan basıncını düzenleme yeteneğine sahip olan peptitlerdir. Bu nedenle ACE-inhibitörleri, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ile kan basıncını kontrol eder. Bilinen

ACE-inhibitör peptitlerin çoğu yarışmalı inhibitör olmakla birlikte yarışmalı olmayan inhibitörler tüm kompleksi inaktive etmek için ACE'nin aktif bölgesinden ziyade başka bir bölgesinde ACE'ye bağlanabilir. Substrat enzime bağlansın veya bağlanmasın, çoğunlukla ACE-inhibitörü enzime bağlanma özelliğindedir. Ancak nadiren bir ACE-inhibitör peptit, yalnızca substrat ACE'ye bağlandığında ACE'ye bağlanma özelliğini göstermektedir (Nakagomi vd., 1998; Lee vd., 2010; Aluko, 2015a; Fu vd. 2016). ACE'nin katalitik bölgesine peptidin bağlanması için peptitin karbon ucunda tripeptit yapısında aromatik ya da dallı hidrofobik yapıların bulunması gerekir (Hernández-Ledesma vd., 2005; Gómez-Ruiz vd., 2006; Ong vd., 2007). Çoğu ACE-inhibitörlerin bağlanma bölgesinde hidrofobik amino asitler bulunmaktadır. ACE-inhibitör peptitlerin karboksi terminalinde prolin amino asidi ile birlikte lisin ve arjinin amino asitlerinin de bulunduğu literatürde bildirilmiştir. Bu amino asitlerin yan zincir grupları ile pozitif yükün ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Udenigwe ve Aluko, 2012). Yapılan bir çalışmada ise anyonik özellikteki bazı peptitlerin, ACE'de bulunan çinkoyu şelatlama özelliği sayesinde ACE inhibisyonunu sağladığı bildirilmiştir (Aluko, 2015b).

ACE-inhibitör peptitlerin aktivitesini hem *in vitro* hem de *in vivo* yöntemler ile ölçmek için araştırmalarda kullanılan farklı parametreler bulunmaktadır. ACE aktivitesini %50 azaltan bir peptit konsantrasyonu olan IC<sub>50</sub>; inhibitör potansiyelin bir göstergesi olarak kabul edilmekte, bu gösterge çoğunlukla *in vitro* deneylerde kullanılmakta ve ne kadar düşük olursa ACE-inhibitör etki o kadar yüksek olmaktadır. ACE-inhibitör peptit uygulamasının etkisini doğrudan gösteren *in vivo* hayvan ve insan çalışmalarında ise yaygın olarak arteriyel, sistolik veya diyastolik kan basıncının yön ölçümü ile birlikte belirlenen ve deneklerin plazmasında bulunan ACE seviyeleri, ilgili peptidin deneğin kan dolaşımına sağlam şekilde ulaşıp ulaşmadığı hakkında fikir vermektedir (Aluko, 2015a; Martin vd., 2020).

Protein yönünden miktar ve çeşit olarak zengin bir gıda olan süt ve süt ürünleri, ACE-inhibitör peptit eldesi açısından üzerinde sıklıkla çalışılan gıdaların başında gelmektedir. Süt proteinlerinden elde edilen ACE-inhibitörlerden

kazein fragmentleri kasokinin adıyla bilinirken (Meisel, 1993) serum protein fragmentleri laktokinin adı ile bilinmektedir (FitzGerald ve Meisel, 1999). İzolösin-Prolin-Prolin (IPP) ve Valine-Prolin-Prolin (VPP), fermente veya enzimatik olarak işlenmiş sütte bulunan en iyi karakterize edilmiş peptitlerdir (Nakamura vd., 1995).

Peynirlerde ACE-inhibitör aktiviteye sahip biyoaktif peptitlerin stabilitesinin pH, tuz ve peynirin olgunlaşma koşulları altında mevcut olan enzimlerin türü gibi çeşitli faktörlere bağlı olduğu bilinmektedir (Bhat vd., 2017). Tuz azaltımı, *Lactobacillus helveticus* LHB02 ilavesi ve Prato peynirinin olgunlaşma süresi gibi parametrelerin antihipertansif potansiyel üzerindeki etkisi yapılan bir çalışmada araştırılmıştır. Hem tuzun azaltılması hem de ek kültürün eklenmesi, biyoaktif peptit  $\beta$ -CN (f193-209) birikimini desteklenmiştir (Baptista vd., 2020). Ong vd. (2007) tarafından yürütülen bir çalışmada, Cheddar peynirine probiyotik kültürlerin (*Lactocaseibacillus casei* 279 ve *L. casei* LAFTI L26 suşları) eklenmesinin, muhtemelen artan proteoliz nedeniyle, 4°C'de olgunlaşma sırasında peynirlerin ACE-inhibitör aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir.

Saito vd. (2000), çalıştıkları birkaç peynir çeşidi arasında iki yıllık Gouda peynirinde en yüksek ACE-inhibitör aktivitesini saptamışlardır. Araştırmacılar 8 aylık Gouda peynirinden güçlü ACE önleyici aktivite gösteren birkaç peptit izole etmişler ve sırasıyla  $\alpha_{s1}$ -kazein f(1-9) ve  $\beta$ -kazein f(60-68)'den türetilen iki peptit şeklinde tanımlamışlardır. Yapılan başka bir çalışmada en az 15 günlük olan Manchego peynirinde bir miktar ACE-inhibitör aktivitesi gözleendiği, aktivitenin ilk 4 ayda azaldığı, proteoliz ilerlediğinde arttığı ve 12. ayda tekrar azaldığı bildirilmiştir (Gómez-Ruiz vd., 2002).

Farklı hayvanların sütünden yapılmış ve üretiminde farklı teknikler kullanılmış çeşitli İspanyol peynirlerinden <1000 Da molekül ağırlığında peptitler elde edilmiştir. Bu peptitlerin ACE-inhibitör aktivitesi incelendiğinde, en yüksek değerin Cabrales peynirine ait peptit ekstraktında, en düşük değerin ise Mahon peynirine ait peptit ekstraktında olduğu görülmüştür. Bu aktiviteye sebep olan peptitlerin  $\beta$ - ve  $\alpha_{s1}$ -CN'den türediği, bunlardan birkaçının C-terminal amino asit

olarak prolin varlığı temelinde seçilip kimyasal olarak sentezlendiği çalışma sonucunda rapor edilmiştir (Gómez-Ruiz vd., 2006).

Yapılan bir çalışmada, Asiago peynirlerine ait suda çözünen ekstraktlardan UF yolu ile elde edilen uzun (10 kDa) ve kısa peptitlerin (3 kDa) ACE önleyici aktivitesi araştırılmıştır (Lignitto vd., 2010). Çalışma sonucunda 3 kDa'dan küçük peptitleri içeren fraksiyonun ACE-inhibitör aktivitesinin, 10 kDa'dan küçük fraksiyona göre daha yüksek olduğu, bunun sonucunda kısa peptitlerin ACE-inhibitör aktiviteye daha fazla katkı sağladığı tespit edilmiştir.

Gürkan (2019) tarafından yürütülen bir çalışmada üretilen peynirlerden elde edilen pH 4,6'da çözünen (pH 4,6-SN) fraksiyonların, retentat ve filtrat fraksiyonlarına göre daha yüksek ACE-inhibitör aktivitesi gösterdiği ifade edilmiştir. Bir başka çalışmada, bazı *Lactococcus* spp. starter bakteriler ile *Lactobacillus* spp. yardımcı kültür bakteri kombinasyonları kullanılarak Beyaz peynir üretilmiş ve iki farklı sıcaklıkta (6°C ve 12°C) 120 gün süre ile olgunlaştırılmıştır. Olgunlaşma süresi ilerledikçe her iki depolama sıcaklığında da peynirlerinin ACE-inhibitör aktivitesinde artış olduğu saptanmıştır (Şahingil, 2012). Artan protein içeriği ve ek kültür ilavesinin de ACE-inhibitör aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir (Cavalheiro vd., 2020).

#### **2.4.2. Antioksidan peptitler**

İnsan vücudu bazı yaşamsal ve çevresel faktörler sebebiyle sürekli olarak serbest radikallere, endojen veya eksojen oksidatif strese maruz kalmaktadır (Leeb vd., 2014). Bu serbest radikaller ve aktif oksijen hızla ortadan kaldırılamazsa insan vücudundaki serbest radikal dengesini bozabilir. Aşırı serbest radikaller hücrelere, dokulara ve DNA'ya saldırır. Bu durum sonucunda DNA, protein ve lipidlerle ilgili kardiyovasküler hastalıklar, dejeneratif hastalıklar, arterioskleroz ve kanser gibi kronik hastalıklara yol açılabilir (Kryston vd., 2011; Harnedy ve FitzGerald, 2012).

Doğal antioksidan bileşikler tarafından serbest radikallerin inhibe edilmesi ve temizlenmesi, vücuttaki oksidatif hasarı azaltmak ve önlemek için etkili bir önlem olarak kabul edilir. Gıda sistemlerinde bulunan antioksidan peptitler, doğal antioksidan bileşiklerden biridir. Literatürde antioksidatif peptitlerin genel olarak 5-16 amino asitten oluştuğu fakat bu sayının değişebileceği bildirilmiştir. Antioksidatif peptitlerin kolaylıkla absorbe edilebilmeleri, düşük molekül ağırlıklarına rağmen yüksek aktivite sergileyebildikleri ve farklı koşullarda stabil oldukları belirtilmiştir (Dhaval vd. 2016). Antioksidan aktiviteye dahil olan peptitler, tek elektron transfer reaksiyonlarını indükleyebilmeli veya bu reaksiyonlarda yer alabilmelidir. Bu nedenle fizyolojik bir pH'da elektronları transfer edebilen amino asitlerin antioksidan aktivitelere katılabileceği düşünülmektedir (Huang vd., 2005).

Antioksidan peptitler, serbest radikallerin oluşumunu önleyerek veya onları temizleyerek antioksidan savunma sistemlerinin korunmasında hayati bir rol oynamaktadır. Bu yüzden son yirmi yılda gıdalardan doğal antioksidan peptitlerin elde edilmesi ile ilgili çalışmaların ve bu konuya olan ilginin arttığı görülmüştür. Antioksidan peptitler, oksidatif stresi önleme ve birçok kronik hastalığın ilerlemesini geciktirebilme hususunda umut verici bir doğal gıda bileşeni olarak kabul edilmektedir.

Antioksidan peptitlerin oluşumu, endojen ve eksojen mikroorganizmaların aktivitesi ve proteolitik enzimler ile gerçekleşmektedir. Proteolitik özellikteki doğal süt enzimleri ile pıhtılaştırıcı enzimler, starter mikroorganizma tarafından üretilen enzimler, starter olmayan ve ikincil kültürlerle ait eksojen enzimler gibi peptitlerin oluşumunda çeşitli proteolitik ajanlar rol oynayabilirler (Lorenzo vd., 2018). Peptitlerin yapısı, hidrofobik özellikte olması, amino asit çeşidi ve sayısı gibi faktörler antioksidan özelliklerini etkilemekle birlikte bir diğer yandan peptitlerin antioksidan özelliği radikal süpürme, lipid peroksidasyonu inhibisyonu ve metal iyon şelasyonu özelliklerini sağlaması ile ilişkilidir (Suetsuna vd., 2000; Sarmadi ve Ismail, 2010).

Süt ve süt ürünleri, faydalı besin özellikleri nedeniyle insan diyetinin vazgeçilmez bir parçasıdır. Süt, makro ve mikro besinler içermesinin yanı sıra, değerli bir antioksidan bileşik kaynağı olup oksidasyon ve pro-oksidatif süreçlerde dengeli bir rol oynar (Manzi ve Durazzo, 2017; Padghan vd., 2017a). Süt proteinleri ise biyoaktif peptitlerin en önemli kaynağı olarak kabul edilir ve süt proteini hidrolizatlarında ve fermente süt ürünlerinde bu tür peptitlerin sayısı giderek artmaktadır (El-Salam ve El-Shibiny, 2013).

Gupta vd. (2009), yardımcı kültür kullanılarak üretilen Cheddar peynirlerinden farklı olgunlaşma sürelerinde elde edilmiş suda çözünen ekstraktların antioksidan özelliklerindeki değişiklikleri araştırmışlardır. Çalışma sonucunda araştırmacılar, Cheddar peyniri yapımında kullanılan ve proteolitik aktiviteye sahip yardımcı kültürün antioksidan aktivitenin artmasına katkı sağladığını ancak olgunlaşmanın 5. ayından sonra antioksidan aktivitede azalış olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar gözlemledikleri bu azalışı, proteolitik aktivite sonucunda antioksidan peptitlerin proteolize karşı dirençli olmayıp parçalanması ile açıklamışlardır.

HPLC-MS/MS kullanılarak peynirde antioksidan aktiviteye sahip önemli peptitlerin belirlendiği Gupta vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada,  $\beta$ -CN'e ait VKEAMAPK diziliminde olan (f98-105) fraksiyon ile  $\alpha_{s1}$ -CN'e ait HIQKEDVPSEER diziliminde olan (f80-90) fraksiyon tanımlanmıştır. Bir başka çalışmada 3 farklı Avustralya Cheddar peynirlerine ait suda çözünen ekstraktlardan elde edilen ve 10 kDa'dan daha büyük molekül ağırlığına sahip peptitleri içeren fraksiyonların yüksek antioksidan aktivite sergilediği belirlenmiştir (Pritchard vd., 2010b). Rennete ek olarak farklı miktarlarda Neutrase enzimi ilave edilmiş Domiati peynirlerinde antioksidan aktivitesinin olgunlaşma esnasında önemli ölçüde arttığı, yüksek miktarda Neutrase ilave edilen peynirde daha yüksek antioksidan aktivite gözlemlendiği bildirilmiştir (Taha vd., 2020).

Peynir üretiminde küflü peyniri bulamacı kullanımının peynirlerdeki etkileri üzerinde yapılan çalışmada, mikroflora ve proteolizdeki farklılık nedeniyle

biyoaktif peptitlerin çeşidi, sayısı ve aktivitesinin etkilenmiş olabileceği yorumu yapılmıştır (Boran, 2021). Meira vd. (2012), Roquefort peynir örneklerinden elde ettikleri suda çözünen ekstraktlarda %87 oranında radikal süpürme gücünü tespit ederken, Feta peynir örneğinden elde edilen ekstraktlarda ise bu değerin %32-45 arasında olduğunu belirlemişlerdir.

Geleneksel teknikle üretilmiş ve 3 ay olgunlaşmış Kaşar peynirlerinden elde edilen suda çözünen ekstraktlarda ve bu ekstraktlardan HPLC ile elde edilen fraksiyonlarda antioksidan aktivite değerleri araştırılmıştır. Peynirlerin antioksidan değerinin olgunlaşma süresine göre değiştiği ve bu değişimin önemli olduğu bildirilirken fraksiyonların aktivitesinin genel olarak peynirlerden elde edilen değerden çok daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Öner ve Sarıdağ, 2018a). Bottesini vd. (2013), Parmigiano-Reggiano peynirinden elde ettikleri suda çözünen ekstraktın antioksidan aktivitesine olgunlaşma süresinin önemli bir etkisinin olmadığını ifade etmişlerdir. Araştırmacılar tirozin, metionin ve triptofan gibi serbest amino asitlerin antioksidan kapasitede önemli rol oynadığını belirtmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada, farklı sütlerden yapılmış Edirne Beyaz peynir örneklerinden elde edilen antioksidan değerlerinin depolamanın başında düşük bulunduğu bildirilmiştir (Demir, 2021). Yapılan başka bir çalışmada, yerel Meksika Cotija sert peynirlerinden olgunlaşma süresi boyunca elde edilen fraksiyonlarda, olgunlaşma ilerledikçe antioksidan aktivitenin arttığı, en yüksek antioksidan aktivitenin olgunlaşmanın 24. haftasında gözlemlendiği, bu aktivitenin fraksiyonlardaki peptit türleri ile alakalı olduğu sonucuna varılmıştır (Hernández-Galán vd., 2016).

Hernández-Ledesma vd. (2005), fermente süttten elde ettikleri suda çözünen ekstraktlardan topladıkları ve dizilimini belirledikleri fraksiyonların arasından yüksek antioksidan aktivite gösteren fraksiyonda prolin kalıntıları içeren farklı peptitlerin olduğunu ve antioksidan aktiviteye prolin kalıntılarının katkısı olabileceğini öne sürmüşlerdir.

### 2.4.3. Biyoaktif peptitlerin *in vitro* olarak sindirilmesi

Gıdalardaki proteinlerin sindirimi midede başlar ve proteinlerin yapısında bulunan peptitler, gastrointestinal sindirim sırasında enzimatik proteoliz yoluyla olduğu gibi açığa çıkar. Oluşan bu peptitlerin biyoyararlılıklarını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Birinci faktör peptidin yapısı ve bileşimine ait temel özellikler olup bunlar peptidin boyutu, moleküler ağırlığı, amino asit dizilimi ve sayısı, peptit yükü, hidroliz derecesi, hidrofobik özelliği ve diğer gıda bileşiklerinin varlığıdır. İkinci faktör ise kapsülleme ve ağız yoluyla vücuda alınması, vücutta dağılımını etkileyen teknolojik özellikler ve gen-diyet etkileşimleridir. Üçüncü faktör ise gastrointestinal sisteme ait özellikler olup bunlar bağırsak mikrobiyotası, gastrik boşluk oranı ve beslenme şekli gibi bireye özgü özelliklerdir (Ay ve Şanlı, 2018).

Gastrointestinal sistem içinde protein ve peptitlerin parçalanarak değişime uğraması ve sonrasında absorbe olarak vücutta biyoyararlılıklarını sergilemeleri önem arz etmektedir (Sun vd., 2018). Bu peptitlerin sağlığı teşvik edici aktivite sergileyebilmeleri için gastrointestinal proteazlara karşı direnç ve herhangi bir bozulma olmaksızın kan serumuna kolay absorpsiyonları gerekmektedir. Bu stabilite, *in vitro* biyoaktivite gösteren sindirilmiş peptit dizilerinin istenen hücresel etki bölgelerine güvenli bir şekilde ulaşmasını sağlamaktadır (Fitzgerald vd., 2004). Farklı tip peynirlerde yapılan bir çalışmada 8 ACE-inhibitör peptidi tanımlanmış ve ölçülmüştür. Bu miktarların, *in vitro* gastrointestinal sindirimden farklı şekilde etkilendiği bildirilmiştir (Stuknytė vd., 2015). Başka bir çalışmada, İspanyol mavi peynirinde *in vitro* gastrointestinal sindirimin peptidomik profili üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda araştırmacılar, bazı peptitlerin sindirim sırasında parçalandığını, bazılarının ise gastrointestinal proteazlar tarafından yeni salındığını belirtmiştir. Araştırmacılar sindirim sonunda, daha fazla sayıda biyoaktif peptit tespit ettiklerini bildirmişlerdir (Sánchez-Rivera vd., 2014b). Yapılan bir başka çalışmada, Parmigiano-Reggiano peynirinin *in vitro* gastrointestinal sindirimi sırasında 8 antihipertansif peptit tanımlanmış ve VPP ile IPP gibi bazı peptitlerin konsantrasyonunun çoğunlukla *in vitro* sindirimden

etkilenmediği, HLPLP ve LHLPLP peptit seviyelerinin sindirim işleminden sonra büyük ölçüde arttığı bildirilmiştir (Basiricò vd., 2015).

Olgunlaşmanın ve *in vitro* sindirimin Parmigiano-Reggiano peynirlerinin peptidomik profili üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, olgunlaşmanın 12., 18. ve 24. ay gibi farklı depolama sürelerinde alınan üç peynir numunesinin peptidomik profili incelenmiştir. Peynirlerin *in vitro* sindirim sonrasında belirlenen biyoaktif peptit sayısının sindirilmemiş peynirlere göre daha fazla olduğu, bazı peptitlerin bozulduğu ve diğerlerinin olgunlaşma sırasında serbest kaldığı belirtilmiştir (Martini vd., 2020).

Cheddar peynirine *L. casei* ve *Lactiplantibacillus plantarum* ilavesinin, olgunlaşma süresi boyunca ve simüle gastrointestinal koşullar sonrasında antioksidan özelliklere olan etkisi yapılan bir çalışmada değerlendirilmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca, DPPH ve hidroksil radikallerin süpürülmesinin 16. haftada maksimum seviyeye ulaştığı, süre boyunca genel olarak probiyotik peynirin antioksidan değerlerinin kontrolden önemli ölçüde yüksek olduğu, bu durumun simüle edilmiş gastrointestinal koşullardan sonra da benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Chen vd., 2019).

İnek sütü kazein fraksiyonlarının ( $\beta$ -,  $\kappa$ - ve  $\alpha_s$ ) pepsin, tripsin ve kimotripsin ile muamelesi öncesi ve sonrasında elde edilen hidrolizatların antioksidan aktivitelerinin değerlendirildiği bir çalışmada tüm fraksiyonlarda hidroliz sonrasında antioksidan aktivitenin yükseldiği, özellikle  $\kappa$ -kazein fraksiyonunun antioksidan aktivitesinin 3 kat arttığı bildirilmiştir (Gómez-Ruiz vd., 2008). Süt proteinlerinden türetilen MAP1 ve MAP2 peptitleri ile yapılan bir çalışmada sadece MAP1'in *in vitro* sindirim sonrasında güçlü inhibitör etki ve kan basıncında azalma gösterebildiği rapor edilmiştir (Boelsma ve Klocek, 2010). Yapılan başka bir çalışma  $\beta$ -kazein'den türeyen bir inhibitör peptidin (LHLPLP), HLPLP peptidine hidrolize olup farklı proteazlara karşı daha stabil olduğu ve kan basıncını korumada başarılı olduğu belirtilmiş ve bu sonuca göre ilgili peptidin sindirim sonrası biyoyararlanım gösterdiği öne sürülmüştür (Quirós vd., 2008).

Himalaya sert chhurpi peynirinin simüle edilmiş *in vitro* gastrointestinal sindirimi sonucunda elde edilen hidrolize protein değerinin, antioksidan ve ACE-inhibitör aktivitelerinin arttığı gözlenmiştir. Çalışmada elde edilen SLVYPPFGPI peptidi, sindirilmiş inek sert chhurpi peyniri, yak (Tibet ineği) sert chhurpi peyniri ile sindirilmemiş inek sert chhurpi peynirinden elde edilmiş ve bu peptidin ACE'ye karşı daha güçlü bağlanma afinitesi gösterdiği belirlenmiştir (Abedin vd., 2022). Emmental peynirinin *in vitro* koşullar altında suda çözünen ekstraktının pepsin ve tripsin ile ardışık olarak sindiriminin, sindirilmemiş ekstrakt ile karşılaştırıldığında ACE inhibisyonunda bir artışa neden olduğu görülmüştür (Parrot vd, 2003).

Ticari olarak temin edilebilen birkaç fermente süt ve taze peynirin sindirilmenden önce gösterdikleri ACE-inhibitör aktivitenin, pepsin ve Corolase PP (esas olarak tripsin ve kimotripsin aktiviteleri gösteren domuz pankreasından elde edilen) ile simüle edilmiş gastrointestinal sindirimden sonra stabil olarak kaldığı veya arttığı Hernández-Ledesma vd. (2004) tarafından yapılan çalışmada bildirilmiştir.

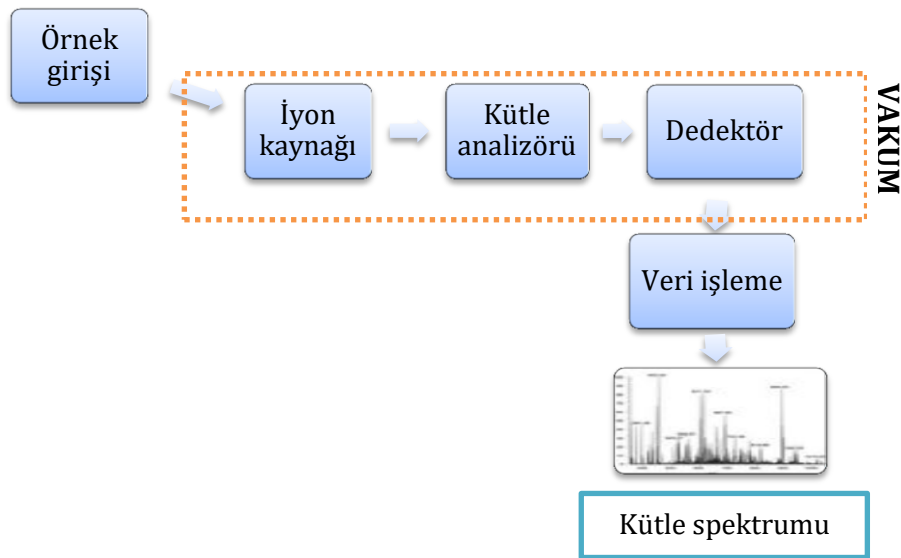
ACE-inhibitör etki gösterdiği bilinen peptitlerin bazı insan çalışmalarında kan basıncını düşürmede yetersiz kaldığı görülmüş ve bu durum peptitlerin gastrointestinal kanaldaki etkinliklerinin kaybı ile açıklanmıştır (Lee vd., 2007; Van der Zander vd., 2008). ACE-inhibitör peptitler üzerine yapılan çoğu klinik çalışmada, mikrobiyal proteazlar ile proteinlerin hidrolizi sonucu elde edilen peptitler kullanılmıştır. Bu peptitlerin, mide ve bağırsak kanalında asit veya çeşitli proteolitik sindirim enzim (pepsin, kimotripsin ve çeşitli peptidazlar gibi) kaynaklı hidrolizasyona daha duyarlı olduğu görülmüştür (FitzGerald ve Meisel, 2000). Ek olarak, gastrointestinal kanalda doğal olarak bulunan mikroorganizmaların da peptit hidrolizini katalize edebilen ek proteaz ve peptidazları ürettiği bilinmektedir. Bu faktörler sebebi ile peptitlerin yapısı sindirim sırasında değişime uğradığı için biyoyararlılıkları da değişebilmektedir.

## 2.5. Kütle Spektrometresi

Günümüzde metabolomiks, genomiks, proteomiks gibi önemli biyokimyasal çalışmaların yapıldığı birçok farklı alanlarda yüksek hassasiyet, hız ve kullanım kolaylığı sağlaması nedeniyle kütle spektrometreleri ile yapılmış çalışmalara sıklıkla rastlanmaya başlanmıştır. İlaç keşifleri, moleküllerin karakterizasyonu, toksisite kontrolü, gıdaların analizleri, çevresel kimyasalların incelenmesi gibi analizlerde de örneklerin hazırlanmasında kolaylık ve analizde hız sağlaması nedeniyle kütle spektrometrik yöntemlere ilgi artmıştır. Analitik uygulamalar haricinde kütle spektrometrik analizlerin izotopik ölçümlerde, gaz fazı reaksiyon mekanizmalarının aydınlatılmasında, reaksiyon kinetiklerinin belirlenmesinde de kullanımları mevcuttur (Birol, 2021). Kütle spektrometrik analizler, proteomik çalışmalarda kullanımı yaygınlaşmaya başlayan önemli sistemler olarak karşımıza çıkmaktadır. Proteinlerin tanımlanması, post-translasyonel değişimlerin belirlenmesi ve protein-protein etkileşimlerinin aydınlatılmasında oldukça yaygın biçimde kullanımı mevcuttur (Öner, 2015).

Kütle spektrometrisinin genel prensibi, hedef atom veya moleküldeki iyonun ayrı ayrı moleküler kütlelerini iyonlara çevirdikten sonra kütle/yük ( $m/z$ ) oranını elde ederek moleküler ağırlık belirleme ile tanımlamaya dayanır (Aslam vd., 2017; Thomas, 2019; Avcı, 2022). Bu yöntemlerde analitin türünün kütlesinin yanı sıra yapısı hakkında da bilgi elde edilir. Kütle spektrometresinde, bir türün vakum altında gaz fazında farklı iyonizasyon yöntemleri ile iyon haline dönüştürülmesi gerçekleştirildikten sonra  $m/z$  oranına göre veri toplanıp analiz edilir. Cihaz içinde oluşturulan manyetik ya da elektriksel alanlar sayesinde iyonları  $m/z$  oranlarına göre ayırma olayı gerçekleştirilir. Elektromanyetik alanlar iyon hareketini iyonun kütlesiyle ters orantılı, iyonun yüküyle ise doğru orantılı olarak etkiler. Bu sayede moleküler kütle tespit edilip iyon bağıl bolluğuna karşı  $m/z$  oranını gösteren kütle spektrumları elde edilmektedir. Kütle spektrumu, tespit edilen  $m/z$  oranı ile iyon bağıl bolluğu odaklı elde edilen ve hedef molekülün kendisi ve kütlesi hakkında bilgi edinilen grafiğe denilmektedir (Siuzdak , 2006; Öner, 2015; Avcı, 2022).

Bir kütle spektrometresinde örnek girişi bölgesi, iyonlaştırma kaynağı, kütle analizörü, dedektör, vakum pompası ve veri analiz sistemi bileşenleri yer almaktadır (Aebersold ve Mann, 2003). Örnek giriş bölgesi, molekülün iyon kaynağına gönderilmesi amacıyla cihaza koyulan kısımdır. İyon kaynağı öncesinde isteğe bağlı olarak kromatografik ayrıştırma cihazları bağlanabilir. Cihazın iyonlaştırma kaynağı olan bölümünde çeşitli iyonlaştırma teknikleri ile nötr durumdaki hedef molekölü gaz fazındaki iyonlara dönüştürölür. İyonlaştırma kaynağının türüne göre atmosferik basınç ya da vakum altında iyonlaşma gerçekleştirilir. Kütle spektrometrelerinde birçok iyon kaynağı kullanılmakta olup bunlar; elektron iyonlaştırma, kimyasal iyonlaştırma, hızlı atom bombardımanı, alan iyonlaştırma, alan desorpsiyon, lazer desorpsiyon, matriks yardımcı lazer desorpsiyon (MALDI) ve elektrosprey iyonlaştırma (ESI) gibi iyon kaynaklarıdır (El-Aneed vd., 2009; Gregorich vd., 2014; Öner, 2015; Avcı, 2022). Elde edilen iyonlar elektriksel veya manyetik alanların varlığında kütle analizörüne taşınırlar. Analizörde ayrılan iyonlar dedektöre aktarılır. Burada iyon akımı, iyon yoğunluğuyla ilişkili fiziksel parametrelere dönüştürölerek değerlendirilmek üzere veri işleme birimine gönderilir (Birol, 2021). Şekil 2.2.'de kütle spektrometresi analizinin kısaca şekilsel gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.2. Kütle spektrometresi analizinin şekilsel gösterimi (Thomas, 2019)

Numune girişi yönteminden bağımsız olarak, kütle spektrometre analizi için gaz fazı iyonlarının üretilmesi gereklidir. Gaz fazındaki analite ait moleküller, bir gaz kromatografisi (GC) sisteminden bir iyonizasyon kaynağına doğrudan verildiğinde, elektron iyonizasyonu (EI) ve kimyasal iyonizasyon (CI) en yaygın olarak kullanılan tekniklerdir. Bir sıvı kromatografisi (LC) sistemi, sıvı haldeki analitlerin eklenmesi için bir kütle spektrometresi ile birleştirildiğinde, atmosferik veya atmosfere yakın koşullar altında iyonizasyon, elektrosprey iyonizasyon, atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon (APCI) veya atmosferik basınç fotoiyonizasyonu (APPI) gibi yöntemler kullanılarak gerçekleştirilir. Yaygın olarak kullanılan diğeri iyonizasyon teknikleri arasında indüktif olarak birleştirilmiş plazma (ICP), matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI), desorpsiyon elektrosprey iyonizasyonu (DESI), hızlı buharlaşmalı iyonizasyon (REI) ve termal desorpsiyon (TD) bulunur (Thomas, 2019).

İyon kaynağında, proteinler veya peptitler gaz fazı iyonlarına dönüştürüldükten sonra kütle analizöründe  $m/z$  oranlarına göre ayrılır ve dedektör tarafından kaydedilir. Protein, polimer, peptit, oligonükleotid, organik bileşikler gibi birçok büyük biyomoleküllerin ya matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI) ya da elektrosprey iyonizasyon (ESI) olarak adlandırılan yumuşak iyonizasyon teknikleri kullanılarak iyonize edilmesi gerekir; bunlar yoğun fazdan gaz fazına aktarılırken proteinlerin ve peptitlerin yapısını koruyabilir. Peptid ve proteinlerin yüksek moleküler ağırlıkları ve polar yapıları göz önüne alındığında, iyonlaştırıcı kaynağın protein ya da peptidleri hem iyon haline hem de gaz faza geçirebilmesi gerekir. MALDI ile ESI bu nedenle proteinlerle çalışmaya uygundur. Aralarındaki temel fark; iyon oluşumu ESI kullanıldığında atmosferik basınç altında meydana gelirken, MALDI'de atmosferik basınç veya vakum altında gerçekleşir (Tran vd., 2011; Monte vd., 2013; Gregorich vd., 2014; Öner, 2015; Birol, 2021)

Cihazın iyonlaştırıcı kaynakta elde edilen iyonlaşmış türlerin  $m/z$  oranlarına göre birbirinden ayrılmasını sağlayan bölümüne kütle analizörü denilir. Bu bölümde elektrik ya da manyetik alanlar kullanılabilir. Tüm analizörler uygun bir iyonlaştırıcı kaynak ile birleştirildiği takdirde peptid ve proteinlerle

çalışmaya uygundur. Kütle spektrometresinde kullanılan kütle ayırıcıları arasında uçuş zamanlı (time of flight, TOF), dört kutuplu (quadrupole, Q), iyon tuzağı (ion trap, IT), fourier dönüşümlü iyon siklotron rezonans (fourier transform ion cyclotron resonance, FT-ICR) ve Orbitrap gibi kütle ayırıcıların yer aldığı bilinmektedir. Bununla birlikte, son birkaç yılda doğrusal tuzak dört kutuplu/ fourier dönüşümlü (LTQ/FT), LTQ-Orbitrap ve dört kutuplu-TOF (Q-TOF) gibi yüksek çözünürlüklü kütle analizörlerine sahip ticari olarak temin edilebilen bir dizi hibrit kütle spektrometresi kullanıma sunulmuştur (Marshall ve Hendrickson, 2008; Yates vd., 2009; Zhang ve Ge, 2011; Öner, 2015; Avcı, 2022).

MALDI'de kullanılan lazerler çoğunlukla atımlı yapıdadır ve dolayısıyla MALDI'de fazlaca sayıda iyon çok kısa bir sürede kütle analizörüne gönderilir. Bu sebeple hızlıca iyonları tarayabilen özellikteki dedektörlere ihtiyaç duyulmaktadır. MALDI kütle spektrometreler çalışmalarında bu yüzden sıklıkla TOF kütle analizörleri bağlanarak analizler gerçekleştirilmektedir. MALDI-TOF cihazının çalışma prensibi, ultraviyole ışınları absorblama özelliğine sahip bir matriksin kullanılmasına dayalıdır. MALDI-TOF yönteminde, 1000 kDa'ya kadar molekül ağırlığına sahip moleküllerin analizi uygun ortam, matriks ve dedektörler kullanıldığında çok büyük bir yüzde doğruluk payı ile yapılabilmektedir. MALDI'de peptit örnekleri ve matriks uygun bir çözücüde çözülerek karıştırılır. Çözelti halinde hazırlandıktan sonra örnek yükleme amaçlı kullanılan özel metal plakalar (plate) üzerine çözücü içinde çözündürülmüş örnek ve matriks karışımı uygulanır. Ardından buradaki çözücü buharlaştırılır ve böylece kristalleşmiş matriks molekülleri arasına gömülü peptitler elde edilmiş olur. Örnek plakası cihaza yerleştirilir ve vakum altında, morötesi (ultraviolet, UV) veya kızılötesi (infrared, IR) bölgesinde dalga boyuna sahip atımlı veya sürekli lazer ışığıyla örnek uyarılır. Bu enerji aktarımını takiben örneğin yüzeyden desorpsiyonu ve iyonlaşma süreçleri gerçekleşir. Matriks molekülleri lazerin enerjisini absorblar ve peptit moleküllerini de beraberinde taşıyarak gaz fazda iyon haline geçerler. En son elde edilen iyonlar kütle analizörüne doğru bir potansiyel eşliğinde ivmelendirilir. Bu aşamada iyonlaşmış moleküller, TOF analizörü içerisinde hızlandırılıp dedektöre

ulaştırılır. İyonlar aynı enerjide olsa da kütle farkından dolayı dedektöre farklı zamanda ulaşır. En küçük iyonların hızı fazla olup dedektöre ilk ulaşan iyonlar olur. İyonların kütleleri arttıkça hızları yavaşlar ve dedektöre daha geç ulaşır. Bu zaman farkına bağlı olarak peptit kütleleri belirlenir. Bu belirlenen veriler ile daha sonra biyoinformatik analizler ve protein tanımlamaları yapılabilir (Laiko vd., 2000; Salih, 2005; Öner, 2015; Birol, 2021).

Kütle spektrometre analizlerinde kullanılan kütle analizörlerinden birisi olan Orbitrap, yüksek çözme gücü ve kütle doğruluğu sağlayabilen sağlam bir kütle analizörü olarak çalışmalarda sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Ulaşılan değerler Fourier Dönüşümü İyon Siklotron Rezonansı (FT-ICR) kadar yüksek olmasa da daha kompakt yapısı, kullanım kolaylığı ve daha düşük maliyetli olduğu için tercih edilen bir cihazdır. Orbitrap ve FT-ICR kütle analizörlerinin dedektörleri diğerlerinden mekanizma olarak farklıdır. Bu dedektörler iyonların sistemde yaptıkları  $m/z$  oranına bağlı periyodik hareketlerin frekanslarını ölçme esasına göre çalışırlar. Geleneksel iyon tuzaklarından farklı olarak orbitrap sisteminde, enjekte edilen iyon popülasyonlarını sınırlamak ve analiz etmek için yalnızca elektrostatik alanlar kullanılır. Orbitrap analizöründe bir dış elektrotla çevrelenmiş iç benzeri bir merkezi elektrot bulunur. Geliş hızlarının etkisiyle oluşan merkezkaç kuvveti sayesinde iyonların elektrotla çarpması engellenmiş olur. Merkezi elektrotun uzun eksen boyunda iyonlar elektrostatik kuvvetle çekilmek suretiyle tuzaklanmış olur ve ileri geri salınım yaparlar. Başka bir ifadeyle, elektrostatik kuvvetle merkezi elektrotun etrafında tuzaklanmış iyonlar belli bir yörüngede olur ve kompleks spiral bir yol izlerler. Elektrot etrafında yaptıkları salınım, tek tek iyonların frekansı ile doğru orantılı olan  $m/z$  değerine bağlı bir görüntü akımı üretir ve böylece Orbitrap sisteminde iyonların ayrımı yapılmış olur. Yörünge tuzaklarının yüksek çözme gücü nedeniyle, sinyal gürültüden güvenilir bir şekilde ayırt edildiğinde bir iyonun doğru kütlesi belirlenebilir (Makarov vd., 2006; Scigelova ve Makarov, 2006; Perry vd., 2008; Thomas, 2019; Birol, 2021). Orbitrap kütle analizörünün, 5-ppm kütle doğruluğuna ve 5000'den fazla dinamik aralıkta >%95 olasılıkla ulaştığı literatürde bildirilmiştir (Makarov vd., 2006).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Süt

Peynirlerin üretimi için çiğ inek sütü Isparta Cebeci Süt ve Süt Ürünleri Fabrikası'ndan temin edilmiştir. Pastörize süttten üretilen Beyaz peynir ve ultrafiltre süttten (UF) Beyaz peynir için aynı çiğ süt kullanılmıştır. Çiğ süttün bir kısmı pastörizasyon ünitesine, bir kısmı UF ünitesine gönderilerek peynirlerin üretiminde kullanılan pastörize süt ve UF süt elde edilmiştir.

##### 3.1.2. Starter kültür

Tüm peynir örneklerinde 2 farklı starter kültür birlikte kullanılmıştır. Chr. Hansen firmasına ait termofilik özellikteki White Classic 200 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Str. thermophilus*) ile mezofilik özellikteki 2003 (*L. lactis* subsp. *cremoris* ve *L. lactis* subsp. *lactis*) kültürleri kullanılmıştır.

##### 3.1.3. Pıhtılaştırıcı enzim

Peynir üretimlerinde hem mikrobiyal kaynaklı hem de hayvansal kaynaklı (şirdenden elde edilen) enzim ayrı ayrı kullanılmıştır. Mikrobiyal enzim olarak Marzyme 55 800 IMCU (*Muchor miehei* ile üretilmiş) ve şirden maya olarak Naturen Mandıra 175 (175 IMCU/mL) ile peynir üretimi gerçekleştirilmiştir. Süte katılacak maya miktarı, maya kuvvet tayini ile belirlenmiş ve maya kuvvet tayini yapıldıktan sonra peynir yapılacak süte ilk pıhtılaşmayı 15 dk'da (900 saniye) tamamlayacak miktarda maya 1/10 oranında saf su ile sulandırıldıktan sonra ilave edilmiştir.

$$\text{Kullanılan rennet miktarı} = (A \times 0,1 \times B) / (C \times 900) \quad (3.1)$$

A: Pıhtılaştırılacak toplam süt miktarı (mL)

B: İlk pıhtının görüldüğü saniye

C: Maya kuvvetinin hesaplanmasında kullanılan süt miktarı (25 mL)

0,1: maya seyreltme miktarı

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Peynir üretimi

Peynir üretimi Isparta Cebeci Süt ve Süt Ürünleri Fabrikası'nda 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Üretilen tüm peynirler 4°C'de depolanmış ve 1. gün başlangıç olmak üzere 30., 60. ve 90. günlerde mikrobiyolojik ve fiziko-kimyasal analizleri 2 paralelli olarak yapılmıştır. Peynir denemelerinde kullanılan sütün gruplandırılması Çizelge 3.1. 'de verilmiştir. Peynir üretimi 2 tekerrürlü, tüm analizler 2 paralelli olarak yapılmıştır.

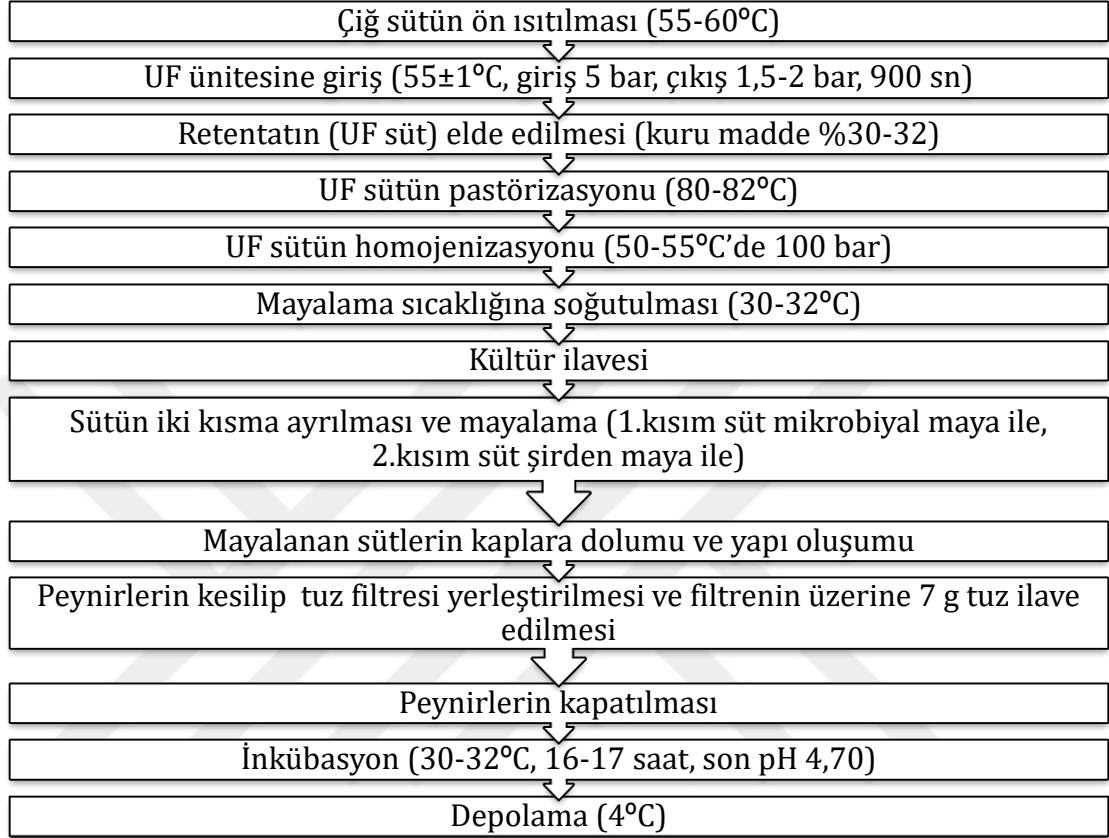
Çizelge 3.1. Denemede üretilen Beyaz peynirlerin üretim farklılıkları

| Örnek Kodu | Peynir Çeşitleri                                               |
|------------|----------------------------------------------------------------|
| M-UF       | Mikrobiyal enzim ile ultrafiltre süttten üretilen Beyaz peynir |
| Ş-UF       | Şirden mayası ile ultrafiltre süttten üretilen Beyaz peynir    |
| M-PAS      | Mikrobiyal enzim ile pastörize süttten üretilen Beyaz peynir   |
| Ş-PAS      | Şirden mayası ile pastörize süttten üretilen Beyaz peynir      |

##### 3.2.1.1. UF süt kullanılarak yapılan Beyaz peynir üretimi

Çiğ süt gerekli kimyasal analizler yapıldıktan sonra klarifikatörden geçirilmiş ve depolama tankına alınmıştır. Depolama takındaki çiğ süt, 55-60°C'de ön ısıtma uygulandıktan sonra UF ünitesine (55±1°C, giriş 5 bar, çıkış 1,5-2 bar, 900 sn.) aktarılmıştır. UF ünitesinden süt, retentat ve permeat olarak iki kısma ayrılarak çıkmıştır. Peynir üretimi için retentat kısmı kullanılmıştır. UF ünitesinde 5 L süttten 1 L retentat elde edilmiştir. Elde edilen, retentat 80-82°C'de 15 sn pastörize edildikten sonra 50-55°C'ye soğutularak iki kademeli homojenizatörde 20-80 bar basınçla homojenize edilmiştir. Ardından 30-32°C'de mayalama sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Mayalama sıcaklığına gelen süte kültür ilavesi yapılmıştır. Ardından süt iki kısma bölünmüş ve UF süttten Beyaz peynir üretimi Şekil 3.1.'de verilen iş akış şeması izlenerek gerçekleştirilmiştir. Peynirlerin üretimi gerçekleştirilip ambalajları

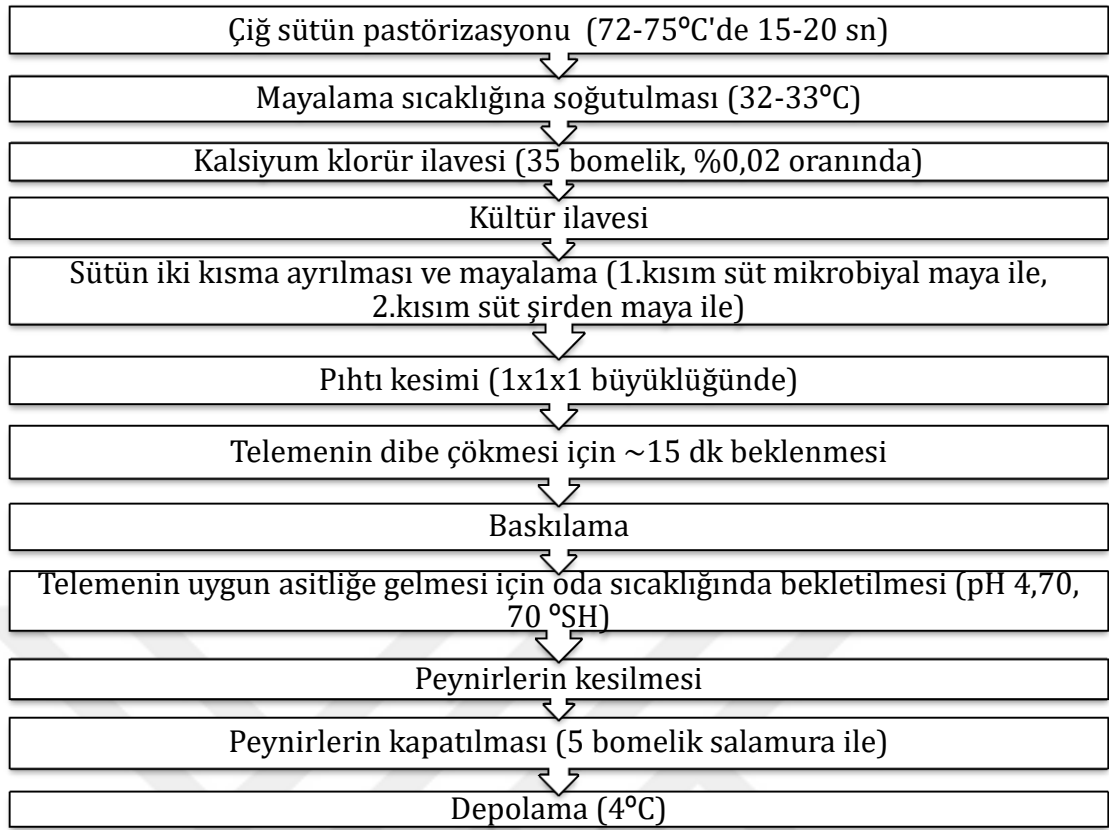
kapatıldıktan sonra 31°C'de 16-17 saat boyunca 4,70 pH görülmesi hedeflenerek inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu biten peynirler 4°C'de depolanmıştır.



Şekil 3.1. UF süttten yapılan Beyaz peynir üretim akış şeması

### 3.2.1.2. Pastörize süt kullanılarak yapılan Beyaz peynir üretimi

Pastörize süttten yapılan Beyaz peynir için ayrılan çiğ süt, 72-75°C'de 15-20 sn pastörize edilmiştir. Daha sonra süt 32-33°C'ye soğutulmuştur. Mayalama sıcaklığına getirilen sütlere 35 bomelik  $\text{CaCl}_2$  çözeltisinden %0,02 oranında süte katılmıştır. Ardından süte kültür ilavesi yapılmıştır. Ardından süt iki kısma bölünmüş ve pastörize süttten Beyaz peynir üretimi Şekil 3.2.'de verilen iş akış şeması izlenerek gerçekleştirilmiştir. Uygun asitlik değerlerine gelen peynirler 5 bomelik salamura ile kapatılıp 4°C'de depolanmıştır.



Şekil 3.2. Pastörize süttten yapılan Beyaz peynir üretiminin iş akış şeması

### 3.2.2. Çiğ süte yapılan fizikokimyasal analizler

#### 3.2.2.1. pH

Çiğ süt numunesinde pH ölçümü, dijital pH-metre (Hanna Instruments HI 2211 pH/ORP meter) ve sıvı uçlu cam elektrot kullanılarak gerçekleştirilmiştir. pH-metre cihazının ekranındaki değer sabitleninceye kadar beklenerek son değer kaydedilmiştir.

#### 3.2.2.2. Titrasyon asitliği

Sütten 25 mL örnek alınarak üzerine 2-3 damla %1'lik fenolftalein indikatörü damlatılmıştır. 0,25 N NaOH ile açık pembe renk elde edilinceye kadar titre edilmiştir. Harcanan NaOH miktarından °SH değerleri bulunmuş, %laktik asit cinsinden asitlik değerleri aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Öner ve Aloğlu, 2018).

$$\% \text{Laktik Asit} = \text{SH} * 0,0225$$

(3.2)

### 3.2.2.3. Yağ tayini

Süt bütirometresi içerisine 1,825 g/mL yoğunluktaki sülfürik asitten 10 mL koyulup üzerine homojen hale getirilmiş süt örneğinden 11 mL ilave edilmiştir. 1 mL amil alkol eklendikten sonra 5 dakika satrifüjlenmiş ve bütirometrenin skalasından % olarak yağ miktarı okunmuştur (Öner ve Aloğlu, 2018).

### 3.2.2.4. Kurumadde tayini

Etüvde kurutulup sabit tartıma getirilen kurutma kaplarının içerisine ~10 mL çiğ süt örneği tartılmıştır Deniz kumu ilave edilerek sıcaklığı 103±2°C olan etüvde sabit tartıma ulaşınca kadar kurutulmuştur. Kurutulan süt örnekleri desikatöre alınarak oda sıcaklığına getirilip tartılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki formül ile hesaplanıp yüzde olarak verilmiştir (IDF, 1987).

$$\% \text{Kurumadde} = [(M1 - M) / (M2 - M)] \times 100$$

(3.3)

M1 : Kurutma kabı ve örneğin kurutma sonrası tartımı, g

M2: Kurutma kabı ve örneğin kurutma öncesi tartımı, g

### 3.2.2.5. Protein tayini

Çiğ sütün protein oranı, FOSS MilkoScan (FT1- Danimarka) cihazı ile ölçülerek %protein olarak belirlenmiştir.

## 3.2.3. Peynir örneklerinde yapılan fizikokimyasal analizler

### 3.2.3.1. pH tayini

Peynir örneklerinde pH ölçümleri, pH-metre kullanılarak doğrudan yapılmıştır. pH metrenin elektrodu, homojen hale getirilmiş peynir kitlesine direkt olarak batırılmıştır. Sabit değere ulaştıktan sonra okunan değer kaydedilmiştir.

### 3.2.3.2. Titrasyon asitliği

Rendelenip homojen hale getirilmiş UF sütten ve pastörize sütten yapılan Beyaz peynir örneklerinden hassas terazide 2,5 g tartılarak havana aktarılmıştır. zerine az miktarda saf su ilave edilerek havanda iyice ezilmiştir. Ezilen peynir örneğine %1' lik fenolftalein indikatöründen 2-3 damla damlatılarak SH breti ile 0,25 N NaOH ile açık pembe renk elde edilinceye kadar peynir rneği titre edilmiştir. Harcanan NaOH miktarı 10 ile çarpılarak SH tayini yapılmış ve asitlik SH olarak tespit edilmiştir (Anonim, 2006).

### 3.2.3.4. Kurumadde tayini

Önceden etüvde kurutulup sabit tartıma getirilen kurutma kaplarının içerisine bütün peynir numunelerinden 3-5 g tartılmıştır. Sıcaklığı 105±2°C olan etüvde peynir örnekleri, son iki tartım arasındaki fark 5 mg oluncaya kadar kurutulmuştur. Her tartım öncesinde peynir örnekleri desikatör içine alınarak oda sıcaklığına getirilmiş ve tartımlar hassas terazi kullanılarak hesaplanmıştır. Kurumadde miktarı aşağıdaki formül ile hesaplanmış ve sonuçlar yüzde olarak verilmiştir (IDF, 1987).

$$\% \text{Kurumadde} = [(M1 - M)/(M2 - M)] \times 100 \quad (3.4)$$

M = Kurutma kabının darası, g

M1 = Kurutma kabı ve örneğin kurutma sonrası tartımı, g

M2 = Kurutma kabı ve örneğin kurutma öncesi tartımı, g

### 3.2.3.5. Yağ tayini

Rendelenmiş peynir rneğininden 3 g peynir btirometresinin kadehcığine tartılmıştır. Yoğunluğu 1,55 g/mL olan sülfürik asitten üzerine 10 mL ilave edilmiştir. Daha sonra peynirin tamamen erimesi için 65-70°C'lik bir su banyosuna yerleştirilmiştir. Peynir rneği tamamen eridikten sora üzerine 1 mL amil alkol ilave edilip çalkalanmış ve bütirometrenin 35 taksimatına kadar aynı özgül ağırlıktaki sülfürik asitten ilave edilmiştir. Ardından 10 dakika santrifüj

edilmiştir. 65°C'lik su banyosunda 5 dakika tutulduktan sonra bütirometre skalasından % olarak yağ miktarı okunmuştur (Anonim, 2006). Kurumaddede yağ miktarı aşağıdaki formül ile hesaplanmış ve sonuçlar yüzde olarak verilmiştir.

$$\% \text{Kurumaddede yağ} = [(\% \text{Yağ miktarı}) / (\text{Kurumadde miktarı})] \times 100 \quad (3.5)$$

### 3.2.3.6. Tuz tayini

Rendelenip homojen hale getirilmiş peynir örneklerinde tuz tayini Mohr yöntemiyle ile yapılmıştır. Rendelenmiş peynir örneklerinden 5 g tartılmış ve bir havanda sıcak saf su ile iyice ezilmiştir. Sulu kısmı 500 mL'lik bir balona aktarılmıştır. Yapılan bu işlem, peynir örneğinin içindeki tuzun tamamen suya geçmesi amacıyla 5-6 kez tekrarlanmıştır. Balondaki su soğuyunca 500 mL çizgisine kadar saf su ile doldurulmuş ve kaba filtre kağıdı yardımıyla süzölmeye bırakılmıştır. Bir erlene süzöntüden 25 mL alınarak sonra üzerine birkaç damla fenolftalein ilavesinden sonra 0,1 N NaOH ile nötrale edilmiştir. Nötralizasyon sonrası karışıma 0,5 mL %5'lik K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> indikatörü ilave edilmiş ve ardından 0.1 N AgNO<sub>3</sub> çözeltisi ile kiremit kırmızısı renk oluşuncaya kadar titre edilmiştir. Harcanan AgNO<sub>3</sub> miktarı kaydedilmiştir. Örnek miktarı kadar saf su ise şahit olarak kullanılmış ve aynı titrasyon işlemi şahit için de yapılmıştır (Bradley vd., 1992). Örneklerin tuz miktarı aşağıdaki formül ile hesaplanmış ve sonuçlar yüzde olarak verilmiştir.

$$\% \text{Tuz miktarı} = [(N \times F \times E \times (V1 - V2)) / (m)] \times 100 \quad (3.6)$$

N : Kullanılan AgNO<sub>3</sub> normalitesi (0,1 N)

F : 0,1 N AgNO<sub>3</sub> çözeltisinin faktörü

E : Sodyum klorürün miliekivalan ağırlığı

V1 :Titrasyonda peynir için harcanan AgNO<sub>3</sub> miktarı, mL

V2 :Titrasyonda şahit için harcanan AgNO<sub>3</sub> miktarı, mL

m : Titre edilen peynir örneği içindeki peynir miktarı, g

Kurumaddede tuz miktarı aşağıdaki formül ile hesaplanmış ve sonuçlar yüzde olarak verilmiştir.

$$\% \text{Kurumaddede tuz} = [(\% \text{Tuz miktarı}) / (\% \text{Kurumadde miktarı})] \times 100 \quad (3.7)$$

### 3.2.3.7. Protein tayini

Peynir örneklerinde protein miktarları makro Kjeldahl yöntemiyle tespit edilmiştir (AOAC, 1990). Peynir örneklerinden 2 g yakma tüpünün içerisine tartılmıştır. Üzerine 1 adet Kjeldahl tableti ve 25 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edilmiştir. Tüpler yakma ünitesine yerleştirilip sıcaklığın kademeli olarak yükseltilmesiyle örnekler yakılmaya bırakılmıştır. Tüplerdeki örnek sıvısı berrak yeşil rengi aldıktan sonra yaklaşık yarım saat daha yakma işlemi sürdürülmüştür. Yakma işlemi bittikten sonra destilasyon işlemine geçilmiştir. Bu aşamada 25 mL borik asit (%4' lük) içerisine destilat toplanmıştır. Toplanan destilat 0,1 N HCl ile gri-leylak renk elde edilinceye kadar titre edilmiştir. Şahit numune için yakma balonu içine analizin başında peynir örneği koyulmadan 1 adet Kjeldahl tableti ve 25 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edilerek diğer tüplerle birlikte yakma, destilasyon ve titrasyon işlemleri gerçekleştirilip harcanan miktar kaydedilmiştir. Azot değeri ve buna göre protein değeri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (IDF, 1993).

$$\% \text{Azot} = [(V1 - V0) \times N \times (0,014)] / (m) \times 100 \quad (3.8)$$

$$\% \text{Protein} = \% \text{Azot} \times F \quad (3.9)$$

V1 : Peynir örneğinin titrasyonunda harcanan HCl çözeltisi miktarı, mL

V0 : Şahit örneğinin titrasyonunda harcanan HCl çözeltisi miktarı, mL

N : Titrasyonda kullanılan HCl çözeltisinin normalitesi (0,1 N)

0,014 : Azotun mili ekivalen ağırlığı

m : Alınan örnek miktarı (g veya mL)

F: %azot içeriğine göre kullanılan faktör (süt ve süt ürünleri için 6,38)

Kurumaddede protein miktarı aşağıdaki formül ile hesaplanmış ve sonuçlar yüzde olarak verilmiştir.

$$\% \text{Kurumaddede protein} = [(\% \text{Protein}) / (\% \text{Kurumadde})] \times 100 \quad (3.10)$$

### 3.2.3.8. Peynirdeki azotlu madde fraksiyonlarının ayrılması

#### 3.2.3.8.1. Suda çözünen azot (SÇA) tayini

Kuchroo ve Fox (1982)'de belirtilen yöntemle göre suda çözünen azotlu maddelerin ayrılması sağlanmıştır. Bunun için 20 g peynir örneğinin üzerine 40 mL su ilave edilip Ultra Turrax blender (Janke&Kunkel KG, IKA, Werk, Almanya) kullanılarak 2 dakika homojenize edilmiştir. Homojenize edilen karışım, 1 saat boyunca 40°C'deki su banyosunda tutulmuştur. Ardından su banyosundan alınan örnekler 4000 devir/dakika hızında 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüplerin üst kısımda biriken yağ tabakası bir spatül ile uzaklaştırılmıştır. Tüpteki sıvı kısım filtre kâğıdından (Whatman No.42) süzölmüştür. Süzüntüden 10 mL alınarak, standart mikro-Kjeldahl metodu ile (IDF, 1993) SÇA içeriği saptanmıştır. Kalan süzöntü diğer analizlerde kullanılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmış ve yüzde olarak verilmiştir.

$$\% \text{SÇA} = [(1,4007) \times (V_1 - V_0) \times N \times F] / (m) \times 100 \quad (3.11)$$

V<sub>1</sub>: Peynir örneği için harcanan HCl, mL

V<sub>0</sub>: Şahit örneği için harcanan HCl, mL

N: HCl'nin standart volumetrik çözeltisinin normalitesi

F: HCl çözeltisinin faktörü

m: Örnek miktarı, g

SÇA değerinin toplam azota oranı olarak ifade edilebilen olgunlaşma derecesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{Olgunlaşma derecesi} = [(\% \text{SÇA}) / (\% \text{Toplam Azot})] \times 100 \quad (3.12)$$

### 3.2.3.8.2. %12 Trikloroasetik asitte (TCA) çözünen azot tayini

SÇA tayini için hazırlanan ekstraktan 25 mL alınıp üzerine %24'lük (w/v) TCA çözeltisinden aynı miktarda ilave edilerek karıştırılmış ve son TCA konsantrasyonunun %12 olması sağlanmıştır. Karışım 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından oda sıcaklığında bekleyen bu karışım filtre kağıdından (Whatman No. 42) süzülmüştür. Süzüntüden 10 mL alınarak IDF (1993)'de belirtilen metoda göre standart mikro Kjeldahl yöntemi uygulanmıştır. Sonuçlar aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmış ve yüzde olarak verilmiştir (Ardö ve Polychroniadou, 1999).

$$\%12 \text{ TCA'da Çözünen Azot} = [(1,4007) \times (V1-V0) \times N \times F]/(m)] \times 100 \quad (3.13)$$

V1: Peynir örneği için harcanan HCl, mL

V0: Şahit örneği için harcanan HCl, mL

N: HCl'nin standart volumetrik çözeltisinin normalitesi

F: HCl çözeltisinin faktörü

m: Örnek miktarı, g

%12'lik TCA'da çözünen azot miktarına göre peynirlerin olgunlaşma derecelerinin hesaplanması aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

$$\% \text{Olgunlaşma derecesi} = [(\%12 \text{ TCA'da Azot}) / (\% \text{Toplam Azot})] \times 100 \quad (3.14)$$

### 3.2.3.8.3. %5 Fosfotungustik asitte (PTA) çözünen azot tayini

SÇA'da hazırlanan ekstraktan 5 mL alınmış ve üzerine 3,5 mL 3,95 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi ile 1,5 mL %33'lük PTA çözeltisinden ilave edilmiştir (Jarrett vd.,1982). Karışım 4°C'de 1 gece bekletilmiştir. Bekletilen çözelti Whatman No. 42'den süzülmüştür. Elde edilen süzüntünün azot içeriği mikro-Kjeldahl ile saptanmıştır (IDF, 1993). Sonuçlar aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmış ve yüzde olarak verilmiştir.

$$\%5 \text{ PTA'da } \text{Çözünen Azot} = [(1,4007) \times (V1-V0) \times N \times F]/(m)] \times 100 \quad (3.15)$$

V1: Peynir örneği için harcanan HCl, mL

V0: Şahit örneği için harcanan HCl, mL

N: HCl'nin standart volumetrik çözeltisinin normalitesi

F: HCl çözeltisinin faktörü

m: Örnek miktarı, g

%5 PTA'da çözünen azot miktarına göre peynirlerin olgunlaşma derecelerinin hesaplanması aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

$$\% \text{Olgunlaşma derecesi} = [(\%5 \text{ PTA'da Azot}) / (\% \text{Toplam Azot})] \times 100 \quad (3.16)$$

#### **3.2.4. Peynir örneklerinde yapılan mikrobiyolojik analizler**

Mikrobiyolojik analiz için 2 tekerrür üretime ait peynirlerden olgunlaşma süresi boyunca aseptik koşullarda örnekler alınıp steril rende ile rendelenmiştir. Rendelenmiş peynirlerden aseptik koşullarda 10 g örnek alınıp üzerlerine 90 mL steril Ringer dilüsyon çözeltisi ilave edilerek peynir örneği (10 g /90 mL) steril havanda homojenize edilmiştir. Ardından seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Mikrobiyolojik ekimler bu dilüsyonlar ile iki paralel olarak yapılmıştır.

##### **3.2.4.1. Toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayımı**

Peynir örneklerinde toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayımında, Plate Count Agar (PCA) kullanılmış ve damla kültür yöntemi uygulanmıştır. Petriler 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, koloni sayısı, dilüsyon faktörü ile çarpılarak ekim sonucu log<sub>10</sub>KOB/g olarak verilmiştir (Karahan vd., 2002).

##### **3.2.4.2. Koliform grubu bakteri sayımı**

Koliform grubu bakterilerin analizinde, Eosin Metilen Blue Agar (EMB) kullanılmış ve damla kültür yöntemi uygulanmıştır. Petriler 37°C'de 24-48 saat

inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda koloni sayısı, dilüsyon faktörü ile çarpılarak ekim sonucu  $\log_{10}$ KOB/g olarak verilmiştir (Öner ve Aloğlu, 2018).

#### **3.2.4.3. Laktobasil sayımı**

Peynir örneklerinde laktobasil sayımında De Man, Rogosa ve Sharp Agar (MRS agar) kullanılmış ve damla kültür yöntemi uygulanmıştır. Petriler 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda koloni sayısı, dilüsyon faktörü ile çarpılarak ekim sonucu  $\log_{10}$ KOB/g olarak verilmiştir (Anonim, 2005).

#### **3.2.4.4. Laktokok sayımı**

Peynir örneklerinde bulunan laktokok sayımında, M17 Agar besiyeri kullanılmış ve damla kültür yöntemi uygulanmıştır. Petriler 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda koloni sayısı, dilüsyon faktörü ile çarpılarak ekim sonucu  $\log_{10}$ KOB/g olarak verilmiştir (Anonim, 2005).

### **3.2.5. Düşük molekül ağırlıklı peptitlerin (<3kDa) elde edilmesi**

#### **3.2.5.1. Suda çözünen ekstraktın hazırlanması**

UF süttten ve pastörize süttten yapılan Beyaz peynir örneklerinde düşük molekül ağırlıklı peptitleri (<3kDa) ekstrakte edebilmek için öncelikle Lu vd. (2016) tarafından belirtilen metoda göre bazı modifikasyonlar ile suda çözünen ekstraktlar hazırlanmıştır. Peynir örneklerinden 15 g tartılmış ve üzerine 30 mL saf su ilave edilerek Ultra Turrax blender ile 15 sn süre boyunca homojenize edilmiştir. Peynir homojenizatları 40°C'deki çalkalamalı inkübatörde 95 rpm hızda 60 dk bekletilmiştir. Süre sonunda peynir homojenizatları 3000 x g (yaklaşık 5651 rpm)' de 30 dk 4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üstteki yağ tabakası atılarak süpernatant kısmı Whatman No. 1'den süzölmüştür.

### 3.2.5.2. Suda çözünen ekstraktlara ultrafiltrasyon işleminin uygulanması

Peynir örneklerinden elde edilen suda çözünen ekstraktlardan <3kDa molekül ağırlığındaki peptit ekstraktlarının elde edilebilmesi için UF işlemi uygulanmıştır (Tagliazucchi vd., 2017). Bu amaçla UF santrifüj tüpleri (Centriprep Centrifugal Filter Devices, Ultracel YM-3, 3.000 moleküler ağırlık sınırı) kullanılmıştır.

Santrifüj öncesinde, santrifüj tüplerindeki filtreler ultra saf su ile 3-4 dakika bekletilerek ıslatılmış ve filtrelerin kullanıma hazır hale getirilmesi sağlanmıştır. Kullanıma hazır hale getirilen santrifüj tüpleri ile ekstraktlar 2 kere santrifüj edilmiştir. Birinci santrifüj işleminde UF santrifüj tüplerinin örnek haznesine 10 mL ekstrakt koyulmuş ve tüplere filtresi yerleştirilerek kapağı kapatılmıştır. Santrifüj şartı; 10 mL örnek hacmi ve 3000 moleküler ağırlık sınırı (MWCO) için filtrelerin kullanım kılavuzunda önerildiği üzere 3000 x *g*'de 25°C'de 65 dk olarak belirlenmiş ve örnekler santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüplerin filtrat kısmı boş falkon tüpüne aktarılmış, retentat kısmına ise ikinci santrifüj işlemi uygulanmıştır. Bunun için retentattan 5 mL alınıp başka bir UF santrifüj tüpünün örnek haznesine aktarılmış ve tüpün filtresi yerleştirilerek kapağı kapatılmıştır. Bu aşamadaki santrifüj şartı ise 5 mL örnek hacmi ve 3000 MWCO için filtrelerin kullanım kılavuzunda önerildiği üzere 3000 x *g*'de 25°C'de 50 dk olarak belirlenmiş ve örnekler ikinci santrifüj işlemi uygulanmıştır. İkinci santrifüj sonrasında toplanan filtratlar da birinci santrifüjde toplanan filtrata ilave edilmiştir. İkinci santrifüjde retentatın santrifüjlenmesindeki amaç, birinci santrifüjde filtrata geçmemiş olabileceği düşünülen küçük molekül ağırlığındaki peptitleri geri kazanmaktır. Bu işlemlerin sonunda peynir örneklerinden <3kDa molekül ağırlığındaki peptit ekstraktları elde edilmiştir. Elde edilen bu ekstraktlar analize kadar -20°C'de saklanmıştır.

### 3.2.6. Peynir örneklerinin *in vitro* gastrointestinal sindirimi

McDougall vd. (2005)'nin uyguladığı metot kullanılarak UF süttten ve pastörize süttten yapılan Beyaz peynir örneklerinin *in vitro* gastrointestinal sindirimi

gerçekleştirilmiştir. Bu metotta öncelikle örneklerin midedeki sindirimi, sonrasında ise sindirilen örneklerin ince bağırsaktaki emilimi taklit edilmiştir.

Peynirlerde mide sindiriminin (gastrik sindirim) taklit edilmesi için öncelikle peynir örneklerinden 5 g tartılıp üzerine 7,5 mL pepsin çözeltisi (10 mg pepsinin üzerine 10 mL 0,1 N hidroklorik asit (HCl) ilave edilerek hazırlanan çözelti) eklenmiştir. Sonra 0,2 g sodyum klorür (NaCl) ile 100 mL'ye saf su ile tamamlanarak hazırlanmış çözeltden her örneğe 20 mL ilave edilmiştir. Örneklerin pH değeri, 5N HCl ile pH 2 değerine sabitlenmiştir. Ardından pH'sı ayarlanan örnekler 37°C'deki çalkalamalı inkübatörde 110 rpm hızda 2 saat bekletilmiştir. 2 saatlik gastrik sindirimin sonunda, her örnekten yaklaşık 5 mL sindirim sonrası (SS) faz örneği alınmıştır.

Beherin içinde kalan SS örneğinde bağırsak emilimi (intestinal sindirim) taklit edilmiştir. Bunun için öncelikle diyaliz poşetleri (MWCO 12000 Da, SIGMA) hazırlanmıştır. Diyaliz poşetleri, yumuşatılıp kullanılabilir hale gelmesi için %0,2'lik NaCl çözeltisi içinde en az 30 dk bekletilmiştir. Yumuşayan diyaliz poşetlerinin bir ucu iple bağlanmış, diğer açık ucundan ise 20 mL sodyum bikarbonat çözeltisi (21 g NaHCO<sub>3</sub> ve 500 mL saf su ile hazırlanan çözelti) ilave edilmiştir. Açık olan ucu da bağlanarak diyaliz tüpü analiz için hazır hale getirilmiştir. Ardından boş bir falkon tüpünün içine mide sindirimi sonrası kalan SS örneği aktararak üzerine 4,5 mL bağırsak sıvısı (18 mg pankreatin, 112,5 mg safra tuzu ve 4,5 mL saf su ile hazırlanan çözelti) eklenmiştir. İçinde sodyum bikarbonat çözeltisi bulunan diyaliz tüpü ise falkonda bulunan bu karışımın içine yerleştirilerek falkon tüpünün kapağı kapatılmış ve 37°C'deki çalkalamalı inkübatörde 110 rpm hızda 2 saat bekletilmiştir. İşlem sonunda diyaliz poşetlerinin içinden 7 mL İÇ faz örnekleri, falkon tüpünün içindeki örnekten de 7 mL DIŞ faz örnekleri alınmıştır.

Alınan tüm sindirim fazı örnekleri 4°C'de 10000 rpm hızda 15 dk santrifüjlenmiştir. Örneklerin santrifüj sonrası elde edilen süpernatant kısımları analizi yapılana kadar -18°C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.2.7. Peptitlerin Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC) ile tanımlanması**

#### **3.2.7.1. Suda çözünen (SÇE) ve <3kDa peptit ekstraktlarının RP-HPLC için hazırlanması**

Üretilen 2 tekerrür peynirlerden alınan olgunlaştırma süresi boyunca örnekler karıştırılmıştır. Karıştırılan peynirlerden Donkor vd. (2007) tarafından belirtilen metoda göre SÇE örnekleri hazırlanmıştır. Buna göre 40 g peynir tartılarak üzerine 120 mL saf su ilave edilerek Ultra Turrax blender ile homojenize edilmiştir. Ardından bu homojenizatlar çalkalamalı inkübatörde 40°C'de 100 rpm'de 30 dk çalkalanmıştır. Çalkalanan örnekler 4°C'de 30 dk 4000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası yağ tabakası atılarak süpernatant kısmı aynı şartlarda tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi bittikten sonra elde edilen süpernatant ise kaba filtreden geçirilmiş ve -20°C'de dondurulduktan sonra liyofilize edilmiştir.

Liyofilize edilen SÇE örneklerinden 0,2 g tartılmıştır. Üzerine 5 mL %0,1 (v/v) triflorasetik asit (saf suda) çözeltisi ilave edilerek çözdürülmüş ve ardından 4°C'de 30 dk 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı 0,45 µm gözenek çaplı filtreden geçirilerek viallere aktarılmış ve RP-HPLC kolonuna 750 µL enjekte edilmiştir.

Fraksiyonların toplanması aşamasında, <3kDa molekül ağırlığındaki peptit ekstraktları 3.2.5.'de belirtildiği şekilde hazırlandıktan sonra 90. gün peynirlere ait olan ekstraktlar liyofilize edilmeden sulu haldeyken 0,45 µm çaplı filtreden geçirilip viallere aktarılmıştır. Ardından RP-HPLC kolonuna 750 µL örnek hacmi ile enjekte edilmiştir. Fraksiyonların yeteri kadar toplanabilmesi için RP-HPLC cihazına <3kDa molekül ağırlığındaki peptit ekstraktlarının 6 kere örnek enjeksiyonu yapılmıştır. Fraksiyonlar, her enjeksiyon sonunda Shimadzu FRC-10A model fraksiyon kolektörü kullanılarak 4 dk ara ile toplanmıştır. Toplanan fraksiyonların içindeki asetonitril, Rotary evaporatörü ile uçurulduktan sonra kalan sulu kısmı liyofilize edilmiştir.

### 3.2.7.2. Kimyasalların hazırlanması ve kromatografik koşullar

Peynirlerdeki peptidlerin analizinde ters faz Shimadzu LC-20 AT (KyotoJAPAN) serisi RP-HPLC ile Inertsil ODS-4 (250x4,6 mm ID, 5 µm) kolon kullanılmıştır. RP-HPLC' de kullanılan mobil faz çözeltileri:

**A çözeltisi:** %0,1 TFA (deiyonize suda)

**B çözeltisi:** %0,08 TFA (%100 asetonitrilde)

RP-HPLC'de kullanılacak olan çözeltiler hazırlandıktan sonra bir süre ultrasonik banyoda bekletilerek içlerindeki hava kabarcıklarının uzaklaşması sağlanmıştır. RP-HPLC cihazının özellikleri ve SÇE ile <3kDa molekül ağırlığındaki peptit ekstraktları için kromatografik koşulları Çizelge 3.2.' de verilmiştir (Öner, 2015).

Çizelge 3.2. RP-HPLC cihazının özellikleri ve kromatografik koşullar

| <b>Cihaz (HPLC) Shimadzu, LC-20 AT (Kyoto-JAPAN)</b> |                                                                                                                                      |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Akış Hızı</b>                                     | 1,0 mL/dk                                                                                                                            |
| <b>Dedektör</b>                                      | 214 nm, PDA (Photo Diode Array)<br>SPD-20A                                                                                           |
| <b>Pompa</b>                                         | LC 20 AT dörtlü gradient pompa                                                                                                       |
| <b>Degazör</b>                                       | Shimadzu, DGA-20A5                                                                                                                   |
| <b>Mobil Faz</b>                                     | A çözeltisi: %0,1 TFA ( suda)<br>B çözeltisi:%0,08 TFA (%100 asetonitril)                                                            |
| <b>Enjeksiyon</b>                                    | 750 µL                                                                                                                               |
| <b>Kolon Fırını</b>                                  | Shimadzu, CTO-10AS                                                                                                                   |
| <b>Kolon Sıcaklığı</b>                               | 20°C                                                                                                                                 |
| <b>Kullanılan Kolon</b>                              | C-18 (250x4,6mm ID, 5µm partikül büyüklüğü, por büyüklüğü 100Å, 450 m <sup>2</sup> /g yüzey alanı) Inertsil ODS-4 Analytical Columns |
| <b>Basınç</b>                                        | 100-110 psi                                                                                                                          |
| <b>Analiz Süresi</b>                                 | 100 dk                                                                                                                               |

Süt örnekleri için RP-HPLC cihazının özellikleri ve kromatografik koşullar Çizelge 3.2.'de belirtildiği gibi olup tek farklılık kolon fırını sıcaklığı ve enjeksiyon hacminde olmuştur. Süt örnekleri RP-HPLC'de analiz edilirken kolon fırını sıcaklığı 45°C, enjeksiyon hacmi ise 75 µL olarak uygulanmıştır.

### **3.2.8. Peptit ekstraktlarının ve sindirim örneklerinin biyoaktivitelerinin belirlenmesi**

SÇE örneklerin, <3kDa molekül ağırlığındaki peptitlerin ve peynirlerin *in vitro* sindirim örneklerinin antioksidan ve ACE-inhibitör aktiviteleri ile birlikte RP-HPLC ile toplanan fraksiyonların sadece ACE-inhibitör aktivitesi belirlenmiştir. SÇE örnekler, 3.2.7.1. belirtilen yönteme göre hazırlanıp liyofilize edildikten sonra 15 mg/mL konsantrasyonunda tekrardan saf suda çözündürülmüştür (Meira vd., 2012). Çözdürülen bu örnekler, ACE-inhibitör aktivite, ABTS radikal giderme yöntemi ile antioksidan aktivite ve DPPH serbest radikalleri giderme yöntemi ile antioksidan aktivite analizinde kullanılmıştır. Tekrar çözödürölen bu ekstraktların protein içeriğı BCA Protein Test Kiti ile belirlenmiştir. RP-HPLC ile toplanan 90. gün peynirlere ait 3kDa peptit ekstraktlarının fraksiyonları liyofilize edildikten sonra 15 mg/mL konsantrasyonunda tekrar çözödürölmüş ve ACE inhibitör akiviteleri belirlenmiştir. Sindirim örnekleri ve <3kDa molekül ağırlığındaki peptit ekstraktları liyofilize edilmeden sulu ekstrakt halinde direkt olarak ACE-inhibitör aktivite, ABTS radikal giderme yöntemi ile antioksidan aktivite ve DPPH serbest radikalleri giderme yöntemi ile antioksidan aktivite analizinde kullanılmıştır.

#### **3.2.8.1. ACE-inhibitör aktivitenin belirlenmesi**

Örneklerin ACE-inhibitör aktivitesi tayininde Cushman ve Cheung (1971) tarafından bildirilen ve Meira vd. (2012) tarafından modifiye edilen yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemin esası, ACE tarafından katalize edilen hippuril-L-histidil-L-lösinden (Hip-HisLeu, HHL) hippurik asidin serbest bırakılmasına dayanmaktadır. Serbest kalan hippurik asidin içeriğı, enzim aktivitesinin bir sonucu olarak ACE tarafından kullanılan substrat içeriğı ile doğru orantılıdır. Örneklerden 20 µL alınıp boş bir tüpe aktarılmıştır. Üzerine 100 µL substrat çözeltisine eklenmiştir. Kontrol tüp (A tüpü) olarak tüpe sadece 100 µL substrat koyulmuştur. Substrat çözeltisi, hazırlanışı EK B'de verilen 5 mM HHL içeren 0,1 M sodyum borat tamponu (0,3 M NaCl içeren, pH 8,3) hazırlanmıştır. Tüpler 37°C'de 5 dk ön inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 20 µL ACE (0,1 U/mL) karışıma ilave edilmiştir. ACE, liyofilize toz halde iken, hazırlanışı EK B'de

verilen 0,5 M NaCl içeren 0,01 potasyum fosfat tamponunun (pH 7,0) içinde çözdürülmüştür. Karışım 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası reaksiyonu durdurmak için tüplere 150 µL 1M HCl ilave edilerek karıştırılmıştır. Oluşan hippürik asidin ekstraksiyonu için tüplere 1 ml etil asetat ilave edilmiştir. Karışım 15 sn vortekslenip oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir. Ardından tüpün üst kısmından 800 µL organik faz alınarak başka bir cam tüpe aktarılmıştır. Aktarılan sıvı faz 95°C'de 20 dakika kurutulmuştur. Kuruyan tüplere 1 mL distile su ilavesinin ardından 228 nm dalga boyunda absorbans okunmuştur. Aşağıdaki formüle göre %ACE inhibisyonu hesaplanmıştır (Munir vd., 2020).

$$\%ACE\text{-inhibitör aktivitesi} = [(A-B)/(A)] \times 100 \quad (3.17)$$

A= ACE + HHL absorbansı

B= ACE + HHL + Örnek absorbansı

#### **3.2.8.2. ABTS radikal giderme yöntemi ile antioksidan aktivitenin belirlenmesi**

2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) (ABTS) saf su içinde çözülmüştür. 2.45 mM potasyum persülfat içeren 7 mM'lık ABTS çözeltisi oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 12-16 saat süresince bekletilerek ABTS radikal çözeltisinin oluşması sağlanmıştır. Çözeltinin hazırlanması ile ilgili detaylı bilgi EK B'de verilmiştir. Hazırlanan bu radikal çözeltisi 2-3 gün stabil kalabilmektedir. Analize başlamadan hemen önce ABTS radikal çözeltisinden (stok) 1 mL alınıp yaklaşık 80 mL 0.1 M tuzlu fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) ile seyreltilmiş ve bir seyreltik radikal çözeltisi elde edilmiştir. Bu seyreltik radikal çözeltinin, 734 nm'de 30°C' de  $0.7 \pm 0.02$  absorbans vermesi hedeflenmiştir. Analizin 1-2 saatten fazla sürmesi halinde seyreltik radikal çözeltisinin aktivitesinde değişimler olduğu için stok radikal çözeltisinden tekrar seyreltme işlemi yapılarak analize devam edilmiştir. Kör olarak saf su kullanılmıştır.

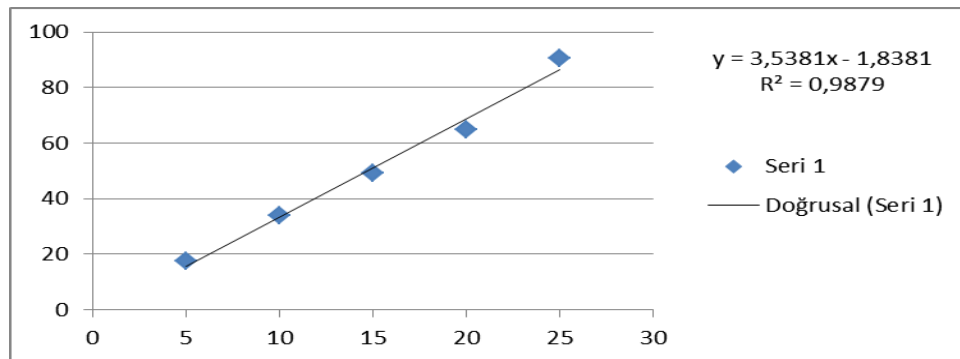
Seyreltilmiş ABTS radikal çözeltisinden 1 mL alınmış ve mikro küvete aktarılmıştır. Üzerine 10 µL örnek veya standart eklenerek kronometre

çalıştırılmıştır. Toplam 6 dakika boyunca 30°C'de karanlıkta 1'er dakika ara ile absorbans değerleri okunarak kaydedilmiştir. Antioksidan aktiviteye bağlı olarak radikal çözeltinin rengi gittikçe açılmış ve absorbans değeri zamana bağlı olarak düşüş göstermiştir. 6 dakika sonunda başlangıç abs değerine göre yüzde azalma oranı (ABTS antioksidan aktivitesi) hesaplanmıştır. Örnek veya standarta ait inhibisyon oranları hesaplanıp paralellerin ortalaması alınmıştır. Daha sonra örnek hacmi değiştirilerek 20 µL ve 30 µL ile aynı işlemler tekrarlanmıştır. İnhibisyon değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\%ABTS \text{ antioksidan aktivitesi} = \frac{[(\text{Başlangıç abs değeri} - \text{Son abs değeri})/(\text{Başlangıç abs değeri})] \times 100}{(3.18)}$$

Yüzde azalma değerleri, örnek miktarlarına karşı grafiğe aktarılıp linear regresyon analizi uygulanmıştır. Yapılan bu işlem ile örneğe ilişkin eğri ve bu eğriyi tanımlayan eşitlik elde edilmiştir. Absorbanstaki azalma troloks eşdeğeri (TEAC) olarak hesaplanmıştır. Troloks standartları, son konsantrasyonları 5-25 µM arasında değişen miktarlarda hazırlanmıştır (Re vd., 1999; Cemeroğlu, 2007; Şahintürk, 2016). TEAC değeri aşağıdaki gibi hesaplanmış ve elde edilen Troloks standart eğrisi Şekil 3.3.'de verilmiştir.

$$TEAC = (\text{Örneğe ait eğrinin eğimi} / \text{Troloks standart eğrisinin eğimi}) \times \text{Seyreltme faktörü} \quad (3.19)$$



Şekil 3.3. Troloks standart eğrisi

### **3.2.8.3. DPPH serbest radikalleri giderme yöntemi ile antioksidan aktivitenin belirlenmesi**

Serbest radikalleri tutma prensibine bağlı olarak belirlenen DPPH antioksidan aktivitesi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. 100 µM DPPH radikal çözeltisi, metanol içinde hazırlanmıştır. Hazırlanan DPPH radikal çözeltisi günlük olarak kullanılmış ve analizde kullanılan DPPH radikal çözeltisi ile %1 oranında Triton X-100 içeren 0.1 M tuzlu fosfat tampon çözeltisinin (pH 7.0) hazırlanışı EK B’de verilmiştir.

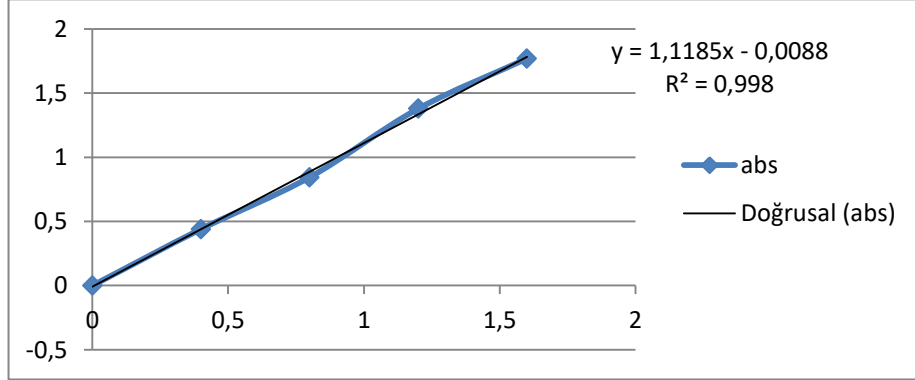
0.1 M tuzlu fosfat tampon çözeltisinden tüplere 1,5 mL koyulup üzerine 200 µL örnek ilave edildikten sonra vortekslenerek karıştırılmıştır. Ardından bu tüplere, DPPH radikal çözeltisinden 1,5 mL ilave edilip tüpler tekrar vortekslenmiştir. Radikal çözelti ilavesinden sonra tüplerde reaksiyonun gerçekleşmesi için karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 30 dakika süresince bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler 3 dakika santrifüjlenmiş ve reaksiyon sonucu oluşan bulanıklığın giderilmesi sağlanmıştır. Ardından hızlıca süpernatant kısmı 517 nm dalga boyunda okunmuştur. Kontrol olarak tuzlu fosfat tampon çözeltisi kullanılmış ve aynı işlemler kontrol için tekrarlanmıştır (Aluko ve Monu, 2003, Farzamirad ve Aluko, 2008). %Antioksidan aktivitesi aşağıda verilen formülden yararlanarak belirlenmiştir:

$$\% \text{Antioksidan aktivitesi} = [( \text{Kontrol abs değeri} - \text{Örnek abs değeri} ) / ( \text{Kontrol abs değeri} )] \times 100 \quad (3.20)$$

### **3.2.9. Toplam serbest amino asit miktarının belirlenmesi**

Peynirlerin liyofilize edilmemiş sulu ekstrakt halindeki SÇE örneklerinde toplam serbest amino asit miktarları Doi vd. (1981) tarafından belirtilen, Folkertsma ve Fox (1992) tarafından uyarlanan spektrofotometrik yöntemle göre yapılmıştır. Bu amaçla, 10-100 mL örnek (beklenen serbest amino asit miktarına göre) ve 1 mL saf su ile karıştırılmış ve karışıma EK B’de hazırlanışı verilen Cd-Ninhidrin reaktifinden 2 mL ilave edilmiştir. Elde edilen karışım 84°C’de 5 dakika tutulduktan sonra soğutulup 507 nm dalga boyunda UV-spektrofotometrede

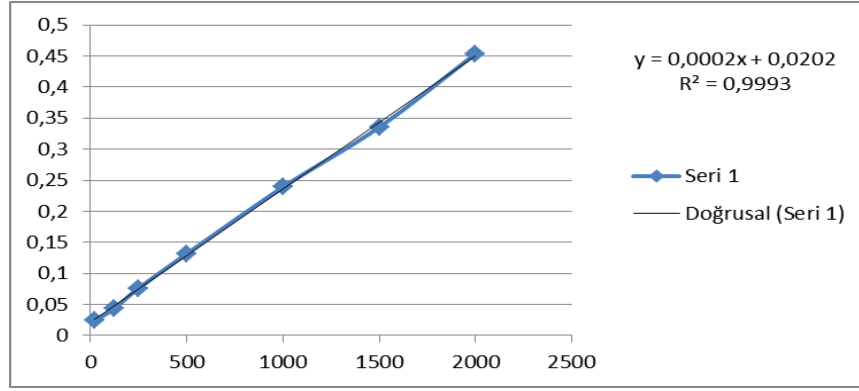
ölçüm yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri, lösin (Leu) amino asidiyle hazırlanan standart eğri kullanılarak mg Leu/g peynir olarak hesaplanmıştır. Aşağıdaki Şekil 3.4.'de lösin standart eğrisi verilmiştir.



Şekil 3.4. Lösin standart eğrisi

### 3.2.10. Ekstraktların ve sindirim örneklerinin protein miktarının belirlenmesi

Peptit ekstratları ve sindirim örneklerinin protein miktarı BCA Kit Assay II (BioVision, K813-2500) kullanılarak belirlenmiştir. BCA Protein Test Kiti, bikinkoninik asidin (BCA), bakır katyonunun ( $\text{Cu}^{+2}$ ) protein ile alkali bir ortamda indirgenmesiyle üretilen bakır katyon ( $\text{Cu}^{+1}$ ) ile şelatlanmasına dayanmaktadır. Reaksiyon sırasında oluşan mor renkli ürünün miktarı, BCA protein analizindeki protein miktarı ile ilişkilidir.  $\text{Cu}^{+1}$  ve BCA şelatı, suda çözünen bir komplekstir. Oluşan bu kompleks, 562 nm'de 25-2000  $\mu\text{g/mL}$  arasındaki geniş bir protein konsantrasyonu aralığında doğrusal olan güçlü bir absorbans vermektedir. Numunelerin toplam protein değerinin hesaplanmasında Bovin Serum Albumin (BSA) protein standardı ile çizilen eğri esas alınmıştır. BSA ile 25-2000  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonu arasında hazırlanan standart eğri Şekil 3.5'de verilmiştir. Eğriden elde edilen denklemde Y yerine örneğin absorbansı yazılarak X değeri protein miktarı olarak bulunmuş, seyreltme faktörü ile çarpılmıştır. Bu hesaplama sonucunda  $\mu\text{g/mL}$  olarak bulunan değerler, Araştırma Bulguları ve Tartışma Bölümü'nde tartışılırken mg/mL olarak hesaplanmış değerleri verilmiştir.



Şekil 3.5. BSA protein standart eğrisi

### 3.2.11. SDS poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) analizi

#### 3.2.11.1. Peynir örneklerinin hazırlanışı ve kullanılan kimyasallar

UF süttten ve pastörize süttten yapılan Beyaz peynir örnekleri liyofilize edilmiştir. Liyofilize peynir örneklerinden 10 mg ependorflara tartılmıştır. Üzerine %49 üre içeren örnek tamponundan 1 mL eklenip vortekslenerek örneklerin iyice çözünmesi sağlanmıştır. Örnek tamponunda çözdürülen örneklerin protein denatürasyonunu sağlamak için 5 dakika 100°C'deki suda kaynatılmıştır. Ardından örnekler 4°C de depolanmıştır (Sambrook vd., 1989). SDS-PAGE analizleri 30. ve 90. gün peynir numunelerinde yapılmıştır.

Elektroforez analizinde kullanılan kimyasallar : %30'luk akrilamid çözeltisi, 1,5 M Tris (hidroksimetil)-aminometan ( $H_2NC(CH_2OH)_3$ ) (pH 8,8), 1 M Tris (hidroksimetil)-aminometan ( $H_2NC(CH_2OH)_3$ ) (pH 6,8), %10 (w/v)'luk Amonyum persulfat, %10 (w/v) Sodyum Dodesil Sulfat (SDS), Yürütme tamponu (Elektrot tamponu, pH 8,3, 1x), TEMED (Tetramethylenediamine), örnek tamponu, yıkama çözeltisi ve boyama çözeltisidir.

Çözeltilerin hazırlanışı Ek B'de verilmiştir. Alt (%12) ve üst (%5) jelin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler ve miktarları Çizelge 3.3'de verilmiştir (Laemmli, 1970). Jeller hazırlandıktan sonra oluşan kuyucuklara 10 µL marker ve 15 µL örnek yüklenmiştir.

Çizelge 3.3. SDS-PAGE alt ve üst jel içerikleri

| Alt Jel (15 mL toplam miktar) | Üst Jel (5 mL toplam miktar)     |
|-------------------------------|----------------------------------|
| H <sub>2</sub> O: 4,9 mL      | H <sub>2</sub> O: 3,4 mL         |
| %30 Akrilamid çözeltisi: 6 mL | %30 Akrilamid çözeltisi: 0,83 mL |
| 1,5 M Tris (pH 8,8): 3,8 mL   | 1,5 M Tris (pH 6,8): 0,63 mL     |
| %10 SDS : 0,15 mL             | %10 SDS : 0,05 mL                |
| %10 APS : 0,15 mL             | %10 APS : 0,05 mL                |
| TEMED: 0,006 mL               | TEMED: 0,005 mL                  |

### 3.2.11.2. Elektroforez yapılışı

Cam plakalar saf metanol ile temizlenmiş ve daha sonra saf su ile yıkanarak kurutulmuştur. Böylece jele herhangi bir kirlilik unsurunun bulaşması önlenmiştir. Cam plakalar temizlenip kurutulduktan sonra arasına ayıraç konularak dik bir vaziyette elektroforez sistemine yerleştirilmiştir.

İlk önce bir beherde TEMED dışındaki alt jel için verilen tüm kimyasallar karıştırılarak alt jelin hazırlanması sağlanmıştır. En son olarak hazırlanan alt jel karışımına TEMED ilave edilmiştir. Jelin donmaması için hızlı bir şekilde plakalar arasına alt jel mikropipet yardımıyla yukarıdan 2 cm boşluk kalacak şekilde (~9 mL kadar) enjekte edilmiştir. Bundan sonra alt jelin iyice donması için en az 30 dakika beklenmiştir. Alt jel donduktan sonra üst jel hazırlanarak üzerine TEMED ilave edilmiş ve hızlıca üst jelin yüklemesi yapılmıştır. Ardından üst jel donmadan tarak düzgünce yerleştirilerek örnekleri koyacağımız kuyucuklar oluşturulmuştur. Jelin donması için en az 20 dakika beklenmiştir. Kuyucukların belli olması için cam plakaların dış kısmından tarağın uç kısımları işaretlenmiştir. Jel donduktan sonra tarak dikkatli ve yavaş bir şekilde çıkartılarak kuyucuklar oluşturulmuştur. Elektroforez sisteminin en üstüne kadar yürütme tamponu (elektrot tamponu) eklenmiştir Örnek tamponu ilave edilerek hazırlanmış örnekler kuyucuklara 15 µL, marker 10 µL olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnek yüklemesi yapıldıktan sonra sistem tank içerisine yerleştirilmiş ve önceden belirlenmiş çizgisine kadar yürütmenin yapıldığı tankın içine yürütme tamponu eklenmiştir. Jel 80-100 V arasında yürütülmüştür. Örneklerin jel üzerindeki yürümesi bittikten sonra elektrik akımı durdurulup sistem çıkartılmıştır. Cam plakalar arasındaki jel yırtılmadan

plakalar açılarak alınmış ve boyama çözeltisine bırakılmıştır. 1 gün boyunca oda sıcaklığında boyama çözeltisinde bekletilen jel yıkama çözeltisine alınmıştır. Yıkama çözeltisi 2 saatte bir değiştirilmiş ve jelin rengi iyice açılana kadar yıkama işlemi yapılmıştır. Bu aşamada proteinlerin oluşturduğu bantların da açılmamasına dikkat edilmiştir. Yıkama işlemi bitmiş jel suya alınarak 4°C'de saklanmıştır (Sambrook vd., 1989; Şahintürk, 2016).

### **3.2.12. MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi ile peptit analizi**

3.2.7.1.'de belirtildiği üzere RP-HPLC ile toplanmış fraksiyonlar arasında en yüksek ACE-inhibitör aktivite gösterenlerin (%50 ve üzeri) peptit analizi MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi ile yapılmıştır. Peptitlerin MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi analizi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü (İYTE) Tümleşik Araştırma Merkezi'nde MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi (Bruker Daltonics, Autoflex III smartbeam) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Analiz öncesinde sulu ekstrakt halinde olan örneklerin su fazı soğutmalı satrifüj ile uzaklaştırılmıştır. Ardından örnekler %0,1 TFA içeren sulu bir çözelti ile çözdürülmüştür. Pierce® C18 Tips ile kullanma talimatında belirtilen ıslatma-şartlama-tutturma-durulama-geri kazanım işlemleri örneklerle uygulanarak konsantre edilip tuzlardan ve diğer kontaminasyonlardan arındırılmıştır. Örnekler, peptit örnekleri için uygun olan MALDI matris malzemesi alfa-siyano-4-hidroksisinnamik asit ile karıştırılıp MALDI plakasına damlatılarak kristallenmesi için kurumaya bırakılmıştır. MALDI örnek hazırlamasında iki katmanlı yöntem kullanılmıştır. İlk katmanda %80 asetonla çözdürülen matris malzemesi plakada ince tabaka oluşturacak şekilde yayılırken ikinci katmanda %40 su içeren matris 1'e 5 oranında örnek ile karıştırılarak ilk katmanın üzerine damlatılmıştır. Bu şekilde örneğin daha homojen şekilde yüzeye uygulanması sağlanmıştır (Zhang vd., 2001). Bu aşamadan sonra örnekler kütle spektrometresinde analizinin yapılması için uygun hale getirilmiş olur. Tabaka üzerinde kuruyup matrikle kristalleşen peptit örneği MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi (Bruker Daltonics, Autoflex III smartbeam) cihazına yerleştirilmiştir. Bu cihazdan proteine ait MS ve peptitlere ait MS/MS spektrumları elde edilerek, belirli algoritmalar ile oluşturulmuş veritabanı

tarama programları aracılığı ile protein veri tabanında bulunan proteinlerle karşılaştırma yapılmış ve hedef proteine ait eşleşmenin istatistiksel olarak güvenilir sonuç vermesi beklenmiştir. Taramalar halen en yaygın kullanıma sahip lisanlı veritabanı tarama yazılımlarından biri olan MASCOT (Matrix Science) programı kullanılarak yapılmıştır. Tarama sonucu peptit fragmentasyon spektrumları ile (MS/MS spektrumu) eşleşme veren proteinlerin tanımlaması yapılmış olur (Pappa vd., 2008).

Analize başlamadan önce kalibrasyon örneği ile (Bradykinin (1-7), Angiotensin\_II, ACTH (18-39), Insulin chain B) uygun metotta sistem kalibre edilerek cihazın kontrolü gerçekleştirilmiştir. MS spektrumu için veriler Bruker MALDI-TOF/TOF cihazını kontrol eden flexControl 3.0 yazılımı kullanılarak örneklerin olduğu pozisyonlardan 4000 vuruştan fazla olmak üzere lazerle 700-4000 Da aralığında veri toplanmıştır. FlexAnalysis 3.0 yazılımı ile elde edilen veriler işlenmiş ve şiddeti yüksek olan sinyaller MS/MS spektrumunu elde etmek üzere fragmente edilmiştir. Tarama işlemi Biotool 3.1 yazılımı aracılığı ile SwissProt veri bankasında taratılmıştır.

### **3.2.13. Orbitrap Fusion Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi Nano LC-MS/MS yöntemi ile peptit analizi**

ACE-inhibitör aktivitesi en yüksek çıkan <3kDa molekül ağırlığındaki peptit ekstraktlarının peptit dizi analizi için Orbitrap Fusion Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi Nano LC-MS/MS yöntemi kullanılmıştır. Bu analiz, İYTE Tümleşik Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Analizlenecek peptit örneklerini fazla tuz ve kontaminasyonlardan arındırarak zenginleştirmek için katı faz ekstraksiyonu (SPE) uygulaması C18 tip kolon ile gerçekleştirilmiştir. Örnek kontrolü sağlamak için nanodrop ile ölçüm gerçekleştirilerek 220 ve 280 nm'de absorbans değerlerine bakılmıştır. Örnekler RP-HPLC viallerine aktarılıp otomatik numune alma cihazına yerleştirilmiştir. Örnekler, 2 µL enjeksiyon ile 0.3X5 mm pepmap 100 C18 5 µm tutma kolonuna 4,5 dakika süresince dakikada 10 µL akışla yüklendikten sonra 25 cm uzunluğunda ve 75 µm çapında olan C18 malzemesinin kullanıldığı ayırım kolonunda, ters faz prensibine dayalı olarak 60 dakika süren sıvı kromatografisi (LC) programı ile yürütülmüştür. Peptitler,

%0,1 formik asit içeren su bazlı mobil fazdan %0,1 formik asit içeren asetronitril bazlı mobil faza gradient akışla geçirilerek geri kazanılmış ve kütle spektrometresine nanosprey iyonlaştırma yöntemi ile aktarılmıştır. Gradient akış, ilk 1 dakikada sabit %2 asetronitril ile başlayıp %5 asetonitrile çıkartılmış olup sonraki 30 dakika asetronitril oranı %25'e çıkartılarak devam edilmiştir. Sonraki 4 dakika sürecinde asetronitril %35'e çıkartılmış ve 2 dakika içinde de %90'a ulaştırılmıştır. %90'da 3 dakika bekletildikten sonra 5 dakika içerisinde başlangıç değerine yakın olan %4'e indirilmiş ve 10 dakika boyunca %4'te tutularak 60 dakika tamamlanmıştır. Tüm analiz boyunca mobil faz akış hızı 0,3 µL/dakika ayarlanmış olup kolon oda sıcaklığında tutulmuştur.

Kütle spektrometre cihazında veriler, otomatik LC-MS/MS yöntemi ile seri halde MS ve peşi sıra gelen 3 saniye içinde mümkün olan sayıda MS/MS spektrumu alınarak toplanmıştır. 120000 orbitrap ayırım gücünde ve 375-1500 Da aralığında pozitif modda 2 kV sprey voltajı ile toplanan MS spektrumu ardından sinyal şiddeti  $2.5e^4$  değerini geçen ve şiddeti en yoğun iyonlar 3 saniye döngü süresince cihaz içinde HCD %35'lik çarpışma enerjisi uygulanarak parçalanmaya uğratılmış ve MS/MS spektrumları kaydedilmiştir. Her defasında aynı iyonların parçalamaya uğramasını engellemek amacıyla 60 saniyelik dinamik dışlama süresi uygulanmıştır. Ham veriler mgf formatına dönüştürülerek MASCOT tarama programı ile protein veribankasında tarama yapılmıştır. MASCOT taraması başlatılmadan önce belirlenmesi gereken parametreler Çizelge 3.4.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.4. MASCOT taramasında belirlenen parametreler

|                               |                |
|-------------------------------|----------------|
| <b>Veribankası:</b>           | SwissProt      |
| <b>Enzim:</b>                 | Hiçbiri        |
| <b>Sabit modifikasyon:</b>    | yok            |
| <b>Değişken modifikasyon:</b> | Oksidasyon (M) |
| <b>Peptit yükü:</b>           | +2, +3, +4     |
| <b>Peptit toleransı:</b>      | 10 ppm         |
| <b>Fragment toleransı:</b>    | 0,02 Da        |
| <b>Kütle ölçümü:</b>          | Monoizotopik   |
| <b>Cihaz tipi:</b>            | ESI FTICR      |

Analiz kapsamında kullanılan cihaz, program ve özellikleri Çizelge 3.5.'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Analiz kapsamında kullanılan cihaz ve özellikleri

| Cihaz                                                                                                                     | Program                              | Özellik                                                  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Thermo UltiMate 3000 Serisi WPS3000(RS) ve WPS-3000FC Autosamples Nano/Cap System NCS-3500RS and Nano/Cap Pump NCP-3200RS | Thermo Scientific Xcalibur 4.4.16.14 | Acclaim PepMap 100 C18; 3µm 100Å 75µmx25cm kapiler kolon |
| Thermo Orbitrap Fusion Tribrid Kütle Spektrometresi                                                                       | Orbitrap Fusion 3.4 Tune             | Yüksek Çözünürlüklü                                      |

### 3.3 İstatistiksel Değerlendirme

Peynir üretimleri iki tekerrürlü olarak yapılmış ve analizler iki paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Peynir örneklerine yapılan analizler sonucunda gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi Minitab (versiyon, 16) istatistik paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmıştır. Olgunlaşma süresince peynir örnekleri arasındaki fark TUKEY çoklu karşılaştırma testine göre yapılmış olup en az  $p < 0,05$  önem seviyesinde test edilmiş ve sonuçlar buna göre değerlendirilerek yorumlanmıştır. Örneklerle uygulanan farklı işlemlerin (depolama süresi, süt ve enzim) etkisinin birlikte görülmesi ve yorumlanması amacıyla SPSS (versiyon, 23) istatistik paket programı aracılığı ile genel lineer model faktör analizi gerçekleştirilmiştir.

Suda çözünen ekstrakt ile <3kDa molekül ağırlığındaki peptit ekstraktlarına ait RP-HPLC kromatogramında belirlenen piklerin alan sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi için hidrofilik (0-40.dakika arası) ve hidrofobik bölge (41-100.dakika arası) olmak üzere pikler iki bölgede incelenmiş ve bu bölgelerde belirlenen toplam alanlar üzerinde genel lineer model faktör analizi uygulanmıştır.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

##### 4.1. Peynir Yapımında Kullanılan Çiğ Sütün Fizikokimyasal Değerleri

Bu çalışmada, peynir üretiminde kullanılan UF ve pastörize sütlerin üretimi için hammadde olarak kullanılan çiğ inek sütünün bileşimine ait değerler Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Çiğ inek sütünün bileşimi

| Özellikler               | Çiğ Süte Ait Değerler |
|--------------------------|-----------------------|
| Kurumadde(%)             | 9,63±0,08             |
| Yağ (%)                  | 3,4±0,07              |
| Yağsız kurumadde (%)     | 6,23±0,06             |
| Protein (%)              | 3,05±0,06             |
| Titrasyon asitliği (°SH) | 7,13±0,08             |
| Titrasyon asitliği (%LA) | 0,16±0,002            |
| pH                       | 6,73±0,03             |

Çizelge 4.1’de görüldüğü üzere bu çalışmada kullanılan çiğ inek sütünün titrasyon asitliği değeri °SH cinsinden 7,13, laktik asit cinsinden %0,16 ve pH değeri 6,73 olarak bulunmuştur. Yeni sağılmış taze çiğ sütün pH değeri 6,6–6,8 ve titrasyon asitliğinin 6,5–7,5°SH arasında olması gerektiği literatürde bildirilmiştir (Metin, 2013). Bu çalışmada kullanılan çiğ sütün pH değeri ve °SH cinsinden titrasyon asitliği değeri literatür ile uyumludur.

Türk Gıda Kodeksi Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği’ne göre; çiğ inek sütünde protein miktarının en az %2,8, yağ miktarının en az %3,5, yağsız kurumadde oranının en az %8,5 değerinde olması gerektiği bildirilmiştir. Kodekse göre çiğ inek sütünün titrasyon asitliğinin ise laktik asit cinsinden %0,135 ile %0,20 değerleri arasında olması gerekmektedir (Anonim, 2000). Bu çalışmada kullanılan çiğ sütün protein ve laktik asit cinsinden titrasyon asitliği değerinin kodeks ile uyumlu olduğu, yağ ve yağsız kurumadde değerlerinin ise kodekste belirtilen değerlerden daha düşük olduğu görülmüştür.

## 4.2. Peynir Örneklerinin Fizikokimyasal Analiz Sonuçları

### 4.2.1. Kurumadde değerleri

Bu çalışmada üretilen Beyaz peynirlerin 90 günlük olgunlaşma süresi boyunca kurumadde değerlerindeki değişim Çizelge 4.2. ve Şekil.4.1'de verilmiştir. Kurumadde değerleri üzerinde peynir yapımında kullanılan sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.3.'de verilmiştir. Üretilen Beyaz peynir örneklerinin kurumadde değerleri olgunlaşma süresi boyunca %31,62-46,15 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.2. Peynir örneklerine ait kurumadde değerleri (%)

| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                 |                          |                           |                           |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                      | M-UF                     | Ş-UF                     | M-PAS                     | Ş-PAS                     |
| <b>1.gün</b>         | 32,12±0,52 <sup>Ab</sup> | 33,82±2,84 <sup>Ab</sup> | 46,15±1,63 <sup>Aa</sup>  | 45,80±4,88 <sup>Aa</sup>  |
| <b>30.gün</b>        | 31,67±0,54 <sup>Ab</sup> | 31,62±0,85 <sup>Ab</sup> | 41,33±1,81 <sup>ABa</sup> | 38,52±1,22 <sup>ABa</sup> |
| <b>60.gün</b>        | 32,50±0,29 <sup>Ab</sup> | 33,74±2,37 <sup>Ab</sup> | 43,31±2,69 <sup>ABa</sup> | 41,31±3,69 <sup>ABa</sup> |
| <b>90.gün</b>        | 33,33±0,21 <sup>Ab</sup> | 32,11±0,63 <sup>Ab</sup> | 39,66±2,21 <sup>Ba</sup>  | 37,50±1,02 <sup>Ba</sup>  |

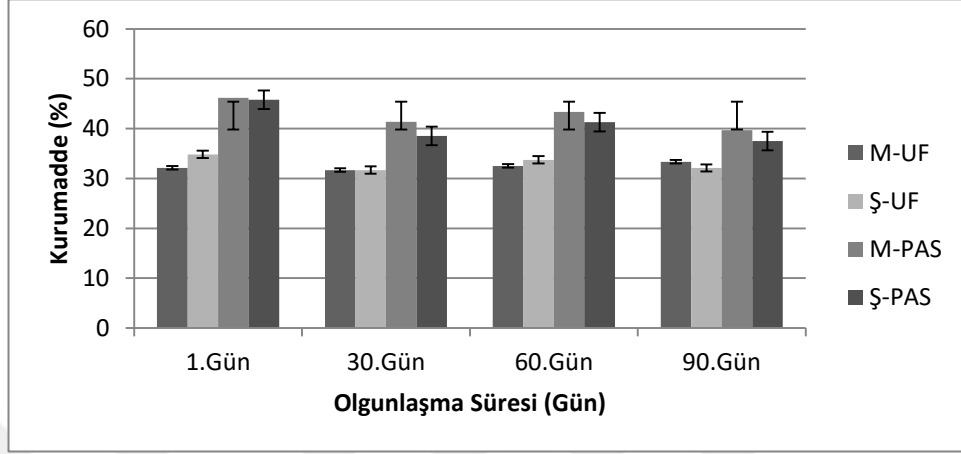
A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.3. Kurumadde değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | F       | P            |
|----------------------|---------|--------------|
| Süt                  | 219,698 | <b>0,000</b> |
| Enzim                | 0,902   | 0,347        |
| Depolama             | 10,055  | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | 1,146   | 0,339        |
| Süt x Depolama       | 5,193   | <b>0,003</b> |
| Süt x Enzim          | 4,330   | <b>0,042</b> |

Olgunlaşma süresi boyunca pastörize sütten üretilen Beyaz peynirlerin, UF sütten üretilen Beyaz peynirlere göre kurumadde değerlerinin daha yüksek olduğu belirlenmiş ve istatistiksel olarak bu farklılık önemli bulunmuştur (p<0,05). Olgunlaşmanın sonunda M-UF peynirinin kurumadde değeri, olgunlaşmanın başına göre artış gösterirken Ş-UF peynirinin kurumadde değeri olgunlaşmanın sonunda azalış göstermiş ancak bu değişimler istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (p>0,05). Pastörize sütten yapılan her iki peynirin de

günlere göre olan artış ve azalışları birbirine paralel olarak ilerlermiş ve olgunlaşma sonunda her ikisinin kurumadde değerindeki azalışları önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).



Şekil 4.1. Olgunlaşma süresi boyunca kurumadde miktarının değişimi

UF sütten üretilen peynirlerin kurumadde değerlerinin olgunlaşma süresi boyunca birbirlerine çok yakın olduğu ve günlere göre önemsiz değişimler gösterdiği belirlenirken ( $p>0,05$ ), pastörize sütten üretilen Beyaz peynirlerin günlere göre farklı değerler gösterdiği ( $p<0,05$ ) belirlenmiştir. Çizelge 4.3.'de görüldüğü üzere peynirlerin kurumadde değeri üzerinde süt, depolama ve süt x depolama ile süt x enzim interaksiyonlarının etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Salamurada olgunlaştırılan Beyaz peynirlerde depolama süresi boyunca peynir içine tuz difüze olmakta veya hidrolize olan proteinlerin, albümin azotu ve laktoglobulin gibi maddelerin peyniraltı suyuna geçmesi söz konusu olmaktadır. Ayrıca peynir kitlesi içinde depolama boyunca peptit bağlarının parçalanıp yeni peptit bağlarının açığa çıktığı ve düşük sıcaklıkta depolanan peynirlerde ile bu bağların suyu absorbe etmesi nedeniyle peynirde nem içeriğinin arttığı literatürde öne sürülmüştür (Sarantinopoulos, 2002; Kırmacı, 2010; Akan 2015; Öner, 2015). Bu çalışmada pastörize sütten üretilen M-PAS ve Ş-PAS peynirlerinde olgunlaşma sonunda kurumadde değerlerinin azaldığı belirlenmiştir. Literatürde, UF ile konsantre edilmiş sütlerden yapılan peynirlerde ise albümin azotu ve laktoglobulin gibi maddelerin büyük bir kısmı

pıhtıda kaldığı bildirilmiştir (Gencer, 2003). Yetişemeyen ve Jancso (1987) ile Arısoy (2019) tarafından yapılan çalışmalarda, UF sütten yapılan Beyaz peynirlerde olgunlaşma süresi boyunca peynirlerde kurumadde miktarının arttığı bildirilmiştir. Bu çalışmada ise UF sütten yapılan peynirlerde olgunlaşma boyunca istatistiksel olarak önemli değişimler gözlenmemiştir.

Yetişemeyen vd. (1998), farklı kaynaklardan elde edilen (hayvansal ve mikrobiyal) pıhtılaştırıcı enzimlerin UF yöntemi ile üretilen Beyaz peynirin kalitesi üzerine etkisini araştırdıkları çalışma sonucunda mikrobiyal enzimle üretilen peynirlerin, hayvansal enzimle üretilen peynirlere göre daha yüksek kurumadde miktarlarına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada peynir üretiminde kullanılan hayvansal kaynaklı enzim ve rekombinant kimozin kullanılan peynirlerin yapısındaki su miktarının benzerlik gösterdiği ancak bitkisel ve mikrobiyal enzim ile elde edilen peynirlerden daha düşük olduğu belirlenmiştir (García-Gmez vd., 2019). İstatistiksel olarak önemli bulunmamasına rağmen bu çalışmada mikrobiyal enzimle üretilen M-UF ve M-PAS peynirlerinin kurumadde değerlerinin olgunlaşma süresi boyunca hayvansal kaynaklı enzimle üretilen ř-UF ve ř-PAS peynirlerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuç, Yetişemeyen vd. (1998) ve García-Gmez vd. (2019) tarafından elde edilen bulgular ile benzerlik göstermektedir.

Ghavam (2017) UF süt kullanarak ürettiği Beyaz peynirlerde ve Yaşar (2007) Kaşar peynirinde farklı enzim kullanımının kurumadde oranları üzerine etkisinin önemli düzeyde olmadığını bildirirken, Ertürkmen vd. (2022) olgunlaşmanın 60. ve 90. gününde peynir örnekleri arasında farklı enzim kullanımının önemli bulunduğu, olgunlaşma sonunda kurumadde değerinin azaldığını bildirmişlerdir. İki farklı starter kültür kombinasyonu ile üretilen Beyaz peynirlerin 90 günlük olgunlaşma boyunca peynirler arasındaki kurumadde oranlarının benzer olduğu Karahan vd. (2010) tarafından bildirilmiştir.

İnek, koyun ve keçi sütlerinden üretilen Beyaz peynirlerde kurumadde değerinin genellikle depolamanın belli aşamasına kadar arttığı daha sonra

düştüğü ya da değişim göstermediği tespit edilmiştir (Demir, 2021). Olgunlaşmaya bağlı olarak kurumaddenin Beyaz peynirlerde azaldığı literatürde yapılan başka çalışmalarda da bildirilmiştir (Gürsoy vd., 2001; Kılıç vd., 2009; Yıldız, 2015; Koçak, 2017; Uğur ve Öner, 2018; Öner ve Sarıdağ, 2019; Fırıncioğulları, 2022)

#### 4.2.2. pH değerleri

Bu çalışmada üretilen Beyaz peynirlerin 90 günlük olgunlaşma süresi boyunca pH değerlerindeki değişim Çizelge 4.4. ve Şekil 4.2'de verilmiştir. pH değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.5.'de verilmiştir. Üretilen Beyaz peynir örneklerinin pH değerleri olgunlaşma süresi boyunca 4,32- 4,63 arasında değişmiştir.

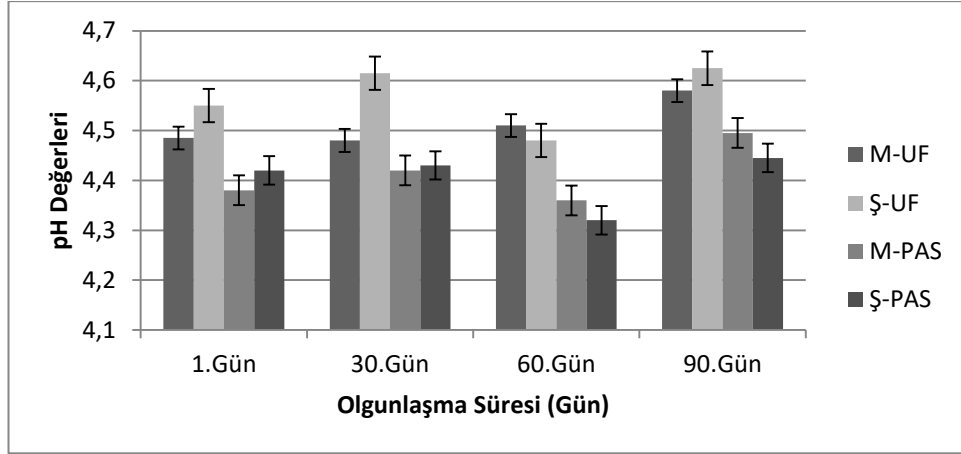
Çizelge 4.4. Peynir örneklerine ait pH değerleri

| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                |                         |                          |                         |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
|                      | M-UF                    | Ş-UF                    | M-PAS                    | Ş-PAS                   |
| <b>1.gün</b>         | 4,49±0,05 <sup>Aa</sup> | 4,55±0,06 <sup>Aa</sup> | 4,38±0,09 <sup>Ba</sup>  | 4,42±0,10 <sup>Aa</sup> |
| <b>30.gün</b>        | 4,48±0,16 <sup>Aa</sup> | 4,62±0,08 <sup>Aa</sup> | 4,42±0,04 <sup>ABa</sup> | 4,43±0,04 <sup>Aa</sup> |
| <b>60.gün</b>        | 4,51±0,13 <sup>Aa</sup> | 4,48±0,14 <sup>Ba</sup> | 4,36±0,08 <sup>Ba</sup>  | 4,32±0,04 <sup>Ba</sup> |
| <b>90.gün</b>        | 4,58±0,21 <sup>Aa</sup> | 4,63±0,26 <sup>Aa</sup> | 4,50±0,18 <sup>Aa</sup>  | 4,45±0,12 <sup>Aa</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p>0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p>0,05)

Çizelge 4.5. pH değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | F     | P            |
|----------------------|-------|--------------|
| Süt                  | 5,528 | <b>0,030</b> |
| Enzim                | 0,152 | 0,701        |
| Depolama             | 0,789 | 0,515        |
| Enzim x Depolama     | 0,194 | 0,899        |
| Süt x Depolama       | 0,022 | 0,995        |
| Süt x Enzim          | 0,323 | 0,576        |



Şekil 4.2. Olgunlaşma süresi boyunca pH değerinin değişimi

Olgunlaşma süresince peynir örneklerinin pH'sı arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ( $p>0,05$ ). Olgunlaşma süresince zamana bağlı olarak peynir örneklerinin pH değişimi M-UF peyniri dışında önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Olgunlaşma sonunda tüm peynirlerin pH değerinde artış olduğu görülmüş ancak bu artış sadece M-PAS peynirinde olgunlaşmanın başına göre önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Çizelge 4.5.'de görüldüğü üzere peynirlerin pH değeri üzerinde yalnızca peynir üretiminde kullanılan sütün etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuş ( $p>0,05$ ), diğer faktörler önemli bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Şekil 4.2.'ye göre olgunlaşma sonunda UF sütten üretilen Beyaz peynirlerin pastörize sütten üretilen Beyaz peynirlere göre daha yüksek pH değerlerine sahip olduğu görülmektedir ( $p>0,05$ ). Bu durum, UF sütten yapılan Beyaz peynirlerde kazein misellerine bağlanan minerallerin, UF retentatının tamponlama kapasitesinde artışa neden olması ve bu durumun LAB'nin asitleşme kinetiğini de etkilemesi ile açıklanabilmektedir. Olgunlaşma süresi boyunca UF sütten üretilen Beyaz peynirlerin pH değerlerindeki dalgalanma benzer olarak Soltanı vd. (2016) ve Ghavam (2017) tarafından yapılan çalışmalarda da bildirilmiştir. Arısoy (2019) tarafından yapılan çalışmada, UF sütten yapılan Beyaz peynirlerde olgunlaşma boyunca pH değerlerinin 4,18-4,72 aralığında değiştiği ve 120 günlük olgunlaşma süresi boyunca pH değerinin tüm peynir örneklerinde düşüş gösterdiği bildirilmiştir. Fathollahi vd. (2010) tarafından İran UF peynirleri üzerinde yapılan bir çalışmada pH değerlerinin 60.

güne kadar azaldığı, 60. günden itibaren olgunlaşmanın sonuna kadar arttığı bildirilmiştir. Yetişemeyen vd. (1998), UF süttten ürettikleri Beyaz peynirlerde, hayvansal enzime göre mikrobiyal enzimin daha düşük pH değerine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada UF süttten yapılan peynirlere ait pH değerinin, olgunlaşmanın 60. günü dışında Yetişemeyen vd. (1998)'nin belirttiği sonuç ile birlikte Arısoy (2019) tarafından bildirilen pH aralığı ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Literatürde yapılan çalışmalar sonucunda, farklı pıhtılaştırıcı enzimler ile üretilmiş değişik peynirlerde pH değerlerinin birbirine yakın olduğu ve enzimin pH üzerinde önemli bir etkisi olmadığı bildirilmiştir (Karaca ve Güven, 2000; Yaşar, 2007; Pino vd., 2009; Moynihan vd., 2014). Bu sonuçların aksine Ertürkmen vd. (2022) tarafından yapılan çalışmada, Beyaz peynirlerde en yüksek pH değerlerinin olgunlaşmanın 0. ve 30. gününde bitkisel enzim ile üretilen gruplarda belirlendiği bildirilmiştir.

Olgunlaşma süresi boyunca Beyaz peynirlerde pH değerlerinin dalgalı bir değer gösterebileceği ve bunun nedeni olarak olgunlaşma ilerledikçe proteolize bağlı olarak bazik karakterdeki maddelerin oluşması ile kurumadadaki değişimden kaynaklandığı birçok çalışmada bildirilmiştir (Öner vd., 2006; Fathollahi vd., 2010; Karahan vd., 2010; Şahingil, 2012; Öner, 2015; Koçak, 2017; Demir, 2021).

#### **4.2.3. Titrasyon asitliği değerleri**

Bu çalışmada üretilen Beyaz peynirlerin 90 günlük olgunlaşma süresi boyunca titrasyon asitliği değerlerindeki değişim Çizelge 4.6. ve Şekil.4.3'de verilmiştir. Titrasyon asitliği değerleri üzerinde süttün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.7.'de verilmiştir. Üretilen Beyaz peynir örneklerinin titrasyon asitliği değerleri olgunlaşma süresi boyunca 57,50- 76 °SH arasında değişmiştir.

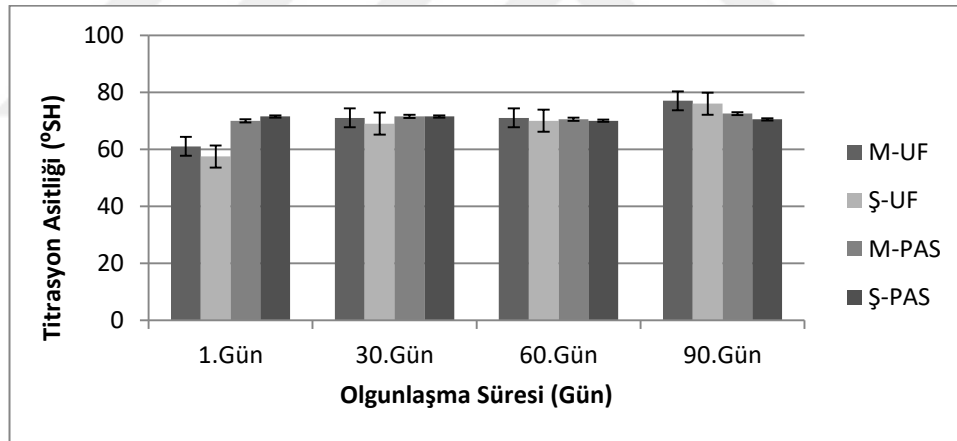
Çizelge 4.6. Peynir örneklerine ait titrasyon asitliği (SH) değerleri

| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER               |                          |                         |                         |
|----------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                      | M-UF                   | Ş-UF                     | M-PAS                   | Ş-PAS                   |
| <b>1.gün</b>         | 61±1,00 <sup>Bb</sup>  | 57,50±2,50 <sup>Bb</sup> | 70±0,00 <sup>Aa</sup>   | 71,5±0,50 <sup>Aa</sup> |
| <b>30.gün</b>        | 71±0,00 <sup>ABa</sup> | 69±0,94 <sup>ABa</sup>   | 71,5±3,50 <sup>Aa</sup> | 71,5±2,50 <sup>Aa</sup> |
| <b>60.gün</b>        | 71±3,00 <sup>ABa</sup> | 70±2,00 <sup>ABa</sup>   | 70,5±1,50 <sup>Aa</sup> | 70±0,00 <sup>Aa</sup>   |
| <b>90.gün</b>        | 77±2,00 <sup>Aa</sup>  | 76±1,00 <sup>Aa</sup>    | 72,5±2,50 <sup>Aa</sup> | 70,5±2,50 <sup>Aa</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.7. Titrasyon asitliği değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | F      | P            |
|----------------------|--------|--------------|
| Süt                  | 4,411  | <b>0,049</b> |
| Enzim                | 1,327  | 0,264        |
| Depolama             | 16,334 | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | 0,029  | 0,993        |
| Süt x Depolama       | 14,156 | <b>0,000</b> |
| Süt x Enzim          | 0,776  | 0,389        |



Şekil 4.3. Olgunlaşma süresi boyunca titrasyon asitliğinin değişimi

Bu çalışmada, olgunlaşma süresi boyunca UF süttten üretilen Beyaz peynir örneklerinin titrasyon asitliği değerlerinin artış gösterdiği (p<0,05) pastörize süttten yapılan Beyaz peynir örnekleri olgunlaşma süresi boyunca önemli bir değişim göstermediği belirlenmiştir (p>0,05). Olgunlaşmanın başında UF süttten üretilen Beyaz peynirlerin titrasyon asitliği değerlerinin pastörize süttten üretilen Beyaz peynirlerden daha düşük olduğu görülmüştür (p<0,05). Olgunlaşma sonunda ise bu durumun tam tersi olduğu ancak peynir örnekleri

arasındaki farklılığın istatistiksel olarak önemli bulunmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ). Olgunlaşmanın başında ve sonunda sütlerin üretim tekniğine göre gözlenen bu farklılığın dışında sütlerin pıhtılaştırılmasında kullanılan enzimlere göre bir farklılık olmadığı gözlenmiştir ( $p>0,05$ ). Çizelge 4.7.'de görüldüğü üzere peynirlerin titrasyon asitliği değeri üzerinde süt, depolama ve süt x depolama interaksiyonunun etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Peynirdeki asitlik büyük oranda kazein ve parakazein gibi azotlu maddelerden kaynaklanır. Diğer kısmı ise peynirin olgunlaşma sürecinde oluşan laktik asit, bütirik asit, formik asit, asetik asit gibi ürünler ile, lipoliz sonucunda meydana gelen serbest yağ asitleri ve proteoliz sonucunda oluşan serbest amino asitlerden kaynaklanır (Şimşek, 1995; Akın ve Şahan, 1998; Fox vd., 2000). UF Beyaz peynirde yapılan bir çalışmada titrasyon asitliğinin olgunlaşma süresince arttığı bildirilmiştir (Arisoy ve Öner, 2019). Çepoğlu (2005) tarafından yapılan çalışmada, Beyaz peynirlerde titrasyon asitliğinin en yüksek buzağı renneti ile üretilen peynirde, en düşük ise rekombinant enzimle üretilen peynirde olduğu görülmüştür. Bir diğer çalışmada, olgunlaşmanın 90. gününde en yüksek titrasyon asitliği değerinin pastörize süt ve hayvansal enzim kullanılarak üretilen peynirde olduğu bildirilmiştir (Ertürkmen vd., 2022). Beyaz peynirlere farklı oranlarda proteolitik enzim ilavesinin etkisi üzerine yapılan bir çalışmada olgunlaşma süresi boyunca peynirlerin titrasyon asitliğinin arttığı ve enzim ilavesinin bu sonuçları etkilemediği Karaca (2007) tarafından bildirilmiştir. Öner ve Sarıdağ (2019), Beyaz peynirlerin titrasyon asitliğinde 3. aya kadar artış olduğunu, 6.-9. aylarda ise azalış olduğunu, bunun nedeninin proteolize bağlı olarak bazik karakterdeki maddelerin ortamda oluşması ve kurumaddedeki değişim olduğunu vurgulamıştır. Benzer olarak literatürde olgunlaşmaya bağlı olarak titrasyon asitliğinin etkilendiği bildirilmiştir (Wishah, 2007; Koçak, 2017; Uğur ve Öner, 2018; Öztürk vd., 2021; Fırıncioğulları, 2022)

#### **4.2.4. Yağ ve kurumaddede yağ değerleri**

Bu çalışmada üretilen Beyaz peynirlerin 90 günlük olgunlaşma süresi boyunca yağ ve kurumaddede yağ değerlerindeki değişim sırasıyla Çizelge 4.8 ve Şekil

4.4 ile Çizelge 4.10 ve Şekil 4.5’de verilmiştir. Yağ ve kurumaddede yağ değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek sırasıyla Çizelge 4.9. ve Çizelge 4.11.’de verilmiştir. Üretilen Beyaz peynir örneklerinin yağ ve kurumaddede yağ değerleri olgunlaşma süresi boyunca sırasıyla %13,50-25,88 ve %40,89-64,34 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.8. Peynir örneklerine ait yağ değerleri (%)

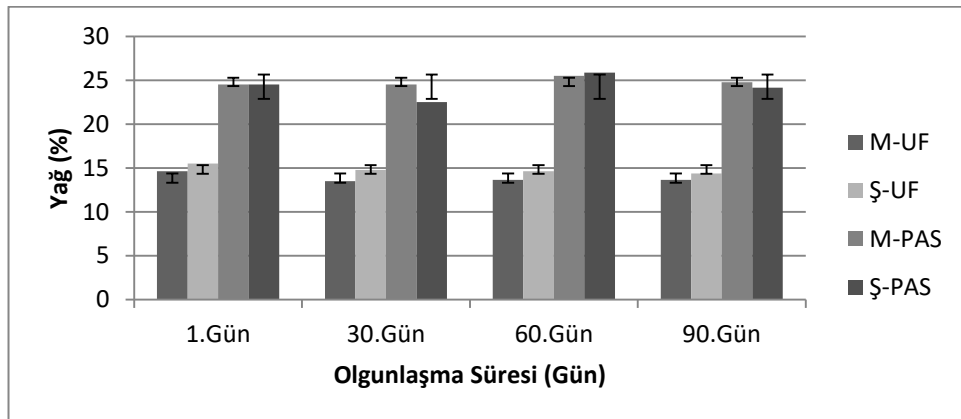
| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                 |                           |                          |                          |
|----------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                      | M-UF                     | Ş-UF                      | M-PAS                    | Ş-PAS                    |
| <b>1.gün</b>         | 14,63±1,85 <sup>Ab</sup> | 15,50±0,50 <sup>Ab</sup>  | 24,50±1,50 <sup>Aa</sup> | 24,50±0,90 <sup>Aa</sup> |
| <b>30.gün</b>        | 13,50±1,06 <sup>Ac</sup> | 14,75±0,43 <sup>ABc</sup> | 24,50±0,87 <sup>Aa</sup> | 22,50±0,50 <sup>Bb</sup> |
| <b>60.gün</b>        | 13,63±0,41 <sup>Ab</sup> | 14,63±0,41 <sup>ABb</sup> | 25,50±1,17 <sup>Aa</sup> | 25,88±0,74 <sup>Aa</sup> |
| <b>90.gün</b>        | 13,63±0,65 <sup>Ab</sup> | 14,38±0,41 <sup>Bb</sup>  | 24,75±0,56 <sup>Aa</sup> | 24,13±0,74 <sup>Aa</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.9. Yağ değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | F        | P            |
|----------------------|----------|--------------|
| Süt                  | 1534,748 | <b>0,000</b> |
| Enzim                | 0,438    | 0,511        |
| Depolama             | 3,635    | <b>0,019</b> |
| Enzim x Depolama     | 0,738    | 0,535        |
| Süt x Depolama       | 4,175    | <b>0,010</b> |
| Süt x Enzim          | 9,419    | <b>0,003</b> |



Şekil 4.4. Olgunlaşma süresi boyunca yağ miktarının değişimi

UF sütün üretilen Beyaz peynirlerin yağ değerlerinin, pastörize sütün üretilen Beyaz peynirlerin yağ değerine göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük olduğu görülmektedir ( $p<0,05$ ). Olgunlaşma süresi mikrobiyal enzimle üretilmiş M-UF ve M-PAS peynirlerinin günlere göre değişimleri önemli bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Şirden mayası ile üretilmiş Ş-UF peynirinin olgunlaşma sonundaki azalışı önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Çizelge 4.9.'da görüldüğü üzere peynirlerin yağ değeri üzerinde süt, depolama ile süt x depolama ve süt x enzim interaksiyonlarının etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

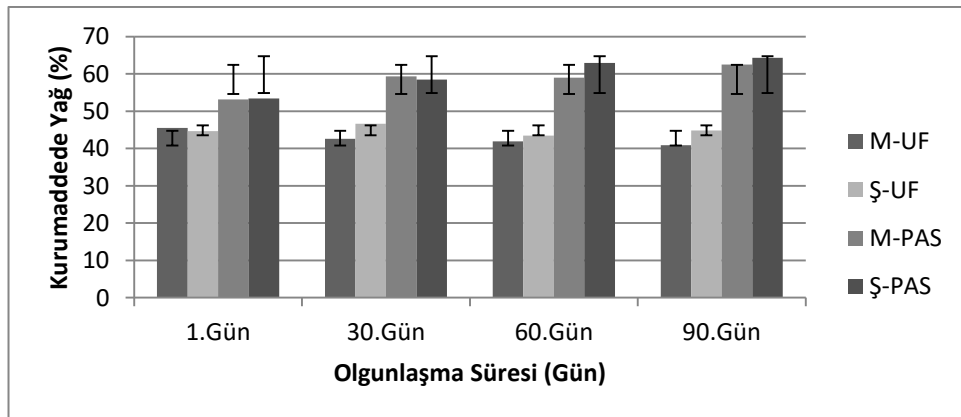
Çizelge 4.10. Peynir örneklerine ait kurumaddede yağ değerleri (%)

| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                  |                          |                           |                           |
|----------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                      | M-UF                      | Ş-UF                     | M-PAS                     | Ş-PAS                     |
| <b>1.gün</b>         | 45,48±5,27 <sup>Ab</sup>  | 44,62±2,57 <sup>Ab</sup> | 53,12±3,42 <sup>Ba</sup>  | 53,36±3,97 <sup>Ba</sup>  |
| <b>30.gün</b>        | 42,59±2,82 <sup>ABb</sup> | 46,59±1,64 <sup>Ab</sup> | 59,34±2,07 <sup>Aa</sup>  | 58,46±2,22 <sup>ABa</sup> |
| <b>60.gün</b>        | 41,92±1,22 <sup>ABb</sup> | 43,41±2,25 <sup>Ab</sup> | 58,95±2,38 <sup>ABa</sup> | 62,91±3,59 <sup>Aa</sup>  |
| <b>90.gün</b>        | 40,89±1,97 <sup>Bb</sup>  | 44,77±1,41 <sup>Ab</sup> | 62,5±1,95 <sup>Aa</sup>   | 64,34±1,07 <sup>Aa</sup>  |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir ( $p<0,05$ )  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir ( $p<0,05$ )

Çizelge 4.11. Kurumaddede yağ değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | F       | P            |
|----------------------|---------|--------------|
| Süt                  | 381,649 | <b>0,000</b> |
| Enzim                | 4,738   | <b>0,034</b> |
| Depolama             | 4,507   | <b>0,007</b> |
| Enzim x Depolama     | 0,877   | 0,459        |
| Süt x Depolama       | 11,937  | <b>0,000</b> |
| Süt x Enzim          | 0,285   | 0,596        |



Şekil 4.5. Olgunlaşma süresi boyunca kurumaddede yağ miktarının değişimi

Peynirlerin kurumaddede yağ değerleri, peynir yapımında kullanılan sütten üretim yöntemine göre olgunlaşma boyunca farklılık göstermiştir. UF sütten üretilen Beyaz peynirlerin kurumaddede yağ değerlerinin, pastörize sütten üretilen Beyaz peynirlere göre daha düşük olduğu Şekil 4.5’de görülmektedir. Bu farklılık Çizelge 4.10.’da görüldüğü üzere istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. M-UF peynirinde olgunlaşmanın başındaki kurumaddede yağ değeri olgunlaşma sonunda azalırken ( $p<0,05$ ) Ş-UF peynirinde önemli bir değişim gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ). Pastörize sütten üretilen Beyaz peynirlerde ise olgunlaşma süresi boyunca kurumaddede yağ değerlerinde artış görülmüştür ( $p<0,05$ ). Çizelge 4.11.’de görüldüğü üzere peynirlerin kurumaddede yağ değeri üzerinde süt, enzim, depolama ve süt x depolama interaksiyonunun etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Öner ve Sarıdağ (2019) keçi sütünden ürettikleri Beyaz peynirlerin 9 aylık olgunlaşma süresi boyunca kurumaddede yağ değerlerinin %40,57-53,60 arasında değiştiğini, başlangıç ve olgunlaşma süresince kurumaddelerdeki farklılıklar nedeniyle bu değişimlerin gözlemlendiğini gözlemlemişlerdir. Bu çalışmadaki pastörize sütten üretilen Beyaz peynirlerin kurumaddede yağ değerleri ile bu sonuç paralellik göstermektedir. Yapılan başka bir çalışmada Beyaz peynirlerde kurumaddede yağ değerlerinin %49,93 – 58,58 değiştiği belirlenmiş, tüm peynirlerde olgunlaşma sonunda arttığı bildirilmiştir (Fırıncioğulları, 2022). Yetişemeyen vd. (1998), hem UF yöntemi hem de geleneksel yöntem ile üretilen peynirlerde olgunlaşmanın başında ve sonunda mikrobiyal enzim ile üretilen peynirin yağ içeriğinin hayvansal kaynaklı enzimle üretilen peynire göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçların, bu çalışmada UF sütten üretilen Beyaz peynirler için tam tersi olduğu görülmektedir.

Peynirlerin yağ ve kurumaddede yağ oranları üzerine pıhtılaştırıcı enzim farklılığının önemli düzeyde etkili olmadığı literatürde birçok çalışmada bildirilmiştir (Çepoğlu, 2005; Yaşar, 2007; Pino vd., 2009). Farklı enzimler ile üretilmiş Beyaz peynirde olgunlaşma süresince yağ oranının %18,17 - 23,37 arasında değiştiği bildirilmiştir (Süner, 2018; Ertürkmen vd., 2022). Arısoy ve

Öner (2019) tarafından yapılan çalışma sonucunda, UF sütün üretilen Beyaz peynirlerin yağ oranında olgunlaşma süresi boyunca önemli bir değişiklik görülmediği vurgulanmıştır. Araştırmacılar bu durumun nedeni olarak, UF Beyaz peynirlerde süt yağının tamamen retentatta kaldığını ve bu nedenle geleneksel yöntemde peyniraltı suyu ile oluşan yağ kayıplarının engellenmiş olduğunu, dolayısıyla peynirlerin yağ oranında olgunlaşma sürecinde değişiklik meydana gelmediğini öne sürmüşlerdir.

#### 4.2.5. Tuz ve kurumaddede tuz değerleri

Bu çalışmada üretilen Beyaz peynirlerin 90 günlük olgunlaşma süresi boyunca tuz ve kurumaddede tuz değerlerindeki değişim sırasıyla Çizelge 4.12 ve Şekil 4.6 ile Çizelge 4.14 ve Şekil 4.7’de verilmiştir. Tuz ve kurumaddede tuz değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek sırasıyla Çizelge 4.13. ve Çizelge 4.15.’de verilmiştir. Üretilen Beyaz peynir örneklerinin tuz ve kurumaddede tuz değerleri olgunlaşma süresi boyunca sırasıyla %2,57-3,97 ve %6,23-11,68 arasında değişmiştir.

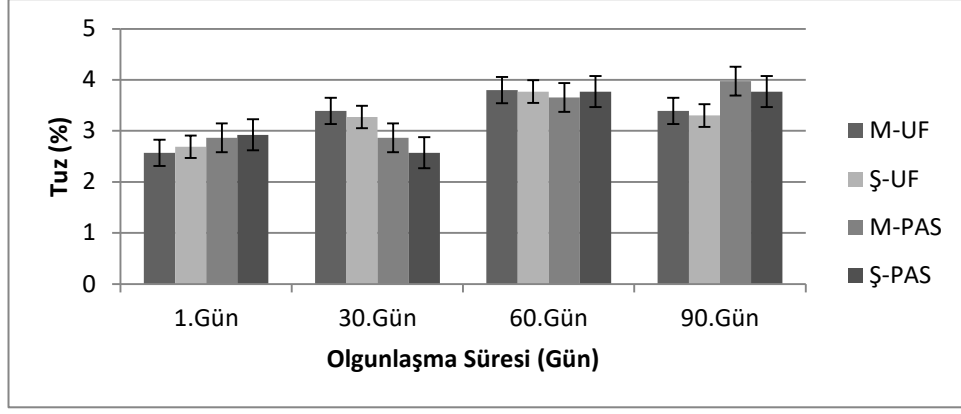
Çizelge 4.12. Peynir örneklerine ait tuz değerleri (%)

| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                |                          |                          |                         |
|----------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
|                      | M-UF                    | Ş-UF                     | M-PAS                    | Ş-PAS                   |
| <b>1.gün</b>         | 2,57±0,17 <sup>Ca</sup> | 2,69±0,12 <sup>Ca</sup>  | 2,86±0,53 <sup>Ba</sup>  | 2,92±0,58 <sup>Ba</sup> |
| <b>30.gün</b>        | 3,39±0,12 <sup>Ba</sup> | 3,27±0,17 <sup>Bab</sup> | 2,86±0,35 <sup>Bbc</sup> | 2,57±0,17 <sup>Bc</sup> |
| <b>60.gün</b>        | 3,80±0,36 <sup>Aa</sup> | 3,77±0,56 <sup>Aa</sup>  | 3,65±0,28 <sup>ABa</sup> | 3,77±0,13 <sup>Aa</sup> |
| <b>90.gün</b>        | 3,39±0,12 <sup>Bb</sup> | 3,3±0,17 <sup>Bb</sup>   | 3,97±0,17 <sup>Aa</sup>  | 3,77±0,17 <sup>Aa</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.13. Tuz değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | F      | P             |
|----------------------|--------|---------------|
| Süt                  | 6,189  | <b>0,0507</b> |
| Enzim                | 0,407  | 0,527         |
| Depolama             | 29,835 | <b>0,000</b>  |
| Enzim x Depolama     | 0,686  | 0,565         |
| Süt x Depolama       | 8,183  | <b>0,000</b>  |
| Süt x Enzim          | 0,089  | 0,767         |



Şekil 4.6. Olgunlaşma süresi boyunca tuz miktarının değişimi

Peynirlerin tuz değerleri, olgunlaşma sonunda pastörize sütün yapılan Beyaz peynirler için artış göstermiş ve olgunlaşmanın başına göre bu artış önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). UF sütün yapılan Beyaz peynirlerde ise olgunlaşma sonuna kadar artış gözlenirken olgunlaşma sonunda azalış gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Olgunlaşma sonunda M-PAS ve Ş-PAS peynirlerin tuz oranının, M-UF ve Ş-UF'den yüksek olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Çizelge 4.13.'de görüldüğü üzere peynirlerin tuz değeri üzerinde süt ve depolama ile birlikte süt x depolama interaksiyonunun etkileri önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Çizelge 4.14. Peynir örneklerine ait kurumaddede tuz değerleri (%)

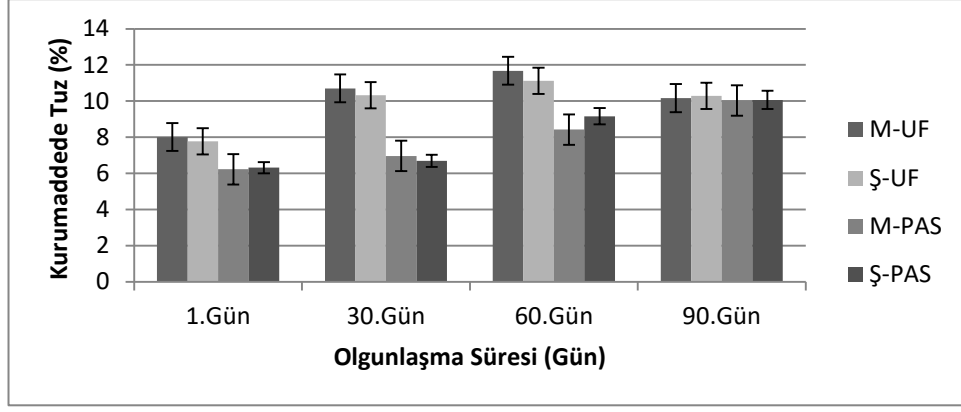
| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                 |                           |                          |                          |
|----------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                      | M-UF                     | Ş-UF                      | M-PAS                    | Ş-PAS                    |
| <b>1.gün</b>         | 8,02±0,64 <sup>Ba</sup>  | 7,78±0,81 <sup>Ba</sup>   | 6,23±1,27 <sup>Ca</sup>  | 6,32±0,64 <sup>Ba</sup>  |
| <b>30.gün</b>        | 10,71±0,42 <sup>Aa</sup> | 10,33±0,27 <sup>Aa</sup>  | 6,97±1,08 <sup>BCb</sup> | 6,69±0,58 <sup>Bb</sup>  |
| <b>60.gün</b>        | 11,68±1,01 <sup>Aa</sup> | 11,13±1,27 <sup>Aab</sup> | 8,42±0,28 <sup>ABc</sup> | 9,17±0,56 <sup>Abc</sup> |
| <b>90.gün</b>        | 10,17±0,35 <sup>Aa</sup> | 10,29±0,57 <sup>Aa</sup>  | 10,03±0,36 <sup>Aa</sup> | 10,07±0,69 <sup>Aa</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir ( $p<0,05$ )

a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir ( $p<0,05$ )

Çizelge 4.15. Kurumaddede tuz değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | F      | P            |
|----------------------|--------|--------------|
| Süt                  | 90,724 | <b>0,000</b> |
| Enzim                | 0,075  | 0,785        |
| Depolama             | 46,306 | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | 0,212  | 0,888        |
| Süt x Depolama       | 12,315 | <b>0,000</b> |
| Süt x Enzim          | 0,930  | 0,339        |



Şekil 4.7. Olgunlaşma süresi boyunca kurumaddede tuz miktarının değişimi

Peynir örneklerinin kurumaddede tuz oranları UF sütten yapılan Beyaz peynirlerde olgunlaşma sonunda azalırken ( $p>0,05$ ), pastörize sütten yapılan Beyaz peynirlerde olgunlaşma süresi boyunca düzenli olarak artış göstermiştir ( $p<0,05$ ). Şekil 4.7.'de görüldüğü üzere olgunlaşma sonuna kadar UF sütten üretilen Beyaz peynirlerin kurumaddede tuz oranının pastörize sütten üretilen Beyaz peynirlerden daha yüksek olduğu, olgunlaşmanın sonunda ise peynir örnekleri arasındaki farkın önemsiz olduğu belirlenmiştir ( $p>0,05$ ). Çizelge 4.15.'de görüldüğü üzere peynirlerin kurumaddede tuz değeri üzerinde süt, depolama ve süt x depolama interaksiyonunun etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Peynirde olgunlaşma süresince artan asitlik ile birlikte salamuradan peynir kitlesine geçen tuz miktarı azalır. Bunun nedeni, yüksek asitlikte pıhtıdaki tuzun eriyebilirliğinin daha az olması, hem de sineresiz artacağından peynirdeki nem içeriğinin azalması şeklinde açıklanmaktadır (Guinee ve Fox, 1993). Beyaz peynirlerde, salamurada olgunlaştırıldığı süre boyunca peynir içine tuz difüzyonu ya da protein hidrolizatlarının salamuraya difüzyonu söz konusudur (Öner, 2015). Bu bilgiler ile bağlantılı olarak UF sütten yapılan peynirlerde olgunlaşmanın sonunda titrasyon asitliği arttığı için tuz oranının 60. günden 90. güne göre azaldığı gözlenmiştir. Pastörize sütten yapılan peynirlerde ise kurumaddenin olgunlaşma sonunda azaldığı, dolayısıyla peynirin nem içeriğinin arttığı, bunun sonucu olarak peynir kitlesine salamuradan tuz geçişlerinin fazla olduğu ve bu peynirlerde olgunlaşma sonunda kurumaddede tuz değerlerinin

arttığı görülmektedir. Bu çalışmada olgunlaşmanın sonunda bu veriler ışığında peynirlerin kurumadde tuz değerleri arasındaki farkın kapanmasının nedeni anlaşılmaktadır.

Çelik ve Uysal (2009) tarafından yapılan çalışmada tuz değerlerinin taze Beyaz peynirlerde %2,00-4,64, olgunlaştırılmış Beyaz peynirlerde ise %2,20-8,70 arasında değiştiği bildirilmiştir. Karahan vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada tuz değerlerinin Beyaz peynirde %2,05-3,74 ile %2,98-4,61 arasında değiştiği, olgunlaşmaya bağlı olarak tuz değerlerinin istatistiksel açıdan önemli olarak arttığı belirlenmiştir. İnek, koyun ve keçi sütünden üretilen Beyaz peynirlerde yapılan bir çalışmada 180 günlük olgunlaşma süresince tuz oranının, keçi ve koyun sütünden üretilen peynirler için depolamanın 150. gününe kadar, inek sütünden üretilen peynirde ise depolama sonuna kadar artış gösterdiği belirlenirken kurumadde tuz oranları da benzer şekilde olgunlaşma süresince artış eğilimi gösterdiği bildirilmiştir (Demir, 2021).

Farklı enzimlerin peynirler üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada, peynirlerin tuz oranının olgunlaşmaya bağlı olarak değiştiği ve farklı enzim kullanımına bağlı bir farklılık olmadığı vurgulanırken, peynirlerin kurumadde tuz değerleri üzerinde depolamanın etkisinin istatistiksel olarak önemli bulunmadığı bildirilmiştir (Yaşar, 2007). UF süttten yapılan Beyaz peynirlerde farklı enzim, farklı starter kültür ve depolama sıcaklığının etkilerinin araştırıldığı çalışmada bu etkenlerin tuz değişimine etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı, olgunlaşma süresine göre değişkenlik gösterdiği Arısoy (2019) tarafından bildirilmiştir. Çalışmada olgunlaşmaya bağlı olarak tuz oranlarının artması, UF süttten yapılan Beyaz peynirlerde kuru tuzlama yapıldığı için olgunlaşmanın başında düşük olan tuz oranının olgunlaşma süresi ilerledikçe artış göstermesi peynir üretiminde kullanılan tuzun, peynir yüzeyinden merkeze doğru hareket etmesinden kaynaklanması ile açıklanmıştır. UF Beyaz peynirlerde benzer olarak Soltanı (2013) tuz oranlarının kurumadde miktarına paralel olarak artış gösterdiğini, Pezeshki vd. (2011) ise farklı pıhtılaştırıcı enzimlerin tuz oranı üzerinde etkisinin önemli olmadığını bildirmiştir.

#### 4.2.6. Toplam protein ve kurumaddede protein değerleri

Bu çalışmada üretilen Beyaz peynirlerin 90 günlük olgunlaşma süresi boyunca toplam protein değerlerindeki değişim izelge 4.16 ve şekil 4.8’de verilmiştir. Toplam protein değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek izelge 4.17.’de verilmiştir. Üretilen Beyaz peynir örneklerinin toplam protein değerleri olgunlaşma süresi boyunca %11,94-16,32 arasında değişmiştir.

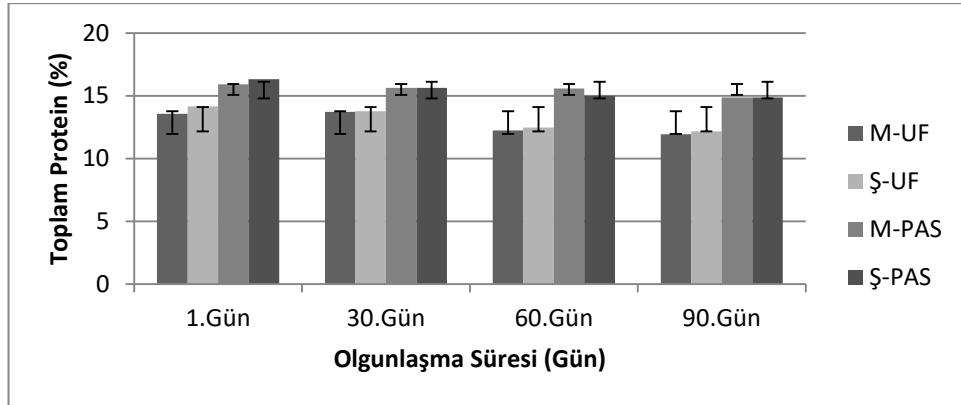
Çizelge 4.16. Peynir örneklerine ait toplam protein değerleri (%)

| OLGUNLAşMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                 |                          |                           |                           |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                      | M-UF                     | ř-UF                     | M-PAS                     | ř-PAS                     |
| 1.gn                | 13,57±0,81 <sup>Ab</sup> | 14,15±0,45 <sup>Ab</sup> | 15,91±0,44 <sup>Aa</sup>  | 16,32±0,25 <sup>Aa</sup>  |
| 30.gn               | 13,71±0,54 <sup>Ab</sup> | 13,76±0,14 <sup>Ab</sup> | 15,63±0,39 <sup>ABa</sup> | 15,63±0,61 <sup>ABa</sup> |
| 60.gün               | 12,23±0,24 <sup>Bb</sup> | 12,46±0,29 <sup>Bb</sup> | 15,59±0,16 <sup>ABa</sup> | 14,98±0,49 <sup>BCa</sup> |
| 90.gün               | 11,94±0,14 <sup>Bb</sup> | 12,15±0,25 <sup>Bb</sup> | 14,88±0,19 <sup>Ba</sup>  | 14,87±0,24 <sup>Ca</sup>  |

A,B,C,D: Aynı stnda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.17. Toplam protein değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | F       | P            |
|----------------------|---------|--------------|
| Süt                  | 479,723 | <b>0,000</b> |
| Enzim                | 1,713   | 0,196        |
| Depolama             | 40,772  | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | 1,492   | 0,228        |
| Süt x Depolama       | 3,454   | <b>0,023</b> |
| Süt x Enzim          | 1,054   | 0,310        |



şekil 4.8. Olgunlaşma süresi boyunca toplam protein miktarının değişimi

Bu çalışmada üretilen peynirlerin tümünde toplam protein oranında zamana bağlı azalış olduğu görülmüş ve bu azalış olgunlaşma sonunda önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). UF sütten üretilen Beyaz peynirlerin toplam protein oranının olgunlaşma süresi boyunca pastörize sütten üretilen Beyaz peynirlerden daha düşük olduğu Şekil 4.8’de görülmektedir ( $p<0,05$ ). Olgunlaşma süresi boyunca M-UF ve Ş-UF peynirler arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemsiz bulunsa da toplam protein oranının M-UF’ye göre Ş-UF’ peynirinde daha yüksek olduğu görülmektedir ( $p>0,05$ ). Pastörize sütten yapılan Beyaz peynirler arasında da istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Peynirlerin toplam protein oranındaki değişimin, olgunlaşma süresine ve peynir yapımında kullanılan sütün üretim yöntemine göre istatistiksel olarak farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Olgunlaşma sürecinde toplam protein oranında görülen azalmalar, proteinlerin proteolize bağlı olarak parçalanarak suda çözünen azotlu bileşiklere dönüşüp salamura geçmesi ile gerçekleşir. Çizelge 4.17.’de görüldüğü üzere peynirlerin toplam protein değeri üzerinde süt, depolama ve süt x depolama interaksiyonunun etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Bu çalışmada üretilen Beyaz peynirlerin 90 günlük olgunlaşma süresi boyunca kurumaddede protein değerlerindeki değişim Çizelge 4.18 ve Şekil 4.9’da verilmiştir. Kurumaddede protein değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.19.’da verilmiştir. Üretilen Beyaz peynir örneklerinin kurumaddede protein değerleri olgunlaşma süresi boyunca %34,49-43,45 arasında değişmiştir.

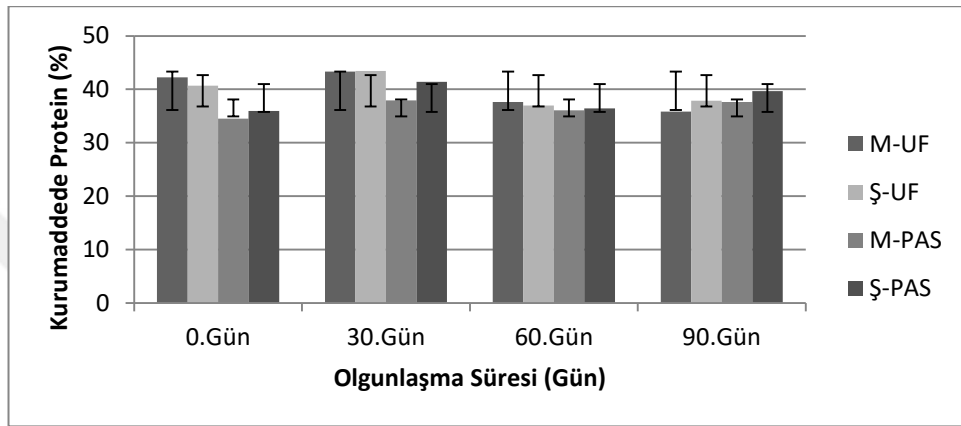
Çizelge 4.18. Peynir örneklerine ait kurumaddede protein değerleri (%)

| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                 |                            |                           |                           |
|----------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                      | M-UF                     | Ş-UF                       | M-PAS                     | Ş-PAS                     |
| <b>1.gün</b>         | 42,25±2,51 <sup>Aa</sup> | 40,69±1,43 <sup>ABa</sup>  | 34,49±1,59 <sup>Ab</sup>  | 35,96±3,19 <sup>Bb</sup>  |
| <b>30.gün</b>        | 43,30±2,19 <sup>Aa</sup> | 43,45±1,12 <sup>Aa</sup>   | 37,91±2,16 <sup>Ab</sup>  | 41,43±1,28 <sup>Aab</sup> |
| <b>60.gün</b>        | 37,64±0,84 <sup>Ba</sup> | 36,99±1,9 <sup>Ca</sup>    | 36,07±1,68 <sup>Aa</sup>  | 36,41±1,8 <sup>ABa</sup>  |
| <b>90.gün</b>        | 35,81±0,38 <sup>Bb</sup> | 37,85±0,97 <sup>BCab</sup> | 37,62±2,20 <sup>Aab</sup> | 39,69±1,59 <sup>ABa</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir ( $p<0,05$ )  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir ( $p<0,05$ )

Çizelge 4.19. Kurumaddede protein değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | F      | P            |
|----------------------|--------|--------------|
| Süt                  | 19,885 | <b>0,000</b> |
| Enzim                | 3,195  | 0,080        |
| Depolama             | 15,857 | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | 1,325  | 0,276        |
| Süt x Depolama       | 11,291 | <b>0,000</b> |
| Süt x Enzim          | 3,248  | 0,077        |



Şekil 4.9. Olgunlaşma süresi boyunca kurumaddede protein miktarındaki değişim

Bu çalışmada UF sütten üretilen Beyaz peynirlerin kurumaddede protein değerinin olgunlaşmanın sonunda azaldığı ( $p<0,05$ ) pastörize sütten üretilen Beyaz peynirlerin kurumaddede protein değerlerinin ise artış gösterdiği belirlenmiştir ( $p>0,05$ ). Peynirlerin bu farklılıkları, olgunlaşma süresince peynir yapımında kullanılan sütlerin üretim yöntemine göre farklılık gösteren kurumadde değerlerinden dolayı gerçekleşmiştir. Kurumadde değerlerinin pastörize sütten yapılan Beyaz peynirlerde, olgunlaşma sonunda azalış göstermesi ile bu peynirlerin kurumaddede protein miktarı artış göstermiştir. UF sütten yapılan Beyaz peynirlerde ise kurumadde değeri olgunlaşma boyunca önemli değişiklik göstermemesine rağmen, toplam protein değerinin azalması ile peynirlerin kurumaddede protein değerleri de olgunlaşma süresine bağlı olarak azalış göstermiştir. Olgunlaşmanın başında Şekil 4.9'da görüldüğü üzere UF sütten yapılan Beyaz peynirlerin kurumaddede protein değerleri pastörize sütten üretilen Beyaz peynirlerden daha yüksek değer göstermiştir ( $p<0,05$ ). Çizelge 4.19.'da görüldüğü üzere peynirlerin kurumaddede protein değeri

üzerinde süt, depolama ve süt x depolama interaksyonunun etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Farklı kaynaklardan (mikrobiyal enzim, buzağı renneti ve bitkisel kaynaklı enzim) elde edilen enzimler ile üretilen peynirlerin protein değerlerinin olgunlaşma boyunca azaldığı ancak enzimin istatistiksel olarak farklılığa neden olmadığı yapılan birçok çalışmada bildirilmiştir (Çepoğlu, 2005; Pino vd., 2009; Timón vd., 2019; D'Incecco vd., 2022). Bu çalışmaların aksine, peynirlerinin olgunlaşma süresinde protein oranları üzerine pıhtılaştırıcı enzim farklılığının önemli düzeyde etkili olduğu belirtilen çalışmalar da mevcuttur (Al-Otaibi ve Wilbey, 2005; Karaca, 2007; Yaşar, 2007).

Farklı kaynaklardan elde edilen enzimlerin Beyaz peynirlerde kullanımının araştırıldığı bir çalışmada, olgunlaşma sonuna kadar protein oranlarının azalış gösterdiği ve en düşük protein oranının pastörize süt ve hayvansal enzim ile üretilen peynirde olduğu belirtilmiştir (Ertürkmen vd., 2022). Arısoy ve Öner (2019) tarafından yapılan çalışmada, UF süttten üretilen Beyaz peynirlerde farklı starter kültür, pıhtılaştırıcı enzim ve depolama sıcaklığı interaksyonunun olgunlaşma süresinde protein oranındaki değişime etkisinin istatistiksel olarak önemli bulunduğu vurgulanmıştır. Soltanı (2013) tarafından yapılan çalışmada, olgunlaşma süresinde UF süttten üretilen peynirlerin protein oranında görülen istatistiksel olarak önemli dalgalanmaların nedeni olarak, peynirlerin su kaybetmesi ve proteoliz sırasında suda çözünen azotun salamuraya geçmesi ile birlikte su tutma kapasitesine sahip olan bazı ürünlerin üretilmesinden dolayı olduğu öne sürülmüştür.

Öner ve Sarıdağ (2019), keçi süttünden yapılan Beyaz peynirde depolama süreci boyunca metabolik aktiviteye bağlı olarak toplam protein oranının azaldığı, düşük moleköl ağırlıklı azot fraksiyonunun ise arttığını bildirmişlerdir. Benzer olarak Demir (2021) tarafından yapılan çalışmada, inek, koyun ve keçi süttlerinden üretilen Beyaz peynirlerin 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca protein oranının düşüş gösterdiği, kurumaddede protein oranlarının ise inek süttünden üretilen peynir için olgunlaşmanın 30. gününden sonra düştüğü tespit

edilmiştir. Hayaloğlu (2003), Beyaz peynirde toplam protein miktarının %12,78 ile 17,27 değerleri arasında değiştiğini, olgunlaşma süresince protein oranında azalma meydana geldiğini bildirmiştir. Olgunlaşma süresince Beyaz peynirlerde toplam protein değerinin azaldığı, proteoliz arttıkça bu azalışın daha fazla olduğu literatürde bildirilmiştir (Topçu, 2004; Koçak, 2017).

#### **4.3. Üretilen Peynirlerde Meydana Gelen Proteolizin Değerlendirilmesi**

Peynirlerin olgunlaşmasını gösteren en önemli biyokimyasal reaksiyon proteolizdir. Bu bölümde peynirlerde olgunlaşma sürecinde meydana gelen proteolizin değerlendirilebilmesi için peynirlerin azot fraksiyonları ve bunlara göre olgunlaşma indeksi sonuçları, toplam serbest amino asit miktarındaki değişimleri, SDS-PAGE elektroforetik analizleri, peynir üretiminde kullanılan sütlerin ve olgunlaşma süresi boyunca peynirlerin RP-HPLC peptit profilleri elde edilmiş ve sonuçlar tartışılmıştır.

##### **4.3.1. Azot fraksiyonları ve olgunlaşma indeksi değerleri**

###### **4.3.1.1. Toplam azot oranları**

Depolama sürecinde metabolik aktiviteye bağlı olarak toplam protein oranı azalırken düşük molekül ağırlıklı azot fraksiyonunda artış olur. Azot fraksiyonlarının bazıları salamuraya geçer ve salamura ortamında çözünen azot fraksiyonlarının konsantrasyonunda artış meydana gelir (Hayaloğlu vd., 2002; Kırmacı, 2010). Salamurada olgunlaştırılan peynirlerde depolama boyunca suda çözünen azot fraksiyonları dengeye gelinceye kadar salamuraya geçer.

Bu çalışmada üretilen Beyaz peynirlerin 90 günlük olgunlaşma süresi boyunca toplam azot oranı değerlerindeki değişim Çizelge 4.20 ve Şekil 4.10'da verilmiştir. Toplam azot değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.21.'de verilmiştir. Üretilen Beyaz peynir örneklerinin toplam azot oranı değerleri olgunlaşma süresi boyunca %1,87-2,56 arasında değişmiştir.

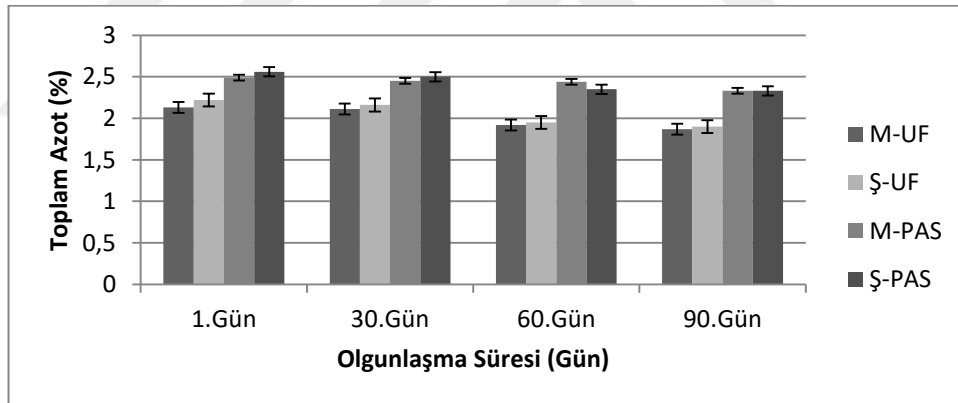
Çizelge 4.20. Peynir örneklerine ait toplam azot değerleri (%)

| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                |                         |                          |                         |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
|                      | M-UF                    | Ş-UF                    | M-PAS                    | Ş-PAS                   |
| <b>1.gün</b>         | 2,13±0,13 <sup>Ab</sup> | 2,22±0,07 <sup>Ab</sup> | 2,49±0,07 <sup>Aa</sup>  | 2,56±0,04 <sup>Aa</sup> |
| <b>30.gün</b>        | 2,11±0,05 <sup>Ab</sup> | 2,16±0,02 <sup>Ab</sup> | 2,45±0,06 <sup>ABa</sup> | 2,50±0,10 <sup>Aa</sup> |
| <b>60.gün</b>        | 1,92±0,04 <sup>Bb</sup> | 1,95±0,05 <sup>Bb</sup> | 2,44±0,03 <sup>ABa</sup> | 2,35±0,08 <sup>Ba</sup> |
| <b>90.gün</b>        | 1,87±0,02 <sup>Bb</sup> | 1,90±0,04 <sup>Bb</sup> | 2,33±0,03 <sup>Ba</sup>  | 2,33±0,04 <sup>Ba</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.21. Toplam azot değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | F       | P            |
|----------------------|---------|--------------|
| Süt                  | 540,641 | <b>0,000</b> |
| Enzim                | 2,743   | 0,104        |
| Depolama             | 43,168  | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | 1,785   | 0,162        |
| Süt x Depolama       | 3,093   | <b>0,035</b> |
| Süt x Enzim          | 1,850   | 0,180        |



Şekil 4.10. Olgunlaşma süresi boyunca toplam azot miktarının değişimi

Üretilen peynirlerde toplam azot oranı Çizelge 4.20.'de görüldüğü üzere olgunlaşma süresi boyunca değişkenlik göstermiş ve olgunlaşma sonundaki azalış tüm peynirlerde önemli bulunmuştur (p<0,05). UF süttten yapılan Beyaz peynirlerin toplam azot değerinin olgunlaşma boyunca pastörize süttten yapılan Beyaz peynirlerden düşük olduğu görülmüş ve peynirler arasındaki bu farklılığın süttlerin üretim yöntemine göre istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür (p<0,05). Peynirlerin 90 günlük olgunlaşma süresi boyunca M-UF peynirine ait toplam azot değerlerinin Ş-UF peynirinden düşük olduğu görüls

de bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Benzer olarak M-PAS peynirine ait toplam azot değerinin Ş-PAS peynirine göre olgunlaşmanın başında düşük olduğu, olgunlaşmanın sonunda ise yaklaşık aynı olduğu belirlenmiştir ( $p>0,05$ ). Çizelge 4.21.'de görüldüğü üzere peynirlerin toplam azot değeri üzerinde süt, depolama ve süt x depolama interaksiyonunun etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Yetişemeyen vd. (1998), UF ve Türk salamura Beyaz peyniri üretiminde sütü pıhtılaştırmak için mikrobiyal ve hayvansal kaynaklı farklı enzimlerin etkisini değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda, peynirlerin toplam azot değerlerinin 60 günlük depolama sonunda azaldığı ve hayvansal kaynaklı enzime ait toplam azot değerlerinin depolama süresinin sonunda mikrobiyal enzimle üretilen peynirlerden daha fazla olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Çepoğlu (2005), farklı kaynaklardan elde edilen enzimlerle üretilen Beyaz peynirlerde toplam protein ile toplam azot değerlerinin zamanla azaldığını, peynirler arasında enzim çeşidine göre istatistiksel olarak farklılık olmadığını vurgulamıştır. Enzim çeşidinin Feta peynirinde toplam azot oranı üzerinde etkisi olmadığı Moatsou vd. (2004) tarafından yapılan çalışmada rapor edilmiştir.

Öner vd. (2006) ve Karahan vd. (2010) tarafından yapılan çalışmalarda, Beyaz peynirde olgunlaşma süresi boyunca toplam azot değerlerinin azaldığı bildirilmiştir. Yılmaztekin (2001), Beyaz peynirde depolama boyunca toplam azot oranının azaldığını ve depolama süresinin peynirlerde önemli etkisi olduğunu tespit etmiştir. İnek, koyun ve keçi peynirinde yapılan bir çalışmada peynirlerin toplam azot oranında zamana bağlı olarak azalış görüldüğü, en düşük azot oranına sahip peynirin inek sütünden üretilen peynir olduğu bildirilmiştir (Demir, 2021).

#### **4.3.1.2. SÇA değerleri**

SÇA miktarı, proteoliz derecesine bağlı olarak artış gösterir ve bu maddelerin yapısında ise peptidler ve amino asitler bulunmaktadır (Fox vd., 1995). Bu

çalışmada üretilen Beyaz peynirlerin 90 günlük olgunlaşma süresi boyunca SA değerlerindeki değişim izelge 4.22 ve şekil 4.11'de verilmiştir. SA değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek izelge 4.23.'de verilmiştir. Üretilen Beyaz peynir örneklerinin SA değerleri olgunlaşma süresi boyunca %0,12-0,53 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.22. Peynir örneklerinin SA değerleri (%)

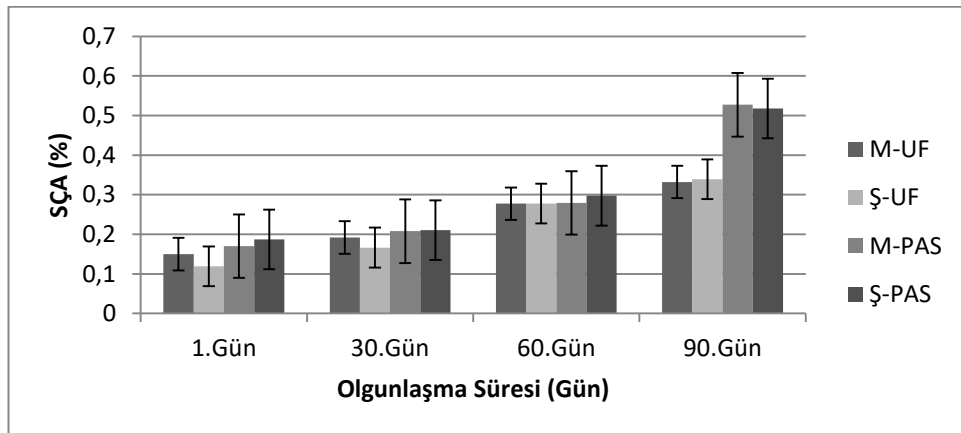
| OLGUNLAşMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                |                         |                          |                         |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
|                      | M-UF                    | ř-UF                    | M-PAS                    | ř-PAS                   |
| <b>1.gün</b>         | 0,15±0,01 <sup>Db</sup> | 0,12±0,01 <sup>Dc</sup> | 0,17±0,004 <sup>Da</sup> | 0,19±0,01 <sup>Ca</sup> |
| <b>30.gün</b>        | 0,19±0,01 <sup>Cb</sup> | 0,17±0,01 <sup>Cc</sup> | 0,21±0,004 <sup>Ca</sup> | 0,21±0,01 <sup>Ca</sup> |
| <b>60.gün</b>        | 0,28±0,02 <sup>Ba</sup> | 0,28±0,02 <sup>Ba</sup> | 0,28±0,02 <sup>Ba</sup>  | 0,30±0,02 <sup>Ba</sup> |
| <b>90.gün</b>        | 0,33±0,01 <sup>Ab</sup> | 0,34±0,03 <sup>Ab</sup> | 0,53±0,02 <sup>Aa</sup>  | 0,52±0,02 <sup>Aa</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.23. SA değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | F        | P            |
|----------------------|----------|--------------|
| Süt                  | 371,530  | <b>0,000</b> |
| Enzim                | 0,567    | 0,455        |
| Depolama             | 1179,821 | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | 1,610    | 0,198        |
| Süt x Depolama       | 130,299  | <b>0,000</b> |
| Süt x Enzim          | 7,613    | <b>0,008</b> |



şekil 4.11. Olgunlaşma süresi boyunca SA miktarının değişimi

Olgunlaşma sürecine bağlı olarak peynir örneklerinin tümünde SÇA miktarları artış göstermiş ve Çizelge 4.22’de görüldüğü üzere olgunlaşma sonunda bu artış önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Olgunlaşmanın başında ve sonunda UF sütün üretilen Beyaz peynirlerin SÇA miktarının, pastörize sütün yapılan Beyaz peynirlere göre düşük olduğu Şekil 4.11.’de görülmektedir ( $p<0,05$ ). Genel olarak peynirlerin 90 günlük olgunlaşma süresi boyunca belirlenen SÇA değerlerinde, olgunlaşma süresi ve peynirlerin yapımında kullanılan sütün üretim tekniğine göre istatistiksel olarak farklılık görüldüğü belirlenmiştir. Çizelge 4.23.’de görüldüğü üzere peynirlerin SÇA değeri üzerinde süt, depolama ve süt x depolama ile süt x enzim interaksiyonlarının etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

UF sütün üretilen Beyaz peynirde yapılan bir çalışmada, 8°C’de depolanan peynirlerde SÇA değerlerinin %0,154-0,543 arasında değiştiği, mikrobiyal enzim kullanılarak üretilen peynirlerin SÇA değerlerinin daha yüksek olduğu, proteolitik aktivitesi yüksek kültür ile birlikte daha yüksek SÇA değerinin görüldüğü rapor edilmiştir (Arısoy ve Öner, 2021). Benzer olarak, UF yöntemi ile üretilen Beyaz peynirlerde SÇA oranındaki artışın en fazla mikrobiyal enzimle üretilen peynirlerde olduğu literatürde bildirilmiştir (Yetişemeyen vd., 1998; Gencer, 2003).

Kimozin ve mikrobiyal enzim kullanarak Beyaz peynir üretilen bir çalışma sonucunda mikrobiyal enzim kullanılarak üretilen peynirlerde SÇA miktarının ve peyniraltı suyuna geçen yağ ve protein miktarının kimozin ile üretilen peynir örneklerine göre daha fazla olduğu yapılan bir çalışmada bildirilmiştir (Al-Badran vd., 1987). Bu çalışmada bu sonuçlara paralel olarak M-UF ve Ş-UF peynirlerde ilk 30 gün boyunca mikrobiyal enzimle olan M-UF daha yüksek değer göstermiş, olgunlaşmanın daha sonraki sürecinde ise bu iki peynir arasında istatistiksel farklılık gözlenmemiştir.

Farklı enzimlerin kullanımının araştırıldığı bir çalışmada, SÇA değerlerinin olgunlaşmanın 30. gününde bitkisel enzimle üretilen peynir örneğinde en yüksek (%0,26), hayvansal enzim ile üretilen peynir örneğinde en düşük

(%0,11) olduğu tespit edilmiştir. Olgunlaşma sonunda yine bitkisel enzimle üretilen peynirlerde en yüksek SÇA değerinin (%0,28) gözlemlendiği bildirilmiştir (Ertürkmen vd., 2022). Yapılan bir çalışmada, yağı azaltılmış UF Beyaz peynirlerin üretiminde farklı kaynaklardan elde edilen pıhtılaştırıcı enzimler kullanılmış ve olgunlaşma süresi boyunca peynirlerin SÇA değerlerinin arttığı, hayvansal buzağı rennetinden yapılan peynirde en fazla değer gözlemlendiği, fermente deve kimosini ile yapılan peynirde ise en düşük değer gözlemlendiği bildirilmiştir (Ghavam, 2017). Beyaz peynirlere farklı oranlarda proteolitik ve lipolitik enzimlerin ilavesinin etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, olgunlaşma boyunca tüm peynirlerde SÇA miktarının arttığı ve proteaz ilave edilen peynirlerde bu değer daha yüksek çıktığı Karaca (2007) tarafından bildirilmiştir. Soltanı (2013), UF sütle üretilen Beyaz peynirlerde SÇA oranlarının %0,368-0,743 aralığında olduğunu ve depolama sürecinde artış gösterdiğini bildirmiştir.

Şengül vd. (2014), farklı kaynaklardan elde edilen enzimlerin Tulum peynirlerde olgunlaşma süresi boyunca etkilerini değerlendirmiş ve SÇA değerlerinin arttığını, peynirler arasında kullanılan enzimden kaynaklanan farklılık görülmediğini bildirmiştir. Başka bir çalışmada, Beyaz peynirlerde 180 günlük olgunlaşma süresi boyunca SÇA oranlarının arttığı, olgunlaşma sonunda koyun Beyaz peynirinin SÇA değerinin %0,47, inek Beyaz peynirinin %0,58 ve keçi Beyaz peynirinin %0,67 değerinde olduğu bildirilmiştir (Demir, 2021).

Yapılan birçok çalışmada UF yöntemi kullanılarak ve geleneksel yöntemle üretilen Beyaz peynirlerde olgunlaşma sürecinde SÇA oranının arttığını belirtmişlerdir (Güven ve Karaca, 2001; Hayaloğlu, 2003; Topçu, 2004; Öner vd., 2006; Karami vd., 2009; Erkaya, 2014; Karaca ve Güven, 2014; Yerlikaya ve Karagözlü, 2014; Öner, 2015; Kocak vd., 2020).

#### **4.3.1.3. %12 TCA'da çözünen azot değerleri**

%12 TCA'da çözünen azot fraksiyonu, orta ve küçük peptidler, amino asitler ile aminler, üre ve amonyak gibi küçük azotlu bileşikler içerir ve suda

çözünenlerden farkı daha küçük peptit yapılarına sahip olmasıdır (Hayaloğlu, 2003). Bu peptidler  $\alpha_1$ -CN'nin hidrolizi sonucu oluşan 600 Da - 15000 Da arasındaki moleküler ağırlığa sahip peptidlerden oluşmaktadır. Olgunlaşma sürecindeki faktörlere göre proteoliz reaksiyonu devam eder. Bunun sonucunda ortamda oluşan amino asitler ve peptidlerin miktarı artar. Bu bileşenler, olgunlaşma süreci sonunda peynirlere tat-koku ve tekstür ile ilgili karakteristik özelliklerini kazandırır (Ardö ve Polychroniadou, 1999). Bu çalışmada üretilen Beyaz peynirlerin 90 günlük olgunlaşma süresi boyunca %12 TCA'da çözünen azot değerlerindeki değişim Çizelge 4.24 ve Şekil 4.12'de verilmiştir. %12 TCA'da çözünen azot değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.25.'de verilmiştir. Üretilen Beyaz peynir örneklerinin %12 TCA'da çözünen azot değerleri olgunlaşma süresi boyunca %0,076-0,241 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.24. Peynir örneklerinin %12 TCA'da çözünen azot değerleri(%)

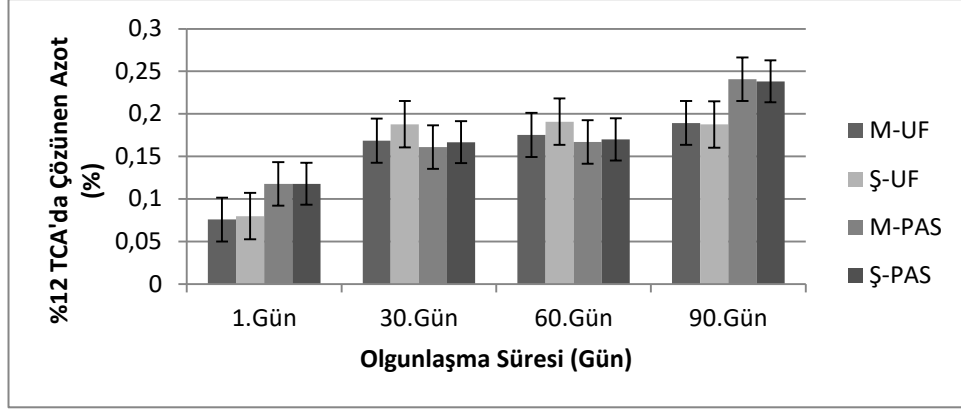
| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                 |                          |                           |                          |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
|                      | M-UF                     | Ş-UF                     | M-PAS                     | Ş-PAS                    |
| <b>1.gün</b>         | 0,076±0,01 <sup>Cb</sup> | 0,080±0,04 <sup>Bb</sup> | 0,118±0,01 <sup>Ca</sup>  | 0,118±0,01 <sup>Ca</sup> |
| <b>30.gün</b>        | 0,169±0,01 <sup>Bb</sup> | 0,188±0,02 <sup>Aa</sup> | 0,161±0,04 <sup>Bb</sup>  | 0,167±0,01 <sup>Bb</sup> |
| <b>60.gün</b>        | 0,175±0,01 <sup>Bb</sup> | 0,191±0,04 <sup>Aa</sup> | 0,167±0,03 <sup>Bb</sup>  | 0,171±0,02 <sup>Bb</sup> |
| <b>90.gün</b>        | 0,189±0,02 <sup>Ab</sup> | 0,188±0,03 <sup>Ab</sup> | 0,241±0,031 <sup>Aa</sup> | 0,238±0,01 <sup>Aa</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.25. %12 TCA'da çözünen azot değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | F       | P            |
|----------------------|---------|--------------|
| Süt                  | 35,821  | <b>0,000</b> |
| Enzim                | 4,373   | <b>0,042</b> |
| Depolama             | 348,895 | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | 1,634   | 0,193        |
| Süt x Depolama       | 44,967  | <b>0,000</b> |
| Süt x Enzim          | 2,150   | 0,149        |



Şekil 4.12. Olgunlaşma süresi boyunca %12 TCA'da çözünen azot miktarının değişimi

Çizelge 4.24.'de görüldüğü üzere %12 TCA'da çözünen azot değerlerinin olgunlaşma süresinin sonunda, olgunlaşmanın başına göre arttığı gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Şekil 4.12.'de görüldüğü üzere olgunlaşmanın başında ve sonunda pastörize süttten üretilen Beyaz peynirlere ait %12 TCA'da çözünen azot değerlerinin UF süttten yapılan Beyaz peynirlere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiş ve bu fark peynirler arasında önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Çizelge 4.25.'de görüldüğü üzere peynirlerin %12 TCA'da çözünen azot değeri üzerinde süt, enzim, depolama ve süt x depolama interaksiyonunun etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Yapılan bazı araştırmalar peynir üretiminde kullanılan pıhtılaştırıcı enzimlerin büyük peptitlerin oluşumundan, starter kültürlerin ise küçük peptidler ve amino asitlerin oluşumundan sorumlu olduğunu göstermiştir (Lane ve Fox, 1996; Dave vd., 2003a,b). Bunun yanı sıra literatürde peynirlerdeki sekonder proteoliz sonucu oluşan farklılıkların, pıhtılaştırıcı enzim ve üretim tekniklerinden etkilendiğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Yetişemeyen vd. (1998), UF yöntemi ile üretilen Beyaz peynirlerde farklı enzimlerin kalite üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, TCA oranının olgunlaşma süresince arttığını ve bu artışın mikrobiyal enzim kullanılan peynirlerde daha fazla olduğunu bildirmiştir. Gencer (2003), UF tekniği ile üretilen koyun ve keçi sütlerinin telemelerinin nitelikleri üzerine farklı pastörizasyon normları ve farklı enzimlerin etkisini araştırmış ve çalışma sonucunda mikrobiyal enzim ile üretilen peynirlerde, hayvansal enzim kullanılarak üretilen peynirlere göre

TCA'da çözünen azot oranının daha yüksek olduğunu tespit etmiştir. Bu çalışmada Gencer (2003) tarafından bildirilen sonucun aksine UF peynirlerde, olgunlaşmanın son günü haricinde bu farklılığın şirden mayası ile üretilen peynirde daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Yaşar (2007) tarafından yapılan çalışmada farklı pıhtılaştırıcı enzim kullanımının peynirler üzerinde farklı proteolitik aktiviteye sebep olması nedeniyle önemli olduğu vurgulanmıştır. Çalışmada, *C. parasitica* proteazı ile yapılan peynirde daha yüksek sonuç bulunmasının nedeni olarak bu enzimin daha yüksek proteolitik aktiviteye sahip olması ve  $\beta$ -CN'i daha fazla parçalanması öne sürülmüştür. Çepoğlu (2005), farklı pıhtılaştırıcı enzimler ile ürettiği Beyaz peynirlerde en yüksek %12 TCA'de çözünen azot oranının *R. miehei* proteazı ile üretilen peynirde olduğunu tespit etmiştir. Arısoy (2019), UF Beyaz peynirlerde olgunlaşma sonunda en yüksek %12 TCA'da çözünen azot oranının proteolitik aktivitesi düşük starter kültür ve fermente kimozen enzimi ile üretilen peynirde olduğunu bildirmiştir. Başka bir çalışmada, Beyaz peynirlerde olgunlaşmanın 30. ve 90. günü %12'lik TCA'da çözünen azot oranının yüksek mikrobiyal enzim ile üretilen peynirlerde belirlendiği bildirilmiştir (Ertürkmen vd., 2022).

Şengül vd. (2014), farklı kaynaklardan elde edilen enzimler ile üretilen Tulum peynirlerinde %12 TCA'da çözünen azot değerlerinin arttığını ve kullanılan enzimlerin etkisinin önemli olduğunu vurgulamıştır. Karaca (2007), yaptığı çalışma sonucunda olgunlaşma süresince Beyaz peynirde %12 TCA'da çözünen azot oranının arttığı, proteaz enziminin ilave edildiği peynirlerde bu değerin yüksek olduğu, enzimin oranının artmasının ise istatistiksel olarak önemli olmadığı sonucuna varmıştır. Alizadeh vd. (2006), İran Beyaz peynirinde ilave edilen rennet miktarının, TCA'da çözünen azot oranı üzerindeki etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğunu, olgunlaşma sıcaklığının ise ikinci derecede önemli olduğunu bildirmiştir.

Soltanı (2013), farklı oranlarda tuz konsantrasyonu kullanarak yaptığı UF Beyaz peynirlerde, olgunlaşma sürecinde %12 TCA'da çözünen azot oranında artış

olduğunu belirtmişlerdir. Cheddar peynirinde sonikasyon, mikrodalga ve yüksek basınç uygulamalarının süte uygulanması sonucunda, peynir sütüne sonikasyon uygulanarak üretilmiş örneklerde çözünür azot (pH 4,6'da) ve %12 TCA'da çözünür azot oranlarının daha yüksek çıktığını, yüksek yoğunluklu ultrasonun çözünür azot miktarında artışa neden olan plazmin ve kimozen gibi enzimler yoluyla daha verimli proteolize katkıda bulunduğunu öne sürmüşlerdir (Munir vd., 2020). Beyaz peynirlerde olgunlaşma süresi boyunca %12 TCA'da çözünen azot değerlerinde artış görüldüğü Öner ve Sarıdağ (2019) tarafından yapılan çalışmada bildirilmiştir. Araştırmacılar, bu artışın olgunlaşma süresince peynirde peptitlerin oluşumu nedeniyle gerçekleştiğini, suda çözünen azotlu maddelerden farkının peptit yapılarının daha küçük olmasından (2-22 amino asitten oluşan peptitler) kaynaklandığını öne sürmüşlerdir.

#### 4.3.1.4. %5 PTA'da çözünen azot değerleri

Peynirlerde %5 fosfotungustik asitte (PTA) çözünen azot miktarı, 700-600 dalton'dan küçük molekül ağırlığına sahip di-, tri- ve tetra-peptidler ile amino asitleri ihtiva eden azot fraksiyonudur (McSweeney ve Fox, 1997). Bu çalışmada üretilen Beyaz peynirlerin 90 günlük olgunlaşma süresi boyunca %5 PTA'da çözünen azot değerlerindeki değişim Çizelge 4.26 ve Şekil 4.13'de verilmiştir. %5 PTA'da çözünen azot değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.27'de verilmiştir. Üretilen Beyaz peynir örneklerinin %5 PTA'da çözünen azot değerleri olgunlaşma süresi boyunca %0,016-0,09 arasında değişmiştir.

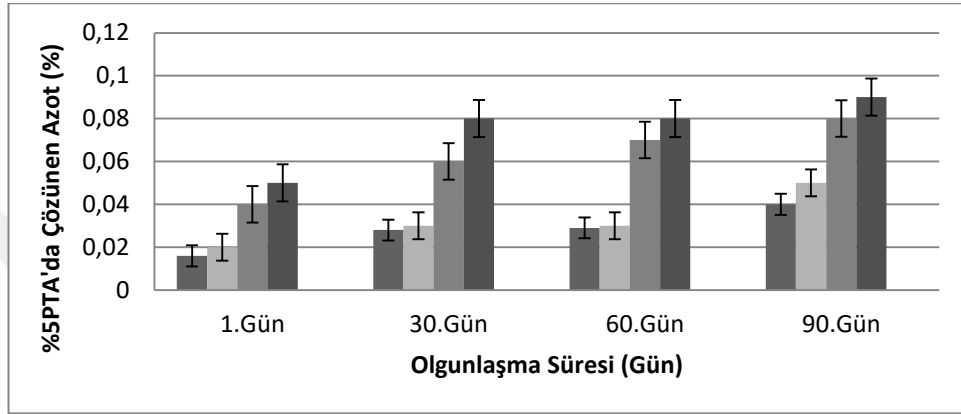
Çizelge 4.26. Peynir örneklerinin %5 PTA'da çözünen azot değerleri(%)

| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                  |                          |                           |                          |
|----------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
|                      | M-UF                      | Ş-UF                     | M-PAS                     | Ş-PAS                    |
| <b>1.gün</b>         | 0,016±0,003 <sup>Cb</sup> | 0,02±0,003 <sup>Bb</sup> | 0,04±0,01 <sup>Ba</sup>   | 0,05±0,005 <sup>Ba</sup> |
| <b>30.gün</b>        | 0,028±0,004 <sup>Bc</sup> | 0,03±0,004 <sup>Ac</sup> | 0,06±0,005 <sup>Bb</sup>  | 0,08±0,002 <sup>Aa</sup> |
| <b>60.gün</b>        | 0,029±0,003 <sup>Bc</sup> | 0,04±0,004 <sup>Ac</sup> | 0,07±0,003 <sup>ABb</sup> | 0,08±0,002 <sup>Aa</sup> |
| <b>90.gün</b>        | 0,040±0,002 <sup>Ab</sup> | 0,05±0,002 <sup>Ab</sup> | 0,08±0,004 <sup>Aa</sup>  | 0,09±0,004 <sup>Aa</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.27. %5 PTA'da çözünen azot değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | F        | P            |
|----------------------|----------|--------------|
| Süt                  | 1027,860 | <b>0,000</b> |
| Enzim                | 5,624    | <b>0,022</b> |
| Depolama             | 56,309   | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | 4,989    | <b>0,004</b> |
| Süt x Depolama       | 0,943    | 0,427        |
| Süt x Enzim          | 8,027    | <b>0,007</b> |



Şekil 4.13. Olgunlaşma süresi boyunca %5 PTA'da çözünen azot miktarının değişimi

Olgunlaşma süresi boyunca peynir örneklerinin %5 PTA'da çözünen azot değerlerinin arttığı belirlenmiş ve olgunlaşma süresi sonunda bu artış tüm peynirlerde önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). UF süttten yapılan Beyaz peynirlere ait değerlerin olgunlaşma süresince pastörize süttten yapılan Beyaz peynirlerden daha düşük olduğu Şekil 4.13.'de görülmektedir. Peynirler arasında süttün üretim yöntemine göre oluşan farklılık önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). İlaveten, hem UF süttten hem de pastörize süttten yapılan peynirlerde şirden mayası ile pıhtılaştırılarak üretilen peynirlere ait değerlerin mikrobiyal enzimle üretilen peynirlerden daha yüksek olduğu gözlenmiş ancak bu farklılık sadece 30. ve 60. günlerde M-PAS ve Ş-PAS arasında önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Çizelge 4.27.'de görüldüğü üzere peynirlerin %5 PTA'da çözünen azot değeri üzerinde süt, enzim, depolama ve enzim x depolama ile süt x enzim interaksiyonlarının etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Beyaz peynirlerde yapılan çalışmalarda %5 PTA'da çözünen azot oranının olgunlaşma süresince arttığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Hayaloğlu, 2003; Topçu, 2004). Yetişemeyen vd. (1998), PTA oranındaki artışın mikrobiyal enzim kullanılan UF Beyaz peynirlerde daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada, UF pastörize ve UF çiğ süt kullanılarak Beyaz peynir üretiminde farklı pıhtılaştırıcı enzim ve farklı proteolitik aktivitelere sahip starter kültür kullanılarak peynirler üretilmiş ve çalışmada %5 PTA'da çözünen azot değerlerinin %0,0133-0,0600 değerleri arasında değiştiği, olgunlaşma boyunca tüm peynirlere ait değerlerin arttığı rapor edilmiştir (Arisoy ve Öner, 2021). Karaca (2007) tarafından yapılan çalışmada, Beyaz peynirlerin olgunlaşma süresi boyunca %5 PTA'da çözünen azot oranında artış olduğu ve %0,042 – 0,086 arasında değiştiği, proteaz ilave edilmiş peynirler ile lipaz ilave edilmiş peynirler arasında önemli farklılık olduğu belirlenmiştir.

Yaşar (2007) yaptığı çalışmada farklı pıhtılaştırıcı enzim kullanımının Kaşar peyniri üzerindeki etkilerini değerlendirmiş ve olgunlaşma boyunca peynir örneklerinde %5 PTA'da çözünen azot değerlerinin arttığını ve olgunlaşmanın 1. günü dışındaki günlerde enzime göre farklılık gözlemlendiğini bildirmiştir. Şengül vd. (2014), Tulum peynirlerde olgunlaşma süresi boyunca %5 PTA'da çözünen azot değerlerinin arttığını, peynirlerin üretiminde kullanılan enzimden kaynaklanan farklılık olduğunu gözlemlemiştir. Araştırmacılar bu farklılığı, peynir üretiminde pıhtılaştırıcı enzim olarak kullanılan fungal kökenli rennetlerin, buzağı rennetinden daha yüksek düzeyde spesifik olmayan proteolize sebep olması ile açıklamışlardır.

#### **4.3.1.5. SÇA'ya göre olgunlaşma indeksi**

Bu çalışmada üretilen Beyaz peynirlere ait SÇA'ya göre olgunlaşma indeksi sonuçları Çizelge 4.28 ve Şekil 4.14'de verilmiştir. SÇA'ya göre olgunlaşma indeksi değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.29'da

verilmiştir. Üretilen Beyaz peynir örneklerinin SÇA'ya göre olgunlaşma indeksi değeri olgunlaşma süresi boyunca %5,39-22,52 arasında değişmiştir.

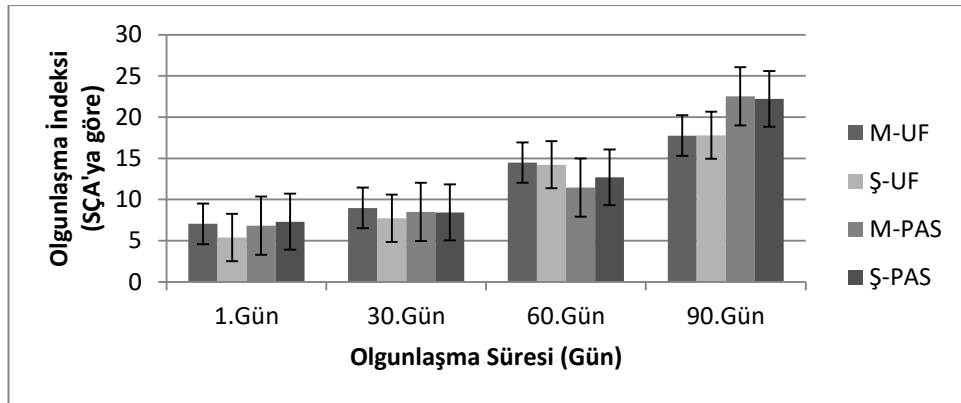
Çizelge 4.28. Peynir örneklerinin SÇA'ya göre olgunlaşma indeksi değerleri

| OLGUNLAŞMA SÜRESİ | ÖRNEKLER                 |                          |                          |                           |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
|                   | M-UF                     | Ş-UF                     | M-PAS                    | Ş-PAS                     |
| <b>1.gün</b>      | 7,05±0,13 <sup>Da</sup>  | 5,39±0,46 <sup>Db</sup>  | 6,83±0,31 <sup>Da</sup>  | 7,3±0,21 <sup>Ca</sup>    |
| <b>30.gün</b>     | 8,96±0,60 <sup>Ca</sup>  | 7,71±0,33 <sup>Cb</sup>  | 8,48±0,30 <sup>Cab</sup> | 8,43±0,47 <sup>Cab</sup>  |
| <b>60.gün</b>     | 14,48±1,02 <sup>Ba</sup> | 14,22±0,90 <sup>Ba</sup> | 11,44±0,69 <sup>Bb</sup> | 12,70±0,95 <sup>Bab</sup> |
| <b>90.gün</b>     | 17,75±0,65 <sup>Ab</sup> | 17,79±0,41 <sup>Ab</sup> | 22,52±0,87 <sup>Aa</sup> | 22,20±0,28 <sup>Aa</sup>  |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.29. SÇA'ya göre olgunlaşma indeksi değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | F        | P            |
|----------------------|----------|--------------|
| Süt                  | 20,547   | <b>0,000</b> |
| Enzim                | 1,502    | 0,226        |
| Depolama             | 1107,170 | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | 2,175    | 0,102        |
| Süt x Depolama       | 62,152   | <b>0,000</b> |
| Süt x Enzim          | 9,682    | <b>0,003</b> |



Şekil 4.14. SÇA'ya göre olgunlaşma indeksi değerlerinin değişimi

Bu çalışmada SÇA'ya göre olgunlaşma indeksi değerlerinin olgunlaşma süresi boyunca tüm peynirlerde artış gösterdiği tespit edilmiş ve bu artış önemli bulunmuştur (p<0,05). Olgunlaşmanın 1. gününde en düşük değerin Ş-UF peynirine, en yüksek değerin ise Ş-PAS peynirine ait olduğu görülmektedir

( $p < 0,05$ ). Olgunlaşmanın sonunda UF sütten yapılan Beyaz peynirlere göre pastörize sütten yapılan Beyaz peynirlerin yüksek değerler gösterdiği, peynirler arasındaki farklılıkların peynir yapımında kullanılan sütün üretim tekniğinden kaynaklandığı görülmektedir. Çizelge 4.29.'da görüldüğü üzere peynirlerin SÇA'ya göre olgunlaşma indeksi değerleri üzerinde süt, depolama ve süt x depolama ve süt x enzim interaksiyonlarının etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).

Yapılan bir çalışmada, UF sütten üretilen Beyaz peynirlerde olgunlaşma indeksi değerlerinin %6,94 – 30,94 arasında değişkenlik gösterdiği, en fazla artışın acılaşmanın en fazla görüldüğü peynirde (kimozen enzimi ile proteolitik aktivitesi yüksek kültür kullanılarak UF sütten üretilen) tespit edildiği vurgulanmıştır (Arisoy, 2019). Bir başka çalışmada, Beyaz peynirlerde depolama süresi boyunca tüm peynirlerde SÇA'ya göre olgunlaşma indeksinin arttığı ve en düşük değerin rekombinant kimozen ile üretilen peynirde, en yüksek değerin ise mikrobiyal proteazdan üretilen peynirde gözlemlendiği bildirilmiştir (Çepoğlu, 2005). Yapılan başka bir çalışmada, yağı azaltılmış UF beyaz peynirlerde olgunlaşma indeksi sonuçlarının %7,08 ile %14,81 arasında değiştiği, en yüksek değeri hayvansal buzağı renneti ile üretilen grubun gösterdiği belirlenmiştir (Ghavam, 2017). Ertürkmen vd. (2022) tarafından yapılan çalışmada, peynirlerin en yüksek SÇA değeri ile SÇA'ya göre olgunlaşma indeksi değerinin, bitkisel enzimle üretilen peynirde gözlemlendiği tespit edilmiştir. Yaşar (2007), Kaşar peynirinde olgunlaşma süresi boyunca SÇA'ya göre olgunlaşma indeksinin artış gösterdiğini, en yüksek olgunlaşma indeksi katsayısı oranına *C. parasitica* proteazı ile üretilen peynirin, en düşük orana ise rekombinant kimozen ile üretilen peynirin sahip olduğunu rapor etmiştir.

Yetişemeyen vd. (1998) UF ve pastörize sütten ürettiği peynirlerin SÇA'ya göre olgunlaşma indeksinin zamanla arttığını, mikrobiyal enzimin hayvansala göre daha yüksek olgunlaşma indeksine sebep olduğunu bildirmiştir. Çalışmada elde edilen önemli diğer sonuç ise aynı tip enzim kullanıldığında geleneksel yöntemle üretilen peynirdeki değere göre UF sütten üretilen peynirde daha düşük olgunlaşma indeksine neden olduğunun gözlenmesidir. Araştırmacılar, UF

yöntemi ile sütün konsantre edilmesinin  $\kappa$ -CN'nin enzimatik olarak parçalanmasını sınırlaması ile birlikte esas neden olarak UF peynirlerde  $\beta$ -CN'nin çok yavaş parçalanmasından dolayı bu sonucun gözlemlendiğini öne sürmüşlerdir (Yetişemeyen vd., 1998).  $\beta$ -CN'nin esas hidrolizi plazmin tarafından katalize edilir. UF peynirde plazminin bu aktivitesinin  $\beta$ -laktoglobulin tarafından engellendiğine ve UF peynirin daha yavaş olgunlaşmasındaki nedenlerden birisinin bu olduğuna dair literatürde kanıtlar bulunmaktadır (Bech, 1993).

Farklı oranda tuz kullanımının UF Beyaz peynirlerde etkisinin araştırıldığı çalışmada olgunlaşma süresi boyunca olgunlaşma derecesinin arttığı ve tuz ilave edilen Ultrafiltre Beyaz peynirlerde üretim sırasında ilave edilen tuz oranı ile suda çözünen %azot oranı arasında ters bir bağlantı görülmüştür (Soltanı, 2013).

Beyaz peynirde olgunlaşma süresi boyunca SÇA'ya göre olgunlaşma indeksinin depolama süresine bağlı olarak artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak önemli bulunduğu (Öner vd., 2006), ek olarak starter kültür kombinasyonlarının da olgunlaşma değerinde etkili olduğu (Karahana vd., 2010; Koçak, 2017) literatürde bildirilmiştir. Çiğ koyun sütünden geleneksel olarak üretilen Urfa peynirlerinde yapılmış çalışmada peynirlerin SÇA'ya göre olgunlaşma indeksinin 90 günlük olgunlaşma süresince artış gösterdiği Kırmacı (2010) tarafından bildirilmiştir. Farklı sütlerden üretilmiş Beyaz peynirlerde olgunlaşma indeksi değerleri tüm peynirlerde artış göstermiş, 90. günde bu değerlerin %12,20 - 18,98 arasında değiştiği bildirilmiştir (Demir, 2021). Yapılan bir çalışmada, üretilen peynirlere salamura ve vakum ambalaj uygulanmış ve peynirlerde olgunlaşma süresince SÇA'ya göre olgunlaşma indeksi değerlerinin zamanla önemli artış gösterdiği ancak örnekler açısından istatistiksel olarak önemli bir farklılığın bulunmadığı bildirilmiştir (Erkaya, 2014).

Koyun ve keçi sütünden üretilen Beyaz peynirlerde yapılan çalışmalarda SÇA'ya göre olgunlaşma indeksi değerinin olgunlaşma süresi boyunca artış gösterdiği,

9. ayda değerlerin sırasıyla %90,11 ve %61,87 değerine ulaştığı bildirilmiştir. Araştırmacılar olgunlaşma sonundaki bu yüksek olgunlaşma indeksi değerlerinin sebebini çiğ sütte bulunan mikrobiyal floraya ve onların proteolitik aktivitesine bağlı olarak artması ile açıklamıştır (Öner, 2015; Öner ve Sarıdağ, 2019).

#### 4.3.1.6. %12 TCA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi

TCA'da çözünür madde azotlu madde bazında olgunlaşma indeksi ileri düzeyde proteoliz hakkında bilgi vermektedir. Bu çalışmada üretilen Beyaz peynirlere ait %12 TCA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi sonuçları Çizelge 4.30 ve Şekil 4.15'de verilmiştir. %12 TCA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.31.'de verilmiştir. Üretilen Beyaz peynir örneklerinin %12 TCA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerleri olgunlaşma süresi boyunca 3,57-10,34 arasında değişmiştir.

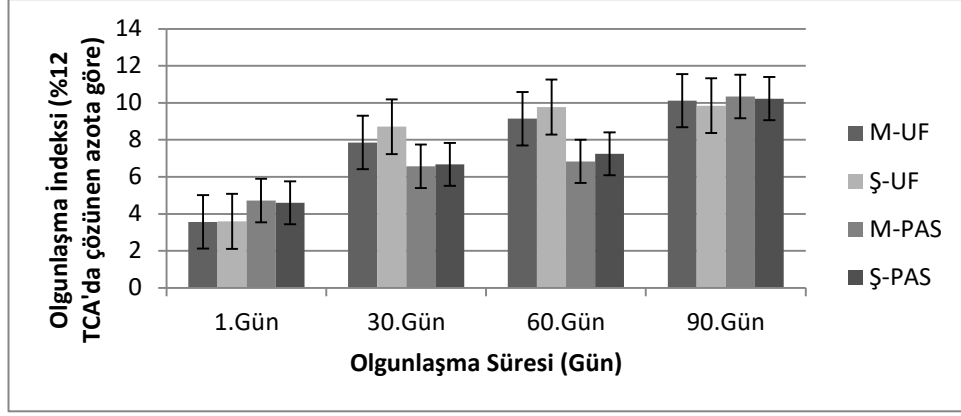
Çizelge 4.30. %12 TCA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerleri(%)

| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                 |                         |                          |                          |
|----------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                      | M-UF                     | Ş-UF                    | M-PAS                    | Ş-PAS                    |
| <b>1.gün</b>         | 3,57±0,29 <sup>Db</sup>  | 3,60±0,18 <sup>Cb</sup> | 4,72±0,30 <sup>Ca</sup>  | 4,60±0,23 <sup>Ca</sup>  |
| <b>30.gün</b>        | 7,85±0,37 <sup>Cb</sup>  | 8,71±0,15 <sup>Ba</sup> | 6,57±0,23 <sup>Bc</sup>  | 6,67±0,25 <sup>Bc</sup>  |
| <b>60.gün</b>        | 9,14±0,33 <sup>Ba</sup>  | 9,77±0,30 <sup>Aa</sup> | 6,84±0,16 <sup>Bb</sup>  | 7,25±0,21 <sup>Bb</sup>  |
| <b>90.gün</b>        | 10,12±0,16 <sup>Aa</sup> | 9,85±0,30 <sup>Aa</sup> | 10,34±1,45 <sup>Aa</sup> | 10,23±0,51 <sup>Aa</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.31. %12 TCA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | F       | P            |
|----------------------|---------|--------------|
| Süt                  | 27,445  | <b>0,000</b> |
| Enzim                | 2,174   | 0,146        |
| Depolama             | 380,522 | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | 1,961   | 0,131        |
| Süt x Depolama       | 40,376  | <b>0,000</b> |
| Süt x Enzim          | 0,884   | 0,352        |



Şekil 4.15. %12 TCA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerlerinin değişimi

Bu çalışmada %12 TCA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerlerinin olgunlaşma süresi boyunca tüm peynirlerde artış gösterdiği tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Olgunlaşmanın başında UF süten üretilen Beyaz peynirlerde %12 TCA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerlerinin pastörize süten üretilen Beyaz peynirlere göre daha düşük olduğu ( $p<0,05$ ) ancak olgunlaşma sonundaki farklılıkların istatistiksel olarak önemli bulunmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ). Çizelge 4.31.'de görüldüğü üzere peynirlerin %12 TCA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerleri üzerinde süt, depolama ve süt x depolama interaksiyonunun etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

TCA'da çözünen protein oranına göre olgunlaşma indeksi değerlerinin, farklı starter kültür ve enzim kullanılarak üretilen UF peynirlerde depolama süresince artış gösterdiği, kimozin ile üretilen ve acılaşmanın en fazla görüldüğü iki peynirde olgunlaşma indeksi değerinin en yüksek çıktığı yapılan bir çalışmada bildirilmiştir (Arısoy, 2019). Başka bir çalışmada, olgunlaşma süresince peynirlerde %12 TCA'ya göre çözünen azot oranının arttığı, peynirlerin olgunlaşma indeksi katsayısı oranları üzerine pıhtılaştırıcı enzim kullanımı, olgunlaşma süresi ile birlikte bu iki etkenin interaksiyonunun önemli düzeyde etkili olduğu tespit edilmiştir (Yaşar, 2007).

Koyun sütünden üretilen Beyaz peynirde 9 aylık olgunlaşma süresi boyunca %12 TCA'da çözünen azot oranına göre olgunlaşma indeksinin arttığı ve bu

durumun olgunlaşma boyunca peptitlerin oluşumunu gösterdiği Öner (2015) tarafından bildirilmiştir. Benzer olarak, Beyaz peynir örneklerinin %12 TCA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerlerinin zamana bağlı olarak önemli düzeyde arttığı Erkay (2014) tarafından da bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada UF Beyaz peynirlerin %12 TCA'da çözünen azot oranlarının olgunlaşma süresinde arttığı, ilave edilen tuz oranı ile %12 TCA'da çözünen %azot oranı arasında ters bir bağlantı belirlenmiştir (Soltanı, 2013).

#### 4.3.1.7. %5 PTA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi

Bu çalışmada üretilen Beyaz peynirlere ait %5 PTA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi sonuçları Çizelge 4.32 ve Şekil 4.16'da verilmiştir. Sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.33'de verilmiştir. Üretilen Beyaz peynir örneklerinin %5 PTA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerleri olgunlaşma süresi boyunca 0,66-3,40 arasında değişmiştir.

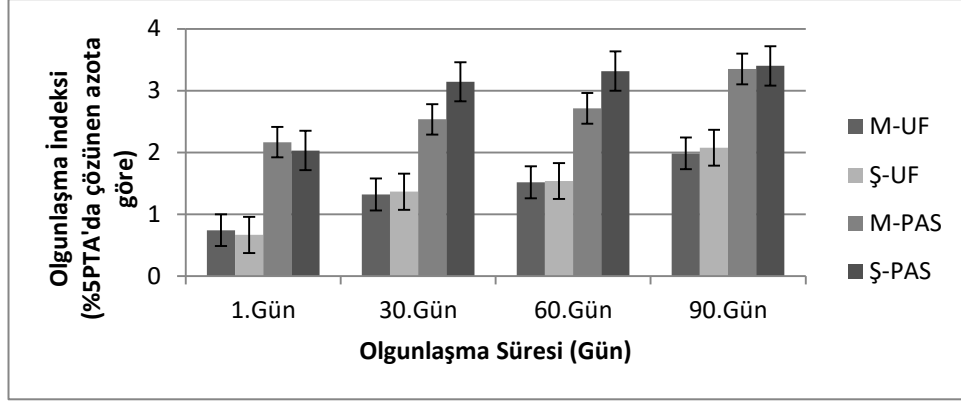
Çizelge 4.32. %5 PTA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerleri(%)

| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                |                          |                         |                         |
|----------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                      | M-UF                    | Ş-UF                     | M-PAS                   | Ş-PAS                   |
| <b>1.gün</b>         | 0,74±0,12 <sup>Cb</sup> | 0,66±0,16 <sup>Bb</sup>  | 2,17±0,40 <sup>Ba</sup> | 2,03±0,22 <sup>Ba</sup> |
| <b>30.gün</b>        | 1,32±0,20 <sup>Bc</sup> | 1,36±0,21 <sup>ABc</sup> | 2,53±0,19 <sup>Bb</sup> | 3,14±0,13 <sup>Aa</sup> |
| <b>60.gün</b>        | 1,52±0,18 <sup>Bc</sup> | 1,53±0,21 <sup>ABc</sup> | 2,71±0,14 <sup>Bb</sup> | 3,31±0,23 <sup>Aa</sup> |
| <b>90.gün</b>        | 1,98±0,10 <sup>Ab</sup> | 2,07±0,12 <sup>Ab</sup>  | 3,35±0,16 <sup>Aa</sup> | 3,40±0,18 <sup>Aa</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.33. %5 PTA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | F       | P            |
|----------------------|---------|--------------|
| Süt                  | 625,268 | <b>0,000</b> |
| Enzim                | 3,701   | <b>0,057</b> |
| Depolama             | 75,539  | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | 4,985   | <b>0,004</b> |
| Süt x Depolama       | 0,251   | 0,860        |
| Süt x Enzim          | 8,229   | <b>0,006</b> |



Şekil 4.16. %5 PTA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerlerinin değişimi

Olgunlaşma süresi boyunca tüm peynirlerin %5 PTA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerlerinin artış gösterdiği ve olgunlaşma sonundaki artışın istatistiksel olarak önemli bulunduğu Çizelge 4.32.'de görülmektedir ( $p<0,05$ ). UF süttten üretilen Beyaz peynirlere ait olgunlaşma indeksi değerinin olgunlaşma süresi boyunca pastörize süttten üretilen Beyaz peynirlerden daha düşük olduğu Şekil 4.16'da görülmektedir ( $p<0,05$ ). Çizelge 4.33.'de görüldüğü üzere peynirlerin %5 PTA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerleri üzerinde süt, enzim, depolama ve depolama x enzim ile süt x enzim interaksyonlarının etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

UF süt ile Beyaz peynir üretimi üzerine yapılan bir çalışmada %5 PTA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerinin olgunlaşma süresi boyunca %0,62-2,64 arasında değiştiği ve önemli bir değişim gözlenmediği bildirilmiştir (Arısoy ve Öner, 2021). Karaca (2007) tarafından yapılan çalışmada, mikrobiyal ve proteolitik enzim kullanarak Beyaz peynir üretimi gerçekleştirilmiş. 90 günlük olgunlaşma süresince PTA'da çözünür azota göre olgunlaşma indeksi değerlerinin %1,54–3,10 arasında değiştiği bildirilmiştir. Olgunlaşma sonunda proteolitik enzim ilave edilen peynirlerin kontrol peynirinden daha yüksek olduğu, ilave edilen proteolitik enzim miktarının ise önemli olmadığı belirlenmiştir. Benzer olarak bir başka çalışmada keçi süttünden üretilip 180 gün boyunca salamura olgunlaştırılan peynirde %5 PTA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerlerinin yüksek çıktığı ve olgunlaşmaya bağlı değişimlerin önemli olduğu bildirilmiştir (Kondyli vd., 2016).

Keçi sütünden üretilmiş Beyaz peynirlerde 9 aylık olgunlaşma süresi boyunca %5 PTA'da çözünen azot değerine göre olgunlaşma indeksinin arttığı ve bu artışın önemli bulunduğu Öner ve Sarıdağ (2019) tarafından yapılan çalışma sonucunda tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, Beyaz peynirlere salamura ve vakum ambalaj uygulanıp 120 günlük olgunlaşmaya bırakılmış ve %5 PTA'da çözünen azota göre olgunlaşma indeksi değerlerinin tüm örneklerde zamana bağlı önemli düzeyde artış gösterdiği, en yüksek değeri vakum ambalajda olgunlaştırılmış probiyotik ilaveli peynir örneğinde olduğu belirlenmiştir. Bu durumun, bakterinin vakum ortamında proteolize katkıda bulunmuş olabileceğini gösterdiği çalışma sonucunda öne sürülmüştür (Erkaya, 2014).

#### 4.3.2. Toplam serbest amino asit miktarı

Serbest amino asitlerin katabolizması amonyak, aminleri, aldehitler, fenoller ve alkollerin oluşumunu sağlar (Sousa vd., 2001). Proteinlerdeki toplam serbest amino asit miktarı, amino asitlerin fonksiyonel amino gruplarının kromofor bir madde ile boyanmasıyla belirlenir. Bu çalışmada üretilen Beyaz peynirlere ait toplam serbest amino asit değerleri Çizelge 4.34 ve Şekil 4.17'de verilmiştir. Toplam serbest amino asit değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzim ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.35.'de verilmiştir. Üretilen Beyaz peynir örneklerinin toplam serbest amino asit değerleri olgunlaşma süresi boyunca 1,37-3,67 mg Leu/g peynir arasında değişmiştir.

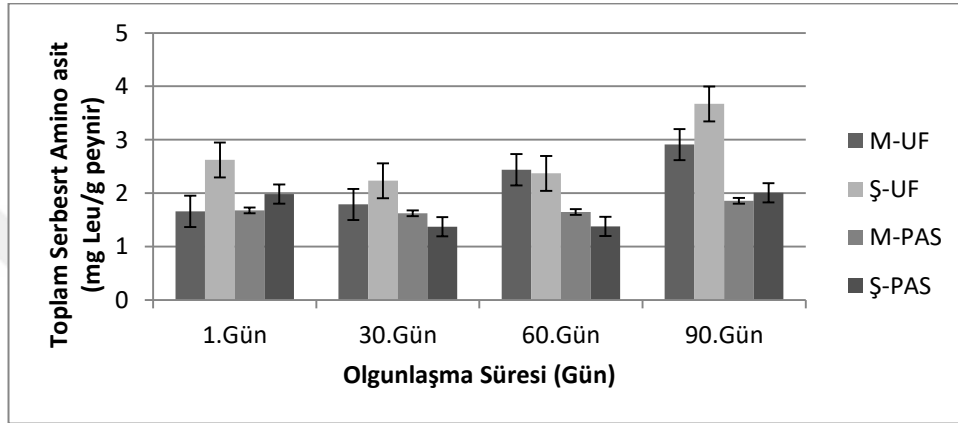
Çizelge 4.34. Toplam serbest amino asit değerleri (mg Leu/g peynir)

| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                  |                          |                          |                          |
|----------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                      | M-UF                      | Ş-UF                     | M-PAS                    | Ş-PAS                    |
| <b>1.gün</b>         | 1,66±0,02 <sup>Cb</sup>   | 2,62±0,27 <sup>BCa</sup> | 1,68±0,01 <sup>Ab</sup>  | 1,98±0,02 <sup>Aab</sup> |
| <b>30.gün</b>        | 1,77±0,07 <sup>BCab</sup> | 2,23±0,25 <sup>Ca</sup>  | 1,63±0,07 <sup>Aab</sup> | 1,37±0,08 <sup>Bb</sup>  |
| <b>60.gün</b>        | 2,44±0,03 <sup>ABa</sup>  | 2,37±0,15 <sup>Ca</sup>  | 1,65±0,04 <sup>Ab</sup>  | 1,42±0,07 <sup>Bb</sup>  |
| <b>90.gün</b>        | 2,91±0,22 <sup>Aa</sup>   | 3,67±0,44 <sup>Aa</sup>  | 1,86±0,18 <sup>Bb</sup>  | 2,01±0,31 <sup>Ab</sup>  |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.35. Toplam serbest amino asit değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | F      | P            |
|----------------------|--------|--------------|
| Süt                  | 88,048 | <b>0,000</b> |
| Enzim                | 12,005 | <b>0,003</b> |
| Depolama             | 11,016 | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | 6,306  | <b>0,004</b> |
| Süt x Depolama       | 10,650 | <b>0,000</b> |
| Süt x Enzim          | 5,253  | <b>0,034</b> |



Şekil 4.17. Olgunlaşma süresi boyunca toplam serbest amino asit miktarının değişimi

Bu çalışmada olgunlaşmanın 30. gününden itibaren UF süttten üretilen Beyaz peynirlerin toplam serbest amino asit miktarının, pastörize süttten üretilen Beyaz peynirlerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Ş-UF ve Ş-PAS peynirlerinde 30. günde azalış gözlenirken M-UF peynirinde artış görülmüş ( $p>0,05$ ), M-PAS peynirinde ise önemli değişim görülmemiştir ( $p>0,05$ ). Olgunlaşmanın 30. gününden itibaren tüm peynirlerin toplam serbest amino asit miktarlarında artış gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Genel olarak en yüksek toplam serbest amino asit miktarının Ş-UF peynirine ait olduğu gözlenmiştir. Olgunlaşmanın 60. günü hariç diğer günlerde pıhtılaştırıcı enzim olarak şirden kullanılan peynirlere ait değerlerin, mikrobiyal enzim kullanılan peynirlere göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Çizelge 4.35.'de görüldüğü üzere peynirlerin toplam serbest amino asit değerleri üzerinde denemede uygulanan farklı işlemlerin (depolama süresi, süt ve enzim) ve bunların interaksiyonlarının (enzim x depolama, süt x depolama, süt x enzim) etkilerinin istatistiksel olarak önemli bulunduğu sonucuna varılmıştır ( $p<0,05$ ).

Peynirde serbest amino asitlerin oluşumundan starter kültürlerin peptidazlarının ve pıhtılaştırıcı enzim olan kimozinin sorumlu olduğu literatürde bildirilmiştir (Lane ve Fox 1996). Pıhtılaştırıcı enzimler kazeinleri büyük veya orta büyüklükte peptitlere hidrolize etmekte, daha sonra starter veya starter olmayan bakterilerin proteinaz ve peptinazları bunları serbest amino asitlere parçalamaktadır (McSweeney vd., 1995; Hayaloğlu, 2003). Oluşan serbest amino asitler ikincil katabolik değişimlerde substrat olarak kullanılmakta ve daha küçük moleküllu lezzet bileşenleri oluşmaktadır. Peynir çeşidi ve olgunlaşma koşullarına bağlı olarak konsantrasyonları değişebilmektedir (Öner ve Sarıdağ, 2019). Bu nedenle, toplam serbest amino asitlerin birikimi için peynirde genel proteolitik aktivite önemlidir.

Yaşar (2007) tarafından yapılan çalışmada, farklı pıhtılaştırıcı enzimler kullanılarak üretilen Kaşar peynirlerinin serbest amino asit miktarlarının depolama sürecine göre arttığı, peynirler arasında 30. günden sonra farklılıkların gözlemlendiği, en yüksek değer *C. parasitica* proteazı ile üretilen peynirde gözlemlendiği, en düşük değer rekombinant kimozin ile üretilen peynirde gözlemlendiği bildirilmiştir. Beyaz peynirlere farklı oranlarda proteolitik ve lipolitik enzimlerin ilavesinin etkisi üzerine Karaca (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, olgunlaşma boyunca toplam serbest amino asit değerlerinin peynirlerde arttığı, proteaz ilaveli peynirlerde bu değer olgunlaşmanın ilk gününde kontrol peynirine göre önemli düzeyde yüksek olduğu ve bu durumun olgunlaşma süresince devam ettiği belirlenmiştir. Enzim düzeyi arttıkça toplam serbest amino asit değerlerinin de artış gösterdiği vurgulanmıştır.

Keçi sütünden yapıp 9 ay boyunca olgunlaştırılan Beyaz peynirlerde olgunlaşma boyunca serbest amino asit miktarının 0,070-0,215 mg Leu/ 100 g arasında değiştiği, olgunlaşma boyunca bu değerlerin düzenli olarak artış gösterdiği bildirilmiştir (Öner ve Sarıdağ, 2019). Yapılan bir çalışmada, Beyaz peynirlerde olgunlaşma süresince toplam serbest amino asit miktarının arttığı, vakum ambalajda olgunlaştırılmış peynirlerin salamurada depolanan örneklerden daha yüksek oranda toplam serbest amino asit miktarına sahip olduğu görülmüştür (Erkaya, 2014).

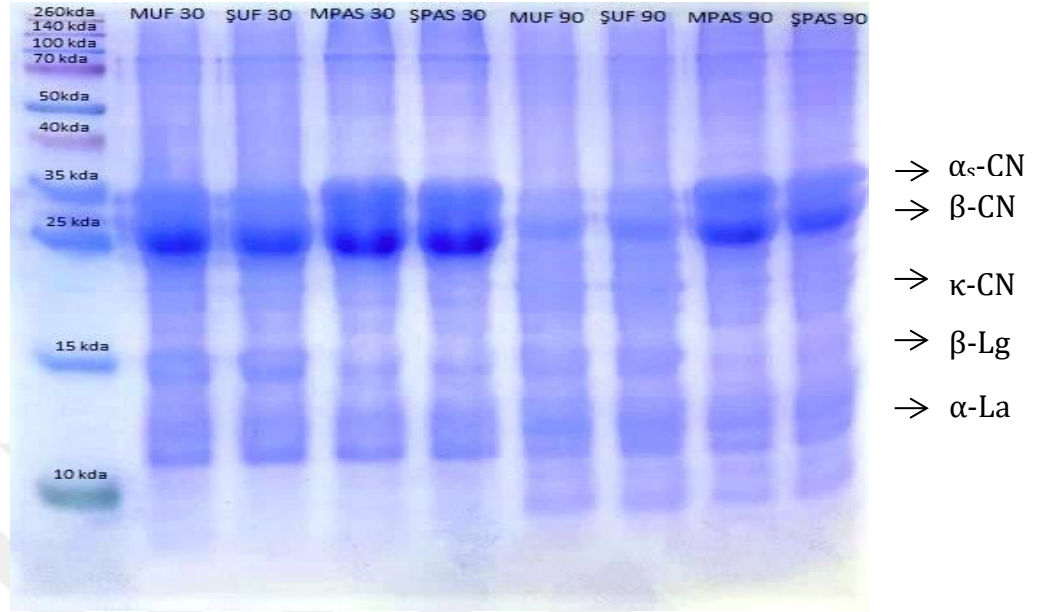
Düşük yağlı Cheddar peynirinde yapılan bir çalışmada, EPS üreten kültürün kullanıldığı peynir gruplarında daha yüksek toplam serbest amino asit miktarının olduğu, kullanılan EPS üreten kültürün yüksek proteolitik aktivitesi nedeniyle birincil proteolizden dolayı bu farkın görüldüğü öne sürülmüştür (Wang vd., 2019). Farklı starter kültür kullanımının etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda olgunlaşma boyunca serbest amino asit değerlerinin arttığı, starter kültür kullanımının toplam serbest amino asit oluşumunda önemli düzeyde etkisi olduğu çalışmalarda bildirilmiştir (Hayaloğlu, 2003; Oneca vd., 2007; Şahingil, 2012, Koçak, 2017).

Bu çalışmada, %5 PTA'da çözünen azot fraksiyonu sonucunda da olduğu gibi şirden mayası ile üretilen peynirlerin mikrobiyal enzimle üretilen peynirlerden daha yüksek toplam serbest amino asit değerlerine sahip olduğu gözlenmiştir. Peynirin olgunlaşma sürecinde sekonder proteoliz aşamasında starter kültürlerin faaliyetleri sonucunda ortaya çıkan bu fraksiyonlardaki ve serbest amino asit sayısındaki farklılığın, pıhtılaştırıcı enzimin peynirdeki primer proteoliz aşamasındaki etkisinin bir sonucu olması ile bu farklılık açıklanabilir. Toplam serbest amino asit değerleri ile %5 PTA değerlerinin birbirine uyumlu olduğu yapılan başka çalışmalarda da görülmektedir (Öner ve Sarıdağ, 2018b).

#### **4.3.3. SDS-PAGE jel elektroforez sonuçları**

Peynirde proteolizin tam olarak incelenebilmesi için elektroforez ve kromatografi gibi bireysel olarak peptitleri çözen tekniklerin kullanılması önem arz etmektedir (Fox vd.,1995). SDS-PAGE yönteminin prensibi; molekül ağırlığı ve molekülde bulunan elektrik enerjisinin, jel içinden bir yükten diğerine giderken katettiği mesafe farklılıklarını ele almasına dayanır (Şahintürk, 2016). Bu çalışmada, olgunlaşmanın 30. ve 90. günlerinde UF ve pastörize süttten yapılan Beyaz peynirlerin protein profilini gözlemlemek üzere SDS-PAGE jel elektroforezi uygulanmıştır. Peynir örneklerindeki  $\alpha$ - ve  $\beta$ -kazeinlerin jel üzerindeki yerleri marker yardımıyla belirlenmiştir. Peynirlerin SDS-PAGE elektroforegramları Bio-Rad ChemiDoc MP Imaging System programı

kullanılarak değerlendirilmiştir. Peynirlere ait elektroforegram sonucu Şekil 4.18'de gösterilmiştir.



Soldan sağa doğru kuyucuklara yüklenenler: Marker, M-UF 30. gün, Ş-UF 30. gün, M-PAS 30. gün, Ş-PAS 30. gün, M-UF 90. gün, Ş-UF 90. gün, M-PAS 90. gün, Ş-PAS 90. gün

Şekil 4.18. Peynir örneklerine ait SDS-PAGE elektroforegramları

Şekil 4.18.'de görüldüğü üzere tüm peynir örneklerine ait  $\alpha_s$ -CN ve  $\beta$ -CN bantları incelendiğinde olgunlaşma süresinin 30. gününde bu bantların yoğun olduğu gözlenmiştir. Olgunlaşmanın 90. gününde  $\alpha_s$ -CN ve  $\beta$ -CN'nin bantlarının yoğunluğunda proteoliz nedeniyle azalma olduğu görülmektedir. Olgunlaşmanın 90. gününde peynir örneklerinde parçalanma ürünlerinin arttığı belirlenmiştir. Peynir üretimi esnasında süte eklenen kimoziin pıhtıda %10 civarında tutulmakta, düşük pH nedeniyle de bu oran artış göstermektedir. (Gürkan, 2019). Peynirlerde kazeinin primer proteolizi ( $\alpha_{s1}$ -CN ve  $\beta$ -CN hidrolizasyonu) çoğunlukla kalıntı kimoziin tarafından, sekonder proteolizi (küçük peptitler ve amino asitler) ise starter kültürlerin enzimleri tarafından gerçekleşmektedir (Broadbent vd., 2002). Bu çalışmada, peynirdeki kalıntı rennetlerin starter kültür aktivitesine katkı sağlayarak proteolizi arttırdığı sonucuna varılmıştır. Pastörize süttten yapılan Beyaz peynirlerde rennet ile  $\kappa$ -CN'nin bağlanması daha iyi gerçekleştiği için bu durum süttün üretim yöntemine göre peynirlerde proteolizde farklılıklara neden olmuş, bu farklılığın bant

yoğunluklarına yansıdığı görülmüştür. Olgunlaşmanın 90. gününde UF sütten yapılan Beyaz peynirlerde görülen  $\alpha_s$ - ve  $\beta$ -kazeinlere ait bantların, pastörize sütten yapılan Beyaz peynirlerde görülenlere göre daha az yoğunlukta olduğu belirlenmiştir. Buna göre pastörize sütten üretilen peynirlerde rennet  $\kappa$ -CN ile daha iyi bağlandığı için UF sütten yapılan Beyaz peynirlerde kalıntı rennetin  $\alpha_s$ -CN ve  $\beta$ -CN hidrolizasyonu üzerinde daha fazla etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Hesari vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada, UF sütten üretilen Beyaz peynirde ve geleneksel yöntemle üretilen Beyaz peynirlerde  $\alpha_{s1}$ -CN'nin parçalanmasının  $\beta$ -CN'den daha yüksek olmasına rağmen  $\alpha_{s1}$ -CN'nin ve özellikle  $\beta$ -CN'nin hidrolizinin, UF peynirde geleneksel peynire göre daha düşük olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar bunun nedeni olarak, UF sütten üretilen peynirlerde bulunan peyniraltı suyu proteinlerinin inert bir dolgu görevi gördüğünü ve üründeki kazein oranını düşürerek seyreltme etkisi yapmış olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Depolama sürecinin sonunda tüm peynir örneklerinde  $\alpha_s$ -CN'e ait bant yoğunluğunun  $\beta$ -CN'e ait bant yoğunluğundan daha az olduğu gözlenmiştir. Peynirlerde, sütün pıhtılaştırıldığı andan itibaren  $\alpha_s$ -CN fraksiyonunları arasında özellikle  $\alpha_{s1}$ -CN'de parçalanmalar olmaktadır. Peynir yapısında alıkonan kimozen, üretimin yaklaşık ilk 24 saatinde  $\alpha_{s1}$ -CN'nin %40'ını hidrolize eder. Bu oran olgunlaşmanın sonlarında %95'e kadar çıkabilmektedir (Fox vd., 1996; Üçüncü, 2020). Olgunlaşma süresinin sonunda  $\beta$ -CN'nin parçalanmasının,  $\alpha_{s1}$ -CN'de meydana gelen parçalanmaya kıyasla daha az olduğu literatürdeki çalışmalarda bildirilmiştir (Fox vd., 1993; Hayaloğlu, 2003; Karaca, 2007; Wishah, 2007; Şahingil, 2012; Erkaya, 2014; Gürkan, 2019; Arısoy ve Öner, 2021; Boran, 2021; Öztürk vd., 2021).

Karaca (2007), proteolitik enzim içeren Beyaz peynir örneklerinde  $\alpha_{s1}$ -CN'in, kontrol peynir örneğine göre daha fazla parçalandığını tespit etmiştir. Benzer olarak Çepoğlu (2005) tarafından yapılan çalışmalarda da  $\alpha_{s1}$ -CN'nin daha fazla hidrolize uğradığı belirtilirken çalışma sonucunda yüksek proteolitik

aktiviteden dolayı *R. miehei* kaynaklı mikrobiyal enzim ile üretilen peynirde  $\alpha_{s1}$ -CN'e ait parçalanmanın en fazla görüldüğünü vurgulamıştır. Saldamlı ve Kaytanlı (1998) tarafından yapılan çalışmada, proteinlerin parçalanmasının peynirler arasında yüksekten düşüğe doğru mikrobiyal rennet, rekombinant kimozen ve ticari rennet ile üretilen peynirlerde görüldüğü tespit edilmiştir. Şengül vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada, Tulum peynirlerinin 90 günlük olgunlaşma süresinde mikrobiyal kaynaklı proteazlar ile yapılan peynirlerde  $\alpha_{s1}$ -CN ve  $\beta$ -CN parçalanmasının buzağı renneti ile yapılan peynirlere göre daha yüksek bulunduğu tespit edilmiştir.

Bitki kimozeni ve buzağı renneti ile üretilen peynirlerde  $\alpha_s$ -CN parçalanmasının buzağı renneti ile üretilenlerde daha fazla olduğu,  $\beta$ -CN'nin parçalanma seviyesinin benzerlik gösterdiği ve  $\gamma$ -CN fraksiyonlarının her iki tip koagülant ile üretilen peynirlerde de artış gösterdiği Pino vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada bildirilmiştir. Başka bir çalışmada, çiğ ve pastörize sütlerin bitkisel enzim kullanılarak pıhtılaştırılması ile elde edilen Beyaz peynirlerde olgunlaşmanın 90. gününde  $\alpha_s$ -CN ve  $\beta$ -CN fraksiyonlarının parçalandığı ve bu nedenle bu proteinlere ait bantların yoğunluğunda azalış olduğu tespit edilmiştir (Ertürkmen vd., 2022).

UF Beyaz peynirinde kazeinlerin ilk proteolizinin esas olarak pıhtılaştırıcıdan kaynaklı olduğu literatürde bildirilmiştir (Hesari vd., 2006). Al-Otaibi ve Wilbey (2005), UF süttten üretilen Beyaz peynirlerde farklı konsantrasyonlarda kimozen enzimi kullanımı ile 15 haftalık olgunlaşma süresinde  $\alpha_{s1}$ -CN parçalanma oranının arttığını bildirmişlerdir. Al-Otaibi ve Wilbey (2006) tarafından yapılmış başka bir çalışmada, Beyaz peynir üretiminde farklı tuz çeşitleri ve kimozen konsantrasyonları kullanılmıştır. Çalışma sonucunda,  $\alpha_{s1}$ -CN'nin hidrolizinde kimozenin etkisinin önemli olmadığı tespit edilmiş,  $\beta$ -CN'nin hidroliz oranının ise  $\alpha_{s1}$ -CN'nin yarısı kadar olduğu belirtilmiştir. UF süttten üretilen peynirler ile yapılan bazı çalışmalarda, olgunlaşma süresinin 40. ile 45. gününden itibaren  $\alpha_{s1}$ -CN ve  $\beta$ -CN'nin parçalandığı, artan tuz oranı ile birlikte  $\alpha_{s1}$ -CN'nin parçalanma ürünlerinde azalma gözlemlendiği bildirmiştir (Hesari vd., 2006; Fathollahi vd., 2010; Soltani, 2013).

Akhgar vd. (2016), olgunlaştırılmış peynir bulamacının retentata eklenmesi ile üretilen İran UF Beyaz peynirlerinde 60 günlük olgunlaşma süresince  $\alpha_{s1}$ -CN'nin,  $\beta$ -CN'den daha hızlı bir şekilde hidrolize olduğunu ancak kontrol peynirine kıyasla  $\alpha_{s1}$ -CN ve  $\beta$ -CN'nin hidroliz oranında anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada, kimozinden kaynaklanan proteolize, ısıtma işlemi görmüş keçi sütü ile yapılan peynirin  $\alpha_{s2}$ -CN fraksiyonunun, çiğ keçi sütünden yapılan peynirdekine kıyasla daha duyarlı olduğu, bunun nedeninin süte uygulanan ısıtma işlemi olduğu bildirilmiştir (Barac vd., 2016).

#### **4.3.4. Peynirlerde RP-HPLC ile belirlenen peptit profilleri**

##### **4.3.4.1. SÇE örneklerinin RP-HPLC kromatogramı**

Peynirde olgunlaşmanın belirlenmesi için RP-HPLC tekniği kullanılmaktadır. RP-HPLC kromatogramında oluşan pik sayısı, piklerin yüksekliği ile birlikte hidrofilik ve hidrofobik alanlar peynirlerde proteoliz hakkında bilgi vermektedir (Topçu, 2004). Hidrofilik peptidler, hidrofobik peptidlere göre daha erken kromatogram vermektedir. Düşük molekül ağırlıklı peptidler ve serbest amino asitler alıkonma süresinin 10-40. dakikalarında kromatogramda belirlenir (Engels ve Visser, 1994; Soltani, 2013). Hidrofobik peptitler ise 40. dakikadan sonra kromatogram vermektedir. Kromatogramda zamana bağlı pik yüksekliğinde görülen azalmaların nedeni peptitlerin mikro peptitlere ve amino asitlere hidrolizi olarak bilinmektedir.

Bu çalışmada üretilen peynirlerin SÇE örneklerine ait 90 günlük olgunlaşma süresince peptit profili sonuçları Şekil 4.19 – 4.22.'de verilmiştir. Şekil 4.23 – 4.26.'da ise her bir peynir örneğinin olgunlaşma süresince değişimleri her bir gün için aynı kromatogram üzerinde kıyaslanarak verilmiştir. Çizelge 4.36.'da olgunlaşma süresi boyunca günden güne SÇE örneklerinin RP-HPLC kromatogramında hidrofilik bölgenin toplam alanı (0-40. dakika arası) ile hidrofobik bölgenin toplam alanındaki (41-100. dakika arası) artış veya azalışlar %değişim olarak verilmiştir. Çizelge 4.37.'da ise SÇE örneklerinin RP-HPLC kromatogramında gözlenen hidrofilik bölgenin toplam alanı ile hidrofobik bölgenin toplam alanının istatistiksel analiz sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.36. SÇE örneklerine ait hidrofilik ve hidrofobik alanlardaki %değişim sonuçları

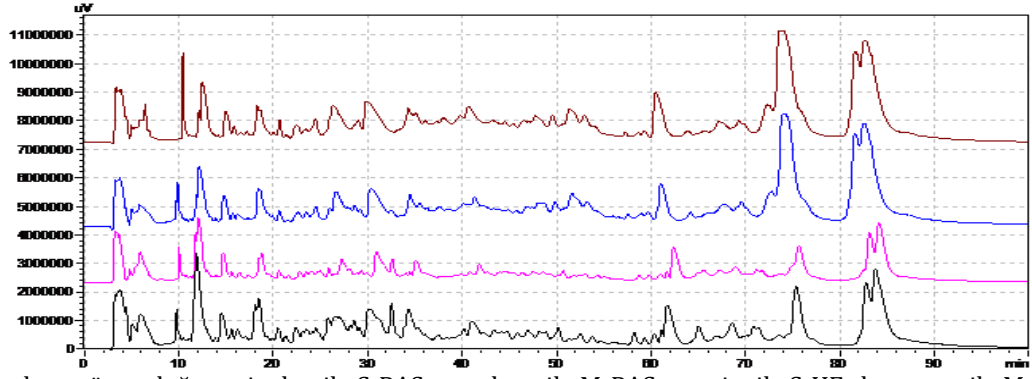
| Peynir | Gün | Dakika | Toplam Hidrofilik Alan | %Değişim | Dakika | Toplam Hidrofobik Alan | %Değişim |
|--------|-----|--------|------------------------|----------|--------|------------------------|----------|
| M-UF   | 1.  | 0-40   | 1285874503             |          | 41-100 | 2092574924             |          |
|        | 30. | 0-40   | 1778847117             | +27,71   | 41-100 | 2539931905             | +17,61   |
|        | 60. | 0-40   | 1696559941             | -4,85    | 41-100 | 3535042826             | +28,15   |
|        | 90. | 0-40   | 1915208469             | +11,42   | 41-100 | 3616492239             | +6,23    |
| Ş-UF   | 1.  | 0-40   | 1054252464             |          | 41-100 | 2244291285             |          |
|        | 30. | 0-40   | 1515507755             | +30,44   | 41-100 | 2360801579             | +4,94    |
|        | 60. | 0-40   | 1906667113             | +20,52   | 41-100 | 3378871177             | +30,13   |
|        | 90. | 0-40   | 2472942991             | +22,9    | 41-100 | 4029851386             | +16,15   |
| M-PAS  | 1.  | 0-40   | 803304245              |          | 41-100 | 972762464              |          |
|        | 30. | 0-40   | 1631865666             | +50,77   | 41-100 | 1254104817             | +22,43   |
|        | 60. | 0-40   | 2169448781             | +24,78   | 41-100 | 2467058477             | +49,17   |
|        | 90. | 0-40   | 2194619025             | +1,15    | 41-100 | 2694346101             | +8,44    |
| Ş-PAS  | 1.  | 0-40   | 1526143191             |          | 41-100 | 1555169299             |          |
|        | 30. | 0-40   | 2129838117             | +28,34   | 41-100 | 1810082662             | +14,08   |
|        | 60. | 0-40   | 2006172026             | -5,80    | 41-100 | 2259434382             | +19,89   |
|        | 90. | 0-40   | 2258826227             | +11,19   | 41-100 | 2218798602             | -1,80    |

Çizelge 4.36.'da görüldüğü üzere tüm peynir örneklerinin olgunlaşma süresinin başına göre 90. günde hem hidrofilik hem hidrofobik bölgelerin toplam alanlarında artış olduğu görülmektedir. M-UF ve Ş-PAS peynirlerinin hidrofilik bölgenin toplam alanında 60. günde hafif bir azalış olduğu, 90. günde tekrar artış olduğu belirlenmiştir. M-PAS ve Ş-UF peynirlerinde ise olgunlaşma süresi boyunca hem hidrofilik hem hidrofobik bölgelerinin toplam alanlarının sürekli artış gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.37. SÇE örneklerine ait RP-HPLC kromatogramının istatistiksel analiz sonuçları

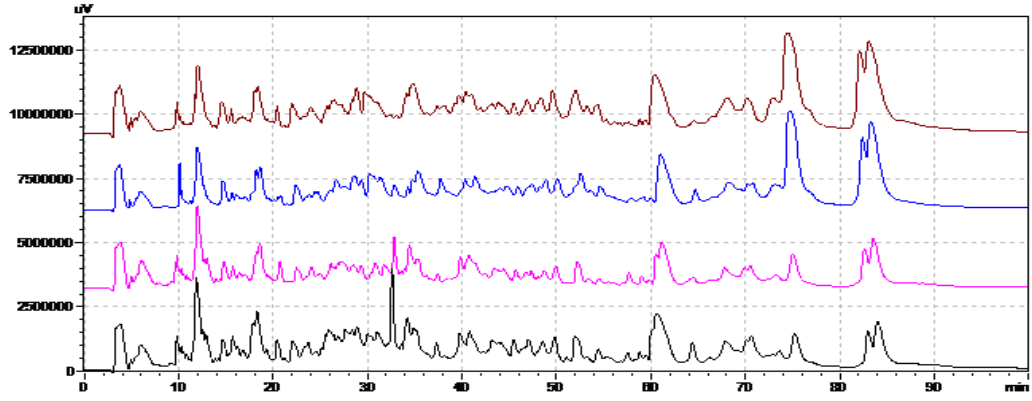
| Varyasyon Kaynakları |            | F       | P            |
|----------------------|------------|---------|--------------|
| Süt                  | Hidrofilik | 3,321   | 0,084        |
|                      | Hidrofobik | 225,641 | <b>0,000</b> |
| Enzim                | Hidrofilik | 5,393   | <b>0,031</b> |
|                      | Hidrofobik | 1,443   | 0,244        |
| Depolama             | Hidrofilik | 34,759  | <b>0,000</b> |
|                      | Hidrofobik | 94,209  | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | Hidrofilik | 0,736   | 0,543        |
|                      | Hidrofobik | 2,869   | 0,064        |
| Süt x Depolama       | Hidrofilik | 0,928   | 0,446        |
|                      | Hidrofobik | 2,279   | 0,112        |
| Süt x Enzim          | Hidrofilik | 1,998   | 0,174        |
|                      | Hidrofobik | 0,156   | 0,697        |

UF sütten üretilen peynirlerin hidrofobik bölgelerinin toplam alanının olgunlaşma süresince hidrofilik bölgenin toplam alanına göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Pastörize sütten üretilen peynirlerde de böyle bir farklılık görülsede alanlar arasındaki farklılığın UF sütten üretilen peynirlerde olduğu kadar fazla olmadığı ve birbirine daha yakın değerler görüldüğü belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre Ş-UF peynirinde olgunlaşma süresince oluşan peptitlerin zamanla M-UF peynirine göre daha hızlı parçalanma gösterdiği, olgunlaşma sonunda suda çözünen peptit miktarlarında Ş-UF’de daha fazla artış olduğu ve bu peptitlerin parçalanarak serbest amino asitlerin miktarında artışa yol açtığı sonucuna varılmıştır. Pastörize sütten üretilen peynirlerden M-PAS peynirinde olgunlaşma sonunda her iki bölgede de artış gözlenirken Ş-PAS peynirinde yalnızca hidrofobik bölgede düşük bir miktarda azalış gözlenmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda hem hidrofilik hem hidrofobik bölgenin toplam alanı üzerinde depolama süresinin önemli bir etkisi olduğu ( $p<0,05$ ), peynir yapımında kullanılan sütün üretim tekniğinin sadece hidrofobik bölge üzerinde önemli bir etki gösterirken ( $p<0,05$ ) kullanılan pıhtılaştırıcı enzimin ise sadece hidrofilik bölge üzerinde önemli etkiye sebep olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ).



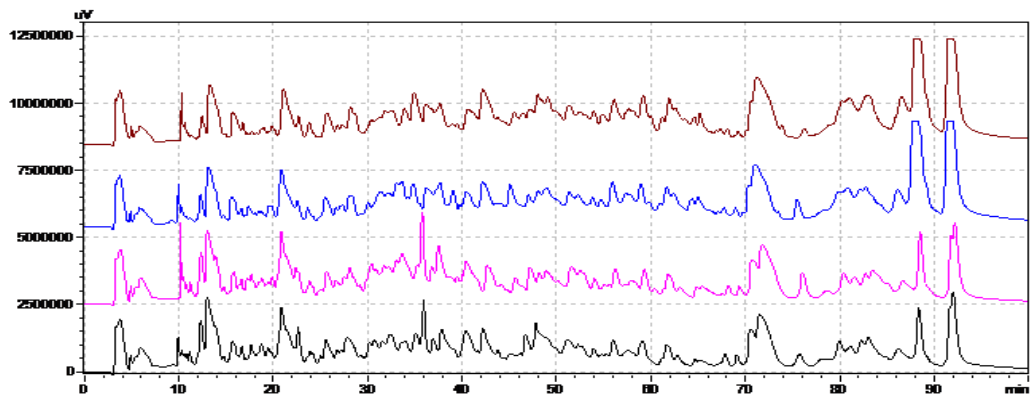
En alttan üste doğru: siyah pik Ş-PAS, pembe pik M-PAS, mavi pik Ş-UF, kırmızı pik M-UF peynirine ait pikleri göstermektedir.

Şekil 4.19. Peynirlerin SÇE örneklerinin 1. gün kromatogramları



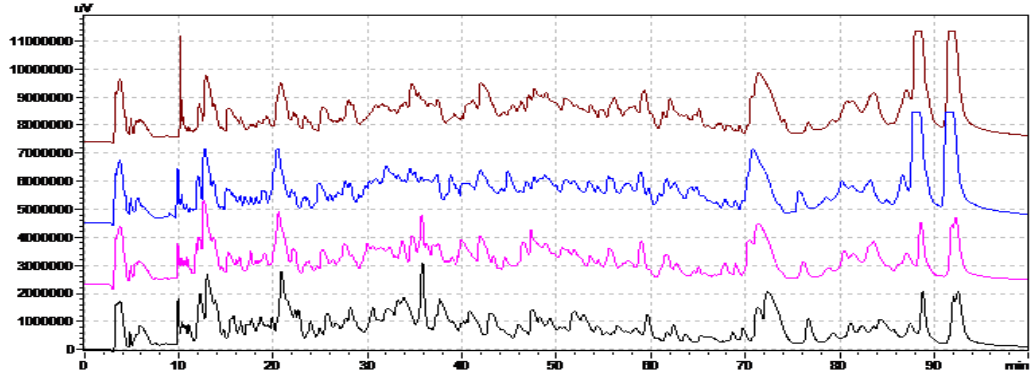
En alttan üste doğru: siyah pik Ş-PAS, pembe pik M-PAS, mavi pik Ş-UF, kırmızı pik M-UF peynirine ait pikleri göstermektedir.

Şekil 4.20. Peynirlerin SÇE örneklerinin 30. gün kromatogramları



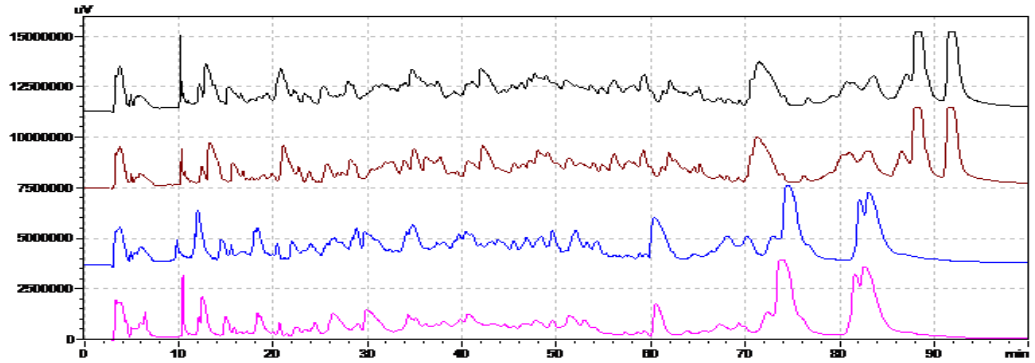
En alttan üste doğru: siyah pik Ş-PAS, pembe pik M-PAS, mavi pik Ş-UF, kırmızı pik M-UF peynirine ait pikleri göstermektedir.

Şekil 4.21. Peynirlerin SÇE örneklerinin 60. gün kromatogramları



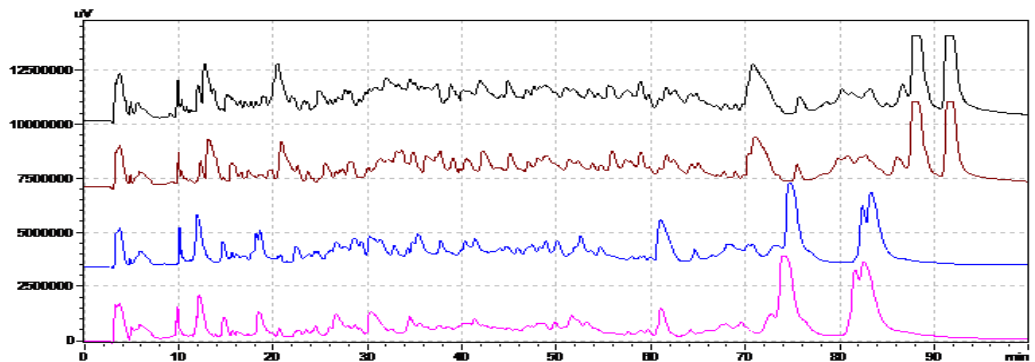
En alttan üste doğru: siyah pik Ş-PAS, pembe pik M-PAS, mavi pik Ş-UF, kırmızı pik M-UF peynirine ait pikleri göstermektedir.

Şekil 4.22. Peynirlerin SÇE örneklerinin 90. gün kromatogramları



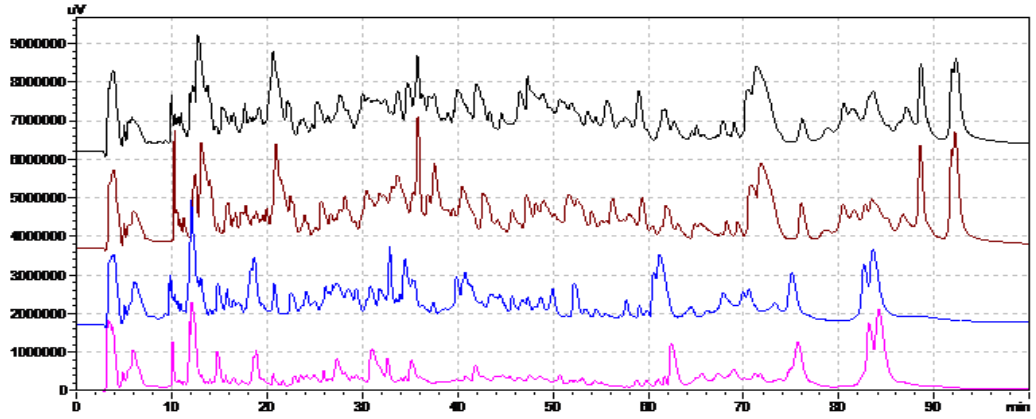
En alttan üste doğru: pembe pik 1. gün, mavi pik 30. gün, kırmızı pik 60. gün, siyah pik 90. güne ait pikleri göstermektedir.

Şekil 4.23. M-UF peynirinin SÇE örneğinin olgunlaşma boyunca belirlenen kromatogramları



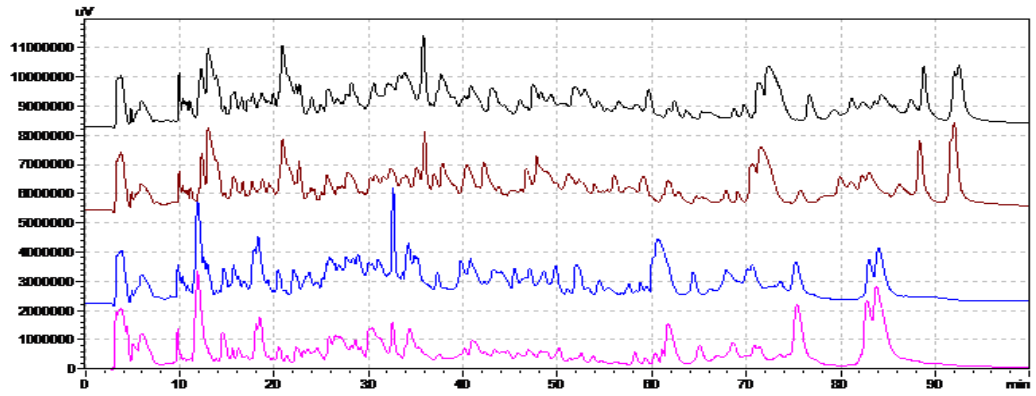
En alttan üste doğru: pembe pik 1. gün, mavi pik 30. gün, kırmızı pik 60. gün, siyah pik 90. güne ait pikleri göstermektedir.

Şekil 4.24. Ş-UF peynirinin SÇE örneğinin olgunlaşma boyunca belirlenen kromatogramları



En alttan üste doğru: pembe pik 1. gün, mavi pik 30. gün, kırmızı pik 60. gün, siyah pik 90. güne ait pikleri göstermektedir.

Şekil 4.25. M-PAS peynirinin SGE örneğinin olgunlaşma boyunca belirlenen kromatogramları



En alttan üste doğru: pembe pik 1. gün, mavi pik 30. gün, kırmızı pik 60. gün, siyah pik 90. güne ait pikleri göstermektedir.

Şekil 4.26. Ş-PAS peynirinin SGE örneğinin olgunlaşma boyunca belirlenen kromatogramları

Olgunlaşmanın 1. gününde UF sütten yapılan M-UF ve Ş-UF arasında pik yüksekliği bakımından belirgin farklılık gözlenmezken, pastörize sütten yapılan peynirlerde M-PAS'a ait pik yüksekliğinin Ş-PAS'a göre daha az olduğu gözlenmiştir 30. günde ise Ş-PAS peynirine ait piklerin 1. güne göre azalış göstermesi sebebiyle M-PAS ile aralarındaki farkın da azaldığı belirlenmiştir. UF sütten üretilen Beyaz peynirlerde M-UF'de gözlenen pik yüksekliklerinin Ş-UF'den biraz daha fazla olduğu belirlenmiştir. Tüm peynirlerde 30. günde, 60. dakikada gelen pik büyüklüğünde artış olduğu tespit edilmiştir. Olgunlaşmanın 60. günde tüm peynirlerde 85.dakikadan itibaren daha önce gözlenmeyen yeni

piklerin oluşumu gözlenmiştir. 90. günde ise M-UF ve Ş-UF arasında 30-40.dakika arasındaki hidrofilik piklerde Ş-UF'nin daha yüksek pik vermesi dışında belirgin bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir.

Şekil 4.23. ve 4.24. incelendiğinde M-UF ve Ş-UF peynirlerinde 71. ve 80. dakikalarda 1. gün ile 30. günde gelen büyük piklerin olgunlaşmanın 60. ve 90. günlerinde gelmediği, onun yerine 85. dakikadan itibaren yeni büyük piklerin oluştuğu görülmüştür. Olgunlaşmanın 60. gününden sonra, kromatogramda 60. dakikada gelen pikin yerini sayıca daha fazla piklere bıraktığı, genel olarak 60. dakikadan itibaren hidrofobik bölgede pik oluşumun arttığı gözlenmiştir. Şekil 4.25. ve 4.26. incelendiğinde M-PAS'da ise 60. ve 81. dakikada gelen piklerin, Ş-PAS'da ise 60. ve 63. dakikalarda gelen piklerin, olgunlaşmanın 60. ve 90. günlerinde yerini daha ufak piklere bıraktığı belirlenirken 70. ve 85. dakikalarda yeni büyük pik geldiği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, olgunlaşma süresince gözlenen 70. dakikadan sonra gelen yeni piklerin proteoliz sonucu oluşan hidrofobik ve yüksek molekül ağırlıklı peptitlere ait olduğu, olgunlaşmanın başlarında görülüp sonrasında gelmeyen hidrofobik bölgelerdeki bazı büyük piklerin ise zamanla parçalanarak yerini daha ufak piklere ve ilerleyen dakikalarda gelen yeni büyük piklerin oluşumuna sebep olduğu belirlenmiştir.

Peynirin olgunlaşma döneminde, farklı starter kültür kullanımı, doğal mikroflora, farklı üretim teknikleri, enzim uygulamaları, olgunlaşma şartları ve süresi proteoliz miktarını etkilemekte ve RP-HPLC peptid profillerinde önemli farklılıklara neden olmaktadır (Öner ve Sarıdağ, 2019). Agboola vd. (2004), mikrobiyal enzim ile üretilen peynirlerde hidrofobik peptitlerin en düşük seviyede olduğunu ve bu peynirlerin hidrofobik peptit seviyesinin 60. güne kadar arttığını, 60. günden sonra ise azaldığını, şirden maya ile yapılan tüm peynirlerde ise olgunlaşma sürecinde hidrofobik peptitlerin arttığını bildirmişlerdir. UF süttten üretilen Beyaz peynirlerde yapılan bir çalışmada, hidrofobik alandaki en fazla artış, UF pastörize sütle üretilen peynir örnekleri arasında kimozen enzimi ve proteolitik aktivitesi yüksek başlatıcı kültür ile üretilen ve acılığın en yüksek düzeyde belirlendiği peynir örneğinde

görülmüştür (Arısoy, 2019). Yüksek proteinaz konsantrasyonlarının peptidaz ile kombine edilerek üretimin gerçekleştirildiği peynirlerde, endo-peptidaz enzimlerinin faaliyeti nedeniyle daha yüksek oranda hidrofilik peptitlerin salındığı bildirilmiştir (Ali vd., 2017). Bir diğer çalışmada, Beyaz peynirlerde olgunlaşma sonunda elde edilen pik yüksekliklerinin arttığı, proteaz enziminin daha fazla ilave edildiği grupta gözlenen pik büyüklüklerinin olgunlaşma sonunda daha düşük konsantrasyonda proteaz ilave edilen peynire oranla daha düşük olduğu, bunun nedeninin ise proteaz enziminin artışına bağlı olarak peptitlerin parçalanması ve serbest amino asit miktarının artması olduğu bildirilmiştir (Karaca, 2007).

Yapılan bir çalışmada, Beyaz peynir örneklerinde pik sayısından ziyade pik yüksekliklerinin olgunlaşmaya bağlı artış göstererek değiştiği, olgunlaşmanın 60. ve 120. günlerde peptitlerin toplam pik alanlarında artış olduğu belirlenmiştir (Erkaya, 2014). Koyun ve keçi sütlerinden geleneksel yöntem ile İzmir Tulum peynirlerinde olgunlaşma ilerledikçe bazı piklerin kaybolup yeni piklerin oluştuğu, toplam pik sayısı artış ve azalışlar göstermekle beraber olgunlaşma sonunda başlangıca göre azalma gözlemlendiği bildirilmiştir (Kısak, 2021). İnek, koyun ve keçi sütlerinden üretilen Beyaz peynirlerde olgunlaşmanın 0. ayında hidrofilik peptitlerin daha fazla olduğu belirlenirken 3., 6 ve 9 aylarda ise hidrofobik ve hidrofilik peptitlerin birbirine yakın olduğu bildirilmiştir. (Öner ve Sarıdağ, 2018b). İnek, koyun ve keçi sütlerinden üretilen Beyaz peynirlerinde piklerin çoğunun kromatogramın 20. ve 50. dakikalar aralığında elde edildiği bildirilmiştir (Kocak vd., 2020; Demir, 2021).

Al-Otaibi ve Wilbey (2005), farklı tuz ve kimozen oranları kullanarak UF süttten üretilen Beyaz peynirlerinde kullanılan tuz oranlarının yükselmesinin peynirlerin peptit konsantrasyonu üzerine inhibe edici etkisinin bulunduğunu belirlemişlerdir. Hesari vd. (2006), kontrol ve startersiz olarak üretilen İran UF Beyaz peynirlerin etanolde çözünmeyen fraksiyonlarının peptit profilleri arasındaki en önemli farkın alıkonma süresinin 10-30 dakikalarında meydana geldiğini, bu süre içindeki peptit konsantrasyonunun startersiz olarak üretilen İran UF Beyaz peynirinde kontrol peynirine oranla daha düşük olduğunu

bildirilmiştir. Soltanı (2013), olgunlaşma sürecinin ilerlemesiyle UF süttten üretilen Beyaz peynirlerin peptit profilleri arasındaki farkın alıkonma süresinin 20-60 dakikalarında belirlendiğini bildirmiştir.

Çiğ koyun sütünden geleneksel olarak üretilen Urfa peynirlerinde yapılmış çalışmada, hem hidrofilik hem de hidrofobik özellik gösteren peptitlerin oranının olgunlaşma süresince arttığı ve farklı alıkonma zamanlarında gözlenen piklerin konsantrasyonunda gözlenen değişimlerin peynirlerdeki proteolizin ilerlediğini gösterdiği vurgulanmıştır (Kırmacı, 2010). Hayaloğlu ve Karabulut (2013) tarafından yapılan çalışmada Civil peynirinin yüksek konsantrasyonlarda piklere ve yüksek seviyelerde çözünür nitrojen fraksiyonlarına sahip olduğu ancak Ezine peynirinde en az 6 ay olgunlaşmasına rağmen yüksek peptit konsantrasyonlarına rastlanmadığı bildirilmiştir. Araştırmacılar bu durumu peptitlerin parçalanıp amino asitlere ve asitler, aldehitler ve alkoller gibi uçucu bileşiklere dönüşmesi ile yorumlamışlardır. Ong vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada, probiyotik Cheddar peynirinde pik sayısı ve alanlarının depolamanın ilk 12 haftası boyunca önemli ölçüde arttığını, daha sonra 24. haftaya kadar yavaş ama önemsiz bir şekilde artmaya devam ettiğini ve bu süreden sonra tüm peynirlerde sabit kaldığını bildirmişlerdir. Fallico vd. (2006), 10 ay süre ile olgunlaştırılan Enesse peynirlerinde olgunlaşma süresinin sonuna doğru hidrofobik peptit miktarının azaldığını, hidrofilik peptit konsantrasyonunun ise arttığını belirlemiştir.

#### **4.3.4.3. <3kDa peptit ekstraktlarının RP-HPLC kromatogramı**

Peynirlerdeki olgunlaşma süresince gerçekleşen proteoliz sonucu oluşan küçük, orta veya büyük boyutlu peptitlerin profili RP-HPLC kromatogramında gözlenen pikler ile belirlenebilmektedir. Küçük peptitler (15 kalıntıdan az) söz konusu olduğunda, alıkonma süresinin esas olarak amino asit bileşimine bağlı olduğu, daha büyük peptitlerin ve proteinlerin alıkonma süresinin de konformasyonel etkiler ve moleküler ağırlık gibi diğer faktörlerden etkilendiği bildirilmiştir (Parrot vd.,2003). Hidrofobik ve yüksek molekül ağırlıklı peptitler ile serum proteinleri, genellikle alıkonma süresinin 70-100 dakikalarında ortaya

çıkmaktadır (Al-Otaibi ve Wilbey, 2005; Hayaloğlu ve Özer, 2011). Bu çalışmada üretilen peynirlerden elde edilen <3kDa peptit ekstraktlarının 30. ve 90. günlerine ait peptit profili sonuçları Şekil 4.27 ve Şekil 4.28’de verilmiştir. Şekil 4.29 – 4.32.’de ise her bir peynir örneğinin 30. ve 90. günlerindeki değişimleri aynı kromatogram üzerinde üst üste getirilerek verilmiştir. Çizelge 4.38.’de <3kDa peptit ekstraktlarının RP-HPLC kromatogramında hidrofilik bölgenin toplam alanı (0-40. dakika arası) ile hidrofobik bölgenin toplam alanının (41-100. dakika arası) olgunlaşma süresinin 30. gününden 90. gününe olan artış veya azalışları %değişim olarak verilmiştir. Çizelge 4.39.’da SÇE örneklerinin RP-HPLC kromatogramında gözlenen hidrofilik bölgenin toplam alanı ile hidrofobik bölgenin toplam alanının istatistiksel analiz sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.38. <3kDa peptit ekstraktlarına ait hidrofilik ve hidrofoik alanlardaki %değişim sonuçları

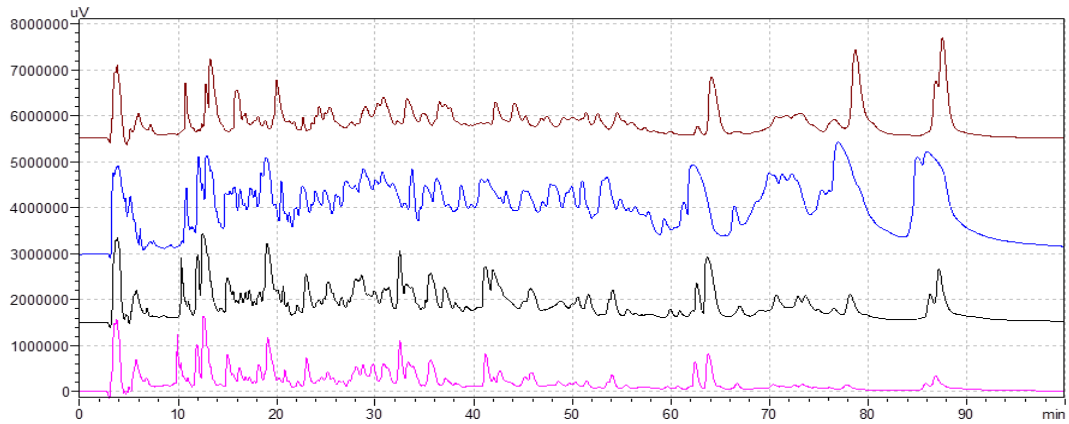
| Peynir | Gün | Dakika | Toplam Hidrofilik Alan | %Değişim | Dakika | Toplam Hidrofobik Alan | %Değişim |
|--------|-----|--------|------------------------|----------|--------|------------------------|----------|
| M-UF   | 30. | 0-40   | 965285036              | +32,18   | 41-100 | 1061637217             | +39,03   |
|        | 90. | 0-40   | 1423251788             |          | 41-100 | 1741150658             |          |
| Ş-UF   | 30. | 0-40   | 2424696075             | -31,13   | 41-100 | 3713540149             | -48,35   |
|        | 90. | 0-40   | 1669963844             |          | 41-100 | 1918222460             |          |
| M-PAS  | 30. | 0-40   | 1230924876             | -6,95    | 41-100 | 1091289833             | -33,36   |
|        | 90. | 0-40   | 1145432377             |          | 41-100 | 727242616              |          |
| Ş-PAS  | 30. | 0-40   | 762624737              | +58      | 41-100 | 374562413              | +68,03   |
|        | 90. | 0-40   | 1815235663             |          | 41-100 | 1171455005             |          |

Çizelge 4.38.’de görüldüğü üzere peynir örneklerinin <3kDa peptit ekstraktlarına ait hem hidrofilik bölgede hem de hidrofobik bölgede gözlenen piklerin toplam alanlarının değişimi değerlendirildiğinde olgunlaşma sonunda Ş-UF (hidrofilik alan -%31,13, hidorfobik alan -%48,35) ve M-PAS (hidrofilik alan -%6,95, hidrofobik alan -%33,36) peynirlerinde azalma olduğu görülmüştür. Bu iki peynir dışındaki M-UF ve Ş-PAS peynirlerinin <3kDa

ekstraktlarına ait piklerin toplam alanında olgunlaşma sonunda artış olduğu belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda hidrofobik bölgenin toplam alanı üzerinde sütün üretim tekniğinin ve süt x enzim interaksiyonunun önemli bir etkisi olduğu ( $p<0,05$ ) belirlenirken, hidrofilik bölge üzerinde istatistiksel olarak yalnızca enzim farklılığının önemli bir etkisi olduğu ( $p<0,05$ ) belirlenmiştir.

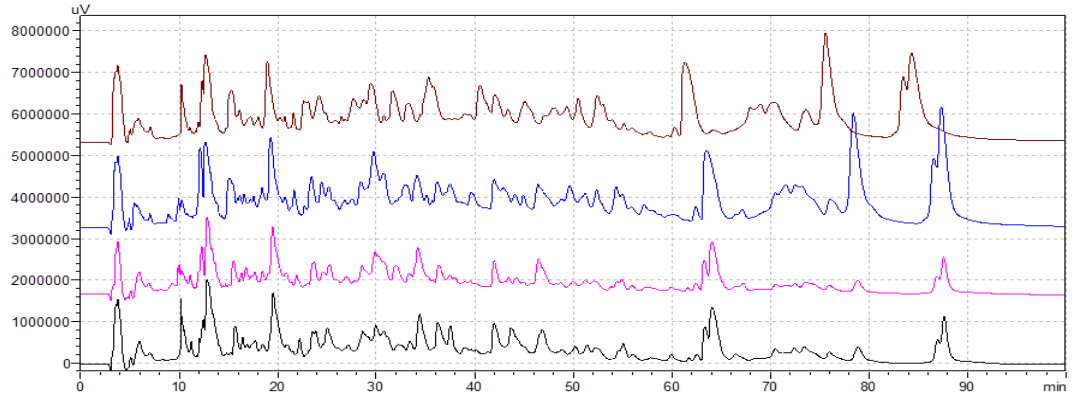
Çizelge 4.39. <3kDa peptit ekstraktlarına ait RP-HPLC kromatogramının istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları |            | F      | P            |
|----------------------|------------|--------|--------------|
| Süt                  | Hidrofilik | 3,796  | 0,083        |
|                      | Hidrofobik | 17,468 | <b>0,002</b> |
| Enzim                | Hidrofilik | 5,909  | <b>0,038</b> |
|                      | Hidrofobik | 4,441  | 0,064        |
| Depolama             | Hidrofilik | 0,730  | 0,415        |
|                      | Hidrofobik | 0,317  | 0,587        |
| Enzim x Depolama     | Hidrofilik | 0,009  | 0,926        |
|                      | Hidrofobik | 1,173  | 0,307        |
| Süt x Depolama       | Hidrofilik | 2,594  | 0,142        |
|                      | Hidrofobik | 1,630  | 0,234        |
| Süt x Enzim          | Hidrofilik | 3,676  | 0,087        |
|                      | Hidrofobik | 6,537  | <b>0,031</b> |



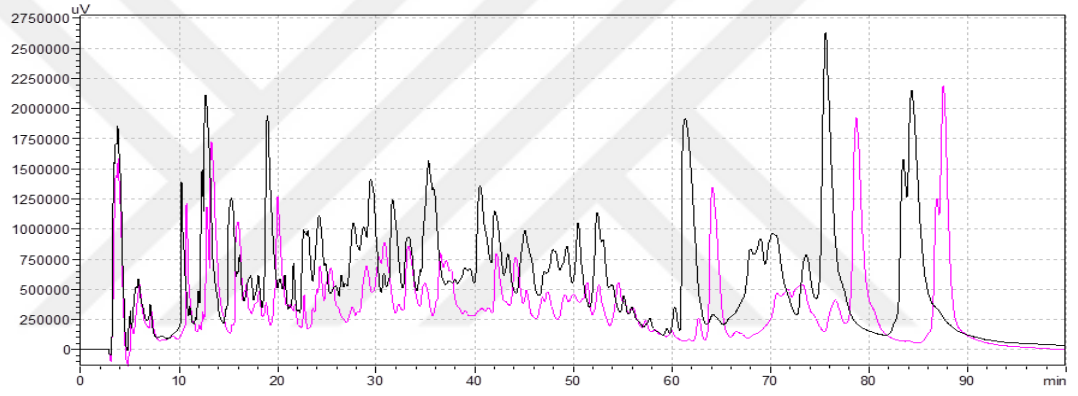
En alttan üste doğru: pembe pik Ş-PAS, siyah pik M-PAS, mavi pik Ş-UF, kırmızı pik M-UF peynirine ait pikleri göstermektedir.

Şekil 4.27. Peynirlerin <3kDa peptit ekstraktlarının 30. günde belirlenen kromatogramları



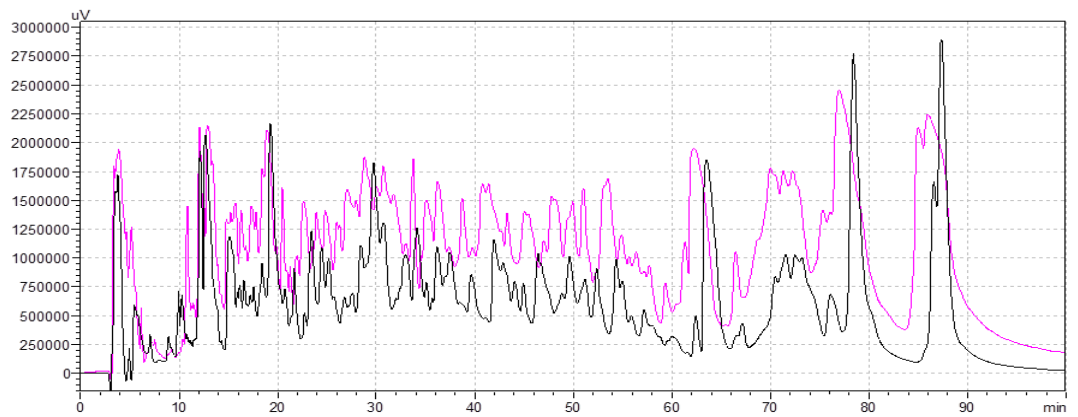
En alttan üste doğru: siyah pik M-PAS, pembe pik Ş-PAS, mavi pik Ş-UF, kırmızı pik M-UF peynirine ait pikleri göstermektedir.

Şekil 4.28. Peynirlerin <3kDa peptit ekstraktlarının 90. günde belirlenen kromatogramları



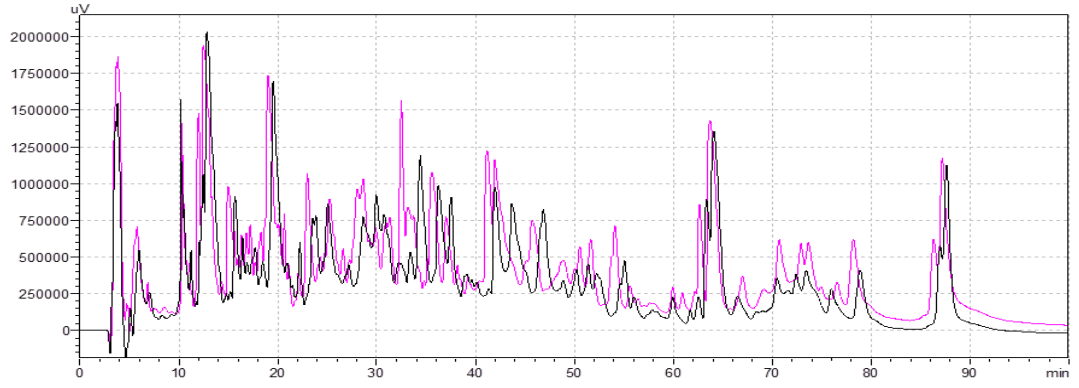
Pembe pik 30. gün, siyah pik 90. güne ait pikleri göstermektedir.

Şekil 4.29. M-UF peynirinin <3kDa peptit ekstraktlarının 30. gün ve 90. günde belirlenen kromatogramları



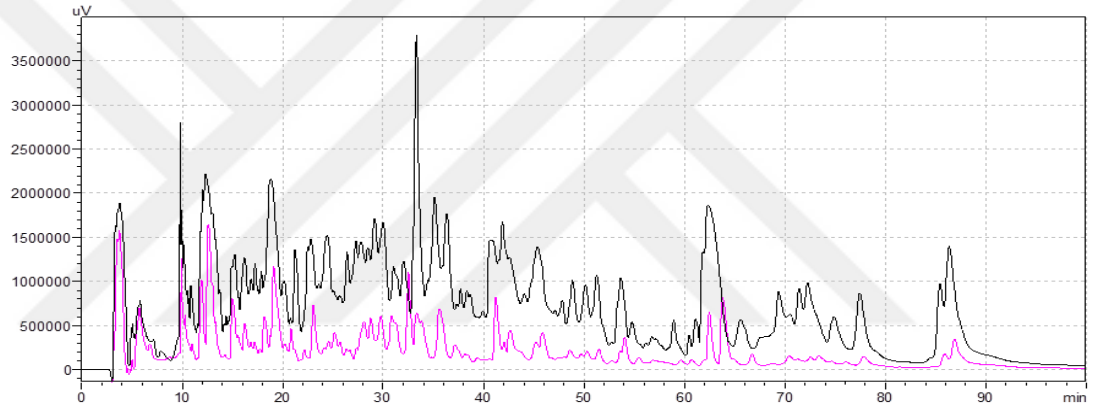
Pembe pik 30. gün, siyah pik 90. güne ait pikleri göstermektedir.

Şekil 4.30. Ş-UF peynirinin <3kDa peptit ekstraktlarının 30. gün ve 90. günde belirlenen kromatogramları



Pembe pik 30. gün, siyah pik 90. güne ait pikleri göstermektedir.

Şekil 4.31. M-PAS peynirinin <3kDa peptit ekstraktlarının 30. gün ve 90. günde belirlenen kromatogramları



Pembe pik 30. gün, siyah pik 90. güne ait pikleri göstermektedir.

Şekil 4.32. Ş-PAS peynirinin <3kDa peptit ekstraktlarının 30. gün ve 90. günde belirlenen kromatogramları

Olgunlaşmanın 30. gününde M-UF ve Ş-UF peynirlerinin pik görüntülerinde özellikle hidrofobik bölgede belirgin olarak farklılık gözlenirse de 90. günde de piklerin şekil bakımından birbirine benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Olgunlaşmanın 90. gününde, hidrofobik bölgenin 60., 65., 75. ve 82. dakikalarında gelen büyük boyutlu peptidlere ait piklerin M-UF peynirinde büyüdüğü ancak Ş-UF'de küçüldüğü Şekil 4.29. ile Şekil 4.30.'da görülmektedir. Bu durum, UF sütte pıhtılaştırıcı enzimden kaynaklanan olgunlaşma sürecinin başındaki birincil proteolizde oluşan peptitlerin farklı düzeyde olduğunu, olgunlaşma ilerledikçe farkın azaldığını göstermektedir. Olgunlaşmanın 30. gününden 90. gününe pastörize süttten üretilen M-PAS ve Ş-PAS peynirlerinin

her ikisinde de 65. ve 86. dakikada gelen piklerde artış olduğu gözlenirken, bu artışın özellikle Ş-PAS peynirinde 86. dakikada gelen pikte oldukça belirgin olduğu görülmektedir.

Burgos-tip peynirlerden elde edilen <3kDa peptit ekstraktlarının RP-HPLC'de incelenmesi sonucunda pik sayısının bitkisel enzimle üretilen peynirde en fazla olduğu, mikrobiyal kaynaklı enzimle üretilen peynirde ise en az sayıda pik geldiği, farklılığın özellikle ilk 20 dakikada gelen piklerde olduğu yapılan bir çalışma sonucunda belirlenmiştir (Timón vd., 2014). Başka bir çalışmada, RP-HPLC fraksiyon sayısı bakımından farklı kaynaklardan elde edilen rennetler ile üretilen peynirlerden elde edilmiş <3kDa ekstraktlar arasında fark olmamasının peynirde benzer bir proteolizin göstergesi olabildiği, <3kDa peptitlerin proteoliz için uygun bir indikatör olmadığı öne sürülmüş olup peynirde proteoliz düzeyini değerlendirmek için diğer proteolitik parametrelerin belirlenmesi önerilmiştir (Timón vd., 2019).

Yapılan bir çalışmada 14 ve 38 aylık Grana Padano peynirinden elde edilen <3kDa peptit ekstraktlarının HPLC kromatogramları kıyaslandığında, kromatogramın son kısmında ayrıştırılan pik grubunun 14 aylık peynirlerde kantitatif olarak daha önemli olduğu tespit edilmiştir. 38 aylık peynirlerin ekstraktlarına ait piklerin sayısında ve büyüklüklerinde özellikle 30. dakikadan sonra belirgin bir azalma görülmüştür (Ferrantia vd., 1997). Cheddar peynirlerinin 5kDa peptit ekstraktlarının HPLC kromatogramlarında peynirin olgunlaşma süresi ilerledikçe yeni piklerin ortaya çıktığı, 6. aydan sonra pik sayısında azalma görüldüğü, 7. aydan sonra gözlenen yeni büyük birkaç pikin 9. ayda kaybolduğu tespit edilmiştir (Gupta vd., 2013).

Yapılan bir çalışmada, fermente koyun sütünün, 3kDa retentat örneğine ait piklerin sayısının ve yüksekliklerinin 3kDa filtrat örneğinden çok daha fazla olduğu, özellikle 20. dakikadan sonra piklerin oldukça yoğun bir şekilde geldiği görülmüştür. Buna göre moleküler büyüklüğü daha az olan peptitlerin, total peptit ekstraktı içinde çok daha az miktarda olduğu belirlenmiştir (Ashokbhai vd., 2022). Bu çalışmadaki SÇE örneklerine göre <3kDa peptit ekstraktlarının

hem protein değerinin daha dūşük olması hem de kromatogramda daha farklı sonuçlar göstermesi ile Ashokbhai vd. (2022) tarafından bildirilen sonucun paralel olduğu görölmüştür. *L. lactis* suşları ile fermente edilerek yağsız süttten üretilmiş fermente süt örneklerinden <3kDa peptit ekstraktlarının HPLC kromatogramının fermente edilmemiş kontrol grubuna göre farklılık gösterdiği, 240 nm’de yürütölen örneklerde en yüksek pik konsantrasyonunun 12-25. dk arasında geldiğı, 280 nm’de yürütölen örneklerde sadece 16-20 dk. arasında 3 pik geldiğı, bunların aromatik yapıya sahip olduğu ve ACE-inhibitör aktiviteye sebep olabileceğı bildirilmiştir (Rodríguez-Figueroa vd., 2012).

#### 4.3.5. Peptit ekstraktlarının protein değerine ait sonuçlar

Peynirde bulunan kazein ve para-kazeinin bir kısmı üretimde kullanılan enzimler ve mikroorganizmaların etkisi ile parçalanıp proteoz-pepton, amino asitler gibi suda çözönen maddeler haline dönüştür. Olgunlaşma süresince protein parçalanması devam eder ve ortamda oluşan serbest amino asitler ve peptitlerin miktarı artar (Öner, 2015). Bu çalışmada peynirlerden elde edilen SÇE örnekleri 3.2.8’de belirtildiğı üzere biyoaktivite analizlerinde kullanılmak üzere tekrar çözödürölmüştür. Tekrar çözödürölen ekstraktların protein içeriğı BCA Kit Assay ile belirlenmiş ve protein içeriğı sonuçları Çizelge 4.40. ve Şekil 4.33.’de verilmiştir. SÇE örneklerine ait protein değerleri üzerinde süttün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.41.’de verilmiştir. Olgunlaşma süresince peynir örneklerinden elde edilen SÇE örneklerine ait protein içeriğı 1,27 – 2,80 mg/mL arasında değiştığı belirlenmiştir.

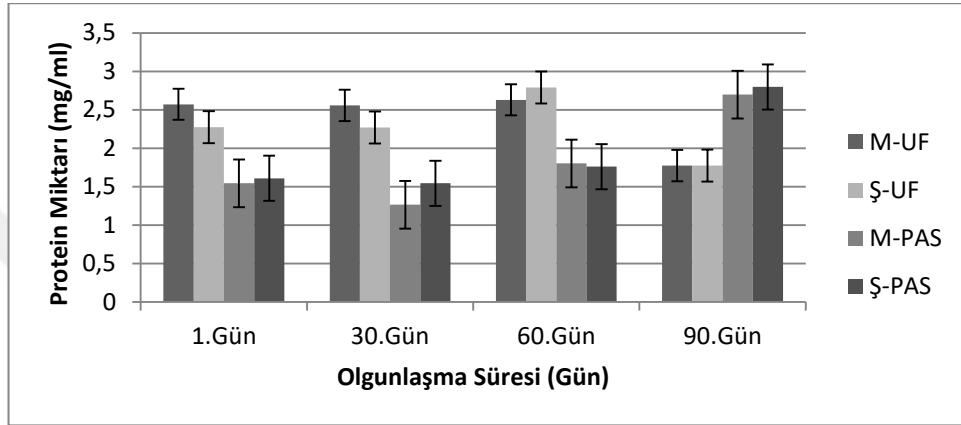
Çizelge 4.40. SÇE örneklerine ait protein içeriğı (mg/mL)

| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                |                         |                         |                         |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                      | M-UF                    | Ş-UF                    | M-PAS                   | Ş-PAS                   |
| <b>1.gün</b>         | 2,57±0,16 <sup>Aa</sup> | 2,27±0,03 <sup>Ba</sup> | 1,54±0,04 <sup>Cb</sup> | 1,61±0,07 <sup>Bb</sup> |
| <b>30.gün</b>        | 2,56±0,09 <sup>Aa</sup> | 2,27±0,05 <sup>Ba</sup> | 1,27±0,01 <sup>Db</sup> | 1,54±0,05 <sup>Bb</sup> |
| <b>60.gün</b>        | 2,63±0,01 <sup>Ab</sup> | 2,79±0,00 <sup>Aa</sup> | 1,80±0,02 <sup>Bc</sup> | 1,76±0,04 <sup>Bc</sup> |
| <b>90.gün</b>        | 1,77±0,07 <sup>Bb</sup> | 1,77±0,06 <sup>Cb</sup> | 2,70±0,04 <sup>Aa</sup> | 2,80±0,10 <sup>Aa</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.41. SÇE örneklerine ait protein değerinin istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | F       | P            |
|----------------------|---------|--------------|
| Süt                  | 104,168 | <b>0,000</b> |
| Enzim                | 0,003   | 0,959        |
| Depolama             | 15,885  | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | 0,829   | 0,494        |
| Süt x Depolama       | 115,709 | <b>0,000</b> |
| Süt x Enzim          | 5,400   | <b>0,031</b> |



Şekil 4.33. SÇE örneklerine ait protein değerinin değişimi

SÇE örneklerine ait protein değeri Çizelge 4.40. ve Şekil 4.33.'de incelendiği üzere olgunlaşmanın 60. gününe kadar UF süttten üretilen Beyaz peynirlerde artış gözlenirken olgunlaşmanın sonunda azalış görülmektedir ( $p<0,05$ ). Pastörize süttten üretilen Beyaz peynirlerde ise 30. günde azalış gözlenirken, olgunlaşma süresi ilerledikçe artış olduğu görülmektedir ( $p<0,05$ ). Genel olarak, UF süttten üretilen Beyaz peynirlere ait SÇE'lerin protein değerinin, pastörize süttten üretilen Beyaz peynirlere göre daha yüksek olduğu görülürken olgunlaşma sonunda bu durumun tam tersi olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Çizelge 4.41.'de görüldüğü üzere peynirlerin SÇE örneklerine ait protein değeri üzerinde süt, depolama ve süt x depolama ile süt x enzim interaksiyonlarının etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Yağsız peyniraltı suyunun UF yöntemi ile konsantre edilmesi ile üretilen Ricotta peynirlerinde protein konsantrasyonunun artmasının moleküller arasındaki yakınlığın azalmasına ve gram protein başına daha az  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  miktarında

düşmesi ile ortamın iyonik gücünün değişmesine neden olduğu, bu faktörlerin de protein geri kazanımı ve Ricotta peyniri verimi üzerinde önemli bir etkisi bulunduğu bildirilmiştir (Salvatore vd., 2014). Bu bilgidan yola çıkılarak, UF sütten üretilen Beyaz peynirlerin yapısındaki moleküler yakınlığın az olması nedeniyle peptitlere ait kayıpların peynir kitlesinde daha az olduğu, pastörize sütten üretilen peynirlere oranla suda çözünebilen peptit moleküllerinin kitlede daha fazla oranda kalabildiği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada 3.2.5.'de anlatıldığı üzere peynir örneklerinden 90 günlük olgunlaşma süresi boyunca elde edilen <3kDa peptit ekstraktlarının BCA Kit Assay ile belirlenen protein değeri Çizelge 4.42. ve Şekil 4.34.'de verilmiştir. <3kDa peptit ekstraktlarının protein değeri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.43.'de verilmiştir. Olgunlaşma süresince peynir örneklerinden elde edilen <3kDa peptit ekstraktlarının protein değeri 0,54 – 2,21 mg/mL arasında değiştiği tespit edilmiştir.

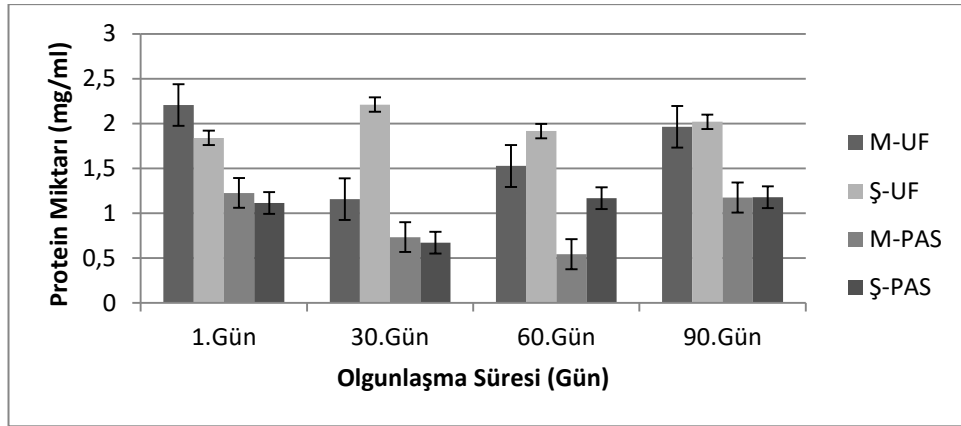
Çizelge 4.42. <3kDa peptit ekstraktlarına ait protein değeri (mg/mL)

| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                  |                         |                         |                         |
|----------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                      | M-UF                      | Ş-UF                    | M-PAS                   | Ş-PAS                   |
| <b>1.gün</b>         | 2,21±0,13 <sup>Aa</sup>   | 1,84±0,09 <sup>Aa</sup> | 1,23±0,03 <sup>Ab</sup> | 1,11±0,03 <sup>Ab</sup> |
| <b>30.gün</b>        | 1,16±0,12 <sup>Bb</sup>   | 2,21±0,04 <sup>Aa</sup> | 0,73±0,07 <sup>Bc</sup> | 0,67±0,03 <sup>Bc</sup> |
| <b>60.gün</b>        | 1,53±0,20 <sup>ABab</sup> | 1,92±0,04 <sup>Aa</sup> | 0,54±0,07 <sup>Bc</sup> | 1,17±0,10 <sup>Ab</sup> |
| <b>90.gün</b>        | 1,96±0,19 <sup>ABa</sup>  | 2,02±0,17 <sup>Aa</sup> | 1,17±0,06 <sup>Ab</sup> | 1,18±0,05 <sup>Ab</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.43. <3kDa peptit ekstraktlarına ait protein değerinin istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | F       | P            |
|----------------------|---------|--------------|
| Süt                  | 120,764 | <b>0,000</b> |
| Enzim                | 6,163   | <b>0,023</b> |
| Depolama             | 6,599   | <b>0,003</b> |
| Enzim x Depolama     | 5,279   | <b>0,008</b> |
| Süt x Depolama       | 0,201   | 0,894        |
| Süt x Enzim          | 1,122   | 0,303        |



Şekil 4.34. <3kDa peptit ekstraktlarına ait protein değerinin değişimi

<3kDa peptit ekstraktlarının protein değerinin, genel olarak SÇE örneklerinin protein değerinden daha düşük olduğu görülmüştür. Düşük molekül ağırlığındaki bu peptitlerin, suda çözünen peptitlerden miktar olarak daha düşük olması beklenen bir sonuçtur. SÇE örneklerinde gözlenen sonuca paralel olarak Çizelge 4.42. ve Şekil 4.34.'de incelendiği üzere, <3kDa ekstraktların protein değerinin UF süttten üretilen Beyaz peynirlerde, pastörize süttten üretilen Beyaz peynirlere göre daha yüksek değer gösterdiği belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Ancak SÇE'lerden farklı olarak, olgunlaşma sonunda da bu durumun <3kDa peptit ekstraktlarının protein değeri için değişmediği gözlenmiştir. Bu çalışmada 90 günlük olgunlaşma süresi sonunda, mikrobiyal enzimle üretilen peynirlere ait <3kDa peptit miktarlarının olgunlaşmanın başlangıcına göre azaldığı, şirden ile üretilen peynirlere ait sonuçların ise arttığı, ancak bu farklılıkların istatistiksel olarak önemli bulunmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ) Çizelge 4.43.'de görüldüğü üzere peynirlerin <3kDa peptit ekstraktlarının protein değeri üzerinde süt, depolama ve enzim ile birlikte enzim x depolama interaksiyonunun etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Olgunlaşma süresince <3kDa peptit ekstraktlarının protein değerinin dalgalı değerler gösterdiği belirlenmiştir. Bu dalgalanmaların bir nedeni olarak UF santrifüj tüplerinden gelen kayıplar ile ilgili olabildiği söylenebilir. Yapılan bir çalışmada, bazı peptitlerin UF santrifüj ile ayırma sırasında kaybolduğu öne sürülmüş ve bu sebeple peynir örnekleri arasında düşük molekül ağırlığındaki

peptit ekstraktlarının aktif peptit içeriğinin farklı olmasının  $IC_{50}$  değerlerine yansıdığı ifade edilmiştir (Qureshi vd., 2013).

Keçi ve inek sütünden yapılan Panela peynirlerinden elde edilen SÇE örneklerinin 28 gün boyunca peptit miktarı sırasıyla 0,16-0,24 ile 0,07-0,25 mg/mL arasında, 14. günde en yüksek peptit miktarının gözlemlendiği, 14. günden sonra azalış gösterdiği belirlenmiştir (López-Villafaña vd., 2023). Koyun sütünden üretilmiş farklı peynirler ile yapılan bir çalışmada, hayvansal kaynaklı rennet ile üretilen ve taze bir peynir olan Feta peynirinden elde edilen SÇE örneklerinin protein miktarı 6,5 mg/mL bulunurken, mikrobiyal enzimle üretilen ve 60 gün olgunlaştırılan Feta peynirinde ise 10,3 mg/mL olarak belirlenmiştir. Pecorino Sardo peynirlerinde olgunlaşma ilerledikçe azalış olduğunu gözlemlemiş ve bu azalışı farklı üretim partilerindeki varyasyonlarla veya serbest amino asitlerin aldehitler, alkoller, karboksilik asitler, esterler, metantiyol, tiyoesterler ve kükürt bileşikler gibi aroma bileşenlerine dönüştürülmesi ile açıklamışlardır (Meira vd., 2012).

Olgunlaşmanın başında pıhtıda tutulan kalıntı pıhtılaştırıcı enzimin aktivitesi ile birlikte plazmin ve birtakım sütün doğal proteolitik enzimleri tarafından kazeinlerin bir dizi büyük ve orta boy peptitlere hidrolize edildiğini, daha sonra LAB ve starter olmayan LAB (NSLAB) kaynaklı proteinazlar ve peptidazlar ile kısa peptitlere ve amino asitlere hidrolize edildiği belirtilerek peynirlerdeki proteoliz modeli McSweeney (2004) tarafından özetlenmiştir. UF süttten yardımcı kültür kullanılarak üretilen Feta peynirinden elde edilen SÇE'lerde, en yüksek antioksidan aktiviteyi gösteren grubun peptit içeriğinin 3,35 mg/mL olduğu, buna karşın kontrolün peptit içeriğini 2,10 mg/mL olduğu belirlenmiştir (Yousefi vd., 2021).

Farklı probiyotiklerin starter kültür ile birlikte Cheddar peynirlerinin üretiminde kullanıldığı çalışmalar sonucunda probiyotikler tarafından üretilen dipeptidaz, tripeptidaz, karboksipeptidaz, aminopeptidaz ve endopeptidaz gibi enzimlerin proteinleri daha fazla hidrolize ederek daha fazla polipeptit üretimine yol açtığı sonucuna varılmıştır (Gupta vd., 2009; Qu vd., 2018; Hao

vd., 2021). Pastörize manda sütünden üretilen Cheddar peynirlerinde SÇE'lerin protein değerinin 62 mg/mL olarak belirlendiği, örnekler arasında fark bulunmadığı bildirilmiştir (Silva vd., 2019). Ticari Cheddar peynirlerinde yapılan başka bir çalışmada, peynirlerden elde edilen 10 kDa'dan daha büyük peptitleri içeren ekstraktların peptit konsantrasyonu değerinin 10 - 59,8 mg/mL arasında bulunduğ u bildirilmiştir (Pritchard vd., 2010b).

Yapılan bir çalışmada, bazı geleneksel peynirlerden elde edilen >3kDa fraksiyonların protein değerinin, <3kDa fraksiyonların protein değerinden daha fazla olduğu belirlenmiştir. İnek peyniri için <3kDa fraksiyonun protein değeri %1,03, >3kDa fraksiyonun protein değeri %13,87 olarak belirlenmiştir (Turan, 2022). Asiago d'allev o peynirlerinde olgunlaşmanın 6. ayında <3kDa ekstraktlarında toplam peptit içeriğ i 4,6 mg/mL olarak bulunurken 12 ve 18 aylık ekstrakt örneklerinde toplam peptit içeriğ inin sırasıyla yaklaşık olarak 5 kat (22,2 mg/mL) ve 4 kat (18 mg/mL) arttığı tespit edilmiştir (Lignitto vd., 2010).

Bir diğ er çalışmada, 12 ay olgunlaştırılmış Parmigiano Reggiano peynirlerinden elde edilen <3kDa peptit ekstraktlarının protein değerinin 8,46 ile 21,55 mg/kg arasında değ iştiğ i bildirilmiştir. Bu protein değ eri sonuçlarının, daha kısa sürede olgunlaştırılmış peynirlerden elde edilen sonuçlara göre daha fazla olduğ u, bunun nedeninin 12 ay gibi uzun bir sürede peynirin olgunlaştırılması ve peynirde daha yüksek oranda gerçekleş en proteoliz olduğ u öne sürülmüştür (Basiricò vd., 2015). Farklı sürelerde olgunlaştırılmış ve telemesi pişirilmiş ve pişirilmemiş peynirler (Karish, Domiati, Ras, Feta-tip, Gouda, Edam) arasında telemesi pişirilmiş ve olgunlaştırılmış üç peynirden (Ras, Gouda ve Edam) elde edilen <3kDa peptit ekstraktlarında en yüksek miktarda peptit miktarına rastlanmıştır. Araştırmacılar ısı l işlem ve/veya olgunlaş ma ile düşük moleküler ağırlıklı peptitlerin miktarı arasında bir ilişki olduğ unu belirtmiştir (Helal ve Tagliazucchi, 2023).

#### 4.4. Peynir Örneklerinin Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

##### 4.4.1. Toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayısı

Bu çalışmada elde edilen mikrobiyolojik sayım sonuçları Çizelge 4.44 ve Şekil 4.35’de verilmiştir. TMAB sayısı üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.45.’de verilmiştir. Yapılan beyaz peynirlerde olgunlaşma boyunca meydana gelen TMAB sayısı 3,74 -6,89 log<sub>10</sub> KOB/ g arasında değişmiştir.

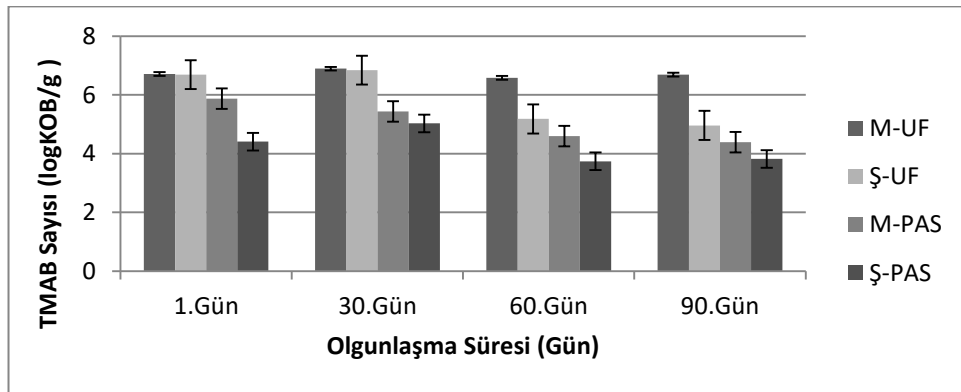
Çizelge 4.44. Peynir örneklerinin TMAB sayısı (log<sub>10</sub> KOB/ g)

| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                 |                           |                         |                          |
|----------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|
|                      | M-UF                     | Ş-UF                      | M-PAS                   | Ş-PAS                    |
| 1.gün                | 6,71±1,03 <sup>Aa</sup>  | 6,89±0,92 <sup>Aa</sup>   | 6,58±0,66 <sup>Aa</sup> | 6,69±0,73 <sup>Aa</sup>  |
| 30.gün               | 6,69±0,45 <sup>Aa</sup>  | 6,84±0,54 <sup>Aa</sup>   | 5,18±0,4 <sup>ABb</sup> | 4,96±0,5 <sup>Bb</sup>   |
| 60.gün               | 5,87±0,57 <sup>ABa</sup> | 5,44±0,38 <sup>BCab</sup> | 4,6±0,22 <sup>Bbc</sup> | 4,39±0,16 <sup>Bc</sup>  |
| 90.gün               | 4,41±1,24 <sup>Bb</sup>  | 5,03±0,43 <sup>Ca</sup>   | 3,74±1,12 <sup>Bc</sup> | 3,82±1,06 <sup>BCc</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.45. TMAB sayısının istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | F      | P            |
|----------------------|--------|--------------|
| Süt                  | 16,713 | <b>0,000</b> |
| Enzim                | 0,194  | 0,661        |
| Depolama             | 12,535 | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | 0,979  | 0,610        |
| Süt x Depolama       | 5,169  | <b>0,003</b> |
| Süt x Enzim          | 0,017  | 0,896        |



Şekil 4.35. Olgunlaşma süresince TMAB sayısının değişimi

Çizelge 4.44’de görüldüğü üzere tüm peynirlerde 90 günlük olgunlaşma süresi boyunca TMAB sayıları azalmış ve bu azalış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Pastörize sütün üretilen Beyaz peynirlerdeki azalış UF sütün yapılan Beyaz peynirdekine göre daha fazla gerçekleşmiştir ( $p<0.05$ ). Olgunlaşma sonunda mikrobiyal enzim ile pıhtılaştırılarak üretilen peynirlerin TMAB sayısının şirden ile üretilen peynirlere göre düşük olduğu ve bu farkın M-UF ve Ş-UF peynirleri arasında önemli olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ). Çizelge 4.45.’de görüldüğü üzere peynirlerin TMAB sayısı üzerinde süt, depolama ve süt x depolama interaksiyonunun etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Paksoy (2016), UF sütün yaptığı Beyaz peynirlerde olgunlaşmanın başında TMAB sayısının 3,49-3,53  $\log_{10}$  KOB/g olarak tespit etmiştir. Olgunlaşma süresi sonunda ise peynirlerde bu sayının düşüş gösterdiğini ve 2,32-2,94  $\log_{10}$  KOB/g olarak sayıldığını bildirmiştir. Çelebi (2011) tarafından yapılan çalışmada farklı pıhtılaştırıcı enzimler ile üretilen örgü peynirlerinde, 1. günde en yüksek TMAB sayısını mikrobiyal enzimle üretilen peynir örneğinde, olgunlaşma süreci sonunda ise en düşük değerin rekombinant kimozen ile üretilen peynir örneğinde olduğu bildirilmiştir.

Beyaz peynirlerde 90 günlük olgunlaşma süresi sonunda tüm peynir örneklerinde TMAB sayısının azaldığı, pastörize süt kullanılmasına rağmen peynirlerin TMAB arasındaki farklılığı, pastörizasyon sonrası kontaminasyon olması, çiğ sütün mikrobiyal ve sütte bulunan suşların termodurik olmasından kaynaklanabileceğini öne sürülmüştür (Ertürkmen vd., 2022). Arısoy ve Öner (2019) tarafından UF Beyaz peynirlerde yapılan çalışma sonucunda peynirlerin TMAB sayısının olgunlaşma süresi boyunca azaldığı, UF çiğ sütle yapılan peynir örneklerinde başlangıç mikroorganizma yükü çok yüksek olmasına rağmen olgunlaşma periyodunda önemli oranda azalma tespit edildiği bildirilmiştir.

Geleneksel İran peyniri olan Koopeh peynirinde yapılmış bir çalışmada piyasada satışı bulunan peynirlerden örnekler alınmış ve bunların TMAB sayısı ile birlikte maya ve küf sayısının  $1 \times 10^3$  KOB’dan fazla olduğu tespit edilmiştir (Banihashemi vd., 2020). Çiğ koyun ve inek sütünden üretilen peynirlerde

sırasıyla TMAB sayılarının 8,00 – 8,62- log KOB/ g ile 7,56 - 8,89 log KOB/g arasında değiştiği ve çalışmalarda olgunlaşma boyunca TMAB sayısının azaldığı bildirilmiştir (Kırmacı, 2010; Uğur ve Öner, 2018). Beyaz peynirlerde genel olarak olgunlaşma boyunca TMAB sayısının olgunlaşma süresine bağlı olarak azaldığı literatürde bildirilmiştir (Öner vd., 2006; Karahan vd., 2010; Ertürkmen, 2014; Öner, 2015; Fırıncioğulları, 2022).

#### 4.4.2. Koliform grubu bakteri sayısı

Bu çalışmada elde edilen mikrobiyolojik sayım sonuçları Çizelge 4.46 ve Şekil 4.36'da verilmiştir. Koliform grubu bakteri sayısı üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.47.'de verilmiştir. Yapılan beyaz peynirlerde olgunlaşma boyunca meydana gelen koliform grubu bakteri sayısı 0,50 – 1,74 log<sub>10</sub> KOB/ g arasında değişmiştir.

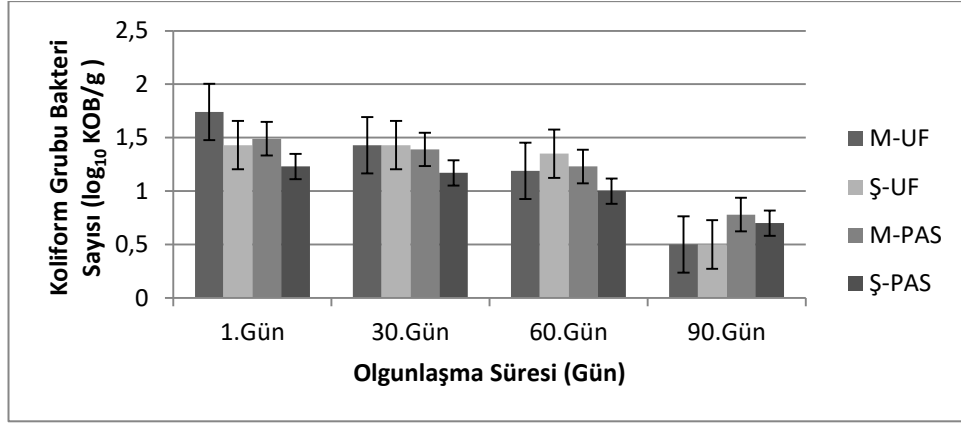
Çizelge 4.46. Koliform grubu bakteri sayısı (log<sub>10</sub> KOB/ g)

| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                 |                          |                          |                         |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
|                      | M-UF                     | Ş-UF                     | M-PAS                    | Ş-PAS                   |
| <b>1.gün</b>         | 1,74±1,29 <sup>Aa</sup>  | 1,43±1,12 <sup>Aab</sup> | 1,49±0,20 <sup>Aab</sup> | 1,23±0,81 <sup>Ab</sup> |
| <b>30.gün</b>        | 1,43±0,68 <sup>ABa</sup> | 1,43±1,08 <sup>Aa</sup>  | 1,39±0,39 <sup>Aa</sup>  | 1,17±0,15 <sup>Ab</sup> |
| <b>60.gün</b>        | 1,19±1,27 <sup>ABb</sup> | 1,35±1,02 <sup>Aa</sup>  | 1,23±0,74 <sup>ABa</sup> | 1,00±0,77 <sup>Ab</sup> |
| <b>90.gün</b>        | 0,50±0,50 <sup>Bb</sup>  | 0,50±0,50 <sup>Bb</sup>  | 0,78±0,15 <sup>Ba</sup>  | 0,70±0,20 <sup>Ba</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.47. Koliform grubu bakteri sayısının istatistiksel analizi

| Varyasyon Kaynakları | F     | P            |
|----------------------|-------|--------------|
| Süt                  | 0,841 | 0,364        |
| Enzim                | 0,447 | 0,507        |
| Depolama             | 3,058 | <b>0,036</b> |
| Enzim x Depolama     | 0,781 | 0,510        |
| Süt x Depolama       | 0,560 | 0,644        |
| Süt x Enzim          | 0,048 | 0,828        |



Şekil 4.36. Olgunlaşma süresince koliform grubu bakteri sayısının değişimi

Bu çalışmada üretilen peynirlerin hepsinde olgunlaşma boyunca koliform bakteri sayısında Çizelge 4.46 ve Şekil 4.36’da görüldüğü üzere azalma görülmüştür. UF sütten üretilen Beyaz peynirlerin olgunlaşma sonundaki koliform yükünün pastörize sütten yapılan Beyaz peynirlerden daha az olduğu görülmektedir ( $p<0,05$ ). Bu farklılığın Çizelge 4.6.’da verilen titrasyon asitliği değerleri de göz önünde bulundurulursa, peynirlerde gelişen asitliğe göre koliform yükünün etkilendiği sonucuna varılmaktadır. Çizelge 4.47.’de görüldüğü üzere peynirlerin koliform grubu bakteri sayısı üzerinde sadece depolamanın etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Kayagil (2006) tarafından üretilen Beyaz peynirlerde olgunlaşma süresi boyunca koliform bakteri tespit edilmediği bildirilirken Kılıç vd. (2009) tarafından üretilen Beyaz peynir örneklerinde tespit edilen koliform bakteri sayılarının peynir standartlarına göre kabul edilebilir değerler arasında olduğunu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Beyaz peynirde kolesterol asimilasyon yetenekleri belirlenmiş kültürlerin starter kültür olarak kullanıldığı bir çalışmada, kontrol grubu olarak ticari starter kültür ile üretilen peynirlerde olgunlaşma süresi sonunda koliform sayısının kontrol grubu peynirde daha düşük olduğu ve tüm gruplarda 1. günden 90. güne kadar azalma gerçekleştiği tespit edilmiştir (Fırıncioğulları, 2022). Beyaz peynirlerde olgunlaşma süresi boyunca koliform sayısının azalış gösterdiği literatürde yapılmış çalışmalarda bildirilmiştir (Yıldız, 2015; Uğur ve Öner; 2018; Öner ve Sarıdağ, 2019)

#### 4.4.3. Laktik asit bakterileri (LAB) sayımı

Bu çalışmada elde edilen mikrobiyolojik sayım sonuçları Çizelge 4.48 ve Şekil 4.37’de verilmiştir. Laktobasil sayısı üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.49.’da verilmiştir. Yapılan beyaz peynirlerde olgunlaşma boyunca meydana gelen laktobasil sayısı 3,36 – 6,95 log<sub>10</sub> KOB/ g arasında değişmiştir.

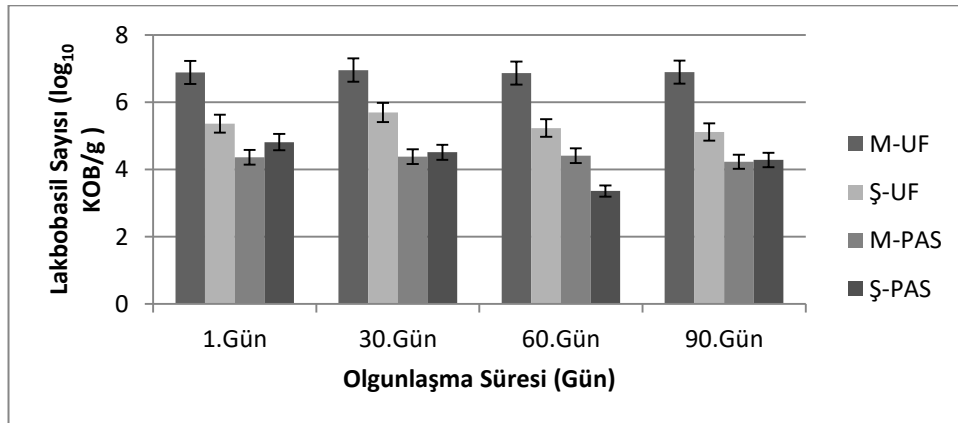
Çizelge 4.48. Peynir örneklerinin laktobasil sayısı (log<sub>10</sub> KOB/ g)

| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                 |                          |                          |                          |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                      | M-UF                     | Ş-UF                     | M-PAS                    | Ş-PAS                    |
| 1.gün                | 6,88±0,79 <sup>Aa</sup>  | 6,95±0,83 <sup>Aa</sup>  | 6,86±0,80 <sup>Aa</sup>  | 6,89±0,76 <sup>Aa</sup>  |
| 30.gün               | 5,36±0,36 <sup>ABa</sup> | 5,69±0,08 <sup>ABa</sup> | 5,23±0,41 <sup>ABa</sup> | 5,11±0,40 <sup>ABa</sup> |
| 60.gün               | 4,36±0,15 <sup>Ba</sup>  | 4,38±0,05 <sup>Ba</sup>  | 4,41±0,14 <sup>ABa</sup> | 4,23±0,15 <sup>Ba</sup>  |
| 90.gün               | 4,81±0,39 <sup>Ba</sup>  | 4,51±0,38 <sup>Ba</sup>  | 3,36±0,48 <sup>Bb</sup>  | 4,28±0,67 <sup>Ba</sup>  |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.49. Laktobasil sayısının istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | F      | P            |
|----------------------|--------|--------------|
| Süt                  | 1,762  | 0,200        |
| Enzim                | 0,155  | 0,698        |
| Depolama             | 25,882 | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | 0,110  | 0,953        |
| Süt x Depolama       | 0,607  | 0,618        |
| Süt x Enzim          | 0,080  | 0,780        |



Şekil 4.37. Olgunlaşma süresince laktobasil sayısının değişimi

Peynir örneklerine ait laktobasil sayısı Çizelge 4.48 ve Şekil 4.37’de görüldüğü üzere olgunlaşma süresi boyunca düzenli azalış göstermiştir. Olgunlaşmanın başına göre laktobasil sayısında gözlenen azalış olgunlaşma sonunda önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Olgunlaşma süresi boyunca peynir örnekleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ( $p>0,05$ ). Olgunlaşma sonunda ise en düşük laktobasil sayısının  $3,36 \log_{10}$  KOB/g ile M-PAS peynirine ve  $4,81 \log_{10}$  KOB/g ile M-UF peynirine ait olduğu belirlenmiştir. Bu iki peynir arasındaki farklılığın istatistiksel olarak önemli olduğu gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Çizelge 4.49.’da görüldüğü üzere peynirlerin laktobasil sayısı üzerinde sadece depolamanın etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Bu çalışmada elde edilen laktokok sayım sonuçları Çizelge 4.50 ve Şekil 4.38’de verilmiştir. Laktokok sayısı üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.51.’de verilmiştir. Yapılan beyaz peynirlerde olgunlaşma boyunca meydana gelen laktokok sayısı  $3,17 - 6,93 \log_{10}$  KOB/ g arasında değişmiştir.

Çizelge 4.50. Peynir örneklerinin laktokok sayısı ( $\log_{10}$  KOB/ g)

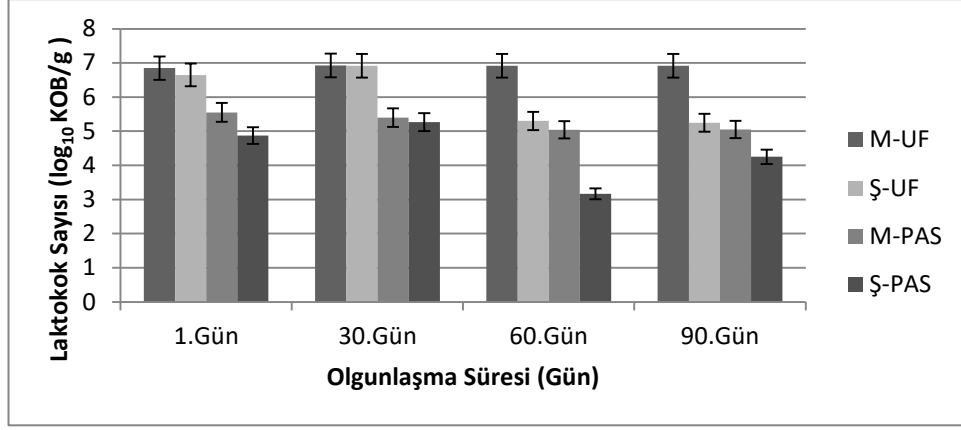
| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER              |                      |                       |                       |
|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                      | M-UF                  | Ş-UF                 | M-PAS                 | Ş-PAS                 |
| <b>1.gün</b>         | $6,85 \pm 0,85^{Aa}$  | $6,93 \pm 0,91^{Aa}$ | $6,92 \pm 0,88^{Aa}$  | $6,92 \pm 0,95^{Aa}$  |
| <b>30.gün</b>        | $6,65 \pm 0,48^{Aa}$  | $6,92 \pm 0,62^{Aa}$ | $5,30 \pm 0,20^{ABb}$ | $5,25 \pm 0,05^{ABb}$ |
| <b>60.gün</b>        | $5,55 \pm 0,04^{ABa}$ | $5,40 \pm 0,27^{Ba}$ | $5,04 \pm 0,24^{ABa}$ | $5,05 \pm 0,48^{ABa}$ |
| <b>90.gün</b>        | $4,87 \pm 0,57^{Bab}$ | $5,27 \pm 0,18^{Ba}$ | $3,17 \pm 0,13^{Bb}$  | $4,25 \pm 0,63^{Bab}$ |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir ( $p<0,05$ )

a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir ( $p<0,05$ )

Çizelge 4.51. Laktokok sayısının istatistiksel analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | F      | P            |
|----------------------|--------|--------------|
| Süt                  | 9,884  | <b>0,005</b> |
| Enzim                | 0,625  | 0,439        |
| Depolama             | 17,053 | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | 0,486  | 0,696        |
| Süt x Depolama       | 2,031  | 0,144        |
| Süt x Enzim          | 0,045  | 0,834        |



Şekil 4.38. Olgunlaşma süresince laktokok sayısının değişimi

Peynir örneklerine ait laktokok sayısı Çizelge 4.50 ve Şekil 4.38’de görüldüğü üzere olgunlaşma süresi boyunca düzenli azalış göstermiş ve olgunlaşma sonunda bu azalış önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Olgunlaşmanın 30. ve 90. günleri dışında peynirler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ( $p>0,05$ ). Olgunlaşma sonunda ise en düşük laktokok sayısının 3,17  $\log_{10}$  KOB/g ile M-PAS peynirine ait olduğu, 5,27  $\log_{10}$  KOB/g ile Ş-UF peynirine ait olduğu ve bu iki peynir arasındaki farklılığın istatistiksel olarak önemli olduğu gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Çizelge 4.51.’de görüldüğü üzere peynirlerin laktokok sayısı üzerinde süt ve depolamanın etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Farklı kaynaklardan elde edilen enzimler ile üretilen Beyaz peynirlerde olgunlaşmanın 0. ve 30. gününde laktobasil sayıları arasındaki farkın önemsiz bulunduğu, olgunlaşmanın 60. ve 90. gününde ise peynirler arasındaki laktobasil sayısının önemli bulunduğu, ancak olgunlaşma boyunca bitkisel enzimle üretilen peynirin laktobasil sayılarının önemli bir değişiklik göstermediği bildirilmiştir. Laktokok sayılarında ise olgunlaşmanın 60. günü dışında peynir örnekleri arasındaki laktokok sayısı farklılığının önemli bulunduğu belirtilmiştir. Olgunlaşma boyunca en yüksek laktobasil ve laktokok sayıları olgunlaşmanın başında tespit edilmiştir (Ertürkmen vd., 2022).

Beyaz peynirlerde yapılan bir çalışmada laktokok ve laktobasil sayısının zamana bağlı azalış gösterdiği, laktokok sayısının laktobasil ve TMAB sayısından biraz

daha yüksek olduğu ve çiğ süttten üretilen peynirler üzerinde yapılan diğer çalışmalara göre olgunlaşmanın erken aşamalarında laktokokların baskın olduğu belirlenmiştir (Öner vd., 2006). Coeuret ve Dubernet (2003) yaptıkları çalışmada Emmental peynirlerde laktobasillerin olgunlaşma süresince su aktivitesi, tuza karşı olan duyarlılıkları ve türlerin otoliz gücüne bağlı olarak miktarlarında hızlı bir azalma olduğunu belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada da Beyaz peynirlerde olgunlaşma boyunca laktobasil sayılarının azalış gösterdiği, bu azalışın bakteri lizisi ve hücre ölümleri ile açıklanabileceği ve bakteri gelişimi üzerinde sıcaklığın etkili olduğu vurgulanmıştır (Şahingil, 2012).

Eghbalian (2017), tarafından, *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* içeren CR-319 ticari kültürün tam yağlı UF Beyaz peynirin üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmada 120 günlük olgunlaşma sonunda peynirlerde laktobasil ve laktokok sayısında azalma olduğu, yardımcı kültür ilavesinin LAB sayısı üzerinde etkili olduğu saptanmıştır Beyaz peynirde kolesterol asimilasyon yetenekleri belirlenmiş kültürlerin starter kültür olarak kullanıldığı bir çalışmada ticari starter kültür ile üretilen peynir grubunda (kontrol) peynir örneklerinin laktobasil sayılarının diğer peynir gruplarına kıyasla olgunlaşma süresince azalma eğilimi gösterdiği belirlenirken laktokok değerine göre peynirler arasında farklılık gözlenmediği ve sürenin sadece kontrol grubu üzerinde istatistiksel düzeyde önemli olduğu belirlenmiştir (Fırıncıoğulları, 2022). Keçi sütünden üretilen Beyaz peynirlerde yardımcı kültürün etkisinin araştırıldığı çalışmada laktobasil sayısında görülen değişimlerin kullanılan yardımcı kültüre göre değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir (Kocak vd., 2020).

Keçi sütünden üretilen Beyaz peynirinde olgunlaşmanın 0. ve 180. günlerinde sırasıyla 6,88 log KOB/g- 6,77 log KOB/g laktobasil sayısı olduğu bildirilmiştir. (Öner ve Sarıdağ, 2019). Karahan vd. (2010) tarafından inek Beyaz peynirinde yapılan çalışmada ise 90 günlük depolama süresinin sonunda laktobasil sayısının 5,90-7,81 log KOB/g'dan 7,53- 8,84 log kob/g'a yükseldiği bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre bu çalışmada olgunlaşma sonunda belirlenen laktobasil sayısının daha düşük olduğu görülmektedir. Genel olarak Beyaz peynirlerde LAB sayıları üzerinde yapılmış çalışmalarda olgunlaşma süresinin

peynirler üzerine etkili olduğu belirlenmiştir. Literatürde olgunlaşma sonunda, başlangıç değerine göre azalış gösterdiği bildirilen çalışmalar mevcuttur ve bu değişimler bu çalışmadaki veriler ile paralellik göstermektedir (Kılıç vd., 2009; Öner, 2015).

#### 4.5. SÇE Örneklerinin Biyoaktif Özelliklerine Ait Sonuçlar

##### 4.5.1. SÇE örneklerinin ACE-inhibitör aktivitesi

Biyoaktif peptitler arasında süt proteinleri kaynaklı, kan basıncını düşürücü etki gösteren ACE-inhibitör peptitlerin, peynirlerde açığa çıkmasında rennet bir potansiyel olarak görülmektedir. Ayrıca bu peptitlerin oluşumunda süte uygulanan ön işlemler, starter ve starter olmayan LAB, olgunlaşma şartları ve süresi, peynirin tipi, protein miktarı, probiyotik bakterinin yardımcı kültür olarak kullanılması ve paketlenme şekli gibi birçok faktör etkilidir (Bütikofer vd., 2008; Erkaya ve Şengül, 2015). Bu çalışmada elde edilen SÇE örneklerinin 90 günlük olgunlaşma sırasında ACE-inhibitör aktivite sonuçları Çizelge 4.52 ve Şekil 4.39'da verilmiştir. SÇE örneklerinin ACE-inhibitör aktivite değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.53.'de verilmiştir. SÇE örneklerinde belirlenen ACE-inhibitör aktivite sonuçları 90 günlük olgunlaşma süresince %19,95 – 71,36 arasında değişmiştir.

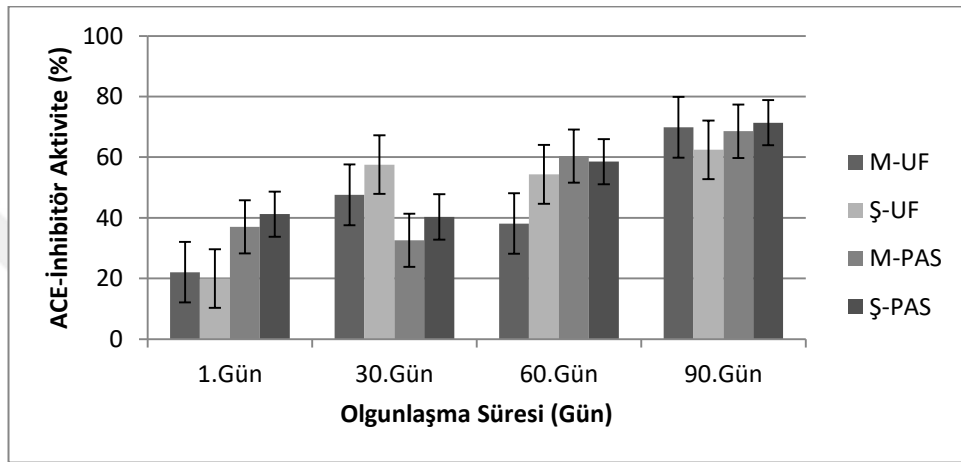
Çizelge 4.52. SÇE örneklerine ait ACE-inhibitör aktivite değerleri (%)

| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                  |                          |                          |                           |
|----------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
|                      | M-UF                      | Ş-UF                     | M-PAS                    | Ş-PAS                     |
| <b>1.gün</b>         | 22,04±0,19 <sup>Dc</sup>  | 19,95±0,34 <sup>Dd</sup> | 36,99±0,19 <sup>Cb</sup> | 41,21±0,24 <sup>Ca</sup>  |
| <b>30.gün</b>        | 47,57±0,19 <sup>Bb</sup>  | 57,52±0,24 <sup>Ba</sup> | 32,55±2,67 <sup>Cc</sup> | 40,28±0,16 <sup>Cbc</sup> |
| <b>60.gün</b>        | 38,12±0,39 <sup>Cd</sup>  | 54,35±0,19 <sup>Cc</sup> | 60,37±0,29 <sup>Ba</sup> | 58,53±0,26 <sup>Bb</sup>  |
| <b>90.gün</b>        | 69,86±0,24 <sup>Aab</sup> | 62,43±0,29 <sup>Ac</sup> | 68,54±0,39 <sup>Ab</sup> | 71,36±0,58 <sup>Aa</sup>  |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.53. SÇE örneklerine ait ACE-inhibitör aktivite değerlerinin istatistiksel analizi

| Varyasyon Kaynakları | F       | P            |
|----------------------|---------|--------------|
| Süt                  | 13,912  | <b>0,001</b> |
| Enzim                | 7,870   | <b>0,011</b> |
| Depolama             | 150,719 | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | 3,924   | <b>0,025</b> |
| Süt x Depolama       | 33,659  | <b>0,000</b> |
| Süt x Enzim          | 0,174   | 0,681        |



Şekil 4.39. SÇE örneklerinin ACE-inhibitör aktivitesinin değişimi

Çizelge 4.52.'de ve Şekil 4.39.'de görüldüğü üzere SÇE örneklerinin ACE-inhibitör aktivitesinde olgunlaşma boyunca artış ve azalışlar görülürken olgunlaşma sonunda tüm peynirlerde artış olduğu görülmektedir. UF süttten yapılan peynirlere ait SÇE örneklerinin ACE-inhibitör değerlerinin 30. günde artış gösterirken 60. günde azalış gösterdiği, pastörize süttten yapılan peynirlere ait SÇE örneklerinde ise tam tersi bir durum olduğu gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Bu durum peynirlerde proteolize bağlı olarak oluşan SÇE'lerin UF süt ve pastörize sütte farklı nitelikler sergilediğini göstermektedir. Olgunlaşmaya bağlı olarak 90. günde ise tüm peynirlerde artış olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ).

Olgunlaşmanın başında tüm peynirlere ait SÇE örneklerinin ACE-inhibitör aktivitesinin birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Olgunlaşmanın sonunda ise M-UF ve M-PAS peynirlerinin arasındaki farklılık önemli bulunmazken ( $p>0,05$ ), Ş-UF ve Ş-PAS peynirleri arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Olgunlaşmanın hem başında hem de sonunda en düşük

ACE-inhibitör aktivite değerinin Ş-UF peynirinde olduğu görülürken, en yüksek değerin Ş-PAS peynirinde olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Bu sonuç, şirden mayasının oluşan peptitlerin biyoaktivitesinde UF süt ve pastörize süte göre önemli farklılıklara yol açtığını göstermektedir. Çizelge 4.53.'de görüldüğü üzere peynirlerin SÇE örneklerinin 90 günlük olgunlaşma süresince ACE-inhibitör aktivitesi üzerinde süt, enzim, depolama ve enzim x depolama ile süt x depolama interaksiyonlarının etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

ACE-inhibitör peptitler, kullanılan starter tipine ve olgunlaşma durumuna göre farklılık gösteren çeşitli peynir türlerinde bildirilmiştir. Süt ürününün türü, süte uygulanan ön işlemler, uyarlanan teknoloji, proteolizin özgülüğüne dayalı suş seçimi, haşlama, olgunlaşma süresi ve koşulları gibi faktörler de yer almaktadır (Bütikofer vd., 2008; Gupta vd., 2009; Meyer vd., 2009; Meira vd., 2012; Uluko vd., 2013). Yapılan bir çalışmada Cheddar peyniri üretiminde uygulanan farklı süt işleme yöntemlerinin (sonikasyon, mikrodalga ve yüksek basınç uygulamaları), peynirde gerçekleşen proteoliz üzerinde proteolitik enzimlerin duyarlılığını arttırdığı, bunun sonucunda ACE-inhibitör aktivite gösteren peptit oluşumuna da katkı sağladığı bildirilmiştir (Munir vd., 2020). Koyun sütlerinden üretilen farklı peynirler ile yapılan bir çalışmada, hayvansal kaynaklı rennet ile üretilen taze bir peynir olan Feta peynirinde, çalışmadaki diğer peynirlere göre daha düşük ACE-inhibitör aktivitenin (%46,45) görüldüğü, mikrobiyal enzimle üretilen ve 60 gün olgunlaştırılan Feta peynirinin ise %70'in üzerinde ACE-inhibitör aktivite sergilediği belirlenmiştir (Meira vd., 2012). Domiati peyniri üretiminde rennete ilave olarak farklı miktarlarda eklenen Neutrase enzimin miktarı arttıkça peynirin SÇE örneklerinde ACE-inhibitör aktivitenin de arttığı, SÇE'nin biyoaktif özelliklerinin peynir olgunlaştırma için kullanılan Neutrase enziminin miktarı ile doğru orantılı olduğu öne sürülmüştür (Taha vd., 2020).

ACE inhibitör aktivitenin proteoliz derecesine bağlı olduğu, artan proteolize göre mevcut ACE inhibitör peptitlerin proteolitik olarak bozulabileceği, peptitlerin daha düşük aktiviteye sahip amino asitlere parçalanmasıyla aktivitede azalış olabileceği literatürde bildirilmiştir (Pripp vd., 2006; Ong vd.

2007; Meira vd., 2012; Gupta vd., 2013; Gonzalez-Gonzalez vd., 2019). Kocak vd. (2020), Beyaz peynirlerde olgunlaşmanın 60. gününe kadar ACE-inhibitör aktivitenin arttığını ve 60. günde en yüksek seviyeye (%51,95) ulaştığını, ardından ilerleyen proteolize bağlı olarak azaldığını bildirmişlerdir. Cheddar peynirinin olgunlaşma süresinde ACE-inhibitör aktivitesinin özellikle ilk 6 haftada hızlı bir biçimde yükseldiği, 24. haftada en yüksek değere ulaştığı ve ardından aktivitede azalma gözlemlendiği bildirilmiştir. Olgunlaşma sırasında ACE-inhibitör aktivite maksimum seviyeye ulaştıktan sonra peynirde devam etmekte olan proteoliz sonucunda ACE-inhibitör etkili peptitlerin de hidrolize olarak parçalandığı ve buna bağlı olarak aktivite azalma olduğu sonucuna varılmıştır (Ong ve Shah, 2008a). Bir başka çalışmada probiyotik Cheddar peynirleri 36 haftalık olgunlaşmaya bırakılmış ve olgunlaşmanın ilk 12 haftasında ACE-inhibitör aktivitenin önemli ölçüde arttığı, bu aktivitenin 24 hafta boyunca tüm peynirlerde artmaya devam ettiği, bu süreden sonra stabilize olduğu çalışma sonucunda bildirilmiştir (Ong vd., 2007). Chihuahua, Ranchero ve Cotija peynirlerinden elde edilen SÇE örneklerinin 90 günlük olgunlaşma sırasında, ACE-inhibisyonu, 60. günden sonra proteolize bağlı olarak önemli ölçüde azaldığı Ramos vd. (2022) tarafından bildirilmiştir.

Diğer taraftan, olgunlaşma süresince ilerleyen proteoliz ile proteinlerin veya polipeptitlerin parçalanması ve ACE-inhibitör aktiviteye sahip yeni peptitlerin açığa çıkması ile aktivitede artışların görüldüğü yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Gómez-Ruiz vd., 2006; Ong ve Shah, 2008b; Sahingil vd., 2019; Garbowska vd., 2020). İnek, koyun ve keçi sütlerinden yapılmış Edirne beyaz peynirlerinden 180 günlük depolama süresi boyunca elde edilen SÇE örneklerinin ACE-inhibitör aktivitesi olgunlaşma süresinin başında %36,47 – 50,73 olarak belirlenirken, olgunlaşma süresinin sonunda %63,70 – 70,39 olarak belirlenmiştir.

Koyun ve inek sütünden üretilen peynirlerin ACE-inhibitör aktivitesinin olgunlaşmanın 150.gününe kadar, keçi sütünden üretilen peynirin ACE-inhibitör aktivitesinin ise olgunlaşmanın 90. gününe kadar artış gösterdiği tespit edilmiştir (Demir, 2021). Manda ve inek sütünden üretilmiş iki farklı Cheddar

peynirinden elde edilen SÇE örneklerinin ACE-inhibitör aktivitelerinin 180. gün sonunda en yüksek seviyeye ulaştığı ve sırasıyla bu değerlerin %86,59 ve %82,86 olduğu (Rafiq vd., 2017).

Beyaz peynirde olgunlaşma süresi ile birlikte sıcaklığın artmasının peynirlerde proteoliz düzeylerini arttırdığı, buna bağlı olarak ACE-inhibitör aktivitenin de arttığı bildirilmiştir (Şahingil vd., 2014). Probiyotik Beyaz peynirlerde olgunlaşmanın 60. ve 120. günlerinde hem vakum ambalajda hem de salamurada olgunlaşmış örnekler için ACE-inhibitör aktivitenin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Erkaya, 2014). Yapılan bir çalışmada olgunlaşma süresi ve yardımcı kültür kullanımının ACE-inhibitör aktivite üzerinde etkisi önemli bulunurken tuz seviyesinin etkisi önemsiz bulunmuştur (Baptista vd., 2020).

#### 4.5.2. SÇE örneklerinin DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesi

Bu çalışmada elde edilen SÇE örneklerinin 90 günlük olgunlaşma sırasında DPPH antioksidan aktivitesi sonuçları Çizelge 4.54 ve Şekil 4.40'da verilmiştir. SÇE örneklerinin DPPH antioksidan aktivitesi üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.55.'de verilmiştir. SÇE örneklerinde belirlenen DPPH antioksidan aktivitesi sonuçları 90 günlük olgunlaşma süresince %19,49 – 32,93 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.54. SÇE örneklerine ait DPPH antioksidan aktivite değerleri (%)

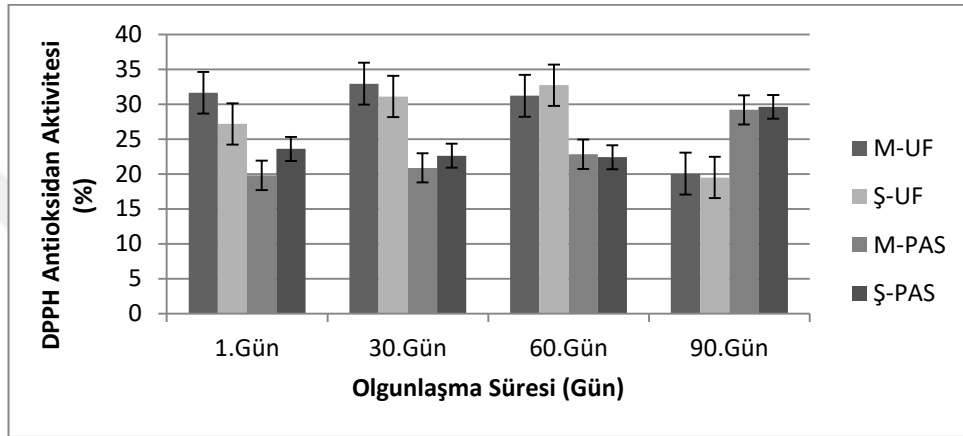
| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                 |                          |                          |                          |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                      | M-UF                     | Ş-UF                     | M-PAS                    | Ş-PAS                    |
| 1.gün                | 31,63±0,11 <sup>Aa</sup> | 27,17±0,22 <sup>Bb</sup> | 19,78±0,22 <sup>Cd</sup> | 23,59±0,33 <sup>Bc</sup> |
| 30.gün               | 32,93±0,11 <sup>Aa</sup> | 31,09±0,22 <sup>Ab</sup> | 20,87±0,22 <sup>Cd</sup> | 22,61±0,22 <sup>Bc</sup> |
| 60.gün               | 31,20±0,76 <sup>Aa</sup> | 32,72±0,54 <sup>Aa</sup> | 22,83±0,22 <sup>Bb</sup> | 22,39±0,22 <sup>Bb</sup> |
| 90.gün               | 20,04±0,22 <sup>Bb</sup> | 19,49±0,33 <sup>Cb</sup> | 29,18±0,22 <sup>Aa</sup> | 29,62±0,22 <sup>Aa</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.55. SÇE örneklerine ait DPPH antioksidan aktivite değerlerinin istatistiksel analizi

| Varyasyon Kaynakları | F       | P            |
|----------------------|---------|--------------|
| Süt                  | 95,052  | <b>0,000</b> |
| Enzim                | 0,003   | 0,953        |
| Depolama             | 7,454   | <b>0,002</b> |
| Enzim x Depolama     | 0,164   | 0,919        |
| Süt x Depolama       | 107,904 | <b>0,000</b> |
| Süt x Enzim          | 8,996   | <b>0,007</b> |



Şekil 4.40. SÇE örneklerinin DPPH antioksidan aktivitesinin değişimi

Çizelge 4.54. ve Şekil 4.40.'da görüldüğü üzere olgunlaşma süresince UF süttten üretilen Beyaz peynirlerden elde edilen SÇE örneklerinin DPPH antioksidan aktivitesinin pastörize süttten üretilen peynirlerden elde edilen SÇE örneklerinden daha yüksek olduğu gözlenirken ( $p < 0,05$ ), olgunlaşma süresinin sonunda bu durumun tam tersi olduğu görülmektedir ( $p < 0,05$ ). UF süttten üretilen Beyaz peynirlere ait SÇE örneklerinin DPPH antioksidan aktivitesinin olgunlaşma sonundaki azalışı istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). M-PAS peynirinin DPPH antioksidan aktivitesinin olgunlaşma süresince arttığı gözlenirken, Ş-PAS peynirinin olgunlaşma sonundaki artışı önemli görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Olgunlaşmanın başında en yüksek değeri M-UF peyniri gösterirken, en düşük değeri M-PAS peynirinin gösterdiği belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Olgunlaşmanın sonunda ise en yüksek değeri Ş-PAS peyniri gösterirken, en düşük değeri Ş-UF peynirinin gösterdiği belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Çizelge 4.55.'de görüldüğü üzere peynirlerin SÇE örneklerinin DPPH antioksidan aktivitesi

sonuçları üzerinde 90 günlük olgunlaşma süresince süt, depolama ve süt x depolama ile süt x enzim interaksiyonlarının etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Bu çalışmada SÇE örneklerine ait DPPH antioksidan aktivitenin olgunlaşma sonundaki değişiminin, 4.3.5.'de incelendiği üzere ekstraktların protein değerindeki değişimler ile paralellik gösterdiği anlaşılmıştır. Olgunlaşma sonunda M-UF ve Ş-UF peynirlerine ait SÇE örneklerinin protein değeri azalırken DPPH antioksidan aktivitesinin de azaldığı, tam tersi olarak M-PAS ve Ş-PAS peynirlerine ait SÇE örneklerinin protein değerine paralel olarak DPPH antioksidan aktivitesinin de arttığı görülmüştür. Bu sonuca göre DPPH antioksidan aktivitesinin peptit konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuca benzer olarak Gupta vd. (2009) tarafından yapılan çalışma sonucunda da antioksidan aktivitedeki değişimlerin çözünür peptitlerin oluşma oranı (proteoliz durumu) ile benzer olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca araştırmacılar peynirin antioksidan aktivitesinin bir dereceye kadar proteolizden etkilendiğini öne sürmüşlerdir (Gupta vd., 2009; Chen vd., 2019). Manda sütünden üretilen taze peynir SÇE'lerin antioksidan aktivitesinin tüm örneklerde %42'nin üzerinde bulunduğu bildirilmiştir. Maksimum peptit konsantrasyonunda (20 mg/mL) yaklaşık %78 ile %80'e ulaşan antioksidan aktivitesi ile SÇE örneklerinin antioksidan potansiyelinin orantılı olduğu öne sürülmüştür (Silva vd., 2019).

Literatürde peptitlerin antioksidan aktivitesinin peynir yapımında kullanılan sütün kaynağından, uygulanan işlemlerden ve peynirin olgunlaşma süresinden etkilendiği bildirilmiştir (Silva vd., 2006; Gupta vd., 2009; Öztürk ve Akın, 2018; Boran, 2021). Çiğ süte uygulanan sonikasyon, yüksek basınç, mikrodalga gibi farklı teknolojik yöntemlerin, yüksek sıcaklık-kısa süre (HTST) gibi ısıl yöntemlere kıyasla sütte biyoaktif peptit oluşumunu teşvik ettiği ve biyoaktif bileşiklerin oluşumunun kullanılan teknoloji ile yakından ilişkili olduğu literatürde belirtilmiştir (Munir vd., 2020; Scudino vd., 2023). Rennete ilave olarak Neutrase farklı miktarda ilave edilmesi ile üretilen Domiati peynirinden elde edilen SÇE örneklerinin antioksidan aktivitesinin kontrol peynirinde ve

yüksek miktarda Neutrase enzimi kullanılan peynirde 45. güne kadar artışın olduğu, 90. günde ise düşüş gösterdiği, düşük miktarda Neutrase ilave edilen peynirin antioksidan aktivitesinin olgunlaşma sonuna kadar sürekli bir azalış gösterdiği tespit edilmiştir (Taha vd., 2020).

UF süte yardımcı kültürün katılması ile üretilen peynirlerde SÇE örneklerinin antioksidan aktivitesinin olgunlaşma ilerledikçe azaldığı gözlenmiş ve bu durum peynirdeki antioksidan özelliklerden sorumlu peptitlerin ikincil proteolize dirençli olmaması ile açıklanmıştır (Moghaddaskia vd., 2018; Yousefi vd., 2021). Bir başka çalışmada, probiyotik Beyaz peynirlerde olgunlaşmanın 60. gününde antioksidan aktivite değerlerinin arttığı (%10,38), 120. gününde ise bu değerlerin azaldığı (%5,10), ek kültür kullanımının farklılığa neden olduğu bildirilmiştir (Erkaya, 2014).

İnek, koyun ve keçi sütlerinden yapılmış Edirne Beyaz peynirlerinin olgunlaşma süresinin başında antioksidan değerlerinin %6,74-8,24 arasında değiştiği belirlenirken olgunlaşmanın sonunda %20,68-31,91 arasında değiştiği bildirilmiştir (Demir, 2021). Koçak (2017) tarafından yapılan çalışmada keçi sütünden üretilen Beyaz peynirde olgunlaşmanın 60. gününe kadar peynirlerin antioksidan aktivitelerinde artış olduğu, 60. günden itibaren ise düşüş olduğu saptanmıştır. Bu çalışmadaki UF süten üretilen peynirler ile bu sonuç benzerlik gösterirken, pastörize süten üretilen Beyaz peynirlerde benzerlik göstermemektedir.

Yapılan bir çalışmada inek sütünden üretilen Beyaz peynirde antioksidan değerinin olgunlaşmanın 60. gününe kadar arttığı, fakat daha sonra olgunlaşma sonu olan 120.güne kadar düştüğü bildirilmiştir.(Erkaya ve Şengül, 2015). Bu azalışlar olgunlaşma sırasında gerçekleşen proteoliz nedeniyle peptitlerin yapısının bozulması ile açıklanmış ve antioksidan peptitlerin proteolize karşı direnç göstermediği öne sürülmüştür (Gupta vd., 2009; Kocak vd., 2020; Taha vd., 2020; Demir, 2021).

Chihuahua, Ranchero ve Cotija peynirlerinden elde edilen SÇE örneklerinin antioksidan aktivitesi değerlerinin, olgunlaşmanın 60. gününe kadar önemli ölçüde azaldığı görülmüş, 90. günde ise SÇE örneklerin antioksidan aktivitesinin %9,09 oranında arttığı bildirilmiştir (Ramos vd., 2022). Bir başka çalışmada, Cottage peynirinin SÇE örneklerinde antioksidan aktivitenin olgunlaşma süresince arttığı bildirilmiştir (Abadia-Garcia vd., 2013).

Keçi sütünde bulunan fazla miktardaki hidrofilik peptitler nedeniyle keçi Tulum peynirlerinden elde edilen SÇE örneklerinin antioksidan aktivitesinin fazla olduğu Öztürk ve Akın (2018) tarafından öne sürülmüştür. Mushtaq vd. (2015), keçi sütünden üretilen peynirlerin antioksidan aktivitesinin manda sütünden üretilen peynirlere göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Keçi ve inek sütünden üretilmiş Panela peynirinin SÇE örnekleri arasında süte ve analizde kullanılan DPPH radikali konsantrasyonuna göre antioksidan aktivitede farklılıklar gözlemlendiği ve bu değerlerin olgunlaşma süresince artış ve azalışlar gösterdiği belirlenmiştir (López-villafañe vd., 2023).

#### **4.5.3. SÇE örneklerinin ABTS yöntemi ile antioksidan aktivitesi**

Bu çalışmada elde edilen SÇE örneklerinin 90 günlük olgunlaşma sırasında ABTS antioksidan aktivitesi sonuçları Çizelge 4.56.'da (10 – 30 µL örnek hacmi için) ve Şekil 4.41'de (10 µL örnek hacmi için) verilmiştir. SÇE örneklerinin 10 – 30 µL örnek hacmi için ABTS antioksidan aktivitesi değeri sonuçları üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.57.'de verilmiştir. SÇE örneklerinde belirlenen ABTS antioksidan aktivitesi değeri sonuçları 10, 20 ve 30 µL örnek hacimleri için 90 günlük olgunlaşma süresince sırasıyla %17,2 - 59,79, %37,9 - 70,08 ve %50,23 - 72,26 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.56. SÇE örneklerine ait ABTS antioksidan aktivite değerleri (%)

| OLGUNLAŞMA SÜRESİ |       | ÖRNEKLER                     |                                |                              |                              |
|-------------------|-------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                   |       | M-UF                         | Ş-UF                           | M-PAS                        | Ş-PAS                        |
| 1.gün             | 10 µL | 21,77±0,18 <sup>Dc</sup>     | 17,2±0,11 <sup>Dd</sup>        | 25,09±0,27 <sup>Db</sup>     | 27,31±0,22 <sup>Ca</sup>     |
|                   | 20 µL | 38,66±0,41 <sup>D*c*</sup>   | 37,9±0,56 <sup>C*c*</sup>      | 43,14±0,16 <sup>D*b*</sup>   | 46,29±0,03 <sup>C*a*</sup>   |
|                   | 30 µL | 50,23±0,23 <sup>C**c**</sup> | 51,06±0,36 <sup>C**c**</sup>   | 53,92±0,29 <sup>C**b**</sup> | 57,03±0,1 <sup>C**a**</sup>  |
| 30.gün            | 10 µL | 41,74±0,6 <sup>Ca</sup>      | 33,73±0,79 <sup>Cb</sup>       | 27,44±0,62 <sup>Cc</sup>     | 40,35±1,00 <sup>Ba</sup>     |
|                   | 20 µL | 64,48±0,27 <sup>C*a*</sup>   | 59,28±0,29 <sup>B*b*</sup>     | 48,64±0,32 <sup>C*c*</sup>   | 61±0,9 <sup>B*b*</sup>       |
|                   | 30 µL | 68,79±0,58 <sup>B**a**</sup> | 67,90±0,11 <sup>B**ab**</sup>  | 58,91±0,1 <sup>B**c**</sup>  | 66,71±0,3 <sup>B**b**</sup>  |
| 60.gün            | 10 µL | 50,82±0,41 <sup>Ba</sup>     | 50±0,11 <sup>Ba</sup>          | 51,35±0,1 <sup>Ba</sup>      | 43,827±0,83 <sup>Bb</sup>    |
|                   | 20 µL | 67,81±0,51 <sup>B*a*</sup>   | 67,79±0,35 <sup>A*a*</sup>     | 66,74±0,27 <sup>Ba</sup>     | 64,44±0,43 <sup>B*b*</sup>   |
|                   | 30 µL | 71,72±0,5 <sup>AB**a**</sup> | 70,56±0,57 <sup>A**a**</sup>   | 67,99±1,00 <sup>A**a**</sup> | 67,76±0,76 <sup>B**a**</sup> |
| 90.gün            | 10 µL | 59,79±0,66 <sup>Aa</sup>     | 55,27±0,17 <sup>Ab</sup>       | 54,90±0,39 <sup>Ab</sup>     | 55,8±0,28 <sup>Ab</sup>      |
|                   | 20 µL | 70,08±0,04 <sup>A*a*</sup>   | 68,39±0,4 <sup>A*a*</sup>      | 68,29±0,27 <sup>Aa</sup>     | 69,04±0,83 <sup>A*a*</sup>   |
|                   | 30 µL | 72,26±0,73 <sup>A**a**</sup> | 69,09±0,06 <sup>AB**bc**</sup> | 68,65±0,43 <sup>A**c**</sup> | 71,95±0,6 <sup>A**ab**</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

A\*,B\*,C\*,D\*: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

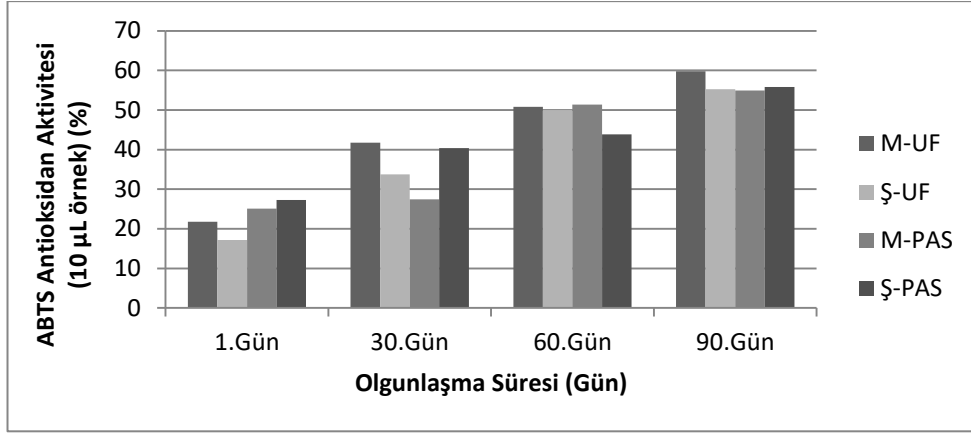
a\*,b\*,c\*,d\*: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

A\*\*,B\*\*,C\*\*,D\*\*: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

a\*\*,b\*\*,c\*\*,d\*\*: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.57. SÇE örneklerine ait ABTS antioksidan aktivite değerlerinin istatistiksel analizi

|                      | 10 µL   |              | 20 µL   |              | 30 µL   |              |
|----------------------|---------|--------------|---------|--------------|---------|--------------|
| Varyasyon Kaynakları | F       | P            | F       | P            | F       | P            |
| Süt                  | 0,016   | 0,900        | 0,955   | 0,341        | 6,516   | <b>0,019</b> |
| Enzim                | 0,600   | 0,448        | 0,817   | 0,377        | 7,998   | <b>0,011</b> |
| Depolama             | 154,681 | <b>0,000</b> | 204,790 | <b>0,000</b> | 357,169 | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | 1,226   | 0,328        | 1,469   | 0,255        | 4,899   | <b>0,011</b> |
| Süt x Depolama       | 3,599   | <b>0,033</b> | 10,301  | <b>0,000</b> | 27,817  | <b>0,000</b> |
| Süt x Enzim          | 7,472   | <b>0,013</b> | 9,662   | <b>0,006</b> | 29,350  | <b>0,000</b> |



Şekil 4.41. SÇE örneklerinin ABTS antioksidan aktivitesinin değişimi

Çizelge 4.56. ve Şekil 4.41.'de görüldüğü üzere peynirlerden olgunlaşma süresince elde edilen SÇE örneklerinin ABTS antioksidan aktivitesi değerleri tüm peynirlerde düzenli olarak artış göstermiştir. Olgunlaşmanın başında en yüksek değeri Ş-PAS peyniri gösterirken, en düşük değeri Ş-UF peynirinin gösterdiği belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Olgunlaşmanın sonunda ise en yüksek değeri M-UF peyniri gösterirken, en düşük değeri M-PAS peynirinin gösterdiği belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Olgunlaşmanın 1. gününde 10  $\mu$ L örnek hacmi için ABTS antioksidan aktivitesi değerlerinin pastörize süttten üretilen Beyaz peynirlerde, UF süttten üretilen Beyaz peynirlere göre daha yüksek olduğu görülmektedir ( $p<0,05$ ). Olgunlaşmanın 30. gününde ise M-PAS peynirine ait SÇE örneği hafif bir artış göstermiş ve diğer peynirlere göre daha düşük bir değer sergilemiştir ( $p<0,05$ ). Olgunlaşmanın 60. gününde ise Ş-PAS peynirine ait SÇE örneğinde hafif bir artış görülmüş ( $p>0,05$ ) ve diğer peynirlere göre daha düşük bir değer sergilemiştir ( $p>0,05$ ). Olgunlaşmanın sonunda ise tüm peynirler artış göstermiş ( $p<0,05$ ) ve M-UF peyniri dışındaki peynirlerin kendi aralarındaki farklılıkları istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Çizelge 4.56.'da 20 ve 30  $\mu$ L örnek hacmine ait sonuçlar değerlendirildiğinde, 10  $\mu$ L örnek hacminde gözlenen sonuçlar ile yaklaşık olarak benzer olduğu görülmektedir. Çizelge 4.57.'de görüldüğü üzere peynirlerin SÇE örneklerinin 90 günlük olgunlaşma süresince ABTS antioksidan aktivitesi değeri üzerinde; 10  $\mu$ L ve 20  $\mu$ L örnek hacminde elde edilen sonuçlarda depolama ve süt x depolama ile süt x enzim interaksiyonlarının etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuş olup

30µL örnek hacmi için tüm varyasyon kaynaklarının etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Bu çalışmada, olgunlaşma süresi sonunda SÇE örneklerinin antioksidan analizinde kullanılan ABTS ve DPPH yöntemleri ile antioksidan aktivite sonuçlarının birbirinden farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bu farklılık, yapılan birçok çalışmada bildirilmiştir. Araştırmacılar, sonuçların olgunlaşmaya ve proteolize göre değişkenlik gösterse de genel olarak ABTS antioksidan aktivitesi değerlerinin daha yüksek olduğunu vurgulamış ve bunun sebebi olarak DPPH ve ABTS radikalleri için farklı radikal giderme modelleri olmasını ileri sürmüşlerdir (Meira vd., 2012; Sah vd., 2014; Alam vd., 2021; Ayyash vd., 2021). DPPH ile ABTS yöntemlerinin radikal giderme kapasiteleri arasındaki farklılığın, kısmen radikallerin çözünürlüğü ile reaksiyon ortamındaki yayılma güçleri arasındaki farklılığa bağlı olduğu bilinmektedir (Tang vd., 2010). DPPH radikalının metanol içinde çözdürüldüğü ve sulu bir ortamdaki hedef peptitlere kolayca yayılım göstermeyebildiği için DPPH yönteminin hidrofilik antioksidan bileşenlerin analizinde sınırlı olduğu bilinmektedir. Bunun tersi olarak ABTS'nin sulu ortamda çözünerek oluşturulmuş radikal katyonunun, sulu çözelti ortamındaki peptitlere kolayca ulaşabildiği, bu nedenle ABTS yönteminin hem hidrofilik hem de lipofilik bileşenlerin antioksidan aktivitelerinin ölçümünde daha iyi olduğu bilinmektedir. Ayrıca, DPPH analizinde kullanılan numunelerin konsantrasyonuna göre ABTS analizinde çok daha düşük konsantrasyonda da sonuç alınabildiği için SÇE'nin antioksidan aktivitesinin ölçümlerinde ABTS analizinin daha duyarlı ve uygun bir yöntem olduğu söylenebilmektedir (Gupta vd., 2009; Şanlıdere ve Öner 2011; Tang vd., 2010; Meira vd., 2012; Sah vd., 2014; Boran, 2021; Aguilar-Toalá vd., 2022). Bu sonuçlardan farklı olarak Abadia-Garcia vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada, Cottage peynirinden elde edilen peptitlerin antioksidan aktivitesinin DPPH yöntemi ile arttığı gözlenirken, ABTS yöntemi sonucunda herhangi bir antioksidan etki gözlenmediği belirtilmiştir.

Literatürde peynirlerin antioksidan aktivitelerinde olgunlaşma ilerledikçe artış veya azalışlar görüldüğü, bunun nedeninin proteolitik enzimlerin aktivitesi ile

büyük peptitlerin parçalanıp daha küçük peptitlere dönüşmesi olduğu bildirilmiştir (Gupta vd., 2009; Aguilar-Toalá vd., 2013; Barac vd., 2016; Hossain vd., 2020). Kazeinlerin potansiyel olarak tirozin, triptofan ve lizin gibi yüksek bir antioksidatif amino asit içeriğine sahip olduğu için antioksidan aktivitede önemli rol oynadığı bilinmektedir (Apostolidis vd., 2007). Yapılan bir çalışmada,  $\beta$ -CN dizisindeki Leu<sub>190</sub>-Tyr<sub>191</sub> peptit bağının bölünmesi üzerine salınan koyun ve keçi peyniri gibi ürünlerden elde edilen SÇE'de bulunan peptitlerin antioksidan aktivite sergilediği rapor edilmiştir (Silva vd., 2006).

Domati peynir üretiminde rennete ek olarak farklı miktarlarda Neutrase enzimi ilave edilmiş ve peynirlerin antioksidan aktivitesinin olgunlaşma esnasında önemli ölçüde arttığı, yüksek miktarda Neutrase ilave edilen peynirde %83,57, düşük miktarda Neutrase ilave edilen peynirde %72,86 ve kontrol peynirinde %67,70 oranında antioksidan aktivite gözlemlendiği bildirilmiştir (Taha vd., 2020). Uzun süreli (41 ay) olgunlaştırılmış Parmigiano-Reggiano peynirinden elde edilen SÇE örneklerinde antioksidan aktivitenin anlamlı bir değişim göstermediği belirtilmiştir (Bottesini vd., 2013). Manda sütünden üretilen taze peynir SÇE'lerin antioksidan aktivitesinin peptit konsantrasyonuyla orantılı olduğu ve sırasıyla 2,5 ile 20 mg/mL peptit konsantrasyonları için %33,39 ile %63,27 değerleri görülmüştür (Silva vd., 2019). Koyun sütünden üretilen farklı peynirlere ait SÇE örneklerinde yapılan bir çalışmada, en düşük ABTS aktiviteyi Feta peynirinin, en yüksek aktiviteyi 90 gün olgunlaştırılmış Roquefort peynirinin gösterdiği belirlenmiştir. Araştırmada aynı çeşitten peynirlere ait ekstraktlar için çözünür peptit miktarı ile antioksidan aktivitenin tutarlı olduğu sonucuna varılmıştır (Meira vd., 2012).

Peynir üretiminde küflü peyniri bulamacı kullanımının peynirlerdeki etkileri üzerinde yapılan çalışmada, küflü peynir bulamacı ilave edilen gruplarda antioksidan aktivitenin daha yüksek olduğu, bunun nedeninin bulamaç sayesinde peynir örnekleri arasında oluşan mikroflora ve proteolizdeki farklılık nedeniyle biyoaktif peptitlerin çeşidi, sayısı ve aktivitesinin etkilenmiş olabileceği yorumu yapılmıştır (Boran, 2021). Geleneksel ve ticari yoğurt örneklerinden 4 haftalık depolama süresince elde edilen peptit fraksiyonları

araştırılmış ve geleneksel yoğurttan elde edilen SÇE'nin antioksidan aktivitesinin, ticari yoğurtlardan elde edilen SÇE'den daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır (Şanlıdere ve Öner, 2011).

#### 4.5.4. SÇE örneklerinin TEAC antioksidan aktivitesi

TEAC yönteminde, ABTS kromojen radikal katyonunun absorbansındaki azalmadan yararlanılarak toplam antioksidan kapasitesi, troloks standart eğrisinden yararlanılarak troloks cinsinden verilir. Bu çalışmada elde edilen SÇE örneklerinin 90 günlük olgunlaşma sırasında TEAC antioksidan aktivite sonuçları Çizelge 4.58 ve Şekil 4.42'de verilmiştir. SÇE örneklerinin TEAC antioksidan aktivite değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.59.'da verilmiştir. SÇE örneklerinde belirlenen TEAC değerleri 90 günlük olgunlaşma süresince 9,36 – 22,66  $\mu\text{M}$  TEAC/mg örnek arasında değişmiştir.

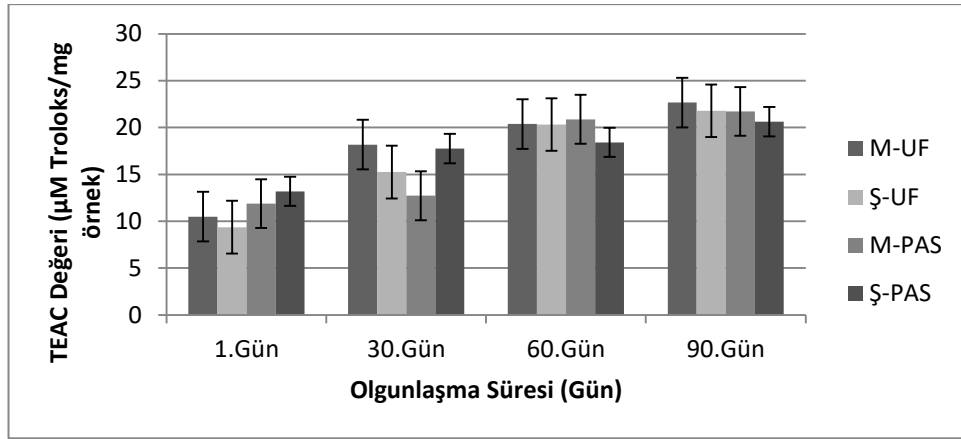
Çizelge 4.58. SÇE örneklerine ait TEAC değerleri ( $\mu\text{M}$  TEAC/mg örnek)

| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                       |                                 |                                 |                                |
|----------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
|                      | M-UF                           | Ş-UF                            | M-PAS                           | Ş-PAS                          |
| <b>1.gün</b>         | 10,49 $\pm$ 0,14 <sup>Dc</sup> | 9,36 $\pm$ 0,40 <sup>Dd</sup>   | 11,88 $\pm$ 0,40 <sup>Db</sup>  | 13,19 $\pm$ 0,40 <sup>Ca</sup> |
| <b>30.gün</b>        | 18,17 $\pm$ 0,03 <sup>Ca</sup> | 15,25 $\pm$ 0,05 <sup>Cc</sup>  | 12,72 $\pm$ 0,02 <sup>Cd</sup>  | 17,75 $\pm$ 0,05 <sup>Bb</sup> |
| <b>60.gün</b>        | 20,38 $\pm$ 0,06 <sup>Bb</sup> | 20,32 $\pm$ 0,07 <sup>Bb</sup>  | 20,88 $\pm$ 0,06 <sup>Ba</sup>  | 18,42 $\pm$ 0,07 <sup>Bc</sup> |
| <b>90.gün</b>        | 22,66 $\pm$ 0,05 <sup>Aa</sup> | 21,79 $\pm$ 0,05 <sup>Aab</sup> | 21,72 $\pm$ 0,08 <sup>Aab</sup> | 20,63 $\pm$ 0,59 <sup>Ab</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.59. SÇE örneklerine TEAC değerlerinin istatistiksel analizi

| Varyasyon Kaynakları | F       | P            |
|----------------------|---------|--------------|
| Süt                  | 0,114   | 0,739        |
| Enzim                | 0,370   | 0,550        |
| Depolama             | 107,132 | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | 1,382   | 0,279        |
| Süt x Depolama       | 4,311   | <b>0,018</b> |
| Süt x Enzim          | 4,650   | <b>0,044</b> |



Şekil 4.42. SÇE örneklerinin TEAC değerinin değişimi

Çizelge 4.58. ve Şekil 4.42.'de görüldüğü üzere peynirlerin SÇE örneklerinin TEAC değerlerinin ABTS antioksidan aktivitesi sonuçlarına paralel olduğu belirlenmiştir. TEAC değerlerinin olgunlaşma süresi boyunca tüm peynirlere ait SÇE örneklerinde arttığı tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Olgunlaşmanın başında en yüksek değeri Ş-PAS peyniri gösterirken, en düşük değeri Ş-UF peynirinin gösterdiği belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Olgunlaşmanın sonunda ise en yüksek değeri M-UF peyniri gösterirken, en düşük değeri M-PAS peynirinin gösterdiği belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Çizelge 4.59.'da görüldüğü üzere peynirlerin SÇE örneklerinin 90 günlük olgunlaşma süresince TEAC değerleri üzerinde depolama ve süt x depolama ile süt x enzim interaksiyonlarının etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Tüm bu sonuçların ABTS antioksidan aktivitesi değerinde gözlenen sonuçlar ile paralel olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç ile birlikte DPPH antioksidan aktivitesindeki sonuç değerlendirildiğinde kullanılan pıhtılaştırıcı enzimlerin elde edildiği kaynağa göre antioksidan analizleri arasında farklı sonuçlar verdiği görülmektedir. DPPH antioksidan aktivitesi için en yüksek ve en düşük aktiviteyi olgunlaşmanın başında mikrobiyal enzimle üretilen peynirler göstermiş olup, olgunlaşmanın sonunda ise şirden mayası ile üretilen peynirler göstermiştir. ABTS ve TEAC antioksidan aktivitelerinde ise en yüksek ve en düşük aktiviteyi olgunlaşmanın başında şirden mayası ile üretilen peynirler gösterirken, olgunlaşmanın sonunda mikrobiyal enzimle üretilen peynirler göstermiştir. Bu sonuçlara göre antioksidan analiz sonuçları arasında enzimlere göre farklı bir durum sergilendiği görülmektedir.

Keçi sütü kullanılarak üretilmiř Beyaz peynirlerden 9 aylık olgunlařma süresince elde edilen SE rneklerinin TEAC antioksidan aktivitesinin olgunlařma sırasında aıća çıkan peptitler nedeniyle arttıćı ve 29,34 – 55,12 mM Troloks/g arasında dećiřtići belirtilmiřtir. Çalıřmada, antioksidan aktivite ile proteolitik aktivite arasında pozitif bir korelasyon olduću sonucuna varılmıřtır (ner ve Sarıdać, 2019).

Olgunlařma süresi 3 ay olan Kařar peynirine ait SE rnećinin TEAC antioksidan sonucunun 41,09 mM Trolox/g olarak belirlendići ancak bu peynirin SE rnećinden RP-HPLC ile toplanan fraksiyonların antioksidan dećerinin daha yüksek olduću ve 392,12 – 920,726 mM Trolox/g dećerleri arasında olduću tespit edilmiřtir (ner ve Sarıdać, 2018a). Yapılan bir çalıřmada, farklı sütlerden yapılmıř Edirne Beyaz peynirlerin TEAC antioksidan aktivitesinin depolama süresince artıř ve azalıřlar gsterdići, taze peynir örneklerinden elde edilen TEAC dećerlerinin depolamanın bařında düřük bulunduću bildirilmiřtir (Demir, 2021).

Gmez-Ruiz vd. (2008) tarafından Koyun sütü kazein fraksiyonlarının hidroliz ile antioksidan aktivitesinin zenginleřtići ve proteolizin antioksidan aktivite artıřına sebep oldućunu bildirilmiřtir. Bozulmamıř kazeinler ve denatüre peynir altı suyu proteinlerinin antioksidan özellik sergilemesi nedeniyle salamurada olgunlařtırılan Beyaz peynirde yapılan bir çalıřmada, suda çözünmeyen fraksiyonun toplam antioksidan kapasitesinin tüm olgunlařma periyodu boyunca yavařça arttıćı, buna karřın suda çözünen fraksiyonun toplam antioksidan kapasitesindeki önemli artıřın 30. günden sonra olduću tespit edilmiřtir (Barac vd., 2016).

Yapılan bir çalıřmada, yardımcı kültür kullanılarak üretilen Cheddar peynirlerinde olgunlařmanın 4. ayına kadar TEAC dećerlerinde artıř olduću, yardımcı kültür ile üretilen grupların TEAC dećerinin 4.ayda en yüksek 16,61  $\mu\text{M}$  /mg protein olduću grlmřtir. Olgunlařmanın 7. ayına kadar benzer

TEAC değerleri gözleendiği, ardından olgunlaşmanın sonuna kadar bu değerlerin düştüğü belirtilmiştir (Gupta vd., 2009).

Başka bir çalışmada, Pecorino Sardo tipi peynirde olgunlaşmanın 80. ve 120. gününde belirlenen TEAC antioksidan sonucunun, olgunlaşmanın 160. gününde belirlenen sonuçtan yüksek olduğu bildirilmiştir. Aynı alışma kapsamında, Pecorino Toscano tipi peynirdede olgunlaşmanın 60. gününde belirlenen TEAC sonucunun, 180. gün belirlenen sonuçtan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Buna göre SE örneklerin antioksidan aktivitesinin olgunlaşma sürecine bağlı olduğu, ileri derecede proteoliz ile antioksidan aktivitenin düştüğü sonucuna varılmıştır (Meira vd., 2012).

#### 4.6. <3kDa Örneklerinin Biyoaktif Özelliklerine Ait Sonuçlar

##### 4.6.1. <3kDa örneklerinin ACE-inhibitör aktivitesi

Bu çalışmada elde edilen <3kDa örneklerinin 90 günlük olgunlaşma sırasında ACE-inhibitör aktivite sonuçları izelge 4.60 ve şekil 4.43'de verilmiştir. <3kDa örneklerinin ACE-inhibitör aktivite değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek izelge 4.61.'de verilmiştir. <3kDa örneklerinde belirlenen ACE-inhibitör aktivite sonuçları 90 günlük olgunlaşma süresince %47,37 – 81,23 arasında değişmiştir.

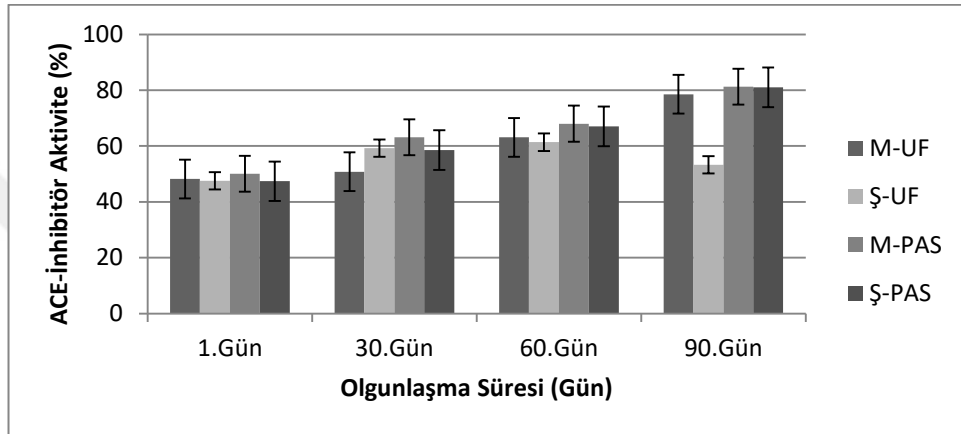
Çizelge 4.60. <3kDa örneklerine ait ACE-inhibitör aktivite değerleri (%)

| OLGUNLAşMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                 |                          |                          |                          |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                      | M-UF                     | ř-UF                     | M-PAS                    | ř-PAS                    |
| <b>1.gün</b>         | 48,21±0,22 <sup>Db</sup> | 47,56±0,19 <sup>Db</sup> | 50,03±0,06 <sup>Da</sup> | 47,37±0,19 <sup>Db</sup> |
| <b>30.gün</b>        | 50,77±0,09 <sup>Cc</sup> | 59,27±0,12 <sup>Bb</sup> | 63,14±0,42 <sup>Ca</sup> | 58,53±0,26 <sup>Cb</sup> |
| <b>60.gün</b>        | 63,13±0,25 <sup>Bb</sup> | 61,37±0,15 <sup>Ac</sup> | 68±0,12 <sup>Ba</sup>    | 67,05±0,15 <sup>Ba</sup> |
| <b>90.gün</b>        | 78,51±0,3 <sup>Ab</sup>  | 53,27±0,48 <sup>Cc</sup> | 81,23±0,48 <sup>Aa</sup> | 80,99±0,36 <sup>Aa</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.61. <3kDa örneklerine ait ACE-inhibitör aktivite değerlerinin istatistiksel analizi

| Varyasyon Kaynakları | F      | P            |
|----------------------|--------|--------------|
| Süt                  | 0,251  | 0,622        |
| Enzim                | 4,249  | <b>0,047</b> |
| Depolama             | 2,997  | <b>0,046</b> |
| Enzim x Depolama     | 15,083 | <b>0,000</b> |
| Süt x Depolama       | 10,236 | <b>0,000</b> |
| Süt x Enzim          | 15,033 | <b>0,001</b> |



Şekil 4.43. <3kDa örneklerinin ACE-inhibitör aktivitesinin değişimi

Çizelge 4.60. ve Şekil 4.43.'de görüldüğü üzere tüm peynirlerin <3kDa peptit ekstraktı örneklerinin ACE-inhibitör aktivitelerinin olgunlaşma sonuna kadar artış gösterdiği, olgunlaşma sonunda ise Ş-UF dışındaki tüm peynirlerde artış olurken Ş-UF'de 60. güne göre azalış olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Olgunlaşmanın 90. gününde Ş-UF peynirinin aktivitesinde düşüş görülmesine rağmen olgunlaşmanın 1. gününe göre daha yüksek bir aktivite gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Olgunlaşmanın 1. gününde <3kDa örneklerinde en yüksek ACE-inhibitör değeri M-PAS peynirinde görülürken, en düşük ACE-inhibitör değeri Ş-PAS peynirinde görülmüştür ( $p>0,05$ ). Olgunlaşmanın 60. gününden itibaren ise en yüksek değer M-PAS peynirinde görülürken, en düşük değer Ş-UF peynirinde gözlenmiştir. Olgunlaşmanın 1. ve 30. günlerinde pastörize süttten üretilen Beyaz peynirler arasında mikrobiyal enzim, şirden mayasına göre daha yüksek ACE-inhibitör aktiviteye neden olmuştur ( $p<0,05$ ). Enzimler arasındaki bu farklılık olgunlaşmanın 60. gününden itibaren UF süttten üretilen Beyaz

peynirlerde gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Çizelge 4.61.'de görüldüğü üzere peynirlerin  $<3\text{kDa}$  örneklerinin 90 günlük olgunlaşma süresince ACE-inhibitör aktivitesi üzerinde enzim ve depolama ile birlikte enzim x depolama, süt x depolama ve süt x enzim interaksiyonlarının etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Peptitlerin ACE-inhibisyonu üzerine yapılan çalışmalarda genellikle ACE-inhibitör aktivitenin proteoliz derecesine bağlı olduğu sonucuna varılmıştır. Gómez-Ruiz vd. (2006), proteoliz derecesinin en yüksek olduğu peynirden elde edilen  $<1\text{kDa}$  molekül ağırlığındaki peptitlerin ACE-inhibitör aktivitesinin diğer peynirlerden yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Peynirlerde olgunlaşma süresince gerçekleşen proteolizin belli dereceye kadar ACE inhibitör aktivitenin artmasını sağladığı ancak proteolizin ileri dereceye ulaşması ile oluşan peptit bozulmalarının aktivitede düşüşe sebep olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Ong vd., 2007; Meira vd., 2012; Gupta vd., 2013; Kocak vd., 2020).

Birçok çalışma sonucunda 1-3 kDa arası molekül ağırlığındaki peptitlerin daha fazla ACE-inhibitör aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Gómez-Ruiz vd., 2002; Quirós vd., 2007; Tarango-Hernández vd., 2015; Abdel-Hamid vd., 2017; Rubak vd., 2021; Wu vd., 2019; Xia vd., 2020; Wu vd., 2023). Lignitto vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada, Asiago d'allevio peynirinde  $<3\text{kDa}$  moleküler kütleyle sahip peptitlerin,  $>3\text{kDa}$  moleküler kütleyle sahip peptitlere göre daha yüksek aktivite gösterdiği vurgulanmıştır (Lignitto vd., 2010). Cheddar peynirinde yapılmış bir çalışmada, farklı molekül ağırlıklarına göre izole edilen peptitlerde ACE-inhibitör aktivite en yüksekten düşüğe doğru sırasıyla  $<5\text{ kDa}$ ,  $<10\text{ kDa}$  ve  $>10\text{ kDa}$  molekül ağırlığına sahip peptitlerde gözlenmiştir (Pritchard vd., 2010b). Başka bir çalışmada Emmental peynirinden elde edilen 10 kDa peptit ekstraktlarının, SÇE örneklerine göre ACE-inhibisyonunda 2 kat artış olduğu gözlemlenmiştir. (Parrot vd., 2003). Bu sonuçlar ile benzer olarak bu çalışmada,  $<3\text{kDa}$  peptit ekstraktlarının ACE-inhibitör aktivite sonuçlarının, SÇE örneklerine göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

Bazı geleneksel peynirlerden elde edilen SÇE örneklerinden, <3kDa ve >3 kDa peptitleri içeren fraksiyonlar elde edilmiştir. Tüm peynir çeşitlerinde ACE-inhibitör aktivite, <3kDa peptit fraksiyonlarında daha yüksek bulunmuştur. Peynirler arasında olgunlaşma indeksi daha yüksek olan peynirlerin ACE-inhibitör aktivitelerinin daha düşük bulunduğu, bu durumun ilerlemiş olan proteolizden kaynaklandığı belirtilmiştir (Turan, 2022). Koyun ve keçi sütlerinden yapılan İzmir Tulum peynirlerinden elde edilen <3kDa peptit ekstraktlarının ACE-inhibitör aktivitesinin koyun İzmir Tulum peynirinde %43,53-94,71 olarak belirlenirken, keçi İzmir Tulum peynirinde %15,07-88,37 aralığında olduğu belirlenmiştir (Kısak, 2021).

Yapılan bir çalışmada, çiğ sütlerden gelen starter olmayan floranın da proteolitik sisteme katkısı olduğu ve oluşan peptitlerin biyoaktivitesine sütün kaynağı ile süte uygulanan işlemlerin doğrudan etki eden faktörlerden olduğu öne sürülmüştür (Silva vd., 2006). Koyun sütü ve farklı starter kültürler kullanılarak üretilen Manchego peynirlerinden elde edilen <3kDa peptitlerin ACE-inhibisyonunun olgunlaşmanın süresinin ortasında en yüksek bulunduğu, olgunlaşmanın sonuna doğru ise azaldığı belirlenmiştir. Bu durum araştırmacılar tarafından peynirlerde devam eden proteoliz nedeniyle ACE-inhibitör aktivite gösteren peptitlerin parçalanması ile açıklanmıştır (Gómez-Ruiz vd., 2002). İki farklı ticari markaya ait Wisconsin Cheddar peynirlerinden elde edilen <3kDa peptit ekstraktlarının olgunlaşma süresi ilerledikçe ACE-inhibitör aktivitenin arttığı, 1 senelik depolanmış örneğe ait ekstraktların en yüksek ACE-inhibitör aktiviteyi gösterdiği ancak 2 senelik peynirde gözlenen sonucun daha düşük ACE-inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir sürülmüştür (Lu vd., 2016). Bir diğer çalışmada, Gamalost peynirlerinden 90 gün boyunca elde edilen pH 4,6'da çözünen <10 kDa ekstraktların ACE-inhibitör aktivitesinin olgunlaşmanın 10.gününde gözlemlendiği belirlenmiştir (Qureshi vd., 2013).

Farklı LAB kültürleri ile üretilen ve 1 hafta depolamadan sonra tüketilen peynirlerden depolamanın 5.gününde <3kDa peptit ekstraktları elde edilmiş ve ACE-inhibisyonunun %95,3 ve %99,8 arasında değiştiği bildirilmiş (Torres-Llanez vd., 2011). Yardımcı kültür ile üretilen Beyaz peynirlerden elde edilen

<3kDa peptit ekstraktlarının olgunlaşmanın 90. gününde %71,14 – 94,61 arasında değiştiği ve yardımcı kültür kullanımının önemli düzeyde ACE-inhibitör aktiviteyi arttırdığı belirlenmiştir (Sahingil vd., 2022).

Literatürde düşük molekül ağırlığındaki peptitlerin yüksek ACE-inhibisyonu gösterdiğine dair birçok çalışma mevcut olmasına rağmen molekül ağırlığı yüksek olan fraksiyonlarda da ACE-inhibtör aktivitenin olduğu yapılan birkaç çalışmada bildirilmiştir (Tarango-Hernández vd., 2015; Paiva vd., 2017; Gürkan, 2019; Wei vd., 2022b). Bu çalışmalar sonucunda ACE-inhibitör aktiviteni yalnızca peptitlerin boyutları (molekül ağırlığı/zincir uzunluğu) ile ilgili olmadığı, bununla birlikte fraksiyonların amino asit kompozisyonlarındaki farklılıklarının da etkili olduğu yorumu yapılmıştır (Paiva vd., 2017; Gürkan, 2019). Ayrıca peptit konsantrasyonu ile biyoaktivite arasında pozitif bir korelasyon olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Gupta vd., 2013; Solieri vd., 2020). Bu çalışmada <3kDa örneklerde olgunlaşmanın 90. gününde ACE-inhibitör aktivitenin Ş-UF dışındaki örneklerde artış gösterdiği belirlenirken Ş-UF’de azaldığı belirlenmiştir. 4.3.4.3.’deki Çizelge 4.38’de verilen <3kDa peptit ekstraktlarına ait hidrofilik ve hidrofoik alanlardaki %değişim sonuçları incelendiğinde, ilerleyen proteoliz nedeniyle her iki bölgeye ait piklerdeki toplam alanların M-PAS ve Ş-UF peynirlerinde azalmasına rağmen bu azalmanın en fazla Ş-UF peynirinde görüldüğü tespit edilmiştir. Bu iki peynir arasında Ş-UF’nin ACE-inhibitör aktivitesinin daha düşük olmasının nedeninin M-PAS’da gözlenen piklerin azalışının Ş-UF’ye göre daha düşük seviyede gerçekleşmesi ve açığa çıkan <3kDa peptitlerin dizilimlerinin farklılığından dolayı olabildiği sonucuna varılmıştır.

#### **4.6.1.1. <3kDa örneklerinin fraksiyonlarına ait ACE-inhibitör aktivitesi sonuçları**

Bu çalışmada 3.2.7.1.’de anlatıldığı üzere RP-HPLC fraksiyon kollektörü ile toplanıp liyofilize edilen ve olgunlaşmanın 90. gününden elde edilen <3kDa ekstraktlarına ait fraksiyonlar 15 mg/mL konsantrasyonunda yeniden çözdürülmüş ve ACE-inhibitör aktivitesi araştırılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.62.’de verilmiştir.

Çizelge 4.62. RP-HPLC ile toplanan fraksiyonların ACE-inhibitör aktivite değerleri (%)

| Fraksiyon numarası | M-UF      | Ş-UF         | M-PAS        | Ş-PAS |
|--------------------|-----------|--------------|--------------|-------|
| <b>F3</b>          | 28,08     | 17,42        | 24,33        | 16,78 |
| <b>F4</b>          | 29        | 12,36        | 10,36        | 12,56 |
| <b>F5</b>          | 6,4       | 7,87         | 13,75        | 19,34 |
| <b>F6</b>          | 15,4      | 38,11        | 38,32        | 7,25  |
| <b>F7</b>          | 44,8      | 28,09        | 44,5         | 19,78 |
| <b>F8</b>          | 33,99     | 12,36        | 48,8         | 37,58 |
| <b>F9</b>          | <b>65</b> | <b>58,81</b> | <b>57,22</b> | 41,32 |
| <b>F10</b>         | <b>51</b> | 30,33        | <b>68,9</b>  | 46,37 |

Çizelge 4.62.'de verilen fraksiyonların ACE-inhibitör değerlerinin %6,4 – 68,9 arasında değiştiği gözlenmiştir. Bu çalışmada toplanan 32 fraksiyondan M-UF ve M-PAS peynirlerine ait F9 ve F10 numaralı fraksiyonları ile Ş-UF peynirinin F9 numaralı fraksiyonu olmak üzere toplamda 5 fraksiyonun %50'nin üzerinde ACE-inhibisyonu gösterdiği tespit edilmiştir. Benzer olarak Ong ve Shah (2008b) tarafından yapılan çalışmada, Cheddar peynirlerine ait SÇE örneklerinden RP-HPLC ile 17 fraksiyon toplanmış ve bunlardan 4 tanesinin (F1 (%54), F4 (%66), F15 (%81) ve F16 (%73) numaralı fraksiyonlar) ACE-inhibisyonu yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada hidrofilik bölgeden elde edilen F1 ve F4 numaralı peptitlerin Ong ve Shah (2008b) tarafından bildirilen sonuçlara göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada, koyun sütü ve farklı starter kültürler kullanılarak üretilen 8 ay olgunlaşma süresi olan Manchego peynirinden elde edilen <3kDa peptitler iyon kromatografisi ile fraksiyonlanmıştır. En yüksek ACE-inhibisyonu gösteren (%93,5) fraksiyon, RP-HPLC ile analiz edilmiş ve 8 fraksiyona ayrılmıştır. Bu fraksiyonlardan yalnızca 3 tanesinin %80'in üzerinde ACE-inhibisyonu gösterdiği belirlenmiştir (Gómez-Ruiz vd., 2002).

Bu çalışmada toplanan fraksiyonların ACE-inhibitör değerlerinin, fraksiyonların elde edildiği <3kDa peptit ekstraktlarına göre düşük olduğu gözlenmiştir. <3kDa peptit ekstraktları ve fraksiyonlarının ACE-inhibitör aktivite değerleri arasındaki bu farklılık Sahingil vd. (2022) tarafından da bildirilmiştir. Çalışmada, hidrofobik bölgenin başlangıcından elde edilen fraksiyonlarda daha yüksek

ACE-inhibisyonunun gözleendiği, fraksiyonların aktivitesinin %2,99 - 79,56 arasında değiştii, <3kDa peptit ekstraktında ACE-inhibitör aktivitesi en yüksek %94,61 olan peynire ait fraksiyonların en yüksek ACE-inhibitör aktivitesinin %4,49 - 64,27 olduğu bildirilmiştir (Sahingil vd., 2022). Elde edilen bu sonuçlar bu çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmada, pastörize süt ile üretilen M-PAS ve Ş-PAS peynirlerinden elde edilen F5, F8 ve F10 numaralı fraksiyonların, UF süttten üretilen M-UF ve Ş-UF peynirlerinin aynı numaralı fraksiyonlarına göre daha yüksek ACE-inhibisyonu gösterdiği belirlenmiştir. Probiyotik ilaveli Cheddar peynirlerinde yapılan bir çalışmada, kontrol peynirinde F9 fraksiyonunun RP-HPLC'de daha fazla toplam alana sahip olması nedeniyle ACE-inhibisyonunun probiyotik ilaveli peynirlere göre daha yüksek olduğu ve tüm peynirlerde F9 fraksiyonun toplam alanı azaldıkça ACE-inhibisyonunun azaldığı bildirilmiştir (Ong vd., 2007). Bu sonuca benzer olarak bu çalışmada, 4.3.4.3.'de verilen RP-HPLC kromatogramları incelendiğinde Ş-PAS peynirinin F9 numaralı (74. ve 82.dk arası) fraksiyonunun olduğu bölgenin diğer peynirlere kıyasla daha düşük olduğu ve bu durumun ACE-inhibisyonuna yansıdığı görülmüştür.

Bir başka çalışmada farklı LAB kültürleri ile üretilen ve 1 hafta depolamadan sonra tüketilen peynirlerden depolamanın 5. gününde <3kDa peptit ekstraktları elde edilmiştir. Kullanılan LAB'ne göre elde edilen ekstraktlardan ACE-inhibitör aktivite gösterenlerin sayısı değişkenlik göstermiştir. Çalışma sonucunda araştırmacılar, LAB proteolitik sisteminin bileşiminin ACE-inhibisyonunu etkilediği ve mevcut spesifik LAB'nin proteinazları ve peptidazlarındaki farklılıklardan kaynaklandığı belirtilmiştir (Torres-Llanez vd., 2011). Çiğ ve ısıt işlem görmüş koyun ve keçi süütünün bitkisel proteaz ile pıhtılaştırılması ile üretilen peynirlerden 45 gün depolama elde edilen <3kDa peptitlerin kromatogramında birkaç pik elde edilmiş, yalnızca bazıları ACE-inhibitör veya antioksidan aktivite ya da her ikisi ile ilişkilendirilmiştir (Silva vd., 2006).

Ticari fermente süt örneğinden elde edilen SÇE örneklerinin ACE-inhibitör aktivitesinin %74,3 olduğu, bu örneklerin HPLC ile toplanan fraksiyonlarının

ACE-inhibitör aktivitesinin %12 ile %80 arasında örnek olduğu belirlenmiştir. Yüksek inhibisyonu gösteren fraksiyonlarda SN, VPP, RY gibi küçük peptitlerin varlığı belirlenmiş ve bu yüksek ACE-inhibitör aktivitenin nedeni olarak gösterilmiştir (Hernández-Ledesma vd., 2005). Fermente sütlerden elde edilen farklı molekül ağırlığındaki peptitlerden Sephadex G-15 kullanılarak ACE-inhibitör aktivitesi %12,68 – 74,78 arasında değişen fraksiyonlar yapılan bir çalışmada izole edilmiştir. Bunlardan en yüksek değere sahip fraksiyon RP-HPLC ile saflaştırılmış ve elde edilen piklerin ACE-inhibitör aktivitesinin de %2,74 – 93,86 arasında değiştiği, hidrofobik bölgede aktivitenin daha yüksek çıktığı gözlenmiştir (Wu vd., 2019). Benzer bir çalışmada, Sephadex G-15 kullanılarak elde edilen fraksiyonların ACE-inhibitör aktivitesinin %28,27 - 57,78 arasında değiştiği bildirilmiştir (Xia vd., 2020).

#### 4.6.2. <3kDa örneklerinin DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesi

Bu çalışmada elde edilen <3kDa örneklerinin 90 günlük olgunlaşma sırasında DPPH antioksidan aktivitesi sonuçları Çizelge 4.63 ve Şekil 4.44’de verilmiştir. <3kDa örneklerinin DPPH antioksidan aktivite değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.64.’de verilmiştir. <3kDa örneklerinde belirlenen DPPH antioksidan aktivite sonuçları 90 günlük olgunlaşma süresince %7,48 – 19,50 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.63. <3kDa örneklerine ait DPPH antioksidan aktivite değeri (%)

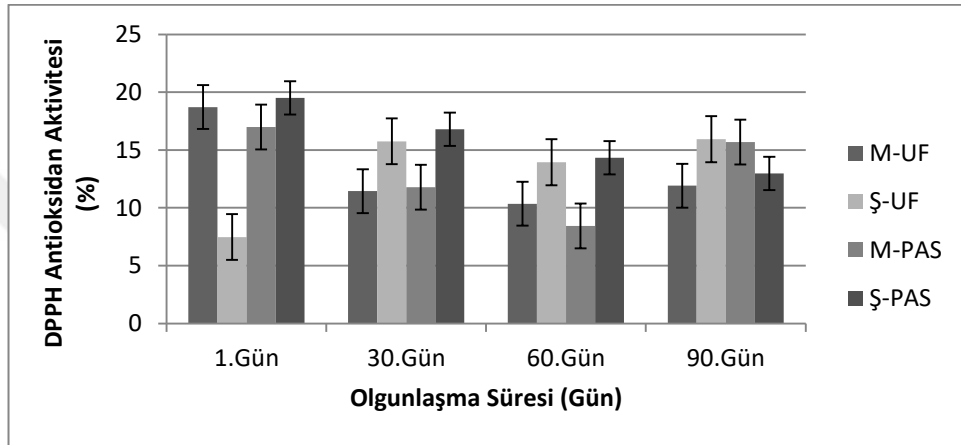
| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                  |                          |                           |                           |
|----------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                      | M-UF                      | Ş-UF                     | M-PAS                     | Ş-PAS                     |
| <b>1.gün</b>         | 18,71±0,04 <sup>Aa</sup>  | 7,48±0,84 <sup>Bb</sup>  | 16,99±1,25 <sup>Aa</sup>  | 19,50±1,36 <sup>Aa</sup>  |
| <b>30.gün</b>        | 11,44±0,67 <sup>Bb</sup>  | 15,75±0,51 <sup>Aa</sup> | 11,78±0,94 <sup>ABb</sup> | 16,80±1,64 <sup>ABa</sup> |
| <b>60.gün</b>        | 10,35±0,48 <sup>Bab</sup> | 13,94±0,30 <sup>Aa</sup> | 8,44±1,43 <sup>Bb</sup>   | 14,32±0,18 <sup>ABa</sup> |
| <b>90.gün</b>        | 11,92±0,43 <sup>Bb</sup>  | 15,94±0,55 <sup>Aa</sup> | 15,69±2,11 <sup>Aa</sup>  | 12,98±1,64 <sup>Bb</sup>  |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.64. <3kDa örneklerine ait DPPH antioksidan aktivite değerlerinin istatistiksel analizi

| Varyasyon Kaynakları | F     | P            |
|----------------------|-------|--------------|
| Süt                  | 1,534 | 0,231        |
| Enzim                | 1,672 | 0,211        |
| Depolama             | 2,526 | <b>0,048</b> |
| Enzim x Depolama     | 4,648 | <b>0,013</b> |
| Süt x Depolama       | 1,760 | 0,189        |
| Süt x Enzim          | 1,256 | 0,276        |



Şekil 4.44. <3kDa örneklerinin DPPH antioksidan aktivitesinin değişimi

Çizelge 4.63. ve Şekil 4.44.'de görüldüğü üzere <3kDa peptit ekstraktı örneklerine ait DPPH antioksidan aktivite sonuçlarının olgunlaşma süresince artış ve azalışlar gösterdiği belirlenmiştir. M-UF ve M-PAS peynirlerine ait <3kDa örneklerinin DPPH antioksidan aktivitesinin 60. günden 90. güne göre artış gösterdiği ( $p>0,05$ ), olgunlaşma sonunda her iki peynirde de artış gözlenirken M-PAS peynirinin artışı önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Ancak bu iki peynirde de olgunlaşma başına göre olgunlaşmanın sonunda DPPH antioksidan aktivitede düşüş olduğu belirlenmiş, bu düşüş M-UF için önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Ş-UF ve Ş-PAS peynirlerine ait <3kDa örneklerin DPPH antioksidan aktiviteleri incelendiğinde, olgunlaşmanın sonuna kadar Ş-PAS peynirinin azalış gösterdiği, Ş-UF peynirinin ise dalgalı bir durum gösterdiği ve olgunlaşma sonunda arttığı tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Olgunlaşmanın başında en yüksek DPPH antioksidan aktivitenin Ş-PAS peynirine ait <3kDa örneğinde olduğu, en düşük DPPH antioksidan aktivitenin ise Ş-UF peynirine ait <3kDa örneğinde

olduğu görülürken ( $p<0,05$ ), olgunlaşma sonunda bu durumun tam tersi olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ). Çizelge 4.64.'de görüldüğü üzere <3kDa örneklerinin 90 günlük olgunlaşma süresince DPPH antioksidan aktivitesi üzerinde depolama ile birlikte enzim x depolama interaksiyonunun etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Literatürde genellikle daha küçük molekül ağırlığına sahip peptitlerin daha yüksek antioksidan özellik gösterdiği bildirilmiştir (Banihashemi vd., 2020). Olgunlaşma süresince peynirlerde aktif peptitlerin varlığı, proteolitik sistem tarafından gerçekleşen sentez ve bozulma arasındaki dengeye bağlıdır (Garbowska vd., 2019). Yapılan birçok çalışmada, peptit ekstraktlarının ACE-inhibisyon ve antioksidan aktivite gibi biyoaktivitelerin peptit miktarına bağlı olduğu bildirilmiştir (Gupta vd., 2009; Pritchard vd., 2010a; Huma vd., 2018; Turan, 2022). Bu çalışmada <3kDa peptit ekstraktlarına ait DPPH antioksidan aktivitenin olgunlaşma süresince dalgalı olmasının nedeninin, ekstraktların protein miktarı ile ilişkili olabileceği 4.3.5. Peptit ekstraktlarının protein değerlerine ait sonuçları incelendiğinde görülmektedir. Özellikle Ş-PAS dışındaki diğer peynirlerdeki protein miktarına ait değişimler ile DPPH antioksidan aktivite değişimlerinin olgunlaşma süresince paralel seyrettiği belirlenmiştir.

Timón vd. (2014; 2019) tarafından yapılan çalışmalarda, farklı orijinlerden (hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal) peynir mayası ilavesi ile üretilen peynirlerin <3kDa peptit ekstraktlarının DPPH antioksidan aktivitesi incelendiğinde, mikrobiyal rennet ile yapılan peynir ekstraktları en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermiş, hayvansal ve bitkisel enzimlerin sonuçlarının birbirine yakın olduğu ve peptit konsantrasyonu arttıkça antioksidan aktivitenin de arttığı belirlenmiştir

Bu çalışmada DPPH antioksidan aktivite sonuçlarının dalgalı olmasının bir diğer sebebi olarak bu metodun literatürde de belirtildiği üzere peptitler için uygun olmaması söylenebilmektedir. Yapılan birçok çalışmada, peptitlerin antioksidan aktivite analizinde DPPH metodunun dalgalı sonuçlar verdiği, ABTS metodunun

bu konuda daha uygun olduğu bildirilmiştir (Chen vd., 2003; Gupta vd., 2009; şanlıdere ve Öner, 2011; Tang vd., 2010; Meira vd., 2012; Sah vd., 2014; Boran, 2021; Aguilar-Toalá vd., 2022). Araştırıcılar bu dalgalanmaların, DPPH'nin yağda çözünen bir serbest radikal olmasından kaynaklanması nedeniyle olabileceğini; dolayısıyla bu reaktifin peptit ekstraktı gibi sulu bir ekstraktta çözülmesinin zor olduğunu, buna ek olarak DPPH radikalının analiz esnasında cihazda spektral örtüşmeye neden olabilecek oksitleyici substrat veya reaksiyon indikatör molekülü olarak görev yapabildiğı, bu nedenle sonuçların olumsuz yönde etkilenebileceğı bildirilmiştir (Tang vd., 2010; şanlıdere ve Öner, 2011; Meira vd., 2012; Sah vd., 2014; Aguilar-Toalá vd., 2022).

UF süte starter kültüre ek olarak yardımcı kültürün de katılması ile üretilen Feta peynirlerinden elde edilen SÇE örneklerinde en yüksek antioksidan aktivite değerini (%31,45) gösteren örnekten <5, 5 - 10 ve >10 kDa molekül ağırlığındaki peptit ekstraktları elde edilmiştir. Bu ekstraktlar arasında >10 kDa molekül ağırlığında olanın daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Yousefi vd., 2021).

Farklı İran Koopeh peynirlere ait SÇE örneklerinin antioksidan aktivitesinin en yüksek %75,5 - 77,8 arasında değıştiğı, <2 kDa olan fraksiyonun herhangi bir aktivite göstermediğı belirlenirken en yüksek antioksidan aktivitenin 2–10 kDa fraksiyonunda %24,7 olarak gözleendiğı bildirilmiştir (Banihashemi vd., 2020).

Cheddar peyniriden elde edilen farklı molekül ağırlığındaki peptit ekstraktlarının antioksidan aktivitesinin, molekül ağırlığı 10 kDa'dan fazla olan peptitlerde en yüksek olduğı bildirilmiştir (Pritchard vd., 2010b). Bu çalışmada <3kDa peptit ekstraktlarının DPPH yöntemi ile belirlenen antioksidan aktivite sonuçlarının SÇE örneklerine göre daha düşük olduğı görölmekte, bu çalışmalar ile paralellik göstermektedir. Bu çalışmaların aksine literatürde düşük molekül ağırlığına sahip peptit ekstraktlarının DPPH antioksidan aktivitesinin daha yüksek olduğına dair çalışmalar da mevcuttur (Pritchard vd., 2010a; Liu vd., 2018; Hsu ve Tain, 2019; Yang vd., 2021).

Yapılan bir çalışmada, probiyotik Cheddar peynirinde, olgunlaşma ilerledikçe antioksidan aktivitenin arttığı, kültür ilave edilen grubun olgunlaşma sırasında kontrol peynirinden daha yüksek DPPH aktivitesi gösterdiği belirlenmiş olup bu aktivite proteoliz derecesi ile ilişkilendirilmiştir (Liu vd., 2018).

Geleneksel ve fermente ovalama peynirlerinden elde edilen <10kDa peptit ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin, fermente olan grubun antioksidan aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Wei vd., 2022b).

Koyun ve keçi sütlerinden yapılan İzmir Tulum peynirlerinden elde edilen <3kDa peptit ekstraktlarının koyun İzmir Tulum peynirinin antioksidan aktivitesinin 60. güne kadar arttığı belirlenirken, keçi İzmir Tulum peynirinde ise tam tersi olarak antioksidan aktivitesinde düşüş olduğu belirlenmiştir. Olgunlaşmanın 60. gününden sonra koyun İzmir Tulum peynirinin antioksidan aktivitesinin azaldığı, keçi İzmir Tulum peynirine ait değerlerin arttığı gözlenmiştir (Kısak, 2021).

#### **4.6.3. <3kDa örneklerinin ABTS yöntemi ile antioksidan aktivitesi**

Bu çalışmada elde edilen <3kDa örneklerinin 90 günlük olgunlaşma sırasında ABTS antioksidan aktivite sonuçları Çizelge 4.65.'de (10 – 30 µL örnek hacmi için) ve Şekil 4.45'de (10 µL örnek hacmi için) verilmiştir. <3kDa örneklerinin 10 – 30 µL örnek hacmi için ABTS antioksidan aktivitesi değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.66.'da verilmiştir. <3kDa örneklerinde belirlenen ABTS antioksidan aktivitesi değeri sonuçları 10, 20 ve 30 µL örnek hacimler için 90 günlük olgunlaşma süresince sırasıyla %35,28– 65,98, %54 – 74,01 ve %63,25 - 77,42 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.65. <3kDa örneklerine ait ABTS antioksidan aktivite değeri (%)

| OLGUNLAŞMA SÜRESİ |       | ÖRNEKLER                      |                              |                              |                               |
|-------------------|-------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
|                   |       | M-UF                          | Ş-UF                         | M-PAS                        | Ş-PAS                         |
| 1.gün             | 10 µL | 57,72±0,42 <sup>Ba</sup>      | 51,87±0,04 <sup>Bb</sup>     | 50,05±1,01 <sup>Bb</sup>     | 55,30±1,71 <sup>Ba</sup>      |
|                   | 20 µL | 65,13±1,25 <sup>A*a*</sup>    | 59,42±0,68 <sup>C*b*</sup>   | 58,82±1,22 <sup>B*b*</sup>   | 67,53±0,96 <sup>A*a*</sup>    |
|                   | 30 µL | 68,87±3,22 <sup>AB**a**</sup> | 67,19±0,63 <sup>C**a**</sup> | 63,25±1,00 <sup>B**b**</sup> | 71,11±3,2 <sup>A**a**</sup>   |
| 30.gün            | 10 µL | 56,82±0,55 <sup>Ba</sup>      | 54,72±0,59 <sup>Ba</sup>     | 35,28±0,89 <sup>Db</sup>     | 38,22±2,89 <sup>Cb</sup>      |
|                   | 20 µL | 62,03±4,24 <sup>A*a*</sup>    | 61,31±0,15 <sup>B*a*</sup>   | 54±1,59 <sup>C*b*</sup>      | 65,16±1,01 <sup>A*a*</sup>    |
|                   | 30 µL | 72,41±1,89 <sup>AB**a**</sup> | 71,85±1,49 <sup>B**a**</sup> | 65,91±1,32 <sup>B**b**</sup> | 67,15±3,34 <sup>A**ab**</sup> |
| 60.gün            | 10 µL | 51,15±1,9 <sup>Cb</sup>       | 62,95±1,52 <sup>Aa</sup>     | 40,07±0,83 <sup>Cc</sup>     | 35,93±1,88 <sup>Cc</sup>      |
|                   | 20 µL | 54,52±3,13 <sup>B*b*</sup>    | 70,23±0,68 <sup>A*a*</sup>   | 58,69±1,61 <sup>B*b*</sup>   | 59,24±0,61 <sup>B*b*</sup>    |
|                   | 30 µL | 61,26±2,68 <sup>B**b**</sup>  | 77,42±1,56 <sup>A**a**</sup> | 65,09±0,38 <sup>B**b**</sup> | 65,99±0,86 <sup>A**b**</sup>  |
| 90.gün            | 10 µL | 65,76±0,45 <sup>Aa</sup>      | 65,98±2,77 <sup>Aa</sup>     | 64,23±0,21 <sup>Aa</sup>     | 62,27±0,77 <sup>Aa</sup>      |
|                   | 20 µL | 74,01±1,50 <sup>A*a*</sup>    | 69,21±0,49 <sup>A*b*</sup>   | 66,94±0,93 <sup>A*b*</sup>   | 66,19±1,01 <sup>A*b*</sup>    |
|                   | 30 µL | 77,38±0,86 <sup>A**a**</sup>  | 71,54±0,77 <sup>B**b**</sup> | 71,81±0,98 <sup>A**b**</sup> | 70,88±1,37 <sup>A**b**</sup>  |

A,B,C: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

a,b,c: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

A\*,B\*,C\*: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

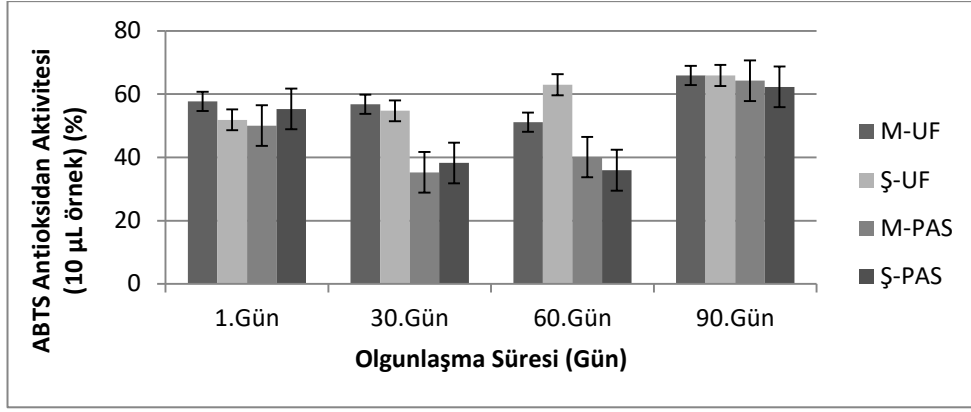
a\*,b\*,c\*: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

A\*\*,B\*\*C\*\*: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

a\*\*,b\*\*,c\*\*: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.66. <3kDa örneklerine ait ABTS antioksidan aktivite değerlerinin istatistiksel analizi

|                      | 10 µL  |              | 20 µL  |              | 30 µL |              |
|----------------------|--------|--------------|--------|--------------|-------|--------------|
| Varyasyon Kaynakları | F      | P            | F      | P            | F     | P            |
| Süt                  | 74,436 | <b>0,000</b> | 5,430  | <b>0,026</b> | 7,958 | <b>0,008</b> |
| Enzim                | 0,511  | 0,479        | 5,653  | <b>0,023</b> | 5,073 | <b>0,031</b> |
| Depolama             | 44,036 | <b>0,000</b> | 10,063 | <b>0,000</b> | 5,400 | <b>0,004</b> |
| Enzim x Depolama     | 0,342  | 0,795        | 3,347  | <b>0,030</b> | 4,339 | <b>0,011</b> |
| Süt x Depolama       | 17,854 | <b>0,000</b> | 1,525  | 0,225        | 0,670 | 0,576        |
| Süt x Enzim          | 0,077  | 0,783        | 3,475  | 0,071        | 0,030 | 0,862        |



Şekil 4.45. <3kDa örneklerinin ABTS antioksidan aktivitesinin değişimi

Çizelge 4.65. ve Şekil 4.45.'de görüldüğü üzere peynirlerden olgunlaşma süresince elde edilen <3kDa örneklerinin ABTS antioksidan aktivitesi değerlerinde artış ve azalışlar görülmüş, olgunlaşma sonunda tüm peynirlerde artış olduğu belirlenmiştir. Olgunlaşmanın 30. gününde Ş-UF dışındaki tüm peynirler azalış gösterirken, Ş-UF peyniri olgunlaşma sonuna kadar artış göstermiştir ( $p<0,05$ ). M-PAS peyniri 60. günden itibaren artış gösterse de M-UF ve Ş-PAS peynirleri olgunlaşma sonuna kadar azalış gösterip, olgunlaşma sonunda artış göstermiştir ( $p<0,05$ ). Bu çalışmada olgunlaşmanın 1. ve 30. günlerinde UF süttten üretilen peynirlerde mikrobiyal enzim yüksek değer verirken pastörize süttten üretilen peynirlerde şirden mayasının yüksek değer verdiği görülmüş ve bu farklılık 1. günde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Olgunlaşmanın 60. gününde ise bu durum tam tersi olmuştur ve UF peynirlerden M-UF ve Ş-UF arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Olgunlaşmanın sonunda ise örnekler arasındaki farklılık önemli bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Olgunlaşmanın başında <3kDa peptit ekstraktları arasında 10 µL örnek hacmi için ABTS antioksidan aktivitesi değerleri en yüksek M-UF peynirine ait ekstraktlarda gözlenirken en düşük M-PAS peynirine ait ekstraktta gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Olgunlaşmanın sonunda ise bu sonuç şirden mayası ile üretilen peynirler arasında olduğu gözlenmiş ( $p>0,05$ ). Çizelge 4.66.'da görüldüğü üzere peynirlerin <3kDa örneklerinin 90 günlük olgunlaşma süresince ABTS antioksidan aktivitesi değeri üzerinde; 10 µL örnek hacminde elde edilen

sonuçlarda süt, depolama ve süt x depolama interaksiyonunun etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuş olup 20 µL ve 30 µL örnek hacminde elde edilen sonuçlar için süt, enzim, depolama ve enzim x depolama interaksiyonunun etkisi önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Bu çalışmada SÇE örneklerinde olduğu gibi <3kDa peptit ekstraktlarının da DPPH ve ABTS yöntemleri ile antioksidan analizleri sonuçlarının birbirinden farklı olduğu, DPPH antioksidan aktivitesinin genel olarak ABTS antioksidan değerlerinden daha düşük olduğu görülmektedir. Bu farklılığın temelinde, DPPH ve ABTS yöntemlerinin kendi içlerindeki farklı esaslar bulunmaktadır. Bunun sonucunda ABTS ile antioksidan analizinin peptitler ile çalışma bakımından daha uygun bir yöntem olduğu literatürde bilinmektedir (Chen vd., 2003; Gupta vd., 2009; Şanlıdere ve Öner, 2011; Tang vd., 2010; Meira vd., 2012; Boran, 2021; Aguilar-Toalá vd., 2022 )

Crema de Chiapas, Fresco ve Cocido peynirlerinden elde edilen <3kDa ekstraktlarının antioksidan kapasitesinin depolama süresine bağlı olduğu gözlenmiştir. Peptitlerin antioksidan etkinliğinin, sekanslarının sağladığı benzersiz kimyasal ve fiziksel özelliklere, özellikle de oksidatif reaksiyonu başlatmayan veya ilerletmeyen peptit radikallerinin kararlılığına atfedilmiştir. Peynirlerden elde edilen peptitlerin radikal süpürme kapasitesi, amino asit dizisinin konformasyonlarından kaynaklanıyor olabildiği, spesifik olarak prolin, valin, lösin ve fenilalanin gibi bazı anahtar amino asitlerin etkili olabileceği vurgulanmıştır (Aguilar-Toalá vd., 2022). Farklı yağ ve tuz oranına sahip 12 ay olgunlaştırılmış Parmigiano Reggiano peynirlerinin antioksidan aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, düşük yağ ve tuz içeren grubun ortalama antioksidan değerlerinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Solieri vd., 2020). Helal ve Tagliazucchi (2023) tarafından yapılan çalışmada, farklı yöntemlerle üretilmiş peynirlerden elde edilen <3kDa peptit ekstraktları arasında telemesi pişirilmiş ve olgunlaştırılmış peynirlerde en yüksek antioksidan aktivitenin görüldüğü tespit edilmiştir (Helal ve Tagliazucchi, 2023).

Literatürde peptit ekstraktlarının antioksidan aktivitesinin genel olarak fraksiyon boyutundan önemli ölçüde etkilendiği, küçük moleküler ağırlıklara sahip peptitlerin daha yüksek antioksidan aktiviteye sebep olduğu bildirilmiştir (Chang vd., 2013; Irshad vd., 2015; Banihashemi vd., 2020; Yang vd., 2021). Farklı İran Koopeh peynirlere ait SÇE'nin antioksidan aktivitesine göre düşük molekül ağırlığındaki ekstraktların antioksidan aktivitesinin daha yüksek olduğu (%83,5 - 90), aralarında en yüksek aktiviteyi <2 kDa peptit ekstraktının gösterdiği belirlenmiştir (Banihashemi vd., 2020). Düşük moleküler ağırlıklı peptitlerin, daha küçük sterik engelleri ve serbest radikallerle reaksiyona girmeye eğilimli hidrofobik ve hidrofilik amino asit kalıntılarına sahip kısa zincirli aktif merkezleri nedeniyle daha yüksek antioksidan özellikler sergiledikleri literatürde bildirilmiştir (Hsu ve Tain, 2019). Öte yandan, peptitlerin hidrofobik karakteri, biyolojik membranların çoklu doymamış zincirli yağ asitleri gibi hidrofobik hücrel hedeflere peptidin erişilebilirliğini arttırdığı için antioksidan özelliklerin arttırılmasında önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür (Zou vd., 2016).

Bazı geleneksel peynirlerden elde edilen SÇE örnekleri, <3kDa ile >3kDa peptitleri içeren iki farklı fraksiyona ayrılmıştır. Antioksidan aktivitelerinin <3kDa peptitler için 12,18 - 86,85 mg askorbik asit eşdeğeri /g protein değerinde, >3kDa peptitler için 7,32 - 16,38 mg askorbik asit eşdeğeri /g protein değerinde olduğu, istatistiksel düzeyde >3kDa peptit örnekleri arasında farklılık bulunmadığı bildirilmiştir (Turan, 2022). Yardımcı kültür ile üretilen Cheddar peynirlerinden olgunlaşmanın 5. ayında elde edilen <3kDa, 3-10 kDa ve >10 kDa peptit ekstraktlarının antioksidan aktivitesi sırasıyla %86,73, %75,46 ve %66,33 olarak belirlenmiştir (Yang vd., 2021). Bunun aksine yapılan bir başka çalışmada, fermente koyun sütünden elde edilen 10 kDa ve 3kDa UF filtreden örnekler geçirilmiş ve antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. 10 kDa örneklerin antioksidan aktivitesi, 3 kDa örneklerle göre daha yüksek bulunmuştur (Ashokbhai vd., 2022).

Geleneksel ve fermente ovalama peynirlerinden elde edilen <10kDa peptit ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada, fermente

olan grubun antioksidan aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Wei vd., 2022b). Yapılan bir çalışmada, koyun ve keçi sütlerinden yapılan İzmir Tulum peynirlerinden elde edilen <3kDa peptit ekstraktlarının antioksidan aktivitesinin olgunlaşma süresince arttığı gözlenmiştir (Kısak, 2021). Benzer olarak olgunlaşma süresince antioksidan aktivitenin arttığı Huma vd. (2018) ve Ayyash vd. (2021) tarafından da bildirilmiştir.

#### 4.6.4. <3kDa örneklerinin TEAC antioksidan aktivitesi

Bu çalışmada elde edilen <3kDa örneklerinin 90 günlük olgunlaşma sırasında TEAC antioksidan aktivite sonuçları Çizelge 4.67 ve Şekil 4.46'da verilmiştir. <3kDa örneklerinin TEAC antioksidan aktivite değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.68.'de verilmiştir. <3kDa örneklerinde belirlenen TEAC değerleri 90 günlük olgunlaşma süresince 17,96 – 26,47  $\mu\text{M}$  TEAC/mg örnek arasında değişmiştir.

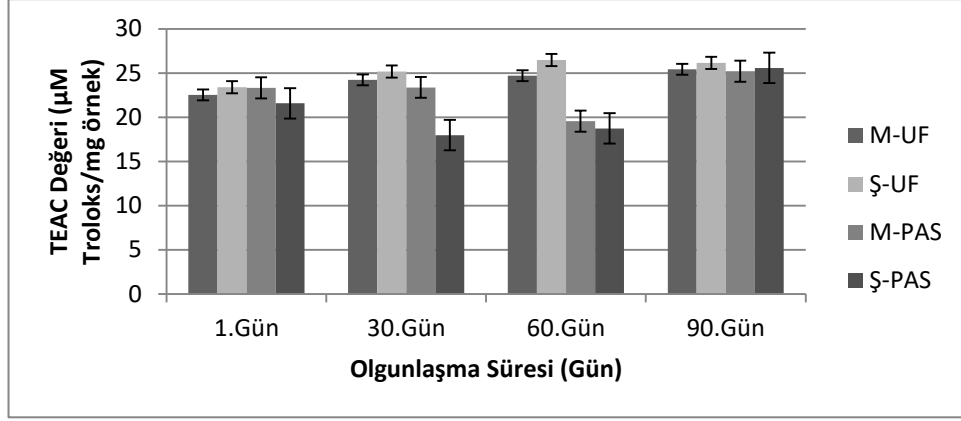
Çizelge 4.67. <3kDa örneklerine ait TEAC değerleri ( $\mu\text{M}$  TEAC/mg örnek)

| OLGUNLAŞMA<br>SÜRESİ | ÖRNEKLER                  |                          |                            |                           |
|----------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                      | M-UF                      | Ş-UF                     | M-PAS                      | Ş-PAS                     |
| <b>1.gün</b>         | 22,53±0,24 <sup>Aa</sup>  | 23,4±1,44 <sup>Aa</sup>  | 23,31±1,28 <sup>ABa</sup>  | 21,57±0,18 <sup>Ba</sup>  |
| <b>30.gün</b>        | 24,22±2,12 <sup>Aa</sup>  | 25,15±1,59 <sup>Aa</sup> | 23,37±2,18 <sup>ABab</sup> | 17,96±1,56 <sup>Cb</sup>  |
| <b>60.gün</b>        | 24,7±0,23 <sup>Aa</sup>   | 26,47±1,81 <sup>Aa</sup> | 19,55±0,17 <sup>Bb</sup>   | 18,73±0,23 <sup>Cb</sup>  |
| <b>90.gün</b>        | 25,43±0,34 <sup>Aab</sup> | 26,14±0,34 <sup>Aa</sup> | 25,20±0,06 <sup>Ab</sup>   | 25,57±0,05 <sup>Aab</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.68. <3kDa örneklerine ait TEAC değerlerinin istatistiksel analizi

| Varyasyon Kaynakları | F      | P            |
|----------------------|--------|--------------|
| Süt                  | 43,139 | <b>0,000</b> |
| Enzim                | 0,914  | 0,346        |
| Depolama             | 12,135 | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | 2,249  | 0,100        |
| Süt x Depolama       | 11,414 | <b>0,000</b> |
| Süt x Enzim          | 11,741 | <b>0,002</b> |



Şekil 4.46. <3kDa örneklerinin TEAC değerinin değişimi

Çizelge 4.67. ve Şekil 4.46.'da görüldüğü üzere <3kDa peptit ekstraktları arasında UF sütten üretilen Beyaz peynirlerin TEAC değerleri olgunlaşma süresi boyunca sürekli artmıştır ancak istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Pastörize sütten üretilen Beyaz peynirlere ait <3kDa peptit ekstraktlarının TEAC değeri olgunlaşmanın başına göre 60. günde azalış göstermiştir ( $p<0,05$ ). Olgunlaşma süresinin sonunda ise tüm Beyaz peynirlerin <3kDa peptit ekstraktlarının TEAC değerleri artmış ve bu artış pastörize sütten üretilen peynirler için istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Çizelge 4.68.'de görüldüğü üzere peynirlerin <3kDa örneklerinin 90 günlük olgunlaşma süresince TEAC değerleri üzerinde süt, depolama ile birlikte süt x depolama ve süt x enzim interaksiyonlarının etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). <3kDa örneklerinin TEAC değerleri üzerinde etkisi önemli bulunan süt x enzim interaksiyonunun dışında önemli etki gösterdiği belirlenen diğer varyasyon kaynaklarının, ABTS antioksidan aktivitesi sonuçlarında da ortak olarak etkisi önemli bulunmuştur. DPPH antioksidan aktivitesi sonuçlarından farklı olarak, TEAC ve ABTS antioksidan aktivite sonuçlarında kullanılan sütün etkisi <3kDa örnekleri üzerinde önemli bulunmuştur.

Peptitlerin radikalleri süpürme aktiviteleri üzerine hidrofobik amino asitlerin çoğunun antioksidan aktiviteye yüksek oranda etki ettiği ve yapısında bu amino asitleri bulunduran peptitlerin aktivite için önemli olduğu Yao vd. (2018) tarafından belirtilmiştir. Yapılan birçok çalışmanın sonucunda, peptitlerin amino asit bileşimi, aromatik ve hidrofobik amino asit kalıntılarının varlığı ile

birlikte amino asit dizilimi, boyutu, miktarı ve konfigürasyonu (terminal amino gruplarının açığa çıkması) ve serbest amino asitlerin konsantrasyonunun toplu olarak antioksidan aktiviteye katkıda bulunduğu görülmüş ve araştırmaların sonucunda bu özelliğin farklı yöntemlerle değerlendirilmesinin önemi vurgulanmıştır (Wu vd., 2006; Gómez-Ruiz vd., 2008; Phanturat vd., 2010; Ajibola vd., 2011; Sonklin vd., 2018). Fermente sütte yapılmış bir çalışmada, fermantasyonda kullanılan kültürün proteolitik/peptidolitik enzimleri tarafından  $\alpha_{s1}$  – ve  $\beta$ -CN'nin hidrolize olmasının genel olarak antioksidan aktivitede artışa neden olduğu tespit edilmiş ve araştırmacılar peptitlerde hidrofobik ve aromatik amino asit kalıntılarının varlığı, radikal yakalamada belirleyici bir faktör olduğu vurgulanmıştır (Moslehishad vd., 2013).

Yapılan bir çalışmada, kazeinin pepsin ve pepsin-tripsin-kimotripsin enzimleri ile hidrolize edildikten sonra farklı molekül ağırlığındaki peptit ekstraktları elde edilmiş ve antioksidan aktiviteleri TEAC değeri üzerinden verilmiştir. 1-3 kDa molekül ağırlığındaki peptitlerin TEAC antioksidan aktivitesinin, 5-10 kDa ve 3-5 kDa molekül ağırlığındaki peptitlerden daha düşük olduğu belirlense de genel olarak molekül ağırlığı azaldıkça aktivitenin arttığı belirtilmiştir (Shanmugam vd., 2015). El Hatmi vd. (2016) peynir altı suyu fraksiyonundan, 3 ve 10 kDa'lık peptit ekstraktları elde etmiş ve 3 kDa fraksiyonunu, diğer fraksiyonlara kıyasla en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlemiştir. Bu çalışmaların aksine literatürde molekül ağırlığı ile orantılı olarak aktivitenin arttığını bildiren çalışmalar da mevcuttur. Starter kültür ile birlikte yardımcı kültür kullanılarak Beyaz peynir üretimi yapılmış bir çalışmada, peynirlerden elde edilen pH 4,6-SN fraksiyonlar ile bunların <3kDa ve >3kDa fraksiyonlarının antioksidan aktivitesine bakılmış ve olgunlaşmanın tüm günlerinde >3kDa peptitlerin antioksidan değerinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Gürkan, 2019).

Başka bir çalışmada molekül ağırlığına göre ayrımı gerçekleştirilmemiş ekstraktların antioksidan aktivitesinin, <3kDa ve 3-10 kDa molekül ağırlığındaki peptit ekstraktlarına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Aguilar-Toalá vd., 2017). Ranchero peynirlerinden elde edilen 5-10 kDa, 5-3 kDa, 3-1 kDa ve <1 kDa molekül ağırlığındaki peptitleri içeren fraksiyonlarının antioksidan

aktiviteye sahip olduğunu ve bu fraksiyonlar arasında 5-10 kDa fraksiyonların 0,62 mM TEAC değeri ile en yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda çalışma sonucunda, Panela peynirine ait peyniraltı suyu 3-1 kDa peptitleri içeren fraksiyonlarının 0,11 mM TEAC değeri ile en düşük değere sahip olduğu tespit edilmiştir (Tarango-Hernández vd., 2015).

#### 4.7. *in vitro* Sindirim Örneklerine Ait Sonuçlar

Bu çalışmada, 3.2.6.'da belirtildiği üzere peynirlerin olgunlaşma süresinin 30. ve 90.gün örneklerine *in vitro* sindirim uygulanmıştır. Sindirim uygulamasında, mide sindirimini taklit etmek için yapılan gastrik sindirim ile SS fazı örnekleri elde edilmiştir. Gastrointestinal ince bağırsakta gerçekleşen sindirimi taklit etmek için kullanılan diyaliz tüpünün içindeki kısım (İÇ faz), ince bağırsaktan emilip kana geçen kısmı temsil etmektedir. Dışta kalan (DIŞ faz) ise örneğin ince bağırsakta emilmeyen kısmını temsil etmektedir.

##### 4.7.1. Sindirim örneklerinin protein değeri

Bu çalışmada peynir örneklerine uygulanan *in vitro* sindirim uygulaması sonucu elde edilen İÇ, DIŞ ve SS sindirim fazlarına ait 30. ve 90. gün protein değeri sonuçları sırası ile Çizelge 4.69, 4.70 ve Şekil 4.47'de verilmiştir. Sindirim fazlarının protein değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.71.'de verilmiştir. Belirlenen protein değeri sonuçları 30. ve 90. günlerde SS, DIŞ ve İÇ sindirim fazları için sırası ile 8,45 – 15,41, 5,79 – 11,74 ve 5,71 – 6,16 mg/mL arasında değişmiştir.

Çizelge 4.69. 30. gün sindirim fazlarının protein değerleri (mg/mL)

| SİNDİRİM<br>FAZI | ÖRNEKLER                 |                          |                         |                          |
|------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
|                  | M-UF                     | Ş-UF                     | M-PAS                   | Ş-PAS                    |
| SS               | 13,42±0,16 <sup>Aa</sup> | 11,83±0,10 <sup>Ab</sup> | 8,74±0,3 <sup>Ac</sup>  | 8,45±0,13 <sup>Bc</sup>  |
| DIŞ              | 10,65±0,65 <sup>Ba</sup> | 9,88±0,04 <sup>Ba</sup>  | 8,78±0,24 <sup>Aa</sup> | 10,52±0,16 <sup>Aa</sup> |
| İÇ               | 5,87±0,07 <sup>Ca</sup>  | 5,77±0,03 <sup>Ca</sup>  | 5,90±0,06 <sup>Ba</sup> | 6,16±0,05 <sup>Ca</sup>  |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

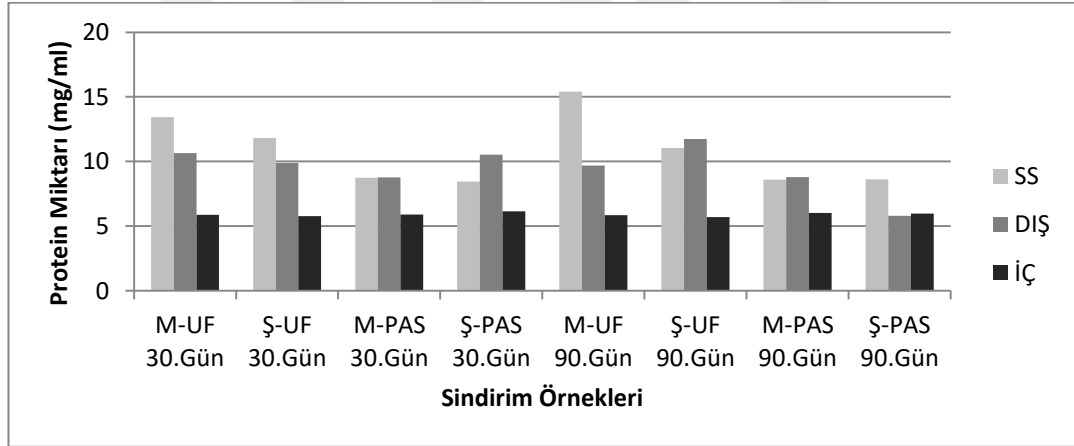
Çizelge 4.70. 90. gün sindirim fazlarının protein değerleri (mg/mL)

| SİNDİRİM<br>FAZI | ÖRNEKLER                 |                          |                         |                         |
|------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                  | M-UF                     | Ş-UF                     | M-PAS                   | Ş-PAS                   |
| SS               | 15,41±0,15 <sup>Aa</sup> | 11,06±0,17 <sup>Ab</sup> | 8,55±0,1 <sup>Ac</sup>  | 8,62±0,02 <sup>Ac</sup> |
| DIŞ              | 9,70±0,08 <sup>Bb</sup>  | 11,74±0,32 <sup>Aa</sup> | 8,79±0,23 <sup>Ab</sup> | 5,79±0,04 <sup>Bc</sup> |
| İÇ               | 5,84±0,07 <sup>Ca</sup>  | 5,71±0,12 <sup>Ba</sup>  | 6,02±0,07 <sup>Ba</sup> | 5,97±0,05 <sup>Ba</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.71. Sindirim fazlarının protein değerlerinin istatistiksel analizi

| Varyasyon Kaynakları | SS      |              | DIŞ   |              | İÇ     |              |
|----------------------|---------|--------------|-------|--------------|--------|--------------|
|                      | F       | P            | F     | P            | F      | P            |
| Süt                  | 246,567 | <b>0,000</b> | 9,426 | <b>0,013</b> | 16,818 | <b>0,003</b> |
| Enzim                | 31,814  | <b>0,000</b> | 0,000 | 0,999        | 0,006  | 0,941        |
| Depolama             | 1,294   | 0,285        | 2,089 | 0,182        | 0,481  | 0,506        |
| Enzim x Depolama     | 4,975   | <b>0,048</b> | 0,536 | 0,483        | 2,667  | 0,137        |
| Süt x Depolama       | 1,166   | 0,308        | 4,571 | 0,061        | 0,006  | 0,941        |
| Süt x Enzim          | 26,326  | <b>0,001</b> | 0,921 | 0,362        | 4,632  | 0,060        |



Şekil 4.47. Sindirim fazlarının protein değerlerinin değişimi

Çizelge 4.69, 4.70'de ve Şekil 4.47'de peynirlerin sindirim fazlarının protein değeri verilmiştir. SS fazlarının protein değerinin olgunlaşma süresince UF sütten üretilen peynirlerde daha yüksek olduğu gözlenmiştir (p<0,05). Olgunlaşmanın 30. ile 90. günlerinde tüm peynirlerin intestinal İÇ fazına ait protein değerlerinde, gastrik bir faz olan SS fazına göre azalış görülmüştür (p<0,05). Olgunlaşmanın her iki gününde de peynir örneklerine ait İÇ fazının protein değeri birbirine çok yakın değerler göstermiş ve aralarındaki farklılık

önemli bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Diğer bir intestinal faz olan DIŞ fazın protein değerinde ise peynirlere ve günlere göre farklılıklar olduğu belirlenmiştir. 30. günde M-UF ve Ş-UF peynirlerin DIŞ fazın protein değerinde SS fazına göre önemli bir azalış olduğu görülürken, Ş-PAS'da istatistiksel olarak önemli bir artış olduğu ( $p<0,05$ ) ve M-PAS'daki değişimin ise önemsiz olduğu görülmüştür ( $p>0,05$ ). 90. günde ise DIŞ fazının protein değerinin SS fazına göre azalışı M-UF ve Ş-PAS peynirleri için önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Çizelge 4.71.'de görüldüğü üzere 30. ve 90. gün protein değeri sonuçlarında tüm sindirim fazlarında sütün etkisi istatistiksel olarak önemli bulunurken, SS fazı için ayrıca enzim ve enzim x depolama ile süt x enzim interaksiyonlarının etkisi de istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Chhurpi peynirine *in vitro* sindirim uygulanmış ve hidrolize protein değerinde yapılan çalışmalarda önemli bir artış gözlemlenmiştir. Chhurpi'nin pepsin ile sindirimden sonra hidrolize protein değerinin, sindirim öncesine göre arttığı belirlenmiştir. Pankreatin ile sindirim sonrasında ise protein değerinin pepsin ile sindirimde gözlenen değere göre daha da artış gösterdiği tespit edilmiştir (Abedin vd., 2022; Chourasia vd., 2022).

Parmigiano-Reggiano peynirlerinde hem gastrik hem de bağırsak sindiriminden sonra 24.ay peynir örneğinden salınan peptit miktarının, 12. ve 18. ay peynir örneklerinden salınan peptit miktarından önemli ölçüde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bağırsak sindirimi ile tüm örneklerde peptit miktarında bir artış olduğu belirtilmiştir (Martini vd., 2020). Bu çalışmada ise genellikle pankreatin ile sindirim sonrasında elde edilen DIŞ ve İÇ fazların protein değerinin, pepsin ile sindirim ile elde edilen SS fazına göre daha az veya istatistiksel olarak önemsiz düzeyde yakın değerlerde olduğu belirlenmiştir.

Farklı probiyotiklere sahip Cheddar peynirinin *in vitro* sindirim sonrasında elde edilen gastrik fazın protein değerinin intestinal fazın protein değerinden daha düşük olduğu, sindirimden sonra peynir örneklerinin peptit içeriğinin %25,39 – 50 değerleri arasında artış gösterdiği belirlenmiştir (Hao vd., 2021). Geleneksel ve fermente ovalama peynirlerinin mide sindirimi sonrası polipeptit içeriği

sırasıyla 2,80 ve 3,32 mg/mL, gastrik sindirim sonrası 3,51 ve 3,85 mg/mL'ye yükseldiği bildirilmiştir (Wei vd., 2022a). Yapılan bir çalışmada, farklı proteolitik düzeyde prosesi olan süt ürünlerinin *in vitro* sindirimi sonrasında protein değerinin de farklı olduğu görülmüştür (Kopf-Bolanz vd., 2014).

#### 4.7.2. Sindirim örneklerinin ACE-inhibitör aktivitesi

Bu çalışmada peynir örneklerine uygulanan *in vitro* sindirim uygulaması sonucu elde edilen İÇ, DIŞ ve SS sindirim fazlarına ait 30. ve 90. gün ACE-inhibitör aktivite sonuçları sırası ile Çizelge 4.72, 4.73.'de ve Şekil 4.48'de verilmiştir. Sindirim fazlarının ACE-inhibitör aktivitesi değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.74.'de verilmiştir. Belirlenen ACE-inhibitör aktivitesi sonuçları 30. ve 90. günlerde SS DIŞ ve İÇ sindirim fazı örnekleri için sırası ile %52,57 – 60,12, %52,66 – 73,98 ve %21,15 – 48,08 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.72. 30. gün sindirim fazlarının ACE-inhibitör aktivitesi(%)

| SİNDİRİM<br>FAZI | ÖRNEKLER                 |                          |                          |                          |
|------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                  | M-UF                     | Ş-UF                     | M-PAS                    | Ş-PAS                    |
| SS               | 56,04±1,49 <sup>Ba</sup> | 55,10±0,5 <sup>Ba</sup>  | 52,57±0,54 <sup>Ba</sup> | 57,10±0,25 <sup>Ba</sup> |
| DIŞ              | 65,16±0,13 <sup>Ab</sup> | 61,12±1,12 <sup>Ac</sup> | 70,99±0,62 <sup>Aa</sup> | 73,98±0,29 <sup>Aa</sup> |
| İÇ               | 21,15±0,25 <sup>Cd</sup> | 33,28±0,17 <sup>Cb</sup> | 30,94±0,33 <sup>Cc</sup> | 36,96±0,33 <sup>Ca</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

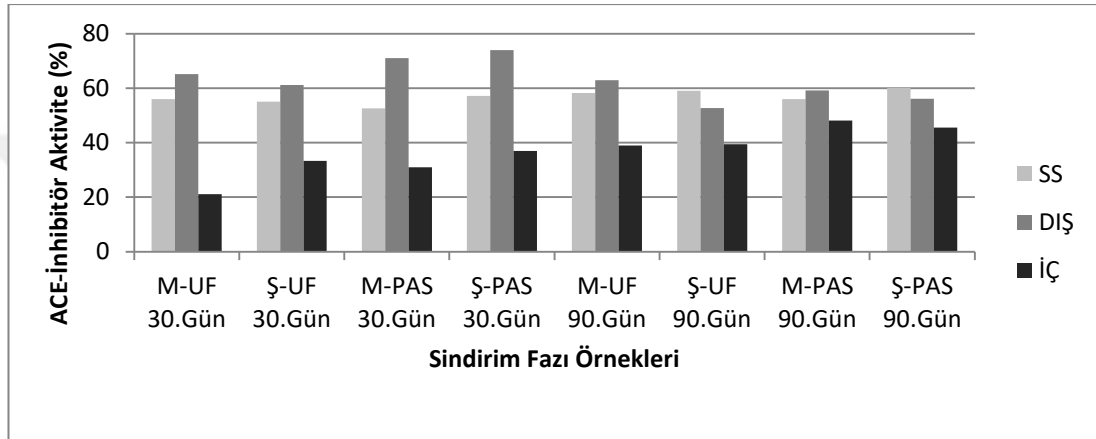
Çizelge 4.73. 90. gün sindirim fazlarının ACE-inhibitör aktivitesi (%)

| SİNDİRİM<br>FAZI | ÖRNEKLER                 |                          |                           |                          |
|------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
|                  | M-UF                     | Ş-UF                     | M-PAS                     | Ş-PAS                    |
| SS               | 58,22±1,37 <sup>Aa</sup> | 59,00±0,5 <sup>Aa</sup>  | 55,93±0,33 <sup>Aa</sup>  | 60,12±0,12 <sup>Aa</sup> |
| DIŞ              | 62,95±0,29 <sup>Aa</sup> | 52,66±2,28 <sup>Bb</sup> | 59,13±0,46 <sup>Aab</sup> | 56,1±0,17 <sup>Bb</sup>  |
| İÇ               | 38,96±0,33 <sup>Bb</sup> | 39,38±0,42 <sup>Cb</sup> | 48,08±0,59 <sup>Ba</sup>  | 45,57±0,75 <sup>Ca</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.74. Sindirim fazlarının ACE-inhibitör aktivitesinin istatistiksel analizi

| Varyasyon Kaynakları | SS     |              | DIŞ     |              | İÇ       |              |
|----------------------|--------|--------------|---------|--------------|----------|--------------|
|                      | F      | P            | F       | P            | F        | P            |
| Süt                  | 1,396  | 0,268        | 51,882  | <b>0,000</b> | 335,758  | <b>0,000</b> |
| Enzim                | 14,774 | <b>0,004</b> | 31,943  | <b>0,000</b> | 104,595  | <b>0,000</b> |
| Depolama             | 31,284 | <b>0,000</b> | 252,695 | <b>0,000</b> | 1001,111 | <b>0,000</b> |
| Enzim x Depolama     | 0,388  | 0,549        | 23,244  | <b>0,001</b> | 166,165  | <b>0,000</b> |
| Süt x Depolama       | 0,019  | 0,892        | 56,198  | <b>0,000</b> | 1,373    | 0,271        |
| Süt x Enzim          | 15,788 | <b>0,003</b> | 31,575  | <b>0,000</b> | 33,095   | <b>0,000</b> |



Şekil 4.48. Sindirim fazlarının ACE-inhibitör aktivitesinin değişimi

Çizelge 4.72, 4.73 ve Şekil 4.48.'de görüldüğü üzere olgunlaşmanın 30. ve 90. gününde tüm peynirler için gastrik bir faz olan SS fazına göre intestinal bir faz olan İÇ fazının ACE-inhibisyon değeri önemli düzeyde azalış göstermiştir ( $p<0,05$ ). Diğer bir intestinal faz olan DIŞ fazı ise 30. gün peynirlerinin hepsinde SS fazına göre ACE-inhibisyonu önemli düzeyde artış göstermiştir. ( $p<0,05$ ). 90. gün peynirlerinde SS fazına göre DIŞ fazının ACE-inhibisyon değeri, mikrobiyal enzimle üretilen peynirlerde artış gösterirken ( $p>0,05$ ), şirden mayası ile üretilen peynirlerde azalış göstermiştir ( $p<0,05$ ). Olgunlaşmanın 90. gününde Ş-UF ve Ş-PAS peynirlerinin DIŞ fazına ait ACE-inhibitör aktivite sonuçlarının SS fazına göre azaldığı görülmesine rağmen İÇ örneklerine göre daha yüksek bir düzeyde olduğu belirlenmiş ve tüm peynirler için DIŞ ve İÇ fazları arasındaki farklılıklar hem 30. günde hem de 90. günde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Çizelge 4.74.'de görüldüğü üzere 30. ve 90. gün ACE-inhibitör aktivite sonuçlarında tüm sindirim fazlarında enzim ve depolama ile

birlikte süt x enzim interaksiyonunun etkisi önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). ACE-inhibisyonu üzerinde SS fazında başka bir varyasyon kaynağının etkisi görülmezken DIŞ fazında tüm varyasyon kaynaklarının etkisi önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). İÇ fazında, tüm varyasyon kaynakları arasında yalnızca süt x depolama interaksiyonlarının etkisi önemli bulunmamış ( $p>0,05$ ), diğer tüm kaynakların etkisi önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Proteinlerin sindirimi ilk olarak midede başlasa da midede yapılan sindirimin bağırsak sindirimine göre oldukça kısıtlı olması nedeniyle ACE sonuçlarının bu durumdan etkilendiği öne sürülmüştür (Şeker, 2017). Abdel-Hamid vd. (2017), çoğu durumda aktif peptitlerin pepsin ve tripsin gibi sindirim enzimleriyle hidroliz yoluyla veya peynir üretimi sırasında mikrobiyal enzimlerin etkisiyle salındığını belirtmişlerdir. Gastrik sindirim aşamasında salınan peptitlerin daha sonra pankreatik proteazlar tarafından daha küçük parçalara parçalandığı için ACE-inhibitör aktivitede bir azalma gözlemlendiği rapor edilmiştir (Tagliazucchi vd., 2017).

Geleneksel bazı peynirlerle yapılan çalışmalarda, peynirlerin *in vitro* sindirim sonrasında ACE-inhibitör aktivitesinde düşüş olduğu ve hidroliz nedeniyle mevcut ACE-inhibitör peptitlerin parçalandığı için aktivitede kayıplar olduğu belirtilmiştir (Cemek, 2020; Turan, 2022). Benzer bir çalışmada, geleneksel koyun ve inek Beyaz peynirinden elde edilen SÇE ve suda çözünmeyen ekstraktlara *in vitro* sindirim uygulanmıştır. Sindirim sonunda SÇE örneklerinin ACE-inhibitör aktivitesinin azaldığı, bunun nedeninin sindirim ile peptitlerde yüksek oranda gerçekleşen proteoliz olduğu öne sürülmüştür. Suda çözünmeyen ekstraktların ise ACE-inhibitör aktivitesinin sindirim sonunda artış gösterdiği, bunun nedeninin ACE-inhibitör peptitlerin ana kaynağı olan kazeinlerin proteolitik parçalanması sonunda yüksek miktarda ACE-inhibitör peptit açığa çıkmasından kaynaklandığı belirtilmiştir (Barac vd., 2019). Bir başka çalışmada, Emmental peynirinden elde edilen SÇE örneğine *in vitro* sindirim uygulandıktan sonra ACE-inhibitör aktivitenin %32 - 33 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Parrot vd., 2003).

Chhurpi peynirinin ardışık olarak pepsin ve pankreatin enzimleri ile sindirimi sonrasında, sindirilmemiş peynirlere oranla ACE-inhibitör aktivitenin artış gösterdiği, pankreatin sindirimi ile aktivitenin daha da arttığı ve en yüksek aktivitenin ise pankreatin sindirimi sonrasında %60 oranında gözlemlendiği belirtilmiştir (Abedin vd., 2022). Bu çalışmadaki SS örnekleri ve DIŞ örnekleri arasındaki ACE-inhibitör aktivitedeki farklılık ile bu sonuç paralellik göstermiştir. Kradi peynirinde yapılan bir çalışmada, ACE-inhibisyonunun sindirim öncesine artış gösterdiği, en yüksek değerin sindirim sonunda %71,23 olarak belirlendiği Mushtaq vd. (2021) tarafından bildirilmiştir Gamalost peynirlerinin *in vitro* sindirim fazlarının ACE-inhibe edici aktivitesinin sindirim öncesine göre daha artış gösterdiği, en yüksek değerin gastrik fazda gözlemlendiği, duodenal sindirimin ACE inhibe edici aktiviteyi pek fazla etkilemediği görülmüştür (Qureshi vd., 2013).

Farklı probiyotik kültürler içeren Cheddar peynirlerinden elde edilen gastrik ve intestinal fazların ACE-inhibitör aktivitesinin, sindirim öncesine göre arttığı ve genel olarak intestinal fazın gastrik faza göre yakın sonuçlar sergilediği belirlenmiştir (Hao vd., 2021). Yapılan bir çalışmada, 12 ay olgunlaştırılmış Parmigiano Reggiano peynirlerinin *in vitro* sindirimi sonrasında, sindirilmemiş peynirden elde edilen ekstrakta göre daha yüksek ACE-inhibitör aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Basiricò vd., 2015).

#### **4.7.3. Sindirim örneklerinin DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesi**

Bu çalışmada peynir örneklerine uygulanan *in vitro* sindirim uygulaması sonucu elde edilen İÇ, DIŞ ve SS sindirim fazlarına ait 30. ve 90. gün DPPH yöntemi ile aktivite sonuçları sırası ile Çizelge 4.75, 4.76'da ve Şekil 4.49'da verilmiştir. Sindirim fazlarının DPPH antioksidan aktivite değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.77'de verilmiştir. Belirlenen DPPH antioksidan aktivite sonuçları 30. ve 90. günlerde SS, DIŞ ve İÇ sindirim fazı örnekleri için sırası ile %10,39 – 24,76, %12,74 – 24,58 ve %12,80 – 20 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.75. 30. gün sindirim fazlarının DPPH antioksidan aktivitesi (%)

| SİNDİRİM<br>FAZI | ÖRNEKLER                  |                          |                          |                          |
|------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                  | M-UF                      | Ş-UF                     | M-PAS                    | Ş-PAS                    |
| SS               | 24,76±1,12 <sup>Aa</sup>  | 23,81±0,96 <sup>Aa</sup> | 17,98±0,43 <sup>Ab</sup> | 12,87±0,60 <sup>Bc</sup> |
| DIŞ              | 19,24±3,26 <sup>Ba</sup>  | 21,07±3,32 <sup>Aa</sup> | 15,62±1,45 <sup>Bb</sup> | 20,89±3,4 <sup>Aa</sup>  |
| İÇ               | 15,34±3,11 <sup>Cab</sup> | 18,91±3,03 <sup>Ba</sup> | 20±3,69 <sup>Aa</sup>    | 12,80±2,93 <sup>Bb</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

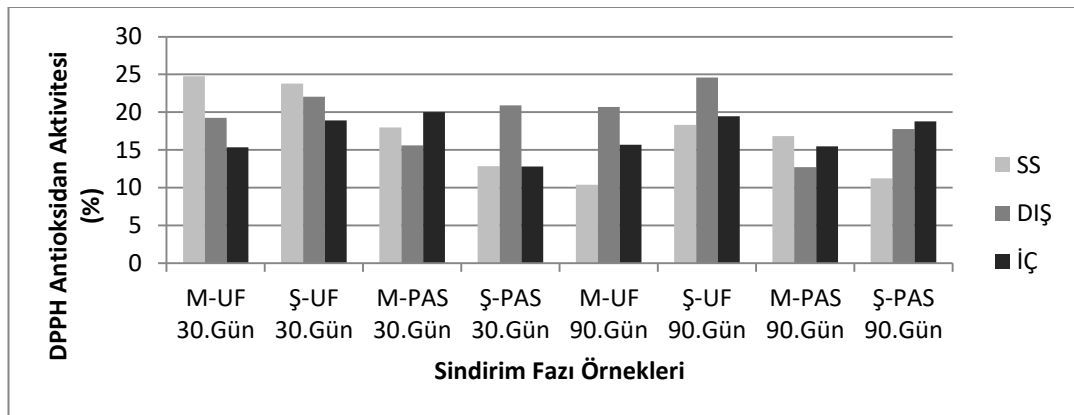
Çizelge 4.76. 90. gün sindirim fazlarının DPPH antioksidan aktivitesi (%)

| SİNDİRİM<br>FAZI | ÖRNEKLER                 |                          |                           |                          |
|------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
|                  | M-UF                     | Ş-UF                     | M-PAS                     | Ş-PAS                    |
| SS               | 10,39±1,07 <sup>Ca</sup> | 18,32±0,77 <sup>Ba</sup> | 16,83±1,58 <sup>Aab</sup> | 11,26±1,01 <sup>Ba</sup> |
| DIŞ              | 20,69±3,6 <sup>Aa</sup>  | 24,58±1,46 <sup>Aa</sup> | 12,74±1,7 <sup>Bc</sup>   | 17,78±2,22 <sup>Ab</sup> |
| İÇ               | 15,71±2,55 <sup>Bb</sup> | 20,47±2,09 <sup>Ba</sup> | 18,48±2,39 <sup>Ab</sup>  | 18,79±3,34 <sup>Aa</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.77. Sindirim fazlarının DPPH antioksidan aktivitesinin istatistiksel analizi

| Varyasyon Kaynakları | SS     |              | DIŞ   |              | İÇ    |       |
|----------------------|--------|--------------|-------|--------------|-------|-------|
|                      | F      | P            | F     | P            | F     | P     |
| Süt                  | 20,015 | <b>0,002</b> | 7,352 | <b>0,024</b> | 0,076 | 0,789 |
| Enzim                | 0,806  | 0,393        | 5,596 | <b>0,042</b> | 0,163 | 0,696 |
| Depolama             | 30,458 | <b>0,000</b> | 0,079 | 0,785        | 0,078 | 0,786 |
| Enzim x Depolama     | 4,220  | <b>0,070</b> | 0,013 | 0,911        | 1,570 | 0,242 |
| Süt x Depolama       | 17,382 | <b>0,002</b> | 1,908 | 0,200        | 0,004 | 0,950 |
| Süt x Enzim          | 18,577 | <b>0,002</b> | 0,249 | 0,630        | 1,724 | 0,222 |



Şekil 4.49. Sindirim fazlarının DPPH antioksidan aktivitesinin değişimi

Çizelge 4.75, 4.76. ve Şekil 4.49.'da görüldüğü üzere 30. ve 90. günde M-UF ve Ş-UF peynirlerinde DIŞ fazına göre İÇ fazın DPPH antioksidan aktivitesinin daha düşük olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ). M-PAS peynirinde DIŞ faza göre İÇ fazın DPPH antioksidan aktivitesinin 30. ve 90. günde istatistiksel olarak daha yüksek olduğu ( $p<0,05$ ), Ş-PAS peynirinde ise 30. günde İÇ fazın DPPH antioksidan aktivitesinde azalma olduğu gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Olgunlaşmanın 30. gününde SS fazına göre İÇ faza ait değerlerde M-UF ve Ş-UF'de azalış olduğu belirlenirken M-PAS'da artış olduğu ( $p<0,05$ ), Ş-PAS'da ise önemli bir değişim olmadığı ( $p>0,05$ ) görülmüştür. Aynı gün içinde SS fazına göre DIŞ fazında ise M-UF ve M-PAS peynirinde önemli düzeyde azalış olduğu belirlenirken, Ş-PAS'da artış olduğu ( $p<0,05$ ), Ş-UF'de ise önemli bir değişim olmadığı görülmüştür ( $p>0,05$ ). 90. günde ise tüm peynirlerin SS fazına göre İÇ fazında artış olduğu gözlenirken bu artışın istatistiksel olarak M-UF ve Ş-PAS'da önemli düzeyde olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Aynı gün içinde SS fazına göre DIŞ fazının antioksidan aktivitesinde M-PAS dışındakilerde artış olduğu, M-PAS'da ise azalış olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ). Çizelge 4.77.'de görüldüğü üzere 30. ve 90. gün DPPH antioksidan aktivite sonuçlarında SS ve DIŞ fazlarında ortak olarak sütün etkisi önemli bulunurken ( $p<0,05$ ), İÇ fazında varyasyon kaynakları arasında hiçbirinin etkisinin önemli olmadığı ( $p>0,05$ ) belirlenmiştir. DPPH antioksidan aktivite üzerinde DIŞ fazında sütün etkisinin yanı sıra enzimin etkisi de önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). SS fazında ise enzim dışındaki tüm varyasyon kaynaklarının etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ).

Düşük yağlı pastörize inek sütü ve farklı oranlarda deve sütü ile inek sütünün karışımıyla üretilmiş Akawi peynirinde, olgunlaşmanın başında ve sonunda tüm örneklerin SÇE örneğine göre intestinal fazlarının antioksidan aktivitesi daha yüksek bulunmuş, en yüksek antioksidan aktivitesi intestinal İÇ fazında gözlenmiştir (Ayyash vd., 2021). Probiyotik Cheddar peynirlerinde *in vitro* sindirimin sonunda antioksidan aktivitesinin sindirim öncesine göre %71,42 oranında arttığı bildirilmiştir (Qu vd., 2018). Benzer başka bir çalışmada, gastrik ve intestinal faz için probiyotik Cheddar peynirinde sırasıyla %77,21 ve %80,26, kontrol peynirinde ise %57,89 ve %58,74 olarak antioksidan aktivite belirlenmiştir (Liu vd., 2018). Başka bir çalışmada probiyotik Cheddar

peynirlerinde gastrik sindirimden sonra her örneğin antioksidan aktivitesinin sindirim öncesine göre daha düşük olduğu olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar bu durumu  $\beta$ -CN'nin pepsin ile degrade olması ile açıklamışlardır. Bununla birlikte, simüle edilmiş bağırsak sindiriminden sonra, antioksidan aktivitenin sindirilmemiş örneklerde gözlenen değerlere yakın olduğu (%34,37 – 41,48) belirlenmiştir. Bu sonuç, pepsin tarafından sindirilen maddenin, tripsin ve kimotripsin sayesinde daha küçük peptitlere ve antioksidan aktiviteye sahip amino asitlere parçalanması ile açıklanmıştır (Chen vd., 2019).

Chhurpi peynirine *in vitro* sindirim uygulanmış ve yapılan çalışmalar sonucunda araştırmacılar sindirilmemiş peynire göre pepsin sindirimi sonucunda antioksidan aktivitenin arttığını, pankreatin enzimleri ile sindirim sonrası aktivitenin daha da yükseldiğini belirlemişlerdir. Çalışmalar sonucunda genel olarak pankreatin enzimlerinin proteolitik aktivitesinin antioksidan peptit içeriğini arttırdığı öne sürülmüştür (Abedin vd., 2022; Chourasia vd., 2022). Magouz vd. (2023), sindirimden sonra antioksidan aktivitedeki artışı, daha yüksek sayıda ve konsantrasyonda peptit salınımı veya yeni üretilen peptitlerin yapısının farklı olması ile açıklamışlardır.

#### **4.7.4. Sindirim örneklerinin ABTS yöntemi ile antioksidan aktivitesi**

Bu çalışmada elde edilen <3kDa örneklerinin İÇ, DIŞ ve SS sindirim fazlarına ait 30. gün ve 90. gün ABTS antioksidan aktivite sonuçları sırasıyla Çizelge 4.78, 4.79'da (10 – 30  $\mu$ L örnek hacmi için) ve Şekil 4.50'de (10  $\mu$ L örnek hacmi için) verilmiştir. Sindirim fazlarının 10 – 30  $\mu$ L örnek hacmi için ABTS antioksidan aktivitesi değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.80.'de verilmiştir. SS sindirim fazı örneği için ABTS antioksidan aktivitesi değeri sonuçları 10, 20 ve 30  $\mu$ L örnek hacimler için 30. ve 90. günlerde sırasıyla %9,77-17,39, %20,36-32,16 ve %31,19-45,67 arasında değişmiştir. DIŞ sindirim fazı örneği için ABTS antioksidan aktivitesi değeri sonuçları 10, 20 ve 30  $\mu$ L örnek hacimler için 30. ve 90. günlerde sırasıyla %12,68-44,46, %20,95-64,66 ve %31,56-68,25 arasında değişmiştir. İÇ sindirim fazı örneği için ABTS

antioksidan aktivitesi değeri sonuçları 10, 20 ve 30 µL örnek hacimler için 30. ve 90. günlerde sırasıyla %21,78-38,41, %27,53-43,85 ve %44,01-58,28 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.78. 30. gün sindirim fazlarının ABTS antioksidan aktivitesi (%)

| SİNDİRİM FAZI |       | ÖRNEKLER                     |                               |                              |                               |
|---------------|-------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
|               |       | M-UF                         | Ş-UF                          | M-PAS                        | Ş-PAS                         |
| SS            | 10 µL | 16,74±0,51 <sup>Ca</sup>     | 10,18±0,31 <sup>Bc</sup>      | 13,32±0,67 <sup>Cb</sup>     | 9,77±0,54 <sup>Cc</sup>       |
|               | 20 µL | 30,86±0,36 <sup>C*a*</sup>   | 21,69±0,35 <sup>C*c*</sup>    | 24,37±0,05 <sup>C*b*</sup>   | 20,36±0,69 <sup>C*c*</sup>    |
|               | 30 µL | 43,5±0,01 <sup>C**a**</sup>  | 33,62±0,4 <sup>C**b**</sup>   | 35,37±1,13 <sup>C**b**</sup> | 31,93±1,05 <sup>C**b**</sup>  |
| DIŞ           | 10 µL | 23,97±0,99 <sup>Bc</sup>     | 28,61±1,35 <sup>Ac</sup>      | 44,46±0,75 <sup>Aa</sup>     | 38,02±0,22 <sup>Ab</sup>      |
|               | 20 µL | 41,42±1,28 <sup>A*c*</sup>   | 48,68±1,12 <sup>A*b*</sup>    | 61,09±0,12 <sup>A*a*</sup>   | 56,28±0,58 <sup>A*a*</sup>    |
|               | 30 µL | 52,16±0,91 <sup>B**c**</sup> | 60,93±0,71 <sup>A**b**</sup>  | 68,25±1,02 <sup>A**a**</sup> | 65,66±0,67 <sup>A**ab**</sup> |
| İÇ            | 10 µL | 34,1±0,77 <sup>Aa</sup>      | 32,28±1,05 <sup>Aa</sup>      | 29,54±1,19 <sup>Ba</sup>     | 31,18±0,96 <sup>Ba</sup>      |
|               | 20 µL | 37,60±1,28 <sup>B*a*</sup>   | 37,76±0,54 <sup>B*a*</sup>    | 35,70±0,56 <sup>B*a*</sup>   | 38±1,76 <sup>B*a*</sup>       |
|               | 30 µL | 57,87±0,38 <sup>A**a**</sup> | 53,15±1,07 <sup>B**ab**</sup> | 49,27±1,05 <sup>B**b**</sup> | 49,71±1,63 <sup>B**b**</sup>  |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
A\*,B\*,C\*,D\*: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a\*,b\*,c\*,d\*: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
A\*\*,B\*\*,C\*\*,D\*\*: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a\*\*,b\*\*,c\*\*,d\*\*: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.79. 90. gün sindirim fazlarının ABTS antioksidan aktivitesi (%)

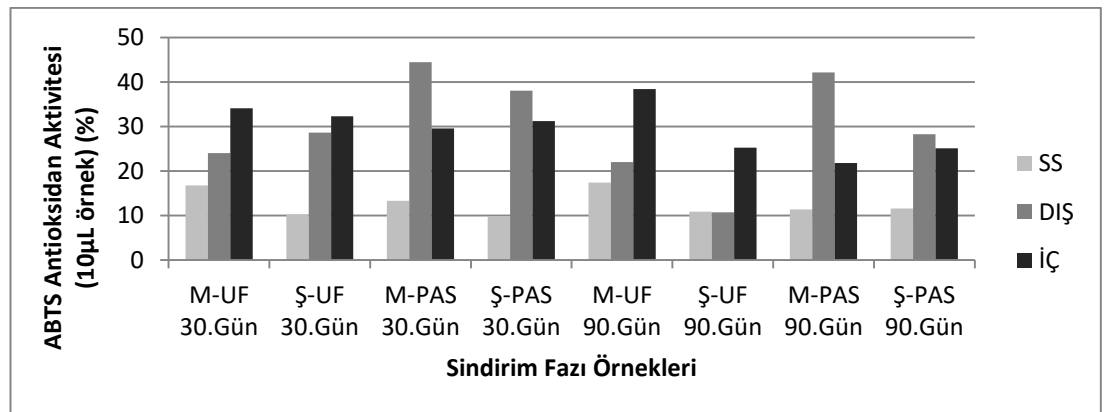
| SİNDİRİM FAZI |       | ÖRNEKLER                     |                              |                               |                               |
|---------------|-------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|               |       | M-UF                         | Ş-UF                         | M-PAS                         | Ş-PAS                         |
| SS            | 10 µL | 17,39±0,58 <sup>Ca</sup>     | 10,85±0,49 <sup>Bb</sup>     | 11,36±1,00 <sup>Cb</sup>      | 11,60±0,15 <sup>Cb</sup>      |
|               | 20 µL | 32,16±0,17 <sup>C*a*</sup>   | 20,72±0,39 <sup>B*c*</sup>   | 24,94±0,27 <sup>B*b*</sup>    | 22,08±0,29 <sup>C*c*</sup>    |
|               | 30 µL | 45,67±2,32 <sup>B**a**</sup> | 31,19±0,97 <sup>B**b**</sup> | 38,91±0,93 <sup>C**ab**</sup> | 35,38±0,40 <sup>C**b**</sup>  |
| DIŞ           | 10 µL | 22±1,00 <sup>Bb</sup>        | 12,68±0,66 <sup>Bc</sup>     | 42,15±1,82 <sup>Aa</sup>      | 28,28±0,29 <sup>Ab</sup>      |
|               | 20 µL | 38,96±0,38 <sup>B*c*</sup>   | 20,95±1,08 <sup>B*d*</sup>   | 64,66±0,11 <sup>A*a*</sup>    | 46,30±0,31 <sup>A*b*</sup>    |
|               | 30 µL | 47,45±1,77 <sup>B**b**</sup> | 31,56±1,32 <sup>B**c**</sup> | 65,03±4,88 <sup>A**a**</sup>  | 59,17±0,19 <sup>A**ab**</sup> |
| İÇ            | 10 µL | 38,41±0,75 <sup>Aa</sup>     | 25,20±0,20 <sup>Ab</sup>     | 21,78±3,60 <sup>Bb</sup>      | 25,10±0,22 <sup>Bb</sup>      |
|               | 20 µL | 43,85±0,48 <sup>A*a*</sup>   | 36,07±0,52 <sup>A*ab*</sup>  | 27,53±2,32 <sup>B*c*</sup>    | 35,53±1,32 <sup>B*b*</sup>    |
|               | 30 µL | 58,28±0,95 <sup>A**a**</sup> | 44,01±1,27 <sup>A**c**</sup> | 51,71±0,43 <sup>B**b**</sup>  | 45,09±0,16 <sup>B**c**</sup>  |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
A\*,B\*,C\*,D\*: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
a\*,b\*,c\*,d\*: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)  
A\*\*,B\*\*,C\*\*,D\*\*: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

a\*\*,b\*\*,c\*\*,d\*\*: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir (p<0,05)

Çizelge 4.80. Sindirim fazlarının ABTS antioksidan aktivitesinin istatistiksel analizi

| Sindirim örnekleri | Varyasyon Kaynakları | Örnek hacimleri |              |         |              |        |              |
|--------------------|----------------------|-----------------|--------------|---------|--------------|--------|--------------|
|                    |                      | 10 µL           |              | 20 µL   |              | 30 µL  |              |
|                    |                      | F               | P            | F       | P            | F      | P            |
| SS                 | Süt                  | 20,866          | <b>0,001</b> | 83,259  | <b>0,000</b> | 13,866 | <b>0,005</b> |
|                    | Enzim                | 67,819          | <b>0,000</b> | 335,937 | <b>0,000</b> | 88,840 | <b>0,000</b> |
|                    | Depolama             | 0,357           | 0,565        | 3,068   | 0,114        | 4,098  | 0,074        |
|                    | Enzim x Depolama     | 3,622           | 0,089        | 0,545   | 0,479        | 1,993  | 0,192        |
|                    | Süt x Depolama       | 0,526           | 0,487        | 1,687   | 0,226        | 4,754  | 0,063        |
|                    | Süt x Enzim          | 24,128          | <b>0,001</b> | 83,857  | <b>0,000</b> | 27,431 | <b>0,001</b> |
| DİŞ                | Süt                  | 296,759         | <b>0,000</b> | 315,619 | <b>0,000</b> | 55,236 | <b>0,000</b> |
|                    | Enzim                | 47,256          | <b>0,000</b> | 59,211  | <b>0,000</b> | 3,073  | 0,113        |
|                    | Depolama             | 66,166          | <b>0,000</b> | 68,864  | <b>0,000</b> | 24,289 | <b>0,001</b> |
|                    | Enzim x Depolama     | 35,457          | <b>0,000</b> | 77,526  | <b>0,000</b> | 9,890  | <b>0,012</b> |
|                    | Süt x Depolama       | 4,009           | 0,076        | 29,078  | <b>0,000</b> | 7,526  | <b>0,023</b> |
|                    | Süt x Enzim          | 12,030          | <b>0,007</b> | 7,963   | <b>0,020</b> | 0,022  | 0,885        |
| İÇ                 | Süt                  | 17,847          | <b>0,002</b> | 10,685  | <b>0,010</b> | 40,465 | <b>0,000</b> |
|                    | Enzim                | 5,392           | <b>0,045</b> | 0,223   | 0,648        | 83,277 | <b>0,000</b> |
|                    | Depolama             | 7,986           | <b>0,020</b> | 1,154   | 0,311        | 15,632 | <b>0,003</b> |
|                    | Enzim x Depolama     | 3,092           | 0,113        | 0,158   | 0,701        | 36,304 | <b>0,000</b> |
|                    | Süt x Depolama       | 3,883           | 0,080        | 7,180   | <b>0,025</b> | 5,652  | <b>0,041</b> |
|                    | Süt x Enzim          | 5,392           | <b>0,045</b> | 10,009  | <b>0,011</b> | 21,544 | <b>0,001</b> |



Şekil 4.50. Sindirim fazlarının ABTS antioksidan aktivitesinin değişimi

Çizelge 4.78,4.79. ve Şekil 4.50’de görüldüğü üzere olgunlaşmanın 30. ve 90. günlerinde İÇ fazının, genellikle tüm peynir örneklerinde ve analizde kullanılan her örnek hacminde SS fazına göre daha yüksek ABTS antioksidan aktivitesi değeri sergilediği ve SS fazının daima en düşük ABTS antioksidan aktivitesi değerini gösterdiği tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Pastörize süttten üretilen M-PAS ve Ş-PAS’ın DIŞ fazının ABTS antioksidan aktivitesi değerinin, UF süttten üretilen M-UF ve Ş-UF’ye göre olgunlaşma süresince daha yüksek olduğu görülmüştür. 10 µL örnek hacmi için 30. ve 90. gün sindirim fazları incelendiğinde en yüksek ABTS antioksidan aktivitesi değerini UF süttten yapılan peynirlerde İÇ fazının gösterdiği, pastörize süttten yapılan peynirlerde DIŞ fazının gösterdiği belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). 20 µL örnek hacmi için 30. günde tüm peynir gruplarında DIŞ fazının en yüksek ABTS antioksidan aktivitesi değerini gösterdiği belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). 90. günde ise en yüksek ABTS antioksidan aktivitesi değerini UF süttten yapılan peynirlerde İÇ fazı gösterirken, pastörize süttten yapılan peynirlerde DIŞ fazının gösterdiği belirlenmiştir. 30 µL örnek hacmi için 90. günde sindirim örnekleri arasındaki farklılığın 10 µL örnek hacmindeki sonuçlar ile paralel olduğu belirlenmiştir. Çizelge 4.80.’de görüldüğü üzere 30. ve 90. gün ABTS antioksidan aktivitesi değeri sonuçlarında tüm örnek hacimlerinde SS örneğinde süt, enzim ve süt x enzim interaksiyonunun etkisi önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Ancak farklı örnek hacimlerinde varyasyon kaynaklarının ABTS antioksidan aktivitesi değerleri üzerindeki etkisi istatistiksel olarak İÇ ve DIŞ fazları için değişkenlik göstermiştir. İnhibisyon değerleri üzerinde, örnek hacmi 20 µL olduğunda DIŞ fazında, 30 µL olduğunda İÇ fazında tüm varyasyon kaynaklarının etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ).

Erzincan Tulum, Kars gravyer, inek ve keçi peynirlerinden elde edilen SÇE örnekleri <3kDa ve >3kDa peptitler içeren iki farklı fraksiyona ayrılmış ve bu fraksiyonlara *in vitro* sindirim uygulanmıştır. Örneklerin antioksidan aktivitesinin sindirim sonrasında ya arttığı ya da değişmediği tespit edilmiştir. Sindirim enzimleri aracılığı ile <3kDa fraksiyonda bulunan protein fragmentlerinin ileri parçalanmaları sonucunda antioksidan aktiviteye sahip

yeni peptitlerin ya da serbest amino asitlerin oluşması sonucu antioksidan aktivitesinin artmış olabileceği öne sürülmüştür (Turan, 2022).

Probiyotik Cheddar peynirlerinde *in vitro* sindirimin sonunda ABTS antioksidan aktivitesinin sindirim öncesine göre %51,69 oranında arttığı bildirilmiştir (Qu vd., 2018). Düşük yağlı pastörize inek sütü ve farklı oranlarda deve sütüyle inek sütününün karışımı ile üretilmiş Akawi peynirinde yapılan *in vitro* sindirimi sonucunda, olgunlaşmanın başında ve sonunda tüm örneklerin SCE örneğine göre intestinal fazlarının antioksidan aktivitesi daha yüksek bulunmuş, en yüksek antioksidan aktivitesi intestinal İÇ fazının gözlenmiştir (Ayyash vd., 2021). Bir başka çalışmada, geleneksel yöntemle üretilmiş Kradi peynirinin *in vitro* sindiriminin 0.dakikasında ABTS antioksidan aktivitesi %12,03 olarak bulunurken sindirimin 480.dakikasında %58,89 olarak bulunmuştur. Sindirim sırasında gözlenen artış, normalde doğal protein molekülleri içinde şifrelenmiş olan biyoaktif peptitlerin, mide enzimleri tarafından proteinlerin proteolizi yoluyla salınmasına bağlanmıştır (Mushtaq vd., 2021). Bu çalışmada SS gastrik fazının ABTS antioksidan aktivitesine göre intestinal fazlar olan İÇ ve DIŞ fazların daha yüksek antioksidan aktivite sergilemesi bu çalışma ile paralellik göstermektedir.

Geleneksel ve fermente ovalama peynirlerinin sindirim sonrası ABTS antioksidan aktivitesinin arttığı, fermente olan örneğin daha yüksek antioksidan olduğu Wei vd. (2022a) tarafından bildirilmiştir. İnek, koyun ve keçi sütünün sindirim sonrası antioksidan aktiviteleri değerlendirildiğinde koyun ve keçi sütünün, inek sütünden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Sindirim sonrasında süt örneklerinin antioksidan aktivitesinin, açığa çıkan peptitlerin spesifikliği ve miktarı ile ilgili olduğu vurgulanmıştır (Tagliazucchi vd., 2018). Farklı peynirlerden elde edilen peynir altı suyu ve bunların hidrolizatları ile yapılan *in vitro* sindirim çalışmalarında ise sindirim işleminin antioksidan aktivitesinin artışında önemli düzeyde etkili olduğu vurgulanmıştır (Corrêa vd., 2014; Bustamante vd., 2021).

#### 4.7.5. Sindirim örneklerinin TEAC antioksidan aktivitesi

Bu çalışmada peynir örneklerine uygulanan *in vitro* sindirim uygulaması sonucu elde edilen İÇ, DIŞ ve SS sindirim fazlarına ait 30. ve 90. gün TEAC aktivite sonuçları sırası ile Çizelge 4.81, 4.82.'de ve Şekil 4.51'de verilmiştir. Sindirim fazlarının TEAC antioksidan aktivitesi değerleri üzerinde sütün prosesinin, kullanılan enzimin ve peynirlerin depolama süresinin etkileri birlikte değerlendirilerek Çizelge 4.83.'de verilmiştir. Belirlenen TEAC antioksidan aktivite sonuçları 30. ve 90. günlerde SS, DIŞ ve İÇ sindirim fazı örnekleri için sırası ile 5,90 – 9,18, 5,44 – 16,68 ve 20,51 – 24,91  $\mu\text{M}$  TEAC/mg örnek arasında değişmiştir.

Çizelge 4.81. 30. gün sindirim fazlarının TEAC değeri ( $\mu\text{M}$  TEAC/mg örnek)

| SİNDİRİM<br>FAZI | ÖRNEKLER                 |                          |                          |                          |
|------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                  | M-UF                     | Ş-UF                     | M-PAS                    | Ş-PAS                    |
| SS               | 8,72±0,14 <sup>Ca</sup>  | 5,90±0,05 <sup>Cd</sup>  | 7,51±0,03 <sup>Cb</sup>  | 6,85±0,05 <sup>Cc</sup>  |
| DIŞ              | 10,7±0,08 <sup>Bd</sup>  | 13,22±0,07 <sup>Bc</sup> | 15,90±0,01 <sup>Ba</sup> | 14,29±0,05 <sup>Bb</sup> |
| İÇ               | 22,38±0,14 <sup>Ab</sup> | 21,39±0,04 <sup>Ac</sup> | 22,64±0,05 <sup>Ab</sup> | 24,91±0,04 <sup>Aa</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir ( $p<0,05$ )  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir ( $p<0,05$ )

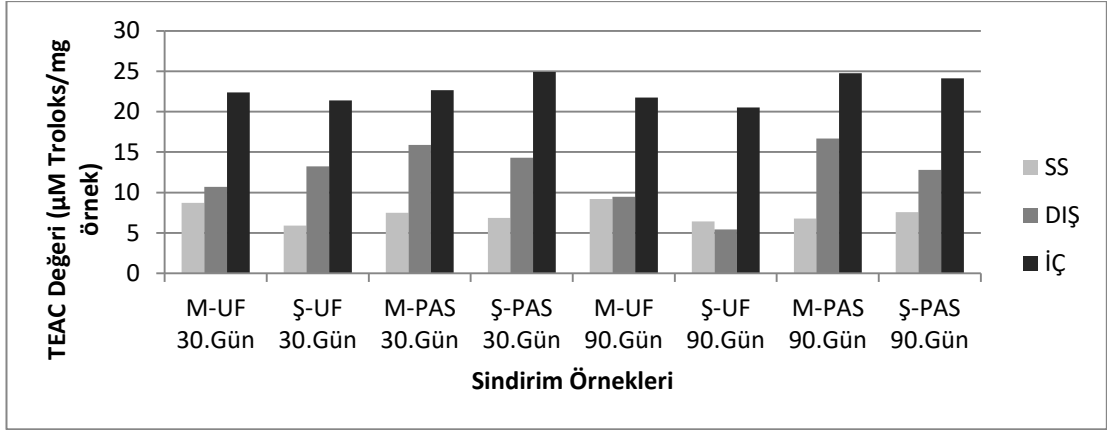
Çizelge 4.82. 90. gün sindirim fazlarının TEAC değeri ( $\mu\text{M}$  TEAC/mg örnek)

| SİNDİRİM<br>FAZI | ÖRNEKLER                 |                          |                          |                          |
|------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                  | M-UF                     | Ş-UF                     | M-PAS                    | Ş-PAS                    |
| SS               | 9,18±0,12 <sup>Ba</sup>  | 6,44±0,04 <sup>Bc</sup>  | 6,80±0,05 <sup>Cc</sup>  | 7,56±0,05 <sup>Cb</sup>  |
| DIŞ              | 9,47±0,07 <sup>Bc</sup>  | 5,44±0,03 <sup>Cd</sup>  | 16,68±0,04 <sup>Ba</sup> | 12,78±0,03 <sup>Bb</sup> |
| İÇ               | 21,73±0,03 <sup>Ab</sup> | 20,51±0,03 <sup>Ab</sup> | 24,74±0,04 <sup>Aa</sup> | 24,12±0,03 <sup>Aa</sup> |

A,B,C,D: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir ( $p<0,05$ )  
a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farkı göstermektedir ( $p<0,05$ )

Çizelge 4.83. Sindirim fazlarının TEAC değerlerinin istatistiksel analizi

| Varyasyon Kaynakları | SS      |              | DIŞ     |              | İÇ      |              |
|----------------------|---------|--------------|---------|--------------|---------|--------------|
|                      | F       | P            | F       | P            | F       | P            |
| Süt                  | 9,639   | <b>0,013</b> | 212,202 | <b>0,000</b> | 131,378 | <b>0,000</b> |
| Enzim                | 124,551 | <b>0,000</b> | 24,147  | <b>0,001</b> | 0,388   | 0,549        |
| Depolama             | 4,011   | 0,076        | 46,351  | <b>0,000</b> | 0,060   | 0,811        |
| Enzim x Depolama     | 9,523   | <b>0,013</b> | 38,268  | <b>0,000</b> | 11,877  | <b>0,007</b> |
| Süt x Depolama       | 4,228   | 0,070        | 33,659  | <b>0,000</b> | 9,855   | <b>0,012</b> |
| Süt x Enzim          | 134,143 | <b>0,000</b> | 7,857   | <b>0,021</b> | 18,044  | <b>0,002</b> |



Şekil 4.51. Sindirim örneklerinin TEAC antioksidan aktivite değerlerinin değişimi

Çizelge 4.81, 4.82 ve Şekil 4.51’de görüldüğü üzere olgunlaşmanın 30. ve 90. gününde TEAC antioksidan aktivitesinde tüm İÇ fazları örneklerinde, DIŞ ve SS fazına göre önemli düzeyde artış olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ). Benzer olarak gastrik bir faz olan SS fazına göre diğer bir intestinal faz türünden olan DIŞ fazının TEAC antioksidan aktivitesinin olgunlaşmanın 30. gününde tüm peynir örneklerinde arttığı belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Olgunlaşmanın 90. gününde ise SS fazına göre DIŞ fazının pastörize süttten yapılan peynirlerde arttığı belirlenirken UF süttten yapılan Ş-UF peynirinde azaldığı ( $p<0,05$ ) ve M-UF peynirindeki değişimin önemsiz olduğu ( $p>0,05$ ) belirlenmiştir. Çizelge 4.83.’de görüldüğü üzere 30. ve 90. gün TEAC antioksidan aktivite sonuçlarında, DIŞ fazı üzerinde tüm varyasyon kaynaklarının etkisi önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ), İÇ fazının TEAC antioksidan aktivitesi sonuçlarında süt ile birlikte enzim x depolama, süt x depolama ve süt x enzim interaksiyonlarının etkisi önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). SS fazında ise süt ve enzim ile birlikte enzim x depolama ve süt x enzim interaksiyonlarının etkisi önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Geleneksel Beyaz peynirinde yapılmış bir çalışmada, inek ve koyun süttünden yapılmış peynir örneklerinin *in vitro* sindirim sonrasında TEAC değerlerinin sindirim öncesine göre arttığı ve bu değerlerin sindirim sonrasında sırasıyla 209,53 – 262,3 mmol Trolox Eq/kg ile 306,94 – 400,1 mmol Trolox Eq/kg olduğu bildirilmiştir. Peynirlerin antioksidan kapasitesinde *in vitro* sindirimden sonra gözlenen artışın, proteinlerin yoğun hidrolizine, serbest amino asitlerin

artmasına ve SDS-PAGE tarafından tespit edilemeyen düşük moleküler ağırlıklı peptitlere bağlanmıştır (Barac vd., 2019). Benzer olarak yapılan başka bir çalışmada, inek ve koyun Beyaz peynirlerinden elde edilen suda çözünen ve çözünmeyen ekstraktların TEAC değerlerinin, sindirim öncesine göre yükseldiği ve suda çözünmeyen ekstraktların sindirim sonrasında TEAC değerlerinin >6 kat daha fazla arttığı gözlenmiştir (Vučić vd., 2020).

Olgunlaştırılmış Parmigiano-Reggiano peynirinde yapılan bir çalışmada, sindirim sonrasında antioksidan kapasitesinin, simüle edilmiş gastrointestinal sindirimden etkilenmediği bildirilmiştir (Bottesini vd., 2013). Uzun dönem olgunlaştırma sırasında aktivitenin değişmemesi, antioksidan kapasiteden sorumlu olan amino asit yan zincirlerinin peptit-protein dizilimi içinde yer aldıklarında ve serbest halde olduklarında aynı antioksidan kapasiteye sahip olmalarıyla ilişkilendirilmiştir.

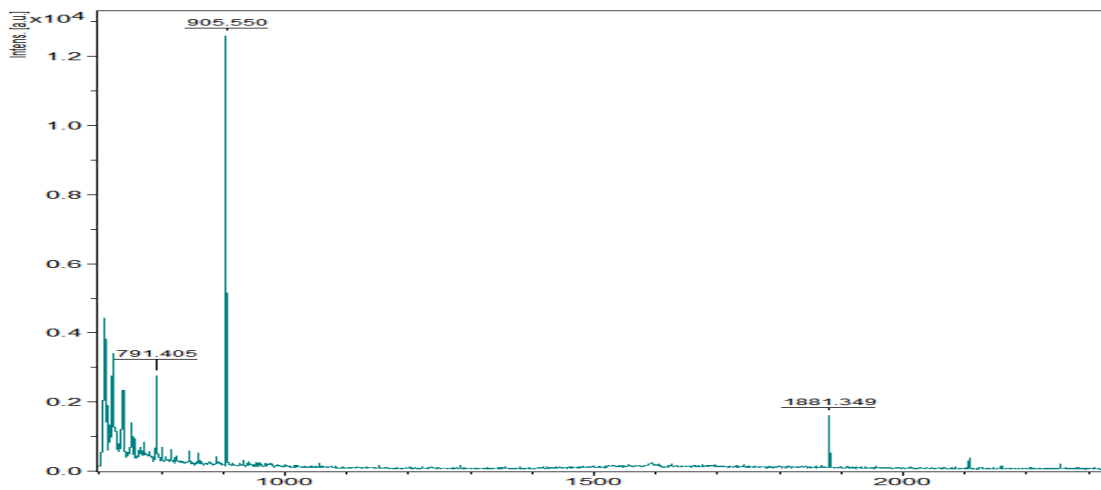
Yapılan bir çalışmada, kazeinin pepsin ve pepsin-tripsin-kimotripsin enzimleri ile hidrolize edildikten sonra antioksidan aktiviteleri TEAC değeri üzerinden verilmiştir. Antioksidan aktivitenin hidrolize olmamış kazein için 0,86  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  değerinde olduğu belirlenirken, kazeinin pepsin ve pepsin-tripsin-kimotripsin hidrolizatları için antioksidan aktivitenin arttığı ve sırasıyla 1,47 ile 1,76  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  arasında değiştiği belirlenmiştir (Shanmugam vd., 2015)

#### **4.8. Fraksiyonların MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi Yöntemi İle Peptit Analizi**

Kütle spektrumlarında gözlenen kütle/yük oranı ( $m/z$ ) x ekseninde temsil edilirken, y eksenini iyon yoğunluğuna karşılık gelmektedir (Silva vd., 2019). Aşağıdaki Çizelge 4.84 – 4.87.’da ve Şekil 4.52 – 4.55’de ACE-inhibitör aktivitesi yüksek çıkan fraksiyonların MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi sonuçları verilmiştir. Elde edilen bu kütle spektrum sonuçlarının ile SwissProt veri bankasında taraması gerçekleştirilmiştir. Ancak taramalarda istatistiksel olarak güvenilir ve doğruluğu yüksek bir eşleşme bulunamadığı için peptitlerin tanımlaması gerçekleştirilememiştir.

Çizelge 4.84. M-UF F9. fraksiyonun MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi sonuçları

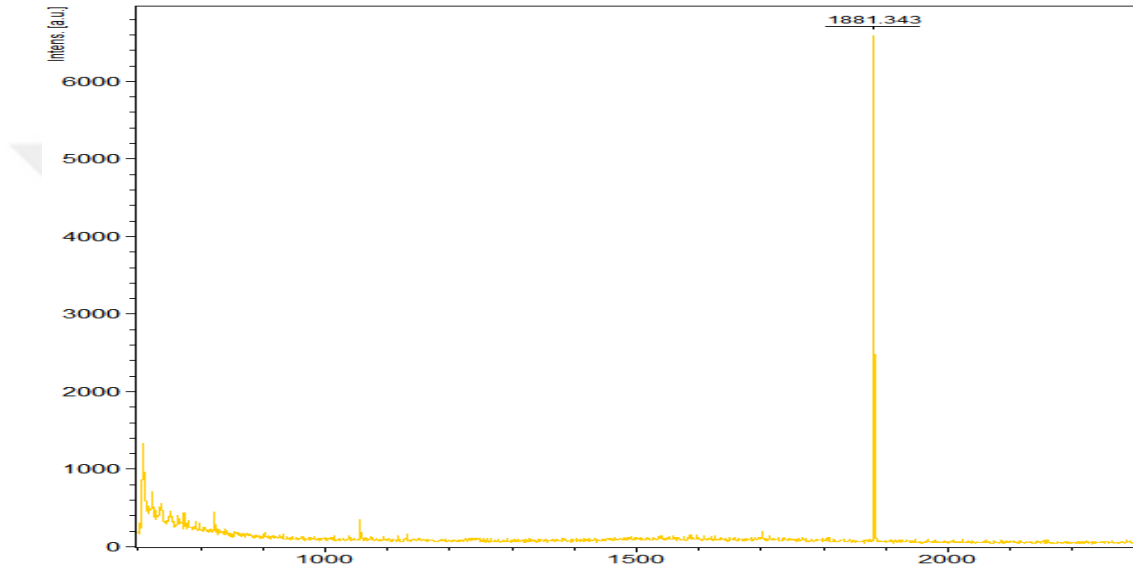
| m/z      | sinyal yoğunluğu (S/N) | Kalite Faktörü | Çözünürlük | Yoğunluk | Alan |
|----------|------------------------|----------------|------------|----------|------|
| 705,649  | 16,5                   | 209            | 1111       | 1640,08  | 1867 |
| 706,916  | 13,5                   | 68             | 2220       | 1350,46  | 706  |
| 708,119  | 38,6                   | 614            | 1890       | 3839,77  | 2290 |
| 710,285  | 35,2                   | 2871           | 3518       | 3492,42  | 1124 |
| 712,309  | 14,5                   | 99             | 4299       | 1440,83  | 381  |
| 716,301  | 12,3                   | 160            | 4356       | 1225,85  | 323  |
| 718,314  | 12,1                   | 134            | 4158       | 1188,32  | 329  |
| 720,338  | 25,2                   | 1339           | 4763       | 2536,08  | 615  |
| 721,331  | 10,1                   | 194            | 2922       | 995,34   | 394  |
| 722,344  | 26,3                   | 2783           | 4549       | 2613,98  | 666  |
| 724,362  | 26,1                   | 1103           | 4858       | 2676,02  | 641  |
| 726,359  | 9,2                    | 232            | 3704       | 892,19   | 282  |
| 728,342  | 10,4                   | 124            | 4316       | 1035,62  | 281  |
| 734,348  | 11,4                   | 61             | 3768       | 1095,3   | 349  |
| 736,444  | 19                     | 212            | 4546       | 1847,46  | 485  |
| 738,449  | 22,4                   | 880            | 4873       | 2189,67  | 538  |
| 740,458  | 8,1                    | 67             | 4232       | 784,71   | 223  |
| 750,448  | 7,4                    | 69             | 4821       | 719,39   | 183  |
| 752,463  | 12,1                   | 2359           | 5169       | 1194,9   | 284  |
| 756,481  | 6,4                    | 381            | 5379       | 616,45   | 142  |
| 791,405  | 27                     | 5459           | 5390       | 2482,9   | 635  |
| 905,55   | 143                    | 15947          | 6046       | 12047,98 | 3309 |
| 1881,349 | 22                     | 3477           | 12969      | 1267,16  | 607  |



Şekil 4.52. M-UF F9. fraksiyonun kütle spektrum görüntüsü

Çizelge 4.85. Ş-UF F9. fraksiyonun MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi sonuçları

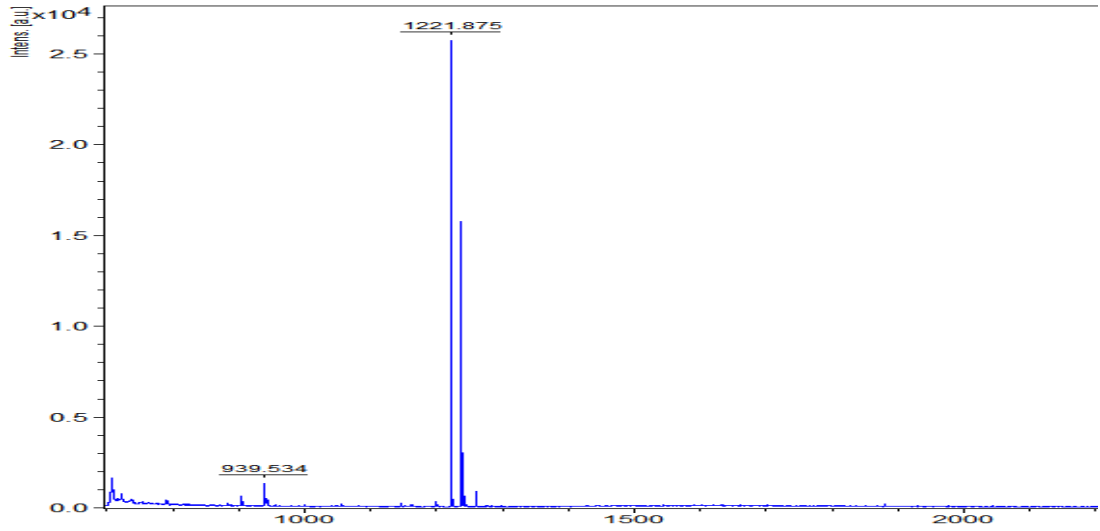
| m/z      | sinyal yoğunluğu<br>(S/N) | Kalite<br>Faktörü | Çözünürlük | Yoğunluk | Alan |
|----------|---------------------------|-------------------|------------|----------|------|
| 705,638  | 8,2                       | 91                | 829        | 641,48   | 992  |
| 708,081  | 15,2                      | 276               | 1794       | 1202,12  | 755  |
| 710,21   | 10,6                      | 157               | 2302       | 842,35   | 414  |
| 715,211  | 6,2                       | 45                | 3974       | 494,38   | 148  |
| 1881,343 | 122,8                     | 6015              | 12885      | 5644,91  | 2693 |



Şekil 4.53. Ş-UF F9. fraksiyonun kütle spektrum görüntüsü

Çizelge 4.86. M-PAS F9. fraksiyonun MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi sonuçları

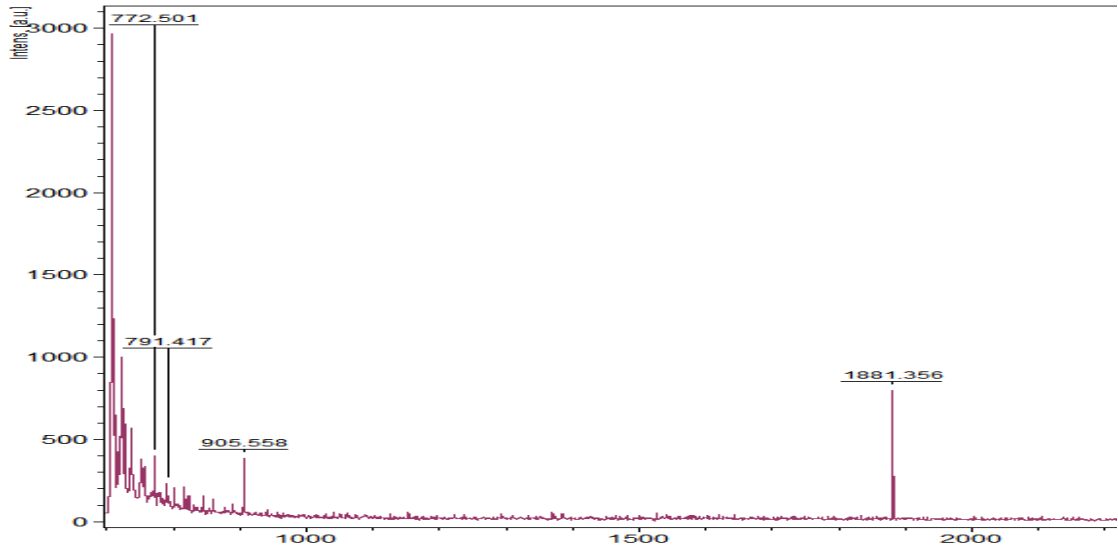
| m/z      | sinyal yoğunluğu<br>(S/N) | Kalite<br>Faktörü | Çözünürlük | Yoğunluk | Alan |
|----------|---------------------------|-------------------|------------|----------|------|
| 705,544  | 8,1                       | 154               | 991        | 601,08   | 806  |
| 706,923  | 7,6                       | 76                | 1945       | 572,6    | 336  |
| 708,11   | 17,5                      | 368               | 1819       | 1306,83  | 809  |
| 710,264  | 11,5                      | 255               | 2693       | 856,53   | 360  |
| 724,336  | 6,5                       | 63                | 3280       | 479,84   | 195  |
| 905,554  | 8,8                       | 2142              | 5869       | 579,15   | 162  |
| 939,534  | 19,1                      | 1988              | 2491       | 1226,27  | 888  |
| 1221,875 | 487,7                     | 18945             | 8267       | 26068,46 | 8573 |
| 1237,856 | 297                       | 32439             | 8507       | 15797,43 | 5099 |
| 1243,86  | 11                        | 3478              | 8551       | 588,41   | 198  |
| 1259,847 | 15,5                      | 6120              | 8945       | 827,85   | 264  |



Şekil 4.54. M-PAS F9. fraksiyonun kütle spektrum görüntüsü

Çizelge 4.87. M-PAS F10. fraksiyonun MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi sonuçları

| m/z      | sinyal yoğunluğu<br>(S/N) | Kalite<br>Faktörü | Çözünürlük | Yoğunluk | Alan |
|----------|---------------------------|-------------------|------------|----------|------|
| 705,643  | 22,8                      | 151               | 1028       | 625,62   | 777  |
| 706,901  | 21,9                      | 74                | 2366       | 599,44   | 294  |
| 708,129  | 92,1                      | 1703              | 1990       | 2536,12  | 1436 |
| 709,252  | 21,2                      | 62                | 5003       | 581,86   | 131  |
| 710,292  | 32,1                      | 1695              | 3451       | 890,35   | 292  |
| 712,294  | 17,4                      | 702               | 3303       | 491,65   | 169  |
| 714,266  | 6,1                       | 71                | 3309       | 167,56   | 58   |
| 716,293  | 8                         | 59                | 4022       | 225,37   | 64   |
| 720,334  | 16,3                      | 268               | 4832       | 451,48   | 108  |
| 722,351  | 29,8                      | 1743              | 5042       | 855,32   | 197  |
| 724,374  | 27,4                      | 1287              | 4998       | 760,15   | 177  |
| 728,354  | 15,1                      | 387               | 6389       | 435,23   | 80   |
| 736,446  | 13,1                      | 448               | 6025       | 358,36   | 71   |
| 738,439  | 12,6                      | 175               | 5522       | 339,58   | 73   |
| 752,458  | 11,3                      | 115               | 5684       | 326,94   | 71   |
| 754,454  | 6,6                       | 190               | 5657       | 181,91   | 40   |
| 756,489  | 8,4                       | 110               | 5420       | 222,61   | 51   |
| 772,501  | 12                        | 287               | 6189       | 318,78   | 66   |
| 791,417  | 6,2                       | 78                | 4803       | 170,59   | 53   |
| 905,558  | 14,2                      | 1629              | 5713       | 355,73   | 107  |
| 1881,356 | 52,9                      | 5663              | 14108      | 676,51   | 300  |



Şekil 4.55. M-PAS F10. fraksiyonun kütle spektrum görüntüsü

Peptitlere ait  $m/z$  sinyal değerleri incelendiğinde, fraksiyonlar arasında benzerlikler ve farklılıklar olduğu görülmektedir. Bütün fraksiyonlar arasında en düşük  $m/z$  sinyal değerini veren peptidin M-PAS F9. fraksiyonda (705,544  $m/z$ ), en yüksek  $m/z$  sinyal değerini veren peptidin ise M-PAS F10. fraksiyonda (1881,356  $m/z$ ) olduğu görülmüştür. M-UF F9. fraksiyonun kütle spektrumu Şekil 4.52'de incelendiğinde yüksek iyon yoğunluğu gösteren peptitlerin 1881,349, 905,550 ve 791,405  $m/z$  sinyal değerlerinde olduğu görülmektedir. Ş-UF F9. fraksiyonun kütle spektrumu Şekil 4.53.'de incelendiğinde yüksek iyon yoğunluğu gösteren yalnızca 1881,343  $m/z$  sinyal değerinde tek bir peptidin olduğu görülmektedir. Şekil 4.54.'de M-PAS F9. fraksiyonun yüksek iyon yoğunluğu gösteren peptitlerin 1221,875 ve 939,543  $m/z$  sinyal değerinde olduğu, Şekil 4.55.'de ise aynı peynirin F10. fraksiyonunda gözlenen yüksek iyon yoğunluğu veren peptitlerin 772,501, 791,417, 905,558 ve 1881,356  $m/z$  sinyal değerinde olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada toplanan tüm fraksiyonlar arasında en yüksek ACE-inhibisyonu gösteren M-UF F9. fraksiyon ile M-PAS F10. fraksiyonun MALDI-TOF sonuçları incelendiğinde, peptitlerden elde edilen  $m/z$  sinyal değerlerinin bu iki fraksiyonda benzer olduğu görülmektedir. M-UF F9. fraksiyonda 23 adet peptide ait değerler olduğu gözlenirken, M-PAS F10. fraksiyonda 21 adet peptide ait değerler olduğu gözlenmiştir. Bu iki peptitte gözlenen  $m/z$  sinyal

değerlerinin yaklaşık olarak benzer olduğu 12 adet peptidin varlığı belirlenmiştir. Sadece Ş-UF F9. fraksiyonda gözlenmeyen ve iyon yoğunluğu yüksek 905 m/z sinyal değerini veren peptidin M-UF F9. ve M-PAS F10. fraksiyonda ortak olarak gözleendiği belirlenmiştir. Buna göre mikrobiyal enzimle üretilen M-UF ve M-PAS peynirlerine ait fraksiyonlar arasında birbirine benzer profili ve yakın ACE-inhibisyonunu gösteren fraksiyonların varlığı tespit edilmiştir.

M-PAS peynirinin <3kDa ekstraktına ait F9 ve F10. fraksiyon ile aralarında farklılıklar olduğu görülmektedir. Analiz edilen fraksiyonlar arasında yalnızca M-PAS F9. fraksiyonda bulunmayan ve iyon yoğunluğu yüksek 1881 m/z sinyal değerini veren peptidin, bu peynirin F10. fraksiyonunda bulunduğu belirlenmiştir. Tam tersi olarak, yalnızca M-PAS F9. fraksiyonda gözlenen ve iyon yoğunluğu yüksek olan 939,534 ve 1221,875 m/z sinyalini veren peptitlerin varlığı gözlenmiştir. Ayrıca M-PAS F9. fraksiyonda gözlenen peptit sayısının daha az olduğu belirlenmiştir. Buna göre bu iki fraksiyonun ACE-inhibisyonundaki farklılıkların peptit sayısı ve özelliklerinden kaynaklandığı anlaşılmaktadır. Bu sonuca paralel olarak Ş-UF F9. fraksiyonda 5 adet peptide ait değerler gözlenmiş ve bu çalışmada analiz edilen 4 fraksiyon arasında en düşük sayıda peptidi içeren fraksiyon olduğu belirlenmiştir. Buna ilaveten yalnızca 3 adet peptide ait m/z sinyal değerinin diğer fraksiyonlar ile ortak olduğu, diğerlerinde gözlenen iyon yoğunluğu yüksek 905 m/z sinyalini veren peptidin bu fraksiyonda olmayışı ACE-inhibitör aktivitenin nispeten daha düşük olmasının nedeni olarak düşünülmüştür.

Baptista vd. (2018; 2020) tarafından bildirilen çalışmalarda, peynirlerden elde edilen fraksiyonlarda MALDI-TOF/TOF yöntemi ile tanımlanmış peptitler arasında 1881 m/z sinyal değerini veren peptidin  $\beta$ -CN'e (f193 - 209) karşılık gelen fragment olduğu tespit edilmiştir. Benzer sonuç Galli vd. (2019) tarafından da bulunmuş olup araştırmacılar aynı zamanda süte ısıt işlem uygulaması, yardımcı kültür ilavesi ve olgunlaşma süresinin peynirlerin peptit profilini etkilediğini öne sürmüşlerdir Bu çalışmada M-PAS F9. fraksiyonu dışında diğer 3 fraksiyonda da gözlenen ve yaklaşık m/z sinyal değeri 1881,3

civarında olan peptitlerin  $\beta$ -CN'e ait bir fragmentten türediği bu çalışmaların ışığında söylenebilir.

Yapılan bir çalışmada RP-HPLC toplanan fraksiyonların nano ESI-MS/MS yöntemi ile peptit dizi analizi yapılmış ve elde edilen sonuçlar arasında 705.04 m/z sinyal değerini gösteren peptidin  $\beta$ -CN (f189–207) türevli bir peptit olduğu bildirilmiştir (Picariello vd., 2010). Bu çalışmadaki MALDI-TOF/TOF analizi yapılan fraksiyonların tümünde de 705 m/z sinyal değerinin görüldüğü ve bunun  $\beta$ -CN'e karşılık gelebileceği sonucuna varılmıştır.

Taze manda sütünden üretilen 4 farklı markaya ait taze peynirlerden elde edilen SÇE'lerin peptit analizi sonucunda tüm peynirlerde ortak olarak 1881.2 ve 1717.9 Da kütleli peptitler bulunmuştur. Peynir örneklerinden birisine ait fraksiyonda 905.5 Da, 1589.9 Da ve 1052.6 Da kütleli parçalar bulunmuş ve bunların sırasıyla  $\alpha_{s1}$ -CN (f17-23),  $\beta$ -CN (f195-209) ve  $\alpha_{s1}$ -CNe (f24-32) karşılık gelen fragmentler olduğu öne sürülmüştür (Silva vd., 2019). Ha vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada yaklaşık olarak 905.4 m/z sinyaline sahip peptidin  $\alpha_{s1}$ -CN'den (f182-198) türeyen ve IPNPIGSENSEKTTMPL diziliminde olduğu bildirilmiştir. Parmesan peynirinde olgunlaşmanın 6. ayında izole edilen  $\alpha_{s1}$ -CN peptitlerinde ACE-inhibitör aktivite görüldüğü, olgunlaşmanın 15. ayından itibaren ACE-inhibitör aktivite gözlenmediği bildirilmiştir (Addeo vd., 1992).

Yardımcı kültür kullanılarak üretilen model peynirlerden elde edilen fraksiyonların MALDI-TOF-MS yöntemi ile peptit analizi sonucunda  $\alpha_{s1}$ - ve  $\kappa$ -CN'den üretilen peptitlerin, diğer kazeinler tarafından üretilenlere kıyasla daha yüksek miktarlarda olduğu belirlenmiştir (Sahingil vd., 2022). İlave probiyotik kültürler ile üretilen ve farklı sıcaklıklarda (4 ve 8°C) olgunlaştırılan Cheddar peynirlerinden elde edilen ve ACE-inhibitör aktivitesi en yüksek olan F1, F4, F15 ve F16 numaralı fraksiyonlar MALDI-TOF-MS ile tanımlanmıştır. F1 fraksiyonun pik noktasında moleküler ağırlığı, 854.674 olarak belirlenmiş ve  $\kappa$ -CN'den (f96-102) türediği tespit edilen ARHPHPH diziliminde bir peptit tanımlanmıştır. F4 fraksiyonunda ilk beş kalıntısının RPKHP olduğu gözlenen üç peptidin bulunduğu belirlenmiştir. F15 ve F16'dan elde edilen peptitler sırasıyla  $\alpha_{s1}$ -CN

(f24-32) ve  $\beta$ -CN (f193-209) olarak tanımlanmıştır (Ong ve Shah, 2008b). Kaşar peynirinde belirlenen peptit sekansları, 875 m/z sinyali için RPKHPIK-H-Q, 1012 sinyali m/z için RPKHPIK+H peptidi ve 1140 m/z sinyali için RPKHPIKH+Q peptidi ile eşleştirilmiştir. Araştırmacılar çalışma sonucunda kaşar peynirinin peptit fraksiyonlarının antioksidan aktivite gösterdiği sonucuna varılabileceğini öne sürmüşlerdir (Öner ve Sarıdağ, 2018a). Cheddar peynirinde yapılan bir çalışmada  $\alpha_{s1}$ -CN'nin N-terminal peptitlerine ve  $\beta$ -CN'nin N-terminal peptidlerine karşılık gelen ve ACE-inhibisyonu yüksek peptitler tanımlanmıştır (Ong vd., 2007).

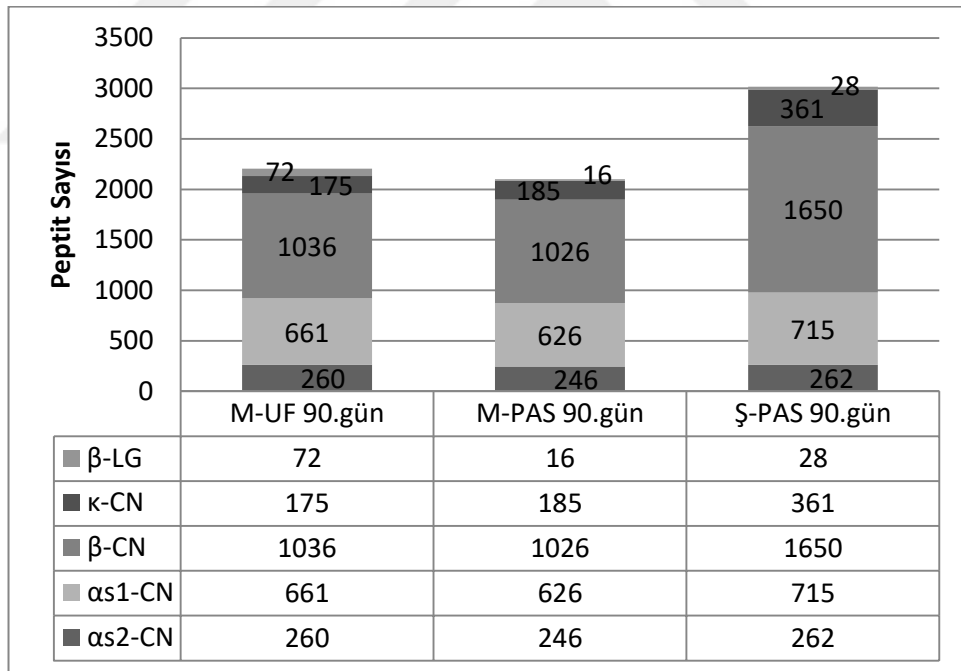
İran Koopeh peynirlerinden elde edilen 2–10 kDa ekstraktların peptit dizi analizi MALDI-TOF-MS ile Banihashemi vd. (2020) tarafından yapılmıştır. Peptit ekstraktının değişen moleküler ağırlıklara sahip peptitlerden oluştuğu bulunmuş ve 3896.91, 3937.42, 3926.57, 3702.51 ile 3692.87 Da moleküler ağırlıklara sahip peptitlerin baskın olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar çalışma sonunda, peptit boyutunun, peptidin antioksidan aktivitesini etkileyen önemli faktörlerden biri olduğunu vurgulamışlardır. Timón vd. (2014), 2217, 1881 ve 2107 Da moleküler ağırlıklara sahip olan ve Burgos tipi peynirin radikal süpürme ve şelatlama etkisine katkıda bulunan peptitleri tanımlamışlardır.

MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrometresi taramalarında olasılığı yüksek (güvenilir bölgede) bir eşleşme bulunamadığı ve taramada kullanılan veri bankası bu konuda yeterli olmadığı için peptitlerin tanımlaması ve dizi analizi bu yöntem ile yapılamamıştır. Bu nedenle, yüksek ACE-inhibitör aktivite gösteren M-UF, M-PAS ve Ş-PAS peynirlerinin 90. günlerine ait <3kDa peptit ekstraktlarının peptit dizi analizinde Orbitrap Fusion Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi Nano LC-MS/MS yöntemi kullanılmıştır.

#### **4.9. Orbitrap Fusion Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi Nano LC-MS/MS Yöntemi İle Peptit Analizi**

Peynir örneklerinden olgunlaşmanın 90. gününde elde edilen <3kDa molekül ağırlığındaki peptitlerin tanımlanması Orbitrap Fusion Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi Nano LC-MS/MS Yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Analiz

sonucunda <3kDa peptit ekstraktlarında tanımlanan tüm peptitlerin sayısı ve dağılımı Şekil 4.56.'da verilmiştir. Tanımlanan tüm peptitler arasında iyon skoru 55 olan ve doğruluğunun daha yüksek olduğu düşünülen peptitler M-UF, M-PAS ve Ş-PAS peynirleri için sırasıyla EK C'de Çizelge C.2., C.3. ve C.4.'de verilmiştir. Bu çizelgelerde, bu çalışmada tanımlanmış amino asitlerin sekansları ile eşleşme veren ve literatürde ACE-inhibisyonu belirlenmiş dizilimlerin bildirildiği çalışmalar verilmiş ve eşleşme gösteren diziler kalın harfler ile gösterilmiştir. Altı çizili harflerde ise prolin aminoasidi ile birlikte üç C-terminal pozisyonunda bulunan fenilalanin, lösin, izölösün, triptofan ve valin gibi hidrofobik amino asitlere ve arginin ile lizin gibi pozitif yüklü amino asitlere vurgu yapılmıştır. EK C.'de amino asitlerin isimlerinin kısaltılması Çizelge C.1.'de verilmiş, bu çalışmada tanımlanan peptitlerin amino asit dizilimleri ve literatürde tanımlanmış dizilimler bu çizelgedeki kısaltmalara göre yorumlanmıştır.



Şekil 4.56. <3kDa ekstraktlarına ait peptitlerin dağılımı

<3kDa ekstraktlarına ait spektrumda m/z sinyal değerinin 509,7921-1339,2402 arasında değiştiği, moleküler ağırlıklarının deneysel ve hesaplanan sonuçlarının sırasıyla 1017,5695 - 3342,9105 Da ile 1017,5607 - 3342,8791 Da arasında değiştiği belirlenmiştir. Şekil 4.56.'da görüldüğü üzere <3kDa

ekstraktları arasında ACE-inhibitör aktivitesi yüksek olan örneklerin toplam peptit sayısı bakımından en yüksekten en düşüğe doğru sıralanışının Ş-PAS (3016 adet peptit) > M-UF (2204 adet peptit) > M-PAS (2099 adet peptit) olduğu belirlenmiştir. Genel olarak kazeinler arasındaki sıralama ise 3 örnek için de en yüksek sayıdan düşüğe doğru  $\beta$ -CN >  $\alpha_{s1}$ -CN >  $\alpha_{s2}$ -CN olarak sıralanmıştır. Serum proteinleri arasından da yalnızca  $\beta$ -laktoglobuline ait peptitlerin tanımlandığı görülmektedir. Literatürde kısa ile orta olgunlaşmış peynirlerden elde edilen peptit ekstraktlarının, potansiyel olarak  $\alpha_{s1}$ - ve  $\beta$ -CN'den türemiş belirli peptitlerden kaynaklanan en güçlü ACE-inhibitör aktivitelerine sahip olduğu bildirilmiştir (Pripp vd., 2006; Sieber vd., 2010; Stuknytė vd., 2015).

Peynir üretiminde kullanılan pıhtılaştırıcı enzim, olgunlaşmanın başında  $\alpha_{s1}$ -CN'i Phe<sub>23</sub>-Phe<sub>24</sub> peptit bağından ve  $\beta$ -CN'i Leu<sub>192</sub>-Tyr<sub>193</sub> peptit bağından hidrolize eder. Bu hidroliz olgunlaşmanın başında, biyoaktif oldukları da bilinen  $\alpha_{s1}$ -CN (f1-23) ile  $\beta$ -CN (f193-209) peptitlerini açığa çıkartır (Baptista ve Gigante, 2021). Peynirde kalan pıhtılaştırıcı enzimin aktivitesi ile  $\alpha_{s1}$ -CN'in ilk parçalanmasının gerçekleştiği bilinmektedir (Fox ve McSweeney, 1997). Olgunlaşma sırasında  $\alpha_{s1}$ -CN, kimozen tarafından yüksek oranda hidrolize edilir. Olgunlaşmanın ilerleyen aşamalarında ise yüksek oranda mikrobiyal proteinazlar veya peptidazlar tarafından, daha az ölçüde kimozen ve plazmin enzimi tarafından hidrolize edilir (Ardö vd., 2017). Bu bilgiler ışığında, toplam <3kDa peptit sayısı ile  $\alpha_{s1}$ -CN ve  $\beta$ -CN miktarının en fazla Ş-PAS peynirine ait olduğu ve mikrobiyal kaynaklı enzimle üretilmiş M-UF ve M-PAS peynirlerinin peptit sayısının birbirine yakın olması sebebiyle bu farklılığın pıhtılaştırıcı enzim kaynaklı olduğu sonucuna varılmaktadır.

Proteolitik aktivite sonucu <3kDa peptitlerden tanımlanan peptitlerin sayısının yüksek olması Cantor vd. (2004) tarafından da bildirilmiştir. Gómez-Ruiz vd. (2002) tarafından yapılan çalışmada, 8 ay olgunlaştırılan peynirden elde edilen <3kDa ekstraktlarının peptit profilinde 5 adet  $\alpha_{s2}$ -CN türevli, 6 adet  $\beta$ -CN türevli ve 10 tane  $\alpha_{s1}$ -CN türevli fragment tanımlamışlardır. Valdeon peynirlerinden elde edilen <3kDa ekstraktlarda da benzer olarak  $\beta$ - ve  $\alpha_{s1}$ -CN türevli

fragmentler  $\alpha_{s2}$ - ve  $\kappa$ -CN türevli fragmentlere göre daha fazla sayıda belirlenmiştir (Sánchez-Rivera vd., 2014b).

ACE, iki katalitik bölgeye sahip bir ektoenzimdir. ACE'nin farklı peptit inhibitörleri arasındaki yapı aktivite korelasyonları, ACE'ye bağlanmanın, substratın C-terminal tripeptid kalıntılarından güçlü bir şekilde etkilendiğini ve ACE'nin aktif bölgesine rekabetçi bağlanmada baskın bir rol oynadığını göstermiştir (Maruyama vd., 1987; Stuknytė vd., 2015). ACE'nin, üç C-terminal pozisyonunda esas olarak hidrofobik (aromatik veya dallanmış yan zincirler) amino asit kalıntıları içeren kısa zincirli, düşük molekül ağırlığına sahip peptitleri tercih ettiği görülmektedir (FitzGerald ve Meisel, 2000; Ong vd., 2007; Hayes ve Tiwari, 2015). Bu kısa zincirli ve üç C-terminal pozisyonunda prolin (Pro) ile birlikte fenilalanin (Phe), lösin (Leu), izolösin (Ile), triptofan (Trp) ve valin (Val) gibi hidrofobik amino asitlerle birlikte arjinin (Arg (R), guanidin grup) ve lisin (Lys (K),  $\epsilon$ -amino grup) gibi pozitif yüklü (+) amino asitlerin yer aldığı, bulunan peptitlerin ACE'ye bağlanma ihtimalinin fazla olduğu bildirilmiştir (Gómez-Ruiz vd., 2002; Hernández-Ledesma vd., 2005; Murray ve FitzGerald, 2007; Hernández-Ledesma vd., 2011; Qureshi vd., 2012; 2013). C-terminalinde bir Pro kalıntısını ihtiva eden küçük peptitlerin varlığının ya da kazeinin proteolize olan yüksek duyarlılığının ACE-inhibitör aktiviteye katkı sağlayabileceği, ilaveten C-terminalinde Pro aminoasidi bulunanların sindirim enzimlerine dirençli olduğu literatürde bildirilmiştir (Korhonen ve Pihlanto-Leppala, 2000; Korhonen ve Pihlanto, 2007; Otte vd., 2007; Moslehishad vd., 2013). İlaveten, bazı antioksidan peptitlerin ayrıca ACE-inhibe edici aktivite gösterdiği bilinmektedir (Hernández-Ledesma vd., 2005). Peptitlerin N-terminalinde de hidrofobik amino asit kalıntıları Leu ve Val içermesinin antioksidan aktiviteye katkısı olduğu literatürde bildirilmiştir (Farvin vd., 2010; Yao vd., 2018). Bazı yapılan çalışmalarda olgunlaştırılmış peynirde tanımlanan peptitlerin çoğunun  $\beta$ -CN'den salındığı ve tanımlanan bazı peptitlerin peynirlerde olgunlaşmanın farklı aşamalarında yaygın olduğu gösterilmiştir (Qureshi vd., 2012; 2013). Bu çalışmalar ışığında bu çalışmada M-UF, M-PAS ve Ş-PAS peynirlerine ait <3kDa peptitlerin tanımlanan neredeyse tüm dizilimlerinde üç C-terminal pozisyonunda hidrofobik amino asitlerin (A, I, L, V,

F, W, R ve K gibi), Pro aminoasidi ile birlikte Arg ve Lys gibi pozitif yüklü amino asitlerin varlığı belirlenmiştir. İlaveten, tanımlanan dizilimlerinin çoğunun  $\beta$ -CN'den salındığı görülmüştür. Bu durum bu çalışmada tanımlanmış peptitlerin potansiyel yüksek biyoaktivitelerinin olduğunu göstermektedir.

Helal ve Tagliazucchi (2023) tarafından ACE-inhibisyonu olduğu bildirilen VYQHQQAMKPWIQPKTKVIPYVRYL dizilimli peptidinin, bu çalışmadaki M-PAS peynirine ait ekstraktta  $\alpha_{s2}$ -CN (f198-222) türevli peptitte varlığı tanımlanmıştır. Bu peptit ile bu çalışmadaki ekstraktlar arasında M-UF peynirinde  $\alpha_{s2}$ -CN (f196-222) türevli, M-PAS peynirinde  $\alpha_{s2}$ -CN (197-222) türevli ve Ş-PAS peynirinde  $\alpha_{s2}$ -CN (196-222) türevli peptitlerin diziliminde de eşleşme olduğu tespit edilmiştir. Shi vd. (2021) tarafından ACE-inhibitör aktivite gösterdiği bildirilmiş LLY ile QEPVLGPVRGPFP dizilimlerini de bu çalışmadaki M-UF peynirinin ekstraktına ait LLYQEPVLGPVRGPFP dizilime sahip peptidin sekansında bütünüyle bulundurması dikkat çekici özelliكتedir. Bu çalışmada peptit dizi analizi yapılan 3 peynire ait ekstraktta da ortak olarak tanımlanan LQYLEQLLR ( $\alpha_{s1}$ -CN (f107-115)) dizilimine sahip peptit, Helal ve Tagliazucchi (2023) tarafından ACE-inhibisyonu bildirilen LGY ve YLEQLLR dizilimlerini bütünüyle bulundurması ile öne çıkmıştır. Bu çalışmada Ş-PAS peynirinde varlığı belirlenen SLSQSKVLPVPQKAVPYPQ ( $\beta$ -CN (f179-197)) dizilimli peptidin de ACE-inhibisyonu bildirilen peptitlerden olan SQSKVLPVPQKAVPYPQ dizilimi ile eşleşme gösterdiği belirlenmiştir.

M-PAS ve Ş-PAS <3kDa peptit ekstraktına ait peptit dizi analizi sonuçlarında LQYLYQGPIVLNPWDQVKR olarak tanımlanan sekans için 100 peptit skor ile eşleşme veren 13153 tarama numaralı MS/MS spektrumu için MASCOT tarama analizinin ekran görüntüsü, bu çalışmada örnek teşkil etmesi amacıyla Şekil 4.57.'de gösterilmiştir. Görüldüğü üzere peptit tanımlanmasına yardımcı olan bolca y iyonu ve bir kaç b iyonu üzerinden fragmentasyon verisi ile amino asit sekansı tanımlaması yapılmıştır (Perkins vd., 1999).

## Mascot Search Results

### Peptide View

MS/MS Fragmentation of **LQYLYQGPIVLNPWDQVKR**

Found in **P04654|CASA2\_SHEEP**, Alpha-S2-casein OS=Ovis aries OX=9940 GN=CSN1S2 PE=2 SV=1

Match to Query 9536: 2329.277487 from(777.433105,3+) intensity(22029002.5127) rtinseconds(1803.961062) index(10493)

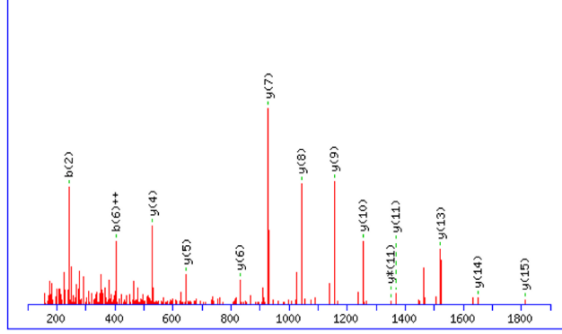
Title: SD16\_3.13153.13153.3 File:"SD16\_3.raw", NativeID:"controllerType=0 controllerNumber=1 scan=13153"

Data file C:\Documents and Settings\Administrator\Desktop\Hela\_ikincideneme\_mgfile\SD16\_3.mgf

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or,  100 to  Da

Label all possible matches ☐ Label matches used for scoring ☒



Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 2329.2583

Ions Score: 100 Expect: 8e-009

Matches : 15/178 fragment ions using 16 most intense peaks ([help](#))

| #  | b               | b <sup>++</sup> | b <sup>*</sup> | b <sup>++</sup> | b <sup>0</sup> | b <sup>0++</sup> | Seq. | y                | y <sup>++</sup> | y <sup>*</sup>   | y <sup>++</sup> | y <sup>0</sup> | y <sup>0++</sup> | #  |
|----|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|------------------|------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|----------------|------------------|----|
| 1  | 114.0913        | 57.5493         |                |                 |                |                  | L    |                  |                 |                  |                 |                |                  | 19 |
| 2  | <b>242.1499</b> | 121.5786        | 225.1234       | 113.0653        |                |                  | Q    | 2217.1815        | 1109.0944       | 2200.1550        | 1100.5811       | 2199.1709      | 1100.0891        | 18 |
| 3  | <b>405.2132</b> | 203.1103        | 388.1867       | 194.5970        |                |                  | Y    | 2089.1229        | 1045.0651       | 2072.0964        | 1036.5518       | 2071.1124      | 1036.0598        | 17 |
| 4  | 518.2973        | 259.6523        | 501.2708       | 251.1390        |                |                  | L    | 1926.0596        | 963.5334        | 1909.0330        | 955.0202        | 1908.0490      | 954.5282         | 16 |
| 5  | 681.3606        | 341.1840        | 664.3341       | 332.6707        |                |                  | Y    | <b>1812.9755</b> | 906.9914        | 1795.9490        | 898.4781        | 1794.9650      | 897.9861         | 15 |
| 6  | 809.4192        | <b>405.2132</b> | 792.3927       | 396.7000        |                |                  | Q    | <b>1649.9122</b> | 825.4597        | 1632.8857        | 816.9465        | 1631.9016      | 816.4545         | 14 |
| 7  | 866.4407        | 433.7240        | 849.4141       | 425.2107        |                |                  | G    | <b>1521.8536</b> | 761.4305        | 1504.8271        | 752.9172        | 1503.8431      | 752.4252         | 13 |
| 8  | 963.4934        | 482.2504        | 946.4669       | 473.7371        |                |                  | P    | 1464.8322        | 732.9197        | 1447.8056        | 724.4064        | 1446.8216      | 723.9144         | 12 |
| 9  | 1076.5775       | 538.7924        | 1059.5510      | 530.2791        |                |                  | I    | <b>1367.7794</b> | 684.3933        | <b>1350.7528</b> | 675.8801        | 1349.7688      | 675.3881         | 11 |
| 10 | 1175.6459       | 588.3266        | 1158.6194      | 579.8133        |                |                  | V    | <b>1254.6953</b> | 627.8513        | 1237.6688        | 619.3380        | 1236.6848      | 618.8460         | 10 |
| 11 | 1288.7300       | 644.8686        | 1271.7034      | 636.3554        |                |                  | L    | <b>1155.6269</b> | 578.3171        | 1138.6004        | 569.8038        | 1137.6164      | 569.3118         | 9  |
| 12 | 1402.7729       | 701.8901        | 1385.7464      | 693.3768        |                |                  | N    | <b>1042.5429</b> | 521.7751        | 1025.5163        | 513.2618        | 1024.5323      | 512.7698         | 8  |
| 13 | 1499.8257       | 750.4165        | 1482.7991      | 741.9032        |                |                  | P    | <b>928.4999</b>  | 464.7536        | 911.4734         | 456.2403        | 910.4894       | 455.7483         | 7  |
| 14 | 1685.9050       | 843.4561        | 1668.8784      | 834.9429        |                |                  | W    | <b>831.4472</b>  | 416.2272        | 814.4206         | 407.7139        | 813.4366       | 407.2219         | 6  |
| 15 | 1800.9319       | 900.9696        | 1783.9054      | 892.4563        | 1782.9214      | 891.9643         | D    | <b>645.3679</b>  | 323.1876        | 628.3413         | 314.6743        | 627.3573       | 314.1823         | 5  |
| 16 | 1928.9905       | 964.9989        | 1911.9640      | 956.4856        | 1910.9799      | 955.9936         | Q    | <b>530.3409</b>  | 265.6741        | 513.3144         | 257.1608        |                |                  | 4  |
| 17 | 2028.0589       | 1014.5331       | 2011.0324      | 1006.0198       | 2010.0484      | 1005.5278        | V    | 402.2823         | 201.6448        | 385.2558         | 193.1315        |                |                  | 3  |
| 18 | 2156.1539       | 1078.5806       | 2139.1273      | 1070.0673       | 2138.1433      | 1069.5753        | K    | 303.2139         | 152.1106        | 286.1874         | 143.5973        |                |                  | 2  |
| 19 |                 |                 |                |                 |                |                  | R    | 175.1190         | 88.0631         | 158.0924         | 79.5498         |                |                  | 1  |

Şekil 4.57. LQYLYQGPIVLNPWDQVKR olarak tanımlanan sekans için MASCOT tarama sonuçları

Literatürde  $\beta$ -CN'den türemiş YQEP, VPKVK ve YQEPVLGP\* ve RPK peptitlerin,  $\alpha_{s1}$ -CN'den türemiş RPKHPIKH-\* dizilimli peptitlerin ACE-inhibitör aktivite sergilediği belirlenmiştir (Silva vd., 2006; Torres-Llanez vd., 2011; Hao vd., 2021). Gómez-Ruiz vd. (2002) tarafından Manchego peynirine ait <3kDa

ekstraktları içinde tanımlanan ve  $\beta$ -CN'den elde edilen, yüksek ACE-inhibisyonu gösterdiği tespit edilmiş VRGPFP dizilimi bildirilmiştir. YQEPVLGP peptidin, yüksek ACE-inhibisyon, antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin tanımlandığı Meira vd. (2012) tarafından vurgulanmıştır. VLGPVRGPFP dizilimine ait ACE-inhibitör aktivite Quirós vd. (2007) tarafından, EPVLGPVRGPFP ise Hao vd. (2021) ve Helal ve Tagliazucchi (2023) tarafından da bildirilmiştir. Farklı olgunluktaki Wisconsin Cheddar peynirlerinden elde edilen <3kDa peptit ekstraktlarında yüksek ACE-inhibitör aktivitesi gösteren VRYL dizilimli peptidin varlığı bildirilmiştir (Lu vd., 2016). Biyoaktivitesi belirlenmiş tüm bu dizilimlerin, bu çalışmada tanımlanmış bazı peptitlerde eşleşme gösterdiği tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda,  $\beta$ -kazeinden türediği belirtilen DKIHFP sekansında bir hekzapeptidin sadece hidrofobik amino asit içerdiği belirlenmiştir. Bu peptidin, ACE hidroliziyle anjiyotensin-I'den üretilmiş bir oktapeptid olan anjiyotensin-II ile ortak olarak ilk N-terminal amino asidine ve son dört C-terminal amino asidine sahip olduğu vurgulanmıştır (Gómez-Ruiz vd. 2007; Ong vd., 2007; Martini vd., 2020; Hao vd., 2021). Bu peptidin, bu çalışmada yalnızca M-UF peynirinde tanımlanan DELQDKIHFPFAQTQSL ( $\beta$ -CN (58-73)) dizilimli peptitte yer aldığı belirlenmiştir.

Farklı peynirlerde elde edilen RPKHPIKHQ dizilimine ait bir peptitte ACE-inhibisyonu bildirilmiştir (Saito vd., 2000; Ong vd., 2007; Helal ve Tagliazucchi, 2023). RPKHPIKHQ diziliminde gözlenen RPK (Silva vd., 2006), PKHP (Gómez-Ruiz vd., 2006), RPKHPI (Ong vd., 2007; Helal ve Tagliazucchi, 2023), RPKHPIK (Ong vd., 2007) ve RPKHPIKH (Silva vd., 2006) sekanslarının ACE-inhibisyonu gösterdiği literatürde bildirilmiştir. ACE-inhibisyonu kanıtlanan bu dizilimlerin, bu çalışmada M-PAS peynirinden elde edilen RPKHPIKHQGLPQ ( $\alpha_{s1}$ -CN (16-28)) dizilimine sahip peptitte yer aldığı belirlenmiştir. Ayrıca RPKHPIK-H-Q, RPKHPIK+H ve RPKHPIKH+Q dizilimleri ile tanımlanan peptitlerin, Öner ve Sarıdağ (2018) tarafından, Kaşar peynirinden elde edilen ve antioksidan aktivite gösteren bir fraksiyona ait peptit dizisi içinde tanımlandığı bildirilmiştir.

ACE-inhibitör aktivitesi Gómez-Ruiz vd. (2002;2006) tarafından bildirilen FPE ve PFP dizilimlerinin ve Ong vd. (2007) tarafından bildirilen FVAPFPEVF dizilimlerinin, bu çalışmada M-PAS peynirinde belirlenen FVAPFPEVFGKEK ( $\alpha_{s1}$ -CN (39-51)) ve FVAPFPEVFGKEKVNE ( $\alpha_{s1}$ -CN (39-54)) dizilimine sahip 2 adet peptitte eşleşme gösterdiği belirlenmiştir. Kerkaert vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada ACE-inhibisyonu bildirilen TDVENL diziliminin bu çalışmada M-UF peynirinden elde edilen ve  $\beta$ -CN (143-156) türevli TDVENLHLPLPLLQ dizilimine sahip peptidinde görüldüğü tespit edilmiştir.

Farklı peynir numunelerinden elde edilen <3kDa peptit ekstraktı örneklerinde LPLP\*- diziliminden türemiş birçok peptit dizilimi ve NLHLPLP ile NLHLPLPLL dizilimleri bu çalışmadaki birçok peptit ile eşleşme göstermiştir (Basiricò vd. 2015; Solieri vd., 2020; Hao vd., 2021; Helal ve Tagliazucchi, 2023). Helal ve Tagliazucchi (2023) ve Solieri vd. (2020) tarafından bildirilmiş KVLPVPQ, ENLLRF, MKPWIQPK ve AMKPWIQPK dizilimlerinin bu çalışmada tanımlanan bazı peptitler ile eşleşme gösterdiği tespit edilmiştir. Hao vd. (2021), LHLPLPL, NLHLPLPLL, VYPFPGPIP, YQEPVLGPVR dizilimlerinin *in vitro* sindirime dirençli olup bozulma göstermediğini vurgulamışlardır. Bu dizilimlerin, bu çalışmadaki birçok peptit ile eşleşme gösterdiği tespit edilmiştir.

Bazı amino asitlerin yapı-aktivite ilişkisinde oynadığı rol bildirilmiştir. Pro aminoasidinin yüksek düzeyde bulunmasının, ACE-inhibitör aktivite gibi antioksidan aktiviteye de etki ettiği çalışmalarda gözlenmiştir. Ajibola vd. (2011), His (H, imidazol grubu), Trp (W, indolik grup), Tyr (Y, fenolik grup), Phe (F, aromatik amino asit) ve Pro (P, hidroksil radikal temizleyici) gibi belirli amino asitlerin, antioksidan kapasite ile ilişkili olduğunu belirtmiştir. Antioksidan aktiviteye katkı sağladığı bildirilen bu amino asitlerden bir veya birkaçının, bu çalışmada ACE-inhibisyonu ile birlikte ABTS ve TEAC antioksidan aktivite sonuçlarının da yüksek olduğu gözlenen <3kDa peptit ekstraktlarının literatürdeki birçok ACE-inhibitör peptitle eşleşme gösteren peptit dizilimlerinde çoğunlukla yer aldığı görülmektedir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, ultrafiltrasyon yöntemiyle üretilmiş UF süt ve pastörize edilmiş sütün, mikrobiyal ve şirden olmak üzere iki farklı enzim kullanılarak pıhtılaştırılması ile Beyaz peynir üretimleri gerçekleştirilmiştir. Peynirler 4°C'de 90 günlük olgunlaşmaya bırakılmış ve olgunlaşma süresince peynirlerin fizikokimyasal özellikleri, meydana gelen proteoliz durumu, SÇE ve <3kDa peptit ekstraktlarının peptit profili ile biyoaktivitesi ve peynirlerin *in vitro* sindirim sonrası biyoaktivitesi belirlenmiştir. Bu bölümde, Beyaz peynir örneklerinde yapılan tüm bu analizlerden elde edilen sonuçlar özetlenmiştir.

1. Kurumadde değerleri M-PAS ve Ş-PAS peynirler için olgunlaşma sonunda azalırken ( $p<0,05$ ), M-UF ve Ş-UF peynirlerinde zamana bağlı önemli bir değişim görülmemiştir ( $p>0,05$ ). Kurumadde değerleri üzerinde sütün proses farklılığı ve depolamanın etkisi önemli bulunurken enzimin yalnızca süt ile olan interaksiyonunun etkisi önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).
2. Peynirlerin titrasyon asitliği ve pH değerleri üzerinde sütün proses farklılığının önemli olduğu, depolamanın etkisinin yalnızca titrasyon asitliği için önemli olduğu belirlenirken ( $p<0,05$ ) enzim farklılığının etkisi önemli bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).
3. Peynirlerin yağ ve kurumaddede yağ değerlerinin olgunlaşma süresi boyunca pastörize süttten yapılan peynirlerde daha yüksek olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ). Bununla birlikte depolama ve sütün proses farklılığının bu değerler üzerinde etki ettiği belirlenmiş, kurumaddede yağ değeri için enzim farklılığının etkisi de önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Peynirlerin tuz ve kurumaddede tuz değerlerinde sütün proses farklılığı ile depolama süresinin etkisinin önemli bulunduğu ( $p<0,05$ ), farklı pıhtılaştırıcı enzim kullanımının etkisinin önemli bulunmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ).

4. Peynirlerin üretiminde kullanılan sütün prosesinin sadece TMAB ve laktokok sayıları üzerinde önemli düzeyde farklılığa neden olduğu, enzimin etkisinin olmadığı belirlenmiştir ( $p<0,05$ ).

5. Peynirlerin toplam protein ve toplam azot değerlerinin pastörize süttten yapılan peynirlerde daha yüksek olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ). Toplam protein, kurumaddede protein ve toplam azot değerlerinde sütün proses farklılığı ile depolama süresinin etkisinin önemli bulunduğu ( $p<0,05$ ), farklı pıhtılaştırıcı enzim kullanımının etkisinin önemli olmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ).

6. Peynirlerin SÇA ve SÇA'ya göre olgunlaşma indeksi değerlerinin olgunlaşma sonunda pastörize süttten yapılan peynirlerde daha yüksek olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). SÇA ve SÇA'ya göre olgunlaşma indeksi değerlerinde sütün proses farklılığı ile depolamanın etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ).

7. %12 TCA'da çözünen azot değerinde olgunlaşma sonunda pastörize süttten yapılan peynirlerde daha yüksek olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Sütün proses farklılığı ile depolama süresinin %12 TCA'da çözünen azot ve olgunlaşma indeksi değerleri için önemli düzeyde etki ettiği ( $p<0,05$ ), farklı enzim kullanımının ise yalnızca %12 TCA'da çözünen azot değerleri üzerinde farklılığa neden olduğu belirlenmiştir.

8. %5 PTA'da çözünen azot ve buna bağlı olgunlaşma indeksi değerlerinin olgunlaşma sonunda pastörize süttten yapılan peynirlerde daha yüksek olduğu, 30. ve 60. günlerde Ş-PAS peynirinde M-PAS peynirine göre daha yüksek olduğu ( $p<0,05$ ), ancak olgunlaşma sonunda farkın önemsiz olduğu belirlenmiştir ( $p>0,05$ ). Sütün prosesi ve enzimlerin farklılığı ile depolama süresinin etkisinin önemli bulunduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ).

9. Olgunlaşmanın sonunda UF süttten üretilen peynirlerin toplam serbest amino asit miktarının daha yüksek olduğu ( $p<0,05$ ), şirden mayası ile yapılan peynirlerin mikrobiyal enzimle üretilenlere göre daha yüksek olduğu

görülmüştür ( $p>0,05$ ). Sütün prosesi ve enzimlerin farklılığı ile depolama süresinin etkisinin önemli bulunduğu sonucuna varılmıştır ( $p<0,05$ ).

10. SDS-PAGE analizi sonucunda oluşan bantlar incelendiğinde olgunlaşmanın 90. gününe göre bant yoğunluğunun azaldığı, bu azalışın UF sütlerden üretilen Beyaz peynirlerde daha fazla olduğu görülmüştür. Bu farklılığın, M-UF ve Ş-UF peynirlerinin kitlesinde kalan kalıntı rennetin  $\alpha_s$ -CN ve  $\beta$ -CN hidrolizasyonu üzerinde daha fazla etkili olmasından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

11. RP-HPLC kromatogramları incelendiğinde, kullanılan her iki pıhtılaştırıcı enzimin de olgunlaşma sonunda hem UF süttten hem de pastörize süttten üretilen peynirlerde SÇE piklerinin artışına neden olduğu gözlenmiştir.  $<3\text{kDa}$  peptitlere ait pikler incelendiğinde, olgunlaşma sonunda mikrobiyal enzimin pastörize süttten üretilen peynirde, şirden mayasının ise UF süttten üretilen peynirde piklerin azalışına yol açtığı görülmüştür.

Hem SÇE hem  $<3\text{kDa}$  peptit örnekleri için sütün prosesinin farklılığının hidrofobik bölgede, enzimin ise hidrofilik bölgede önemli etkiye sebep olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Depolama süresinin sadece SÇE örnekleri için hem hidrofilik hem hidrofobik bölgede önemli bir etkisinin olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ).

12. Olgunlaşmanın sonunda SÇE örneklerinin protein miktarının pastörize süttten yapılan peynirlerde,  $<3\text{kDa}$  peptit ekstraktı örneklerinin protein miktarının UF süttten yapılan peynirlerde daha yüksek olduğu gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Sütün proses farklılığı ve depolama süresinin etkisi, her iki peptit ekstraktı örneklerinin protein içeriği üzerinde önemli bulunurken enzimin etkisi  $<3\text{kDa}$  örneklerde önemli bulunmuştur. SÇE örneklerinde ise sadece enzimin süt ile olan interaksiyonun etkisi önemli bulunmuştur.

13. Aşağıdaki Çizelge 5.1.'de peptitlerin biyoaktivite sonuçları ve olgunlaşma süresi sonundaki farklılıkları özetlenmiştir.

Çizelge 5.1. Peptitlerin biyoaktivitesi sonuçları üzerinde varyasyon kaynaklarının etkisi ve olgunlaşma sonundaki farklılıkları

|                                                     |           |                                                                      |     | Peynir örnekleri |           |           |           |
|-----------------------------------------------------|-----------|----------------------------------------------------------------------|-----|------------------|-----------|-----------|-----------|
| Analizler                                           | Peptitler | Varyasyon kaynakları                                                 | Gün | M-UF             | Ş-UF      | M-PAS     | Ş-PAS     |
| ACE-inhibitör aktivite                              | SÇE       | Süt, Enzim, Depolama (p<0,05)                                        | 1   |                  | En düşük  |           | En yüksek |
|                                                     |           |                                                                      | 30  |                  | En yüksek | En düşük  |           |
|                                                     |           |                                                                      | 60  | En düşük         |           | En yüksek |           |
|                                                     |           |                                                                      | 90  |                  | En düşük  |           | En yüksek |
|                                                     | <3kDa     | Enzim, Depolama ve tüm varyasyon kaynaklarının interaksyonu (p<0,05) | 1   |                  |           | En yüksek | En düşük  |
|                                                     |           |                                                                      | 30  | En düşük         |           | En yüksek |           |
|                                                     |           |                                                                      | 60  |                  | En düşük  | En yüksek |           |
|                                                     |           |                                                                      | 90  |                  | En düşük  | En yüksek |           |
| DPPH antioksidan aktivitesi                         | SÇE       | Süt, Depolama ve Süt x Enzim interaksyonu (p<0,05)                   | 1   | En yüksek        |           | En düşük  |           |
|                                                     |           |                                                                      | 30  | En yüksek        |           | En düşük  |           |
|                                                     |           |                                                                      | 60  |                  | En yüksek |           | En düşük  |
|                                                     |           |                                                                      | 90  |                  | En düşük  |           | En yüksek |
|                                                     | <3kDa     | Depolama, Enzim x Depolama interaksyonu (p<0,05)                     | 1   |                  | En düşük  |           | En yüksek |
|                                                     |           |                                                                      | 30  | En düşük         |           |           | En yüksek |
|                                                     |           |                                                                      | 60  |                  |           | En düşük  | En yüksek |
|                                                     |           |                                                                      | 90  | En düşük         | En yüksek |           |           |
| ABTS antioksidan aktivitesi (10µL örnek hacmi için) | SÇE       | Depolama ve Süt x Depolama ve Süt x Enzim interaksyonları (p<0,05)   | 1   |                  | En düşük  |           | En yüksek |
|                                                     |           |                                                                      | 30  | En yüksek        |           | En düşük  |           |
|                                                     |           |                                                                      | 60  |                  |           | En yüksek | En düşük  |
|                                                     |           |                                                                      | 90  | En yüksek        |           | En düşük  |           |

Çizelge 5.1. Peptitlerin biyoaktivitesi sonuçları üzerinde varyasyon kaynaklarının etkisi ve olgunlaşma sonundaki farklılıkları (devam)

| Analizler                                           | Peptitler | Varyasyon kaynakları                                               | Gün | M-UF      | Ş-UF      | M-PAS     | Ş-PAS     |
|-----------------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------------|-----|-----------|-----------|-----------|-----------|
| ABTS antioksidan aktivitesi (10µL örnek hacmi için) | <3kDa     | Süt ve Depolama (p<0,05)                                           | 1   | En yüksek |           | En düşük  |           |
|                                                     |           |                                                                    | 30  | En yüksek |           | En düşük  |           |
|                                                     |           |                                                                    | 60  |           | En yüksek |           | En düşük  |
|                                                     |           |                                                                    | 90  |           | En yüksek |           | En düşük  |
| TEAC antioksidan aktivite                           | SÇE       | Depolama ve Süt x Depolama ve Süt x Enzim interaksyonları (p<0,05) | 1   |           | En düşük  |           | En yüksek |
|                                                     |           |                                                                    | 30  | En yüksek |           | En düşük  |           |
|                                                     |           |                                                                    | 60  |           |           | En yüksek | En düşük  |
|                                                     |           |                                                                    | 90  | En yüksek |           |           | En düşük  |
|                                                     | <3kDa     | Süt, Depolama ve Süt x Enzim interaksyonu (p<0,05)                 | 1   |           | En yüksek |           | En düşük  |
|                                                     |           |                                                                    | 30  |           | En yüksek |           | En düşük  |
|                                                     |           |                                                                    | 60  |           | En yüksek |           | En düşük  |
|                                                     |           |                                                                    | 90  |           | En yüksek | En düşük  |           |

14. Sindirim fazı örneklerinin protein içerikleri incelendiğinde, olgunlaşma süresince gastrik SS fazına göre intestinal İÇ fazının daha düşük olduğu, intestinal DIŞ fazının ise genel olarak daha düşük veya önemsiz düzeyde yakın değerler sergilediği belirlenmiştir. Tüm sindirim fazı örneklerinin protein değerinde sütün prosesinin etkisinin önemli bulunduğu, yalnızca SS fazı için depolama ve enzimin etkisinin önemli bulunduğu belirlenmiştir (p<0,05).

15. Peynir örneklerinin sindirim fazları arasında en düşük ACE-inhibitör aktiviteyi İÇ fazının sergilediği belirlenmiştir. SS fazına göre DIŞ fazında 30. günde ACE-inhibitör aktivitenin yükseldiği, 90. günde ise şirden mayası ile üretilen peynirlerde azalırken mikrobiyal enzimle üretilenlerde arttığı

görülmüştür. İÇ ve DIŞ fazların ACE-inhibisyonu üzerinde depolama süresi, sütün prosesi ve enzim farklılığının etkisi önemli bulunurken, SS fazı için bunlardan farklı olarak sütün enzimle olan interaksiyonunun etkisi önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

16. Olgunlaşmanın sonunda DPPH antioksidan aktivitenin, SS fazı örneklerine göre tüm İÇ fazlarında arttığı belirlenirken DIŞ fazda ise yalnızca M-PAS peynirinde azaldığı belirlenmiştir. Sindirim fazlarının DPPH antioksidan aktivitesinde depolamanın SS fazı için önemli etki gösterdiği belirlenirken, enzimin etkisinin DIŞ fazında, sütün prosesinin ise SS ve DIŞ fazında önemli düzeyde etkisi olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Olgunlaşma süresince tüm örneklerin hem İÇ hem de DIŞ fazın ABTS ve TEAC antioksidan aktivitesinin SS fazına göre yükseldiği görülmüştür. Hem ABTS hem TEAC antioksidan aktivitesinde, sütün prosesinin tüm sindirim fazlarında, enzim farklılığının SS ve DIŞ fazlarında, depolamanın ise DIŞ fazında etkili olduğu görülmüştür. ( $p<0,05$ ).

17. ACE-inhibisyonu en yüksek iki fraksiyon olan M-UF F9. fraksiyon ile M-PAS F10. fraksiyonun MALDI-TOF/TOF MS sonuçlarında m/z sinyal değerlerinin birbirine benzediği görülmüş, diğer fraksiyonların ACE-inhibisyonundaki farklılıkların peptit sayısı ve özelliklerinden kaynaklandığı anlaşılmıştır. Orbitrap Nano LC-MS/MS Yöntemi ile tanımlanan <3kDa peptit ekstraktlarında toplam peptitlerin sayısının en yüksek Ş-PAS peynirinde görüldüğü, mikrobiyal enzim ile üretilen her iki peynirde peptit sayılarının yakın olduğu gözlenmiştir. Buna göre şirden mayasının düşük molekül ağırlıklı peptitlerin oluşumunda ve biyoaktivitesinde daha fazla etkin olduğu görülmüştür. Bu çalışmada tanımlanan peptit sekanslarının tamamında üç C-terminal bölgede prolin aminoasidi, hidrofobik ve/veya pozitif yüklü amino asitlerin yer aldığı ve bunların potansiyel olarak ACE-inhibisyonuna katkı sağlayabileceği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışma sonucunda, farklı kaynaklardan elde edilen enzimlerin proteolitik etkisinin, Beyaz peynir üretiminde kullanılan sütün üretim prosesi sonucu değişen protein değerlerinden etkilenebileceği ve buna göre farklı düzeylerde

proteolitik aktivite sergileyebileceği belirlenmiştir. Şirden mayasının proteolitik aktivitesinin UF sütte daha yüksek olması nedeniyle olgunlaşma sonunda <3kDa molekül ağırlığındaki peptitlerin azaldığı belirlenirken, DPPH ve TEAC antioksidan aktivitesinin arttığı ancak ACE-inhibisyonunun azaldığı görülmüştür. Pastörize sütte ise şirden mayasının <3kDa peptitlerin oluşumu ile ACE-inhibitör aktivitesi üzerinde olumlu yönde etkili olduğu sonucuna belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada tanımlanan <3kDa peptit dizilimleri arasında ACE-inhibisyonu bilinen birçok peptit dizisinin sayısının en fazla şirden mayası ile pastörize süttten üretilen peynirde olduğu görülmüştür. Ancak *in vitro* gastrointestinal sindirim ile peptitlerin biyoaktivitelerinde değişimler gözlemlendiği, özellikle ACE-inhibitör aktivitenin sindirim sonrasında azaldığı belirlendiği için sindirime uğramış proteinlerin yapı ve aktivite değişimlerinin daha iyi anlaşılması ve fonksiyonel gıda üretimlerinde kullanımında insan tüketimi sonrasındaki etkilerinin daha açık ortaya konulması gerektiği sonucuna varılmıştır. Proteoliz sonucu süt ürünlerinde oluşan, özellikle olgunlaşmaya bağlı değişkenlik görülen peptitlerin biyoaktivitesinin hem sindirim öncesinde hem de sonrasında aydınlatılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

- Abadia-Garcia, L., Cardador, A., del Campo, S.T.M., Arvízu, S.M., CastañoTostado, E., Regalado-González, C., García-Almendarez, B., AmayaLlano, S.L., 2013. Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. *International Dairy Journal*, 33 (2), 191–197.
- Abdel-Hamid, M., Otte, J., Gobba, C.D., Osman, A., Hamad, E., 2017. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. *The International Dairy Journal*, 66, 91–98.
- Abedin, M. M., Chourasia, R., Chiring Phukon, L., Singh, S. P., Kumar Rai, A., 2022. Characterization of ACE inhibitory and antioxidant peptides in yak and cow milk hard chhurpi cheese of the Sikkim Himalayan region. *Food Chemistry*:X, 13, 100231.
- Addeo, F., Chianes, L., Salzano, A., Sacchi, R., Cappucio, U., Ferranti, P., Malroni, A., 1992. Characterization of the 12% trichloroacetic acid-insoluble oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese. *Journal of Dairy Research*, 59, 401–411.
- Aebersold, R., Mann, M., 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198–207.
- Agboola, S., Chen, S., Zhao, J., 2004. Formation of Bitter Peptides During Ripening of Ovine Milk Cheese Made With Different Coagulants. *Dairy Journal*, 84 (6), 567- 578.
- Aguilar-Toalá, J.E., González-Córdova, A.F., Hernández-Mendoza, A., Torres-Llenez, M.J., Vallejo-Cordoba, B., 2013. Antioxidant activity of bioactive peptides and polyphenols isolated from Mexican Artisanal Cheeses. Abstract number 072-04 in IFT annual meeting and expo, Chicago, IL. Chicago, IL: Institute of Food Technologists.
- Aguilar-Toalá, J. E., Santiago-López, L., Peres, C. M., Peres, C., Garcia, H. S., Vallejo-Cordoba, B., Hernández-Mendoza, A., 2017. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 65–75.
- Aguilar-Toalá, J.E., Torres-Llenez, M.J., Hernández-Mendoza, A., Reyes-Díaz, R., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A.F., 2022. Antioxidant capacity and identification of radical scavenging peptides from Crema de Chiapas, Fresco and Cocido cheeses. *Journal of Food Science and Technology*, 59(7), 2705–2713.

- Ahtesh, F.B., Stojanovska, L., Apostolopoulo, V., 2017. Processing and sensory characteristics of a fermented low-fat skim milk drink containing bioactive antihypertensive peptides, a functional milk product. *International Journal of Dairy Technology*, 71, 230-239.
- Ajibola, C.F., Fashakin, J.B., Fagbemi, T.N., Aluko, R.E., 2011. Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 6685–6702.
- Akalın, V., 2021. Çiğ Sütteki Somatik Hücre Yüğü Farklılığına Göre Ultra Filtre Beyaz Peynirlerde Oluşan Farklı Kalite Değerlerinin İzlenmesi. Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 65s, Konya.
- Akan, E. 2015. Yüksek sıcaklıkta ısıtılan sütlerden elde edilen beyaz peynir üretiminde tuz ikame maddeleri kullanımının proteoliz üzerine etkisi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 104, İzmir.
- Akhgar, R.N.R., Hesari, J., Damirchi, S.A., 2016. Effect of Slurry Incorporation Into Retentate on Proteolysis of Iranian Ultrafiltered White Cheese. *Journal of Food Sciences*, 34(2), 173-179.
- Akın, S.M., Şahan, N., 1998. Şanlıurfa'da Üretilen Taze Urfa Peynirlerinin Kimyasal ve Duyusal Özelliklerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. V. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, 21-22 Mayıs, Ankara.
- Alam, M. Z., M. S. Alhebsi, S. Ghnimi, A. Kamal-Eldin., 2021. Inability of total antioxidant activity assays to accurately assess the phenolic compounds of date palm fruit (*Phoenix dactylifera* L.). *NFS J.* 22, 32–40.
- Al-Badran, D.S.H., Al-Omar, M.E., Al-Fayadh, M.H., 1987. The Use of Microbial Rennet (Rennillase) in Soft White Cheesemaking. *Dairy Science Abstracts*, 50(7), 5515.
- Albenzio, M., Santillo, A., Caroprese, M., Malva, A. della ve Marino, R., 2017. Bioactive peptides in animal food products. *Foods*, 6(35), 14.
- Ali, B., Khan, K. Y., Majeed, H., Abid, M., Xu, L., Wu, F., Xu, X., 2017. Soymilk-Cow's milk ACE-inhibiting enzyme modified cheese. *Food Chemistry*, 237, 1083–1091.
- Alizadeh, M., Hamed, M., Khosroshahi, A., 2006. Modeling of Proteolysis and Lipolysis In Iranian White Brine Cheese. *Food Chemistry*, 97(2), 294-301.
- Aloglu, H.Ş., Öner, Z., 2011. Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. *Journal of Dairy Science*, 94(11), 5305–5314.

- Al-Otaibi, M.M., Wilbey, R.A., 2005. Effect of Chymosin and Salt Reduction on the Quality of Ultrafiltrated White-Salted Cheese. *Journal of Dairy Research*, 72(2), 234-242.
- Al-Otaibi, M.M., Wilbey, R.A., 2006. Effect of Chymosin Reduction and Salt Substitution on The Properties of White Salted Cheese. *International Dairy Journal*, 16(8), 903-909.
- Aluko, R.E., Monu, E., 2003. Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates. *Journal of Food Science*, 68 (4), 1254-1258.
- Aluko, R.E., 2015a. Antihypertensive peptides from food proteins. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6, 235-262.
- Aluko, R.E., 2015b. Structure and function of plant protein-derived antihypertensive peptides. *Current Opinion in Food Science*, 4, 44-50.
- Anonim, 1990. Türk Standartları Enstitüsü, T.S. 8189, Sütte Yağ Tayini-Gerber Metodu.
- Anonim, 2000. Türk Gıda Kodeksi, Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş, İçme Sütleri Tebliği, Resmi Gazete, 14 Şubat 2000, 23964, 27-37s.
- Anonim, 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Halkman, A.K. (Ed), Başak Matbaacılık,, 358s, Ankara.
- Anonim, 2006. Türk Standartları Enstitüsü, Beyaz Peynir Standardı, TS 591, Ankara.
- Anonim, 2015. Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği, Resmî Gazete, 8 Şubat 2015, Sayı 29261, No 2015/16.
- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis, 15th Ed., Association of Official Analysis Chemists: Arlington, VA, USA.
- Apostolidis, E., Kwon, Y.I., Shetty, K., 2007. Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(1), 46-54.
- Ardö, Y., McSweeney, P.L.H., Magboul, A.A.A., Upadhyay, V.K., Fox, P.F., 2017. Chapter 18 - Biochemistry of Cheese Ripening: Proteolysis. In McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W.(Eds), *Cheese (Fourth Edition)*, (ss. 445-482). San Diego: Academic Press.
- Ardö, Y., Polychroniadou, A., 1999. Laboratory manual for chemical analysis of cheese. Luxembourg: Cost 95.

- Arısoy, Z., 2019. Uf Beyaz Peynirde Raf Ömrü Boyunca Acılaşmaya Neden Olan Problemlerin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 138s, Isparta.
- Arısoy, Z., Öner, Z., 2019. Ultrafiltrasyon Tekniği İle Üretilen Beyaz Peynirlerin Fiziko-Kimyasal, Mikrobiyolojik Ve Duyusal Özellikleri Üzerine Farklı Pıhtılaştırıcı Enzimlerin Etkisi. Kırklareli University Journal of Engineering and Science, 5-1, 68-86.
- Arısoy, Z., Öner, Z., 2021. Determination Of The Factors That Cause Bitterness During Shelf-Life In White Cheese Produced Using Ultrafiltrated Milk. GIDA, 46(3), 552-565.
- Ashokbhai, J. K., Basaiawmoit, B., Das, S., Sakure, A., Maurya, R., Bishnoi, M., Hatia, S., 2022. Antioxidative, antimicrobial and anti-inflammatory activities and release of ultra-filtered antioxidative and antimicrobial peptides during fermentation of sheep milk: In vitro, in-silico and molecular interaction studies. Food Bioscience, 47, 101666.
- Aslam, B., Basit, M., Nisar, M.A., Khurshid, M., Rasool, M.H., 2017. Proteomics: Technologies and Their Applications, Journal Of Chromatographic Science, 55(2), 182-196.
- Avcı, İ., 2022. Protein Esaslı Biyoterapötik İlaçların İyon Hareketliliği Kütle Spektrometresi İle Karakterizasyonları. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 114s, Ankara.
- Ay, C., Şanlı, T., 2018. Süt Ürünlerinde Biyoaktif Peptitlerin Oluşumu ve Fonksiyonel Özellikleri. Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 15(1), 115-120.
- Ayyash, M., Abdalla, A., Alameri, M., Baig, B.A., Kizhakkayil, J., Chen, G., Huppertz, T., Kamal-Eldin, A., 2021. Biological activities of the bioaccessible compounds after in vitro digestion of low-fat Akawi cheese made from blends of bovine and camel milk. Journal of Dairy Science, 104(9), 9450-9464.
- Banihashemi, S. A., Nikoo, M., Ghasempour, Z., Ehsani, A., 2020. Bioactive peptides fractions from traditional Iranian Koopeh cheese; lactic fermentation products. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 29, 101798.
- Baptista, D.P., Galli, B.D., Cavaleiro, F.G., Negrão, F., Eberlin, M.N., Gigante, M.L., 2018. Lactobacillus helveticus LH-B02 favours the release of bioactive peptide during Prato cheese ripening. International Dairy Journal, 87, 75-83.
- Baptista, D.P., Negrão, F., Eberlin, M.N., Gigante, M.L., 2020. Peptide profile and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of Prato cheese with

salt reduction and *Lactobacillus helveticus* as an adjunct culture. *Food Research International*, 133(March), 109190.

- Baptista, D.P., Gigante, M. L., 2021. Bioactive peptides in ripened cheeses: release during technological processes and resistance to the gastrointestinal tract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(10), 4010–4017.
- Barac, M., Pesic, M., Zilic, S., Smiljanic, M., vd., 2016. Protein profiles and total antioxidant capacity of water-soluble and water-insoluble fractions of white brined goat cheese at different stages of ripening. *International Journal of Food Science and Technology*, 51, 1140–1149.
- Barac, M., Vucic, T., Zilic, S., Pesic, M., Sokovic, M., Petrovic, J., Milincic, D., 2019. The effect of in vitro digestion on antioxidant, ACE-inhibitory and antimicrobial potentials of traditional Serbian white-brined cheeses. *Foods*, 8(3), 1–18.
- Basiricò, L., Catalani, E., Morera, P., Cattaneo, S., Stuknytė, M., Bernabucci, U., De Noni, I., Nardone, A., 2015. Release of angiotensin converting enzyme-inhibitor peptides during in vitro gastrointestinal digestion of Parmigiano Reggiano PDO cheese and their absorption through an in vitro model of intestinal epithelium. *Journal of Dairy Science*, 98(11), 7595–7601.
- Bech, A.M., 1993. Characterising ripening in UF-cheese. *International Dairy Journal*, 3(4-6), 329-342.
- Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R., Kumar, V., 2020. A Review on Bioactive Peptides: Physiological Functions, Bioavailability and Safety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(1), 139–150.
- Bhat, Z.F., Kumar, S., Bhat, H.F., 2017. Antihypertensive peptides of animal origin: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(3), 566–578.
- Birol, E., 2021. MALDI-Kütle Spektrometresi'nde İyon Oluşma Mekanizmalarına Etki Eden Bazı Faktörlerin Belirlenmesi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 97s, Ankara.
- Boelsma, E., Kloek, J., 2010. IPP-rich milk protein hydrolysate lowers blood pressure in subjects with stage 1 hypertension, a randomized controlled trial. *Nutrition Journal*, 9(52), 7s.
- Boldogh, I., Stanton, J.G., Georgiades, J.A., Hughes, T.K., Kruzel, M., 2006. Use of colostrinin, constituent peptides thereof, and analogs thereof as inhibitors of apoptosis and other cellular damage: U.S. Patent 7,119,064[P], 2006-10-10.

- Boran, O.S., 2021. Model Peynirde Peynir Bulamacı İlavesinin Proteoliz Ve Bioaktif Peptit Oluşumuna Etkisinin Belirlenmesi. İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, s165, Malatya.
- Bottesini, C., Paoletta, S., Lambertini, F., Galaverna, G., Tedeschi, T., Dossena, A., Marchelli, R., Sforza, S., 2013. Antioxidant capacity of water soluble extracts from Parmigiano-Reggiano cheese. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(8), 953–958.
- Bradley, R.L., Arnold, E., Barbano, D.M., Semerad, R.G., Smith, D.E., Vines, B.K., 1992. *Chemical and Physical Methods in Standard.*, 433–531.
- Broadbent, J.R., Barnes, M., Brennand, C., Strickland, M., Houck, K., Johnson, M.E., Steele, J.L., 2002. Contribution of *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase specificity to peptide accumulation and bitterness in reduced-fat cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1778–1785.
- Broome, M.C., Limsowtin, G.Y.K., 1998. Milkcoagulants. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53(3), 188.
- Bustamante, S. Z., González, J. G., Sforza, S., Tedeschi, T., 2021. Bioactivity and peptide profile of whey protein hydrolysates obtained from Colombian double-cream cheese production and their products after gastrointestinal digestion. *LWT*, 145.
- Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R., Wechsler, D., 2007. Quantification of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in hard, semi-hard and soft cheeses. *International Dairy Journal*, 17(8), 968–975.
- Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R., Walther, B., Wechsler, D., 2008. Occurrence of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in different cheese varieties of Swiss origin. *Journal of Dairy Science*, 91, 29–38.
- Cantor, M.D., van den Tempel, T., Hansen, T. K., Ardö, Y., 2004 *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 2: Major Cheese Groups, Chapman. in: P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, T. P. Guinee (Eds.), Hall, London, pp 175–198.
- Cavalheiro, F.G., Baptista, D.P., Galli, B.D., Negrão, F., Eberlin, M.N., Gigante, M.L., 2020. High protein yogurt with addition of *Lactobacillus helveticus*: Peptide profile and angiotensin-converting enzyme ACE-inhibitory activity. *Food Chemistry*, 333, 127482.

- Cemek, K., 2020. Olgunlaştırılmış Kars Kaşar Peynirindeki Peptitlerin İzolasyonu Ve Biyoaktif Özelliklerinin Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 99s, Adana.
- Cemeroğlu, 2007. Gıda Analizleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, No:34. 535s., Ankara.
- Chang, O.K., Seol, K.H., Jeong, S.G., Oh, M.H., Park, B.Y., Perrin, C., Ham, J.S., 2013. Casein hydrolysis by *Bifidobacterium longum* KACC91563 and antioxidant activities of peptides derived therefrom. *Journal of Dairy Science*, 96(9), 5544–5555.
- Chen, J., Lindmark-Månsson, H., Gorton, L., Åkesson, B., 2003. Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and amperometric methods. *International Dairy Journal*, 13, 927-935.
- Chen, P., Liu, L., Zhang, X., Bora, A.F.M., Li, X., Zhao, M., Hao, X., Wang, Y., 2019. Antioxidant activity of Cheddar cheese during its ripening time and after simulated gastrointestinal digestion as affected by probiotic bacteria. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 218–229.
- Chourasia, R., Kumari, R., Singh, S.P., Sahoo, D., Rai, A.K., 2022. Characterization of native lactic acid bacteria from traditionally fermented chhurpi of Sikkim Himalayan region for the production of chhurpi cheese with enhanced antioxidant effect. *LWT*, 154, 112801.
- Coeuret, V., Dubernet, S., 2003. Isolation, characterization and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait*, 83, 269-306.
- Corrêa, A.P.F., Daroit, D.J., Fontoura, R., Meira, S.M.M., Segalin, J., Brandelli, A., 2014. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Peptides*, 61, 48–55.
- Cushman, D.W., Cheung, H.S., 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20(7), 1637-1648.
- Çakmakçı, S., Cantürk, A., Çakır, Y., 2017. Peynir Üretimi İçin Sütü Pıhtılaştırıcı Enzimlere Genel Bir Bakış ve GüncelGelişmeler. *Akademik Gıda*, 15(4).
- Çardak, A.D., 2014. Peynir üretiminde bitkisel proteaz kullanımı. 4. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 17-19 Nisan 2014, 517 s, Adana.
- Çelebi, M., 2011. Farklı Pıhtılaştırıcı Enzimlerin Olgunlaşma Süresince Örgü Peynirini Özellikleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 87s, Isparta.

- Çelik, Ş., Uysal, Ş., 2009. Beyaz Peynirin Bileşim, Kalite, Mikroflora ve Olgunlaşması. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 40 (1), 141-151.
- Çepoğlu, F., 2005. Beyaz Peynir Üretiminde Rekombinant Kimozin Kullanım Olanaklarının Araştırılması. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 69 s, Şanlıurfa.
- D’Incecco, P., Hogenboom, J.A., Rosi, V., Cabassi, G., Pellegrino, L., 2022. Effects of microbial coagulants from *Rhizomucor miehei* on composition, sensory and textural characteristics of long-ripened hard cheeses. Food Chemistry, 370, 131043.
- Dave, R.I., Sharma, R., McMahon, D.J., 2003a. Melt and Rheological Properties of Mozzarella Cheese as Affected by Starter Culture and Coagulating Enzymes. Lait, 83(1), 61-77.
- Dave, R.I., Sharma, R., Muthukumarappan, K., 2003b. Effects of Starter Culture and Coagulating Enzymes on Viscoelastic Behavior and Melt of Mozzarella Cheese. Journal of Food Science, 68(4), 1404-1410.
- Demir, F.H., 2021. Koyun, İnek Ve Keçi Sütlerinden Üretilen Edirne Beyaz Peynirlerinin Depolama Süresince Fizikokimyasal, Mikrobiyolojik, Tekstürel Ve Duyusal Açidan Değerlendirilmesi. Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 279s, Tekirdağ.
- Dervişoğlu, M., Aydemir, O., Yazıcı, F., 2007. Peynir yapımında kullanılan pıhtılaştırıcı enzimler ve kazein fraksiyonları üzerine etkileri. Gıda 32(5), 241-249.
- Desmazeaud, M.J., 1983. L’état connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. Le Lait, 63, 267-316.
- Dhaval, A., Yadav, N., Purwar, S., 2016. Potential applications of food derived bioactive peptides in management of health. Internaional Journal of Peptide Research, 22, 377-398.
- Doi, E., Shibata, D., Matoba, T., 1981 Modified colorimetrie ninhydrin methods for peptidase assay. Analytical Biochemistry, 118, 173-184.
- Dominguez-Gonzalez, K.N., Cruz-Guerrero, A., Gonzalez-Marquez, H., Gómez-Ruiz, L., Garcia-Garibay, M., Jimenez-Guzman, J., Rodriguez-Serrano, G., 2014. Antihypertensive and antithrombotic activities of a commercial fermented milk product made with *Lactobacillus casei shirota* and *Streptococcus thermophilus*. The International Journal of Dairy Technology, 67, 358-364.

- Donkor, O.N., Henriksson, A., Singh, T.K., Vasiljevic, T., Shah, N.P., 2007. ACE Inhibitory Activity of Probiotic Yoghurt. *International Dairy Journal*, 17, 1321-1331.
- Eghbalian, S., 2017. Utilization Of Commercial Adjunct Culture in The Manufacture Of Ultrafiltrated White Cheese and Its Effects On The Cheese Properties. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 115s, Ankara.
- El-Aneed, A., Cohen, D., Banoub, J., 2009. Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*, 44(3), 210-230.
- El Hatmi, H., Jrad, Z., Khorchani, T., Jardin, J., Poirson, C., Perrin, C., Cakir-Kiefer, C., Girardet, J.M., 2016. Identification of bioactive peptides derived from caseins, glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1 (GlyCAM-1), and peptidoglycan recognition protein-1 (PGRP-1) in fermented camel milk. *International Dairy Journal*, 56, 159-168.
- El-Salam, M.H.A., El-Shibiny, S., 2013. Bioactive Peptides of Buffalo, Camel, Goat, Sheep, Mare, and Yak Milks and Milk Products. *Food Reviews International*, 29(1), 1-23.
- Engels, W.J.M., Visser, S., 1994. Isolation and Comparative Characterization of Components That Contribute to the Flavor of Different Types of Cheese. *Netherlands, Milk and Dairy Journal*, 48(3), 127-140.
- Erdmann, K., Cheung, B. W., Schröder, H., 2008. The possible roles of foodderived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19 (10), 643-654.
- Erkaya, T., 2014. Probiyotik Kültürlerle Üretilen Beyaz Peynirlerin Olgunlaşma Süresince Bazı Kalite Özellikleri Ve Oluşan Peptitlerin Biyoaktivitesinin Belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 181s, Erzurum.
- Erkaya, T., Şengul, M., 2015. Bioactivity of water soluble extracts and some characteristics of white cheese during the ripening period as effected by packaging type and probiotic adjunct cultures. *Journal of Dairy Research*, 82(1), 47-55.
- Ertürkmen, P., 2014. Beyaz Peynir Üretimi İçin Starter Kültür İzolasyonu ve Bu Kültürlerin Peynirin Özellikleri Üzerine Etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 107s, Isparta.
- Ertürkmen, P., Akbal, S., Arısoy, Z., 2022. The Physico-Chemical and Microbial Content of White Cheese Obtained Using Plant-based, Animal and Microbial Enzymes. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*. 10(11), 2252-2262.

- Fallico, V., Tuminello, L., Pediliggieri, C., Horne, J., Carpino, S., Licitra, G., 2006. Proteolysis and Microstructure of Piacentinu Ennese Cheese Made Using Different Farm Technologies. *Journal of Dairy Science*, 89, 37–48.
- Fan, M., Guo, T., Li, W., Chen, J., Li, F., Wang, C., Shi, Y., Li, DX., Zhang, S., 2019. Isolation and identification of novel casein-derived bioactive peptides and potential functions in fermented casein with *Lactobacillus helveticus*. *Food Science and Human Wellness*, 8, 156-176.
- Farvin, K. H. S., Baron, C. P., Nielsen, N. S., Otte, J., Jacobsen, C., 2010. Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 2 — Characterisation of peptide fractions. *Food Chemistry*, 123, 1090–1097.
- Farzamirad, V., Aluko, R.E., 2008. Angiotensin-converting enzyme inhibition and free-radical scavenging properties of cationic peptides derived from soybean protein hydrolysates. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59(5), 428-437.
- Fathollahi, I., Hesari, J., Azadmard, S., Oustan, S., 2010. Influence of Proteolysis and Soluble Calcium Levels on Textural Changes in the Interior and Exterior of Iranian UF White Cheese during Ripening. *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Nutrition and Food Engineering*, 4(6), 399-404.
- Ferrantia, P., Itollia, E., Baronea, F., Malornib, A., Garroa, G., Laezza, P., Chianesea, L., Migliaccioa, F., Stingoa V., Addeoc, F., 1997. Combined high resolution chromatographic techniques (FPLC and HPLC) and mass spectrometry-based identification of peptides and proteins in Grana Padano cheese. *Lait*, 77, 683-697.
- Fırıncıoğulları, B., 2022. Laktik Asit Bakterileri İle Kolesterolü Azaltılmış Peynirlerin Özellikleri. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 94s, Isparta.
- FitzGerald, R.J., Meisel, H., 1999. Lactokinins: whey proteinderived ACE inhibitory peptides. *Nahrung* 43, 165-167.
- FitzGerald, R.J., Meisel, H., 2000. Milk protein derived peptide inhibitors of angiotensin-I converting enzyme. *British Journal of Nutrition*, 84, 33–37.
- FitzGerald, R.J., Murray, B.A., Walsh, D.J., 2004. Hypotensive peptides from milk proteins. *Journal of Nutrition* 134(4), 980–988.
- Folkertsma, B., Fox, P.F., 1992. Use of the Cd-ninhydrin reagent to assess proteolysis in cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*, 59, 217–224.

- Fox, P.F., 1989. Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening. *Journal of Dairy Science*, 72 (3), 379-1400.
- Fox, P.F., Law, J., McSweeney, P.L.H, Wallace, J.M., 1993, Biochemistry of cheese ripening. *Cheese: Chemistry Physics and Microbiology* Vol. 1, In: Fox PF (ed), 2nd edn., Aspen Publication, Maryland, 389-438.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Singh, T.K., 1995. Methods For Assessing Proteolysis In Cheese During Maturation. In *Chemistry of Structure-Function Relationships In Cheese* (Pp. 161-194). Springer, Boston, MA.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., 1996. Proteolysis in cheese during ripening. *Food Review International*, 12, 457–509.
- Fox, P.F., O'Connor, T.P., McSweeney, P.L.H., 1996, Cheese: physical, biochemical, and nutritional aspects, *Advances in Food and Nutrition Research*, 39, 163-328.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., 1997. Rennets: Their in milk coagulation and cheese ripening. In: *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk* (Ed: B.A. Law). 1- 40 pp.
- Fox, P.F., 1999. *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1, General Aspects, Second Edition*, Aspen PublishersInc Gaithersburg, Maryland, 601 s.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., 2000. *Fundamentals of Cheese Science*, Chapter 6. Maryland: Aspen Publication, 98-137.
- Fox, P.F., 2003. Milk Proteins: General and historical aspects, Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry*, (1-48s), 1: Proteins, 3.ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Fox, P.F., Kelly, A.L., 2006. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects-part 1. *International Dairy Journal*, 16, 500–516.
- Fu, Y., Young, J. F., Rasmussen, M. K., Dalsgaard, T. K., Lametsch, R., Aluko, R. E., Therkildsen, M., 2016. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides from bovine collagen: insights into inhibitory mechanism and transepithelial transport. *Food Research International*, 89, 373–381.
- Galli, B.D., Baptista, D.P., Cavaleiro, F.G., Negrão, F., Eberlin, M.N., Gigante, M.L., 2019. Peptide profile of Camembert-type cheese: Effect of heat treatment and adjunct culture *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Food Research International*, 123, 393–402.
- Garbowska, M., Pluta, A., Berthold-Pluta, A., 2019. Antihypertensive peptide activity in Dutch-type cheese models prepared with different additional

strains of *Lactobacillus* genus bacteria. *Applied Sciences* (Switzerland), 9(8).

Garbowska, M., Pluta, A., Berthold-Pluta, A., 2020. Proteolytic and ACE-inhibitory activities of Dutch-type cheese models prepared with different strains of *Lactococcus lactis*. *Food Bioscience*, 35, 100604.

García-Gómez, B., Vázquez-Odériz, M.L., Muñoz-Ferreiro, N., Romero-Rodríguez, M.Á., Vázquez, M., 2019. Interaction between rennet source and transglutaminase in white fresh cheese production: Effect on physicochemical and textural properties. *LWT*, 113, 108279.

Gencer, N., 2003. Ultrafiltre Koyun ve Keçi Sütlerinin ve Telemelerin Bazı Nitelikleri Üzerine Farklı Pastörizasyon Normları ve Pıhtılaştırıcı Enzimlerin Etkisi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 93s, Ankara.

Ghavam, R., 2017. Utilization Of Camel Chymosin in the Production Of Reduced Fat Ultrafiltrated White Cheese And Its Effect On Cheese Quality. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 71s, Ankara.

Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F., Addeo, F., 2000. Production of Angiotensin-I-Converting-Enzyme-Inhibitory Peptides in Fermented Milks Started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3898–3904.

Gómez-Ruiz, J.A., Ramos, M., Recio, I., 2002. Angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *International Dairy Journal*, 12, 697–706.

Gómez- Ruiz, J.A., Taborda, G., Amigo, L., Recio, I., Ramos, M., 2006. Identification of ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 223, 595–601.

Gómez-Ruiz, J.A., Ramos, M., Recio, I., 2007. Identification of novel angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides from ovine milk proteins by CE-MS and chromatographic techniques. *Electrophoresis*, 28, 4202–4211.

Gómez-Ruiz, J.Á., López-Expósito, I., Pihlanto, A., Ramos, M., Recio, I., 2008. Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *European Food Research and Technology*, 227(4), 1061–1067.

Gregorich, Z.R., Chang, Y.H., Ge, Y., 2014. Proteomics in heart failure: topdown or bottom-up?. *Pflugers Archiv : European Journal Of Physiology*, 466 (6), 1199–1209.

- Guinee, T.P., Fox, P.F., 1993. Salt In Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, General Aspects. Fox, P.F., Chapman and Hall (eds), 1, 257-302, London, England.
- Gupta, A., Mann, B., Kumar, R., Sangwan, R.B., 2009. Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 62(3), 339-347.
- Gupta, A., Mann, B., Kumar, R., Sangwan, R.B., 2010. Identification of antioxidant peptides in Cheddar cheese made with adjunct culture *Lactobacillus casei* ssp *casei* 300. *Milchwissenschaft*, 65, 396-399.
- Gupta, A., Mann, B., Kumar, R., Sangwan, R.B., 2013. ACE-Inhibitory activity of Cheddar cheeses made with adjunct cultures at different stages of ripening. *Advances in Dairy Research*, 1(1), 1-6.
- Gürkan, H., 2019. Bazı Mayaların Beyaz Peynirde Uçucu Aroma Bileşikleri Ve Proteoliz Düzeyine Katkısı İle Biyoaktif Peptit Üretme Performanslarının Belirlenmesi. İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 187 s., Malatya.
- Gürsoy, A., Gürsel, A., Şenel, E., Deveci, O., Karademir, E., 2001. Yağ içeriği azaltılmış Beyaz peynir üretiminde ısıtma işlemi uygulanan *Lactobacillus helveticus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* kültürlerinin kullanımı. GAP II. Tarım Kongresi, Şanlıurfa, Ekim 24-26, 2001 (pp. 269-278).
- Güven, M., Karaca, O.B., 2001. Proteolysis Levels of White Cheese Salted and Ripened in Prepared from Various Salt. *International Journal of Dairy Technology*, 54(1), 29-33.
- Ha, G.E., Chang, O.K., Jo, S.M., Han, G.S., Park, B.Y., Ham, J.S., Jeong, S.G., 2015. Identification of Antihypertensive Peptides Derived from Low Molecular Weight Casein Hydrolysates Generated during Fermentation by *Bifidobacterium longum* KACC 91563. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(6), 738-747.
- Hao, X., Yang, W., Zhu, Q., Zhang, G., Zhang, X., Liu, L., Li, X., Hussain, M., Ni, C., Jiang, X., 2021. Proteolysis and ACE-inhibitory peptide profile of Cheddar cheese: Effect of digestion treatment and different probiotics. *LWT*, 145, 111295.
- Harnedy, P. A., Fitzgerald, R. J., 2012. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*, 4 (1), 6-24.
- Hayaloğlu, A.A., 2003. Starter Olarak Kullanılan Bazı *Lactococcus* Suşlarının Beyaz peynirlerin Özellikleri ve Olgunlaşmaları Üzerine Etkileri. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 170s, Adana.

- Hayaloğlu, A.A., Güven M., Fox, P.F., 2002. Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White Cheese 'Beyaz Peynir'. The International Dairy Journal, 12, 635-648.
- Hayaloğlu, A.A., Karabulut, İ., 2013. Primary and secondary proteolysis in eleven Turkish cheese varieties. International Journal of Food Properties, 16, 1663-1675.
- Hayaloğlu, A.A., Özer, B., 2011. Peynirde Olgunlaşma. Hayaloğlu A.A. ve Özer B. (Ed.), Peynir Biliminin Temelleri, (173-203), Sidas, 613s İzmir.
- Hayes, M., Tiwari, B.K., 2015. Bioactive carbonhydrates and peptides in foods: an overview of sources, downstream processing steps and associated bioactivities. International Journal of Molecular Sciences, 16, 22485-22508.
- Helal, A., Tagliazucchi, D., 2023. Peptidomics Profile, Bioactive Peptides Identification and Biological Activities of Six Different Cheese Varieties. Biology, 12(1), 78.
- Hernández-Galán, L., Cardador-Martínez, A., Picque, D., Spinnler, H.E., Lozano, M.L-d-C., del Campo, S.T.M., 2016. Angiotensin converting enzyme inhibitors and antioxidant peptides release during ripening of Mexican Cotija hard cheese. Journal of Food Research, 5, 85-91.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., Recio, I., 2004. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 1504-1510.
- Hernández-Ledesma, B., Miralles, B., Amigo, L., Ramos, M., Recio, I., 2005. Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85(6), 1041-1048.
- Hernández-Ledesma, B., del Mar Contreras, M., Recio, I., 2011. Antihypertensive peptides: production, bioacailability and incorporation into foods. Advances in Colloid and Interface Science, 165, 23-35.
- Hesari, J., Ehsani, M.R., Khosroshahi, A., McSweeney, P.L., 2006. Contribution of Rennet and Starter to Proteolysis In Iranian UF White Cheese. Dairy Journal, 86(4), 291-302.
- Hesari, J., Ehsani, M.R., Mosavi, M.A., Mcsweeney, P.L., 2007. Proteolysis in Ultra-Filtered and Conventional Iranian White Cheese During Ripening. International Journal of Dairy Technology, 60(3), 211-220.

- Hossain, S., Khetra, Y., Ganguly, S., Kumar, R., Sabikhi, L., 2020. Effect of heat treatment on plasmin activity and bio-functional attributes of Cheddar cheese. *LWT*, 120, 108924.
- Hsu, C.N., Tain, Y.L., 2019. Regulation of nitric oxide production in the developmental programming of hypertension and kidney disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), ARTN 681.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856.
- Huma, N., Rafiq, S., Sameen, A., Pasha, I., Khan, M.I., 2018. Antioxidant potential of buffalo and cow milk Cheddar cheeses to tackle human colon adenocarcinoma (Caco-2) cells. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 31(2), 287-292.
- Huppertz, T., Upadhyay, U.K., Kelly, A.L., Tamime, A.Y., 2006. Constituents and properties of milk from different spices, Tamime, A.Y. (Ed), *Brined Cheeses*, (1-34s), Blackwell Publishings Ltd., Oxford.
- Hutkins, R.W., 2006. *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Blacwell Publishing, IFT Pres.
- Ibrahim, H.R., Ahmed, A.S., Miyata, T., 2017. Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. *Journal of Advanced Research*, 8, 63-71.
- IDF, 1987. Determination of Total Solids Content. IDF Standard 21B, Brussels, Belgium, International Dairy Federation.
- IDF, 1993. Milk, Determination of Nitrogen Content, FIL-IDF 20B, Brussels, Belgium, International Dairy Federation.
- Irshad, I., Kanekanian, A., Peters, A., Masud, F.S., 2015. Antioxidant activity of bioactive peptides derived from bovine casein hydrolysate fractions. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 231–239.
- Jarrett, W.D., Aston, J.W., Dulley, J.R., 1982. A Simple Method For Estimating Free Amino Acids İn Cheddar Cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 37(2), 55.
- Karaca, O. B., Güven, M., 2000. Mikrobiyolojik Kaynaklı Proteolitik ve Lipolitik Enzim Kullanımının Beyaz Peynirlerin Özellikleri ve Olgunlaşma Hızları Üzerine Etkileri. *The Journal of Food*, 29(3), 239-248.
- Karaca, O. B., Güven, M., 2014. Effect of commercial lipase and protease enzymes from microbiological sources on properties of White chesee. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*, 1, 1080-1084.

- Karaca, O.B., 2007. Mikrobiyel kaynaklı proteolitik ve lipolitik enzim kullanımının beyaz peynirlerin özellikleri ve olgunlaşmaları üzerine etkileri. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 190s, Adana.
- Karahan, A.G., Arıdoğan-Cicioğlu, B., Çakmakçı, M.L., 2002. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Kılavuzu. SDÜ Yayın No. 24, 171s., Isparta.
- Karahan, A.G., Başyigit-Kılıç, G., Kart, A., Şanlıdere-Aloğlu, H., Öner, Z., Aydemir, S., Erkuş, O., Harsa, Ş., 2010. Genotypic identification of some lactic acid bacteria by amplified fragment length polymorphism analysis and investigation of their potential usage as starter culture combinations in Beyaz cheese manufacture. *Journal of Dairy Science*, 93, 1-11.
- Karami, M., Ehsani, M.R., Mousavi, S.M., Rezaei, K., Safari, M., 2009. Changes In The Rheological Properties of Iranian UF-Feta Cheese During Ripening. *Food Chemistry*, 112(3), 539-544.
- Kayagil, F., 2006. Geleneksel Starter kültürlerin peynir kalitesine Etkisi. Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 88s, Ankara.
- Kerkaert, B., Mestdagh, F., Cucu, T., Shrestha, K., Van Camp, J., De Meulenaer, B., 2012. The impact of photo-induced molecular changes of dairy proteins on their ACEinhibitory peptides and activity. *Amino Acids*, 43(2), 951-962.
- Kılıç, G.B., Kuleaşan, H., Eralp, I., Karahan, A.G., 2009. Manufacture of Turkish Beyaz cheese added with probiotic strains. *LWT*, 42, 1003-1008.
- Kılıç, S., 2001. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No 542.
- Kınık, Ö., Gürsoy, O., 2002. Süt proteinleri kaynaklı biyoaktif peptitler. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 8 (2), 195-203.
- Kırmacı, H.A., 2010. Geleneksel Urfa Peynirinde Yer Alan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Moleküler Karakterizasyonu Ve Starter Kültür Olarak Kullanım Olanakları. Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 152s, Şanlıurfa.
- Kısak, E.Y., 2021. Koyun Ve Keçi Sütlerinden Üretilen İzmir Tulum Peynirinin Biyoaktif Özelliklerinin Ve Uçucu Bileşiklerinin Belirlenmesi. İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 116s, Malatya.
- Koçak, A., 2017. Keçi Sütünden Yardımcı Starter Kültür Kullanılarak Üretilen Beyaz Peynirde ACE-Inhibitör Aktivitesi Ve Antioksidan Kapasitenin Araştırılması. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 52s, Ankara.

- Kocak, A., Sanli, T., Anli, E.A. ve Hayaloglu, A.A., 2020. Role of using adjunct cultures in release of bioactive peptides in white-brined goat-milk cheese. *LWT*, 123, 109127.
- Kondyli, E., Pappa, E.C., Svarnas, C., 2016. Ripening changes of the chemical composition, proteolysis, volatile fraction and organoleptic characteristics of a white-brined goat milk cheese. *Small Ruminant Research*, 145, 1–6.
- Kopf-Bolan, K.A., Schwander, F., Gijs, M., Vergères, G., Portmann, R., Egger, L., 2014. Impact of milk processing on the generation of peptides during digestion. *International Dairy Journal*, 35(2), 130–138.
- Korhonen, H., Pihlanto, A., 2007. Technological options for the production of healthpromoting proteins and peptides derived from milk and colostrum. *Current Pharmaceutical Design*, 13(8), 829–843.
- Korhonen, H., Pihlanto-Leppala, A., 2000. Milk Protein-Derived Bioactive Peptides- Novel Opportunities For Health Promotion. *Bulletin of IDF* 363, 17-26.
- Kruzel, M.L., 2009. Therapeutic use of peptides: U.S. Patent 138,762[P]. 2009-11-19.
- Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., Georgakilas, A.G., 2011. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1–2), 193–201.
- Kuchroo, C.N., Fox, P.F., 1982. Soluble Nitrogen in Cheddar Cheese: Comparison of Extraction Procedures. *Milchwissenschaft*, 37(6), 331-335.
- Kumar, S., Maury, D.R., Chandra, M., 2000. ACE inhibition versus angiotensin-II antagonism in heart failure. *Asian Cardiovascular and Thoracic Annals*, 8, 195–203.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Protein During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Laiko, V.V., Baldwin, M.A., Burlingame, A.L., 2000. Atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 15;72(4), 652-657.
- Lane, C.N., and Fox, P.F., 1996. Contribution of Starter and Adjunct Lactobacilli to Proteolysis in Cheddar Cheese During Ripening. *International Dairy Journal*, 6 (7), 715-728.
- Lee, S.H., Qian, Z.J., Kim, S.K., 2010. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its

- antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 118(1), 96–102.
- Lee, Y. M., Skurk, T., Hennig, M., Hauner, H., 2007. Effect of a milk drink supplemented with whey peptides on blood pressure in patients with mild hypertension. *European Journal of Nutrition*, 46, 21–27.
- Leeb, E., Holder, A., Letzel, T., Cheison, S.C., Kulozik, U., Hinrichs, J., 2014. Fractionation of dairy based functional peptides using ion-exchange membrane adsorption chromatography and cross-flow electro membrane filtration. *International Dairy Journal*, 38(2), 116–123.
- Lignitto, L., Cavatorta, V., Balzan, S., Gabai, G., Galaverna, G., Novelli, E., Sforza, S., Severino, S., 2010. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of water-soluble extracts of Asiago d'allevio cheese. *International Dairy Journal*, 20(1), 11–17.
- Lin, K., Ma, Z., Ramachandran, M., De Souza, C., Han, X., Zhang, L.wei., 2020. ACE inhibitory peptide KYIPIQ derived from yak milk casein induces nitric oxide production in HUVECs and diffuses via a transcellular mechanism in Caco-2 monolayers. *Process Biochemistry*, 99, 103–111.
- Liu, L., Qu, X., Xia, Q., Wang, H., Chen, P., Li, X., Yang, W., 2018. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on the antioxidant activity of Cheddar cheese during ripening and under simulated gastrointestinal digestion. *LWT*, 95(600), 99–106.
- López-villafañá, B.P., Rojas-gonzález, S., Damián, R., Rodríguez-hernández, G., 2023. The evolution of antioxidative properties of protein-derived peptides of Mexican Panela goat and cow milk cheese during its shelf life. *CyTA - Journal of Food*, 21(1), 57–63.
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Gomez, B., Barba, F. J., Mora, L., Perez-Santaescolastica, C., Toldra, F., 2018. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products—A review. *Trends in food science and technology*, 79, 136–14.
- Lu, Y., Govindasamy-Lucey, S., Lucey, J.A., 2016. Angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides in commercial Wisconsin Cheddar cheeses of different ages. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 41–52.
- Magouz, O., Mehanna, N., Khalifa, M., Sakr, H., Gensberger-, S., Dalabasmaz, S., Pischetsrieder, M., 2023. Profiles , antioxidative and ACE inhibitory activity of peptides released from fermented buttermilk before and after simulated gastrointestinal digestion. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 84, 103266.

- Makarov, A., Denisov, E., Lange, O., Horning, S., 2006. Dynamic Range of Mass Accuracy in LTQ Orbitrap Hybrid Mass Spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17(7), 977–982.
- Manzi, P., Durazzo, A., 2017. Antioxidant properties of industrial heat-treated milk. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(4), 1690–1698.
- Marilley, L., Casey, M.G., 2004. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 139–159.
- Marshall, A.G., Hendrickson, C.L., 2008. High-resolution mass spectrometers. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 1, 579–599.
- Marth, E.H., Steele, J.L., 2001. *Applied Dairy Microbiology*. Second Edition, Marcel, Dekker, Inc., NewYork, 744 p.
- Martin, M., Hagemann, D., Nguyen, T.T., Schwarz, L., Khedr, S., Moskopp, M.L., Deussen, A. vd., 2020. Plasma concentrations and ACE-inhibitory effects of tryptophan-containing peptides from whey protein hydrolysate in healthy volunteers. *European Journal of Nutrition*, 59, 1135–1147.
- Martini, S., Conte, A., Tagliazucchi, D., 2020. Effect of ripening and in vitro digestion on the evolution and fate of bioactive peptides in Parmigiano-Reggiano cheese. *International Dairy Journal*, 105, 104668.
- Maruyama S.K., Mitachi H., Tanaka H., Tomizuka N., Suzuki H., 1987. Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin-I-converting enzyme derived from casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51, 1581–1586.
- McDougall, G.J., Dobson, P., Smith, P., Blake, A. and Stewart, D., 2005. Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro 83 digestion system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5896–5904.
- McSweeney, P.L.H., Nursten, H.E., Urbach, G., 1995. Flavours and off-Flavours in Milk and Dairy Products. In *Advanced Dairy Chemistry 3. Lactose, Water, Salts and Minor Constituents*, Ed: Fox, P.F. pp. 403–468. Fox Chapman and Hall, London, England.
- McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., 1997. Chemical Methods For The Characterization of Proteolysis In Cheese During Ripening. *Dairy Journal*, 77(1), 41–76.
- McSweeney, P.L.M., Sousa, M.J., 2000. Biochemical Pathways For The Production of Flavour Compounds In Cheese During Ripening. *Lait*, 80, 293–324.

- Mcsweeney, P.L.M. 2004. Biochemistry Of Cheese Ripening: Introduction Overview. In: Cheese: Chemistry, Physics And Microbiology, Ed. P.F.Fox, P.L.H. Mcsweeney, T.M.Cogan, T.P. Guinee. Third Edition, General Aspects, 347-360.
- Meira, S.M.M., Daroit, D.J., Helfer, V.E., Correa, A.F.P., Segalin, J., Carro, S., Brandelli, A., 2012. Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. Food Research International, 48, 322–329.
- Meisel, H., 1993. Casokinins as inhibitors of angiotensin-converting enzyme. In New Perspectives in Infant Nutrition, pp. 153-159. Ed:G Sawatski and B Renner, Stuttgart, New York: Thieme.
- Metin, M., 2013. Süt Teknolojisi: Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. Ege Üniversitesi Basımevi, 5. baskı, 802 s., Borvova, İzmir.
- Meyer, J., Bütikofer, U., Walther, B., Wechsler, D., Sieber, R., 2009. Hot topic: Changes in angiotensin-converting enzyme inhibition and concentrations of the tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro during ripening of different Swiss cheese varieties. Journal of Dairy Science, 92, 826–836.
- Mistry, V.V., 2011. Membrane Processing in Cheese Manufacture, Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), 618-624p.
- Moatsou, G., Moschopoulou, E., Georgala, A., Zoidou, E., Kandarakis, I., Kaminarides, S., Anifantakis, E., 2004. Effect of artisanal liquid rennet from kids and lambs abomasa on the characteristics of Feta cheese. Food Chemistry, 88(4), 517-525.
- Moghaddaskia, E., Alizadeh, M. Esmaili, M., 2018. Development and characterization of probiotic UF Feta cheese containing Lactobacillus paracasei microencapsulated by enzyme based gelation method. Journal of Food Science and Technology, 55, 3657–3664.
- Monte, E., Mouillesseaux, K., Chen, H., Kimball, T., Ren, S., Wang, Y., Chen, J.N., Vondriska, T.M., Franklin, S., 2013. Systems proteomics of cardiac chromatin identifies nucleolin as a regulator of growth and cellular plasticity in cardiomyocytes. The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 305, 1624–1638.
- Moslehishad, M., Ehsani, M.R., Salami, M., Mirdamadi, S., Ezzatpanah, H., Naslaji, A.N., Moosavi-Movahedi, A.A., 2013. The comparative assessment of ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions obtained from fermented camel and bovine milk by Lactobacillus rhamnosus PTCC 1637. International Dairy Journal, 29(2), 82–87.
- Moynihan, A.C., Govindasamy-Lucey, S., Jaeggi, J.J., Johnson, M.E., Lucey, J.A., Mcsweeney, P.L.H., 2014. Effect of Camel Chymosin on The Texture,

Functionality, and Sensory Properties of Low-Moisture, PartSkim Mozzarella Cheese. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 85-96.

- Munir, M., Nadeem, M., Qureshi, M.T., Gamlath, C.J., Martin, G.J.O., Hemar, Y., Ashokkumar, M., 2020. Effect of sonication, microwaves and high-pressure processing on ACE-inhibitory activity and antioxidant potential of Cheddar cheese during ripening. *Ultrasonics Sonochemistry*, 67, 105140.
- Murray, B.A., FitzGerald, R.J., 2007. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: Biochemistry, bioactivity and production. *Current Pharmaceutical Design*, 13, 773-791.
- Mushtaq, M., Gani, A., Shetty, P.H., Masoodi, F., Ahmad, M., 2015. Himalayan cheese (Kalari/kradi): effect of different storage temperatures on its physicochemical, microbiological and antioxidant properties. *LWT*, 63(2), 837-845.
- Mushtaq, M., Gani, A., Noor, N., Masoodi, F.A., 2021. Phenotypic and probiotic characterization of isolated LAB from Himalayan cheese (Kradi/Kalari) and effect of simulated gastrointestinal digestion on its bioactivity. *LWT*, 149, 111669.
- Nakagomi, K., Fujimura, A., Ebisu, H., Sakai, T., Sadakane, Y., Fujii, N., Tanimura, T., 1998. Acein-1, a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide isolated from tryptic hydrolysate of human plasma. *FEBS Letters*, 438(3), 255-257.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Takano, T., 1995. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to Angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Dairy Science*, 78, 1253-1257.
- Nongonierma, A.B., Paoletta, S., Mudgil, P., Maqsood, S., FitzGerald, R.J., 2017. Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory properties of camel milk protein hydrolysates generated with trypsin. *Journal of Functional Foods*, 34, 49-58.
- Nout, M.J.R., 1994. Fermented foods and food safety. *Food Research International*, 27(3), 291-298.
- Oneca, M., ortigosa, M., Irigoyen, A. And Torre, P., 2007. Proteolytic activity of some *Lactobacillus paracasei* strains in a model ovine-milk curd system: Determination of free amino acids by RP-HPLC. *Food Chemistry*, 100, 1602-1610.
- Ong, L., Henriksson, A., Shah, N., 2007. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. *Lait*, 87, 149-165.

- Ong, L., Shah, N.P., 2008a. Influence of Probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *L. helveticus* on Proteolysis, Organic Acid Profiles, and ACE-Inhibitory Activity of cheddar Cheeses Ripened at 4, 8, and 12 °C. *Journal Of Food Science*, 73(3), 111-120.
- Ong, L., Shah, N.P., 2008b. Release and identification of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. *LWT*, 41(9), 1555–1566.
- Otte, J., Shalaby, S. M., Zakora, M., Pripp, A. H., El-Shabrawy, S. A., 2007. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: Effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 17(5), 488-503.
- Öner, Z., Karahan, A.G., Aloğlu, H., 2006. Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal Turkish white cheese during ripening. *LWT*, 39, 449–454.
- Öner, Z., 2015. Beyaz, Kaşar ve Tulum Peynirinde Biyoaktif Peptitlerin Belirlenmesi ve Tanımlanması, TÜBİTAK Proje Raporu -213-190.
- Öner, Z., Aloğlu, H.Ş., (Ed.), 2018. Süt ve Süt Ürünleri Analiz Yöntemleri. Sidas Yayıncılık, 590 s. İzmir.
- Öner, Z., Sarıdağ, A.M., 2018a. Identification of bioactive peptides in kashar cheese and its antioxidant activities. *International Journal of Agriculture, Environment and Food Sciences*, 2(2), 44-49.
- Öner, Z., Sarıdağ, A. M., 2018b. Proteolysis in the beyaz (White) cheese produced from various milk. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 24(2), 269–277.
- Öner, Z., Sarıdağ, A.M., 2019. Keçi Sütünden Üretilmiş Beyaz Peynirlerde Olgunlaşma Süresince Meydana Gelen Değişimler. *GIDA*, 44 (3), 523-533.
- Öztek, L., 1991. Peynirde Olgunlaşma ve Buna Etkili Olan Faktörler. II. Milli Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu. Her Yönüyle Peynir, 12-13 Haziran, 125-141, Tekirdağ.
- Öztürk, H.I., Akın, N., 2018. Comparison of some functionalities of water soluble peptides derived from Turkish cow and goat milk Tulum cheeses during ripening. *Food Science and Technology, Campinas*, 38(4), 674-682.
- Öztürk, H.I., Konak-Göktepe, Ç., Akın, N., 2021. Proteolysis pattern and functional peptides in artisanal Tulum cheeses produced from Mut province in Turkey. *LWT*, 149, 111642.
- Padghan, P.V., Mann, B., Hati, S., 2017a. Purification and characterization of antioxidative peptides derived from fermented milk (lassi) by lactic

- cultures. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 24(2), 235–249.
- Padghan, P.V., Mann, B., Sharma, R., 2017b. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks (Lassi) fermented by *Lactobacillus acidophilus* with consideration of incubation period and simmering treatment. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 23, 69–79.
- Paiva, L., Lima, E., Neto, A.I., Baptista, J., 2017. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity, antioxidant properties, phenolic content and amino acid profiles of *Fucus spiralis* L. Protein hydrolysate fractions. *Marine Drugs*, 15(10).
- Paksoy, G., 2016. Bazı Baharatların Ultrafiltre Beyaz Peynir Kalitesi Üzerine Etkileri. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 63s, Tekidağ.
- Pappa, E.C., Robertson, J.A., Rigby, N.M., Mellon, F., Kandarakis, I., Mills, E.N.C., 2008. Application of proteomic techniques to protein and peptide profiling of Teleme cheese made from different types of milk. *International Dairy Journal*, 18, 605–614.
- Parrot, S., Degraeve, P., Curia, C., Martial-Gros, A., 2003. In vitro study on digestion of peptides in Emmental cheese: Analytical evaluation and influence on angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Nahrung - Food*, 47(2), 87–94.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., Cottrell, J.S., 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20(18), 3551–67.
- Perry, R.H., Cooks, R.G., Noll, R.J., 2008. Orbitrap mass spectrometry: Instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrometry Reviews*, 27(6), 661–699.
- Pezeshki, A., Hesari, J., Ahmadi, Z.A., Ghambarzadeh, B., 2011. Influence of *Withania Coagulans* Protease As a Vegetable Rennet on Proteolysis of Iranian UF White Cheese. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13, 567–576.
- Phanturat, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Roytrakul, S., 2010. Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *LWT*, 43, 86–97.
- Picariello, G., Ferranti, P., Fierro, O., Mamonea, G., Cairaa, S., Di Lucciaa, A., Monicaa, S., Addeo F., 2010. Peptides surviving the simulated

gastrointestinal digestion of milk proteins: Biological and toxicological implications. *Journal of Chromatography B*, 878, 295–308.

Pino, A., Prados, F., Galán, E., McSweeney, P.L.H., Fernández-Salguero, J., 2009. Proteolysis during the ripening of goats' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food Research International*, 42(3), 324–330.

Pripp, A.H., Sørensen R., Stepaniak, L., Sørhaug, T., 2006. Relationship between proteolysis and angiotensin-I-converting enzyme inhibition in different cheeses. *LWT*, 39, 677–683.

Pritchard, S. R., Phillips, M., Kailasapathy, K., 2010a. Identification of bioactive peptides in commercial Australian organic cheddar cheeses. *Australian Journal of Dairy Technology*, 65(3), 170–173.

Pritchard, S.R., Phillips, M. and Kailasapathy, K., 2010b. Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, 43, 1545–1548.

Qu, X., Lu, L., Wang, H., Li, X., Zhang, X., Chen, P., 2018. Antioxidant capacity of probiotic cheese after simulated gastrointestinal digestion. *Food Science*, 39(3), 90–96.

Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., Recio, I., 2007. Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal*, 17(1), 33–41.

Quirós, A., Dávalos, A., Lasunción, M.A., Ramos, M., Recio, I., 2008. Bioavailability of the antihypertensive peptide LHLPLP: transepithelial flux of HLPLP. *The International Dairy Journal*, 18, 279–286.

Qureshi, T. M., Vegarud, G. E., Abrahamsen, R. K., Skeie, S., 2013. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory activity of the Norwegian autochthonous cheeses Gamalost and Norvegia after in vitro human gastrointestinal digestion. *Journal of Dairy Science*, 96(2), 838–853.

Qureshi, T.M, Vegarud, G.E., Abrahamsen, R.K., Skeie, S., 2012. Characterization of the Norwegian autochthonous cheese Gamalost and its angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity during ripening. *Dairy Science and Technology*, 92, 613–625.

Rafiq, S., Huma, N., Pasha, I., Shahid, M., Xiao, H., 2017. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory and antithrombotic activities of soluble peptide extracts from buffalo and cow milk Cheddar cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 70(3), 380–388.

Rai, A.K., Sanjukta, S., Jeyaram, K., 2017. Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory (ACE-I) peptides during milk fermentation and their

role in reducing hypertension. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), 2789–2800.

- Ramos, A.L., Arrieta Baez, D., Dávila Ortiz, G., Carlos Ruiz Ruiz, J., Manuel Toledo López, V., 2022. Antioxidant and antihypertensive activity of Gouda cheese at different stages of ripening. *Food Chemistry: X*, 14.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9;10), 1231-1237.
- Rodríguez-Figueroa, J.C., González-Córdova, A.F., Torres-Llenez, M.J., Garcia, H.S., Vallejo-Cordoba, B., 2012. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides produced in fermented milk by specific wild *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Dairy Science*, 95(10), 5536–5543.
- Rubak, Y.T., Nuraida, L., Iswantini, D., Prangdimurti, E., Sanam, M.U.E., 2021. Peptide profiling of goat milk fermented by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Delbrueckii* bd7: Identification of potential biological activity. *Biodiversitas*, 22(8), 3136–3145.
- Ryhänen, E. L., Pihlanto-Leppala, A., Pahkala, E., 2001. A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *The International Dairy Journal*, 11(4-7), 441-447.
- Sah, B.N.P., Vasiljevic, T., McKechnie, S., Donkor, O.N., 2014. Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. *Food Chemistry*, 156(1), 264-270.
- Sahingil, D., Gokce, Y., Yuceer, M., Hayaloglu, A.A., 2019. Optimization of proteolysis and angiotensin converting enzyme inhibition activity in a model cheese using response surface methodology. *LWT*, 99, 525-532.
- Sahingil, D., Gokce, Celikbicak, O., Hayaloğlu, A.A., 2022. ACE-inhibitory activities of peptide fractions (<3kDa) and identification of peptide sequence by MALDI-ToF-MS in model cheeses incorporating different *Lactobacillus* species. *Journal of Food Composition and Analysis*, 110, 104579.
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh, T., 2000. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *The International Dairy Journal*, 83, 1434–1440.
- Saldamlı, İ., Kaytanlı, M., 1998. Utilisation of fromase, maxiren and rennilase as alternative coagulating enzymes to rennet in Turkish white cheese production. *Milchwissenschaft*, 53(1), 22-25.

- Saleh, A.S., Zhang, Q., Shen, Q., 2016. Recent research in antihypertensive activity of food protein-derived hydrolyzates and peptites, *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(5), 760-787.
- Salih, B., 2005, Poliamin Kanser İlaçlarının CKII Enzimi ve MYC Onkoproteinler ile Etkileşim Mekanizmalarının Kapiler Elektroferez ve MALDI-MS, ile İncelenmesi, DPT Projesi Sonuç Raporu, Proje No:02 K 020 290-14, Ankara.
- Salvatore, E., Pes, M., Falchi, G., Pagnozzi, D., Furesi, S., Fiori, M., Pirisi, A., 2014. Effect of whey concentration on protein recovery in fresh ovine ricotta cheese. *Journal of Dairy Science*, 97(8), 4686–4694.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sánchez-Rivera L, Martinez-Maqueda D, CruzHuerta E, Miralles B, Recio I., 2014a. Peptidomics for discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides. *Food Research International*, 63, 170-181.
- Sánchez-Rivera, L., Diezhandino, I., Gómez-Ruiz, J.Á., Fresno, J.M., Miralles, B., Recio, I., 2014b. Peptidomic study of Spanish blue cheese (Valdeón) and changes after simulated gastrointestinal digestion. *Electrophoresis*, 35(11), 1627–1636.
- Sarantinopoulos, P., Kalatzopoulos, G. and Tsakalidon, E. 2002. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Doktora Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 76, 93-105
- Sarmadi, B.H., Ismail, A., 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31, 1949-1956.
- Say, D., Güzeler, N., 2016. Süt pıhtılaştırılmasında kullanılan bazı bitkiler. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi TARGİD Özel Sayı*, 253-261.
- Say, D., Soltani, M., Güzeler, N., 2012. Süt ürünlerinde kullanılan bitkiler. III. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu 10-12 Mayıs, 390-391s, Konya
- Schurink, M., van Berkel, W.J., Wichers, H.J., 2007. Improvement of lipoxygenase inhibition by octapeptides. *Peptides*, 28 , 2268–2275.
- Scigelova, M., Makarov, A., 2006. Orbitrap mass analyzer - Overview and applications in proteomics. *Proteomics*, 6(2), 16-21.
- Scott, R., 1981. *Cheesemaking Practice*. Applied Science Publishers, London.
- Scudino, H., Silva, R., Luis, G., Ramos, P.A., Guimar, J.T., Pimentel, T.C., Cruz, A.G., 2023. Ultrasonics Sonochemistry Thermosonication as a pretreatment of

raw milk for Minas frescal cheese production. *Ultrasonics Sonochemistry*, 92(October 2022), 106260.

Shah, N. P., 2000. Effects of milk-derived bioactives: an overview. *The British Journal of Nutrition*, 84 Suppl 1(SUPPL. 1).

Shamtsyan, M., Dmitriyeva, T., Kolesnikov, B., Denisova, N., 2014. Novel milk-clotting enzyme produced by *Coprinus lagopides* basidial mushroom. *Food Science and Technology*, 58, 343-347.

Shanmugam, V.P., Kapila, S., Sonfack, T.K., Kapila, R., 2015. Antioxidative peptide derived from enzymatic digestion of buffalo casein. *International Dairy Journal*, 42, 1-5.

Shi, Y., Wei, G., Huang, A., 2021. Simulated in vitro gastrointestinal digestion of traditional Chinese Rushan and Naizha cheese: Peptidome profiles and bioactivity elucidation. *Food Research International*, 142, 110201.

Sieber, R., Bütikofer, U., Egger, C., Portmann, R., Walther, B. Wechsler, D., 2010. ACE inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. *Dairy Science and Technology*, 90, 47-73.

Silva, S.V., Pihlanto, A., Malcata, F.X., 2006. Bioactive peptides in ovine and caprine cheeselike systems prepared with proteases from *Cynara cardunculus*. *Journal of Dairy Science*, 89(9), 3336-3344.

Silva, D. D. da, Lima, M. dos S. F. de, Silva, M. F. da, Silva, G. R. da, Campos, J. F., Albuquerque, W. W. C., Cavalcanti, M. T. H., Porto, A. L. F., 2019. Bioactive water-soluble peptides from fresh buffalo cheese may be used as product markers. *LWT*, 108, 97-105.

Singh, H., Waungana, A., 2001. Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. *International Dairy Journal*, 11, 543-551.

Siuzdak, G., 2006. *The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology*. MCC Press, 2nd edition, 257p.

Solieri, L., Baldaccini, A., Martini, S., Bianchi, A., Pizzamiglio, V., Tagliazucchi, D., 2020. Peptide Profiling and Biological Activities of 12-Month Ripened Parmigiano Reggiano Cheese. *Biology*, 9(170), 18.

Soltanı, M., 2013. İran'da Üretilen Ultrafiltre Beyaz Peynirin Özellikleri Üzerine Tuz Oranı ve Depolama Süresinin Etkileri. Çukurova Üniversitesi, FenBilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 168s, Adana.

Soltanı, M., Boran, O.S., Hayaloğlu, A.A., 2016. Effect of Various blends of Camel Chymosin and Microbial Rennet (*Rhizomucormiehei*) on Micro Structure and Rheological Properties of Iranian UF White Cheese. *Food Science and Technology*, 68, 724-728.

- Sonklin, C., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., 2018. Assessment of antioxidant properties of membrane ultrafiltration peptides from mungbean meal protein hydrolysates. *PeerJ*, 6, E5337.
- Sousa, M.J., Ardo, Y., McSweeney, P.L.H., 2001. Advances in The Study of Proteolysis During Cheese Ripening. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 327-345.
- Srinivas, S., Prakash, V., 2010. Bioactive peptides from bovine milk  $\alpha$ casein: Isolation, characterization and multifunctional properties. *The International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 16, 7-15.
- Stuknytė, M., Cattaneo, S., Masotti, F., De Noni, I., 2015. Occurrence and fate of ACE-inhibitor peptides in cheeses and in their digestates following in vitro static gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 168, 27-33.
- Suetsuna, K., Ukeda, H., Ochi, H., 2000. Isolation and characterisation of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11 (3), 128-131.
- Sun, C., Wu, W., Yin, Z., Fan, L., Ma, Y., Lai, F., Wu, H., 2018. Effects of simulated gastrointestinal digestion on the physicochemical properties, erythrocyte haemolysis inhibitory ability and chemical antioxidant activity of mulberry leaf protein and its hydrolysates. *International Journal of Food Science and Technology*, 53, 282-295.
- Süner, G., 2018. Farklı ticari rennetler ile üretilen Beyaz peynirlerde uçucu bileşenler ve serbest amino asitlerin belirlenmesi. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 97s., Hatay.
- Şahan, N., Yaşar, K., 2002. Peynir Üretiminde Süt Pıhtılaştırıcı Enzimlerin Roller. *Gıda Teknolojisi*, 6 (9), 31-40.
- Şahingil, D., 2012. Beyaz Peynir Üretiminde Kullanılan Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Proteoliz, Ace-İnhibisyon Aktivitesi Ve Aroma Oluşumuna Etkilerinin Belirlenmesi. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 163s, Tekirdağ.
- Şahingil, D., Hayaloğlu, A. A., Kırmacı, H. A., Özer, B., Şimşek, O., 2014. Changes of proteolysis and angiotensin-I converting enzyme-inhibitory activity in white-brined cheese as affected by adjunct culture and ripening temperature. *Journal of Dairy Research*, 81(04), 394-402.
- Şahintürk, M., 2016. Eşek Sütünün Özelliklerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 120s, Isparta.

- Şanlıdere, H., Öner, Z., 2006. Süt ürünlerinde bulunan biyoaktif peptitler ve fonksiyonlar. GIDA, 31(6), 311-317.
- Şanlıdere, H.A., 2010. Yoğurttan biyoaktif peptit eldesi ve bu peptitlerin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi (Doktora tezi), Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 152s., Isparta.
- Şanlıdere, H.A., Öner, Z., 2011. Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. Journal of Dairy Science, 94(11), 5305-5314.
- Şeker, A., 2017. Kefir İçeceğinin Biyoaktif Bileşenlerinin İn Vitro Gastrointestinal Simülasyon İle Belirlenmesi. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 75s, Denizli.
- Şengül, M., Erkaya, T., Dervişoğlu, M., Aydemir, O., Gül, O., 2014. Compositional, biochemical and textural changes during ripening of Tulum cheese made with different coagulants. International Journal of Dairy Technology 67, 373-383.
- Şimşek, B., 1995. Ankara Piyasasında Satılan Beyaz Peynirlerin Proteoliz Düzeyi Üzerinde Bir Araştırma. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Tagliazucchi, D., Shamsia, S., Helal, A., Conte, A., 2017. Angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from goats' milk released by in vitro gastrointestinal digestion. International Dairy Journal, 71, 6-16.
- Tagliazucchi, D., Martini, S., Shamsia, S., Helal, A., Conte, A., 2018. Biological activities and peptidomic profile of in vitro-digested cow, camel, goat and sheep milk. International Dairy Journal, 81, 19-27.
- Taha, S., El Abd, M., De Gobba, C., Abdel-Hamid, M., Khalil, E., Hassan, F. ul, Fathy, D., 2020. The multifunctional activity of water-soluble peptides' extract of Domiati cheese during accelerated ripening by Neutrase. Journal of Food Processing and Preservation, 44(5), 14434.
- Tang, X., He, Z., Dai, Y., Xiong, Y. L., Xie, M., Chen, J., 2010. Peptide fractionation and free radical scavenging activity of zein hydrolysate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(1), 587-593.
- Tarango-Hernández, S., Alarcón-Rajo, A.D., Robles-Sánchez, M., Gutiérrez-Méndez, N., Rodríguez-Figueroa, J.C., 2015. Short communication: Potential of Fresco-style cheese whey as a source of protein fractions with antioxidant and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities. Journal of Dairy Science, 98(11), 7635-7639.
- Tejada, L., Abellán, A., Prados, F., Cayuela, J.M., 2008. Compositional characteristics of Murcia al Vino Goat's cheese made with calf rennet and

- plant coagulant. *International Journal of Dairy Technology*, 61(2), 119-125.
- Tekinşen, O.C., Tekinşen, K.K., 2005. Süt ve süt ürünleri: Temel bilgiler teknoloji kalite kontrolü. Selçuk Üniversitesi Basımevi, 349s, Konya.
- Thomas, S.N., 2019. Chapter 10 - Mass spectrometry. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry* (4th Edition), 171-185.
- Tikhomirova, V.E., Kost, O.A., Kryukova, O.V., Golukhova, E.Z., Bulaeva, N.I., Zholbaeva, A.Z., Bokeria, L.A., Garcia J.G. N., Danilov, S.M., 2017. ACE phenotyping in human heart. *PLoS One* 12,e0181976.
- Timón, M.L., Andrés, A.I., Otte, J., Petrón, M.J., 2019. Antioxidant peptides (< 3 kDa) identified on hard cow milk cheese with rennet from different origin. *Food Research International*, 120, 643-649.
- Timón, M.L., Parra, V., Otte, J., Broncano, J.M., Petrón, M.J., 2014. Identification of radical scavenging peptides (<3kDa) from Burgos-type cheese. *LWT*, 57, 359-365.
- Topçu, A., 2004. Kaşar ve Beyaz Peynirlerde Acılaşmaya Yol Açan Peptidlerin Saptanması ve Starter Kültürlerin Etkisinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 158s, Ankara.
- Torres-Llanaez, M.J., González-Córdova, A.F., Hernandez-Mendoza, A., Garcia, H.S., Vallejo-Cordoba, B., 2011. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in Mexican Fresco cheese. *Journal of Dairy Science*, 94, 3794-3800.
- Tran, J.C., Zamdborg, L., Ahlf, D.R., Lee, J.E., Catherman, A.D., Durbin, K.R., Tipton, J.D., Vellaichamy, A., Kellie, J.F., Li, M., Wu, C., Sweet, S.M., Early, B.P., Siuti, N., LeDuc, R.D., Compton, P.D., Thomas, P.M., Kelleher, N.L., 2011 Mapping intact protein isoforms in discovery mode using topdown proteomics. *Nature*, 480, 254-258.
- Tunçtürk, Y., 2003. Sütte Bulunan Biyoaktif Proteinler ve Peptidler. Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu, 22-23 Mayıs, 335-340 s, İzmir.
- Turan, N., 2022. Bazı Geleneksel Peynirlerin Biyoaktif Peptit Profillerinin Belirlenmesi. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 146s.
- Udenigwe, C.C., Aluko, R.E., 2012. Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77(1).

- Uğur, E., Öner, Z., 2018. Ticari Salmonella Faj Preparatının Beyaz Peynirde Salmonella spp. Üzerine Etkisinin Araştırılması. Türk Tarım - Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 6(8), 995 – 1001.
- Uluko, H., Li, H., Cui, W., Zhang, S., Liu, L., Chen, J., Lv, J., 2013. Response surface optimization of angiotensin converting enzyme inhibition of milk protein concentrate hydrolysates in vitro after ultrasound pretreatment. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 20, 133–139.
- Uraz, T., 1979. Peynirlerde Acı Tadın Oluşumu. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 28, 13.
- Üçüncü, M., 2002. Süt Teknolojisi. II. Bölüm. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları No 32. Ege Meslek Yüksekokulu Basımevi, 210s, İzmir.
- Üçüncü, M., 2005. Süt ve Mamülleri Teknolojisi, Meta Basım, İzmir, 571 s.
- Üçüncü, M., 2020. A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi. 1. ve 2. Cilt, Meta Basım Matbaası, 2. Basım, 1236s, İzmir.
- Üstünol, Z., Hicks, C.L., 1990. Effect of milk-clotting enzymes on cheese yield. Journal of Dairy Science, 73(1), 8-16.
- Van der Zander, K., Bots, M. L., Bak, A. A., Koning, M. M., de Leeuw, P. W., 2008. Enzymatically hydrolyzed lactotripeptides do not lower blood pressure in mildly hypertensive subjects. The American Journal of Clinical Nutrition, 88, 1697–1702.
- Vapur, U., 2010. Farklı Starter Kültür Oranları İle Hayvansal ve Mikrobiyel Kaynaklı Peynir Mayaları Kullanılarak Üretilen Tam Yağlı Beyaz peynirlerin Özelliklerinin Belirlenmesi. Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 238s, Bursa.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verstraete, W., 2004. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. British Journal of Nutrition, 92 (3), 357-366.
- Vučić, T., Milinčić, D., Žilić, S., Ignjatović-Sredović, I., Sarić, Z., Ećim-đurić, O., Barać, M., 2020. The effect of in vitro digestion on antioxidant properties of water-soluble and insoluble protein fractions of traditional serbian white-brined cheeses. Mljekarstvo, 70(4), 253–265.
- Wang, J., Wu, T., Fang, X., Yang, Z., 2019. Manufacture of low-fat Cheddar cheese by exopolysaccharide-producing Lactobacillus plantarum JLK0142 and its functional properties. Journal of Dairy Science, 102(5), 3825–3838.
- Wei, G., Wang, D., Wang, T., Yang, C., Shi, Y., Huang, A., 2022a. Insights into in vitro digestion properties and peptide profiling of Chinese rubing PDO

cheese prepared using different acidification technology. *Food Research International*, 158, 111564.

- Wei, G., Zhao, Q., Wang, D., Fan, Y., Shi, Y., Huang, A., 2022b. Novel ACE inhibitory, antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides identified from fermented rubing cheese through peptidomic and molecular docking. *LWT*, 159, 113196.
- WHO, 2020. The top 10 causes of death, 2020. Erişim Tarihi: 11.12.2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top10-causes-of-death>
- WHO, 2021. Hypertension. Erişim Tarihi: 11.12.2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>
- Wishah, R., 2007. Peynir Üretiminde Starter Kültürlere Ek Olarak Bazı Bakteri Suşlarının Kullanımı Ve Bunun Peynir Özelliklerine Etkisi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 87.
- Wu, J., R. Aluko, and S. Nakai. 2006. Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: Quantitative structure-activity relationship modeling of peptides containing 4–10 amino acid residues. *Qsar and Combinatorial Science*, 25, 873–880.
- Wu, N., Xu, W., Liu, K., Xia, Y., Shuangquan., 2019. Angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from *Lactobacillus delbrueckii* QS306 fermented milk. *Journal of Dairy Science*, 102(7), 5913–5921.
- Wu, N., Zhang, F., Shuang, Q., 2023. Peptidomic analysis of the angiotensin-converting-enzyme inhibitory peptides in milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* QS306 after ultrahigh pressure treatment. *Food Research International*, 164(306), 112406.
- Xia, Y., Yu, J., Xu, W., Shuang, Q., 2020. Purification and characterization of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from whey proteins of milk fermented with *Lactobacillus plantarum* QS670. *Journal of Dairy Science*, 103(6), 4919–4928.
- Xiang, L., Qiu, Z., Zhao, R., Zheng, Z., Qiao, X., 2021. Advancement and prospects of production, transport, functional activity and structure-activity relationship of foodderived angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–27.
- Yang, W., Hao, X., Zhang, X., Zhang, G., Li, X., Liu, L., Pan, Y., 2021. Identification of antioxidant peptides from cheddar cheese made with *Lactobacillus helveticus*. *LWT*, 141(600), 110866.

- Yao, S., Agyei, D., Udenigwe, C.C., 2018. Structural basis of bioactivity of food peptides in promoting metabolic health. *Advances in Food and Nutrition Research*, 84, 145-81.
- Yaşar, K., 2007. Farklı Pıhtılaştırıcı Enzim Kullanımının Ve Olgunlaşma Süresinin Kaşar Peynirinin Özellikleri Üzerine Etkisi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 134s, Adana.
- Yates, J.R., Ruse, C.I., Nakorchevsky, A., 2009 Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 11, 49–79.
- Ye, X.Y., Yoshida, S., Ng, T.B., 2000. Isolation of lactoperoxidase, lactoferrin, alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin B and beta-lactoglobulin A from bovine rennet whey using ion exchange chromatography. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32(11-12), 1143-1150.
- Yerlikaya, O., Karagözlü, C., 2014. Effect of added caper on some physicochemical properties of White Chesse. *Mljekarstvo*, 64(1), 34-48.
- Yetişemeyen, A., Jancso, J., 1987. Ultrafiltrasyon Tekniğiyle Üretilen Feta Peynirinde Salamura ve Olgunlaşma Sırasındaki Madde Geçişleri. *Gıda/The Journal of Food*, 12(4), 221-224.
- Yetişemeyen, A., Çimer, A., Özer, M., Odabaşı, S., Deveci, O., 1998. Ultrafiltrasyon Tekniği İle Salamura Beyaz Peynir Üretiminde Kalite Üzerine Değişik Maya Enzimlerinin Etkisi. *Gıda/The Journal of Food*, 23(1), 3-9.
- Yetişemeyen, A., 2007. Süt Teknolojisi. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 142 s.
- Yetişemeyen, A., Yıldız, F., 2011. Membran Ayırma Tekniklerinin Peynir Teknolojisinde Kullanımı, Hayaloğlu A.A. ve Özer B. (Ed.), *Peynir Biliminin Temelleri*, (304-322), Sidas, 613s İzmir.
- Yıldız, B., 2015. Karbondioksit Uygulamasının Beyaz Peynir Kalitesine Etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 106s, Isparta.
- Yılmaztekin, M., 2001. Beyaz Peynir Üretiminde *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*'dan Yararlanma Olanakları Üzerine Bir Araştırma. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 102s, Şanlıurfa.
- Yousefi, L., Dovom, M.R.E., Najafi, M.B.H., Mortazavian, A.M., 2021. Antioxidant activity of ultrafiltered-Feta cheese made with adjunct culture during ripening. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 4336–4342.

- Zhang, H., Ge, Y., 2011. Comprehensive analysis of protein modifications by top-down mass spectrometry. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 4, 711.
- Zhang, N., Doucette, A., Li, L., 2001. Two-Layer Sample Preparation Method for MALDI Mass Spectrometric Analysis of Protein and Peptide Samples Containing Sodium Dodecyl Sulfate. *Analytical Chemistry*, 73, 2968-2975.
- Zou, T.B., He, T.P., Li, H.B., Tang, H.X., Xia, E.Q., 2016. The structureactivity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*, 21, 72.



## **EKLER**

### **EK A. Besiyerlerinin Hazırlanması**

#### **Ringer dilüsyon çözeltisi hazırlanması (Merck):**

NaCl: 2,25 g/L  
KCl: 0,105 g/L  
Susuz CaCl<sub>2</sub>: 0,06 g/L  
NaHCO<sub>3</sub>: 0,05 g/L  
Destile su: 1000 mL

**Hazırlanması:** 1 tablet 500 mL damıtık suya ilave edilip uygun kaplara (tüp, erlen vb.) dağıtılıp, otoklavda 121°C'da 15 dk sterilize edilir.

#### **Plate Count Agar (PCA) (Merck 1.05463):**

Peptone from casein: 5,0 g/L  
Yeast extract: 2,5 g/L  
D (+) Glucose: 1,0 g/L  
Agar-Agar: 14,0 g/L  
Destile su : 1000,0 mL

**Hazırlanması:** Dehidre besiyeri 22,5 g/L olacak şekilde destile su içerisinde eritilip, otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilir ve steril petri kutularına 45-50°C'de dökülür.

#### **Eosin Metilen Blue (EMB) Agar (Merck 1.01347):**

Pepton : 10,0 g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 2,0 g  
Laktoz : 5,0 g  
Sukroz :5,0 g  
Eosin Y sarısı : 0,4 g  
Metilen mavisi : 0,07 g  
Agar agar : 13,5 g  
Destile su : 1000,0 mL

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

#### **M17 Agar (Merck 1.15108) :**

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

Askorbik asit : 0,5 g  
Sodyum  $\beta$ -gliserofosfat : 19,0 g  
Magnezyum sülfat : 0,25 g  
Agar agar : 12,75 g  
Destile su : 1000,0 mL

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

**MRS Agar (Merck 1.0660):**

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

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

**EK B. Çözeltilerin Hazırlanması**

**Cd-Ninhydrin reaktifi :**

0,8g ninhydrin reaktifi, 80 mL ethanol + 10 mL asetik asit karışımında çözündürülmüştür. Sonra elde edilen karışıma 1 mL suda çözündürülmüş CdCl<sub>2</sub> (1 g/mL) ilave edilerek Cd-Ninhydrin reaktifi hazırlanmıştır.

**12,25 mM potasyum persulfat (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) :**

270,32 g/mol potasyum persulfat 1000 mL damıtık su ile tamamlanmıştır.

**Tuzlu fosfat tampon çözeltisi (pH 7,4) :**

0,1 M tuzlu fosfat tampon çözeltisi (pH 7,4) hazırlamak için; 19 mL 0,2 M monobazik sodyum fosfat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) çözeltisi ile 81 mL 0,2 M dibazik sodyum fosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) çözeltisi karıştırılarak üzerine 8,77 g NaCl eklenmiştir. Son pH değeri tampon çözeltiler ile 7,4'e kesin olarak ayarlandıktan sonra çözeltinin hacmi destile su ile 1 L' ye tamamlanmıştır.

**2.45 mM potasyum persulfat içeren 7 mM ' lık ABTS<sup>•+</sup> çözeltisi (2,2'-azino-bis (3- ethylbenzthiazoline - 6- sulfonik acid) :**

0,0384 g (38,4 mg) ABTS tartılmış bir miktar saf suda çözündürülmüş ve kayıp olmayacak şekilde 10 ml' lik ölçü balonuna alınmıştır. Üzerine 12,25 mM potasyum persulfattan 2 ml ilave edilmiştir. Damıtık su ile balon hacmine kadar tamamlanmıştır. Böylece 2,45 mM potasyum persulfat içeren 7 mM' lık ABTS' çözeltisi hazırlanmış olur. Bu çözelti oda sıcaklığında ve karanlıkta en az 12-16 saat bekletilmiş ve böylece ABTS<sup>•+</sup> radikalinin oluşması sağlanmıştır. Hazırlanan çözelti 2-3 gün stabil kalmaktadır.

**Troloks (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboksilik asit) standart çözeltisinin hazırlanması :**

62,57 mg troloks tartılmıştır. Kayıpsız bir şekilde 100 ml ' lik ölçü balonuna alınmış ve tuzlu fosfat tampon çözeltisi ile 100 ml ' ye tamamlanmıştır. Böylece 2,5 mM troloks standart çözeltisi hazırlanmıştır .

**%1 (w/v) Triton X-100 içeren 0.1 M tuzlu fosfat tampon çözeltisi (pH 7.0) :**

0,1 M tuzlu fosfat tampon çözeltisinin pH'sı 7,0'a ayarlandıktan sonra çözeltiye %1 (w/v) Triton X-100 eklenir.

**DPPH Çözeltisi :**

250 mL 100 µM DPPH çözeltisi hazırlamak için 10 mg DPPH tartılıp 250 mL hacimli bir balona kayıpsız olacak şekilde aktarılıp bir miktar metanol ile çözdürülür. Ardından metanol ile çizgisine tamamlanır.

**5 mM HHL ve 0,3 M NaCl içeren 0,1 M sodyum borat tamponu (pH 8,3) :**

100 mL 0,1 M sodyum borat tamponu hazırlamak için 2,0122 gram di-sodyum tetraborat ( $M_A = 201,22$  g/mol) ve 1,755 g NaCl tartılıp bir miktar suda çözdürülür. Ardından pH değeri 8,3'e ayarlanır. 5mM HHL içermesi için pH değeri ayarlanmış 100mL çözeltiye 0,214 g HHL ilave edilmiştir. Ardından çözelti 100 mL'e balonda destile su ile tamamlanır.

**0,5 M NaCl içeren 0,01 potasyum fosfat tamponu (pH 7,0) :**

Stok 1 çözeltisi hazırlanır. 0,01 M potasyum dihidrojen fosfat ( $KH_2PO_4$ ) çözeltisi (0,5 M NaCl içeren) hazırlanır. 100 mL için 0,136 g  $KH_2PO_4$  + 2,922 g NaCl tartılıp balonda 100 mL çizgisine destile su ile tamamlanır. Ardından stok 2 çözeltisi hazırlanır. 0,01 M dipotasyum hidrojen fosfat ( $K_2HPO_4$ ) çözeltisi (0,5 M NaCl içeren) hazırlanır. 100 mL için 0,174 g  $K_2HPO_4$  + 2,922 g NaCl tartılıp balonda 100 mL çizgisine destile su ile tamamlanır. Stok çözeltiler kullanılarak çözeltinin son pH değerinin 7,0 olması sağlanır. Bunun için 20 mL stok 1 çözeltisinin üzerine 20 mL stok 2 çözeltisi ilave edilerek pH ölçülür. pH değeri 7,0 olana kadar stok 1 çözeltisine stok 2 çözeltisinden ilave edilir.

**%30'luk akrilamid çözeltisi:**

29,0 g akrilamid ( $\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$ ) + 1,0 g N,N - methylene bisakrilamid destile su içinde çözündürülmüş ve 100 mL' ye tamamlanmış ve 4°C ' de saklanmıştır.

**%10 (w/v)'luk amonyum persulfat:**

100 mg amonyum persulfat 1 ml saf su içinde çözündürülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözelti günlük olarak taze kullanılmalıdır.

**1,5 M Tris (hidroksimetil)-aminometan ( $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ) (pH 8,8):**

18,15 g tris-base tartılıp ve bir miktar destile suda çözündürülerek pH' sı 6 NHCl ile 8,8'e ayarlanmış ve son hacim 100 mL' ye tamamlanmıştır. Çözelti 4°C de saklanmıştır.

**1 M Tris (hidroksimetil)-aminometan ( $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ) (pH 6.8):**

12,11 g tris-base tartılıp bir miktar destile suda çözündürülmüş ve pH'sı 6 N HCl ile 6,8'e ayarlanmıştır. Son hacmi 100 mL' ye tamamlanmış ve 4°C' de saklanmıştır.

**% 10 (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS):**

10 g SDS tartılmış ve köpürmesini önlemek için yavaş bir şekilde bir miktar destile su ilave edilmiştir. Çözündükten sonra hacmi 100 mL' ye tamamlanmıştır.

**Yürütme tamponu (Elektrot tamponu, pH (8,3), (1x)):**

15,1 g tris-base + 94 g glisin + %10 'luk SDS' den 50 mL alınıp bir miktar destile suda çözündürülür ve pH 8,3'e ayarlanarak 1000 mL' ye tamamlanmıştır. 5 kat su ile seyreltilerek (1x) kullanılmıştır.

**Örnek tamponu:**

1 mL 1 M Tris (pH 6,8) + 19 mL su + 0,4 g SDS + 0,02 g bromfenol blue + 2 g gliserol karıştırılarak örnek tamponu elde edilmiştir.

**Yıkama çözeltisi:**

450 mL methanol + 90 mL asetik asit + 450 mL destile su ile hazırlanmıştır.

**Boyama çözeltisi:**

0,25 g coomassie brillant blue + 125 mL methanol + 25 mL asetik asit + 100 mL destile su ile hazırlanmıştır.

## EK C. Çizelge

Çizelge C.1. Amino asitlerin isimlerinin kısaltılması

| Amino asit               | 3 harfli kısaltılması | Tek harfli kısaltılması |
|--------------------------|-----------------------|-------------------------|
| Alanin                   | Ala                   | A                       |
| Arjinin                  | Arg                   | R                       |
| Asparajin                | Asn                   | N                       |
| Aspartik asit            | Asp                   | D                       |
| Aspartat ya da Asparajin | Asx                   | B                       |
| Fenilalanin              | Phe                   | F                       |
| Glutamik asit            | Glu                   | E                       |
| Glutamin                 | Gln                   | Q                       |
| Glutamat ya da Glutamin  | Glx                   | Z                       |
| Glisin                   | Gly                   | G                       |
| Histidin                 | His                   | H                       |
| İzolösin                 | Ile                   | I                       |
| Lisin                    | Lys                   | K                       |
| Lösin                    | Leu                   | L                       |
| Metiyonin                | Met                   | M                       |
| Prolin                   | Pro                   | P                       |
| Serin                    | Ser                   | S                       |
| Sistein                  | Cys                   | C                       |
| Tirozin                  | Tyr                   | Y                       |
| Treonin                  | Thr                   | T                       |
| Triptofan                | Trp                   | W                       |
| Valin                    | Val                   | V                       |

Çizelge C.2. M-UF peynirinin 90. gün <3kDa peptit ekstraktına ait tanımlanmış peptitler

| Amino asit Dizisi           | m/z       | Moleküler Ağırlık (Deneysel, Da) | Moleküler Ağırlık (Hesaplamalı, Da) | Peptit Fragmenti            | Yapılan önceki çalışmalar                                                                                                              |
|-----------------------------|-----------|----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ALPQYLKTVYQH                | 730,9047  | 1459,7948                        | 1459,7823                           | $\alpha_{s2}$ -CN (190-201) |                                                                                                                                        |
| TKLTEEEKNRLNF               | 811,4379  | 1620,8613                        | 1620,8471                           | $\alpha_{s2}$ -CN (166-178) |                                                                                                                                        |
| YQGPIVLNPWDQVKR             | 605,002   | 1811,9842                        | 1811,9682                           | $\alpha_{s2}$ -CN (115-129) |                                                                                                                                        |
| YLYQGPIVLNPWDQVKR           | 697,0519  | 2088,1338                        | 2088,1156                           | $\alpha_{s2}$ -CN (113-129) | Nongonierma vd. (2017)                                                                                                                 |
| MKPWIQPKTKVIPYVRYL          | 565,8365  | 2259,3168                        | 2259,2966                           | $\alpha_{s2}$ -CN (205-222) | Gómez-Ruiz vd. (2002; 2007); Lu vd. (2016) ; Solieri vd. (2020)                                                                        |
| KAMKPWIQPKTKVIPYVRYL        | 615,6202  | 2458,4519                        | 2458,4286                           | $\alpha_{s2}$ -CN (203-222) | Gómez-Ruiz vd. (2002; 2007); Lu vd. (2016); Martini vd. (2020); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021)                                     |
| QHQKAMKPWIQPKTKVIPYVRYL     | 956,8818  | 2867,6237                        | 2867,5996                           | $\alpha_{s2}$ -CN (200-222) | Gómez-Ruiz vd. (2002; 2007); Lu vd. (2016); Martini vd. (2020); Solieri vd. (2020) ; Hao vd. (2021)                                    |
| KTVYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRYL | 1115,3108 | 3342,9105                        | 3342,8791                           | $\alpha_{s2}$ -CN (196-222) | Gómez-Ruiz vd. (2002; 2007); Lu vd. (2016); Martini vd. (2020); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021); Helal ve Tagliazucchi (2023)       |
| YQEPVLGPVRGPF               | 729,8976  | 1457,7806                        | 1457,7667                           | $\beta$ -CN (208-220)       | Hao vd. (2021)                                                                                                                         |
| VENLHLPLPLQS                | 736,9341  | 1471,8536                        | 1471,8398                           | $\beta$ -CN (145-157)       | Quirós vd. (2007); Schurink vd., (2007); Basiricò vd. (2015); Stuknyté vd. (2015); Solieri vd. (2020); Hao vd., 2021; Wei vd. (2022b)  |
| DVENLHLPLPLQS               | 794,4485  | 1586,8825                        | 1586,8668                           | $\beta$ -CN (144-157)       | Quirós vd. (2007); Schurink vd., (2007); Basiricò vd. (2015); Stuknyté vd. (2015); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021); Wei vd. (2022b) |

Çizelge C.2. M-UF peynirinin 90. gün <3kDa peptit ekstraktına ait tanımlanmış peptitler (Devam)

|                                |          |           |           |                             |                                                                                                                                                             |
|--------------------------------|----------|-----------|-----------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>TDVENLHLPLPL<u>LLQ</u></b>  | 801,4561 | 1600,8976 | 1600,8824 | $\beta$ -CN (143-156)       | Quirós vd. (2007); Schurink vd., (2007); Kerkaert vd. (2012); Basiricò vd. (2015); Stuknytė vd. (2015); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021); Wei vd. (2022b) |
| <b>DVENLHLPLPL<u>LSW</u></b>   | 887,4885 | 1772,9625 | 1772,9461 | $\beta$ -CN (144-158)       | Quirós vd. (2007); Schurink vd., (2007); Basiricò vd. (2015); Stuknytė vd. (2015); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021); Wei vd. (2022b)                      |
| <b>LLYQEPVLGPVRG<u>PFP</u></b> | 891,5085 | 1781,0025 | 1780,9876 | $\beta$ -CN (206-221)       | Quirós vd. (2007); Hao vd. (2021); Shi vd. (2021); Helal ve Tagliazucchi (2023)                                                                             |
| <b>DELQDKIHPFAQT<u>QSL</u></b> | 935,4784 | 1868,9422 | 1868,9268 | $\beta$ -CN (58-73)         | Ong vd. (2007); Lignitto vd. (2010); Ibrahim vd. (2017); Fan vd. (2019); Martini vd. 2020; Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021); Wei vd. (2022b)              |
| <b>LNEN<u>LLRF</u></b>         | 509,7921 | 1017,5696 | 1017,5607 | $\alpha_{s1}$ -CN (31-38)   | Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021)                                                                                                                          |
| <b>EVLNEN<u>LLR</u></b>        | 550,3138 | 1098,6131 | 1098,6033 | $\alpha_{s1}$ -CN (29-37)   | Helal ve Tagliazucchi (2023)                                                                                                                                |
| <b>LGYLEQ<u>LLR</u></b>        | 552,8293 | 1103,6441 | 1103,6339 | $\alpha_{s1}$ -CN (107-115) | Helal ve Tagliazucchi (2023)                                                                                                                                |
| <b>EVLNEN<u>LLRF</u></b>       | 623,8491 | 1245,6836 | 1245,6717 | $\alpha_{s1}$ -CN (29-38)   | Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021); Helal ve Tagliazucchi (2023)                                                                                            |
| <b>GLPQEVLNEN<u>LLR</u></b>    | 747,9241 | 1493,8336 | 1493,8202 | $\alpha_{s1}$ -CN (25-37)   | Helal ve Tagliazucchi (2023)                                                                                                                                |
| <b>GLPQEVLNEN<u>LLRF</u></b>   | 821,4589 | 1640,9033 | 1640,8886 | $\alpha_{s1}$ -CN (25-38)   | Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021); Helal ve Tagliazucchi (2023)                                                                                            |
| <b>KIDALNENK<u>VL</u></b>      | 628,8698 | 1255,7249 | 1255,7136 | $\beta$ -LG (99-109)        |                                                                                                                                                             |
| <b>KIDALNENK<u>VL</u></b>      | 734,9467 | 1467,8788 | 1467,866  | $\beta$ -LG (99-111)        |                                                                                                                                                             |
| <b>FSDKIAKYI<u>PIQ</u></b>     | 711,9009 | 1421,8051 | 1421,7918 | $\kappa$ -CN (39-50)        | Gómez-Ruiz vd (2007)                                                                                                                                        |

Kalın harfle gösterilenler: Literatürde ACE-inhibisyonu belirlenmiş ve eşleşme gösteren diziler.

Altı çizili gösterilenler: Prolin aminoasidi ile birlikte üç C-terminal pozisyonunda bulunan fenilalanin, lösin, izolösin, triptofan ve valin gibi hidrofobik amino asitlere ve arginin ile lizin gibi pozitif yüklü amino asitlere vurgu yapılmıştır.

Çizelge C.3. M-PAS peynirinin 90. gün <3kDa peptit ekstraktına ait tanımlanmış peptitler

| Amino asit Dizisi                               | m/z      | Moleküler Ağırlık (DeneySEL) | Moleküler Ağırlık (Hesaplamalı) | Peptit Fragmenti            | Yapılan önceki çalışmalar                                                                                                        |
|-------------------------------------------------|----------|------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <u>I</u> QPKTKVIPY <u>R</u>                     | 721,4547 | 1440,8947                    | 1440,8817                       | $\alpha_{s2}$ -CN (209-220) | Gómez-Ruiz vd. (2002)                                                                                                            |
| YQGPIVLNPWDQV <u>K</u> R                        | 60530021 | 1811,9846                    | 1811,9682                       | $\alpha_{s2}$ -CN (115-129) |                                                                                                                                  |
| YQGPIVLNPWDQV <u>K</u> RN                       | 964,0215 | 1926,0284                    | 1926,0112                       | $\alpha_{s2}$ -CN (115-130) |                                                                                                                                  |
| <b>AMKPW</b> IQPKTKVIPY <u>R</u>                | 685,7423 | 2054,2051                    | 2054,1863                       | $\alpha_{s2}$ -CN (204-220) | Gómez-Ruiz vd. (2002); Martini vd. (2020); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021)                                                    |
| <b>TKTKL</b> TEEEKNRLN <u>F</u> L               | 698,0697 | 2091,1873                    | 2091,1687                       | $\alpha_{s2}$ -CN (163-179) | Srinivas ve Prakash (2010)                                                                                                       |
| KPWIQPKTKVIPY <u>V</u> R <u>L</u>               | 710,4318 | 2128,2736                    | 2128,2561                       | $\alpha_{s2}$ -CN (206-222) | Gómez-Ruiz vd. (2002; 2007); Lu vd. (2016)                                                                                       |
| <b>MKPW</b> IQPKTKVIPY <u>V</u> R <u>L</u>      | 565,8367 | 2259,3178                    | 2259,2966                       | $\alpha_{s2}$ -CN (205-222) | Gómez-Ruiz vd. (2002; 2007); Lu vd. (2016); Solieri vd. (2020)                                                                   |
| <u>L</u> QYLYQGPIVLNPWDQV <u>K</u> R            | 777,4338 | 2329,2795                    | 2329,2583                       | $\alpha_{s2}$ -CN (111-129) | Nongonierma vd. (2017)                                                                                                           |
| <b>AMKPW</b> IQPKTKVIPY <u>V</u> R <u>L</u>     | 777,7925 | 2330,3558                    | 2330,3337                       | $\alpha_{s2}$ -CN (204-222) | Gómez-Ruiz vd. (2007); Lu vd. (2016); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021)                                                         |
| QHQA <b>MPW</b> IQPKTKVIPY <u>R</u>             | 859,5008 | 2575,4806                    | 2575,4573                       | $\alpha_{s2}$ -CN (200-220) | Gómez-Ruiz vd. (2007); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021)                                                                        |
| QA <b>MPW</b> IQPKTKVIPY <u>V</u> R <u>L</u>    | 647,6351 | 2586,5114                    | 2586,4872                       | $\alpha_{s2}$ -CN (202-222) | Gómez-Ruiz vd. (2007); Lu vd. (2016); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021)                                                         |
| VYQHQA <b>MPW</b> IQPKTKVIPY <u>R</u>           | 710,4106 | 2837,6135                    | 2837,5891                       | $\alpha_{s2}$ -CN (198-220) | Gómez-Ruiz vd. (2007); Lu vd. (2016); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021)                                                         |
| QHQA <b>MPW</b> IQPKTKVIPY <u>V</u> R <u>L</u>  | 713,915  | 2851,6311                    | 2851,6047                       | $\alpha_{s2}$ -CN (200-222) | Gómez-Ruiz vd. (2007); Lu vd. (2016); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021)                                                         |
| <b>VYQHQA</b> MPW <b>IQPKTKVIPYVRY</b> <u>L</u> | 779,4484 | 3113,7646                    | 3113,7364                       | $\alpha_{s2}$ -CN (198-222) | Gómez-Ruiz vd. (2002; 2007); Lu vd. (2016); Martini vd. (2020); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021); Helal ve Tagliazucchi (2023) |

Çizelge C.3. M-PAS peynirinin 90. gün <3kDa peptit ekstraktına ait tanımlanmış peptitler (Devam)

|                                    |               |           |           |                             |                                                                                                                                        |
|------------------------------------|---------------|-----------|-----------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>TVYQHQAAMKPWIKPKTKVIPYVRYL</b>  | 643,97        | 3214,8135 | 3214,7841 | $\alpha_{s2}$ -CN (197-222) | Gómez-Ruiz vd. (2002; 2007); Lu vd. (2016); Martini vd. (2020); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021); Helal ve Tagliazucchi (2023)       |
| <b>LNENLLRF</b>                    | 509,7921      | 1017,5696 | 1017,5607 | $\alpha_{s1}$ -CN (31-38)   | Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021)                                                                                                     |
| <b>LGYLEQLLR</b>                   | 552,8296      | 1103,6446 | 1103,6339 | $\alpha_{s1}$ -CN (107-115) | Helal ve Tagliazucchi (2023)                                                                                                           |
| <b>GKEKVNELSKD</b>                 | 623,8411      | 1245,6676 | 1245,6564 | $\alpha_{s1}$ -CN (48-58)   | Wei vd. (2022b)                                                                                                                        |
| <b>EVLNENLLRF</b>                  | 623,849       | 1245,6834 | 1245,6717 | $\alpha_{s1}$ -CN (29-38)   | Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021); Helal ve Tagliazucchi (2023)                                                                       |
| <b>SDIPNPIGSENSEK</b>              | 743,8616      | 1485,7086 | 1485,6947 | $\alpha_{s1}$ -CN (195-208) |                                                                                                                                        |
| <b>FVAPFPEVFGKEK</b>               | 747,9101      | 1493,8056 | 1493,7919 | $\alpha_{s1}$ -CN (39-51)   | Ong vd. (2007); Helal ve Tagliazucchi (2023)                                                                                           |
| <b>RPKHPIKHQGLPQ</b>               | 768,4561      | 1534,8977 | 1534,8844 | $\alpha_{s1}$ -CN (16-28)   | Saito vd. (2000); Gómez-Ruiz vd (2006); Ong vd. (2007); Helal ve Tagliazucchi (2023)                                                   |
| <b>GLPQEVLNENLLRF</b>              | 821,4586      | 1640,9026 | 1640,8886 | $\alpha_{s1}$ -CN (25-38)   | Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021); Helal ve Tagliazucchi (2023)                                                                       |
| <b>FVAPFPEVFGKEK<sub>V</sub>NE</b> | 918,988       | 1835,9614 | 1835,9458 | $\alpha_{s1}$ -CN (39-54)   | Ong vd. (2007); Helal ve Tagliazucchi (2023)                                                                                           |
| <b>FSDKIAKYIPIQYVL</b>             | 600,015       | 1797,0232 | 1797,0076 | $\kappa$ -CN (39-53)        | Gómez-Ruiz vd (2007)                                                                                                                   |
| <b>FSDKIAKYIPIQYVLS</b>            | 943,0352      | 1884,0559 | 1884,0397 | $\kappa$ -CN (39-54)        | Gómez-Ruiz vd (2007)                                                                                                                   |
| <b>DVENLHLPLPLLQSW</b>             | 887,4884      | 1772,9623 | 1772,9461 | $\beta$ -CN (144-158)       | Quirós vd. (2007); Schurink vd., (2007); Basiricò vd. (2015); Stuknytė vd. (2015); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021); Wei vd. (2022b) |
| <b>KAVPYPQRDMP<sub>I</sub>QA</b>   | 1339,240<br>2 | 2676,4659 | 2676,4421 | $\beta$ -CN (181-204)       | Boldogh vd. (2006); Kruzel (2009); Martini vd. (2020); Solieri vd. (2020); Helal ve Tagliazucchi (2023)                                |

Çizelge C.4. Ş-PAS peynirinin 90. gün <3kDa peptit ekstraktına ait tanımlanmış peptitler

| Amino asit Dizisi           | m/z       | Moleküler Ağırlık (Deneysel) | Moleküler Ağırlık (Hesaplamalı) | Peptit Fragmenti            | Yapılan önceki çalışmalar                                                                          |
|-----------------------------|-----------|------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <u>QGPIVLNPWDQVK</u>        | 747,4161  | 1492,8176                    | 1492,8038                       | $\alpha_{s2}$ -CN (116-128) |                                                                                                    |
| <u>QGPIVLNPWDQVKR</u>       | 550,6471  | 1648,9195                    | 1648,9049                       | $\alpha_{s2}$ -CN (116-129) |                                                                                                    |
| <u>IQPKTKVIPYVRYL</u>       | 573,3558  | 1717,0455                    | 1717,029                        | $\alpha_{s2}$ -CN (209-222) | Gómez-Ruiz vd. (2002; 2007); Lu vd. (2016)                                                         |
| <u>YQGPIVLNPWDQVKR</u>      | 605,0023  | 1811,9851                    | 1811,9682                       | $\alpha_{s2}$ -CN (115-129) |                                                                                                    |
| <u>YQGPIVLNPWDQVKRN</u>     | 964,0219  | 1926,0293                    | 1926,0112                       | $\alpha_{s2}$ -CN (115-130) |                                                                                                    |
| <u>MKPWIQPKTKVIPYVR</u>     | 662,0624  | 1983,1653                    | 1983,1492                       | $\alpha_{s2}$ -CN (205-220) | Gómez-Ruiz vd (2002;2007); Solieri vd. (2020)                                                      |
| <u>LYQGPIVLNPWDQVKRN</u>    | 1020,5633 | 2039,112                     | 2039,0952                       | $\alpha_{s2}$ -CN (114-130) | Nongonierma vd. (2017)                                                                             |
| <u>AMKPWIQPKTKVIPYVR</u>    | 514,5586  | 2054,2053                    | 2054,1863                       | $\alpha_{s2}$ -CN (204-220) | Gómez-Ruiz vd (2007); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021)                                           |
| <u>TKKTKLTEEEKNRLNFL</u>    | 698,0699  | 2091,1878                    | 2091,1687                       | $\alpha_{s2}$ -CN (163-179) | Srinivas ve Prakash (2010)                                                                         |
| <u>KPWIQPKTKVIPYVRYL</u>    | 710,4314  | 2128,2724                    | 2128,2561                       | $\alpha_{s2}$ -CN (206-222) | Gómez-Ruiz vd. (2007); Lu vd. (2016)                                                               |
| <u>KAMKPWIQPKTKVIPYVR</u>   | 728,4404  | 2182,2995                    | 2182,2812                       | $\alpha_{s2}$ -CN (203-220) | Gómez-Ruiz vd (2002; 2007); Martini vd. (2020); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021)                 |
| <u>QYLYQGPIVLNPWDQVKR</u>   | 739,7371  | 2216,1895                    | 2216,1742                       | $\alpha_{s2}$ -CN (112-129) | Nongonierma vd. (2017)                                                                             |
| <u>MKPWIQPKTKVIPYVRYL</u>   | 565,836   | 2259,3149                    | 2259,2966                       | $\alpha_{s2}$ -CN (205-222) | Gómez-Ruiz vd. (2002; 2007); Lu vd. (2016); Solieri vd. (2020)                                     |
| <u>LQYLYQGPIVLNPWDQVKR</u>  | 777,4331  | 2329,2775                    | 2329,2583                       | $\alpha_{s2}$ -CN (111-129) | Nongonierma vd. (2017)                                                                             |
| <u>AMKPWIQPKTKVIPYVRYL</u>  | 583,5962  | 2330,3557                    | 2330,3337                       | $\alpha_{s2}$ -CN (204-222) | Gómez-Ruiz vd. (2002; 2007); Lu vd. (2016); Martini vd. (2020); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021) |
| <u>LQYLYQGPIVLNPWDQVKRN</u> | 1222,6688 | 2443,3231                    | 2443,3012                       | $\alpha_{s2}$ -CN (111-130) | Nongonierma vd. (2017)                                                                             |

Çizelge C.4. Ş-PAS peynirinin 90. gün <3kDa peptit ekstraktına ait tanımlanmış peptitler (Devam)

|                                    |          |           |           |                                |                                                                                                                   |
|------------------------------------|----------|-----------|-----------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>KAMKPWIQPKTKVIPYVRYL</b>        | 615,6198 | 2458,4499 | 2458,4286 | $\alpha_{s2}$ -CN<br>(203-222) | Gómez-Ruiz vd. (2007); Lu vd. (2016); Martini vd. (2020); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021)                      |
| <b>QHQAAMKPWIQPKTKVIPYVR</b>       | 859,5005 | 2575,4796 | 2575,4573 | $\alpha_{s2}$ -CN<br>(200-220) | Gómez-Ruiz vd (2007); Martini vd. (2020); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021)                                      |
| <b>VYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRY</b>    | 1001,233 | 3000,6771 | 3000,6524 | $\alpha_{s2}$ -CN<br>(198-221) | Gómez-Ruiz vd (2007); Martini vd. (2020); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021)                                      |
| <b>KTVYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRYL</b> | 836,7344 | 3342,9086 | 3342,8791 | $\alpha_{s2}$ -CN<br>(196-222) | Gómez-Ruiz vd. (2007); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021); Helal ve Tagliazucchi (2023)                           |
| <b>NLHLPLPLLSW</b>                 | 715,9179 | 1429,8213 | 1429,8082 | $\beta$ -CN<br>(147-158)       | Quirós vd. (2007); Schurink vd., (2007); Basiricò vd. (2015); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021); Wei vd. (2022b) |
| <b>YQEPVLGPVRGPF</b>               | 729,8967 | 1457,7789 | 1457,7667 | $\beta$ -CN<br>(208-220)       | Hao vd. (2021)                                                                                                    |
| <b>VENLHLPLPLLS</b>                | 736,934  | 1471,8534 | 1471,8398 | $\beta$ -CN<br>(145-157)       | Quirós vd. (2007); Schurink vd., (2007); Basiricò vd. (2015); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021); Wei vd. (2022b) |
| <b>LGYLEQLLR</b>                   | 552,8295 | 1103,6444 | 1103,6339 | $\alpha_{s1}$ -CN<br>(107-115) | Helal ve Tagliazucchi (2023)                                                                                      |
| <b>YQEPVLGPVRGPFPII</b>            | 891,509  | 1781,0034 | 1780,9876 | $\beta$ -CN<br>(208-223)       | Quirós vd. (2007); Torres-Llanez vd. (2011); Hao vd. (2021); Helal ve Tagliazucchi (2023)                         |
| <b>YQEPVLGPVRGPFPII</b>            | 891,509  | 1781,0034 | 1780,9876 | $\beta$ -CN<br>(208-223)       | Gómez-Ruiz vd. (2007); Quirós vd. (2007); Torres-Llanez vd. (2011); Hao vd. (2021); Helal ve Tagliazucchi (2023)  |
| <b>LYQEPVLGPVRGPFPII</b>           | 948,0504 | 1894,0863 | 1894,0717 | $\beta$ -CN<br>(207-223)       | Gómez-Ruiz vd. (2007); Quirós vd. (2007); Torres-Llanez vd. (2011); Hao vd. (2021); Helal ve Tagliazucchi (2023)  |

Çizelge C.4. Ş-PAS peynirinin 90. gün <3kDa peptit ekstraktına ait tanımlanmış peptitler (Devam)

|                           |               |           |           |                             |                                                                                                           |
|---------------------------|---------------|-----------|-----------|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>SLSQSKVLPVPQKAVPYQ</b> | 1033,595<br>2 | 2065,1759 | 2065,1572 | $\beta$ -CN (179-197)       | Boldogh vd. (2006); Padghan vd. (2017b); Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021); Helal ve Tagliazucchi (2023) |
| <b>LNENLLRF</b>           | 509,792       | 1017,5695 | 1017,5607 | $\alpha_{s1}$ -CN (31-38)   | Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021); Helal ve Tagliazucchi (2023)                                          |
| <b>EVLNENLLR</b>          | 550,314       | 1098,6134 | 1098,6033 | $\alpha_{s1}$ -CN (29-37)   | Helal ve Tagliazucchi (2023)                                                                              |
| <b>LGYLEQLLR</b>          | 552,8295      | 1103,6444 | 1103,6339 | $\alpha_{s1}$ -CN (107-115) | Helal ve Tagliazucchi (2023)                                                                              |
| <b>EVLNENLLRF</b>         | 623,8483      | 1245,6821 | 1245,6717 | $\alpha_{s1}$ -CN (29-38)   | Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021); Helal ve Tagliazucchi (2023)                                          |
| <b>GLPQEVNENLLRF</b>      | 821,4586      | 1640,9027 | 1640,8886 | $\alpha_{s1}$ -CN (25-38)   | Solieri vd. (2020); Hao vd. (2021); Helal ve Tagliazucchi (2023)                                          |
| <b>YQEPVLGPVRGPF</b>      | 729,8967      | 1457,7789 | 1457,7667 | $\beta$ -CN (206-218)       | Hao vd. (2021)                                                                                            |
| <b>YQEPVLGPVRGPFIL</b>    | 891,509       | 1781,0034 | 1780,9876 | $\beta$ -CN (206-221)       | Quirós vd. (2007); Torres-Llanez vd. (2011); Hao vd. (2021); Helal ve Tagliazucchi (2023)                 |
| <b>LYQEPVLGPVRGPFIL</b>   | 948,0504      | 1894,0863 | 1894,0717 | $\beta$ -CN (205-221)       | Quirós vd. (2007); Torres-Llanez vd. (2011); Hao vd. (2021); Helal ve Tagliazucchi (2023)                 |
| <b>GLNYYQKPVALIN</b>      | 810,9482      | 1619,8819 | 1619,8671 | $\kappa$ -CN (6-19)         | Xiang vd. (2021)                                                                                          |
| <b>YYQKPVALINNQLPYPY</b>  | 1180,119<br>4 | 2358,2242 | 2358,2048 | $\kappa$ -CN (9-27)         | Gómez-Ruiz vd. (2007); Wu vd. (2019); Xiang vd. (2021)                                                    |

Kalın harfle gösterilenler: Literatürde ACE-inhibisyonu belirlenmiş ve eşleşme gösteren diziler.

Altı çizili gösterilenler: Prolin aminoasidi ile birlikte üç C-terminal pozisyonunda bulunan fenilalanin, lösin, izolösin, triptofan ve valin gibi hidrofobik amino asitlere ve arginin ile lizin gibi pozitif yüklü amino asitlere vurgu yapılmıştır.