



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKEŞ BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

OLGUN BEYAZ PEYNİR LEZZETİNE SAHİP ENZİM
MODİFİYE PEYNİR ÜRETİM SÜRECİNDE BİYOAKTİVİTE
ÖZELLİKLERİNİN DEĞİŞİMİ

AYSUN ALTINYÜZÜK AKILLI
YÜKSEK LİSANS



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

OLGUN BEYAZ PEYNİR LEZZETİNE SAHİP ENZİM
MODİFİYE PEYNİR ÜRETİM SÜRECİNDE BİYOAKTİVİTE
ÖZELLİKLERİNİN DEĞİŞİMİ

AYSUN ALTINYÜZÜK AKILLI
YÜKSEK LİSANS

DANIŞMAN
DOÇ. DR. ZAFER ERBAY

ADANA 2022

OLGUN BEYAZ PEYNİR LEZZETİNE SAHİP ENZİM MODİFİYE PEYNİR ÜRETİM SÜRECİNDE BİYOAKTİVİTE ÖZELLİKLERİNİN DEĞİŞİMİ

Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Lisansüstü Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Aysun ALTINYÜZÜK AKILLI tarafından tamamlanan Yüksek Lisans Tezi onaylanmıştır.

Doç. Dr. Ahmet BEYÇİÖĞLU
Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Haşim KELEBEK
Anabilim Dalı Başkanı

Doç. Dr. Zafer ERBAY
Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Levent Yurdaer
AYDEMİR
İkinci Danışman

Tez Jürisi

Doç. Dr. Zafer ERBAY
Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Özgür Cem ERKİN
Adana Alparslan Türkeş Bilim ve
Teknoloji Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Mithat KURBAN
Hakkari Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi 17 / 08 / 2022

Bu tezde yer alan tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik davranışa uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, bu kuralların ve davranışların gerektirdiği şekilde bu çalışmaya özgün olmayan tüm bilgiler için atıf verdiğimi ve kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

[İmza]

Aysun ALTINYÜZÜK AKILLI



ÖZET

OLGUN BEYAZ PEYNİR LEZZETİNE SAHİP ENZİM MODİFİYE PEYNİR ÜRETİM SÜRECİNDE BİYOAKTİVİTE ÖZELLİKLERİNİN DEĞİŞİMİ

Aysun ALTINYÜZÜK AKILLI

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Zafer ERBAY

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Levent Yurdaer AYDEMİR

Ağustos 2022, 68 sayfa

Peynir, gıda tedarik zincirinin en büyük ve önemli parçasını oluşturan süt sektörünün, hem ürün çeşitliliği, hem kullanım yaygınlığı, hem de lezzet yoğunluğu açısından en dikkat çekici ürünüdür. Dünyada tüketilen sütün yaklaşık %40'ının peynir üretiminde kullanıldığı düşünülmektedir. Günümüz itibariyle ise, üretilen peynirlerin çok önemli bir bölümü, başka gıdaların üretiminde formülasyona katılan bir katkı/bileşen olarak tüketilmektedir. Gıda katkısı/bileşeni olarak peynirlerin kullanımının temel nedeni lezzetleridir. Peynirlerin özgün lezzeti üretim sonrasındaki olgunlaşma sürecinde oluşmaktadır. Bu süreç oldukça maliyetli ve standardize edilmesi güç bir süreçtir. Olgunlaşma sürecinin kontrollü koşullarda, enzimatik reaksiyonlarla taklit edilmesi ile peynir lezzetinin geliştirilmesi ve yoğunlaştırılması, çok daha kısa sürelerde mümkün olabilmektedir. Bu yöntemle elde edilen ürüne enzim modifiye peynir (EMP) denilmektedir. EMP üretiminde gerçekleşen yüksek proteoliz ve lipoliz işlemleri sonucu biyoaktif peptitler başta olmak üzere, çeşitli biyoaktif bileşenlerin oluşabileceği düşünülmektedir. Literatürde yapılmış az sayıda çalışmada bu yönde bulgular vardır. Bu çalışmada, olgun beyaz peynir lezzetine sahip EMP üretim sürecindeki işlem basamakları boyunca (hammadde, eritme işlemi sonrası, proteoliz sonrası, lipoliz sonrası) alınan örneklerin suda çözünür ekstraktlarında antihiperansif (ACE inhibisyon), antidiyabetik (α -amilaz ve α -glukozidaz inhibisyon), antioksidan (ABTS katyon radikali ve metal iyonu bağlama), antimikrobiyal (*E. coli* K12, *S. aureus* ATCC 25923) aktivite düzeyi ve değişimi analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda EMP'nin sağlık açısından potansiyel niteliklerinin

olduğu görülmüştür. EMP üretim aşamalarının tamamında hem serbest radikal süpürme kapasitesinde (12,6-215,0 μmol troloks/g kuru madde), hem de antihipertansif aktivitede (1,18-2,80 μmol captopril/kg kuru madde) önemli artışlar saptanmıştır ve bu artışlar *in vitro* sindirim sonrasında da devam etmiştir (171,2-471,1 μmol troloks/g kuru madde ve 8,51-20,69 μmol captopril/kg kuru madde). Demir bağlama kapasitesi açısından ise en yüksek değerler proteoliz sonrası *in vitro* sindirim öncesindeki örneklerde saptanmıştır (0,95-27,6 mg EDTA/g kuru madde) ve *in vitro* sindirim ile beraber saptanan değerler düşmüştür. Antidiyabetik aktivite açısından ise *in vitro* sindirim öncesinde α -amilaz, sonrasında ise α -glukosidaz inhibisyon aktivitesi tüm örneklerde saptanmıştır. *In vitro* sindirim öncesi α -glukosidaz, sonrasında ise α -amilaz inhibisyon aktivitesi örneklerde ölçülememiştir. Örneklerde sadece *in vitro* sindirim sonrası *S. aureus* üzerinde etkili bir inhibisyon aktivitesi saptanmıştır.

Bu çalışma sonuçları ile EMP'nin sağlık üzerinde olumlu etkiler gösterme potansiyeline sahip olduğu ortaya konulmuştur. EMP'nin üretimi sürecinde ortaya çıkan peptitlerin tanımlanması, biyoaktif özelliklerinin bileşen bazında ortaya konulması ve lezzet katkısı olarak kullanıldığı ürünlerde bu potansiyel etkinin değişiminin gözlemlenmesi gelecekteki çalışmalar olarak önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Enzim modifiye peynir, biyoaktif peptitler, biyoaktivite, antihipertansif, antidiyabetik, antioksidan, antimikrobiyal, *in vitro* sindirim.

ABSTRACT

VARIATION OF BIOACTIVITY PROPERTIES DURING THE PRODUCTION OF ENZYME-MODIFIED CHEESE WITH RIPENED WHITE CHEESE FLAVOR

Aysun ALTINYÜZÜK AKILLI

MSc, Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Zafer ERBAY

Co-Supervisor: Assist. Prof. Dr. Levent Yurdaer AYDEMİR

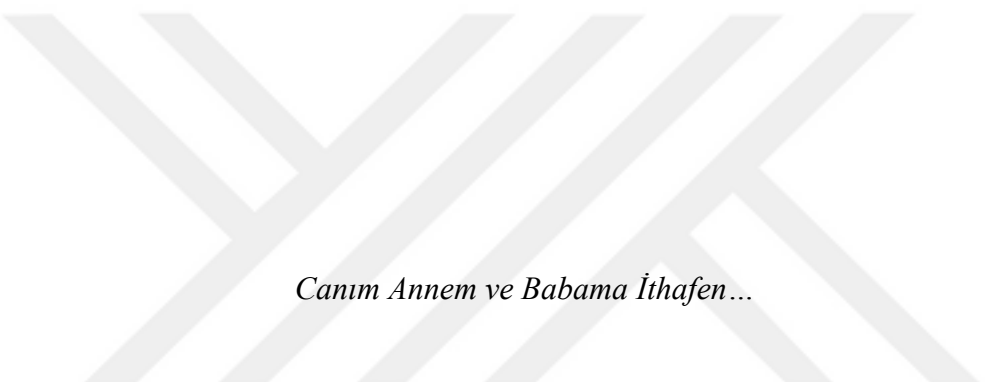
August 2022, 68 pages

Cheese is the most striking product of the dairy industry, which constitutes the largest and most important part of the food supply chain, in terms of product variety, prevalence of use and intensity of flavor. It is known that approximately 40% of the milk consumed in the world is used in cheese production. Recently, a very important part of the cheese produced is consumed as an additive/ingredient to the formulation in the production of other foods. The main reason for the use of cheeses as food additives/ingredient is their flavor. The unique flavor of the cheeses is formed during ripening. It is quite costly and difficult to standardize. By mimicing the ripening process with enzymatic reactions under controlled conditions, it is possible to develop and intensify cheese flavor in a shorter time. The product obtained by this method is called enzyme modified cheese (EMC). It is thought that various bioactive components, especially bioactive peptides, may be formed as a result of high proteolysis and lipolysis during EMC production. There are few studies in the focused on this topic. In this study, the water-soluble extracts of the samples obtained from the processing stages (raw material, processed cheese, after proteolysis, after lipolysis) in the EMC production including ripened white cheese flavor were analyzed for antihypertensive (ACE inhibition), antidiabetic (α -amylase and α -glucosidase inhibition), antioxidant (ABTS cation radical and metal ion binding), antimicrobial (*E. coli* K12, *S. aureus* ATCC 25923) activity levels and changes. Results showed that EMC has potential health. Significant increases were found in both free radical scavenging capacity (12.6-215.0 μ mol trolox/g dry matter) and antihypertensive activity (1.18-2.80 μ mol captopril/kg dry matter) in all production stages and-the increase

continued after *in vitro* digestion (171.2-471.1 μmol trolox/g dry matter and 8.51-20.69 μmol captopril/kg dry matter). In terms of iron binding capacity, the highest values were determined in the samples after proteolysis without *in vitro* digestion (0.95-27.6 mg EDTA/g dry matter) and the values determined with *in vitro* digestion decreased. In terms of antidiabetic activity, α -amylase inhibition activity without *in vitro* digestion and α -glucosidase inhibition activity with *in vitro* digestion was detected in all samples. The inhibition activity of α -glucosidase without *in vitro* digestion and α -amylase with digestion could not be measured in the samples. An effective inhibitory activity on *S. aureus* was detected only in the samples without *in vitro* digestion.

According to the results of this study, it has been revealed that EMC has the potential to have positive effects on health. It is suggested as future studies to identify the peptides that emerge during the production process of EMC, to reveal their bioactive properties on the basis of components, and to observe the change of this potential effect in products where it is used as a flavor additive.

Keywords: Enzyme-modified cheese, bioactive peptides, bioactivity, antihypertensive, antidiabetic, antioxidant, antimicrobial, *in vitro* digestion.



Canım Annem ve Babama İthafen...

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı hazırlarken engin bilgi ve deneyimleriyle her zaman yanımda olan sayın danışman hocam Doç. Dr. Zafer ERBAY'a ve biyoaktivite analizleri sürecinde yanımda olup beni yönlendiren Dr.Öğr.Üyesi Levent Yurdaer AYDEMİR ve Dr.Öğr.Üyesi Özgür Cem ERKİN hocalarıma çok teşekkür ederim.

Ayrıca tüm eğitim ve öğretim hayatım boyunca yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen canım aileme ve her an olduğu gibi yüksek lisans eğitimimde de beni yalnız bırakmayıp destekleyen sevgili biricik eşim Burak AKILLI'ya sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması 120O088 proje numarası ile TUBİTAK tarafından desteklenmiştir.

Aysun ALTINYÜZÜK AKILLI

Ağustos, 2022

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
TABLolar LİSTESİ	xiii
KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	15
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	17
2.1. Peynir.....	17
2.2 Peynir tozu.....	18
2.3. Enzim Modifiye Peynir	19
2.4. Enzim Modifiye Peynirde Sağlık	22
3. MALZEME VE YÖNTEM	27
3.1. Malzeme	27
3.2. Yöntem	28
3.2.1. EMP Üretimi	28
3.2.2 Analiz yöntemleri	29
3.2.2.1. Bileşim analizleri.....	29
3.2.2.2. Çözünür azot fraksiyonlarının olgunlaşma indeksi analizleri belirlenmesi ve olgunlaşma indeksi analizleri	30
3.2.2.2.1. SÇA tayini	30
3.2.2.2.2. TCA-ÇA tayini	30
3.2.2.2.3. PTA-ÇA tayini.....	30
3.2.2.2.4. Proteolitik olgunlaşma indeksi hesaplamaları	31
3.2.2.3. Toplam peptit miktarının belirlenmesi	31
3.2.2.4. Serbest yağ asidi (SYA) bileşiminin ve miktarının belirlenmesi	32
3.2.2.5. Biyoaktivite analizleri	33
3.2.2.5.1. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi.....	34
3.2.2.5.2. Antihipertansif aktivitenin belirlenmesi	35
3.2.2.5.3. Antidiyabetik aktivitenin belirlenmesi	35
3.2.2.5.4. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi.....	36
3.2.2.6. <i>In vitro</i> sindirim çalışmaları	37

3.2.2.7. İstatiksel değerlendirme	38
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	39
4.1. EMP Üretiminde Temel Bileşim ve Olgunlaşma Parametrelerinin Değişimi.....	39
4.2. EMP Üretiminde Antioksidan Aktivitenin Değişimi	42
4.3. EMP Üretiminde Antihipertansif Aktivitenin Değişimi.....	45
4.4. EMP Üretiminde Antidiyabetik Aktivitenin Değişimi.....	47
4.5. EMP Üretiminde Antimikrobiyal Aktivitenin Değişimi	48
5. SONUÇLAR.....	55
KAYNAKLAR.....	58
ÖZGEÇMİŞ.....	68



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Peynir lezzetinin oluşumu (Mcsweeney ve Sousa, 2000).....	18
Şekil 3.1: Tez çalışmasında kullanılan EMP üretim ve analiz akış şeması.....	29
Şekil 4.1: EMP üretimindeki farklı aşamalardan alınan örneklerin suda çözünür ekstraktlarının Gram (-) <i>Escherichia coli</i> bakterileri üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin kuyucuk yayılım yöntemi ile belirlenmesi.....	50
Şekil 4.2: EMP üretimindeki farklı aşamalardan alınan örneklerin suda çözünür ekstraktlarının Gram (+) <i>Staphylococcus aureus</i> bakterileri üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin kuyucuk yayılım yöntemi ile belirlenmesi.....	51
Şekil 4.3: <i>In vitro</i> sindirim süreci öncesi örneklerin <i>Staphylococcus aureus</i> bakterilerinde en düşük büyüme engelleme konsantrasyonlarının (MIC değeri) resazurin boyaması ile belirlenmesi.....	53
Şekil 4.4: <i>In vitro</i> sindirim süreci sonrası örneklerin <i>Staphylococcus aureus</i> bakterilerinde en düşük büyüme engelleme konsantrasyonlarının (MIC değeri) resazurin boyaması ile belirlenmesi.....	54

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4.1: Enzim modifiye peynir (EMP) üretiminde işlem basamaklarının temel bileşim ve proteolitik olgunlaşma parametreleri üzerine etkisi.....	40
Tablo 4.2: Enzim modifiye peynir (EMP) üretiminde işlem basamaklarının toplam peptit miktarının değişimi üzerine etkileri.....	41
Tablo 4.3: Enzim modifiye peynir (EMP) üretiminde işlem basamaklarının serbest yağ asidi bileşim ve miktarları üzerine etkisi (mg/100 g yağ).	43
Tablo 4.4: Enzim modifiye peynir (EMP) üretiminde işlem basamaklarının antioksidan aktivite üzerine etkileri.	44
Tablo 4.5: Enzim modifiye peynir (EMP) üretiminde işlem basamaklarının antihipertansif aktivite (ACE-inhibisyon aktivitesi) üzerine etkileri.....	46
Tablo 4.6: Enzim modifiye peynir (EMP) üretiminde işlem basamaklarının antidiyabetik aktivite üzerine etkileri.	48

KISALTMALAR

ABTS:	2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
ACE:	Anjiyotensin-dönüştürücü enzim
DNS:	3,5-Dinitrosalisilik asit
DPPH:	1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil serbest radikali
EMP:	Enzim modifiye peynir
EP:	Eritme peyniri
FID:	Alev iyonizasyon dedektörlü
GC:	Gaz kromatografisi
GC-FID:	Alev iyonizasyon dedektörlü gaz kromatografi
IC ₅₀ :	Yarı maksimum (%50) inhibisyon konsantrasyonu
MIC:	En düşük büyüme engelleyici konsantrasyon
OPA:	<i>o</i> -fitaldialdehit
OUI:	Olgunlaşma uzama indeksi (SÇA, %azot cinsinden)
OYİ:	Olgunlaşma yoğunluk indeksi (TCA, %azot cinsinden)
PPK:	Proteolize peynir konsantresi
PTA:	Fosfotungustik asit
PTA-ÇA:	%5'lik fosfotungustik asitte çözünür azot
SAAİ:	Serbest amino asit indeksi (PTA, %azot cinsinden)
SÇA:	Suda çözünür azot
SYA:	Serbest yağ asitleri
TA:	Toplam azot
TCA:	Trikloroasetik asit
TCA-ÇA:	%12'lik trikloroasetik asitte çözünür azot

1. GİRİŞ

Beslenme ve gıda üretimi, artık sadece yaşamı sürdürmek için gerekli olan temel beslenme ihtiyacının karşılanması amacıyla değil; sağlık açısından çeşitli olumlu değişimler sağlamak amacıyla da gerçekleştirilmektedir. Bu durumda günümüz gıda sektörü üzerinde önemli etkilere neden olmaktadır. Gıda sektöründe değişim etkileyen bazı temel faktörler; Sağlık ve beslenme alanlarındaki bilimsel ve teknolojik ilerleme, dünya nüfusunun yaşlanması, sağlık hizmetlerinin maliyetindeki artış, sağlıklı ve güvenli gıdaya ulaşmanın bir hak olarak tanımlanması ve bu doğrultudaki tüketici talepleri, gıda endüstrisinde gerçekleşen teknolojik gelişim, çevre konusundaki bilinçlenme ile değişen düzenlemeler ve gelişen çevreci yaklaşımlardır (Korhonen, 2002; Siro vd., 2008; Ozen vd., 2012).

Bu doğrultuda, başta Japonya, AB ve ABD olmak üzere dünyanın çeşitli ülkelerinde “fonksiyonel gıdalar” ile “yeni/yenilikçi gıdalar” kavramları ortaya çıkmıştır. Fonksiyonel gıdalar, “vücudumuzda hedef fonksiyonlara olumlu şekilde etki eden, yeterli besleyici etkilerin dışında, bireyin ruhsal, fiziksel ve genel sağlık durumunda olumlu etki yaratan gıdalar” olarak tarif edilmektedir (Diplock vd., 1999). Bu yaklaşımların sonucu, çeşitli teknolojik çalışmalarla gıdaların vucudumuza etkileri üzerinde yapılan çalışmalar artmış ve hali hazırda tüketilen gıdaların etkileri incelenmeye başlamıştır.

Bu gıdaların tanımlanması veya üretilmesinde, gıda içeriğinde bulunan biyolojik olarak aktif bileşenler belirleyicidir. Çok çeşitli gıda bileşenlerinin (fitokimyasallar, biyoaktif yağlar, yağ sterolleri, probiyotikler, prebiyotikler, mineraller, vitaminler ve biyoaktif peptitler) potansiyel sağlık iyileştirici etkileri saptanmış olup, bu bileşenlerle ilgili çalışmalar devam etmektedir (Korhonen, 2002). Biyoaktif gıda bileşenlerinde biyoaktif peptitler önemli bir gruba oluştururlar. Biyoaktif peptitler, bulundukları protein yapısı içerisinde inaktif haldeyken, proteinlerin sindirimi sürecinde proteolitik enzimler ve koşullarla parçalanması sonucu ortaya çıkmakta ve hormon benzeri özellikleriyle çok çeşitli fizyolojik etkiler gösterebilmektedirler. Genellikle, 2-20 aminoasit kalıntısı içeren, düşük molekül ağırlığına sahip bu moleküller, yapısal özelliklerine, aminoasit bileşimine, dizilimine ve yüküne bağlı olarak çeşitli biyolojik özellikler göstermektedirler (Kınık ve Gürsoy, 2002; Korhonen ve Pihlanto, 2003; Gür vd., 2010; Semen ve Altıntaş, 2015; Marciniak vd., 2018; Ay ve Şanlı, 2018).

Biyoaktif peptitler açısından en önemli kaynak süt ve yumurtadır, ancak ette ve bitkilerde biyoaktivite gösterebilen proteinler mevcuttur (Korhonen ve Pihlanto, 2003). Süt proteinlerinden üretilen biyoaktif peptitlerin ağız yolu ile alınmasının kalp-damar, sindirim, endokrin, bağışıklık, sinir sistemi gibi vucut sistemleri üzerinde etkili olduğu görülmüştür (Clare ve Swaisgood, 2000; Korhonen, 2009; Ünal vd., 2018). Süt ürünleri içerisinde ise, peynir başta olmak üzere, fermente sütlerde biyoaktif peptitler bulunmaktadır (Korhonen, 2009). Süt ve ürünleri içerisinde uğradığı yüksek proteoliz nedeniyle dikkat çeken ürünlerden birisi de enzim modifiye peynirdir (EMP). Peynir lezzetinin geliştirilmesi ve yoğunlaştırılması veya bir başka ifadeyle olgunlaşma süresinin kısaltılması için peynirin enzim ile işlenmesi sonucu elde edilen ürüne enzim modifiye peynir (EMP) denir (Erbay vd.,2021). EMP üretiminde proteoliz kritik bir işlemdir ve bu işlemle beraber EMP içerisinde biyoaktif nitelikleri gelişkin peptitlerin oluşumu mümkündür. Bu konuda literatürde çok az sayıda çalışma olmakla beraber, EMP’lerin antihipertansif, antialerjen ve antimikrobiyal etkilerinin saptandığı birkaç makale yayınlanmıştır (Haileselassie vd., 1999; Glass ve Johnson, 2004a, 2004b, 2004c; Tanabe vd., 2006; Suzuki vd., 2007; Tonouchi vd., 2008; Isobe vd., 2008; Yamasaki ve Mitsuyama, 2014).

2018 yılında Erbay ve ark yapmış olduğu proje çalışmasında, ülkemize özgü bir ürün olan olgun beyaz peynir lezzetine sahip EMP üretiminde uygun üretim ve işlem koşulları belirlenmiştir. Tez çalışmamızda, olgun beyaz peynir lezzetine sahip EMP “iki aşamalı üretim tekniği” ile üretilmiş, son üründe ve üretim aşamalarında biyoaktif özelliklerinin (antioksidan, antihipertansif, antidiyabetik ve antimikrobiyal) değişimleri *in vitro* sindirim süreci öncesi ve sonrasında değerlendirilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Süt ve süt ürünleri günümüzde gıda tedarik zincirinin en büyük ve en önemli parçasını oluşturmaktadır (Fox vd.,2011). Bu sektörün ürün yelpazesinde yoğurt, krema, tereyağı, peynir, içme sütü başta olmak üzere fermente sütler, dondurma, koyulaştırılmış süt ve toz ürünleri bulunmaktadır (Britz ve Robinson, 2008). 2017 yılında dünyadaki süt üretiminin %80’den fazlasını oluşturan inek sütünün üretimi bir önceki yıla göre %2.2 oranında artmıştır. 2010-2017 yılları arasında hemen hemen tüm süt ürünlerinin üretimlerinde dünya çapında artış gözlemlenmekle birlikte, bu yükselişteki en belirgin pay süt tozları ve peynirde görülmüştür (USK, 2018; IDF, 2018). Süt ürünleri içerisinde, ürün çeşitliliği dolayısıyla en dikkat çekici ürün tipi peynirdir.

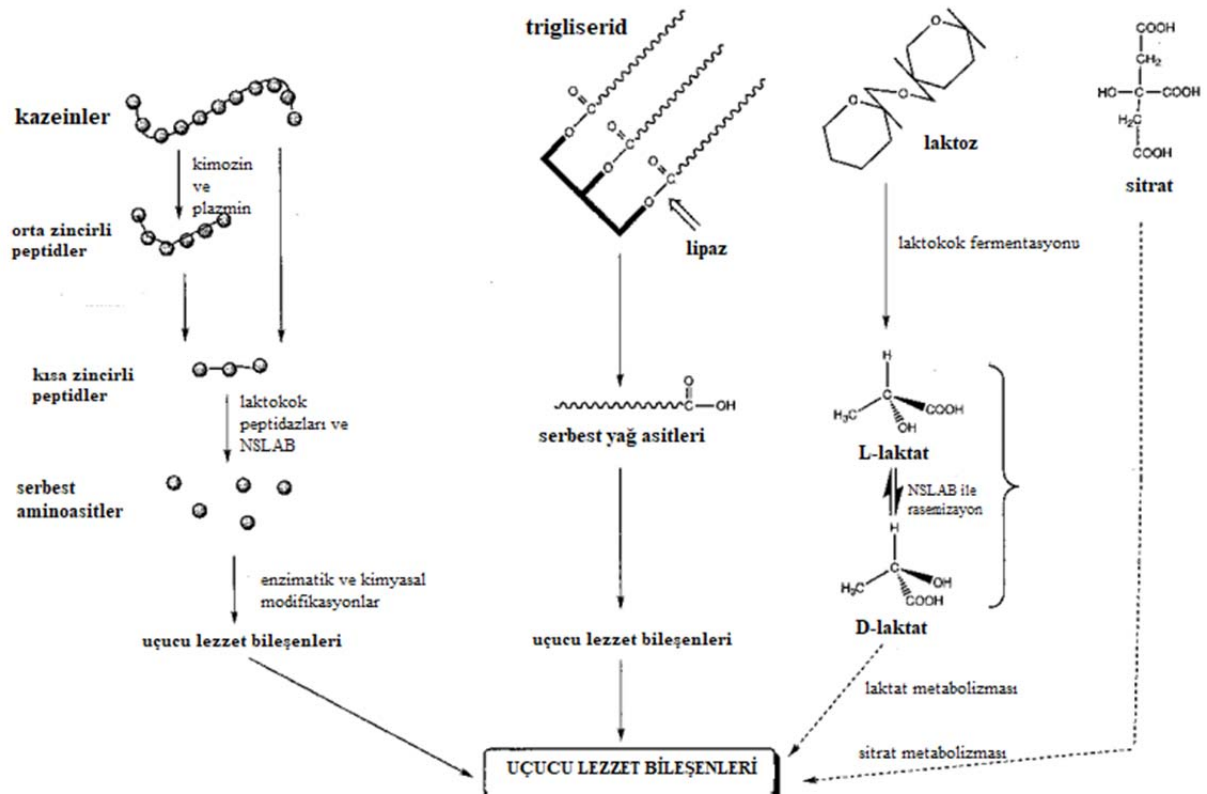
2.1. Peynir

Yaklaşık 5000 yıllık bir geçmişi olduğu bilinen peynirin, günümüzde 1000’den fazla çeşidi vardır (Fox, 2011).

Peynirin, süt ile kıyasla lezzet yoğunluğu çok yüksek bir üründür. Bu lezzetin yoğunluğu, pek çok lezzet bileşeninin kompleks bir karışımı sonucu oluşur ve esasen peynirin olgunlaşma sürecinde ortaya çıkar. Her peynirin kendine özgü tatları ve farklılıkları vardır. Bu amaçla, çeşitli gıdaların üretimde katkı/bileşen olarak kullanılmaktadır.

Gıdalara peynir lezzetini aktarabilmek veya gıda içinde var olan peynir lezzetini artırabilmek için lezzet verici/artırıcı olarak peynirlerin direkt ilavesi ilk akla gelen yöntem olmuştur ve pizza gibi çeşitli ürünlerde hem lezzet, hem doku açısından oldukça olumlu sonuçları olmuştur. Fakat istenilen lezzet etkisine ulaşabilmek için üretimde olgun peynirlerin kullanımı zorunludur. Bunun sonucunda gıda bileşeni olarak olgun peynirlerin doğrudan kullanımlarında çeşitli sorunlar ortaya çıkabilir. Bu sorunlar yetersiz peynir lezzeti, standart olmayan lezzet profili, son üründe aşırı laktoz veya yağ düzeyleri, ürünlere yüksek miktarlarda ilave edilmesi durumunda düşük çözünürlüğe sahip bileşenler barındırmasından dolayı istenmeyen doku özellikleri, ürünlere doğrudan işlenmesinde uygulanabilirlik sorunları ve olgunlaşma sürecinin uzunluğundan kaynaklı yüksek maliyetler olarak sıralanabilir. Bu tip sorunlardan dolayı, gıdalarda peynir lezzetini sağlayabilmek ve arttırabilmek amaçlı çeşitli yöntemler geliştirilmiş ve bu yöntemler günümüzde sektöre hakim olmuştur (Moskowitz ve Noelck, 1987; Kilcawley vd., 1998; Erbay vd., 2016).

Peynir lezzeti sağlayan katkı maddeleri üretim tekniğine bağlı olarak; doğal ve sentetik olabilmektedir. Sentetik lezzet bileşiminin maliyeti ve istenilen kalitede üretimi mümkünken, peynir lezzetinin karmaşık ve dinamik yapısı nedeniyle sentetik peynir lezzetinin üretiminde zorlanılmaktadır. Son yıllarda doğal ürünlere yönelik artan eğilim ve yapılan etiketleme ile ilgili zorunluluklar da sentetik lezzet bileşenlerinden uzak durmasına yol açmıştır. Bundan dolayı, peynir lezzet katkısı olarak doğal peynir lezzetleri öne çıkmıştır. Doğal peynir lezzet katkıları/bileşenleri; enzim modifiye peynir (EMP) ve peynir tozlarıdır (Erbay vd., 2018; Erbay vd., 2021).



Şekil 2.1: Peynir lezzetinin oluşumu (McSweeney ve Sousa, 2000).

2.2 Peynir tozu

Peynir lezzetini bir gıda bileşeni veya katkı maddesi haline getirmenin veya bu amaçla üretmenin en basit yolu, peynirin emülsifiye edici tuzlarla işlenmesi sonucu (ısı ve mekanik etki ile) elde edilen homojen peynir bulamacının püskürtmeli kurutma ile toza dönüştürülmesidir. Bu yöntemle, peynir lezzeti toz forma dönüştürülebilmekte ve endüstriyel

olarak peynirlerin doğrudan kullanımında karşılaşılan pratik sorunların önemli bir kısmı çözülebilmektedir. Aynı zamanda, üretim tekniğinin kolaylığı, uzun raf ömrü ve düşük nem içeriği nedeniyle artan lezzet yoğunluğu (2-5 kat fazla) peynir tozunun kullanım alanını ve peynir tozu ile ilgili yapılmış bilimsel çalışmaları son yıllarda artırmıştır (Varming vd., 2011; Erbay vd., 2015; Koca vd., 2015; Erbay ve Koca, 2015, 2019; da Silva vd., 2017; da Silva vd., 2018a, 2018b; Sahin vd., 2018). Buna karşın, peynir lezzeti sağlamak veya artırmak amacıyla kullanılacak bir gıda bileşeni olarak kaliteli bir peynir tozu üretebilmek için birinci şart; hammadde olarak lezzet yoğunluğu yüksek bir olgun peynirin kullanılmasıdır. Dolayısıyla, olgun peynirlerin gıda bileşeni olarak kullanımından kaynaklanan sorunlar, peynir tozu için de geçerli olmaktadır (olgunlaşma sürecinden kaynaklı yüksek maliyetler, standart ürün eldesinde sorunlar vb). Ek olarak, püskürtmeli kurutma işlemi sırasında gerçekleşen lezzet kayıpları gibi kimi teknik sorunlarla da peynir tozu üretiminde karşılaşılmaktadır.

2.3. Enzim Modifiye Peynir

Bu doğal lezzet katkıları içerisinde enzim modifiye peynir (EMP) son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. EMP, peynir lezzetinin geliştirilmesi/yoğunlaştırılması veya başka ifadeyle olgunlaşma süresinin kısaltılması için taze peynirin proteolitik ve lipolitik enzimlerle işlenmesi sonucu üretilen üründür (Erbay vd. 2016). EMP’de, hammadde olarak taze peynir veya pıhtı kullanılmakta ve olgunlaşma süreci kontrollü koşullarda taklit edilmektedir. Bu yöntemle olgun peynir kullanımına olan bağımlılığı ortadan kaldırmakla beraber, olgun peynir kullanımından kaynaklanan sorunlar da aşılabilmektedir. Bu şekilde olgun peynirde bulunan lezzetin 15-30 kat daha yoğun halini, 1-7 gün süren bir işlem ile elde edilebilmektedir (Kilcawley vd., 1998; West, 2007). EMP içeriğinde serbest aminoasit, peptit, serbest yağ asidi gibi katabolik ürünler bulunurken, kalıntı enzim aktivitesi bulunmamaktadır (Hannon vd. 2006). EMP üretiminde emülgatör veya stabilizör olarak mono/digliseritler, fosfatlar, sitrik asit ve/veya ksantan gum kullanılabilmekte; formülasyona antioksidan olarak tokoferol gibi yağda çözünen vitaminler ilave edilebilmektedir (Law, 2010). Lezzete olan etkisi dolayısıyla, üretim aşamasında bileşime krema ve ekstra tereyağ eklenebilmektedir. Lezzeti geliştirmek amacıyla üretim aşamasında maya ekstraktı, tuz, organik asitler, monosodyum glutamat veya starter kültür ekstraktları da kullanılabilmektedir (Kilcawley vd.1998; Wilkinson vd.,2011).

Literatürde EMP ile ilgili yapılan çalışma sayısı çok azdır. Piyasadaki ticari EMP’lerin araştırıldığı çalışmalarda, aynı firmalara farklı zamanlarda üretilen ürünlerde belli bir standart

kalitenin elde edilebildiği; fakat farklı firmalar arasında üretimi yapılan ve aynı peynir lezzetini taşıdığı belirtilen EMP'lerin hem birbirinden farklı hem de temsil ettiği olgun peynirlerden çok fazla farklılık gösterdiği belirenmiştir (Kilcawley vd. 2000; Hulin-Bertaud vd.,2000). EMP'lerinde lezzetini etkileyen belli başlı faktörler vardır. Bunlar arasında; hammadde olarak kullanılacak olan taze peynirin özellikleri, üretim tekniği, işlem koşulları veya lezzet üzerinde etkili olduğu düşünülen bazı anahtar bileşiklerin üretilmesi aşamasında bazı özel işlemlerin uygulanması ve bu bileşiklerin dışardan ilave edilmesini söyleyebilmekteyiz (Kilcawley vd., 1998; Erbay vd., 2021).

Cheddar EMP'leri incelendiğinde, çok farklı oranlarda laktik asit ve asetat belirlenmiştir. Bunun nedeni olarak ise bazı örnekler için hammadde olarak kullanılan Cheddar peynirlerinin arasındaki farklılıktan kaynaklanabileceği gibi kimi örneklerde ise bu bileşiklerin dışardan ilave edilmesinden dolayı olabileceği belirtilmiştir (Kilcawley vd., 2001). Bazı ticari Cheddar EMP'lerinde propiyonat saptanmıştır bunun sebebi olarak hammaddeye ilave edilen İsviçre tipi peynirlerin olabileceği iddia edilmiştir (Kilcawley vd., 2001).

Başka bir çalışmada ise Parmesan lezzetine sahip olan EMP'lerde çok yüksek miktarda asetik asite rastlanmış bunun nedeni olarak Parmesan peynirinin karakteristik lezzetinde etkili olan bileşiğin üretim sürecince dışardan ilave edildiği fikrine varılmıştır (Erbay vd., 2018; Salum vd., 2019).

Ülkemizde üretilen ve mavi damarlı peynir lezzetine sahip bir ticari EMP'nin bileşim ve uçucu bileşik analizleri sonuçlarından hareketle; üretimde hammadde olarak taze peynir veya pıhtının değil, kremanın kullanıldığı ve üretimlerinde hedeflenen lezzetin elde edilmesinde küflerden yararlanıldığı gösterilmiştir (Salum vd., 2019). Yine ülkemizde üretilen keçi peyniri lezzetine sahip EMP'nin üretiminde, özgün lezzetin oluşumu için yüksek şiddette ısı işlem uygulandığı, üründe saptanan ısı işlem kaynaklı uçucu bileşiklerle anlaşılmıştır (Erbay vd., 2018; Salum vd., 2019).

EMP üretimi temelde 3 farklı yöntemle gerçekleştirilebilmektedir;

1. Tek hammadde de, tek aşamada proteoliz ve lipoliz
2. Farklı hammaddeler de ayrı ayrı proteoliz ve lipoliz
3. Tek hammaddede iki aşamada, sırasıyla proteoliz ve lipoliz

(Moskowitz ve Noelck, 1987; Kilcawley vd., 1998; Wilkinson vd., 2011; Erbay vd., 2021).

Bu yöntemler içerisinde uygulaması çalışılmış tek yöntem iki aşamalı üretim tekniğidir. Bu yöntemde, taze peynir kontrollü koşullarda, önce proteolize uğratılmakta, proteoliz sonucu enzimatik aktivite ısıl işlemle durdurulmakta, sonrasında ise ürün lipolitik enzimlerle işlenmekte ve en sonunda tekrar bir ısıl işlemle enzimatik aktiviteler sonlandırılmaktadır (Kilcawley vd., 2006; West, 2007). Bu yöntemle tek hammadde ile çok farklı peynir lezzetlerine ulaşabiliriz. Aynı zamanda aşamalı olarak gerçekleştirdiğimiz işlemlerle, enzimatik reaksiyonun kontrolü ve hedeflediğimiz ürünün üretim koşullarının öngörülmesine olanak sağlamaktadır. Aşamaların ayrı ayrı optimizasyonu ve sürekli üretim sisteminin tasarımı da yapılabilir. Bu yöntemin literatürdeki ilk kullanımı Kilcawley vd. tarafından gerçekleştirilmiş ve bir makale dizisi olarak 2000-2006 yılları arasında yayınlanmıştır (Kilcawley vd. 2000, 2001, 2006; Hulin-Bertaud vd., 2000). Bu çalışmada Cheddar lezzetine sahip ticari EMP'lerin özellikleri incelenmiştir. Bu EMP'ler arasında duyuşal özellikleri en uygun olanı seçilmiş ve bu EMP'nin özelliklerine en yakın olanı “2 aşamalı üretim tekniği” ile üretilmeye çalışılmıştır. Üretimde kullanılabilecek uygun enzimler ve inkübasyon koşulları belirlenmiştir. Hemen hemen aynı yöntemi kullanarak, soya sütü ve inek sütü karışımından, genel bir peynir lezzetine sahip EMP üretimi Ali vd. (2017a) tarafından gerçekleştirilmiştir. EMP üretiminin ve EMP tozu üretiminde püskürtmeli kurutma işleminin optimizasyonu amaçlı çeşitli çalışmalar da yapılmıştır, ancak belirlenen modellerin istatistiksel uygunluğu tartışmalı olduğundan ve çalışma sonuçlarının doğrulamaları yapılmadığından çok güvenilir sonuçlar elde edilmemiştir (Amighi vd., 2013; Amighi vd., 2016; Ali vd., 2017b). Ticari olarak piyasada bulunmayan, olgun beyaz peynir lezzetine sahip EMP üretimi ve üretim koşullarının optimizasyonu (istatistiksel ve deneysel doğrulamaları ile birlikte) yapılmıştır (Erbay vd., 2018; Salum vd., 2019; Bas vd., 2019; Kendirci vd., 2020).

EMP üretimi enzimatik reaksiyonlarla gerçekleştirilir. EMP üretimde proteaz, peptidaz, lipaz ve esteraz enzimleri kullanılmaktadır ve bunların hemen hemen hepsi hayvansal ya da mikrobiyal kökenlidir (Wilkinson vd., 2011). EMP üretimde kullanılan proteazlar genelde mikrobiyal kökenli ve *Bacillus*, *Aspergillus* ile *Rhizomucor* kaynaklıdır (Azarnia vd., 2010; Wilkinson vd., 2011; Kilara ve Chandan, 2011). Yağların enzimatik modifikasyonu lipaz ve esterazlarla sağlanır. İstenilen peynir lezzeti eldesi için uzun ve kısa serbest yağ asitleri arasındaki belli bir oranda denge olmalı ve bundan dolayı enzim olarak esteraz-lipaz karışımının kullanılması önerilmektedir (Wilkinson vd., 2011; Kilara ve Chandan, 2011). İstenilen peynir lezzeti elde edilmesindeki etken lipoliz ve proteoliz ürünleri belirgin bir etken

olurken, istenilen türlerde ve oranlarda üretilmediklerinde lezzet içerikli sorunlara neden olurlar. EMP'nin üretiminde yaşanan büyük sorun budur (Kilcawley vd., 2001; Wilkinson vd., 2011). EMP'de olgun peynirler üretiminden 4 kat daha çok serbest aminoasit ile peptit oluşumu vardır. Fakat fazla proteoliz, peynirin olgunlaşmasında bilindiği gibi, acı tat veren maddelerinin oluşmasına neden olabilir (Topçu, 2004). Bu acılıktan genellikle, 3-15 aminoasite sahip olan, β -kazein tarafından türetilmiş, hidrofobik olan acı peptitler sebep olmaktadır. Acılığa neden olan peptitlerin hidrolizinde daha ufak aminoasitlere ve peptitlere parçalanmasıyla acı tat azaltılmaktadır. Ayıriyeten ortama glutamik asit ya da olgun peynir eklenmesi acı tadın azaltılmasına yardım etmektedir (Habibi-Najafi ve Lee, 2007; Wilkinson vd., 2011). Literatüre baktığımızda, proteoliz ürünlerinin neden olduğu acılığı EMP üretiminde ortadan kaldırmak üzere yapılan birçok çalışma bulunmaktadır (Park vd., 1995; Habibi-Najafi ve Lee, 2007; Sudhir vd., 2010; Azarnia vd., 2010; Kumar vd., 2013).

Son zamanlarda EMP üretim çalışmalarında starter kültür kullanım denemeleri yapılmaktadır. Buna yönelik çalışmalarda, EMP üretimi için küf kullanımı (*Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae*) (Moosavi-Nasab vd., 2010) ile ısıl şokla zayıflatılmış *Lactobacillus helveticus* DPC 4571 kullanımı (Lee vd., 2007) yapıldığı çalışmalar görülmektedir. EMP üretim çalışmasında literatürde görülen starter kültür kullanılan çalışmalar oldukça azdır (Wilkinson vd., 2011; Erbay vd., 2021).

EMP'nin gıda formülasyonlarında çok farklı ürünlere katıldığı bilinmektedir (Kilcawley vd., 1998; Soccol vd., 2007; Hannon vd., 2006). Literatürde peynir olgunlaşmasını hızlandırmak amacıyla (Hannon vd., 2006), az yağlı Cheddar üretiminde (Farkye ve Arnold, 2008; Amelia vd., 2013), az yağlı eritme peyniri üretiminde (Hassan vd., 2007), eritme peyniri üretiminde (Habibi-Najafi vd., 2010), az ve çok yağlı krema peyniri üretiminde (Miri ve Habibi-Najafi, 2011) ve taklit peynir üretiminde (Noronha vd., 2008a, 2008b) EMP kullanımı ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır.

2.4. Enzim Modifiye Peynirde Sağlık

EMP'nin üretimi sırasında, süt proteinlerinin ve yağının enzimatik hidrolizi sonucunda çeşitli peptitler, serbest amino asitleri ve serbest yağ asitleri (SYA) meydana gelir. Oluşan bu bileşiklerin fonksiyonel ve sağlıklı destekleyici özellikleri görülmüş ve bilimsel çalışmalarda kendine yer bulmuştur. Bu kapsamda en dikkat çeken bileşenler biyoaktif peptitlerdir.

Biyoaktif peptitler, bulundukları protein yapısı içerisinde inaktif haldeyken, proteinlerin proteolitik enzimler ve koşullarla parçalanması sonucu ortaya çıkmakta ve hormon benzeri özellikleriyle çok çeşitli fizyolojik etkiler gösterebilmektedirler. Genellikle, 2-20 aminoasit kalıntısı içeren, düşük molekül ağırlığına sahip bu moleküller, yapısal özelliklerine, aminoasit bileşimine, dizilimine ve yüküne bağlı olarak çeşitli biyolojik özellikler göstermektedirler (Kınık ve Gürsoy, 2002; Korhonen ve Pihlanto, 2003; Gür vd., 2010; Semen ve Altıntaş, 2015; Marciniak vd., 2018; Ay ve Şanlı, 2018). Biyoaktif peptitler açısından en önemli kaynak süt ve yumurtadır, ancak ette ve bitkilerde biyoaktivite gösterebilen proteinler mevcuttur (Korhonen ve Pihlanto, 2003). Süt proteinlerinden üretilen biyoaktif peptitlerin ağız yolu ile alınmasının kalp-damar, sindirim, endokrin, bağışıklık, sinir sistemi gibi vücut sistemleri üzerinde etkili olduğu görülmüştür (Clare ve Swaisgood, 2000; Korhonen, 2009; Ünal vd., 2018). Süt ürünleri içerisinde ise, peynir başta olmak üzere, fermente sütlerde biyoaktif peptitler bulunmaktadır (Korhonen, 2009). Süt ürünlerindeki biyoaktif peptit içeriğinin gerçekleşen proteoliz düzeyi ile ilişkili olduğu belirtilmekte ve süt ürünleri içerisinde en yüksek miktarda biyoaktif peptide olgun peynirlerde rastlanmaktadır. Peynirdeki olgunlaşma ile genellikle biyoaktivite artmış, ancak belirli bir düzeydeki olgunlaşma sonrasında bu aktivitede azalmalar saptanmıştır (Korhonen ve Pihlanto, 2003; Korhonen, 2009; Otag ve Hayta, 2013). Bu azalmanın nedeni olarak oluşan biyoaktif peptitlerin, olgunlaşma süresince devam eden proteolizle parçalanmaları ve aktivitelerini kaybetmeleri. Buradan yapacağımız çıkarımla, bir gıda ürününde biyoaktif peptitlerin varlığı potansiye bir önem taşımakla beraber, esas önemli olan, gıdadaki biyoaktif peptitlerin vücuttaki hedef organlara ulaşabilmesidir. Bu anlamda, gıdanın sindirim sistemindeki süreci de önemlidir. İnsan, sindirim sistemindeki proteoliz sonucu, tüketilen gıdanın biyoaktif peptit içeriği artabileceği gibi içerik azalabilir de. Dolayısıyla, biyoaktifçe zengin gıdaların aktivitelerinin değerlendirmesi yapılırken, sindirim sisteminde geçirdiği sürecinde göz ardı edilmemesi gerekir.

EMP üretimi sırasında çok yüksek düzeyde proteoliz gerçekleşmekte ve bunun sonucu olarakta insan vücudunda çeşitli fizyolojik işlevler gösteren biyoaktif peptitler oluşmaktadır. Haileselassie vd. (1999) yaptıkları çalışmada, EMP üretiminde bir endopeptidaz olan Neutrase enziminin kullanılması ile opioid özellikteki peptitlerden olan β -kazomorfinlerin oluştuğunu belirlemişlerdir. Ancak, bu peptitlerin proteolize, özellikle de ekzopeptidaz aktivitesine karşı dirençli olmadıkları görülmüş ve bir ekzopeptidaz olan Debitrase veya

Lactobacillus casei'den elde edilen bir peptidaz karışımının kullanımı ile parçalandığını saptamışlardır (Haileselassie vd., 1999). Bu parçalanma sonucunda ise yüksek antihipertansif aktiviteye sahip peptitlerin oluştuğu belirlenmiştir (Haileselassie vd., 1999).

Kardiyovasküler hastalıkta en büyük risk faktörü hipertansiyon olduğundan, antihipertansif peptitler önemli ve araştırılan bir konu haline gelmiştir (De Leo vd., 2009). Biyoaktif bileşenlerin antihipertansif potansiyellerinin analizinde en yaygın kullanılan yöntem, biyoaktif bileşenlerin anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ACE) inhibe etme düzeylerinin saptanmasına dayanır. EMP'lerin antihipertansif potansiyellerinin belirlenmesine dair literatürde yapılan çalışmalardan ilki Suzuki vd. (2007) tarafından yapılmıştır. EMP üretiminde farklı ekzopeptidaz ve endopeptidaz enzimlerinin kullanarak yüksek ACE inhibisyon aktivitesine sahip bir EMP elde edilmeye çalışılmıştır. Üretilen EMP'nin ise hipertansif sıçanların kan basıncını düşürdüğü in vivo olarak saptanmıştır. Devamında aynı araştırma grubunun yaptığı çalışmalarda, yüksek ACE inhibisyon aktivitesine sahip iki farklı peptit EMP'den izole edilmiş ve amino asit sekansları (Leu-Gln-Pro ve Met-Ala-Pro) tanımlanmıştır. Bu peptitlerden ilki daha öncesinde α -zein'in thermolysin ile hidrolizi sonucu oluştuğu saptanmış olan ve yüksek ACE inhibisyon aktivitesi bilinen bir peptitken, ikincisi ilk kez izole edilmiş bir peptittir. Bu durumdan hareketle, ilk kez izole edilmiş olan Met-Ala-Pro peptidinin hipertansif sıçanlardaki etkileri incelenmiş ve önemli antihipertansif etki tespit edilmiştir (Tonouchi vd., 2008). Bu çalışmalar, EMP'lerde antihipertansif etkisi yüksek farklı biyoaktif peptitlerin oluşabileceğini ve EMP'lerin bu açıdan da incelenmesi gerektiği göstermiştir

Besin alerjisi ve enflamatuvar bağırsak hastalıklarını önlemenin etkili bir yolu bağırsak bariyer fonksiyonunun güçlendirilmesidir. EMP'de bulunan peptitlerin, bağırsaktaki alerjen geçirgenliğini inhibe etme potansiyelinin olduğu çeşitli çalışmalarla saptanmıştır (Tanabe vd., 2006; Isobe vd., 2008; Yamasaki ve Mitsuyama, 2014). Yapılan çalışmalar sonucunda, EMP'deki α 2-kazeinden elde edilmiş bir peptidin, Caco-2 hücre modelinde temsili bir gıda alerjeni olarak ovalbumin geçirgenliğini engellediği (Tanabe vd., 2006) ve bazı EMP'lerin, alerjen geçirgenliğini inhibe ederek gıda alerjisinin önlenmesi için potansiyel olarak faydalı olduğu in vivo olarak saptamıştır (Isobe vd., 2008; Yamasaki ve Mitsuyama, 2014).

EMP'lerin antimikrobiyal etkileri, özel olarak da antibotulinal etkileri üzerine bazı çalışmalar yapılmıştır. Eritme peynirlerindeki en önemli mikrobiyal risk, ısıya dayanıklı, spor oluşturan patojenlerin ürettiği toksindir ve bu kapsamdaki hedef organizma *Clostridium botulinum*'dur. Eritme peyniri üretiminde EMP ilavesinin antibotulinal etkisini değerlendirmek için çalışmalar yapılmış ve EMP kullanımı ile yağsız eritme peynirlerindeki toksin üretiminin geciktirildiği saptanmıştır. Eritme peynirlerindeki yağ içeriğinin artışı ile antibotulinal etki azalırken, eritme peynirinin su aktivitesi ve pH değerleri EMP ilavesinden kaynaklanan antibotulinal etki üzerinde anlamlı bir farklılığa neden olmamıştır (Glass ve Johnson, 2004a, 2004b, 2004c). Bu çalışmaları yapan araştırmacılar, saptanan antimikrobiyal etkinin nedeninin, EMP içerisinde bulunan SYA'lerinin (özellikle de kaprik ve laurik asitler) antimikrobiyal özellikleri olduğunu düşünmüşlerdir. Bu çalışmalarda farklı lezzetlerdeki ticari EMP'ler kullanılmış ve sadece mavi damarlı peynir lezzetine sahip EMP'de bu tip bir etki saptanmamıştır. Mavi damarlı peynir lezzetindeki EMP'lerin üretiminde proteoliz genellikle kullanılmamakta, hatta sıklıkla pıhtı veya taze peynir yerine kremadan üretim gerçekleştirilmektedir. Yani bu tip EMP'lerde protein içeriği ve protein parçalanma ürünleri çok azdır. Dolayısıyla, EMP'lerde saptanan bu antimikrobiyal etkinin ve bu etkinin mavi damarlı peynir lezzetine sahip EMP'lerde görülmemesinin nedeninin, EMP içeriğindeki SYA'lerinden ziyade biyoaktif peptitler olması çok muhtemeldir. Ancak, bu konuda herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında, EMP'lerin üretim sürecindeki enzimatik reaksiyonların sonucunda biyoaktif özelliklere sahip bileşenlerin oluşması potansiyel olarak mümkünken, bu biyoaktif potansiyelin niteliği ve düzeyine dair çalışmaların çok sınırlı kaldığı görülmektedir. EMP'lerin antihipertansif, antialerjen ve antimikrobiyal etkilerine dair birkaç çalışma vardır, ancak bu çalışmaların derinleştirilmesi gereklidir. Bununla beraber, antidiyabetik ve antikanser aktivitesine dair hiçbir çalışma bulunmamaktadır. EMP'nin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi hedefiyle yapılmış bir çalışmaya da yazarlar rastlamamıştır. Ek olarak, biyoaktivitenin uygun şekilde değerlendirilebilmesi için, sindirim süreçlerindeki değişimlerin de dikkate alınması doğru olacaktır, ancak literatürde bu tip bir çalışmayla karşılaşmamaktadır. Bu çalışmada, olgun beyaz peynir lezzetine sahip EMP'nin biyoaktif özellikleri ve bu özelliklerin üretim sürecinde değişimi *in vitro* sindirim öncesi ve sonrasında incelenmiştir.

Bu şekilde hem üretilen EMP'nin biyoaktif özellikleri belirlenmiş, hem üretim sürecinde biyoaktivitedeki değişimler incelenmiş, hem de tüm bu koşullarda *in vitro* sindirim süreci sonrası biyoaktif özelliklerdeki değişimler analiz edilmiştir.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Malzeme

EMP üretimlerinde, hammaddede olarak kullanılmak üzere geleneksel yöntemle starter kültür kullanılmaksızın, inek sütü ile olgunlaştırılmak üzere üretilmiş beyaz peynir kullanımıştır.

EMP üretiminin ilk aşamasında hammadde olarak kullanılan beyaz peynir eritme peynirine dönüştürülmektedir. Eritme peyniri üretiminde eritme tuzu olarak Sigma-Aldrich'den (Darmstadt, Almanya) satın alınmış olan sodyum sitrat ile sodyum fosfat ve koruyucu olarak potasyum sorbat kullanılmıştır.

EMP üretiminde proteoliz aşamasında birisi endopeptidaz, diğeri ise ekzopeptidaz olan 2 proteolitik enzim kullanıldı. Bu proteolitik enzimlerden endopeptidaz olanı Neutrase™'dir ve Novozymes'dan (Kopenhag, Danimarka) tedarik edilmiştir. Ekzopeptidaz olarak ise Biocatalysts'ten (Cardiff, Galler) satın alınan Flavorpro™ 937MDP kullanılmıştır. Lipoliz aşamasında ise yine Biocatalysts'ten (Cardiff, Galler) satın alınan Lipomod™ 801MDP kullanılmıştır.

Neutrase™: *Bacillus amyloliquefaciens* kaynaklı nötral bir endopeptidazdır. Bu enzimin optimum çalışma sıcaklık aralığı 40-50 °C, optimum çalışma pH'sı 7'dir. Enzimin aktivite değeri 0.8 AU (Anson unit/g)'dir.

Flavorpro™ 937MDP: *Aspergillus oryzae* kaynaklı bir lösin aminopeptidazdır. EMP üretiminde acılaştırmanın kontrol edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Optimum çalışma pH'sı 5-7 iken, optimum çalışma sıcaklığı 45-55 °C aralığındadır. Bu enzimin EMP üretiminde önerilen kullanım miktarı %0.05-0.10 w/w peynirdir.

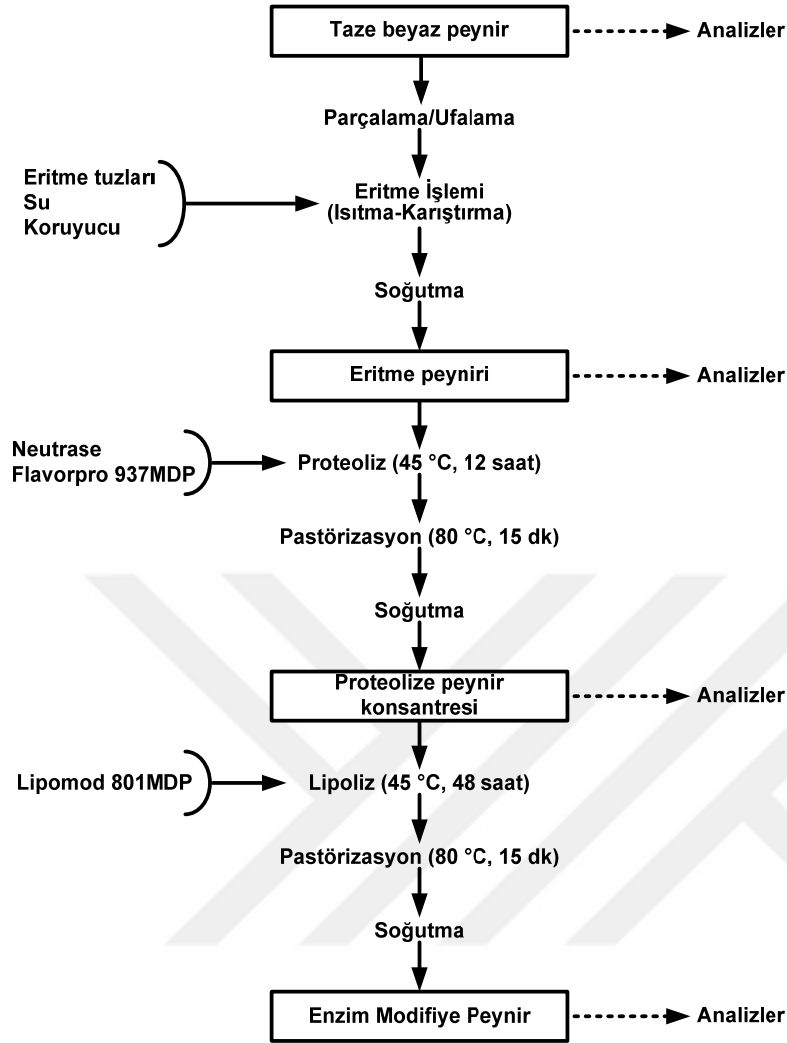
Lipomod™ 801MDP: Karma bir fungal lipaz olup, pankreatik lipaz özellikleri taşımaktadır. Aktivitesi 3900 U/g (Substrat: tribütirat) olarak belirtilmiştir. Optimum pH'sı 5-7, optimum çalışma sıcaklık aralığı 40-50 °C'dir. Çalışma kapsamındaki kullanım miktarı, peynir bazında % 0.1'dir. Enzimin keskin serbest yağ asidi lezzetleri ile bir miktar tatlı, bulyonumsu ve kükürt lezzet notları ile karakterize olduğu belirtilmektedir

3.2. Yöntem

3.2.1. EMP Üretimi

“İki aşamalı üretim tekniği” ile olgun beyaz peynir lezzetinde EMP üretim prosedürü, TÜBİTAK 3501 programı kapsamında yürütülen ve sonuçlandırılan bir projede belirlenmiştir (Erbay vd., 2018). Tez çalışmasında ise, belirlenmiş olan bu iki aşamalı üretim tekniği kullanılmıştır ve üretimin 4 farklı aşamasından örnek alınarak analizler gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1).

Üretim prosedüründe, öncelikle, homojen yapıda ve çalkalamalı inkübatörde, 45 °C’de, 48 saat boyunca stabilitesini kaybetmeyen, %25 kuru maddeli eritme peyniri elde edilmiştir. Bunun için, peynir bazında %2 trisodyum sitrat, %1 trisodyum fosfat ile %0.2 potasyum sorbat tartılmış ve hammadde olarak kullanılan peynirle hedeflenen kuru madde oranına göre hesaplanan miktardaki beyaz peynir Thermomix cihazında (TM31, Vorwerk, Wuppertal, Almanya) 4000 rpm’de 45 saniye ile 7000 rpm’de 105 saniye karıştırılmış, eritme tuzları saf suda çözündürülmüş şekilde ve 80 °C’ye ısıtıldıktan sonra karışımın üzerine ilave edilmiştir. İçerik Thermomix cihazı ile 4000 rpm’de karıştırılmış, bulamacın sıcaklığı 80 °C’ye ulaştıktan sonra ise karıştırma hızı 7000 rpm’e yükseltilerek, 10 dakika süreyle karıştırma işlemine devam edilmiştir. Elde edilen eriyik, borosilikat şişelere alınmış ve akan su altında hızlı bir şekilde 45 °C’ye soğutularak, içerisine belirlenmiş ticari proteolitik enzimler belirlenmiş oranlarda ilave edilmiş (Neutrase™ enzimi peynir bazında %0.01 ile Flavorpro™ 937 MDP enzimi peynir bazında %0.05), sonrasında çalkalamalı inkübatörde 45 °C’de 12 saat inkübasyona/proteolize bırakılmıştır (Bas vd., 2019). 12 saatin sonunda örnekler otoklavda, 80 °C’de 15 dakika pastörize edilerek proteolitik hidroliz durdurulmuştur. Daha sonrasında örnekler akan su altında, hızla 45 °C’ye soğutulmuş, içerisine belirlenmiş olan ticari lipolitik enzimden belirlenmiş oranda ilave edilmiş (Lipomod™ 801MDP enzimi peynir bazında %0.1) ve çalkalamalı inkübatörde 45 °C’de 48 saat inkübasyona/lipolize bırakılmıştır (Kendirci vd., 2020). İnkübasyon sonucunda örnekler son kez otoklava alınmış ve 80 °C’de 15 dakikalık bir ısıl işlemle pastörize edilerek, içerisindeki enzim aktiviteleri tamamen durdurulmuştur (Erbay vd., 2018). EMP üretimleri 2 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1: Tez çalışmasında kullanılan EMP üretim ve analiz akış şeması.

3.2.2 Analiz yöntemleri

3.2.2.1. Bileşim analizleri

Hammadde olarak kullanılan taze peynirde, eritme işlemi ile elde edilen eritme peynirinde, proteoliz sonrası üretilen ara üründe (proteolize peynir konsantresi) ve üretilen EMP’de bileşim özellikleri belirlenmiştir. Örneklerin nem oranı gravimetrik yöntem ile (AOAC, 2012a), yağ oranı Gerber-Van Gulik yöntemi ile (AOAC, 2012b; Funke-Gerber, 2018), protein oranı için toplam azot (TA) miktarı ise Kjeldahl yöntemi ile (AOAC, 2012c) belirlenmiştir. Örneklerin pH değerleri pH/İyon metre (Mettler Toledo Seven Compact) cihazı ile ölçülmüştür.

3.2.2.2. Çözünür azot fraksiyonlarının olgunlaşma indeksi analizleri belirlenmesi ve olgunlaşma indeksi analizleri

Peynirde olgunlaşma düzeyinin belirlenmesinde önemli bir ölçü, proteinlerin hidroliz oranıdır. Hidroliz sürecinde proteinler peptitlere ve aminoasitlere parçalanırken, parçalanmanın düzeyi örneklerdeki çözünür azot fraksiyonlarının oranlarının belirlenmesi ile saptanabilir. Bu düzeyin belirlenmesi amacıyla EMP üretim aşamalarında incelenen örneklerdeki toplam azot (TA) miktarının yanı sıra, suda çözünür azot (SÇA), %12'lik trikloroasetik asitte (TCA) çözünür azot (TCA-ÇA) ve %5'lik fosfotungustik asitte (PTA) çözünür azot (PTA-ÇA) miktarları belirlenir. Kazein pek çok çözgüde çözünmezken, kazeinin hidroliz ürünleri molekül boyutuna bağlı olarak çeşitli çözgenlerde çözünmektedir (McSweeney ve Fox, 1997). Örneklerin SÇA, TCA-ÇA ve PTA-ÇA miktarlarının belirlenmesinde Bütikofer vd. (1993)'te açıklanan yöntemden yararlanılmıştır. Yöntemin uygulamasında kimi modifikasyonlar yapılmıştır ve uygulanan yöntemlerin ayrıntıları aşağıda verilmiştir.

3.2.2.2.1. SÇA tayini

20 g örnek ile 40 °C'de 20 mL saf su bir behere alınmış ve karışım önce Ultra-Turrax ile 10000 rpm'de 1 dakika homojenize edilip, sonrasında 1 dakika serbest halde bırakılıp, aynı koşullarda 1 dakika daha Ultra-Turrax ile karıştırılmıştır. Homojenat 1 saat boyunca 40 °C'de tutulmuş ve örnekler 4 °C'de, 3000 g'de, 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte biriken yağ bölümü bir spatül ile alınmış, kalan sıvı kısım cam yününden geçirilip, Whatman No.113 filtre kağıdı ile filtre edilmiştir. Filtre edilen kısımda Kjeldahl yöntemi ile azot tayini yapılarak SÇA miktarı hesaplanmıştır.

3.2.2.2.2. TCA-ÇA tayini

5 mL SÇA ekstraktı ile 5 mL %24'lük TCA karıştırılmış ve bu şekilde %12'lik TCA hazırlanmıştır. Sonrasında süspansiyon karıştırılmış, oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiş ve Whatman No.540 filtreden süzölmüştür. Süzöntünün içeriğindeki toplam azot miktarı, yine Kjeldahl yöntemi ile belirlenerek hesaplanmıştır.

3.2.2.2.3. PTA-ÇA tayini

5 mL SÇA ekstraktı, 3.5 mL 3.95 mol/L'lik H₂SO₄ çözeltisi ile ve 1.5 mL 330 g/L'lik PTA çözeltisi ile karıştırılmıştır. Karışım gece boyunca 4 °C'de bekletilmiş, sonrasında Whatman

No.542 filtreden süzölmüştür. Süzüntünün toplam azot içeriğı Kjeldahl yöntemi ile belirlenmiştir.

3.2.2.2.4. Proteolitik olgunlaşma indeksi hesaplamaları

Elde edilen çözünür azot fraksiyonlarının TA miktarına oranlanmasıyla çeşitli indeksler oluşturulmuştur ve bu indeksler proteoliz temelli peynir olgunlaşmasının düzeyinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Bu tez çalışması kapsamında, olgunlaşma uzama indeksi (OUİ) SÇA/TA oranıyla (SÇA, %azot cinsinden); olgunlaşma yoğunluk indeksi (OYİ) TCA-ÇA/TA oranıyla (TCA, %azot cinsinden); serbest amino asit indeksi (SAİ) ise PTA-ÇA/TA oranıyla (PTA, %azot cinsinden) hesaplanmıştır (Pereira vd., 2008):

$$\text{Olgunlaşma Uzama İndeksi (OUİ)} = \frac{SÇA}{TA} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Olgunlaşma Yoğunluk İndeksi (OYİ)} = \frac{TCA - ÇA}{TA} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Serbest Amino Asit İndeksi (SAİ)} = \frac{PTA - ÇA}{TA} \times 100 \quad (3)$$

3.2.2.3. Toplam peptit miktarının belirlenmesi

Çalışmada örneklerdeki peptit miktarları ile biyoaktivite arasında ilişkilerin kurulabileceğı düşünölerek örneklerin toplam peptit miktarları analiz edilmiştir. Bilindiğı üzere, o-fitaldialdehit (OPA) bileşigi, proteinlerin amino gruplarıyla bağ yapma eğilimindedir. Ortamda β-merkaptöetanol bileşigi de bulunduğı durumda OPA ve amino gruplarının oluşturduğu kompleks 340 nm'de absorbens vermektedir. Ortamda bulunan amino grubu sayısı ile 340 nm'deki absorbens artar. Protein yapısı parçalandıkça OPA ile reaksiyon verebilen amino grubu sayısı da artar. Bu şekilde, proteoliz düzeyine dair fikir elde edilir. Bu reaksiyon pH 9.0'un üzerindeki koşullarda kararlı sonuçlar verir. Bundan dolayı çözeltiler borat tamponunda hazırlanır. Aynı zamanda bu reaksiyon ile 340 nm'deki absorbens ilk 1-1.5 dakika artarken, sonra 3.dakikaya kadar görece kalıcı olur, daha sonra ise azalır. Dolayısıyla, hassas ölçümler için 2 dakikalık inkübasyon süresine uymak gerekir (Church vd., 1983). Örneklerin toplam peptit miktarının belirlenmesinde Church vd. (1983)'de belirtilen yöntemden yararlanılmıştır. Öncelikle OPA çözeltisi hazırlanmıştır. OPA çözeltisinin hazırlanmasında, 50 mL'lik balonjoje alınıp, içerisine 100 mM sodyum tetraborat

çözeltilisinden 25 mL ilave edilmiştir. Sonrasında, üzerine %20'lik sodyum dodesil sülfat çözeltilisinden 2.5 mL eklenmiştir. Daha sonra 10 mL'lik bir beherde 40 mg OPA tartılmış ve üzerine eklenen 1 mL metanolde çözündürülmüştür. Bu çözelti de, balonjojeye aktarılmıştır. Beher içeriği, balon joje içeriği ile birkaç kez yıkanmıştır. Balonjojeye β -merkaptotanol çözeltilisinden 100 μ L ilave edilmiş ve içerik saf su ile tamamlanmıştır. Bu OPA çözeltisi günlük olarak hazırlanarak analizlerde kullanılmıştır. Analiz için, örneklerden elde edilmiş olan (Bölüm "3.2.2.1. SÇA tayini"nde elde edilen şekilde) suda çözünür ekstraktlardan 50 μ L spektrofotometre küvetine alınmıştır. Üzerine 1 mL OPA çözeltisi ilave edilmiş ve küvet içeriği pipetleme ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyona bırakılan küvetlerde oluşan renk 340 nm'de ölçülmüş ve toplam peptit miktarı tripton ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hareketle hesaplanmıştır.

3.2.2.4. Serbest yağ asidi (SYA) bileşiminin ve miktarının belirlenmesi

Süt yağındaki değişimlerin ve lezzet özelliklerinin belirlenmesinde, SYA bileşimi önemlidir. Peynirlerin olgunlaşmasında da lipoliz önemli bir yer tutar ve lipoliz ürünlerinin başında SYA gelmektedir. Çalışma kapsamında kullanılan peynirlerin, ara ürünlerin ve üretilen sıvı/toz EMP örneklerinin SYA analizleri gaz kromatografisi ile De Jong ve Badings (1990) ve Deeth vd. (1983) tarafından açıklanmış olan yöntem esas alınarak belirlenmiştir. Analizlerde alev iyonizasyon dedektörlü (FID) gaz kromatografisi (GC-FID) cihazı (7890A, Agilent Technologies, Santa Clara, ABD) kullanılmıştır. Öncelikle SYA'leri katı faz ekstraksiyonu yöntemi kullanılarak ekstrakte edilmiş ve daha sonra ekstraktlar GC'ye enjekte edilerek analiz edilmiştir. Analizlerde miktar hesaplamasında iç ve dış standart yöntemleri birlikte kullanılmıştır.

Peynirlerin olgunlaşmasında önemli bir yer tutan lipoliz, EMP üretimindeki son aşamadır. Lipoliz ürünlerinin başında SYA'leri gelmektedir ve süt yağındaki değişimlerle, lipoliz düzeyinin ayrıntılı bir şekilde belirlenmesi/tartışılması için SYA bileşim ve miktarlarının belirlenmesi gerekmektedir. Tez çalışma kapsamında analiz edilecek örneklerin SYA analizleri gaz kromatografisi ile De Jong ve Badings (1990) ve Deeth vd. (1983) tarafından temel prensipleri verilmiş olan ve EMP örneklerinin analizinde kimi modifikasyonlarıyla Salum vd. (2019)'da ayrıntılı olarak açıklanan yöntemle gerçekleştirilmiştir. Analizlerde alev iyonizasyon dedektörlü (FID) gaz kromatografisi (GC-FID) cihazı (7890A, Agilent Technologies, Santa Clara, ABD) kullanılmıştır. Öncelikle SYA'leri katı faz ekstraksiyonu

yöntemi kullanılarak ekstrakte edilmiş ve daha sonra ekstraktlar GC'ye enjekte edilerek analiz edilmiştir. Çözgen olarak Hekzan/Dietileter (1:1, v/v), ekstraktaki suyu tutmak için ise Na_2SO_4 , ekstraksiyon aşamasında ise deaktive edilmiş alümina konulmuş Biorad kolonlar (aminopropil, katı faz ekstraksiyon) kullanılmıştır. Ekstraktların enjeksiyonunda otomatik örnek alma ünitesinden yararlanılmış, her bir ekstrakttan 0.5 μL GC-FID cihazına enjekte edilmiş ve split oranı ise 1:5 olarak ayarlanmıştır. Ayrım için DB-FFAP kolonu (30 m x 0.25 μm x 0.25 mm, Agilent Technologies, Santa Clara, ABD) kullanılmış, fırın sıcaklığı başlangıçta 90 °C olarak ayarlanıp ve bu sıcaklıkta 1 dakika tutulup, ardından 7 °C/dk artışla 240 °C'ye getirilip bu sıcaklıkta 15 dakika tutulmak suretiyle, 2 mL/dk sabit helyum akış hızında analiz gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon sıcaklığı 250 °C, FID sıcaklığı 260 °C'ye ayarlanmıştır. Analizlerde miktar hesaplamasında ise iç ve dış standart yöntemleri birlikte uygulanmıştır. İç standart olarak pentanoik ($\text{C}_{5:0}$), tridekanoik ($\text{C}_{13:0}$) ve heptadekanoik ($\text{C}_{17:0}$) asitler kullanılmıştır. Dış standart yöntemiyle de her bir SYA için (butirik asit ($\text{C}_{4:0}$), kaproik asit ($\text{C}_{6:0}$), kaprilik asit ($\text{C}_{8:0}$), kaprik asit ($\text{C}_{10:0}$), laurik asit ($\text{C}_{12:0}$), miristik asit ($\text{C}_{14:0}$), palmitik asit ($\text{C}_{16:0}$), stearik asit ($\text{C}_{18:0}$), oleik asit ($\text{C}_{18:1}$), linoleik asit ($\text{C}_{18:2}$), linolenik asit ($\text{C}_{18:3}$)) kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır. Hesaplamalarda $\text{C}_{4:0}$ - $\text{C}_{10:0}$ arasındaki yağ asitleri için iç standart olarak $\text{C}_{5:0}$, $\text{C}_{12:0}$ - $\text{C}_{14:0}$ yağ asitleri için $\text{C}_{13:0}$ ve $\text{C}_{16:0}$ - $\text{C}_{18:3}$ arasındaki yağ asitleri için de $\text{C}_{17:0}$ iç standart olarak kullanılmıştır.

3.2.2.5. Biyoaktivite analizleri

Çalışma kapsamında örneklerin *in vitro* sindirim öncesindeki ve sonrasındaki biyoaktivite özellikleri incelenmiştir. EMP üretim aşamalarında alınan örneklerin biyoaktivite özellikleri belirlenirken, suda çözünür ekstraktları hazırlanmış (Bölüm “3.2.2.2.1. SÇA tayini”nde elde edilen şekilde) ve analizler bu ekstraktlarda gerçekleştirilmiştir. *In vitro* sindirim sonrasındaki özelliklerin analizinde ise, EMP üretim aşamalarında alınan örneklerin kendileri *in vitro* sindirim sürecine sokulmuş ve ince bağırsak işlemi sonrasında alınan örneklerin biyoaktivite özellikleri incelenmiştir. *In vitro* sindirim sürecinde örneğe dahil olan bileşenlerden (elektrolitler, enzimler vb) kaynaklı biyoaktivite üzerinde oluşabilecek etkilerin değerlendirilebilmesi için, örnek içermeyen şekilde *in vitro* sindirim süreci gerçekleştirilmiş ve buradan alınan örnek kontrol olarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.5.1. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi

EMP üretim aşamalarında alınan örneklerin suda çözünen peptit ekstraktlarının antioksidan aktivitesi üç farklı yöntemle analiz edilerek değerlendirilmiştir.

Serbest radikal süpürme kapasitesi sonuçlarının değerlendirilmesinde troloks eşleniği kullanılmıştır. Bu yöntemde, örneklerin suda çözünür ekstraktlarının ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sulfonik asit)) radikallerini nötralize etme kapasiteleri ölçülmüştür. Re vd. (1999) tarafından tanımlanan ABTS serbest radikallerinin bağlanma kapasitelerinin ölçülmesi 0,1 mL örnek çözeltisi ile 1,9 mL 7 mmol/L ABTS radikal çözeltisinin (2,5 mmol/L potasyum persülfat içerisinde hazırlanmış) verdiği reaksiyonun 6 dakika boyunca kinetik olarak 734 nm'deki absorbans değerinde meydana gelen değişimin ölçülmesiyle belirlenmiştir. Ölçümler görünür ve UV bölgede ölçüm yapabilen bir spektrofotometre (Agilent, Carry 60) ile gerçekleştirilmiştir. ABTS radikal çözeltisinin başlangıç absorbans değeri 0.700 ± 0.020 olacak şekilde pH 7.4 75 mmol/L tuzlu fosfat tamponu (150 mmol/L NaCl içeren) kullanılarak ayarlanmıştır.

DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil serbest radikali) kullanılarak gerçekleştirilen antioksidan aktivite ölçüm yöntemi Brand-Williams vd. (1995) ve Kim vd. (2002)'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. 0.1 mL örnek çözeltisi 3,9 mL DPPH (0,06 mmol/L metanol olacak şekilde hazırlanmış) ile 30 dakika boyunca reaksiyona sokulmuş ve ardından çözeltinin 517 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir (Agilent Carry 60). DPPH çözeltisinin başlangıç absorbans değeri 0.700 ± 0.020 olacak şekilde 0.06 mmol/L metanol kullanılarak ayarlanmıştır. Ancak çalışmada kullanılan suda çözünür ekstraktlar, alkol içerisinde çözünürlüklerini kaybedip bulanıklığa yol açmışlardır. Bu sebeple doğru ve tekrarlanabilir ölçüm sonuçları elde edilememiştir. Bundan dolayı, DPPH analizi yerine suda çözünür ABTS katyon radikali kullanılarak yapılan analizlerle antioksidan aktivite değerlendirilmiştir (Re vd., 1999).

Örneklerin demir iyonlarını şelatlama kapasiteleri de spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir (Carter, 1971). 2 mL uygun oranda seyreltilmiş örnek çözeltisi 0.1 mL 1 mmol/L $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile karıştırılarak 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 0.1 mL 5 mmol/L ferrozin ilave edilerek karıştırılmış ve 10 dakika daha inkübasyona bırakılmıştır.

Oluşan renk spektrofotometrik olarak 562 nm’de ölçülmüş ve sonuçlar EDTA cinsinden ifade edilmiştir.

3.2.2.5.2. Antihipertansif aktivitenin belirlenmesi

EMP üretim aşamalarında alınan örneklerin antihipertansif aktivitelerinin belirlenmesi için, anjiyotensin dönüştürücü enzimi (angiotensin converting enzyme, ACE) inhibe etme özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla, Shalaby vd. (2006)’de açıklanan yöntem ile analizler gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, 40 µL örnek çözeltisi Eppendorf tüplerine alınmış ve üzerine 0.01 M tuzlu fosfat tamponu (pH: 7.0, NaCl konsantrasyonu: 0.5 M) içerisinde hazırlanmış olan 40 µL 0.1 ünite/mL ACE ilave edilmiştir. Karışım 15 dakika 37 °C’de inkübe edilmiş ve ardından tuzlu fosfat tamponunda hazırlanmış 600 µL 0.75 mM substrat çözeltisi (FAPGG, N-[3-(2-Furyl) acryloyl]-Phe-Gly-Gly) ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyon 30 dakika boyunca 37 °C’de sürdürüldükten sonra, örnekler spektrofotometre kuvvetlerine aktarılmış ve üzerlerine 320 µL tampon çözeltisi ilave edildikten sonra, bekletilmeden 340 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.2.2.5.3. Antidiyabetik aktivitenin belirlenmesi

EMP üretim sürecinin farklı aşamalarından alınan örneklerin antidiyabetik etkilerinin incelenmesinde iki farklı yöntemden yararlanılmıştır. Bu kapsamda, örneklerin suda çözünen ekstraktlarının antidiyabetik aktiviteleri α -amilaz ve α -glukosidaz enzimlerinin aktivitelerinin inhibe edilme düzeylerine göre belirlenmiştir.

Çalışmada α -amilaz enziminin inhibisyonu Kim vd. (2004)’de açıklanan yöntemle gerçekleştirilmiştir. Yöntemde, α -amilaz enzimi içeren ağız benzeri bir ortam hazırlanmış ve bu ortama substrat olarak nişasta ilave edilerek nişasta parçalanma ürünlerinin miktarı belirlenmeye çalışılmıştır (Çam ve İçyer, 2015). Nişasta parçalanma ürünleri kapsamında belirlenen ise indirgen şekerlerdir. Bunun için indirgen şekerlerin ölçülmesinde yaygın kullanılan bir yöntem olan 3,5-Dinitrosalicylic asit (DNS) kolorimetrik yöntemi kullanılır. Yöntem, alkali koşullar ve ısı uygulaması ile şekerlerin fonksiyonel gruplarının (serbest halde bulunan karbonil gruplarının) oksidasyonu ve DNS’in indirgenerek 3-amino-5-nitrosalicylic aside dönüşümüne dayanır. Reaksiyon sonucu oluşan 3-amino-5-nitrosalicylic asit 540 nm’de ışığı absorbe eder ve absorpsiyonun belirlenmesi ile ortamda oluşan indirgen şeker miktarı arasında ilişki kurulur. İşlem sırasında ortama sodyum potasyum tartrat ilavesi, ortamdaki

iyon konsantrasyonunun artmasını ve çözünmüş oksijen miktarının azalmasını sağlar; bu şekilde, işlemin etkinliği artar (Miller, 1959). Özetle, α -amilaz etkinliği ile nişasta parçalanır, indirgen şekerler açığa çıkar ve indirgen şekerlerle DNS arasındaki reaksiyon sonucu 540 nm’de absorpsiyon veren bileşikler oluşur. Bu bileşiklerin oluşumu azalırsa, enzim aktivitesinin inhibe edildiği sonucuna varılır. Bu kapsamda, 10 unite/mL’lik α -amilaz enziminden 100 μ L bir Eppendorf tüpüne alınmış ve üzerine 100 μ L örnek ilave edilmiştir. Bu karışım 5 dakika 37°C’de ön inkübasyona bırakılmıştır. Karışımın üzerine 250 μ L %1’lik nişasta çözeltisinden ilave edilmiş ve enzimatik reaksiyonun gerçekleşmesi için 5 dakika 37°C’de inkübe edilmiştir. Sonrasında, karışımın üzerine 200 μ L DNS çözeltisi ilave edilmiş ve karışım 95°C’de 10 dakika bekletilip, ardından karışıma 1 mL saf su ilave edilip oda sıcaklığına hızla gelmesi sağlanmıştır. Oda sıcaklığına gelen çözeltide oluşan renk, spektrofotometrik olarak 540 nm’de ölçülmüştür.

Çalışma kapsamındaki diğer antidiyabetik aktivite analizinde ise örneklerin α -glukosidaz enzimini inhibe etme yeteneği Kim vd. (2004)’de belirtilen yöntemle ölçülmüştür. Yöntem, α -glukosidaz enziminin 4-nitrophenyl α -D-glucopyranoside bileşiğinin parçalanmasını sağlaması ve bu parçalanma reaksiyonu sonucu oluşan *p*-nitrophenol bileşiğinin spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır. Oluşan *p*-nitrophenol bileşiği 400 nm’de absorbans vermektedir ve bu bileşiğin konsantrasyonu ile enzim aktivitesi arasında ilişki tanımlanmaktadır. Bu bileşiğin oluşumu azalırsa, enzim aktivitesinin inhibe edildiği sonucuna varılır. Bu amaçla, tuzsuz fosfat tamponunda hazırlanmış olan α -glukosidaz enziminden (0.1 ünite/mL) 100 μ L bir Eppendorf tüpüne alınmış ve üzerine 100 μ L örnek ilave edilmiştir. Bu karışım 10 dakika 37 °C’de ön inkübasyona bırakılmıştır. Karışımın üzerine 100 μ L 10 mM’lık substrat çözeltisinden (pNPG, 4-nitrofenil α -D-galaktopiranosit) ilave edilmiş, enzimatik reaksiyonun gerçekleşmesi için 60 dakika 37°C’de inkübe edilmiştir. Sonrasında, karışımın üzerine 1 mL 0.1 M Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilmiş ve enzimatik reaksiyon durdurulmuştur. Çözeltide oluşan renk spektrofotometrik olarak 400 nm’de ölçülmüştür.

3.2.2.5.4. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

EMP üretim aşamalarında alınan örneklerin antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesinde kuyucuk difüzyon yönteminden (Rizzello vd., 2005) yararlanılmıştır. Farklı aşamalardan alınan örneklerin *in vitro* sindirim öncesi ve sonrası antimikrobiyal aktivitelerinin

belirlenmesi amacıyla, iki mikrobiyal suş, *Escherichia coli* K12 (Gram -) ve *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (Gram +) hedef alınmıştır. Mikroorganizmalar sıvı Luria Broth ya da M17 broth besiyeri içerisinde çalkalamalı inkübatör ve 36 °C ortam sıcaklığında gece boyunca (16-18 saat) geliştirilmiştir. Elde edilen sıvı bakteri kültürlerinin hücre yoğunluğu standart ayarlı bir densitometre yardımıyla 0.5 McFarland değerine (10^6 KOB/mL) ayarlanmıştır. Uygun hacimdeki (100 µL) bakteri süspansiyonu petri plaklarında agar eklenerek elde edilen katı büyüme ortamı yüzeyine yaydırılmıştır. Daha sonra plaklarında yaklaşık 0.6 cm çapında kuyucuklar açılmış ve eşit hacimde (50 µL) peynir çözeltisi örnekleri kuyucuklara yerleştirilmiştir. Bakteri plakları 24 saat 36 °C’de inkübe edilerek kuyucuklar etrafında oluşan inhibisyon alanlarının yarıçapları ölçülmüştür. Ölçümlerde genel etkili antibiyotikler olan Chloramphenicol (50 µg) ve Cefotaxime (50 µg) bakteri büyümesini engelleyen pozitif kontroller olarak kullanılmıştır. Antimikrobiyel etki gösteren örneklerin en düşük büyüme engelleme konsantrasyonları (MIC değeri) 96 kuyucuklu plakalarda resazurin boyaması yardımıyla belirlenmiştir (Elshikh vd., 2016). Bu amaçla 24 saat 36°C’de inkübe edilen bakteri süspansiyonları 0.5 McFarland değerine denk gelecek şekilde seyreltilmiş, 100 µL büyüme ortamı içeren her bir kuyucuğa 5 µL sıvı bakteri kültürü (10^6 KOB/mL) eklenmiştir. Daha sonra bakteri büyüme ortamı üzerine 50 µL hacimden başlanarak seri dilüsyon yöntemiyle farklı konsantrasyonda örnek eklenerek 24 saat 36 °C’de inkübe edilmiştir. Boyama için her bir kuyucuğa 30 µL resazurin boyası eklenerek canlı hücrelerle doğru orantılı renk değişimi 3 saat 36 °C’de inkübasyon sonrası gözlenmiştir. Her bir örnek konsantrasyonu için 2 farklı zamanda 2 tekrarlı boyama yapılmıştır.

3.2.2.6. *In vitro* sindirim çalışmaları

EMP üretiminin farklı aşamalarından alınan örneklerin *in vitro* sindirim uygulaması Minekus vd. (2014) ve Brodkorb vd. (2019) tarafından tanımlanan yöntemle göre yapılmıştır. Bu analiz yönteminde, sıvı örnekler için ağız ortamının kullanımı zorunlu görülmemektedir. Buna ek olarak, çalışmada incelenen örneklerin karbonhidrat içeriğinin çok düşük olmasından da hareketle, *in vitro* sindirim ortamının oluşturulmasında ağız ortamı enzim içermeyen şekilde kullanılmıştır. Buna göre, örnekler 1:1 oranında simüle tükürük sıvısı (K^+ : 18.8 mmol/L, Na^+ : 13.6 mmol/L, Cl^- : 19.5 mmol/L, $H_2PO_4^-$: 3.7 mmol/L, HCO_3^- ve CO_3^{2-} : 13.7 mmol/L, Mg^{2+} : 0.15 mmol/L, NH_4^+ : 0.12 mmol/L, Ca^{2+} : 1.5 mmol/L) içerisinde 2 dakika boyunca pH 7.0’de 37 °C’de bekletilmiştir. Oral faz ortamı sonrası gastrik faz sindirimine geçilmiştir. Burada da oral faz ortamından alınan örnekler 1:1 oranında simüle gastrik sıvısı (K^+ : 7.8 mmol/L, Na^+ :

72.2 mmol/L, Cl^- : 70.2 mmol/L, H_2PO_4^- : 0.9 mmol/L, HCO_3^- ve CO_3^{2-} : 25.5 mmol/L, Mg^{2+} : 0.1 mmol/L, NH_4^+ : 1.0 mmol/L, Ca^{2+} : 0.15 mmol/L) ve pepsin (2000 U/mL) karışımı ile 2 saat boyunca pH 3.0'de sindirime uğratılmıştır. Ardından intestinal faz kısmına geçilerek örnekler 1:1 oranında simüle intestinal sıvısı (K^+ : 7.6 mmol/L, Na^+ : 123.4 mmol/L, Cl^- : 55.5 mmol/L, H_2PO_4^- : 0.8 mmol/L, HCO_3^- ve CO_3^{2-} : 85 mmol/L, Mg^{2+} : 0.33 mmol/L, Ca^{2+} : 0.6 mmol/L) ve enzim ekstraktı (100 U/mL pankreatin ve 10 mmol/L safra) karışımı ile 2 saat boyunca pH 7.0'de sindirime uğratılmıştır. İşlem sonrasında ortama 1 mmol/L AEBSF proteaz inhibitörü (4-(2-Aminoethyl) benzenesülfonil florid hidroklorid) ilave edilerek reaksiyon sonlandırılmıştır. pH ayarlamalarında NaOH ve HCl çözeltileri kullanılmıştır. Sindirilmiş örneklerde biyoaktivite analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.7. İstatiksel değerlendirme

Çalışmada, EMP üretim aşamalarının ürün biyoaktif özellikleri üzerindeki etkilerinin anlamlı farklılıklar yaratıp yaratmadığı belirlenmiştir. Bu amaçla, üretim aşamalarının ürün özellikleri üzerinde değişiminin önemliliği, tek değişkenli varyans analizi ile saptanmış, belirlenen önemlilik derecelerine göre örneklerin gruplandırılmasında ise Duncan testinden yararlanılmıştır. Analizlerde SPSS istatistiksel paket programı (SPSS ver. 13.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, ABD) kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında taze beyaz peynirden EMP üretimi gerçekleştirilmiştir. Örneklerimiz; EMP üretiminde kullandığımız hammadde olan taze beyaz peynir, eritme tuzları ile eritme işlemi sonucu oluşan eritme peynir, proteolitik enzimlerin aktivitesiyle oluşan proteolize peynir konsantresi ve lipolitik enzim aktivitesiyle oluşan son ürün EMP örnek olarak alınmıştır. Örneklerin *in vitro* sindirim öncesi ve *in vitro* sindirim sonrası analizleri yapılmış ve analiz sonuçları değerlendirilmiştir.

4.1. EMP Üretiminde Temel Bileşim ve Olgunlaşma Parametrelerinin Değişimi

Çalışmamızda EMP üretim sürecinde almış olduğumuz temel bileşim ve proreolitik olgunlaşma parametrelerindeki değişim Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Bu tabloda temel bileşim özelliklerinde örneklerin yağ, nem ve protein içerikleri ile PH değerleri analizi yapılmıştır. Proteolitik olgunlaşma parametrelerinde ise öncelikle örneklerin çözünür azot fraksiyonları Kjeldahl yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Bu doğrultuda SÇA, TCA-ÇA ve PTA-ÇA değerleri incelenmiş ve sonrasında bu değerlerin kullanılmasıyla olgunlaşma indeksi (OUI (SÇA, %azot cinsinden), OYİ (TCA, %azot cinsinden) ve SAAİ (PTA, %azot cinsinden)) değerleri hesaplanmıştır. Örneklerdeki proteoliz düzeyi hakkında değerlendirme yapabilmek için, örneklerdeki proteinlerin parçalanması sonucu açığa çıkan peptitlerin belirlenmesi amacıyla örneklerdeki toplam peptit miktarı analiz edilmiştir (Tablo 4.2).

Toplam peptit miktarı tayin yöntemi süt ürünlerinde özellikle de peynirlerdeki peptit oluşumlarını ve değişimlerini belirlemek için uygun bir teknik olduğu literatürde bildirilmiştir (Wallace ve Fox, 1998). Peynirlerin biyoaktivitesinin incelendiği bazı çalışmalarda, proteoliz ile biyoaktivite arasındaki ilişkinin saptanmasında toplam peptit miktarı tayini yöntemi kullanılmıştır. Pripp vd. (2006) sekiz farklı peynirin suda çözünür ve etanolik ekstraktlarında ACE inhibisyon aktivitesini incelerken, toplam peptit miktarı analizi ile inhibisyon aktivitesindeki değişimle proteoliz düzeyi arasındaki ilişkiyi kurmaya çalışmışlardır. Çalışma sonuçlarına göre ACE inhibisyon aktivitesi ile OPA analizi arasında tam bir bağlantı yakalanamasa da en düşük ve en yüksek değerlerin aynı peynirlerde elde edilmiş olması ile belirli bir ilişkinin sağlandığı bildirilmiştir (Pripp vd., 2006). Başka bir çalışmada ise manda sütünden elde edilen peynir altı suyundaki serum proteinlerinin tanımlaması, karakterizasyonu, biyoaktif özellikleri ve hidroliz ile *in vitro* sindirim süreçlerindeki

değişimleri incelenmiştir (Bassan vd., 2015). Bu çalışmada da proteoliz düzeyi hakkında bilgi edinmek için OPA yönteminden faydalanılmıştır. Hidroliz ile *in vitro* sindirim süreçlerindeki peptit ve serbest amino asit miktarında artışların olduğu gösterilmiştir (Bassan vd., 2015).

Bu çalışmamızda, hem EMP üretim süreçlerinde alınan örneklerde, hem de bu örneklerin *in vitro* sindirim süreci sonrasındaki hallerinde toplam peptit miktarları belirlenmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.1:Enzim modifiye peynir (EMP) üretiminde işlem basamaklarının temel bileşim ve proteolitik olgunlaşma parametreleri üzerine etkisi.

Özellikler*	Peynir	EP	PPK	EMP
Nem (%)	48,52 ± 0,15 ^a	73,50 ± 0,72 ^b	73,85 ± 0,81 ^b	77,18 ± 0,44 ^c
Yağ (%)	26,38 ± 0,53 ^c	13,00 ± 0,41 ^b	12,75 ± 0,29 ^b	11,25 ± 0,29 ^a
Protein (%)	18,90 ± 0,08 ^c	9,49 ± 0,13 ^b	9,40 ± 0,13 ^b	8,73 ± 0,08 ^a
pH	5,22	6,30 ± 0,05 ^b	6,24 ± 0,04 ^b	5,32 ± 0,06 ^a
TA (%)	2,96 ± 0,01 ^c	1,49 ± 0,02 ^b	1,47 ± 0,02 ^b	1,37 ± 0,02 ^a
SÇA (%)	0,33 ± 0,01 ^a	1,16 ± 0,01 ^c	0,97 ± 0,01 ^b	0,98 ± 0,01 ^b
TCA-ÇA (%)	0,13 ± 0,00 ^b	0,06 ± 0,00 ^a	0,79 ± 0,01 ^c	0,87 ± 0,01 ^d
PTA-ÇA (%)	0,06 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,01 ^a	0,47 ± 0,04 ^b	0,49 ± 0,01 ^b
OUI (%)	11,00	77,98 ± 0,56 ^c	66,10 ± 0,12 ^a	71,32 ± 0,69 ^b
OYİ (%)	4,27	3,78 ± 0,04 ^a	53,84 ± 0,70 ^b	63,28 ± 0,97 ^c
SAAİ (%)	2,11	1,83 ± 0,05 ^a	32,18 ± 0,76 ^b	35,59 ± 0,19 ^c

^{a-d} Aynı harfler örnekler arasında farkın önemli olmadığını göstermektedir (p>0.05).

* TA: Toplam azot; SÇA: Suda çözünür azot; TCA-ÇA: TCA'da çözünür azot; PTA-ÇA: PTA'da çözünür azot; OUI: Olgunlaşma Uzama İndeksi (SÇA, %azot cinsinden); OYİ: Olgunlaşma Yoğunluk İndeksi (TCA, %azot cinsinden); SAAİ: Serbest Aminoasit İndeksi (PTA, %azot cinsinden); EP: Eritme peyniri; PPK: Proteolize peynir konsantresi; EMP: Enzim modifiye peynir

Tablo 4.1 ve 4.2'deki sonuçları değerlendirdiğimiz zaman, EMP üretiminde hammadde olan peynir örneğimizin diğer örneklerle kıyasla en yüksek yağ, protein ve toplam azot değerlerine sahip, pH değeri 5,22'dir. Toplam peptit miktarına baktığımızda ise sindirim sonrası, sindirim öncesine kıyasla dikkate değer şekilde artış göstermiştir.

Tablo 4.2.Enzim modifiye peynir (EMP) üretiminde işlem basamaklarının toplam peptit miktarının değişimi üzerine etkileri.

Örnek ¹	Toplam Peptit Miktarı ²	
	Sindirim Öncesi	Sindirim Sonrası ³
Peynir	14,4 ± 1,2 ^a	678,5 ± 64,0 ^a
EP	66,5 ± 3,2 ^b	752,2 ± 75,9 ^{ab}
PPK	165,8 ± 5,1 ^c	854,7 ± 36,5 ^b
EMP	231,5 ± 17,3 ^d	764,5 ± 76,6 ^{ab}

^{a-d} Aynı harfler örnekler arasında farkın önemli olmadığını göstermektedir (p>0.05).

¹ EP: Eritme peyniri; PPK: Proteolize peynir konsantresi; EMP: Enzim modifiye peynir

² mg tripton/g kuru madde

³ *In vitro* sindirim ortamı ayrıca analiz edilmiş ve örnekteki toplam peptit miktarının belirlenmesinde kör olarak kabul edilerek hesaplamaya dahil edilmiştir. Sindirim ortamının toplam peptit miktarı 29,71 g tripton/L *in vitro* sindirim ortamı olarak ölçülmüştür.

EMP üretiminde ilk aşama olan eritme işlemi, sitrat ve fosfat tuzları ile birlikte işlenen peynirden elde ettiğimiz ikinci örneğimiz olan eritme peynirine (EP) baktığımızda peynirden daha yüksek pH değerine sahip, SÇA ve OUI değerleri diğer örneklerden daha yüksek olduğu görülmüştür. Toplam peptit miktarına baktığımızda ise sindirim sonrasında sindirim öncesine göre artış görülmüştür.

EMP üretiminde bir sonraki aşamasında proteoliz işlemi, Erbay vd. (2018) makalesinde belirttiği “iki aşamalı üretim” tekniğinde kullandığı enzimlerinden endopeptidaz olan NeutraseTM ile ekzopeptidaz olan FlavorproTM 937 MDP enzim kombinasyonu EP’ye ilave edilerek proteolize bırakılmış ve proteolize peynir konsantresi (PPK) elde edilmiştir. Üçüncü örneğimiz olan PPK, EP’ye kıyasla daha düşük SÇA ve OUI değerlerine sahip iken daha yüksek TCA-ÇA, PTA-ÇA, OYİ ve SAAİ değerlerine sahip olduğu görülmüştür. pH değerine baktığımızda EP il PPK arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (p>0.05). PPK’nın toplam peptit miktarına baktığımızda sindirim sonrası sindirim öncesine göre artış göstermiştir, örnekler arasında sindirim sonrası en yüksek toplam peptit miktarına PPK sahiptir.

EMP üretimindeki son aşama olan lipoliz aşamasında ise LipomodTM 801MDP enzimi kullanılmış EMP elde edilmiştir (Erbay vd., 2018). Diğer örneklerle kıyasladığımızda en yüksek TCA-ÇA, OYİ ve SAAİ değerlerine sahiptir. EMP, PPK’ya kıyasla yağ, protein, pH ve TA sonuçlarında anlamlı bir şekilde azalma göstermiş iken OUI değerinde anlamlı

derecede artış göstermiştir ($p<0.05$). Toplam peptit miktarına baktığımızda sindirim sonrası sindirim öncesine göre artış göstermiş ve sindirim öncesi en yüksek toplam peptit miktarı EMP örneğinde görülmüştür.

Çalışmamızda örneklerin lipolitik olgunlaşma düzeyi hakkında fikir sahibi olmak adına serbest yağ asidi bileşim ve miktarları da belirlenmiş yapılan analizlerin sonuçları Tablo 4.3'de verilmiştir. Sonuçlara baktığımızda peynir, EP ve PPK örneklerinde serbest yağ asitlerindeki değişimin genel olarak anlamlı bir fark görülmemişken, EMP'de ise anlamlı değişimler göstermiştir ($p<0.05$). Peynir, EP ve PPK'da USYA, OUZSYA ve TSYA değerlerinde anlamlı bir fark görülmemiş ($p>0.05$), EMP'de ise USYA,OUZSYA ve TSYA değerlerinde anlamlı değişimler olmuştur ($p<0.05$).

4.2. EMP Üretiminde Antioksidan Aktivitenin Değişimi

Apostolidis vd. (2007) üç farklı peynirini farklı bitki ve meyvelerle zenginleştirilmiş ekstraktlarının antioksidan aktivitelerini değerlendirmiş. Elde ettiği sonuçlarda rokfor peynirinin bitki ve meyvelerle zenginleştirilmiş ekstrak örneklerinde *in vitro* antioksidan aktivitesinin daha yüksek olduğunu belirtmiştir. Çedar peynirinden yapmış olduğu ekstraktın ve *in vitro* sonrası ekstraktın Rafiq vd. (2017) serbest radikal süpürücü aktivite değerini araştırmışlar. Çedar peynirinden ekstraktının serbest radikalleri attığını ve *in vitro* ekstraktlarında da inhibe ettiği sonuçlar görülmektedir.

Çalışmada incelediğimiz örneklerin antioksidan aktivite kapsamında yapılan analizlerinin sonuçları Tablo 4.4'de verilmiştir. EMP üretim sürecinde alınan örneklerde (sindirim öncesi) ve bu örneklerin *in vitro* sindirim süreci sonrasındaki örneklerde (sindirim sonrası) antioksidan aktivitelerine bakılmıştır.

Serbest radikal süpürme kapasitesine baktığımızda hem sindirim öncesi hem de sindirim sonrası örneklerimizde anlamlı şekilde fark görülmüştür ($p<0.05$). Sindirim öncesinde serbest radikal süpürme kapasitesine baktığımızda en düşük antioksidan aktivite Peynir'de $12,6 \pm 0,8$ μmol troloks/g kuru madde görülmüştür, en yüksek antioksidan aktivite EMP'de $215,0 \pm 15,8$ μmol troloks/g kuru madde görülmüştür (Tablo 4.4). Sindirim öncesinde antioksidan aktiviteye baktığımızda EMP üretim aşamalarında sırasıyla peynir, EP, PPK ve EMP örneklerin hepsinde antioksidan aktivite anlamlı şekilde artış göstermiştir ($p<0.05$).

Tablo 4.3.Enzim modifiye peynir (EMP) üretiminde işlem basamaklarının serbest yağ asidi bileşim ve miktarları üzerine etkisi (mg/100 g yağ).

Özellikler*	Peynir	EP	PPK	EMP
Bütirik asit (C _{4:0})	60,53 ± 2,63 ^a (%2,35)	32,12 ± 3,19 ^a (%0,94)	16,42 ± 1,36 ^a (%0,46)	1368 ± 154,5 ^b (%4,60)
Kaproik asit (C _{6:0})	36,39 ± 3,55 ^a (%1,41)	25,18 ± 0,96 ^a (%0,74)	12,29 ± 1,23 ^a (%0,34)	729,1 ± 70,40 ^b (%2,59)
Kaprilik asit (C _{8:0})	23,52 ± 2,25 ^a (%0,91)	12,14 ± 0,95 ^a (%0,36)	2,16 ± 0,19 ^a (%0,06)	513,4 ± 49,78 ^b (%1,72)
Kaprik asit (C _{10:0})	60,16 ± 3,46 ^a (%2,34)	38,88 ± 2,35 ^a (%1,14)	24,91 ± 2,76 ^a (%0,69)	997,9 ± 64,42 ^b (%3,35)
Laurik asit (C _{12:0})	83,00 ± 4,15 ^a (%3,23)	53,30 ± 2,14 ^a (%1,56)	43,68 ± 3,48 ^a (%1,21)	1113 ± 92,77 ^b (%3,74)
Miristik asit (C _{14:0})	356,2 ± 34,3 ^a (%13,84)	266,5 ± 19,98 ^a (%7,81)	293,3 ± 25,24 ^a (%8,15)	4643 ± 398,2 ^b (%15,57)
Palmitik asit (C _{16:0})	885,1 ± 49,5 ^a (%34,40)	1208 ± 139,5 ^{ab} (%35,25)	1282 ± 80,37 ^b (%35,66)	9600 ± 458,0 ^c (%32,20)
Stearik asit (C _{18:0})	274,8 ± 14,8 ^a (%10,68)	495,7 ± 34,30 ^a (%14,48)	548,3 ± 36,71 ^a (%15,26)	2781 ± 368,8 ^b (%9,31)
Oleik asit (C _{18:1})	770,4 ± 9,5 ^a (%29,94)	1271 ± 86,77 ^{ab} (%37,12)	1343 ± 93,22 ^b (%37,35)	7724 ± 674,8 ^c (%25,87)
Linoleik asit (C _{18:2})	22,07 ± 1,14 ^a (%0,86)	18,73 ± 1,76 ^a (%0,55)	27,07 ± 2,01 ^a (%0,76)	289,5 ± 29,69 ^b (%0,97)
Linolenik asit (C _{18:3})	0,96 ± 0,12 ^a (%0,04)	2,35 ± 0,21 ^a (%0,07)	2,08 ± 0,19 ^a (%0,06)	28,27 ± 3,36 ^b (%0,10)
USYA	180,6 ± 6,1 ^a (%7,02)	108,3 ± 3,35 ^a (%3,17)	55,79 ± 4,74 ^a (%1,55)	3648 ± 323,3 ^b (%12,26)
OUZSYA	2392 ± 64 ^a (%92,98)	3316 ± 205,4 ^a (%96,83)	3540 ± 173,4 ^a (%29,5)	26176 ± 1673 ^b (%87,74)
TSYA	2573 ± 70,13 ^a	3425 ± 204,3 ^a	3596 ± 175,6 ^a	29825 ± 1592 ^b

^{a-d} Aynı harfler örnekler arasında farkın önemli olmadığını göstermektedir (p>0.05).

* Parantez içerisinde %oran değerleri verilmiştir. USYA: Uçucu serbest yağ asitleri (C_{4:0}- C_{10:0}); OUZSYA: Orta ve uzun zincirli serbest yağ asitleri (C_{12:0}- C_{18:3}); TSYA: Toplam serbest yağ asidi; EP: Eritme peyniri; PPK: Proteolize peynir konsantresi; EMP: Enzim modifiye peynir

Sindirim sonrası serbest radikal süpürme kapasitesine baktığımızda ise en düşük antioksidan aktivite Peynir’de $171,2 \pm 5,5$ μmol troloks/g kuru madde görülmüştür, en yüksek aktivite PPK’da $471,1 \pm 27,2$ μmol troloks/g kuru madde görülmüştür (Tablo 4.4). Sindirim sonrası elde ettiğimiz sonuçlara baktığımızda EP ve EMP arasında anlamlı bir fark yokken ($p>0.05$), diğer örneklerle aralarında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$).

Sindirim öncesi ve sindirim sonrasını karşılaştırdığımızda *in vitro* sindirim sonrası en yüksek artış peynir örneğinde görülürken en düşük artış EMP örneğinde görülmüştür. Çalışmamızda örneklerimizin demir bağlama kapasitesine baktığımızda hem sindirim öncesi hem de sindirim sonrası örneklerimizde anlamlı şekilde fark görülmüştür ($p<0.05$).

In vitro sindirim öncesi antioksidan aktivite demir bağlama kapasitesine baktığımızda EP ve EMP arasında anlamlı bir fark yokken ($p>0.05$), diğer örneklerle aralarında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Sindirim öncesinde demir bağlama kapasitesi sonuçlarında en düşük antioksidan aktivite gösteren örnek peynir $0,95 \pm 0,05$ mg EDTA/g kuru madde iken en yüksek antioksidan aktivite PPK’da $27,6 \pm 1,0$ mg EDTA/g kuru madde görülmüştür (Tablo 4.4).

Tablo 4.4.Enzim modifiye peynir (EMP) üretiminde işlem basamaklarının antioksidan aktivite üzerine etkileri.

Örnek ¹	Antioksidan Aktivite			
	Serbest Radikal Süpürme Kapasitesi ²		Demir Bağlama Kapasitesi ³	
	Sindirim Öncesi	Sindirim Sonrası ⁴	Sindirim Öncesi	Sindirim Sonrası
Peynir	$12,6 \pm 0,8^a$	$171,2 \pm 5,5^a$	$0,95 \pm 0,05^a$	$-3,58 \pm 0,20^a$
EP	$139,2 \pm 8,1^b$	$360,5 \pm 10,3^b$	$16,0 \pm 1,3^b$	$10,51 \pm 0,66^b$
PPK	$176,1 \pm 26,3^c$	$471,1 \pm 27,2^c$	$27,6 \pm 1,0^c$	$13,26 \pm 1,04^c$
EMP	$215,0 \pm 15,8^d$	$353,4 \pm 16,4^b$	$16,2 \pm 0,9^b$	$10,74 \pm 1,03^b$

¹ EP: Eritme peyniri; PPK: Proteolize peynir konsantresi; EMP: Enzim modifiye peynir

² μmol troloks/g kuru madde

³ mg EDTA/g kuru madde

⁴ *In vitro* sindirim ortamı ayrıca analiz edilmiş ve örnek aktivitesinin belirlenmesinde kör olarak kabul edilerek hesaplamaya dahil edilmiştir. Sindirim ortamının aktivitesi ABTS için $8.30 \mu\text{mol}$ troloks/mL *in vitro* sindirim ortamı ve demir bağlama kapasitesi için ise 407.24 mg EDTA/L *in vitro* sindirim ortamı olarak ölçülmüştür.

In vitro sindirim sonrasında antioksidan aktivite demir bağlama kapasitesine baktığımızda *in vitro* sindirim öncesi demir bağlama kapasite değerlerine kıyasla sonuçlarda düşüş gözlenmiştir. Sindirim sonrası peynir örneğinde ölçülebilir demir bağlama kapasitesi hesaplanamamıştır. Diğer örneklerde ise en düşük demir bağlama kapasitesi EP'de $10,51 \pm 0,66$ mg EDTA/g kuru madde, en yüksek demir bağlama kapasitesi PPK'da $10,74 \pm 1,03$ mg EDTA/g kuru madde görülmüştür (Tablo 4.4).

4.3. EMP Üretiminde Antihipertansif Aktivitenin Değişimi

Yapılan çalışmalara baktığımızda literatürde birçok antihipertansif aktivite çalışmasıyla karşılaşmaktayız. Bazı çalışmalar şu şekilde;

Suzuki vd. (2007) ve Tonouchi vd. (2008) yapmış oldukları çalışmada EMP'den ACE-inhibe edici iki peptit izole etmiş ve bu peptitlerin amino asit dizilerini Leu-Gln-Pro ve Met-Ala-Pro olarak tanımlamışlardır. Danimarka peyniri EMP'sinin, spontan hipertansif farelerde ACE inhibe edici aktivite ve antihipertansif aktivite gösterdiğini gözlemlemişler. Sonuç olarak, EMP örneklerinde güçlü ACE-inhibe edici aktivite saptamışlar ve bunu sağlayan peptidi Met-Ala-Pro belirlemişlerdir. Bu çalışma, EMP'nin hipertansiyon için fonksiyonel gıdalara uygulanmasının faydalı olabileceğini göstermiştir.

Hailesselassie vd. (1999) Cheddar peynirinin bir endopeptidaz olan Neutrase ile işlenmesi ile üretilen EMP'nin, bir opioid agonist peptidi olan β -casomorfın içerdiğini belirlemiştir. Ancak, oluşan bu β -casomorfın'ın proteolize dayanıklı olmadığı ve ekzopeptidaz aktivitesi ile (Debitrase ve/veya *Lactobacillus casei*'den elde edilen enzim ekstraktı) parçalandığı görülmüştür. Bu parçalanma sonucunda ise potansiyel antihipertansif etkisi olan çeşitli peptitlerin oluştuğu saptanmıştır.

Al-Dhaheri vd. (2017), az yağlı Akawi peynirlerde antihipertansif aktivitenin olgunlaşmanın etkisiyle ACE inhibitör aktivitesinde artış gözlemlediğini belirtmiştir. Olgunlaşmanın etkisiyle mozzarella peynirinde antihipertansif aktivitenin arttığını Ayyash ve Shah (2011)' de yaptıkları araştırmada bildirmiştir.

Çalışmada incelediğimiz örneklerin antihipertansif aktivite kapsamında yapılan analiz sonuçları Tablo 4.5'te verilmiştir. EMP üretim sürecinde alınan örneklerde (sindirim öncesi)

ve bu örneklerin *in vitro* sindirim süreci sonrasındaki örneklerde (sindirim sonrası) antihipertansif aktivitelere bakılmıştır.

Antihipertansif aktivite değerlerine baktığımızda hem sindirim öncesi hem de sindirim sonrası örneklerimizde anlamlı şekilde fark görülmüştür ($p<0.05$). *In vitro* sindirim öncesi antihipertansif aktivite değerlerine baktığımızda en düşük ACE inhibisyon aktivite peynir örneğinde $1,18 \pm 0,07$ μmol captopril/kg kuru madde, en yüksek ACE inhibisyon aktivite EMP’de $2,80 \pm 0,14$ μmol captopril/kg kuru madde görülmüştür (Tablo 4.5). Sindirim öncesinde antihipertansif aktivite sonuçlarımıza baktığımızda EMP üretim aşamalarında sırasıyla peynir, EP, PPK ve EMP örneklerin hepsinde antihipertansif aktivite anlamlı şekilde artış göstermiştir ($p<0.05$).

In vitro sindirim sonrası antihipertansif aktivite değerlerine baktığımızda ise peynir ve EP örnekleri arasında anlamlı bir fark yokken ($p>0.05$), diğer örneklerle aralarında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Sindirim sonrası ACE inhibisyon aktivite sonuçlarına baktığımızda birbirine yakın en düşük değer sırasıyla EP ve Peynir’de $8,51 \pm 0,51$ ile $8,96 \pm 0,06$ μM captopril/kg kuru madde görülürken, en yüksek değer EMP’de $20,69 \pm 0,61$ μM captopril/kg kuru madde görülmüştür (Tablo 4.5).

Sindirim öncesi ve sindirim sonrası sonuçları karşılaştırdığımızda *in vitro* sindirim sonrası ACE inhibisyon aktivite artışı daha fazla görülmüştür.

Tablo 4.5. Enzim modifiye peynir (EMP) üretiminde işlem basamaklarının antihipertansif aktivite (ACE-inhibisyon aktivitesi) üzerine etkileri.

Örnek ¹	Antihipertansif Aktivite ²	
	Sindirim Öncesi	Sindirim Sonrası ³
Peynir	$1,18 \pm 0,07^a$	$8,96 \pm 0,06^a$
EP	$1,67 \pm 0,11^b$	$8,51 \pm 0,51^a$
PPK	$2,09 \pm 0,13^c$	$11,84 \pm 0,88^b$
EMP	$2,80 \pm 0,14^d$	$20,69 \pm 0,61^c$

^{a-d} Aynı harfler örnekler arasında farkın önemli olmadığını göstermektedir ($p>0.05$).

¹ EP: Eritme peyniri; PPK: Proteolize peynir konsantresi; EMP: Enzim modifiye peynir

² μmol captopril/kg kuru madde

³ *In vitro* sindirim ortamı ayrıca analiz edilmiş, ancak *in vitro* sindirim ortamının antihipertansif aktivitesi saptanamamıştır.

4.4. EMP Üretiminde Antidiyabetik Aktivitenin Değişimi

Literatürde peynirlerdeki antidiyabetik aktivite üzerine yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Apostolidis vd. (2007) üç farklı peynirini farklı bitki ve meyvelerle zenginleştirilmiş ekstraktlarının α -glukosidaz ve α -amilaz inhibisyonu değerlendirmiş, α -glukosidaz ve α -amilaz inhibisyonu sonuçlarında yaban mersini ile zenginleştirilmiş peynirin en yüksek aktiviteye sahip olduğunu belirtmiştir.

Lactobacillus plantarum (NCDC 012), *Lactobacillus casei* (NCDC 297) ve *Lactobacillus brevis* (NCDC 021) isimli probiyotiklerin Kalari peynirine ilave edilmesi ile üretilen peynirlerdeki antidiyabetik aktivite değişimini Mushtaq vd. (2019) incelemiştir. Sonuç olarak üretilen peynirlerde biyoaktif peptitlerin arttığı ve α -amilaz ile α -glukozidaz inhibisyonlarında da artış olduğu belirlenmiştir.

Az yağlı Akawi peynirinde Al-Dhaheri vd. (2017) α -amilaz ve α -glukozidaz enzim aktiviteleri incelenmiştir. Sonuç olarak α -amilaz ve α -glukozidaz inhibisyonu peynirde olgunlaşma artıka aktivite artış göstermiştir.

Bu tez çalışmasında incelediğimiz örneklerin antidiyabetik aktivite kapsamında yapılan analizlerin sonuçları Tablo 4.6'da verilmiştir. EMP üretim sürecinde alınan örneklerde (sindirim öncesi) ve bu örneklerin *in vitro* sindirim süreci sonrasındaki örneklerde (sindirim sonrası) antidiyabetik aktivitelerine bakılmıştır. Çalışma sonuçlarına baktığımızda α -amilaz inhibisyon aktivitesi sindirim öncesi görülürken, sindirim sonrası aktivite görülmemektedir. Sonuçlarımızın α -glukosidaz inhibisyon aktivitesine baktığımızda ise sindirim öncesinde görülmezken, sindirim sonrasında aktivite görülmektedir (Tablo 4.6).

In vitro sindirim öncesinde antidiyabetik aktivite α -amilaz inhibisyonu sonuçlarına baktığımızda EP ile PPK arasında anlamlı fark görülmemiştir ve peynir ile EMP arasında da anlamlı fark görülmemiştir ($p>0.05$), diğer örneklerle aralarında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$). Sindirim öncesi α -amilaz inhibisyonu sonuçlarına baktığımızda birbirin yakın en düşük aktivite değerleri EP ve PPK'da görülürken, birbirine yakın en yüksek aktivite değerleri peynir ve EMP'de görülmüştür (Tablo 4.6).

In vitro sindirim sonrasında antidiyabetik aktivite α -glukosidaz inhibisyonu sonuçlarına baktığımızda ise EMP üretim aşamalarında sırasıyla peynir, EP, PPK ve EMP örneklerin hepsinde α -glukosidaz inhibisyonu genel olarak anlamlı artış göstermiştir ($p<0.05$). Sindirim sonrasında antidiyabetik aktiviteye baktığımızda en düşük α -glukosidaz inhibisyonu Peynir'de 168777 ± 13263 mg akarboz/g kuru madde görülürken, en yüksek α -glukosidaz inhibisyonu EMP'de 341838 ± 48896 mg akarboz/g kuru madde görülmüştür (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Enzim modifiye peynir (EMP) üretiminde işlem basamaklarının antidiyabetik aktivite üzerine etkileri.

Örnek ¹	Antidiyabetik Aktivite			
	α -amilaz inhibisyon aktivitesi ²		α -glukosidaz inhibisyon aktivitesi ³	
	Sindirim Öncesi	Sindirim Sonrası ⁴	Sindirim Öncesi	Sindirim Sonrası
Peynir	$830,0 \pm 36,8^b$	ND ⁵	ND	168777 ± 13263^a
EP	$624,3 \pm 37,1^a$	ND	ND	243865 ± 19867^{ab}
PPK	$637,7 \pm 52,9^a$	ND	ND	247180 ± 11768^{ab}
EMP	$810,3 \pm 31,0^b$	ND	ND	341838 ± 48896^b

^{a-d} Aynı harfler örnekler arasında farkın önemli olmadığını göstermektedir ($p>0.05$).

¹ EP: Eritme peyniri; PPK: Proteolize peynir konsantresi; EMP: Enzim modifiye peynir

² mg akarboz/g kuru madde

³ mg akarboz/g kuru madde

⁴ *In vitro* sindirim ortamı ayrıca analiz edilmiş ve örnek aktivitesinin belirlenmesinde kör olarak kabul edilerek hesaplama dahil edilmiştir. Sindirim ortamının aktivitesi α -amilaz inhibisyonu için 384,19 g akarboz/L *in vitro* sindirim ortamı olarak ölçülmüştür. α -glukosidaz inhibisyonu için ise *in vitro* sindirim ortamının herhangi bir aktivitesi saptanamamıştır.

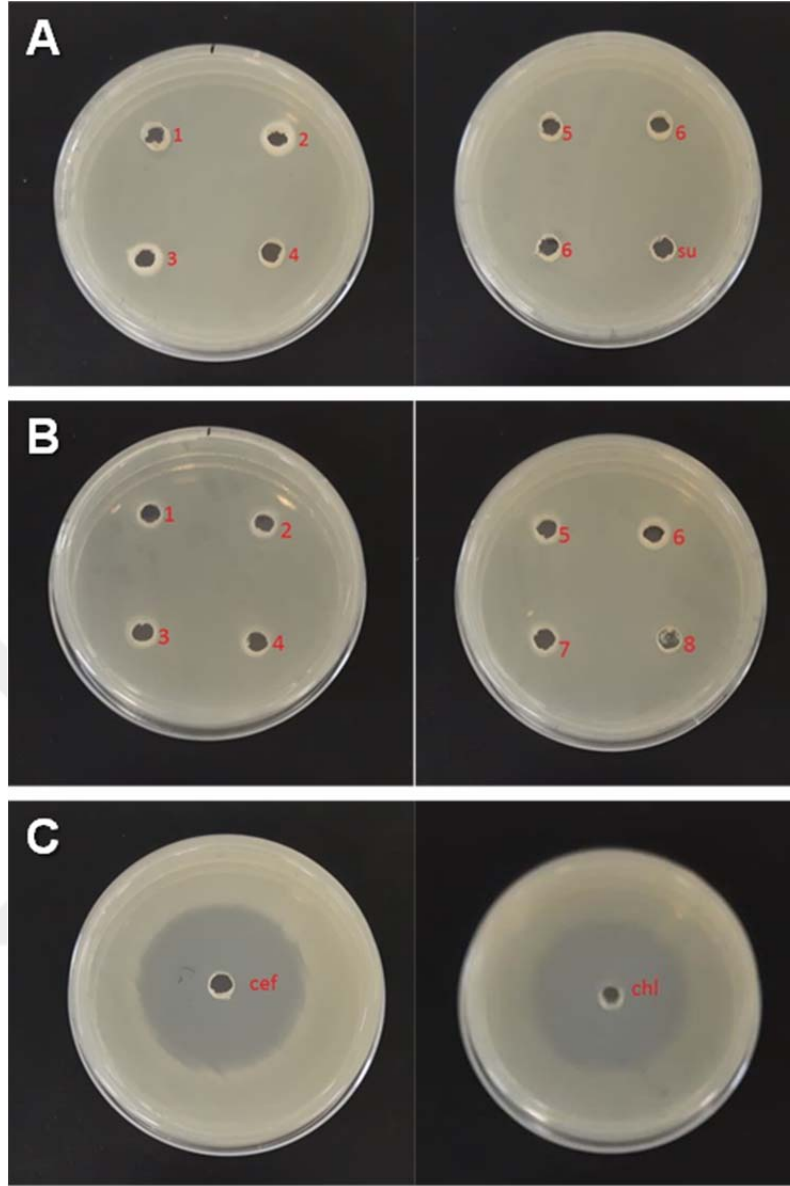
⁵ ND: saptanamamıştır.

4.5. EMP Üretiminde Antimikrobiyal Aktivitenin Değişimi

EMP'lerin antimikrobiyal etkileri üzerine Glass vd. (2004 a,b,c) yapmış olduğu çalışmalar bulunmaktadır. Laktoferrisin ve laktoferrin gibi bazı peptitler ve protein ile uçucu, orta ve uzun zincirli serbest yağ asitlerinin, az orandayken antimikrobiyal özelliklerinin olduğu görülmektedir. EMP'lerin birçoğunda, %20 oranlarında oleik asit olduğu, ayrıca linoleik, linolenik ve laurik asitlerin de yüksek konsantrasyonlarda görülmüştür. Özellikle stearik ve laurik asitlerin antibotulinal etkileri bilinmektedir. Bu etkilerden yola çıkarsak, *C.botulinum* toksin oluşturması ve gelişmesini önlemesi için EMP'nin etkileri ve değişimi araştırılmıştır. Yapılmış olan çalışmanın yağ içeriğinin etkisi de araştırılmış fakat çıkan sonuçlar çelişkili bulunmuştur.

Çalışmamızda örneklerin antimikrobiyal aktivite, Gram (-) *E.coli* bakterilerinin kullanıldığı sonuçlara baktığımızda hem *in vitro* sindirim öncesi hem de *in vitro* sindirim sonrası örneklerin herhangi bir bakteri çeşidinde büyümeleri engellediği gözlenmemiştir (Şekil 4.1). Pozitif kontrol olarak Cefotaxime ve Chloramphenicol antibiyotikleri kullanılmıştır. Cefotaxime antibiyotiğinin oluşturduğu inhibisyon bölge ortalama $2,62 \pm 0,20$ cm iken Chloramphenicol antibiyotiğinin oluşturduğu inhibisyon bölge ortalama $2,26 \pm 0,10$ cm yarıçapında görülmüştür (Tablo 4.7).

Çalışmamızda örneklerin antimikrobiyal aktivite, Gram (+) *S.aureus* bakterilerinin kullanıldığı sonuçlara baktığımızda *in vitro* sindirim öncesi örneklerin bakterilerin büyümeleri engellediği görülmemiştir (Şekil 4.2). *In vitro* sindirim sonrası örneklerinde ise Gram (+) *S.aureus* bakterilerinin büyümesini engellediği görülmüştür (Şekil 4.2). Örneklerimizin (peynir, EP, PPK, EMP) oluşturduğu inhibisyon bölgelerin yarıçapları (cm) Tablo 4.7’de verilmiştir. Sindirim sonrası oluşan antimikrobiyal etkiye baktığımızda PPK ve EMP örnekleri diğer örneklerle göre daha yüksek aktivite göstermiştir (Tablo 4.7). Pozitif kontrol olarak Cefotaxime ve Chloramphenicol antibiyotikleri kullanılmıştır. Cefotaxime antibiyotiğinin oluşturduğu inhibisyon bölge ortalama $2,70 \pm 0,12$ cm iken Chloramphenicol antibiyotiğinin oluşturduğu inhibisyon bölge ortalama $2,35 \pm 0,20$ cm yarıçapında görülmüştür (Tablo 4.7).



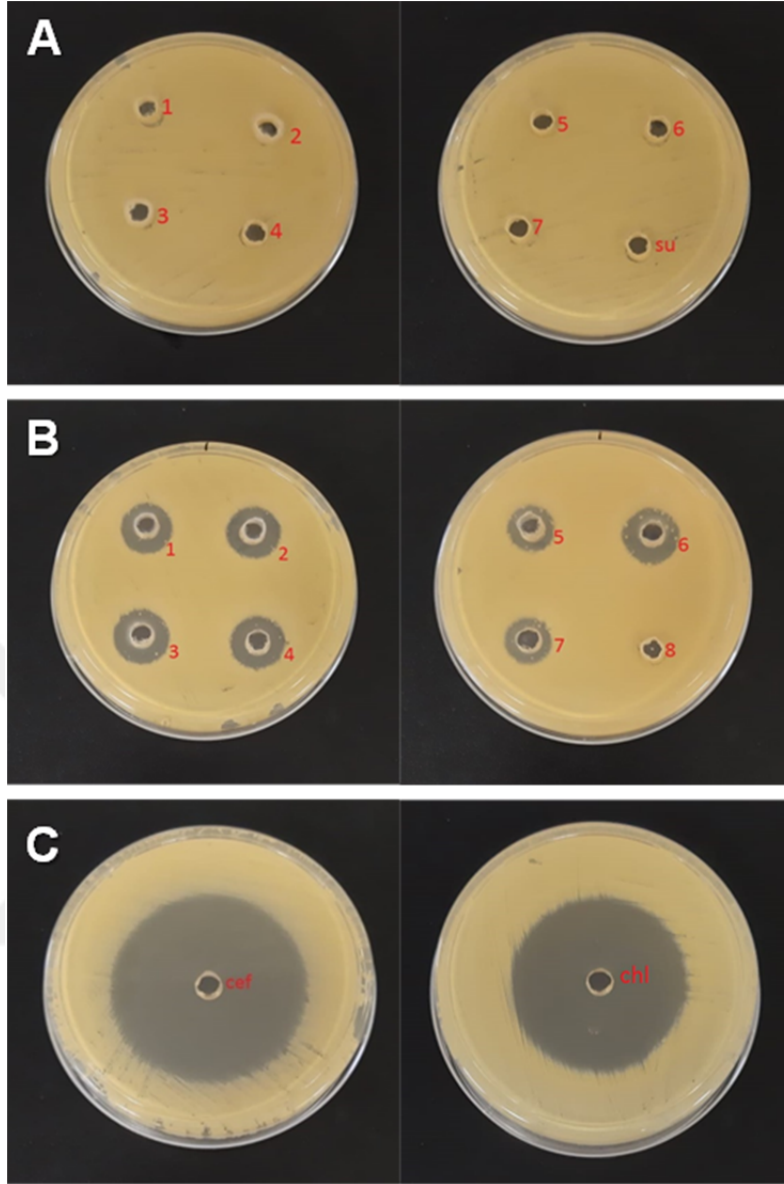
Şekil 4.1: EMP üretimindeki farklı aşamalardan alınan örneklerin suda çözünür ekstraktlarının Gram (-) *Escherichia coli* bakterileri üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin kuyucuk yayılım yöntemi ile belirlenmesi.

(A) *In vitro* sindirim süreci öncesi örnek ekstraktları.

(B) *In vitro* sindirim süreci sonrası örnek ekstraktları.

(C) Kontrol antibiyotiklerinin antimikrobiyal aktivitesi.

* ¹Peynir, ^{2,3}EP, ^{4,5}PPK, ^{6,7}EMP, ⁸*In vitro* sindirim ortamı, ^{cef}Cefotaxime (50 µg), ^{chl}Chloramphenical (50 µg)



Şekil 4.2: EMP üretimindeki farklı aşamalardan alınan örneklerin suda çözünür ekstraktlarının Gram (+) *Staphylococcus aureus* bakterileri üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin kuyucuk yayılım yöntemi ile belirlenmesi.

(A) *In vitro* sindirim süreci öncesi örnek ekstraktları.

(B) *In vitro* sindirim süreci sonrası örnek ekstraktları.

(C) Kontrol antibiyotiklerinin antimikrobiyal aktivitesi.

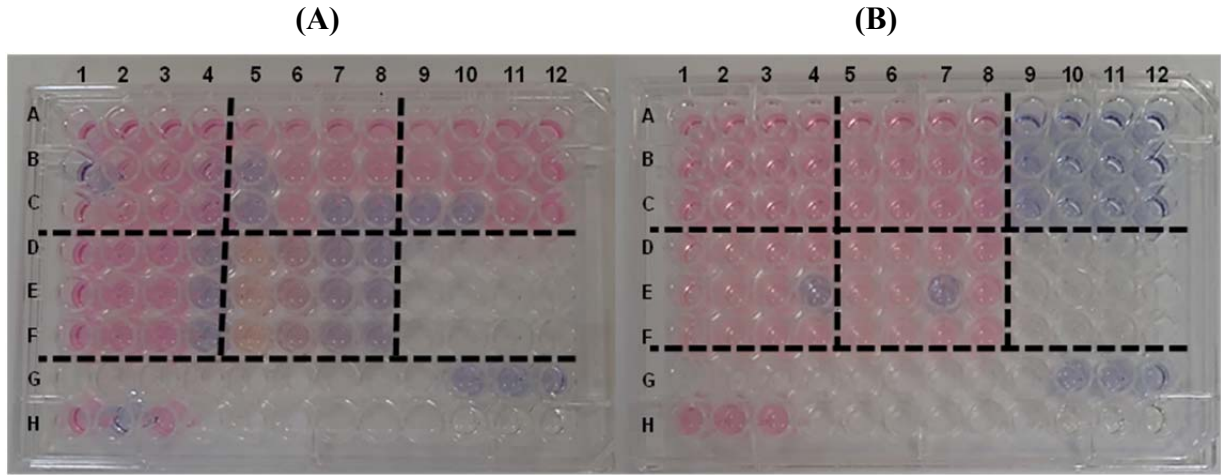
* ¹Peynir, ^{2,3}EP, ^{4,5}PPK, ^{6,7}EMP, ⁸*In vitro* sindirim ortamı, ^{cef}Cefotaxime (50 µg), ^{chl}Chloramphenical (50 µg)

Tablo 4.7. Enzim modifiye peynir (EMP) üretim aşamalarında alınan örneklerin suda çözünür ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri.

	Örnek	Mikroorganizma		Mikroorganizma	
		Gram +	İnhibisyon bölgesi	Gram -	İnhibisyon bölgesi
		<i>Staphylococcus aureus</i>	Yarıçap (cm)	<i>Escherichia coli</i>	Yarıçap (cm)
İn vitro öncesi	Peynir	-	0,6 ± 0,1	-	0,6 ± 0,1
	EP	-	0,6 ± 0,1	-	0,6 ± 0,1
	PPK	-	0,6 ± 0,1	-	0,6 ± 0,1
	EMP	-	0,6 ± 0,1	-	0,6 ± 0,1
	Su	-	0,6 ± 0,1	-	0,6 ± 0,1
	Cefotaxime	+	2,70 ± 0,12	+	2,62 ± 0,20
	Chloramphenicol	+	2,35 ± 0,2	+	2,26 ± 0,10
İn vitro sonrası	Peynir	+	0,73 ± 0,04	-	0,6 ± 0,1
	EP	+	0,79 ± 0,03	-	0,6 ± 0,1
	PPK	+	0,86 ± 0,16	-	0,6 ± 0,1
	EMP	+	0,83 ± 0,13	-	0,6 ± 0,1
	İn vitro ortam	-	0,6 ± 0,1	-	0,6 ± 0,1
	Cefotaxime	+	2,70 ± 0,12	+	2,62 ± 0,20
	Chloramphenicol	+	2,35 ± 0,20	+	2,26 ± 0,10

(+) Mikrobiyal etki vardır.

(-) Mikrobiyal etki yoktur.



Şekil 4.3: *In vitro* sindirim süreci öncesi örneklerin *Staphylococcus aureus* bakterilerinde en düşük büyüme engelleme konsantrasyonlarının (MIC değeri) resazurin boyaması ile belirlenmesi.

Örnekler plaklara yukarıdan aşağıya 3 tekrarlı olarak yerleştirilmiştir. Bakteri çoğalması kuyucuklarda maviden pembeye renk değişimi ile gözlenmiştir. Örnek konsantrasyonları soldan sağa seri dilüsyon ile 1, 1/2, 1/4, 1/8 oranında azaltılarak seyreltilmiştir. MIC değeri seri dilüsyonda mavi rengin ilk görüldüğü kuyucuk olarak belirlenmiştir. Örnek bölgeleri kesikli çizgilerle ayrılmıştır.

Plak yerleşimi:

(A) A-C, 1-4 Peynir; A-C, 5-8 EP; A-C, 9-12 EP; D-F, 1-4 Su; D-F, 5-8 Cefotaxime; H, 1-3 Bakteri+Resazurin; G,10-12 Büyüme ortamı+Resazurin; H 10-12, Büyüme ortamı.

(B) A-C, 1-4, PPK; A-C, 5-8 PPK; A-C, 9-12 Chloramphenicol; D-F, 1-4 EMP, D-F, 5-8 EMP; H, 1-3 Bakteri+Resazurin; G,10-12 Büyüme ortamı+Resazurin; H 10-12, Büyüme ortamı.



Şekil 4.4: *In vitro* sindirim süreci sonrası örneklerin *Staphylococcus aureus* bakterilerinde en düşük büyüme engelleme konsantrasyonlarının (MIC değeri) resazurin boyaması ile belirlenmesi.

Örnekler plaklara yukarıdan aşağıya 3 tekrarlı olarak yerleştirilmiştir. Bakteri çoğalması kuyucuklarda maviden pembeye renk değişimi ile gözlenmiştir. Örnek konsantrasyonları soldan sağa seri dilüsyon ile 1, 1/2, 1/4, 1/8 oranında azaltılarak seyreltilmiştir. MIC değeri seri dilüsyonda mavi rengin ilk görüldüğü kuyucuk olarak belirlenmiştir. Örnek bölgeleri kesikli çizgilerle ayrılmıştır.

Plak yerleşimi:

(A) A-C, 1-4 Peynir; A-C, 5-8 EP; A-C, 9-12 EP; D-F, 1-4 Su; D-F, 5-8 Cefotaxime; H, 1-3 Bakteri+Resazurin; G,10-12 Büyüme ortamı+Resazurin; H 10-12, Büyüme ortamı.

(B) A-C, 1-4, PPK; A-C, 5-8 PPK; A-C, 9-12 Chloramphenicol; D-F, 1-4 EMP, D-F, 5-8 EMP; H, 1-3 Bakteri+Resazurin; G,10-12 Büyüme ortamı+Resazurin; H 10-12, Büyüme ortamı.

In vitro sindirim işlemi sonrasında farklı örneklerin suda çözünür ekstraktlarının, *S.aureus* bakterileri üzerinde etkili olabilecekleri “en düşük büyüme engelleyici konsantrasyonları”nı (MIC değeri) belirlemek amacıyla 96 kuyucuklu plakalarda resazurin boyaması gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.3, 4.4). Kullanılan yöntemin temelinde; aktif bakteri hücrelerinin floresan olmayan mavi renkli resazurini, pembe renkli floresan resorufine çevirmeleri ve metabolik aktivitelerinin yarı-kantitatif şekilde belirlenmesi bulunmaktadır (O’Brien vd., 2000). Sonuçlar incelendiğinde kuyucuk yayılım sonuçlarıyla uyumlu bir şekilde *in vitro* sindirim süreci öncesi örneklerde konsantrasyona bağlı herhangi bir renk değişimi gözlenmemiştir. Ancak *in vitro* sindirim süreci sonrası peynir, EP, PPK ve EMP örneklerinde MIC değerleri sırasıyla 9.4, 26.8, 13.3 ve 11.5 mg kurumadde/mL olarak belirlenmiştir.

5. SONUÇLAR

Tez çalışmamızda taze beyaz peynirden, olgun beyaz peynir lezzetinde bir sıvı EMP üretimi gerçekleştirilmiştir. EMP üretim aşamalarında örnekler alınıp, bu aldığımız örneklerin temel bileşim ve olgunlaşma parametrelerindeki değişimler ve biyoaktivite özelliklerindeki değişimler analiz edilmiştir. Biyoaktivite kapsamında alınan örneklerin antioksidan, antihipertansif, antidiyabetik ve antimikrobiyal özellikleri analiz edilmiştir. Çalışmamızda örnekler EMP üretiminde hammadde olarak kullanılan beyaz peynir, eritme tuzları ile eritme işlemi sonucu oluşan eritme peynir, proteolitik enzimlerin aktivitesiyle oluşan proteolize peynir konsantresi ve lipolitik enzim aktivitesiyle oluşan son ürün EMP örnek olarak alınmıştır. EMP üretim sürecinde alınan örneklerde (sindirim öncesi) ve bu örneklerin *in vitro* sindirim süreci sonrasındaki örneklerde (sindirim sonrası) analizler yapılmış ve sonuçları değerlendirilmiştir.

Çalışmamız sonucunda elde edilen temel sonuçlar aşağıda maddeler halinde yazılmıştır:

- EMP üretimi sürecinde yağ ve protein değerleri peynirden itibaren azalma göstermiştir, EP ve PPK arasındaki azalmanın önemsiz olduğu görülmüştür.
- pH değerine baktığımızda peynire kıyasla eritme işlemi ile EP’de arttığı, proteolizle PPK’da değişmediği ve lipolizle EMP’de azaldığı peynirinin başlangıçtaki pH değeri düzeylerine düştüğü görülmüştür.
- Toplam azot (TA) sonuçlarımızda en yüksek değer peynirde görülken en düşük değer lipoliz ile birlikte EMP’de görülmüştür, EP ve PPK arasındaki azalmanın önemsiz olduğu görülmüştür.
- Suda çözünür azot (SÇA) sonuçlarımızda en düşük değer peynirde iken eritme işlemiyle en yüksek değere EP sahip olduğu görülmüştür, PPK ve EMP arasındaki artışın önemsiz olduğu görülmüştür.
- TCA’da çözünür azot (TCA-ÇA) sonuçlarımızda en yüksek değer EMP’de iken en düşük değer EP’de görülmektedir.
- PTA’da çözünür azot (PTA-ÇA) sonuçlarımıza baktığımızda aralarındaki önemsiz farktan dolayı en düşük değerler peynir ile EP’de görülmüşken en yüksek değerler ise PPK ile EMP’de görülmüştür.

- OUI değerlerine baktığımızda peynir örneğine göre EP, PPK ve EMP artış göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek değer EP’de iken en düşük değer ise PPK’da görülmüştür.
- OYİ değerlerine baktığımızda peynir örneğine göre EP azalış gösterirken PPK ile EMP artış göstermiştir. Sonuçlara göre en yüksek değer EMP’de görülmüş en düşük değer EP’de görülmüştür.
- SAAİ değerlerine baktığımızda peynir örneğine göre EP azalış gösterirken PPK ile EMP artış göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek değer EMP’de görülmüş en düşük değer EP’de görülmüştür.
- Çalışmamızda antioksidan aktivite serbest radikal süpürme kapasite değerleri sindirim öncesi örneklerde anlamlı şekilde artışlar görülmüştür ve $12,6 \pm 0,8$ ile $215,0 \pm 15,8$ μmol troloks/g kuru madde aralığında değişiklik göstermiştir. Serbest radikal süpürme kapasite değerleri *in vitro* sindirim sonrası örneklerde ise genel olarak anlamlı artışlar görülmüştür ve değerler $171,2 \pm 5,5$ ile $471,1 \pm 27,2$ μmol troloks/g kuru madde arasında değişiklik göstermiştir.
- Çalışmamızda antioksidan aktivite demir bağlama kapasiteleri sindirim öncesi örneklerde $0,95 \pm 0,05$ ile $27,6 \pm 1,0$ mg EDTA/g kuru madde arasında değişiklik göstermiştir. *In vitro* sindirim sonrasında örneklerde antioksidan aktivite sindirim öncesi antioksidan aktivite değerlerine göre düşüş göstermiş ve özellikle peynir örneğinde ölçülebilir bir demir bağlama kapasitesi hesaplanamamıştır.
- Çalışmamızda antihipertansif aktivite değerlerine baktığımızda sindirim öncesi örneklerde anlamlı artışlar görülmüştür. Antihipertansif aktivite değerleri $1,18 \pm 0,07$ ile $2,80 \pm 0,14$ μmol captopril/kg kuru madde arasında değişiklik göstermiştir. *In vitro* sindirim sonrasında tüm örneklerinin antihipertansif aktivite sindirim öncesine göre artarak $8,51 \pm 0,51$ ile $20,69 \pm 0,61$ μM captopril/kg kuru madde arasında değişiklik göstermiştir.
- Antidiyabetik aktiviteye baktığımızda α -amilaz inhibisyonu *in vitro* sindirim öncesi örneklerde inhibisyon $624,3 \pm 37,1$ ile $830,0 \pm 36,8$ mg akarboz/g kuru madde değerleri arasında görülmüşken, *in vitro* sindirim sonrası α -amilaz inhibisyonu görülmemiştir. Örneklerimizde α -glukozidaz inhibisyonu *in vitro* sindirim öncesi inhibisyon görülmemişken, *in vitro* sindirim sonrasında α -glukozidaz inhibisyon görülmüştür. En yüksek α -glukozidaz inhibisyon aktivitesi EMP’de 341838 ± 48896 mg akarboz/g kuru madde olarak görülmüştür.

- Antimikrobiyal aktivite için örneklerimizin *in vitro* sindirim öncesinde *S. aureus* ve *E. coli* üzerinde antimikrobiyal etki görülmemiştir. Örneklerimiz *in vitro* sindirim sonrası *E. coli* üzerinde antimikrobiyal etki görülmemişken, *S. aureus* üzerinde örneklerimizin antimikrobiyal etkisi belirlenmiştir. Örneklerimiz sindirim sonrası *S. aureus* bakterilerinin büyümelerini engellediği görülmüştür. Yapılan analizler sonucunda *in vitro* sindirim süreci sonrası peynir, EP, PPK ve EMP örneklerinde MIC değerleri sırasıyla 9.4, 26.8, 13.3 ve 11.5 mg kurumadde/mL olarak belirlenmiştir.

Bu çalışma sonucunda EMP'nin biyoaktif niteliklerinin bulunduğu ve sağlık üzerinde olumlu etkiler gösterme potansiyeline sahip olduğu ortaya konulmuştur. Üretim sürecinde oluşan bileşenlerin biyoaktif niteliklerinin ayrıntılı çalışılması ve olumlu sağlık etkilerinin ürün içerisinde de sürüp sürmediğinin ortaya konulması gerekmektedir. EMP'nin vücut fonksiyonlarını olumlu etkileyen biyoaktif bileşenleri üzerinde araştırmalar derinleştirilmelidir. Yapılan araştırmalar sonucunda EMP'nin kullanım alanları genişletilebilir.

KAYNAKLAR

- Al-Dhaheri A. S., Al-Hemeiri R., Kizhakkayil J., Al-Nabulsi A., Abushelaibi A., Shah N. P. and Ayyash M. (2017). "Health-promoting benefits of low-fat akawi cheese made by exopolysaccharide-producing probiotic *Lactobacillus plantarum* isolated from camel milk". *J. Dairy Sci.* 100:7771–7779 <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12761>
- Ali, B., Khan, K.Y., Majeed, H., Abid, M., Xu, L., Wu, F., Tao, H., Xu, X. (2017a). "Imitation of soymilk–cow's milk mixed enzyme modified cheese: their composition, proteolysis, lipolysis and sensory properties". *Journal of Food Science and Technology*, 54, 1273–1285.
- Ali, B., Khan, K.Y., Majeed, H., Abid, M., Xu, L., Wu, F., Xu, X. (2017b). "Soy milk ACE-inhibiting enzyme modified cheese". *Food Chemistry*, 237, 1083–1091.
- Amelia, I., Drake, M.A., Nelson, B., Barbano, D.M. (2013). "A new method for the production of low-fat Cheddar cheese". *Journal of Dairy Science*, 96, 4870–4884.
- Amighi, F., Emam-Djomeh, Z., Madadlou, A. (2013). "Spray drying of ACE-inhibitory enzyme-modified white cheese". *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 2276–2282.
- Amighi, F., Emam-Djomeh, Z., Madadlou, A. (2016). "Optimised production and spray drying of ACE-inhibitory enzyme-modified cheese". *Journal of Dairy Research*, 83, 125–134.
- AOAC International. (2012a). "Loss on Drying (Moisture) in Cheese". Official Method 926.08. Official Methods of Analysis of AOAC International (19. Basım). Editör: Latimer Jr., G.W. Gaithersburg, MA: AOAC International.
- AOAC International. (2012b). "Fat Content of Raw and Pasteurized Whole Milk, Gerber Method by Weight". Official Method 2000.18. Official Methods of Analysis of AOAC International (19. Basım). Editör: Latimer Jr., G.W. Gaithersburg, MA: AOAC International.
- AOAC International. (2012c). "Determination of Nitrogen (Total) in Cheese, Kjeldahl Method". Official Method 2001.14. Official Methods of Analysis of AOAC International (19. Basım). Editör: Latimer Jr., G.W. Gaithersburg, MA: AOAC International.

- 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 and Emerging Technologies* 8 (2007) 46–54.
- Ay, C., Şanlı, T. (2018). "Süt proteinlerinde biyoaktif peptitlerin oluşumu ve fonksiyonel özellikleri", *ADÜ Ziraat Dergisi*, 15(1), 115-120.
- Ayyash, M.M., Sherkat, and Shah N. P. (2011). "Proteolysis of low-moisture Mozzarella cheese as affected by substitution of NaCl with KCl" . School of Biomedical and Health Sciences, Victoria University, Werribee Campus, PO Box 14428, Melbourne, Victoria 8001, Australia.
- Azarnia, S., Lee, B.H., Yaylayan V., Kilcawley, K.N. (2010). "Proteolysis development in enzyme-modified Cheddar cheese using natural and recombinant enzymes of *Lactobacillus rhamnosus* S93", *Food Chemistry*, 120, 174-178.
- Bas, D., Kendirci, P., Salum, P., Govce, G., Erbay, Z., (2019). "Production of enzyme-modified cheese (EMC) with ripened white cheese flavour: I-effects of proteolytic enzymes and determination of their appropriate combination". *Food and Bioproducts Processing*, 117, 287-301.
- Bassan, J.C., Goulart, A.J., Nasser, A.L.M., Bezerra, T.M.S., Garrido, S.S., Rustiguel, C.B., Guimaraes, L.H.S., Monti, R. (2015). "Buffalo cheese whey proteins, identification of a 24 kDa protein and characterization of their hydrolysates: *in vitro* gastrointestinal digestion". *PLoS ONE*, 10(10), e0139550.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *LWT - Food Science and Technology*, 28, 25–30.
- Britz, T. J., Robinson, R. K. (2008). "Advanced Dairy Science and Technology", Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A.R., Martins, C., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Minekus, M., Portmann, R., Santos, C.N., Souchon, I., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Recio, I., (2019). "INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion". *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014.

- Bütikofer, U., Rüegg, M., Ardö, Y. (1993). "Determination of nitrogen fractions in cheese: Evaluation of a collaborative study", *Food Science and Technology – Lebensmittel – Wissenschaft & Technologie*, 26(3), 271-275.
- Çam, M., İçyer, N. C. (2015). "Phenolics of pomegranate peels: extraction optimization by central composite design and alpha glucosidase inhibition potentials", *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1489-1497.
- Carter, P. (1971). "Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine)". *Analytical Biochemistry*, 40(2), 450–458.
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., Catignani, G. L. (1983). "Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins". *Journal of Dairy Science*, 66(6), 1219–1227.
- Clare, D. A., Swaisgood, H. E. (2000). "Bioactive milk peptides: A prospectus", *Journal of Dairy Science*, 83, 1187-1195.
- da Silva, D.F., Larsen, F.H., Hougaard, A.B., Ipsen, R. (2017). "The influence of raw material, added emulsifying salt and spray drying on cheese powder structure and hydration properties". *International Dairy Journal*, 74, 27–38.
- da Silva D.F., Ahrné, L., Larsen, F.H., Hougaard, A.B., Ipsen, R. (2018a). "Physical and functional properties of cheese powders affected by sweet whey powder addition before or after spray drying". *Powder Technology*, 323, 139–148.
- da Silva D.F., Hirschberg, C., Ahrné, L., Hougaard, A.B., Ipsen, R. (2018b). "Cheese feed to powder: Effects of cheese age, added dairy ingredients and spray drying temperature on properties of cheese powders". *Journal of Food Engineering*, 237, 215–225.
- De Jong, C., Badings, H.T. (1990). "Determination of free fatty acids in milk and cheese procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis", *Journal of High Resolution Chromatography*, 13, 94-8.
- De Leo, F., Panarese, S., Gallerani, R., Ceci, L. (2009). "Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides: Production and implementation of functional food", *Current Pharmaceutical Design*, 15(31), 3622–3643.
- Deeth, H.C., Gerald, F., Snow, J. (1983). "A gas chromatographic method for the quantitative determination of free fatty acids in milk and milk products", *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 18, 13-20.

- Diplock, A., Aggett, P., Aswell, M., Bornet, F., Fren, E., Roberfroid, M. (1999). "Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus Document". *British Food Journal* 81: 1-27.
- Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., Banat, I. M., (2016). "Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants". *Biotechnol Lett*, 38:1015–1019.
- Erbay, Z., Koca, N. (2015). "Effects of whey or maltodextrin addition during production on physical quality of white cheese powder during storage". *Journal of Dairy Science*, 98, 8391–8404.
- Erbay, Z., Koca, N. (2019). "Effects of using whey or maltodextrin in white cheese powder production on free fatty acid content, nonenzymatic browning and oxidation degrees during storage". *International Dairy Journal*, 96, 1–9.
- Erbay, Z., Koca, N., Kaymak-Ertekin, F., Ucuncu, M. (2015). "Optimization of spray drying process in cheese powder production", *Food and Bioproducts Processing*, 93, 156-165.
- Erbay, Z., Baş, D., Kendirci, P., Çam, M., Kelebek, H., Salum, P., Selli, S. (2016). "Lezzet katkısı olarak peynir ve enzim modifiye peynir tekniğinde güncel durum", *Akademik Gıda*, 14(2), 209-217.
- Erbay, Z., Baş, D., Kendirci, P., Çam, M., Kelebek, H., Salum Erbay, P., Berktaş, S., (2018). "Olgun Beyaz Peynir Lezzetine Sahip Mikroenkapsüle Enzim Modifiye Peynir Tozu Üretimi". TÜBİTAK Program Kodu: 3501, Proje No: 115O229, Proje Sonuç Raporu, Adana, Türkiye.
- Erbay, Z., Salum, P., Kilcawley, K. N., (2021). "Enzyme modified cheese". *Agents of Change: Enzymes in Milk and Dairy Products*. Editörler: Kelly, A., Larsen, L.B. New York, USA. Springer, 397-416.
- Farkye, N.Y., Arnold, M. (2008). "A novel technology for making lowfat cheese". In: *Jt. Annu. Meet. Abstr. Abstr. No140, Dairy Foods Division*. p.154.
- Fox, P. F. (2011). "History of Dairy Products and Processes", *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2. Basım), Elsevier Academic Press.
- Fox, P. F., McGuffey, R. K., Shirley, J. E., Cogan, T. M. (2011). "History of Dairy Science and Technology". *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2. Basım). Editorler: Fuquay, J. W., Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. London, UK: Elsevier Academic Press.
- Funke-Gerber. (2018). "Laboratory catalogue for milk analysis". http://www.funke-gerber.de/FG_Kat_ENG.pdf Son erişim tarihi: 21 Haziran 2019.

- Glass, K.A., Johnson, E.A. (2004a). "Antagonistic effect of fat on the antibotulinal activity of food preservatives and fatty acids", *Food Microbiology*, 21, 675–682.
- Glass, K.A., Johnson, E.A. (2004b). "Factors that contribute to the botulinal safety of reduced-fat and fat-free process chesse products", *Journal of Food Protection*, 67, 1687–1693.
- Glass, K.A., Johnson, E.A. (2004c). "Antibotulinal activity of process cheese ingredients". *Journal of Food Protection*, 67, 1765–1769.
- Gür, F., Güzel, M., Öncül, N., Yıldırım, Z., Yıldırım, M. (2010). "Süt serum proteinleri ve türevlerinin biyolojik ve fizyolojik aktiviteleri", *Akademik Gıda*, 8(1), 23-31.
- Habibi-Najafi, M.B., Lee, B.H. (2007). "Debittering of tryptic digests from β -casein and enzyme modified cheese by x-prolyl dipeptidylpeptidase from *Lactobacillus casei* ssp. LLG", *Iranian Journal of Science and Technology*, Transaction A, 31, No.A3.
- Habibi-Najafi, M.B., Sabouri, S., Mahallati, M.N. (2010). "Formulation optimization of process cheese using enzyme modified cheese". In: Int. Conf. *Food Science and Technology*. 22nd-24th March, Univ. Chester. pp L34, 43.
- Haileselassie, S.S., Lee, B.H., Gibbs, B.F. (1999). "Purification and identification of potentially bioactive peptides from enzyme-modified cheese", *Journal of Dairy Science*, 82(8), 1612-1617.
- Hannon, J.A., Kilcawley, K.N., Wilkinson, M.G., Delahunty, C.M., Beresford, T.P. (2006). "Production of ingredient-type Cheddar cheese with accelerated flavor development by addition of enzyme-modified cheese powder", *Journal of Dairy Science*, 89, 3749-3762.
- Hassan, A.N., Awad, S., Mistry, V.V. (2007). "Reduced fat process cheese made from young reduced fat Cheddar manufactured with exopolysaccharide-producing cultures", *Journal of Dairy Science*, 90(8), 3604-3612.
- Hulin-Bertaud, S., Kilcawley, K.N., Wilkinson, M.G., Delahunty, C.M. (2000). "Sensory and compositional relationships between commercial Cheddar-flavored enzyme-modified cheeses and natural Cheddar", *Journal of Food Science*, 65(6), 1076-1082.
- IDF (International Dairy Federation). (2018). "The World Dairy Situation 2018". Bulletin of the International Dairy Federation, 494/2018. Brussels, Belgium: IDF.

- Isobe, N., Suzuki, M., Oda, M. Tanabe, S. (2008). "Enzyme-modified cheese exerts inhibitory effects on allergen permeation in rats suffering from indomethacin-induced intestinal inflammation", *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 72(7), 1740-1745.
- Kendirci, P., Salum, P., Bas, D., Erbay, Z., (2020). "Production of enzyme-modified cheese (EMC) with ripened white cheese flavour: II-Effects of lipases". *Food and Bioproducts Processing*, 122, 230-244.
- Kilara, A., Chandan, R.C. (2011). "Enzyme-modified dairy ingredients". *Dairy Ingredients for Food Processing*. Editörler: Chandan, R.C., Kilara, A. West Sussex, UK: Wiley-Blackwell.
- Kilcawley, K. N., Wilkinson, M. G., Fox, P. F. (1998). "Enzyme-modified cheese", *International Dairy Journal*, 8(1), 1-10.
- Kilcawley, K. N., Wilkinson, M. G., Fox, P. F. (2000). "A survey of the composition and proteolytic indices of commercial enzyme-modified Cheddar cheese", *International Dairy Journal*, 10, 181-190.
- Kilcawley, K. N., Wilkinson, M. G., Fox, P. F. (2001). "A survey of lipolytic and glycolytic end-products in commercial Cheddar enzyme-modified cheese", *Journal of Dairy Science*, 84, 66-73.
- Kilcawley, K. N., Wilkinson, M. G., Fox, P. F. (2006). "A novel two-stage process for the production of enzyme-modified cheese", *Food Research International*, 39, 619-627.
- Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., Lee, C. Y. (2002). "Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3713–3717.
- Kim, Y. M., Wang, M. H., Rhee, H. I. (2004). "A novel α -glucosidase inhibitor from pine bark". *Carbohydrate Research*, 339(3), 715–717.
- Kınık, Ö., Gürsoy, O. (2002). "Süt proteinleri kaynaklı biyoaktif peptitler", *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(2), 195-203.
- Koca, N., Erbay, Z., Kaymak-Ertekin, F. (2015). "Effects of spray drying process conditions on the chemical, physical and sensory properties of cheese powder", *Journal of Dairy Science*, 98(5), 2934-2943.
- Korhonen, H. (2002). "Technology options for new nutritional concepts", *International Journal of Dairy Technology*, 55(2), 79-88.

- Korhonen, H., Pihlanto, A. (2003). "Food bioactive peptides: Opportunities for designing future foods", *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1297-1308.
- Korhonen, H., (2009). "Milk-derived bioactive peptides: From science to applications", *Journal of Functional Foods*, 1, 177-187.
- Kumar, S., Jha, Y.K., Singh, P. (2013). "Influence of adjuncts as debittering aids on the sensory and biochemical properties of enzyme modified cheese-base", Proceedings of the National Academy of Sciences, *India Section B - Biological Sciences*, 83(3), 347-355.
- Law, B.A. (2010). "Enzymes in Dairy Product Manufacture". *Enzymes in Food Technology* (2. Basım). Editörler: Whitehurst, R.J., van Oort, M. West Sussex, UK: Wiley-Blackwell.
- Lee, B.H., Kilcawley, K.N., Hannon, J.A., Park, S.Y., Wilkinson, M.G., Beresford, T.P. (2007). "The use of viable and heat-shocked *Lactobacillus helveticus* DPC 4571 in enzyme-modified cheese production", *Food Biotechnology*, 21(2), 129-143.
- Marciniak, A., Suwal, S., Naderi, N., Poulet, Y., Doyen, A. (2018). "Review: Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology", *Trends in Food Science & Technology*, 80, 187-198.
- McSweeney, P. L. H., Fox, P. F. (1997). "Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review", *Lait* 80 (2000) 293-324, Doi: 10.1051/lait:2000127
- McSweeney, P. L. H., Sousa M. (2000). "Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening", *Lait*, 77, 41-76.
- Miller, G. L. (1959). "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar". *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carri, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Enard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W., Brodkorb, A. (2014). "A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus", *Food & Function*, 5, 1113-1124.

- Miri, M.A., Habibi-Najafi, M.B. (2011). "The effect of adding enzyme-modified cheese on sensory and texture properties of low- and high-fat cream cheeses", *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 92-98.
- Moosavi-Nasab, M., Radi, M., Jouybari, H.A. (2010). "Investigation of enzyme modified cheese production by two species of *Aspergillus*", *African Journal of Biotechnology*, 9(4), 508-511.
- Moskowitz, G. J., Noelck, S. S. (1987). "Enzyme-modified cheese technology", *Journal of Dairy Science*, 70, 1761-1769.
- Mushtaq, M., Gani, A., Masoodi, F.A. (2019). "Himalayan cheese (Kalari) fermented with different probiotic strains: *In vitro* investigation of nutraceutical properties", *LWT - Food Science and Technology*, 104 (2019) 53–60.
- Noronha, N., Cronin, D.A., O’Riordan, D., O’Sullivan, M. (2008a). "Flavouring of imitation cheese with enzyme-modified cheeses (EMCs): Sensory impact and measurement of aroma active short chain fatty acids (SCFAs)", *Food Chemistry*, 106, 905-913.
- Noronha, N., Cronin, D.A., O’Riordan, D., O’Sullivan, M. (2008b) "Flavouring reduced fat high fibre cheese products with enzyme-modified cheeses (EMCs)", *Food Chemistry*, 110, 973-978.
- Otag, F. B., Hayta, M. (2013). "Gıdalarda biyoaktif peptit oluşumu ve aktivitesi üzerine ısıtma işlem ve fermentasyonun etkileri", *Gıda*, 38(5), 307-314.
- Ozen, A. E., Pons, A., Tur, J. A. (2012). "Worldwide consumption of functional foods: a systematic review", *Nutrition Reviews*, 70(8), 472-481.
- O’Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. (2000). "Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity". *European Journal of Biochemistry*, 267, 5421–5426.
- Park, S.Y., Gibbs, B.F., Lee, B.H., (1995). "Effects of crude enzyme of *Lactobacillus casei* LLG on water-soluble peptides of enzyme-modified cheese". *Food Research International*, 28, 43–49.
- Pereira, C.I., Gomes, E.O., Gomes, A.M.P., Malcata, F.X. (2008). "Proteolysis in model Portuguese cheeses: Effects of rennet and starter culture", *Food Chemistry*, 108, 862-868.
- Pripp, A.H., Sorensen, R., Stepaniak, L., Sorhaug, T. (2006). "Relationship between proteolysis and angiotensin-I-converting enzyme inhibition in different cheeses". *LWT*, 39(6), 677-683.

- Rafiq, S., Huma, N., Gulzar, N., Pasha, I., Shahid, M. and Xiao, H., (2017). "Exposure of raw-264.7 macrophage cell line to water-soluble extract of cheddar cheese assessment of antioxidant activity". *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 27(2): 2017, Page: 611-616 ISSN: 1018-7081.
- 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, 1231–1237.
- Rizzello, C. G., Losito, I., Gobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M. D., Zambonin, P.G. (2005). "Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties", *Journal of Dairy Science*, 88(7), 2348–2360.
- Sahin, C.C., Erbay, Z., Koca, N. (2018). "The physical, microstructural, chemical and sensorial properties of spray dried full-fat White cheese powders stored in different multilayer packages". *Journal of Food Engineering*, 229, 57–64.
- Salum, P., Erbay, Z., Selli, S. (2019). "The compositional properties, proteolytic-lipolytic ripening parameters, and volatile compositions of commercial enzyme-modified cheeses (EMCs) with different cheese flavours", *International Journal of Dairy Technology*, <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12591>, baskıda.
- Semen, Z., Altıntaş, A. (2015). "Sütte biyoaktif peptitler ve biyolojik önemi", *Türk Veteriner Hekimleri Birliği Dergisi*, 3-4, 67-84.
- Shalaby, S. M., Zakora, M., Otte, J. (2006). "Performance of two commonly used angiotensin-converting enzyme inhibition assays using FA-PGG and HHL as substrates". *Journal of Dairy Research*, 73(2), 178–186.
- Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B., Lugasi, A. (2008). "Functional Food: Product development, marketing and consumer acceptance – A review", *Appetite*, 51, 456-467.
- Soccol, C.R., Medeiros, A.B.P., Vandenberghe, L.P.S., Woiciechowski, A.L. (2007). "Flavor compounds produced by fungi, yeasts, and bacteria". *Handbook of Food Products Manufacturing*. Editör: Hui, Y.H. West Sussex, UK: Wiley-Blackwell.
- Sudhir, K., Jha, Y.K., Pratibha, S. (2010). "Influence of adjuncts as a debittering aids in encountering the bitterness developed in cheese slurry during accelerated ripening", *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1403-1409.
- Suzuki, M., Uchida, M., Tonouchi, H., Oda, M. (2007). "Inhibition of angiotensin I converting enzyme and hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats by enzyme-modified cheese". *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 54, 181–186.

- Tanabe, S., Isobe, N., Miyauchi, E., Kobayashi, S., Suzuki, M., Oda, M. (2006). "Identification of a peptide in enzymatic hydrolysate of cheese that inhibits ovalbumin permeation in Caco-2 cells", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18), 6904-6908.
- Tonouchi, H., Suzuki, M., Uchida, M., Oda, M. (2008). "Antihypertensive effect of an angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from enzyme modified cheese", *Journal of Dairy Research*, 75, 284-90.
- Topçu, A. (2004). "Kaşar ve beyaz peynirlerde acılaşmaya yol açan peptidlerin saptanması ve acılaşmada depolama koşulları ile starter kültürlerin etkisinin incelenmesi", Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı.
- USK (Ulusal Süt Konseyi), (2018). "Dünya ve Türkiye’de süt sektörü istatistikleri", Ankara, Türkiye.
- Ünal, M. Ü., Şener, A., Cemek, K., (2018). "Biyoaktif peptitlerin sağlık üzerine etkileri", *Gıda*, 43(6), 930-942.
- Varming, C., Beck, T. K., Petersen, M. A, Ardo, Y. (2011). "Impact of processing steps on the composition of volatile compounds in cheese powders", *International Journal of Dairy Technology*, 64(2), 197-206.
- Wallace, J.M., Fox, P.F. (1998). "Rapid spectrophotometric and fluorimetric methods for monitoring nitrogenous (proteinaceous) compounds in cheese and cheese fractions: a review". *Food Chemistry*, 62(2), 217-224.
- West, S. (2007). "Production of flavours, flavour enhancers and other protein-based speciality products". *Novel Enzyme Technology for Food Applications*. Editör: Rastall, R. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Wilkinson, A.G., Doolan, I.A., Kilcawley, K.N. (2011). "Enzyme-Modified Cheese". *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2. Basım). Editörler: Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. London, UK: Elsevier Academic Press.
- Yamasaki, H., Mitsuyama, K. (2014). "Enzyme-modified cheese suppresses intestinal inflammation in rats", Japan Digestive Disease Week 2014, International Session Workshop-1,24.10.2014.