



**FARKLI KÜLTÜR KOMBİNASYONLARI
KULLANIMININ FERMENTE SÜTLERİN BİYOAKTİF
PEPTİD VE GAMA AMİNOBÜTİRİK ASİT İÇERİĞİ İLE
KALİTE ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Sümevra IŞIK

Danışman: Prof. Dr. Elif DAĞDEMİR

Doktora Tezi

Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı

2022

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

**FARKLI KÜLTÜR KOMBİNASYONLARI KULLANIMININ FERMENTE
SÜTLERİN BİYOAKTİF PEPTİD VE GAMA AMİNOBÜTİRİK ASİT İÇERİĞİ İLE
KALİTE ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

(The Effect of Using of Different Culture Combinations on the Bioactive Peptide, Gamma
Aminobutyric Acid Content and Quality Characteristics of Fermented Milks)

DOKTORA TEZİ

Sümevra IŞIK

Danışman: Prof. Dr. Elif DAĞDEMİR

Erzurum
Haziran, 2022

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Sümeysra IŞIK tarafından hazırlanan “Farklı Kültür Kombinasyonları Kullanımının Fermente Sütlerin Biyoaktif Peptid ve Gama Aminobütirik Asit İçeriği ile Kalite Özellikleri Üzerine Etkisi” başlıklı çalışması 10/06/2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı’nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Mustafa ŞENGÜL <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır.
Danışman:	Prof. Dr. Elif DAĞDEMİR <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır.
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Gülşah ÇANAKÇI ADIGÜZEL <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır.
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Enes DERTLİ <i>Yıldız Teknik Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır.
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Engin GÜNDOĞDU <i>Gümüşhane Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır.

Enstitü Yönetim Kurulunun
....../....../.... tarih ve sayılı
kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır.

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: FDK-2020-7548

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak *Prof. Dr. Elif DAĞDEMİR* danışmanlığında sunulan “Farklı Kültür Kombinasyonları Kullanımının Fermente Sütlerin Biyoaktif Peptid ve Gama Aminobütirik Asit İçeriği ile Kalite Özellikleri Üzerine Etkisi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	4	30
Kuramsal Temeller	10	30
Materyal ve Yöntem	23	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	15	20
Sonuç ve Öneriler	1	20
Tezin Geneli	15	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Sümeysra IŞIK	Prof. Dr. Elif DAĞDEMİR
29.6.2022	29.6.2022
İmza: Aslı Islak İmzalıdır.	İmza: Aslı Islak İmzalıdır.

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

- ☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.
- ☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesiyle beni aydınlatan, çalışmalarım esnasında karşılaştığım zorlukların üstesinden gelmem için yardımcı olan, bilimsel bakış açısı ve akademik vizyonu ile bana öncülük eden, doktora tezimin her safhasında büyük katkısı ve emeği olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Elif DAĞDEMİR'e,

Görüş ve önerileriyle tez çalışmamın şekillenmesini sağlayan Tez İzleme Komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. Mustafa ŞENGÜL ve Sayın Prof. Dr. Gülşah ÇANAKÇI ADIGÜZEL'e, laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Bülent ÇETİN'e, öğrenim hayatım boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocam Sayın Prof. Dr. İhsan BAKIRCI'ya,

HPLC ve GC-MS analizlerinin gerçekleştirilmesi için İnönü Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarlarında çalışma imkânı sağlayan, bilgi ve desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ali Adnan HAYALOĞLU'na ve Öğr. Gör. Ali TEKİN'e, antioksidan aktivite analizi için bilgilerini paylaşarak yol gösteren Dr. Öğr. Üyesi Elif Feyza TOPDAŞ'a

Laboratuvar çalışmalarım sırasındaki desteklerinden ötürü Arş. Gör. Haktan AKTAŞ, Arş. Gör. Hacer MERAL AKTAŞ ve Arş. Gör. Zeynep GÜRBÜZ'e, doktora öğrenimim boyunca birlikte güzel anılar biriktirdiğim, yardımlarıyla her zaman yanımda olan değerli dostum Doktora Öğrencisi Neslihan AYAĞ'a,

Tez çalışmamı maddi olarak destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje No: FDK-2020-7548),

Benim için hiçbir zaman fedakârlıktan kaçınmayan, her konuda desteklerini hissettiğim annem Nadime BAKIRCI, babam Prof. Dr. Selami BAKIRCI ve kardeşlerim Şeyma ile Muhammet Enes'e, bu zorlu ve yoğun süreçte beni yalnız bırakmayan, büyük sabır ve fedakârlık göstererek bana destek olan kıymetli eşim Öğr. Gör. Sefa IŞIK'a ve biricik kızım Fatma Betül'e tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Sümeysa IŞIK

ÖZET

DOKTORA TEZİ

FARKLI KÜLTÜR KOMBİNASYONLARI KULLANIMININ FERMENTE SÜTLERİN BİYOAKTİF PEPTİD VE GAMA AMİNOBÜTİRİK ASİT İÇERİĞİ İLE KALİTE ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Sümeysa IŞIK

Danışman: Prof. Dr. Elif DAĞDEMİR

Amaç: Bu çalışmada ev yapımı yoğurt ve kefir danelerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin (LAB) gama aminobütirik asit (GABA) üretme yeteneklerinin belirlenmesi ve farklı starter kültür kombinasyonları kullanılarak biyoaktif peptitler ve GABA açısından doğal olarak zenginleştirilmiş yoğurt benzeri fermente bir süt ürününün üretilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Öncelikle yoğurt ve kefir danelerinden izole edilerek tanısı yapılmış toplam 422 adet LAB suşunun glutamat dekarboksilaz (GAD) aktivitesi PCR yöntemiyle kalitatif olarak belirlenmiştir. Ardından GABA üreticisi olarak belirlenen *Lactobacillus plantarum* 156, *L. casei* ATCC 334, *L. helveticus* DPC 4571 ve *Streptococcus thermophilus* 20S4 suşları beş farklı kombinasyon halinde (A, B, C, D ve E) yoğurt benzeri fermente sütlerin üretiminde kullanılmıştır. Depolama periyodu boyunca fermente sütlerin bazı fizikokimyasal, mikrobiyolojik, duyuşal özelliklerinin yanı sıra; GABA ve serbest amino asit miktarı, uçucu bileşenler ile peptid profili, oluşan peptitlerin ACE–inhibitör, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir.

Bulgular: GABA üretme yeteneği açısından taranan toplam 422 adet izolatan hiçbirinde GAD aktivitesinin olmadığı belirlenmiştir. Farklı kültür kombinasyonları kullanımının yoğurt benzeri fermente sütlerin kimyasal kompozisyonu üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı, bununla birlikte asitlik ve pH değerlerini etkilediği tespit edilmiştir. MRS agarda gelişen mezofilik ve termofilik LAB sayıları açısından örnekler arasında farklılıkların bulunduğu, M17 agarda gelişen LAB sayısının tüm örneklerde benzer olduğu belirlenmiştir. Peptid profiline ait kromatogramlar incelendiğinde hem pik yükseklikleri hem de çeşitliliği açısından önemli farklılıkların bulunduğu, özellikle B (*S. thermophilus* 20S4+*L. plantarum* 156+*L. helveticus* DPC 4571), D (*S. thermophilus* 20S4+*L. plantarum* 156+ *L. casei* ATCC 334+*L. helveticus* DPC 4571) ve E (*S. thermophilus* 20S4+*L. casei* ATCC 334+*L. helveticus* DPC 4571) kültür kombinasyonları ile üretilen örneklerde pik sayısı ve yüksekliklerinin diğer örneklerle oranla daha fazla olduğu belirlenmiştir. Peptid ekstraktlarının yüksek ACE inhibitör aktivitesi gösterdiği, *L. casei* ATCC 334 ile *L. helveticus* DPC4571 suşlarının birlikte kullanıldığı örneklerde (D ve E) ACE inhibitör aktivitesinin önemli derecede yükseldiği tespit edilmiştir. Fermente sütlerden ekstrakte edilen peptitlerin antioksidan aktivitelerinin ise genel olarak benzer olduğu görülmüştür. Peptid ekstraktlarının *S. aureus* ATCC 29213, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. typhimurium* RSHMB 95091 ve *E. coli* O157:H7'e karşı belirli ölçüde antimikrobiyal aktivite sergilediği, bununla birlikte *B. cereus* BC 6230'a karşı inhibitör aktivite göstermediği belirlenmiştir. His, Arg, Ala ve Pro tüm fermente süt örneklerinde hakim amino asitler olarak tespit edilmiştir. GABA konsantrasyonu açısından fermente süt örnekleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunmuş ve proteolitik aktivite sonucu GABA konsantrasyonunun arttığı gözlenmiştir. GC-MS analizi sonucunda fermente süt örneklerinde 13'ü keton, 10'u alkol, 7'si karboksilik asit, 6'sı ester, 4'ü aldehit, 4'ü terpen ve 10'u diğer bileşikler olmak üzere toplam 54 adet uçucu bileşik tespit edilmiştir. Kültür kombinasyonlarının duyuşal parametreleri genel olarak etkilemediği ve farklı LAB suşlarının yoğurt benzeri fermente süt ürünlerinde kullanımının tüketici beğenilirliği üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Sonuç: Farklı starter kültürlerin kullanımıyla GABA ve biyoaktif peptitler açısından zengin, sağlığa olumlu katkıları olabilecek fonksiyonel bir fermente süt ürünü üretilebileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Yoğurt benzeri fermente süt, gama aminobütirik asit, biyoaktif peptid

Haziran 2022, 171 Sayfa

ABSTRACT

DOCTORAL DISSERTATION

THE EFFECT OF USING OF DIFFERENT CULTURE COMBINATIONS ON THE BIOACTIVE PEPTIDE, GAMMA AMINOBUTYRIC ACID CONTENT AND QUALITY CHARACTERISTICS OF FERMENTED MILKS

Sümeysra IŞIK

Supervisor: Prof. Dr. Elif DAĞDEMİR

Purpose: In this study, it was aimed to determine the gamma amino butyric acid (GABA) production abilities of lactic acid bacteria (LAB) isolated from homemade yogurt and kefir grains, and to produce a fermented milk product like yogurt naturally enriched in bioactive peptides and GABA by using different starter culture combinations.

Method: Glutamat decarboxylase (GAD) activity of a total of 422 LAB strains isolated from yogurt and kefir grains were determined qualitatively by PCR method. *L. plantarum* 156, identified as GABA producer, *L. casei* ATCC 334, *L. helveticus* DPC 4571 and *S. thermophilus* 20S4 strains were used in the production of yogurt-like fermented milk (A, B, C, D and E) in five different combinations. During the storage period, some physicochemical, microbiological and sensory properties of fermented milks, as well as the amounts of GABA and free amino acids, volatile component and peptide profiles, ACE-inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of the formed peptides were investigated.

Findings: It was determined that none of the 422 isolates screened for GABA production ability had GAD activity. It was determined that the use of different culture combinations did not have a significant effect on the chemical composition of yoghurt-like fermented milks, but affected acidity and pH values. There were differences between samples in terms of LAB counts mesophilic and thermophilic growth on MRS agar, and the counts of LAB growth on M17 agar was similar in all samples. When the chromatograms of the peptide profile were examined, it was seen that there were significant differences in terms of both peak heights and diversity. Especially samples produced by culture combinations B (*S. thermophilus* 20S4+*L. plantarum* 156+*L. helveticus* DPC 4571), D (*S. thermophilus* 20S4+*L. plantarum* 156+ *L. casei* ATCC 334+*L. helveticus* DPC 4571) and E (*S. thermophilus* 20S4+ *L. casei* ATCC 334+*L. helveticus* DPC 4571) had higher peak numbers and heights than the others. It was determined that peptide extracts showed high ACE inhibitory activity, and ACE inhibitory activity was significantly increased in samples (D and E) in which coexisted *L. casei* ATCC 334 and *L. helveticus* DPC 4571 strains. It was determined that the antioxidant activities of the peptides extracted from fermented milk were generally similar. Peptide extracts exhibited some antimicrobial activity against *S. aureus* ATCC 29213, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. typhimurium* RSHMB 95091 and *E. coli* O157:H7, however inhibitory activity against *B. cereus* BC 6230 did not show. His, Arg, Ala and Pro were determined as the predominant amino acids in fermented milk samples. The significant differences were statistically found among fermented milk samples in terms of GABA concentration and it was observed that GABA concentration increased as a result of proteolytic activity. In the result of GC-MS analysis, a total of 54 volatile compounds in fermented milks, consist of ketones (13), alcohol (10), carboxylic acids (7), esters (6), aldehydes (4), terpenes (4), and other compounds (10), were detected. It was observed that the culture combinations generally did not affect the sensory parameters and the use of different LAB strains in fermented milks did not have any negative effect on consumer desirability.

Results: According to the findings obtained in this study, it was concluded that a functional fermented milk product rich in GABA and bioactive peptides with positive contributions to health can be produced by using different starter cultures.

Keywords: Yogurt-like fermented milk, gamma aminobutyric acid, bioactive peptide

June 2022, 171 Pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	xv
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	5
Sütün Fermantasyonu.....	5
Gama Aminobütirik Asit.....	6
GABA'nın sağlık üzerindeki rolü ve önemi	8
GABA'nın üretim mekanizması	10
GABA'nın üretimi	11
GABA üretimini etkileyen faktörler	15
Gıdaların GABA ile zenginleştirilmesi.....	17
Biyoaktif Peptitler	21
ACE inhibitör peptitler.....	22
Antioksidatif peptitler	27
Antimikrobiyal peptitler.....	29
MATERYAL ve YÖNTEM	32
Materyal	32
GABA üretim yeteneği açısından test edilen LAB izolatları.....	32
Fermente sütlerin üretiminde kullanılan bakteriler	32
Süt	32
Peptitlerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan patojen bakteriler.....	32
Yöntem.....	33
LAB izolatlarının aktifleştirilmesi	33
LAB izolatlarında glutamat dekarboksilaz (GAD) varlığının belirlenmesi	33
Fermente sütlerin üretiminde kullanılan kültürlerin çoğaltılması	34

Fermente sütlerin üretiminde kullanılan sütte yapılan analizler	35
Fermente sütlerin retimi	35
Fermente süt örneklerinde yapılan fiziksel ve kimyasal analizler	37
Fermente süt örneklerinde yapılan mikrobiyolojik analizler	38
Suda znen ekstraktların hazırlanması	39
Fermente süt örneklerinde peptid profilinin belirlenmesi	39
Peptitlerde biyoaktivite analizleri	40
Fermente sütlerde GABA ve serbest amino asit miktarlarının belirlenmesi.....	42
Fermente süt örneklerinde uçucu bileşiklerin belirlenmesi	43
Duyusal analizler.....	43
İstatistiksel analizler.....	44
ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	45
LAB İzolalarında GAD Geninin Varlığı.....	45
Fermente sütlerin üretiminde kullanılan sularda GAD aktivitesi	47
Fermente Sütlerin retiminde Kullanılan Sütün Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları.....	48
Fermente Süt rneklerine Ait Fiziksel ve Kimyasal Analiz Sonuçları	49
Kuru madde miktarı	49
Protein miktarı.....	50
Yağ miktarı.....	52
Titrasyon asitliği	53
pH.....	54
Serum ayrılması	56
Viskozite	57
Fermente Süt rneklerine Ait Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları.....	58
MRS agarda gelişen mezofilik LAB sayıları	58
MRS agarda gelişen termofilik LAB sayıları.....	60
M-17 agarda gelişen LAB sayıları	62
Maya ve küf sayısı	63
Fermente Süt rneklerine Ait Peptid Profili Analizi Sonuçları.....	65
Peptitlerde Biyoaktivite Analizleri.....	70
ACE inhibitör aktivite	70
Antioksidan aktivite	75
Antimikrobiyal aktivite	79

Fermente Sütlerin Serbest Amino Asit İçeriği	89
Fermente Süt Örneklerinin GABA İçeriği	95
Fermente Süt Örneklerinde Belirlenen Uçucu Bileşikler.....	98
Ketonlar.....	99
Alkoller	103
Karboksilik asitler	106
Esterler	107
Terpenler	110
Aldehitler.....	112
Diğer bileşikler.....	114
Fermente Süt Örneklerine Ait Duyusal Analiz Sonuçları.....	117
Renk ve görünüş.....	118
Yapı ve tekstür	119
Koku.....	119
Tat ve aroma.....	120
Asitlik.....	121
Yabancı tat ve aroma.....	122
Genel kabul edilebilirlik.....	122
SONUÇ VE ÖNERİLER	124
KAYNAKLAR.....	130
ÖZGEÇMİŞ.....	152

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. GABA Üreten Çeşitli LAB Suşlarının İzolasyon Kaynakları	14
Tablo 2. Bazı LAB Suşlarının Optimum Fermantasyon Şartlarında GABA Konsantrasyonları	17
Tablo 3. Süt Proteini Kaynaklı Bazı Biyoaktif Peptitler	22
Tablo 4. Fermente Süt Örneklerinin Üretiminde Kullanılan Bakteri Kombinasyonları.....	36
Tablo 5. Peptid Profili Analizinde Hareketli Faz Çözeltilerinin (A ve B) Kromatografi Süresi İçerisinde Kolondan Geçiş Oranları	40
Tablo 6. Amino asit Analizinde Hareketli Faz Çözeltilerinin (A ve B) Kromatografi Süresi İçerisinde Kolondan Geçiş Oranları	43
Tablo 7. Deneme Fermente Süt Örneklerinin Duyusal Değerlendirilmesinde Kullanılan Skala Örneği	44
Tablo 8. Fermente Süt Örneklerinin Üretiminde Kullanılan Çiğ ve Pastörize Sütün Bazı Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri	49
Tablo 9. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Kuru Madde Miktarları (%).....	49
Tablo 10. Fermente Süt Örneklerinin Kuru Madde Değerlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları.....	49
Tablo 11. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Protein Miktarları (%)	51
Tablo 12. Fermente Süt Örneklerinin Protein Değerlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları	51
Tablo 13. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Yağ Oranları (%).....	52
Tablo 14. Fermente Süt Örneklerinin % Yağ Değerlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları.....	52
Tablo 15. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Asitlik Değerleri (%)	53
Tablo 16. Fermente Süt Örneklerinin % Asitlik Değerlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları..	54
Tablo 17. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen pH Değerleri	55
Tablo 18. Fermente Süt Örneklerinin pH Değerlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları	55
Tablo 19. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Boyunca Belirlenen Serum Ayrılması Değerleri (mL).....	56
Tablo 20. Fermente Süt Örneklerinin Serum Ayrılması Değerlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları.....	57

Tablo 21. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Viskozite Değerleri (cP)	58
Tablo 22. Fermente Süt Örneklerinin Viskozite Değerlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları..	58
Tablo 23. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Boyunca Belirlenen MRS Agarda Gelişen Mezofilik LAB Sayıları (log kob/g)	59
Tablo 24. Fermente Süt Örneklerinin MRS Agarda Gelişen Mezofilik LAB Sayılarına Ait Varyans Analiz Sonuçları	59
Tablo 25. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Boyunca Belirlenen MRS Agarda Gelişen Termofilik LAB Sayıları (log kob/g).....	61
Tablo 26. Fermente Süt Örneklerinin MRS Agarda Gelişen Termofilik LAB Sayılarına Ait Varyans Analiz Sonuçları	61
Tablo 27. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Boyunca Belirlenen M-17 Agarda Gelişen LAB Sayıları (log kob/g)	62
Tablo 28. Fermente Süt Örneklerinin M17 Agarda Gelişen Sayılarına Ait Varyans Analiz Sonuçları	63
Tablo 29. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Boyunca Belirlenen Maya Sayıları (log kob/g).....	64
Tablo 30. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Boyunca Belirlenen Küf Sayıları (log kob/g)	64
Tablo 31. Fermente Süt Örneklerinin Maya Sayılarına Ait Varyans Analiz Sonuçları.....	64
Tablo 32. Peptid Ekstraktlarında Depolama Boyunca Belirlenen ACE İnhibisyon Değerleri (%)	71
Tablo 33. Peptid Ekstraktlarının % ACE İnhibisyon Değerlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları	72
Tablo 34. Peptid Ekstraktlarının ACE İnhibitör Aktivitelerine Ait IC50 Değerleri (mg/L) ...	74
Tablo 35. Peptid Ekstraktlarının ACE İnhibitör Aktivitelerine Ait IC50 Değerlerinin Varyans Analizi Sonuçları	74
Tablo 36. Peptid Ekstraktlarında Depolama Boyunca Belirlenen DPPH Radikalini Giderme Aktivitesi (% inhibisyon)	76
Tablo 37. Peptid Ekstraktlarının DPPH Radikalini Giderme Aktivitesine (%) Ait Varyans Analiz Sonuçları	76
Tablo 38. Peptid Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerine Ait IC50 Değerleri (mg/mL)....	78
Tablo 39. Peptid Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerine Ait IC50 Değerlerinin Varyans Analizi Sonuçları	78

Tablo 40. Peptid Ekstraktlarının <i>S. aureus</i> ATCC 29213'e Karşı Depolama Boyunca Gösterdiği İnhibisyon Değerleri (%)	80
Tablo 41. Peptid Ekstraktlarının <i>S. aureus</i> ATCC 29213'e Karşı Belirlenen İnhibisyon Değerlerine Ait Varyans Analizi Sonuçları.....	80
Tablo 42. Peptid Ekstraktlarının <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644'e Karşı Depolama Boyunca Gösterdiği İnhibisyon Değerleri (%)	82
Tablo 43. Peptid Ekstraktlarının <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644'e Karşı Belirlenen İnhibisyon Değerlerine Ait Varyans Analizi Sonuçları.....	83
Tablo 44. Peptid Ekstraktlarının <i>B. cereus</i> BC 6230'a Karşı Depolama Boyunca Gösterdiği İnhibisyon Değerleri (%)	84
Tablo 45. Peptid Ekstraktlarının <i>B. cereus</i> BC 6230'a Karşı Belirlenen İnhibisyon Değerlerine Ait Varyans Analizi Sonuçları.....	84
Tablo 46. Peptid Ekstraktlarının <i>S. typhimurium</i> RSHMB 95091'e Karşı Depolama Boyunca Gösterdiği İnhibisyon Değerleri (%)	86
Tablo 47. Peptid Ekstraktlarının <i>S. typhimurium</i> RSHMB 95091'e Karşı Belirlenen İnhibisyon Değerlerine Ait Varyans Analizi Sonuçları.....	87
Tablo 48. Peptid Ekstraktlarının <i>E. coli</i> O157:H7'e Karşı Depolama Boyunca Gösterdiği İnhibisyon Değerleri (%)	88
Tablo 49. Peptid Ekstraktlarının <i>E. coli</i> O157:H7'e Karşı Belirlenen İnhibisyon Değerlerine Ait Varyans Analizi Sonuçları.....	89
Tablo 50. Fermente Süt Örneklerinde Belirlenen Serbest Amino Asit Konsantrasyonları (mg/kg)	92
Tablo 51. Fermente Süt Örneklerinin Serbest Amino Asit Değerlerine Ait Varyans Analizi Sonuçları.....	94
Tablo 52. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen GABA Konsantrasyonları (mg/kg).....	96
Tablo 53. Fermente Süt Örneklerinin GABA Konsantrasyonlarına Ait Varyans Analizi Sonuçları.....	96
Tablo 54. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Keton Bileşikleri (µg/100g)	101
Tablo 55. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Alkol Bileşikleri (µg/100g)	104
Tablo 56. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Karboksilik Asit Bileşikleri (µg/100g)	108

Tablo 57. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Ester Bileşikleri (µg/100g)	109
Tablo 58. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Terpen Bileşikleri (µg/100g)	111
Tablo 59. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Aldehit Bileşikleri (µg/100g)	113
Tablo 60. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Diğer Bileşikler (µg/100g)	115
Tablo 61. Fermente Süt Örneklerinin Duyusal Analiz Sonuçları	117
Tablo 62. Fermente Süt Örneklerinin Duyusal Parametrelerine Ait Varyans Analiz Sonuçları	118

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. L-Glutamat'tan GABA'nın oluşumu	7
Şekil 2. Sinapslar aracılığıyla nöronların birbiriyle iletişimi	7
Şekil 3. GABA'nın sağlık üzerindeki bazı rolleri	9
Şekil 4. TCA döngüsünden GABA'nın metabolik yolu	10
Şekil 5. Glutamat dekarboksilaz (GAD) mekanizması	11
Şekil 6. ACE inhibitörlerinin renin-angiotensin ve kallikrein-kenin sistemlerindeki rolü	24
Şekil 7. Fermente sütlerin üretiminde kullanılan kültürlerin çoğaltılması	35
Şekil 8. Fermente süt örneklerine ait üretim akış şeması	36
Şekil 9. Fermente süt örneklerine ait görsel	37
Şekil 10. Çalışmada kullanılan 96 kuyucuklu plakalar	42
Şekil 11. Kontrol suşu (<i>L. plantarum</i> 56) ve LAB izolatlarında GAD geninin varlığına ilişkin PCR görüntüleri (a:Yoğurt izolatları b:Kefir danesi izolatları)	46
Şekil 12. Yoğurt benzeri fermente süt üretiminde kullanılan suşlarda GAD geninin varlığına ilişkin PCR (a) ve HRM (b) analizi görüntüleri	48
Şekil 13. Fermente süt örneklerinin MRS agarda gelişen mezofilik LAB sayıları üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi	60
Şekil 14. Fermente süt örneklerinin maya sayıları üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi	65
Şekil 15. Fermente süt örneklerinde 1. günde belirlenen peptid profiline ait RP-HPLC kromatogramı	66
Şekil 16. Fermente süt örneklerinde 14. günde belirlenen peptid profiline ait RP-HPLC kromatogramı	66
Şekil 17. Fermente süt örneklerinde 28. günde belirlenen peptid profiline ait RP-HPLC kromatogramı	67
Şekil 18. Fermente süt örneklerinde 42. günde belirlenen peptid profiline ait RP-HPLC kromatogramı	67
Şekil 19. Fermente süt örneklerinin depolama boyunca peptid profillerine ait kromatogramlar	70
Şekil 20. Peptid ekstraktlarının % ACE inhibisyon değerleri üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi	73
Şekil 21. Peptid ekstraktlarının ACE inhibitör aktivitesine ait IC50 değerleri üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi	75

Şekil 22. Peptid ekstraktlarının antioksidan aktivitelerine ait IC50 değerleri üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi.....	79
Şekil 23. Peptid ekstraktlarının <i>S. aureus</i> ATCC 29213'e karşı gösterdiği inhibisyon değerleri üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi	81
Şekil 24. Peptid ekstraktlarının <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644'e karşı gösterdiği inhibisyon değerleri üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi	83
Şekil 25. Peptid ekstraktlarının <i>B. cereus</i> BC 6230'a karşı gösterdiği inhibisyon değerleri üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi	86
Şekil 26. Peptid ekstraktlarının <i>S. typhimurium</i> RSHMB 95091'e karşı gösterdiği inhibisyon değerleri üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi	88
Şekil 27. Peptid ekstraktlarının <i>E. coli</i> O157:H7'e karşı gösterdiği inhibisyon değerleri üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi	89
Şekil 28. Fermente süt örneklerinin GABA konsantrasyonları üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi	98
Şekil 29. Fermente süt örneklerinin renk ve görünüş puanları üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi	119
Şekil 30. Fermente süt örneklerinin asitlik puanları üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi	121

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

GABA	: Gama Aminobütirik Asit
GAD	: Glutamat Dekarboksilaz
ACE	: Angiotensin Dönüştürücü Enzim
LAB	: Laktik Asit Bakterisi
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DPC	: Süt Kültür Koleksiyonu
EDTA	: Etilendiamintetra Asetik Asit
GC-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
MRS	: De Man Rogosa and Sharpe
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD-PCR	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
HRM	: Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi
PDA	: Potato Dextrose Agar
RP-HPLC	: Ters Fazlı Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
TFA	: Triflorasetik Asit
TCA	: Triklorasetik Asit
PLP	: Piridoksal-5'-Fosfat
CN	: Kazein
GDH	: Glutamik Asit Dehidrogenaz
GABA-AT	: GABA Aminotransferaz
SSADH	: Semialdehit Dehidrogenaz
MSG	: Monosodyum Glutamat
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
GRAS	: Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen
BHT	: Bütillenmiş Hidroksitoluen
BHA	: Bütillenmiş Hidroksianisol
DPPH	: 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl
ABTS	: 2,2'-Azino-Bis 3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic acid
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat

HHL	: Hipüril Histidin Lösin
UV	: Ultraviyole
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
BHI	: Beyin Kalp İnfüzyonu
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
Kob	: Koloni Oluşturan Birim
Log	: Logaritma
Ala	: Alanin
Arg	: Arginin
Asn	: Asparagin
Asp	: Apartik asit
Cys	: Sistein
Gln	: Glutamin
Glu	: Glutamik asit
Gly	: Glisin
His	: Histidin
Ile	: İzolösin
Leu	: Lösin
Lys	: Lisin
Met	: Metiyonin
Phe	: Fenilalanin
Pro	: Prolin
Ser	: Serin
Thr	: Treonin
Trp	: Triptofan
Tyr	: Tirosin
Val	: Valin

Simgeler

α	: Alfa
β	: Beta
κ	: Kappa
γ	: Gama
d	: Dakika
s	: Saniye
°	: Derece
kg	: Kilogram
g	: Gram
mg	: Miligram
μg	: Mikrogram
v	: Hacim
L	: Litre
mL	: Mililitre
μL	: Mikrolitre
ppm	: mg/kg (milyonda bir)
mm	: Milimetre
μm	: Mikrometre
nm	: Nanometre
M	: Molarite
N	: Normalite
μM	: Mikromolar
mM	: Milimolar

GİRİŞ

Sağlıklı bir beslenme için gerekli olan bileşenlerin çoğunu içeren süt, binlerce yıldır insan diyetinin önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Süt; protein, kalsiyum, B₂ (riboflavin) ve B₁₂ (kobalamin) vitamini başta olmak üzere birçok besin ögesini bünyesinde bulundurmaktadır. Ayrıca içerdiği besin unsurları nedeniyle mikroorganizma gelişimi için de ideal bir ortamdır. Bu nedenle süt daha uzun süre muhafaza edilebilmesi, lezzet ve tekstür açısından farklı mamüllerin elde edilebilmesi amacıyla çeşitli ürünlere işlenmektedir.

Özellikle fermentasyon ile süttten peynir, yoğurt, kefir gibi mamüller üretilmektedir. Tarihi dönemlerde gıdaların sadece daha uzun süre muhafaza edilmesi ve son üründe organoleptik özelliklerin gelişmesi için kullanılan fermentasyon tekniği, günümüzde fermente gıdaların fonksiyonel özelliklerinin anlaşılmasıyla daha farklı amaçlar için de kullanılmaktadır (Akdeniz Oktay ve Özbaş 2020). Nitekim fermente süt ürünlerinde, fizyolojik etkileri olan bazı metabolik ve biyoaktif bileşenlerin oluştuğu, bu yüzden fonksiyonel gıda olarak kabul edildiği bildirilmektedir (Stanton *et al.* 2005; Widyastuti *et al.* 2014).

Günümüzde beslenme denilince sadece açlığın giderilmesi için yeme-içme faaliyetlerinin yürütülmesi algısından uzaklaşmış, vücuda alınan gıdaların sağlık üzerindeki etkilerinin bilinmesi de önem kazanmaya başlamıştır. Böylece son yıllarda birçok insan aldıkları besinlerin nitelikleri ve sağlık üzerindeki etkileri hakkında çok daha hassas ve bilinçli olmaya başlamıştır. Bu durum fonksiyonel gıdalara olan talebi artırmıştır.

Fonksiyonel gıdalar; günlük diyetle alınan, besleyici etkisinin yanı sıra insan sağlığı için de faydalı olan gıdalardır (Stanton *et al.* 2005). Bir gıdanın fonksiyonel olabilmesi için biyoaktif bileşenler içermesi ve bunların vücudun ilgili yerlerine yeterince ulaşabilmesi gereklidir (Gülbandılar vd 2017). Biyoaktif bileşenler tüketildikten sonra temel beslenmenin ötesinde sağlık üzerine olumlu etkiler sağlayan gıda komponentleri olarak tanımlanmaktadır (Biesalski *et al.* 2009). Biyoaktif bileşenler arasında antioksidanlar, polioller, glikozitler, diyet lifleri, prebiyotikler, çoklu doymamış yağ asitleri, oligosakkaritler, amino asitler, biyoaktif peptitler, proteinler, kolinler, isoprenoitler ve fitokimyasallar yer almaktadır (Stachnik and Bac, 2017; Chai *et al.* 2018). Fonksiyonel gıdalar biyoaktif bir bileşeni doğal olarak içerebileceği gibi, biyoaktif bir bileşenle zenginleştirilmiş ya da olumsuz etki gösteren bir bileşiği çıkartılmış da olabilir. Ayrıca gıda içerisindeki bazı bileşiklerin değişikliğe uğratılarak, biyoyararlılığı artırılarak ya da bunların farklı kombinasyonları yapılarak da fonksiyonel gıda üretimi yapılabilmektedir (Choudhary and Tandon 2009; Dayısoylu vd 2014). Biyoaktif bileşenler ile

ilgili çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bununla birlikte γ -aminobütirik asit (GABA) ve biyoaktif peptitler son zamanlarda dikkat çeken biyoaktif bileşenler arasında yer almaktadır.

GABA, omurgalılar, bitkiler ve mikroorganizmalarda bulunan, birçok fizyolojik etkiye sahip olan bir amino asittir. L-glutamik asit ya da tuzlarının dekarboksilasyonu sonucu oluşmakta ve reaksiyon glutamat dekarboksilaz (GAD) enzimi ile katalize edilmektedir. Omurgalılarda kimyasal sinir iletimini sağlayan önemli bir inhibitör nörotransmitter olan GABA, beyinde nöronların aşırı uyarılmasıyla ortaya çıkan stres, endişe, sinirlilik gibi durumlarda yatıştırıcı etkisiyle sinir sisteminde aktif rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra, antihipertansif, antidiyabetik, antikarsinojenik ve diüretik etki gibi birçok fonksiyona da sahiptir (Cui *et al.* 2020; Dhakal *et al.* 2012; Sahab *et al.* 2020). GABA'nın söz konusu fizyolojik etkilerinin dışında naylon 4 (polyamid 4) olarak bilinen ve biyolojik olarak parçalanabilen plastik polimerinin monomeri olan 2-pyrolidin'in öncü maddesi olduğu, söz konusu polimerin toprakta *Pseudomonas* sp., *Fusarium solani*, *F. oxysporum* ve *Clonostachys rosea* gibi mikroorganizmalar tarafından parçalanabildiği bildirilmiştir (İrila *et al.* 2017). GABA'nın biyolojik olarak parçalanabilir plastik madde üretiminde kullanılabilir olması çevre kirliliğinin önlenmesi açısından umut vadetmekte ve GABA'nın biyoteknolojik olarak düşük maliyetle fazla miktarda üretimine yönelik araştırmaların yapılmasına da öncülük etmektedir.

Bitkisel gıdalarda GABA'nın üretim mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte bazı meyve (elma, üzüm), sebze (patates, kabak, domates) ve tahıllarda (arpa, buğday) doğal olarak düşük konsantrasyonlarda bulunduğu, bununla birlikte biyoaktif özellik gösterebilmesi için miktarının nispeten yetersiz kaldığı bildirilmiştir (Kook and Cho 2013; Özer 2019a; Sahab *et al.* 2020). Ancak bitkilerde abiyotik (düşük veya yüksek sıcaklık, kuraklık vb.) ve biyotik (hastalık vb.) stres anında GABA'nın hızlı ve yüksek oranda üretildiği tespit edilmiştir (Oh *et al.* 2003). Bakteri, maya, küf gibi mikroorganizmaların ise GAD enzimine sahip oldukları, bu nedenle doğal olarak GABA üretebildikleri bilinmektedir (Sahab *et al.* 2020). Bu mikroorganizmalar arasında özellikle laktik asit bakterilerinin (LAB) önemli bir yere sahip olduğu ifade edilmektedir. LAB'ların GRAS (Generally Regarded As Safe) olarak kabul edilmesi ve fermente gıdalarda güvenle kullanılmasından dolayı, araştırmalar daha çok GABA'nın LAB'lar tarafından üretilmesine yönelmiştir (Li and Cao 2010). Geleneksel fermente gıdalardaki LAB florasının oldukça çeşitlilik gösterdiği düşünüldüğünde, bu gıdalardan GABA üretme yeteneğine sahip suşların belirlenmesi önem arz etmektedir. İlâveten GABA'nın sağlık üzerindeki olumlu etkileri dikkate alındığında sadece bu suşların tespit edilmesinin yeterli olmadığı, bu suşlar kullanılarak gıdaların GABA ile zenginleştirilmesinin de önemli hale geldiği görülmektedir.

GABA'nın yanı sıra önemli bir diğer biyoaktif bileşen de "biyoaktif peptid" olarak adlandırılan peptitlerdir. Gıdalarda bulunan proteinlerden enzimatik hidroliz ya da mikrobiyal faaliyetler sonucu açığa çıkan bu peptitler antimikrobiyal, antihipertansif, antioksidatif gibi birçok fizyolojik etkiye sahiptir (Silva and Malcata 2005). Biyoaktif peptitler, gıdalarla alındıklarında veya gastrointestinal geçiş sırasında enzimler tarafından üretildikten sonra bağırsakta hedef bölgelerle interaksiyona girmekte, ardından absorbe edilerek perifer organlara ulaşmaktadır (Möller *et al.* 2008). Biyoaktif potansiyele sahip pek çok sayıda hayvansal veya bitkisel kaynaklı protein bulunmasına rağmen süt proteinleri, özellikle kazeinler, biyoaktif peptitlerin önemli bir kaynağı olarak gösterilmektedir. Birçok araştırmacı peynir, yoğurt gibi fermente süt ürünlerinin biyoaktif peptitler bakımından zengin kaynaklar olabileceğini bildirmişlerdir (Korhonen and Pihlanto 2006; Sanchez and Vazquez 2017; FitzGerald *et al.* 2020; Ali *et al.* 2021). Sütün fermentasyonu ya da olgunlaşma sırasında kazeinin LAB'ların yapısındaki proteolitik enzimler ile hidrolize olarak, biyoaktif peptitleri veya bunların ön bileşiklerini oluşturabileceği ifade edilmiştir (Kınık ve Gürsoy 2002). Fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılan starter kültürlerin biyoaktif peptitlerin oluşumunda önemli rol oynadığı bilinmektedir. Dolayısıyla biyoaktif peptitlerin oluşumunu sağlayabilecek yeni suşların belirlenmesi ve bu suşların çeşitli ürünlerde kullanılarak söz konusu peptitlerin oluşumu açısından değerlendirilmesi önem taşımaktadır.

Son yıllarda fermente gıdalarda GABA üreten çeşitli mikroorganizmaların taranması ve yüksek oranda GABA üreten yeni suşların belirlenmesine yönelik çok sayıda araştırmaya rastlamak mümkündür. Söz konusu araştırmalarda mümkün olduğunca fazla fermente gıdadan GABA üreten çeşitli mikroorganizmaların taranması ve yüksek oranda GABA üreten yeni suşların keşfedilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Quilez and Diana 2017; Beltrán-Barrientos *et al.* 2018; Yogeswara *et al.* 2020a;). Ülkemizde fermente gıdaların çeşitliliği dikkate alındığında; bu anlamda büyük bir potansiyele sahip olduğu, ancak söz konusu gıdalardan GAD aktivitesine, dolayısıyla yüksek GABA üretme yeteneğine sahip suşların belirlenmesine yönelik araştırma sayısının oldukça sınırlı olduğu görülmektedir (Demirbaş *et al.* 2017; Özer 2019a; Alkay 2021; Memiş 2021). Yüksek GABA üretme yeteneğine sahip suşların belirlenmesinin yanı sıra, aynı zamanda bu suşların kullanımıyla GABA ile zenginleştirilmiş fonksiyonel gıdaların üretimi de önem taşımaktadır. Aynı zamanda kazeinin yüksek oranda glutamik asit içermesi (toplam amino asit içeriğinin yaklaşık %17,5'u kadar), dolayısıyla sütün fermentasyonu ya da proteolizi sırasında söz konusu amino asidin fazla miktarda serbest kalabilecek olması GABA üretimi açısından önem arz etmektedir. Benzer şekilde kazeinin biyoaktif peptitlerin oluşumunda uygun substrat olması söz konusu peptitlerin oluşumu içinde potansiyel oluşturmaktadır.

Bu çalışmada doğal yollarla GABA ve biyoaktif peptitler açısından zenginleştirilmiş, bazı metabolik hastalıkları koruyucu nitelikte fonksiyonel fermente bir süt ürününün üretilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla öncelikle yoğurt ve kefir danelerinden daha önce izole edilmiş ve genetik yöntemlerle tanısı yapılmış toplam 422 adet LAB suşunun GABA üretme yeteneği kalitatif olarak PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) metoduyla test edilmiştir. Ardından GABA üretme yeteneği belirlenen *Lactobacillus plantarum* 156 suşu, proteolitik aktiviteye sahip olan *L. helveticus* DPC 4571 ve *L. casei* ATCC 334 suşları ile istenilen jel yapıyı oluşturmak amacıyla *Streptococcus thermophilus* 20S4 suşu farklı kombinasyonlar halinde yoğurt benzeri fermente süt üretiminde kullanılmıştır. Tüm fermente süt örnekleri 42 günlük depolama süresince bazı fizikokimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşal özellikler açısından analiz edilmiştir. Aynı zamanda fermente süt örneklerinin GABA ve serbest amino asit miktarları, uçucu bileşenler ile peptid profili ve depolama süresince oluşan peptitlerin ACE (angiotensin converting enzyme) inhibitör, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri de belirlenmiştir.

KURAMSAL TEMELLER

Sütün Fermantasyonu

Fermantasyon, doğal ya da kontrollü olarak gerçekleştirilen mikrobiyal bir süreç ile bir hammaddeden farklı özellikte ürün oluşturmak amacıyla kullanılan en eski ve ekonomik muhafaza yöntemlerden birisi olarak kabul edilmektedir (Akdeniz Oktay ve Özbaş 2020). Yoğurt ve benzeri fermente sütlerin fermantasyonunda meydana gelen temel biyokimyasal olay glikolizdir. LAB'lar karbonhidrat metabolizması ile laktozu laktik aside metabolize ederek ortamın asitliğini artırmaktadır. Böylece patojen ve saprofitlerin gelişmesine imkân vermeyen koşullar oluşturarak gıdanın güvenilirliğini artırmaktadır (Demirgöl ve Sağdıç 2018). Bunun yanı sıra sütün pH'sının düşmesiyle kazein misellerinin etrafındaki elektriksel tabaka nötrlenmekte ve buna bağlı olarak kazein miselleri stabilitesini kaybederek jelleşme süreci başlamaktadır. Laktik asit ayrıca tat/aroma dengesinin kurulmasında da önemli rol oynamaktadır (Özer 2006).

Proteoliz ile lipoliz ise yoğurt ve benzeri ürünlerde peynirde olduğu gibi önemli düzeyde gerçekleşmemektedir (Özer 2006). Ancak proteolitik starterlerin fermantasyon sırasında bir dereceye kadar proteolizi sağladıkları bilinmektedir. Proteolitik starter bakteriler sahip oldukları proteazlar ile oligopeptidleri açığa çıkarırken, oligopeptitleri ise peptidazlar aracılığı ile düşük molekül ağırlıklı peptidlere ve amino asitlere yıkmaktadır. Bu azotlu bileşikler ise genelde *S. thermophilus* tarafından gelişim faktörü olarak kullanılmaktadır. Ayrıca proteoliz sonucu açığa çıkan Thr ve Met gibi amino asitler aroma maddelerinin sentezi için öncü madde olarak kullanılmaktadır. İlaveten proteoliz ile biyoaktif özellikte peptid ve metabolitler oluşabilmektedir. Bu nedenle kullanılacak starter bakterilerin seçiminde proteolitik aktivite dikkate alınmaktadır (Özer 2006; Mann *et al.* 2017).

Fermantasyon veya depolama sırasında meydana gelen glikoliz, proteoliz ve lipoliz gibi biyokimyasal olaylar sonucu oluşan aroma, fermente süt ürünlerinde kaliteyi oluşturan en önemli faktörlerden birisidir. Süt ürünlerinde duyuşal özelliklerin büyük ölçüde sütteki yağ, protein veya karbonhidrattan türetilen aroma bileşiklerinin nispi dengesine bağlı olduğu belirtilmiştir. Alkoller, aldehitler, ketonlar, asitler, esterler, laktonlar, kükürt içeren bileşikler, pirazinler ve furan türevleri dahil olmak üzere çok sayıda aroma bileşiğı tanımlanmıştır (Cheng 2010). Fermantasyon veya depolama sırasında oluşan laktik asit başta olmak üzere pürivik, oksalik ve süksinik asit gibi uçucu olmayan bileşikler, asetaldehit, aseton, diaseton gibi karbonil bileşenleri ile formik, asetik, bütirik ve propiyonik asit gibi uçucu bileşenler fermente süt ürünlerinde karakteristik tat/aroma dengesinin oluşumunda büyük öneme sahiptir (Özer 2006;

Erkaya and Şengül 2011). Tat/aroma oluşumu sütün kompozisyonuna, türüne, işleme koşullarına ve kullanılan starter kültürlerle bağlı olarak değişim göstermektedir (Pan *et al.* 2014). Birçok aroma bileşeni tanımlanmış olmasına rağmen asetik asit, diasetil ve asetaldehitin fermente süt ürünlerinin nihai aroması üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. (Dan *et al.* 2017, 2018). Bu bileşikler laktoz, laktik asit ve sitrik asidin mikroorganizmalar tarafından metabolize edilmesi sonucu oluşmaktadır (Kavaz Yüksel and Bakırcı 2015).

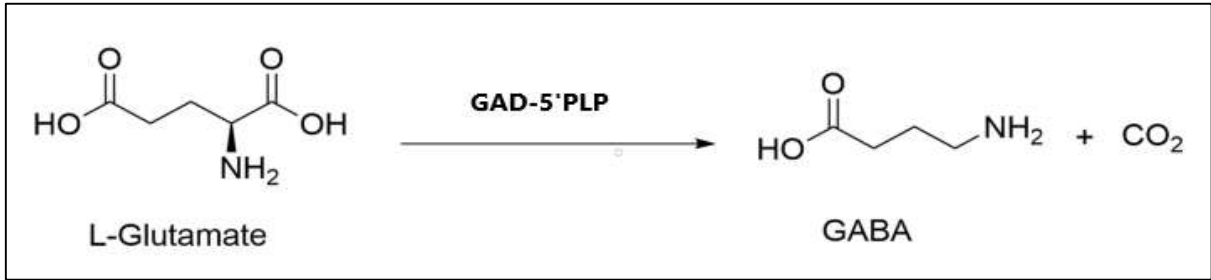
Zareba *et al.* (2014) tarafından yapılan bir çalışmada *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 suşu kullanılarak fermente edilen sütlerde 4 haftalık depolama süresince toplam 14 uçucu bileşiğin tespit edildiği, bunlar arasında en baskın olan bileşiğin asetik asit olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar ayrıca uçucu bileşen profilinin fermantasyon sürecinden ve uzun süreli depolamadan etkilendiğini belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada ise *L. pentosus* ile fermente edilen sütlerde laktoz ve ksiloz ilavesinin aroma profili üzerine etkisi araştırılmış, etanol, 2,3-bütandion ve asetik asit miktarlarının ilave edilen karbonhidratların çeşidine göre önemli derecede farklılık gösterdiği, ksiloz ve laktoz ilaveli fermente sütlerde en yüksek konsantrasyonlarda belirlenen bileşiklerin sırasıyla asetik asit (%22,70) ile etanol (%18,09) olduğu ifade edilmiştir (Pan *et al.* 2014). Zhou *et al.* (2021) ise yaptıkları bir çalışmada yoğurt kültürüne ilaveten *L. gasseri* LGZ 1029 ve ticari probiyotik *L. rhamnosus* suşlarını kullanarak ürettikleri yoğurt örneklerinde uçucu bileşiklerin konsantrasyonlarının kullanılan suşlara bağlı olduğunu ve *L. gasseri* LGZ 1029 suşunun özellikle ketonların miktarı üzerinde etkili olduğunu vurgulamışlardır.

Gama Aminobütirik Asit

Sinir sisteminde uyarıların iletilmesinde görev yapan kimyasal maddeler nörotransmitter olarak adlandırılmaktadır. Nörotransmitter olarak kullanılan 60 farklı kimyasal madde olduğu, bazı nörotransmitterlerin uyarıcı (stimülatör, eksitatör), bazılarının ise inhibe edici (inhibitör, baskılayıcı) etki gösterdiği bildirilmiştir. Glutamat ve aspartatın stimülatör, GABA ve glisinin ise inhibitör nörotransmitterler arasında yer aldığı ifade edilmiştir (Yılmaz and Soygüder, 2017).

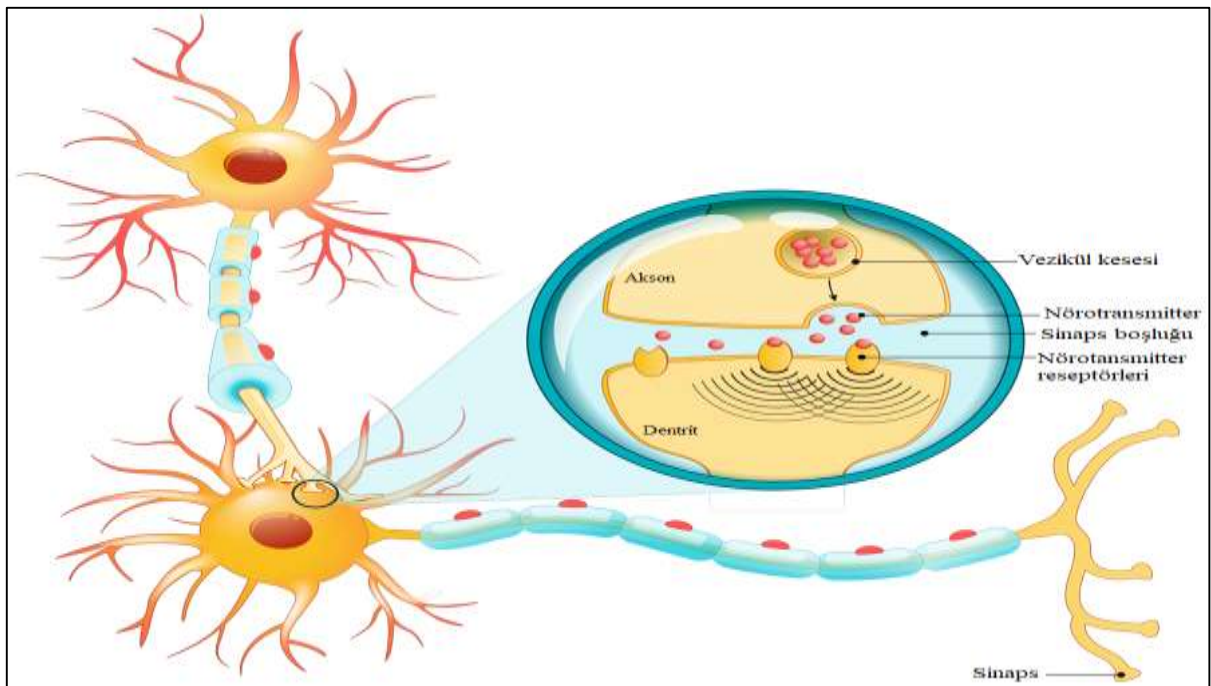
İnhibitör nörotransmitterlerden olan GABA, 4 aminobütanoik asit veya 4 aminobütirik asit olarak da bilinen protein yapısında olmayan dört karbonlu bir amino asittir. Yapısındaki amino grubu diğer amino asitlerden farklı olarak alfa karbon atomu yerine gama karbonunda bulunmakta ve bu da GABA'nın protein sentezinde kullanılmasına imkân vermemektedir (Chua *et al.* 2019). GABA piridoksal-5'-fosfat (PLP)'a bağlı olan GAD enzimi tarafından katalize edilen, glutamik asit ya da tuzlarının geri dönüşümsüz dekarboksilasyon reaksiyonu

sonucu oluşmaktadır (Şekil 1) (Duranti *et al.* 2020). Molekül formülü $C_4H_9NO_2$ olup, moleküler ağırlığı ise 103 Da'dır (Nikmaram *et al.* 2017).



Şekil 1. L-Glutamat'tan GABA'nın oluşumu (Diana *et al.* 2014a)

GABA memelilerin merkezi sinir sisteminde sinir hücrelerindeki presinaptik membranda bulunan vezikül keseleri içinde depolanmaktadır. Sinyal aktarımı sırasında GABA, vezikül keselerinden sinaptik boşluğa salınarak buradan postsinaptik nörona ulaşmaktadır (Şekil 2). GABA sinir iletimini gerçekleştirmek amacıyla postsinaptik membranlarda bulunan spesifik reseptörlerle etkileşime girmektedir. Bunlar GABA-A, GABA-B ve GABA-C olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadır. Bu reseptörler farmakolojik ve yapısal olarak birbirlerinden farklılık göstermekte, GABA-A reseptörleri hızlı inhibe edici sinaptik iletimlere aracılık ederek nöronal uyarıları ve ruh halindeki hızlı değişimleri kontrol etmektedir. Böylece nöbet, anksiyete, panik ve stres durumları GABA-A reseptörleri tarafından düzenlenmektedir. GABA-B reseptörleri, hafıza, ruh hali ve ağrıda önemli olduğu görülen yavaş inhibe edici iletimlere aracılık etmektedir. GABA-C reseptörlerinin ise tanımlanmalarına rağmen fizyolojik rolleri henüz net olarak bilinmemektedir (Diana *et al.* 2014a; Rashmi *et al.* 2018).



Şekil 2. Sinapslar aracılığıyla nöronların birbiriyle iletişimi (Lucic 2020)

GABA'nın sağlık üzerindeki rolü ve önemi

GABA, uyku/uykusuzluk döngüsünün düzenlenmesinde, motor aktivite ile ilgili faaliyetlerin yürütülmesinde, hafıza oluşumunda ve idrak etme yeteneğinin devam ettirilmesinde önemli rol oynamaktadır (Yunes *et al.* 2016; Yu *et al.* 2019). Beynin çok fazla uyarılması ile sinirlilik, huzursuzluk, uykusuzluk, nöbetler ve hareket bozuklukları meydana gelebilmekte ve bunların çeşitli faktörlerle dengelenmesi gerekmektedir. GABA bu dengeyi sağlayarak bir nevi "fren" etkisi yapmaktadır (Bamnia 2011).

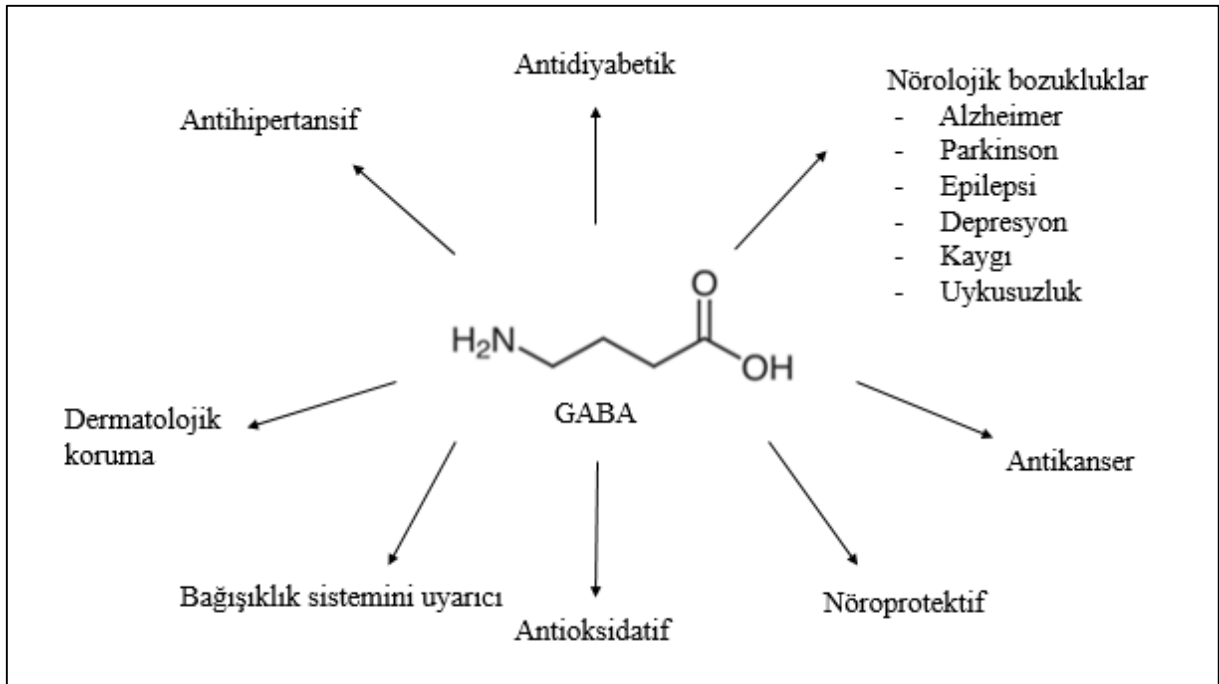
GABA ile ilgili fonksiyonlardaki değişikliklerin Alzheimer, Parkinson, Şizofreni, Epilepsi gibi nörolojik hastalıklarla ilişkili olabileceğı düşünülmektedir. Nitekim Alzheimer ve Parkinson hastalarında beyindeki GABA konsantrasyonunun çok düşük olduğu ve GABAerjik inhibisyonun azaldığı gözlemlenmiştir (Diana *et al.* 2014a; Jain and Ghodke 2021).

Vücuttaki ağrı hissinin ağrı impulslarının iletilmesinin kısmen ya da tamamen engellenmesi ve buna bağılı olarak GABA gibi inhibitör nörotransmitterlerin salınması ile azalabileceğı belirtilmiştir (Öztürk ve Özerdoğan 2020). Ayrıca uykuda aktif olan GABA nöronlarının histaminerjik ve diğere uyanıklık oluşturan hücre gruplarını inhibe ederek uykunun başlatılmasında ve sürdürülmesinde çok önemli rol oynadığı ifade edilmektedir (Saygın ve Özgüner 2020). Bir araştırmada yüksek dozlu GABA içeren sütler ile beslenen farelerde anksiyetenin azaldığı, uyku süresinin ise önemli derecede uzadığı görülmüştür (Yu *et al.* 2020). Benzer şekilde Yamatsu *et al.* (2016) GABA'nın insanlarda uyku gecikmesini önemli ölçüde azalttığını, uyku süresini ise arttırdığını belirtmişlerdir.

GABA'nın önemli fizyolojik etkilerinden bir diğeri de kan basıncını düzenleyici etkisidir. Bu etki presinaptik GABA reseptörleri üzerindeki bir eylem yoluyla noradrenalinin salınımını engellemesi ve buna bağılı olarak perfüzyon basıncındaki artışı durdurmasından kaynaklanmaktadır (Hayakawa *et al.* 2004; Anggraini *et al.* 2018). Nitekim konu ile ilgili yapılan araştırmalar GABA'nın hem sıçanlarda hem de insanlarda antihipertansif etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Aoki *et al.* 2003; Inoue *et al.* 2003; Pouliot-Mathieu *et al.* 2013; Kawakami *et al.* 2018). GABA'nın antihipertansif etkisiyle ilgili yapılan bir çalışmada hipertansiyonlu ratlar fermente ve fermente edilmemiş gıda ile beslenmiş, 0,0065 g/100 g GABA içeren fermente gıda ile beslenen ratların sistolik kan basıncının kontrol grubuna göre önemli derecede düşük olduğu tespit edilmiştir (Zareian *et al.* 2020). Benzer şekilde Beltran-Barrientos *et al.* (2018) *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 suşunu kullanarak fermente ettikleri sütler ile beslenen hipertansiyonlu ratların kan basıncını 2 saat boyunca 15 d aralıklarla incelemişlerdir. Araştırmacılar fermente sütteki GABA konsantrasyonunun 111,4 mg/100 g

olduğunu ve GABA ile beslenen ratların kan basıncının kontrol grubuna göre önemli düzeyde düştüğünü bildirmişlerdir.

Ayrıca GABA'nın pankreasta bulunan ve insülin üretiminden sorumlu beta hücrelerinin fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynayarak, insülin salınımını teşvik ettiği, böylece antidiyabetik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Li and Cao 2010; Dhakal *et al.* 2012; Rezazadeh *et al.* 2021). Chen *et al.* (2016) *S. salivarius* subsp. *thermophiles* fmb5 suşu kullanılarak GABA açısından zenginleştirilen yoğurdun diyabetli farelerde kan şekeri düzeyini azalttığını, bunun yanı sıra insülin ve HDL kolesterol düzeyini artırdığını bildirmişlerdir. Sağlıklı insanlarda ise GABA'nın glukoz seviyesini önemli derecede etkilemediği, ancak insülin seviyesini artırdığı ve diyabet için potansiyel faydalar sağlayabileceği rapor edilmiştir (Li *et al.* 2015). Tüm bunlara ilaveten GABA'nın antioksidatif, antikanserojen, böbrek hastalıklarına karşı koruyucu ve bağışıklık sistemi ile ilgili hücrelerin uyarılmasında da etkili olduğu belirlenmiştir (Sahab *et al.* 2020). Abdou *et al.* (2006) tarafından yapılan çalışmada GABA takviyesinin kaygıyı azaltarak rahatlamayı sağladığı ve stres koşulları altında insanların bağışıklığını uyararak Ig(A) seviyesini artırdığı tespit edilmiştir. Yapılan bazı araştırmalar GABA'nın dermatolojik faydalarının bulunduğunu da göstermektedir. Öyle ki GABA'nın kollajenin sentezi ve degradasyonu arasındaki dengeyi kontrol ederek cilt elastikiyetini geliştirdiği ve dermal fibroblastların canlılığını artırdığı bildirilmiştir (Ito *et al.* 2007; Uehara *et al.* 2017). GABA'nın fermente ürünler veya takviyeler ile belirli dozlarda tüketilmesi bahsedildiği üzere hayvanlar ve insanlar üzerinde birçok faydalı etkiye sahip olabilmektedir. GABA'nın sağlık üzerindeki bazı fonksiyonları Şekil 3'de özetlenmiştir.



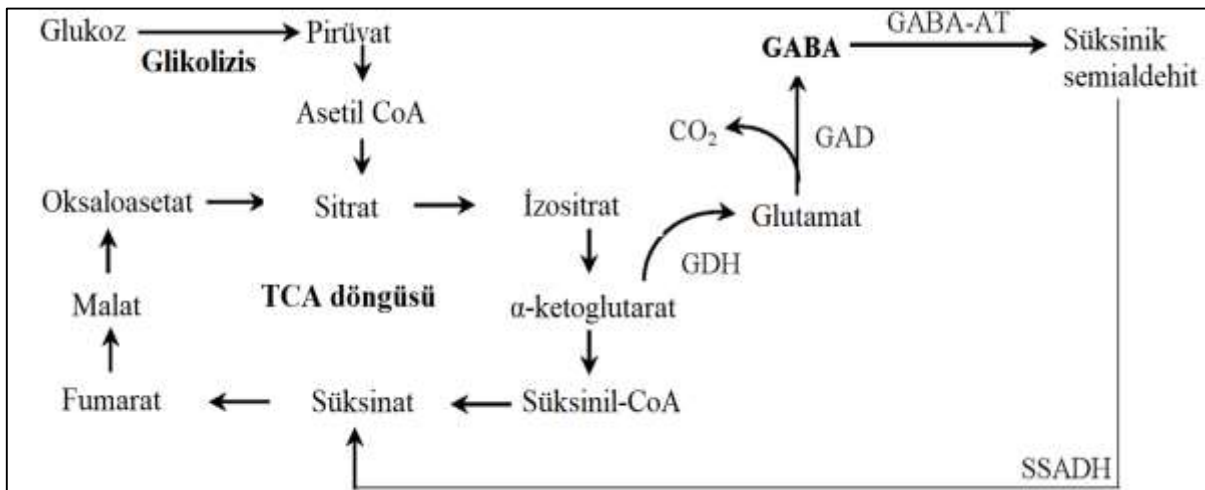
Şekil 3. GABA'nın sağlık üzerindeki bazı rolleri (Jain and Ghodke 2021)

GABA'nın üretim mekanizması

Mikroorganizmalarda, omurgalılarda ve bitkilerde bazı metabolik yollar sayesinde GABA oluşumu sağlanmaktadır. Substrat olarak kullanılan glutamat, TCA döngüsünden oluşabileceği gibi bazı gıdalarda doğal olarak da bulunabilmektedir. TCA döngüsü ile glutamattan GABA'nın oluşumu Şekil 4'de görülmektedir. Glikoliz sırasında oluşan piruvat, asetil-CoA'ya dönüştürülmekte, asetil-CoA ise TCA döngüsüne giren sitrat üzerinden α -ketoglutarata metabolize edilmektedir. TCA döngüsünden elde edilen α -ketoglutarat glutamik asit dehidrogenaz (GDH) tarafından glutamata, glutamat ise dekarboksilasyon ile GABA'ya dönüşmektedir. Geri dönüşümsüz olan bu reaksiyon PLP'ye bağlı GAD tarafından katalize edilmektedir.

GABA'nın degradasyonu ise iki enzim aracılığıyla meydana gelmektedir. GABA, öncelikle GABA-aminotransferaz (GABA-AT) enzimi tarafından tersinir bir reaksiyonla süksinik semialdehit ara metabolitine, daha sonra semialdehit dehidrogenaz (SSADH) ile süksinata okside edilmektedir. Süksinat ise daha sonra TCA döngüsüne katılmaktadır (Şekil 4). TCA döngüsü mitokondride meydana gelirken, glutamattan GABA oluşumu sitozolde meydana gelmektedir (Yalçinkaya vd 2019; Sahab *et al.* 2020).

Belirtildiği üzere beyindeki GABA konsantrasyonunun fazla ya da yetersiz olması epilepsi, nöbetler, kasılmalar, Parkinson, Alzheimer gibi çeşitli nörolojik hastalıklara sebep olabilmektedir. GABA eksikliğine bağlı olarak beyinde glutamatın GABA'ya dönüşümü gerçekleşirken, fazlalığı durumunda ise süksinata parçalanmaktadır. Dolayısıyla bu metabolizmalar sayesinde beyindeki GABA dengesi sağlanmış olmaktadır.

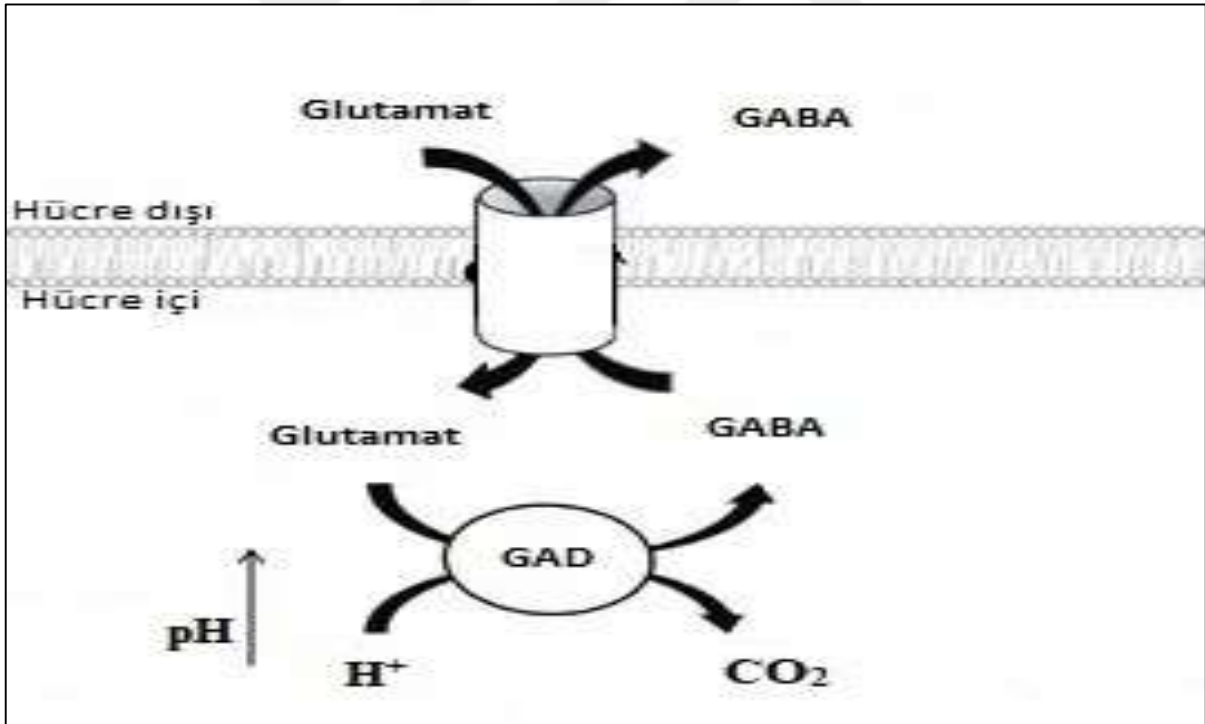


Şekil 4. TCA döngüsünden GABA'nın metabolik yolu (Sahab *et al.* 2020)

Memelilerde GAD sistemi çeşitli beyin fonksiyonlarında önemli rol oynarken, bitkiler ve mikroorganizmalarda başka roller üstlenmektedir. GABA oluşumunun bitkilerde sıcaklık

şoku, hipoksi (O_2 yetmezliği) ve artan Ca^{+} iyonu seviyesi gibi çeşitli stres koşullarına, mikroorganizmalarda ise özellikle asidik şartlara karşı verilen tepkiyle ilişkili olduğu bildirilmektedir (Feehily and Karatzas 2013).

Çeşitli bakteri türlerinde bulunan ve intraselüler bir enzim olan GAD aside karşı en önemli direnç mekanizması olarak görülmektedir. Bu sistem glutamatın GABA'ya dekarboksilasyonunda H^{+} iyonunu tüketerek hücre içindeki pH dengesini korumaktadır. Genelde mikrobiyal fermantasyon sırasında oluşan sorbik, asetik, laktik asit gibi zayıf ve disosiyasyon olmayan asitlerin bakterinin sitoplazmasında birikerek hücre içi pH'yı düşürdüğü, hücrenin asitlenmesinin ise metabolizmayı olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Pandey *et al.* 2016). Bu yüzden hücre içi pH'nın dengelenmesi için öncelikle hücre dışında bulunan glutamat hücre içine (sitoplazma) alınarak GAD enzimi aracılığıyla GABA sentezlenmekte, bu reaksiyonda bir H^{+} iyonu tüketilmektedir. Hücre içinde oluşan GABA ise bir antiporter aracılığıyla hücre dışına gönderilerek, yeni bir döngü için başka bir glutamat hücre içine alınmaktadır (Şekil 5). Böylece sitoplazma içinde H^{+} iyonlarının azalması pH'yı yükseltirken hücreyi aside karşı korumaktadır (Feehily and Karatzas 2013).



Şekil 5. Glutamat dekarboksilaz (GAD) mekanizması (Feehily *et al.* 2014)

GABA'nın üretimi

Son yıllarda fizyolojik fonksiyonlarından dolayı GABA hem gıda hem de ilaç endüstrinin yoğun ilgisini çekmekte, gıda katkı maddesi veya ilaç olarak kullanılması açısından uygun bir aday olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle GABA'nın kimyasal veya biyolojik olarak

sentezlenmesi önem arz etmektedir. GABA'nın "gama-bütürolakton" veya "2-bromo propiyonik asit" kullanılarak kimyasal sentezinin yapıldığı ifade edilmiştir (Jain and Ghodke 2021). Bununla birlikte doğal ve güvenli olmasından dolayı GABA'nın biyolojik yolla sentezi için mikrobiyal fermantasyonun etkili bir yöntem olabileceği bildirilmiştir. Şimdiye kadar çok sayıda çalışmada bakteri, maya, küf gibi mikroorganizmaların fermantasyon yoluyla GABA üretebileceği doğrulanmıştır (Rashmi *et al.* 2018; Sarasa *et al.* 2020).

Aynı zamanda biyolojik yolla sentezinin basit bir reaksiyon prosedürüne, yüksek katalitik verimliliğe ve çevresel uyumluluğa sahip olması nedeniyle diğer kimyasal sentez yöntemlerinden daha fazla tercih edildiği bildirilmiştir (Huang *et al.* 2007; Dhakal *et al.* 2012). Ayrıca doğal ve sentetik GABA'nın karşılaştırıldığı bir araştırmada sentetik GABA'nın klinik olarak etkili olmadığı görülmüştür. Sentetik GABA'nın yapısındaki küçük farklılıklardan dolayı GABA reseptörlerine bağlanamadığı ve tüm GABA reseptörlerinin aktive olamadığı belirtilmiştir. Oysa GABA'nın doğal formunun daha fazla reseptörü aktive ettiği klinik olarak kanıtlanmıştır (Rashmi *et al.* 2018). GABA'nın biyolojik olarak sentezi için immobilize hücre teknolojisi, kesikli (batch) fermantasyon teknolojisi, GABA üreten mikrobiyal suşların yardımcı kültür olarak kullanılması, GAD enziminin moleküler olarak tasarlanması gibi farklı biyoteknolojik teknikler geliştirilmiştir. Bu teknikler farmasötik, gıda ve diğer endüstrilerde GABA preparatları hazırlamak için kullanılmaktadır (Diana *et al.* 2014a; Nikmaram *et al.* 2017). Nitekim Japonya'da PharmaFood şirketi tarafından Kimçi'den izole edilen LAB' lar kullanılarak üretilen preparat PharmaGABA ismiyle satışa sunulmuştur (Kook and Cho 2013).

GABA üreten mikroorganizmalar

Laktik asit bakterileri

LAB'lar Gram (+), katalaz (-), spor oluşturmeyen, hareketsiz, fakültatif anaerobik bakteriler olup, karbonhidrat metabolizmaları sonucunda son ürün olarak laktik asit oluşturan mikroorganizmalardır. LAB'lar gıda endüstrisinde fermente gıdaların üretiminde starter kültür olarak yüzyıllardır yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Çoğu gıdanın önemli miktarda glutamat içerdiği, LAB'ların asidik koşullara karşı toleranslarını artırmak için GAD sistemini kullanarak glutamattan GABA sentezlediği bilinmektedir (Yogeswara *et al.* 2020b). Bu yüzden glutamat bakımından zengin fermente gıdalarda doğal olarak yüksek konsantrasyonlarda GABA bulunabilmektedir (Cui *et al.* 2020). Süt bu açıdan değerlendirildiğinde kazeinin yüksek oranda glutamik asit içerdiği, dolayısıyla sütün fermantasyonu ya da proteolizi sırasında söz konusu amino asitin fazla miktarda serbest kalabileceği belirtilmiştir (Yalçinkaya *et al.* 2019). Bu nedenle özellikle yoğurt ve peynir

GABA üretimi açısından üzerinde en çok yoğunlaşılan süt ürünleri arasında yer almaktadır. Konu ile ilgili ülkemizde yapılan bir çalışmada Beyaz, Kaşar ve Tulum peynirlerine ait 30 adet peynir örneği GABA içeriği ve serbest amino asit profilleri açısından incelenmiş, GABA konsantrasyonu açısından analiz edilen peynir örnekleri içerisinde en yüksek GABA konsantrasyonunun (83,05 mg/100g) Beyaz peynire ait örnekte belirlendiği bildirilmiştir. Üç peynir çeşidinin de yüksek oranda GABA üretebilme yeteneğine sahip bakterilerin izolasyonu için uygun kaynaklar olabileceği ifade edilmiştir (Ayağ *et al.* 2022). Diğer bir araştırmada salatalık turşusunun fermentasyonu ve depolanması süresince GABA oluşumu incelenmiş, turşudaki GABA konsantrasyonunun 24 saat içinde en yüksek değere (1,21 mM) ulaştığı, depolama boyunca ise stabil kaldığı belirlenmiştir. Ayrıca fermente turşudaki GABA konsantrasyonunun (1,21 mM) taze turşudakine göre (0,83 mM) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Moore *et al.* 2021).

Son yıllarda çalışmalar çoğunlukla GABA'nın doğrudan eldesinden ziyade, GABA üretebilen LAB'ın fermente gıdalardan izolasyonuna odaklanmış ve konu ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Çeşitli kaynaklardan yapılan izolasyon çalışmalarında laktobasil ve laktokok başta olmak üzere bazı LAB suşlarının GAD genine sahip olduğu, yani GAD enzim aktivitesi ve GABA üretme yeteneği gösterdiği belirlenmiştir (Dhakal *et al.* 2012; Yogeswara *et al.* 2020b). Yapılan çalışmalar incelendiğinde GABA üreten LAB'ın çiğ süt, peynir, turşu, ekşi hamur, Uzak Doğu'ya özgü geleneksel fermente gıdalar ve fermente içecekler gibi çeşitli gıdalardan izole edildiği görülmüştür (Huang *et al.* 2007; Lu *et al.* 2008; Das and Goyal 2015; Franciosi *et al.* 2015; Barla *et al.* 2016; Yogeswara *et al.* 2020a; Hurtado-Romero *et al.* 2021). Bazı gıdalardan izole edilen ve GABA üretme yeteneğine sahip LAB suşları Tablo 1'de verilmiştir.

GABA üreten *Lactobacillus* türleri arasında özellikle *L. brevis* ve *L. plantarum* en çok izole edilen suşlar olup, uygun koşullarda yüksek GABA üretme yeteneği sergiledikleri bilinmektedir (Binh *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2017a). Nitekim *L. brevis*'in çiğ süt (Huang *et al.* 2007), peynir (Carafa *et al.* 2015), ekşi hamur (Cataldo *et al.* 2020), Kimchiden (Park and Oh 2007); *L. plantarum*'un ise peynir (Siragusa *et al.* 2007), lahana turşusu (Karimian *et al.* 2020), fermente içecekler (Das and Goyal 2015) gibi çeşitli gıdalardan izole edildiği ve iyi birer GABA üreticileri oldukları bildirilmiştir.

Geleneksel Meksika peynirlerinden izole edilen *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. ve *Streptococcus* spp. türlerinin GABA sentezleme kapasitelerinin değerlendirildiği bir çalışmada, toplam 94 adet LAB suşu arasında 19'unun GAD genine sahip olduğu ve bunlar arasında en yüksek konsantrasyonda GABA üreten suşların *L. lactis* L-571 ve L-572 olduğu tespit

edilmiştir. Ayrıca izole edilen *Streptococcus* spp. suşlarının hiçbirinde GAD genine rastlanmadığı da bildirilmiştir (Santos-Espinosa *et al.* 2020).

Tablo 1. GABA Üreten Çeşitli LAB Suşlarının İzolasyon Kaynakları

LAB Suşu	İzolasyon Kaynağı	GABA Konsantrasyonu	Referans
<i>L. plantarum</i> FNCC 260	Fermente gıdalar	809,2 mg/L	Yogeswara <i>et al.</i> (2020a)
<i>K. lactis</i> BIOTEC009	Kefir daneleri	1,66 mM	Hurtado-Romero <i>et al.</i> (2021)
<i>L. plantarum</i> BC114	Lahana turşusu	3,45 g/L	Zhang <i>et al.</i> (2017a)
<i>L. plantarum</i> DSM19463	Peynir	4,83 mM	Di Cagno <i>et al.</i> (2010)
<i>L. brevis</i>	Kimchi	44,4 g/L	Binh <i>et al.</i> (2014)
<i>L. brevis</i> CRL 1942	Ekşi hamur	255 mM	Villegas <i>et al.</i> (2016)
<i>L. brevis</i>	Peynir	129 mg/L	Carafa <i>et al.</i> (2015)
<i>S. thermophilus</i> QYW-LYS1	Yoğurt	2,905 g/L	Liu <i>et al.</i> (2014)
<i>S. thermophilus</i>	Peynir	80,0 mg/kg	Franciosi <i>et al.</i> (2015)
<i>L. paracasei</i> PF6	Peynir	99,9 mg/kg	Siragusa <i>et al.</i> (2007)
<i>L. paracasei</i> NFRI 7415	Fermente balık	302 mM	Komatsuzaki <i>et al.</i> (2005)
<i>L. paracasei</i>	Yoğurt	100,09 mg/kg	Zarei <i>et al.</i> (2018)
<i>L. lactis</i>	Kimchi	3,68 g/L	Lu <i>et al.</i> (2008)
<i>L. lactis</i> L-572	Peynir	86,2 mg/L	Santos-Espinosa <i>et al.</i> (2020)
<i>L. casei</i> ZHANG	Kıymız	677,35 mg/kg	Wang <i>et al.</i> (2010)
<i>L. helveticus</i> ND01	Kıymız	165,11 mg/L	Sun <i>et al.</i> (2009)
<i>L. acidophilus</i> RMK567	Çiğ süt	711,40 µg/g	Lim <i>et al.</i> (2009)
<i>L. rhamnosus</i> YS9	Sebze turşusu	187 mM	Lin (2013)

Diğer bir çalışmada çiğ inek sütünden üretilen geleneksel İtalya peynirlerinden izole edilen LAB'ların GABA üretim yetenekleri HPLC cihazı ile analiz edilmiş, toplam 1059 izolata ait 97 baskın küme içerisinde 68 suşun GABA ürettiği, GABA üreten suşların çoğunluğunun *L. paracasei*' den oluştuğu, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *P. pentosaceus* ve *S. thermophilus* bakterilerinin ise GABA sentezleyen türler arasında olduğu bildirilmiştir (Franciosi *et al.* 2015). Lu *et al.* (2008) tarafından yapılan bir çalışmada ise Kimchi ve yoğurttan izole edilen 10 adet LAB suşunun GABA üretim yeteneklerinin bulunduğu, ancak MRS broth ortamında en yüksek konsantrasyonda (3,68 g/L) GABA üreten suşun Kimchi'den izole edilen *L. lactis* olduğu belirtilmiştir. Ayrıca *L. helveticus*'un kıymızdan, *Enterococcus avium* M5 ve *L. sakei*'nin ise Uzakdoğu'ya ait fermente bir deniz ürününden izole edildiği ve bu suşların da GABA üretme yeteneklerinin bulunduğu bildirilmiştir (Sun *et al.* 2009; Sa *et al.* 2015; Lee *et al.* 2017).

Ülkemizde fermente gıdalardan GABA aktivitesi gösteren LAB'ların izolasyonu ile ilgili az sayıda araştırmaya rastlanmıştır. Yapılan bir çalışmada ekşi hamurdan izole edilen

LAB'ların antifungal, antibakteriyel aktiviteleri ile GABA üretme yetenekleri araştırılmış, tüm izolatların insan sağlığı için önemli bir fizyolojik bileşen olarak GABA'yı sentezleyebildikleri ve en yüksek GABA konsantrasyonunun ise *Weissella paramesenteroides* N-7 tarafından üretildiği belirlenmiştir (Demirbaş *et al.* 2017). Özer (2019a) tarafından yapılan çalışmada lahana turşusu, Sauerkraut ve Kimchi gibi lahana-bazlı fermente ürünlerin doğal mikroflorasından izole edilen LAB'ların GABA üretme yeteneği ve kontrollü fermantasyon koşullarında GABA üretim seviyeleri araştırılmıştır. İzolatlardan *L. lactis* ssp. *lactis* 1 SK1-C29 ve *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* 1 KM1-C102 suşlarının yüksek oranda GABA ürettiği bildirilmiştir. GABA üretme yeteneğinin kullanılan LAB suşuna bağımlı olduğu ve bu nedenle farklı gıdalardan GABA üreten yeni suşların belirlenmesinin önem arz ettiği rapor edilmiştir. Diğer bir çalışmada ise ekşi hamurdan izole edilen 253 adet LAB izolatının GAD gen bölgeleri RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) ile belirlenmiş, GABA üretim miktarları HPLC ile analiz edilmiştir. GAD (+) 37 adet suş arasından yüksek GABA üreticisi olarak belirlenen *L. brevis* ile *L. plantarum* suşları yoğurt ve boza üretiminde kullanılmış, ayrıca *L. brevis* suşunun GABA verimini artırmak amacıyla fermantasyon koşullarının optimizasyonu sağlanmıştır. Sonuç olarak maksimum GABA konsantrasyonuna 30 °C sıcaklıkta, 130,71 mM mono sodyum glutamat (MSG) konsantrasyonunda, 4,74 pH değerinde ve 72 saatlik fermantasyon süresi sonunda ulaşılabildiği bildirilmiştir (Alkay 2021).

Diğer mikroorganizmalar

LAB'lar GABA üreticisi olarak üzerinde en çok çalışılan bakteri grubu olsa da diğer bakteriler, küf ve maya gibi mikroorganizmaların da GAD aktivitesine sahip olduğu bilinmektedir. Nitekim bakterilerde *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis*; küflerde *Aspergillus oryzae*, *A. nidulans*, *A. niger*; mayalarda ise *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* ve *C. fermenti* GABA ürettiği bildirilen mikroorganizmalardır (Dhakal *et al.* 2012; Chua *et al.* 2019; Yu *et al.* 2019; Sarasa *et al.* 2020; Sahab *et al.* 2020).

GABA üretimini etkileyen faktörler

Suşların GABA üretim kapasitesi starter kültürlerin türü, kültür ortamının başlangıç pH'sı, sıcaklığı, kompozisyonu ve fermantasyon süresi gibi faktörlerden önemli ölçüde etkilenmektedir. GABA üretim kapasitesinin öncelikle kullanılan LAB suşuna bağımlı olduğu bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada farklı *L. plantarum* suşları (UPMC90, UPMC91 ve UPMC1065) yoğurt üretiminde kullanılmış ve üç suşun da farklı konsantrasyonlarda (18,23 mg/100g; 21,05 mg/100g ve 17,76 mg/100g) GABA ürettikleri tespit edilmiştir. Aynı zamanda

UPMC90 ve UPMC91 suşlarının birlikte kullanıldığı örnekte simbiyotik ilişki ile en yüksek GABA seviyesine (25,36 mg/100g) ulaşıldığı rapor edilmiştir (Hussin *et al.* 2020).

Yapılan bazı optimizasyon çalışmalarında en yüksek GAD aktivitesini *S. thermophilus* Y2'nin pH 4,5 ve 40 °C'de, *L. brevis*'in pH 5,25 ve 37 °C'de, *L. paracasei* NFRI 7415'nin pH 5 ve 37 °C'de, *L. sakei* A156'nın ise pH 5 ve 55 °C'de gösterdiği bildirilmiştir (Komatsuzaki *et al.* 2005; Yang *et al.* 2008; Binh *et al.* 2014; Sa *et al.* 2015). GABA oluşumu için bir diğer önemli faktörün asitlik gelişimi olduğu ifade edilmiştir. Nitekim *L. lactis* suşunun fermentasyon koşullarının optimize edildiği bir çalışmada aynı oranda glutamat içeren sütlerde, pH 5,1 ve 5,4'de GAD aktivitesinin düşük kaldığı, pH 4,8'de ise en yüksek oranda GABA oluşumunun sağlandığı gözlemlenmiştir (Gardner-Fortier *et al.* 2013). Bununla birlikte çok düşük pH (<4) şartlarında ise GAD aktivitesinin azaldığı belirtilmiştir (Komatsuzaki *et al.* 2005).

Öte yandan araştırmacılar kültür ortamının kompozisyonunun LAB'ın GABA üretimini etkilediğini, özellikle glutamat ve/veya PLP katkılı ortamlarda maksimum oranda GABA sentezlediklerini bildirmişlerdir (Shan *et al.* 2015; Santos-Espinosa *et al.* 2020; Yogeswara *et al.* 2020b). Glutamat GAD enziminin substratı olduğundan GABA üretimini teşvik eden önemli bir bileşik olarak kabul edilmekte, çoğunlukla LAB'lar GABA üretimi için yeterli miktarda glutamik asit sentezleyemediklerinden genelde monosodyum glutamat (MSG) veya glutamik asit kültür ortamına ilave edilmektedir. Optimal MSG konsantrasyonunun her mikroorganizma için farklılık gösterdiği, aşırı MSG konsantrasyonunun mikroorganizma gelişimini olumsuz etkileyebileceği, dolayısıyla GABA üretimini azaltabileceği bildirilmiştir (Cui *et al.* 2020). GAD enziminin kofaktörü olarak görev alan PLP'nin ise kültür ortamına ilave edilmesi ile GABA üretiminin arttığı bilinmektedir. Öyle ki *L. paracasei* NFRI 7415 ve *L. plantarum* NDC75017 suşlarının GABA üretimlerinin ortama eklenen PLP ile artış gösterdiği belirtilmiştir (Komatsuzaki *et al.* 2005; Shan *et al.* 2015).

Fermentasyon süresi, pH, sıcaklık, MSG konsantrasyonu gibi kültür koşullarının optimize edilmesiyle *L. plantarum* BC114 suşunun GABA üretim kapasitesinin artırılmasına yönelik yürütülen bir çalışmada, en yüksek GABA konsantrasyonuna (3,45 g/L) MSG konsantrasyonunun 20 g/L, pH'nın 5, sıcaklığın 30°C ve fermentasyon süresinin 72 saat olduğunda ulaşılabildiği bildirilmiştir (Zhang *et al.* 2017a). Benzer şekilde Cataldo *et al.* (2020) tarafından yapılan bir çalışmada *L. brevis* 2013 suşunun 267 mM MSG konsantrasyonunda, 6,5 pH'da, 30 °C sıcaklıkta ve 72 saatlik fermentasyon süresi sonunda maksimum oranda GABA (265 mM) üretebildiği belirtilmiştir. GABA üretiminde fermentasyon şartlarının optimizasyonuna ait bazı çalışmalar Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Bazı LAB Suşlarının Optimum Fermantasyon Şartlarında GABA Konsantrasyonları

LAB suşu	Optimum Şartlar	GABA Konsantrasyonu	Referans
<i>L. plantarum</i> NDC75017	80 mM MSG, 18 µM PLP ve 36 °C	314,56 mg/100 g	Shan <i>et al.</i> (2015)
<i>L. plantarum</i> NTU102	%0,6 MSG, 37 °C	33 mg/L	Tung <i>et al.</i> (2011)
<i>L. plantarum</i>	250 mM glutamik asit 37,27 °C ve pH 5,19	195,5 ppm	Zarei <i>et al.</i> (2020)
<i>L. buchneri</i>	%5 MSG, pH 5,0 ve 30°C	251 mM	Cho <i>et al.</i> (2007)
<i>L. brevis</i> 877G	29,57 mM MSG	22,51 mM	Seo <i>et al.</i> (2013)
<i>L. brevis</i>	%3 MSG, 30 °C	149,05 mM	Li <i>et al.</i> (2008)
<i>L. rhamnosus</i> YS9	20 mM MSG 200 µM PLP	187 mM	Lin (2013)
<i>S. thermophilus</i> QYW-LYS1	0,2 OD mL ⁻¹ , 34 °C ve 72 saat	2,905 g/L	Liu <i>et al.</i> (2014)
<i>S. thermophilus</i> fmb5	38,8°C, 20 g/L MSG	9,66 g/L	Chen <i>et al.</i> (2018)
<i>L. lactis</i>	110 mg/100 mL MSG pH 5	226,22 mg/100 g	Bhanwar <i>et al.</i> (2013)
<i>L. lactis</i>	pH 4,8, 3,0 mg glutamat	23 mg/30 g	Gardner-Fortier <i>et al.</i> (2013)
<i>Lactobacillus</i> sp. Makhdzir Naser-1	360 mM glutamik asit 36 °C ve pH 4,4	3,818 mg/mL	Gharehyakheh (2021)

Tüm bunlara ek olarak fermantasyon yoluyla yüksek GABA üretiminin sadece kültür ortamının optimizasyonuna değil, aynı zamanda GABA'nın degradasyonuna sebep olan GABA-aminotransferaz ve semialdehit dehidrogenaz enzimlerinin inhibe edilmesine de bağlı olduğu bildirilmiştir. Semialdehit dehidrogenaz enziminin pH 8,4'de, GABA-aminotransferaz enziminin ise pH 8,5'da yüksek aktivite göstererek GABA miktarını azaltabilecekleri, bu nedenle bir tampon vasıtasıyla bu iki enzimin aktivitesi engellenerek GABA'nın degradasyonunun önlenebileceği belirtilmiştir (Dhakal *et al.* 2012; Sahab *et al.* 2020).

Gıdaların GABA ile zenginleştirilmesi

GABA'nın sağlık üzerinde birçok biyolojik ve fonksiyonel etkiye sahip olması, ayrıca insan ve hayvanlar üzerinde yapılan klinik çalışmalar ile sağlık adına umut verici sonuçların elde edilmesi gıdalardaki GABA içeriğinin artırılmasına yönelik birçok yaklaşımı ortaya çıkarmıştır. Bu yaklaşımlardan biri bitkilerde doğal olarak az miktarda bulunan GABA'nın dış kaynaklı stres koşullarının sağlanması ile miktarının artırılmasına odaklanmıştır. Bitkilerde mekanik yaralanma, anoksi, sıcak/soğuk şok ve tuzluluk gibi abiyotik stres koşullarının GAD aktivitelerinde hızlı artışa neden olduğu, dolayısıyla GABA miktarını artırdığı belirlenmiştir

(Ding *et al.* 2019). Konu ile ilgili yapılan bir çalışmada anoksi şartlarında çay yapraklarında oluşan GABA miktarı incelenmiş, anoksi şartlarında çay yapraklarındaki GABA konsantrasyonunun diğer çay yapraklarına göre 20 kat daha fazla olduğu vurgulanmıştır (Liao *et al.* 2017).

Diğer bir yaklaşımın ise yulaf, buğday, pirinç gibi tahıl tanelerinin çimlendirilmesi olduğu bildirilmiştir. Kontrollü olarak yapılan çimlendirmenin tahılların besin değeri ve lezzetini artırmak amacıyla kullanıldığı, GABA dahil olmak üzere birçok biyoaktif bileşenin miktarlarında artışa neden olduğu ifade edilmiştir (Ding *et al.* 2019). Caceres *et al.* (2019) tarafından yapılan bir çalışmada 48 ve 96 saat boyunca çimlendirilmiş pirinç ile yoğurt benzeri fermente sütler üretilmiş, en yüksek GABA konsantrasyonunun (1,9 mg/100 g) ve ACE inhibitör aktivitesinin (%61,5) 96 saat çimlendirilmiş pirinç içeren fermente sütlerde tespit edildiği bildirilmiştir.

Gıdaların GABA ile zenginleştirilmesinde üçüncü bir yaklaşımın ise mikrobiyal fermentasyon yönteminin olduğu belirtilmiştir. GABA'nın gıdaya doğrudan ilavesinin doğal ve güvenilir olmadığı, GABA'nın fermentasyon yoluyla yerinde üretiminin tercih edildiği bildirilmiştir (Chua *et al.* 2019). Bu açıdan değerlendirildiğinde GABA'nın doğal olarak bakteri, maya, küf gibi mikroorganizmalar tarafından üretilbildiği, özellikle de GRAS olarak kabul edilmeleri nedeniyle LAB'ların önemli potansiyele sahip olduğu ifade edilmiştir (Diana *et al.* 2014b). Bu nedenle GABA üreten LAB suşlarının çeşitli gıdaların üretiminde fonksiyonel kültür olarak kullanımına yönelik araştırmaların sayısı artış göstermiştir. Ülkemizde ise gıdaların GABA ile zenginleştirilmesine yönelik çok az sayıda çalışma mevcuttur. Özer (2019b) tarafından yapılan çalışmada probiyotik nitelikte ve GABA üretim yeteneği gösteren LAB'lar ile fonksiyonel bir çikolata üretilmesi amaçlanmış, öncelikle LAB suşlarının GABA üretim yeteneği farklı metotlar ile incelenmiş, *L. rhamnosus* NRRL-B442 suşunun en yüksek GABA konsantrasyonuna (59,0 mg/L) sahip olduğu belirlenmiştir. Söz konusu bakteri daha sonra mikroenkapsüle edilerek çikolataya ilave edilmiş ve böyle bir ürünün anksiyete bozukluğu olan bireylerde terapötik etkisinin olabileceği ifade edilmiştir. Alkay (2021) ise *L. plantarum* JCM 1149, KCO-48 ve *L. brevis* ATCC 14869 suşlarının bozada GABA üretim potansiyellerini değerlendirmiştir. *L. plantarum*+MSG'li boza örneğinde GABA miktarının *L. brevis*+MSG içeren boza örneğinden fazla olduğunu ve depolama süresince GABA oranının azaldığını bildirmiştir.

Süt ürünleri açısından değerlendirildiğinde GABA üretme yeteneğine sahip suşların fermente süt üretiminde (Minervini *et al.* 2009; Nejati *et al.* 2013), yoğurt üretiminde (Linares *et al.* 2016; El-Fattah *et al.* 2018) ve peynir üretiminde (Wang *et al.* 2010; Carafa *et al.* 2015;

Renes *et al.* (2019) kullanımına yönelik araştırmalar bulunmaktadır. Aşağıda fermente süt rnlerinin GABA ile zenginleştirilmesine yönelik bazı araştırmalar zet halinde verilmiştir.

Minervini *et al.* (2009) farklı LAB suşlarını (*S. thermophilus* CR12, *L. casei* LC01, *L. helveticus* PR4, *L. plantarum* 1288) tek ya da kombine halde kullanarak 8 farklı fermente keçi sütü üretmişler, 4 °C de 45 gün boyunca depolayarak GABA oluşumu açısından incelemişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar, en yüksek GABA içeriğini (30,86 mg/kg) *S. thermophilus* CR12, *L. casei* LC01, *L. plantarum* 1288 kültür kombinasyonunu içeren fermente süt örneğinde tespit etmişlerdir.

Wang *et al.* (2010) kımızdan izole ettikleri probiyotik *L. casei*'nin bir suşunu farklı oranlarda (%0,1, %1 ve %2) Cheddar peynirinin üretiminde kullanmışlar, *L. casei* ilave ettikleri peynirlerin tümünün kontrol örneğine göre daha yüksek oranda GABA içerdiğini bildirmişlerdir. İlaveten en yüksek GABA konsantrasyonunun (677,35 mg/kg) %2 oranında probiyotik kültür içeren peynirde olduğunu belirtmişlerdir.

Servili *et al.* (2011) tarafından yapılan bir çalışmada polifenoller ve GABA ile zenginleştirilmiş fonksiyonel bir fermente süt içeceğinin üretilmesi amacıyla süte farklı konsantrasyonlarda (100 ve 200 mg/L) fenolik madde ilave edilmiş ve *L. plantarum* C48 ile *L. paracasei* 15N suşlarıyla fermente edilmiştir. Depolama boyunca glutamik asit konsantrasyonunun azaldığı, bu durumun glutamik asidin GABA'ya dönüşmesinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Aynı zamanda fermente sütlerde GABA konsantrasyonunun depolama periyodu boyunca arttığı, en yüksek GABA konsantrasyonunun (67,0 mg/L) ise depolamanın 30. gününde elde edildiği belirtilmiştir.

Nejati *et al.* (2013) GABA üretimini teşvik etmesi amacıyla 20 mmol/L glutamik asit içeren sütlerden *L. lactis* DIBCA2 ve *L. plantarum* PU11 suşlarını kullanarak ürettikleri fermente sütteki GABA konsantrasyonunun 144,5 mg/kg olduğunu, böyle bir fermente süt ürününün hafif hipertansiyon tedavisi için fonksiyonel bir ürün olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

Linares *et al.* (2016) balığın sindirim sisteminden izole ettikleri *S. thermophilus* APC151 suşunu yoğurt üretiminde kullanarak 21 günlük depolama süresince yoğurtların GABA içeriğini incelemişlerdir. Kontrol yoğurdunda GABA'nın tespit edilemediğini belirten araştırmacılar, en yüksek GABA konsantrasyonunu (2 mg/mL) fermentasyonun sonunda elde ettiklerini ve depolama boyunca GABA miktarının sabit kaldığını belirtmişlerdir.

El – Fattah *et al.* (2018) yaptıkları bir çalışmada biyoaktif bileşenler içeren fonksiyonel bir yoğurt üretimi için yoğurt starter kültürlerine (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S.*

thermophilus) ek olarak yüksek proteolitik aktiviteye sahip suşları (*L. cremoris*-*L. lactis*, *L. helveticus* Lh-B02, *L. rhamnosus* B-1445) yardımcı kültür olarak kullanmışlardır. Ayrıca kısmi proteoliz için süte tripsin (2,5 mg/100g) ilave ederek 14 günlük depolama süresince yoğurdun bazı kalite kriterlerini ve biyoaktif özelliklerini incelemişlerdir. Depolama boyunca yoğurtlarda GABA içeriğinin arttığını gözlemleyen araştırmacılar, en yüksek GABA içeriğini (10,33 mg/100 mL) ise depolamanın 14. gününde tripsin ve yardımcı kültürlerin birlikte kullanıldığı yoğurtta belirlemişlerdir.

Zhou *et al.* (2019) tarafından yürütülen bir çalışmada *L. helveticus* H9 suşu 4 farklı konsantrasyonda (1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 ve 1×10^7 kob/mL) yoğurt kültürü (*S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) ile birlikte kullanılmış, en yüksek GABA seviyesinin (71,28 mg/L) depolamanın 28. gününde belirlendiği ifade edilmiştir. Aynı zamanda araştırmacılar GABA seviyesinin süşun konsantrasyonundan önemli derecede etkilenmediğini bildirmişlerdir.

Han *et al.* (2020) tarafından yapılan bir çalışmada kımızdan izole edilen 100 adet süşdan (50 adet *S. thermophilus* suşu ve 50 adet *Lactobacillus* suşu) 10 tanesinin GAD genine sahip olduğu, ancak sadece 2 adet *S. thermophilus* süşunun süt ortamında GABA ürettiği bildirilmiştir. İki süş arasında en yüksek GABA veriminin ise *S. thermophilus* CGMCC 14810 süşunda belirlendiği, bu süşun fermentasyondan 48 saat sonra kazein ilaveli rekonstüte süt ortamında 5,4 g/L GABA ürettiği, hatta *L. rhamnosus* varlığında ise bu oranın 8,3 g/L'ye çıktığı bildirilmiştir.

Jitpakdee *et al.* (2021) tarafından yapılan bir çalışmada çiğ süt ve çeşitli fermente gıdalardan izole edilen *P. pentosaceus* ENM104 ile *L. plantarum* SPS109 süşları kombinasyonlar halinde fermente süt üretiminde starter olarak kullanılmış, sütler 35 °C'de 72 saat fermentasyona bırakılmıştır. Sonuç olarak GABA miktarının en fazla (4,58 µg/mL) *L. plantarum* SPS109 içeren sütte bulunduğu ifade edilmiştir. İki süşun birlikte kullanılması halinde ise GABA miktarının 4,47 µg/mL olduğu görülmüştür.

Khanlari *et al.* (2021) GABA üreten *Enterococcus faecium* MDM21 ve *W. confusa* MDM8 süşlarını *L. lactis* subsp. *lactis* BRM3 ile kombinasyon halinde fermente süt üretiminde kullanmışlar, yoğurtlarda GABA konsantrasyonunun 8-136 mg/L arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar en yüksek GABA konsantrasyonunu *E. faecium* MDM21 ve *L. lactis* subsp. *lactis* BRM3 süşlarının birlikte kullanıldığı yoğurtta tespit ettiklerini, böyle bir ürünün yeni bir fonksiyonel gıda olarak kabul edilebileceğini bildirmişlerdir.

Biyoaktif Peptitler

Son yıllarda yapılan birçok araştırma gıda kaynaklı proteinlerin besleyici değerinin yanı sıra sağlık üzerinde de olumlu etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Proteinlerin bu etkisi yapısal protein içinde inaktif olan, ancak bazı in-vivo ya da in-vitro şartlardaki enzimatik faaliyetler sonucu açığa çıkarak aktif hale geçen ve önemli fizyolojik rollere sahip olan spesifik protein fragmentlerinden kaynaklanmaktadır. Biyoaktif peptid olarak tanımlanan bu fragmentler üç farklı yolla üretilebilmektedir. Bunlardan birincisi mikrobiyal veya bitkisel kaynaklı enzimlerin yardımıyla proteinlerin hidrolize olması, ikincisi proteolitik starter kültürlerle fermentasyon ve olgunlaşma sürecinde oluşması, sonuncusu ise gastrointestinal sistemde geçiş boyunca sindirim enzimleri tarafından üretilmesidir (Daliri *et al.* 2017).

Biyoaktif peptidler, düşük molekül ağırlığında olup 2 ile 20 amino asit ünitesinden oluşmakta ve bu amino asitler amid veya peptid bağları olarak da bilinen kovalent bağlarla birleşmektedir (Sanchez and Vazquez 2017). Düzenli ve yeterli beslenme ile vücuda alınan biyoaktif peptidlerin kardiyovasküler, bağışıklık, sinir ve sindirim sistemleri üzerinde potansiyel ayarlayıcı ve/veya düzenleyici görevler üstlendiği bilinmektedir (Korhonen and Pihlanto 2006). Biyoaktivitelerinin amino asit kompozisyonuna, amino (N-) ve karboksil (C-) ucundaki amino asit tipine, peptid zincir uzunluğuna, molekül ağırlığına, amino asitlerin yük karakterlerine, hidrofobik ve hidrofilik özelliklerine bağlı olduğu, boyutlarının küçük olmaları nedeniyle daha kolay absorbe edildikleri bildirilmiştir (Semen ve Altıntaş, 2015; Şimşek ve Kılıç 2016).

Süt, yumurta, et, balık gibi hayvansal gıdaların yanı sıra soya, buğday, mısır gibi bitkisel kaynaklı gıdaların da biyoaktif peptitlerin potansiyel kaynağını oluşturduğu, bununla birlikte biyoaktif peptitler için en iyi kaynağın süt ürünleri olduğu ifade edilmiştir (Möller *et al.* 2008; Sanchez and Vazquez 2017). Özellikle kazein biyoaktif peptidlerin başlıca kaynağı olarak kabul edilmektedir. Gıda kaynaklı biyoaktif peptitlerin antihipertansif (ACE inhibitör peptidleri), antimikrobiyal, antioksidatif, antidiyabetik, antitrombotik, mineral bağlayıcılık ve opioid etki (yatıştırıcı etki) gibi birçok fizyolojik etkiye sahip olduğu ve bazı biyoaktif peptitlerin birden fazla fizyolojik etkiyi bir arada gösterebildiği bildirilmiştir (Kınık ve Gürsoy, 2002; Gürsoy vd 2015). Sütün fermentasyonu ya da olgunlaşma sırasında özellikle LAB'ların yapısındaki proteolitik enzimler ile kazeinin hidrolize olabildiği ve sonuç olarak biyolojik değere sahip peptitlerin oluşabileceği bilinmektedir. Biyoaktif peptitler ile ilgili son yirmi yılda yapılmış çok sayıda araştırma bulunmakla birlikte; ACE inhibitör aktivitesi başta olmak üzere biyoaktif peptitlerin oluşumunu sağlayabilecek yeni suşların belirlenmesi ve çeşitli ürünlerde bu suşların söz konusu peptitlerin oluşumu açısından değerlendirilmesi önem taşımaktadır.

Biyoaktif peptitlerin insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri göz önüne alındığında bu peptitler ile zenginleştirilmiş fonksiyonel gıdaların önemi de giderek artmaktadır. Nitekim yapılan çalışmalarda süt proteinleri çeşitli proteolitik ajanlar kullanılarak biyoaktif peptid oluşumu açısından incelenmiştir (Minervini *et al.* 2003; Hayes *et al.* 2006; Donkor *et al.* 2007; Parmar *et al.* 2020; Hao *et al.* 2021). Aynı zamanda bu peptitlerin izolasyon ve identifikasyonuna yönelik araştırmalar da mevcuttur. Tablo 3’de süt proteinlerinden çeşitli mikroorganizmalar ve enzimler kullanılarak elde edilen bazı biyoaktif peptitler ve özellikleri verilmiştir.

Tablo 3. Süt Proteini Kaynaklı Bazı Biyoaktif Peptitler

Tanımlanan Biyoaktif Peptitler	İzolasyon Kaynağı	Biyoaktif Özellik	Referans
α ₁ -CN f(1–9), β -CN f(60–68)	Gouda peyniri	ACE inhibitör	Saito <i>et al.</i> (2000)
β -CN f(73–82)	Fermente süt	ACE inhibitör	Gobbetti <i>et al.</i> (2000)
RLSFNP	Ekşi süt	ACE inhibitör	Guo <i>et al.</i> (2018)
Ser–Lys–Val–Tyr–Pro	Dahi	ACE inhibitör	Ashar and Chand (2004)
PYVRYL, LVYPFTGPIPN	Kefir	ACE inhibitör	Quiros <i>et al.</i> (2005)
α ₁ -CN f(1–9) α ₁ -CN f(24–32) κ -CN f(96–102) β -CN f(193–209)	Çedar peyniri	ACE inhibitör	Ong and Shah (2008)
α ₂ -CN f(19–23), β -CN f(193–198)	Yoğurt	ACE inhibitör	Donkor <i>et al.</i> (2007)
α ₂ -CN(f151–181)	Süt	Antimikrobiyal	Liu <i>et al.</i> (2015)
β -lg f(14–18)	Serum proteini	Antimikrobiyal	Theolier <i>et al.</i> (2013)
α ₁ -CN f(99–109), α ₂ -CN(183–207)	Kazein	Antimikrobiyal	McCann <i>et al.</i> (2006)
κ -CN f(106–169)	Kazein	Antimikrobiyal	Malkoski <i>et al.</i> (2001)
α ₁ -CN f(22–30) α ₁ -CN f(24–33) α ₁ -CN f(10–21) κ -CN f(106–115) β -CN f(60–68)	Çeşitli peynirler	Antimikrobiyal	Rizzello <i>et al.</i> (2005)
YQEPVLGPVRGPFPIIV, YQEPVLGPVRGPFPI	Kolostrum	Antimikrobiyal	Birkemo <i>et al.</i> (2009)
κ -CN f(96–106)	Fermente süt	Antioksidan	Kudoh <i>et al.</i> (2001)
β -CN f(199–207)	Fermente süt	Antioksidan	Rana <i>et al.</i> (2018)
α ₁ -CN f(195–205)	Fermente süt	Antioksidan- Antimikrobiyal	Rubak <i>et al.</i> (2021)
β -CN f(212–221)	Fermente süt	Antioksidan- ACE inhibitör	Rubak <i>et al.</i> (2021)

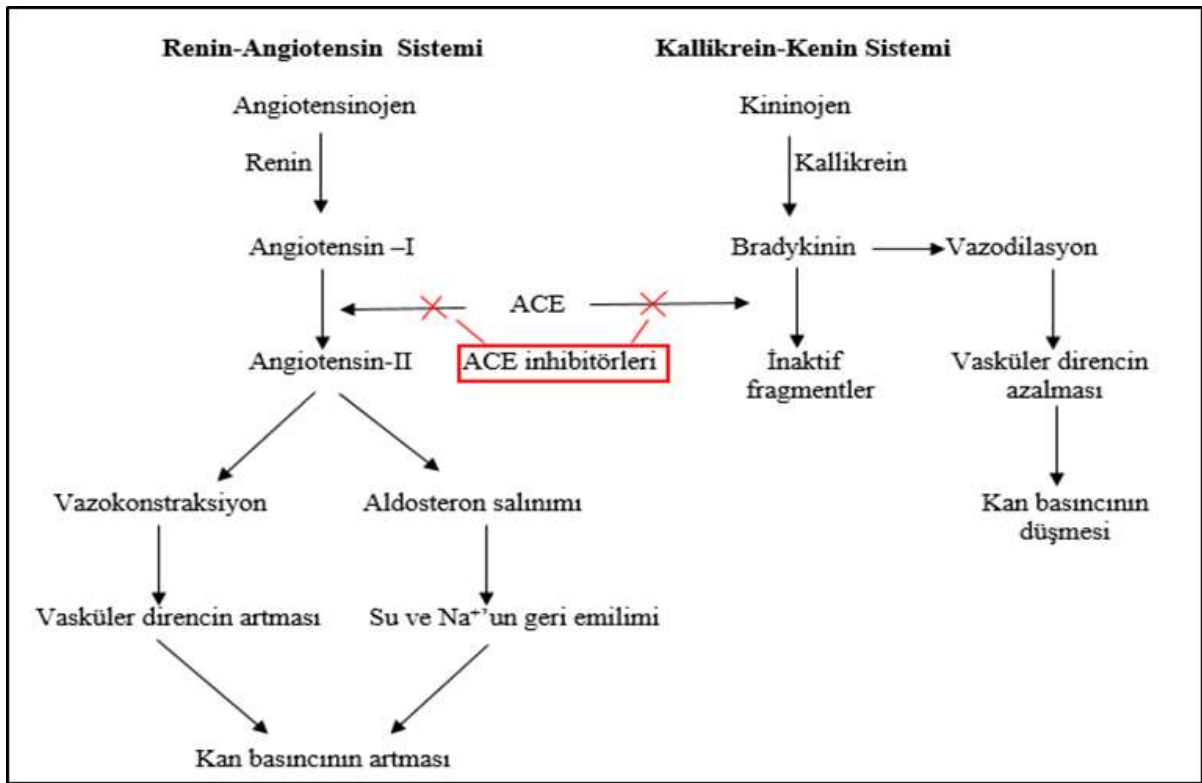
ACE inhibitör peptitler

Hipertansiyon, önleyici ve tedavi edici yaklaşımların bulunmasına rağmen dünya çapında en sık görülen kronik hastalıklardan biridir. İnme, kalp hastalığı, kronik böbrek hastalığı ve yeti yitimini önemli ölçüde artıran hipertansiyon, küresel bir risk faktörü olmaya

devam etmektedir (Tian and Liang 2021). Tüm dünyadaki ölüm nedenleri arasında hipertansiyonun üçüncü sırada yer aldığı, erişkin ölümlerinin ise %12,8'ini oluşturduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte her yıl 9,4 milyon kişinin hipertansiyon ve hipertansiyona bağlı komplikasyonlardan dolayı hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne göre, gelişmekte olan ülkelerdeki kalp hastalıklarına bağlı ölümlerin %45'i, inmeye bağlı ölümlerin %51'i hipertansiyondan kaynaklı gerçekleşmektedir (Deniz Akan vd 2020). Hipertansiyonun farmakolojik tedavisinde antihipertansif etki gösteren diüretikler, beta blokerleri, kalsiyum kanal blokerleri, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri ve anjiyotensin II reseptör antagonistleri gibi birçok ilaç grubu kullanılmaktadır (Bakır ve Şahin 2020).

Kininaz veya dipeptidil karboksipeptidaz olarak da bilinen Angiotensin Converting Enzimi (EN 3.4.15.1) kan basıncının ve elektrolit dengesinin düzenlenmesinde görev alan bir enzimdir (Kumar *et al.* 2010). Vücudun farklı dokularında lokalize halde olan ACE, kan basıncını düzenleyen renin-angiotensin ve kallikrein-kenin sistemleri ile ilişkilendirilmektedir (Nagpal *et al.* 2011; Guo *et al.* 2018). Renin aracılığıyla inaktif bir öncü olan Angiotensinojen'den Angiotensin-I oluşmakta, ACE ise Angiotensin I'i damarların daralmasına (vazokonstriktör) neden olan angiotensin II'ye dönüştürmektedir. Angiotensin II vasküler direnci artırarak, ayrıca su ve sodyumun böbreklerden kana geri emilimini artıran Aldosteron'un da açığa çıkmasını stimüle ederek kan basıncının yükselmesine sebep olmaktadır. ACE aynı zamanda damarların genişlemesini sağlayan (vazodilatör) Bradykinin'i inaktif hale getirmekte ve böylece hipertansiyona yol açmaktadır (Lahogue *et al.* 2010; Shori *et al.* 2013; Mada *et al.* 2020). ACE-inhibitör peptitleri bu etkileri bloke ederek kan basıncını düşürmektedir. ACE inhibisyonunun angiotensin II seviyesinde azalma, bradykinin seviyesinde ise bir artış sağlayarak kan basıncının düşmesinde önemli bir role sahip olduğu ifade edilmektedir (Donkor *et al.* 2007). ACE'nin renin-angiotensin ve kallikrein-kenin sistemlerindeki rolü Şekil 6'da şematize edilmiştir.

ACE inhibitör peptidi ilk olarak yılan zehirinden elde edilmiş (Kostis *et al.* 2018), daha sonradan üretilen sentetik ACE inhibitör peptitleri hipertansiyon tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Kaptopril, enalapril, lisinopril ve temokapril gibi sentetik ilaçlar günümüzde hipertansiyonun klinik tedavisi için kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçların uzun süreli kullanımında öksürük, deride döküntü, anjiyoödem gibi güçlü yan etkilerin ortaya çıktığı ifade edilmiştir (Vercruysse *et al.* 2005; Li *et al.* 2017). Bu yüzden güvenilir ve doğal olması sebebiyle gıda kaynaklı proteinlerden ACE inhibitörlerinin üretimine yönelik araştırmalar önem kazanmaya başlamıştır.



Şekil 6. ACE inhibitörlerinin renin-angiotensin ve kallikrein-kenin sistemlerindeki rolü (Kumar *et al.* 2010)

Gıda kaynaklı ACE inhibitör peptitlerin yapı-aktivite ilişkisi henüz tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte, bir ACE inhibe edici peptitin nihai gücünü etkilediği görünen birkaç yapısal özellik tanımlanmıştır. Amino asit diziliminin, kompozisyonunun, C-terminal veya N- terminalinde bulunan amino asitlerin ACE inhibitör aktivitesi açısından önem arz ettiği belirtilmiştir. Özellikle C-terminalinde bulunan hidrofobik ve pozitif yüklü kalıntılar ile ACE inhibitör aktivitesi arasında bir korelasyon olduğu bildirilmiştir. C-terminalinde triptofan, tirozin, fenil alanin ve prolin gibi hidrofobik amino asitler içeren peptitlerin substrat olarak kullanıldığı ve ACE inhibisyonunda oldukça etkili oldukları ifade edilmektedir (Vermeirssen *et al.* 2004; Nagpal *et al.* 2011; FitzGerald *et al.* 2020). Yapılan çalışmalarda kazeinden izole edilen ve C terminalinde Pro ve Tyr bulunduran LHLPLP, YQKFPQY peptitlerinin güçlü ACE inhibitör ve antihipertansif etkiye sahip oldukları belirlenmiştir (Quiros *et al.* 2008; Del Mar Contreras *et al.* 2009). Benzer şekilde β -kazein'nin mikrobiyal bir enzimle parçalanmasıyla elde edilen ve 7 amino asit zincirinden oluşan (Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln) bir peptidin C-terminalinden Gln amino asidi uzaklaştırıldığında oluşan hekzapeptidin kuvvetli ACE inhibitör etkisi gösterdiği bildirilmiştir (Maeno *et al.* 1996). Bununla birlikte Lys ve Arg gibi pozitif yüklü amino asitlerin de inhibisyona önemli ölçüde katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (Murray and Fitzgerald 2007).

ACE inhibitörlerinin süt, jelatin, mısır, soya fasülyesi, buğday, deniz ürünleri gibi çeşitli gıdalardan izole edildiği bildirilmiştir (Vercruysse *et al.* 2005). Gıda proteinleri arasında bilhassa süt proteinleri (kazein ve serum proteinleri) ACE inhibitör peptidlerinin temel kaynağını oluşturmaktadır. Serum proteinleri α -laktoalbumin ve β -laktoglobulin'den izole edilen Tyr-Gly-Leu-Phe ve Tyr-Leu-Leu-Phe peptitlerinin ACE inhibisyon aktivitesine sahip oldukları ifade edilmiştir (Nagpal *et al.* 2011). Kazein kaynaklı peptitlerin ise en bilineni ve en çok çalışılanı valin-prolin-prolin (VPP) ve izolösin-prolin-prolin (IPP) olup, bu peptitlerin güçlü ACE inhibitör aktivitesi ve *in vivo* şartlarda antihipertansif etki gösterdiği bildirilmektedir (Robert *et al.* 2004; Shuangquan *et al.* 2008). Nitekim bu iki tripeptiti içeren fermente sütler Calpis® ve Evolus® ticari adıyla üretilip satışa sunulmaktadır (Nagpal *et al.* 2011). Yüksek tansiyonlu fareler üzerinde yapılan bir çalışmada da 14 hafta boyunca VPP ve IPP içeren fermente sütün tüketilmesiyle kan basıncının önemli düzeyde azaldığı, sadece yağsız süt ile beslenen grubun kan basıncında bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir (Sipola *et al.* 2002).

Gıda kaynaklı ACE inhibitörlerinin genelde proteinlerin pepsin, tripsin ve kimotripsin gibi sindirim enzimleri tarafından hidrolize edilmesiyle üretildiği belirtilmiştir. Bununla birlikte fermentasyon işleminin de bu peptitlerin oluşumunda dikkat çekici bir yaklaşım olduğu ifade edilmiştir. LAB'ın fermentasyon sırasında sahip oldukları proteinaz enzimi ile kazein başta olmak üzere süt proteinlerinden farklı konsantrasyonlarda ACE inhibitör peptidleri ürettikleri bildirilmiştir. Bunlardan *L. lactis*, *L. casei*, *B. bifidum*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. jensenii*, *L. mesenteroides* ve *L. helveticus*'un yüksek oranda ACE inhibitör aktivitesi meydana getiren LAB'lar arasında yer aldığı ifade edilmiştir (Papadimitriou *et al.* 2007; Minervini *et al.* 2009; Pihlanto *et al.* 2010; Gonzalez-Gonzalez *et al.* 2011; Nejati *et al.* 2013). Bu LAB'lar çeşitli fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılmış ve ilgi çekici sonuçlar alınmıştır. Bu konuyla ilgili ülkemizde ve dünyada yapılan çalışmalardan bazıları aşağıda kısaca özetlenmiştir.

Papadimitriou *et al.* (2007) yoğurt kültürü (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Y10.13 ve *S. thermophilus* Y10.7) ve *L. paracasei* subsp. *paracasei* DC412 suşunu farklı kombinasyonlar halinde koyun yoğurdu üretiminde kullanmışlar, en yüksek ACE inhibitör aktivitesini üç suşun birlikte kullanıldığı yoğurtta tespit etmişlerdir. ACE inhibitör aktivitesinin depolama boyunca peptid içeriği ile pozitif korelasyon göstererek arttığını, ayrıca antihipertansif etki gösteren β -CN f114-121 fragmentinin oluştuğunu bildirmişlerdir. İlave olarak bu sonuçların *L. bulgaricus* Y10.13 ve *L. paracasei* DC412 suşlarının yüksek proteolitik aktivitesi ile ilişkilendirilebileceğini belirtmişlerdir.

Ünal and Akalın (2012) yoğurda farklı oranlarda (%2 ve %4) yağsız süt tozu, sodyum kalsiyum kazeinat ve peynir altı suyu protein konsantresi ilavesinin ACE inhibitör aktivitesine

etkisini araştırmışlar, yoğurtların ACE inhibitör aktivitesinin %61,31–%96,61, IC50 değerlerinin ise 0,32–2,10 mg/mL arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda en yüksek ACE inhibitör kapasitesini %4 peynir altı suyu protein konsantresi içeren yoğurtta, en dūřuk değerin ise %2 yağsız sūt tozu içeren yoğurtta tespit edildiğini, peynir altı suyu protein konsantresi ilavesinin ACE inhibitör aktivitesi açısından sodyum kalsiyum kazeinata göre daha etkili olduğunu ifade etmişlerdir.

El–Fattah *et al.* (2018) yoęurt starter kūltürleri, yüksek proteolitik aktiviteye sahip suřlar (*L. cremoris lactis*, *L. helveticus* Lh-B02, *L. rhamnosus* B-1445) ve tripsin enzimi kullanarak ūretmiř oldukları yoęurtlarda ACE inhibitör aktivitesinin depolama boyunca arttıęını, en yüksek ACE inhibitör aktivitesini (%89,17) tripsin ve karıřık kūltür içeren yoęurtta belirlediklerini rapor etmiřlerdir.

Abdel-Hamid *et al.* (2019) *L. casei* ATCC 393 suřu ile ūretilen fermente sūtte depolama boyunca ACE inhibitör aktivitesinin artıř gösterdięini, IC50 deęerlerinin ise azaldıęını, sonuç olarak *L. casei* ATCC 393 suřunun sūt proteinlerinden biyoaktif peptid ūretme yeteneęinin bulunduęunu bildirmiřlerdir.

Li *et al.* (2019a) yaptıkları çalıřmada *L. helveticus* KLDS.31 ve *L. casei* KLDS.105 suřlarının bulunduęu fermente sūtte fermentasyon sıcaklıęının ACE inhibitör aktivitesine etkisini arařtırmıřlar, ayrıca oluřan ACE inhibitör peptitlerini izole edip saflařtırmıřlardır. Arařtırmacılar 37 °C’de fermente edilen sūtūn ACE inhibitör aktivitesinin 42 °C’de fermente edilene göre önemli derecede yūksek olduęunu, saflařtırdıkları dört ACE inhibitrū peptidin amino asit diziliminin Lys-Pro-Ala-Gly-Asp-Phe, Lys-Ala-Ala-Leu-Ser-Gly-Met, Lys-Lys-Ala-Ala-Met-Ala-Met ve Leu-Asp-His-Val-Pro-Gly-Gly-Ala-Arg řeklinde olduęunu bildirmiřlerdir.

Cavalheiro *et al.* (2020) protein içerięinin ve proteolitik suř kullanımının biyoaktif peptitlerin oluřumuna etkisini arařtırdıkları çalıřmada, protein ve proteolitik kūltür ilavesi ile ūretilen yoęurtta ACE inhibitör aktivitesinin kontrol yoęurduna göre yūksek olduęunu, ayrıca *L. helveticus* LH-B02 suřunun ACE inhibitrū olduęu bildirilen α₁-kazein f(24–32) ve β-kazein f(193–209)’nin oluřumunu teřvik ettięini ifade etmiřlerdir.

Rubak *et al.* (2020) tarafından yapılan bir arařtırmada 10 farklı LAB suřu fermente sūt ūretiminde kullanılarak ACE inhibisyonu incelenmiř ve ACE inhibitör peptitleri karakterize edilmiřtir. Arařtırma sonucunda en yūksek ACE inhibisyon aktivitesinin (sırasıyla %57,36 ve %56,53) *L. kefir* YK4 ve *L. kefir* JK17 suřlarının bulunduęu fermente sūtlerde tespit edildięi bildirilmiřtir.

Erkaya-Kotan (2020) tarafından yapılan başka bir çalışmada farklı oranlarda (%0,5, %1, %1,5 ve %2) portakal lifi içeren probiyotik yoğurtlarda en düşük ACE inhibitör aktivitesinin (%32,52) depolamanın 1. gününde lif içermeyen kontrol yoğurdunda, en yüksek ACE inhibitör aktivitesinin (%58,50) ise depolama sonunda %1 lif içeren yoğurtta tespit edildiği bildirilmiştir.

Antioksidatif peptitler

Hidroksil radikalleri, süperoksit anyonları ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri ile nitrik oksit ve peroksinitrit gibi reaktif nitrojen kaynakları biyosinyal üretimi ve enfeksiyonlara karşı savunma sağlama gibi vücutta hayati roller oynayan serbest radikallerdir (Liu *et al.* 2016; Chai *et al.* 2017). Bu radikaller günlük fizyolojik süreçlerin normal seyrinde üretildiğinde canlı organizma tarafından koruyucu enzimler (glutasyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz) gibi savunma sistemleri ile nötralize ve elimine edilebilmektedir (Nwachukwu and Aluko 2019). Ancak elektron transport sistemi, bazı enzimatik reaksiyonlar, oksidasyon reaksiyonları gibi metabolik olaylar ile UV ışınları, radyasyon, ilaç yan etkileri, sigara, beslenme, kanserojen maddeler gibi dış kaynaklardan dolayı serbest radikallerin aşırı miktarda oluşumu savunma sisteminin yetersiz kalmasına neden olarak DNA, proteinler ve membran lipidleri gibi çeşitli hücrel bileşenlerde oksidatif strese neden olabilmektedir. Tüm bu faktörlere bağlı olarak erken yaşlanma, diyabet, kanser, nörodejeneratif ve inflamatuvar hastalıklar ortaya çıkmaktadır (Güzel vd 2013; Sila and Bougatef 2016). Serbest radikaller sadece canlı organizmalarda değil aynı zamanda gıdalarda da oksidatif bozulmalara yol açarak kaliteyi önemli düzeyde etkilemektedir. Gıda ürünlerinin işlenmesi ve depolanması sırasında katı ve sıvı yağlarda meydana gelen oksidasyon lipid kalitesini düşürerek besleyici değerlerini azaltmakta, aynı zamanda toksik yan ürünlerin oluşumuna da neden olabilmektedir. Lipid oksidasyonu gıdalarda acılaşmanın ve raf ömrünün kısalmasının başlıca nedeni olarak görülmektedir (Sarmadi and İsmail 2010; Chai *et al.* 2017).

Gıdalarda lipid oksidasyonunun önlenmesi ve insan sağlığının korunması amacıyla serbest radikal oluşumunun engellenmesi gerekmektedir. Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu önleyerek, nötralize ederek veya radikal zincir reaksiyonlarının ilerlemesini geciktirerek olumsuz etkilerini inhibe eden maddelerdir. Gıdalarda oksidasyonu kontrol altında tutmak için bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), propil gallat gibi sentetik antioksidanlar gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Söz konusu sentetik antioksidanlar güçlü antioksidan aktivite gösterebilirler de sağlık açısından risk taşımaları sebebiyle kullanımları kısıtlanmıştır (Liu *et al.* 2016; Chai *et al.* 2017). Bu nedenle sentetik antioksidanların yerini alacak doğal ve yenilebilir kaynaklardan elde edilen yeni ve güvenli antioksidan bileşiklerin bulunmasına yönelik bir eğilim bulunmakta, özellikle α - tokoferol,

fenolik bileşikler, askorbik asit gibi doğal antioksidanlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte son dönemde gıda kaynaklı antioksidatif peptitler de ilgi görmeye başlamış, bu peptitler yumurta, balık, soya fasulyesi, deniz yosunu ve fermente süt ürünleri gibi çeşitli protein substratlarının hidrolize edilmesiyle üretilmişlerdir (Lemes *et al.* 2016).

Peptitlerin antioksidan aktivitelerinin yapılarında bulunan amino asitlerle ilişkili olduğu belirtilmiş, prolin, histidin, tirozin, fenilalanin ve triptofan gibi hidrofobik ve aromatik amino asitler ile sistein gibi kükürt içeren amino asitlerin serbest radikallere proton transfer ederek; lisin, arginin, aspartat ve glutamat gibi asidik ve bazik amino asitlerin ise metal iyonlarını şelatlayarak antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Arcan and Yemenicioğlu 2007; Chai *et al.* 2017). Bir protein dizisinde amino asitlerin konumunun da antioksidan aktivite açısından önemli bir faktör olduğu vurgulanmıştır (Arcan and Yemenicioğlu 2007).

Süt, kazein, antioksidan enzimler (süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz), konjuge linoleik asit, vitaminler, karotenoidler gibi antioksidan özellik gösteren bazı bileşikleri yapısında bulundurmaktadır (Fardet and Rock 2018). Süt proteinlerinin biyoaktif peptidler açısından mükemmel bir kaynak olduğu ve antioksidatif peptidlerin sindirim enzimleriyle hidroliz edilmesiyle ya da fermente sütlerde proteolitik LAB'lar ile kazein ve serum proteinlerinden salınabileceği ifade edilmiştir (Semen ve Altıntaş 2015). Konuyla ilgili yapılan bir çalışmada pepsin ile hidrolize edilen deve sütü kazeini ve serum proteinlerinin yüksek oranda serbest radikal giderici peptidlere sahip olduğu rapor edilmiştir (İbrahim *et al.* 2018). Başka bir çalışmada *L. plantarum* 55 suşu kullanılarak fermente edilen sütün peptid fraksiyonlarının yüksek antioksidan aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (Aguilar-Toala *et al.* 2017). Hernandez-Ledesma *et al.* (2005) tarafından yapılan bir çalışmada ise α -laktoalbumin ve β -laktoglobulinin bazı proteolitik enzimler ile hidrolize edilmesiyle oluşan peptitlerin antioksidan aktiviteye sahip olduğu, özellikle β -laktoglobulin kaynaklı bir peptidin (Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ala-Ser-Asp-Ile) BHA'dan daha yüksek radikal giderme etkisinin bulunduğu belirtilmiştir.

De Lima *et al.* (2018) tarafından yapılan çalışmada koyun sütünden üretilen kefirde peptitlerin biyoaktiviteleri 28 günlük depolama periyodu boyunca incelenmiş, 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radikali giderme etkisinin depolama boyunca arttığı, 28. günde en yüksek seviyeye (%41,5) ulaştığı bildirilmiştir. Sonuç olarak antioksidan aktiviteye sahip peptitlerin fermentasyon sonucunda oluştuğu ve kefirin biyoaktif peptidler açısından iyi bir kaynak olduğu ifade edilmiştir.

Sultan *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada farklı keçi, inek, koyun ve bufalo sütlerinden üretilen yoğurtlarda depolama süresince oluşan peptitlerin antioksidan aktiviteleri

araştırılmış, depolamanın ilk 5 gününde bütün yoğurt tiplerinin antioksidan aktivitelerinin arttığı, depolamanın ilerleyen günlerinde ise azalma olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar ilk günlerdeki artışın yoğurt bakterilerinin aktivitelerinden, sonraki günlerdeki azalmanın antioksidan özellikli bileşiklerin degradasyonundan kaynaklanabileceğini, depolama sonunda ise en yüksek antioksidan aktivitenin (%39,5) keçi yoğurdunda belirlendiğini bildirmişlerdir.

Sah *et al.* (2014) tarafından yapılan bir çalışmada yoğurt kültürlerine ilaveten *L. acidophilus* (ATCC 4356™), *L. casei* (ATCC 393™) ve *L. paracasei* subsp. *paracasei* (ATCC BAA52™) proteolitik suşları farklı kombinasyonlar halinde yoğurt üretiminde kullanılmış, oluşan peptitlerin biyoaktiviteleri incelenmiştir. En yüksek proteoliz derecesi (%11,91) ile en yüksek 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ve ABTS radikallerini giderme etkisi (sırasıyla IC50; 1,51 ve 1,63) bütün kültürleri içeren yoğurtta elde edilmiştir. Araştırmacılar antioksidan özellikli peptid oluşumunun proteoliz derecesi ile yüksek oranda ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Li *et al.* (2013a) tarafından yapılan bir çalışmada keçi sütü kazeini bazı proteazlar ile hidrolize edildikten sonra antioksidan aktivitesindeki değişim incelenmiş, kazeinin hidrolizinin antioksidan aktiviteyi önemli derecede arttırdığı, IC50 değerlerini ise önemli derecede düşürdüğü gözlemlenmiştir. Ayrıca kazein hidrolizatında yüksek antioksidan özellikli yeni peptitlerin (Val-Tyr-Pro-Phe, Phe-Gly-Gly-Met-Ala-His, Phe-Pro-Tyr-Cys-Ala-Pro, Tyr-Val-Pro-Glu-Pro-Phe ve Tyr-Pro-Pro-Tyr-Glu-Thr-Tyr) izole edildiği de vurgulanmıştır.

Antimikrobiyal peptitler

Gıda proteini kaynaklı antimikrobiyal peptitlerin gıdalarda antimikrobiyal ajanların kullanımında yeni bir alan oluşturduğu, bu peptitlerin *Escherichia*, *Helicobacter*, *Listeria*, *Salmonella* ve *Staphylococcus* gibi patojenik organizmalara karşı aktif olduğu ve antibiyotiklere alternatif olarak kullanılabileceği ileri sürülmektedir (Kamali Alamdari and Ehsani 2017).

Antimikrobiyal peptitler 11-50 amino asit uzunluğunda hidrofobik ve hidrofilik kalıntılar içeren pozitif yüklü moleküller olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca primer ve sekonder yapılardan meydana geldikleri, sekonder yapının ise disülfid bağları içeren α -heliks ve β -tabaka formundaki üç boyutlu yapılardan oluştuğu bildirilmiştir. Peptitlerin sahip olduğu hidrofilik ve hidrofobik amino asitler sayesinde antimikrobiyal etki gösterdiği, hidrofobik kısımların bakteri membranının lipid gruplarına, hidrofilik kısımların ise fosfolipid gruplarına bağlanarak membran tahribatına neden olduğu ifade edilmiştir (Hancock 1997; Jenssen *et al.* 2006). Aynı zamanda katyonik yapıdaki antimikrobiyal peptitler ile negatif yüklü bakteri membranı

arasında ortaya çıkan elektrostatik çekimin ilk bağlanmayı kolaylaştırdığı (Gan *et al.* 2021), bu faktörlerden ötürü peptitlerin membrana bağlandıktan sonra birikerek por oluşumu meydana getirdiği, membran geçirgenliğinin artması ile hücre içi iyonların ve metabolitlerin dışarı sızarak bakteri hücresinin ölmesine yol açtığı ifade edilmiştir (Akün ve Kökbaş 2021; Zhang *et al.* 2021).

İmmünoglobulinler, laktoferrin, laktoperoksidaz ve lizozim gibi bazı süt proteinlerinin antimikrobiyal aktiviteleri olduğu bilinmektedir. Öte yandan son zamanlarda diğer süt proteinlerinin parçalanmasıyla ortaya çıkan biyoaktif peptitlerin de antimikrobiyal özelliklerinin olduğu keşfedilmiştir (Akalın 2014). Kazein ve serum proteinlerinin pepsin, tripsin, kimozin, pankreatin ve kimotripsin gibi çeşitli proteazlar ile hidrolize edilerek antimikrobiyal peptitlerin üretilebildiğine dair çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Nitekim α -s₁ kazeinin kimozin ile hidrolizi ile elde edilen “israsidin, f(1-23)” fraksiyonunun *S. aureus*’a karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği, ayrıca mastitis hastalığına karşı da koruma sağladığı bildirilmiştir (Lahov and Regelson 1996; Bulca ve Güvenç 2020). Benzer şekilde yapılan bir çalışmada pepsin kullanılarak hidrolize edilen α s₂-kazeininden türetilen f (165–181) fraksiyonunun *E. coli*’ye karşı güçlü antibakteriyel etki gösterdiği belirtilmiştir (Lopez-Exposito *et al.* 2006). Pellegrini *et al.* (2001) β -laktoglobulini tripsin ile hidrolize ederek elde ettikleri peptitlerin VAGTWY (f 15-20), AASDISLLDAQSAPLR (f 25-40), IPAVFK (f 78-83) ve VLVLDTDYK (f 92-100) Gram (+) bakterilere karşı bakterisidal etki gösterdiğini bildirmişlerdir. İlaveten laktoferrinin hidrolitik parçalanma ürünü olan Laktoferrisin (f 17-41)’in katyonik, amfipatik ve α -heliks yapıda olduğu, bundan dolayı Gram (-) bakterilere ve *Candida albicans*’a karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği ifade edilmiştir (Bulca ve Güvenç 2020). *L. lactis*, *L. helveticus* ve *L. delbrueckii* var. *bulgaricus* gibi proteinaz ve peptidaz enzimlerine sahip olan LAB suşlarının bu enzimler sayesinde söz konusu peptitlerin oluşumunu sağladığı bildirilmiştir (Mohanty *et al.* 2016).

Hayes *et al.* (2006) *L. acidophilus* DPC6026 suşunu kullanarak fermente ettikleri sütte kazein kaynaklı “Kazeisin A f(21-29)”, “Kazeisin B f(30-37)” ve “Kazeisin C f(195-208)” peptitlerinin oluştuğunu, bu peptitlerin *Enterobacter sakazakii* ATCC 12868 ve *E. coli* DPC5063 suşlarına karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Hanifah *et al.* (2016) tarafından yapılan çalışmada *L. acidophilus* IIA-2B4 suşu ve gül ekstraktı keçi yoğurdu üretiminde kullanılmış, bazı fizikokimyasal, mikrobiyolojik özellikleri ile antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Araştırma sonucunda *L. acidophilus* IIA-2B4’un Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı inhibisyon etkisinin söz konusu suşu içermeyen kontrol yoğurduna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. En yüksek antimikrobiyal aktivitenin (19,98

mm) ise *S. aureus*'a karşı belirlendiği, bu durumun fermentasyon sırasında oluşan antimikrobiyal peptitlerden kaynaklanmış olabileceği bildirilmiştir.

Muhaladin and Alboory (2018) *L. plantarum* ile fermente ettikleri deve sütünde, “fraksiyon 14”ün en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi (%20) *Shigella dysenteriae*'e karşı gösterdiğini belirtmiş ve fermente deve sütünün bakteri enfeksiyonlarını azaltarak tüketici sağlığının korunmasında önemli bir yeri olduğunu bildirmişlerdir.

Rubak *et al.* (2021) *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* BD7 ile fermente ettikleri keçi sütünün peptid profilini incelemişler, 37 °C'de pH 4,6'ya gelinceye kadar fermente ettikleri sütte 28 adet ACE inhibitör peptid, 19 adet antioksidan peptid ve 10 adet antimikrobiyal peptidin varlığını belirlemişlerdir. Birkaç peptidin birden fazla biyolojik aktivite gösterdiğini ifade eden araştırmacılar, α ₁-kazein (f 195-205) fraksiyonunun antioksidan ve antimikrobiyal; β -kazein (f 208-222) fraksiyonunun ise ACE inhibitör ve antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

GABA üretim yeteneği açısından test edilen LAB izolatları

Ev yapımı yoğurtlar ile kefir danelerinden izole edilen ve genetik tanısı yapılan toplam 422 suş (264'ü yoğurt, 158'i kefir danesi izolatu) GABA üretme yeteneği açısından taranmıştır. İzolatların GABA üretme yeteneklerinin belirlenmesinde GABA üretim yeteneği olduğu bilinen *L. plantarum* 56 kontrol suşu olarak kullanılmıştır. Test edilen tüm izolatlar ile kontrol suşu Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir.

Fermente sütlerin üretiminde kullanılan bakteriler

Yoğurt benzeri fermente sütlerin üretiminde pıhtı ve jel yapısını geliştirmek amacıyla yoğurttan izole edilen *S. thermophilus* 20S4 suşu, GABA ile zenginleştirme amacıyla ise GABA üretme yeteneği olduğu belirlenen ve Beyaz peynirden izole edilen *L. plantarum* 156 suşu kullanılmış, söz konusu suşlar Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir. Aynı zamanda yoğurt benzeri fermente sütlerin üretiminde peptid oluşumunu teşvik etmek amacıyla yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğu bilinen *L. casei* ATCC 334 ve *L. helveticus* DPC 4571 suşları kullanılmış, *L. casei* ATCC 334 suşu Amerikan Kültür Koleksiyonu'ndan, *L. helveticus* DPC 4571 suşu ise İnönü Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir.

Süt

Yoğurt benzeri fermente sütlerin üretiminde Atatürk Üniversitesi Gıda ve Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü'nden temin edilen çiğ inek sütü kullanılmıştır.

Peptitlerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan patojen bakteriler

Yoğurt benzeri fermente sütlerde oluşan peptitlerin antimikrobiyal aktivitelerinin test edilmesinde kullanılan *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Bacillus cereus* BC 6230, *Salmonella typhimurium* RSHMB 95091 ve *Escherichia coli*

O157:H7 suşları Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir.

Yöntem

LAB izolatlarının aktifleştirilmesi

LAB izolatlarının aktifleştirilmesi amacıyla; öncelikle -80°C'de muhafaza edilen yoğurt ve kefir danelerine ait stok izolatlardan bir öze dolusu alınarak uygun besiyerlerine (MRS ya da M-17 agar) üçlü çizim yapılmış, 32 °C/42 °C'de 2-3 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra saflıkları kontrol edilen genç izolatlar DNA izolasyonu için steril saf su içerisine alınmıştır.

İzolatların saflığının kontrolü için koloni lam üzerine alınarak ışık mikroskopunda incelenmiş, hücre şekli kaydedilmiştir. Aynı zamanda izolatlar Gram boyama ve katalaz testlerine tabii tutulmuştur.

LAB izolatlarında glutamat dekarboksilaz (GAD) varlığının belirlenmesi

DNA izolasyonu

LAB izolatlarından DNA izolasyonu için taze kültürlerden 1 öze dolusu alınıp 1mL steril saf su ile karıştırılmış, ardından bu solüsyondan 100 µL alınarak üzerine 500 µL steril saf su ilave edilmiştir. Daha sonra 5000 x g'de 3 d santrifüj edilerek PBS (phosphate buffered saline) ile 3 defa yıkanmıştır. Yıkama sonunda bakteri peleti üzerine 0,1 mL %10 SDS (sodyum dodesil sulfat) ve 0,5 mL 6 M üre ilave edilerek, 37 °C'de 20 d süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler 95 °C'de 5 d bekletilerek, 8000 x g'de 10 d santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp pelet üzerine 0,1 mL 0,2 N NaOH eklenmiş, 37 °C'de 10 d bekletildikten sonra 3000 x g'de 3 d süre ile tekrar santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet 2,5 hacim absolute etanol ile karıştırılmış, -20 °C'de 2 saat bekletilmiş, 4 °C'de 13200 x g'de 15 d santrifüjlenmiştir. Ardından %70'lik etanol ile yıkanarak oda sıcaklığında bekletilmiştir. DNA peleti kuruduktan sonra 20 µL Tris-EDTA (etilendiamintetra asetik asit) tamponunda süspanse edilip PCR işleminde template (kalıp) DNA olarak kullanılmıştır (Singh and Ramesh 2009). DNA kalitesinin belirlenmesi amacıyla 260_{nm}/280_{nm}' de absorbans değeri ölçülmüş, 1,8 olanlar saf olarak değerlendirilmiştir. DNA konsantrasyonu ise ng/µL olarak ifade edilmiştir.

LAB izolatlarında GAD geninin PCR ile belirlenmesi

LAB izolatlarında GAD geninin varlığı PCR (Rotor-Gene Q, QIAGEN Hilden, Almanya) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla GAD geninin yüksek oranda korunmuş

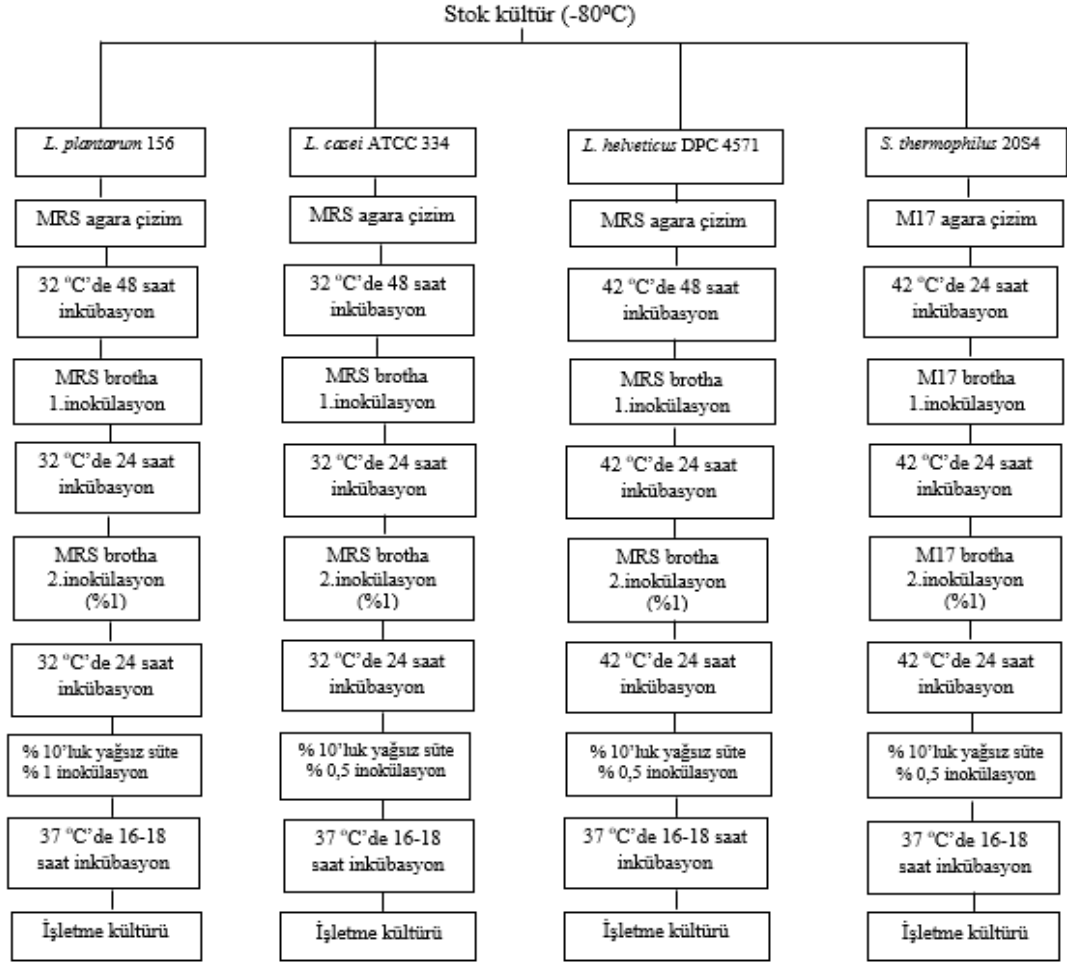
bölgelerinden elde edilen Core F (5'-CCTCGAGAAGCCGATCGCTTAGTTCG-3') ve Core R (5'-TCATATTGACCGGTATAAGTGATGCCC-3') primerleri kullanılmıştır (Demirbaş *et al.* 2017). Her bir PCR karışımı 7,5 µL PCR master mix (Real Q Plus Master Mix Green, AMPLIQON, Danimarka), 1 µL template DNA, 1 µL Core F primer, 1 µL Core R primer ve 4,5 µL su kullanılarak hazırlanmıştır. PCR işleminde kullanılan süre ve sıcaklık döngüsü ise 95°C'de 15 d ilk denatürasyon, 95°C'de 20 s denatürasyon, 65,5°C'de 30 s bağlanma ve 72°C'de 30 s uzama, 72°C 10 d son uzama ve 35 döngü olacak şekilde uygulanmıştır. Kontrol olarak GAD genine sahip olduğu bilinen *L. plantarum* 56 suşu kullanılmıştır.

Fermente sütlerin üretiminde kullanılan suşlarda GAD geninin HRM ile belirlenmesi

Fermente sütlerin üretiminde kullanılan *S. thermophilus* 20S4, *L. plantarum* 156, *L. casei* ATCC 334 ve *L. helveticus* DPC 4571 suşlarının GAD genine sahip olup olmadığının kontrol edilmesi amacıyla söz konusu suşlar kontrol suşu (*L. plantarum* 56) ile birlikte HRM (high-resolution melting analysis) analizine tabi tutulmuştur. Karışımlar 12,5 µL HRM master mix (QIAGEN GmbH, Hilden, Almanya), 1 µL template DNA, 1 µL Core F primer, 1 µL Core R primer ve 9,5 µL su kullanılarak hazırlanmıştır. Süre ve sıcaklık döngüsü ise 95 °C'de 10 d, 95 °C'de 20 s, 65,5 °C'de 60 s, 72 °C'de 90 s, 72 °C 10 d 35 döngü olarak ayarlanmıştır.

Fermente sütlerin üretiminde kullanılan kültürlerin çoğaltılması

Yoğurt benzeri fermente sütlerin üretiminde kullanılmak üzere seçilen *S. thermophilus* 20S4, *L. plantarum* 156, *L. casei* ATCC 334 ve *L. helveticus* DPC 4571 suşları MRS/M17 broth besiyerlerine bireysel olarak inoküle edilmiş, mezofilik suşlar 32 °C'de, termofilik suşlar ise 42 °C'de 24 veya 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. Aktifleştirilen suşlar 2. kez MRS veya M17 brotha %1 oranında inoküle edilerek inkübasyona bırakılmıştır. *L. plantarum* 156 suşu %1 oranında, diğer suşlar ise %0,5 oranında %10'luk steril yağsız süte (110 °C' de 10 d) bireysel olarak inoküle edilmiş ve 37 °C 16-18 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Yağsız sütte geliştirilen suşlar işletme kültürü olarak 10⁸ kob/g düzeyinde süte ilave edilmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. Fermente sütlerin üretiminde kullanılan kültürlerin çoğaltılması

Fermente sütlerin üretiminde kullanılan sütte yapılan analizler

Fermente sütlerin üretiminde kullanılan sütte kuru madde tayini belirli miktardaki örneğin $105 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de sabit tartıma gelinceye kadar kurutulması ile gravimetrik olarak, yağ miktarı Gerber yöntemiyle, protein miktarı ise mikro-Kjeldahl yöntemiyle azot miktarlarının tespit edilmesi ve 6,38 faktörü ile çarpılmasıyla belirlenmiştir. Asitlik değeri ayarlı 0,1 N NaOH kullanılarak titrasyon yöntemiyle, pH değeri ise Mettler Toledo (Seven Compact TM S220, Schwerzenbach, İsviçre) marka dijital pH metre kullanılarak saptanmıştır (Kurt vd 2007). Toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayımı, LAB sayımı, koliform grubu bakteri sayımı ve maya-küf sayımı ise Diliello (1982) tarafından belirtilen yöntemlere göre yapılmıştır.

Fermente sütlerin üretimi

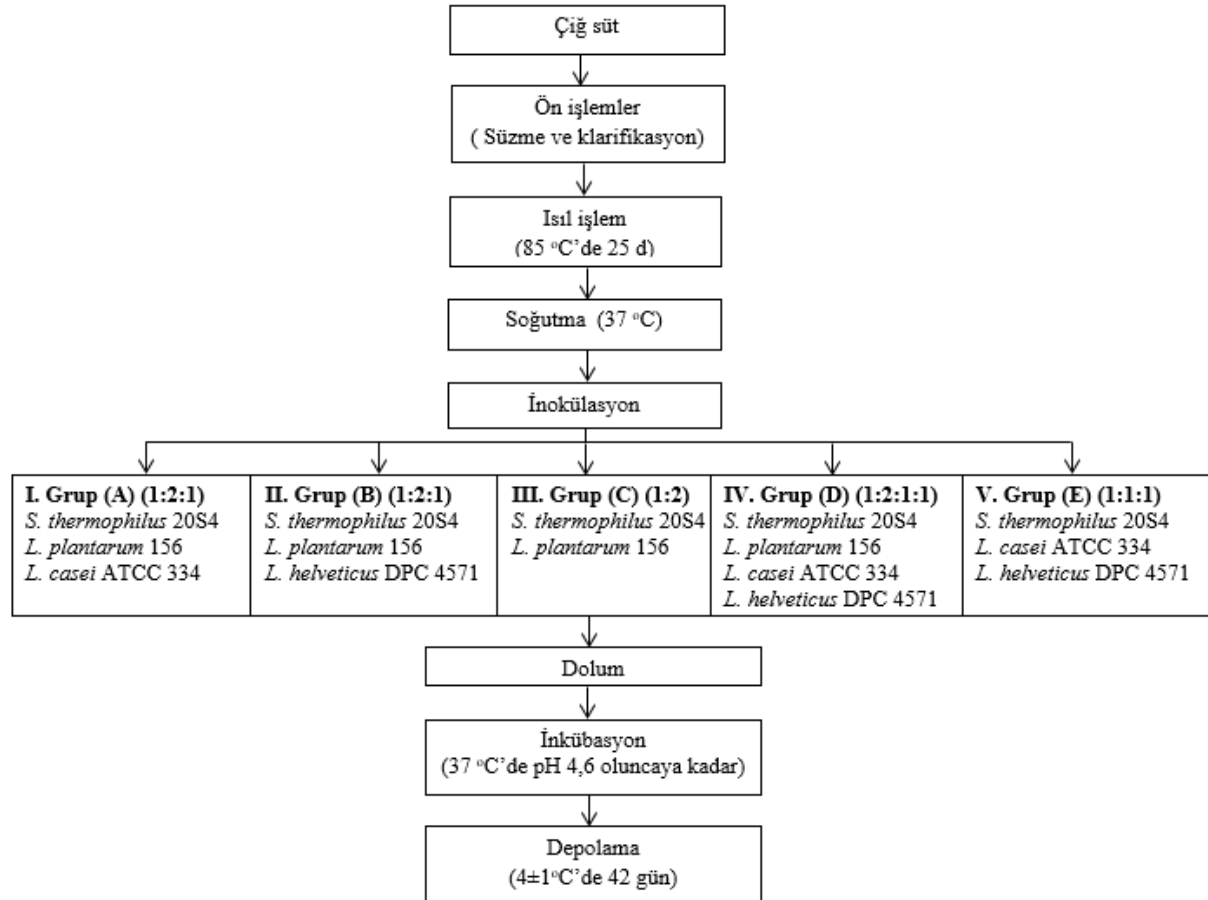
Çiğ inek sütü öncelikle ön işlemlerden geçirilmiş, ardından 85°C 'de 25 d ısıtılma işlemi tabi tutulmuş ve ısıtılma işlemi takiben 37°C 'ye soğutulmuştur. Soğutulmuş sütler 5 gruba ayrılmış ve her bir gruba Tablo 4'de belirtilen bakteri grupları ilave edilmiştir. Ardından steril cam kavanozlara dolum yapılmış, dolum yapılan kavanozlar $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de pH 4,6'ya ulaşınca kadar

inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra örnekler hızla soğutularak buzdolabı koşullarında $4\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 42 gün süreyle depolanmıştır. Fermente sütlerinin üretim akış şeması Şekil 8'de, örneklerle ait görüntüler ise Şekil 9'da sunulmuştur.

Fermente sütlerin üretimi 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş, depolamanın 1., 14., 28. ve 42. günlerinde fizikokimyasal, mikrobiyolojik, duyuşal özellikleri açısından analiz edilmiştir. Aynı zamanda örneklerle ait GABA ve serbest amino asit miktarları, uçucu bileşenler ile peptid profilleri belirlenmiş, depolama süresince oluşan peptitlerin ACE-inhibitör, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri de tespit edilmiştir.

Tablo 4. Fermente Süt Örneklerinin Üretiminde Kullanılan Bakteri Kombinasyonları

I. Grup (A): <i>S. thermophilus</i> 20S4, <i>L. plantarum</i> 156 ve <i>L. casei</i> ATCC 334 (1:2:1)
II. Grup (B): <i>S. thermophilus</i> 20S4, <i>L. plantarum</i> 156 ve <i>L. helveticus</i> DPC 4571 (1:2:1)
III. Grup (C): <i>S. thermophilus</i> 20S4 ve <i>L. plantarum</i> 156 (1:2)
IV. Grup (D): <i>S. thermophilus</i> 20S4, <i>L. plantarum</i> 156, <i>L. casei</i> ATCC 334 ve <i>L. helveticus</i> DPC 4571 (1:2:1:1)
V. Grup (E): <i>S. thermophilus</i> 20S4, <i>L. casei</i> ATCC 334 ve <i>L. helveticus</i> DPC 4571 (1:1:1)



Şekil 8. Fermente süt örneklerine ait üretim akış şeması



Şekil 9. Fermente süt örneklerine ait görsel

Fermente süt örneklerinde yapılan fiziksel ve kimyasal analizler

Kuru madde oranı

Darası alınmış kurutma kaplarının içerisine iyice karıştırılmış fermente süt örneğinden 5 g kadar tartılmış, örnekler 105 °C’de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuştur. Ardından desikatörde oda sıcaklığına soğutulduktan sonra tartılmış ve % kuru madde miktarı formül yardımıyla belirlenmiştir (Ranadheera *et al.* 2016).

Yağ oranı

Yağ tayini için fermente süt örneklerinden 10 g tartılmış, üzerine 10 mL saf su ilave edilmiş ve Gerber yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Bütirometreden okunan değer 2 ile çarpılarak % yağ miktarı tespit edilmiştir (Hrnjez *et al.* 2014).

Protein oranı

Protein tayini için fermente süt örnekleri yaş yakmaya tabi tutulmuş, mikro-Kjeldahl yöntemi ile bulunan azot miktarı 6,38 faktörü ile çarpılarak sonuç hesaplanmış ve % olarak ifade edilmiştir (Gu *et al.* 2020).

Titrasyon asitliği

Titrasyon asitliği tayini için fermente süt örneklerinden 9 g tartılmış, birkaç damla fenolfitaleyn indikatörü ilave edildikten sonra 0,1 N NaOH çözeltisi ile hafif pembe renk elde edilinceye kadar titre edilmiştir. Titrasyonda harcanan 0,1 N NaOH miktarı formülde yerine konularak laktik asit cinsinden % asitlik hesaplanmıştır (Hassan and Amjad 2010).

$$\% \text{ Asitlik} = \frac{\text{Harcanan NaOH miktarı (mL)} \times 0,009}{\text{Örnek miktarı (g)}} \times 100$$

pH

Fermente süt örneklerinde pH değerleri tampon çözeltiler (pH 4, 7 ve 10) kullanılarak kalibrasyonu yapılan dijital pH metre kullanılarak belirlenmiştir.

Serum ayrılması

Serum ayrılması analizinde Atamer ve Sezgin (1986) tarafından belirtilen metot modifiye edilerek kullanılmıştır. Fermente süt örneklerinden 25 g tartılmış, $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 2 saat süreyle bekletilerek kaba filtre kağıdından süzölmüştür. Süre sonunda elde edilen süzöntü miktarı volumetrik olarak ölçölmüştür.

Viskozite

Örneklerin viskozite değerleri Brookfield DV II Pro+ Viskosimeter (Brookfield DV II, Brookfield Mühendislik Laboratuvar A.Ş., Stoughton, Amerika) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Ölçömler 20 rpm'de yapılmış, sonuçlar "Centipoise (cP)" cinsinden verilmiştir (El-Fattah *et al.* 2018).

Fermente süt örneklerinde yapılan mikrobiyolojik analizler

Örnek hazırlama

Homojen hale getirilen 10 g fermente süt örneğı aseptik şartlarda 90 mL steril fizyolojik tuzlu su (FTS, %0,85 NaCl çözeltilisi) içerisine alınarak iyice karıştırılmış ve 10^{-1} 'lik dilüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra steril pipetler ile ilk dilüsyondan 1 mL alınarak 9 mL'lik steril dilüsyon sıvısına aktarılmıştır. İşleme 10^{-7} 'lik dilüsyona ulaşılıncaya kadar devam edilmiştir (Chouchouli *et al.* 2013).

MRS agarda gelişen laktik asit bakteri sayımı

MRS agarda gelişen LAB sayısının belirlenmesinde pH'sı 5,4'e ayarlanmış Man–Rogosa–Sharpe (MRS) (Merck) agar besiyeri kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan steril MRS agara yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. Petriler termofilik LAB'lar (olası laktobasiller) için $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de, mezofil LAB'lar için $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat anaerobik ortamda inkübe edilmiş ve koloni içeren petriler sayılmıştır (Von Gastrow *et al.* 2020).

M17 agarda gelişen laktik asit bakteri sayımı

M17 agarda (Merck) gelişen LAB sayısının (olası streptokoklar) belirlenmesi için steril edilmiş M-17 agar'a uygun dilüsyonlardan yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. Petri kutuları aerobik ortamda $42\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 24-48 saat inkübe edilmiş ve koloni içeren petriler sayılmıştır (Linares *et al.* 2016).

Maya ve küf sayımı

Maya ve küf sayımında Patates Dekstroz Agar (PDA) (Merck) kullanılmış, %10'luk steril tartarik asit ile pH'sı 3,5'e ayarlanan steril agara uygun dilüsyonlardan ekim yapılmıştır. Petriler $20-25^{\circ}\text{C}$ 'de 5-7 gün süreyle inkübe edilerek maya ve küf sayısı belirlenmiştir (Frank *et al.* 1985).

Suda çözünen ekstraktların hazırlanması

Suda çözünen ekstraktların hazırlanmasında Sah *et al.* (2014) tarafından belirtilen metot modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla fermente süt örneklerinden 20 g santrifüj tüplerine tartılmış, $10000\times g$ 'de 4°C 'de 30 d süreyle santrifüj (Allegra X-30R, Almanya) edilmiştir. Daha sonra süpernatant $0,45\ \mu\text{m}$ 'lik şırınga filtreden (Millex®) geçirilerek süzölmüş, elde edilen filtrat liyofilize edilerek kurutulmuştur. Toz haline getirilen ekstraktlar peptid profili ve peptidlerin biyoaktivitelerinin belirlenmesinde kullanılmak üzere -20°C 'de muhafaza edilmiştir.

Fermente süt örneklerinde peptid profilinin belirlenmesi

Fermente süt örneklerinin peptid profili ters fazlı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) ile belirlenmiştir (Hayaloğlu vd 2011). Analizin gerçekleştirilmesinde Shimadzu LC 20 AD Prominence HPLC cihazı (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonya) kullanılmıştır. Kromatografik ayırım için C18 kolon Zorbax 300SB ($4,6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm} \times 5\ \mu\text{m}$, Amerika) kullanılmış ve elüsyon işlemi $214\ \text{nm}$ 'de DAD (Diod Array Dedector, model SPD-M20A prominence) dedektörde gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak; akış hızı $0,75\ \text{mL/d}$ olan solvent A [%0,1 TFA (Trifloroasetikasit; v/v) içeren HPLC-grade deiyonize saf su (Milli-Q system; Waters Corp., Molsheim, Fransa)] ve solvent B [%0,1 TFA içeren asetonitril (v/v) (Sigma-Aldrich, UHPLC plus, Amerika)] kullanılmıştır. Liyofilize edilmiş suda çözünen ekstraktlardan $100\ \text{mg}$ tartılarak $1\ \text{mL}$ solvent A ile çözündürülmüştür. Ardından $0,45\ \mu\text{m}$ selüloz asetat filtreden geçirilmiş ve filtrattan $80\ \mu\text{L}$ alınarak HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Elüsyon gradiyentli olarak gerçekleştirilmiş ve akış programı Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. Peptid Profili Analizinde Hareketli Faz Çözeltilerinin (A ve B) Kromatografi Süresi İçerisinde Kolondan Geçiş Oranları

Süre (d)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
0	0	0
5	100	0
60	70	30
75	50	50
80	40	60
85	5	95
90	5	95
95	100	0
105	100	0

Peptitlerde biyoaktivite analizleri

ACE-inhibitör aktivitenin belirlenmesi

ACE-inhibitör aktivitesi HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonya) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Metod hipüril–histidin–lösin’in (HHL, Sigma–Aldrich) ACE tarafından hidrolizi sonucu oluşan hipürik asit miktarının belirlenmesi esasına dayalı olarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre öncelikle 15 mg liyofilize ekstrakt tartılarak 500 µL 0,01N sodyum fosfat tamponunda (400 mM NaCl içeren) çözündürülmüş, ardından 25 µL ekstrakt çözeltisi 60 µL HHL çözeltisiyle (5 mM HHL, 0,01 N sodyum fosfat tamponu, 400 mM NaCl, pH: 8.3) karıştırılmıştır. Hazırlanan karışıma 50 µL 200 mU ACE (tavşan akciğeri ekstraktı, Sigma-Aldrich, Almanya) ilave edilerek vortekslenmiş ve hemen 37 °C sıcaklıkta çalkalamalı su banyosunda 30 d inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 7 µL HCl (1 M) ile reaksiyon durdurulmuş ve 0,45 µm selüloz asetat filtreden geçirilmiştir. Filtrattan 10 µL alınarak HPLC kolonuna (Zorbax 300SB-C18, Amerika) (4,6 mm x 250 mm x 5 µm) enjekte edilmiştir (Şahingil *et al.* 2019). ACE inhibisyonu (%) aşağıdaki formülden yararlanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ ACE inhibisyonu} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

A: ACE ve HHL’nin olduğu, ACE-inhibitörünün olmadığı durumdaki absorbans (kör)

B: ACE, HHL ve ACE-inhibitörü varlığındaki absorbans

ACE inhibisyon aktivitesi ayrıca IC₅₀ değeri ile de ifade edilmekte olup, IC₅₀ değeri ACE’nin en az %50’sini inhibe edebilen peptid miktarı olarak tanımlanmaktadır. IC₅₀ değeri farklı protein konsantrasyonlarına karşı ACE inhibisyon değerlerinin grafiksel ekstrapolasyonu ile hesaplanmıştır. Örneklerin protein miktarları ise Folin–Lowry metodu kullanılarak belirlenmiştir (Lowry *et al.* 1951).

Antioksidatif aktivitenin belirlenmesi

Peptitlerin antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde Sultan *et al.* (2017) tarafından belirtilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Analizde serbest radikal olarak DPPH kullanılmış ve analiz üç paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle liyofilize ekstrakt (20 mg/mL) saf su içinde çözündürülmüş, ardından 500 µL örnek solüsyonu 500 µL etanolik DPPH çözeltisi (0,6 mM) ile karıştırılmıştır. Son hacim etanolle 2500 µL'ye tamamlanmış ve karışım oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 1 saat bekletilmiştir. Absorbans UV–VIS spektrofotometre (Optizen POP, Kore) kullanılarak 517 nm'de etanole karşı ölçülmüştür. Sonuç olarak 500 µL örnek solüsyonundaki % inhibisyon değerleri verilmiştir. Peptitlerin antioksidan aktivitesi aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{DPPH giderme aktivitesi (\%)} = \frac{(\text{Kontrol absorbansı}) - (\text{Örnek absorbansı})}{(\text{Kontrol absorbansı})} \times 100$$

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

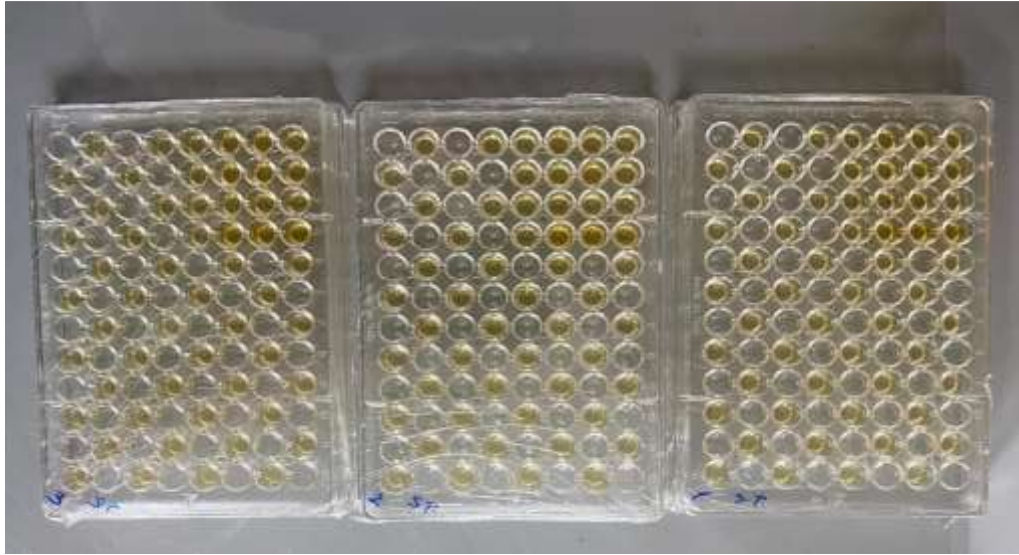
Peptitlerin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde De Lima *et al.* (2018) tarafından belirtilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Fermente sütlerin suda çözünür ekstraktlarına ait antimikrobiyal aktivite *E. coli* O157:H7, *S. aureus* ATCC 29213, *B. cereus* BC 6230, *S. typhimurium* RSHMB 95091 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 patojen bakterilerine karşı test edilmiş, tüm patojen bakteriler Nutrient agara çizilmiş, 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından saf koloniler alınarak 9 mL FTS içeren tüplere aktarılmış ve McFarland 0,5'e ayarlanmıştır. Liyofilize edilmiş suda çözünen ekstrakt (25 mg/mL) steril saf su içinde çözündürülmüş, ardından steril 96 kuyucuklu plakalara 70 µL steril Brain Heart Infusion broth (BHI) +70 µL örnek solüsyonu + 10 µL bakteri solüsyonu olacak şekilde aktarılmıştır (Şekil 10). Pozitif kontrol olarak steril saf su, negatif kontrol olarak ise ofloxacin içeren solüsyon kullanılmıştır. Plakalar 37 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra Mikroplate Reader (Epoch, BioTek, Almanya) cihazı ile 595 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Analiz üç paralelli olarak gerçekleştirilmiş ve antimikrobiyal aktivite aşağıdaki formülden yararlanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Antimikrobiyal aktivite (\%)} = 1 - \left(\frac{A - B}{C - B} \right) \times 100$$

A: Örneğin absorbansı

B: Negatif kontrolün absorbansı

C: Pozitif kontrolün absorbansı



Şekil 10. Çalışmada kullanılan 96 kuyucuklu plakalar

Fermente sütlerde GABA ve serbest amino asit miktarlarının belirlenmesi

Serbest amino asit tayini için; 10 g fermente süt örneği falcon tüplerine tartılmış, üzerine internal standart olarak 0,1 N HCl çözeltisinde hazırlanmış 0,4 mM methionin sülfon çözeltisinden 10 mL ilave edilmiştir. Karışım 20 d süreyle ultrasonik su banyosunda bekletilmiş ardından, $3000 \times g$ 'de 4°C 'de 10 d santrifüj işlemine tabii tutulmuştur. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatanttan 1 mL alınıp, üzerine 1 mL %40'lık TCA ilave edilmiş ve $0-4^{\circ}\text{C}$ 'de buzlu suda 10 d bekletilmiştir. Ardından $20.000 \times g$ 4°C 'de 10 d santrifüj edilmiş ve deproteinize edilmiş 25 μL süpernatant liyofilize edilerek kurutulmuştur. Kurutulmuş örnek üzerine 20 μL eşleme tamponu (metanol:1M sodium asetat: trietilenamin) (2:2:1) eklenmiş ve tekrar liyofilize edilmiştir. Daha sonra üzerine 20 μL türevlendirme tamponu (metanol: trietilenamin: deiyonize su: fenilizotiyosiyonat) (7:1:1:1) ilave edilmiş, çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında 20 d bekletilmiştir. Bekleme sonunda tekrar liyofilize edilmiş ve 1 mL seyreltme tamponu ilave edilerek 0,20 μm çapındaki filtreden geçirilmiştir. Filtre edilmiş örnekten 40 μL alınarak HPLC kolonuna enjekte edilmiştir (Hayaloğlu vd 2011). Sonuçlar mg/kg olarak verilmiştir.

Amino asitlerin ayırımı Kromasil 100-5C18 (150 x 4,6 mm) kolunu kullanılarak yapılmıştır. Solvent A olarak %2,5 asetonitril içeren 75 mM sodyum asetat (pH'sı asetik asitle 6,55'e ayarlanmış) çözeltisi kullanılmıştır. Solvent B ise asetonitril: deiyonize su: metanol 9:8:3 (v/v/v) oranında karıştırılarak hazırlanmış ve her iki solvente 10 mg/L olacak şekilde disodyum etilendiamintetra asetik asit (Na_2EDTA) ilave edilmiştir. Ardından 254 nm'de 40°C 'de 1 mL/d akış oranı ile kolona enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Solventlere ait akış oranı Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Amino asit Analizinde Hareketli Faz Çözeltilerinin (A ve B) Kromatografi Süresi İçerisinde Kolondan Geçiş Oranları

Süre (d)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
0	95	5
11	65	35
16	50	50
20	30	70
25	30	70
30	95	5
35	95	5

Amino asit standartları 0,1 N HCl içeren 0,4 mM metionin sülfon çözeltisinde hazırlanmış ve HPLC sistemine örnek enjeksiyonu yapılmadan önce tek tek cihaza enjekte edilerek alıkonma süreleri saptanmıştır. Daha sonra karışım halindeki serbest amino asit standartları en yüksek konsantrasyondan en düşüğe doğru kolona enjekte edilmiştir. Gerçekleştirilen ayırım sonrasında tüm serbest amino asitler için HPLC sisteminin yazılım programında standart eğri oluşturularak hesaplamalar yapılmıştır.

Fermente süt örneklerinde uçucu bileşiklerin belirlenmesi

Uçucu aroma bileşiklerinin belirlenmesinde Shimadzu GC gaz kromatografisi ve buna bağlı Shimadzu QP-2010 kütle spektrometresi (MS) sistemi kullanılmıştır. Cam viallere 3 g örnek tartılmış ve üzerine 10 µL metanolde hazırlanmış 100 ppm’lik 2-methyl-3-heptanone içeren internal standart ilave edilmiştir. Örnekler ısıtma ünitesinde 40 °C’de 30 d bekletilmiş, ekstraksiyon işlemi 75 µm carboxen-polydimethylsiloxane fiber (Supelco SPME Fiber, 75 µm Carboxen-PDMS, Bellefonte, Amerika) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bekleme süresi sonunda fiber açık konuma getirilerek vialin tepe boşluğunda 40°C’de 30 d tutulmuş, ekstrakte edilen uçucu bileşiklerin desorpsiyonu için fiber 2 d süreyle GC-MS enjeksiyon portunda bırakılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmış, akış hızı 1mL/d olacak şekilde ayarlanmıştır. Uçucu bileşiklerin ayrılması için DB-Wax kolon (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm) kullanılmıştır. Fırın sıcaklığı 40°C’de 2 d tutulmuş (desorpsiyon periyodu), dakikada 5°C olmak üzere sıcaklık 70°C’ye yükseltilmiş ve bu sıcaklıkta 1 d tutulmuştur. Daha sonra sıcaklık dakikada 10°C artışla 240°C’ye çıkarılmış ve bu sıcaklıkta 47 dakika tutulmuştur (Hayaloğlu *et al.* 2013). Fermente süt örneklerindeki uçucu bileşenlerin miktarları ise internal standardın pik alanıyla karşılaştırılarak µg/100 g olarak verilmiştir.

Duyusal analizler

Fermente süt örneklerinin duyusal değerlendirilmesinde Bodyfelt *et al.* (1988) tarafından belirtilen kriterler dikkate alınarak hazırlanan skala kullanılmıştır (Tablo 7). Duyusal değerlendirme Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim

elemanları ve lisansüstü öğrencilerinden oluşan 8 kişilik bir panelist grubu tarafından yapılmıştır. Fermente süt örnekleri üç basamaklı sayılarla kodlanmış ve panelistlere sunulmuştur.

Tablo 7. Deneme Fermente Süt Örneklerinin Duyusal Değerlendirilmesinde Kullanılan Skala Örneği (Tam Puan=9)

Örnek Kodu:				
Renk ve Görünüş	Çok iyi (9-8)	İyi (7-6)	Orta (5-4-3)	İyi değil (2-1)
Yapı ve Tekstür	Çok iyi (9-8)	İyi (7-6)	Orta (5-4-3)	İyi değil (2-1)
Koku	Çok iyi (9-8)	İyi (7-6)	Orta (5-4-3)	İyi değil (2-1)
Tat ve Aroma	Çok iyi (9-8)	İyi (7-6)	Orta (5-4-3)	İyi değil (2-1)
Asitlik	Normal (9-8)	Yüksek (7-6)	Biraz yüksek (5-4-3)	Çok yüksek (2-1)
Yabancı Tat ve Aroma	Yok (9-8)	Çok az (7-6)	Hissedilir (5-4-3)	İyi değil (2-1)
Genel Kabul Edilebilirlik	Çok iyi (9-8)	İyi (7-6)	Orta (5-4-3)	İyi değil (2-1)

İstatistiksel analizler

Araştırma 5 farklı starter kültür kombinasyonu (*S. thermophilus* 20S4 + *L. plantarum* 156 + *L. casei* ATCC 334 ilaveli, *S. thermophilus* 20S4 + *L. plantarum* 156 + *L. helveticus* DPC 4571 ilaveli, *S. thermophilus* 20S4 + *L. plantarum* 156 ilaveli, *S. thermophilus* 20S4+ *L. plantarum* 156 + *L. casei* ATCC 334 + *L. helveticus* DPC 4571 ilaveli, *S. thermophilus* 20S4 + *L. casei* ATCC 334 + *L. helveticus* DPC 4571 ilaveli) x 4 farklı depolama süresi (1., 14., 28. ve 42. günler) x 2 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Elde edilen veriler SPSS for Windows Release version 26 (Armonk, NY, IBM Corp., Amerika) paket programında varyans analizine tabi tutulmuş, önemli bulunan ortalamalara ise Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmıştır.

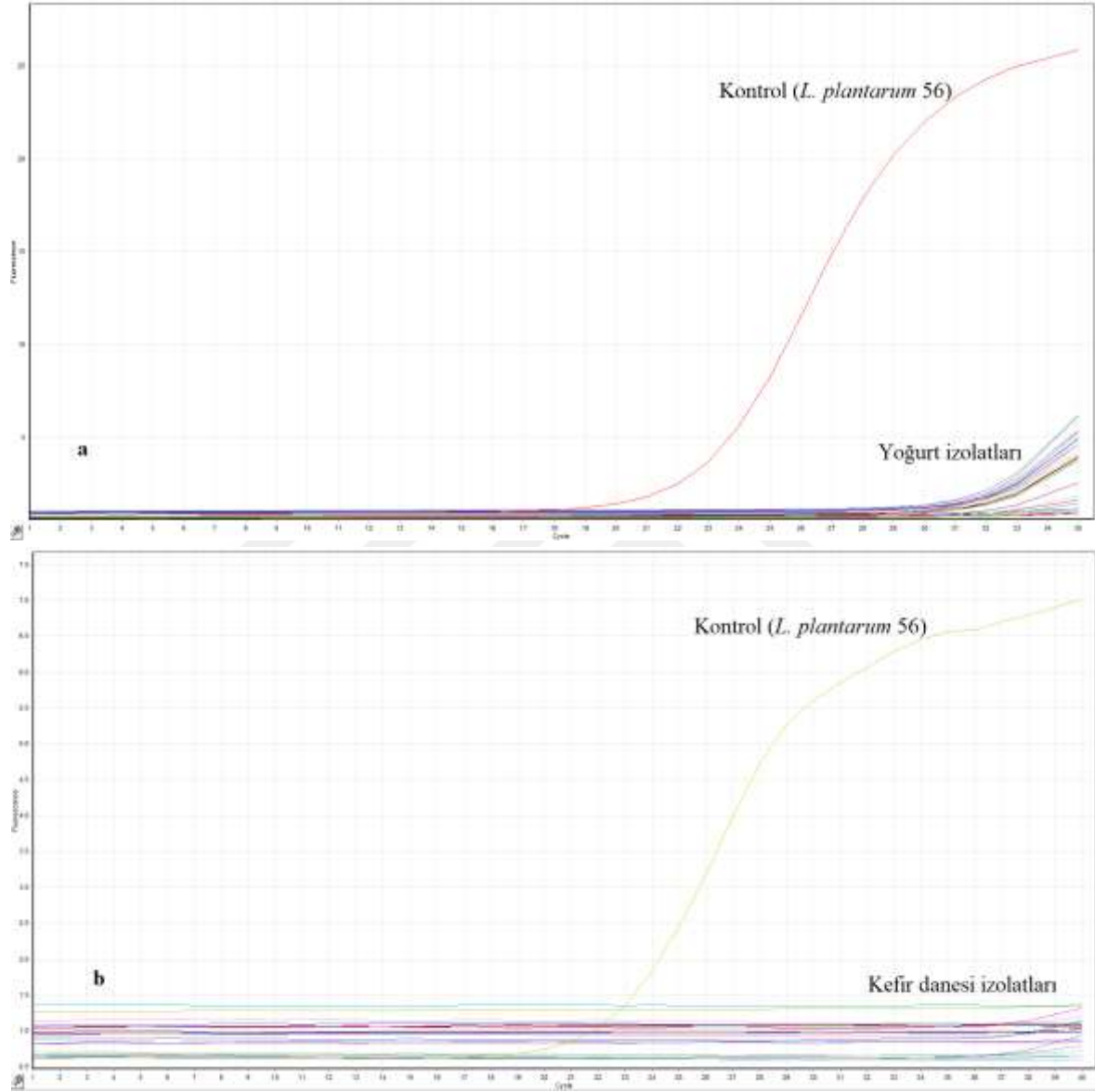
ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

LAB İzolatlarında GAD Geninin Varlığı

Son yıllarda seçilen LAB suşları tarafından GABA'nın mikrobiyal üretimi doğal olarak GABA ile zenginleştirilmiş gıdaların elde edilmesi için uygun bir strateji olarak kabul edilmekte, bu amaçla çeşitli fermente gıdalardan izole edilen LAB'lar GABA üretme potansiyeli açısından değerlendirilmektedir. Bu çalışmada da ev yapımı yoğurt (264 izolat) ile kefir danelerinden (158 izolat) daha önce izole edilen toplam 422 LAB suşunun GABA üretme yeteneği, başka bir deyişle GAD aktivitesi PCR işlemi ile kalitatif olarak değerlendirilmiştir. GABA üretme yeteneğine sahip olduğu bilinen *L. plantarum* 56 suşu ise kontrol olarak kullanılmıştır. PCR analizi sonucunda GAD (+) kontrol suşunda (*L. plantarum* 56) gene spesifik amplifikasyon gözlenmiş, buna karşılık test edilen LAB izolatlarının hiçbirinde GAD geninin varlığı belirlenememiştir (Şekil 11). Yani yoğurt ve kefir danesi izolatlarının hiçbirinde GAD geni tespit edilememiş, dolayısıyla GABA üretim yeteneğine sahip olmadıkları belirlenmiştir.

Yapılan bazı araştırmalarda peynir ve yoğurttan izole edilen bazı *S. thermophilus* suşlarının GABA üretebildiği bildirilmiştir. (Franciosi *et al.* 2015; Chen *et al.* 2018; Han *et al.* 2020). Belirtilen çalışmaların aksine bu çalışmada ev yapımı yoğurttan izole edilen *S. thermophilus* (171 adet) ve *L. bulgaricus* (93 adet) suşlarının GABA üretemediği tespit edilmiştir. Bu durumun ev yapımı yoğurtların fermantasyonunda çoğunlukla ticari yoğurt kültürlerinin kullanılmış olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda yoğurtta mikrobiyal çeşitliliğin az olması da GAD aktivitesine sahip suşların tespit edilememesinin nedeni olarak düşünülebilir. Nitekim fermente süt ürünü olan yoğurtta bilindiği üzere *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* olmak üzere iki temel bakteri bulunmaktadır. Benzer şekilde Santos-Espinosa *et al.* (2020) geleneksel olarak üretilen Meksika peynirlerinden izole ettikleri 94 yabancı LAB suşunun GABA üretme yeteneğini araştırmışlar ve *Lactobacillus* ssp.'ye ait 54 suştan 16'sının, *Lactococcus* ssp.'ye ait 8 suştan 3'ünün GABA üretebildiğini, buna karşılık *Streptococcus* ssp.'ye ait hiçbir suşun ise GABA üretme yeteneğine sahip olmadığını belirlemişlerdir. Brasca *et al.* (2016) 191 adet *S. thermophilus* suşundan 20 tanesinin GAD genine sahip olduğunu, bunlardan sadece 5'inin pastörize sütte GABA üretebildiğini bildirmişlerdir. Park *et al.* (2014) tarafından yapılan bir çalışmada Kimchiden izole edilen 3000 adet LAB suşundan sadece 9 tanesinin GABA üreticisi olduğu bildirilmiştir. Valenzuela *et al.*

(2019) tarafından yapılan bir çalışmada starter kültür kullanılmaksızın çiğ süttten üretilen geleneksel süt ürünlerinden izole edilen 262 LAB suşu %1 MSG katkılı kültür ortamında GABA üretimi açısından taranmış ve suşların yaklaşık olarak yarısının (123) GABA ürettiği belirlenmiştir. Söz konusu araştırmada 16'sı *L. lactis* subsp. *lactis*, 3'ü *S. thermophilus* olmak üzere 24 suşun 1 mM'ın üzerinde (1,01-2,81 mM aralığında) GABA ürettiği tespit edilmiştir.



Şekil 11. Kontrol suşu (*L. plantarum* 56) ve LAB izolatlarında GAD geninin varlığına ilişkin PCR görüntüleri (**a**:Yoğurt izolatları **b**:Kefir danesi izolatları)

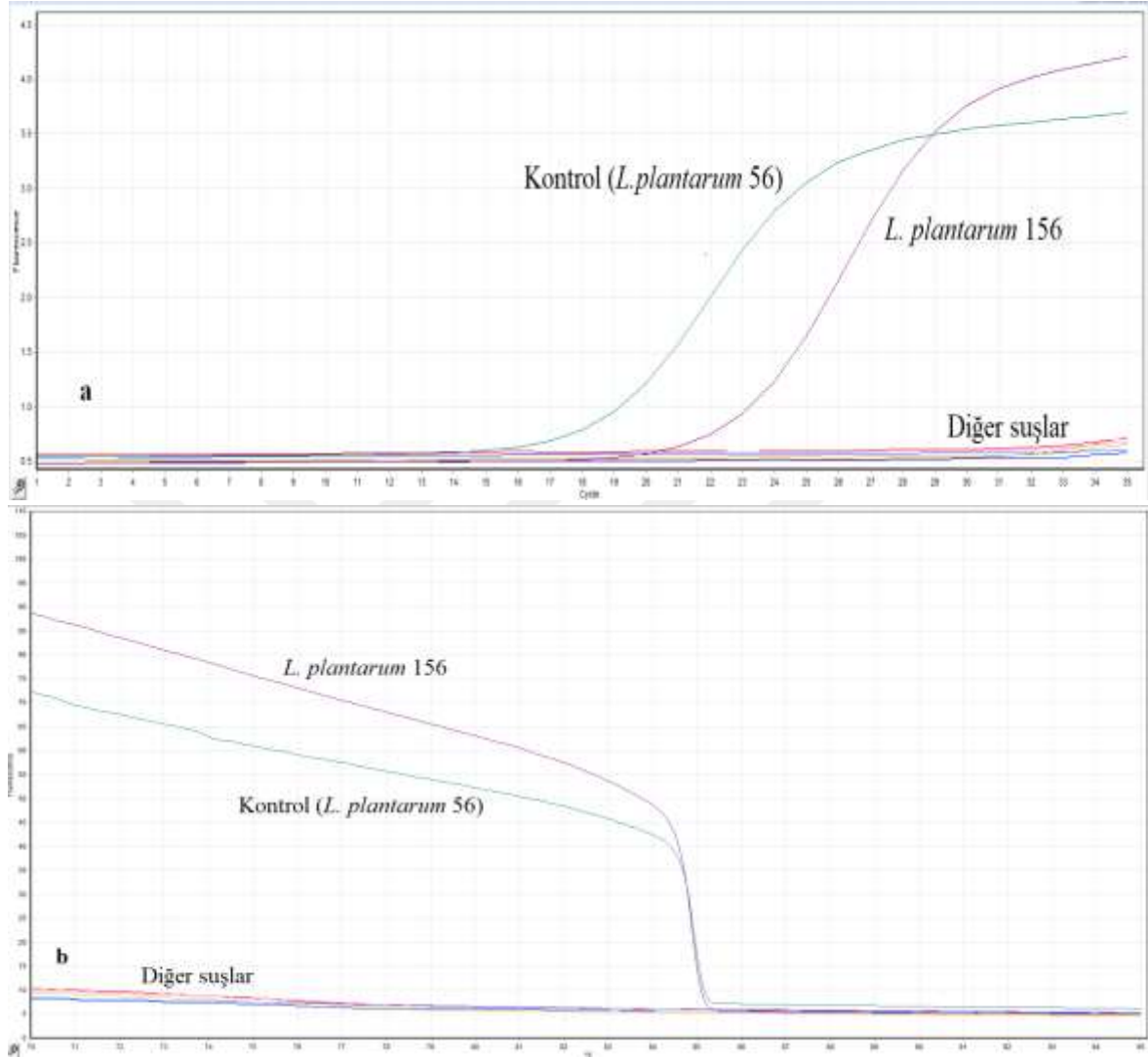
Daha önce bahsedildiği üzere kefir daneleri sahip olduğu floranın çeşitliliğinden dolayı çalışmada GABA üreticisi suşların belirlenmesi amacıyla seçilmiş, ancak laktobasil, streptokok, laktokok cinslerine ait suşların hiçbirinde GAD geninin varlığı tespit edilememiştir. Elde edilen sonuçların aksine Hurtado-Romero *et al.* (2021) Meksika'da kefir danelerinden izole ettikleri *L. lactis* BIOTEC006, BIOTEC007, BIOTEC008, *Kluyveromyces lactis* BIOTEC009, *L. pseudomesenteroides* BIOTEC012 ve *L. kefir* BIOTEC014 suşlarının GABA

üreticisi olduklarını belirtmişlerdir. Araştırma sonuçlarındaki bu farklılıklar GABA üretiminin suşa bağımlı olmasına bağlanabilir. Nitekim Santos-Espinosa *et al.* (2020) LAB suşlarının GABA üretme yeteneğinin farklılık gösterebileceğini, pH, sıcaklık, inkübasyon süresi, PLP ilavesi ve ortam bileşimi dahil olmak üzere pek çok farklı fermentasyon parametresinin GABA üretiminde etkili olabileceğini ifade etmişlerdir. Benzer şekilde Siragusa *et al.* (2007) İtalyan peynirlerindeki GABA üreten izolatların büyük bir kısmını *L. plantarum* ve *L. paracasei* suşlarının oluşturduğunu ve GABA sentezleme kapasitesinin belirgin şekilde suşa bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Nomura *et al.* (1999) peynirden izole edilen *L. lactis* subsp. *cremoris* suşlarından hiçbirinin GABA üretmediğini, bu durumun suşların GAD genine sahip olmamasından kaynaklandığını ifade etmişlerdir. Sun *et al.* (2009) tarafından yapılan çalışmada ise kıymızdan izole edilen 81 *Lactobacillus* suşundan sadece 2 tanesinin GABA ürettiği tespit edilmiştir. Diğer bir çalışmada ise *L. plantarum* DM5, *L. acidophilus* NRRL B-4495 ve *L. plantarum* NRRL B-4496 suşlarının GABA üretme yeteneği TLC yöntemiyle belirlenmiş, *L. acidophilus* NRRL B-4495 ile *L. plantarum* NRRL B-4496 suşlarının GABA standardı ile benzer görüntü oluşturmadığı ve bu iki suşun GAD enzimine sahip olmadığı bildirilmiştir (Dan and Goyal 2015). Valenzuela *et al.* (2019) %1 MSG katkılı kültür ortamında 1 mM'dan fazla miktarda GABA üreten suşlarda (24 izolat) türe özgü primerler kullanılarak PCR amplifikasyonu ile GAD geninin varlığını araştırmışlar ve 1 suş dışında tümünün GAD genine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. GAD geninin belirlenemediği *L. lactis* subsp. *lactis* L-LAC43 suşunda amplifikasyonun gerçekleşmemesinin primerlerdeki sekans heterojenliğinden kaynaklanmış olabileceğini bildirmişlerdir.

Fermente sütlerin üretiminde kullanılan suşlarda GAD aktivitesi

Bahsedildiği üzere yoğurt ve kefir izolatlarından GAD genine sahip suşların tespit edilememesi nedeniyle GAD aktivitesine sahip olduğu belirlenmiş Beyaz peynir izolatı (*L. plantarum* 156) ile çalışmaya devam edilmiştir. Yoğurt benzeri fermente süt üretiminde kullanılan tüm suşlar (*L. plantarum* 156, *L. helveticus* DPC 4571, *L. casei* ATCC 334 ve *S. thermophilus* 20S4) GAD geninin varlığının kontrol edilmesi amacıyla kontrol suşu (*L. plantarum* 56) ile birlikte HRM analizine tabi tutulmuştur. Suşlara öncelikle PCR analizi uygulanmış, daha sonra 70-95 °C arasında kademeli sıcaklık artışı yapılarak HRM analizi gerçekleştirilmiştir. PCR ve HRM analizlerine ait görüntüler Şekil 12' de sunulmuştur. İlgili görsel incelendiğinde 4 farklı suş arasından sadece *L. plantarum* 156 suşunun kontrol suşuna benzer şekilde amplifikasyon grafiği oluşturduğu, diğer suşlarda (*L. helveticus* DPC 4571, *L. casei* ATCC 334 ve *S. thermophilus* 20S4) bu durumun söz konusu olmadığı görülmektedir (Şekil 12-a). Böylece sadece *L. plantarum* 156 suşunun GAD genine sahip olduğu ve GABA

üretebildiği anlaşılmıştır. HRM analizine ait erime eğrilerine göre ise kontrol suşu (*L. plantarum* 56) ile GAD genine sahip olduğu tespit edilen *L. plantarum* 156 suşuna ait erime sıcaklıklarının sırasıyla 84,93 °C ve 84,88 °C olduğu belirlenmiştir (Şekil 12-b). Bu durum *L. plantarum* 156 suşunda GAD geninin varlığını teyit etmektedir.



Şekil 12. Yoğurt benzeri fermente süt üretiminde kullanılan suşlarda GAD geninin varlığına ilişkin PCR (a) ve HRM (b) analizi görüntüleri

Fermente Sütlerin Üretiminde Kullanılan Sütün Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

Fermente süt örneklerinin üretiminde kullanılan çiğ ve pastörize sütlerin bazı fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Fermente Süt Örneklerinin Üretiminde Kullanılan Çiğ ve Pastörize Sütün Bazı Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri

Fizikokimyasal Özellikler	Çiğ Süt	Pastörize Süt
Kuru madde (%)	12,62	12,65
Protein (%)	3,30	3,30
Yağ (%)	3,82	3,75
Asitlik (%)	0,17	0,17
pH	6,89	6,80
Mikrobiyolojik Özellikler (log kob/mL)	Çiğ Süt	Pastörize Süt
TAMB sayısı	6,29	2,81
MRS agarda gelişen LAB sayısı	4,25	<2,0
M-17 agarda gelişen LAB sayısı	5,98	2,77
Koliform grubu sayısı	3,88	<1,0
Maya-küf sayısı	3,12	<2,0

Verilen değerler iki tekerrür ortalamasıdır.

Fermente Süt Örneklerine Ait Fiziksel ve Kimyasal Analiz Sonuçları

Kuru madde miktarı

Fermente süt örneklerinde depolama süresince belirlenen kuru madde miktarları (%) standart sapmaları ile birlikte Tablo 9’ da, varyans analiz sonuçları ise Tablo 10’da verilmiştir. Yapılan varyans analizi test sonuçlarından kültür ilavesinin kuru madde miktarı üzerindeki etkisi istatistiksel olarak $p<0,05$ düzeyinde, depolama süresinin etkisi ise $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Aynı zamanda kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 9. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Kuru Madde Miktarları (%)

Örnekler	Depolama Süresi (Gün)			
	1	14	28	42
A	12,30±0,32 ^{a,A}	12,43±0,15 ^{a,A}	12,25±0,43 ^{a,A}	12,00±0,65 ^{ab,A}
B	12,06±0,34 ^{a,A}	12,31±0,09 ^{a,A}	12,12±0,44 ^{a,A}	11,50±0,45 ^{b,B}
C	12,68±0,64 ^{a,A}	12,37±0,31 ^{a,A}	12,43±0,26 ^{a,A}	12,35±0,40 ^{a,A}
D	12,31±0,43 ^{a,A}	12,23±0,20 ^{a,A}	12,29±0,31 ^{a,A}	11,85±0,44 ^{ab,A}
E	12,24±0,20 ^{a,A}	12,19±0,15 ^{a,A}	12,12±0,16 ^{a,A}	11,83±0,48 ^{ab,A}

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

Tablo 10. Fermente Süt Örneklerinin Kuru Madde Değerlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	F	P
Kültür ilavesi (A)	4	3,328	0,016*
Depolama süresi (B)	3	5,216	0,003**
AxB	12	0,478	0,920
Hata	60		
Genel	80		

*($p<0,05$) düzeyinde önemli; ** ($p<0,01$) düzeyinde önemli

En düşük kuru madde miktarı (%11,50) B örneğinde depolamanın 42. gününde, en yüksek kuru madde miktarı ise (%12,68) C örneğinde depolamanın 1. gününde belirlenmiştir. Taha *et al.* (2017) farklı starter kültürler ile ürettikleri bufalo yoğurdunda kuru madde miktarını %11,71-%12,94 olarak belirlemişlerdir. Belirtilen sonuçlar bu araştırmada elde edilen kuru madde miktarları ile benzerlik göstermektedir. El-Fattah *et al.* (2018) yoğurt starteri ve yüksek proteolitik aktiviteye sahip yardımcı kültürler kullanarak ürettikleri yoğurtlarda kuru madde miktarını %14,46 olarak belirlemişlerdir. Bu sonuç ise araştırmada elde edilen verilerden yüksek olup, bu farklılığın mevcut araştırmada fermente süt örneklerinin üretiminde kuru madde artırımına yönelik herhangi bir uygulama yapılmamış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tablo 9 incelendiğinde tüm örneklerde kuru madde miktarlarının genel olarak benzer olduğu, depolamanın ilk 28 günü boyunca istatistiksel açıdan önemli bir farklılığın bulunmadığı depolamanın 42. gününde örneklerin kuru madde oranında bir miktar azalma meydana geldiği ve bu azalmaların B örneği dışındaki diğer örneklerde istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir. Mevcut sonuçlardan farklı kültür kombinasyonlarının fermente süt örneklerinin kuru madde değerleri üzerinde önemli bir etkisinin bulunmadığı söylenebilir. Benzer olarak Saccaro *et al.* (2009) probiyotik ve yoğurt kültürleriyle üretilen yoğurtta ortalama kuru madde miktarının %11,45 olduğunu ve örnekler arasında önemli derecede farklılıkların olmadığını bildirmişlerdir. İki farklı starter kültürün (*L. bulgaricus* ve *L. acidophilus*) yoğurt üretiminde kullanıldığı diğer bir çalışmada ise yoğurtların nem yüzdeleri arasındaki farklılıkların önemli olmadığı ve yoğurt kalitesini etkilemediği belirtilmiştir (Hassan and Amjad 2010).

Protein miktarı

Fermente süt örneklerine ait protein miktarları standart sapmaları ile birlikte Tablo 11’de, varyans analizi test sonuçları ise Tablo 12’de verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarından protein miktarları açısından fermente süt örnekleri arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak $p < 0,01$ düzeyinde önemli olduğu, ancak depolama süresi ile kültür ilavesi x depolama süresi interaksiyonunun etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir ($p > 0,05$). Tablo 11’de görüldüğü üzere en düşük protein miktarı (%3,36) depolamanın 14. gününde D örneğinde, en yüksek protein miktarı ise (%4,05) depolamanın 42. gününde A örneğinde tespit edilmiştir. Fermente süt örneklerinin protein miktarları arasında çok büyük farklılıkların bulunmadığı ve depolama süresince genel olarak önemli bir değişim sergilemediği görülmektedir. Benzer şekilde Linares *et al.* (2016) *S. thermophilus* APC151 suşunu kullanarak ürettikleri biyoaktif yoğurtta üç haftalık depolama süresince protein miktarında önemli bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Mevcut araştırma sonuçlarından kullanılan kültür kombinasyonlarının fermente sütlerin protein miktarlarında önemli bir değişikliğe neden

olmadığı söylenebilir.

Tablo 11. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Protein Miktarları (%)

Örnekler	Depolama Süresi (Gün)			
	1	14	28	42
A	3,82±0,29 ^{a,A}	3,94±0,25 ^{a,A}	3,77±0,14 ^{a,A}	4,05±0,35 ^{a,A}
B	3,79±0,29 ^{a,A}	3,63±0,31 ^{abc,A}	3,98±0,19 ^{a,A}	3,97±0,25 ^{a,A}
C	3,89±0,42 ^{a,A}	3,80±0,40 ^{ab,A}	3,81±0,60 ^{a,A}	3,88±0,29 ^{ab,A}
D	3,65±0,38 ^{a,A}	3,36±0,03 ^{c,A}	3,65±0,22 ^{a,A}	3,65±0,27 ^{ab,A}
E	3,69±0,41 ^{a,A}	3,44±0,16 ^{bc,A}	3,77±0,14 ^{a,A}	3,49±0,10 ^{b,A}

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden p<0,05 düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden p<0,05 düzeyinde farklıdır.

Tablo 12. Fermente Süt Örneklerinin Protein Değerlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	F	P
Kültür ilavesi (A)	4	3,881	0,007**
Depolama süresi (B)	3	1,365	0,262
AxB	12	0,643	0,797
Hata	60		
Genel	80		

*(p<0,05) düzeyinde önemli; ** (p<0,01) düzeyinde önemli

Ehirim and Onyeneke (2013) inek ve keçi sütü karışımlarından ürettikleri yoğurtlarda protein miktarının %3,22-4,27 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Saccaro *et al.* (2009) yoğurt kültürü ve probiyotik kültürlerin (*L. acidophilus* LA5, *L. rhamnosus* LBA ve *B. animalis* subsp. *lactis* BL-04) farklı kombinasyonlarının bulunduğu yoğurtlarda protein miktarını %4,12 olarak tespit etmişlerdir. Taha *et al.* (2017) ise farklı starter kültürler (*L. acidophilus* 20552 ATCC ve *L. helveticus* CH5) kullanılarak üretilen yoğurt örneklerinde protein miktarını %3,34-4,36 olarak bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada serum protein konsantratu ilavesiyle ve farklı starter kültürler kullanılarak üretilen yoğurtlarda protein miktarı %5,22 olarak belirlenmiştir (El-Fattah *et al.* 2018). Hassan and Amjad (2010) farklı starter kültürler ile ürettikleri yoğurtlarda protein miktarını %4,45-4,92 olarak; Torre *et al.* (2003) ise yoğurt kültürü ve ticari probiyotik kültürler ile üretilen yoğurtlarda protein miktarını %5,39-5,60 olarak belirlemişlerdir. Bahsedilen araştırmalarda elde edilen bulgular ise bu araştırmada belirlenen protein miktarlarından daha yüksek bulunmuştur. Çeşitli araştırmalarda belirlenen protein miktarlarının farklılıklar gösterebileceği ve bu durumun fermente sütlerin üretiminde kullanılan hammadde, süt kuru maddesinin standardizasyonu için ilave edilen katkı maddeleri ve konsantrasyonları gibi faktörlere bağlı olarak değiştiği düşünülmektedir.

Yağ miktarı

Fermente süt örneklerine ait yağ miktarları standart sapmaları ile birlikte Tablo 13’de, varyans analiz sonuçları ise Tablo 14’de verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre kültür ilavesi, depolama süresi ile kültür ilavesi x depolama süresi inreraksiyonunun yağ miktarı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 13. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Yağ Miktarları (%)

Örnekler	Depolama Süresi (Gün)			
	1	14	28	42
A	3,15±0,12 ^{a,A}	3,20±0,08 ^{ab,A}	3,10±0,18 ^{ab,A}	3,02±0,09 ^{a,A}
B	3,17±0,05 ^{a,A}	3,20±0,14 ^{ab,A}	3,27±0,22 ^{a,A}	3,12±0,29 ^{a,A}
C	3,27±0,22 ^{a,A}	3,07±0,09 ^{b,A}	3,00 ±0,08 ^{b,A}	3,17±0,22 ^{a,A}
D	3,10±0,14 ^{a,A}	3,15±0,23 ^{ab,A}	3,00±0,08 ^{b,A}	3,07±0,15 ^{a,A}
E	3,12±0,37 ^{a,A}	3,32±0,12 ^{a,A}	3,07±0,09 ^{ab,A}	3,07±0,17 ^{a,A}

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

Farklı kültür kombinasyonları ile üretilen fermente süt örneklerinin yağ miktarlarının %3,00-3,32 arasında değiştiği ve depolama süresince önemli bir değişim sergilemediği görülmektedir. Mevcut sonuçlar kullanılan kültür kombinasyonlarının fermente sütlerin yağ miktarları üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Nitekim Ranadheera *et al.* (2016) farklı probiyotik kültürler kullanarak ürettikleri fermente keçi sütlerinde depolama boyunca yağ miktarlarında önemli farklılıkların olmadığını ifade etmişlerdir.

Tablo 14. Fermente Süt Örneklerinin Yağ Değerlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	F	P
Kültür ilavesi (A)	4	0,851	0,499
Depolama süresi (B)	3	1,565	0,207
AxB	12	0,911	0,542
Hata	60		
Genel	80		

*($p<0,05$) düzeyinde önemli; ** ($p<0,01$) düzeyinde önemli

Bu çalışmada belirlenen yağ değerleri diğer araştırmacılar tarafından bildirilen yağ değerleriyle benzerlik göstermektedir (Hrnjez *et al.* 2014; Ranadheera *et al.* 2016; Taha *et al.* 2017). Ehirim and Onyeneke (2013) keçi ve inek sütünü farklı oranlarda karıştırarak ürettikleri yoğurt örneklerinde yağ oranının %1,89-4,27 arasında olduğunu, en yüksek değeri ise %100 keçi sütü ile üretilen yoğurtta tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada elma, kuru üzüm ve buğday ilaveli probiyotik yoğurtlarda yağ oranının %3,59-3,92 arasında değiştiği gözlemlenmiştir (Bosnea *et al.* 2017). Araştırma sonuçlarındaki bu farklılıkların kullanılan

sütün türü, bileşimi, üretim metodu, kullanılan ingredientler ve farklı depolama şartlarından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Titrasyon asitliği

Titrasyon asitliği, fermente süt ürünlerinde sütün doğal asitliğinin yanı sıra bakterilerin faaliyetleri sonucu sonradan oluşan laktik asit başta olmak üzere diğer organik asitlerin miktarı hakkında bilgi veren önemli bir parametredir. İnkübasyon sonrasında asitlik değişiminin, ürünün dayanıklılığı yani tüketilebilme özelliğini kaybetmeksizin saklanabileceği sürenin belirlenebilmesi açısından da önemli olduğu belirtilmektedir (Yılmaz 2006).

Farklı kültür kombinasyonları ile üretilen fermente süt örneklerinde depolama boyunca belirlenen % asitlik değerleri standart sapmaları ile birlikte Tablo 15’de, varyans analizi sonuçları ise Tablo 16’da verilmiştir. Varyans analiz sonuçlarından fermente süt örneklerinin % asitlik değerleri üzerine kültür ilavesi ve depolama süresinin etkisi $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunurken, kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$). Fermente süt örneklerine ait en düşük % asitlik değeri (%0,687) depolamanın sonunda *S. thermophilus* 20S4 ve *L. plantarum* 156 suşlarının kullanıldığı C örneğinde; en yüksek % asitlik değeri ise (%0,914) depolamanın sonunda *S. thermophilus* 20S4, *L. plantarum* 156 ve *L. helveticus* DPC 4571 suşlarının kullanıldığı B örneğinde belirlenmiştir. Khanlari *et al.* (2021) farklı kültür kombinasyonları ile ürettikleri fermente süt örneklerinde titrasyon asitliğini %0,73-0,89; Abdel-Hamid *et al.* (2019) *L. casei* ATTC 393 ile ürettikleri fermente sütlerde titrasyon asitliğini %0,73-0,90; Fırat (2019) ise antioksidan ve probiyotik aktivite gösteren yoğurt bakterileri ile ürettikleri yoğurtlarda depolama boyunca titrasyon asitliği değerlerini %0,68-0,93 olarak belirlemişlerdir. Bu bulgular araştırmada elde edilen % asitlik değerleri ile uyum içerisindedir. Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği’nde (Anonim 2009) ise titrasyon asitliği değerlerinin (laktik asit olarak ağırlıkça %) %0,6-1,5 aralığında olması gerektiği belirtilmiş, bu açıdan değerlendirildiğinde fermente süt örneklerinin % asitlik değerleri bakımından ilgili tebliğe uygun olduğu görülmüştür.

Tablo 15. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Asitlik Değerleri (%)

Örnekler	Depolama Süresi (Gün)			
	1	14	28	42
A	0,788±0,05 ^{a,AB}	0,818±0,01 ^{b,A}	0,749±0,04 ^{bc,B}	0,747±0,03 ^{b,B}
B	0,802±0,03 ^{a,B}	0,911±0,05 ^{a,A}	0,887±0,03 ^{a,A}	0,914±0,04 ^{a,A}
C	0,713±0,07 ^{ab,AB}	0,774±0,02 ^{b,A}	0,729±0,02 ^{c,AB}	0,687±0,05 ^{b,B}
D	0,741±0,06 ^{ab,A}	0,844±0,05 ^{ab,A}	0,778±0,04 ^{bc,A}	0,798±0,14 ^{ab,A}
E	0,696±0,04 ^{b,B}	0,857±0,08 ^{ab,A}	0,810±0,06 ^{b,A}	0,787±0,05 ^{b,AB}

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

Tablo 16. Fermente Süt Örneklerinin % Asitlik Değerlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	F	P
Kültür ilavesi (A)	4	13,706	0,00**
Depolama süresi (B)	3	8,071	0,00**
AxB	12	1,239	0,279
Hata	60		
Genel	80		

*(p<0,05) düzeyinde önemli; ** (p<0,01) düzeyinde önemli

Fermente süt örneklerine ait % asitlik değerlerinin depolama boyunca dar bir aralıkta değişim gösterdiği, bununla birlikte özellikle *S. thermophilus* 20S4, *L. plantarum* 156 ve *L. helveticus* DPC 4571 suşları ile üretilen B örneğinin daha yüksek asitlik değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Depolama boyunca fermente sütlerin asitlik değerlerinde dalgalanmalar meydana geldiği, bununla birlikte B, D ve E örneklerinin asitliklerinin 42. günde 1. güne göre bir miktar yükseldiği tespit edilmiştir. Bu örneklerde özellikle *S. thermophilus* 20S4 suşuna ilaveten MRS agarda gelişen termofilik LAB popülasyonunun (muhtemel *L. helveticus* DPC 4571) depolama boyunca yüksek kalması asitlik gelişimini teşvik etmiş olabilir. Nitekim fermente süt ürünlerinde asitlik gelişimi bakteri faaliyetleri sonucu oluşan başta laktik asit olmak üzere organik asitler ile ilişkilendirilmektedir (Shori *et al.* 2022b). Dolayısıyla *L. helveticus* DPC 4571 suşunun örneklerde asitlik gelişimi üzerine katkıda bulunduğu söylenebilir. A ve C örneklerinin asitlik değerleri ise 14. güne kadar artmış, ardından azalma eğilimine girmiştir. Yapılan bir çalışmada araştırmacılar farklı oranlarda inoküle edilen *L. casei* AST18 suşunun yoğurt örneklerinin asitlik değerlerini minimum seviyede artırdığını, depolamanın ilk ve son günündeki değerler arasında önemli farklılıkların bulunmadığını tespit etmişlerdir (Li *et al.* 2013b). Guo *et al.* (2009) tarafından yapılan bir çalışmada ise kullanılan probiyotik kültürler içinde *L. acidophilus* NCFM ile *B. animalis* Bb12 suşlarının bulunduğu fermente sütlerde depolama sonunda fermentasyonun yavaşladığı ve titrasyon asitliğinin azaldığı rapor edilmiştir.

pH

Fermente süt örneklerinde depolama süresince belirlenen pH değerleri standart sapmaları ile birlikte Tablo 17’de, varyans analizi sonuçları ise Tablo 18’de verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre kültür ilavesi ve depolama süresinin fermente süt örneklerinin pH değerleri üzerine önemli derecede (p<0,01) etki ettiği belirlenmiştir. Bununla birlikte kültür ilavesi x depolama süresi interaksiyonunun pH’ya olan etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (p>0,05). Örnekler ait en düşük pH değeri (4,08) depolamanın 42. gününde B örneğinde, en yüksek pH değeri (4,45) ise depolamanın 28. gününde C örneğinde saptanmıştır.

Vitheejongjaroen *et al.* (2021) *B. animalis* MSMC83 ile ürettikleri probiyotik yoğurtlarda pH değerlerinin 3,72 ile 4,67 arasında; Abdel-Hamid *et al.* (2019) ise *L. casei* ATCC 393 suşunu kullanarak fermente ettikleri sütlerde pH değerlerinin 3,95 ile 4,52 arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Tablo 17. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen pH Değerleri

Örnekler	Depolama Süresi (Gün)			
	1	14	28	42
A	4,35±0,02 ^{ab,A}	4,33±0,04 ^{ab,A}	4,42±0,11 ^{a,A}	4,37±0,07 ^{a,A}
B	4,32±0,07 ^{b,A}	4,20±0,07 ^{b,B}	4,18±0,04 ^{b,B}	4,08±0,06 ^{b,C}
C	4,42±0,05 ^{ab,A}	4,38±0,03 ^{a,A}	4,45±0,05 ^{a,A}	4,40±0,07 ^{a,A}
D	4,44±0,07 ^{a,A}	4,30±0,09 ^{ab,A}	4,37±0,07 ^{a,A}	4,27±0,21 ^{ab,A}
E	4,44±0,10 ^{a,A}	4,32±0,14 ^{ab,A}	4,31±0,12 ^{ab,A}	4,26±0,11 ^{ab,A}

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden p<0,05 düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden p<0,05 düzeyinde farklıdır.

Tablo 18. Fermente Süt Örneklerinin pH Değerlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	F	P
Kültür ilavesi (A)	4	11,878	0,00**
Depolama süresi (B)	3	6,107	0,00**
AxB	12	1,194	0,308
Hata	60		
Genel	80		

*(p<0,05) düzeyinde önemli; ** (p<0,01) düzeyinde önemli

Tablo 17 incelendiğinde özellikle B örneğinde pH değerlerinin diğer örneklerden önemli derecede düşük olduğu, başlangıçta 4,32 olan pH'nın depolama boyunca istatistiksel olarak önemli derecede (p<0,01) düşüş sergileyerek 4,08'e ulaştığı görülmektedir. Aynı örnekte titrasyon asitliği değerlerinin de yüksek olması ve depolama süresince artış göstermesi bu sonucu doğrular niteliktedir. Söz konusu durum daha önce bahsedildiği üzere B örneğinde *S. thermophilus* 20S4, *L. plantarum* 156 suşlarına ilaveten *L. helveticus* DPC 4571 suşunun kullanılmasına ve asit üretimine katkıda bulunmasına bağlanabilir. Benzer şekilde *S. thermophilus* 20S4, *L. casei* ATCC 334 ve *L. helveticus* DPC 4571 suşlarının kullanıldığı E örneğinin pH değerinin de depolama boyunca istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte, bir düşüş sergilediği görülmektedir. Diğer örneklerin pH değerlerinde ise depolama boyunca hafif artış ve azalışların olduğu belirlenmiştir. Laktozun bakteri faaliyetleri sonucu degrade olmasıyla asitlik artışına paralel olarak pH'nın düşebileceği, ardından laktik asitin parçalanması ve proteoliz sonucu açığa çıkan bazik karakterli degradasyon ürünlerinin pH'ı yükseltebileceği bildirilmiştir (Erkaya 2014). Yapılan bir çalışmada farklı süt çeşitleri kullanılarak üretilen yoğurtlarda 14 günlük depolama süresince pH değerlerinin azaldığı bildirilmiştir (Ghoneem *et al.* 2018). Shori *et al.* (2022a) ise farklı starter kültürlerin bulunduğu yoğurt örneklerinde en düşük pH değerinin *L. rhamnosus* suşunun bulunduğu örnekte

belirlendiğini, *L. plantarum* ve *L. casei* suşlarının bulunduğu örneklerde ise pH'nın depolamanın 14. günü hariç diğer günlerde kontrol ile benzer olduğunu ifade etmişlerdir.

Serum ayrılması

Yoğurt ve benzeri fermente süt ürünlerindeki en yaygın teknolojik kusurlardan biri olan serum ayrılması, su fazının jel yapısından ayrılması olarak bilinmektedir. Sinerezis sırasında meydana gelen olaylar net olarak anlaşılmamakla birlikte, depolama sırasında görülen su salmaya kazein ağının yeniden düzenlenmesinin neden olduğu düşünülmektedir. Serum ayrılmasının en önemli nedenleri arasında asitlik düzeyi, yüksek inkübasyon sıcaklıkları, düşük kuru madde içeriği ve yetersiz depolama sıcaklıkları bulunmaktadır (Bakırcı 2014; Bosnea *et al.* 2017; Vitheejongjaroen *et al.* 2021).

Fermente süt örneklerinde depolama boyunca belirlenen serum ayrılması değerleri (mL) standart sapmaları ile birlikte Tablo 19'da, varyans analizi sonuçları ise Tablo 20'de verilmiştir. Serum ayrılması değerleri üzerine depolama süresinin etkisi $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunurken, kültür ilavesi ve kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$). Fermente süt örneklerinde en düşük serum ayrılması değeri (6,87 mL) depolamanın 28. gününde A örneğinde, en yüksek serum ayrılması değeri (8,87 mL) ise depolamanın 1. gününde D örneğinde saptanmıştır. Benzer şekilde Fırat (2019) yoğurt örneklerinde depolama boyunca serum ayrılmasına ait değerlerin 7,05-9,0 mL arasında değiştiğini belirtmiştir.

Tablo 19. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Boyunca Belirlenen Serum Ayrılması Değerleri (mL)

Örnekler	Depolama Süresi (Gün)			
	1	14	28	42
A	7,62±0,47 ^{b,B}	7,00±0,91 ^{a,AB}	6,87±1,31 ^{a,A}	8,62±0,25 ^{b,B}
B	7,75±0,64 ^{b,A}	7,50±0,91 ^{a,A}	7,12±1,03 ^{a,A}	7,72±0,48 ^{b,A}
C	8,55±0,10 ^{a,A}	7,37±1,10 ^{a,AB}	7,00±1,15 ^{a,B}	7,50±0,40 ^{ab,AB}
D	8,87±0,62 ^{a,A}	8,12±0,85 ^{a,AB}	7,25±0,50 ^{a,B}	8,37±0,47 ^{a,A}
E	8,30±0,23 ^{ab,A}	7,81±1,02 ^{a,A}	7,62±0,75 ^{a,A}	8,00±0,81 ^{ab,A}

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

Tablo 19'da görüldüğü üzere serum ayrılması açısından örnekler arasında depolamanın 1. ve 42. günleri hariç istatistiksel olarak farklılığın bulunmadığı, söz konusu değerlerin genel olarak benzer olduğu belirlenmiştir. Bosnea *et al.* (2017) serbest ve immobilize *L. casei* kullanarak ürettikleri yoğurt örnekleri arasında serum ayrılması açısından farklılığın olmadığını bildirmişlerdir.

Tablo 20. Fermente Süt Örneklerinin Serum Ayrılması Değerlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	F	P
Kültür ilavesi (A)	4	2,106	0,091
Depolama süresi (B)	3	7,433	0,00**
AxB	12	0,970	0,487
Hata	60		
Genel	80		

*($p<0,05$) düzeyinde önemli; ** ($p<0,01$) düzeyinde önemli

Fermente sütlerin tümünde serum ayrılmasının depolamanın 28. gününe kadar azaldığı, depolamanın son gününde artış gösterdiği, bununla birlikte bu artış ve azalışların A, C, D örneklerinde istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir. Bir çalışmada ticari probiyotik ve yoğurt kültürlerinin kullanıldığı fermente sütlerde serum ayrılmasının depolama süresince azaldığı rapor edilmiştir (Torre *et al.* 2003). Yoğurt ve benzeri süt ürünlerinde asitlik artışının serum ayrılmasını azalttığı bildirilmiştir (Hussin *et al.* 2021). Nitekim Atamer ve Sezgin (1987) depolama boyunca yoğurt örneklerinde serum ayrılmasının azaldığını ve asitlik düzeyinin pH 4'e kadar artmasının serum ayrılmasını azalttığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte uzun süreli fermentasyonda jel ağının yeniden düzenlendiği, buna bağlı olarak gözenek sayısının çoğaldığı ve serum ayrılmasının arttığı rapor edilmiştir (Vittheejongjaroen *et al.* 2021). Ayrıca pH'nın 4'ün altına düşmesi durumunda ise suyun hidrasyonunun azaldığı, sonuç olarak pıhtının büzülerek sineresizin belirginleştiği ifade edilmiştir (Penna *et al.* 2006).

Viskozite

Viskozite; fermente süt ürünlerinin pıhtı stabilitesi ve kıvamı hakkında bilgi veren, ayrıca tüketici tercihini etkileyen önemli kalite göstergelerinden biridir. Farklı kültür kombinasyonları ile üretilen yoğurt benzeri fermente süt örneklerinin viskozite değerleri Tablo 21'de, varyans analiz sonuçları ise Tablo 22'de verilmiştir. Yapılan varyans analizi test sonuçlarından viskozite değerleri üzerine depolama süresinin etkisi $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunurken, kültür ilavesi ile kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi ise istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$). Fermente süt örneklerine ait en düşük viskozite değeri (9546,75 cP) *S. thermophilus* 20S4, *L. plantarum* 156 ve *L. helveticus* DPC 4571 suşlarının kullanıldığı B örneğinde depolamanın 42. gününde, en yüksek viskozite değeri ise (14638,00 cP) *S. thermophilus* 20S4, *L. plantarum* 156 ve *L. casei* ATCC 334 suşlarının kullanıldığı A örneğinde depolamanın 14. gününde tespit edilmiştir.

Tablo 21. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Viskozite Değerleri (cP)

Örnekler	Depolama Süresi (Gün)			
	1	14	28	42
A	10785,75±1449,97 ^{a,B}	14638,00±1759,51 ^{a,A}	13461,25±830,28 ^{a,A}	10048,25±989,46 ^{ab,B}
B	10775,00±1142,59 ^{a,B}	11551,00±939,27 ^{b,AB}	13438,00±570,45 ^{a,A}	9546,75±2244,01 ^{b,B}
C	12147,00±2548,14 ^{a,A}	12559,00±1091,06 ^{b,A}	12963,50±1480,36 ^{a,A}	10894,75±1171,81 ^{ab,A}
D	11565,25±2191,28 ^{a,A}	11987,50±1350,49 ^{b,A}	12920,50±1188,62 ^{a,A}	11272,75±468,53 ^{ab,A}
E	10583,50±1252,71 ^{a,C}	12355,75±554,40 ^{b,AB}	13671,25±1015,83 ^{a,A}	11636,00±492,22 ^{a,CB}

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden p<0,05 düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden p<0,05 düzeyinde farklıdır.

Tablo 22. Fermente Süt Örneklerinin Viskozite Değerlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	F	P
Kültür ilavesi (A)	4	1,114	0,358
Depolama süresi (B)	3	16,055	0,00**
AxB	12	1,585	0,120
Hata	60		
Genel	80		

*(p<0,05) düzeyinde önemli; ** (p<0,01) düzeyinde önemli

Fermente süt örneklerinin viskozite değerlerinin depolamanın 14. ve 42. günleri dışında, istatistiksel olarak benzer olduğu, kullanılan kültür kombinasyonlarının fermente sütlerin viskozite değerlerini önemli düzeyde etkilemediği görülmektedir. Viskozite değerlerinin depolama süresince değişimine bakıldığında; tüm örneklerde ilgili parametrenin genel olarak depolamanın 28. gününe kadar artış gösterdiği, bu artışın A, B ve E örneklerinde istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir. Depolamanın 42. gününde ise tüm örneklerin viskozite değerlerinde belirgin düşüş meydana gelmiş, en fazla düşüş ise B örneğinde tespit edilmiştir. Yapılan bir araştırmada *L. helveticus* H9 suşu farklı oranlarda yoğurt üretiminde kullanılmış ve depolamanın ilk 14 gününde viskozitenin arttığı belirtilmiştir. Araştırmacılar viskozitedeki bu artışı bakteriler tarafından üretilen polisakkaritlere, ayrıca düşük pH ve sıcaklık koşullarının koagülasyon ve jel oluşumunu teşvik etmesine bağlamışlardır (Zhou *et al.* 2019). Nitekim kuru madde, protein miktarı, uygulanan ısıl işlem ve süresi, serum proteinlerinin denatüre olma dereceleri, homojenizasyon, pH, bakterilerin metabolik ürünleri gibi çok sayıda faktörün viskozite üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (Özer 2006; Bakırcı 2014).

Fermente Süt Örneklerine Ait Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

MRS agarda gelişen mezofilik LAB sayıları

Fermente süt örneklerinin MRS agarda gelişen mezofilik LAB sayıları standart sapmaları ile birlikte Tablo 23’de, varyans analizi test sonuçları ise Tablo 24’de verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarından MRS agarda gelişen mezofilik LAB sayısı üzerine kültür ilavesi

ve depolama süresinin etkisinin istatistiksel olarak $p<0,01$ düzeyinde; kültür ilavesi x depolama süresi interaksiyonunun etkisinin ise $p<0,05$ düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir. Fermente süt örneklerinin MRS agarda gelişen mezofilik LAB sayılarına ait kültür ilavesi x depolama süresi interaksiyonunun grafiği ise Şekil 13’de sunulmuştur.

Örneklere ait MRS agarda gelişen en düşük mezofilik LAB sayısı (7,06 log kob/g) B örneğinde depolamanın 28. gününde, en yüksek sayı (8,24 log kob/g) ise E örneğinde depolamanın başlangıcında belirlenmiştir. Benzer şekilde Pyo and Song (2009) *L. delbrueckii* subsp. *latis* KFRI 01181 ve *L. plantarum* KFRI 00144 ile fermente ettikleri soya yoğurdunda LAB sayısının 30 günlük depolama boyunca 7,7-8,9 log kob/g arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Starter ve probiyotik kültürler kullanılarak yoğurt üretiminin yapıldığı başka bir çalışmada ise *L. casei* ve *L. paracasei* toplam sayısının 6,74-8,70 log kob/g arasında değiştiği ifade edilmiştir (Sah *et al* 2015). Mevcut sonuçlardan mezofilik laktobasil kültürlerinin bütün örneklerde depolama sonuna kadar canlılıklarını yüksek oranda (10^6 - 10^7 kob/g) koruduğu görülmektedir. Nitekim yoğurt ve benzeri fermente süt ürünlerinin raf ömrü boyunca canlı LAB’ları belirli oranda içermesi sağlık üzerinde faydalı olabilmesi için önem arz etmektedir. pH, besin bileşenleri, depolama koşulları dahil olmak üzere birçok faktörün LAB’ın canlılığına katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Shori *et al.* 2022a).

Tablo 23. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Boyunca Belirlenen MRS Agarda Gelişen Mezofilik LAB Sayıları (log kob/g)

Örnekler	Depolama Süresi (Gün)			
	1	14	28	42
A	7,94±0,04 ^{b,A}	7,86±0,09 ^{ab,A}	7,90±0,06 ^{ab,A}	7,70±0,07 ^{ab,B}
B	7,73±0,26 ^{c,A}	7,48±0,12 ^{c,A}	7,06±0,22 ^{d,B}	7,40±0,31 ^{bc,AB}
C	7,75±0,03 ^{c,A}	7,70±0,12 ^{abc,A}	7,61±0,13 ^{c,AB}	7,27±0,43 ^{c,B}
D	8,01±0,08 ^{b,A}	7,57±0,38 ^{bc,B}	7,72±0,07 ^{bc,AB}	7,76±0,06 ^{ab,AB}
E	8,24±0,00 ^{a,A}	7,91±0,13 ^{a,B}	8,02±0,29 ^{a,AB}	7,98±0,11 ^{a,AB}

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

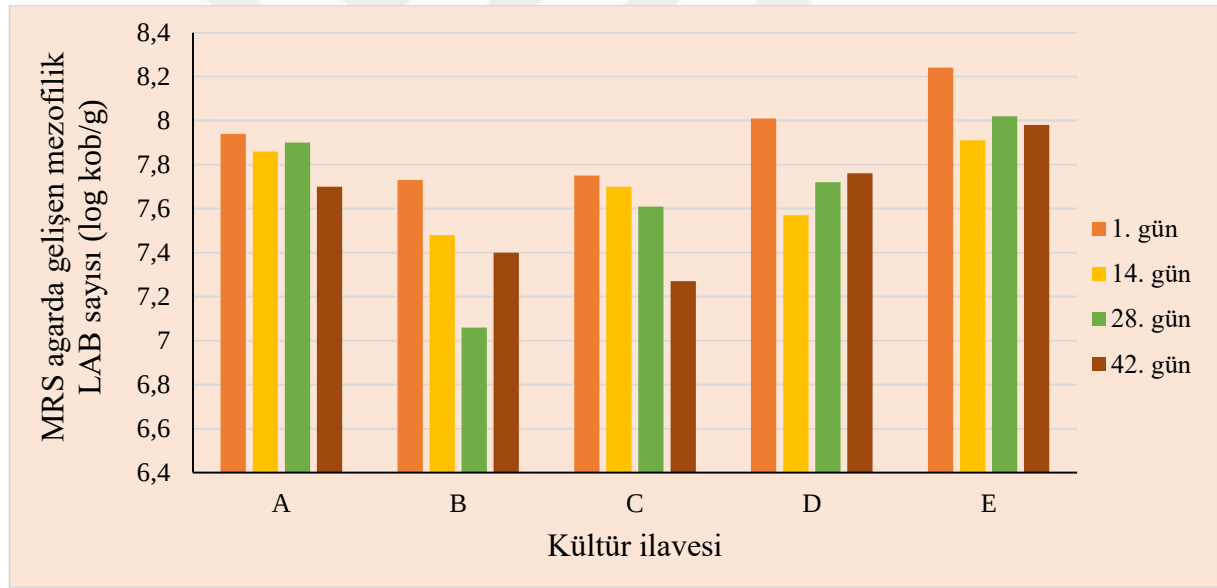
Tablo 24. Fermente Süt Örneklerinin MRS Agarda Gelişen Mezofilik LAB Sayılarına Ait Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	F	P
Kültür ilavesi (A)	4	24,525	0,00**
Depolama süresi (B)	3	10,287	0,00**
AxB	12	2,387	0,014*
Hata	60		
Genel	80		

*($p<0,05$) düzeyinde önemli; ** ($p<0,01$) düzeyinde önemli

Tablo 23 incelendiğinde MRS agarda gelişen mezofilik LAB sayıları açısından örnekler arasında istatistiksel olarak farklılıkların bulunduğu, bu farklılıkların fermente sütlerin üretiminde kullanılan kültür kombinasyonlarındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim söz konusu bakteri grubuna ait en yüksek sayıların *L. plantarum* 156 ve *L. casei* ATCC 334 suşlarının bulunduğu A, D örnekleri ile *L. casei* ATCC 334 suşunu içeren E örneğinde tespit edildiği, B (*S. thermophilus* 20S4+*L. plantarum* 156+*L. helveticus* DPC 4571) ve C (*S. thermophilus* 20S4+*L. plantarum* 156) örneklerinde ise bu sayıların nispeten düşük kaldığı görülmektedir.

Depolama boyunca MRS agarda gelişen mezofilik LAB sayılarının C örneğinde sürekli olarak azaldığı, bu azalmanın özellikle 42. günde daha belirgin olduğu, diğer örneklerde ise hafif artış/azalışlar olmakla birlikte, bakteri sayılarının genel olarak stabil kaldığı gözlenmiştir. Benzer şekilde Gu *et al.* (2020) *L. paracasei* IMC502 suşunun kullanıldığı yoğurtlarda *L. paracasei* sayısının 10^6 log kob/g'dan yüksek olduğunu ve depolama süresince stabil kaldığını bildirmişlerdir.



Şekil 13. Fermente süt örneklerinin MRS agarda gelişen mezofilik LAB sayıları üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi

Şekil 13 incelendiğinde fermente süt örneklerinin MRS agarda gelişen mezofilik LAB sayılarında depolama süresince hafif dalgalanmaların meydana geldiği, bununla birlikte bakteri sayılarının genel olarak stabil kaldığı görülmektedir.

MRS agarda gelişen termofilik LAB sayıları

Fermente süt örneklerinin MRS agarda gelişen termofilik LAB sayılarının depolama boyunca değişimi standart sapmaları ile birlikte Tablo 25’de, varyans analizi test sonuçları ise Tablo 26’da verilmiştir. Fermente süt örneklerinin MRS agarda gelişen termofilik LAB

sayılarına ilişkin varyans analizi sonuçlarından bakteri sayıları üzerine kültür ilavesi ve depolama süresinin etkisi $p<0,01$ düzeyinde önemli, kültür ilavesi x depolama süresi interaksiyonunun etkisi ise istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$). Fermente süt örneklerine ait MRS agarda gelişen en düşük termofilik LAB sayısı ($3,73 \log \text{ kob/g}$) A örneğinde depolamanın 28. gününde, en yüksek sayı ($8,33 \log \text{ kob/g}$) ise B örneğinde depolamanın başlangıcında tespit edilmiştir.

Tablo 25. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Boyunca Belirlenen MRS Agarda Gelişen Termofilik LAB Sayıları ($\log \text{ kob/g}$)

Örnekler	Depolama Süresi (Gün)			
	1	14	28	42
A	$4,12 \pm 0,21^{b,A}$	$3,78 \pm 0,13^{c,B}$	$3,73 \pm 0,04^{c,B}$	$3,86 \pm 0,20^{b,B}$
B	$8,33 \pm 0,14^{a,A}$	$8,28 \pm 0,01^{a,A}$	$8,12 \pm 0,04^{a,B}$	$8,00 \pm 0,03^{a,C}$
C	$4,19 \pm 0,16^{b,B}$	$4,38 \pm 0,05^{b,A}$	$4,02 \pm 0,02^{b,C}$	$3,80 \pm 0,04^{b,D}$
D	$8,10 \pm 0,20^{a,A}$	$8,09 \pm 0,18^{a,A}$	$8,12 \pm 0,17^{a,A}$	$7,97 \pm 0,02^{a,A}$
E	$8,27 \pm 0,20^{a,A}$	$8,08 \pm 0,45^{a,A}$	$7,91 \pm 0,37^{a,A}$	$7,86 \pm 0,28^{a,A}$

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

Tablo 26. Fermente Süt Örneklerinin MRS Agarda Gelişen Termofilik LAB Sayılarına Ait Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	F	P
Kültür ilavesi (A)	4	2189,599	0,00**
Depolama süresi (B)	3	9,935	0,00**
AxB	12	1,629	0,108
Hata	60		
Genel	80		

*($p<0,05$) düzeyinde önemli; ** ($p<0,01$) düzeyinde önemli

MRS agarda gelişen termofilik LAB sayıları açısından örnekler arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılıkların bulunduğu, özellikle A ve C örneklerinde MRS agarda gelişen termofilik LAB sayılarının diğer örneklere göre düşük düzeyde kaldığı görülmektedir (Tablo 25). Bu durumun fermente sütlerin üretiminde kullanılan kültür kombinasyonlarının farklılığından kaynaklandığı, özellikle B, D ve E örneklerinin termofil karakterli olduğu bilinen *L. helveticus* DPC 4571 suşunu içermesi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. A ve C örneklerine ait kültür kombinasyonlarında ise *L. helveticus* DPC 4571 suşunun bulunmaması, bu örneklerde MRS agarda gelişen termofilik LAB sayılarının daha düşük olmasını açıklamaktadır. Yine A ve C örneklerine ait petrilere gelişen kolonilerin ise *S. thermophilus* 20S4, *L. plantarum* 156 ya da *L. casei* ATCC 334 suşlarına ait olabileceği düşünülmektedir.

MRS agarda gelişen termofilik LAB popülasyonunun depolama süresince genel olarak azalma eğiliminde olduğu, özellikle başlangıç sayıları dikkate alındığında tüm örneklerde

depolamanın 42. gününde azalma görüldüğü, bu azalmanın A, B ve C örneklerinde istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Moineau-Jean *et al.* (2019) *S. thermophilus* ve *L. helveticus* R0052 suşları ile ürettikleri yoğurt örneklerinde; başlangıç sayısı 10^7 kob/mL olan *L. helveticus* R0052'un depolamanın 16. gününden itibaren hafif azaldığını, ancak depolama boyunca genel olarak stabil kaldığını bildirmişlerdir. *L. helveticus* H9 suşunun üç farklı süt çeşidine değişik oranlarda inoküle edildiği bir çalışmada ise örneklerin tümünde *L. helveticus* sayısının 10^6 kob/g'nın üzerinde olduğu ve depolama süresince hafif şekilde azaldığı rapor edilmiştir (Wang *et al.* 2015).

M-17 agarda gelişen LAB sayıları

Fermente süt örneklerinin M-17 agarda gelişen LAB sayıları standart sapmaları ile birlikte Tablo 27'de, varyans analizi test sonuçları ise Tablo 28'de verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarından bakteri sayıları üzerine depolama süresinin etkisi $p<0,01$ düzeyinde önemli, kültür ilavesi ve kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi ise istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$).

Fermente süt örneklerine ait M-17 agarda gelişen en düşük LAB sayısı (8,59 log kob/g) C örneğinde depolamanın başlangıcında, en yüksek LAB sayısı (8,92 log kob/g) ise depolamanın 14. gününde yine C örneğinde belirlenmiştir. Shori *et al.* (2022a) tarafından yapılan çalışmada farklı starter kültür kombinasyonları ile üretilen yoğurtlarda *S. thermophilus* sayısının 8,04-8,84 log kob/g arasında değiştiği, Minervini *et al.* (2009) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise 8,61-8,77 log kob/g arasında olduğu bildirilmiştir. Elde edilen bulgular bu araştırmaların sonuçları ile benzerlik arz etmektedir.

Tablo 27. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Boyunca Belirlenen M-17 Agarda Gelişen LAB Sayıları (log kob/g)

Örnekler	Depolama Süresi (Gün)			
	1	14	28	42
A	8,80±0,05 ^{a,A}	8,91±0,12 ^{a,A}	8,79±0,16 ^{a,A}	8,81±0,07 ^{a,A}
B	8,73±0,17 ^{ab,A}	8,79±0,05 ^{a,A}	8,73±0,05 ^{a,A}	8,66±0,12 ^{b,A}
C	8,59±0,05 ^{b,C}	8,92±0,07 ^{a,A}	8,85±0,05 ^{a,A}	8,72±0,09 ^{ab,B}
D	8,79±0,02 ^{a,A}	8,80±0,04 ^{a,A}	8,81±0,13 ^{a,A}	8,75±0,05 ^{ab,A}
E	8,67±0,10 ^{ab,A}	8,89±0,08 ^{a,A}	8,81±0,26 ^{a,A}	8,79±0,05 ^{ab,A}

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

Tablo 28. Fermente Süt Örneklerinin M17 Agarda Gelişen LAB Sayılarına Ait Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	F	P
Kültür ilavesi (A)	4	1,929	0,11
Depolama süresi (B)	3	6,966	0,00**
AxB	12	1,336	0,22
Hata	60		
Genel	80		

*($p<0,05$) düzeyinde önemli; ** ($p<0,01$) düzeyinde önemli

Fermente süt örneklerinin M-17 agarda gelişen LAB sayılarının depolamanın 1. ve 42. günleri dışında istatistiksel olarak benzer olduğu, tüm örneklerde depolama süresince bakteri sayısının 10^8 kob/g seviyelerinde kaldığı görülmektedir. Bu durumun fermente sütlerin üretiminde kullanılan kültür kombinasyonlarının tümünde aynı oranda *S. thermophilus* 20S4 suşunun bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer şekilde Turgut *et al.* (2004) probiyotik ve yoğurt kültürleri ile; Moineau-Jean *et al.* (2019) ise yoğurt kültürü ve *L. helveticus* R0052 suşu ile ürettikleri yoğurtlarda *S. thermophilus* sayısının depolama süresince sabit kaldığını bildirmişlerdir. Nitekim uzun süreli buzdolabı şartlarında streptokok cinsine ait suşların laktobasillere göre daha fazla sağ kalım gösterdiği bildirilmiştir (Minervini *et al.* 2009). Ayrıca *S. thermophilus*'un laktobasil suşları ile simbiyotik bir ilişki içinde olduğu, bu yüzden yüksek popülasyona sahip olduğu düşünülmektedir. Nitekim bir çalışmada probiyotik *Lactobacillus* spp. suşlarının *S. thermophilus*'un canlılığı üzerinde koruyucu etkilerinin olduğu ve böylece depolama sonunda yoğurt örneklerinin *S. thermophilus* sayısında bir azalma olmadığı rapor edilmiştir (Shori *et al.* 2022b). Öte yandan örneklerde pH'nın önemli oranda düşmemesinde *S. thermophilus*'un canlılığını korumasında etkili olabilmektedir.

Maya ve küf sayısı

Fermente süt örneklerinin maya ve küf sayılarının depolama süresince değişimi Tablo 29 ve Tablo 30'da, varyans analiz test sonuçları ise Tablo 31'de verilmiştir. Fermente süt örneklerinde maya sayısı üzerine kültür ilavesi ve kültür ilavesi x depolama süresi interaksiyonunun etkisi $p<0,05$ düzeyinde önemli bulunurken, depolama süresinin etkisi $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Fermente süt örneklerinin maya sayılarına ait kültür ilavesi x depolama süresi interaksiyonunun grafiği Şekil 14'de verilmiştir.

Tablo 29 incelendiğinde A, B ve D örneklerinde depolamanın 28. gününden itibaren maya oluşumu gözlenmiş, en yüksek maya sayısı (3,94 log kob/g) B örneğinde depolamanın 42. gününde saptanmıştır. Küf sayısı ise bütün örneklerde depolama sonuna kadar tespit edilebilir seviyenin altında (<2 log kob/g) kalmıştır. Elde edilen sonuçlara paralel olarak Erkaya (2009) inek yoğurdunda maya küf sayısının 1,00-1,33 log kob/g olarak tespit edildiğini

bildirmiştir. Şanlıdere Aloğlu and Öner (2011) ise geleneksel yöntemlerle üretilen yoğurtlarda maya küf sayısının depolama boyunca 4,0-5,26 log kob/g arasında olduğunu ifade etmişlerdir. Maya küf sayısının yüksek olmasında üretim sırasında hijyen koşullarına dikkat edilmemesinin ve muhafaza şartlarında gereken hassasiyetin gösterilmemesinin etkili olabileceğini belirtmişlerdir.

Tablo 29. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Boyunca Belirlenen Maya Sayıları (log kob/g)

Örnekler	Depolama Süresi (Gün)			
	1	14	28	42
A	<2±0,00 ^{a,A}	<2±0,00 ^{a,A}	2,75±0,98 ^{a,A}	3,26±1,57 ^{ab,A}
B	<2±0,00 ^{a,B}	<2±0,00 ^{a,B}	2,63±0,73 ^{a,B}	3,94±0,76 ^{a,A}
C	<2±0,00 ^{a,B}	<2±0,00 ^{a,B}	<2±0,00 ^{a,B}	3,23±1,53 ^{ab,A}
D	<2±0,00 ^{a,B}	<2±0,00 ^{a,B}	2,64±0,86 ^{a,A}	<2±0,00 ^{b,B}
E	<2±0,00 ^{a,A}	<2±0,00 ^{a,A}	<2±0,00 ^{a,A}	<2±0,00 ^{b,A}

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden p<0,05 düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden p<0,05 düzeyinde farklıdır.

Tablo 30. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Boyunca Belirlenen Küf Sayıları (log kob/g)

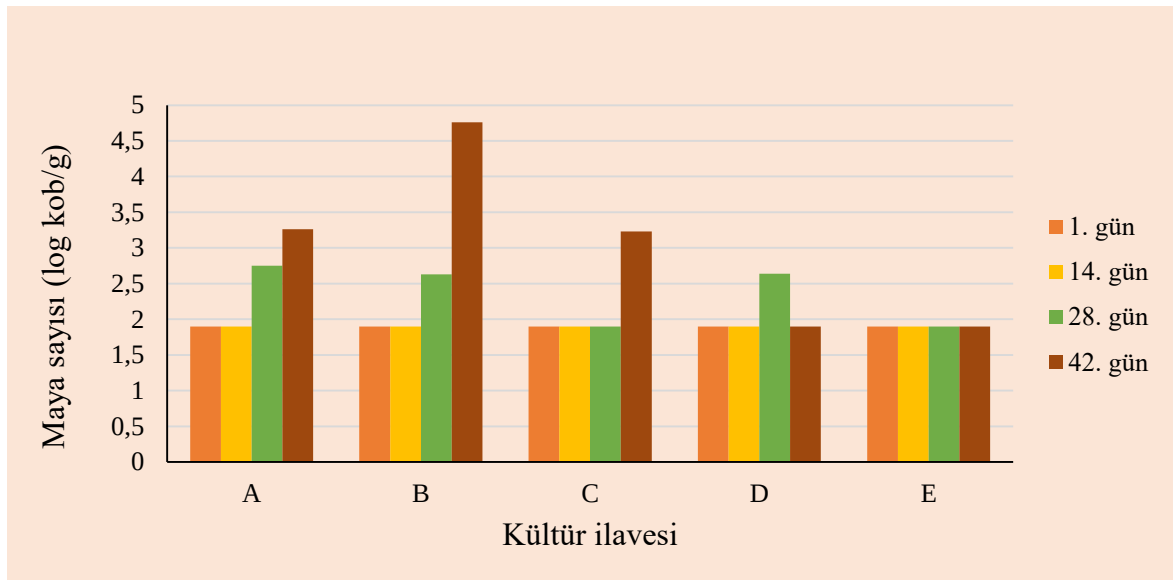
Örnekler	Depolama Süresi (Gün)			
	1	14	28	42
A	<2±0,00	<2±0,00	<2±0,00	<2±0,00
B	<2±0,00	<2±0,00	<2±0,00	<2±0,00
C	<2±0,00	<2±0,00	<2±0,00	<2±0,00
D	<2±0,00	<2±0,00	<2±0,00	<2±0,00
E	<2±0,00	<2±0,00	<2±0,00	<2±0,00

Tablo 31. Fermente Süt Örneklerinin Maya Sayılarına Ait Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	F	P
Kültür ilavesi (A)	4	3,239	0,018*
Depolama süresi (B)	3	10,705	0,00**
AxB	12	2,447	0,011*
Hata	60		
Genel	80		

*(p<0,05) düzeyinde önemli; ** (p<0,01) düzeyinde önemli

Şekil 14 incelendiğinde A ve B örneklerinin maya sayılarının 14. güne kadar <2 log kob/g seviyesinde olduğu, depolamanın ilerleyen günlerinde bu sayının arttığı görülmektedir. Tüm örnekler arasında en yüksek maya sayısı B örneğinde depolamanın 42. gününde belirlenmiştir. C örneğinde depolamanın 42. gününde, D örneğinde ise depolamanın 28. gününde maya sayısının arttığı tespit edilmiştir. E örneğinde ise maya gelişimi depolama boyunca tespit edilebilir seviyenin altında kalmıştır (<2 log kob/g).

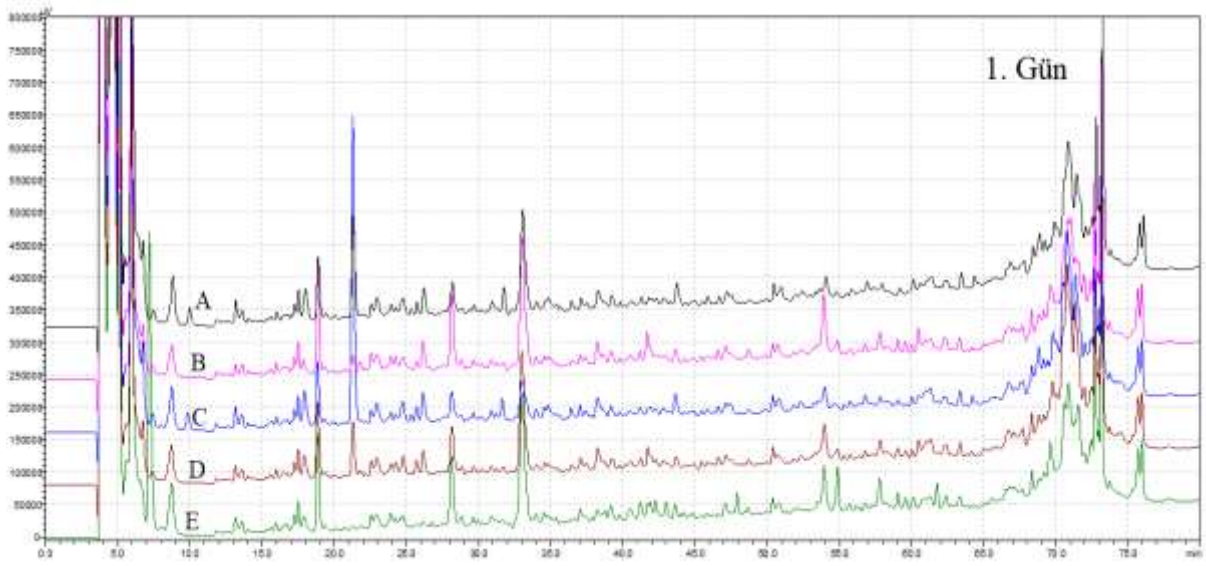


Şekil 14. Fermente süt örneklerinin maya sayıları üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi

Fermente Süt Örneklerinin Peptid Profiline Ait Analiz Sonuçları

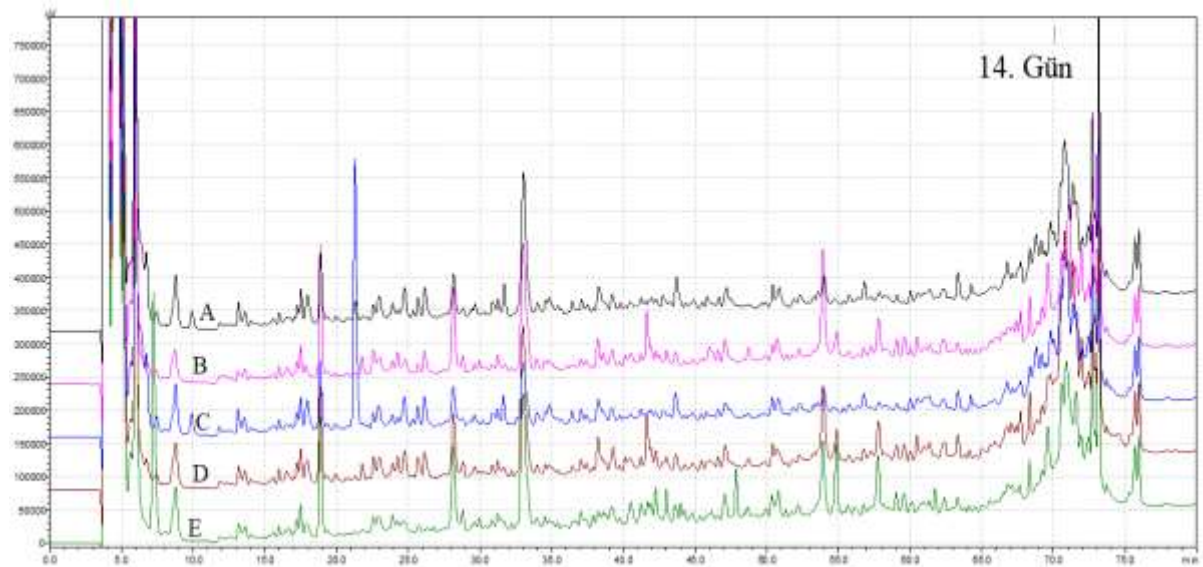
Proteinler ve yüksek molekül ağırlıklı peptidler enzimatik olarak veya proteolitik bir suş ile fermentasyona uğratarak daha düşük molekül ağırlıklı peptidlere hidrolize edilebilmektedir (Korhonen *et al.* 2006). Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi proteolizin bir göstergesi olarak kabul edilen bu peptidlerin oluşumunu analiz etmek için başvurulan en yaygın ve en etkili yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. RP-HPLC kromatogramları farklı molekül ağırlıklarındaki peptitlerin dizilimini göstermekte ve peptid konsantrasyonları arasındaki farklılığı açık bir şekilde ortaya koymaktadır (Şahingil 2012). Aynı zamanda HPLC kromatogramlarında oluşan pik sayısı, yüksekliği ve oluştuğu alan (hidrofilik ve hidrofobik bölge) proteoliz hakkında önemli bilgiler vermektedir.

Yoğurt benzeri fermente süt örneklerinin peptid profili analizi RP-HPLC kullanılarak belirlenmiş ve depolama periyodunun 1., 14., 28. ve 42. günlerinde elde edilen HPLC kromatogramları Şekil 15-Şekil 18’de verilmiştir.



Şekil 15. Fermente süt örneklerinde 1. günde belirlenen peptid profiline ait RP-HPLC kromatogramı

Şekil 15 incelendiğinde depolamanın başlangıcında hem pik sayısı hem de yükseklikleri açısından fermente süt örnekleri arasında bazı farklılıkların bulunduğu belirlenmiştir. Özellikle alıkonma süresinin 21. dakikasında gelen pikin yüksekliğinin C örneğinde diğer örneklerle göre belirgin derecede yüksek olduğu, söz konusu pikin E örneğinde ise belirlenemediği görülmektedir. Alıkonma süresinin 28. dakikasında gelen piklerin ise B ve E örneklerinde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde 33. dakikada gelen pikin yüksekliğinin A, B, D, E örneklerinde birbirine yakın olduğu, C örneğinde ise oldukça düşük kaldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda 54. dakikada gelen pik yüksekliğinin B, E ve D örneklerinde daha yüksek olduğu, 55. dakikada gelen pikin ise sadece E örneğinde belirlendiği görülmektedir.

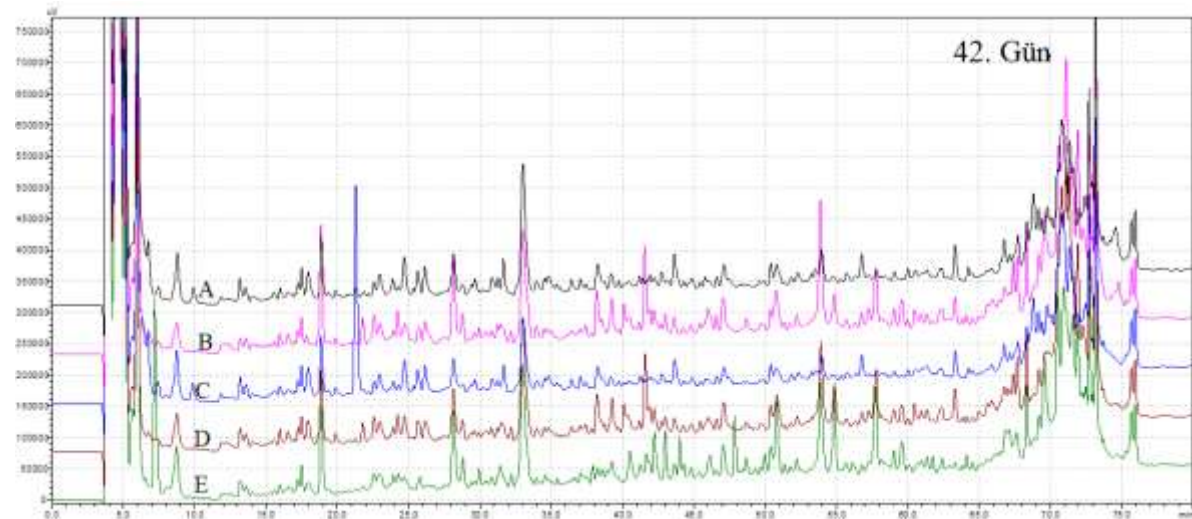


Şekil 16. Fermente süt örneklerinde 14. günde belirlenen peptid profiline ait RP-HPLC kromatogramı

Depolamanın 14. gününe ait peptid profili kromatogramı Şekil 16’da verilmiştir. Kromatogram incelendiğinde örnekler arasında bazı farklılıkların bulunduğu, özellikle B, D, E örneklerinde bazı piklerin A ve C örneklerine göre belirgin derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Alıkonma süresinin 19., 28., 42., 54., 55. ve 58. dakikalarında gelen pik yüksekliklerinin bu örneklerde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Depolamanın 1. gününde A, C ve D örneklerinde 21. dakikada gözlemlenen piklerin yüksekliğinin 14. günden itibaren önemli düzeyde azaldığı gözlenmiştir. Bu durumun kullanılan kültürlerin sahip olduğu proteolitik enzimler vasıtasıyla peptitleri parçalayarak yeni peptid ya da amino asitleri meydana getirmesi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Nitekim Bergamini *et al.* (2006) peptidazlar için substrat olarak kullanılan peptitlerin parçalanmasıyla pik alanlarının azaldığını belirtmişlerdir.



Şekil 17. Fermente süt örneklerinde 28. günde belirlenen peptid profiline ait RP-HPLC kromatogramı

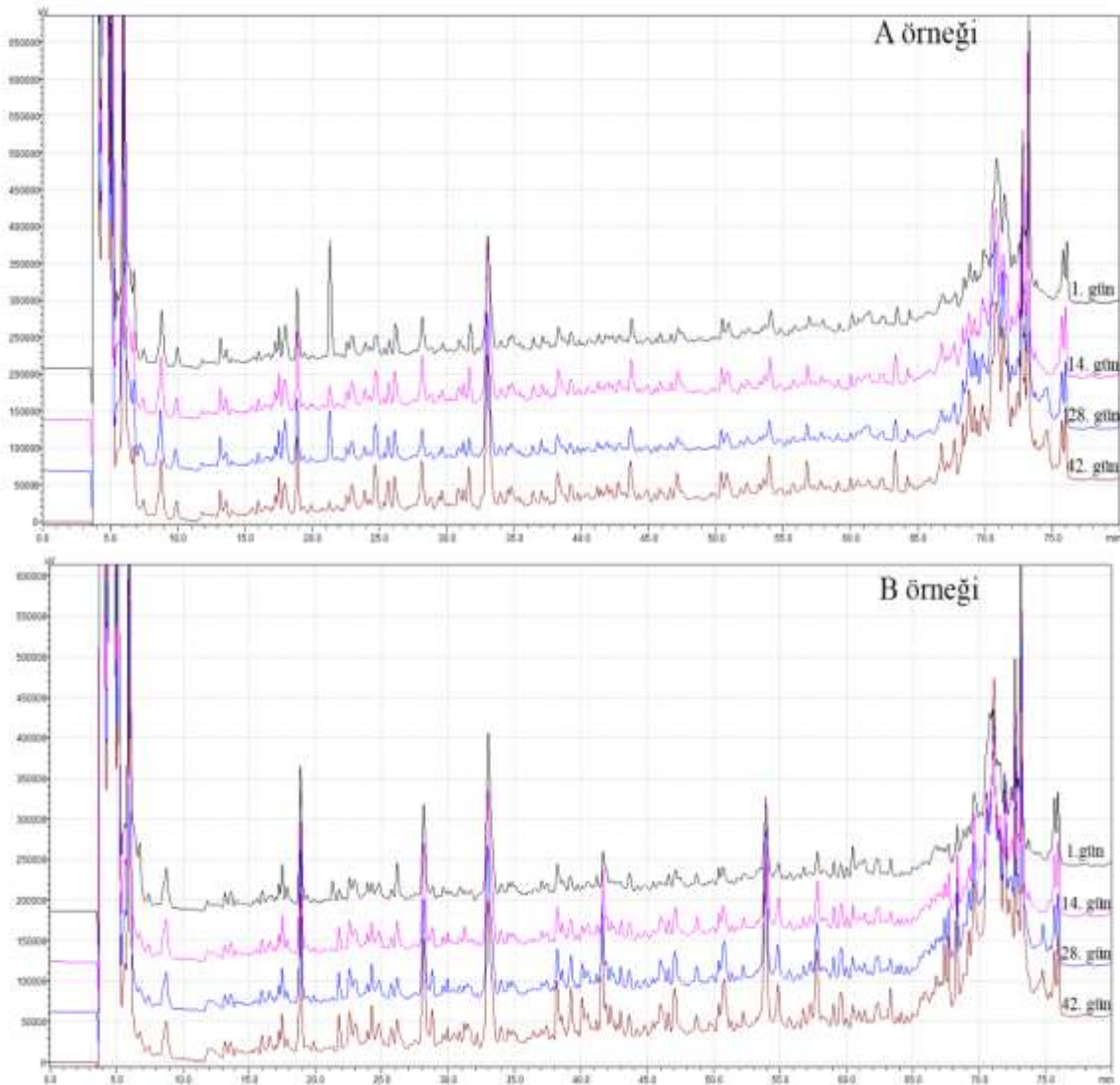


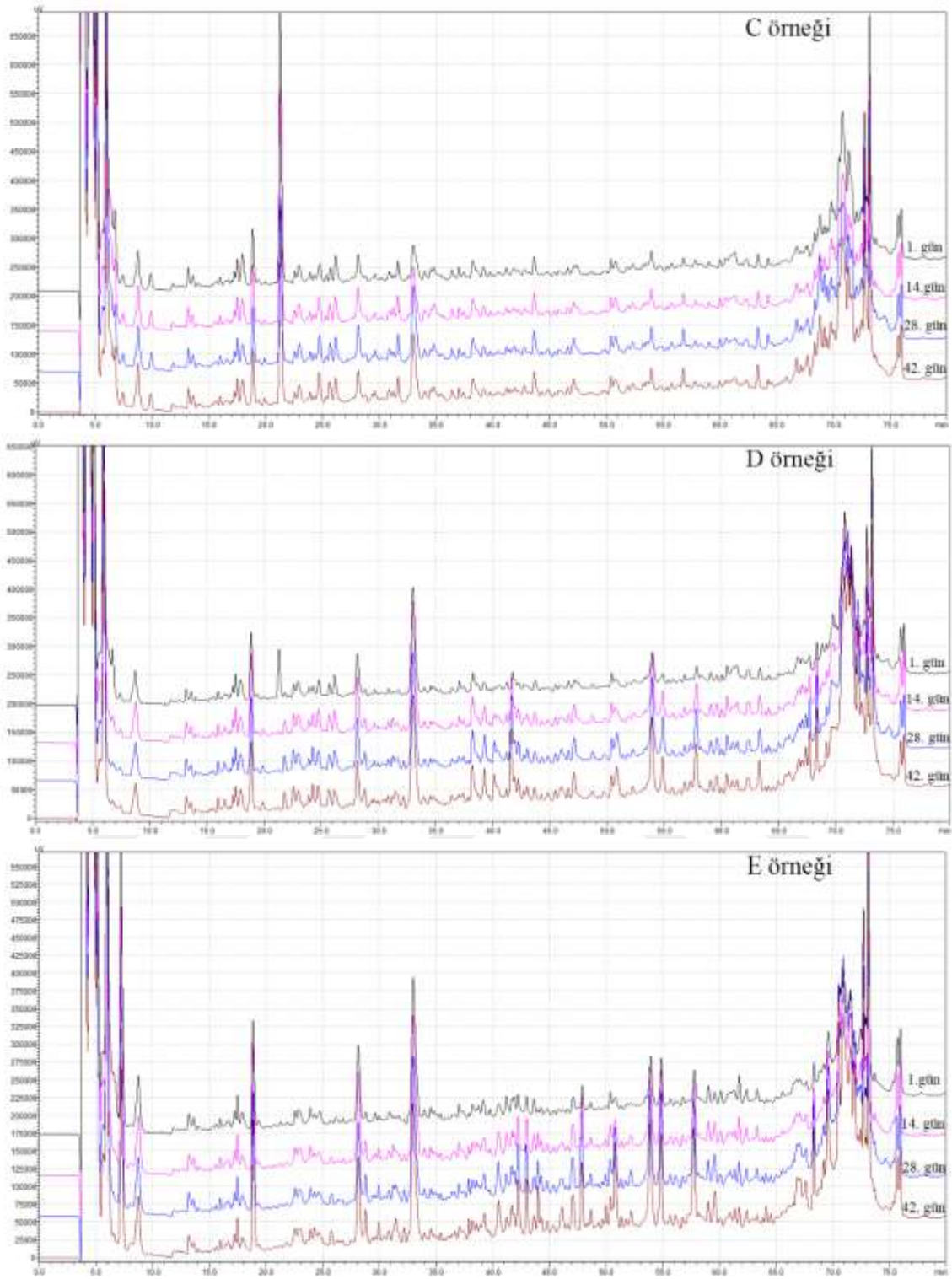
Şekil 18. Fermente süt örneklerinde 42. günde belirlenen peptid profiline ait RP-HPLC kromatogramı

Depolamanın 28. ve 42. günlerinde özellikle örnekler arasında hem piklerin sayısı hem de yükseklikleri açısından farklılıkların bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 17-Şekil 18). Peptid profillerinin 28. ve 42. günlerine ait kromatogramlar incelendiğinde; B, D ve E örneklerinde pik sayısı ve yüksekliklerinin diğer örneklerle oranla daha fazla olduğu, bu örneklerde 42. ve 51. dakikalarda yeni piklerin oluştuğu görülmektedir. Aynı zamanda 54., 55. ve 58. dakikalarda gelen piklerin B, D ve E örneklerinde daha yüksek ve belirgin, A ve C örneklerinde ise daha düşük olduğu belirlenmiştir. Alıkonma süresinin 48. dakikasında gelen pikin ise sadece E örneğinde belirlendiği gözlenmiştir. Bu durumun söz konusu örneklerin (B, D ve E) üretiminde proteolitik aktiviteye sahip *L. helveticus* DPC 4571 ticari suşunun kullanılması ve bu suşun peptid oluşumunu teşvik etmiş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim *L. helveticus* suşlarının kompleks bir proteolitik sisteme sahip olduğu ve diğer laktik kültürlerle nazaran daha yüksek oranda peptid ürettiği bildirilmiştir (Cavalheiro *et al.* 2020). Ayrıca D ve E örneklerinin üretiminde *L. helveticus* DPC 4571'in yanı sıra *L. casei* ATCC 334 suşunun kullanılmasının da sinerjistik etki oluşturduğu ve buna bağlı olarak proteoliz seviyesini artırdığı düşünülmektedir. Benzer şekilde Gu *et al.* (2020) çoklu starter kullanımının yoğurtta peptid oluşumunu teşvik ettiğini bildirmişlerdir.

Depolama boyunca her bir fermente süt örneğinin kendi içerisinde peptid profilinde görülen değişimi gösteren kromatogramlar toplu olarak Şekil 19'da sunulmuştur. A örneğinde depolama boyunca bazı pik yüksekliklerinin değiştiği, ancak kromatogramda genel olarak önemli değişikliklerin olmadığı tespit edilmiştir. Söz konusu örnekte 21. dakikada gelen pikin depolamanın 42. gününde son derece azaldığı, 57. ve 63. dakikada oluşan pik yüksekliklerinin ise depolamanın 42. gününde arttığı görülmektedir. B örneğinde depolama ilerledikçe pik yüksekliklerinin arttığı, 28., 38., 39., 41., 50., 54. ve 58. dakikalarda gelen piklerin seviyesinin depolamanın sonlarına doğru yükseldiği ve piklerin belirginleştiği görülmektedir. C örneğinde depolama boyunca peptid profili açısından önemli farklılıkların olmadığı, 21. dakikada gelen pik yüksekliğinin depolama sonuna doğru azaldığı, 33. dakikada gelen pikin yüksekliğinin ise 42. güne kadar arttığı görülmektedir. D örneğinde depolama periyodu boyunca pik yüksekliklerinin değiştiği, 1. günde 21. dakikada gelen pikin ilerleyen günlerde önemli derecede azaldığı, 38., 39. ve 40. dakikalar ile 51., 54., 55., 58. ve 63. dakikalarda gelen piklerin yüksekliğinin ise depolama ilerledikçe arttığı belirlenmiştir. Piklerin sayısı ve yüksekliği bakımından E örneğinin diğer örneklerle göre önemli derecede farklılık gösterdiği, 40.-51. dakikalar arası ile 57. dakikada gelen pik yüksekliklerinin depolama ilerledikçe artış gösterdiği görülmüştür.

Şanlıdere Aloğlu (2010) ticari ve geleneksel yoğurt örneklerinin peptid profillerine ait kromatogramların birbirine benzer olduğunu, ancak depolama boyunca pik alanlarında kantitatif farklılıkların bulunduğunu belirtmiştir. Nielsen *et al.* (2009) yüksek proteolitik aktiviteye sahip *L. helveticus* suşları ile fermente ettikleri sütlerde 7. günde çok sayıda belirgin piklerin oluştuğunu, 1. güne göre peptid profilinin önemli ölçüde değiştiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu durumun hidrolizin yüksek oranda gerçekleşmesinden kaynaklandığını ifade etmişlerdir. Benzer şekilde *L. helveticus* suşlarının (MI 1198 ve CHCC 4080) kullanıldığı fermente sütlerde belirlenen peptid sayısında ve miktarında depolama boyunca artış olduğu bildirilmiştir (Otte *et al.* 2011). Yapılan bir çalışmada ise yoğurt kültürü ve ilaveten *L. paracasei* ssp. *paracasei* DC412 suşunun kullanıldığı koyun yoğurdu örneklerinde peptid profilinin birbirine benzer olduğu, sadece bazı pik alanlarında kantitatif olarak farklılıkların tespit edildiği bildirilmiştir. Araştırmacılar ayrıca çoğu pikin depolamanın 2. gününde oluştuğunu belirtmişlerdir (Papadimitriou *et al.* 2007).





Şekil 19. Fermente süt örneklerinin depolama boyunca peptid profillerine ait kromatogramlar

Peptitlerde Biyoaktivite Analizleri

ACE inhibitör aktivite

Peptitlerin ACE inhibisyon aktivitesi (% inhibisyon)

Fermente süt örneklerinden ekstrakte edilen peptitlerin ACE inhibitör aktivitesi % inhibisyon ve IC₅₀ değeri olarak ifade edilmiş ve analiz sonuçları standart sapmaları ile birlikte

Tablo 32’de sunulmuştur. Peptid ekstraktlarının % ACE inhibisyonu değerlerine ait varyans analizi sonuçları ise Tablo 33’de verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarından % inhibisyon değeri üzerine kültür ilavesi, depolama süresi ile kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,01$). Peptid ekstraktlarının % ACE inhibisyonuna ait kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonu ise Şekil 20’de sunulmuştur.

Fermente süt örneklerine ait en düşük % inhibisyon değeri (%45,71) depolamanın başlangıcında E örneğinde, en yüksek değer (%84,78) ise depolamanın 42. gününde yine E örneğinde belirlenmiştir. El-Fattah *et al.* (2018) yoğurt bakterilerine ilaveten yüksek proteolitik aktiviteye sahip suşları (*L. cremoris*, *L. lactis*, *L. helveticus* Lh-B02, *L. rhamnosus* B-1445) kullanarak ürettikleri yoğurt örneklerinde ACE inhibitör aktivitesinin %66,79-89,17 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Minervini *et al.* (2009) *S. thermophilus* CR12, *L. casei* LC01, *L. helveticus* PR4, *L. acidophilus* 2949 ve *L. plantarum* 1288 suşlarını tekli ve kombinasyon halinde kullanarak ürettikleri fermente keçi sütlerinde ACE inhibitör aktivitesinin %34,30-82,00 aralığında değiştiğini bildirmişlerdir.

Min *et al.* (2020) ise *L. plantarum* K25 ve yoğurt kültürlerini kullanarak ürettikleri fermente sütlerde ACE inhibitör aktivitesinin depolama boyunca %22,30-49,30 arasında olduğunu tespit etmişlerdir. Çeşitli araştırma bulgularından görüldüğü üzere ACE inhibisyon aktivitesinin farklı aralıklarda değişim gösterdiği, bu durumun ACE inhibisyon aktivitesinin büyük ölçüde bakteri suşuna bağlı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim ACE inhibitör aktivitesinin suşa bağımlı olarak değişebileceği başka araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Panayotova *et al.* 2018; Kariyawasam *et al.* 2021).

Yapılan bir çalışmada 59 adet *L. helveticus* suşu fermente süt üretiminde kullanılmış, söz konusu bakteri suşlarının 38’inin %50’nin üzerinde ACE inhibitör aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (Chen *et al.* 2015). Bir diğer çalışmada ise kefir izolatları (155 ve 256) ile *L. lactis* suşlarında ACE inhibitör aktivitesinin belirlenemediği bildirilmiştir (Pihlanto *et al.* 2010).

Tablo 32. Peptid Ekstraktlarında Depolama Boyunca Belirlenen ACE İnhibisyon Değerleri (%)

Örnekler	Depolama Süresi (Gün)			
	1	14	28	42
A	61,28±1,48 ^{a,A}	69,20±7,03 ^{a,A}	66,90±6,59 ^{a,A}	66,36±2,05 ^{bc,A}
B	58,99±1,18 ^{b,C}	63,96±0,58 ^{b,B}	61,43±1,46 ^{b,BC}	71,26±5,78 ^{b,A}
C	53,01±0,93 ^{c,C}	56,21±0,88 ^{d,B}	51,65±0,00 ^{c,D}	63,22±0,00 ^{c,A}
D	54,55±2,00 ^{c,C}	63,53±0,12 ^{b,B}	63,66±1,41 ^{ab,B}	81,50±4,06 ^{a,A}
E	45,71±1,65 ^{d,C}	60,11±1,69 ^{bc,B}	59,81±2,09 ^{b,B}	84,78±2,82 ^{a,A}

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

Tablo 33. Peptid Ekstraktlarının ACE İnhibisyon Değerlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

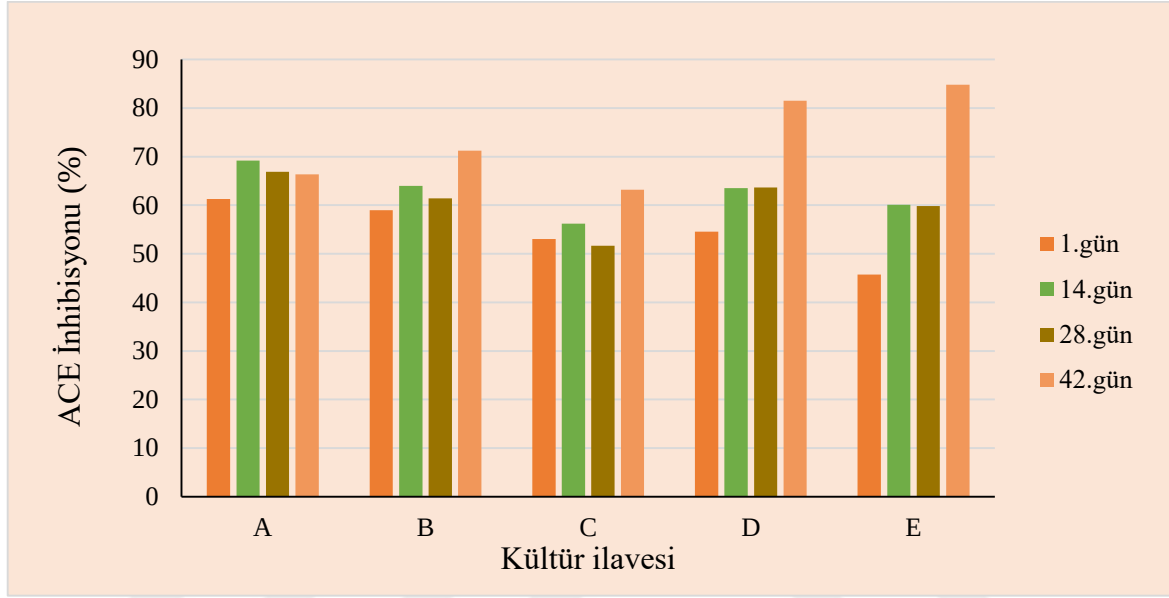
Varyasyon Kaynağı	SD	F	P
Kültür ilavesi (A)	4	29,54	0,00**
Depolama süresi (B)	3	136,27	0,00**
AxB	12	17,06	0,00**
Hata	60		
Genel	80		

*(p<0,05) düzeyinde önemli; ** (p<0,01) düzeyinde önemli

Tablo 32’de depolamanın başlangıcından itibaren örnekler arasında ACE inhibisyonu açısından farklılıkların bulunduğu, 1., 14. ve 28. günlerde A örneğinde % inhibisyon değerlerinin istatistiksel olarak önemli derecede yüksek olduğu, bu örneği B, D, E ve C örneklerinin izlediği görülmektedir. Depolamanın son gününde ise D ve E örneklerinin güçlü ACE inhibisyonuna sahip oldukları göze çarpmaktadır. Bu durumun söz konusu fermente sütlerin üretiminde yüksek proteolitik aktiviteye sahip *L. helveticus* DPC 4571 ve *L. casei* ATCC 334 suşlarının bir arada kullanılması ve bu suşların ACE inhibisyonu aktivitesi gösteren peptitlerin oluşumunu teşvik etmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Nitekim fermente süt örneklerinin 42. güne ait peptid profili kromatogramları incelendiğinde (Şekil 18) özellikle D ve E örneklerinde hem pik sayılarının hem de yüksekliklerin belirgin düzeyde artış gösterdiği görülmektedir. Tüm depolama periyotlarında genel olarak en düşük % inhibisyon değerlerinin sadece *S. thermophilus* 20S4 ile *L. plantarum* 156 suşlarını içeren C örneğinde belirlendiği, bu durumun ise söz konusu örnekte proteolitik aktiviteye sahip bir suşun bulunmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Chaves-Lopez *et al.* (2014) karışık starter kültür kullanımının fermente sütlerde ACE inhibitör peptitlerin oluşumunda önemli rol oynadığını vurgulamışlardır. Benzer şekilde Panayotova *et al.* (2018) yaptıkları bir çalışmada *L. helveticus* A1 ve *L. bulgaricus* J24 suşlarının birlikte kullanıldığı fermente sütte ACE inhibitör peptitlerinin yüksek konsantrasyonlarda belirlendiğini bildirmişlerdir.

ACE inhibisyon aktivitesinin depolama boyunca değişimi incelendiğinde; 1. günde örneklerin yüksek inhibisyon aktivitesine sahip olduğu ve 14. günde aktivitenin daha da arttığı görülmektedir. Bu sonuçlardan sütlerin fermantasyonu sırasında söz konusu peptitlerin oluştuğu, depolama sırasında da oluşmaya devam ettiği anlaşılmaktadır. Nitekim LAB suşlarının sahip olduğu proteolitik sistemler sayesinde fermantasyon sırasında ACE inhibitör peptitlerinin oluşabildiği diğer araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Gonzalez- Gonzalez *et al.* 2011; Parmar *et al.* 2020). Depolamanın 28. gününde ise fermente süt örneklerinin % inhibisyon değerlerinin sabit kaldığı ya da azaldığı tespit edilmiştir. Bu azalışın muhtemel nedeninin peptitlerin amino asitlere dönüşümünün olduğu düşünülmektedir. Donkor *et al.* (2007) probiyotik yoğurt örneklerinin 28 günlük depolama periyodu boyunca ACE

inhibisyonunda bir azalma eğilimi olduğunu belirterek, bu durumun nedenini ise ACE inhibitörlerinin hidrolize olmasıyla açıklamışlardır. Başka bir çalışmada ise *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG suşunun kullanıldığı yağsız sütte ACE inhibisyonunun fermentasyon sonunda azaldığı belirlenmiştir. Araştırmacılar bu azalmanın nedeni olarak *L. rhamnosus* GG suşunun gelişimi için aromatik amino asitlere ihtiyaç duyduğunu, dolayısıyla bu amino asitleri içeren peptitlerin birikimini engellediğini ve sonuç olarak ACE inhibitör aktivitenin azaldığını öne sürmüşlerdir (Sebastian-Nicolas *et al.* 2021).



Şekil 19. Peptid ekstraktlarının % ACE inhibisyon değerleri üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksiyonunun etkisi

Şekil 20 incelendiğinde A örneğine ait % inhibisyon değerlerinin depolama süresince genel olarak sabit bir değişim sergilediği, diğer örneklerde 28. güne kadar artma/azalmaların olduğu, ancak 42. günde özellikle D ve E örneklerinde daha belirgin olmak üzere artışların olduğu görülmektedir.

Peptitlerin ACE inhibisyon aktivitesi (IC50)

IC50 değeri ACE aktivitesinin %50 oranında inhibe edilmesi için gerekli olan peptid konsantrasyonunu ifade etmekte olup, ACE inhibisyonunun artışına paralel olarak IC50 değerlerinde azalma olması beklenmektedir. Fermente süt örneklerinden ekstrakte edilen peptitlerin IC50 değerlerinde depolama süresince görülen değişimler Tablo 34’de, varyans analizi test sonuçları ise Tablo 35’de verilmiştir. IC50 değerleri üzerine kültür ilavesi ve depolama süresi ile kültür ilavesi x depolama süresi interaksiyonunun etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,01$). Peptid ekstraktlarının IC50 değerlerine ait kültür ilavesi x depolama süresi interaksiyonu Şekil 21’de sunulmuştur.

Tablo 34. Peptid Ekstraktlarının ACE İnhibitör Aktivitelerine Ait IC50 Değerleri (mg/L)

Örnekler	Depolama Süresi (Gün)			
	1	14	28	42
A	84,04±3,32 ^{c,A}	79,84±4,60 ^{ab,A}	80,85±11,13 ^{b,A}	67,96±8,73 ^{a,B}
B	82,77±4,42 ^{c,B}	76,58±4,19 ^{b,B}	94,62±5,05 ^{a,A}	75,45±9,66 ^{a,B}
C	102,71±9,69 ^{ab,A}	90,81±10,43 ^{a,AB}	103,87±4,93 ^{a,A}	80,11±14,94 ^{a,B}
D	92,64±5,67 ^{bc,A}	75,55±4,91 ^{b,B}	74,26±1,29 ^{b,B}	67,55±3,59 ^{a,C}
E	104,06±10,00 ^{a,A}	59,03±11,80 ^{c,B}	59,88±10,63 ^{c,B}	49,68±5,02 ^{b,B}

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden p<0,05 düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden p<0,05 düzeyinde farklıdır.

Tablo 35. Peptid Ekstraktlarının ACE İnhibitör Aktivitelerine Ait IC50 Değerlerinin Varyans Analizi Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	F	P
Kültür ilavesi (A)	4	22,47	0,00**
Depolama süresi (B)	3	34,81	0,00**
AxB	12	6,20	0,00**
Hata	60		
Genel	80		

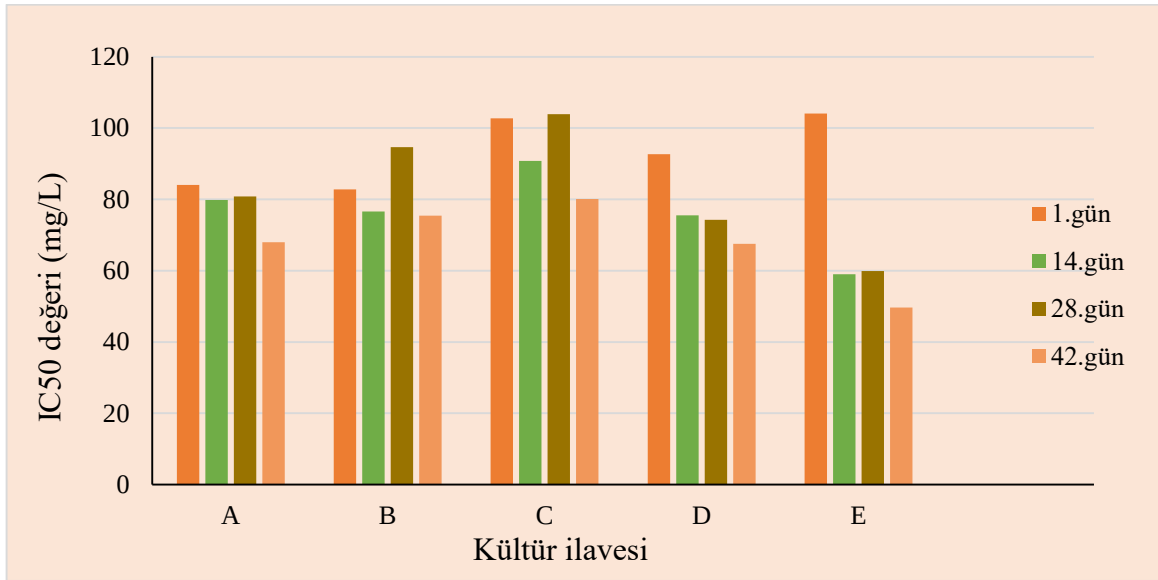
*(p<0,05) düzeyinde önemli; ** (p<0,01) düzeyinde önemli

İlgili tablodan görüldüğü üzere en düşük IC50 değeri (49,68 mg/L) depolamanın 42. gününde E örneğinde, en yüksek IC50 değeri (104,06 mg/L) ise depolamanın 1. gününde E örneğinde belirlenmiştir. Benzer olarak *L. acidophilus* L10, *L. casei* L26 ve *B. lactis* B94 probiyotik kültürlerinin kullanıldığı yoğurtlarda ACE inhibitör aktivitesine ait IC50 değerleri 27,79-103,30 µg/mL olarak rapor edilmiştir (Donkor *et al.* 2007). Minervini *et al.* (2003) ise *L. helveticus* PR4 suşundan saflaştırdıkları proteinaz enzimi ile hidrolize ettikleri farklı sütlerde hidrolizasyon sonucu oluşan peptitlerden bazılarının oldukça düşük IC50 değerlerine sahip olduğunu ve bu değerlerin 16-100 µg/mL arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Tablo 34 incelendiğinde IC50 değerleri açısından fermente süt örnekleri arasında istatistiksel olarak farklılıkların bulunduğu görülmektedir. Diğer örneklerle kıyasla daha düşük % ACE inhibitör aktivitesine sahip olan C örneğinde IC50 değerinin daha yüksek olduğu, % ACE inhibitör aktivitesinin daha yüksek olduğu E örneğinde ise IC50 değerlerinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Depolama süresince B ve C örneklerinin % ACE inhibisyon aktivitesinde meydana gelen artış/azalışlar IC50 değerlerine de yansımış ve bu örneklerin IC50 değerlerinde dalgalanmalar görülmüştür. Mevcut sonuçlardan özellikle *L. helveticus* DPC 4571 ve *L. casei* ATCC 334 suşlarının bir arada kullanımının tek başlarına kullanımına oranla ACE inhibitörü peptitlerin oluşumunu arttırdığı söylenebilir.

Fermente süt örneklerinden ekstrakte edilen peptitlerin IC50 değerlerinin depolamanın ilk 14 gününde tüm örneklerde % ACE inhibitör aktivitesinin artmasına bağlı

olarak azaldığı, 28. günde genel olarak bir miktar artış gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte depolama sonunda tüm örneklerin IC50 değerlerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum depolama sonunda ACE inhibitör aktivitesine sahip yeni peptitlerin oluştuğuna dair bir gösterge olarak kabul edilebilir. Abdel-Hamid *et al.* (2019) *L. casei* ATCC 393 suşu ile ürettikleri fermente sütlerde 42,78-52,28 µg/mL arasında tespit ettikleri IC50 değerlerinin 21 günlük depolama boyunca azaldığını bildirmişlerdir. Donkor *et al.* (2007) ise probiyotik kültür içeren yoğurtlarda 28 günlük depolama boyunca IC50 değerlerinde artış ve azalışlar meydana geldiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca probiyotik kültür içermeyen kontrol yoğurdunda da ACE inhibitör aktivitenin bulunduğunu, ancak IC50 değerinin probiyotik yoğurtlara göre önemli ölçüde yüksek olduğunu ifade etmişlerdir.



Şekil 20. Peptid ekstraktlarının ACE inhibitör aktivitesine ait IC50 değerleri üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksiyonunun etkisi

Şekil 21’de görüldüğü üzere B ve C örneklerinin IC50 değerlerinde depolama süresince artış/azalışların olduğu, ancak IC50 değerlerinin depolamanın başlangıcına göre azaldığı belirlenmiştir. A, D ve E örneklerinin IC50 değerlerinde ise depolama boyunca azalma olduğu söylenebilir. Özellikle E örneğinin 14. gününe ait IC50 değerinde keskin bir düşüş olduğu gözlenmiştir. En düşük IC50 değeri dolayısıyla en yüksek ACE inhibitör aktivitesi ise E örneğinde depolamanın 42. gününde elde edilmiştir.

Antioksidan aktivite

Süt proteinlerinin hidrolizi sonucu açığa çıkan peptidlerin lipid veya yağ asitlerinin peroksidasyonuna karşı antioksidatif aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Kazein ve serum proteini fragmentlerinin serbest radikalleri giderme ve metalleri bağlama özellikleri ile

oksidasyon zincir reaksiyonunu engellediği, böylece antioksidan aktivite sergilediği ifade edilmektedir (Virtanen *et al.* 2007; Sultan *et al.* 2017). Antioksidan aktivitenin değerlendirilmesinde substrat olarak DPPH, ABTS gibi kararlı serbest radikaller yaygın bir şekilde kullanılmakta ve peptidlerin bu radikalleri giderme derecesi ile antioksidan aktivitesi tayin edilmektedir (Li *et al.* 2013a).

Peptitlerin antioksidan aktivitesi (% inhibisyon)

Fermente süt örneklerinden ekstrakte edilen peptitlerin antioksidan aktiviteleri DPPH serbest radikalini giderme aktivitesi ile belirlenmiş, sonuçlar % inhibisyon ve IC50 (mg/mL) değerleri olarak verilmiştir. Peptid ekstraktlarının DPPH radikalini giderme etkisi (% inhibisyon) değerleri standart sapmaları ile birlikte Tablo 36’da, varyans analizi test sonuçları ise Tablo 37’de sunulmuştur. Varyans analizi test sonuçlarından kültür ilavesi ve depolama süresinin % inhibisyon değerleri üzerindeki etkisi $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunurken, kültür ilavesi x depolama süresi interaksiyonunun etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 36. Peptid Ekstraktlarında Depolama Boyunca Belirlenen DPPH Radikalini Giderme Aktivitesi (% inhibisyon)

Örnekler	Depolama Süresi (Gün)			
	1	14	28	42
A	22,43±1,05 ^{b,B}	26,00±1,73 ^{a,A}	21,61±0,80 ^{a,B}	22,80±2,87 ^{abc,B}
B	23,99±1,22 ^{ab,AB}	25,09±3,58 ^{a,A}	21,42±1,11 ^{a,B}	23,42±0,59 ^{ab,AB}
C	23,84±1,04 ^{ab,A}	23,89±1,85 ^{a,A}	18,75±1,43 ^{b,C}	21,16±0,95 ^{bc,B}
D	25,02±1,22 ^{a,A}	25,47±0,79 ^{a,A}	23,50±2,92 ^{a,AB}	20,96±1,02 ^{c,B}
E	24,47±1,97 ^{ab,B}	26,63±1,00 ^{a,A}	22,80±0,34 ^{a,B}	24,31±0,91 ^{a,B}

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

Tablo 37. Peptid Ekstraktlarının DPPH Radikalini Giderme Aktivitesine (%) Ait Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	F	P
Kültür ilavesi (A)	4	5,47	0,00**
Depolama süresi (B)	3	20,48	0,00**
AxB	12	1,82	0,06
Hata	60		
Genel	80		

*($p<0,05$) düzeyinde önemli; ** ($p<0,01$) düzeyinde önemli

En düşük % inhibisyon değeri (%18,75) depolamanın 28. gününde C örneğinde, en yüksek % inhibisyon değeri ise (%26,63) depolamanın 14. gününde E örneğinde tespit edilmiştir. *L. brevis* ATCC 14869 ve *L. brevis* KU200019 suşlarının yoğurt üretiminde

kullanıldığı bir çalışmada 21 günlük depolama boyunca yoğurt örneklerinin antioksidan aktivitesi ölçülmüş, örneklerin depolama sonundaki antioksidan aktivitesi DPPH ve ABTS yöntemleri ile sırasıyla %30,75-32,32 ve %40,25-46,43 aralığında belirlenmiştir (Kariyawasam *et al.* 2021). Şanlıdere Aloğlu and Öner (2011) geleneksel ve ticari yoğurt örneklerinde peptid ekstraktlarının DPPH giderme aktivitesinin %15,96-31,22 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada ise *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG KCTC 12202 BP, *Lactiplantibacillus plantarum* (KU15003, KU15031, NK181) ve *L. delbrueckii* KU200171 suşları kullanılarak üretilen fonksiyonel yoğurt örneklerinin DPPH ve ABTS yöntemi ile analiz edilen antioksidan aktiviteleri sırasıyla %71,33-86,49 ve %38,00-39,31 aralığında tespit edilmiştir (Kim *et al.* 2021). Antioksidan aktiviteye ait araştırma sonuçlarının farklılık arz ettiği, söz konusu farklılıkların özellikle kullanılan LAB'ların türüne bağlı olabileceği düşünülmektedir. Yoğurt ve benzeri fermente sütlerde antioksidatif peptid üretiminin LAB türleri arasında farklılık gösterebileceği, dolayısıyla suş seçimine bağlı olduğu başka araştırmacılar tarafından da ifade edilmiştir (Aguilar-Toalá *et al.* 2017; Shori *et al.* 2022a). Nitekim bir çalışmada 25 farklı LAB suşu ile fermente edilen sütlerde antioksidan aktivitenin %3-53 arasında değiştiği, en yüksek antioksidan aktivitenin ise *Leu. mesenteroides* ssp. *cremoris* (A, B), *L. jensenii* ATCC 25258 ve *L. acidophilus* ATCC 4356 suşlarının bulunduğu örneklerde tespit edildiği bildirilmiştir (Virtanen *et al.* 2007).

Tablo 36 incelendiğinde fermente süt örneklerinin antioksidan aktivitelerine ilişkin % inhibisyon değerleri arasında çok büyük farklılıkların bulunmadığı, bununla birlikte özellikle en yüksek değerlerin depolamanın 14. ve 42. günlerinde E örneğinde belirlendiği görülmektedir. Depolama süresince % inhibisyon değerlerinin tüm örneklerde 14. güne kadar artış gösterdiği, 28. günde azaldığı, 42. günde ise D örneği dışında diğer örneklerde yeniden arttığı tespit edilmiştir. Bu dalgalanmaların depolama süresince bir yandan peptitlerin amino asitlere parçalanması ile diğer yandan yeni peptitlerin oluşumuna paralel olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. De Lima *et al.* (2018) koyun sütünden ürettikleri kefir örneklerinde antioksidan aktiviteye ait en yüksek değerlerin 28. günde elde edildiğini bildirmişlerdir. Elfahri *et al.* (2014) farklı *L. helveticus* suşları (Lh 474, Lh 1188, Lh 1315) ile fermente edilen sütün fermantasyonu boyunca antioksidan aktivitesinin arttığını rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise *L. rhamnosus*, *L. casei* ve *L. plantarum* suşları ile üretilen yoğurtların 28 günlük depolama boyunca antioksidan aktivitelerinde artış ve azalışların olduğu belirtilmiştir (Shori *et al.* 2022a). Sultan *et al.* (2017) inek, koyun, keçi ve bufalo yoğurtlarında depolamanın 10. gününden sonra antioksidan aktivitenin azaldığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu azalmanın antioksidan özelliğe sahip bileşenlerin modifikasyonu veya degradasyonundan kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir.

Peptitlerin antioksidan aktivitesi (IC50)

Fermente süt örneklerinden elde edilen peptid ekstraktlarının antioksidan aktivitelerine ait IC50 değerlerinde depolama süresince görülen değişimler Tablo 38’de, varyans analizi sonuçları ise Tablo 39’da verilmiştir. İlgili tabloya göre IC50 değeri üzerine depolama süresinin etkisi $p<0,01$ düzeyinde, kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi $p<0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Kültür ilavesinin etkisi ise istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$). Peptid ekstraktlarının IC50 değerlerine ait kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi Şekil 22’de sunulmuştur.

En düşük IC50 değeri (8,02 mg/mL) depolamanın 14. gününde E örneğinde, en yüksek IC50 değeri (11,41 mg/mL) ise depolamanın 28. gününde C örneğinde tespit edilmiştir. Kim *et al.* (2021) kontrol yoğurdu ile *L. rhamnosus* GG KCTC 12202 BP, *L. plantarum* KU15003, *L. plantarum* KU15031, *L. plantarum* NK181, *L. delbrueckii* KU200171 probiyotik suşlarının kullanıldığı yoğurtlarda DPPH giderme aktivitesine ait IC50 değerlerinin 0,28-0,38 mg/mL arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Sah *et al.* (2014) *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. casei* ATCC 393 ve *L. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC BAA52 suşlarının bulunduğu yoğurt örneklerinde IC50 değerlerini 1,51-2,23 mg/mL arasında rapor etmişlerdir.

Tablo 38. Peptid Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerine Ait IC50 Değerleri (mg/mL)

Örnekler	Depolama Süresi (Gün)			
	1	14	28	42
A	9,40±0,25 ^{a,B}	8,28±0,20 ^{ab,C}	10,42±0,93 ^{ab,A}	9,94±0,52 ^{b,AB}
B	9,29±0,30 ^{a,B}	9,00±0,87 ^{ab,B}	10,86±0,86 ^{ab,A}	9,55±0,47 ^{b,B}
C	9,17±0,26 ^{a,B}	9,26±0,77 ^{a,B}	11,41±2,03 ^{a,A}	10,21±0,67 ^{ab,AB}
D	8,87±0,58 ^{a,B}	8,71±1,09 ^{ab,B}	9,58±0,11 ^{b,B}	10,96±0,08 ^{a,A}
E	9,01±0,56 ^{a,B}	8,02±0,41 ^{b,C}	10,88±0,12 ^{ab,A}	9,46±0,63 ^{b,B}

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

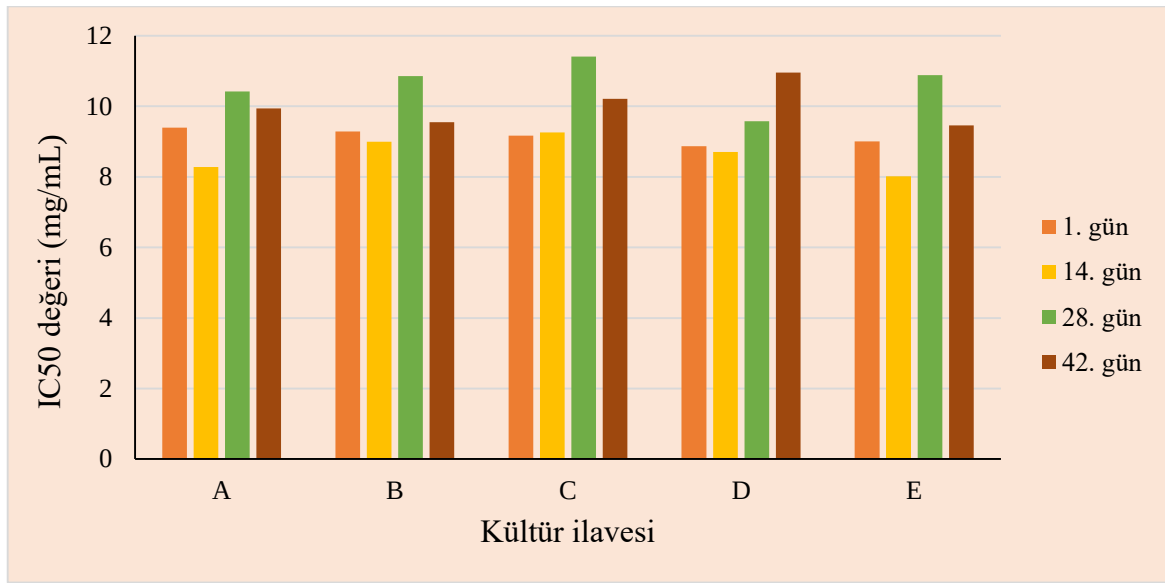
Tablo 39. Peptid Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerine Ait IC50 Değerlerinin Varyans Analizi Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	F	P
Kültür ilavesi (A)	4	1,89	0,12
Depolama süresi (B)	3	28,87	0,00**
AxB	12	2,16	0,02*
Hata	60		
Genel	80		

*($p<0,05$) düzeyinde önemli; ** ($p<0,01$) düzeyinde önemli

Peptid ekstraktlarının antioksidan aktivitesine ait IC50 değerleri açısından örnekler arasında depolamanın 1. gününde farklılık olmadığı, depolamanın ilerleyen günlerinde istatistiksel olarak bazı farklılıklar olduğu tespit edilmiştir (Tablo 38). Depolama süresince

ise IC50 değerlerinde % inhibisyona bağlı olarak dalgalanmalar meydana geldiği gözlenmiştir. Depolamanın 14. gününde IC50 değerleri genel olarak azalırken, 28. günde artış göstermiş ve bu artış D örneği dışındaki diğer örneklerde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Depolamanın son gününde ise söz konusu parametrenin D örneği dışında diğer örneklerde istatistiksel olarak önemli oranda azaldığı belirlenmiştir. Antioksidan aktiviteyi ifade eden IC50 değerleri ile % inhibisyon arasında negatif bir korelasyon olduğu bilinmektedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde E örneğinin 14. gününe ait en düşük IC50 değeri, bu örneğin daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Abdel-Hamid *et al.* (2019) *L. casei* ATCC 393 suşu ile ürettikleri fermente süt örneklerinde IC50 değerlerinin depolama boyunca azaldığını, dolayısıyla antioksidan aktivitenin arttığını belirtmişlerdir.



Şekil 21. Peptid ekstraktlarının antioksidan aktivitelerine ait IC50 değerleri üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksiyonunun etkisi

Şekil 22 incelendiğinde genel olarak fermente süt örneklerinin IC50 değerlerinin depolamanın 14. gününde azaldığı, 28. günde tekrar artış gösterdiği, depolamanın son gününde ise D örneği dışında diğer tüm örneklerde yeniden azaldığı görülmektedir.

Antimikrobiyal aktivite

Sütün sindirim proteazları tarafından hidrolizi ya da proteolitik LAB suşları ile fermentasyonu sonucunda kazein veya serum proteinlerinden antimikrobiyal özelliğe sahip peptitlerin oluştuğu bilinmektedir. Antimikrobiyal peptitlerin bakterilerdeki plazma zarı ve hücre içi hedeflere hızlı bir şekilde etki ettiği böylece, çoğu Gram (-) ve Gram (+) bakterilerin, ayrıca maya ve küflerin inhibisyonunda etkili oldukları belirtilmiştir (Akalin 2014). Söz konusu peptitlerin antibiyotiklere dirençli bakterilere karşı da güçlü aktiviteye sahip olduğu ve antibiyotik ilaçlara alternatif olarak kullanılabileceği öne sürülmektedir (Zhang *et al.* 2021).

Peptid ekstraktlarının *S. aureus* ATCC 29213'e karşı inhibisyonu

Fermente süt örneklerinden elde edilen peptid ekstraktlarının *S. aureus* ATCC 29213'e karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite % inhibisyon değerleri olarak belirlenmiş, standart sapmaları ile birlikte Tablo 40'da verilmiştir. Peptid ekstraktlarının *S. aureus* ATCC 29213'e karşı inhibisyon değerlerine ait varyans analizi sonuçları ise Tablo 41'de sunulmuştur. İlgili tabloya göre inhibisyon değeri üzerine kültür ilavesi, depolama süresi ile kültür ilavesi x depolama süresi interaksiyonunun etkisi $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

En düşük inhibisyon değeri (%-15,55) depolamanın 1. gününde A örneğinde, en yüksek inhibisyon değeri (%22,63) ise depolamanın 14. gününde E örneğinde tespit edilmiştir. *L. acidophilus* IIA-2B4 suşu ve *Hibiscus sabdariffa* ekstraktının kullanıldığı keçi yoğurdu örneklerinin antimikrobiyal aktivitelerinin kuyu difüzyon yöntemi ile belirlendiği bir çalışmada *S. aureus*'a karşı inhibisyon değerlerinin 7,45-19,98 mm olduğu bildirilmiştir (Hanifah *et al.* 2016). Azizkhani *et al.* (2021) tarafından yapılan bir çalışmada ise farklı sütlerden üretilen kefir ve yoğurtların antimikrobiyal aktiviteleri kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmiş ve *S. aureus* inhibisyon değerlerinin 17,9-61,5 mm arasında değiştiği rapor edilmiştir.

Tablo 40. Peptid Ekstraktlarının *S. aureus* ATCC 29213'e Karşı Depolama Boyunca Gösterdiği İnhibisyon Değerleri (%)

Örnekler	Depolama Süresi (Gün)			
	1	14	28	42
A	-15,55±7,48 ^{d,B}	10,04±3,28 ^{c,A}	3,27±5,61 ^{c,A}	8,68±2,86 ^{b,A}
B	2,75±2,13 ^{bc,C}	19,38±2,67 ^{a,AB}	14,50±5,39 ^{ab,B}	21,36±2,68 ^{a,A}
C	7,33±2,88 ^{ab,B}	16,89±4,58 ^{ab,A}	19,38±3,26 ^{a,A}	20,29±4,34 ^{a,A}
D	11,99±4,59 ^{a,B}	13,02±1,80 ^{bc,B}	9,88±0,65 ^{bc,B}	19,97±1,43 ^{a,A}
E	-3,34±1,73 ^{c,B}	22,63±6,05 ^{a,A}	19,06±5,84 ^{a,A}	17,90±7,73 ^{a,A}

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

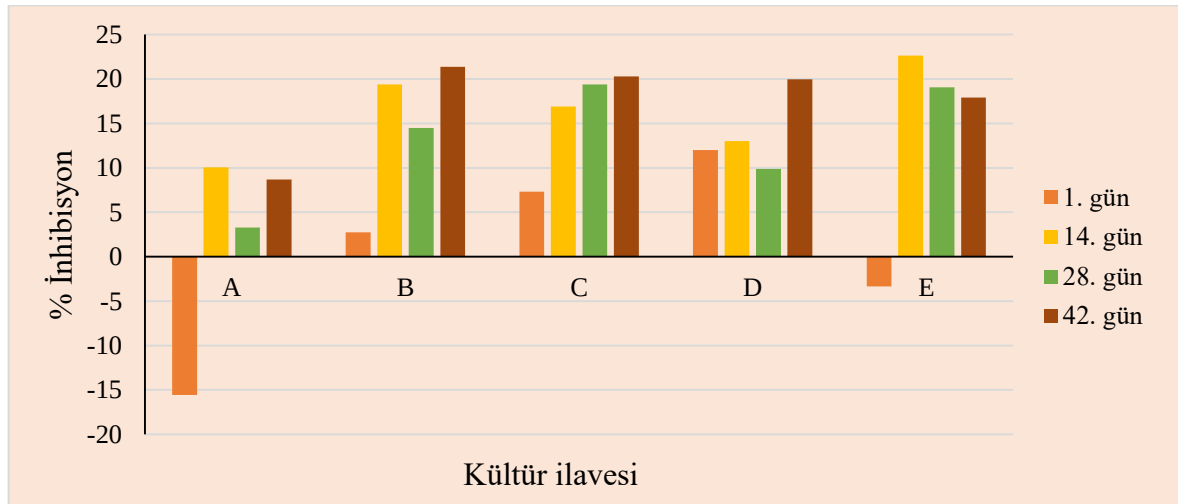
Tablo 41. Peptid Ekstraktlarının *S. aureus* ATCC 29213'e Karşı Belirlenen İnhibisyon Değerlerine Ait Varyans Analizi Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	F	P
Kültür ilavesi (A)	4	29,35	0,00**
Depolama süresi (B)	3	64,82	0,00**
AxB	12	5,30	0,00**
Hata	60		
Genel	80		

*($p<0,05$) düzeyinde önemli; ** ($p<0,01$) düzeyinde önemli

S. aureus ATCC 29213'ün inhibisyonu açısından özellikle depolamanın 1. gününde örnekler arasında belirgin farklılıklar göze çarpmaktadır (Tablo 40). A ve E örneklerinin *S. aureus* ATCC 29213'e karşı % inhibisyon değerleri depolamanın 1. gününde negatif iken,

depolamanın ilerleyen günlerinde bu değerlerin pozitif olduğu ve önemli derecede arttığı görülmektedir. Bu durumun fermente süt örneklerinin üretiminde kullanılan kültür kombinasyonlarının farklı olmasından, dolayısıyla fermentasyon aşamasından başlayarak depolama süresince farklı çeşit ve sayıda peptid oluşumuna katkıda bulunmuş olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Depolama süresince tüm örneklerin *S. aureus* ATCC 29213'e karşı % inhibisyon değerlerinde artış ve azalışlar olmakla birlikte, depolamanın 42. gününde bu değerlerin 1. güne göre önemli derecede arttığı tespit edilmiştir. De Lima *et al.* (2018) koyun sütünden yapılan kefirde ekstrete edilen peptitlerin depolamanın ilk gününde *S. aureus* ATCC 6538'e karşı inhibitör aktivite göstermediğini, ancak depolamanın 7. gününden 28. gününe kadar inhibisyon elde ettiklerini bildirmişlerdir. Rahmawati and Suntornsuk (2016) farklı sütlerden üretilen yoğurtlarda fermentasyonun ilk 2 saatinde *S. aureus*'a karşı herhangi bir antimikrobiyal aktivitenin görülmediğini, ancak depolama süresince bir inhibisyon olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu durumun ortamdaki laktik asitten kaynaklandığını, ayrıca antimikrobiyal peptid oluşumunun da inhibisyona katkıda bulunabileceğini bildirmişlerdir. Peptid ekstraktlarının *S. aureus* ATCC 29213'e karşı inhibisyon değerlerine ait kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonu Şekil 23'de görülmektedir. Şekil 23 incelendiğinde peptid ekstraktlarının *S. aureus* ATCC 29213'e karşı antimikrobiyal aktivitesinin tüm örneklerde depolamanın 14. gününde arttığı, C örneği dışındaki örneklerde ise depolamanın 28. gününde azaldığı görülmektedir. C örneğinin inhibisyon etkisinin depolama boyunca sürekli artış gösterdiği, en yüksek inhibisyon değerinin ise *S. thermophilus* 20S4, *L. helveticus* DPC 4571, *L. casei* ATCC 334 suşlarının bulunduğu E örneğinde elde edildiği belirlenmiştir. Söz konusu örnekte özellikle 14. günde % inhibisyon değerlerinin önemli düzeyde artış (%-3,34'den %22,63'e) gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 22. Peptid ekstraktlarının *S. aureus* ATCC 29213'e karşı gösterdiği inhibisyon değerleri üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi

Peptid ekstraktlarının *L. monocytogenes* ATCC 7644'e karşı inhibisyonu

Fermente süt örneklerinden elde edilen peptid ekstraktlarının *L. monocytogenes* ATCC 7644'e karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitenin (% inhibisyon) depolama süresinceki değişimi standart sapmaları ile birlikte Tablo 42'de, varyans analizi sonuçları ise Tablo 43'de verilmiştir. İnhibisyon değeri üzerine kültür ilavesi, depolama süresi ile kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. *L. monocytogenes* ATCC 7644'ye karşı en düşük inhibisyon değeri (%-3,32) depolamanın 1. gününde D örneğinde, en yüksek inhibisyon değeri (%14,98) ise depolamanın 42. gününde E örneğinde tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada sığır kazeininin bazı proteolitik enzimlerle muamelesi sonucu Cp1 ve Cp2 olarak isimlendirilen iki farklı antibakteriyel peptid tanımlanmış, söz konusu peptitlerin *L. monocytogenes* suşlarına karşı minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) değerleri sırasıyla 125 µg /mL ve 21 µg /mL olarak belirlenmiştir (McCann *et al.* 2006). Wakabayashi *et al.* (1992) tarafından yapılan bir çalışmada ise inek sütünden izole edilen ve antimikrobiyal bir peptid olan Laktoferrisin'in dört farklı *L. monocytogenes* suşunda (IDF-lb, JCM-7672, JCM-7673 ve JCM-7674) da inhibisyon etkisi gösterdiği belirtilmiştir.

Tablo 42. Peptid Ekstraktlarının *L. monocytogenes* ATCC 7644'e Karşı Depolama Boyunca Gösterdiği İnhibisyon Değerleri (%)

Örnekler	Depolama Süresi (Gün)			
	1	14	28	42
A	-2,42±0,15 ^{c,B}	0,99±0,98 ^{d,B}	9,13±4,44 ^{a,A}	6,47±2,72 ^{c,A}
B	12,30±1,99 ^{a,A}	4,75±1,28 ^{c,C}	9,98±4,87 ^{a,AB}	7,00±1,66 ^{c,BC}
C	2,75±1,09 ^{b,B}	4,31±0,99 ^{c,B}	8,78±2,59 ^{a,A}	10,43±2,00 ^{b,A}
D	-3,32±4,36 ^{c,C}	7,19±1,82 ^{b,B}	9,45±2,08 ^{a,AB}	12,17±1,26 ^{ab,A}
E	11,26±1,03 ^{a,AB}	13,21±2,00 ^{a,A}	9,03±3,53 ^{a,B}	14,98±2,44 ^{a,A}

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

Fermente süt örneklerinden ekstrakte edilen peptitlerin *L. monocytogenes* ATCC 7644'e karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite açısından örnekler arasında farklılıkların bulunduğu tespit edilmiştir. Depolamanın 1. gününde A ve D örneklerinde herhangi bir inhibisyon olmamakla birlikte, depolama ilerledikçe inhibisyonun gerçekleştiği ve genel olarak artış gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 42). Benzer olarak inhibisyon değerlerinin C ve D örneklerinde depolama boyunca artış gösterdiği, en yüksek değerlere depolamanın 42. gününde ulaşıldığı tespit edilmiştir. Diğer örneklerin inhibisyon değerlerinde ise artış ve azalışlar olduğu saptanmıştır. Depolama boyunca LAB suşlarının proteolitik aktiviteleri sonucu antimikrobiyal peptitlerin oluşumuna katkı sağladığı, bu sayede inhibisyon değerlerinin arttığı düşünülmektedir. Aynı zamanda oluşan peptitlerin amino asitlere dönüşümü de depolama

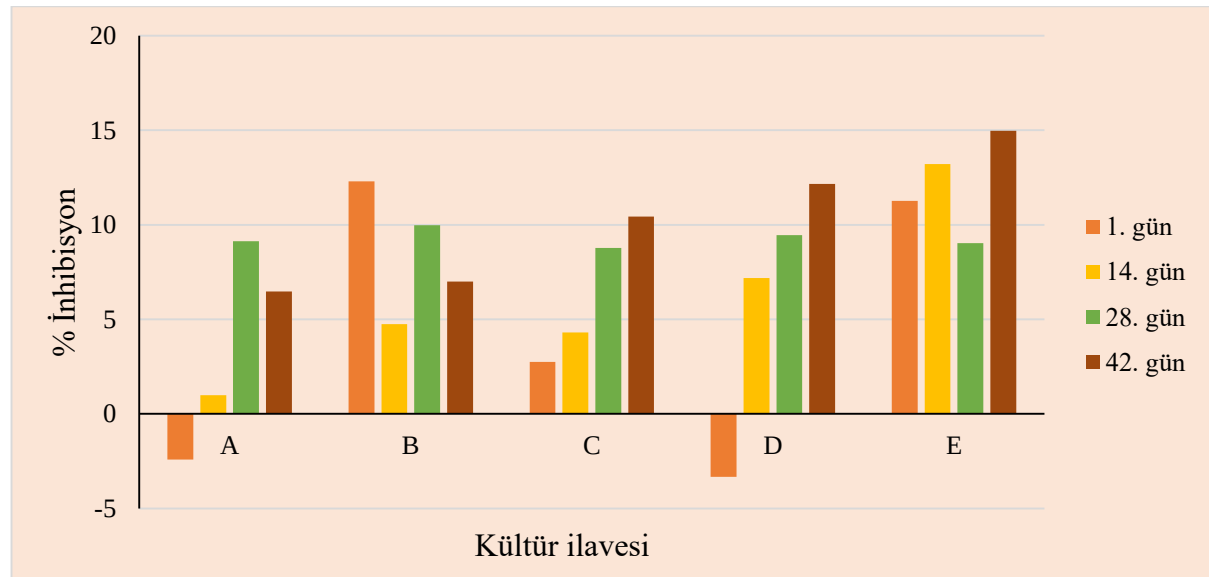
süresince görülen azalmanın nedeni olarak düşünülebilir. Benzer şekilde ileri derecede proteolizin antimikrobiyal peptitlerin parçalanmasına ve aktivite kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Rana *et al.* 2018). Yapılan başka bir çalışmada farklı sütlerden üretilen yoğurt ve kefir örneklerinin tümünde *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal aktivitenin depolama süresince arttığı bildirilmiştir (Azizkhani *et al.* 2021).

Tablo 43. Peptid Ekstraktlarının *L. monocytogenes* ATCC 7644'e Karşı Belirlenen İnhibisyon Değerlerine Ait Varyans Analizi Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	F	P
Kültür ilavesi (A)	4	25,68	0,00**
Depolama süresi (B)	3	25,54	0,00**
AxB	12	10,25	0,00**
Hata	60		
Genel	80		

*(p<0,05) düzeyinde önemli; ** (p<0,01) düzeyinde önemli

Peptid ekstraktlarının *L. monocytogenes* ATCC 7644'e karşı gösterdiği inhibisyon değerlerine ait kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonu Şekil 24'de sunulmuştur. İlgili şekilde görüldüğü üzere peptid ekstraktlarının *L. monocytogenes* ATCC 7644'e karşı inhibitör aktivitesi depolama boyunca C ve D örneklerinde artmış, diğer örneklerde ise artış/azalışlar meydana gelmiştir. *L. monocytogenes* ATCC 7644'e ait en yüksek inhibisyon değerleri *S. thermophilus* 20S4, *L. helveticus* DPC 4571, *L. casei* ATCC 334 suşlarının birlikte kullanıldığı E örneğinde tespit edilmiştir.



Şekil 23. Peptid ekstraktlarının *L. monocytogenes* ATCC 7644'e karşı gösterdiği inhibisyon değerleri üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi

Peptid ekstraktlarının *B. cereus* BC 6230'a karşı inhibisyonu

Fermente süt örneklerinden elde edilen peptid ekstraktlarının *B. cereus* BC 6230'a karşı depolama boyunca gösterdiği inhibisyon değerleri (%) standart sapmaları ile birlikte Tablo 44'de, varyans analizi sonuçları ise Tablo 45'de verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarından inhibisyon değeri üzerine kültür ilavesi, depolama süresi ile kültür ilavesi x depolama süresi interaksiyonunun etkisi $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Tablo 44. Peptid Ekstraktlarının *B. cereus* BC 6230'a Karşı Depolama Boyunca Gösterdiği İnhibisyon Değerleri (%)

Örnekler	Depolama Süresi (Gün)			
	1	14	28	42
A	-23,05±1,51 ^{c,B}	-6,09±1,37 ^{c,A}	-5,90±0,80 ^{d,A}	-5,02±0,60 ^{b,A}
B	-5,90±2,30 ^{a,C}	-2,51±0,57 ^{bc,B}	2,77±1,98 ^{a,A}	1,01±0,98 ^{a,A}
C	-15,22±5,19 ^{b,B}	-13,39±5,22 ^{d,B}	-3,82±0,96 ^{c,A}	-6,93±2,05 ^{b,A}
D	-5,18±2,53 ^{a,B}	0,76±1,45 ^{ab,A}	0,12±1,44 ^{b,A}	0,33±1,19 ^{a,A}
E	-0,90±4,51 ^{a,A}	2,89±1,91 ^{a,A}	2,28±0,68 ^{a,A}	1,84±1,78 ^{a,A}

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0,05$ düzeyinde farklıdır.

Tablo 45. Peptid Ekstraktlarının *B. cereus* BC 6230'a Karşı Belirlenen İnhibisyon Değerlerine Ait Varyans Analizi Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	F	P
Kültür ilavesi (A)	4	82,07	0,00**
Depolama süresi (B)	3	59,49	0,00**
AxB	12	7,72	0,00**
Hata	60		
Genel	80		

*($p<0,05$) düzeyinde önemli; ** ($p<0,01$) düzeyinde önemli

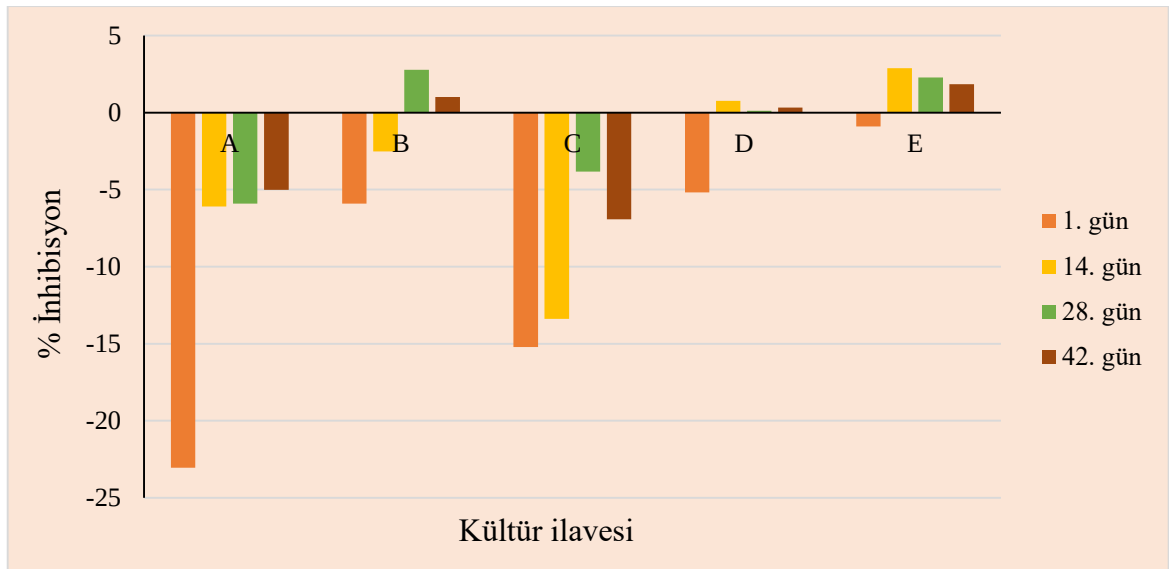
En düşük inhibisyon değeri (%-23,05) depolamanın 1. gününde A örneğinde, en yüksek inhibisyon değeri (%2,89) ise depolamanın 14. gününde E örneğinde tespit edilmiştir. Hanifah *et al.* (2016) *L. acidophilus* IIA-2B4 suşu ve *Hibiscus sabdariffa* ekstraktının bulunduğu keçi yoğurdu örneklerinin *B. cereus* üzerindeki inhibisyon değerlerinin 9,94 mm-14,75 mm arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar yoğurt örneklerindeki antimikrobiyal aktivitenin fermentasyon sırasında proteoliz yoluyla oluşan peptitlerden kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir. Alhaj *et al.* (2018) ise *L. acidophilus*, *S. thermophilus* ve *L. helveticus* suşları ile fermente ettikleri deve sütünde depolama boyunca *B. cereus*'a ait inhibisyon değerlerinin 11-16 mm olduğunu bildirmişlerdir.

Peptid ekstraktlarının *B. cereus* BC 6230'a karşı belirlenen inhibisyon değerlerinin büyük oranda negatif değerlerden oluştuğu tespit edilmiştir (Tablo 44). Bu durum peptitlerin *B. cereus* BC 6230 üzerinde önemli düzeyde antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığını, tersine

söz konusu bakterinin gelişimine katkı sağladığını göstermektedir. Çeşitli araştırmalarda *B. cereus* suşlarının proteaz enzimi ürettiği ve yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Montanhini *et al.* 2013; Yang *et al.* 2021). Nitekim *B. cereus* suşlarının alkali proteaz üretimi için dünya çapında ticari bir kaynak olduğu da ifade edilmektedir (Nabrdalik *et al.* 2010). Dolayısıyla *B. cereus* BC 6230'un proteolitik aktivitesinden dolayı fermente sütlerden ekstrakte edilen antimikrobiyal özellikteki peptitleri parçaladığı, bu yüzden söz konusu suşda bir inhibisyon meydana gelmediği düşünülmektedir. Ancak Tablo 44 incelendiğinde, tüm örneklerde depolama ilerledikçe negatif olan inhibisyon değerlerinin arttığı, özellikle B, D ve E örneklerinde bu değerlerin pozitif değerlere ulaştığı, düşük düzeyde de olsa antimikrobiyal etki gösterdiği görülmektedir. Fermente süt örnekleri arasındaki bu farklılıkların söz konusu örneklerin üretiminde proteolitik aktiviteye sahip *L. helveticus* DPC 4571, *L. casei* ATCC 334 suşlarının kullanılmış olması, bu nedenle proteoliz sonucu oluşan peptitlerin *B. cereus* BC 6230'a karşı diğer örneklerle oranla daha fazla antimikrobiyal etki göstermesiyle açıklanabilir. Nitekim bu örneklerdeki peptid sayısı ve konsantrasyonlarının daha yüksek olduğu peptid profillerine ait kromatogramlarda da görülmektedir (Şekil 15-Şekil 18).

Atalay and Şahingil (2022) *L. bulgaricus* ATCC 11842, *L. helveticus* ATCC 15009 ve *L. plantarum* ATCC 14917 suşları ile ürettikleri kefirlerden izole ettikleri peptid fraksiyonunun *B. cereus* RS 863'e karşı antimikrobiyal etki göstermediğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Meira *et al.* (2012) yaptıkları çalışmada peynirden ekstrakte ettikleri peptitlerin *B. cereus* ATCC 9634, *S. aureus* ATCC 1901, *S. enteritidis* ATCC 13076, *E. coli* ATCC 8739 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşlarına karşı antibakteriyel etki göstermediğini rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise *L. acidophilus*, *S. thermophilus* ve *L. helveticus* suşları kullanılarak fermente edilen deve sütü örneklerinin antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiş, *B. cereus*'a karşı inhibisyon değerinin depolamanın 9. gününden itibaren azaldığı belirlenmiştir. Bu azalmanın antimikrobiyal peptitlerin degradasyona uğramasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Alhaj *et al.* 2018).

Peptid ekstraktlarının *B. cereus* BC 6230'a karşı inhibisyon değerlerine ait kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonu Şekil 25'de verilmiştir. Peptid ekstraktlarının *B. cereus* BC 6230'a karşı inhibisyon değerlerinin negatif olduğu, özellikle A ve C örneklerinin söz konusu patojeni inhibe edici etkisinin bulunmadığı söylenebilir. Bununla birlikte depolama boyunca tüm örneklerde inhibisyon değerlerinin arttığı, özellikle 14. günden sonra B, D ve E örneklerinde pozitif değerlere ulaştığı görülmektedir.



Şekil 24. Peptid ekstraktlarının *B. cereus* BC 6230'a karşı gösterdiği inhibisyon değerleri üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksiyonunun etkisi

Peptid ekstraktlarının *S. typhimurium* RSHMB 95091'e karşı inhibisyonu

Fermente süt örneklerinden elde edilen peptid ekstraktlarının *S. typhimurium* RSHMB 95091'e karşı depolama boyunca gösterdiği inhibisyon değerleri (%) standart sapmaları ile birlikte Tablo 46'da, varyans analizi sonuçları ise Tablo 47'de sunulmuştur. İlgili tabloya göre inhibisyon değeri üzerine kültür ilavesi, depolama süresi ile kültür ilavesi x depolama süresi interaksiyonunun etkisi $p < 0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Fermente süt örneklerine ait en düşük inhibisyon değeri (%-6,70) depolamanın 14. gününde C örneğinde, en yüksek inhibisyon değeri (%17,12) ise depolamanın 14. gününde B örneğinde tespit edilmiştir. Aguilar-Toala *et al.* (2017) dört farklı *L. plantarum* suşunun bulunduğu fermente süt örneklerinin *S. typhimurium*'a karşı antimikrobiyal aktivitesinin %23,73-39,42 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada ise inek ve keçi sütünden üretilen yoğurt örneklerinin *S. typhimurium*'a karşı antimikrobiyal etki gösterdiği, buna karşılık bufalo sütünden üretilen yoğurtlarda ise söz konusu bakteriye karşı herhangi bir antimikrobiyal aktivite bulunmadığı belirtilmiştir (Rahmawati and Suntornsuk 2016).

Tablo 46. Peptid Ekstraktlarının *S. typhimurium* RSHMB 95091'e Karşı Depolama Boyunca Gösterdiği İnhibisyon Değerleri (%)

Örnekler	Depolama Süresi (Gün)			
	1	14	28	42
A	10,86±2,46 ^{b,B}	12,80±1,24 ^{b,AB}	13,93±0,48 ^{a,A}	14,47±1,38 ^{a,A}
B	15,14±1,03 ^{a,A}	17,12±1,45 ^{a,A}	14,79±3,33 ^{a,A}	13,91±1,50 ^{a,A}
C	-6,30±2,41 ^{d,B}	-6,70±1,54 ^{d,B}	5,25±1,47 ^{c,A}	7,76±2,61 ^{b,A}
D	7,94±1,15 ^{c,C}	11,78±1,59 ^{bc,AB}	9,78±2,03 ^{b,BC}	12,76±0,94 ^{a,A}
E	5,34±2,11 ^{c,C}	10,32±1,39 ^{c,B}	9,34±1,92 ^{b,B}	15,13±2,12 ^{a,A}

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p < 0,05$ düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p < 0,05$ düzeyinde farklıdır.

Tablo 47. Peptid Ekstraktlarının *S. typhimurium* RSHMB 95091'e Karşı Belirlenen İnhibisyon Değerlerine Ait Varyans Analizi Sonuçları

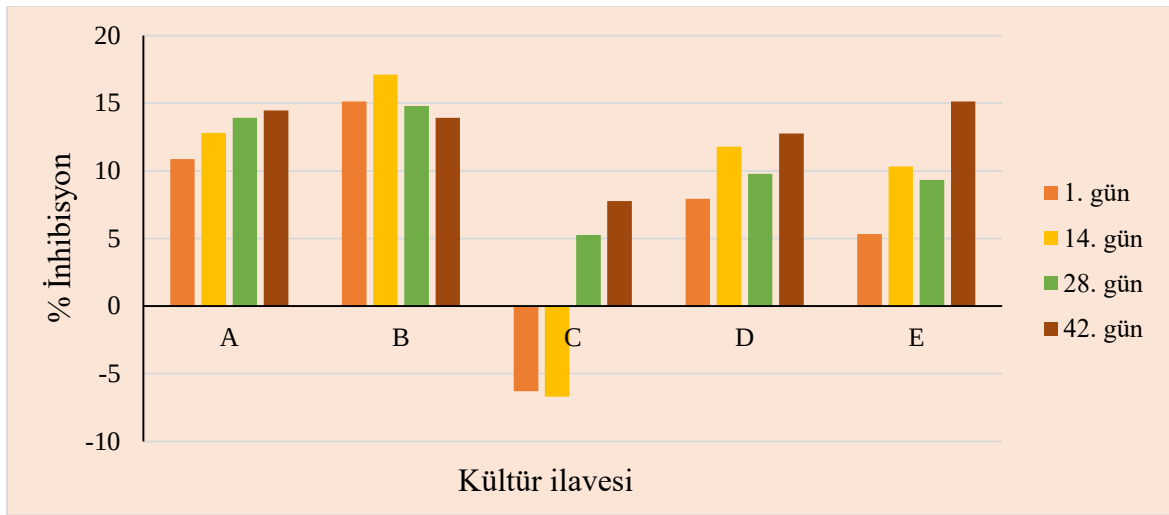
Varyasyon Kaynağı	SD	F	P
Kültür ilavesi (A)	4	162,95	0,00**
Depolama süresi (B)	3	40,77	0,00**
AxB	12	14,46	0,00**
Hata	60		
Genel	80		

*(p<0,05) düzeyinde önemli; ** (p<0,01) düzeyinde önemli

Tablo 46'da görüldüğü üzere fermente süt örneklerinden ekstrakte edilen peptitler *S. typhimurium* RSHMB 95091'e karşı az da olsa inhibisyon etki göstermiştir. Örnekler içerisinde *S. typhimurium* RSHMB 95091'e karşı en düşük antimikrobiyal aktivite C örneğinde belirlenmiştir. A ve C örneklerinin inhibisyon değerlerinin depolama boyunca arttığı, D ve E örneklerinin inhibisyon değerlerinin depolamanın 28. gününde azaldığı, ancak 42. günde artarak en yüksek değerlere ulaştığı görülmektedir. B örneğinin inhibisyon değerlerinde ise depolamanın 28. ve 42. günlerinde bir azalma olduğu, bu azalmanı istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir.

McCann *et al.* (2006) sığır kazeininin proteolitik enzimlerle hidrolizi sonucu elde ettikleri f (99-109) peptid fraksiyonunun *S. enteritidis* ve *S. typhimurium* suşlarına karşı inhibitör aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Farklı sütlere ait kazeinlerden hidrolize edilen fraksiyonların Gram (-) ve Gram (+) bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesinin test edildiği bir çalışmada ise *Salmonella* spp. suşuna karşı inhibisyon zonu elde edildiği bildirilmiştir (Minervini *et al.* 2003).

Peptid ekstraktlarının *S. typhimurium* RSHMB 95091'e karşı inhibisyon değerlerine ait kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonu Şekil 26'da verilmiştir. Sadece *S. thermophilus* 20S4 ve *L. plantarum* 156 suşları ile üretilen C örneğinde negatif olan inhibisyon değerlerinin 14. günden itibaren artarak pozitif değerlere ulaştığı, A örneğinde depolama süresince sürekli bir artış olduğu, B, D, E örneklerinde ise dalgalanmalar olduğu görülmektedir. Söz konusu dalgalanmaların proteoliz sonucu peptid oluşumundan ve daha sonra bu peptitlerin degradasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 25. Peptid ekstraktlarının *S. typhimurium* RSHMB 95091'e karşı gösterdiği inhibisyon değerleri üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksiyonunun etkisi

Peptid ekstraktlarının *E. coli* O157:H7'e karşı inhibisyonu

Fermente süt örneklerinden elde edilen peptid ekstraktlarının *E. coli* O157:H7'e karşı gösterdiği inhibisyon değerlerinde (%) depolama boyunca görülen değişim Tablo 48'de, varyans analizi sonuçları ise Tablo 49'da verilmiştir. Varyans analizi test sonuçlarından inhibisyon değerleri üzerine kültür ilavesi ve kültür ilavesi x depolama süresi interaksiyonunun etkisi $p < 0,01$ düzeyinde, depolama süresinin etkisi ise $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Fermente süt örneklerine ait en düşük inhibisyon değeri (%2,33) depolamanın 1. gününde A örneğinde, en yüksek inhibisyon değeri (%9,09) ise depolamanın 28. gününde E örneğinde tespit edilmiştir. Hanifah *et al.* (2016) yaptıkları çalışmada *L. acidophilus* IIA-2B4 suşu ve *Hibiscus sabdariffa* ekstraktını kullandıkları keçi yoğurdu örneklerinde *E. coli*'ye karşı inhibisyon zon çaplarının 3,17-11,88 mm arasında olduğunu ifade etmişlerdir.

Tablo 48. Peptid Ekstraktlarının *E. coli* O157:H7'e Karşı Depolama Boyunca Gösterdiği İnhibisyon Değerleri (%)

Örnekler	Depolama Süresi (Gün)			
	1	14	28	42
A	2,33±1,18 ^{c,B}	6,39±1,51 ^{b,A}	7,36±0,85 ^{ab,A}	6,73±0,70 ^{b,A}
B	8,66±1,85 ^{a,A}	7,27±1,03 ^{ab,AB}	6,13±1,51 ^{b,B}	6,70±1,03 ^{b,AB}
C	8,13±0,33 ^{a,A}	8,53±0,72 ^{ab,A}	9,06±2,10 ^{a,A}	8,76±2,24 ^{a,A}
D	8,08±1,18 ^{a,A}	6,41±0,88 ^{b,A}	6,91±1,39 ^{ab,A}	7,58±0,93 ^{ab,A}
E	5,05±1,51 ^{b,B}	9,04±2,03 ^{a,A}	9,09±1,40 ^{a,A}	6,75±0,50 ^{b,AB}

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p < 0,05$ düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p < 0,05$ düzeyinde farklıdır.

Tablo 48 incelendiğinde fermente süt örneklerinden ekstrakte edilen peptitlerin *E. coli* O157:H7'e karşı belirli ölçüde inhibitör aktivite sergilediği görülmektedir. Depolama boyunca ise örneklerin inhibisyon değerlerinde artış ve azalışlar olmakla birlikte, C ve D örnekleri

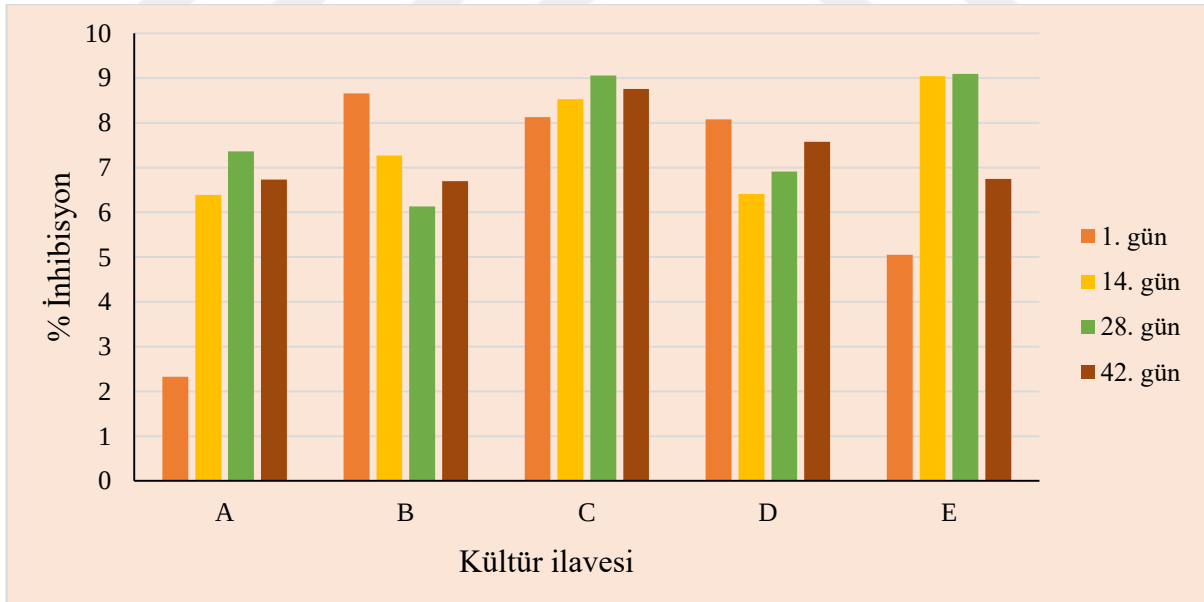
haricindeki diğer örneklerde değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada *E. coli*'nin *L. plantarum* ile fermente edilen deve sütünden ekstrakte edilen peptitlere karşı dirençli olduğu ve sadece bir peptid fraksiyonu tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir (Muhialdin and Alboory 2018). Hayes *et al.* (2006) kazein kaynaklı üç peptid fraksiyonundan ikisinin (f21-29, f30-38) *E. coli* 0157:H7'ye karşı inhibitör aktivite gösterdiğini, diğer fraksiyonun (f195-208) ise herhangi bir antimikrobiyal aktivite sergilemediğini bildirmişlerdir.

Tablo 49. Peptid Ekstraktlarının *E. coli* O157:H7'e Karşı Belirlenen İnhibisyon Değerlerine Ait Varyans Analizi Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	F	P
Kültür ilavesi (A)	4	8,20	0,00**
Depolama süresi (B)	3	2,93	0,04*
AxB	12	4,42	0,00**
Hata	60		
Genel	80		

*(p<0,05) düzeyinde önemli; ** (p<0,01) düzeyinde önemli

Peptid ekstraktlarının *E. coli* O157:H7'e karşı inhibisyon değerlerine ait kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonu Şekil 27'de verilmiştir. Peptid ekstraktlarının *E. coli* O157:H7'e karşı inhibisyon değerlerinde depolama boyunca artış ve azalışların olduğu görülmektedir.



Şekil 26. Peptid ekstraktlarının *E. coli* O157:H7'e karşı gösterdiği inhibisyon değerleri üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi

Fermente Sütlerin Serbest Amino Asit İçeriği

Fermentasyon ve depolama sırasında meydana gelen proteolizin süt ürünlerinin tekstürü, aroması ve lezzetinin oluşmasında önemli bir mekanizma olduğu bilinmektedir.

Proteolizin nihai ürünü olan amino asitler çoğu uçucu aroma bileşeni için öncü madde olarak görev almakta (Irigoyen *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2017b), bununla birlikte gıdanın besinsel kalitesinin değerlendirilmesi açısından da amino asit içeriğinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Aynı zamanda son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda depolama sırasında oluşan serbest amino asitlerin LAB'leri tarafından ikincil katabolik reaksiyonlar ile GABA ve ornitin gibi bileşiklere dönüştürülebileceği bildirilmiştir (Renes *et al.* 2019).

Yoğurt benzeri fermente süt örneklerinde depolama süresince belirlenen serbest amino asit içerikleri standart sapmaları ile birlikte Tablo 50'de, varyans analizi sonuçları ise Tablo 51'de verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarından His, Val, Met, Ileu, Trp dışındaki tüm amino asitlere kültür ilavesinin etkisi $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Depolama süresinin Asp, Glu, Gly, His, Arg, Ala, Val, Met, Cys, Lys amino asitleri üzerine etkisinin $p<0,01$ düzeyinde; Asn, Gln, Tyr, Phe amino asitleri üzerine etkisinin ise $p<0,05$ düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir. Kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi ise His, Pro, Tyr, Cys, Met, Phe amino asitleri üzerine $p<0,01$ düzeyinde; Asp, Ser, Gly, Ala, Ileu amino asitleri üzerine $p<0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Fermente süt örneklerinin tümünde 20 amino asidin de tespit edildiği, His, Arg, Ala ve Pro amino asitlerinin hakim amino asitler olduğu, Thr, Met ve Cys amino asitlerinin ise en düşük konsantrasyonlarda belirlenen amino asitler olduğu tespit edilmiştir. Benzer olarak Farvin *et al.* (2010) Pro, Glu, His, Tyr, Leu ve Val amino asitlerinin yoğurt örneklerinde; Özcan *et al.* (2019) Pro, Met, Leu, Val, His amino asitlerinin buffalo sütünden üretilen kefir örneklerinde baskın amino asitler olduğunu bildirmişlerdir. Farklı starter kültürlerin yoğurt benzeri fermente süt üretiminde kullanıldığı bir çalışmada tüm örneklerde Lys, Met, Ileu, Pro, Glu, Asp, Ala ve Leu amino asitlerinin tespit edildiği rapor edilmiştir (Akabanda *et al.* 2014). *S. thermophilus*, *L. plantarum*, *B. animalis* subsp. *lactis* kültürlerinin fermente süt üretiminde kullanıldığı bir çalışmada ise örneklerin tümünde Pro amino asidinin en yüksek konsantrasyonda belirlenen amino asit olduğu, ayrıca *L. plantarum* suşunu içeren örneklerde Ala konsantrasyonunun depolama boyunca artış gösterdiği bildirilmiştir (Li *et al.* 2019b). Yapılan diğer bir çalışmada inek sütü ve inek sütü kefirinin amino asit profili karşılaştırılmış, inek sütünde düşük konsantrasyonda (0,30 mg/100 mL) bulunan Pro amino asit miktarının kefirde önemli derecede yükseldiği (5,31 mg/100 mL) bildirilmiştir (Gamba *et al.* 2020).

Tablo 50 incelendiğinde amino asit miktarları açısından örnekler arasında istatistiksel olarak bazı farklılıkların bulunduğu görülmektedir. Glu, Gly, Arg, Thr, Ala, Pro, Cys, Leu, Ile, Lys amino asitlerinin *S. thermophilus* 20S4 suşuna ilaveten *L. plantarum* 156, *L. casei* ATCC 334 ve *L. helveticus* DPC 4571 suşlarının bir arada kullanıldığı D örneğinde önemli derecede

yüksek olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda Phe amino asidinin A örneğinde, Gln amino asidinin E örneğinde, Asn amino asidinin ise C örneğinde yüksek konsantrasyonlarda belirlendiği görülmektedir.

Beslenme açısından önem arz eden esansiyel amino asitler (Ileu, Leu, Val, Lys, Met, Thr, Phe, Trp) fermente süt örneklerinin tümünde tespit edilmiş, özellikle çocukluk çağında esansiyel kabul edilen His ve Arg amino asitleri yüksek konsantrasyonlarda belirlenmiştir. Arg amino asidi D örneğinde (12,52 mg/kg), His amino asidi ise E örneğinde (12,00 mg/kg) özellikle depolamanın 42. gününde yüksek konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Depolama süresince Arg miktarının B, C, D, E örneklerinde istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte genel olarak artış gösterdiği; His miktarının ise depolama süresince artış eğiliminde olduğu, özellikle depolamanın 42. gününde örneklerin tümünde istatistiksel olarak önemli derecede arttığı belirlenmiştir.

Benzer şekilde *L. fermentum* 22-16, *L. plantarum* 8-2, *L. helveticus* 22-7 ve *Leu. mesenteroides* 14-11 suşlarının farklı kombinasyonları ile üretilen yoğurt benzeri fermente sütlerde esansiyel amino asitlerin (Lys, Ileu, Leu, His, Val, Thr, Met ve Phe) tüm örneklerde tespit edildiği, Ileu'nin ise en yüksek konsantrasyonda (7,10 mg/L) belirlenen esansiyel amino asidi olduğu ve *L. plantarum* ile *L. helveticus* suşlarının bulunduğu örnekte tespit edildiği bildirilmiştir (Akabanda *et al.* 2014).

Amino asit konsantrasyonlarında depolama süresince görülen değişim incelendiğinde; bazı amino asit (Trp, Phe, Leu, Ileu, Cys, Met, Val, Thr) konsantrasyonlarının depolama süresince önemli bir değişim sergilemediği, buna karşılık diğer amino asitlerin miktarlarında artış ve azalışların meydana geldiği gözlenmiştir. Amino asit konsantrasyonlarında genel olarak çok büyük değişikliklerin olmamasının analiz periyotlarının kısa olmasından veya oluşan amino asitlerin uçucu bileşiklere dönüşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan bir araştırmada farklı LAB kombinasyonlarının bulunduğu yoğurt örneklerinin serbest amino asit konsantrasyonlarında depolama boyunca hafif değişikliklerin meydana geldiği belirtilmiştir (Gu *et al.* 2021).

Tablo 50. Fermente Süt Örneklerinde Belirlenen Serbest Amino Asit Konsantrasyonları (mg/kg)

Amino asit	Dep. Sür. (Gün)	Örnekler				
		A	B	C	D	E
Asp	1	2,75±1,18 ^{a,A}	2,13±0,62 ^{a,AB}	1,79±0,22 ^{c,AB}	2,02±0,53 ^{a,AB}	1,42±0,19 ^{bc,B}
	14	2,16±1,20 ^{a,AB}	2,42±1,02 ^{a,A}	2,80±0,06 ^{b,A}	2,56±0,40 ^{a,A}	1,06±0,11 ^{c,B}
	28	3,05±0,72 ^{a,A}	1,51±0,51 ^{a,B}	2,81±0,36 ^{b,A}	1,89±0,10 ^{a,B}	2,09±0,31 ^{a,B}
	42	3,36±1,08 ^{a,A}	2,66±0,73 ^{a,AB}	3,85±0,81 ^{a,A}	2,70±0,88 ^{a,AB}	1,60±0,36 ^{b,B}
Glu	1	4,83±1,03 ^{a,AB}	4,50±0,44 ^{a,AB}	4,72±1,63 ^{a,AB}	5,58±0,47 ^{a,A}	3,41±0,01 ^{a,B}
	14	2,41±0,72 ^{b,B}	3,16±0,18 ^{b,AB}	2,31±0,59 ^{b,B}	3,98±0,83 ^{b,A}	2,64±0,14 ^{bc,B}
	28	3,18±0,62 ^{b,BC}	3,68±0,73 ^{b,AB}	2,67±0,20 ^{b,C}	4,08±0,59 ^{b,A}	2,50±0,03 ^{c,C}
	42	3,44±0,18 ^{b,BC}	3,60±0,10 ^{b,B}	3,26±0,45 ^{b,BC}	4,23±0,51 ^{b,A}	2,91±0,46 ^{b,C}
Asn	1	4,44±0,46 ^{a,B}	3,78±0,25 ^{a,B}	5,71±1,03 ^{a,A}	3,93±0,28 ^{b,B}	2,85±0,66 ^{a,C}
	14	2,93±1,60 ^{b,B}	3,66±0,68 ^{a,AB}	4,61±1,17 ^{a,A}	4,03±0,01 ^{b,AB}	3,68±0,68 ^{a,AB}
	28	4,61±0,64 ^{a,AB}	3,89±0,36 ^{a,BC}	5,48±0,94 ^{a,A}	3,94±0,07 ^{b,BC}	3,23±0,97 ^{a,C}
	42	5,07±0,03 ^{a,A}	3,57±0,65 ^{a,B}	5,71±0,13 ^{a,A}	5,00±0,04 ^{a,A}	3,51±1,39 ^{a,B}
Ser	1	0,78±0,38 ^{a,B}	2,10±0,36 ^{a,A}	0,97±0,22 ^{b,B}	1,57±0,32 ^{c,A}	1,63±0,52 ^{a,A}
	14	0,64±0,04 ^{a,C}	2,02±0,96 ^{a,B}	0,78±0,15 ^{b,C}	2,79±0,09 ^{a,A}	1,73±0,51 ^{a,B}
	28	1,01±0,15 ^{a,B}	1,86±0,43 ^{a,AB}	0,90±0,04 ^{b,B}	1,95±0,46 ^{bc,AB}	3,11±2,22 ^{a,A}
	42	0,88±0,19 ^{a,D}	2,61±0,10 ^{a,A}	1,81±0,48 ^{a,BC}	2,22±0,31 ^{b,AB}	1,62±0,04 ^{a,C}
Gln	1	1,39±0,79 ^{bc,B}	3,06±0,89 ^{a,A}	2,99±0,85 ^{a,A}	2,73±0,67 ^{a,A}	3,74±0,08 ^{a,A}
	14	1,12±0,32 ^{c,C}	2,64±0,01 ^{a,B}	1,93±0,12 ^{a,BC}	2,56±0,72 ^{a,B}	4,11±1,06 ^{a,A}
	28	2,06±0,20 ^{ab,B}	3,49±0,54 ^{a,A}	2,73±1,03 ^{a,AB}	2,97±0,82 ^{a,AB}	3,56±0,80 ^{a,A}
	42	2,39±0,71 ^{a,C}	3,23±0,17 ^B	2,34±0,51 ^{a,C}	3,34±0,02 ^{a,B}	4,33±0,00 ^{a,A}
Gly	1	2,47±0,60 ^{b,B}	3,46±0,10 ^{a,A}	1,17±0,19 ^{b,C}	2,94±0,35 ^{b,AB}	2,76±0,95 ^{a,AB}
	14	2,22±0,78 ^{b,A}	3,20±0,65 ^{a,A}	4,34±2,67 ^{a,A}	4,11±0,66 ^{b,A}	3,53±0,05 ^{a,A}
	28	3,48±0,24 ^{a,A}	3,47±0,10 ^{a,A}	2,69±0,47 ^{ab,A}	4,03±0,11 ^{b,A}	3,58±1,80 ^{a,A}
	42	3,56±0,13 ^{a,B}	3,78±0,28 ^{a,B}	3,80±0,90 ^{a,B}	6,99±3,52 ^{a,A}	2,84±0,65 ^{a,B}
His	1	2,19±0,00 ^{c,B}	8,07±2,70 ^{ab,A}	6,45±2,39 ^{b,A}	5,65±4,22 ^{b,A}	9,13±1,62 ^{ab,A}
	14	5,86±2,56 ^{b,A}	9,27±1,51 ^{ab,A}	7,80±0,81 ^{b,A}	9,28±3,15 ^{ab,A}	6,38±4,92 ^{b,A}
	28	7,67±0,67 ^{b,AB}	6,03±4,50 ^{b,B}	8,52±1,65 ^{ab,AB}	10,83±0,47 ^{a,A}	5,12±2,66 ^{b,B}
	42	10,14±0,27 ^{a,B}	11,04±0,97 ^{a,AB}	10,74±0,00 ^{a,AB}	9,55±1,98 ^{ab,B}	12,00±0,00 ^{a,A}
Arg	1	6,12±0,01 ^{b,B}	8,93±0,05 ^{a,A}	8,98±1,67 ^{a,A}	9,24±0,03 ^{a,A}	6,72±1,80 ^{a,B}
	14	6,00±2,66 ^{b,B}	9,35±3,51 ^{a,AB}	7,88±3,20 ^{a,AB}	10,30±0,04 ^{a,A}	8,32±0,66 ^{a,AB}
	28	9,40±0,07 ^{a,AB}	10,22±1,54 ^{a,A}	8,79±1,12 ^{a,AB}	10,04±2,89 ^{a,A}	7,32±1,32 ^{a,B}
	42	9,34±0,22 ^{a,AB}	10,96±0,56 ^{a,A}	9,76±0,48 ^{a,AB}	12,52±4,31 ^{a,A}	7,41±1,55 ^{a,B}
Thr	1	0,84±0,00 ^{a,AB}	1,11±0,19 ^{a,A}	0,56±0,24 ^{a,B}	0,85±0,24 ^{b,AB}	0,75±0,08 ^{a,B}
	14	0,79±0,57 ^{a,AB}	1,01±0,35 ^{a,AB}	0,54±0,17 ^{a,B}	1,23±0,38 ^{ab,A}	0,85±0,01 ^{a,AB}
	28	0,87±0,09 ^{a,AB}	0,87±0,28 ^{a,AB}	0,74±0,16 ^{a,B}	1,28±0,01 ^{a,A}	1,06±0,61 ^{a,AB}
	42	0,92±0,24 ^{a,AB}	0,95±0,25 ^{a,AB}	0,65±0,16 ^{a,B}	1,18±0,17 ^{ab,A}	0,88±0,17 ^{a,AB}
Ala	1	5,85±0,32 ^{a,B}	11,31±0,17 ^{a,A}	6,01±0,18 ^{a,B}	9,77±1,29 ^{b,A}	9,89±2,33 ^{a,A}
	14	3,86±1,42 ^{b,B}	10,95±1,94 ^{a,A}	4,02±1,34 ^{b,B}	11,65±2,44 ^{ab,A}	10,37±0,30 ^{a,A}
	28	6,48±0,15 ^{a,BC}	12,08±1,95 ^{a,A}	5,46±0,36 ^{a,C}	11,99±3,00 ^{ab,A}	8,38±1,22 ^{a,B}
	42	6,54±0,21 ^{a,C}	12,71±1,10 ^{a,A}	5,51±0,50 ^{a,C}	14,10±2,73 ^{a,A}	10,11±0,48 ^{a,B}

Tablo 50. (devam)

Pro	1	18,06±0,73 ^{a,AB}	20,34±0,57 ^{a,A}	18,64±1,06 ^{a,AB}	14,95±4,80 ^{b,B}	19,60±2,39 ^{a,A}
	14	12,50±2,34 ^{b,B}	18,55±1,53 ^{b,A}	14,97±1,56 ^{b,B}	20,03±1,84 ^{a,A}	20,60±0,12 ^{a,A}
	28	15,99±1,98 ^{a,B}	19,99±1,04 ^{ab,A}	15,47±1,16 ^{b,B}	20,44±2,37 ^{a,A}	17,60±2,25 ^{a,AB}
	42	15,61±1,59 ^{a,D}	20,06±0,64 ^{ab,AB}	17,60±0,53 ^{a,C}	21,60±0,28 ^{a,A}	18,44±2,11 ^{a,BC}
Tyr	1	1,35±0,32 ^{b,C}	3,91±0,60 ^{ab,A}	3,86±0,43 ^{a,A}	2,98±0,63 ^{b,B}	3,15±0,08 ^{b,B}
	14	3,04±1,16 ^{a,B}	2,55±0,96 ^{b,B}	6,14±3,47 ^{a,A}	3,16±0,58 ^{b,B}	3,61±0,87 ^{ab,AB}
	28	3,37±0,21 ^{a,BC}	2,69±0,22 ^{b,C}	4,15±0,99 ^{a,B}	3,34±0,08 ^{b,BC}	5,15±0,58 ^{a,A}
	42	2,81±0,38 ^{a,B}	4,97±1,26 ^{a,A}	3,90±0,42 ^{a,AB}	4,43±0,11 ^{a,AB}	4,33±1,73 ^{ab,AB}
Val	1	1,69±0,00 ^{a,A}	1,69±0,03 ^{ab,A}	1,68±0,64 ^{b,A}	1,43±0,23 ^{a,A}	1,19±0,08 ^{c,A}
	14	1,36±0,58 ^{a,A}	1,40±0,00 ^{b,A}	1,08±0,15 ^{b,A}	1,78±0,84 ^{a,A}	1,06±0,17 ^{c,A}
	28	2,81±1,83 ^{a,A}	1,81±0,79 ^{ab,A}	1,44±0,75 ^{b,A}	1,51±0,42 ^{a,A}	1,94±0,10 ^{a,A}
	42	2,09±0,08 ^{a,B}	2,09±0,19 ^{a,B}	2,89±0,40 ^{a,A}	1,97±0,86 ^{a,B}	1,56±0,35 ^{b,B}
Met	1	0,42±0,06 ^{c,A}	0,42±0,10 ^{a,A}	0,44±0,11 ^{b,A}	0,43±0,05 ^{c,A}	0,53±0,05 ^{a,A}
	14	0,25±0,08 ^{d,B}	0,45±0,17 ^{a,A}	0,50±0,09 ^{ab,A}	0,39±0,05 ^{c,AB}	0,51±0,04 ^{a,A}
	28	0,79±0,07 ^{a,A}	0,51±0,02 ^{a,BC}	0,57±0,01 ^{a,B}	0,53±0,00 ^{b,BC}	0,49±0,05 ^{a,C}
	42	0,57±0,09 ^{b,A}	0,58±0,01 ^{a,A}	0,57±0,02 ^{a,A}	0,68±0,06 ^{a,A}	0,62±0,19 ^{a,A}
Cys	1	0,33±0,04 ^{b,C}	0,61±0,09 ^{bc,A}	0,61±0,09 ^{ab,A}	0,50±0,11 ^{c,AB}	0,42±0,12 ^{b,BC}
	14	0,40±0,15 ^{b,B}	0,52±0,20 ^{c,B}	0,45±0,28 ^{b,B}	0,87±0,23 ^{b,A}	0,53±0,12 ^{ab,B}
	28	0,62±0,01 ^{a,B}	0,73±0,04 ^{b,AB}	0,80±0,09 ^{a,A}	0,76±0,15 ^{bc,AB}	0,74±0,15 ^{a,AB}
	42	0,66±0,02 ^{a,C}	1,07±0,09 ^{a,B}	0,71±0,04 ^{a,C}	1,55±0,31 ^{a,A}	0,71±0,27 ^{ab,C}
Ileu	1	1,25±0,47 ^{a,AB}	1,52±0,06 ^{a,A}	1,57±0,08 ^{a,A}	0,97±0,06 ^{b,B}	1,20±0,29 ^{a,AB}
	14	1,15±0,00 ^{a,AB}	0,84±0,18 ^{b,B}	0,82±0,02 ^{b,B}	1,45±0,57 ^{ab,A}	1,06±0,01 ^{a,AB}
	28	1,31±0,25 ^{a,AB}	0,77±0,13 ^{b,B}	1,35±0,30 ^{a,AB}	1,59±0,35 ^{a,A}	1,39±0,83 ^{a,AB}
	42	1,17±0,28 ^{a,A}	0,89±0,36 ^{b,A}	1,35±0,31 ^{a,A}	1,16±0,09 ^{ab,A}	0,98±0,36 ^{a,A}
Leu	1	1,32±0,30 ^{a,AB}	1,32±0,04 ^{a,AB}	1,81±1,01 ^{a,A}	1,00±0,26 ^{b,B}	0,64±0,11 ^{a,B}
	14	1,06±0,69 ^{a,AB}	1,11±0,35 ^{a,AB}	0,90±0,06 ^{a,AB}	1,62±0,77 ^{ab,A}	0,75±0,10 ^{a,B}
	28	1,73±0,60 ^{a,A}	1,09±0,00 ^{a,B}	1,37±0,28 ^{a,AB}	1,43±0,02 ^{ab,AB}	0,93±0,38 ^{a,B}
	42	1,41±0,01 ^{a,AB}	1,14±0,28 ^{a,BC}	1,74±0,75 ^{a,AB}	2,00±0,24 ^{a,A}	0,69±0,22 ^{a,C}
Phe	1	1,83±0,28 ^{b,AB}	1,65±0,16 ^{a,B}	2,26±0,61 ^{a,A}	1,31±0,35 ^{ab,B}	1,52±0,15 ^{a,B}
	14	1,04±0,19 ^{c,C}	0,98±0,23 ^{b,C}	1,64±0,26 ^{ab,AB}	1,40±0,24 ^{ab,BC}	1,99±0,42 ^{a,A}
	28	2,25±0,19 ^{a,A}	1,17±0,09 ^{ab,C}	1,57±0,01 ^{bc,BC}	1,70±0,34 ^{a,B}	1,60±0,60 ^{a,BC}
	42	2,28±0,20 ^{a,A}	1,41±0,65 ^{ab,B}	0,97±0,45 ^{c,B}	1,01±0,43 ^{b,B}	1,60±0,53 ^{a,AB}
Trp	1	1,32±0,45 ^{ab,A}	1,57±0,28 ^{a,A}	1,72±0,42 ^{a,A}	1,38±0,03 ^{a,A}	1,23±0,49 ^{a,A}
	14	0,91±0,02 ^{b,A}	1,70±0,96 ^{a,A}	0,91±0,63 ^{b,A}	1,81±0,42 ^{a,A}	1,46±0,54 ^{a,A}
	28	1,63±0,31 ^{a,A}	1,10±0,49 ^{a,A}	1,33±0,24 ^{ab,A}	1,49±0,35 ^{a,A}	2,73±2,18 ^{a,A}
	42	1,25±0,24 ^{ab,A}	1,44±0,06 ^{a,A}	1,16±0,53 ^{ab,A}	1,62±0,48 ^{a,A}	1,13±0,13 ^{a,A}
Lys	1	2,07±0,09 ^{b,AB}	2,42±0,03 ^{a,AB}	2,52±0,50 ^{ab,A}	2,42±0,13 ^{b,AB}	1,98±0,45 ^{a,B}
	14	1,62±0,48 ^{c,B}	3,15±1,66 ^{a,A}	1,57±1,09 ^{b,B}	2,94±0,43 ^{ab,AB}	2,20±0,02 ^{a,AB}
	28	2,82±0,17 ^{a,AB}	2,90±0,75 ^{a,AB}	3,00±0,60 ^{a,A}	3,06±0,40 ^{a,A}	2,13±0,34 ^{a,B}
	42	2,49±0,12 ^{a,C}	3,16±0,29 ^{a,AB}	2,88±0,18 ^{a,BC}	3,45±0,38 ^{a,A}	2,06±0,32 ^{a,D}
Toplam	1	61,37±1,94 ^{ab,C}	83,95±3,23 ^{a,A}	74,50±7,43 ^{ab,B}	71,67±4,75 ^{c,B}	73,81±9,55 ^{a,B}
	14	51,36±17,66 ^{b,C}	78,98±16,63 ^{a,AB}	66,05±4,44 ^{b,BC}	87,99±13,33 ^{b,A}	76,49±5,78 ^{a,AB}
	28	75,20±5,68 ^{a,B}	79,92±4,02 ^{a,AB}	71,90±7,11 ^{ab,B}	88,91±3,80 ^{b,A}	74,70±12,77 ^{a,B}
	42	76,03±1,53 ^{a,B}	91,99±0,17 ^{a,A}	81,23±6,11 ^{a,B}	101,34±4,84 ^{a,A}	79,36±11,40 ^{a,B}

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden p<0,05 düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden p<0,05 düzeyinde farklıdır.

Tablo 51. Fermente Süt Örneklerinin Serbest Amino Asit Değerlerine Ait Varyans Analizi Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	F değeri																			
		Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	Gly	His	Arg	Thr	Ala	Pro	Tyr	Val	Met	Cys	Ileu	Leu	Phe	Trp	Lys
Kültür ilavesi (A)	4	9,79**	14,71**	16,58**	16,36**	26,11**	4,89**	2,49	7,92**	7,56**	73,95**	15,56**	6,86**	1,70	0,62	15,69**	1,98	8,06**	6,12**	1,04	7,43**
Depolama süresi (B)	3	5,35**	27,97**	3,65*	1,81	3,94*	6,52**	12,20**	4,40**	0,92	4,27**	1,89	3,27*	6,72**	23,49**	31,63**	2,73	1,84	3,35*	1,07	5,24**
AxB	12	2,04*	1,07	1,78	2,49*	1,32	2,51*	2,81**	0,98	0,78	2,00*	5,09**	3,06**	1,84	5,36**	5,06**	2,46*	1,90	5,26**	1,75	1,75
Hata	60																				
Genel	80																				

*(p<0,05) düzeyinde önemli; ** (p<0,01) düzeyinde önemli

Toplam serbest amino asit konsantrasyonları açısından değerlendirildiğinde; fermente sütlerde en yüksek konsantrasyonlar (91,99 mg/kg ve 101,34 mg/kg) sırasıyla B ve D örneklerinde depolamanın 42. gününde tespit edilmiştir. Depolama süresince toplam amino asit miktarı D örneğinde artarken diğer örneklerde artış/azalışlar meydana gelmiş, bununla birlikte toplam amino asit konsantrasyonlarının depolamanın 42. gününde 1. gününe göre arttığı gözlenmiştir. Mevcut sonuçlardan özellikle B ve D kültür kombinasyonlarının fermente süt örneklerinde amino asit konsantrasyonunun arttırılmasında etkili olduğu söylenebilir. Nitekim amino asit oluşumu üzerinde starter/starter olmayan bakterilerin peptidaz aktivitelerinin etkili olduğu bilinmektedir.

Benzer olarak Li *et al.* (2019b) *S. thermophilus*, *L. plantarum*, *B. animalis* subsp *lactis* suşlarının bulunduğu fermente sütlerin toplam amino asit miktarlarının 21 günlük depolama periyodu sonunda arttığını ifade etmişlerdir. Yılmaz and Gökmen (2017) *L. bulgaricus* (B), *S. thermophilus* (S) ve *L. plantarum* (P) suşlarının farklı kombinasyonları ile ürettikleri yoğurtlarda SB, BP ve SBP içeren örneklerin toplam amino asit miktarlarının arttığını, ancak SP içeren yoğurt örneğinin toplam amino asit miktarının önemli ölçüde değişmediğini bildirmişlerdir. Gu *et al.* (2021) *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* GG ve *B. lactis* suşlarının farklı kombinasyonları ile ürettikleri yoğurtlarda toplam amino asit konsantrasyonlarının düşük olduğunu ifade etmişlerdir. Bu durumun söz konusu suşların zayıf proteolitik aktiviteye sahip olmasından ve gelişimleri için amino asitlere ihtiyaç duymaları nedeniyle oluşan amino asitleri kullanmalarından kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Fermente Süt Örneklerinin GABA İçeriği

GAD genine sahip LAB suşları tarafından üretilebilen GABA'nın, insan metabolizmasında çok önemli fonksiyonlara sahip biyoaktif bir bileşen olduğu bildirilmiştir (Zarei *et al.* 2018). Bu nedenle son yıllarda yapılan çalışmalarda GABA'nın hem fermente gıdalardaki miktarının belirlenmesinin hem de GABA ile zenginleştirilmiş fonksiyonel gıdaların üretiminin önemi vurgulanmıştır.

Fermente süt örneklerinde depolama süresince belirlenen GABA konsantrasyonları standart sapmaları ile birlikte Tablo 52'de, varyans analizi sonuçları ise Tablo 53'de verilmiştir. GABA miktarı üzerine kültür ilavesi ile kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisinin istatistiksel olarak $p < 0,01$ düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir. Fermente süt örneklerinde belirlenen GABA konsantrasyonlarına ait kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun grafiği ise Şekil 28'de sunulmuştur.

Tablo 52. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen GABA Konsantrasyonları (mg/kg)

Örnekler	Depolama Süresi (Gün)			
	1	14	28	42
A	7,67±0,07 ^{a,A}	9,27±0,00 ^{a,A}	7,77±3,34 ^{bc,A}	8,07±0,34 ^{b,A}
B	8,41±0,45 ^{a,AB}	9,80±2,14 ^{a,AB}	10,07±0,38 ^{ab,A}	8,02±0,42 ^{b,B}
C	7,79±1,22 ^{a,A}	6,43±0,89 ^{b,A}	6,08±0,99 ^{cd,A}	7,56±2,40 ^{b,A}
D	7,21±2,58 ^{a,B}	10,69±2,85 ^{a,AB}	12,26±2,77 ^{a,A}	12,86±2,19 ^{a,A}
E	4,62±0,20 ^{b,A}	4,36±0,15 ^{b,B}	4,47±0,13 ^{d,AB}	4,54±0,08 ^{c,AB}

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden p<0,05 düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden p<0,05 düzeyinde farklıdır.

Tablo 53. Fermente Süt Örneklerinin GABA Konsantrasyonlarına Ait Varyans Analizi Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	F	P
Kültür ilavesi (A)	4	33,39	0,00**
Depolama süresi (B)	3	1,94	0,13
AxB	12	2,80	0,00**
Hata	60		
Genel	80		

*(p<0,05) düzeyinde önemli; ** (p<0,01) düzeyinde önemli

Fermente sütlerde en düşük GABA konsantrasyonu (4,36 mg/kg) E örneğinde depolamanın 14. gününde, en yüksek GABA konsantrasyonu ise (12,86 mg/kg) D örneğinde depolamanın 42. gününde belirlenmiştir (Tablo 52). Elde edilen bulgulara benzer olarak Minervini *et al.* (2009) farklı starter kültürler kullanarak ürettikleri fermente keçi sütü örneklerinde *L. plantarum* 1288 suşunun 12,84 mg/kg konsantrasyonunda GABA ürettiğini bildirmişlerdir. Kim *et al.* (2022) ise GABA üreticisi olarak *L. plantarum* Y7'nin kullanıldığı yağsız sütte GABA miktarının 4,85 µg/mL olduğunu, *L. bulgaricus* suşu ile birlikte kullanıldığı zaman bu oranın 6,85 µg/mL'ye yükseldiğini rapor etmişlerdir.

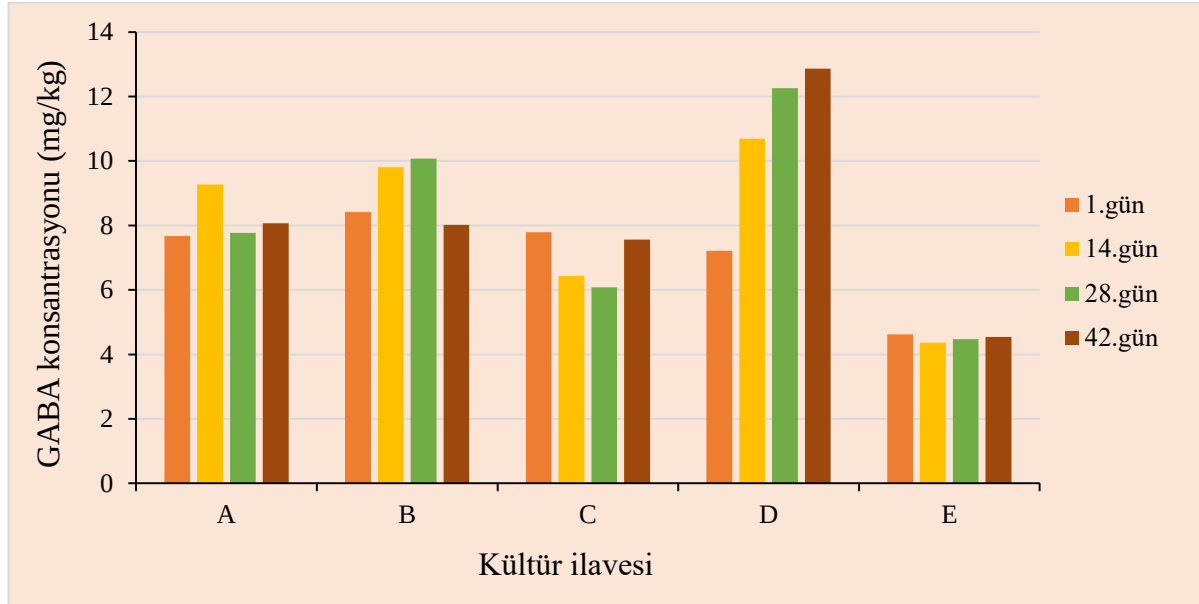
Diğer çalışmalarda ise farklı *L. plantarum* suşlarının yoğurtta 314,56 mg/100g; fermente sütte 33 mg/L; MSG katkılı MRS ortamında 3,45 g/L oranında GABA ürettiği belirtilmiştir (Tung *et al.* 2011; Shan *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2017a). Araştırma sonuçlarındaki bu farklılıkların fermantasyonda kullanılan mikroorganizmalar ve kültür ortamlarının kompozisyonundaki farklılıklar ile GABA üretim koşullarının optimizasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterdiği düşünülmektedir. Nitekim araştırmacılar GABA üretiminin pH, sıcaklık gibi ortam şartlarından, glutamik asit, PLP gibi ingredientlerin kültür ortamına ilavesinden etkilendiğini, bununla birlikte GABA veriminin önemli derecede bakteri suşuna bağlı olduğunu vurgulamışlardır (Siragusa *et al.* 2007; Nejati *et al.* 2013; Jitpakdee *et al.* 2021). Aynı zamanda bazı bakteri suşlarında glutamat ile GABA'nın hücre içine/hücre dışına taşınmasını sağlayan

transport sisteminin düzenli çalışmadığı ya da glutamatın diğer metabolik yollarda kullanıldığı ve bütün bu faktörlerin GABA üretimini sınırladığı bildirilmiştir (Santos-Espinosa *et al.* 2020). Nejati *et al.* (2013) üç farklı *L. plantarum* suşunun (1 TP, FC₂10 ve PU11) farklı oranlarda GABA sentezlediğini (11,1 mg/kg, 43,5 mg/kg ve 77,4 mg/kg) ve GABA sentezleme kapasitesinin suşlar arasında değişkenlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Cataldo *et al.* (2020) 7 adet *L. brevis* ve 9 adet *L. plantarum* izolatından sadece 3 tanesinin (*L. brevis* CRL 1942, *L. brevis* CRL 2013 ve *L. brevis* CRL 1959) yüksek konsantrasyonda (>230 mM) GABA sentezleme yeteneğine sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

GABA konsantrasyonu açısından depolamanın başlangıcından itibaren fermente süt örnekleri arasında istatistiksel olarak farklılıkların bulunduğu, en yüksek GABA konsantrasyonunun D örneğinde belirlendiği, bu örneği sırasıyla B, A, C ve E örneklerinin izlediği görülmektedir. Örnekler arasındaki farklılıkların fermente sütlerin üretiminde kullanılan kültür kombinasyonlarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. D örneğinde GABA (+) olduğu belirlenen *L. plantarum* 156'nın yanı sıra proteolitik aktiviteye sahip olduğu bilinen *L. casei* ATCC 334 ve *L. helveticus* DPC 4571 suşlarının bir arada kullanılmasının sinerjistik etki gösterdiği, başta glutamik asit olmak üzere amino asit oluşumunu artırdığı ve GABA üretimini teşvik ettiği belirlenmiştir. Nitekim GABA'nın glutamik asitin dekarboksilasyonu sonucu oluştuğu bilinmektedir. Ayağ *et al.* (2022) tarafından yürütülen bir çalışmada GABA oluşumu ile Glu, Gln, Ser ve Met amino asitleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir. D örneğinde toplam serbest amino asit konsantrasyonunun daha yüksek olması bu sonucu destekler niteliktedir (Tablo 50). Benzer şekilde konu ile ilgili yapılan bir çalışmada *L. plantarum* Y7 suşunun proteolitik aktivitesinin zayıf olmasından dolayı fermente sütte GABA miktarının düşük kaldığı, ancak güçlü proteolitik aktiviteye sahip *L. bulgaricus* suşu ile birlikte kullanıldığında GABA miktarının arttığı bildirilmiştir (Kim *et al.* 2022). Aynı zamanda *L. plantarum* 156 suşunu içeren diğer örneklerde de (A, B, C) önemli miktarlarda GABA'nın oluştuğu belirlenmiştir. *L. plantarum* 156 ile birlikte proteolitik aktiviteye sahip *L. casei* ATCC 334 ve *L. helveticus* DPC 4571 suşlarının GABA üretimi üzerinde etkili olduğu görülmektedir. *L. plantarum* 156 suşunun yanı sıra sadece *S. thermophilus* 20S4 suşunu içeren C örneğinde GABA miktarı nispeten düşük kalmıştır. Bu durumun daha önce bahsedildiği üzere C örneğinde güçlü proteolitik bir ajanın bulunmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. *L. plantarum* 156 suşunu içermeyen E örneğinde ise düşük konsantrasyonda da olsa bir miktar GABA oluşumu gözlenmiştir. Söz konusu örnekte GABA'nın pastörizasyon sonrası sütte kalan LAB suşları tarafından ya da maya grubu mikroorganizmalar tarafından üretilmiş olabileceği tahmin edilmektedir. Jitpakdee *et al.* (2021) *P. pentosaceus* ENM104 ve *L. plantarum* SPS109 suşlarını kullanarak ürettikleri

fermente sütlerde en yüksek GABA konsantrasyonunun 4,58 µg/mL olduğunu, herhangi bir starter kültür içermeyen kontrol örneğinde de 4,39-4,42 µg/mL düzeyinde GABA tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Tüm bunlara ilaveten maya/küflerin GAD enzimine ve GABA  retim kapasitesine sahip olduğu, çeşitli fermente gıdalardan izole edilen *S. cerevisiae* ve *K. marxianus* gibi mayalarda GAD enziminin tanımlandığı belirtilmiştir (Sahab *et al.* 2020).

Depolama süresince GABA konsantrasyonunun D  rneğinde sürekli artış gösterdiği, diğer örneklerde ise artış ve azalışların olduğu belirlenmiştir. Hussin *et al.* (2021) *L. plantarum* Taj-Apis362 suşunu kullanarak ürettikleri yoğurtlarda GABA miktarının depolamanın 21. gününe kadar artış gösterdiğini, depolamanın 28. gününde ise azaldığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar bu azalmanın yoğurtta sıklıkla tespit edilen ve GABA'nın degradasyonuna sebep olan enzimleri içeren *S. cerevisiae*'dan kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir.



şekil 27. Fermente süt  rneklerinin GABA konsantrasyonları üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi

şekil 28'de A, B ve C  rneklerinin GABA miktarında depolama süresince artış/azalışlar meydana geldiği, D  rneğindeki GABA miktarının depolama süresince artarak 42. günde en yüksek değere ulaştığı görülmektedir. E  rneğinin GABA konsantrasyonunun ise diğer örneklerle göre önemli düzeyde düşük olduğu ve depolama süresince önemli bir değişim sergilemediği belirlenmiştir.

Fermente Süt  rneklerinde Belirlenen Uçucu Bileşikler

Yoğurt benzeri fermente süt örneklerinin uçucu bileşen profili depolama periyodunun 1., 14., 28. ve 42. günlerinde GC-MS tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Tespit edilen uçucu bileşikler 7 grup altında birleştirilmiş ve varyans analizi sonuçları ile birlikte tablolar halinde

verilmiştir (Tablo 54-Tablo 60). Fermente süt örneklerinde 13'ü keton, 10'u alkol, 7'si asit, 6'sı ester, 4'ü terpen, 4'ü aldehit ve 10'u diğer bileşikler olmak üzere toplam 54 adet uçucu bileşik saptanmıştır.

Ketonlar

Ketonlar; serbest yağ asitlerinin enzimatik oksidasyonu ile β - ketoasitlerine, ardından söz konusu bileşiklerin dekarboksilasyonu ile metil ketonlara dönüşmekte ve düşük konsantrasyonlarda bile aroma üzerinde etkili olmaktadır. Diasetil, asetoin gibi ketonlar ise sitrat ve laktat metabolizması ile oluşan pirüvatın yıkılması sonucu meydana gelmekte ve fermente süt ürünlerine kremamsı bir aroma vermektedir. Asetoin aynı zamanda diasetil redüktaz tarafından katalizlenen geri dönüşümsüz reaksiyon ile diasetilden de oluşmaktadır (Köse ve Ocak 2014; Farag *et al.* 2021). Depolama süresince belirlenen keton bileşikleri varyans analizi sonuçları ile birlikte Tablo 54'de verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarından kültür ilavesinin acetone, 2-pentanone, acetoin haricindeki bileşiklerde; depolama süresinin ise 2,3-pentanedione, acetone, 3-hydroxy-3-methyl-2-butanone, 2-undecanone dışındaki bileşiklerde istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0,01$). Fermente süt örneklerinde toplam 13 adet keton bileşiği tespit edilmiş, tüm örneklerde acetone, 2,3-bütanedione (diasetil), acetoin ve 2-heptanone majör keton bileşikler olarak tespit edilmiştir. *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* suşlarının tek ve birlikte fermente süt üretiminde kullanıldığı bir çalışmada, sadece *S. thermophilus* ile üretilen fermente sütte 10 adet keton bileşiği tespit edildiği, bunlar arasında 2,3-butanedione, acetoin, 2-heptanone ve 2-nonanone bileşiklerinin hakim olduğu bildirilmiştir (Dan *et al.* 2017).

Acetoin ve acetone bileşiklerinin yoğurt ve benzeri fermente süt ürünlerinde arzu edilen tat/aromanın oluşmasında etkili temel aroma bileşikler oldukları bilinmektedir (Li *et al.* 2020). Fermente süt örneklerinde belirlenen acetone ve acetoin miktarlarının tüm örneklerde genel olarak benzer olduğu, depolama süresince özellikle acetone miktarındaki değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada *S. thermophilus* MGA45-4 suşu ile üretilen fermente sütlerde depolama boyunca acetoin miktarının 21,12-29,87 $\mu\text{g/L}$ aralığında değiştiği bildirilmiştir (Dan *et al.* 2018). Muelas *et al.* (2018) farklı LAB suşları ile fermente ettikleri sütlerde tüm örneklerde farklı konsantrasyonlarda acetoin tespit ettiklerini, en yüksek acetoin miktarının (684 nL/L) ise *L. sakei* CECT 5964 suşu ile üretilen örnekte belirlediklerini ifade etmişlerdir.

Acetaldehyde bileşiğinden sonra yoğurt ve benzeri fermente süt ürünlerinde tipik aromayı oluşturan diğer bir bileşiğin 2,3-bütanedione (diasetil) olduğu bildirilmiştir (Pinto *et al.* 2009). 2,3-bütanedione (diasetil) bileşiği açısından örnekler arasında belirgin farklılıklar

olduğu, bu bileşiğin D ve E örneklerinde oldukça yüksek konsantrasyonda bulunduğu ve depolama süresince artış gösterdiği gözlenmiştir. Özellikle *L. casei* ATCC 334, *L. helveticus* DPC 4571 ve *S. thermophilus* 20S4 suşlarının bulunduğu E örneğinde depolamanın 42. gününde önemli düzeyde arttığı ve keton bileşikler arasında en yüksek konsantrasyona (10,89 µg/100g) ulaştığı belirlenmiştir. Söz konusu örneklerde proteolitik aktiviteye sahip suşların kullanılmasının proteolizi, dolayısıyla aroma oluşumunu artırdığı söylenebilir. Bir çalışmada yoğurt kültürüne ilaveten *L. rhamnosus* DSA LR1 suşunun kullanıldığı örneklerde depolama süresince diasetil konsantrasyonunun sürekli artış gösterdiği bildirilmiştir. Araştırmacılar bu durumun *L. rhamnosus* suşunun sitratı metabolize etmesinden kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir (Innocente *et al.* 2016). Xu *et al.* (2006) yoğurt kültürü (YC) ve *L. rhamnosus* (LB) suşunu kullandıkları çalışmada, LB ve YC+LB ile üretilen fermente sütlerde 2,3-butanedione oluşumunun YC ile üretilen kontrol örneğine kıyasla arttığını ifade etmişlerdir. Min *et al.* (2020) ise yoğurt kültürü ve ilaveten *L. plantarum* K25 ile ürettikleri yoğurtlarda 2,3-butanedione konsantrasyonunun depolama boyunca arttığını rapor etmişlerdir.

2-heptanone bileşiği B, D, E örneklerinde yüksek konsantrasyonda belirlenmiş, bilhassa D örneğinde depolamanın 42. gününde en yüksek değere ulaşmıştır. Condurso *et al.* (2008) yoğurt örneklerinde yüksek konsantrasyonda 2-heptanone tespit ettiklerini ve bu bileşiğin yoğurtta majör aroma bileşiklerinden biri olduğunu ifade etmişlerdir. Fermente süt örneklerinde tespit edilen diğer keton bileşiklerinden 2-pentanone, 2,3-pentanedione, 3-pentanone, 2-nonanone ve 2-undecanone düşük konsantrasyonlarda belirlenmiş ve miktarlarında depolama süresince dalgalanmaların olduğu gözlenmiştir. 3-Methyl-2-pentanone bileşiğini sadece depolamanın başlangıcında, 3-Octanone bileşiği ise depolama periyodunun 28. ve 42. günlerinde belirlenmiştir. Mevcut sonuçlar değerlendirildiğinde özellikle D ve E kültür kombinasyonlarının keton bileşiklerinin konsantrasyonlarını artırdığı söylenebilir.

Tablo 54. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Keton Bileşikleri (µg/100g)

Bileşik	Dep. Sür. (Gün)	Örnekler					ANOVA	
		A	B	C	D	E	Kültür İlavesi	Dep. Sür.
Acetone	1	3,30±0,86	1,56±0,65	1,97±0,61	1,92±0,65	2,94±0,85	-	-
	14	1,93±0,80	2,90±1,05	2,33±0,41	2,93±0,74	3,21±1,05		
	28	2,99±0,68	3,24±0,82	2,58±0,08	2,61±1,19	2,43±0,33		
	42	3,21±1,38	3,18±0,85	2,22±0,41	2,74±0,91	2,35±0,36		
2,3-Butanedione (Diasetil)	1	1,17±0,72	0,68±0,33	0,49±0,33	2,21±1,39	3,03±1,13	**	**
	14	1,22±0,37	1,40±0,63	0,80±0,08	3,12±0,63	8,05±3,10		
	28	1,50±0,25	1,63±0,23	0,84±0,05	5,02±0,37	7,82±1,86		
	42	1,51±0,28	1,46±0,25	0,67±0,05	4,97±1,59	10,89±1,58		
3-Methyl-2- pentanone	1	1,99±0,44	1,54±0,50	1,03±0,35	0,79±0,08	0,27±0,09	**	**
	14	TE	TE	TE	TE	TE		
	28	TE	TE	TE	TE	TE		
	42	TE	TE	TE	TE	TE		
2-Pentanone	1	0,27±0,15	0,22±0,09	0,17±0,05	0,19±0,05	0,23±0,11	-	**
	14	0,27±0,10	0,36±0,14	0,33±0,13	0,41±0,15	0,35±0,08		
	28	0,37±0,13	0,44±0,15	0,35±0,05	0,44±0,26	0,40±0,06		
	42	0,42±0,09	0,39±0,05	0,33±0,09	0,40±0,05	0,40±0,05		
2,3-Pentanedione	1	0,14±0,03	0,15±0,09	0,29±0,13	0,28±0,17	0,35±0,17	**	-
	14	0,13±0,03	0,25±0,09	0,11±0,04	0,28±0,15	0,48±0,15		
	28	0,20±0,12	0,35±0,16	0,14±0,03	0,32±0,15	0,57±0,16		
	42	0,24±0,12	0,27±0,07	0,10±0,02	0,30±0,12	0,25±0,10		
3-Pentanone	1	0,11±0,05	0,04±0,00	0,09±0,03	0,06±0,00	0,10±0,05	**	**
	14	0,08±0,01	0,15±0,07	0,09±0,00	0,13±0,01	0,32±0,10		
	28	0,12±0,06	0,27±0,02	0,10±0,02	0,12±0,04	0,33±0,02		
	42	0,15±0,07	0,13±0,07	0,08±0,03	0,10±0,07	0,19±0,12		
Acetoin	1	5,03±1,10	2,42±1,33	3,15±1,12	3,60±1,08	4,63±2,11	-	**
	14	3,72±1,20	4,61±0,57	5,02±0,76	6,31±1,27	5,10±0,88		
	28	5,06±0,39	5,94±0,96	5,05±0,90	6,07±0,94	4,27±0,92		
	42	5,51±1,88	5,29±0,80	3,65±1,49	5,40±0,72	3,71±1,04		

Tablo 54. (devam)

2-Hexanone	1	TE	TE	TE	TE	TE		
	14	TE	TE	TE	TE	TE		
	28	0,04±0,00	0,05±0,01	0,04±0,01	TE	0,06±0,03	**	**
	42	TE	TE	TE	TE	0,10±0,05		
3-Hydroxy-3-methyl-2-butanone	1	0,29±0,02	0,37±0,08	0,26±0,11	TE	0,40±0,14		
	14	0,23±0,02	0,36±0,08	0,23±0,01	0,31±0,03	0,25±0,07	**	-
	28	0,18±0,01	0,32±0,07	0,21±0,02	0,31±0,13	0,25±0,01		
	42	0,24±0,04	0,30±0,05	0,16±0,04	0,30±0,04	0,24±0,01		
2-Heptanone	1	1,29±0,50	1,65±0,20	1,00±0,44	1,59±±0,74	1,86±0,65		
	14	1,54±0,30	3,61±1,02	1,53±0,26	3,42±1,12	3,38±0,43	**	**
	28	1,48±0,15	4,51±2,01	1,72±0,17	3,68±1,81	3,76±1,16		
	42	1,60±0,24	5,62±0,39	1,39±0,56	6,94±2,23	4,16±1,05		
3-Octanone	1	TE	TE	TE	TE	TE		
	14	TE	TE	TE	TE	TE		
	28	TE	TE	0,07±0,02	0,06±0,02	0,08±0,00	**	**
	42	0,10±0,03	0,11±0,00	0,09±0,03	0,06±0,00	0,10±0,03		
2-Nonanone	1	0,34±0,20	0,29±0,13	0,23±0,11	0,22±0,02	0,71±0,14		
	14	0,40±0,12	0,86±0,31	0,35±0,04	0,86±0,26	1,11±0,36	**	**
	28	0,34±0,04	1,15±0,42	0,39±0,05	1,11±0,54	0,95±0,31		
	42	0,41±0,02	1,41±0,04	0,40±0,13	1,40±0,62	1,07±0,27		
2-Undecanone	1	0,10±0,03	0,08±0,02	0,06±0,01	TE	0,11±0,04		
	14	0,03±0,00	0,09±0,02	0,04±0,01	0,08±0,02	0,09±0,03	**	-
	28	0,04±0,00	0,09±0,03	0,05±0,00	0,09±0,04	0,07±0,01		
	42	0,05±0,01	0,09±0,01	0,06±0,01	0,12±0,05	0,09±0,01		

*(p<0,05) düzeyinde önemli; ** (p<0,01) düzeyinde önemli

Alkoller

Primer alkollerin; aldehitlerin aldehit dehidrogenaz ile indirgenmesi sonucu olduğu, sekonder alkollerin ise yağ asitlerinin oksidasyonu ile meydana gelen metil ketonların redüktaz enzimleri tarafından indirgenmesi ile olduğu bilinmektedir (Hu *et al.* 2020). Primer ve sekonder alkollerin aynı zamanda karbonhidrat ve amino asitlerin çeşitli metabolik reaksiyonları sonucu da meydana geldiği (Tylewicz *et al.* 2022) ve alkol veya çiçeğimsi/meyvemsi aroma ile karakterize edildiği bildirilmiştir (Muelas *et al.* 2018).

Fermente sütlerde depolama süresince belirlenen alkol bileşikleri varyans analizi sonuçları ile birlikte Tablo 55’de verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarından kültür ilavesinin etkisi ethanol hariç diğer bileşiklerde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Depolama süresinin etkisinin ise ethanol ve 1-heptanol haricindeki diğer bileşiklerde $p < 0,01$ düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir. Fermente süt örneklerinde toplam 10 adet alkol bileşiği tespit edilmiş, ethanol miktarının diğer alkol bileşiklerine göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ethanol fermente süt örneklerinin tümünde tespit edilmiş, miktarı açısından örnekler arasında önemli farklılıklar gözlenmemiş ve depolama süresince değişimi de istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p > 0,05$). Glikozun ve amino asitlerin katabolizmasında son ürün olan etanolün yoğurt ve benzeri fermente süt ürünlerinde başlıca alkol bileşiği olduğu ifade edilmiştir (Cheng 2010). Muelas *et al.* (2018) *L. casei*, *L. lactis* ve *L. bulgaricus* ile ürettikleri fermente sütlerde etanolün majör bileşen olduğunu belirtmişlerdir. Etanolün temel bir uçucu bileşen olduğu bildirilmesine rağmen, laktik asit fermantasyonu sırasında üretilen az miktardaki etanolün yoğurt ve benzeri fermente süt ürünlerinin aromasına katkısının önemli olmadığı öne sürülmüştür (Erkaya and Şengül 2011; Beltrán-Barrientos *et al.* 2019). Bununla birlikte etanolün aroma/lezzet oluşumunda tamamlayıcı bir rol üstlendiği de belirtilmiştir (Cheng 2010). Yoğurt ve benzeri fermente süt ürünlerinde etanolün fazla miktarda oluşmasının, kullanılan kültürün maya ile kontamine olduğunun göstergesi olarak kabul edilebileceği, bu durumun aromanın bozulmasına sebep olacağı da ifade edilmiştir (Köse ve Ocak 2014). Alkol bileşikleri arasında 3-methyl-2-buten-1-ol, 2-ethyl hexanol, 1-heptanol, 1-hexanol, 1-octanol ve 1-nonanol bileşikleri daha düşük konsantrasyonlarda belirlenmiş, örneklerin çoğunda tespit edilebilmiştir. Söz konusu bileşiklerin konsantrasyonlarının depolama boyunca önemli ölçüde değişmediği gözlenmiştir. *L. lactis* NRRL B-50571 ve NRRL B-50572 suşlarının tek ve ko-kültür olarak fermente sütlerde kullanıldığı bir çalışmada örneklerin tümünde 2-ethyl-1-hexanol bileşiğinin belirlendiği rapor edilmiştir (Beltrán-Barrientos *et al.* 2019). Dan *et al.* (2017) ise *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus*’u birlikte kullanarak fermente ettikleri sütlerde 8 alkol bileşiği tespit ettiklerini, ancak konsantrasyonlarının düşük olduğunu ve 1-hexanol, 1-heptanol, ve 2-nonanol miktarlarının depolama süresince farklılık göstermediğini rapor etmişlerdir.

Tablo 55. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Alkol Bileşikleri (µg/100g)

Bileşik	Dep. Sür. (Gün)	Örnekler					ANOVA	
		A	B	C	D	E	Kültür İlavesi	Dep. Sür.
Ethanol	1	1,13±0,21	0,90±0,34	1,01±0,32	0,89±0,22	1,07±0,59	-	-
	14	0,77±0,25	1,23±0,47	1,08±0,28	1,17±0,28	1,31±0,62		
	28	1,49±0,83	1,38±0,60	1,04±0,26	1,09±0,57	0,95±0,15		
	42	1,38±0,66	1,44±0,18	0,75±0,12	1,08±0,12	1,17±0,21		
3-Methyl-butanol	1	0,08±0,04	TE	TE	TE	TE	**	**
	14	0,07±0,01	0,04±0,02	TE	0,07±0,03	0,08±0,03		
	28	0,07±0,03	0,02±0,01	0,01±0,00	0,10±0,03	0,05±0,03		
	42	0,08±0,03	0,03±0,01	0,01±0,00	0,07±0,05	0,09±0,01		
1-Pentanol	1	TE	TE	TE	TE	TE	**	**
	14	TE	TE	0,03±0,00	0,03±0,00	0,02±0,00		
	28	TE	0,04±0,02	0,03±0,00	TE	0,02±0,00		
	42	0,04±0,02	TE	0,04±0,00	TE	0,03±0,01		
3-Methyl-2-buten-1-ol	1	0,19±0,06	0,02±0,00	0,12±0,03	TE	TE	**	**
	14	0,16±0,01	0,06±0,01	0,08±0,00	0,18±0,0	0,14±0,04		
	28	0,15±0,01	0,15±0,04	0,12±0,02	0,07±0,02	0,08±0,07		
	42	0,18±0,09	0,10±0,02	0,11±0,04	0,11±0,01	0,15±0,01		
1-Hexanol	1	0,06±0,02	TE	0,08±0,02	0,27±0,03	0,12±0,04	**	**
	14	0,06±0,00	0,06±0,01	0,05±0,00	0,02±0,00	0,09±0,03		
	28	0,04±0,00	0,04±0,01	TE	0,06±0,02	0,09±0,02		
	42	0,11±0,01	TE	0,07±0,0	TE	0,22±0,08		
1-Heptanol	1	0,05±0,01	0,03±0,00	0,05±0,01	0,08±0,00	0,03±0,00	**	-
	14	0,05±0,00	0,03±0,00	0,02±0,00	0,03±0,00	0,07±0,04		
	28	0,03±0,00	0,04±0,00	0,02±0,00	0,05±0,01	0,07±0,04		
	42	0,03±0,0	0,05±0,0	0,06±0,00	0,02±0,00	0,15±0,09		
2-Ethyl hexanol	1	0,10±0,03	0,07±0,01	0,05±0,01	TE	0,13±0,04	*	**
	14	0,10±0,03	0,09±0,04	0,12±0,03	0,17±0,02	0,25±0,14		
	28	0,09±0,02	0,15±0,04	0,12±0,03	0,17±0,06	0,11±0,02		
	42	0,16±0,03	0,14±0,01	0,12±0,05	0,14±0,02	0,15±0,03		

Tablo 55. (devam)

1-Octanol	1	0,07±0,02	0,05±0,01	0,04±0,01	TE	0,05±0,01		
	14	0,15±0,01	0,08±0,01	0,04±0,00	0,06±0,01	0,06±0,02	**	**
	28	0,04±0,00	0,05±0,00	0,04±0,0	0,04±0,01	0,06±0,02		
	42	0,04±0,01	0,05±0,00	0,06±0,01	0,05±0,01	0,13±0,06		
1-Nonanol	1	0,02±0,00	0,05±0,01	0,07±0,02	TE	0,06±0,02		
	14	0,15±0,01	0,34±0,05	0,04±0,00	TE	0,09±0,02	**	**
	28	0,08±0,02	0,07±0,01	0,04±0,00	0,07±0,02	0,25±0,02		
	42	0,04±0,01	TE	0,04±0,00	TE	0,22±0,00		
6-Methyl-1-octanol	1	TE	0,03±0,00	0,07±0,01	0,05±0,00	TE		
	14	TE	0,37±0,06	TE	0,04±0,00	TE	**	**
	28	0,12±0,05	0,05±0,00	0,03±0,00	0,17±0,05	0,12±0,05		
	42	TE	0,03±0,01	0,04±0,00	0,05±0,01	0,06±0,02		

*(p<0,05) düzeyinde önemli; ** (p<0,01) düzeyinde önemli

Karboksilik asitler

Fermente süt ürünlerinin ekimsi tadından sorumlu olan asit bileşikleri, amino asitlerin yıkımı, lipoliz ya da laktoz fermentasyonu sonucu oluşmaktadır (Dan *et al.* 2019a). Asitlerin aynı zamanda metil ketonların, alkollerin, laktonların ve esterlerin oluşumu için nc bileşikler olduğu ifade edilmektedir (Dan *et al.* 2018).

Fermente süt örneklerinde depolama süresince belirlenen asit bileşikleri varyans analizi sonuçları ile birlikte Tablo 56'da verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarından kültür ilavesinin etkisi hexanoic acid dışındaki diğer asitlerde; depolama süresinin etkisi ise propiolic acid ve hexanoic acid haricindeki diğer bileşiklerde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Fermente süt örneklerinde toplam 7 adet asit bileşiği tespit edilmiş, acetic acid ve hexanoic acid tüm örneklerde hakim asit bileşikleri olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde yapılan bir çalışmada *L. plantarum* K25 ile fermente edilen sütlerde 7 adet karboksilik asit bileşiğinin belirlendiği, bunlar arasında acetic acid, hexanoic acid, octanoic acid ve benzoic acid bileşiklerinin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu belirtilmiştir (Min *et al.* 2020).

Süt rnlerinde sirke tadı ile karakterize edilen acetic acid miktarının B, C ve D örneklerinde genel olarak depolama süresince arttığı, depolamanın 42. gününde B ve D örneklerinde diğer örneklerle oranla daha yüksek düzeyde belirlendiği tespit edilmiştir. Zareba *et al.* (2014) *L. casei* DN-114 001 tarafından fermente edilen sütlerde acetic acid bileşiğinin depolama boyunca baskın olduğunu bildirmiştir. Dan *et al.* (2017) *S. thermophilus* IMAU80842 ve *L. bulgaricus* IMAU20401 sularını tek ve bir arada kullanarak ürettikleri fermente sütlerin tümünde yüksek düzeyde acetic acid tespit etmişlerdir.

Fermente sütlerde baskın asitlerden bir diğeri olan hexanoic acid miktarının örneklerin tümünde benzer olduğu ve depolama süresince değişiminin istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir. Dan *et al.* (2019b) 17 farklı *L. bulgaricus* suunu kullandıkları bir çalışmada B4, B6, B7, B12 ve B16 sularının bulunduğu fermente sütlerde hexanoic acid miktarının kontrol suuna kıyasla daha yüksek miktarda olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer olarak Beltran-Barrientos *et al.* (2019) *L. lactis* NRRL B-50571 ve NRRL B-50572 sularının bulunduğu fermente sütlerde asit bileşiklerinden hexanoic acid ve octanoic acid konsantrasyonlarının yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Yoğurt ve benzeri fermente sütlerde karakteristik aromasının oluşumunda etkili olan Lactic acid'in ise depolama süresince artış ve azalışlar sergilediği, bununla birlikte en yüksek konsantrasyona D rneğinde depolamanın 42. gününde ulaştığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda A rneğinde 28. günden itibaren, C rneğinde ise 14. günden itibaren belirlenememiştir. E rneğinde depolamanın 1. gününde tespit edilemezken depolamanın sonunda yüksek miktarda

oluştugu gözlenmiştir. Nitekim lactic acid bileşiğinin düşük uçuculuğa sahip olmasına rağmen yoğurt ve benzeri fermente sütlerin tipik aroma/lezzetine büyük ölçüde katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Cheng 2010). Propiolic acid, bütanoic acid ve octanoic acid bileşikleri nispeten düşük konsantrasyonda olmakla birlikte fermente süt örneklerinin tümünde saptanmıştır. Söz konusu bileşiklerin miktarlarının örneklerde benzer aralıklarda olduğu ve depolama süresinceki değişiminin çoğunlukla önemli olmadığı tespit edilmiştir.

Esterler

Esterler; diğer aroma bileşiklerine göre daha kompleks reaksiyonlar ile oluşmakta, genel olarak alkolizis ile ya da alkol ve karboksilik asitlerin esterifikasyon reaksiyonları sonucunda meydana gelmektedirler (Yılmaz 2019). Fermente süt ürünlerinde genellikle meyvemsi veya çiçeğimsi aroma ile karakterize edilen ester bileşiklerinin algılama eşiğinin alkollerden daha düşük olduğu, bu nedenle süt ürünlerinin aroması üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Dan *et al.* 2018; Farag *et al.* 2021; Tylewicz *et al.* 2022). Ayrıca yağ asitleri ve aminlerin neden olduğu keskin ve acı tadı baskılayarak aromaya katkıda bulunduğu ifade edilmiştir (Cheng 2010). Bazı LAB suşlarının esteraz enzimine sahip olduğu ve aromatik ester bileşiklerini gliserid ve alkollerden direkt olarak üretebildiği belirtilmiştir (Hu *et al.* 2020).

Fermente süt örneklerinde depolama süresince belirlenen ester bileşikleri varyans analizi sonuçları ile birlikte Tablo 57’de verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarından kültür ilavesinin etkisi 2-methyl-methyl pentanoate ve ethyl hexanoate haricindeki bileşiklerde; depolama süresinin etkisi ise 1,1- dimethyl propyl hexanoate dışındaki bileşiklerde $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Fermente süt örneklerinde toplam 6 adet ester bileşiği tespit edilmiş, ethyl acetate en yüksek konsantrasyonda belirlenen ester bileşiği olarak saptanmıştır.

Ethanol ve acetic acid arasındaki esterleşme reaksiyonu sonucu oluşan ethyl acetate B ve C örneklerinde depolamanın 1. gününde tespit edilememiş, ancak depolamanın ilerleyen günlerinde tüm örneklerde diğer bileşiklere göre yüksek konsantrasyonlarda saptanmıştır. Özellikle A ve B örneklerinde depolamanın 42. gününde en yüksek konsantrasyonlara ulaştığı gözlenmiştir. Wang *et al.* (2021) keçi sütünden üretilen kefir örneklerinde tespit edilen esterler arasında ethyl acetate’ın en baskın ester bileşiği olduğunu bildirmişlerdir. Ticari yoğurtların aroma profilinin incelendiği bir çalışmada 10 adet yoğurt örneğinden 8’inde ethyl acetate tespit edildiği rapor edilmiştir (Güler and Park 2011). Yoğurt kültürü ile *L. rhamnosus*’un tek ve yardımcı kültür olarak farklı oranlarda kullanıldığı bir çalışmada ise ethyl acetate bileşiğinin tüm örneklerde belirlendiği ifade edilmiştir (Xu *et al.* 2006).

Tablo 56. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Karboksilik Asit Bileşikleri (µg/100g)

Bileşik	Dep. Sür. (Gün)	Örnekler					ANOVA	
		A	B	C	D	E	Kültür İlavesi	Dep. Sür.
Propiolic acid	1	1,02±0,26	1,33±0,31	1,77±0,74	1,42±0,17	1,64±0,80	**	-
	14	0,72±0,08	1,39±0,56	0,93±0,05	1,07±0,28	2,00±0,76		
	28	1,43±0,67	1,37±0,70	1,09±0,09	1,09±0,28	1,32±0,09		
	42	1,15±0,51	1,59±0,67	0,87±0,05	1,11±0,16	1,56±0,24		
Acetic acid	1	2,91±1,10	1,77±0,42	1,70±0,66	2,14±1,16	2,20±0,99	**	**
	14	2,80±0,82	4,51±1,45	2,66±0,97	3,87±0,64	3,76±1,43		
	28	3,63±0,76	3,55±0,87	2,87±1,05	4,02±1,05	1,78±0,09		
	42	2,17±1,04	6,09±0,15	3,64±1,18	5,65±0,02	1,81±0,93		
Bütanoic acid	1	0,99±0,12	0,82±0,19	0,85±0,24	0,51±0,05	0,26±0,08	**	*
	14	0,74±0,19	1,20±0,52	0,38±0,22	0,72±0,32	0,79±0,25		
	28	0,54±0,15	0,71±0,22	0,66±0,13	0,53±0,07	0,60±0,14		
	42	0,86±0,22	0,91±0,23	0,77±0,19	0,93±0,39	0,81±0,20		
Lactic acid	1	0,57±0,29	0,40±0,09	0,39±0,19	0,56±0,24	TE	**	**
	14	0,73±0,18	0,98±0,16	TE	0,71±0,38	0,79±0,15		
	28	TE	0,51±0,07	TE	0,62±0,25	0,17±0,01		
	42	TE	0,93±0,14	TE	1,58±0,30	1,00±0,41		
Hexanoic acid	1	1,90±0,60	1,21±0,53	1,28±0,31	2,03±0,99	1,33±0,60	-	-
	14	1,85±0,65	1,98±0,53	1,62±0,24	2,31±0,69	2,31±0,99		
	28	1,44±0,60	1,74±0,75	1,73±0,43	2,31±1,07	1,69±0,59		
	42	1,50±0,66	2,12±0,60	2,02±0,54	2,38±0,88	1,67±0,17		
Benzoic Acid	1	1,20±0,41	0,84±0,20	TE	0,11±0,01	0,04±0,01	**	**
	14	0,77±0,09	1,02±0,17	TE	TE	TE		
	28	TE	0,83±0,15	TE	TE	TE		
	42	TE	TE	TE	TE	0,86±0,10		
Octanoic Acid	1	0,75±0,33	0,52±0,17	0,53±0,15	1,25±0,61	0,68±0,35	**	**
	14	1,05±0,34	0,90±0,33	0,64±0,14	1,12±0,41	1,24±0,55		
	28	0,83±0,21	0,80±0,13	0,89±0,12	1,27±0,32	1,04±0,19		
	42	0,95±0,29	1,33±0,37	1,12±0,50	1,36±0,38	0,91±0,09		

*(p<0,05) düzeyinde önemli; ** (p<0,01) düzeyinde önemli

Tablo 57. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Ester Bileşikleri (µg/100g)

Bileşik	Dep. Sür. (Gün)	Örnekler					ANOVA	
		A	B	C	D	E	Kültür İlavesi	Dep. Sür.
Ethyl acetate	1	0,18±0,08	TE	TE	0,07±0,03	0,20±0,12		
	14	0,26±0,14	0,34±0,05	0,33±0,17	0,74±0,40	0,50±0,16	**	**
	28	0,07±0,00	0,62±0,36	0,41±0,12	0,43±0,13	0,55±0,24		
	42	1,69±0,49	2,86±1,01	0,36±0,18	0,34±0,01	0,53±0,20		
Methyl butanoate	1	TE	0,13±0,04	0,08±0,02	TE	TE		
	14	0,06±0,02	0,04±0,01	0,10±0,03	0,08±0,03	0,14±0,08	**	**
	28	0,06±0,00	0,12±0,03	0,09±0,05	0,06±0,01	0,10±0,03		
	42	0,12±0,05	0,07±0,01	0,07±0,01	0,07±0,02	0,11±0,04		
2-Methyl-methyl pentanoate	1	0,10±0,04	0,08±0,03	0,08±0,03	0,07±0,02	0,19±0,07		
	14	0,08±0,02	0,08±0,02	0,10±0,02	0,10±0,03	0,11±0,02	-	**
	28	0,12±0,02	0,11±0,01	0,13±0,01	0,13±0,02	0,11±0,00		
	42	0,13±0,01	0,17±0,05	0,11±0,04	0,13±0,00	0,11±0,00		
Ethyl hexanoate	1	0,07±0,01	0,09±0,02	0,06±0,03	0,07±0,01	0,09±0,05		
	14	0,09±0,02	0,07±0,02	0,10±0,02	0,10±0,01	0,10±0,02	-	**
	28	0,08±0,00	0,10±0,00	0,09±0,01	0,11±0,01	0,10±0,01		
	42	0,11±0,02	0,11±0,01	0,14±0,01	0,11±0,02	0,14±0,01		
Methyl octanoate	1	TE	TE	TE	TE	TE		
	14	TE	TE	TE	TE	TE	**	**
	28	TE	0,03±0,00	0,04±0,02	TE	0,05±0,00		
	42	0,04±0,01	0,06±0,00	0,06±0,02	0,06±0,02	0,09±0,06		
1,1- Dimethyl propyl hexanoate	1	0,08±0,03	0,08±0,02	0,07±0,01	TE	0,10±0,03		
	14	0,10±0,01	0,04±0,00	0,08±0,00	0,08±0,01	0,08±0,02	**	-
	28	0,05±0,00	0,07±0,01	0,07±0,00	0,07±0,01	0,06±0,00		
	42	0,07±0,01	0,07±0,01	0,10±0,04	0,07±0,01	0,07±0,00		

*(p<0,05) düzeyinde önemli; ** (p<0,01) düzeyinde önemli

Diğer ester bileşiklerinin (Methyl butanoate, 2-methyl-methyl pentanoate, ethyl hexanoate ve 1,1- dimethyl propyl hexanoate) konsantrasyonları açısından örnekler arasında önemli farklılıkların olmadığı ve depolama süresince dalgalanmalar olduğu gözlenmiştir. Li *et al.* (2020) *S. thermophilus*, *B. animalis* ve *L. plantarum* suşlarını kullanarak ürettikleri fermente sütlerin toplam ester miktarında 21 günlük depolama periyodu boyunca artış ve azalışlar olduğunu bildirmişlerdir.

Terpenler

Terpenlerin; doğada, özellikle bitkilerin uçucu yağlarının ana bileşenleri olduğu (Dastager 2009), süt ürünlerinde bulunan terpenlerin hayvanlar tarafından tüketilen otlardan süte ve sütten de süt mamüllerine geçtiği bildirilmiştir (Bezerra *et al.* 2017). Dolayısıyla terpenlerin fermente süt ürünlerinde metabolik reaksiyonlar sonucu oluşmadığı ve bu bileşiklerin varlığının süt mamülünün yapıldığı coğrafi bölge ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir (Yılmaz, 2019). Fermente süt örneklerinde depolama süresince farklı konsantrasyonlarda sabinene, limonene, 1,8-cineole (eucalyptol) ve linalool tespit edilmiştir (Tablo 58). Yapılan bazı çalışmalarda da limonene bileşiğinin fermente sütlerde belirlendiği rapor edilmiştir (Xu *et al.* 2005; Min *et al.* 2020).

Tablo 58. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Terpen Bileşikleri ($\mu\text{g}/100\text{g}$)

Bileşik	Dep. Sür. (Gün)	Örnekler					ANOVA	
		A	B	C	D	E	Kültür İlavesi	Dep. Sür.
Sabinene	1	0,91±0,31	TE	TE	TE	TE		
	14	0,91±0,10	0,92±0,15	0,72±0,03	0,81±0,13	1,68±0,47	**	**
	28	0,72±0,06	1,28±0,21	0,94±0,12	0,91±0,30	0,99±0,13		
	42	1,10±0,29	1,02±0,05	0,79±0,31	0,91±0,21	1,19±0,09		
Limonene	1	TE	TE	TE	TE	0,07±0,02		
	14	0,24±0,15	0,24±0,11	0,30±0,22	0,40±0,24	1,11±0,19	**	**
	28	0,22±0,05	0,30±0,10	0,30±0,18	0,21±0,07	0,40±0,19		
	42	0,73±0,37	0,53±0,11	0,63±0,18	0,38±0,13	0,76±0,21		
1,8-Cineole (Eucalyptol)	1	0,24±0,08	0,14±0,05	0,10±0,03	TE	0,07±0,02		
	14	0,23±0,12	0,19±0,05	0,08±0,02	0,17±0,00	0,16±0,04	*	**
	28	0,14±0,05	0,09±0,04	0,33±0,24	0,18±0,07	0,36±0,17		
	42	0,43±0,20	0,62±0,04	0,60±0,17	0,71±0,21	1,09±0,46		
Linalool	1	0,14±0,04	0,09±0,01	0,11±0,05	0,37±0,04	0,20±0,12		
	14	0,39±0,14	0,28±0,13	0,14±0,07	0,32±0,12	0,40±0,29	**	**
	28	0,21±0,11	0,31±0,09	0,40±0,11	0,27±0,13	0,56±0,27		
	42	0,68±0,12	0,65±0,10	0,76±0,23	0,84±0,28	1,23±0,63		

*(p<0,05) düzeyinde önemli; ** (p<0,01) düzeyinde önemli

Aldehitler

Aldehitler; genellikle amino asitlerin transaminasyon ve dekarboksilasyon reaksiyonları sonucu oluşmakta, aynı zamanda doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile meydana gelen hidroperoksitlerden de üretilmektedir (Cheng 2010; Chen *et al.* 2017). Aldehitlerin nispeten aktif kimyasal özelliklerinden dolayı kolaylıkla asit veya alkollere dönüştükleri, bu yüzden fermente sütlerde geçici bileşikler oldukları bildirilmiştir (Dan *et al.* 2019a). Bunun yanı sıra hexanal, heptanal ve nonanal gibi düz zincirli aldehit bileşiklerinin fermente sütlerde yaygın olarak bulunduğu ve çimensi/otsu aroma ile karakterize edildiği belirtilmiştir (Beltran-Barrientos *et al.* 2019; Dan *et al.* 2019a).

Fermente süt örneklerinde hexanal, heptanal, octanal ve nonanal olmak üzere dört adet aldehit bileşiği tespit edilmiş, depolama süresince belirlenen aldehit bileşikleri varyans analizi sonuçları ile birlikte Tablo 59’da sunulmuştur. Varyans analizi sonuçlarından belirlenen tüm aldehit bileşikleri üzerine kültür ilavesinin etkisi ile depolama süresince meydana gelen değişim istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Genel olarak tüm fermente süt örneklerinde aldehit konsantrasyonlarının oldukça düşük olduğu, bunula birlikte E örneğinde belirlenen aldehit konsantrasyonlarının diğer örneklere oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Tablo 59). Aldehit bileşikleri içerisinde hexanal özellikle E örneğinde depolamanın 14. gününde en yüksek konsantrasyonda tespit edilmiştir. Benzer şekilde Dan *et al.* (2019a) yoğurt starterlerine ilaveten farklı oranlarda (1:1, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:1000) *L. plantarum* P-8 suşunu kullanarak ürettikleri fermente sütlerde, aldehit bileşikleri arasında en yüksek konsantrasyonların hexanal bileşiğine ait olduğunu bildirmişlerdir. Wang *et al.* (2021) ise keçi sütü kefirinde sadece iki adet aldehit bileşiği (hexanal ve benzaldehyde) tespit ettiklerini ve toplam miktarlarının %3’den fazla olmadığını rapor etmişlerdir. Bu durumun nedeni olarak aldehitlerin kararsız ve hızlıca oksitlenebilen ara bileşikler olduğunu, bu yüzden düşük konsantrasyonda kaldığını ifade etmişlerdir.

Fermente süt örneklerine ait aldehit bileşiklerinde depolama boyunca artış ve azalışlar olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun daha önce de bahsedildiği üzere aldehitlerin kararsız bileşikler olması ve depolama süresince diğer uçucu bileşiklere (alkol veya asit) dönüşmesiyle ilgili olabileceği düşünülmektedir. Heptanal depolama günlerinin tümünde sadece A örneğinde tespit edilememiştir. Li *et al.* (2020) *S. thermophilus*, *B. animalis* ve *L. plantarum* suşlarını kullanarak ürettikleri fermente sütlerde total aldehit miktarının 21 günlük depolama süresince azaldığını ifade etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise yoğurt starter kültürlerine ilaveten *L. plantarum* K25 suşunun kullanıldığı fermente sütlere ait aldehit bileşiklerinde depolama boyunca artış ve azalışlar olduğu tespit edilmiştir (Min *et al.* 2020).

Tablo 59. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Aldehit Bileşikleri ($\mu\text{g}/100\text{g}$)

Bileşik	Dep. Sür. (Gün)	Örnekler					ANOVA	
		A	B	C	D	E	Kültür İlavesi	Dep. Sür.
Hexanal	1	0,06±0,03	0,05±0,00	0,14±0,04	0,15±0,06	0,14±0,06	**	**
	14	0,10±0,07	0,11±0,06	0,16±0,04	0,29±0,11	1,20±0,20		
	28	0,09±0,02	0,35±0,19	0,14±0,03	0,21±0,08	0,67±0,17		
	42	0,15±0,03	0,36±0,16	0,18±0,10	0,10±0,03	0,38±0,17		
Heptanal	1	TE	TE	TE	TE	0,04±0,01	**	**
	14	TE	TE	0,04±0,00	0,03±0,00	0,15±0,06		
	28	TE	0,05±0,00	0,05±0,01	0,09±0,03	0,11±0,09		
	42	TE	0,11±0,01	0,06±0,02	TE	0,17±0,00		
Octanal	1	0,07±0,02	0,06±0,01	TE	TE	0,06±0,02	**	**
	14	0,04±0,01	0,07±0,03	0,05±0,00	0,07±0,03	0,20±0,09		
	28	0,04±0,00	0,08±0,04	0,03±0,00	0,05±0,01	0,07±0,04		
	42	0,04±0,00	0,07±0,04	0,07±0,01	0,04±0,00	0,16±0,07		
Nonanal	1	0,17±0,08	0,09±0,03	0,07±0,01	0,03±0,00	0,10±0,05	**	*
	14	0,09±0,06	0,09±0,07	0,07±0,03	0,11±0,02	0,19±0,12		
	28	0,07±0,01	0,12±0,02	0,08±0,02	0,10±0,05	0,12±0,04		
	42	0,08±0,03	0,11±0,01	0,12±0,03	0,08±0,00	0,30±0,05		

*(p<0,05) düzeyinde önemli; ** (p<0,01) düzeyinde önemli

Diğer bileşikler

Fermente süt örneklerinde depolama süresince tespit edilen diğer bileşikler varyans analizi sonuçları ile birlikte Tablo 60'da verilmiştir. Buna göre fermente süt örneklerinde toluene, hydroxyurea, methanethiol, borane-methyl sulfide, methylene chloride, hexane, dimethyl disulfide, 2,4-dimethyl undecane ve 3,7-dimethyl-1,3,6-octatriene olmak üzere 10 adet uçucu bileşik tespit edilmiştir. Bu bileşikler arasında hexane, hydroxyurea ve methylene chloride yüksek konsantrasyonlarda belirlenmiştir.

Hidrokarbon bileşiklerinden olan toluene, hexane, 2,4-dimethyl undecane ve 3,7-dimethyl-1,3,6-octatriene fermente süt örneklerinde tespit edilmiştir. En yüksek konsantrasyonun hexane bileşiğine ait olduğu, bu miktarın özellikle depolamanın 14. gününde önemli derecede arttığı saptanmıştır. Bir çalışmada yoğurt kültürü ve *L. plantarum* P-8 suşu farklı oranlarda fermente süt üretiminde kullanılmış ve örneklerde farklı konsantrasyonlarda hexane bileşiği tespit edilmiştir (Dan *et al.* 2019a). Conurso *et al.* (2008) yoğurt örneklerinde; Dan *et al.* (2017) ise *L. bulgaricus* IMAU20401 suşunun kullanıldığı fermente sütlerde toluene bileşiğinin tespit edildiğini rapor etmişlerdir. Hidrokarbon bileşiklerinin, algılama eşik düzeylerinin yüksek olması nedeniyle fermente süt ürünlerinin aroması üzerinde önemli etkilerinin olmadığı ve temel aroma bileşiği olarak kabul edilmediği öne sürülmektedir (Li *et al.* 2020; Zhou *et al.* 2021). Ancak belli konsantrasyonlarda oldukları zaman fermente sütlere daha dolgun bir tat verdikleri bildirilmiştir (Dan *et al.* 2019a). Li *et al.* (2020) *S. thermophilus*, *B. animalis* ve *L. plantarum* suşlarını kullanarak ürettikleri fermente sütlerde, depolama periyodu sonunda en fazla bulunan bileşik grubunun hidrokarbonlar olduğunu belirtmişlerdir. Farklı LAB' ların kullanıldığı bir çalışmada ise *L. helveticus*'un bulunduğu fermente keçi sütünde hidrokarbon miktarının arttığı bildirilmiştir (Muelas *et al.* 2018).

Diğer bileşikler arasından hydroxyurea ve methylene chloride konsantrasyonlarının daha yüksek olduğu, ancak depolama süresince genel olarak önemli ölçüde değişmediği gözlenmiştir. Methanethiol, borane-methyl sulfide ve dimethyl disulfide konsantrasyonları açısından ise örnekler arasında önemli derecede farklılıkların bulunmadığı saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada *L. casei* GBHM-21 suşunun bulunduğu farklı yağ oranlarına sahip fermente sütlerde dimethyl disulfide bileşiğinin sadece bir örnekte tespit edildiği bildirilmiştir. Nispeten düşük seviyelerde kalsalar da bu tür bileşiklerin fermente sütlerin aromasında önemli rol oynadıkları belirtilmiştir (Bao *et al.* 2016).

Tablo 60. Fermente Süt Örneklerinde Depolama Süresince Belirlenen Diğer Bileşikler (µg/100g)

Bileşik	Dep. Sür. (Gün)	Örnekler					ANOVA	
		A	B	C	D	E	Kültür İlavesi	Dep. Sür.
Hydroxyurea	1	0,81±0,17	0,92±0,21	1,37±0,43	1,46±0,70	1,46±0,57		
	14	0,95±0,35	1,28±0,62	1,18±0,49	1,24±0,40	1,55±0,29	**	**
	28	1,04±0,35	TE	1,36±0,14	1,52±0,49	1,53±0,40		
	42	1,74±0,56	TE	TE	TE	1,38±0,10		
Methanethiol	1	1,20±0,55	0,63±0,20	TE	TE	0,39±0,15		
	14	0,42±0,13	0,43±0,18	0,39±0,13	0,53±0,27	0,59±0,12	**	-
	28	TE	0,61±0,27	0,41±0,08	0,48±0,24	0,49±0,16		
	42	TE	0,38±0,02	0,32±0,02	0,43±0,11	0,63±0,20		
Borane-methyl sulfide	1	0,39±0,15	0,35±0,13	0,25±0,07	0,31±0,05	0,32±0,11		
	14	0,24±0,03	0,29±0,11	0,34±0,01	0,27±0,04	0,33±0,06		
	28	0,36±0,06	0,35±0,15	0,31±0,05	0,30±0,10	0,31±0,04	-	-
	42	0,26±0,07	0,35±0,11	0,18±0,03	0,33±0,04	0,35±0,03		
Methylene chloride	1	0,56±0,07	0,36±0,22	0,52±0,22	0,86±0,43	1,53±0,61		
	14	1,27±0,54	2,15±1,05	1,45±0,24	2,01±0,76	3,75±1,42	**	**
	28	1,38±0,22	1,33±0,18	1,16±0,08	1,53±0,87	0,89±0,26		
	42	1,50±0,38	1,67±0,79	1,33±0,37	1,68±0,69	1,25±0,32		
Hexane	1	2,81±1,17	0,43±0,08	0,52±0,25	2,77±1,21	8,65±2,02		
	14	8,88±5,53	5,70±1,55	10,13±9,35	11,34±6,20	13,97±9,72	-	**
	28	5,64±1,89	10,74±9,89	4,83±0,74	4,66±1,29	4,51±1,50		
	42	6,13±0,59	5,66±1,45	4,95±1,28	5,46±0,83	7,40±0,52		
Dimethyl disulfide	1	TE	TE	TE	TE	0,06±0,01		
	14	0,07±0,03	0,07±0,02	0,11±0,06	0,07±0,04	0,08±0,03		
	28	0,07±0,01	0,07±0,02	0,05±0,02	0,09±0,00	0,07±0,04	-	**
	42	0,07±0,04	0,09±0,06	0,04±0,02	0,13±0,06	0,13±0,05		

Tablo 60. (devam)

2,4-Dimethyl undecane	1	0,03±0,01	0,03±0,00	0,03±0,01	TE	TE		
	14	0,03±0,00	0,06±0,03	0,02±0,00	0,04±0,00	0,05±0,02	**	**
	28	0,02±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00	0,05±0,03	0,01±0,00		
	42	0,02±0,00	0,06±0,01	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00		
3,7-Dimethyl- 1,3,6-octatriene	1	TE	TE	TE	TE	TE		
	14	TE	TE	TE	TE	TE	**	**
	28	TE	TE	0,02±0,00	TE	0,03±0,00		
	42	0,03±0,01	0,02±0,00	0,03±0,01	0,04±0,00	0,07±0,00		
Oxime-methoxy phenyl	1	0,14±0,00	0,09±0,04	0,17±0,11	0,09±0,05	0,11±0,05		
	14	0,13±0,04	0,14±0,11	0,19±0,08	0,09±0,02	0,09±0,05	*	-
	28	0,10±0,02	0,09±0,07	0,09±0,05	0,17±0,03	0,09±0,06		
	42	0,18±0,08	0,03±0,02	0,09±0,03	0,06±0,01	0,05±0,03		
Toluene	1	0,05±0,01	0,03±0,00	0,05±0,01	0,16±0,01	0,16±0,10		
	14	0,18±0,07	0,27±0,15	0,14±0,07	0,35±0,13	0,27±0,13	-	**
	28	0,09±0,06	0,21±0,04	0,15±0,08	0,18±0,08	0,12±0,06		
	42	0,37±0,17	0,23±0,11	0,25±0,14	0,26±0,05	0,29±0,12		

*(p<0,05) düzeyinde önemli; ** (p<0,01) düzeyinde önemli

Fermente Süt Örneklerine Ait Duyusal Analiz Sonuçları

Depolama süresince fermente süt örneklerinin duyusal özelliklerinde meydana gelen değişimler panelistler tarafından değerlendirilmiş, duyusal değerlendirme sonucunda yapılan puanlama Tablo 61’de, duyusal analiz parametrelerine ait varyans analizi sonuçları ise Tablo 62’ de verilmiştir. Panelistler tarafından fermente süt örneklerinin renk-görünüş, yapı-tekstür, koku, tat-aroma, asitlik, yabancı tat-aroma ve genel kabul edilebilirlik özellikleri değerlendirilmiştir.

Tablo 61. Fermente Süt Örneklerinin Duyusal Analiz Sonuçları

Duyusal Parametreler	Dep. Sür. (Gün)	Örnekler				
		A	B	C	D	E
Renk ve Görünüş	1	8,45±0,08 ^{a,BC}	8,33±0,19 ^{ab,CD}	8,75±0,28 ^{a,A}	8,62±0,08 ^{a,AB}	8,17±0,00 ^{a,D}
	14	8,16±0,19 ^{b,C}	8,58±0,09 ^{a,A}	8,21±0,20 ^{b,BC}	8,37±0,25 ^{ab,ABC}	8,49±0,23 ^{b,AB}
	28	8,50±0,00 ^{a,A}	8,37±0,25 ^{a,A}	8,25±0,28 ^{b,A}	8,37±0,25 ^{ab,A}	8,50±0,00 ^{a,A}
	42	8,25±0,09 ^{b,B}	8,08±0,09 ^{b,C}	8,25±0,09 ^{b,B}	8,12±0,08 ^{b,BC}	8,58±0,09 ^{a,A}
Yapı ve Tekstür	1	7,91±1,05 ^{a,A}	7,67±0,57 ^{a,A}	7,75±0,66 ^{a,A}	7,75±0,28 ^{a,A}	7,41±0,09 ^{b,A}
	14	7,25±0,48 ^{a,A}	7,25±0,28 ^{a,A}	7,50±0,19 ^{a,A}	7,17±0,57 ^{a,A}	7,50±0,38 ^{b,A}
	28	7,75±0,28 ^{a,A}	7,83±0,19 ^{a,A}	8,08±0,09 ^{a,A}	7,33±0,38 ^{a,B}	8,00±0,00 ^{a,A}
	42	7,41±1,25 ^{a,A}	7,58±0,28 ^{a,A}	7,91±0,09 ^{a,A}	7,66±0,23 ^{a,A}	7,50±0,19 ^{b,A}
Koku	1	8,25±0,28 ^{a,A}	8,35±0,17 ^{a,A}	8,25±0,28 ^{a,A}	8,35±0,17 ^{a,A}	8,25±0,28 ^{a,A}
	14	8,05±0,19 ^{a,A}	8,15±0,52 ^{a,A}	8,25±0,29 ^{a,A}	8,37±0,25 ^{a,A}	8,07±0,29 ^{a,A}
	28	8,25±0,28 ^{a,A}	8,15±0,40 ^{a,A}	8,37±0,25 ^{a,A}	8,00±0,00 ^{b,A}	8,25±0,28 ^{a,A}
	42	7,95±0,28 ^{a,C}	8,10±0,11 ^{a,ABC}	8,25±0,05 ^{a,AB}	8,35±0,17 ^{a,A}	8,00±0,00 ^{a,BC}
Tat ve Aroma	1	7,66±0,38 ^{a,A}	8,10±0,46 ^{a,A}	8,15±0,40 ^{a,A}	8,25±0,05 ^{a,A}	8,20±0,46 ^{b,A}
	14	7,55±0,28 ^{a,B}	8,12±0,37 ^{a,A}	7,85±0,17 ^{a,AB}	8,12±0,15 ^{a,A}	8,00±0,00 ^{b,A}
	28	7,90±0,46 ^{a,B}	8,25±0,28 ^{a,AB}	8,25±0,29 ^{a,AB}	8,25±0,05 ^{a,AB}	8,65±0,17 ^{a,A}
	42	7,85±0,17 ^{a,A}	7,85±0,17 ^{a,A}	8,00±0,34 ^{a,A}	7,75±0,28 ^{b,A}	8,00±0,00 ^{b,A}
Asitlik	1	8,15±0,17 ^{a,A}	7,45±0,86 ^{a,B}	8,50±0,34 ^{a,A}	8,20±0,00 ^{a,A}	8,10±0,11 ^{a,A}
	14	7,90±0,11 ^{ab,A}	7,40±0,11 ^{a,B}	8,00±0,34 ^{b,A}	7,30±0,57 ^{b,B}	7,75±0,05 ^{b,AB}
	28	7,82±0,23 ^{b,A}	7,40±0,11 ^{a,B}	7,50±0,00 ^{c,B}	7,25±0,28 ^{b,B}	7,50±0,01 ^{c,B}
	42	7,27±0,20 ^{c,B}	6,87±0,15 ^{a,C}	7,75±0,28 ^{ab,A}	6,85±0,17 ^{b,C}	6,90±0,11 ^{d,C}
Yabancı Tat ve Aroma	1	8,66±0,19 ^{a,A}	8,50±0,19 ^{a,A}	8,66±0,20 ^{a,A}	8,58±0,09 ^{a,A}	8,58±0,10 ^{a,A}
	14	8,50±0,38 ^{a,A}	8,50±0,19 ^{a,A}	8,66±0,19 ^{a,A}	8,50±0,00 ^{ab,A}	8,41±0,09 ^{ab,A}
	28	8,50±0,00 ^{a,A}	8,50±0,00 ^{a,A}	8,41±0,16 ^{a,A}	8,25±0,28 ^{b,A}	8,33±0,19 ^{b,A}
	42	8,58±0,09 ^{a,A}	8,58±0,09 ^{a,A}	8,58±0,09 ^{a,A}	8,21±0,20 ^{b,B}	8,58±0,09 ^{a,A}
Genel Kabul Edilebilirlik	1	8,00±0,57 ^{a,A}	7,65±0,40 ^{ab,A}	8,35±0,63 ^{a,A}	8,15±0,17 ^{a,A}	8,00±0,34 ^{b,A}
	14	7,85±0,17 ^{a,AB}	7,25±0,28 ^{b,B}	8,10±0,46 ^{a,A}	7,50±0,57 ^{a,AB}	7,55±0,28 ^{c,AB}
	28	7,75±0,28 ^{a,C}	7,85±0,17 ^{a,BC}	8,25±0,28 ^{a,AB}	7,97±0,37 ^{a,BC}	8,40±0,11 ^{a,A}
	42	7,95±0,28 ^{a,A}	7,85±0,17 ^{a,A}	8,40±0,69 ^{a,A}	8,00±0,47 ^{a,A}	8,25±0,05 ^{ab,A}

^{a,b,c}: Aynı sütunda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden p<0,05 düzeyinde farklıdır.

^{A,B,C}: Aynı satırda üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden p<0,05 düzeyinde farklıdır.

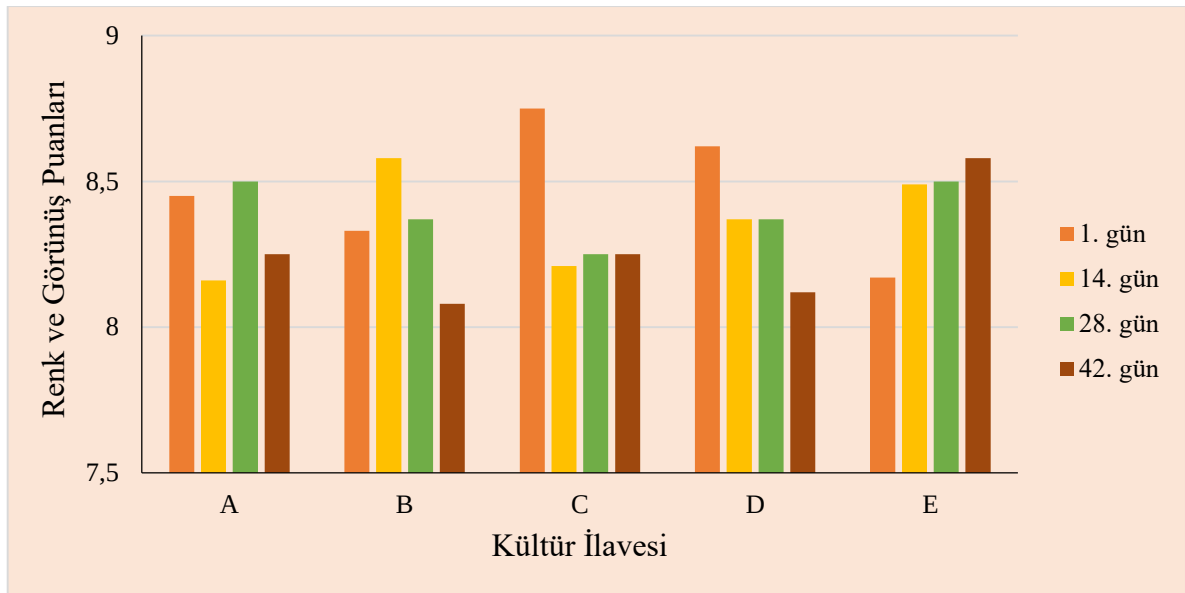
Tablo 62. Fermente Süt Örneklerinin Duyusal Parametrelerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	SD	F değeri						
		Renk ve Görünüş	Yapı ve Tekstür	Koku	Tat ve Aroma	Asitlik	Yabancı Tat ve Aroma	Genel Kabul Edilebilirlik
Kültür ilavesi (A)	4	0,80	0,97	1,17	5,84**	13,41**	3,31*	5,81**
Depolama süresi (B)	3	5,09**	3,31*	1,29	6,60**	35,77**	4,54**	5,72**
AxB	12	5,78**	0,66	0,93	1,11	2,23*	1,29	0,81
Hata	60							
Genel	80							

*(p<0,05) düzeyinde önemli; ** (p<0,01) düzeyinde önemli

Renk ve görünüş

Fermente süt örneklerinin panelistler tarafından verilen renk ve görünüş puanları Tablo 61’de verilmiştir. İlgili tabloya göre, en yüksek renk ve görünüş puanı (8,75) depolamanın 1. gününde C örneğinde, en düşük puan (8,08) ise depolamanın 42. gününde B örneğinde tespit edilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre renk ve görünüş puanları üzerine depolama süresi ve depolama süresi x kültür ilavesi interaksyonunun etkisi $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunurken, kültür ilavesinin etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 62). Fermente süt örneklerinin renk ve görünüş puanları üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisine ait grafik ise Şekil 29’da verilmiştir. Elde edilen sonuçlardan fermente sütlerin renk ve görünüş puanları üzerinde farklı kültür kombinasyonlarının bir etkisi olmadığı söylenebilir. Depolama süresince ise renk ve görünüşe ait puanlarda dalgalanmalar görülmekle birlikte; çok önemli sayılabilecek bir değişim gözlenmemiştir. Benzer şekilde El-Fattah *et al.* (2018) ticari yoğurt kültürü ve farklı LAB suşlarının (*L. cremoris*, *L. lactis*, *L. helveticus* Lh-B ve *L. rhamnosus* B-1445) bulunduğu fermente sütlerde depolama boyunca görünüş puanları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmadığını bildirmişlerdir. Farklı probiyotik suşlar (*L. rhamnosus* GG KCTC 12202BP, *L. plantarum* NK181, *L. delbrueckii* KU200171) ve kontrol olarak ticari yoğurt kültürünün kullanıldığı bir çalışmada ise probiyotik yoğurt örnekleri ile kontrol örneğine ait renk puanlarının benzer olduğu bildirilmiştir (Kim *et al.* 2021).



Şekil 28. Fermente süt örneklerinin renk ve görünüş puanları üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksyonunun etkisi

Şekil 29 incelendiğinde depolama süresince A, B, C örneklerinin renk ve görünüş puanlarında dalgalanmalar görülmektedir. D örneğinin renk ve görünüş puanlarında azalma görülürken, E örneğinde ilgili puanların arttığı gözlenmiştir.

Yapı ve tekstür

Fermente süt örneklerinin yapı ve tekstür puanlarına ait sonuçlar Tablo 61’de verilmiştir. Buna göre, en yüksek yapı ve tekstür puanı (8,08) depolamanın 28. gününde C örneğinde, en düşük puan (7,17) ise depolamanın 14. gününde D örneğinde tespit edilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre yapı ve tekstür puanlarına depolama süresinin etkisi $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunurken, kültür ilavesi ve depolama süresi x kültür ilavesi interaksyonunun etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p > 0,05$) (Tablo 62). Depolamanın 28. günü haricinde yapı ve tekstür puanları açısından örnekler arasında farklılığın bulunmadığı ve E örneği dışındaki örneklerin yapı ve tekstür puanlarının depolama süresinceki değişimlerinin istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir. Benzer olarak Lee *et al.* (2010) *L. plantarum* LHB55 suşunun kullanıldığı yoğurtlarda tekstür değerlerinin kontrol yoğurdu ile benzer olduğunu rapor etmişlerdir.

Koku

Fermente süt örneklerinin koku puanlarında depolama süresince görülen değişim Tablo 61’de verilmiştir. Buna göre; en düşük koku puanı (7,95) A örneğine depolamanın 42. gününde, en yüksek koku puanı (8,37) ise C örneğine depolamanın 28. gününde ve D örneğine depolamanın 14. gününde verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarından fermente süt örneklerinin

koku puanları üzerine kültür ilavesinin, depolama süresinin ve kültür ilavesi x depolama süresi interaksiyonunun etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$) (Tablo 62). Fermente süt örneklerinin depolamanın 42. günü dışında koku puanlarının birbirine benzer olduğu gözlenmiştir. Depolama süresince ise koku puanlarında artış ve azalışlar olmasına rağmen değişimlerin genelde istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır. Shan *et al.* (2015) *L. plantarum* NDC75017 ve yoğurt kültürünün bir arada kullanıldığı örnekler ile sadece yoğurt kültürünün kullanıldığı kontrol örneği arasında koku açısından önemli farklılıklar bulunmadığını ifade etmişlerdir.

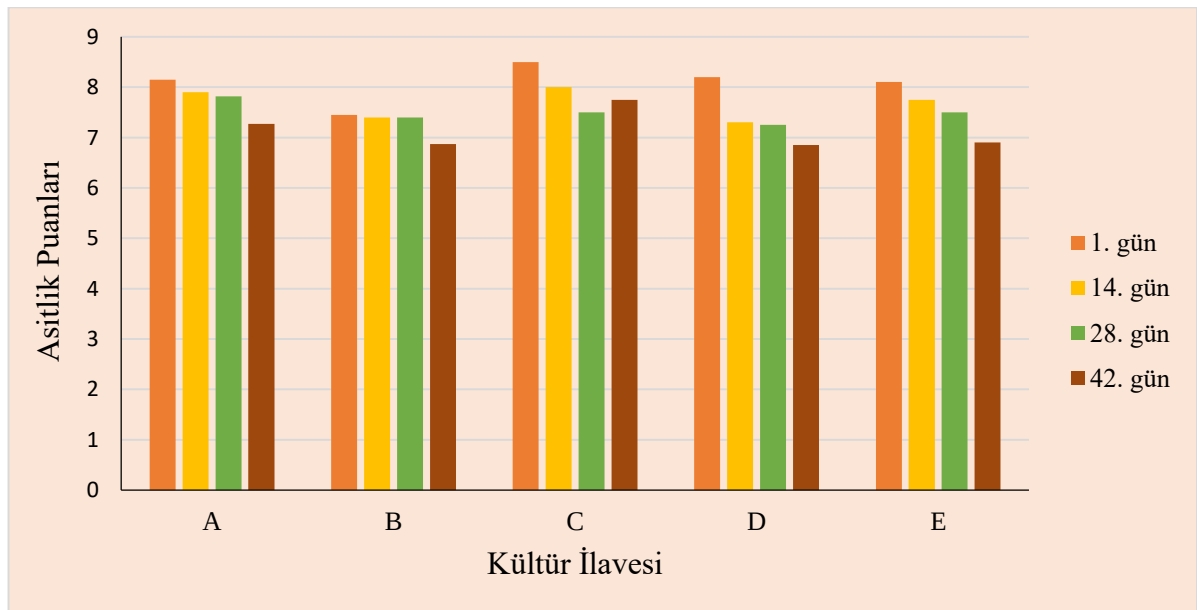
Tat ve aroma

Fermente süt örneklerine ait tat ve aroma puanları Tablo 61’de sunulmuştur. İlgili tablodan görüldüğü üzere panelistler tarafından en düşük tat ve aroma puanı (7,55) A örneğine depolamanın 14. gününde, en yüksek tat ve aroma puanı (8,65) ise E örneğine depolamanın 28. gününde verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre tat ve aroma puanlarına kültür ilavesi ve depolama süresinin etkisi $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Depolama süresi x kültür ilavesi interaksiyonunun etkisi ise istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 62). Tat ve aroma puanlarının tüm örneklerde depolamanın 1. gününde benzer olduğu, 14. ve 28. günlerde en düşük puanların A örneğine verildiği, 42. günde ise tüm örneklerin benzer tat ve aroma puanlarına sahip olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada *L. brevis* ATCC 14869 ve *L. brevis* KU200019 suşlarının bulunduğu yoğurtlarda aroma puanlarının kontrol yoğurdu ile benzer olduğu bildirilmiştir (Kariyawasam *et al.* 2021). *et al.* (2009) ise yoğurt kültürü ile fermente edilen deve sütlerinin tat puanlarının farklı LAB suşları (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. lactis*, *S. thermophilus*) ile fermente edilenlere kıyasla önemli derecede yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Yoğurt ve benzeri fermente sütlerde tat-aroma fermentasyon ve depolama sırasında LAB tarafından üretilen laktik asit ve diğer aroma bileşiklerinden etkilenmektedir. Mevcut sonuçlardan çok büyük farklılıklar olmamakla birlikte özellikle B, D ve E örneklerinin tat ve aroma açısından daha fazla beğenildiği söylenebilir. Söz konusu örneklerde kullanılan kültür kombinasyonlarının proteoliz düzeyleri ile uçucu aroma bileşiklerinin oluşumuna katkıda bulundukları ve bu durumun da tat ve aroma puanlarına yansıdığı düşünülmektedir. Diğer örneklerin de (A ve C) tat ve aroma puanlarının yüksek olduğu, fermente sütlerin üretiminde kullanılan tüm bakteri kombinasyonlarının tat ve aromayı olumsuz etkilemediği görülmektedir. Nitekim bazı LAB suşlarının sütün yapısını değiştirdiği ve yoğurtlarda istenmeyen tat ve koku oluşumuna yol açtığı belirtilmiştir (Hekmat and Reid 2006).

Asitlik

Fermente süt örneklerine panelistler tarafından verilen asitlik puanları Tablo 61’de sunulmuştur. En yüksek asitlik puanı (8,50) depolamanın 1. gününde C örneğinde, en düşük puan (6,85) ise depolamanın 42. gününde D örneğinde tespit edilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre asitlik puanları üzerine depolama süresi ve kültür ilavesinin etkisi $p<0,01$ düzeyinde, depolama süresi x kültür ilavesi interaksiyonunun etkisi ise $p<0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur (Tablo 62). Fermente süt örneklerinin asitlik puanları üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksiyonunun etkisine ait grafik Şekil 30’da verilmiştir.

Fermente süt örneklerine ait asitlik puanları arasında depolama süresince bazı farklılıkların bulunduğu, genel olarak A ve C örneğine verilen asitlik puanlarının daha yüksek olduğu görülmektedir. Asitlik puanları arasındaki farklılıkların kullanılan kültür kombinasyonlarının farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim A ve C örneklerine ait pH değerlerinin daha yüksek olduğu ve bu durumun duyu analizi sonuçlarına da yansıdığı görülmektedir (Tablo 17). Depolama süresince tüm örneklerde asitlik puanlarında düşüş olduğu belirlenmiş, bu durumun titrasyon asitliğinin artışına bağlı olabileceği kanısına varılmıştır. Nitekim pH’nın birçok duyu parametre üzerinde etkili olduğu, özellikle pH’da 0,4’lük bir farkın asitlik ve tat-aromayı önemli ölçüde etkilediği bildirilmiştir (Ott *et al.* 2000). Ranadheera *et al.* (2016) *L. acidophilus* LA-5, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 ve *Propionibacterium jensenii* 702 suşlarının kullanıldığı fermente süt içeceklerinde depolama sonunda çoğu duyu parametreye ait puanların düştüğünü ve bu durumun örneklerdeki asitlik artışından kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir.



Şekil 30. Fermente süt örneklerinin asitlik puanları üzerine kültür ilavesi x depolama süresi interaksiyonunun etkisi

Şekil 30 incelendiğinde fermente süt örneklerinin tümünde asitlik puanlarının depolamanın sonunda 1. güne göre azaldığı görülmektedir. A, B, D ve E örneklerinin asitlik puanlarında depolama boyunca azalma, C örneğinin söz konusu puanlarında ise dalgalanmalar olduğu belirlenmiştir.

Yabancı tat ve aroma

Fermente süt örneklerine ait yabancı tat ve aroma puanlarının 8,21 ile 8,66 arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 61). Varyans analizi sonuçlarına göre yabancı tat ve aroma puanlarına kültür ilavesinin etkisi $p<0,05$ düzeyinde, depolama süresinin etkisi $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Depolama süresi x kültür ilavesi interaksiyonunun etkisi ise istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 62). Yabancı tat ve aroma açısından fermente süt örnekleri arasında 42. gün dışında istatistiksel olarak farklılık bulunmamış, depolama süresince ise D ve E örnekleri dışında önemli derecede bir değişim kaydedilmemiştir. Mevcut sonuçlardan fermente süt örneklerinin üretiminde starter olarak kullanılan bakterilerin herhangi bir yabancı tat ve aroma oluşumuna neden olmadığı söylenebilir. Zedan *et al.* (2021) yoğurda maya, küf veya psikrotrofik bakterilerin kontaminasyonunun ve uygun olmayan depolama koşullarının aroma ile diğer organoleptik parametrelerde arzu edilmeyen değişikliklere yol açtığını bildirmişlerdir. Ayrıca yüksek miktarda stabilizatör kullanımının da yoğurtlarda yabancı tat ve aromaya sebep olduğu ifade edilmiştir (Jasim *et al.* 2018).

Genel kabul edilebilirlik

Genel kabul edilebilirlik; tat, koku, yapı ve tekstür gibi özelliklerin tümünü kapsamakta ve yoğurt/benzeri fermente sütlerin duyuşal değerlendirilmesinde önem arz etmektedir. Fermente süt örneklerine panelistler tarafından verilen genel kabul edilebilirlik puanlarının 7,25-8,40 arasında değiştiği görülmektedir (Tablo 61). Varyans analizi sonuçlarından genel kabul edilebilirlik puanları üzerine kültür ilavesi ve depolama süresinin etkisi $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunurken, depolama süresi x kültür ilavesi interaksiyonunun etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 62). Genel kabul edilebilirlik puanları açısından örnekler arasında farklılıkların bulunduğu, özellikle depolama süresince C, D ve E örneklerinin panelistlerden daha yüksek puanlar aldığı görülmektedir. Mevcut sonuçlardan farklı kültür kombinasyonları kullanımının tüketici beğenilirliği üzerinde herhangi bir olumsuz etki yaratmadığı, hatta olumlu etkilediği söylenebilir. Özellikle D ve E örneklerinin üretiminde bir arada kullanılan *L. helveticus* DPC 4571 ile *L. casei* ATCC 334 suşlarının proteolitik/peptidolitik aktivitesi sonucu lezzet ve tekstür üzerine olumlu etkide bulunması söz konusu örneklerde genel kabul edilebilirlik puanlarının daha yüksek olmasının nedeni olarak

düşünülebilir. Güler-Akın (2005) probiyotik kültür içeren bio-yoğurtların duyusal puanlarının sadece yoğurt kültürü içeren örneklerin puanlarına kıyasla daha yüksek olduğunu belirtmiştir. Li *et al.* (2013b), *L. casei* AST18 suşunun yoğurt üretiminde kullanımının duyusal parametreleri önemli derecede etkilemediğini bildirmiştir. Shan *et al.* (2015) ise *L. plantarum* NDC75017 ve yoğurt kültürünün birlikte kullanıldığı örnekler ile kontrol yoğurdu arasında genel kabul edilebilirlik açısından önemli farklılık olmadığını rapor etmişlerdir.



SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada GABA ve biyoaktif peptitler açısından doğal olarak zenginleştirilmiş, bazı metabolik hastalıkları koruyucu nitelikte yoğurt benzeri fonksiyonel fermente bir süt ürününün üretilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla öncelikle yoğurt ve kefir danelerinden daha önce izole edilmiş ve genetik yöntemlerle tanısı yapılmış toplam 422 adet LAB suşu GABA üretme yeteneği açısından taranmıştır. Ancak yoğurt ve kefir izolatlarından GAD genine sahip suşların tespit edilememesi nedeniyle GAD aktivitesine sahip olduğu belirlenmiş peynir izolatu (*L. plantarum* 156) ile çalışmaya devam edilmiştir. Ardından *L. plantarum* 156 suşu, proteolitik aktiviteye sahip olan *L. helveticus* DPC 4571, *L. casei* ATCC 334 suşları ve istenilen jel yapıyı oluşturmak amacıyla *S. thermophilus* 20S4 suşu yoğurt benzeri fermente süt üretiminde starter kültür olarak farklı kombinasyonlarda kullanılmıştır.

I. Grup (A) fermente süt üretiminde *S. thermophilus* 20S4, *L. plantarum* 156 ve *L. casei* ATCC 334; **II. Grup (B)** fermente süt üretiminde *S. thermophilus* 20S4, *L. plantarum* 156 ve *L. helveticus* DPC 4571, **III. Grup (C)** fermente süt üretiminde *S. thermophilus* 20S4 ve *L. plantarum* 156; **IV. Grup (D)** fermente süt üretiminde *S. thermophilus* 20S4, *L. plantarum* 156, *L. casei* ATCC 334 ve *L. helveticus* DPC 4571; son olarak **V. Grup (E)** fermente süt üretiminde *S. thermophilus* 20S4, *L. casei* ATCC 334 ve *L. helveticus* DPC 4571 suşları kullanılmıştır. Fermente süt örnekleri 2 tekerrürlü olarak üretilmiş ve tüm örnekler $+4\pm1$ °C' de 42 gün süreyle depolanmıştır. Depolamanın 1., 14., 28. ve 42. günlerinde fermente sütlerin bazı fizyokimyasal, mikrobiyolojik, duyuşal özellikleri ile GABA ve serbest amino asit miktarı, uçucu bileşen ile peptid profili, depolama süresince oluşan peptitlerin ACE–inhibitör, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Bu araştırma sonucunda aşağıda belirtilen bulgular elde edilmiş ve öneriler yapılmıştır.

1. Ev yapımı yoğurt (264 izolat) ile kefir danelerinden (158 izolat) izole edilen toplam 422 LAB suşu GAD geninin varlığı açısından taranmış, taranan suşların hiçbirinde GAD geni tespit edilememiş, dolayısıyla GABA üretim yeteneğine sahip olmadıkları belirlenmiştir. Taranan izolat sayısı dikkate alındığında her suşun GAD aktivitesine sahip olmadığı, GABA üretim aktivitesinin suşa bağlı olarak değişiklik gösterdiği ve az sayıda suşun GABA üretebildiği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle farklı fermente gıdalardan daha fazla sayıda LAB suşunun GABA üretimi açısından değerlendirilmesinin önemli olduğu düşünülmüştür. Aynı

zamanda GABA'nın biyoteknolojik yöntemlerle daha fazla üretimine yönelik araştırmaların yapılmasının da faydalı olabileceği kanaatine varılmıştır.

2. Kimyasal bileşim açısından fermente sütler arasında önemli farklılıkların bulunmadığı, genel olarak kuru madde, protein ve yağ içeriklerinin benzer olduğu ve depolama süresince çok önemli bir değişim sergilemediği belirlenmiştir. Mevcut sonuçlardan fermente sütlerin üretiminde kullanılan tüm kültür kombinasyonlarının kimyasal kompozisyon üzerinde etkili olmadığı kanaatine varılmıştır. Bununla birlikte kullanılan kültürlerin asitlik oluşumu üzerindeki etkilerinin farklı olduğu, özellikle B, D ve E kültür kombinasyonları ile üretilen örneklerin asitlik değerlerinin daha yüksek, pH değerlerinin ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği'nde (Anonim 2009) ise titrasyon asitliği değerlerinin (laktik asit olarak ağırlıkça %) %0,6-1,5 aralığında olması gerektiği belirtilmiş, bu açıdan değerlendirildiğinde fermente süt örneklerinin tümünün asitlik değerleri bakımından ilgili tebliğe uygun olduğu tespit edilmiştir.

3. Farklı kültür kombinasyonları kullanımının fermente süt örneklerinin serum ayrılması ve viskozite değerlerini önemli düzeyde etkilemediği, serum ayrılması değerlerinin depolamanın 28. güne kadar azaldığı, viskozite değerlerinin ise genel olarak 28. güne kadar artış gösterdiği belirlenmiştir.

4. Mikrobiyolojik analiz sonuçları değerlendirildiğinde; MRS agarda gelişen mezofil ve termofilik bakteri sayıları açısından fermente süt örnekleri arasında farklılıkların bulunduğu, MRS agarda gelişen mezofilik LAB sayılarının *L. casei* ATCC 334 suşunu içeren A, D ve E örneklerinde önemli derece yüksek olduğu, buna karşılık termofil LAB sayılarının ise termofilik bir bakteri olan *L. helveticus* DPC 4571 içermeyen A ve C örneklerinde önemli derece düşük sayılarda bulunduğu belirlenmiştir. MRS agarda gelişen mezofilik LAB sayılarının depolama boyunca C örneğinde azaldığı, diğer örneklerde ise hafif artış/azalışlar olmakla birlikte bakteri sayılarının genel olarak stabil kaldığı tespit edilmiştir. MRS agarda gelişen termofilik LAB popülasyonunun ise depolama süresince genel olarak azalma eğiliminde olduğu belirlenmiştir. Fermente süt örneklerinin M-17 agarda gelişen LAB sayılarının genel olarak benzer olduğu ve depolama süresince çok önemli bir değişim sergilemediği tespit edilmiştir. Mevcut sonuçlardan starter kültür olarak kullanılan tüm bakterilerin fermente sütlerde yüksek oranlarda canlılıklarını korudukları ve sağlık üzerine olumlu etkileri olan biyoaktif bileşenlerin oluşumuna katkıda bulundukları kanaatine varılmıştır.

5. Fermente süt örneklerine ait RP-HPLC kromatogramları incelendiğinde; depolamanın başından itibaren pik yüksekliklerinde daha belirgin olmak üzere hem pik

çeşitliliği hem de yükseklikleri açısından farklılıkların bulunduğu belirlenmiştir. Kullanılan kültür kombinasyonlarının peptid oluşumunu etkilediği, özellikle B, D ve E kültür kombinasyonlarının daha fazla proteolitik aktivite gösterdiği, buna bağlı olarak söz konusu kombinasyonlarla üretilen fermente sütlerde daha fazla sayıda ve yükseklikte pik olduğu tespit edilmiştir. Depolama süresince fermente sütlerde genel olarak pik yüksekliklerinin artış gösterdiği, bununla birlikte amino asit oluşumuna bağlı olarak bazı pik yüksekliklerinin ise azaldığı belirlenmiştir.

6. Peptid ekstraktlarının ACE inhibisyon aktivitesi üzerine fermente sütlerin üretiminde kullanılan kültür kombinasyonlarının etkili olduğu, sadece *S. thermophilus* 20S4 ve *L. plantarum* 156 suşları ile üretilen C örneğinde ACE inhibitör aktivitenin belirgin derecede düşük olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte özellikle depolama sonunda *L. helveticus* DPC 4571 ve *L. casei* ATCC 334 suşlarının bir arada kullanıldığı D ve E örneklerinden elde edilen peptid ekstraktlarının güçlü ACE inhibisyon aktivitesi gösterdikleri belirlenmiştir. IC50 değerleri açısından da fermente süt örnekleri arasında istatistiksel olarak farklılıkların bulunduğu, daha düşük % ACE inhibitör aktivitesine sahip olan C örneğinde IC50 değerinin daha yüksek, buna karşılık % ACE inhibitör aktivitesinin daha yüksek olduğu E örneğinde ise IC50 değerlerinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Özellikle *L. helveticus* DPC 4571 ve *L. casei* ATCC 334 suşlarının bir arada kullanımının tek başlarına kullanımına oranla ACE inhibitörü peptitlerin oluşumunu artırdığı belirlenmiştir. ACE inhibitör peptitlerinin tanımlanmasının önemli olduğu ve in-vivo/in-vitro ortamda antihipertansif etkilerinin incelenmesine yönelik detaylı araştırmaların yapılmasının faydalı olacağı kanaatine varılmıştır.

7. Peptid ekstraktlarının antioksidan aktivitelere ilişkin % inhibisyon değerleri açısından fermente süt örnekleri arasında çok büyük farklılıkların bulunmadığı, bununla birlikte % inhibisyonun E örneğinde biraz daha yüksek düzeyde gerçekleştiği belirlenmiştir. Antioksidan aktiviteye ait % inhibisyon değerlerinin örneklerin tümünde depolamanın 28. gününde azaldığı, depolamanın sonunda ise D örneği hariç diğer örneklerde arttığı gözlenmiştir. Depolama süresince peptid ekstraktlarının IC50 değerlerinde % inhibisyona bağlı olarak dalgalanmaların meydana geldiği, söz konusu değerlerin depolamanın 14. gününde genel olarak azaldığı, 28. günde artış gösterdiği, 42. günde ise D örneği dışında tekrar azaldığı belirlenmiştir. Fermente süt örnekleri arasında en düşük IC50 değeri ise en yüksek % inhibisyon değerinin belirlendiği E örneğinde tespit edilmiştir.

8. Farklı kültür kombinasyonları ile üretilen fermente süt örneklerinden elde edilen peptid ekstraktlarının *S. aureus* ATCC 29213'e karşı farklı düzeylerde antimikrobiyal aktivite gösterdiği, özellikle A ve E örneklerinde başlangıçta negatif olan % inhibisyon değerlerinin

depolamanın ilerleyen günlerinde pozitif olduğu ve önemli derecede arttığı belirlenmiştir. Depolama süresince ise tüm örneklerin *S. aureus* ATCC 29213'e karşı % inhibisyon değerlerinde artış ve azalışlar olduğu, bununla birlikte 42. gününde belirlenen değerlerin 1. güne göre önemli derecede arttığı tespit edilmiştir.

L. monocytogenes ATCC 7644'e karşı inhibitör aktivite incelendiğinde; A ve D örneklerine ait peptid ekstraktlarının depolamanın 1. gününde *L. monocytogenes* ATCC 7644'e karşı inhibitör aktivite sergilemediği, ancak depolamanın ilerlemesiyle bir inhibisyon oluştuğu tespit edilmiştir. *L. monocytogenes* ATCC 7644'e karşı inhibitör aktivitenin depolama boyunca C ve D örneklerinde arttığı, diğer örneklerde artış/azalışlar meydana geldiği ve en yüksek inhibisyonun E örneğinde oluştuğu belirlenmiştir.

Peptid ekstraktlarının *B. cereus* BC 6230'a karşı belirlenen inhibisyon değerlerinin büyük oranda negatif değerlerden oluştuğu, yani peptitlerin *B. cereus* BC 6230 üzerinde önemli düzeyde antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Ancak tüm örneklerde depolama ilerledikçe inhibisyon değerlerinin arttığı, B, D ve E örneklerinde ise bu değerlerin pozitif değerlere ulaştığı saptanmıştır.

Fermente süt örneklerinden ekstrakte edilen peptitlerin *S. typhimurium* RSHMB 95091'e karşı az da olsa inhibisyon etki gösterdiği, örnekler içerisinde *S. typhimurium* RSHMB 95091'e karşı en düşük antimikrobiyal aktivitenin C örneğinde belirlendiği tespit edilmiştir. Aynı zamanda *S. typhimurium* RSHMB 95091'e karşı inhibisyonun A ve C örneklerinde depolama boyunca arttığı, D ve E örneklerinde artış ve azalışlar olmakla birlikte depolamanın 42. gününde inhibisyonun en yüksek değere ulaştığı belirlenmiştir.

Fermente süt örneklerinden ekstrakte edilen peptitlerin *E. coli* O157:H7'e karşı bir miktar inhibitör aktivite sergilediği, depolama boyunca ise örneklerin inhibisyon değerlerinde artış ve azalışlar olduğu belirlenmiştir. Peptid ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi genel olarak değerlendirildiğinde; Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı belirli bir düzeyde inhibitör aktivite sergilediği, diğer patojen bakterilerle karşılaştırıldığında en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi *S. aureus* ATCC 29213'e karşı, en düşük aktiviteyi ise *B. cereus* BC 6230'a karşı gösterdiği belirlenmiştir.

9. Fermente sütlerden ekstrakte edilen peptitlerin biyoaktivitesi ana hatlarıyla değerlendirildiğinde; en yüksek biyoaktiviteyi ACE inhibitör aktiviteye karşı göstermiş, bunu antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteler takip etmiştir.

10. Fermente süt örneklerinin tümünde 20 amino asidin de tespit edildiği, bunlar arasında His, Arg, Ala ve Pro amino asitlerinin hakim amino asitler olduğu belirlenmiştir. Pro,

Ala ve Arg amino asitlerinin D örneğinde; His amino asidinin ise E örneğinde depolamanın 42. gününde yüksek konsantrasyonlarda olduğu tespit edilmiştir. Toplam serbest amino asit konsantrasyonlarının B (*S. thermophilus* 20S4 + *L. plantarum* 156 + *L. helveticus* DPC 4571) ve D (*S. thermophilus* 20S4 + *L. plantarum* 156 + *L. casei* ATCC 334 + *L. helveticus* DPC 4571) örneklerinde daha yüksek olduğu, söz konusu veriler dikkate alındığında *L. helveticus* DPC4571 ve *L. casei* ATCC334 suşlarının faaliyetlerinin amino asit oluşumunu artırdığı sonucuna varılmıştır.

11. GABA konsantrasyonu açısından fermente süt örnekleri arasında istatistiksel olarak farklılıkların bulunduğu, GAD (+) *L. plantarum* 156 suşunu içeren A, B, C, D örnekleri arasında en yüksek GABA miktarlarının proteolitik aktivitenin yüksek olduğu B ve D örneklerinde tespit edildiği belirlenmiştir. *L. plantarum* 156, *S. thermophilus* 20S4, *L. helveticus* DPC4571 ve *L. casei* ATCC 334 suşlarının kullanıldığı D örneğinde GABA miktarının depolama süresince arttığı, *L. plantarum* 156, *S. thermophilus* 20S4 ve *L. helveticus* DPC4571 suşlarının bulunduğu B örneğinde ise depolamanın 28. gününe kadar arttığı, daha sonra azaldığı saptanmıştır. Sadece *S. thermophilus* 20S4 ve *L. plantarum* 156 suşunu içeren C örneğinde ise GABA miktarının nispeten düşük kaldığı, bu durumun söz konusu örneğin yüksek proteolitik aktiviteye sahip bir suş içermemesi ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. *L. plantarum* 156 suşunu içermeyen E örneğinde de düşük konsantrasyonda olmakla birlikte, GABA oluşumu tespit edilmiş, bu örnekteki GABA'nın mayalar ya da çiğ sütte bulunan ve pastörizasyon sonrası sütte kalan LAB suşları tarafından üretildiği kanaatine varılmıştır.

Mevcut sonuçlardan GAD (+) bir suş kullanımı ile fermente sütlerde GABA içeriğinin doğal olarak artırılabilineceği, proteolitik suşlarla birlikte kullanılması durumunda GABA konsantrasyonlarının önemli düzeyde artış gösterebileceği, böylece biyoaktif bileşenlerce zengin bir süt ürününün üretilabileceği sonucuna varılmıştır. Fermente gıdalarda GABA'nın daha yüksek konsantrasyonlarda elde edilebilmesi için fermentasyon koşullarının optimizasyonunun gerekli olduğu, bununla birlikte yüksek GABA üretme yeteneğine sahip yeni suşların tespiti için farklı fermente gıdaların incelenebileceği düşünülmektedir. Ayrıca GABA içeren fermente gıdaların uzun vadede tüketiminin sağlık üzerine olumlu etkileri dikkate alındığında klinik uygulamalara ilişkin çalışmalarında gerekli olduğu görülmektedir.

12. Fermente süt örneklerinde 13'ü keton, 10'u alkol, 7'si asit, 6'sı ester, 4'ü aldehit, 4'ü terpen ve 10'u diğer bileşikler olmak üzere toplam 54 adet uçucu bileşik saptanmıştır. Yoğurt ve benzeri fermente süt ürünlerinde arzu edilen aromanın oluşumunda etkili olan acetoin, acetone ve 2,3 bütandione (diasetil) bileşiklerinin tüm fermente süt örneklerinde belirlendiği, özellikle 2,3 bütandione (diasetil) konsantrasyonunun D ve E örneklerinde oldukça

yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca tüm örneklerde önemli miktarlarda ethanol, acetic acid, hexanoic acid bulunduğu, yine yoğurt benzeri fermente sütlerin aroması üzerinde etkili olan lactic acid konsantrasyonlarının ise özellikle D ve E örneklerinde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ester bileşikler arasında yer alan ethyl acetate'nin ise A ve B kültür kombinasyonları ile üretilen örneklerde daha yüksek olduğu, aynı zamanda tüm fermente süt örneklerinde düşük düzeylerde de olsa bazı aldehit ve terpen bileşiklerinde belirlendiği tespit edilmiştir. Mevcut sonuçlardan D ve E kombinasyonları başta olmak üzere kullanılan tüm kültür kombinasyonlarının bazı uçucu aroma bileşenlerinin hem miktar ve hem de çeşitliliğini artırdığı sonucuna varılmıştır.

13. Fermente süt örneklerinde kullanılan farklı LAB kombinasyonlarının renk ve görünüş, yapı-tekstür ve koku puanlarını etkilemediği; bununla birlikte tat-aroma ve asitlik puanları üzerinde ise önemli derecede etkisinin olduğu tespit edilmiştir. En yüksek tat ve aroma puanı E örneğinde, en düşük tat ve aroma puanı ise A örneğinde belirlenmiştir. Yoğurt benzeri fermente süt ürünlerinde önemli bir duyuşal parametre olan asitliğin C örneğinde daha az düzeyde, B, D ve E örneklerinde ise daha yüksek düzeyde hissedildiği gözlenmiştir. Genel kabul edilebilirlik açısından C, D ve E örneklerinin panelistler tarafından daha fazla tercih edildiği belirlenmiştir. Genel olarak farklı kültür kombinasyonlarının fermente süt ürünlerinde kullanımının duyuşal parametreleri büyük ölçüde değiştirmedeği ve tüketici beğenisini olumsuz yönde etkilemediği sonucuna varılmıştır.

Elde edilen veriler genel olarak değerlendirildiğinde; *L. helveticus* DPC 4571, *L. casei* ATCC 334 ve *L. plantarum* 156 suşlarının fermente sütlerin biyoaktif bileşen iğeriğini artırdığı, özellikle *L. helveticus* DPC 4571 ve *L. casei* ATCC 334 suşlarının bir arada kullanımının ACE inhibisyon aktivitesi başta olmak üzere peptitlerin biyoaktivitesini, serbest amino asit konsantrasyonunu ve uçucu aroma bileşiklerinin oluşumunu etkilediği gözlenmiştir. GAD (+) *L. plantarum* 156 suşunun fermente sütlerde farklı konsantrasyonlarda GABA üretebildiği, *L. helveticus* DPC 4571 ve *L. casei* ATCC 334 suşları ile birlikte kullanıldıda GABA miktarının önemli düzeyde arttığı belirlenmiştir. GABA ve biyoaktif bileşenlerce zenginleştirilmiş böyle bir fermente süt ürününün tüketilmesiyle hem hipertansiyonun kontrol altına alınmasına hem de bazı nörolojik hastalıkların önlenmesine katkı sağlanacağı düşünölmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Hamid, M., Romeih, E., Gamba, R. R., Nagai, E., Suzuki, T., Koyanagi, T. and Enomoto, T., 2019. The biological activity of fermented milk produced by *Lactobacillus casei* ATCC 393 during cold storage. *International Dairy Journal*, 91, 1-8.
- Abdou, A.M., Higashiguchi, S., Horie, K., Kim, M., Hatta, H., and Yokogoshi, H., 2006. Relaxation and immunity enhancement effects of γ -aminobutyric acid (GABA) administration in humans. *Biofactors*, 26(3), 201-208.
- Aguilar-Toalá, J.E., Santiago-López, L., Peres, C.M., Peres, C., Garcia, H. S., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A. F. and Hernández-Mendoza, A., 2017. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 65-75.
- Akabanda, F., Owusu-Kwarteng, J., Tano-Debrah, K., Parkouda, C., and Jespersen, L., 2014. The use of lactic acid bacteria starter culture in the production of Nunu, a spontaneously fermented milk product in Ghana. *International Journal of Food Science*, 2014.
- Akalın, A.S., 2014. Dairy-derived antimicrobial peptides: action mechanisms, pharmaceutical uses and production proposals. *Trends in Food Science and Technology*, 36(2), 79-95.
- Akdeniz Oktay, B. ve Özbaş, Z. Y., 2020. Fermente gıdaların insan sağlığı üzerindeki etkileri. *Gıda*, 45(6), 1215-1226.
- Akün, S.E. and Kökbaş, U. 2021. Antimikrobiyal peptidler ve tıpta kullanım alanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 53-58.
- Alhaj, O. A., Metwalli, A. A., Ismail, E. A., Ali, H. S., Al-Khalifa, A. S. and Kanekanian, A.D., 2018. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity and antimicrobial effect of fermented camel milk (*Camelus dromedarius*). *International Journal of Dairy Technology*, 71(1), 27-35.
- Ali, M. A., Kamal, M. M., Rahman, M. H., Siddiqui, M. N., Haque, M. A., Saha, K. K. and Rahman, M.A., 2021. Functional dairy products as a source of bioactive peptides and probiotics: current trends and future perspectives. *Journal of Food Science and Technology*, 1-17.
- Alkay, Z., 2021. Ekşi Hamur İzolatlarının Gaba Üretim Ve Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Model Gıda Uygulamaları. Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Anggraini, L., Marlida, Y., Wizna, W., Jamsari, J., Mirzah, M., Adzitey, F., and Huda, N., 2018. Molecular identification and phylogenetic analysis of GABA-producing lactic acid bacteria isolated from indigenous dadih of West Sumatera, Indonesia. *F1000Research*, 7.
- Anonim, 2009. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, Fermente Süt Ürünleri Tebliği. Resmi Gazete, Sayı: 27143, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Ankara.
- Aoki, H., Furuya, Y., Endo, Y. and Fujimoto, K., 2003. Effect of γ -aminobutyric acid-enriched tempeh-like fermented soybean (GABA-tempeh) on the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(8), 1806-1808.

- Arcan, I. and Yemenicioğlu, A., 2007. Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans. *Food Chemistry*, 103(2), 301-312.
- Ashar, M. N., and Chand, R., 2004. Fermented milk containing ACE-inhibitory peptides reduces blood pressure in middle aged hypertensive subjects. *Milchwissenschaft*, 59(7-8), 363-366.
- Atalay, M., and Şahingil, D., 2022. Characterization of Antimicrobial Peptide fraction producing *Lactobacillus* spp. based on LC/MS-MS and determination of ACE-inhibition activity in Kefir. *Journal of Agricultural Sciences*, 19-19.
- Atamer, M. ve Sezgin, E., 1986. Yoğurtlarda kurumadde artımının pıhtının fiziksel özellikleri üzerine etkisi, *Gıda*, 11(6), 327-331.
- Atamer, M., and Sezgin, E., 1987. İnkübasyon sonu asitliğinin yoğurt kalitesi üzerine etkisi. *Gıda*, 12(4).
- Ayağ, N., Dagdemir, E., Hayaloglu, A. A., 2022. Comparison of γ -aminobutyric acid and free amino acid contents of some common varieties of Turkish cheeses, *International Dairy Journal*, 128, 1-5.
- Azizkhani, M., Saris, P. E. J. And Baniasadi, M., 2021. An in-vitro assessment of antifungal and antibacterial activity of cow, camel, ewe, and goat milk kefir and probiotic yogurt. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(1), 406-415.
- Bakır, B., and Şahin, G. A., 2020. Polifenollerden zengin besinler ve hipertansiyon. *Türkiye Klinikleri Journal of Health Sciences*, 5(1), 135-44.
- Bakırcı, S., 2014. Balkabağı Lifi Kullanımının Yarım Yağlı Yoğurdun Kalitesi ve Depolama Stabilitesi Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Bamnia, M. 2011. Evaluation of Gamma Aminobutyric Acid Production by Indigenously Isolated Lactic Acid Bacteria. Master's Thesis, Patiala.
- Bao, Z., Xiong, J., Lin, W. and Ye, J., 2016. Profiles of free fatty acids, free amino acids, and volatile compounds of milk bases fermented by *Lactobacillus casei* GBHM-21 with different fat levels. *CyTA-Journal of Food*, 14(1), 10-17.
- Barla, F., Koyanagi, T., Tokuda, N., Matsui, H., Katayama, T., Kumagai, H., Michihata, T., Sasaki, T., Tsuji, A. and Enomoto, T., 2016. The γ -aminobutyric acid-producing ability under low pH conditions of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods of Ishikawa Prefecture, Japan, with a strong ability to produce ACE-inhibitory peptides. *Biotechnol Reports*, 10, 105-110.
- Beltran-Barrientos, L. M., Estrada-Montoya, C., Reyes-Díaz, R., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. F. and Vallejo-Córdova, B., 2018. Does gamma-aminobutyric acid have a potential role on the antihypertensive effect of fermented milk with *Lactococcus lactis* NRRL B-50571?. *Journal of Functional Foods*, 48, 297-301.
- Beltran-Barrientos, L. M., Garcia, H. S., Reyes-Díaz, R., Estrada-Montoya, M. C., Torres-Llanez, M. J., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A.F. and Vallejo-Cordoba, B., 2019. Cooperation between *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 and NRRL B-50572 for aroma formation in fermented milk. *Foods*, 8(12), 645.
- Bergamini, C. V., Hynes, E. R. and Zalazar, C. A., 2006. Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese. *International Dairy Journal*, 16(8), 856-866.
- Bezerra, T. K. A., de Oliveira Arcanjo, N. M., de Araújo, A. R. R., de Queiroz, A. L. M., de Oliveira, M. E. G., Gomes, A. M. P. and Madruga, M. S., 2017. Volatile profile in goat coalho cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 76, 209-215.

- Bhanwar, S., Bamnia, M., Ghosh, M. and Ganguli, A., 2013. Use of *Lactococcus lactis* to enrich sourdough bread with γ -aminobutyric acid. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(1), 77-81.
- Biesalski, H. K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., Walter, P. And Weber, P., 2009. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*, 25(11-12), 1202-1205.
- Binh, T. T. T., Ju, W. T., Jung, W. J. and Park, R. D., 2014. Optimization of γ -amino butyric acid production in a newly isolated *Lactobacillus brevis*. *Biotechnology Letters*, 36(1), 93-98.
- Birkemo, G. A., O'Sullivan, O., Ross, R. P. and Hill, C., 2009. Antimicrobial activity of two peptides casecidin 15 and 17, found naturally in bovine colostrum. *Journal of Applied Microbiology*, 106(1), 233-240.
- Bodyfelt, F.W., Tobias, J. and Trout, G.M., 1988. *The Sensory Evaluation of Dairy Products*, 598, London: Van Nostrand Reinhold.
- Bosnea, L. A., Kopsahelis, N., Kokkali, V., Terpou, A. and Kanellaki, M., 2017. Production of a novel probiotic yogurt by incorporation of *L. casei* enriched fresh apple pieces, dried raisins and wheat grains. *Food and Bioproducts Processing*, 102, 62-71.
- Brasca, M., Hogenboom, J. A., Morandi, S., Rosi, V., D'Incecco, P., Silvetti, T. and Pellegrino, L., 2016. Proteolytic activity and production of γ -aminobutyric acid by *Streptococcus thermophilus* cultivated in microfiltered pasteurized milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(45), 8604-8614.
- Bulca, S. and Güvenç, B., 2020. Bioactive Peptides in milk and milk products, antimicrobial properties and effects on human health. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(1), 158-164.
- Caceres, P. J., Peñas, E., Martínez-Villaluenga, C., García-Mora, P. and Frías, J., 2019. Development of a multifunctional yogurt-like product from germinated brown rice. *LWT*, 99, 306-312.
- Carafa, I., Nardin, T., Larcher, R., Viola, R., Tuohy, K. and Franciosi, E., 2015. Identification and characterization of wild lactobacilli and pediococci from spontaneously fermented Mountain cheese. *Food Microbiology*, 48, 123-132.
- Cataldo, P. G., Villegas, J. M., de Giori, G. S., Saavedra, L. and Hebert, E. M., 2020. Enhancement of γ -aminobutyric acid (GABA) production by *Lactobacillus brevis* CRL 2013 based on carbohydrate fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108792.
- Cavalheiro, F. G., Baptista, D. P., Galli, B. D., Negrão, F., Eberlin, M. N. and Gigante, M. L., 2020. High protein yogurt with addition of *Lactobacillus helveticus*: Peptide profile and angiotensin-converting enzyme ACE-inhibitory activity. *Food Chemistry*, 333, 127482.
- Chai, T. T., Law, Y. C., Wong, F. C. and Kim, S. K., 2017. Enzyme-assisted discovery of antioxidant peptides from edible marine invertebrates: a review. *Marine drugs*, 15(2), 42.
- Chai, J., Jiang, P., Wang, P., Jiang, Y., Li, D., Bao, W., Liu, B., Liu, B., Zhao, L., Norde, W., Yuan, Q., Ren, F. And Li, Y., 2018. The intelligent delivery systems for bioactive compounds in foods: Physicochemical and physiological conditions, absorption mechanisms, obstacles and responsive strategies. *Trends in Food Science and Technology*, 78, 144–154.

- Chaves-López, C., Serio, A., Paparella, A., Martuscelli, M., Corsetti, A., Tofalo, R. and Suzzi, G., 2014. Impact of microbial cultures on proteolysis and release of bioactive peptides in fermented milk. *Food microbiology*, 42, 117-121.
- Chen, Y., Li, C., Xue, J., Kwok, L. Y., Yang, J., Zhang, H. and Menghe, B., 2015. Characterization of angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk produced by *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science*, 98(8), 5113-5124.
- Chen, L., Zhao, H., Zhang, C., Lu, Y., Zhu, X. and Lu, Z., 2016. γ -Aminobutyric acid-rich yogurt fermented by *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophiles* fmb5 appears to have anti-diabetic effect on streptozotocin-induced diabetic mice. *Journal of Functional Foods*, 20, 267-275.
- Chen, C., Zhao, S., Hao, G., Yu, H., Tian, H. and Zhao, G., 2017. Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(sup1), S316-S330.
- Chen, L., Alcazar, J., Yang, T., Lu, Z. and Lu, Y., 2018. Optimized cultural conditions of functional yogurt for γ -aminobutyric acid augmentation using response surface methodology. *Journal of Dairy Science*, 101, 10685–10693.
- Cheng, H., 2010. Volatile flavor compounds in yogurt: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(10), 938-950.
- Cho, Y. R., Chang, J. Y. and Chang, H. C., 2007. Production of gamma-Aminobutyric Acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* Isolated from Kimchi and its Neuroprotective Effect on Neuronal Cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(1), 104-109.
- Chouchouli, V., Kalogeropoulos, N., Konteles, S.J., Karvela, E., Makris, D.P. and Karathanos, V.T., 2013. Fortification of yoghurts with grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 53, 522-529.
- Choudhary, R. and Tandon, R. V., 2009. Consumption of functional food and our health concerns. *Pakistan Journal of Physiology*, 5(1).
- Chua, J. Y., Koh, M. K. P. and Liu, S. Q., 2019. Gamma-aminobutyric acid: a bioactive compound in foods. *Sprouted grains*, 25-54.
- Condurso, C., Verzera, A., Romeo, V., Ziino, M. and Conte, F., 2008. Solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry analysis of dairy product volatiles for the determination of shelf-life. *International Dairy Journal*, 18(8), 819-825.
- Cui, Y., Miao, K., Niyaphorn, S. and Qu, X., 2020. Production of gamma-aminobutyric acid from lactic acid bacteria: A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 995.
- Daliri, E. B. M., Oh, D. H. and Lee, B. H., 2017. Bioactive peptides. *Foods*, 6(5), 32.
- Dan, T., Wang, D., Jin, R. L., Zhang, H. P., Zhou, T. T. and Sun, T. S., 2017. Characterization of volatile compounds in fermented milk using solid-phase microextraction methods coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 100(4), 2488-2500.
- Dan, T., Jin, R., Ren, W., Li, T., Chen, H. and Sun, T., 2018. Characteristics of milk fermented by *Streptococcus thermophilus* MGA45-4 and the profiles of associated volatile compounds during fermentation and storage. *Molecules*, 23(4), 878.

- Dan, T., Chen, H., Li, T., Tian, J., Ren, W., Zhang, H. and Sun, T., 2019a. Influence of *Lactobacillus plantarum* P-8 on fermented milk flavor and storage stability. *Frontiers in Microbiology*, 3133.
- Dan, T., Ren, W., Liu, Y., Tian, J., Chen, H., Li, T. and Liu, W., 2019b. Volatile flavor compounds profile and fermentation characteristics of milk fermented by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Frontiers in Microbiology*, 2183.
- Das, D. and Goyal, A., 2015. Antioxidant activity and g-aminobutyric acid (GABA) producing ability of probiotic *Lactobacillus plantarum*DM5 isolated from Marcha of Sikkim. *LWT- Food Science and Technology*, 61, 263-268.
- Dastager, S. G., 2009. Aroma compounds. In *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation* (pp. 105-127). Springer, Dordrecht.
- Dayısoylu, K. S., Gezginç, Y. ve Cingöz, A. 2014. Fonksiyonel gıda mı, fonksiyonel bileşen mi? *Gıdalarda fonksiyonellik*. *Gıda*, 39(1),57-62.
- De Lima, M. D. S. F., da Silva, R. A., da Silva, M. F., da Silva, P. A. B., Costa, R. M. P. B., Teixeira, J. A. C., Porto, A. L. F. and Cavalcanti, M. T. H., 2018. Brazilian kefir-fermented sheep's milk, a source of antimicrobial and antioxidant peptides. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(3), 446-455.
- Del Mar Contreras, M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M. and Recio, I., 2009. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19(10), 566-573.
- Demirbaş, F., İspirli, H., Kurnaz, A.A., Yılmaz, M.T. and Dertli, E., 2017. Antimicrobial and functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs. *LWT - Food Science and Technology*, 79: 361-366.
- Demirgöl, F. ve Sağdıç, O., 2018. Fermente süt ürünlerinin insan sağlığına etkisi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (13), 45-53.
- Deniz Akan, D., Çaydam, Ö. D., and Pakyüz, S.Ç., 2020. Hipertansiyon tanısı olan hastalarda bilgi düzeyi ve ilaç tedavisine uyumunun değerlendirilmesi. *Anadolu Hemşirelik ve Sağlık Bilimleri Dergisi*, 23(2), 241-249.
- Dhakal, R., Bajpai, V. K. and Baek, K. H., 2012. Production of GABA (γ -aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 1230-1241.
- Di Cagno, R., Mazzacane, F., Rizzello, C.G., De Angelis, M., Giuliani, G., Meloni, M., De Servi, B. and Gobetti, M., 2010. Synthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: functional grape must beverage and dermatological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86:731–41.
- Diana, M., Quílez, J. and Rafecas, M., 2014a. Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review. *Journal of Functional Foods*, 10, 407-420.
- Diana, M., Tres, A., Quílez, J., Llombart, M. and Rafecas, M., 2014b. Spanish cheese screening and selection of lactic acid bacteria with high gamma-aminobutyric acid production. *LWT - Food Science and Technology*, 56, 351-355.
- Diliello, L.R., 1982. *Methods In Food And Dairy Microbiology*. Avi. Publishing Company Inc., USA, p 142.
- Ding, W., Cui, J., Zhao, Y., Han, B., Li, T., Zhao, P., Xu, J.W. and Yu, X., 2019. Enhancing *Haematococcus pluvialis* biomass and γ -aminobutyric acid accumulation by two-step cultivation and salt supplementation. *Bioresource Technology*, 285, 121334.

- Donkor, O. N., Henriksson, A., Singh, T. K., Vasiljevic, T. And Shah, N. P., 2007. ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*, 17(11), 1321-1331.
- Duranti, S., Ruiz, L., Lugli, G. A., Tames, H., Milani, C., Mancabelli, L., Mancino, W., Longhi, G., Carnevali, L., Sgoifo, A., Margolles A., Ventura, M., Ruas-Madiedo, P. and Turrone, F., 2020. *Bifidobacterium adolescentis* as a key member of the human gut microbiota in the production of GABA. *Scientific Reports*, 10(1), 1-13.
- Ehirim, F. N. and Onyeneke, E. N., 2013. Physico-chemical and organoleptic properties of yoghurt manufactured with cow milk and goat milk. *Academic Research International*, 4(4), 245.
- EI-Fattah, A. A., Sakr, S., EI-Dieb, S. and Elkashef, H., 2018. Developing functional yogurt rich in bioactive peptides and gamma-aminobutyric acid related to cardiovascular health. *LWT-Food Science and Technology*, 98, 390–397.
- Elfahri, K. R., Donkor, O. N. and Vasiljevic, T., 2014. Potential of novel *Lactobacillus helveticus* strains and their cell wall bound proteases to release physiologically active peptides from milk proteins. *International Dairy Journal*, 38(1), 37-46.
- Erkaya, T., 2009. İnek, Manda, Koyun ve Keçi Sütlerinden Üretilen Yoğurtların Bazı Kalite Özelliklerinin Tespiti ve Aroma Profillerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Erkaya, T. and Şengül, M., 2011. Comparison of volatile compounds in yoghurts made from cows', buffaloes', ewes' and goats' milks. *International Journal of Dairy Technology*, 64(2), 240-246.
- Erkaya, T., 2014. Probiyotik Kültürlerle Üretilen Beyaz Peynirlerin Olgunlaşma Süresince Bazı Kalite Özellikleri ve Oluşan Peptitlerin Biyoaktivitesinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Erkaya-Kotan, T., 2020. In vitro angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitory and antioxidant activity of probiotic yogurt incorporated with orange fibre during storage. *Journal of Food Science and Technology*, 57(6), 2343-2353.
- Farag, M. A., Saleh, H. A., El Ahmady, S. and Elmassry, M. M., 2021. Dissecting yogurt: The impact of milk types, probiotics, and selected additives on yogurt quality. *Food Reviews International*, 1-17.
- Fardet, A. and Rock, E., 2018. In vitro and in vivo antioxidant potential of milks, yoghurts, fermented milks and cheeses: a narrative review of evidence. *Nutrition Research Reviews*, 31(1), 52-70.
- Farvin, K. S., Baron, C. P., Nielsen, N. S., Otte, J. and Jacobsen, C., 2010. Antioxidant activity of yoghurt peptides: part 2–characterisation of peptide fractions. *Food Chemistry*, 123(4), 1090-1097.
- Feehily, C. and Karatzas, K. A. G., 2013. Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *Journal of Applied Microbiology*, 114(1), 11-24.
- Feehily, C., Finnerty, A., Hill, C., Casey, P. G., Gahan, C. G. M., O'Byrne, , C. P. and Karatzas, K. A. G., 2014. Divergent evolution of the activity and regulation of the glutamate decarboxylase systems in *Listeria monocytogenes* EGDe and 10403S : roles in virulence and acid tolerance. *Plos One*, 9 (11).
- Fırat, M.Ç., 2019. Probiyotik ve Antioksidan Özellikli Yoğurt Bakterilerinin İzolasyonu ve İdentifiye Edilen Suşlarla Üretilen Yoğurtların Bazı Mikrobiyolojik ve Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

- FitzGerald, R. J., Cermeño, M., Khalesi, M., Kleekayai, T. and Amigo-Benavent, M., 2020. Application of in silico approaches for the generation of milk protein-derived bioactive peptides. *Journal of Functional Foods*, 64, 103636.
- Franciosi, E., Carafa, I., Nardin, T., Schiavon, S., Poznanski, E., Cavazza, A., Larcher, R. and Tuohy, K.M., 2015. Biodiversity and c-aminobutyric acid production by lactic acid bacteria isolated from traditional alpine raw cow's milk cheeses. *BioMed Research International*, 11 pages.
- Frank, J.F., Hankin, L., Koburger, J.A. and Marth, E.H., 1985. Tests for Group of Microorganisms. (In) *Standard Methods for Examination of Dairy Products* (APHA), 15 th Eddition. Ed: G.H. Richardson, 189-201.
- Gamba, R. R., Yamamoto, S., Abdel-Hamid, M., Sasaki, T., Michihata, T., Koyanagi, T. and Enomoto, T., 2020. Chemical, microbiological, and functional characterization of kefir produced from cow's milk and soy milk. *International Journal of Microbiology*, 2020.
- Gan, B. H., Gaynord, J., Rowe, S. M., Deingruber, T. and Spring, D. R., 2021. The multifaceted nature of antimicrobial peptides: current synthetic chemistry approaches and future directions. *Chemical Society Reviews*.
- Gardner-Fortier, C., St-Gelais D., Champagne, C.P. and Vuillemand, J.C., 2013. Determination of optimal conditions for g-aminobutyric acid production by *Lactococcus lactis* ssp.*lactis*. *Interntional Dairy Journal*, 32, 136-143.
- Gharehyakheh, S., 2021. Gamma aminobutyric acid (GABA) production using *Lactobacillus* sp. Makhdzir Naser-1 (GQ451633) in the cherry-kefir beverage. *Journal of Food Processing and Preservation*, e15521.
- Ghoneem, G., Ismail, M., El-Boraey, N., Tabekha, M. and Elashrey, H., 2018. Optimal combination of soy, buffalo, and cow's milk in bioyogurt for optimal chemical, nutritional, and health benefits. *Journal of the American College of Nutrition*, 37(1), 8-16.
- Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F. and Addeo, F., 2000. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3898-3904.
- Gonzalez-Gonzalez, C.R., Tuohy, K.M. and Jauregi, P., 2011. Production of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with probiotic strains: effects of calcium, pH and peptides on the ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, 21,615–622.
- Gu, Y., Li, X., Liu, H., Li, Q., Xiao, R., Dudu, O. E., Yang, L. and Ma, Y., 2020. The impact of multiple-species starters on the peptide profiles of yoghurts. *International Dairy Journal*, 106, 104684.
- Gu, Y., Li, X., Chen, H., Guan, K., Qi, X., Yang, L. and Ma, Y., 2021. Evaluation of FAAs and FFAs in yogurts fermented with different starter cultures during storage. *Journal of Food Composition and Analysis*, 96, 103666.
- Guo, Z., Wang, J., Yan, L., Chen, W., Liu, X. M. and Zhang, H. P., 2009. In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. *LWT-Food Science and Technology*, 42(10), 1640-1646.
- Guo, Y., Gan, J., Zhu, Q., Zeng, X., Sun, Y., Wu, Z. and Pan, D., 2018. Transepithelial transport of milk-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide with the RLSFNP sequence. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(3), 976-983.

- Gülbandılar, A., Okur, M. ve Dönmez, M., 2017. Fonksiyonel gıda olarak kullanılan probiyotikler ve özellikleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 10(1), 44-47.
- Güler-Akın, M. B., 2005. The effects of different incubation temperatures on the acetaldehyde content and viable bacteria counts of bio-yogurt made from ewe's milk. *International Journal of Dairy Technology*, 58(3), 174-179.
- Güler, Z. and Park, Y. W., 2011. Characteristics of physico-chemical properties, volatile compounds and free fatty acid profiles of commercial set-type Turkish yoghurts. *Open Journal of Animal Sciences*, 1(01), 1.
- Gürsoy, O., Yazar, A. ve Yılmaz, Y., 2015. Peynirlerde bulunan kan basıncını düşürücü biyoaktif peptitler. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*, 13(3).
- Güzel, E., Boğa, R. ve Bursal, E., 2013. Çiriş otunun (*Asphodelus aestivus*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi. *Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 1(1), 17–25
- Han, M., Liao, W. Y., Wu, S. M., Gong, X. and Bai, C., 2020. Use of *Streptococcus thermophilus* for the in situ production of γ -aminobutyric acid-enriched fermented milk. *Journal of Dairy Science*, 103(1), 98-105.
- Hancock, R. E., 1997. Peptide antibiotics. *The Lancet*, 349(9049), 418-422.
- Hanifah, R., Arief, I. I. and Budiman, C., 2016. Antimicrobial activity of goat milk yoghurt with addition of a probiotic *Lactobacillus acidophilus* IIA-2B4 and roselle (*Hibiscus sabdariffa* L) extract. *International Food Research Journal*, 23(6).
- Hao, X., Yang, W., Zhu, Q., Zhang, G., Zhang, X., Liu, L., Li, X., Hussain, M., Ni, C. and Jiang, X., 2021. Proteolysis and ACE-inhibitory peptide profile of Cheddar cheese: Effect of digestion treatment and different probiotics. *LWT*, 145, 111295.
- Hassan, A. and Amjad, I., 2010. Nutritional evaluation of yoghurt prepared by different starter cultures and their physiochemical analysis during storage. *African Journal of Biotechnology*, 9(20).
- Hayakawa, K., Kimura, M., Kasaha, K., Matsumoto, K., Sansawa, H. and Yamori, Y., 2004. Effect of a γ -aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar–Kyoto rats. *British Journal of Nutrition*, 92(3), 411-417.
- Hayaloğlu, A.A., Topcu, A. and Koca, N., 2011. Peynir Analizleri. Peynir Biliminin Temelleri. Ed: Özer, B., Hayaloğlu, A.A. Sidas Yayıncılık, İzmir, 489-558.
- Hayaloğlu, A. A., Yasar, K., Tolu, C. and Sahingil, D., 2013. Characterizing volatile compounds and proteolysis in Gokceada artisanal goat cheese. *Small Ruminant Research*, 113(1), 187-194.
- Hayes, M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Hill, C. and Stanton, C., 2006. Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 2260-2264.
- Hekmat, S. and Reid, G., 2006. Sensory properties of probiotic yogurt is comparable to standard yogurt. *Nutrition Research*, 26(4), 163-166.
- Hernandez-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B. and Amigo, L., 2005. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 588-593.

- Hrnjez, D., Vaštag, Ž., Milanović, S., Vukić, V., Ilić, M., Popović, L. and Kanurić, K., 2014. The biological activity of fermented dairy products obtained by kombucha and conventional starter cultures during storage. *Journal of Functional Foods*, 10, 336-345.
- Hu, Y., Zhang, L., Wen, R., Chen, Q. and Kong, B., 2020. Role of lactic acid bacteria in flavor development in traditional Chinese fermented foods: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-15.
- Huang, J., Lehe, M., Sheng, Q., Shanjiang, Y. A. O. and Dongqiang, L. I. N., 2007. Purification and characterization of glutamate decarboxylase of *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 isolated from fresh milk. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 15(2), 157-161.
- Hurtado-Romero, A., Toro-Barbosa, D., Gradilla-Hernández, M. S., Garcia-Amezquita, L. E. and García-Cayuela, T., 2021. Probiotic properties, prebiotic fermentability, and gaba-producing capacity of microorganisms isolated from mexican milk kefir grains: A clustering evaluation for functional dairy food applications. *Foods*, 10(10), 2275.
- Hussin, F. S., Chay, S. Y., Zarei, M., Meor Hussin, A. S., Ibadullah, W. Z. W., Zaharuddin, N. D., and Saari, N., 2020. Potentiality of self-cloned *Lactobacillus plantarum* Taj-Apis362 for enhancing GABA production in yogurt under glucose induction: optimization and its cardiovascular effect on spontaneous hypertensive rats. *Foods*, 9(12), 1826.
- Hussin, F. S., Chay, S. Y., Hussin, A. S. M., Wan Ibadullah, W. Z., Muhialdin, B. J., Abd Ghani, M. S. and Saari, N., 2021. GABA enhancement by simple carbohydrates in yoghurt fermented using novel, self-cloned *Lactobacillus plantarum* Taj-Apis362 and metabolomics profiling. *Scientific Reports*, 11(1), 1-12.
- Ibrahim, H. R., Isono, H. and Miyata, T., 2018. Potential antioxidant bioactive peptides from camel milk proteins. *Animal Nutrition*, 4(3), 273-280.
- Innocente, N., Biasutti, M., Rita, F., Brichese, R., Comi, G. and Iacumin, L., 2016. Effect of indigenous *Lactobacillus rhamnosus* isolated from bovine milk on microbiological characteristics and aromatic profile of traditional yogurt. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 158-164.
- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M. and Sansawa, H., 2003. Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(3), 490-495.
- Irigoyen, A., Ortigosa, M., Garcia, S., Ibanez, F. C. and Torre, P., 2012. Comparison of free amino acids and volatile components in three fermented milks. *International Journal of Dairy Technology*, 65(4), 578-584.
- Irla, M., Naerdal, I., Brautaset, T. and Wendisch, V.F., 2017. Methanol-based γ -aminobutyric acid (GABA) production by genetically engineered *Bacillus methanolicus* strains. *Industrial Crops and Products*, 106, 12-20.
- Ito, K., Tanaka, K., Nishibe, Y., Hasegawa, J. and Ueno, H., 2007. GABA-synthesizing enzyme, GAD67, from dermal fibroblasts: evidence for a new skin function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770(2), 291-296.
- Jain, P. and Ghodke, M. S., 2021. Advances and Perspectives of Gamma-Aminobutyric Acid as a Bioactive Compound in Food. *Bioactive Natural Products for Pharmaceutical Applications*, Ed: D. Pal, A. K. Nayak, Springer, Cham, 819-839.
- Jasim, M. A., Salih, G. M. and Hamk, M. L., 2018. The effect of arabic gum on physicochemical and sensory properties of camel milk, yogurt. *Journal of Zankoy Sulaimani-Part A*, 2, 97-104.

- Jenssen, H., Hamill, P. and Hancock, R. E., 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491-511.
- Jitpakdee, J., Kantachote, D., Kanzaki, H. and Nitoda, T., 2021. Selected probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented foods for functional milk production: Lower cholesterol with more beneficial compounds. *LWT*, 135, 110061.
- Kamali Alamdari, E. and Ehsani, M. R., 2017. Antimicrobial peptides derived from milk: A review. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 7(1), 49-56.
- Karimian, E., Moayedi, A., Khomeiri, M., Aalami, M. and Mahoonak, A. S., 2020. Application of high-GABA producing *Lactobacillus plantarum* isolated from traditional cabbage pickle in the production of functional fermented whey-based formulate. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(6), 3408-3416.
- Kariyawasam, K. M. G. M. M., Lee, N. K. and Paik, H. D., 2021. Synbiotic yoghurt supplemented with novel probiotic *Lactobacillus brevis* KU200019 and fructooligosaccharides. *Food Bioscience*, 39, 100835.
- Kavaz Yüksel, A. and Bakırcı, İ., 2015. An investigation of the volatile compound profiles of probiotic yogurts produced using different inulin and demineralised whey powder combinations. *Food Science and Biotechnology*, 24(3), 807-816.
- Kawakami, K., Yamada, K., Yamada, T., Nabika, T. and Nomura, M., 2018. Antihypertensive effect of γ -aminobutyric acid-enriched brown rice on spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 64(1), 56-62.
- Khanlari, Z., Moayedi, A., Ebrahimi, P., Khomeiri, M. and Sadeghi, A., 2021. Enhancement of γ -aminobutyric acid (GABA) content in fermented milk by using *Enterococcus faecium* and *Weissella confusa* isolated from sourdough. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(10), e15869.
- Kınık, Ö. ve Gürsoy, O., 2002. Süt proteinleri kaynaklı biyoaktif peptitler. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(2), 195-203.
- Kim, N. Y., Kim, S. K. and Ra, C. H., 2021. Evaluation of gamma-aminobutyric acid (GABA) production by *Lactobacillus plantarum* using two-step fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 1-10.
- Kim, J., Yoon, Y. W., Kim, M. S., Lee, M. H., Kim, G. A., Bae, K. and Yoon, S. S., 2022. Gamma-aminobutyric acid fermentation in MRS-based medium by the fructophilic *Lactiplantibacillus plantarum* Y7. *Food Science and Biotechnology*, 31(3), 333-341.
- Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, S., Momose, H. and Kimura, T., 2005. Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiology*, 22, 497-504.
- Kook, M. C. and Cho, S. C., 2013. Production of GABA (gamma amino butyric acid) by lactic acid bacteria. *Food Science of Animal Resources*, 33(3), 377-389.
- Korhonen, H. and Pihlanto, A., 2006. Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960.
- Kostis, W. J., Shetty, M., Chowdhury, Y. S. and Kostis, J. B., 2018. ACE inhibitor-induced angioedema: a review. *Current Hypertension Reports*, 20(7), 1-7.
- Köse, Ş. ve Ocak, E., 2014. Yoğurtta lezzet bileşenlerinin oluşumu ve bu oluşum üzerine etki eden faktörler. *Akademik Gıda*, 12(2), 101-107.

- Kudoh Y., Matsuda S., Igoshi K. and Oki T., 2001. Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* IFO13953. The Japanese Society for Food Science and Technology, 48, 44.
- Kumar, R., Kumar, A., Sharma, R. and Baruwa, A., 2010. Pharmacological review on natural ACE inhibitors. Der Pharmacia Lettre, 2(2), 273-293.
- Kurt, A., Çakmakçı S. ve Çağlar A., 2007. Süt ve Mamülleri Muayene ve Analiz Metotları Rehberi, Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Yay. No.18.
- Lahogue, V., Réhel, K., Taupin, L., Haras, D. and Allaume, P., 2010. A HPLC-UV method for the determination of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. Food Chemistry, 118(3), 870-875.
- Lahov, E. and Regelson, W., 1996. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. Food and Chemical Toxicology, 34(1), 131-145.
- Lee, S. G., Lee, Y. J., Kim, M. K., Han, K. S., Jeong, S. G., Oh, M. H., Jang, A., Kim, D.H., Bae, I.H. and Ham, J. S., 2010. A study on the yogurt manufacture suitability and antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* LHB55 isolated from Kimchi. Journal of Animal Science and Technology, 52(2), 141-148.
- Lee, K. W., Shim, J. M., Yao, Z., Kim, J. A., Kim, H. J. and Kim, J. H., 2017. Characterization of a glutamate decarboxylase (GAD) from *Enterococcus avium* M5 isolated from Jeotgal, a Korean fermented seafood. Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(7), 1216-1222.
- Lemes, A. C., Sala, L., Ores, J. D. C., Braga, A. R. C., Egea, M. B. and Fernandes, K. F., 2016. A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. International Journal of Molecular Sciences, 17(6), 950.
- Li, H., Gao, D., Cao, Y. and Xu, H., 2008. A high γ -aminobutyric acid-producing *Lactobacillus brevis* isolated from Chinese traditional paocai. Annals of Microbiology, 58(4), 649-653.
- Li, H. and Cao, Y., 2010. Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. Amino acids, 39(5), 1107-1116.
- Li, Z., Jiang, A., Yue, T., Wang, J., Wang, Y. and Su, J., 2013a. Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates. Journal of Dairy Science, 96(7), 4242-4251.
- Li, H., Liu, L., Zhang, S., Uluko, H., Cui, W. and Lv, J., 2013b. Potential use of *Lactobacillus casei* AST18 as a bioprotective culture in yogurt. Food Control, 34(2), 675-680.
- Li, J., Zhang, Z., Liu, X., Wang, Y., Mao, F., Mao, J., Lu, X., Jiang, D., Wan, Y., Lv, J.Y., Cao, G., Zhang, J., Zhao, N., Atkinson, M., Greiner, D.L., Prud'homme, G.J., Jiao, Z., Li, Y. and Wang, Q., 2015. Study of GABA in healthy volunteers: pharmacokinetics and pharmacodynamics. Frontiers in Pharmacology, 6, 260.
- Li, C., Kwok, L. Y., Mi, Z., Bala, J., Xue, J., Yang, J., Ma, Y., Zhang, H. and Chen, Y., 2017. Characterization of the angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of fermented milks produced with *Lactobacillus casei*. Journal of Dairy Science, 100(12), 9495-9507.
- Li, J., Zhao, J., Wang, X., Qayum, A., Hussain, M. A., Liang, G., Hou, J., Jiang, Z. and Li, A., 2019a. Novel angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides from fermented bovine milk started by *Lactobacillus helveticus* KLDS. 31 and *Lactobacillus casei*

- KLDS. 105: purification, identification, and interaction mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2643.
- Li, S., Tang, S., He, Q., Hu, J. and Zheng, J., 2019b. Changes in proteolysis in fermented milk produced by *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus plantarum* or *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* during refrigerated storage. *Molecules*, 24(20), 3699.
- Li, S., Tang, S., He, Q., Gong, J. and Hu, J., 2020. Physicochemical, textural and volatile characteristics of fermented milk co-cultured with *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium animalis* or *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Science and Technology*, 55(2), 461-474.
- Liao, J., Wu, X., Xing, Z., Li, Q., Duan, Y., Fang, W. and Zhu, X., 2017. γ -Aminobutyric acid (GABA) accumulation in tea (*Camellia sinensis* L.) through the GABA shunt and polyamine degradation pathways under anoxia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(14), 3013-3018.
- Lim, S. D., Kim, K. S. and Do, J. R., 2009. Physiological characteristics and GABA production of *Lactobacillus acidophilus* RMK567 isolated from raw milk. *Food Science of Animal Resources*, 29(1), 15-23.
- Lin, Q., 2013. Submerged fermentation of *Lactobacillus rhamnosus* YS9 for γ -aminobutyric acid (GABA) production. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 183-187.
- Linares, D.M., O'Callaghan, T.F., O'Connor, P.M., Ross, R.P. and Stanton, C., 2016. *Streptococcus thermophilus* APC151 strain is suitable for the manufacture of naturally GABA-enriched bioactive yogurt. *Frontiers in Microbiology*, 7:1876.
- Liu, H., Zhang, J., Yang, W. Q., Liu, Z. Y., Chen, X., Guo, H., Liu, B.Y., Zhang, C.G., Liu, Y.C., Liu, J.C. and Guan, H., 2014. Bio-synthesis of GABA by *Streptococcus thermophilus* QYW-LYS1 isolated from traditional fermented yoghurt. In *Advanced Materials Research* (Vol. 884, pp. 401-404). Trans Tech Publications Ltd.
- Liu, Y., Eichler, J. and Pischetsrieder, M., 2015. Virtual screening of a milk peptide database for the identification of food-derived antimicrobial peptides. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(11), 2243-2254.
- Liu, R., Xing, L., Fu, Q., Zhou, G. H. and Zhang, W. G., 2016. A review of antioxidant peptides derived from meat muscle and by-products. *Antioxidants*, 5(3), 32.
- Lopez-Exposito, I., Gómez-Ruiz, J. Á., Amigo, L. and Recio, I., 2006. Identification of antibacterial peptides from ovine α 2-casein. *International Dairy Journal*, 16(9), 1072-1080.
- Lowry, O.H., Resebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*, 193, 265–275.
- Lu, X., Chen, Z., Gu, Z. and Han, Y., 2008. Isolation of γ -aminobutyric acid-producing bacteria and optimization of fermentative medium. *Biochemical Engineering Journal*, 41(1), 48-52.
- Lucic, V., 2020. Cryo-electron tomography and synaptic transmission in the brain. *Health and Medicine, Research Outreach*. <https://researchoutreach.org/wp-content/uploads/2020/10/Vladan-Lucic.pdf>. (24.01.2022)
- Mada, S. B., Ugwu, C. P. and Abarshi, M. M., 2020. Health promoting effects of food-derived bioactive peptides: A review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(2), 831-848.

- Maeno, M., Yamamoto, N. and Takano, T., 1996. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 79(8), 1316-1321.
- Malkoski, M., Dashper, S. G., O'Brien-Simpson, N. M., Talbo, G. H., Macris, M., Cross, K. J. and Reynolds, E. C., 2001. Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(8), 2309-2315.
- Mann, B., Athira, S., Sharma, R. and Bajaj, R., 2017. Bioactive Peptides in Yogurt. *Yogurt in Health and Disease Prevention*, Ed: N.P. Shah, Academic Press, UK, 411-423.
- McCann, K. B., Shiell, B. J., Michalski, W. P., Lee, A., Wan, J., Roginski, H. and Coventry, M. J., 2006. Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine α S1-casein. *International Dairy Journal*, 16(4), 316-323.
- Meira, S. M. M., Daroit, D. J., Helfer, V. E., Corrêa, A. P. F., Segalin, J., Carro, S. and Brandelli, A., 2012. Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Research International*, 48(1), 322-329.
- Memiş, H., 2021. *Levilactobacillus Brevis* AK19B Suşu ile γ -Aminobütirik Asit Üretiminin Optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bayburt.
- Min, Z., Yunyun, J., Miao, C. and Zhennai, Y., 2020. Characterization and ACE inhibitory activity of fermented milk with probiotic *Lactobacillus plantarum* K25 as Analyzed by GC-MS-based metabolomics approach, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(6), 903-911.
- Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C. G., Fox, P. F., Monnet, V. and Gobbetti, M., 2003. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5297-5305.
- Minervini, F., Bilancia, M.T., Siragusa, S., Gobbetti, M. and Caponio, F., 2009. Fermented goats' milk produced with selected multiple starters as a potentially functional food. *Food Microbiology*, 26, 559-564.
- Mohanty, D., Jena, R., Choudhury, P. K., Pattnaik, R., Mohapatra, S. and Saini, M. R., 2016. Milk derived antimicrobial bioactive peptides: a review. *International Journal of Food Properties*, 19(4), 837-846.
- Moineau-Jean, A., Champagne, C. P., Roy, D., Raymond, Y. and LaPointe, G., 2019. Effect of Greek-style yoghurt manufacturing processes on starter and probiotic bacteria populations during storage. *International Dairy Journal*, 93, 35-44.
- Montanhini, M. T. M., Montanhini, R. N., Pinto, J. P. N. and Bersot, L. S., 2013. Effect of temperature on the lipolytic and proteolytic activity of *Bacillus cereus* isolated from dairy products. *International Food Research Journal*, 20(3).
- Moore, J. F., DuVivier, R. and Johanningsmeier, S. D., 2021. Formation of γ -aminobutyric acid (GABA) during the natural lactic acid fermentation of cucumber. *Journal of Food Composition and Analysis*, 96, 103711.
- Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N. and Schrezenmeir, J., 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47(4), 171-182.
- Muelas, R., de Olives, A. M., Romero, G., Díaz, J. R., Sayas-Barberá, M. E. and Sendra, E., 2018. Evaluation of individual lactic acid bacteria for the fermentation of goat milk: Quality parameters. *LWT*, 98, 506-514.

- Muhialdin, B. J. and Algboory, H. L., 2018. Identification of low molecular weight antimicrobial peptides from Iraqi camel milk fermented with *Lactobacillus plantarum*. *PharmaNutrition*, 6(2), 69-73.
- Murray, B. A. and FitzGerald, R. J., 2007. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production. *Current Pharmaceutical Design*, 13(8), 773-791.
- Nabrdalik, M., Grata, K. and Latała, A., 2010. Proteolytic activity of *Bacillus cereus* strains. *Proceedings of ECOpole*, 4.
- Nagpal, R., Behare, P., Rana, R., Kumar, A., Kumar, M., Arora, S., Morotta, F., Jain, S. and Yadav, H., 2011. Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. *Food and Function*, 2(1), 18-27.
- Nejati, F., Rizzello, C. G., Di Cagno, R., Sheikh-Zeinoddin, M., Diviccaro, A., Minervini, F. and Gobbetti, M., 2013. Manufacture of a functional fermented milk enriched of Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE)-inhibitory peptides and γ -amino butyric acid (GABA). *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 183-189.
- Nielsen, M. S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K. I. and Otte, J., 2009. Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *International Dairy Journal*, 19(3), 155-165.
- Nikmaram, N., Dar, B. N., Roohinejad, S., Koubaa, M., Barba, F. J., Greiner, R. and Johnson, S. K., 2017. Recent advances in γ -aminobutyric acid (GABA) properties in pulses: An overview. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(9), 2681-2689.
- Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y. and Suzuki, I., 1999. Novel characteristic for distinguishing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from subsp. *cremoris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(1), 163-166.
- Nwachukwu, I. D. and Aluko, R. E., 2019. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. *Journal of Food Biochemistry*, 43(1), e12761.
- Oh, S. H., Moon, Y. J. and Oh, C. H., 2003. γ -Aminobutyric acid (GABA) content of selected uncooked foods. *Preventive Nutrition and Food Science*, 8(1), 75-78.
- Ong, L. and Shah, N. P., 2008. Release and identification of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. *LWT-Food Science and Technology*, 41(9), 1555-1566.
- Ott, A., Hugi, A., Baumgartner, M. and Chaintreau, A., 2000. Sensory investigation of yogurt flavor perception: mutual influence of volatiles and acidity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 441-450.
- Otte, J., Lenhard, T., Flambard, B. and Sørensen, K. I., 2011. Influence of fermentation temperature and autolysis on ACE-inhibitory activity and peptide profiles of milk fermented by selected strains of *Lactobacillus helveticus* and *Lactococcus lactis*. *International Dairy Journal*, 21(4), 229-238.
- Özcan, T., Sahin, S., Akpınar-Bayazit, A. and Yilmaz-Ersan, L., 2019. Assessment of antioxidant capacity by method comparison and amino acid characterisation in buffalo milk kefir. *International Journal of Dairy Technology*, 72(1), 65-73.
- Özer, B., 2006. Yoğurt Bilimi ve Teknolojisi. Sidas LTD. ŞTİ., 488 s.
- Özer, C., 2019a. Farklı Biyoteknolojik Yöntemler ile Gamma-Aminobutirik Asit (Gaba) Üretimi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.

- Özer, M. 2019b. Development of Functional Chocolate Using Gammaamino Butyric Acid Producer Probiotic: Prominent to Alleviate Anxiety Disorder. Master's Thesis, Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology, İzmir.
- Öztürk, Y. ve Özerdoğan, N., 2020. Postpartum ağrının fizyolojisi ve yönetimi. Türkiye Klinikleri Journal Health Sciences, 5(2), 345-53.
- Pan, D. D., Wu, Z., Peng, T., Zeng, X. Q. and Li, H., 2014. Volatile organic compounds profile during milk fermentation by *Lactobacillus pentosus* and correlations between volatiles flavor and carbohydrate metabolism. Journal of Dairy Science, 97(2), 624-631.
- Panayotova, T., Pashova-Baltova, K. and Dimitrov, Z., 2018. Production of ACE-inhibitory peptides in milk fermented with selected lactic acid bacteria. Journal of BioScience and Biotechnology, 7(1), 31-37.
- Pandey, R., Vischer, N. O., Smelt, J. P., van Beilen, J. W., Ter Beek, A., De Vos, W. H., Brul, S. and Manders, E. M., 2016. Intracellular pH response to weak acid stress in individual vegetative *Bacillus subtilis* cells. Applied and Environmental Microbiology, 82(21), 6463-6471.
- Papadimitriou, C.G., Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., Silva, S.V., Gomes, A-M., Malcata, F.X. and Alichanidis, E., 2007. Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. Food Chemistry, 105(2):647–56.
- Park, K. B. and Oh, S. H., 2007. Cloning, sequencing and expression of a novel glutamate decarboxylase gene from a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus brevis* OPK-3. Bioresource Technology, 98(2), 312-319.
- Park, J. Y., Jeong, S. J. and Kim, J. H., 2014. Characterization of a glutamate decarboxylase (GAD) gene from *Lactobacillus zymae*. Biotechnology Letters, 36(9), 1791-1799.
- Parmar, H., Hati, S., Panchal, G. and Sakure, A. A., 2020. Purification and production of novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory bioactive peptides derived from fermented goat milk. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 26(2), 997-1011.
- Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U. and Hunziker, P., 2001. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1526(2), 131-140.
- Penna, A. L. B., Gurram, S. and Barbosa-Cánovas, G. V., 2006. Effect of high hydrostatic pressure processing on rheological and textural properties of probiotic low-fat yogurt fermented by different starter cultures. Journal of Food Process Engineering, 29(5), 447-461.
- Pihlanto, A., Virtanen, T. and Korhonen, H., 2010. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. International Dairy Journal, 20, 3–10.
- Pinto, S. M., Clemente, M. D. G. and De Abreu, L. R., 2009. Behaviour of volatile compounds during the shelf life of yoghurt. International Journal of Dairy Technology, 62(2), 215-223.
- Pouliot-Mathieu, K., Gardner-Fortier, C., Lemieux, S., St-Gelais, D., Champagne, C. P. and Vuilleumard, J.-C., 2013. Effect of cheese containing gamma-aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria on blood pressure in men. Pharma Nutrition 1 (4):141–8

- Pyo, Y. H. and Song, S. M., 2009. Physicochemical and sensory characteristics of a medicinal soy yogurt containing health-benefit ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(1), 170-175.
- Quilez, J. and Diana, M., 2017. Gamma-aminobutyric acid-enriched fermented foods. In *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*, 85-103, Academic Press.
- Quiros, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L. and Recio, I., 2005. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *Journal of Dairy Science*, 88(10), 3480-3487.
- Quiros, A., Dávalos, A., Lasunción, M. A., Ramos, M. and Recio, I., 2008. Bioavailability of the antihypertensive peptide LHLPLP: Transepithelial flux of HLPLP. *International Dairy Journal*, 18(3), 279-286.
- Rahman, I. E. A., Dirar, H. A. and Osman, M. A., 2009. Microbiological and biochemical changes and sensory evaluation of camel milk fermented by selected bacterial starter cultures. *African Journal of Food Science*, 3(12), 398-405.
- Rahmawati, I. S., and Suntornsuk, W., 2016. Effects of fermentation and storage on bioactive activities in milks and yoghurts. *Procedia Chemistry*, 18, 53-62.
- Rana, S., Bajaj, R. and Mann, B., 2018. Characterization of antimicrobial and antioxidative peptides synthesized by *L. rhamnosus* C6 fermentation of milk. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 24(2), 309-321.
- Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Adams, M. and Baines, S. K., 2016. Co-culturing of probiotics influences the microbial and physico-chemical properties but not sensory quality of fermented dairy drink made from goats' milk. *Small Ruminant Research*, 136, 104-108.
- Rashmi, D., Zanan, R., John, S., Khandagale, K. and Nadaf, A., 2018. γ -aminobutyric acid (GABA): biosynthesis, role, commercial production, and applications. In *Studies in Natural Products Chemistry*, 57, 413-452.
- Renes, E., Ladero, V., Tornadijo, M. E. and Fresno, J. M., 2019. Production of sheep milk cheese with high γ -aminobutyric acid and ornithine concentration and with reduced biogenic amines level using autochthonous lactic acid bacteria strains. *Food microbiology*, 78, 1-10.
- Rezazadeh, H., Sharifi, M. R. and Soltani, N., 2021. Insulin resistance and the role of gamma-aminobutyric acid. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 26.
- Rizzello, C. G., Losito, I., Gobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M. D. and 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.
- Robert, M. C., Razaname, A., Mutter, M. and Juillerat, M. A., 2004. Identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), 6923-6931.
- Rubak, Y. T., Nuraida, L., Iswantini, D. and Prangdimurti, E., 2020. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in milk fermented by indigenous lactic acid bacteria. *Veterinary World*, 13(2), 345.
- Rubak, Y. T., Nuraida, L., Iswantini, D., Prangdimurti, E. and Sanam, M. U. E., 2021. Peptide profiling of goat milk fermented by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* BD7: Identification of potential biological activity. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(8).

- Sa, H. D., Park, J. Y., Jeong, S. J., Lee, K. W. and Kim, J. H., 2015. Characterization of glutamate decarboxylase (GAD) from *Lactobacillus sakei* A156 isolated from Jeotgal. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(5), 696-703.
- Saccaro, D. M., Tamime, A. Y., Pilleggi, A. L. O. and Oliveira, M. N., 2009. The viability of three probiotic organisms grown with yoghurt starter cultures during storage for 21 days at 4 C. *International Journal of Dairy Technology*, 62(3), 397-404.
- Sah, B. N. P., Vasiljevic, T., McKechnie, S. and Donkor, O. N., 2014. Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. *Food Chemistry*, 156, 264-270.
- Sah, B. N. P., Vasiljevic, T., McKechnie, S. and Donkor, O. N., 2015. Effect of refrigerated storage on probiotic viability and the production and stability of antimutagenic and antioxidant peptides in yogurt supplemented with pineapple peel. *Journal of Dairy Science*, 98(9), 5905-5916.
- Sahab, N. R., Subroto, E., Balia, R. L. and Utama, G. L., 2020. γ -Aminobutyric acid found in fermented foods and beverages: Current trends. *Heliyon*, 6(11), e05526.
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. and Itoh, T., 2000. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, 83(7), 1434-1440.
- Sanchez, A. and Vazquez, A., 2017. Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1(1), 29-46.
- Santos-Espinosa, A., Beltrán-Barrientos, L. M., Reyes-Díaz, R., Mazorra-Manzano, M. Á., Hernández-Mendoza, A., González-Aguilar, G. A., Sáyo-Ayerdi, S.G., Vallejo-Cordoba, B. and González-Córdova, A. F., 2020. Gamma-aminobutyric acid (GABA) production in milk fermented by specific wild lactic acid bacteria strains isolated from artisanal Mexican cheeses. *Annals of Microbiology*, 70(1), 1-11.
- Sarasa, S. B., Mahendran, R., Muthusamy, G., Thankappan, B., Selta, D. R. F. and Angayarkanni, J., 2020. A brief review on the non-protein amino acid, gamma-amino butyric acid (GABA): its production and role in microbes. *Current Microbiology*, 77(4), 534-544.
- Sarmadi, B. H. and Ismail, A., 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956.
- Saygın, M. ve Özgüner, M., 2020. Uygunun mikro yapısı ve mimarisi. *Uyku Bülteni*, 1(1), 19-29.
- Sebastian-Nicolas, J. L., Contreras-López, E., Ramírez-Godínez, J., Cruz-Guerrero, A. E., Rodríguez-Serrano, G. M., Añorve-Morga, J., Jaimez-Ordaz, J., Castañeda-Ovando, A., Pérez-Escalante, E., Ayala-Niño, A. and González-Olivares, L. G., 2021. Milk Fermentation by *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG and *Streptococcus thermophilus* SY-102: Proteolytic profile and ACE-inhibitory activity. *Fermentation*, 7(4), 215.
- Semen, Z. ve Altıntaş, A., 2015. Sütte biyoaktif peptitler ve biyolojik önemi. *Türk Veteriner Hekimleri Birliği Dergisi*, 3-4.
- Seo, M. J., Nam, Y. D., Park, S. L., Lee, S. Y., Yi, S. H. and Lim, S. I., 2013. γ -aminobutyric acid production in skim milk co-fermented with *Lactobacillus brevis* 877G and *Lactobacillus sakei* 795. *Food Science and Biotechnology*, 22(3), 751-755.
- Servili, M., Rizzello, C. G., Taticchi, A., Esposto, S., Urbani, S., Mazzacane, F., Di Maio, I., Selvaggini, R., Gobbetti, M. and Di Cagno, R., 2011. Functional milk beverage fortified with phenolic compounds extracted from olive vegetation water, and fermented with

- functional lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 147(1), 45-52.
- Shan, Y., Man, C. X., Han, X., Li, L., Guo, Y., Deng, Y., Li, T., Zhang, L., W. and Jiang, Y.J., 2015. Evaluation of improved GABA production in yoghurt using *Lactobacillus plantarum* NDC75017. *Journal of Dairy Science*, 98, 2138–2149.
- Shori, A. B., Baba, A. S. and Chuah, P. F., 2013. The effects of fish collagen on the proteolysis of milk proteins, ACE inhibitory activity and sensory evaluation of plain-and *Allium sativum*-yogurt. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(5), 701-706.
- Shori, A. B., Albalawi, A., Al Zahrani, A. J., Al-sulbi, O. S. and Baba, A. S., 2022a. Microbial analysis, antioxidant activity, and sensory properties of yoghurt with different starter cultures during storage. *International Dairy Journal*, 126, 105267.
- Shori, A. B., Aljohani, G. S., Al-zahrani, A. J., Al-sulbi, O. S. and Baba, A. S., 2022b. Viability of probiotics and antioxidant activity of cashew milk-based yogurt fermented with selected strains of probiotic *Lactobacillus* spp. *LWT*, 153, 112482.
- Shuangquan, H. T. and Miyamoto, T., 2008. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in skim milk fermented with *Lactobacillus helveticus* 130B4 from camel milk in Inner Mongolia. China. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(15), 2688-92.
- Sila, A. and Bougatef, A., 2016. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *Journal of Functional Foods*, 21, 10-26.
- Silva, S. V. and Malcata, F. X., 2005. Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15(1), 1-15.
- Singh, A. K. and Ramesh, A., 2009. Evaluation of a facile method of template DNA preparation for PCR-based detection and typing of lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 26, 504–513.
- Sipola, M., Finckenberg, P., Korpela, R., Vapaatalo, H. and Nurminen, M. L., 2002. Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *Journal of Dairy Research*, 69(1), 103-111.
- Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C.G., Coda, R. and Gobbetti, M., 2007. Synthesis of gamma-aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:7283–7290.
- Stachnik, M. and Bac. A., 2017. Bioactive compounds in foods. 2ND Workshop On Applied and Sustainable Engineering, Faculty of Mechanical Engineering, Koszalin University of Technology.
- Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. and Van Sinderen, D., 2005. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2), 198-203.
- Sultan, S., Huma, N., Butt, M. S. and Shahid, M., 2017. Antihypertensive and antioxidative potential of water soluble peptide fraction from different yoghurts. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(3), e12979.
- Sun, T., Zhao, S., Wang, H., Cai, C., Chen, Y. and Zhang, H., 2009. ACE-inhibitory activity and gamma-aminobutyric acid content of fermented skim milk by *Lactobacillus helveticus* isolated from Xinjiang koumiss in China. *European Food Research and Technology*, 228(4), 607-612.

- Şahingil, D., 2012. Beyaz Peynir Üretiminde Kullanılan Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Proteoliz, Ace-İnhibisyon Aktivitesi Ve Aroma Oluşumuna Etkilerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Şahingil, D., Gokce, Y., Yuceer, M. and Hayaloglu, A. A., 2019. Optimization of proteolysis and angiotensin converting enzyme inhibition activity in a model cheese using response surface methodology. LWT, 99, 525-532.
- Şanlıdere Aloğlu, H., 2010. Yoğurttan Biyoaktif Peptit Eldesi ve Bu Peptitlerin Antimikrobiyel ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Şanlıdere Aloğlu, H. and Öner, Z., 2011. Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. Journal of Dairy Science, 94(11), 5305-5314.
- Şimşek, A. ve Kılıç, B., 2016. Et kaynaklı biyoaktif peptitler ve fonksiyonel özellikleri. Gıda, 41(4), 267-274.
- Taha, S., El Abd, M., De Gobba, C., Abdel-Hamid, M., Khalil, E. and Hassan, D., 2017. Antioxidant and antibacterial activities of bioactive peptides in buffalo's yoghurt fermented with different starter cultures. Food Science and Biotechnology, 26(5), 1325-1332.
- Theolier, J., Hammami, R., Labelle, P., Fliss, I. and Jean, J., 2013. Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. Journal of Functional Foods, 5(2), 706-714.
- Tian, Z. and Liang, M., 2021. Renal metabolism and hypertension. Nature Communications, 12(1), 1-12.
- Torre, L. L., Tamime, A. Y. and Muir, D. D., 2003. Rheology and sensory profiling of set-type fermented milks made with different commercial probiotic and yoghurt starter cultures. International Journal of Dairy Technology, 56(3), 163-170.
- Tung, Y. T., Lee, B. H., Liu, C. F. and Pan, T. M., 2011. Optimization of culture condition for ACEI and GABA production by lactic acid bacteria. Journal of Food Science, 76(9), M585-M591.
- Turgut, T., Çetin, B., Erdoğan, A. and Gürses, M., 2004. Some microbiological characteristics of rose hip yoghurt inoculated with *Lactobacillus acidophilus* DSMZ 20079. In I International Rose Hip Conference 690, 299-302.
- Tylewicz, U., Inchingolo, R. and Rodriguez-Estrada, M. T., 2022. Food aroma compounds. In Nutraceutical and Functional Food Components, Academic Press, 363-409.
- Uehara, E., Hokazono, H., Hida, M., Sasaki, T., Yoshioka, H. and Matsuo, N., 2017. GABA promotes elastin synthesis and elastin fiber formation in normal human dermal fibroblasts (HDFs). Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 81(6), 1198-1205.
- Ünal, G. and Akalın, A. S., 2012. Antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of yoghurt fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate. Dairy Science and Technology, 92(6), 627-639.
- Valenzuela, J. A., Flórez, A. B., Vázquez, L., Vasek, O. M. and Mayo, B., 2019. Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by lactic acid bacteria strains isolated from traditional, starter-free dairy products made of raw milk. Beneficial Microbes, 10(5), 579-587.
- Vercruysse, L., Van Camp, J. and Smagghe, G., 2005. ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: a review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(21), 8106-8115.

- Vermeirssen, V., Van Camp, J. and Verstraete, W., 2004. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92(3), 357-366.
- Villegas, J. M., Brown, L., de Giori, G. S. and Hebert, E. M., 2016. Optimization of batch culture conditions for GABA production by *Lactobacillus brevis* CRL 1942, isolated from quinoa sourdough. *LWT-Food Science and Technology*, 67, 22-26.
- Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S. and Korhonen, H., 2007. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), 106-115.
- Vitheejongjaroen, P., Kanthawang, P., Loison, F., Jaisin, Y., Pachekreapol, U. and Taweetchotipatr, M., 2021. Antioxidant activity of *Bifidobacterium animalis* MSMC83 and its application in set-style probiotic yoghurt. *Food Bioscience*, 43, 101259.
- Von Gastrow, L., Madec, M. N., Chuat, V., Lubac, S., Morinière, C., Lê, S., Santoni, S., Sicard, D. and Valence, F., 2020. Microbial diversity associated with gwell, a traditional french mesophilic fermented milk inoculated with a natural starter. *Microorganisms*, 8(7), 982.
- Wakabayashi, H., Bellamy, W., Takase, M. And Tomita, M., 1992. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by lactoferricin, a potent antimicrobial peptide derived from cow's milk. *Journal of Food Protection*, 55(4), 238-240.
- Wang, H. K., Dong, C., Chen, Y. F., Cui, L. M. and Zhang, H. P., 2010. A new probiotic cheddar cheese with high ACE-inhibitory activity and γ -aminobutyric acid content produced with koumiss-derived *Lactobacillus casei* Zhang. *Food Technology and Biotechnology*, 48(1), 62-70.
- Wang, J., Li, C., Xue, J., Yang, J., Zhang, Q., Zhang, H. and Chen, Y., 2015. Fermentation characteristics and angiotensin I-converting enzyme-inhibitory activity of *Lactobacillus helveticus* isolate H9 in cow milk, soy milk, and mare milk. *Journal of Dairy Science*, 98(6), 3655-3664.
- Wang, H., Sun, X., Song, X. and Guo, M., 2021. Effects of kefir grains from different origins on proteolysis and volatile profile of goat milk kefir. *Food Chemistry*, 339, 128099.
- Widyastuti, Y. and Febrisiantosa, A., 2014. The role of lactic acid bacteria in milk fermentation. *Food and Nutrition Sciences*, 2014.
- Xu, S., Boylston, T. D. and Glatz, B. A., 2005. Conjugated linoleic acid content and organoleptic attributes of fermented milk products produced with probiotic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9064-9072.
- Xu, S., Boylston, T. D. and Glatz, B. A., 2006. Effect of inoculation level of *Lactobacillus rhamnosus* and yogurt cultures on conjugated linoleic acid content and quality attributes of fermented milk products. *Journal of Food Science*, 71(4), C275-C280.
- Yalçınkaya, S., Kılıç, G. B. and Çakmakçı, A. G. K., 2019. The importance of gamma aminobutyric acid produced by lactic acid bacteria. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(8), 1094-1099.
- Yamatsu, A., Yamashita, Y., Pandharipande, T., Maru, I. and Kim, M., 2016. Effect of oral γ -aminobutyric acid (GABA) administration on sleep and its absorption in humans. *Food Science and Biotechnology*, 25(2), 547-551.
- Yang, S. Y., Lü, F. X., Lu, Z. X., Bie, X. M., Jiao, Y., Sun, L. J. and Yu, B., 2008. Production of γ -aminobutyric acid by *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* Y2 under submerged fermentation. *Amino Acids*, 34(3), 473-478.
- Yang, X., Wang, Z., Zhang, C., Wang, L., Pang, L., Zhang, D., Man, C. and Jiang, Y., 2021. Assessment of the production of *Bacillus cereus* protease and its effect on the quality of

- ultra-high temperature-sterilized whole milk. *Journal of Dairy Science*, 104(6), 6577-6587.
- Yılmaz, L., 2006. Yoğurt Benzeri Fermente Süt Ürünleri Üretiminde Farklı Probiyotik Kültür Kombinasyonlarının Kullanımı, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Yılmaz, C. and Gökmen, V., 2017. Formation of tyramine in yoghurt during fermentation—Interaction between yoghurt starter bacteria and *Lactobacillus plantarum*. *Food Research International*, 97, 288-295.
- Yılmaz, O. and Soygüder, Z., 2017. Neurotransmitter substances and anatomical localizations. *Van Veterinary Journal*, 28(3), 177-182.
- Yılmaz, F., 2019. Kaşar Peyniri Üretiminde Sonikasyon Uygulanmış Bazı Laktobasillerin Peynirin Olgunlaşması ve Kalitesi Üzerine Etkileri, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Yogeswara, I. B. A., Kittibunchakul, S., Rahayu, E. S., Domig, K. J., Haltrich, D. and Nguyen, T. H. 2020a. Microbial production and enzymatic biosynthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) using *Lactobacillus plantarum* FNCC 260 isolated from Indonesian fermented foods. *Processes*, 9(1), 22.
- Yogeswara, I. B. A., Maneerat, S. and Haltrich, D., 2020b. Glutamate decarboxylase from lactic acid bacteria—a key enzyme in gaba synthesis. *Microorganisms*, 8(12), 1923.
- Yu, P., Ren, Q., Wang, X. and Huang, X., 2019. Enhanced biosynthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) in *Escherichia coli* by pathway engineering. *Biochemical Engineering Journal* Volume 141, 252-258.
- Yu, L., Han, X., Cen, S., Duan, H., Feng, S., Xue, Y., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q. and Chen, W., 2020. Beneficial effect of GABA-rich fermented milk on insomnia involving regulation of gut microbiota. *Microbiological Research*, 233, 126409.
- Yunes, R.A., Poluektova, E.U., Dyachkova, M.S., Klimina, K.M., Kovtun, A.S., Averina, O.V., Orlova, V.S. and Danilenko, V.N., 2016. GABA production and structure of gadB/gadC genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from human microbiota. *Anaerobe*, 42, 197-204.
- Zareba, D., Ziarno, M., Ścibisz, I. and Gawron, J., 2014. The importance of volatile compound profile in the assessment of fermentation conducted by *Lactobacillus casei* DN-114 001. *International Dairy Journal*, 35(1), 11-14.
- Zarei, F., Nateghi, L., Eshaghi, M. R. and Abadi, M. E. T., 2018. Optimization of gamma-aminobutyric acid production in probiotics extracted from local dairy products in west region of Iran using MRS broth and whey protein media. *Applied Food Biotechnology*, 5(4), 233-242.
- Zarei, F., Nateghi, L., Eshaghi, M. R. and Abadi, M. E. T., 2020. Production of Gamma-Aminobutyric acid (GABA) in whey protein drink during fermentation by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(6), 1087-1092.
- Zareian, M., Oskoueian, E., Majdinasab, M. and Forghani, B., 2020. Production of GABA-enriched idli with ACE inhibitory and antioxidant properties using *Aspergillus oryzae*: the antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats. *Food and Function*, 11(5), 4304-4313.
- Zedan, H., Hosseini, S. M. and Mohammadi, A., 2021. The effect of tarragon (*Artemisia dracunculus*) essential oil and high molecular weight Chitosan on sensory properties and shelf life of yogurt. *LWT*, 147, 111613.

- Zhang, Q., Zeng, L., Tan, X., Tang, J. and Xiang, W., 2017a. An efficient γ -aminobutyric acid (GABA) producing and nitrite reducing ability of *Lactobacillus plantarum* BC114 isolated from chinese paocai. Food Science and Technology Research, 23(5), 749-755.
- Zhang, D. D., Liu, J. L., Jiang, T. M., Li, L., Fang, G. Z., Liu, Y. P. and Chen, L. J., 2017b. Influence of *Kluyveromyces marxianus* on proteins, peptides, and amino acids in *Lactobacillus*-fermented milk. Food Science and Biotechnology, 26(3), 739-748.
- Zhang, Q. Y., Yan, Z. B., Meng, Y. M., Hong, X. Y., Shao, G., Ma, J. J., Cheng, X.R., Liu, J., Kang, J. and Fu, C. Y., 2021. Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. Military Medical Research, 8(1), 1-25.
- Zhou, T., Huo, R., Kwok, L. Y., Li, C., Ma, Y., Mi, Z. and Chen, Y., 2019. Effects of applying *Lactobacillus helveticus* H9 as adjunct starter culture in yogurt fermentation and storage. Journal of Dairy Science, 102(1), 223-235.
- Zhou, Q. Y., Zhao, S., Huang, Y. Y., Hu, J. S., Kuang, J. H., Liu, D. M. and Brennan, C. S., 2021. *Lactobacillus Gasseri* LGZ 1029 in yogurt: rheological behaviour and volatile compound composition. International Journal of Food Science and Technology, 56(6), 2992-3003.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı: Sümeyra IŞIK	
Eğitim	
Lisans:	Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü (2012)
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (2014)
Doktora:	Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (2022)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Tezden Üretilmiş Yayınlar	
1. S. Işık, E. Dağdemir and B. Çetin, “Determination of Gamma Aminobutyric Acid (GABA) Production Ability of Lactic Acid Bacteria Isolated from Yogurt and Kefir Grain”, 3 rd International Conference on Food, Agriculture and Animal Sciences (ICOFAAS), Erzurum, 2021.	