

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PEYNİR ALTI SUYUNDA β -KAZOMORFİN-7 ÖLÇÜMÜ
İÇİN ELİSA'YA DAYALI KANTİTATİF METOT
TASARIMI**

**Hazırlayan
Ömer ERGİN**

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Ebru SAATÇİ**

Yüksek Lisans Tezi

**Mayıs 2013
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PEYNİR ALTI SUYUNDA β -KAZOMORFİN-7 ÖLÇÜMÜ
İÇİN ELİSA'YA DAYALI KANTİTATİF METOT
TASARIMI
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Hazırlayan
Ömer ERGİN**

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Ebru SAATÇI**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından FBY-11-3726 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Mayıs 2013
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.



Ömer ERGİN

YÖNERGEYE UYGUNLUK

Peynir Altı Suyunda β -Kazomorfin-7 Ölçümü İçin ELİSA'ya Dayalı Kantitatif Metot Tasarımı adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.



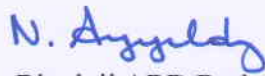
Tezi Hazırlayan

Ömer ERGİN



Danışman

Yrd. Doç. Dr. Ebru SAATÇI



Biyoloji ABD Başkanı

Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ

Yrd. Doç. Dr. Ebru SAATÇI danışmanlığında **Ömer ERGİN** tarafından hazırlanan “Peynir Altı Suyunda β -Kazomorfin-7 Ölçümü İçin ELİSA’ya Dayalı Kantitatif Metot Tasarımı” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

13 / 05 / 2013

JÜRİ:

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Ebru SAATÇI
Üye : Prof. Dr. Aydın TUNÇBİLEK
Üye : Yrd. Doç. Dr. Didem AYDIN

**ONAY:**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun **07/06/2013** tarih ve **2013/25-09** sayılı kararı ile onaylanmıştır.

07 / 06 / 2013

Prof. Dr. Necmettin MARAŞLI

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca farklı bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla beni aydınlatan, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve bu günlere gelmemde en büyük katkı sahibi sayın hocam Yrd. Doç Dr. Ebru SAATÇİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalarım sırasında karşılaştığım zorlukları aşmam için benden manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli nişanlım Çiğdem ATİK'e teşekkür ederim.

FBY-11-3726 kodlu projeye desteklerinden dolayı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

FRM.02.01.06 kodlu KOSGEB Arge ve İnovasyon projesi kapsamında KOSGEB'e katkı ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Ömer ERGİN

Kayseri, Mayıs 2013

PEYNİR ALTI SUYUNDA β -KAZOMORFİN-7 ÖLÇÜMÜ İÇİN ELİSA'YA DAYALI KANTİTATİF METOT TASARIMI

Ömer ERGİN

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi, Mayıs 2013

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ebru SAATÇI

ÖZET

Bu çalışmada Türkiye’de imal edilmiş peynirlerin, peynir altı sularında bulunan beta-kazomorfin-7 (β -kazomorfin-7, BKM-7) peptidi indirek ELİSA ve ters-faz HPLC de analiz edilmiştir. Öncelikle ELİSA standart grafiğini elde etmek üzere, standart inek BKM-7 peptidi BSA ile gluteraldehit konjugasyon metoduyla konjuge edilmiştir. Optimize ELİSA metodu sonlandırılması 25. dk da, 405 nm dalga boyunda plaka okuyucu ile yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri, 1:30 molar oranda BSA-BKM-7 peptit konjugatının 6.25-100 ng/ml aralığında 1/150 primer antikor ve 1/250 enzimatik işaret dilüsyonlarında bir seri standart BKM-7 eğrisine karşı hesaplanmıştır. ELİSA testinin hassasiyeti 23 ± 5.3 ng/ml olarak bulunmuştur. 0.05-0.5 dilüsyon aralığındaki 9 çeşit peynir altı suyu BKM-7 miktarı optimizasyon sonrası indirek ELİSA metodu ile ölçülmüştür. C marka peynir örneği için bulunan BKM-7 miktarı absorbans BKM-7 standart eğrisi kullanılarak, 403.1 ng/ml olarak bulunmuştur. Diğer peynir sularında BKM-7 miktar hesaplaması için immün aktivite alınamamıştır.

Ters-faz HPLC çalışmalarında, BKM-7’nin 220 nm dalga boyunda, 36-38. dk arasında maksimum absorbans verdiği gözlenmiştir. Elde edilen BKM-7 piklerinin konsantrasyonu, 0.0312-1.25 mM derişim aralığında standart eğrisine karşı hesaplanmıştır. Kullanılan filtrelerin geri kazanım katsayılarına göre (30000 MWCO için 0.9) yapılan iyileştirme ile A marka peynir altı suyundaki ortalama BKM-7 miktarı 12.5 ± 2.35 μ M ve karşılığı 10 ng/ml, B marka peynir altı suyundaki ortalama BKM-7 miktarı 35.1 ± 3.93 μ M ve karşılığı 28.1 ng/ml ve C marka peynir altı suyundaki ortalama BKM-7 miktarı 422.68 ± 4.16 μ M ve karşılığı 338.15 ng/ml bulunmuştur.

Çalışılan metotları karşılaştırdığımızda, ELİSA metodunun deteksiyon alt limiti 6.25 ng/ml olmakla beraber HPLC metodunun düşük konsantrasyonlarda, ELİSA’nın ise

yüksek konsantrasyonlarda HPLC'ye göre daha iyi sonuç verdiği görülmüştür. C marka peynir altı suyu BKM-7 peptit miktarının HPLC ile tespit edilen miktarı ile ELİSA da tayin edilen miktarı yüksek tutarlılık göstermektedir. Çalışılan metotlar peptit tespiti ve ölçümü açısından birbirlerini desteklemektedirler.

Pek çok hastalığın etmeni olan ve sağlık açısından her yönden önem ihtiva eden biyoaktif peptit BKM-7, şimdiye kadar geliştirilen diğer yöntemlerinin aksine, sindirim metabolizması çalışmaları ve ekstraksiyon yöntemleri dâhil edilmeden, çalışmamızda geliştirilen metotlarla peynirde direk olarak tespit edilmektedir. Buna bağlı olarak çalışmamız, marketlerde, A1 tip inek sütü ürünlerinin tespitine olanak sağlayan özel bir araştırma niteliği taşımaktadır. İnek sütünde A1 tip süt biyobelirteci niteliğindeki BKM-7' nin miktar tayini yapılabilmesi yönünden geliştirilen analitik metot, günlük hayata uygulanabilirliği kuvvetle muhtemel inovatif bir çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: A1 tip inek sütü, peynir altı suyu, beta-kazomorfın-7, indirek ELİSA, ters-faz HPLC

ELISA-BASED QUANTITATIVE METHOD DESIGN FOR THE DETECTION OF β -CASOMORPHIN-7 IN CHEESE WHEYS

Ömer ERGİN

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

M.Sc. Thesis, May 2013

Supervisor: Assist. Prof. Ebru SAATÇI

In recent study, beta-casomorphin-7 (β -casomorphin-7, BCM-7) content of Turkish white cheese rennet was quantitatively detected by indirect ELISA and RP-HPLC methods. Bovine standard BCM-7 was conjugated with BSA by using glutaraldehyde conjugation method for the drawing of standard graph of ELISA method. Developed ELISA plates had read at 405 nm at 25. min by using plate reader. The concentration of BCM-7 peptides in the samples were calculated towards standard graphics. The graphics were constructed by using 1:30 (w/w) molar ratio of BSA-BCM-7 peptide conjugation in the range of 6.25-100 ng/ml with 0.991 r^2 linearity where the optimum antibody dilutions were 1/150 and 1/250 for the primer antibody and enzymatic labels, respectively. The precision of the indirect ELISA test was as 23 ± 5.3 ng/ml. BCM-7 quantity of 9 different brands of cheese wheys were detected in the dilution limits of 0.05-0.5 by using optimized indirect ELISA method. As a result of detection, the amount of BCM-7 in white cheese C brand was found as 403.1 ng/ml. For the other brands, the immunoreactive did not detected for the calculation of the amount of the peptide.

In RP-HPLC chromatograms, the maximum absorbance peaks of standard bovine BCM-7 peptides were detected at 220 nm between 36-38. minutes. The amount of the peptide in the cheese rennets were calculated towards standard graphic in the range of 0.0312-1.25 mM concentration with 0.9999 r^2 linearity. After the calculation of the recovery coefficient (0.9 for MWCO 30,000) of the used filters in the filtration, the concentration of BCM-7 were found as 12.5 ± 2.35 μ M and 10 ng/ml, 35.1 ± 3.93 μ M and 28.1 ng/ml, 422.68 ± 4.16 μ M and 338.15 ng/ml for brands A, B and C, respectively.

When we compare the methods, even the detection limit of ELISA test was 6.25 ng/ml. It was seen that indirect ELISA method was good in the high concentrations of the peptide and RP-HPLC was good in the low concentrations. A good correlation was found between the methods for the concentration of brand C cheese peptide. Developed methods are supported each other in the determination and the detection of the peptide.

The bioactive peptide BCM-7, factor and reason of many diseases in terms of the importance of health, can be directly detected from the cheese rennet by using the designed method in the thesis without the need for digestion, extraction processes and metabolism studies, unlike the other methods so far developed. Therefore, our study is a unique and an innovative research which allows to determine A1-type cow milk and milk products in the markets. In terms of the amount to determination of BCM-7 as A1 type cow milk biomarker in the milk products, the applicability of the analytical developed method in daily life is more likely.

Keywords: A1 type bovine milk, cheese whey, beta-casomorphin-7, indirect ELISA, RP-HPLC

İÇİNDEKİLER

PEYNİR ALTI SUYUNDA β -KAZOMORFİN-7 ÖLÇÜMÜ İÇİN ELİSA'YA DAYALI KANTİTATİF METOT TASARIMI

	<u>Sayfa</u>
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	xiii
TABLolar LİSTESİ.....	xvi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xvii
GİRİŞ.....	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Sütün Tanımı.....	4
1.1.1. İnek Sütünün Tanımı.....	4
1.1.2. Süt Proteinleri.....	5
1.1.2.1. Kazeinler.....	6
1.1.2.1.1. α-Kazein.....	9
1.1.2.1.2. κ-Kazein.....	10
1.1.2.1.3. β-Kazein.....	10
1.1.2.3. Süt Proteinlerinde Polimorfizm.....	10

1.1.2.3.1. β -kazeinin polimorfizmi	11
1.1.2.3.2. β -Kazeinlerden β -Kazomorfin Sahnımı.....	13
1.2. Peynir Nedir?	14
1.2.1. Serum Proteinleri (Peynir Altı Suyu Proteinleri).....	15
1.2.2. Peynir Üretimi	16
1.2.3. Peynir Üretimi Aşamaları.....	17
1.2.3.1. Sütün Standardizasyonu	18
1.2.3.2. Sütün Pastörizasyonu	19
1.2.3.3. Soğutma	19
1.2.3.4. Mayalama	20
1.2.3.5. Sütün Rennet (Peynir Mayası) İle Pıhtılaşması.....	20
1.2.3.6. Peynir Mayası (Rennin) Etkisi.....	21
1.2.3.6.1. Rennet Enziminin Çalışma Mekanizması.....	22
1.2.3.7. Starter Kültürler	22
1.2.3.8. Pıhtı Kesimi	23
1.2.3.9. Tuzlama	24
1.2.3.10. Ambalajlama ve Depolama	24
1.3. Peynir Kalitesini Etkileyen Faktörler.....	24
1.3.1. Kullanılan Sütün Etkisi.....	24
1.3.2. Pastörizasyonun Etkisi.....	24
1.3.3. Peynir Mayasının Etkisi.....	25
1.3.4. Tuz Konsantrasyonu	25
1.4. Peynirde Biyoaktif Peptitler	26
1.4.1. Biyoaktif Peptitler	26
1.4.2. Peynirde Biyoaktif Peptit Oluşumu.....	27
1.4.2.1. Peynirde β -Kazomorfin-7.....	28
1.4.3. Biyoaktif Peptitlerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri	29
1.4.3.1. β -Kazomorfinler ve Diyabet Hastalığı İlişkisi	29
1.4.3.2. Sindirim Sistemi Üzerine Etkileri	30
1.4.3.3. β -Kazomorfinler ve Ani Bebek Ölüm Sendromu İlişkisi	30
1.4.3.4. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri.....	31
1.4.3.5. Sinir Sistemi Üzerine Etkileri	32
1.5. Biyoaktif Peptitlerin Tayini	33

1.5.1. Biyoaktif Peptitlerin Kromatografik Yöntemlerle Tayini	33
1.5.1.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması.....	34
1.5.1.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	34
1.5.1.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Cihaz Bileşenleri	36
1.5.1.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi' nin Uygulama Alanları	36
1.5.1.5. Diğer Kromatografik ve Analitik Analizler	37
1.5.2. Biyoaktif Peptitlerin İmmünolojik Yöntemler ile Tayini	37
1.5.2.1. Konjugasyon.....	38
1.5.2.2. Gluteraldehit ile konjugasyon.....	38
1.5.2.3. Enzim-Bağımlı İmmüno Ölçümler (ELİSA)	39
1.5.2.4. ELİSA Metodunun Çeşitleri ve Prensipleri	40
1.5.3. Biyoaktif Peptitlerin Analizlerinde Kullanılan Diğer Yöntemler.....	40

2. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Peynir Altı Suyu Örnekleri	42
2.2 Peynir Altı Sularının Süzülmesi	42
2.3. BKM-7'nin BSA konjugasyonu	43
2.4. ELİSA Protokollerinde Kullanılan Materyal ve Cihazlar.....	44
2.5. ELİSA Optimizasyon Protokolleri	44
2.5.1. ELİSA Optimizasyon Metodu I.....	45
2.5.2. ELİSA Optimizasyon Metodu II.....	47
2.5.3. ELİSA Optimizasyon Metodu III.....	48
2.5.4. ELİSA Optimizasyon Metodu IV	50
2.6. Peynir Altı Sularında RP-HPLC ile Peptit Miktarı Tayini	51

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. BKM-7'nin Peynir Altı Sularında ELİSA ile Tayini	52
3.1.1. ELİSA Metot I Sonuçları	52
3.1.2. ELİSA Metot II Sonuçları.....	55
3.1.3. ELİSA Metot III Sonuçları	56

3.1.4. ELİSA Metot IV. Sonuçları	57
3.2. Peynir Altı Suyu BKM-7 Peptitlerinin RP-HPLC ile Miktar Tayini.....	58
3.2.1. BKM-7 Peptit Standartlarından Elde Edilen HPLC Kromatogram Sonuçları..	58
3.2.2. Peynir Altı Suyu BKM-7 RP-HPLC Peptit Kromatogramı Sonuçları.....	58
3.3. ELİSA ve HPLC sonuçlarının karşılaştırılması.....	61

4. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1. Tartışma	64
4.2. Sonuç ve Öneriler	64
KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ	80

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

α -Kazein	: Alfa-Kazein
β -Kazein	: Beta-Kazein
κ -Kazein	: Kappa-Kazein
β -Kazomorfin	: Beta-Kazomorfin
BKM-7	: Beta-Kazomorfin-7
BLG	: Beta-Laktoglobulin
SIDS	: Sudden Infant Death Syndrome (Ani Bebek Ölüm Sendromu)
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi)
RP-HPLC	: Reverse Phase- High Performance Liquid Chromatography (Ters Faz-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi)
MWCO	: Molecular Weight Cut-Off (Moleküler Ağırlık Sınırlama)
TS	: Türk Standartları
CMP	: Kazeinomakropeptit
ACE	: Angiotensin I-Dönüştürücü Enzim
CPP	: Kazeinofosfopeptitler
GIS	: Gastrointestinal Sistem
UV	: Ultra Viyole
UV-Vis	: Ultra Viyole-Visible

ELİSA	: Enzyme Linked İmmuno Sorbent Assay (Enzim İlintili İmmünolojik Test)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
GLUT	: Glucose Transporter (Glukoz Taşıyıcısı)
LPS	: Lipopolisakkarit
PBMC	: Peripheral Blood Mononuclear Cell (Periferik Kan Mononükleer Hücreleri)
KKH	: Kroner Kalp Hastalıkları
SYA	: Sature Yağ Asitleri
AD(H)D	: Attention Deficit (Hyperactivity) Disorder (Dikkat Eksikliği (Hiperaktiflik))
RT-PCR	: Real Time- Polymerase Chain Reaction (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
BSA	: Bovine Serum Albumin
HRP	: Horseradish Peroxidase
KHL	: Keyhole Limpet Hemocyanin
ABTS	: 2,2'-Azino-Bis(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulphonic Acid)
TMB	: 3,3',5,5'-Tetramethybenzidine
MS	: Multiple Skleroz

DPIV	: Dipeptidil Peptidaz 4
EIA	: Enzyme İmmunoassay
RIA	: Radio İmmunoassay
EDC	: Etilen Bikarbodimit
TNF	: Tumor Necrosis Factor (Tümör Nekroz Faktörü)
IL	: İnter Lökin
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1	α -kazein, β -kazein ve κ -kazein'in protein konsantrasyon aralığı [9]	7
Tablo 1.2	Süt proteinlerinin allelik varyasyonları [28]	11
Tablo 1.3	Peynir çeşitlerinde bulunan biyoaktif peptitler [11].....	26
Tablo 2.1	Süzülen peynir altı suyu miktarları.....	43
Tablo 2.2	Metot I optimizasyon değerleri.....	46
Tablo 2.3	Metot II optimizasyon değerleri.....	48
Tablo 3.1	Peynir altı sularında BKM-7 miktarları.....	63

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Sütün ana bileşenleri [1].....	5
Şekil 1.2.	İnek sütü bileşimi [1].....	6
Şekil 1.3.	Kazein Misellerinin Yapısı [24].....	9
Şekil 1.4.	A2 tip β -kazein' den inek sütündeki β -kazein' lerin oluşumu [25]	12
Şekil 1.5.	A1 ve A2 β -kazein proteinlerinde 67. pozisyondaki aminoasit farklılığını gösteren protein zinciri [30].....	13
Şekil 1.6.	β -kazomorfin-7'nin kimyasal yapısı [31]	14
Şekil 1.7.	β -kazomorfin-7'nin serbest bırakılması [30].	14
Şekil 1.8.	Sütten taze peynir yapım ilkeleri [36]	18
Şekil 1.9.	Süt pH'sındaki değişim ile sütün koagülasyonu [30].....	22
Şekil 1.10.	Kromatografide hareketli ve durgun fazlara göre sınıflandırma [55].	34
Şekil 1.11.	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının şematik görünüşü [55].	36
Şekil 2.1.	ELİSA protokolü şeması	46
Şekil 3.1.	1/150 – 1/1000 primer antikor 1 ve enzimatik işaret dilüsyonları kullanılarak, 0.375-12 μ g/ml aralığında, BSA ile konjuge BKM-7 peptit (1:10 molar oran) grafikleri.....	53
Şekil 3.2.	1/150 ve 1/250 primer antikor 1 ve 1/250 enzimatik işaret dilüsyonları kullanılarak, 1:30 molar oranda, 6.25-100 ng/ml aralığında BSA-BKM-7 peptit konjugatı ve 0.05-0.5 dilüsyon aralığında 4 çeşit peynir altı suyu ile beraber plaka prosedür sonu görüntüsü	53
Şekil 3.3.	ELİSA Metot I temelli standart grafiği (6.25-100 ng/ml BKM-7)..	54
Şekil 3.4.	0.05-0.5 oranlarında peynir altı suyu dilüsyonları absorbans grafiği.....	54
Şekil 3.5.	10-640 pg/ml aralığında, BKM-7 peptit dilüsyonları ve 0.05-0.5 dilüsyon aralığında, 4 çeşit peynir altı suyu plaka prosedür sonu görüntüsü.....	55
Şekil 3.6.	ELİSA Metot II temelli 40-640 pg/ml BKM-7 standart grafiği	56
Şekil 3.7.	1.25-1250 ng/ml standart aralığında, BKM-7 peptit dilüsyonları ve 0.05-0.5 dilüsyon aralığında A marka peynir altı suyunun 2 farklı HRP substrat ile prosedür sonu görüntüsü.....	57
Şekil 3.8.	0.008 – 1.25 mM BKM-7 standart RP-HPLC pikleri kromatogramları	59
Şekil 3.9.	0.008 – 1.25 mM BKM-7 standart peptitleri RP-HPLC standart grafiği.	59

Şekil 3.10.	30000 MWCO ile filtre edilmiş A marka peynirin 1. HPLC kromatogramı ve 31.2 µM BKM-7 standart kromatogramı	60
Şekil 3.11.	30000 MWCO ile filtre edilmiş A marka peynirin 2. HPLC kromatogramı ve 31.2 µM BKM-7 standart kromatogramı	61
Şekil 3.12.	30000 MWCO ile filtre edilmiş B marka peynirin 1. HPLC kromatogramı ve 31.2 µM BKM-7 standart kromatogramı	62
Şekil 3.13.	30000 MWCO ile filtre edilmiş B marka peynirin 2. HPLC kromatogramı ve 31.2 µM BKM-7 standart kromatogramı	62
Şekil 3.14.	Filtre edilmemiş C marka peynir altı suyu HPLC kromatogramı	63

GİRİŞ

Peynir, sütün peynir mayası veya zararsız organik asitlerin etkisiyle pıhtılaştırılması, değişik şekillerde işlenmesi ve bu arada süzülmesi, şekillendirilmesi, tuzlanması, bazen tat ve koku verici zararsız maddeler katılması ve çeşitli süre ve sıcaklıklarda olgunlaştırılması sonucunda elde edilen besin değeri yüksek bir süt ürünüdür [1]. Sütün bileşimindeki protein, yağ, mineral maddeler özellikle kalsiyum ve fosfor minerallerini ve özellikle yağda eriyen A, D, E, K vitaminleri ve suda eriyen B₂ vitamini başta olmak üzere vitaminleri yoğunlaştırılmış bir şekilde yapısında bulunduran peynir, beslenme değerinin üstün olması ve zevkle tüketilmesinden dolayı, toplumun her yaş grubunun beslenmesinde büyük öneme sahiptir [2]. Her peynir çeşidinin kendine özgü renk, koku, tat, yapı, gözenek, kabuk gibi özelliklerinin oluşmasında kullanılan hammadde, uygulanan teknik ve olgunlaşma koşulları önemli rol oynamaktadır. Olgunlaşma, çeşitli enzimlerin ve mikroorganizmaların etkisiyle çok karmaşık biyokimyasal reaksiyonların gerçekleştiği bir süreçtir [3].

Peynirin ham maddesi süttür. Ancak süt deyince akla ilk olarak inek sütü gelir. Bugünkü bilgilere göre memeden sağılan sütte 200 civarında madde bulunmaktadır. Bunlardan bir kısmı ana besin öğeleri dediğimiz maddeler olup, diğerleri daha az miktarda veya eser miktarda bulunan sütün minör bileşenleridir [1].

Peynirler de birer protein jelidirlir. Bu nedenle süt proteinleri bu ürünlerin oluşumunda temel önem arz ederler [4]. İnek sütü gelişmiş toplumların beslenmesinin büyük kısmını oluşturur ve litrede ortalama 32 gr protein içermektedir [5]. Süt proteinlerinin içinde bulunan kazein genel olarak en önemli süt proteini olarak bilinmektedirler. Kazeinler inek sütündeki total proteinin % 82'sini oluşturmaktadır [6].

Sütün esas proteini olarak bilinen kazeinler, sütün asit ile reaksiyonundan sonra çökmeyen kısımdır [7]. Memeli epitelyum hücreleri tarafından üretilirler [6]. Kazein

proteini, süt içerisinde 30-300 nm çapında partiküller halinde yüksek miktarda bulunmaktadır [8]. Misel olarak bilinen bu protein kompleksi kovalent olmayan bağlarla bir arada tutulan ve sütte son derece kararlı dağılım gösteren 4 farklı kazeinden (α^1 - α^2 -, β - ve κ - kazeinler) oluşur. Klasik peynir yapım sürecinde enzim-tetikli süt pıhtılaşma basamağından sonra oluşan lor (kesmik) kazein fraksiyonudur [9].

β -Kazein α^1 -kazein' den sonra ikinci en çok bulunan kazeindir. okelek oluşumu için esastır ve misellerin yüzey özelliklerini belirlemede önemlidir önemlidir [5]. β -Kazein inek sütünde bulunan 209 amino asitin tekli polipeptit zincirinden oluştuğu büyük kazein fraksiyonudur. β -kazomorfinler (BKM), β -kazeinlerden türeyen 3'ten 7 aminoasite kadar değişen küçük peptitlerdir [10]. BKM' ler sindirim esnasında ya da besin işleme esnasında β - kazeinden serbest bırakılırlar. β -kazomorfinler Tyr⁶⁰-Pro⁶¹-Phe⁶²-Pro⁶³-Gly⁶⁴-Pro⁶⁵-Ile⁶⁶aminoasit sekansından oluşan β -kazein'in opiat-benzeri aktivite gösteren fragmentleridir [11].

Starter kültürler peynir yapımında çok önemli bir faktördür; birçok görevi yerine getirmektedir. Özellikle proteinleri ayrıştırma kabiliyeti peynir yapımında önemlidir [12]. Fermentasyon sırasında kazeinin parçalanmasıyla açığa çıkan çeşitli uzunlukta oligopeptitler diğer enzimler ile parçalandığında biyoaktif peptitleri veya bunların n bileşiklerinin oluşumu gerçekleşmektedir. Biyoaktif peptitler süt proteinlerinden 3 farklı yolla retilenmektedir. Sindirim enzimlerinin yardımıyla enzimatik hidroliz sonucu, Proteolitik starter kültürler ile sütün fermantasyonu ve proteolitik mikroorganizma kaynaklı enzimlerin etkisi ile meydana gelirler [13].

β -kazomorfin-7 (BKM-7) opioid peptiti (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile) besin proteinlerinden türeyen biyoaktif peptitin ilk örneğidir. Özellikle, μ -opioid reseptörler beyin sapında şiddetli bir şekilde ifade edilir. BKM-7 bilinen μ -opioid reseptör ligantıdır. Süt ışlah çalışmaları sonucu ortaya çıkan A1 β -kazein 67. pozisyonda histidin aminoasitine sahipken, A2 β -kazein aynı pozisyonda proline sahiptir. Bu aminoasit değişikliğinden dolayı A1 β -kazein normal enzimatik sindirim sonrası BKM-7' yi serbest bırakırken, A2 β -kazein serbest bırakmaz ya da çok düşük oranda serbest bırakır [11, 14].

Dünyada sağlıklı (A2) ve sağlıksız (A1) tip olarak bilinen ve bulunan bu sütler arasındaki fark ise mutasyona uğramış süt proteini olan A1 tip beta-kazeinin enzimatik

sindirimi ve süt ürünleri fermantasyonu sırasında zararlı peptitlerin (BKM-7) açığa çıkmasıdır [15]. Bu peptitlerin çocuklarda uykuda ani ölümlere sebep olan Sudden Infant Death Sendroma (SIDS) yol açtığına ve otizme sebep olduğuna dair çalışmalar vardır [16, 17]. İleri yaşlarda A1 tip süt alımının damar sertliği gelişimine ve iskemik kalp hastalığına sebep olduğu gösterilmiştir [18]. Yetişkinlerde şizofreni benzeri davranışlara ve ocuklarda Tip 1 diyabete yol açtığına dair çalışmalar da bulunmaktadır [19].

Bu çalışmadaki amacımız, pek çok hastalığın etkeni olan ve sağlık açısından her yönden önem ihtiva eden biyoaktif peptit BKM-7'nin, Türkiye'de bulunan süt rnlerinde, BKM-7'nin miktar tayininde kullanılabilecek bir ELİSA metodu geliştirmek ve örneklere alnan değerleri, aynı peynir rneklarini Ters-Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (RP-HPLC) cihazında analiz ederek aldığımız sonuçlarla doğrulamaktır. Bunun için ticari olarak satın alınan 9 farklı marka beyaz peynir rneklarinin peynir altı suları alınmıştır. Bu örneklere, öncelikle RP-HPLC yöntemi ile peptit miktar tayini yapıldıktan sonra, inovatif bir ELİSA protokolü ile β -kazomorfin-7 peptitlerin kalitatif ve kantitatif tayinleri karşılaştırmalı olarak doğrulanmıştır.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

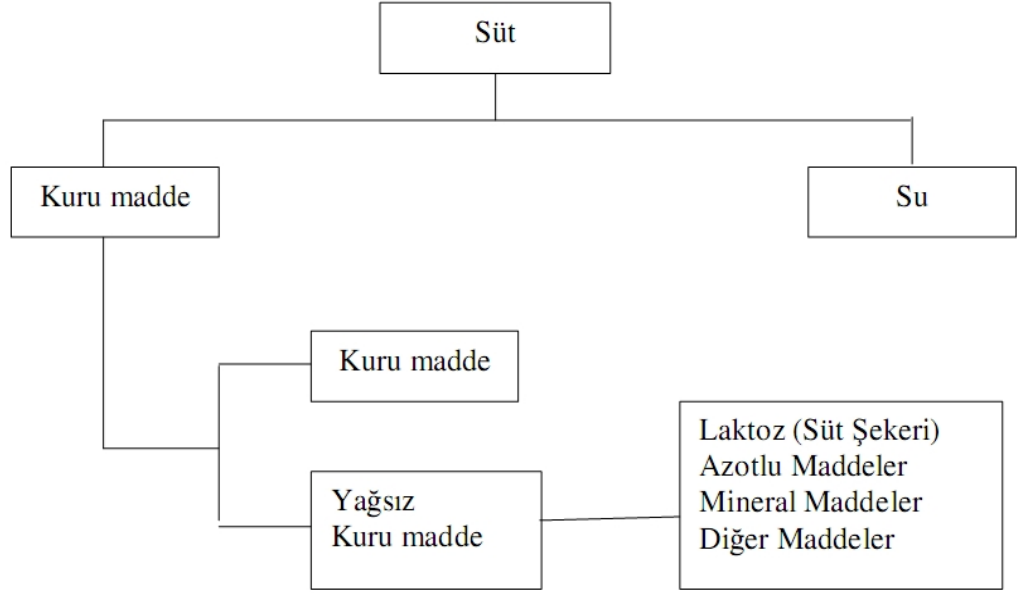
1.1. Sütün Tanımı

Süt; inek, koyun, keçi ve mandaların meme bezlerinden salgılanan, kendine özgü tat ve kıvamda olan, içine başka maddeler karıştırılmamış, içinden herhangi bir maddesi alınmamış, beyaz veya krem renkli sıvıdır [20]. Süt, içerdiği protein, laktoz, mineral maddeler, vitamin ve yağ yönünden oldukça zengin bir besin maddesidir. Süt proteini olan kazein ile süt karbonhidratı olan laktozun doğada sadece sütte bulunması sütün değerini daha da arttırmaktadır. Sütün içermiş olduğu esansiyel aminoasitler, galaktoz ve kalsiyum gibi bileşenin vücutta gelişmeyi olumlu yönde etkilediği bilinmektedir [21].

Teknolojik ve ekonomik açıdan incelendiğinde, sütün kuru maddesi büyük önem taşır. Kuru madde, sütün su hariç diğer maddelerinin toplamıdır [22]. Çoğu zaman kuru madde; yağ ve yağsız kuru madde olarak ele alınır. Yağsız kuru madde denildiği zaman ise, sütün ana besin öğeleri, yani yağın dışındaki süt şekeri (laktoz), azotlu maddeler, mineral maddeler ve sütün diğer maddeleri anlaşılır [1]. Sütün yağsız kuru madde oranı oldukça sabittir ve ancak % 8 ile 10 arasında değişir. En az olduğu dönem yaz başlarına rastlar. Sonbahar sonu ve kış başlarında ise en yüksek seviyeye ulaşır [1].

1.1.1. İnek Sütünün Tanımı

Başta içme sütü olmak üzere birçok süt mamulünün işlenmesine uygun olan ve bu nedenle süt teknolojisi için önem taşıyan inek sütünün bileşimine ait ortalama değerler ve söz konusu bileşenlerin kuru madde içerisindeki oranları Şekil 1.2'de gösterilmiştir [1].

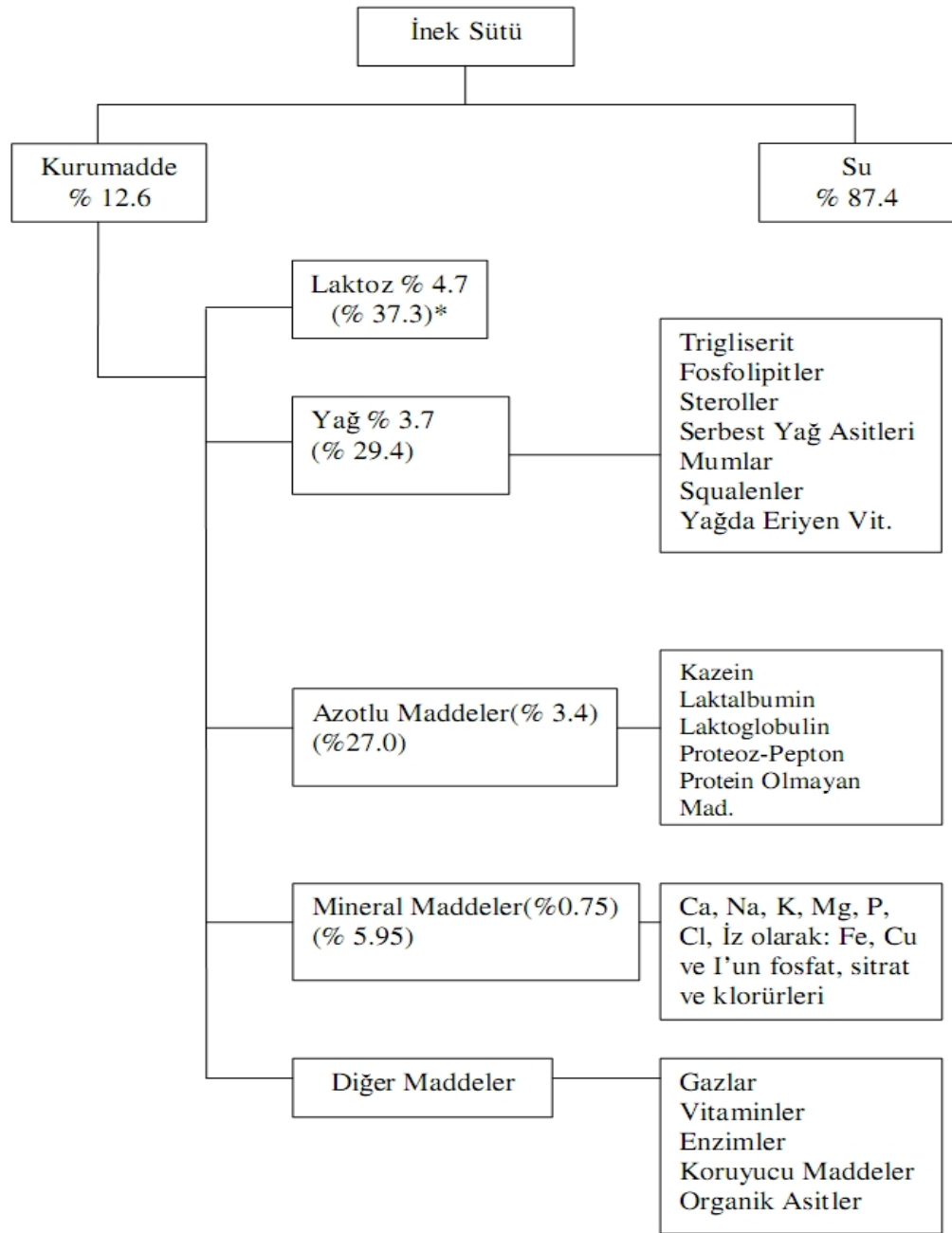


Şekil 1.1. Sütün ana bileşenleri [1].

Kuru maddenin yaklaşık % 27'si azotlu maddelerden ve yine yaklaşık % 29' u süt yağından oluşmaktadır. Kuru maddedeki yaklaşık % 37'lik değeri ile laktoz en büyük paya sahiptir. Mineral maddeler ise toplam kuru maddeler içerisinde % 5.95'lik bir oranda bulunmaktadır. İnek sütü bileşimindeki diğer maddeler, miktar açısından önemli değildir. Ancak fonksiyonları açısından büyük önemleri vardır [1]. İnek sütünün bileşimi başta ırk olmak üzere çeşitli faktörlerin etkisi altında değişiklik gösterir. İnek sütünün kuru maddesi % 10.5-14.5, yağ oranı % 2.5-6.0, laktoz oranı % 3.6-5.5, protein oranı % 2.9-5.0 ve mineral madde oranı % 0.6-0.9 arasında değişir [1].

1.1.2. Süt Proteinleri

İnek sütü gelişmiş toplumların beslenmesinde büyük kısmını oluşturmaktadır ve litrede ortalama 32 gr protein içermektedir [5]. Süt proteinlerinin içinde bulunan kazein genel olarak en önemli süt proteini olarak bilinmektedir. Kazeinler inek sütündeki total proteinin % 82'sini oluşturmaktadır ve geri kalan % 18'i whey proteinleri de denilen serum proteinleridir [7]. Peynirde birer protein jelidir. Bu nedenle süt proteinleri bu ürünlerin oluşumunda temel önem arz etmektedir [4].



* Parantez içindeki rakamlar, kurumadde içerisindeki oranlarını göstermektedir.

Şekil 1.2. İnek sütü bileşimi [1].

1.1.2.1. Kazeinler

Sütün esas proteini olarak bilinen kazeinler, sütün asit ile reaksiyonundan sonra çökmeyen kısımdır [7]. Memeli epitelyum hücreleri tarafından üretilirler [6]. Kazeinler nicelik bakımından en önemli süt protein bileşenleridir [9]. Kazeinin yapısında karbon

(C), hidrojen (H), oksijen (O), azot (N), kükürt (S) ve fosfor (P) bulunur [22]. Kazein proteini, süt içerisinde 30-300 nm çapında partiküller halinde yüksek miktarda bulunmaktadır [10]. Misel olarak bilinen bu protein kompleksi kovalent olmayan bağlarla birarada tutulan ve sütte son derece kararlı dağılım gösteren 4 farklı kazeinden (α_1 -, α_2 -, β - ve κ - kazeinler) oluşur. Klasik peynir yapım sürecinde enzim-tetikli süt pıhtılaşma basamağından sonra oluşan lor (kesmik) kazein fraksiyonudur [9]. Kazein inek sütünde % 2.63 oranındadır [8]. Veloso ve arkadaşları, inek sütünde ters-faz HPLC ile belirlenen kazein konsantrasyonunun ortalama 0.377–3.76 mg/ml ve β -kazeinin konsantrasyonunun ise 0.151–1.51 mg/ml arasında olduğunu göstermişlerdir (Tablo 1.4) [9].

Tablo 1.1. α -kazein, β -kazein ve κ -kazein'in protein konsantrasyon aralığı [9].

Kazeinler	Konsantrasyon Aralığı (mg/ml)
Bütün Kazein	0.377 – 3.76
κ -Kazein	0.038 – 0.377
α -Kazein	0.188 – 1.88
β -Kazein	0.151 – 1.51

Kazeinler hidrofobik bir yapıya sahiptirler. Bu yüzden kazein miselleri sütte bir süspansiyon halinde bulunurlar. Hidrofobik olmaları, kazeinlerin suda ve nötral tuz çözeltilerinde çözünmemelerine, sodyum oksalat ve sodyum asetat gibi tuz çözeltilerinde ve bazik çözeltilerde ise çözünmelerine sebep olmaktadır. Kazeinin yapısında çokça etkileşime girmemiş prolin peptitleri bulunmaktadır [23].

Kazeine kalsiyum-kazeinat-fosfat kompleksi de denilebilir. Bileşiminde % 2,9 kalsiyum, % 0,8 fosfor bulunur. Kazein ısıya karşı oldukça dirençlidir; ancak asitliğe karşı duyarlıdır, izoelektrik noktasında (pH 4.6-4.7) pıhtılaşır. Kazein sekansı tekli ya da çoklu fosforil kalıntılarını içerir ve birkaç fosfopeptit in vitro ya da in vivo şartlarda α_1 -, α_2 - ve β -kazeinin enzimatik hidrolizi sırasında serbest kalır [4].

Fosfoseril zincirlerinin negatif kutuplu bölgesi mineraller için anyonik bağlama bölgesidir [21]. Kazeinlere bağlı negatif yüklü fosfat grupları enzimatik olarak asit fosfataz, alkalın fosfataz ve fosfoprotein fosfataz ile ortadan kaldırılabilir. Kazeinden fosfat gruplarının ortadan kaldırılması proteinin bazı fiziksel ve fonksiyonel özelliklerini değiştirir. Böylece bu değişimle kazeinler aralarında ilişki kurar ve miseller oluşturur [21].

Sütte kazeinin % 90'ı misel adı verilen kolloidal parçacıklar halinde bulunur. Miselde alt misellerden oluşur. Miselin iç kısmında Ca^{+2} iyonlarına duyarlı olan α -s1 ve β -kazein fraksiyonları daha fazla bulunurken yüzey kısmında ise oldukça yüksek elektrik yüklü bölgeler bulunur ve Ca^{+2} 'a duyarlı olmayan κ -kazeinin hidrofilyk karakterli karbonhidrat kısmı lokalize olmuştur. κ -kazeinin % 90'ı misellerin yüzeyinde bulunur. Yüzeyde ayrıca α -s1, α -s2 ve β -kazeinlerde yüklü bölgeler oluştururlar [4].

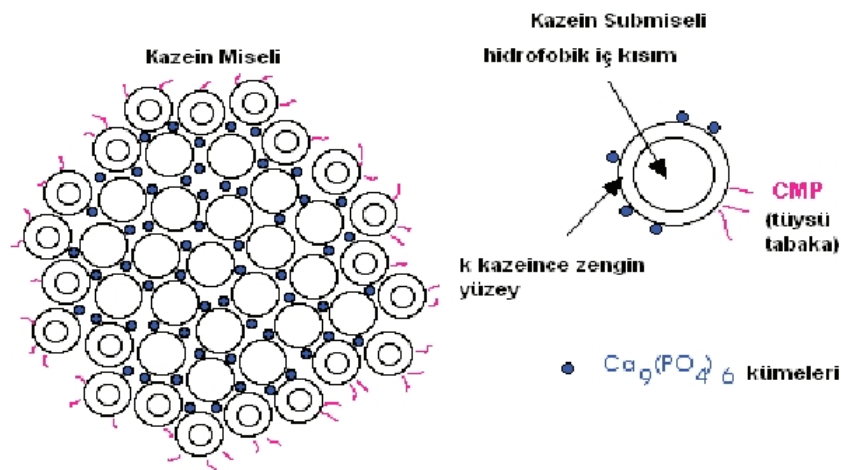
Taze sütte kazeinler stabil durumdadırlar ve net negatif elektriksel yük dağılımına sahiptir. Misellerin yüzeyindeki hidrofilyk C-terminal ucu ayrılırsa (örneğin rennet ile) miseller çözünürlüğünü kaybederek kümeleşmeye başlar ve kazein pıhtısını oluşturur. Hidrofilyk kısımlar uzaklaşınca su yapıyı terk etmeye başlar. Negatif yükte azalma olur ve çekim kuvvetleri etki etmeye başlar. Biri kalsiyumun aktif olduğu tuz tipinde ve ikincisi de hidrofobik tipte olan yeni bağlar oluşur. Bu bağlar suyun uzaklaşmasını arttırır ve yapı sonuçta yoğun bir pıhtıya dönüşür. Kazein misellerinin bu yapısı Şekil 1.3'de verilmiştir [4].

Asitlik artışıyla (+) yükün artması, misellerden kolloidal kalsiyum fosfatın ayrılmasına ve yerine H^+ gelmesine neden olur. Miselde (-) yük azalır. İzoelektrik noktaya kadar devam ederse pıhtılaşma olur [24].

Serum proteinleri: Süt proteinlerinin % 20'sini oluştururlar. Albuminler (α -laktalbumin, β -laktoglobulin ve serum albumini), globulinler (euglobulin, pseudoglobulin), proteoz-peptonlardır. Serum proteinlerinin sekonder ve tersiyer yapıları ısıya duyarlı kimyasal bağlar ile stabilize edildiğinden 80-85°C'lerin üzerinde ısı uygulaması sonucunda bu bağlar kırılmakta ve serum proteinlerinin denatürasyonu gerçekleşmektedir. Serum proteinlerinin denatürasyonu ile serum proteinlerinin su tutma kapasitesi fazla olduğundan pıhtının bağlayabildiği su miktarının artışı sağlanır ve bu olayla yoğurt

oluşumunda tekstürün daha iyi olması, su salmanın önlenmesi sağlanır. Isıl işlemin etkisiyle serum proteinleri önce kendi aralarında, ardından da kazein miselleri ile (özellikle β -laktoglobulin ile κ -kazein arasında) interaksiyon meydana gelir [24].

Kazein Miselleri:



Şekil 1.3. Kazein Misellerinin Yapısı [24].

Isıtma ile ayrıca sütte istenmeyen mikroorganizmaların ortadan kaldırılması sağlanır. Sütün fizikokimyasal özelliklerinde değişim olur. Sütün doğal enzimleri inaktif hale geçer. Standart ürün üretilmesinde önemli bir etmendir. Peynir yapımında süt proteinleri maya (proteolitik enzim) etkisiyle pıhtılaştırılırken yoğurt yapımında asit etkisiyle pıhtılaştırılır [24].

1.1.2.1.1. α -Kazein

Tipik bir fosfoprotein olup, kalsiyuma karşı son derece hassastır. Her 100 g' da 7.47 g prolin içerir [1]. α 1- ve α 2- kazein olmak üzere iki farklı genetik varyanta sahiptir. α 1-kazein toplam kazein içinde miktar açısından en büyük orana sahip kazein fraksiyonudur. Diğer kazein fraksiyonları gibi prolin bakımından zengindir. Bünyesinde 199 aminoasit içerir. α 2-Kazein ise 207 amino asite sahiptir [1]. α 2-Kazein bağlı fosfat gruplarının sayıca farklı olduğu beş proteinden oluşur [6].

1.1.2.1.2. κ -Kazein

Kazein misellerinin en kararlı komponenti olup, bir glikoproteindir. κ -Kazein kalsiyuma karşı herhangi bir hassasiyet göstermez. Diğer bir ifadeyle, κ -kazeine kalsiyum iyonları ilave edildiği zaman κ -kazein berrak bir halde dururken, α s-kazein kalsiyum iyonu ile tepkimeye girerek çok zor çözünen bir çökelti oluşturur. Fakat κ -kazeinin yüksek prolin içeriği (her 100 g' da 17 g) ve düşük fosfor içeriği alkolde yüksek çözünürlük sağlar [1].

1.1.2.1.3. β -Kazein

β -Kazein α -s1-kazein'den sonra ikinci en çok bulunan kazeindir. Çökelek oluşumu için esastır ve misellerin yüzey özelliklerini belirlemede önemlidir [1]. β -Kazein inek sütünde bulunan 209 amino asitin tekli polipeptit zincirinden oluştuğu büyük kazein fraksiyonudur [23]. Her 100 g' da 15 g prolin içerir [1].

1.1.2.3. Süt Proteinlerinde Polimorfizm

Süt proteinlerinin kodominant Mendel kalıtımı gösterdiği saptanmıştır. Süt proteinin genetik varyantları birkaç aminoasitin yer değiştirmesi bakımından birbirlerinden farklıdır [25]. Bu genlerin pek çoğu haritalanmış ve dizileri bilinmektedir. Günümüzde süt proteinleri bakımından polimorfizmlerin gerek protein gerekse DNA düzeyinde saptanabildiği belirtilmiş ve süt proteinlerindeki bu polimorfizmlerden bazılarının süt verimini, kompozisyonunu, misel organizasyonunu, pıhtılaşma özelliklerini ve sütün peynir verimini etkilediği gösterilmiştir [7].

Dünyanın farklı bölgelerinden farklı hayvanlardaki süt protein polimorfizmi üzerine yapılan çalışmaların temel amacı şunlardır:

- (1) Süt proteinin evrimsel tarihini belirlemek,
- (2) Farklı türler ya da soylar arasındaki ilişkiyi doğrulamak,
- (3) Belirli hayvan populasyonları için zamanında ve aralıklarla olan değişiklikleri gözlemlemek,
- (4) Genetik varyantlar, süt özellikleri (süt üretimi, süt protein içeriği, süt yağ içeriği, peynir üretimi ve kalitesi), üretim etkinliği ve hayvanın adaptasyon kapasitesi arasındaki ilişkileri açıklığa kavuşturmak [25].

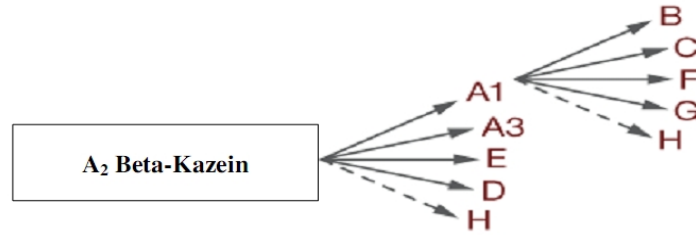
Altı büyük süt protein geninin hepsinde, genetik varyant denilen, otozomal ve kodominant allel vardır [26]. Bütün sütler aynı değildir ve farklı ülkelerden alınan sütler süt protein varyantlarının kompozisyonunda kayda değer değişiklik gösterebilir. Süt protein moleküllerindeki farklılıklar seperasyona (ayırma) ve elektroforez ile farklı varyantların algılanmasına izin verir [27]. Proteinlerde aminoasit değişikliklerine sebep olan ilişkin genlerdeki polimorfik bölgeler göz önüne alınır, süt proteinlerinin genetik varyantları (allel varyasyonları) Tablo 1.2.'de gösterilmiştir [28].

Tablo 1.2. Süt proteinlerinin allelik varyasyonları [28]

Süt Proteinleri	Allelik Varyasyonlar
α_{s1} -Kazein	A, B, C, D, F
α_{s2} -Kazein	A, D
β -Kazein	A ₁ , A ₂ , A ₃ , B, C, E
κ -Kazein	A, B, C, E
α -Laktoglobulin	A, B
β -Laktoglobulin	A, B, C, D, H, W, X

1.1.2.3.1. β -kazeinin polimorfizmi

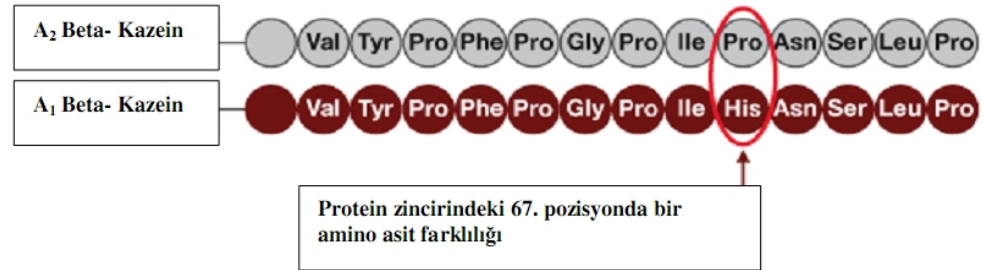
Diğer minör alleller de bulunmasına rağmen A1 ve A2 genetik varyantları sütü sağılan büyükbaş hayvanlarda en yaygın β -kazein allelleridir (Şekil 1.5) [25]. İnekler A1 ve A2 β -kazein alleli için homojen (A1A1 ve A2A2) ya da heterojen (A2A1) gen taşıyabilir. Bu eş baskınlık ile birlikte böylece, bir allel diğerini ezemez yani bir inek sütünde en çok iki β -kazein tipini üretebilir ve eğer iki farklı allel taşırırsa o zaman 1:1 oranında iki formu üretilir [25]. A2 β -kazein orjinal β -kazein olarak tanımlanır, çünkü A2 β -kazein birkaç bin yıl önce Avrupa sürülerinde A1 β -kazein' in görünmesine sebep olan mutasyondan önce bulunmuştur [25].



Şekil 1.4. A2 tip β -kazein'den inek sütündeki β -kazein'lerin oluşumu [25].

Beta-kazeindeki genetik polimorfizminin ilk kanıtı Aschaffenburg'un 1961'de yaptığı Jersey ve Guernsey ineklerinden alınan süt örneklerine dayanan çalışmadan gelir [29]. Batı ülkelerindeki ineklerin çoğunluğu genetik varyantı β -kazein A1'i zengin süt üretir. Örneğin, Holstein ve Ayshire ineklerinin yavruları sırasıyla % 63 ve % 67 A1, % 35 ve % 33 A2 üretir [5]. A2 β -kazein ise Batı, Afrika, Hindistan ineği ve su bufalosu dâhil, bütün büyükbaş hayvan tiplerinde bulunmuştur [29]. Guernsey yavruları % 1 A1 ve % 98 A2 üretir[5]. Jersey ırkı tipik olarak Holstein'den bir dereceye kadar daha yüksek A2 allel frekansına sahiptir. Bazı Jersey inekleri de BKM-7'nin daha yüksek salınma gösterdiği β -kazein allelini taşır [11].

A1 ve A2 β -kazein proteinleri arasındaki büyük fark 209 aminoasit dizisinin 67. pozisyonundaki tek bir aminoasittir. A2 β -kazein 67. pozisyonda prolin aminoasitine sahipken, aynı pozisyonda A1 β -kazein histidin aminoasitine sahiptir (Şekil. 1.6) [23]. Altıncı kromozomdaki β -kazein geninin ekzon VII'deki nokta mutasyonunun sonucu olarak, sitozinden adenine dönüşme 67. pozisyonda prolinin (kodon; CCT) histidin (kodon; CAT) ile yer değiştirmesine yol açar [25]. İnek sütündeki A1 β -kazein 67. pozisyonundaki histidin'den dolayı diğer memelilerin β -kazein'lerinden farklıdır. Bu nokta mutasyonu insanlarda, maymunlarda, keçilerde ve koyunlarda yoktur bu yüzden onların sütü sadece A2-benzeri β -kazeine sahiptir ve 'A2 süt' olarak adlandırılır [30]. A1 β -kazein proteini Tip 1 diyabet, iskemik kalp rahatsızlığı ve aynı zamanda otizim gibi bazı nörolojik durumları ima eder. A2 β -kazein bu durumları ima etmez [28, 30].



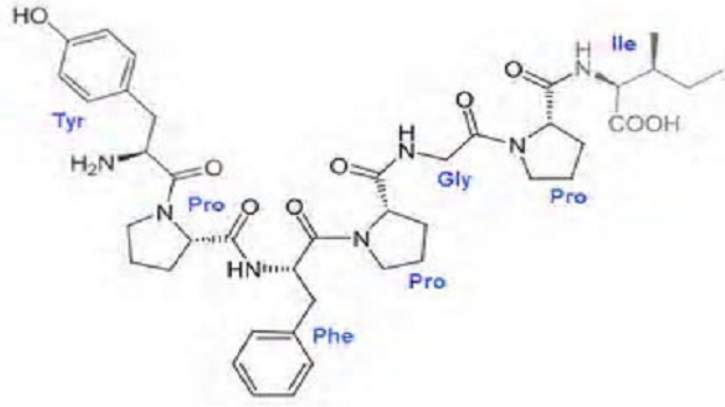
Şekil 1.5. A1 ve A2 β -kazein proteinlerinde 67. pozisyondaki aminoasit farklılığını gösteren protein zinciri [30].

1.1.2.3.2. β -Kazeinlerden β -Kazomorfin Salınımı

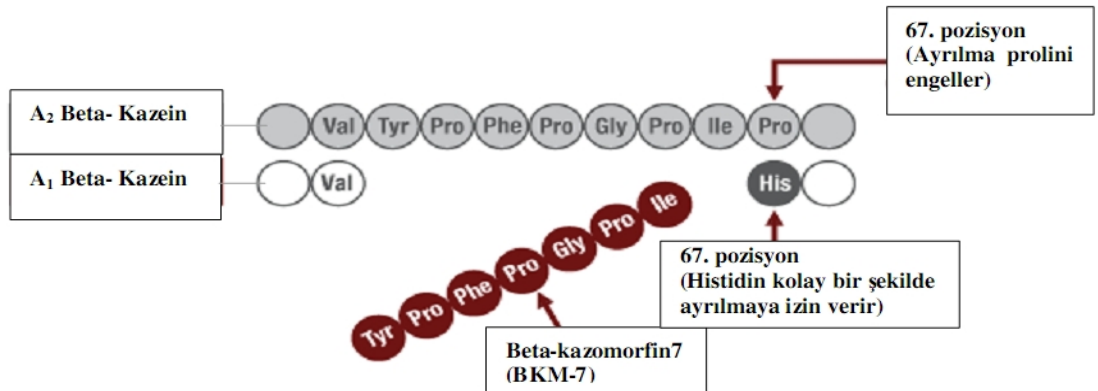
β -kazomorfinler (BKM), β -kazeinlerden türeyen 3'ten 7 aminoasite kadar değişen küçük peptitlerdir [10]. BKM'ler sindirim esnasında ya da besin işleme esnasında β -kazeinden serbest bırakılırlar. β -kazomorfinler Tyr⁶⁰-Pro⁶¹-Phe⁶²-Pro⁶³-Gly⁶⁴-Pro⁶⁵-Ile⁶⁶ aminoasit sekansından oluşan β -kazein'in opiat-benzeri aktivite gösteren fragmentleridir. 60 ile 66 rezidüde yer alan Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile sekanslı peptit ilk kez 1970'lerin sonunda kazein-türevli opioid peptit olarak tanımlanan büyükbaş β -kazomorfin-7 (BKM-7)'dir (Şekil 1.7) [11, 14].

A1 β -kazein 67. pozisyonda histidin aminoasitine sahipken, A2 β -kazein aynı pozisyonda proline sahiptir. Bu aminoasit değişikliğinden dolayı A1 β -kazein normal enzimatik sindirim sonrası BKM-7'yi serbest bırakırken, A2 β -kazein serbest bırakmaz ya da çok düşük oranda serbest bırakır (Şekil 1.7) [11,14]. 2-3 gr A1 β -kazein içeren bir fincan süttten BKM-7'nin azami kuramsal salınması 66 ile 100 mg arasındadır [11, 30].

Büyükbaş ve insan BKM-7'si peptitin 4. ve 5. pozisyonundaki iki aminoasitten dolayı farklıdır; büyükbaş orijinli BKM-7 H-Tyr⁶⁰-Pro⁶¹-Phe⁶²-Pro⁶³-Gly⁶⁴-Pro⁶⁵-Ile⁶⁶-OH sekansına sahipken, insan türevli BKM-7 H-Tyr⁵¹-Pro⁵²-Phe⁵³-Val⁵⁴-Glu⁵⁵-Pro⁵⁶-Ile⁵⁷-OH sekansına sahiptir. Bu yapısal farklılık insan β -kazomorfinlerinden 10 kat daha güçlü (örneğin; μ -opioid reseptörlerine daha büyük bağlanma affinitesi) olduğunu gösteren büyükbaş süt β -kazomorfinlerinin BKM-7 aktivitesini etkiler [11].



Şekil 1.6. β -kazomorfin-7'nin kimyasal yapısı [31].



Şekil 1.7. β -kazomorfin-7'nin serbest bırakılması [30].

1.2. Peynir Nedir?

Peynir, yağlı süt, krema, kısmen ya da tamamen yağ alınmış süt, yayık altı veya bunların birkaçının veya tümünün karışımının peynir mayası denilen uygun proteolitik enzimlerle ve/veya zararsız organik asitlerle pıhtılaştırıldıktan sonra, peynir altı suyunun ayrılması, pıhtının şekillendirilmesi ve tuzlanmasıyla elde edilen, taze veya olgunlaştırıldıktan sonra tüketilen bir süt ürünüdür [4].

Bir kilogram sert peynir yapımı için on kilogram süt kullanılır. Peynirlerin içeriğinde süt, starter kültür, protein koagüle edici enzim (rennetler) ve tuz bulunur. Peynir mayası geviş getiren hayvan buzağularının dördüncü midelerinden (şirden) elde edilir. Günümüzde bu mayalar dana, domuz, piliç gibi hayvanlardan elde edilmektedir [4].

Peynir yapımında kullanılan sütün 100 lt'sine yaklaşık olarak 1:10000 kuvvetindeki sıvı mayadan 12 ml, 1:15 000 kuvvetindeki mayadan ise 8-9 ml kadar katılır. Peynire katılacak maya miktarı; mayanın kuvveti, peynir çeşidi, dolayısıyla mayalama sıcaklığı, asitlik, yağ oranı vb. çeşitli faktörlere bağlı olarak değişmektedir [12].

Her peynir çeşidinin kendine özgü renk, koku, tat, yapı, gözenek, kabuk gibi özelliklerinin oluşmasında kullanılan hammadde, uygulanan teknik ve olgunlaşma koşulları önemli rol oynamaktadır. Olgunlaşma, çeşitli enzimlerin ve mikroorganizmaların etkisiyle çok karmaşık biyokimyasal reaksiyonların gerçekleştiği bir süreçtir [3].

Ülkemizde ise ekonomik açıdan önemli olan Beyaz, Kaşar ve Tulum peynirleri gibi endüstriyel boyutlarda üretilen ticari tip peynirlerin dışında Urfa peyniri, Civil peyniri, Otlu peynir ve Mihaliç peyniri gibi mahalli peynir çeşitleri de bulunmaktadır. Peynir üretiminin büyük bir bölümü yeterli donanımdan yoksun olan küçük işletmelerde, starter kültür kullanılmaksızın çiğ sütlerden yapılmaktadır. Ancak her geçen gün bilinçli ve modern işletmelerin önderliğinde ürün standardizasyonunun önemi kavranmaktadır. Böylece peynir üretiminde pastörize süt kullanımı ve buna bağlı olarak da starter kültür kullanımının yaygınlaştığı görülmektedir [32].

Peynirin hammaddesi süttür. Bu ürünlerin üretiminde inek, koyun, keçi, manda, deve sütleri kullanılabilir. Ancak bu endüstride öncelikle miktar ve temin açısından inek sütü kullanılır [1].

1.2.1. Serum Proteinleri (Peynir Altı Suyu Proteinleri)

Yağsız sütün bünyesinden kazein herhangi bir yolla uzaklaştırıldığında, geriye kalan kısma “süt serumu” denir. Süt serumu içerisinde, pek çok fraksiyondan oluşan ve süt proteinlerinin yaklaşık % 20' lik bölümünü meydana getiren bu proteinlere “serum proteinleri” veya peynir üretimi sırasında, peynir altı suyunda kaldıkları için “peynir

altı suyu proteinleri” denir [1]. Yarı saydam, yeşilimsi-sarı renkte bir sıvı protein kaynağı olarak tanımlanmaktadır [20].

Serum proteinleri 4 grup altında toplanır [1]:

1. β -Laktoglobulin
2. α -Laktalbumin
3. Proteaz-Peptonlar
4. İmmünoglobulinler

1.2.2.Peynir Üretimi

Peynir, çabuk bozulabilen sütün rutubet oranının azaltılarak, besin değeri yüksek ve uzun süre bozulmadan saklanabilen besine dönüşmesiyle elde edilen bir üründür [34]. Genel anlamda taze peynirin yapım ilkeleri Şekil 1.9’da gösterilmiştir [35].

Peynir yapımında kullanılacak süt, peynirin standart bileşimde olmasını sağlamak ve tüketicinin isteği doğrultusunda sütü unsurlarını en ekonomik şekilde değerlendirmek amacıyla standardize edilir. Süt yağındaki % 0.05 oranında bir değişim, kuru maddede % 45-50 oranında yağ içeren peynirin kuru maddesindeki yağ düzeyinde % 0.5 oranında değişime neden olur [36]. Sütün kimyasal bileşimi, özellikle yağ düzeyi, peynirin yağ oranını ve yapısını önemli ölçüde etkiler. Üretimde kullanılacak sütte, kazeinin yağ oranının belirli bir düzeyde (0.70 w/w oranında) bulunması arzu edilir [35].

Homojenizasyon işlemi, normal olarak peynir yapımında kullanılacak süte uygulanmaz. Çünkü homojenizasyon, sütün kalsiyum kazein fosfat kompleksi ile tuz dengesini bozar ve lipolitik enzimlerin, yağ globullerinin merkezinde bulunan yağın daha kolay ve hızlı nüfuz etmesine olanak sağlar [35].

Peynir yapımında kullanılacak sütün, mikrobiyal kalitesi ve peynirin yapımı esnasında istenmeyen saprofit ve patojen mikroorganizmalarla kontaminasyonu peynirin kalitesini önemli ölçüde etkiler. Bu bakımdan süte, peynirin kalitesini olumsuz yönde etkileyen veya tüketici için tehlike arz eden mikroorganizmaları veya enzimlerini tahrip etmek için ısı işlemleri uygulanır [35].

Birçok ülkede peynir yapılacak süte genellikle 69-72°C'de 15 saniye süren bir işlem uygulanır. Pastörizasyon sıcaklığının 15 saniyede 74 °C'yi geçmemesi, 65°C'nin de altına düşmemesi gerekir. Aksi takdirde yüksek derecede (75°C'nin üzerinde) ısıtılan sütlerden yapılan peynirler, özellikle süt tuzlarının, asit şartlarda da serum proteinlerinin kazein miselleri üzerinde birikerek enzim aktivitelerini engellemesi ve denatüre serum proteinlerinin fazla su tutma kapasitelerinden dolayı, yumuşak olmakta ve olgunlaşma işlemi gecikmektedir [35].

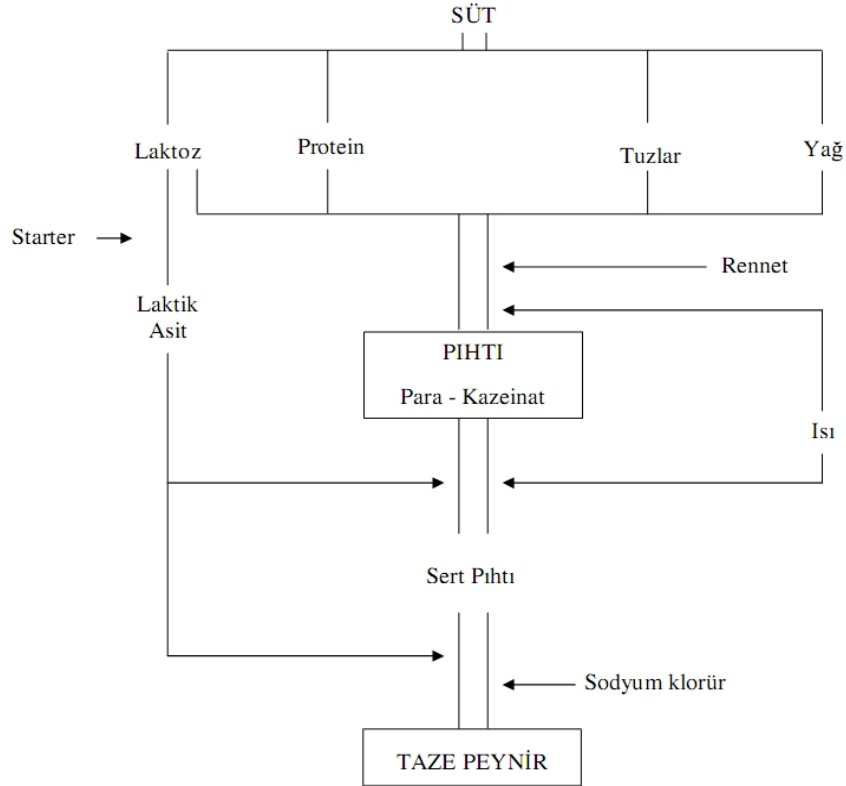
Ülkemiz coğrafik konumu, yüzyıllarboyunca birçok medeniyete beşiklik etmesi nedeniyle süt ürünlerinde özellikle peynir türlerinde zengin bir çeşitliliğe sahiptir. Ülkemizde yöre koşullarına, özellikle kültürel alışkanlıklara, hayvan tür ve ırklarının farklılığına bağlı olarak alışılğelen farklı yapım teknikleri ile çeşitli yöresel peynirler üretilmektedir. Sütün kaynağı, yöre ve üretimde uygulanan teknik işlemlere bağlı olarak türüleri ile birlikte ülkemizde her biri kendine özgü kimyasal ve duysal niteliklere, özellikle lezzet, tekstür ve görünümüne sahip 50'den fazla yöresel ve bölgesel peynir çeşidi bulunmaktadır [36, 37]. Ülkemizde peynir çeşitleri arasında gerek üretim gerekse tüketim bakımından ilk sırada yer alan peynir çeşidi %60 ile beyaz peynirdir. Bunu %12 ile kaşar peyniri, %12 ile tulum ve mihaliç peyniri, yaklaşık %16 ile de yöresel peynirler takip etmektedir. Yöresel peynirlerimizden en fazla bilinenleri Abaza, Civil (Çeçil), Lor, Mihaliç, Çerkez, Testi ve Sepet peynirleridir [36].

1.2.3. Peynir Üretimi Aşamaları

Peynir yapımının aşamaları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- a) Çiğ Süt
- b) Standardizasyon
- c) Pastörizasyon
- d) Soğutma (Pastörizasyondan sonra sütün ısısı mayalama sıcaklığı 28-32°C'ye soğutulur.)
- e) Mayalama (28-32 °C'ye soğutulan sütlere mayanın kuvvetine göre 1.5-2.5 saatte pıhtılaşma olacak şekilde maya ilave edilir.)
- f) Sütün pıhtılaşması
- g) Pıhtının işlenmesi
- h) Presleme

- i) Tuzlama
- j) Ambalajlama
- k) Depolama



Şekil 1.8. Sütten taze peynir yapım ilkeleri [35].

1.2.3.1. Sütün Standardizasyonu

Sütün peynire işlenmesinde ilk aşama, sütün uygun yağ oranına standardize edilmesidir. Sütün yağ oranının yüksek oluşu, peynir randımanı ve kalitesini aynı oranda artırmamaktadır. Çünkü kazan sütünde yağ oranı arttıkça peynir altı suyu ile kayıplar artmaktadır. Bu nedenle peynir sütünde yağ oranı standardizasyon işlemi ile belli bir düzeyde tutulması gerekmektedir [38].

Peynir yapımında kullanılacak süt, peynirin standart bileşimde olmasını sağlamak ve tüketicinin isteği doğrultusunda sütü unsurlarını en ekonomik şekilde değerlendirmek amacıyla standardize edilir. Süt yağındaki % 0.05 oranında bir değişim, kuru maddede % 45-50 oranında yağ içeren peynirin kuru maddesindeki yağ düzeyinde % 0.5 oranında

değişime neden olur. Kuru maddede yağın gerçek oranı ancak üretimden 4-6 hafta sonra belirlenebilir. Bu süre içerisinde tuz peynir kitlesine tam olarak nüfuz eder [35].

Üretimde kullanılacak sütte, kazeinin yağ oranının belirli bir düzeyde (0.70) bulunması arzu edilir. Sütün laktoz miktarı, üretimde kullanılacak sütün standardizasyonu için önem arz etmez. Laktoz, üretim sırasında fermente edilerek başlıca laktik aside dönüşür; olgun peynirlerin bileşiminde bulunmaz [35].

Homojenizasyon işlemi, normal olarak peynir yapımında kullanılacak süte uygulanmaz. Çünkü homojenizasyon, sütün kalsiyum kazein fosfat kompleksi ile tuz dengesini bozar ve lipolitik enzimlerin, yağ globullerinin merkezinde bulunan yağın daha kolay ve hızlı nüfuz etmesine olanak sağlar [35].

1.2.3.2.Sütün Pastörizasyonu

Peynir yapımında kullanılacak sütün, mikrobiyal kalitesi ve peynirin yapımı esnasında istenmeyen saprofit ve patojen mikroorganizmalarla kontaminasyonu peynirin kalitesini önemli ölçüde etkiler. Bu bakımdan süte, peynirin kalitesini olumsuz yönde etkileyen veya tüketici için tehlike arz eden mikroorganizmaları veya enzimlerini tahrip etmek için ısı işlemleri uygulanır [35].

Günümüzde hemen hemen bütün peynirler kimyasal ve mikrobiyolojik kalitenin tek düzeliği için pastörize süttten üretilmektedir. Türkiye`de peynir sütünde pastörize mevzuatlarda belirtildiği üzere 63-65°C de 30 dakika veya 72-75°C de 15-20 saniyedir. Sütün pastörize edilmesinin; sağlıklı ve teknik olmak üzere başlıca iki amacı bulunmaktadır. Yani, zararlı mikroorganizmaların ortadan kaldırılması ve diğer mikroorganizmaların sayısının azaltılması hedeflenmektedir. Ayrıca pastörizasyon ile % 1-10 oranında randıman artışı da sağlanmaktadır [39].

1.2.3.3. Soğutma

Pastörizasyon sırasında ısı arttıkça sütün maya ile pıhtılaşma yeteneği azalmaktadır. Böylece elde edilen pıhtı daha az sıkı olmakta ve peynir altı suyunun ayrılması zorlaşmaktadır. 75°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda bu sakıncaları gidermek için

mayalama ısısındaki 10 kg. süte 20 gr. kalsiyum klorür (CaCl_2) katılabilir. Pastörizasyonun ardından, sütün ısısı mayalama sıcaklığı $28-32^\circ\text{C}$ ye soğutulur [3,40].

1.2.3.4. Mayalama

$28-32^\circ\text{C}$ ye soğutulan sütlere mayanın kuvvetine göre 1.5–2.5 saatte pıhtılaşma olacak şekilde peynir mayası (renin enzimi) (starter kültür değil) ilave edilmektedir [3, 40].

Peynir yapımında kullanılan sütün 100 L'ne yaklaşık olarak 1:10000 kuvvetindeki sıvı mayadan 12 ml, 1:15 000 kuvvetindeki mayadan ise 8-9 ml kadar katılır. Sütün pıhtılaştırılması peynir yapımının temel aşamalarından olup, genellikle peynir mayası tarafından gerçekleştirilmektedir. Beyaz peynir üretiminde, ticari sıvı peynir mayası kullanılmaktadır. Ticari Beyaz peynir mayaları, mikrobiyel veya hayvansal kaynaklı (şirden mayası) olabilmektedir [3,40].

Şirden mayasının azlığı, fiyatının yüksek oluşu ve peynir üretiminin artmasıyla birlikte ihtiyacı karşılayamaması, çeşitli bitki özütleri, pepsin, tripsin ve kimotripsin gibi çeşitli hayvansal kaynaklı enzimler ile mikrobiyel kaynaklı proteolitik enzimler peynir mayası olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan mikrobiyel olanların, ekonomik olmaları ve şirden mayası ile üretilen peynirlere yakın özelliklerde ürün vermeleri nedeniyle, süt pıhtılaştırıcı olarak kullanımları yaygınlaşmıştır. Mikrobiyal veya fermantasyonla üretilen kimozen (rennin) genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar tarafından üretilmekte ve günümüzde pek çok ülkede yaygın olarak kullanılmaktadır [3,40].

1.2.3.5. Sütün Rennet (Peynir Mayası) İle Pıhtılaşması:

- a) Enzimatik Proteoliz Aşaması
- b) Enzimin etkisi ile parçalanma
- c) Pıhtılaşma (Agregasyon) Aşaması
- d) Ayrı parçacıkların bir araya gelmesi
- e) Jelleşme Aşaması Misel topluluklarının bir araya gelerek sertleştiği sıkılaştığı, şekil kazandığı aşamadır [24, 40].

Birinci aşamada rennetteki asit proteazlar özellikle rennin (kimozen) κ -kazeini fenilalanin (105)-metiyonin (106) arasındaki tek bir peptid bağımlı hidrolize ederek para-

κ -kazein ve glikomakropeptide dönüştürür. İkinci aşamada agregasyon (birleşme, toplanma) aşamasında, κ -kazeinin proteolizi ile stabilitesi bozulan kazein miselleri birbirleriyle birleşerek misel toplulukları oluştururlar. Üçüncü aşamada meydana gelen misel kümelerinin bir ağ gibi birleşerek sıkılaştığı, pıhtının şekillendiği jelleşme aşamasıdır [24, 40].

1.2.3.6. Peynir Mayası (Rennin) Etkisi

Enzim

1. κ -kazein \rightarrow Enzim- κ -kazein kompleksi \rightarrow Enzim+para- κ -kazein + glikomakropeptid molekülü

Rennin enziminin etkisiyle κ -kazein, para- κ -kazein ve glikomakropeptid şeklinde parçalanmaktadır. Bu durumda kalsiyum karşısında α -s1 ve β kazeinlerin stabilitesi bozulur [24].

Enzimatik proteoliz sırasında makropeptit moleküllerinin ayrılması nedeniyle miseller küçülür, negatif yükleri azalır ve viskozite geriler[24].

Ca^{+2}

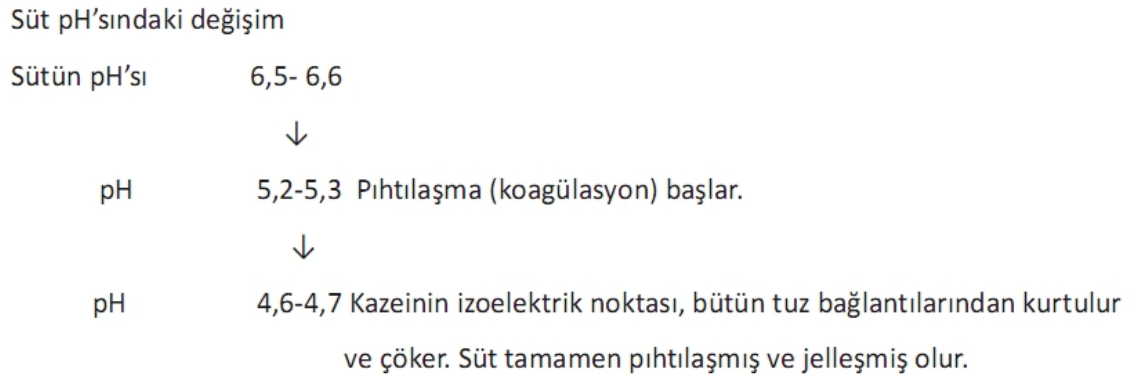
2. Para- κ -kazein \rightarrow Kalsiyum Para-kazeinat (Jel)

Kolloidal kalsiyum ve fosfat çözelti içinde kalmayıp, pıhtıdaki kazein, kalsiyum ile bir kompleks meydana getirir. Ca^{+2} varlığı agregasyon aşamasında negatif yükü azaltması bakımından önemlidir. Ortamda yeterince Ca^{+2} bulunmadığı zaman para- κ -kazein diğer kazein fraksiyonları gibi davranır ve pıhtılaşma olmaz[24].

Bir kazein miseli üzerindeki para- κ -kazeinin (+) yükü ile diğer misel üzerindeki κ -kazeinin (-) yüklü grupları arasındaki etkileşim misellerin bir araya gelmesini sağlar. Ayrıca bu aşamada, misel stabilitesinde rol oynayan kolloidal kalsiyum fosfat bağlarının ayrılması ve Ca^{+2} 'a duyarlı olan α -s ve β -kazeinlerin Ca^{+2} ile bağlanması sonucu artan Ca^{+2} aktivitesi sonucunda (-) yüklerde bir azalma olur ve kalsiyum parakazeinat oluşur. Sütteki asitlik fazla ise ve fazla gelişmişse pıhtılaşma çabuklaşır. Enzimle değil, asitle pıhtı oluşumu hâkimdir. Peynir altı suyu ayrılması zorlaşır, kötüleşir. Pıhtı yumuşak olur. İnce, küçük, ufak pıhtılar kayıpları arttırır [24].

1.2.3.6.1. Rennet Enziminin Çalışma Mekanizması

Kazein miselleri stabil haldeyken rennet enziminin proteini parçalamasıyla stabilize bozulur. Miseller serbest kalsiyumlarla bağlanır. Oluşan protein ağ yapısının içinde su ve yağda bulunur [24, 40].



Şekil 1.9.Süt pH'sındaki değişim ile sütün koagülasyonu [24].

Peynire işlenecek sütte pH 4.6'ya kadar düşmesi istenmez. Ön olgunlaştırma 6.3-6.5 pH arasında olması hedeflenir. Bu sayede kazein koloidal halde kalır [24, 40].

1.2.3.7. Starter Kültürler

Starter kültürler peynir yapımında çok önemli bir faktördür; birçok görevi yerine getirmektedir [41].

Peynir yapımında başlıca iki çeşit kültür kullanılmaktadır:

- mezofilik kültürler, optimum 20°C ve 40°C arasında gelişirler
- termofilik kültürler, 45°C'ye kadar gelişirler [41].

En yaygın kullanılan kültürler karışık suşlu kültürlerdir ve burada mezofilik ve termofilik bakterilerin iki veya daha fazla suşları mevcuttur ve simbiyoz oluştururlar, yani karşılıklı fayda sağlarlar. Bu kültürler sadece laktik asit üretmeyip aynı zamanda aroma bileşenleri ve CO₂ de oluştururlar [41].

Starter kültürlerin başlıca üç özelliği peynir yapımında önemlidir:

- laktik asit oluşturma kabiliyeti,
- proteinleri ayrıştırma kabiliyeti,
- karbondioksit oluşturma (CO₂) kabiliyetidir.

Kültürün başlıca görevi kesilmiş sütte asit oluşturmaktır. Süt pıhtılaştığı zaman, bakteri hücreleri pıhtı içerisinde konsantre hale gelirler ve böylece peynirde de konsantre hale gelirler. Pıhtılaşmaya yardım ettiği için önemli olan asit oluşumu pH'yı düşürür (pıhtının kasılması peynir altı suyunun uzaklaşması ile beraberdir). Ayrıca kalsiyum ve fosfor tuzları serbest bırakılır, bunlar da peynirin kıvamını etkiler ve pıhtının sıklığının artmasına yardımcı olur. Sert ve belirli yarı-sert peynirlerde olgunlaşma işlemi sütteki orijinal ve kültürdeki bakterilerin enzimleri ile beraber rennet enziminin kombine proteolitik etkileri proteinlerin ayrışmasına neden olur [24, 40].

Türkiye'de klasik (standart) beyaz peynirin, genellikle 72°C'de 20 saniye pastörize edilen süttten, *Lactococcus lactis ssp. lactis* ve *Lactococcus lactis ssp. cremoris* kullanılarak üretilmesi öngörülmektedir [34]. Yurtdışında özellikle biyoaktif peptidlerin salınımı ve uzaklaştırılması için starter suşlar üretilmekte ve pazarda yerini almaktadır [42, 43]. Özellikle süt ve peynirlerin ısıtması ve depolanması sırasında peptit analizleri yapılarak, peptit profilleri çıkarılmaktadır [44]. Bazı peynir çeşitlerinde bulunan biyoaktif peptitler Tablo 1.3.'de verilmiştir.

Biyoaktif peptitlerin ölçüldüğü bazı peynir türleri şöyledir: Comte, Grana Padano, Parmigiano-Reggiano, yarı sert Herrgard, Brie, Rokpol, Edamski, Gouda, Kazsten, Mozzarella, Cheddar, Emmental, Festivo, Manchego, Crescenza ve Italico [42, 43, 44].

1.2.3.8. Pıhtı Kesimi

Pıhtı kesim olgunluğuna geldiğinde 2 veya 3 cm³ lük parçalar halinde kesilir. Parçalama işleminde pıhtının fazla hırpanmamasına dikkat edilmelidir. İşlenmiş pıhtı baskı teknelerinde veya Bulgar usulüyle yapılıyorsa mayalanmanın yapıldığı teknede pıhtı yarım saat doğal süzmeye bırakılmaktadır. Pıhtı kendi halinde süzildikten sonra 2-3.5 saat baskılı süzme işlemine tabi tutulmaktadır [38]. Bir sonraki aşama olan tuzlama, beyaz peynir üretiminde önemli işlemlerden biridir ve tuzlama peynirin karakteristik özelliklerini belirlemektedir [40].

1.2.3.9. Tuzlama

Hedeflenen pH, su aktivitesi ve redoks potansiyeli ile birlikte tuz, patojenlerin gelişimini inhibe etmekte ve bozulmayı minimize etmektedir. Bunlara ilaveten, mikrobiyel gelişme ve enzimatik aktivitenin kontrolü, peynirde nem içeriğinin azaltılması, peynir tekstürü, lipoliz, proteoliz, proteinlerin çözünürlüğünü ve tat gelişimini etkileyen proteinlerdeki fiziksel ve biyokimyasal değişimler üzerinde de tuzun önemli etkisi vardır [3, 4, 40].

1.2.3.10. Ambalajlama ve Depolama

Tüm bu aşamalardan sonra, peynir hava almayacak şekilde plastik ambalaj veya metal kutular içinde saklanır ve ambalajlanmış peynir olgunlaşmanın sağlanması amacıyla 5-6°C' lik soğuk hava depolarında depolanır [45].

1.3. Peynir Kalitesini Etkileyen Faktörler

1.3.1. Kullanılan Sütün Etkisi

Peynire işlenecek süt taze olmalı ve içinde yabancı madde bulunmamalıdır. Önceden ısıtılmış sütler yavaş ve zayıf pıhtı oluşturacağı için peynirde kaliteyi etkilemektedir. Bunların yanında peynire işlenecek sütün bileşim yönünden zengin olması, kuru madde miktarının yüksek olması kalite yönünden olduğu kadar, randıman bakımından da önem taşımaktadır [38].

1.3.2. Pastörizasyonun Etkisi

Çiğ süttten yapılan peynirlerde patojen mikroorganizmalar uzun süre canlı kalabilmektedir. Bu nedenle üretimden hemen sonra tüketime sunulacak peynirler için sütün pastörize edilmesi tüketici sağlığı açısından önem taşımaktadır. Peynirde mikrobiyel kaynaklı kusurlar genellikle pastörizasyona dayanıklı mikroorganizmalar ve bazı durumlarda da pastörizasyonla tahrip edilemeyen ve starter kültürler için inhibitör etkisi olan maddeleri sentezleme yeteneğine sahip mikroorganizmalardan kaynaklanmaktadır [40]. İyi kalitede peynir elde etmek için zorunlu hale gelen

pastörizasyon işleminden sonra, yıkımlanan faydalı mikroorganizmaların yeniden kazanılması amacıyla starter kültür ilave edilmesi gerekmektedir [1].

Pastörizasyon sıcaklığının 15 saniyede 74°C'yi geçmemesi, 65°C'nin de altına düşmemesi gerekir. Aksi takdirde yüksek derecede (75°C'nin üzerinde) ısıtılan sütlerden yapılan peynirler, özellikle süt tuzlarının, asit şartlarda da serum proteinlerinin kazein miselleri üzerinde birikerek enzim aktivitelerini engellemesi ve denatüre serum proteinlerinin fazla su tutma kapasitelerinden dolayı, yumuşak olmakta ve olgunlaşma işlemi gecikmektedir [40].

1.3.3. Peynir Mayasının Etkisi

Süte katılan pıhtılaştırıcı enzimin büyük bir kısmı peynir altı suyu ile birlikte ayrılır ve sonuçta ilave edilen enzimin yalnızca % 0-15 kadarı pıhtıda kalır. Söz konusu enzimin pıhtıda tutulma oranını, katılan enzim miktarı, enzimin pH ve ısıl işlemlere karşı stabilitesi, pıhtının kesilme ve süzülme pH'sı ve pıhtının yıkanması, ısıtılması ve telemenin haşlanması ve peynirin su miktarı gibi faktörler etkiler [4].

İlave edilen enzim miktarı arttıkça pıhtıda tutulma oranı artmaktadır ya da pH ve sıcaklığa karşı stabilitesi bağlamında, eklenen kimozinin %6'sı, mikrobiyal kaynaklı enzimin ise %2-3'ü pıhtıda alıkonulmaktadır. Keza peynirin su oranı arttıkça pıhtıda tutulan enzim miktarı artmaktadır. Pıhtısı ısıtılan ve/veya telemesi haşlanan peynir tiplerinde de rennin enzimi inaktive olmaktadır. Pıhtıda alıkonulan enzim miktarı, hiç kuşkusuz peynirin aroma ve tekstür oluşumunda hem olumlu hem de olumsuz yönde önemli etkiye sahiptir [4].

1.3.4. Tuz Konsantrasyonu

Tuz konsantrasyonu ve peynir kitlesine dağılımı, peynir kalitesini ve tercih edilebilirliğini etkileyen önemli bir parametredir [4, 41]. Diğer taraftan, tuzlama peynirde lezzet gelişimine katkıda bulunmakta ve koruyucu etki göstermektedir [3, 4, 40].

Tablo 1.3. Peynir çeşitlerinde bulunan biyoaktif peptitler.

Kazeinden türeyen peptit	Biyoaktivite	Referans
β-kazomorfin-5 (BCM-5)	Agonist Opioid	Sienkiewicz-Szlapka, 2009 [81]; De Noni, 2010 [14].
β-kazomorfin-7 (BCM-7)	Agonist Opioid	Sienkiewicz-Szlapka, 2009 [81]; De Noni, 2010 [14].
Laktoferoksin A (LA)	Antagonist Opioid	Sienkiewicz-Szlapka, 2009 [81].
Kazoksin-6 (CSX-6)	Antagonist Opioid	Sienkiewicz-Szlapka, 2009 [81].
Kazoksin-C (CSX-C)	Antagonist Opioid	Sienkiewicz-Szlapka, 2009 [81].
β-kazomorfin-9 (BCM-9)	Opioid	Saito, 2000 [99], Rizzello, 2005 [100].
β-kazomorfin-10 (BCM-10)	Opioid	Toelstede 2008 [23].
β-kazomorfin-11 (BCM-11)	ACE-inhibitörü*	Rizzello, 2005 [100]
β-CN (f7-28)4P	Mineral taşıyıcı, immünomodülatör ve sitomodülatör	Pinto, 2012 [90].
α1-CN (f61-79)4P	Mineral taşıyıcı	Pinto, 2012 [90].
α2-CN (f7-21)4P	ACE-inhibitörü	Pinto, 2012 [90].

*Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü

1.4. Peynirde Biyoaktif Peptitler

1.4.1. Biyoaktif Peptitler

Süt proteinleri genellikle temel aminoasitleri sağlayan moleküller olarak bilinir. Fakat süt proteinlerinden türeyen oligopeptitlerin biyolojik fonksiyonlara sahip oldukları gösterilmiştir. Fermentasyon sırasında kazeinin parçalanmasıyla açığa çıkan çeşitli uzunlukta oligopeptitler diğer enzimler ile parçalandığında biyoaktif peptitlerin veya

bunların ön bileşiklerin oluşumu gerçekleşmektedir [13]. Büyük miktardaki biyoaktif peptitler major kazein ve serum protein bileşenlerinin her 1 gr'ının proteolizi esnasında potansiyel olarak üretilebilir [46].

Biyoaktif peptitler doğal protein yapısında aminoasit zincirleri içerisine kodlanmışlardır. Biyoaktif peptitler her molekülünde genellikle 3 ile 20 aminoasit kalıntısı bulunduran kısa peptitlerdir. Fakat 64 aminoasit içeren kazeinomakropeptit (CMP) bunların istisnasıdır. Küçük boyutlu ve hidrofobik özellikte olmaları daha kolay absorbe edilmelerine yardımcı olmaktadır [13].

Biyoaktif maddelerin bazıları proteinler sayesinde tamamıyla aktifken, diğerleri proteolitik olarak serbest bırakılınca kadar gizlidir. Gizli biyoaktivitelerin görünmesi proteoliz bölgesine (meme bezi ya da gastrointestinal bölge) bağlıdır [46]. İnaktif durumdaki biyoaktif maddelerin in vivo ve in vitro şartlardaki enzimatik sindirim ve parçalanma sırasında açığa çıkarak aktif duruma geçmektedirler [13]. Buna ilave olarak, biyoaktivitenin tam ekspresyonu süttteki peptit olmayan ajanlarla (lipitler, glikolipitler ve oligosakkaritler) biyoaktif peptitlerin sinerjik etkisini gerektirmektedir [46].

1.4.2. Peynirde Biyoaktif Peptit Oluşumu

Sütün işlenmesi sırasında, peynir yapımı için kullanılan starter kültürlerin ve proteolitik mikroorganizmaların biyolojik aktivitelerinin yan ürünü olarak biyoaktif peptitler serbest kalmaktadır [13].

Biyoaktif peptitler süt proteinlerinden 3 farklı yolla üretilebilmektedir [13]:

1. Sindirim enzimleri yardımıyla enzimatik hidroliz,
2. Proteolitik starter kültürler ile sütün fermentasyonu,
3. Proteolitik mikroorganizma kaynaklı enzimlerin etkisi ile.

Bütün β -kazomorfinlerde bulunan N-terminal Tyr kalıntısı onların biyoaktivitesi için kritiktir. Prolin kalıntılarının yüksek içeriğinden dolayı bu peptitler bariz bir şekilde proteolitik saldırıya dirençlidir. β -kazeinlerin sindirimi esnasında bu biyoaktif peptitler bütün olarak absorbe edilir [47].

1.4.2.1. Peynirde β -Kazomorfin-7

A1 süt proteinleri opioid olan kazomorfin denilen peptitler için potansiyel bir kaynaktır [48]. Opioid terimi içinde bir morfin benzeri aktiviteye sahip kimyasal maddeleri ifade etmektedir. Bunların bazıları stres, ağrı ve yanıtta, gıda alınımı kontrolünde önemli rol oynadığı bilinmektedir.

A1 tip süt kullanılarak yapılan peynirlerde, peynir proteolitik mikroorganizmalarının A1 tip beta-kazeini katabolize etmeleri sonucu β -kazomorfin-7 (BKM-7) opioid peptidi meydana gelmektedir. β -kazomorfin-7 opioid peptiti (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile) besin proteinlerinden türeyen biyoaktif peptitin ilk örneğidir. Özellikle, μ -opioid reseptörler beyin sapında şiddetli bir şekilde ifade edilir ve BKM-7 bilinen μ -opioid reseptör ligantıdır. Biyoaktif peptit olan BKM-7' nin N-terminalindeki "Tyr-Pro-Phe" opioid özelliklere sahip olduğundan dolayı vücutta morfinbenzeri aktivite gösteren kimyasal olarak hareket edebilir [11, 14].

Güçlü bir opioid aktivite sergileyen bir peptid olan BKM-7 yedi aminoasitten oluşur: Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile. BKM-7 opioid özelliğini biyoaktif peptidin N-ucundan sıralanan "Tyr-Pro-Phe" dizisinden alır, bu dizi bir morfin benzeri eylem ile bir kimyasal madde olarak görev alabilir [14]. Öte yandan, son dört aminoasit "Pro-Gly-Pro-Ile" kalıntısı pankreatik beta hücreleri spesifik glukoz taşıyıcısı olan GLUT-2 molekülü ile homolojisi ileri sürülmektedir. Bunlar ana protein dizisi içinde aktif değildir ve gastrointestinal sindirim (sindirim enzimler tarafından hidroliz) veya gıda işleme (teknolojik işlem sırasında ya da proteolitik olgunlaşma) esnasında salınır veya vücut kendisi tarafından üretilmektedir [30, 32, 48]. Muhtemelen taklitçilikte rol alan bu moleküller, Yeni Zelanda Samoan çocuklarında Tip-I diyabet insidansı artışı gözlenmesinin sebebi olduğu gösterilmiştir [30].

Beta-kazomorfin tüketiminin birçok hastalığa sebebiyet verdiği ve risk faktörü olduğu çok çeşitli çalışmalarda yıllar boyunca ifade edilmiştir [30]. Bu amaçla, sütte ve süt ürünlerinde opioid aktif peptidlerin varlığı ve miktar analizleri, süt kalitesi parametreleri ölçümleri arasına katılmıştır [49].

Bu güne kadar yapılan çalışmalardan yola çıkarak, tip 1 diyabet gelişiminde rolü olan BKM-7'nin, Swinburn (2004) ve Truswell' in (2006) sağlık sorunları raporları sonucuna

dayanarak besinlerde bulunmasına izin verilmemiştir (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi Bilimsel Raporu, 2009).

Dünya üzerinde öneme sahip olan A1 ve A2 tip süt ayrımı için çeşitli çalışmalar yıllardır süregelmektedir. Bunun için öncelikle hayvanların genotiplemesi ve süt ve süt ürünleri kazeinlerinin protein özellikleri çalışılmıştır. Kurek ve ark (1992), β -kazomorfin-7 ve histamin enjekte edilen kobaylarda benzer alerjik reaksiyonlar (dermatik pasif anafilaksi testi) verdiğini bildirdi [50].

1990'ların sonunda, bazı raporlar kazein varyantı A1 tüketimini bir risk faktörü olduğunu ortaya koydu [27]. İnsanlarda diyabet (insüline bağımlı) ve iskemik kalp hastalığı kazein varyantı A1 tüketimi sonucu arttığını önerdi [27, 28]. Bu beta-kazein varyantı A1 bazı insan hastalıklarının gelişiminde belli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, ani bebek ölümü sendromu (SIDS) beta-kazomorfin ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür [16]. İnsan sağlığı üzerindeki süt proteinlerinin diğer potansiyel etkisi süt alerjisidir.

1.4.3. Biyoaktif Peptitlerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

1.4.3.1. β -Kazomorfinlerin Diyabet Hastalığı ile İlişkisi

Diyabet hastalarına ve sağlıklı kişilerde lipopolisakkarid (LPS) stimülasyon sonrası periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) sitokin üretimini bağışıklıkta hücresel yanıtları çözmek için değerlendirilmiştir [51, 52, 53]. Ayrıca bir başka çalışmada, sitokin tayini BCM-7 tahfribatı üzerine PBMC tarafından yayımlanan sitokin düzeylerindeki değişiklikler ELİSA testinin kullanımı ile yapılmıştır [51]. Benzer bir sistem diyabetiklerde bağışıklık sistemi üzerinde BCM-7'nin etkisini araştırmak için kullanıldı. Doğan ve ark.'nın (2006) çalışmasında, kan serum konsantrasyonları Tip 1 diyabetli çocuklarda ELİSA yöntemi ile TNF α , IL-2 ve IL-6, IL IL-2 ve IL-6 düzeyleri araştırılmıştır ve diyabetin tüm aşamalarında tespit edildiği gösterilmiştir [54]. Son iki çalışma çalışmada sağlıklı ve diyabetik bireylerin PBMC kültürlerinde BKM-7 etkilerini değerlendirmek için ön deney tasarımı önermişlerdir.

Biyoaktif peptitlerin immünomodülatör etkileri hücre kültürü ve in vivo şartlarda çalışılmaktadır [46, 55, 56]. Çoğunlukla sitomodülatör etkileri üzerinden B-lenfosit

salgılamaya artışına ve immünmodülatör artışa sebep oldukları belirtilmektedir. Peptitlerin zararlı etkileri uzun yıllardan bu yana çok farklı çalışmayla gösterilmiş olmakla beraber, son zamanlarda peptitlerin bazı yararlı etkilerini gösteren çalışmalarda sunulmaktadır. Özellikle Tip I diyabet üzerine engelleyici etkileri [27], potansiyel antikarsinojenik ve oksidatif stres üzerine azaltıcı etkileri üzerine araştırmalar da yayımlanmıştır [57, 58]. Bunlarla beraber peptitlerin hastalık etmeni ve risk faktörü olmalarına yönelik çalışmalar ağır basmaktadır. Bu sebepten, inek sütüne alternatif sütlerin, koyun sütü kısrak sütü ve özellikle keçi sütü için biyoaktif peptitler ve besin değerlerine yönelik çalışmalar yapılmakta ve inek sütü yerine önerilmektedir [59, 60, 61, 62].

1.4.3.2. Sindirim Sistemi Üzerine Etkileri

Beta-kazomorfinlerdeki prolin kalıntılarının yüksek içeriği birçok degradatif enzimlere-pepsin, tripsin ve kimotripsin- dirençlidir. Beta-kazomorfin-7 peptiti proteolizlere β -kazomorfin-5 ya da β -kazomorfin-3'ten daha dirençlidir. Buna rağmen β -kazomorfinler sindirim sonucu açığa çıkmaktadırlar. β -kazeinler bağırsakta, dipeptidil dipeptidaz-4'ün (DP4) etkisiyle intestinal zarın mukozal bölgesinde β -kazomorfinlere ayrılarak emilmektedirler. Daha büyük peptitlerden X-Pro (N-terminal) dipeptitlerini kesmek DP-4'ün görevidir. β -kazomorfinler, Tyr-Pro grubunun enzimatik sindirimi ile serbest bırakılır. Bu yüzden β -kazomorfin peptitleri opioid reseptörlere varmadan ve muhtemelen intestinal zardan geçerken zarar vermektedirler [10].

Süt ve süt ürünlerinin her formu yutulduktan sonra, kazeinin gastral enzimatik yıkılmasıyla bebeklerin midesinde β -kazomorfinler gibi daha küçük peptitlere şekillenir. Beta-kazomorfinler bir kez şekillendiğinde, proteolizlere oldukça dirençli olduklarından, midede önemli seviyelere ulaşabilirler [14].

1.4.3.3. β -Kazomorfinler ve Ani Bebek Ölüm Sendromu İlişkisi

Çocukların ana besin kaynağı olan süt, Ani Bebek Ölüm Sendromu'nu güçlendiren, bütün çocuklarda yaygın olan bir faktördür. Bebeklerin olgunlaşmamış merkezi sinir sisteminden dolayı absorpsiyonu takip eden gastrointestinal yolda, β -kazomorfinler kolayca kan-beyin bariyerini geçebilmektedirler. Bebeklerin vagal sinir gelişiminde ve solunum kontrolündeki anormallikler, süttten elde edilen opioid peptitlerin beyin

sapındaki solunum merkezlerinde çöküntüye sebep olması nedeniyle meydana gelirler. Buna bağlı olarak da bebeklerde ve çocuklarda, opioid aktif peptitlerin Apne ve SIDS'na sebep oldukları görülmüştür [16].

Wasilewska (2011) SIDS potansiyeli ve apnesi olan bebeklere ait kan serumları örneklerinin DPPIV etkinliği için β -kazomorfin miktarlarını anlamlı bulmuştur [17].

1.4.3.4. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri

Yıllardır süt yağı da dâhil olmak üzere hayvansal yağ içeriği yüksek olan gıdaların, koroner kalp hastalıkları (KKH) açısından yüksek risk taşıdıkları öne sürülmüştür. Satüre yağ asitlerinin (SYA) yüksek oranda aterojenik (damar içi duvarında daralma yapan) olduğu görüşü, çevreyle ilgili çalışmalardan köken almaktadır. Süt ürünleri kaynaklı yağ tüketimiyle KKH mortalitesi arasında bir bağlantı olduğu da öne sürülmüştür. Ayrıca klasik çalışmalar diyet ve yaşam tarzı ile ilişkili faktörlerde yapılan değişikliklerin mortaliteyi düşürdüğünü göstermiştir. Örneğin, Kuzey Karelia Projesindeki düşük mortalite, büyük oranda süt ürünleri kaynaklı SYA ve kolesterol alımının azaltılmasına, yaşam tarzı ile ilişkili faktörlerde yapılan değişikliklerle birlikte, çoklu doymamış yağ asitleriyle meyve ve sebze alımındaki azalmaya bağlanmıştır. Ancak populasyon içi kohort çalışmalarının bulguları arasında tutarsızlıklar vardır [13].

Bazı çalışmalarda, süt ürünleri alımı ile KKH mortalitesi arasındaki bağlantı gösterilememiştir. Bazı olgularda, süt ürünleri alımı ve KKH risk belirteçleri, insülin duyarlılığı ve yüksek kan basıncı arasında şaşırtıcı olarak ters yönde bir ilişki gözlenmiştir. Süt ürünleri alımı ile KKH mortalite ve morbiditesinde artışa işaret eden çalışmalarda ise, peynir ve bazen mayalanmış süt ürünlerinin istisna oluşturduğu, kolesterol ve SYA'nın alımının fazla olduğu bir alt grupta, süt ürünleri alımı ve KKH mortalite veya morbiditesi arasında bağlantı olmadığı görülmüştür. Diğer araştırmacılar, süt ürünleri kaynaklı yağ alımı ve KKH mortalitesi arasında anlamlı bir bağlantının, peynir dışındaki süt ürünlerinde görüldüğünü belirtmişlerdir [63].

Elwood ve arkadaşları, süt ve KKH ile ilgili önemli bir deneme yayımlamışlardır. Süt içimi ile vasküler hastalık arasındaki 10 prospektif çalışmadan yola çıkarak, süt tüketimi en yüksek ve en düşük olanlarda iskemik kalp hastalığı riskini araştırmışlardır. İskemik

kalp hastalığından ölüm ve β -kazein Al'in tüketimi arasındaki güçlü ilişki birkaç popülasyonda karşılaştırılmıştır. Sonuçlara ilişkin verilerin az olduğu bir çalışma dışında hiçbir çalışmada, süt tüketimi en fazla olanlarda riskin arttığına dair bir kanıt bulunamamıştır [63].

1.4.3.5. Sinir Sistemi Üzerine Etkileri

Kazomorfin ve gluteomorfin multisistem nörolojik hastalıkların bazı alt türleri için, şizofreni ve otizm, dikkat eksikliği bozukluğu ADD/ADHD, epilepsi ve yaygın gelişim bozukluklarına da sebep olmaktadır. Otizm kazomorfin ve gluteomorfinin bir kişi üzerinde sahip olabileceği etkilerin türlerine bir örnektir. Otizm erken yaştaki çocuklarda oldukça nadir görülen bir sendromdur [64].

Otizm kurbanlarının bedensel işleyişini ve yaşam keyfini bozan ciddi bir hastalıktır. Otistik çocuklarda hiperpeptiduria bulunmuştur [65]. Sıradan çocuklarda nöbetler ve epileptik atakların sıklığı yaşla birlikte azalır. Otistik çocuklarda epilepsi ve EEG anormalliklerinde yaşla artan bir artış göstermektedir. Epilepsi hastalığındaki frekans artışına paralel çölyak hastalığı da artar. Ayrıca çölyak hastalığında idrardaki artan opioidler de tespit edilmiştir [66]. Bu durumda, kasomorfin ve gluteomorfin peptitlerinin idrar içinde tesbiti, çocuklarda önemli hale gelmiştir. Çocuklarda, Otizim tanısı koyabilmek için idrar örneklerinde Gluten/Kazein peptitlerinin ELİSA ile tayini yapılmaktadır [64].

Gluten/Kazein ELİSA testi aynı zamanda AD(H)D, şizofreni, MS, beslenme bozuklukları, down sendromu, sindirim bozuklukları gözlenen çocuklarda tanı için başvurulan bir yöntemdir. Test sonucunda hassas bir standart eğri yakalanarak uygun gluten ve kazein diyeti uygulanır. Sıkı bir glutensiz ve kazein diyet hasta için yararlı etkileri olduğunu aşikârdır [67]. Diyetteki başarısızlık ciddi sorunlar getirebilmektedir. Çünkü bu gıdalar otistik çocukların beyinleri için toksik niteliktedir. Diyet tüm süt ürünlerini çıkarma anlamına gelmektedir [64].

Otistik çocuklarında idrarlarında SPE-HPLC-tandem mass spektrometri ile β -kazomorfin gibi ekzojen peptit miktarları ölçülmüş ve kontrollere göre otistik çocuklarda peptit miktarları yüksek bulunmuştur [65].

Süt, tereyağı, peynir, krem peynir, ekşi krema, vb aynı zamanda soya peyniri, ton balığı ve hatta ekmek kazein içerir. Bu sebeple süt ürünlerindeki β -kazomorfin tayini önem teşkil eder [68].Yapılan bir çalışmada yeni doğmuş bebekler için üretilen ticari bir bebek maması agonistik dört opioid peptide karşı test edilmiş ve β -kazomorfinlerin olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada izole tavşan bağırsağı motor aktivite üzerindeki etkileri incelenerek HPLC de belirlendi. Sonuç olarak, bu formüllerin opioid aktivite çeşitliliği ek bir göstergesi olabileceği öne sürülmüştür [68].

Otistik hastaların kan serum ve BOS'larında opioid peptitlerde artırmak bulunmuştur. Bunlardan bazıları da sığır kazomorfin peptiti olduğu tespit edilmiştir. Otistik hastaların idarında tespit edilen gliadinomorfin, glutemorfin, deltorfin ve dermorphin ve kazomorfinlerin oluşturduğu kronik etki, hastalık semptomu olan sosyal kayıtsızlık davranışını açıklayabilmektedir [69].

Tveiten ve Reichelt (2012) Şizofreni'li hastaların idrarında artmış opioid peptit düzeyleri bulunmuştur. HPLC üzerinde değişik eğimlerin kullanımı ile eksorfinlerin peptit kromatografileri rapor edilmiştir. Şizofrenide genetik ve diyetsel faktörlerin şizofreni ile ilgisi gösterilmiştir [70]. İsveçli bir grup reseptör bağlayıcı opioidlerin düzeyine ilişkin şizofreninin belirtileri nitelendirmiştir ve postpartum psikoz insanlarda kazomorfin artışını göstermişlerdir [9].

Bunların yanında, β -kazomorfinlerin depresyonla ilişkisi, depresyon teşhisi konulmuş hastaların idrarlarında artmış β -kazomorfin peptitlerinin tespitiyle sunulmuştur [71].

1.5. Biyoaktif Peptitlerin Tayini

1.5.1. Biyoaktif Peptitlerin Kromatografik Yöntemlerle Tayini

Karışımlardaki kimyasal bileşiklerin ayrılması, tanınması ve teşhisi için yaygın olarak kullanılan analitik yöntemler topluluğuna 'kromatografi' adı verilmektedir. Kimyada diğer ayırma yöntemlerinden hiç birisi kromatografi kadar etkili olmayıp uygulamada yaygın olarak kullanılmaz. Bu nedenle de kromatografik yöntemler araştırma amacıyla en çok kullanılan yöntemler arasındadır [72].

1.5.1.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

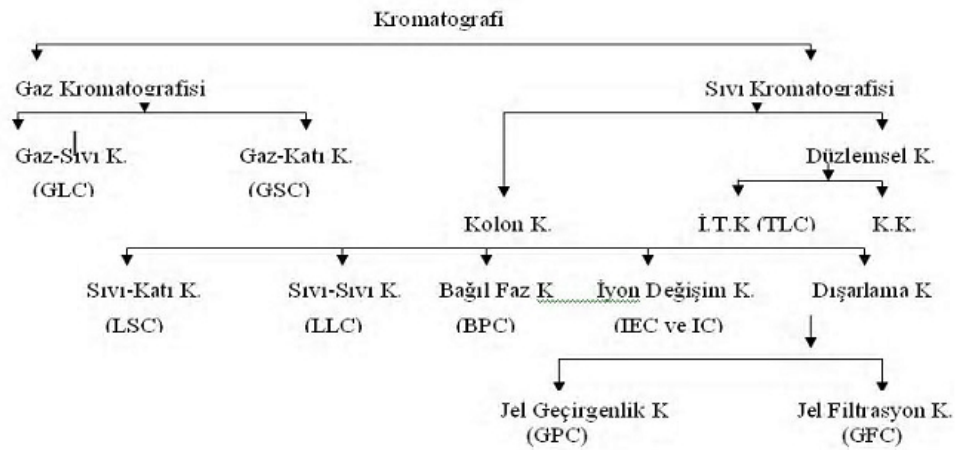
Kromatografik yöntemler, durgun fazın ortamda bulunma şekline göre kolon ve düzlemsel olmak üzere ikiye ayrılır. Kolon kromatografisinde durgun faz dar bir boruda tutulur, hareketli faz ise yer çekimi veya basınç etkisiyle borudan geçirilir. Düzlemsel kromatografisinde ise, durgun faz düz bir yüzeyde veya bir kâğıdın gözeneklerinde tutulur. Bu durumda hareketli faz, durgun faz üzerinde kılcal veya yer çekim etkisiyle hareket eder. Bunun dışında kromatografik yöntemler ayırma işlemlerinin farklılığına göre çok daha değişik şekillerde sınıflandırılabilir [72]:

1. Teorik Sınıflandırma

- a- Paylaşım Kromatografisi
- b- Adsorpsiyon Kromatografisi
- c- Jel Filtrasyon Kromatografisi
- d- İyon Değişim Kromatografisi

2. Pratik Sınıflandırma

- a- Kağıt Kromatografisi
- b- İnce Tabaka Kromatografisi
- c- Kolon Kromatografisi
- d- Gaz Kromatografisi
- e- Sıvı Kromatografisi



Şekil 1.10. Kromatografide hareketli ve durgun fazlara göre sınıflandırma [55].

1.5.1.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri, duyarlılığı, doğruluğu, kesinliği ve seçiciliğinin yüksek olması, kantitatif analizlere

kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasında uygun olması ve hepsinden de önemlisi sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derece ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu gibi maddelere örnek olarak; aminoasitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, pestisitler, antibiyotikler, çeşitli organik bileşikler sayılabilir. Kısacası, uygun dedektör, uygun kolon ve uygun hareketli faz olduğu sürece bütün kimyasal maddelerin ayrılmasında ve analizinde HPLC kullanılabilir [72, 73].

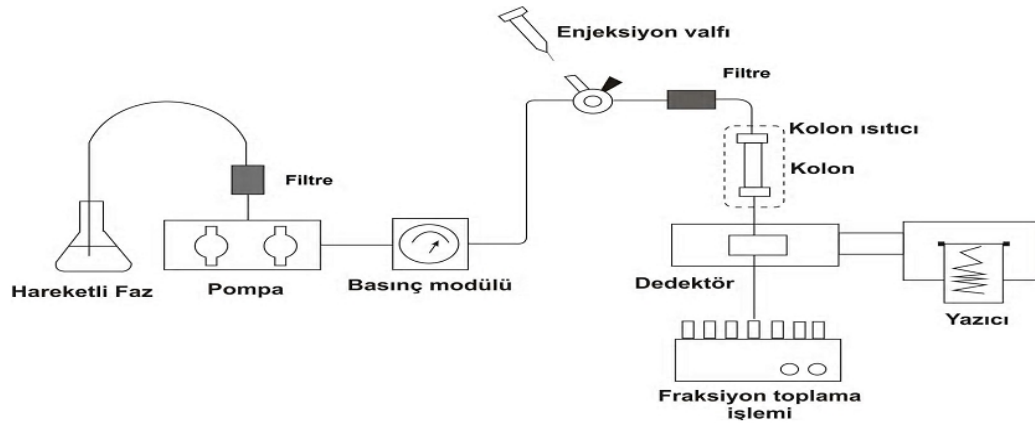
HPLC'nin farklı türleri mevcuttur. Kolon dolgu materyallerinin ve solventlerin pek çoktürü mevcuttur. Alıkonma davranışı ve rezolüsyon kolon özelliklerinden (C-yükleme, zincir uzunluğu, porozite vb.) ve elüsyon şema özelliklerinden (mobil faz, pH vb.) etkilenir. Örnekler örnek bileşenlerinin çözünürlük ve polaritesine bağlı olarak ayrıştırılabilir [73].

Normal faz HPLC'de solvent (mobil faz) nonpolardır (hekzan, metilen klorid gibi), vekolon dolgusu (sabit faz) polardır (silika). Örnek molekülleri solvante zıt olarak az ya da çok kolondaki partiküllere çekilir. Daha az polar moleküller ilk olarak kolondan çıkar (elüe olur). Normal faz kromatografi iyonik olmayan ve/ya da polar olmayan maddeleri için kullanılabilir [73]. Ters-faz HPLC (RP-HPLC) polar solvent (su, polar çözücüler ya da karışımlar) ve nonpolar dolgu materyali (C18 ya da fenil) kullanır. Ters-faz HPLC'de elüsyon sırası tersine dönmüştür. Sabit faz çoğunlukla oktadesil gruplar (C18 ya da ODS) ya da oktil gruplar (C8) gibi alkilsilandan türetilmiştir. Polar bağlı fazlarda silikayüzeyi polar fonksiyonel gruplardan türetilmiştir. Ters-faz HPLC orta polar maddeler için iyon oluşturan polar olmayan maddelerin yanında iyonik olmayan maddelerin ayrımı için de kullanılabilir. İyonlaşabilen farmasötik bileşiklerin çoğu C18 kolonunda çok iyi ayrılabilir [74].

Tek bir solventin kullanımı izokratik sistem olarak bilinir, fakat daha çok tercih edilen gradiyent elüsyon olarak bilinen kromatografik koşma esnasında solvent karışım kompozisyonunun değişme yeteneğine sahip olmasıdır [73].

1.5.1.3.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Cihaz Bileşenleri

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı, kendine özgü işlevlere sahip olan pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydedici olmak üzere beş ana bölümden oluşan bir sistemdir (Şekil 1.12) [75].



Şekil 1.11. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının şematik görünüşü [72]

1.5.1.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi'nin Uygulama Alanları

HPLC yapıları benzer kimyasal türlerin ayrılması ve saflaştırılması işlemlerinde güçlü ve kullanışlı bir araçtır. Buna ek olarak ayrılan türlerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde de kullanılan bir yöntemdir [72].

Saflaştırma: Herhangi bir karışım içerisindeki hedef bir bileşiğin, diğer bileşiklerden ya da safsızlıklardan ayrılmasıdır. Saflaştırma işleminde, saflaştırılacak bileşiğin özelliklerine uygun mobil faz ve kolon seçimi yapıldığında iyi bir ayırım gerçekleştirebilir ve ayrıca yüksek saflık elde edebilmek içinde diğer bileşiklerin kolon içerisindeki göç hızlarının yeteri derecede birbirinden farklı olması gerekmektedir [72].

Kalitatif Analiz: Az sayıda ve bilinen türleri içeren karışımlardaki bileşenlerin varlığını tanımak amacıyla HPLC yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Örneğin, tek bir kromatogramla, bir protein hidrolizatında 30 kadar aminoasit yeterince kesin bir şekilde

görülebilmektedir. Öte yandan kromatogram, karışımdaki her tür için, tutulma süresi gibi yalnızca tek bir bilgi içerir; bu nedenle anılan tekniğin bilinmeyen bileşimde karmaşık numunelere uygulanmasındaki başarı sınırlıdır. Kromatografi kolonunun doğrudan ultraviyole, infrared veya kütle spektrofotometrelerine bağlanmasıyla, bu sınırlamalar önemli ölçüde aşılmıştır. Böylece oluşturulan ikili cihazlar, karmaşık karışımlardaki bileşenlerin tanınmasında güçlü araçlar olarak kullanılır. Bu tip ayırmalar yapılırken en çok dikkat edilmesi gereken nokta, bilinen bir örneğin verdiği pikin kesin olarak saptanmış olmasıdır. Ancak yine de kesin bir sonuç elde etmek için, birkaç yöntemin karşılaştırmalı olarak denenmesi gerekmektedir [72].

Kantitatif Analiz: HPLC ayrılan türler hakkında kantitatif bilgi verdiği için dolayı bu denli yaygınlaşmıştır. Kantitatif analiz, analit pikinin yüksekliği veya alanının bir veya daha çok sayıda standart değerleriyle karşılaştırılması temeline dayanır. Şartlar uygun biçimde denetlenirse, bu parametrelerin ikisi de derişim ile doğrusal olarak değişir [72].

1.5.1.5. Diğer Kromatografik ve Analitik Analizler

Süt ve süt ürünlerinde var olan veya çeşitli muameleler sonucu ortaya çıkan biyoaktif peptitlerin analizi HPLC-Tandem Kütle Spektroskopisi, kütle spektroskopisi temelli teknikler (Maldi-TOF-MS, ESI-MS, FTIR-MS gibi) kullanılmaktadır [76, 77]. Peynir kazeinlerinin differansiyasyonu HPLC-chip/MS/MS ve çeşitli aminoasit sayısı kalıntısına sahip β -kasomorfınların ayırımı ve saptanması, standart β -kasomorfınlar kullanılarak, mikrofluidik çip elektroforezi ile kombine lazer indüksiyonlu flüoresans gibi hibrit sistemlerde yapılmaktadır [78, 79]. Bunlarda başka, hayvan ve insan, serum ve idrarlarında β -kasomorfın tayinleri HPLC, SPE-HPLC-tandem yük spektroskopisi ve ELİSA ile yapılmaktadır [80, 81].

1.5.2. Biyoaktif Peptitlerin İmmünolojik Yöntemler ile Tayini

Antijen antikor reaksiyonlarını gösterebilmek için enzim kullanılan tüm tekniklere genel olarak enzim immünotest (enzyme immunoassay, EIA) denir. Radyoimmüno-testler (RIA) EIA'den daha önce kullanılmaya başlanmış, ancak işaretleme için I^{125} gibi kısa ömürlü izotopların kullanılması, toplum sağlığı ve çevreye zararlı radyoaktif madde

kullanımı, RIA'in endokrinoloji laboratuvarlarında kullanımı ile sınırlı kalmasına neden olmuştur [82].

ELİSA sistemleri 1960'larda radioimmunoassay yöntemlerine alternatif aranırken bulunmuştur. EIA'de kullanılan reaktiflerin uzun ömürlü olmaları, atık maddeleri ile ilgili radyasyon tehlikesi olmaması, basit testler olması ve otomatize edilebilmesi diğer iki tekniğe olan üstünlükleridir. Daha önemlisi laboratuvarlara çok fazla sayıda örnekle çalışma olanağı verdiği gibi analizlerin kısa sürede sonuçlanması gibi üstünlükleri de vardır [82].

1.5.2.1. Konjugasyon

Peptitlerin konjugasyonunun önemli bir nedeni de antijen yakalama etkisini arttırmaktır. Yakalayıcı antijen molekülleri ile antibodylerin bağ yapması ELİSA'da kullanılır. Bununla birlikte bu bileşenler nonspesifik özellikte plastik microtiter plakalara bağlanabilir. Ancak ELİSA plakalarına genellikle büyük boyutlu peptitler bağlanır. Küçük ve orta boylu peptitler bağlanması olumsuz olur. Bu sebeple taşıyıcı protein kullanılarak antijen yakalama yeterli büyüklükte iyi bir nonspesifik bağlanma gösterir ve antibody molekülünün özgül bağlanması için gerekli olan peptiti de taşıyıcı protein yüzeyinde taşır. Konjugasyon için Etilen dikarbodimit (EDC) ve Gluteraldehit gibi çeşitli kimyasal çapraz bağlayıcılar kullanılmaktadır [83].

1.5.2.2. Gluteraldehit İle Konjugasyon

Gluteraldehit serbest α -amino ve lisin epsilon-amino gurupların kapsayan serbest amino gurupları homobifonksiyon bağlayıcılarının bir örneğidir. Sisteinin sülfidri de reaktifidir. Ayrıca tirozin ile histidine daha az bir ölçüde katılırlar. Çünkü bu reaksiyonun seçiciliği, glutrealdehit metodu bilhassa peptiti zincirsiz reaktif guruplar ya da tekbir lizinin N ya da C terminaline bağlamak için özelleşmiştir. Bu tekniğin mükemmelliğinin sebebi basit, hızlı ve etkili olmasıdır. Buna rağmen reaksiyon mekanizmasında ve sonraki süreçlerde kimyasal yolla bağlanmış zayıf karakterde atıklar meydana gelir. Eğer yüksek derecede üretim gerekli ise üretim performansı ya da yerine koyma seviyesinde diğer metodlar göz önüne alınmalıdır [84].

Bağlanma reaksiyonu muhtemelen glutraldehit-lizin yolu üzerinden shift baz bileşimi ile gerçekleşir. Bununla birlikte hızlı bir yeniden düzenleme gözlenir, başlıca hidrolize olmayan bir bağ oluşur. UV spektro gözlemlerinde kuarterner piridinyum yapısının formülü, 4 glutraldehit molekülü/ 1 Lizin amino asidini kapsar. Konjugasyon reaksiyonu aynı zamanda sodyum borohidrat varlığında da gerçekleşebilir. Düzenlenmesi gerçekleştirilmeden önce, amit bağı ile schiff bazının arası kısacaktır [84].

1.5.2.3. Enzim-Bağımlı İmmüno Ölçümler (ELİSA)

EIA diye isimlendirilen yöntemler, homojen ve heterojen olmak üzere iki çeşittir. Homojen tekniklerde, enzim bir haptin ile konjuge haldedir. Tekniğin esası, bu konjugatın antikor ile reaksiyona girmesi halinde enzim aktivitesinin başlamasına dayanır. Ancak bu tekniğin düşük moleküler ağırlıklı maddeler kullanma zorunluluğunun bulunması, pahalı ve zahmetli olması gibi dezavantajları vardır. Bu nedenlerden dolayı fazla sık kullanılmazlar [85].

Heterojen EIA'da bağlı olan ve olmayan reaktifler birbirinden yıkama işlemi ile fiziksel olarak ayrılırlar. Enzyme linked immunosorbent assay (ELİSA), heterojen EIA'e örnektir. ELİSA'da bir enzimle konjuge edilmiş antikor (veya antijen), substratı ile reaksiyona girerek renkli bir ürün oluşturur. ELİSA testleri antijeni veya antikoru (sınıfa özgül antikor da olabilir) ölçmek için kullanılabilir [85].

ELİSA karmaşık bir teknik olmamasına rağmen bu teknikte birçok değişken kontrol edilmelidir. Katı faz, yıkama işlemleri, kullanılan enzim ve substratların seçimi ve etkinliği, reaksiyonların sonlandırılma zamanı, kontrol edilmesi gereken değişkenlerdir. Katı faz olarak çoğunlukla mikrotitrasyon plakları şeklinde plastik kullanılmaktadır. Polistren mikrotitrasyon çukurcuklarından başka, plastik boncuklar, ferröz boncuklar ve nitrosellüloz membran da solid materyal olarak kullanılabilir [85].

ELİSA'da kullanılan enzimler kinetikleri ve konjuge edilme dereceleri açısından iyi tanımlanmış enzimlerdir. Bunlar peroksidaz, alkalin fosfat, β -galaktozidaz gibi substratları renkli ürünlere çevirebilme yeteneğinde olan enzimlerdir. Bu renkli ürünler standart spektrofotometrede okutulabilir. β -galaktozidaz kullanılmışsa florimetrede

okunmalıdır. Substratlar genellikle alkalen fosfataz için nitrofenil fosfat, peroksidaz için ortofenilendiamindir [85].

1.5.2.4. ELİSA Metodunun Çeşitleri ve Prensipleri

Genel olarak 6 farklı ELİSA protokolünden bahsedilebilir [84]. Yarışmacı olan (kompetatif) ve direkt ELİSA testleri vardır. Yarışmacı ELİSA genellikle antijen varlığını göstermek için kullanılır. Aranılan antijene özgül antikor katı faza bağlanmıştır. Enzimle işaretli antijen ve test edilecek antijen (klinik örnek) katı fazdaki antikora aynı zamanda eklenir ve her iki antijenin de antikordaki bağlanma bölgeleri için yarışması amacıyla inkübe edilir. İnkübasyondan sonra yıkanarak bağlanmamış antijenler uzaklaştırılır ve enzim substratı konarak inkübe edilir. Bağlanmış enzim substratla reaksiyona girerek renk oluşturur, spektrofotometrede absorbans okunur. Substratın hidroliz miktarı, örnekteki antijen miktarı ile ters orantılıdır. Yani sonuçta renk değişikliği olmazsa bu klinik örnekte antijen varlığını gösterir [86]. ELİSA plakları hazırlanırken, antijen aranacaksa antijene özgül antikor veya antikor aranacaksa antikora özgül antijen katı faza bağlanmalıdır. Plakların kaplanma işlemi, 2 saat 37°C'de ya da bir gece oda ısısında veya +4°C'de bekletildikten sonra yıkama yapılarak gerçekleştirilir. İnkübasyonlar ise 1-2 saat 37°C'de yapılır [86].

Antijen saptama için kullanılan yakalama testinde katı faza poliklonal veya monoklonal antikor bağlanır. Enzimle işaretli antikor da poli veya monoklonal olabilir. Monoklonal antikorların sadece bir epitopa bağlandığı düşünülürse, poliklonal antikorlar antijenin farklı formlarını saptamada daha güvenilir antikorlardır [86].

1.5.3. Biyoaktif Peptitlerin Analizlerinde Kullanılan Diğer Yöntemler

Beta-kazomorfın-7 ve β -kazomorfın-5'in tayininde, sütün in vitro enzimatik sindirim sonucu açığa çıkan peptitleri göstermek amacıyla spektral karşılaştırma, second order derivative spectroscopy ve HPLC yöntemleri kullanılmıştır [87]. Bir çalışmada, β -kazomorfın-7'nin bağırsak goblet hücreleri doğrudan aktive edebilir hipotezini, kantitatif ve semikantitatif RT-PCR ve ELİSA yöntemi ile sıçan bağırsak müsin üreten hücreleri in vitro araştırılmıştır. Sonuç olarak, BKM-7 bağırsak goblet hücreleri opioid reseptörleri üzerindeki etkisi müsin üretimini önemli ölçüde arttırdığı ortaya çıkmıştır.

Bundan önce, opioid peptitlerin tayini için opioid reseptörlerine bağlanma çalışmaları, izole organ preparatları veya immunoreaktif materyaller kullanılmaktaydı [88].

Yoğurt ve peynirde de bu konuda çalışmalar yapılmıştır. Juan-Garcia ve arkadaşları, 2009 yılında süt ürünlerinden beta-kazomorfinlerin tespiti için nanoelektrosprey ile birlikte ion-trap-mass spektrometresi metodunu geliştirerek, kazomorfinlerin süt ve süt ürünlerinden direkt ölçümü sağlamaya çalışmışlardır [89].

Wang (2011) cam mikroakışkan yonga elektroforezi ve lazer kaynaklı floresan algılama dayalı deteksiyon sistemi geliştirerek peynir örneklerinde β -kazomorfin tayinini için çalışmıştır [62]. İdrardan BKM-7 tayini için geliştirilen ve satışa sunulan bir ELİSA kiti bulunmaktadır (Biosystems, K7010 Casomorphin (96 test), Germany).

Tez çalışmamızda, marketlerden alınan çeşitli beyaz peynirlerin peynir altı sularında β -kazomorfin-7 miktar tayini RP-HPLC ve indirek ELİSA ölçüm metotları kullanılarak yapılmıştır.

2. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Peynir Altı Suyu Örnekleri

Bu çalışmanın yapılabilmesi için Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na başvurulmuştur ve 08.06.2011 tarihinde izin alınmıştır (Karar No: 11/73).

Çalışmamız, marketlerde satılmakta olan 9 çeşit beyaz peynirin peynir altı suyu (A, B, C, D, E, F, G, H, I markaları) örnek alınarak yapılmıştır.

Beyaz peynir örnekleri üretimleri sırasında mayalanma bakterilerinin proteolitik aktivitesi sonucunda, süt β -kazein peptitlerinden peynir β -kazomorfın peptitleri ortaya çıkmaktadır. Bu β -kazomorfın peptitlerini peynir altı suyundan analiz etmek mümkündür. Yeterli proteolitik seviyeye ulaşan her markanın peynir altı suyu sargı bezinden süzülerek alındı. Örnek analizi için ELİSA standart grafiğini elde etmek üzere, standart BKM-7 peptidi BSA ile konjuge edildi. Son olarak standartlar ve örnekler plakalara kaplanarak, uygun ELİSA metodu ile niceleyici analizi, mikropłaka okuyucu ile 405 nm de gerçekleştirildi.

2.2. Peynir Sularının Süzülmesi

Marketten alınan 9 farklı marka beyaz peynir örnekleri ELİSA protokolünün uygulanacağı günden 1 gün öncesine kadar 4°C de ambalajları açılmadan saklanmıştır. Her markanın peynir altı suyu ambalajları açılarak bir sargı bezinden uygun hacimlerde beherlere süzülerek içinde peynir tortusu olmayan peynir suları elde edilmiştir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Süzülen peynir altı suyu miktarları

Örnek Peynir	Süzülen miktar
A	135 ml
B	90 ml
C	150 ml
D	30 ml
E	140 ml
F	310 ml
G	245 ml
H	425 ml
I	160 ml

2.3. BKM-7'nin BSA Konjugasyonu

BKM-7, ELİSA plaka kuyucuklarını kaplamak için çok küçük bir peptittir. Kuyucuk yüzeyini kapladıktan sonra primer antikorun tanıyabileceği bölgede yüzeye gömülür ve antikor peptidi bağlayamaz. Bu sebepten dolayı primer antikorun bağlanacağı bölgenin açıkta kalabilmesi için BKM-7 daha büyük bir peptit olan BSA ile konjuge edilerek plaka kuyucuklarına kaplanması sağlanmıştır. BKM-7 peptidi ile BSA'nın konjuge edilmesi için Briand ve arkadaşlarının (1984) geliştirdiği konjugasyon metodu modifiye edilerek uygulanmıştır.

- 1) Kaplama tamponu içinde standart BKM-7 peptidi 1:4, 1:10, 1:20, 1:30 molar oranları korunarak BSA ile aynı tüpte karıştırıldı.
- 2) Solüsyona % 2'lik gluteraldehit solüsyonu 0.75 (v/v) oranında eklenerek, konjugasyon başlatıldı.
- 3) Karışım 90 dakika oda sıcaklığında hafif çalkalanarak inkübe edildi.
- 4) İnkübasyon sonrasında 0.1 hacim 0.1 M NaBH₄ konjugata eklenerek, 30 dk inkübe edildi ve reaksiyon durduruldu.

- 5) Elde edilen konjugatın tamamı 5000 rcf, 10°C, 40 dk santrifüj edildi ve fazla glutaraldehit ortamdan uzaklaştırıldı.
- 6) Konsantrasyon olarak eklenen BKM-7 miktarı ml⁻¹ olarak alındı.

2.4. ELİSA Protokollerinde Kullanılan Materyal ve Cihazlar

Antikorlar: Poliklonal β -kazomorfin-biotin (1:150-1:1000 dilüsyon aralığında), İnek anti- β -kazomorfin (1:250-1:3000 dilüsyon aralığında), HRP-Goat Anti-Rabbit IgG (Proteintech Group) (1:500-1:3000 dilüsyon aralığında) antikorları ve enzimatik işaret (1:150-1:1000) dilüsyon aralığında) kullanılmıştır.

Kullanılan Peynir Altı Suları: 0.05-0.5 dilüsyon aralığında 9 çeşit beyaz peynirin peynir altı suyu örneklendirilmiştir.

Standart: BSA ile konjuge inek BKM-7'si β -kazomorfin-7 (THERMO) (1:4, 1:10, 1:20, 1:30 molar konjugasyon oranı) 187.5 ng/ml-50 μ g/ml aralığında çalışılmıştır.

Materyal: Nunc-Maxisorp 96 well-plate, Ebioscience ELİSA kaplama tamponu, Ebioscience ELİSA yıkama tamponu, Ebioscience ELİSA dilüsyon solüsyonu, metot kromojenik solüsyonu ve Euroimmun HRP substrate (E1203001AH) metotların tasarımında kullanılmıştır.

Cihazlar: HPLC metot analizleri için UV-Vis HPLC (Shimadzu, SCL-10AVP) kullanılmıştır. Plaka inkübasyonlarında 96 plaka karıştırıcı vorteks (Velp Scientification) kullanılmıştır. 96 plaka okumaları için Biotek μ Quant MQX200 mikropilaka okuyucuları kullanılmıştır. HPLC kolonu olarak Ters-faz C18 (5 μ m, 25x1.0 mm) kolonu kullanılmıştır.

2.5. ELİSA Optimizasyon Protokolleri:

Optimizasyon çalışmaları sırasında kullanılan bütün ELİSA protokollerini 4 başlık altında toplandı.

2.5.1. ELİSA Optimizasyon Metodu I

Protokol:

1. 100 µl, 1x kaplama tamponu ile hazırlanmış BSA ile konjuge BKM-7 peptit dilüsyonları ve 0.05-0.5 dilüsyon aralığında farklı peynir altı suları, plaka kuyucuklarına 4°C’de gece boyunca kaplandı.
2. 250 µl, 1x yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.
3. Yıkamadan sonra kuyucuk başına 200 µl 1x bloklama solüsyonu (dilüsyon tamponu) eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon sonrası, 250 µl, 1x yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.
5. Poliklonal primer antikor 1, 1:150-1:1000, dilüsyonları kuyucuk başına 100 µl olarak eklendi ve 1,5 saat inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonrası, 250 µl, 1x yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.
7. Enzimatik işaret, 1:150-1:1000 dilüsyonları kuyucuk başına 100 µl olarak eklendi ve 45 dk inkübe edildi.
8. İnkübasyon sonrası, 250 µl, 1x yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.
9. Kuyucuk başına 100 µl ELİSA substrat eklenerek 10-30 dakika arasında 405 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu da absorbanlar okundu.

Protokolün şematize edilmiş çizimi Şekil 2.1’de verilmiştir.

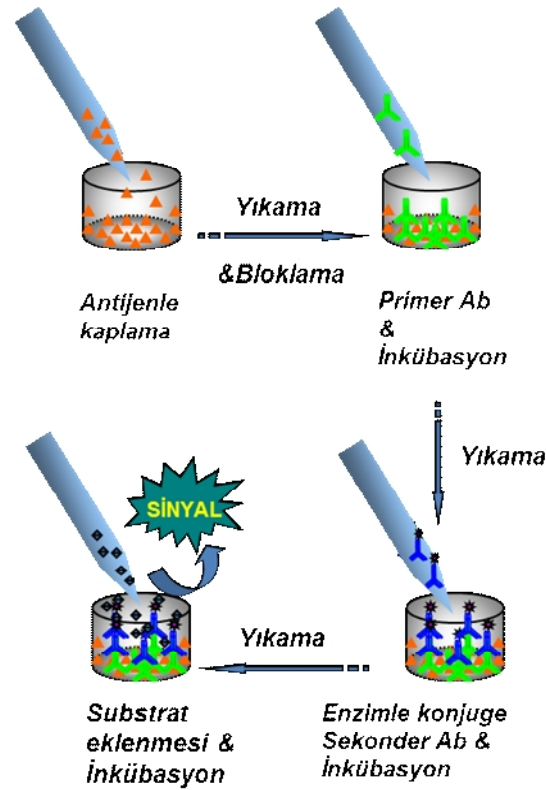
Uygulama

Geniş bir optimizasyon aralığı taramak için kullanılan Metot I’in en stabil optimizasyon değerleri Tablo 2.2’de verilmiştir.

Plaka düzeni ve kaplanması:

ELİSA plakası 12’lik çoklu mikropipet kullanılarak her dilüsyon dublike çalışılacak şekilde kuyucuk başına 100 µl ekleme yapıldı ve plakanın üzeri yapışkanlı membran ile

kapatılarak 4°C de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Bulunan optimizasyon değerlerinde Metod I peynir altı sularına da uygulandı.



Şekil 2.1. ELİSA protokolü şeması

Tablo 2.2. Metot I Optimizasyon Değerleri

	Örnek miktarı	Dilüsyon aralığı
Standart kaplaması	1:30 molar konjugasyon oranında	400-200 ng/ml
Peynir örnekleri	A, B, C, D ve diğerleri 100 µl	0.5 – 0.05
BCM-7 primer antikoru	100 µl	1:250 – 1:150
Enzimatik işaret	100 µl	1:150

2.5.2. ELİSA Optimizasyon Metodu II

Protokol:

1. 100 µl, 1x kaplama tamponu ile hazırlanmış BSA ile konjuge BKM-7 peptit dilüsyonları ve 9 çeşit peynir altı suyu, 0.5-0.05 dilüsyon aralığında plaka kuyucuklarına 4°C’de gece boyunca kaplandı.
2. 250 µl, 1x yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.
3. Yıkamadan sonra kuyucuk başına 200 µl 1x bloklama solüsyonu (dilüsyon tamponu) eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon sonrası, 250 µl, 1x yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.
5. Poliklonal primer antikor 2, 1:250-1:3000, dilüsyonları kuyucuk başına 100 µl olarak eklendi ve 1.5 saat inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonrası, 250 µl, 1x yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.
7. Enzimatik işaret, 1:500-1:3000 dilüsyonları kuyucuk başına 100 µl olarak eklendi ve 1.5 saat inkübe edildi.
8. İnkübasyon sonrası, 250 µl, 1x yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.
9. Kuyucuk başına 100 µl ELİSA substrat eklenerek 10-30. dakikalar arasında 405 nm de mikropilaka okuyucu da absorbanslar okundu.

Uygulama:

Geniş bir optimizasyon aralığı taramak için kullanılan Metod II’nin en stabil optimizasyon değerleri Tablo 2.3 de verilmiştir.

Plaka düzeni ve kaplanması

ELİSA Plakası 12’lik çoklu mikropipet kullanılarak her dilüsyon dublike çalışılacak şekilde kuyucuk başına 100µl ekleme yapıldı ve plakanın üzeri yapışkanlı membran ile kapatılarak 4°C de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Bulunan optimizasyon değerlerinde Metod II, peynir altı sularına da uygulandı.

Tablo 2.3. Metot II optimizasyon değerleri

	Örnek miktarı	Dilüsyon aralığı
Standart kaplaması	1:30 molar konjugasyon oranında	10-640 pg/ml
Peynir örnekleri	A, B, C, D 100 µl	0.5 – 0.05
BCM-7 primer antikor	100 µl	1:1000 – 1:750
Enzimatik işaret	100 µl	1:2000

2.5.3. ELİSA Optimizasyon Metodu III

Protokol:

- 100 µl, 1x kaplama tamponu ile hazırlanmış BSA ile konjuge BKM-7 peptit dilüsyonları ve C marka peynir altı suyu, 0.5-0.05 dilüsyon aralığında plaka kuyucuklarına 4°C’de gece boyunca kaplandı.
- 250 µl, 1x yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.
- Yıkamadan sonra kuyucuk başına 200 µl 1x bloklama solüsyonu (dilüsyon tamponu) eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası, 250 µl, 1x yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.
- Poliklonal primer antikor 1, 1:250 dilüsyonları kuyucuk başına 100 µl olarak eklendi ve 1 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası, 250 µl, 1x yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.
- Enzimatik işaret 1:250 dilüsyonda, kuyucuk başına 100 µl olarak eklendi ve 1.5 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası, 250 µl, 1x yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.

9. A1-D4, A7-D8 arası kuyucuklara kuyucuk başına 100 µl ELİSA substratı eklendi.
10. E3, E6, E7, E8 arası kuyucuklara kuyucuk başına 100 µl Euroimmun HRP substrate (E1203001AH) eklendi ve 15 dk inkübasyona bırakıldı.
11. 15 dk sonunda yalnızca E3, E6, E7, E8 arası kuyucuklarda gözlenen mavi renklenmeler, tekrar kuyucuklara 100 µl durdurma solüsyonu eklemesi ile sarı renge dönüştürüldü. Hemen ardından yalnızca E3, E6, E7, E8 arası kuyucuklar 450 nm de absorbansları ölçüldü.
12. Plaka okuyucudan hiç çıkarılmadan okuyucu dalga boyu 405 nm ye ayarlanır ve son okumadan 5 dk sonra A1-D4, A7-D8 arası kuyucuklar 20., 25., 30. dakikalarının 405 nm deki absorbansları alındı .

Plaka düzeni ve kaplanması

ELİSA Plakası 12 lik çoklu mikropipet kullanılarak her dilüsyon dublike çalışılacak şekilde kuyucuk başına 100 µl ekleme yapıldı ve plakanın üzeri yapışkanlı membran ile kapatılarak 4°C de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Bulunan optimizasyon değerlerinde Metod III peynir altı sularına da uygulandı.

2.5.4. ELİSA Optimizasyon Metodu IV

Protokol:

1. 100 µl poliklonal primer antikor 2, 1/250-1/1000 dilüsyon aralığında plaka kuyucuklarına 4°C'de gece boyunca kaplandı.
2. 250 µl, 1x yıkama tamponu ile kuyucuklar 5 kere yıkandı.
3. Yıkamadan sonra kuyucuk başına 200 µl 1x bloklama solüsyonu eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon sonrası, 250 µl, 1x yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.

5. BKM-7 peptit standart dilüsyonları 1xELİSA dilüsyon solüsyonu ile 0.375-1000 ug/ml konsantrasyon aralığında hazırlanarak kuyucuk başına 100 µl olarak eklendi ve 2 saat inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonrası, 250 µl, 1x yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.
7. Poliklonal primer antikor 1, 1:500-1:1500 dilüsyonları kuyucuk başına 100 µl olarak eklendi ve 30 dakika inkübe edildi.
8. İnkübasyon sonrası, 250 µl, 1x yıkama tamponu ile kuyucuklar 5 kere yıkandı.
9. Enzimatik işaret, 1:250-1:1000 dilüsyonları kuyucuk başına 100 µl eklenerek, 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
10. 1X wash buffer ile kuyucuk başına 250 µl ile yıkama yapılır.
11. Kuyucuk başına 100 µl aquablue ELİSA substratı eklenerek 10-30. dakikalar arasında 405 nm de absorbanslar okundu.

Plaka düzeni ve kaplanması

ELİSA Plakası 12'lik çoklu mikropipet kullanılarak her dilüsyon dublike çalışılacak şekilde kuyucuk başına 100µl ekleme yapıldı ve plakanın üzeri yapışkanlı membran ile kapatılarak 4°C de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Protokol immün reaktivite vermediği için, Metod IV peynir altı sularına uygulanmadı.

2.6. Peynir Altı Sularında RP-HPLC ile Peptit Miktarı Tayini

Peynir altı suyu süzüntüsünden 1000 µL alınmıştır. Etiketlenmiş Amicon 30000 Molecular Weight Cut-off (MWCO) ultra santrifüj tüplerinde 500 µl peynir süzüntüsü 14000 g' de, 4 °C' de, 10 dk santrifüj edilmiştir. 10 dk sonunda filtratlar ependorflara toplanmıştır. İkinci seferde kalan peynir süzüntüsünden amicon filtrelelere eklenmiş ve 14000 g' de, 4 °C' de, 10 dk santrifüj yapılmıştır. 10 dk sonunda filtratlar öncekilerin üzerine eklenmiştir. Filtrasyon sonrası hacimler ölçülmüştür.

Daha sonra peynir filtratlarının HPLC yüklemeleri yapılmıştır. Bu fraksiyonlardan elde edilen peptit pikleri ayrımını netleştirilmek üzere daha sonra 10000 MWCO filtrelerle peynir suları filtre edilerek ayrıştırılmıştır. Bunun için her bir marka peynir altı suyundan bir miktar alınarak süzölmüştür. Bu süzöntüden 4000 µL alınmıştır. 5000 g' de 4 °C' de, 30 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası hacimler ölçölmüş ve filtratlar falkon tüplere toplanmıştır. Daha sonra filtratların HPLC yüklemeleri yapılmıştır.

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. BKM-7'nin Peynir Altı Sularında ELİSA ile Tayini

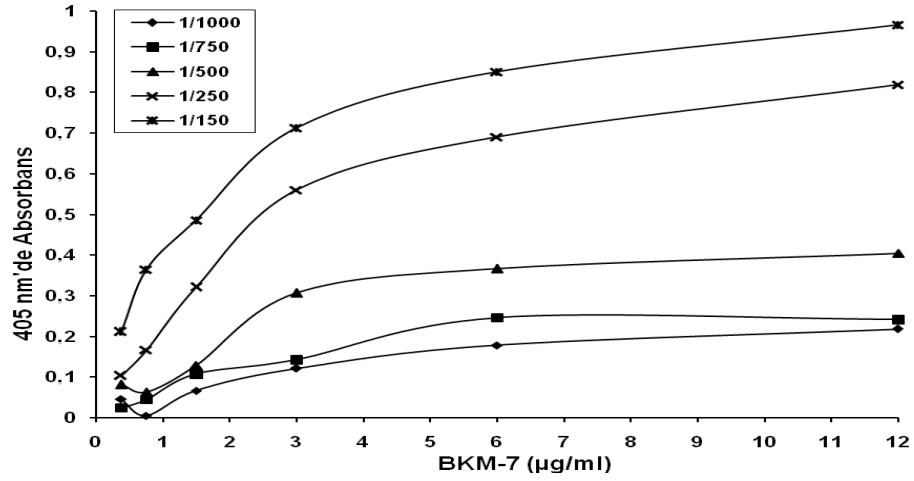
3.1.1. ELİSA Metot I Sonuçları

Optimizasyonun ilk aşamasında, 1:10 molar oranında konjuge edilmiş BSA-peptit konjuge standardı kullanılarak Primer antikor 1 ve enzimatik işaret optimizasyonu yapılmıştır. Bunun için 1/150 – 1/1000 primer antikor ve enzimatik işaret dilüsyonları kullanılmıştır (Şekil 3.1). Optimum primer antikor miktarı olarak 1/250 dilüsyon miktarı seçilmiştir.

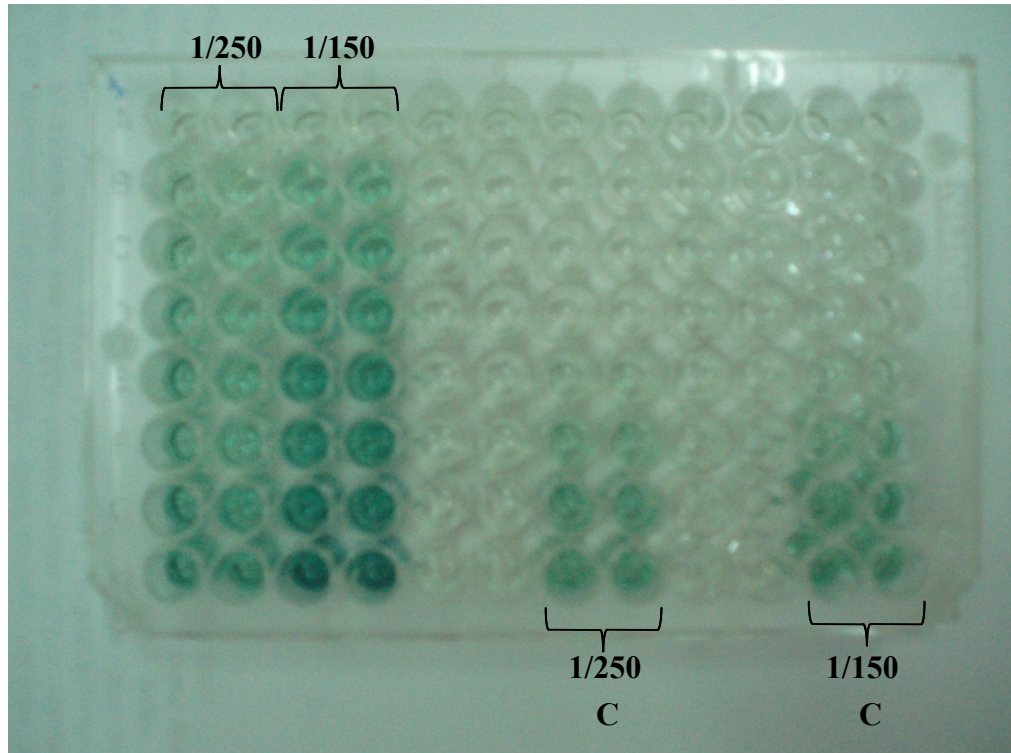
İleri optimizasyonlarda, 1:30 molar oranda BSA- BKM-7 peptit konjugatı, 6.25-100 ng/ml aralığında ve 0.05-0.5 dilüsyonlarda, 4 çeşit peynir altı suyu ile beraber plaka kuyucuklarına 4°C'de gece boyunca kaplandı. 1/150 primer antikor ve 1/250 enzimatik işaret dilüsyonlarında 25. dk absorbans okumaları alındı (Şekil 3.2) ve BKM-7 standart grafiği çizildi.

ELİSA Metot I'e dayalı standart grafiği, 6.25-100 ng/ml doğrusal aralığında ($R^2=0,991$) Şekil 3.3'de verilmiştir. Bu metotla elde edilen standart BKM-7 grafikleri peynir altı suyu peptit miktarı tayinlerinde kullanılmıştır. ELİSA testinin hassasiyeti 23 ± 5.3 ng/ml olarak bulunmuştu

Örnek kuyucuklarından bu metotla peynir altı suyu örnekleri için de immün aktivite alınmıştır. Peynir altı suyu örneğinin 0.05-0.5 oranlarında dilüsyonları absorbans grafiği Şekil 3.4'de verilmiştir. Peynir altı suyunda, dilüsyonla beraber doğrusal artan immün reaktivite gözlenmiştir.

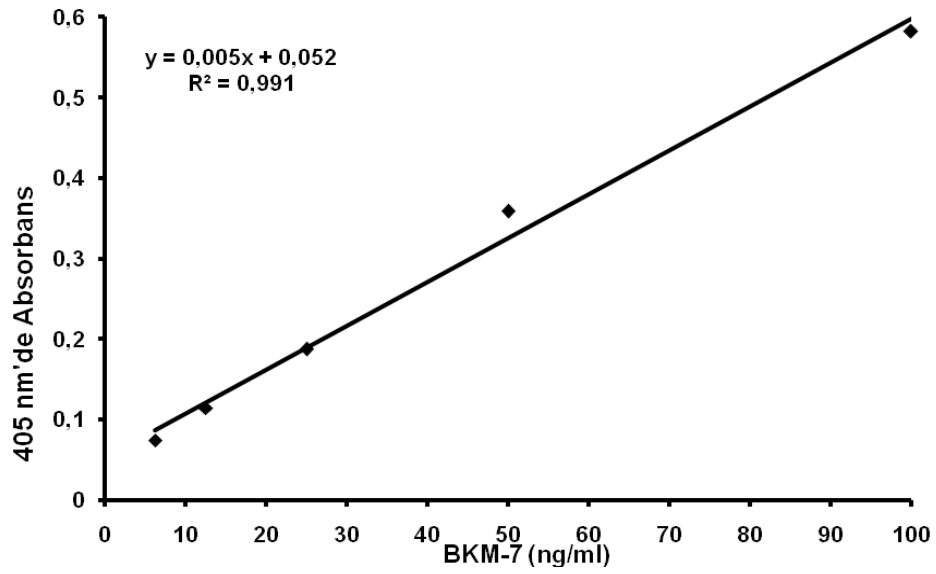


Şekil 3.1. 1/150 – 1/1000 primer antikor 1 ve enzimatik işaret dilüsyonları kullanılarak, 0.375-12 µg/ml aralığında, BSA ile konjuge BKM-7 peptit (1:10 molar oran) grafikleri.

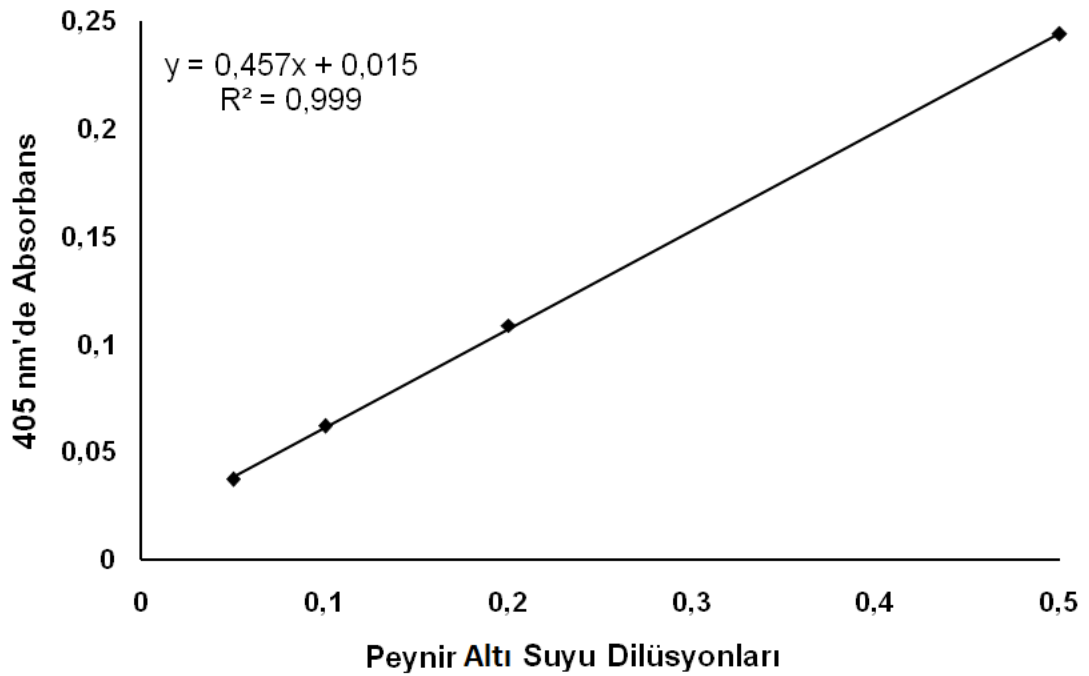


Şekil 3.2. 1/150 ve 1/250 primer antikor 1 ve 1/250 enzimatik işaret dilüsyonları kullanılarak, 1:30 molar oranda, 6.25-100 ng/ml aralığında BSA-BKM-7 peptit konjugatı ve 0.05-0.5 dilüsyon aralığında 4 peynir altı suyu ile beraber plaka protokol sonu görüntüsü.

C marka örneği için bulunan absorbans değerleri standart grafiği denkleminde yerlerine konularak, bu peynir altı suyu için BKM-7 miktarı 403.1 ng/ml olarak bulunmuştur. Diğer peynir altı sularında BKM-7 varlığı için immün aktivite alınmamıştır



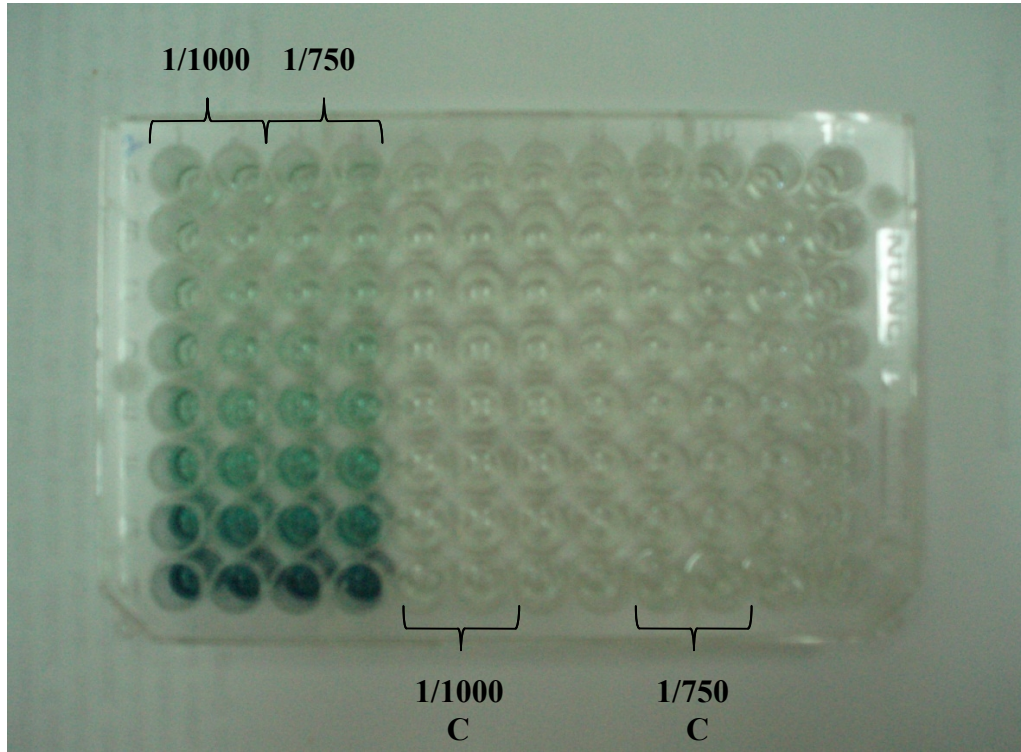
Şekil 3.3. ELİSA Metot I temelli standart grafiği (6.25-100 ng/ml BKM-7).



Şekil 3.4. 0.05-0.5 oranlarında C marka peynir altı suyu dilüsyonları absorbans grafiği.

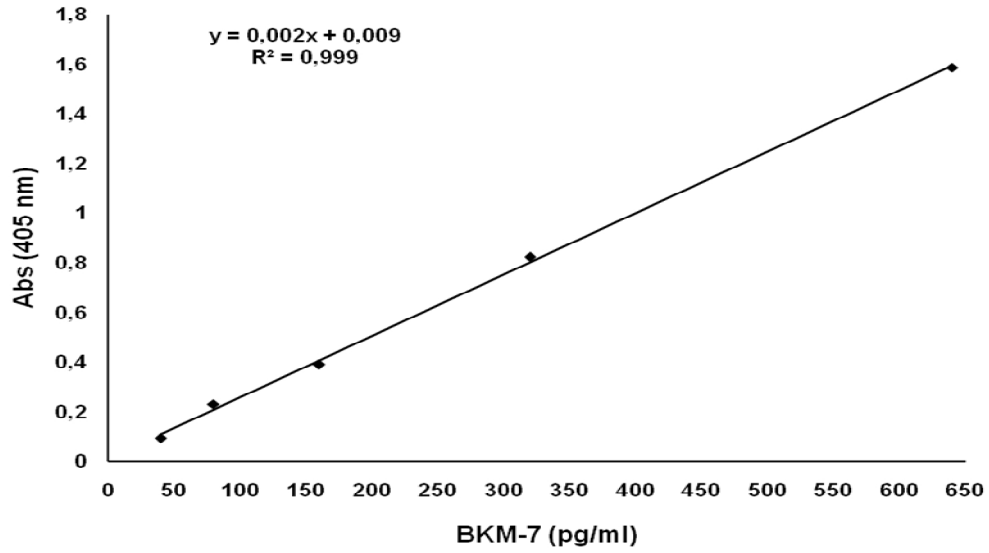
3.1.2. ELİSA Metot II Sonuçları

BSA-BKM-7 konjugat dilüsyonları, 10-640 pg/ml aralığında ve 4 çeşit peynir altı suyu, 0.05-0.5 dilüsyon aralığında plaka kuyucuklarına 4°C’de gece boyunca kaplandı. 1/1000 primer antikor 2 ve 1/2000 sekonder antikor dilüsyonlarında 25. dk absorbans okumaları alındı (Şekil 3.5) ve BKM-7 standart grafiği çizildi. ELİSA Metot II’ye dayalı standart grafiği 40-640 pg/ml doğrusal aralığında ($R^2= 0,999$) Şekil 3.6’da verilmiştir.



Şekil 3.5. 10-640 pg/ml aralığında, BKM-7 peptit dilüsyonları ve 0.05-0.5 dilüsyon aralığında, 4 çeşit peynir altı suyu plaka protokol sonu görüntüsü.

Örnek kuyucuklarından bu metotla hiçbir plakada immün aktivite alınamamıştır. Bu sebepten dolayı, Metot II’de kullanılan primer antikorun, örneklerdeki BKM-7’yi tanımadığına karar verilmiştir.



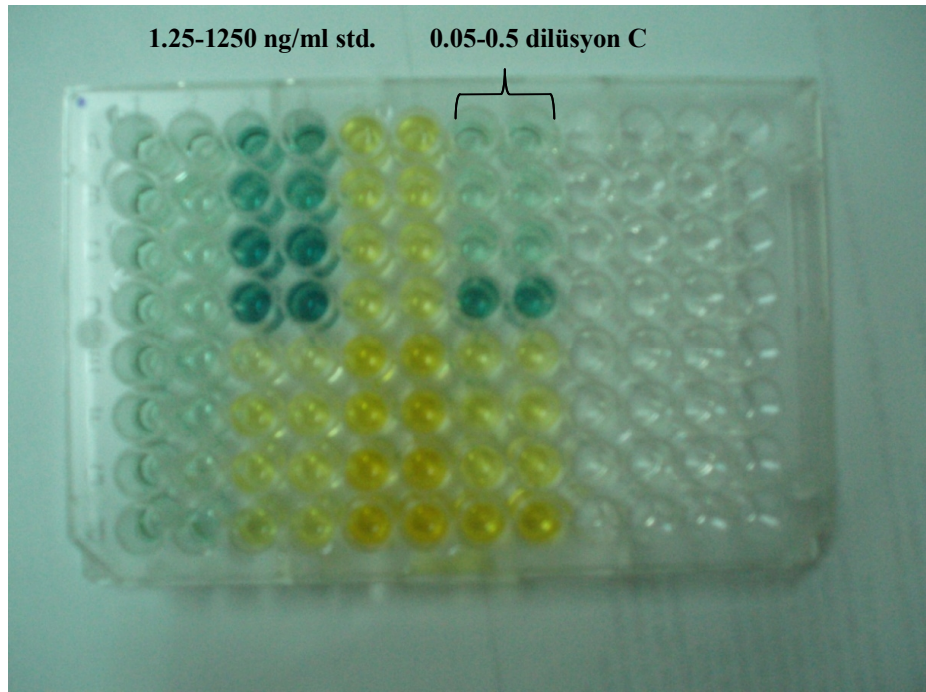
Şekil 3.6. ELİSA Metot II temelli 40-640 pg/ml BKM-7 standart grafiği.

3.1.3. ELİSA Metot III Sonuçları

BSA-BKM-7 konjugat dilüsyonları, 1.25-1250 ng/ml aralığında ve C marka peynir altı suyu, 0.05-0.5 dilüsyon aralığında plaka kuyucuklarına 4°C’de gece boyunca kaplandı. 1/250 primer antikor 1 ve 1/250 enzimatik işaret dilüsyonlarında 2 farklı HRP substratı için 15. ve 25. dk absorbans okumaları alındı (Şekil 3.7). Bu çalışmada Protokol 1 metodu uygulanmıştır. Bu plaka düzeni hem antikorun BSA’ya karşı olabilecek olan immün aktivitesini test etmek hem de iki farklı substratın konjugasyonda kullanılan gluteraldehit ile özgül olmayan oksidasyon reaksiyonu vererek, yanlış aktivite sonuçları değerlendirilmesi için yapılmıştır. Protokollerde kullanılan primer antikorların immünizasyon için taşıyıcı proteinlerinin “keyhole limpet hemocyanin (KHL)” olarak verilmişlerdir. Buna rağmen, primer antikorların olası BSA immün reaktivitesi için plaka 5-40 µg konsantrasyon aralığında BSA ile kaplanmıştır. Bu şekilde antikorun BSA’ya karşı olan ilgisine bakılmıştır. Bu sırada hiçbir immün reaktivite gözlenmemiştir.

Gluteraldehit homobifonksiyonel krosslink yapıcı bir çapraz bağlayıcı olduğu için HRP substratları ile reaksiyona girerek yanlış pozitiflik verdiği belirtilmektedir [66]. Bunu aşmak için konjugasyon sonrası fazla gluteraldehiti ortamdaki uzaklaştırmak için diyaliz gibi yöntemler uygulanmaktadır [103]. Çalışmamızda bu sorunun eliminasyonu için öncelikle konjugasyon sonrası filtreleme ile fazla glutatyon ortamdaki uzaklaştırılmıştır

ve iki farklı HRP substratı kullanılarak, protokol substratının gluteraldehit ile oksidasyona girmediği gösterilmiştir. A1,2'den D 3,4'e kadar olan kuyucuklar protokol ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) içeren substrat ile sonlandırıldığında immün aktiviteye bağlı orantılı bir absorbans artışı gözlenmiştir. Bununla beraber, çoğu ELİSA kit içeriğinde bulunan TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) içeren kromojenik substrat kullanıldığında özgül olmayan oksidasyona bağlı yüksek absorbans gözlenmiş ve dilüsyonlar arasında absorbansa bağlı doğrusallık yakalanamamıştır. Bu çalışma ile protokollerde kullanılan kromojenik HRP-substratının gluteraldehit ile özgül olmayan reaksiyon vermediği gösterilmiştir. Çalışma her iki substrat için aynı konsantrasyonlarında plakaya kaplanan standart ve peynir altı suyu dilüsyonlarına uygulanmıştır.



Şekil 3.7. 1.25-1250 ng/ml standart aralığında, BKM-7 peptit dilüsyonları ve 0.05-0.5 dilüsyon aralığında C marka peynir altı suyunun 2 farklı substrat ile protokol sonu görüntüsü.

3.1.4. ELİSA Metot IV Sonuçları

Poliklonal primer antikor 2, 1/250-1/1000 dilüsyon aralığında plaka kuyucuklarına 4°C'de gece boyunca kaplandı. BKM-7 peptit standart dilüsyonları 1xELİSA dilüsyon solüsyonu ile hazırlanarak 0.375-1000 ug/ml konsantrasyon aralığında inkübe edildi.

1:500-1:1500 Poliklonal primer antikor 1 ve 1:250-1:1000 enzimatik işaret için 405 nm de 10-30. dakikalar arasında okumaları alındı. Bu metotla plakada örnek kuyucuklarından hiçbir aktivite alınamamıştır. Bu sebepten dolayı, Metot IV tasarımının, bu sistem için uygun bir ELİSA metot tasarımı olmadığına karar verilmiştir.

3.2. Peynir Altı Suyu BKM-7 Peptitlerinin RP-HPLC ile Miktar Tayini

3.2.1. BKM-7 Peptit Standartlarından Elde Edilen HPLC Kromatogram Sonuçları

β -kazomorfin-7 aminoasit sekansına sahip olan standartların (Thermo marka, % 90 saflıkta) alıkonma zamanlarını tayin etmek için ters-faz HPLC kullanılmıştır. HPLC çalışmalarında, BKM-7'nin 220 nm dalga boyunda maksimum absorbanı verdiği belirlendikten sonra yöntemin standart çözeltileri için uygulanma koşulları optimize edilmiştir. Alet yıkama solüsyonu olarak kullanılan Metil alkol ile cihaz yıkanıp β -kazomorfin-7 standartları için sırasıyla 0.008-1.25 mM konsantrasyonları arasında yüklemeler yapılmıştır. Her yükleme 45 dk'lık metotla ayrıştırılmıştır. Her bir konsantrasyon için iki kez yükleme yapılmıştır. Kromatogramların sonucu Şekil 3.8'deki gibidir.

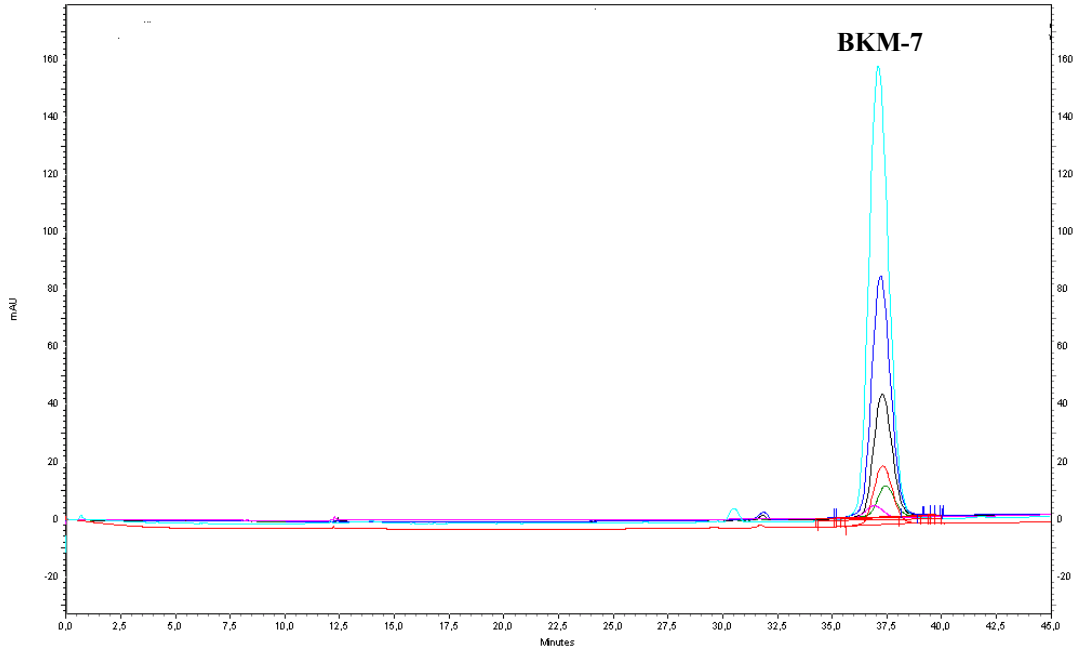
Yöntemin doğrusal olduğu 0.008-1.25 mM derişim aralığında bir seri standart BKM-7 çözeltilerinin derişimine karşı HPLC'de elde edilen piklerin alan değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden, regresyon doğrusunun denklemi $y = 8,1155x - 0,0064$ (y: pik alanı, x: konsantrasyon) ve korelasyon katsayısı (R^2) 0.9999 olarak bulunmuştur (Şekil 3.9).

3.2.2. Peynir Altı Suyu BKM-7 RP-HPLC Peptit Kromatogramı Sonuçları

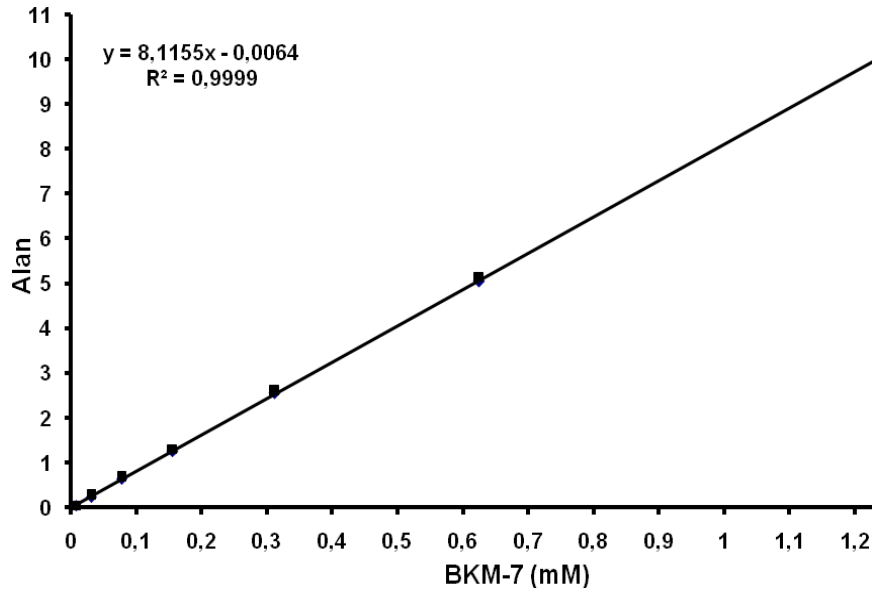
Peynir örneklerinden kolona 25 μ l enjekte edilmiş ve her yüklemeden sonra 45 dk beklemiştir. 220 nm'de pikler tanımlanmıştır. Pik tanımlanması standart BKM-7'nin geliş zamanı ve spektruma bakılarak yapılmıştır. Herbir konsantrasyon için iki kez yükleme yapılmıştır. Sisteme yapılan yüklemeler:

- 1) 950 μ l 30000 MWCO ile filtre edilmiş A marka peynir filtratından 25 μ L

- 2) 800 µl 30000 MWCO ile filtre edilmiş B marka peynir filtratından 25 µL
 3) Filtre edilmemiş C marka peynirden 25 µL

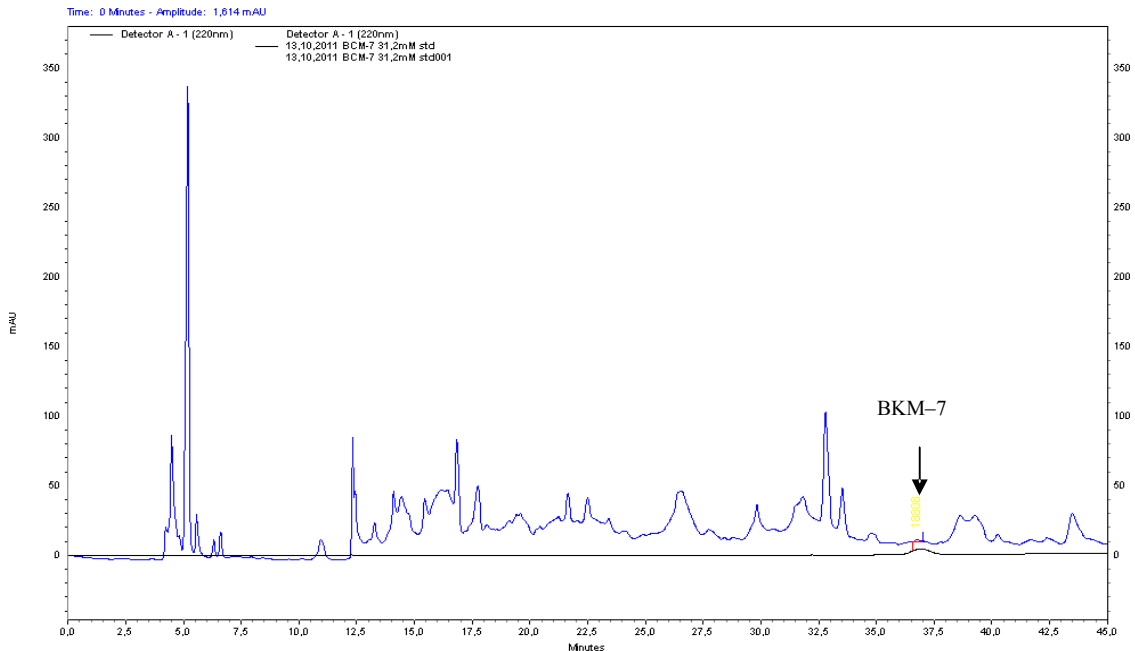


Şekil 3.8. 0.008–1.25 mM BKM-7 standart RP-HPLC pikleri kromatogramları.



Şekil 3.9. 0.008 – 1.25 mM BKM-7 standart peptitleri RP-HPLC standart grafiği.

Şekil 3.10 ve 3.11’de verilen HPLC kromatogramında, 5.-40. dk’ lar arasında görülen pikler 30000 MWCO ile filtre edilen A marka peynir altı suyu peptit fraksiyonlarına aittir. Kromatogramlarda 36.-38. dakikalar arasında yoğun BKM-7 piki görülmüştür. Bu piklere karşılık gelen alanlar Class-VP üzerinden hesaplanmış ve sırasıyla 0.01 ve 0.013 olarak bulunmuştur. Daha sonra BKM-7 standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisinden elde edilen regrasyon doğrusunun denklemi kullanılarak ve kullanılan filtrelerin geri kazanım katsayılarına göre (30000 MWCO için 0.9), bu alanlara karşılık gelen konsantrasyonlar sırasıyla 11.2 ve 14.6 μM olarak hesaplanmıştır. Ortalama peptit konsantrasyonu $12.5 \pm 2.35 \mu\text{M}$ ve karşılığı 10 ng/ml olarak bulunmuştur.

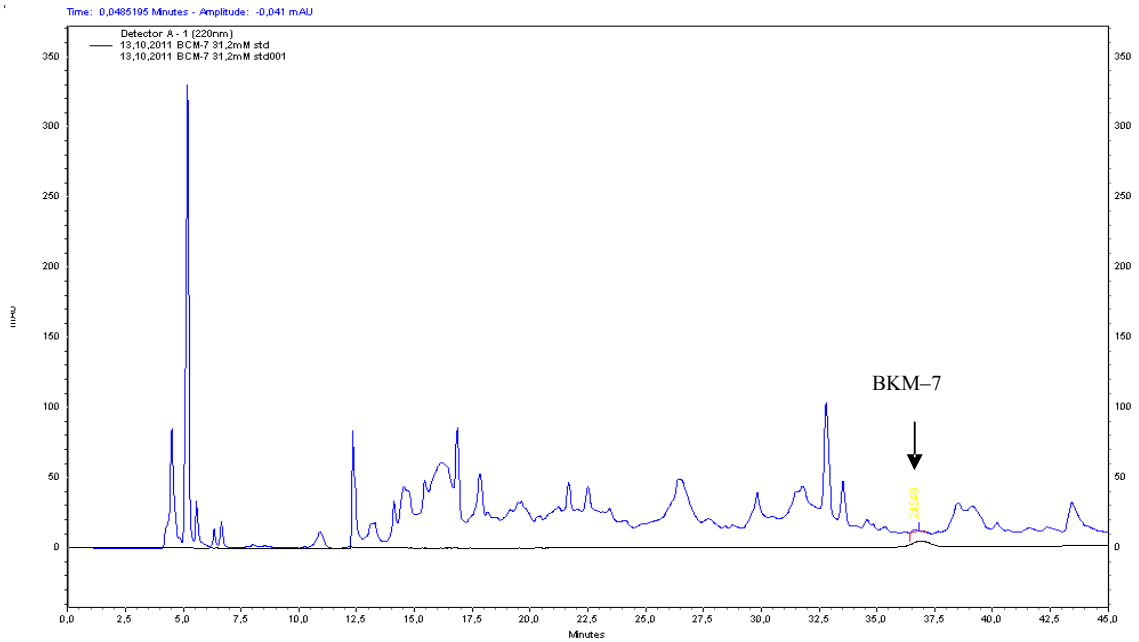


Şekil 3.10. 30000 MWCO ile filtre edilmiş A marka peynirin 1. HPLC kromatogramı ve 31.2 μM BKM-7 standart kromatogramı

Bu piklere karşılık gelen alanlar Class-VP üzerinden hesaplanmış ve sırasıyla 0.029 ve 0.034 olarak bulunmuştur. Daha sonra BKM-7 standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisinden elde edilen regrasyon doğrusunun denklemi kullanılarak ve kullanılan filtrelerin geri kazanım katsayılarına göre (30000 MWCO için 0.9), bu alanlara karşılık gelen konsantrasyonlar sırasıyla 32.3 ve 37.9 μM olarak hesaplanmıştır. Ortalama peptit konsantrasyonu $35.1 \pm 3.93 \mu\text{M}$ ve karşılığı 28.1 ng/ml olarak bulunmuştur.

Şekil 3.14’de verilen HPLC kromatogramı, 5-40. dk’ lar arasında görülen pikler filtre edilmemiş C marka peynir altı suyu peptit fraksiyonlarına aittir. Kromatogramda 36-38.

dakikaları arasında yoğun BKM-7 piki görülmüştür. Dublike kromatogramlarda piklere karşılık gelen alanlar Class-VP üzerinden hesaplanmış ve sırasıyla 0.23 ve 0.27 olarak bulunmuştur. Daha sonra BKM-7 standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisinden elde edilen regrasyon doğrusunun denklemi kullanılarak ve kullanılan filtrelerin geri kazanım katsayılarına göre (30000 MWCO için 0.9), bu alanlara karşılık gelen konsantrasyonlar sırasıyla 419.74 ve 425.63 μM olarak hesaplanmıştır. Ortalama peptit konsantrasyonu $422.68 \pm 4.16 \mu\text{M}$ ve karşılığı 338.15 ng/ml olarak bulunmuştur.

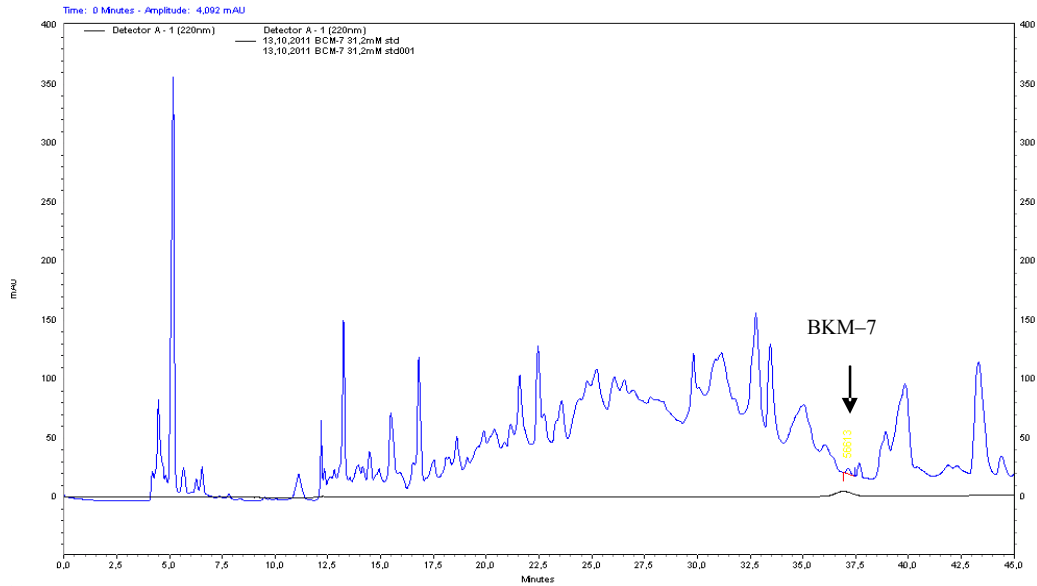


Şekil 3.11. 30000 MWCO ile filtre edilmiş A marka peynirin 2. HPLC kromatogramı ve 31.2 μM BKM-7 standart kromatogramı

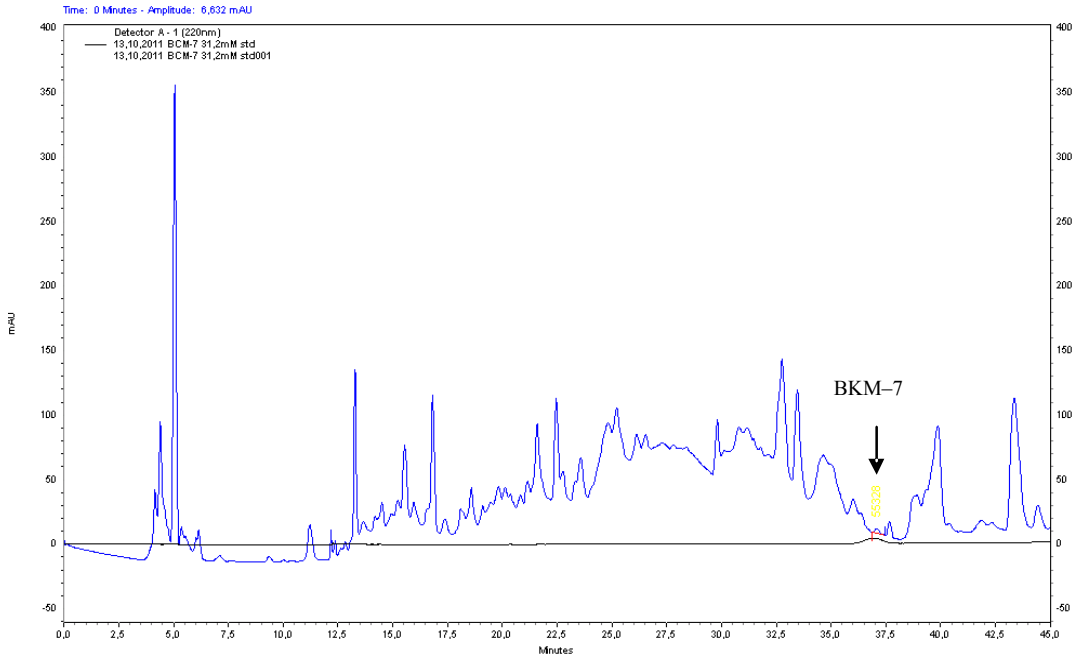
3.3. ELİSA ve HPLC sonuçlarının karşılaştırılması

Ters-faz HPLC analitik metodu ile 3 farklı marka (A,B,C) peynir sularında BKM-7 kromatogram pikleri görülerek, peptit miktarı tayini yapılmıştır. Ancak ELİSA metodunda ancak bu 3 markadan C marka peynir altı suyunda peptit miktarı tayini yapılabilmektedir. C marka peynir altı suyu BKM-7 peptit miktarının HPLC ile tespit edilen miktarı ile ELİSA da tayin edilen miktarı yüksek tutarlılık göstermektedir. A ve B marka peynir sularında BKM-7 miktarı ELİSA ile tayin edilememiştir. ELİSA metodunun deteksiyon alt limiti 6.25 ng/ml olmakla beraber, A ve B marka peynir sularında ölçümün alınamamasının sebebinin, peynir sularında peptidin az miktarlarda

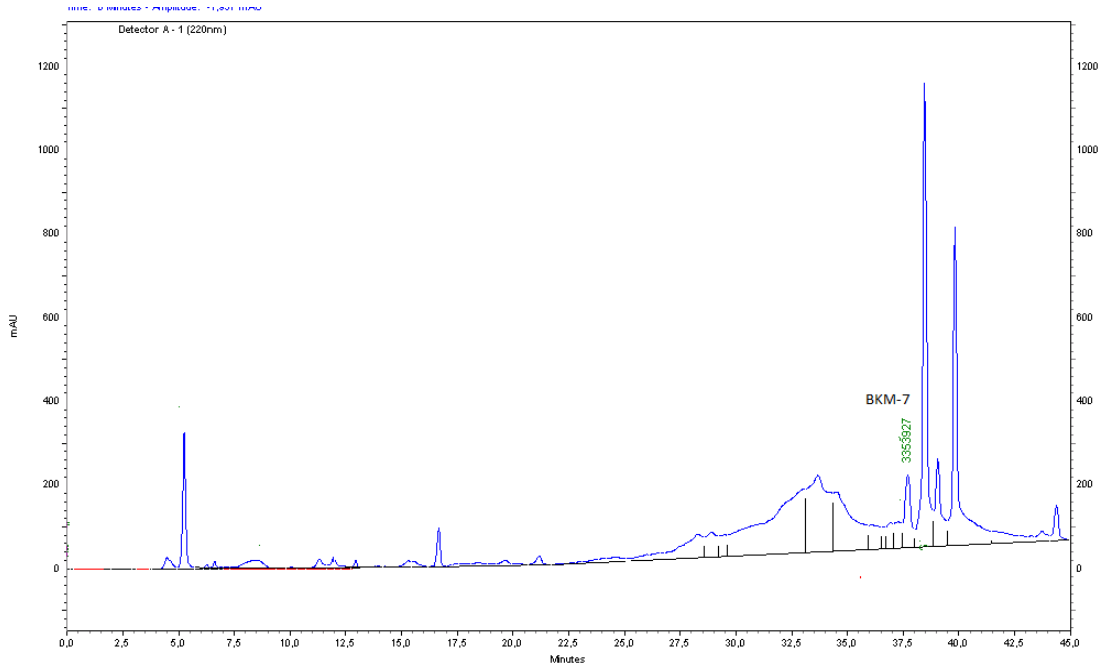
bulunması sebebiyle kaplama sırasında peptidin yüzeye yeterli miktarda tutunamadığı varsayılmaktadır. Bu karşılaştırmada, HPLC metodunun düşük konsantrasyonlarda daha iyi sonuç verdiği, ELİSA'nın da yüksek konsantrasyonlarda HPLC'ye göre daha iyi sonuç verdiği ön görülmüştür. Diğer peynir altı sularında BKM-7 varlığı için immün aktivite ve HPLC piki alınmamıştır.



Şekil 3.12. 30000 MWCO ile filtre edilmiş B marka peynirin 1. HPLC kromatogramı ve 31.2 μ M BKM-7 standart kromatogramı



Şekil 3.13. 30000 MWCO ile filtre edilmiş B marka peynirin 2. HPLC kromatogramı ve 31.2 μ M BKM-7 standart kromatogramı



Şekil 3.14. Filtre edilmemiş C marka peynir altı suyu HPLC kromatogramı

Tablo 3.1. Peynir altı sularında BKM-7 miktarları

	HPLC (μ M)	HPLC (ng/ml)	ELİSA (ng/ml)
Peynir altı suyu A	12,5 \pm 2,35	10	-*
Peynir altı suyu B	35,1 \pm 3,93	28,1	-*
Peynir altı suyu C	422,68 \pm 4,16	338,15	403,1
Peynir altı suyu D	-	-	-
Peynir altı suyu E	-	-	-
Peynir altı suyu F	-	-	-
Peynir altı suyu G	-	-	-
Peynir altı suyu H	-	-	-
Peynir altı suyu I	-	-	-

*Söz konusu kuyucuklarda kör değerlerine yakın absorbanlar alındığı için hesaplama yapılmamıştır.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1. Tartışma

Sakıncalı beslenme kavramı tamamlanmamış genetik potansiyelin birincil faktörü olarak kabul edilmektedir. Tüketicilerde zihinsel ve fiziksel performansı azaltır ve hastalık yatkınlığı artmıştır. Etkili diyet müdahale ve stratejileri ararken, gıdanın yeni bir sınıfı “fonksiyonel gıda” hızla gelişti ve bu probiyotik, prebiyotik, nutraceutical gibi birçok yeni terimleri ortaya çıkarmıştır. Belirli sağlık faydaları aktarmak üzere özel maddeler ile güçlendirilmiş gıdaları tanımlamak için, sanayi tarafından 1980'lerde Japonya kökenli terim "fonksiyonel gıda" terimi kullanılmıştır [90].

O dönem fonksiyonel gıda için birçok olası tanımları vardır; ancak, fonksiyonel gıda genellikle temel beslenme sağlanması ötesinde sağlık teşvik gıda olarak tanımlanmaktadır. Fonksiyonel gıdalar, doğal gıdalardan meydana gelen ve sadece içeriği zenginleştirilmiş olabilir diye belirtmiştir. Benzer olarak, pozitif bir şekilde vücut işlevlerinin sınırlı sayıda etkileyen bir yiyecek bileşeni içeriyorsa, bir fonksiyonel gıda olduğunu belirtti. Ancak, Pariza (1999) son zamanlarda fonksiyonel gıda için yeni bir tanım önermiştir: Üretilen gıda. O da "imal" sürecinde bir genetik mühendislik, yanı sıra geleneksel gıda işleme uygulamaları yoluyla değişmesi olarak, insan müdahalesi bir ürünü ifade ettiğini açıkladı. Bu da "imal" sürecinde bir genetik mühendisliğin yanı sıra geleneksel gıda işleme uygulamaları yoluyla değişmesiyle insan müdahalesi bir ürünü ifade etmektedir [90].

Fonksiyonel gıdaların ilk nesli kalsiyum, karoten ve antioksidan benzeri bileşenlerin gıda içeriği takviyesidir. Daha yakın yıllarda bağırsak mikrobiyal kompozisyon ve aktivitesini iyileştirmek üzere beslenme desteğinin geliştirilmesine yönelik besin takviyeleri yapılmıştır. Buna ek olarak, olası anti-kanserojen aktivitesi veya diğer özgül fizyolojik etkileri aktarabilecek yeni bileşenler ve genetik manüplasyonlar ile üretilebilecek fonksiyonel gıdalar araştırılmıştır [90].

İnsan sütünün ekosistemde en değerli doğal besin olduğunu ifade etmek abartı değildir. Bu sebepten, ekonomik kaygılarla çiftlik hayvanlarının ekonomik önem taşıyan vasıflarını ön plana çıkarmak için genetik iyileştirmeyi amaçlayan ıslah çalışmaları uygulanmaktadır. Bu asrın başlarında akademik olarak çalışılmaya başlanan süt protein tipleri damızlık seçiminde ölçüt olarak alınmaya ve genetik populasyonların ıslahında kullanılmaya başlanmıştır [91]. Fakat bu ıslah çalışmaları ve gen modifikasyonları normalde sütlerde bulunmayan zararlı proteinlerin açığa çıkmasına sebep olmuştur [92].

Dünyada şuan A1 ve A2 tip süt olarak nitelendirilen sütler arasında önemli farklar bulunmaktadır. Bu fark, A1 sütü geni oynanmış ineklerden elde edilen (daha çok süt elde etmek amaçlı olan özellikle Hollanda inekleri-Holstein, Jersey gibi) sütü belirtmekte, A2 ise mutasyona uğramamış olan ineklerden elde edilen sütü simgelemektedir. Türkiye, Kuzey Anadolu yerli ırkları bu farklılaşmaya uğramış geni ve buna bağlı olarak proteini taşımamaktadır. Yani sağlıklı süt sağlamaktadırlar [93].

Sütten peynir fermentasyonu ile olgunlaşması sırasında (mikrobiyal enzimlerle fermentasyon) ve proteolizle çeşitli biyoaktif peptitleri ortaya çıkarmaktadır [42, 48]. Açığa çıkan biyoaktif peptitlerin analizleri çeşitli analitik yöntemlerle son zamanlarda tespit edilmiştir [43, 46, 81, 94]. Biyoaktif peptitlerin insan sağlığında ve beslenmesindeki önemi sürekli vurgulanmıştır [33]. Picariello ve ark. (2010) GIS tarafından üretilen kazein ve whey biyoaktif peptitlerinin fizyolojik önemlerini ve süt allerjisi sebebi olduğunu belirtmişlerdir [95].

Kazeinler insanda gastrointestinal sistem üzerinden degrade edilerek parçalanmaktadır. Bu sindirim koşulları in vitro şartlarda çeşitli proteolitik enzimlerin aktivitesi ile araştırmacılar tarafından sağlanmıştır. Edmund ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada iyi tanımlanmış *Lactococcus lactis* mutantlarını kullanarak saflaştırılmış ve β -kazeinin

kullanımını araştırmışlardır. Ekstraselüler proteazın oluşturduğu peptitleri sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC/MS) ile tanımlamışlardır. Beş aminoasit rezidüsünden daha küçük peptitler proteinazın geniş özgüllüğüne rağmen in vivo' da şekillenmemiştir [96].

Beta-kazomorfin-7 tayininde, sütün in vitro enzimatik sindirim sonucu açığa çıkan peptitleri göstermek amacıyla spektral karşılaştırma, second order derivative spectroscopy ve HPLC yöntemleri kullanılmıştır [87]. Bir çalışmada, beta-kazomorfin-7'nin bağırsak goblet hücreleri doğrudan aktive edebilir hipotezini, kantitatif ve semikantitatif RT-PCR ve ELİSA yöntemi ile sıçan bağırsak müsin üreten hücreleri in vitro araştırılmıştır. Sonuç olarak, BKM-7 bağırsak goblet hücreleri opioid reseptörleri üzerindeki etkisi müsin üretimini önemli ölçüde arttırdığı ortaya çıkmıştır. Bundan önce, opioid peptitlerin tayini için opioid reseptörlerine bağlanma çalışmaları, izole organ preparatları veya immunoreaktif materyaller kullanılmaktaydı [88].

Yoğurt ve peynirde de bu konuda çalışmalar yapılmaktadır. Juan-Garcia ve arkadaşları, 2009 yılında süt ürünlerinden beta-kazomorfinlerin tespiti için nanoelektrosprey ile birlikte ion-trap-mass spektrometresi metodunu geliştirerek, kazomorfinlerin süt ve süt ürünlerinden direkt ölçümü sağlamaya çalışmışlardır [89].

β -kazeinler bağırsakta, dipeptidil dipeptidaz-4'ün (DP-4) etkisiyle intestinal zarın mukozal bölgesinde β -kazomorfinlere ayrılarak emilmektedirler. Daha büyük peptitlerden X-Pro (N-terminal) dipeptitlerini kesmek DP-4'ün görevidir. β -kazomorfinler, Tyr-Pro grubunun enzimatik sindirimi ile serbest bırakılır. Bu yüzden β -kazomorfin peptitleri opioid reseptörlere varmadan ve muhtemelen intestinal zardan geçerken zarar vermektedirler [10].

Zong ve ark.(2007) sıçanların Mide ve somatostatin mukozasında gastrin mesajcı RNA düzenlenmesi üzerinde β -kazomorfin-7 in vivo etkisini araştırdı. İn situ hibridizasyon çalışmalarında elde edilen veriler, β -kazomorfin -7 somatostatin parakrin hareket ve iç moleküler işlevler vasıtasıyla dolaylı olarak gastrin gen ekspresyonu etkilediğini göstermektedir. Ayrıca, normal mide işlevinde düzenleyici peptidleri ve nörotransmitterlerin gastrin mRNA ve somatostatin mRNA ile ilişkilidir. Çalışmalar endojen opioid peptidlerin gastrik asit sekresyonunun stimülasyonu katkı yaptığını

göstermiştir. Somatostatin postprandiyal serbest in vivo ve in vitro olarak endojen opioid peptidler tarafından düzenlenmiş olduğunu kanıtlayan başka çalışmalar vardır [97].

Macaud ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada mide proteinazı ile müdahaleden sonra besin proteini olan kazeinden izole edilebilen yeni kazomorfin-benzeri peptiti göstermişlerdir. Standart olarak sentetik standartları kullanmışlardır. İnek sütü kazein peptit hidrolizatından kazomorfin ve kazomorfin-benzeri peptitin tespiti için hızlı bir metot uygulamışlardır. β -kazomorfin 1-3 ve α 90-94 kazomorfin-benzeri peptit ters-faz HPLC ile tespit etmişlerdir. Bu tekniğin kompleks hidrolizatlardan aromatik aminoasitleri içeren biyoaktif peptitlerin tanımlanması ve saflaştırılmasını basitleştirdiğini göstermişlerdir [89].

Jarmolowska ve ark. (2007) yeni doğmuş bebekler için üretilen ticari bir bebek maması agonistik dört opioid peptide karşı test edilmiş ve β -kazomorfinlerin olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada izole tavşan bağırsağı motor aktivite üzerindeki etkileri incelenerek HPLC de belirlendi. Sonuç olarak, bu formüllerin opioid aktivite çeşitliliği ek bir göstergesi olabileceği öne sürülmüştür [69].

Jarmolowska ve ark. (1999), opioid aktiviteyi ticari Brie, Kaszkawal, Kamp ve Tilsit peynirleri kullanarak test etmişlerdir. Bu peynirlerin peptid özlerinin, izole tavşan bağırsağın da artan kasılmalara sebep olduğu ve yoğun opioid aktivitesini görüntülenmiştir. Opioid aktivitesini izole tavşan bağırsak motor aktivitesi üzerinde morfin ve peynir özüne karşı eylemleri karşılaştırılarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda, yazarlar hem morfin hem de peyniri peptit özünün opioid reseptörleri ile etkileşimi ve bağırsak kasılmaları ile genliğinin arttığını göstermişlerdir [98].

Sindirim ve bakteriyel enzimleri ile hidrolize edildikten sonra sütte oluşan opioid peptidlerin diğer süt ürünlerinde de oluşabileceği düşünülmektedir. Ekstra keskin Cheddar, İsviçre, Blue, Brie ve Limburger peynirlerinin analizleri Muehlenkamp ve Warthesen (1995) tarafından sunulmuştur. Bu yazarlar tarafından çalışmalarda, BKM-7 peynirlerde saptanamamıştır. Fakat nihai sonuç olarak yazarlar, daha hassas algılama yöntemleri ile peynirde muhtemel BKM-7 varlığının gösterilebileceği ön görmüşlerdir [10].

Senocq ve ark. (2002) yılında Comte peynirinin çeşitli starter kültürleri ile olgunlaştırma süreci sırasında, β -kazeinin ile sindirimi ile açığa çıkan peptit fragmentlarını indirek ELİSA metodu ile araştırmışlardır ve farklı fragmentları % içerik olarak sunmuşlardır [94].

Sienkiewicz-Szlapka ve ark. (2009), Brie, Rokpol, Edamski, Gouda ve Kasztelan çeşitli peynir ekstraktlarında BKM-5 ve BKM-7 miktar tayinini yarışmalı ELİSA testi ile gerçekleştirmişlerdir. Peynir ekstraktlarından saflaştırdıkları BKM-7'nin miktarını peynir çeşitlerine göre Brie için 648 ± 79 , Rokpol için 166 ± 20 , Edamski için 100 ± 12 , Gouda için 6 ± 1 ve Kasztelan için $4 \pm 0.3 \mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (w/w) olarak bulmuşlardır. ELİSA testi hassasiyetini, BKM-7 için $13 \pm 2 \text{ pg/ml}$ olarak vermişlerdir [81].

De Noni ve ark. (2010) çeşitli peynir ekstraktlarından elde ettikleri suda çözünebilir peptit ekstraktlarının HPLC-MS/MS analizleri ile BKM-7 miktarlarını Brie'de 0.15 ± 0.02 , Fontina'da 0.04 ± 0.01 , Gouda'da 0.1 ± 0.02 , Gorgonzola'da 0.01 ve Cheddar'da $0.11 \pm 0.02 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (w/w) olarak bulmuşlardır [43].

Çalışmamızda geliştirilen ELİSA testi, yukarıda verilen çalışmalara göre ekstraksiyona gerek kalmaksızın direk rennetlerden yani örneğin kendinden çalışılması sebebiyle avantajlı konumdadır. Testimizin doğrusallık aralığı $6.25-100 \text{ ng/ml}$, $R^2=0,991$ ve hassasiyeti $23 \pm 5.3 \text{ ng/ml}$ olarak bulunmuştur.

McLachian'ın 2001 yılında yaptığı çalışmaya göre günlük 2-4 mg İskemik kalp hastalıklarına ve diğer β -kazein A1 tüketimine bağlı hastalıkların risk faktörlerinde önemli bir artış gözlenmektedir. 0.5 - 1.5 mg β -kazein A1 tüketen toplumlarda risk faktörlerinde önemli artış gözlenmemiştir [27, 28].

Woodford'a (2009) göre teorik olarak bir bardak sütte 2-3 gr A1 beta-casein bulunmaktadır ve GIS sindirimi ile bu miktar kazeinden 66 to 100 mg BKM-7 salınmaktadır. Emilim oranı kişiye göre değişmekle beraber, bu miktarın μg düzeyinde emilime tabii tutulduğu varsayılabilir. Bu sonuçtan yola çıkarak, çalışmada geliştirilen ng hassasiyet düzeyine sahip olan ELİSA testimizin, BKM-7 için ölçümü için geçerli olan LD_{50} miktarını tesbit etmede yeterli olduğu görülmektedir [30].

Kost ve ark. (2009), insan ve inek sütüyle beslenen infantların plazmalarındaki insan ve inek BKM-7 miktarlarını, fizikomotor gelişim açısından, HPLC ve ELİSA ile tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, inek sütü ile beslenen ve serum BKM-7 miktarları yüksek çıkan infantların fizikomotor davranışlarının, anne sütü ile beslenenlere göre oldukça geri kaldığını göstermişlerdir [79].

4.2. Sonuç ve Öneriler

İnsan sağlığı üzerine süre gelen etkileri uzun yıllardır araştırılan ve bu sayede sürekli önemini koruyan β -kazomorfın-7 (BKM-7)'nin süt ve süt ürünlerindeki tayin ve miktar tespiti zaman içinde süt kalitesi parametreleri ölçümleri arasına katılmıştır [82]. BKM-7'nin A1 tip süt biyobelirteci olarak analitik yönden günlük hayata uygulanabilirliği kuvvetli ve özgüdür.

Yurtiçi literatürdeki çalışmaları incelendiğinde şimdiye kadar hiçbir çalışmada süt ve süt ürünlerindeki BKM-7'nin miktar analizi verilmediği görülmektedir. Bu çalışma, bu açıdan Türkiye'deki piyasa peynirlerindeki olası BKM-7 ihtivasını gösteren yegâne çalışma niteliğindedir.

Yaptığımız bu çalışma ile pek çok hastalığın etmeni olan ve sağlık açısından her yönden önem ihtiva eden biyoaktif bir peptit olan BKM-7'nin tayininde kullanılan mevcut ELİSA yöntemlerinin aksine BKM-7 nin insan metabolizması ve ekstraksiyon yöntemleri dâhil edilmeden peynirdeki BKM-7 varlığı ve miktar tespiti mümkün kılınmıştır. Buna bağlı olarak A1 tip sütün tespitine olanak sağlayan, Türkiye' deki bu konu ile ilgili taramayı ve tayin metodunu gerçekleştiren özel bir çalışma niteliği taşımaktadır. Ülke içindeki farklı sitelerde çalışmalarımız referans olarak gösterilmektedir. Referans linkleri:

<http://www.ciftliginizden.com/neden-keci-sutu>

<http://www.biorezonanstedavisi.com/Linkler>

<http://www.biorezonanstedavisi.com/inek-sutu-ile-ilgili-gercekler>

Süt ve süt ürünlerinde A1 β -kazein ve opioid aktif peptitlerin söz konusu edildiği çalışmalar için farklı patentler alınmıştır. Bunlar, United States Patent: US 2003/0153549, Ağustos 2003; International Patent Classification: A61K 38/17, Nisan

2004; United States Patent: 6.808.938, Ekim, 2004; United States Patent: 6.821.514, Kasım, 2004; United States Patent: US 2007/0031399, Şubat 2007.

Geliştirdiğimiz BKM-7 peptit miktarı tayini metotları için ileri iyileştirme ile patent başvurusu yapılması planlanmaktadır. Bu çalışma, söz konusu alanda gerçekleştirilen inovatif ve ihtiyaca yönelik bir çalışmadır.

KAYNAKLAR

1. Metin, M., 2010. **Sütün bileşimi ve İşlenmesi**. 9. Baskı. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, 793s.
2. Çakmakçı, S. 2008. **Peynirde olgunlaşma**, pp. 761-762. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs, 2008, Erzurum.
3. Çelik, Ş., Uysal, Ş., 2009. Beyaz peynirin bileşim, kalite, mikroflora ve olgunlaşması. **Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, **40** (1): 141-151
4. Üçüncü, M., 2005. **Süt ve Mamulleri Teknolojisi**. Meta Basım Matbaacılık, Bornova, İzmir, 571s.
5. Tailford, A. K., Berry, C. L., Thomas, A. C., Campbell, J. H., 2003. A casein variant in cow's milk is atherogenic. **Atherosclerosis**, **170** (1): 13-19.
6. Gaiaschi, A., Beretta, B., Poiesi, C., Conti, A., Giuffrida, M.G., Galli, C.L., Restani, P., 2000. Proteolysis of α - casein as a marker of grana padanocheese ripening. **Journal of Dairy Science**, **83** (1): 2733-2739.
7. Yardibi, H., 2008. Ruminantlarda süt proteinleri ve polimorfizmi. **İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, **34** (3): 29-35.
8. Çetin, B., Avşar, A., Ulusoy, A. T., 2011. Kazein içerikli besinler ve dental ürünler. **Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi**, **1** (1): 24-31.
9. Veloso, C. A., Teixeira, N., 2002. Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis detection of milk adulterations. **Journal of Chromatography A**, **967** (1): 209-218.
10. Wedholm, A., Muller, H. S., Stensballe, A., Lindmark-Mansson, H., Karlsson, A. H., Andersson, R., Andren, A., Larsen, L. B., 2008. Effect of minor milk proteins in chymosin separated whey and casein fractions on cheese yield as determined by proteomics and multivariate data analysis. **Journal of Dairy Science**, **91** (1):3787–3797.
11. Scientific Report of EFSA Prepared by a DATEX, 2009. Working group on the potential health impact of beta-casomorphins and related peptides, **EFSA Scientific Report**, **231** (1): 1-107.
12. Üçüncü, M., 2004. **A' dan Z' ye Peynir Teknolojisi** I. Cilt. Meta Basım Matbaacılık Bornova İzmir, 545 s.

13. Kınık, Ö., Gürsoy, O., 2002. Süt Proteinleri Kaynaklı Biyoaktif Peptitler. **Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi**, **8** (2): 195-203.
14. De Noni I., 2008. Release of β -casomorphins-5 and -7 during simulated gastrointestinal digestion of bovine β -casein variants and milk-based infant formulas. **Food Chemistry**, **110** (4):897-903.
15. Silva, V. S., Malcata X. F., 2005. Caseins as source of bioactive peptides. **International Dairy Journal**, **1** (15):1-15.
16. Sun, Z., Zhang, Z., Wang, X., Cade, R., Elmer, Z., Fregly, M., 2003. Relation of beta-casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome. **Peptides**, **4** (1): 937-943.
17. Wasilewska, J., Sienkiewicz-Szlapka, E., Kuzbida, E., Jarmolowska, B., Kaczmarek, M., Kostyra, E., 2011. The exogenous opioid peptides and DPPIV serum activity in infants with apnoea expressed as apparent life threatening events (ALTE). **Neuropeptides**, **45** (1): 189-195.
18. Yeargin-Allsopp, M., Rice, C., Karapurkar, T., Doernberg, N., Boyle, C., Murphy, C., 2003. Prevalence of autism in a US metropolitan area, **JAMA**, **289** (1): 49-55.
19. Woodford, K., 2004. A2 milk. Woodford editorial in BioScience News and Advocate.
20. Ünal, R. N., Besler, H. T., 2006. Beslenmede sütün önemi. Hacettepe Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü. Ankara.
21. Anonim, 2002. İstanbul Ticaret Odası, **Dünya ve Türkiye’de Süt ve Süt Ürünleri Sanayinde Gelişmeler**, Yayın No: 2002-7.
22. Milli Eğitim Bakanlığı, 2011. **Süt ve ürünleri 850CK0020 Çevre Sağlığı**. Ankara.
23. Toelstede, S., Hofmann, T., 2008. Sensomics mapping and identification of the key bitter metabolites in Gouda cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **56** (1): 2795-2804.
24. Küçüköner, E., 2011. **Peynir ve yoğurt oluşum mekanizması**, pp. 26-33. 1. Ulusal Helal ve Sağlık Gıda Kongresi, 19 - 20 Kasım 2011, Vakıflar Genel Müdürlüğü Kongre Salonu, Kızılay/Ankara, 203s.
25. Ng-Kwai-Hang, K. F., Grosclaude F., 2002. Genetic polymorphism of milk proteins. **Advanced Dairy Chemistry Proteins, Parts A&B**. New York: **Kluwer Academic/Plenum Publishers**, **1** (1): 739-816.

26. Farrell, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., et al., 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. **Journal of Dairy Science**, **87** (1):1641-1674.
27. Yin, H., Miao, J., Zhang, Y., 2010. Protective effect of β -casomorphin-7 on type 1 diabetes rats induced with streptozotocin. **Peptides**, **31** (9): 1725–1729.
28. Mclachlan, C. N. S., 2001. β -casein A1 ischaemic heart disease mortality and other illnesses. **Medical Hypotheses**, **56** (2): 262-272.
29. Mishra, B. P., Mukesh, M., Prakash, B., Sodhi, M., Kapila, R., Kishore, A., et al., 2009. Status of milk protein, β -casein variants among Indian milch animals. **Indian Journal of Animal Sciences**, **79** (7): 722-5.
30. Woodford, K., 2009. Devil in the milk: illness, health, and politics of A1 and A2 milk. Chelsea Green Publishing Company, USA.
31. Dinneen, D., 2010. The chemical structure/peptide sequence of Bovine β -Casomorphin 7, with labeled amino acids. (Web page: <http://en.wikipedia.org/wiki/Casomorphin>), (Date accessed: April 2013)
32. Durlu-Özkaya, F., 2001. Salamura Beyaz peynirlerden izole edilen bazı laktokokenterokok ve laktobasil suşlarının proteolitik aktivite, bakteriyosin etkenliği ve biyojen amin oluşumu açısından karşılaştırılması. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, 63 s.
33. Gobbetti, M., Stepaniak, L., Angelis, M., Corsetti, A., Cagno, R., 2002. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. **Food Science and Nutrition**, **42** (2): 223-239.
34. Anonim, 2006. Türk Standartları Enstitüsü (TSE), TS 591 Beyaz Peynir. Ankara.
35. Tekinşen, O. C., Atasever, M., Keleş, A., Tekinşen K. K., 2002. Süt, Yoğurt, Tereyağı, Peynir Üretim ve Kontrol. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 130s.
36. Tekinşen, K. K., Elmalı, M., 2006. Taze civil (çeçil) peynirin bazı mikrobiyolojik özellikleri. **Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi**, **1** (3-4): 78-81.
37. Tekinşen, O. C., Tekinşen, K. K., 2005. **Süt Ve Süt Ürünleri**: Temel Bilgiler, Teknoloji, Kalite Kontrolü. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 364 s.
38. Tetra Pak. Dairy Processing Handbook. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund, Sweden.

39. Nizamlioğlu, M., Keleş, A., Atasever, M., Kayırdı, S., Gürbüz, Ü., 1998. Beyaz Peynir Üretiminde Pastörizasyon Sıcaklığının Kalite Üzerine Etkisi. **Veteriner Bilimleri Dergisi**, **1** (1): 92-130.
40. Üçüncü, M., 2004. A' dan Z' ye Peynir Teknolojisi II. Cilt. Meta Basım Matbaacılık, Bornova İzmir, 545-1235 s.
41. Christensen, J. E., Broadbent, J. R., Steele J. L., 2003. Hydrolysis of casein-derived peptides α S1-casein(f1-9) and β -casein(f193-209) by lactobacillus helveticus peptidase deletion mutants indicates the presence of a previously undetected endopeptidase. **Applied And Environmental Microbiology**, **69** (2): 1283–1286.
42. Korhonen, H., 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, **1** (2): 177–187.
43. De Noni, I., Cattaneo, S., 2010. Occurrence of beta-casomorphins 5 and 7 in commercial dairy products and in their digests following in-vitro simulated gastro-intestinal digestion. **Food Chemistry**, **119** (1): 560–566.
44. Meltretter, J., Schmidt, A., Humeny, A., Becker, C., Pischetsrieder, M., 2008. Analysis of the peptide profile of milk and its changes during thermal treatment and storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **56** (1): 2899–2906.
45. Küçüköner, E., 2011. Peynir tozu ve peynir altı suyu tozu üretimi, pp. 80-85, 1. **Ulusal Helal ve Sağlık Gıda Kongresi**, 19-20 Kasım 2011, Vakıflar Genel Müdürlüğü Kongre Salonu, Kızılay/Ankara, 203s.
46. Özcan, T., Delikanlı, B., 2011. Gıdaların tekstürel özelliklerinin geliştirilmesinde peyniraltı suyu protein katkılarının fonksiyonel etkileri. **Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, **25** (2):77-88.
47. Stuknyte, M., De Noni, I., Guglielmetti, S., Minuzzo, M., Mora, D., 2011. Potential immunomodulatory activity of bovine casein hydrolysates produced after digestion with proteinases of lactic acid bacteria, **International Dairy Journal**, **21** (10): 763-769.
48. Korhonen, H., Pihlanto, A., 2006. Bioactive peptides: production and functionality. **International Dairy Journal**, **16** (1): 945–960.
49. Roncada P, Piras C, Soggiu A, Turk R, Urbani A, Bonizzi L., 2012. Farm animal milk proteomics. **Journal of Proteomics**, **75** (14): 4259-74.

50. Kurek, M., Przybilla, B., Hermann, K., Ring, J., 1992. A naturally occurring opioid peptide from cow's milk beta-casomorphine-7 is a direct histamine releaser in man. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, **97** (2): 115-120.
51. Foss-Freitas, M. C., Foss, N. T., Donadi, E. A., Foss, M. C., 2008. Effect of the glycemic control on intracellular cytokine production from peripheral blood mononuclear cells of type 1 and type 2 diabetic patients. **Diabetes Research and Clinical Practice**, **82** (1): 329-334.
52. Mills, S., Ross, R. P., Hill, C., Fitzgerald, G. F., Stanton, C., 2011. Milk intelligence: mining milk for bioactive substances associated with human health. **Review Article International Dairy Journal**, **21** (1): 377-401.
53. Mills, S., Stanton, C., Hill, C., Ross, R. P., 2011. New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. **Annual Review of Food Science Technology**, **2** (1): 299-329.
54. Dogan, Y., Akarsu, S., Ustundag, B., Yilmaz, E., Gurgoze, M. K., 2006. Serum IL-1 β , IL-2, and IL-6 in insulin-dependent diabetic children. **Mediators of Inflammation**, **2006** (1): 59206.
55. Sharma, S., Singh, R., Rana, S., 2011. Bioactive peptides. **International Journal of Bioautomation**, **15** (4):223-250.
56. Eriksen, E. K., Vegarud, G. E., Langsrud, T., Almaas, H., Lea, T., 2008. Effect of milk proteins and their hydrolysates on in vitro immune responses. **Small Ruminant Research**. **79** (1):29–37.
57. Pepe, G., Tenore, G. C., Mastrocinque, R., Stusio, P., Campiglia, P., 2013. Potential anticarcinogenic peptides from bovine milk hindawi publishing corporation. **Journal of Amino Acids**, **2013** (1): 939804, 7 p.
58. Yin, H., Miao, J., Ma, C., Sun, G., Zhang, Y., 2012. β -Casomorphin-7 cause decreasing in oxidative stress and inhibiting NF- κ B-iNOS-NO signal pathway in pancreas of diabetes rats. **Journal of Food Science**, **77** (2): 278–282.
59. Park, Y. W., Juarez, M., Ramos, M., Haenlein, G. F.W., 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, **68** (1-2): 88-113.

60. Potocnik, K., Gantner, V., Kuterovac, K., Cividini, A., 2011. Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species. **Mljekarstvo**, **61** (2): 107-113.
61. Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., Chilliard, Y., 2008. Composition of goat and sheep milk products. **Small Ruminant Research** **79** (1): 57-72.
62. Ceballos, L. S., Morales, E. R., Adarve, G. T., Castro, J. D., Martinez, L. P., Sampelayo, M. R. S., 2009. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. **Journal of Food Composition and Analysis**, **22** (1): 322–329.
63. Tholstrup, T., 2006. Dairy products and cardiovascular disease. **Current Opinion in Lipidology**. **17** (1): 1-10
64. The Great Plains Laboratory, Inc., Gluten/Casein Peptides Test Brochure
65. Dettmer, K., Hanna, D., Whetstone, P., Hansen, R., Hammock, B. D., 2007. Autism and urinary exogenous neuropeptides: development of an on-line SPE–HPLC–tandem mass spectrometry method to test the opioid excess theory. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, **388** (1): 1643–1651.
66. Reichelt, W. H., Stensrud, M. B., Reichelt, K. L., 1998. Peptide excretion in Celiac disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, **26** (1): 305–309.
67. Whiteley, P., Shattock, K., Carr, P., Hooper, M., Todd, L., 2010. How could a gluten- and casein-free diet ameliorate symptoms associated with autism spectrum conditions? **Journal of Autism Insights**, **2** (1): 39–53.
68. Jarmolowska, B., et al., 2007. Opioid activity of humana formula for newborns. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **87** (1): 2247-2250.
69. Tveiten D., Reichelt K., 2012. Exorphins in urine from schizoaffective psychotics, **Open Journal of Psychiatry**, **2** (1): 220-227.
70. Reichelt, K. L., Michael L., Gardner, G., 2012. Genetic and dietary factors related to schizophrenia. **Open Journal of Psychiatry**, **2** (1): 12-20
71. Liu, Y., Heiberg, T., Reichelt, K. L., 2007. Towards a possible aetiology for depressions? **Behavioral and Brain Functions**, **3** (1): 47., 7 p.

72. Demirkaya, F., 2003. Karbemazepinin UV-Visible spektrofotometri ve HPLC yöntemleriyle miktar analizi. Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, 110 s.
73. Tekinşen, K. K., Elmalı, M., 2006. Taze civil peynirin bazı mikrobiyolojik özellikleri. **Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi**, **1** (3-4): 78-81.
74. Erdik, E., 2007. Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler. Gazi Kitabevi, 530 s.
75. Bidasolo, I., B., Ramos, M., Gomez-Ruiz, J., A., 2012. In vitro simulated gastrointestinal digestion of donkeys' milk. Peptide characterization by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **International Dairy Journal**, **24** (1): 146-152.
76. Mamonea, G., Picariello, G., Cairaa, S., Addeob, F., Ferranti. P., 2009. Analysis of food proteins and peptides by mass spectrometry-based techniques. **Journal of Chromatography A**, **1216** (1): 7130–7142.
77. Franc, M., Krížek, T., Coufal, P., Stulík, K., 2010. Differentiation among various kinds of cheese by identification of casein using HPLC-chip/MS/MS. **Journal of Separation Science**, **33** (16): 2515-9.
78. Wang, Z., Wang, W., Xu, L., Chen, G., Fu, F., 2010. Separation and determination of b-casomorphins by using glass microfluidic chip electrophoresis together with laser induced fluorescence detection, **Journal of Separation Science**, **34** (1): 196–201.
79. Kost, N., Sokolov, O., Kurasova, O., Dmitriev, A., Tarakanova, J., Gabaeva, M., Zolotarev, Y., Dadayan, A., Grachev, S., Korneeva, E., Mikheeva, I., Zozulya, A., 2009. Beta-casomorphins-7 in infants on different type of feeding and different levels of psychomotor development. **Peptides**, **30** (10): 1854-60.
80. Dettmer, K., Hanna, D., Whetstone, P., Hansen, R., Hammock, B. D., 2007. Autism and urinary exogenous neuropeptides: development of an on-line SPE–HPLC–tandem mass spectrometry method to test the opioid excess theory. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, **388** (1): 1643–1651.
81. Sienkiewicz-Szlapkaa, E., Jarmołowskaa, B., Krawczuka, S., Kostyraa, E., Kostyrab, H., Iwan, M., 2009. Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. **International Dairy Journal**, **19** (4): 258–263.

82. Babacan, F., Topçu, A., Söyletir, G., Doğanay, M., 1996. İnfeksiyon Hastalıklarının immüno serolojisi, İnfeksiyon Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 235 s.
83. Carter. J. M., 1996. Conjugation of peptides to carrier proteins via glutaraldehyde, pp 679-687. *In: The Protein Protocols Handbook* (Ed. Walker J. M.). Humana Press, New Jersey.
84. Reichlin, M., 1980. Use of glutaraldehyde as a coupling agent for proteins and peptides. **Methods in Enzymology**, **70** (1): 159-165.
85. Abbas, K., Lichtman, A., Pober, J., 2011. Quantitation of Antigen. *In: Cellular and Molecular Immunology*, 2nd Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 560 p.
86. Peninsula Laboratories, LLC A Member of the Bachem Group, Peptide Enzyme Immunoassay (EIA) Protocols.
87. Macaud, C., Zhao, Q., Ricart, G., Piot, J. M., 1999. Rapid detection of a casomorphin and new casomorphin-like peptide from a peptic casein hydrolysate by spectral comparison and second order derivative spectroscopy during HPLC analysis. **Journal of Liquid Chromatography**, **22** (3):401-418.
88. Zoghbi, S., Et all., 2006. Beta-Casomorphin-7 regulates the secretion and expression of gastrointestinal mucins through a -opioid pathway, **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, **290**:1105–G1113.
89. Juan-Garcia, A., Font, G., Juan, C., Pico, Y., 2009. Nanoelectrospray with ion-trap mass spectrometry for the determination of beta-casomorphins in derived milk products. **Talanta** **80** (1): 294- 306.
90. Pinto, G., Caira, S., Cuollo, M., Lilla, S., Chianese, L., Addeo, F., 2012. Bioactive casein phosphopeptides. dairy products as nutraceuticals for functional foods. pp. 3-44. *In: Milk Protein* (Ed. Hurley, W. L.). In Tech Published, Croatia.
91. Kaminski, S., Cieslinska, A., Kostyra, E. J., 2007. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. **Journal of Applied Genetics**, **48** (3): 189-98.
92. Caroli, A. M., Chessa, S., Erhardt, G. J., 2009. Milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition. **Journal of Dairy Science**, **92** (1): 5335-5352.

93. Dinç, H., 2009. Genotyping of beta-kazein, kappa-kazein and beta-laktoglobulin genes in turkish native cattle breeds and efforts to delineate BCM-7 on human PBMC. METU Graduate School of Natural and Applied Sciences, PhD Thesis, Ankara, 208 p.
94. Senocq, D., Dupont, D., Rolet-Répécaud, O., Levieux, D., 2002. ELISA for monitoring the cleavage of β -casein at site Lys28–Lys29 by plasmin during Comte cheese ripening. **Journal of Dairy Research**, **69** (3): 491-500.
95. Picariello, G., Ferranti, P., Fierro, O., Mamone, G., Caira, S., Di Luccia, A., Monica, S., Addeo, F., 2010. Peptides surviving the simulated gastrointestinal digestion of milk proteins: biological and toxicological implications. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, **878** (3-4): 295-308.
96. Edmund, R. S., Gang Fang, C., Jeronimus-Stratingh, M., Andries, P., Poolman, B., Konings, W. N., 1998. Reconstruction of the proteolytic pathway for utilization of β -casein by *Lactococcus lactis*. **Molecular Microbiology**, **27** (1): 1107-1111.
97. Zong, Y., Chen, W., Zhang, Y., Zou, S., 2007. Effects of intra-gastric beta-casomorphin-7 on somatostatin and gastrin gene expression in rat gastric mucosa. **World Journal of Gastroenterology**, **13** (14): 2094-2099.
98. Jarmolowska, B., Kostyra E., Krawczuk, S., Kostyra., H. 1999. β -Casomorphin-isolated from brie cheese. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **79** (1): 1788-1792.
99. Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh, T., 2000. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in gouda cheese. **Journal of Dairy Science**, **83** (7): 1434–1440.
100. Rizzello, C G, Losito, I., Gobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M D., 2005. Zambonin PG: antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. **Journal of Dairy Science**, **88** (1): 2348-2360.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Ömer ERGİN

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 4 Şubat 1987, Trabzon

Medeni Durumu: Bekâr

Tel: 538 862 68 07

email: omererginbio@gmail.com

Yazışma Adresi: 3 nolu Erdoğan mah. Özge sok. Hanem Sit. H blok Dış kapı no: 1 İç kapı no: 19

Kuruçeşme/Trabzon

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü - Biyoloji	2013
Lisans	Erciyes Üniversitesi / Fen Fakültesi - Biyoloji	2010
Lise	Trabzon Lisesi	2004

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2011-2012.	Mobetu Teknoloji Yazılım Bilişim Ar-Ge Reklam Sanayi Ticaret Ltd. Şti.	Proje Araştırmacısı

YAYINLAR

1. Dilek KAAN, Ömer ERGİN, Ebru SAATÇİ. 2010. Microspectrophotometric Detection Of Serum L-Carnitine and Glutathione S-Transferase Activities on Breast Cancer Patients Whom Got Combined Drug Teraphy. Turkish Journal of Biochemistry, 35:104.

KATILDIĞI KONFERANSLAR:

1. Ulusal Genetik ve Biyoteknoloji Çalıştayı, 12-13 Şubat 2010 –Kayseri, Türkiye.
2. Dilek KAAN, Ömer ERGİN, Ebru SAATÇİ. 2010. Microspectrophotometric Detection Of Serum L-Carnitine and Glutathione S-Transferase Activities on Breast Cancer Patients Whom Got Combined Drug Teraphy. 22. Ulusal Biyokimya Kongresi, Bildiri, 27-30 Ekim, Eskişehir.
3. Dilek KAAN, Ömer ERGİN, Ebru SAATÇİ. Determination of Sera Glutathione S-transferase Isozymes from Docetaxel/Adriamycin Treated Breast Cancer Patients. International Conference on Enzyme Science and Technology, ICEST 2011, Poster, 31 October-4 November 2011, Kuşadası, Turkey.
4. T. C. ERCİYES ÜNİVERSİTY 1st International Conference on Stem Cell Research And Applications; Has Organized & Has Attended

GÖREV ALDIĞI PROJELER :

1. Meme kanseri tedavisinde uygulanan Docetaxel/Adriamicin kemoterapisinin metabolik proteinlerin aktivite ve düzeyleri üzerine etkisinin mikro-spektroskopi ve HPLC yöntemleriyle incelenmesi, Erciyes Üniversitesi, Araştırma Projesi, FBA-09-894, 2009-2012.
2. Beta-Kazomorfın-7 Amperometrik İmmünoşensörü Yapımı, Kosgeb Ar-GE İnovasyon Programı Projesi, Proje çalışanı, 2011-2012.
3. A1 Tip İnek Sütü ve Süt Ürünlerinde Beta-Kazomorfın-7 peptidi için ELİSA'ya Dayalı Tayin Yöntemi Geliştirilmesi, Erciyes Üniversitesi, Araştırma Projesi, FBY-11-3726, 2011-2012

SERTİFİKALARI:

1. Araştırmacılar İçin Deney Hayvanları Kullanım Ve Uygulama Sertifikası

YABANCI DİL

İngilizce