

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÜRETİM PARAMETRELERİNİN KEFİRİN FİZİKOKİMYASAL,  
MİKROBİYOLOJİK VE DUYUSAL ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ İLE  
ÜRETİLEN KEFİRLERİN PEPTİD PROFİLİNİN BELİRLENMESİ**

**Ayşe AŞCI ARSLAN**

**DOKTORA TEZİ**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**2015**

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÜRETİM PARAMETRELERİNİN KEFİRİN FİZİKOKİMYASAL,  
MİKROBİYOLOJİK VE DUYUSAL ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ İLE  
ÜRETİLEN KEFİRLERİN PEPTİD PROFİLİNİN BELİRLENMESİ**

**Ayşe AŞCI ARSLAN**

**DOKTORA TEZİ**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez 2012.03.0121.007 proje numarasıyla Akdeniz Üniversitesi Bilimsel  
Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından ve 110 O 797 numaralı  
TÜBİTAK projesi kapsamında desteklenmiştir.**

**2015**

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÜRETİM PARAMETRELERİNİN KEFİRİN FİZİKOKİMYASAL,  
MİKROBİYOLOJİK VE DUYUSAL ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ İLE  
ÜRETİLEN KEFİRLERİN PEPTİD PROFİLİNİN BELİRLENMESİ

Ayşe AŞCI ARSLAN

DOKTORA TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 05.07.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oycokluğu ile kabul edilmiştir.

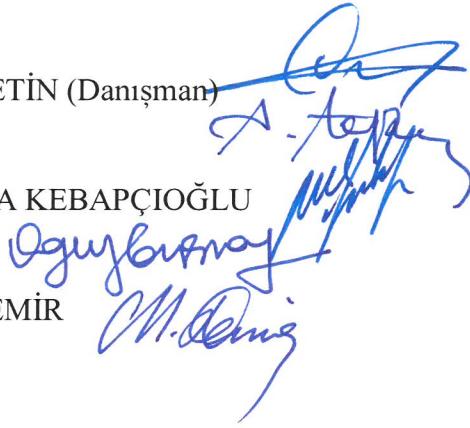
Doç. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN (Danışman)

Prof. Dr. Ayhan TOPUZ

Doç. Dr. Pınar YERLİKAYA KEBAPÇIOĞLU

Doç. Dr. Oğuz GÜRSOY

Yrd. Doç. Dr. Muammer DEMİR



## ÖZET

### ÜRETİM PARAMETRELERİNİN KEFİRİN FİZİKOKİMYASAL, MİKROBİYOLOJİK VE DUYUSAL ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ İLE ÜRETİLEN KEFİRLERİN PEPTİD PROFİLİNİN BELİRLENMESİ

Ayşe AŞCI ARSLAN

**Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**  
**Danışman: Doç. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN**  
**Şubat 2015, 210 Sayfa**

Bu çalışmada, üretim sırasında farklı ısıl işlem normları (90°C’de 5 dakika ve 90°C’de 10 dakika), starter kültür çeşitleri (kefir danesi ve ticari kefir starter kültürü), inkübasyon sıcaklıkları (20°C ve 25°C) ile inkübasyon sonlandırma pH’ları (pH 4.4 ve pH 4.8) uygulanarak kefir üretilmiş ve üretilen kefir örneklerinin üretim sonrası ve 4±1°C’de 30 günlük depolama sırasında fizikokimyasal, mikrobiyolojik ve duyusal özellikleri belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada, farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerinin peptid ve biyoaktif peptid profili ortaya konulmaya çalışılmış ve kefir üretim parametrelerinin kefir örneklerinin söz konusu peptid profilleri üzerine etkisi araştırılmıştır.

Üretimde kullanılan ısıl işlem normunun kefir örneklerinin kurumadde, kül, pH, titrasyon asitliği, sertlik, yapışkanlık ve serum ayrılması değerleri üzerine önemli bir etkisinin olmadığı; ancak kefir örneklerinin proteolitik aktivite değerleri üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Kefir danesi ve ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinin kurumadde ve kül değerleri arasında önemli farklılık olmadığı; buna karşın starter kültür çeşidinin pH, titrasyon asitliği, proteolitik aktivite, sertlik, yapışkanlık ve serum ayrılması değerleri üzerine değişen düzeylerde etkisinin olduğu saptanmıştır. Ayrıca üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklıklarının kefir örneklerinin kül ve pH değerleri üzerinde önemli bir farklılık oluşturmadığı; fakat örneklerin kurumadde, titrasyon asitliği, proteolitik aktivite, sertlik, yapışkanlık ve serum ayrılması değerleri üzerine etkisinin önemli olduğu tespit edilmiştir. Farklı inkübasyon sonlandırma pH’sı kullanılarak üretilen kefir örneklerinin kurumadde, kül ve proteolitik aktivite değerleri arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır. Bununla birlikte depolama süresi sonunda kefir örneklerinde proteolitik aktivite ve serum ayrılması değerlerinde artma olduğu; pH, titrasyon asitliği, sertlik ve yapışkanlık değerlerinde ise değişme olmadığı belirlenmiştir.

Araştırmada incelenen üretim parametrelerinin kefir örneklerinin görünür viskozite değerleri üzerine etkisinin önemli olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte depolama süresince kefir örneklerine ait görünür viskozite değerlerinin arttığı belirlenmiştir. Farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerinin Power Law modeline göre reolojik özelliklerinin incelenmesi sonucunda, örneklerin depolama



süresince Newton tipi olmayan pseudoplastik akış davranışı gösterdiği ve zamana bağlı olarak da tiksotropik akış özelliklerine sahip olduğu belirlenmiştir.

Depolama süresince kefir örneklerinde toplam aerobik mezofilik bakteri, laktokok, laktobasil, asetik asit bakteri ve lökonostok sayılarının azaldığı, maya sayılarının ise arttığı saptanmıştır. Ayrıca incelenen üretim parametrelerinden starter kültür çeşidinin kefir örneklerinde sayımı yapılan tüm mikroorganizmaların sayım sonuçları üzerine önemli düzeyde etkisinin olduğu belirlenmiştir. Farklı inkübasyon sıcaklıkları kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen laktokok ve maya sayıları arasında önemli bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte üretimde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH'sının kefir örneklerindeki laktobasil sayıları üzerine ve ısıl işlem normunun kefir örneklerinde yapılan tüm mikroorganizma sayım sonuçları üzerine önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Yapılan duyuusal değerlendirme sonucunda farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerinin depolanması sırasında verilen toplam puanlarda düşme meydana gelmiştir. Ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerine verilen toplam duyuusal puanların kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine verilen puanlara göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca üretimlerinde inkübasyon sonlandırma pH'sı olarak pH 4.4 seçilen örneklere ait toplam duyuusal puanların üretimlerinde inkübasyon sonlandırma pH'sı olarak pH 4.8 seçilen örneklere ait olanlara göre yüksek olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada, kefir peptid profilinin belirlenmesinde matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektrometresi (MALDI-TOF-MS) ile nanoelektronspray iyonizasyon (nano-ESI) kaynağı içeren LTQ Orbitrap XL ETD kütle spektrometresi ile kombine edilmiş nano-ultra-performans sıvı kromatografi (nano-UPLC) sistemi kullanılmıştır. Kefir örneklerinde multifosforile peptidler de dahil olmak üzere toplamda  $\beta$ -kazein,  $\alpha_{s1}$ -kazein,  $\kappa$ -kazein ve  $\alpha_{s2}$ -kazein orijinli 257 peptid tanımlanmıştır. Kefir örneklerinde tanımlanan 257 peptidin 16'sının çeşitli biyoaktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca kefirde tanımlanan söz konusu 257 peptidin 236'sının çiğ sütte tespit edilemeyip sadece kefirde tespit edilmesi, söz konusu peptidlerin sütün fermantasyonu sırasında oluştuğunu ve kefire özgü peptidler olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte üretimde kullanılan starter kültür çeşidi, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon sonlandırma pH'sının kefir örneklerinde belirlenen bazı peptidlerin bağıl yoğunluk değerleri üzerine değişen düzeylerde etkisinin olduğu, ısıl işlem normunun ise kefir örneklerinde belirlenen peptidlerin bağıl yoğunluk değerleri üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı saptanmıştır.

**ANAHTAR KELİMELER:** Kefir, üretim parametreleri, peptid profili, biyoaktif peptidler, MALDI-TOF-MS, Nano-UPLC-nano-ESI-MS/MS

**JÜRİ:** Doç. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN (Danışman)  
Prof. Dr. Ayhan TOPUZ  
Doç. Dr. Pınar YERLİKAYA KEBAPÇIOĞLU  
Doç. Dr. Oğuz GÜR SOY  
Yrd. Doç. Dr. Muammer DEMİR

## ABSTRACT

### **EFFECT OF PRODUCTION PARAMETERS ON PHYSICOCHEMICAL, MICROBIOLOGICAL AND SENSORIAL PROPERTIES OF KEFIR, AND DETERMINATION OF PEPTIDE PROFILE IN PRODUCED KEFIR**

**Ayşe AŞCI ARSLAN**

**PhD. Thesis in Food Engineering**  
**Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN**  
**February 2015, 210 Pages**

In this study, kefir was produced by using different heat treatment norms (at 90°C for 5 minutes and at 90°C for 10 minutes), starter culture types (kefir grain and commercial kefir starter culture), incubation temperatures (20°C and 25°C) and final incubation pH values (pH 4.4 and pH 4.8). Physicochemical, microbiological and sensory properties of kefir samples were determined during storage at 4±1°C for 30 days. Additionally, peptide and bioactive peptide profiles of the kefir samples produced by different production parameters have been tried to be presented and the effect of the production parameters on these peptide profiles in the kefir samples were studied.

Heat treatment norms used in the production did not have significant effect on total solids, ash, pH, titratable acidity, firmness, stickness and syneresis values of the kefir samples; but they were found to be effective on proteolytic activity values of the kefir samples. Regarding total solids and ash values of the kefir samples, no significant differences were found between kefir samples produced by using kefir grain and commercial kefir starter culture; in contrast type of starter culture has significant effect with varying levels on pH, titratable acidity, proteolytic activity, firmness, stickness and syneresis values. Furthermore, it was determined that incubation temperature used in the production did not make significant differences on ash and pH values of the kefir samples; but its effect on total solid, titratable acidity, proteolytic activity, firmness, stickness and syneresis values was significant. Regarding total solids, ash and proteolytic activity values, there were not significant differences between the kefir samples produced by using different final incubation pH levels. However, at the final stage of the storage period, proteolytic activity and syneresis values of the kefir samples increased; pH, titratable acidity, firmness and stickness values of the kefir samples did not change.

In the study it was determined that the effect of tested process parameters on apparent viscosity values of the kefir samples was significant. In addition, apparent viscosity values of the kefir samples increased during the storage. As a result of examination of the rheological properties of the kefir samples according to the Power Law model, all kefir samples exhibited non-newtonian pseudoplastic behavior and have thixotropic flow properties with respect to time.

During the storage, the counts of total mesophilic aerobic bacteria, lactococci, lactobacilli, acetic acid bacteria and *Leuconostoc* spp. in the kefir samples decreased; in contrast the counts of yeasts in the samples increased. Moreover, it was found that there was a significant effect of the starter culture type on the number of microorganisms counted in the kefir samples. Regarding lactococci and yeast numbers, no significant differences were found between kefir samples produced by using different incubation temperatures. Besides, the final incubation pH levels used in production were determined to have no significant effect on the counts of lactobacilli detected in the kefir samples, but also count results of all microorganisms were not influenced by the heat treatment norms.

Based on the results of sensory analysis, given total scores of the kefir samples produced using different production parameters decreased during the storage. The total scores of the kefir samples produced with commercial kefir starter cultures were higher than that of the kefir samples produced with kefir grain. In addition, it was determined that the total scores of kefir samples with final incubation pH 4.4 were higher than that of the kefir samples with final incubation pH 4.8.

Determination of the peptide profile of kefir was performed in this study by matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and nanoelectrospray ionization (nano-ESI) LTQ Orbitrap mass spectrometry coupled to nano ultra performance liquid chromatography (nano-UPLC). A total of 257 peptides including multiphosphorylated peptides were identified in kefir samples, which were mainly derived from  $\beta$ -casein,  $\alpha_{S1}$ -,  $\kappa$ - and  $\alpha_{S2}$ -casein. Sixteen of 257 peptides were determined to have various bioactivities. However, 236 of these peptides were unique for kefir and not detected in milk which showed that these 236 peptides were formed during the fermentation process and peculiar to kefir. In addition, relative intensity values of some peptides determined in the kefir samples were influenced by the starter culture type, incubation temperature and final incubation pH used in the production in variable significant levels; in contrast heat treatment norms have not significant effect on relative intensity values of the peptides in the kefir samples.

**KEYWORDS:** Kefir, production parameters, peptide profile, bioactive peptides, MALDI-TOF-MS, Nano-UPLC-nano-ESI-MS/MS

**COMMITTEE:** Assoc. Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN (Supervisor)  
Prof. Dr. Ayhan TOPUZ  
Assoc. Prof. Dr. Pınar YERLİKAYA KEBAPÇIOĞLU  
Assoc. Prof. Dr. Oğuz GÜRSOY  
Assist. Prof. Dr. Muammer DEMİR

## ÖNSÖZ

Besleyici değeri ve sağlık ile ilgili olumlu özellikleri nedeniyle son yıllarda fonksiyonel gıdaların tüketimine olan ilgi artmaktadır. Fonksiyonel gıdalar içerisinde yer alan kefir uzun yıllardan beri tüketilmekle birlikte, özellikle son yıllarda sağlığa yararlı etkilerinin belirlenmesi ile tüketimi artan probiyotik bir fermente süt ürünüdür. Ancak kefirin sağlıkla ilgili olumlu özelliklerinin kaynağının içerdiği mikroorganizmalardan, kefir danesinde bulunan kefirandan, sütün fermantasyonu sırasında serbest hale geçen peptidlerden ya da tüm bu faktörlerin birleşiminden mi kaynaklandığı henüz tam olarak açıklanamamıştır. Konu ile ilgili birçok çalışma bulunmasına rağmen, kefirin sağlıkla ilgili olumlu özelliklerinin kaynağını oluşturan fonksiyonel bileşenlerden biri olan biyoaktif peptidler hakkında yapılan araştırma sayısı yok denecek kadar azdır.

Bu çalışmada farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerinin peptid ve biyoaktif peptid içeriği ortaya konulmaya çalışılmıştır. Ayrıca çalışmada; farklı starter kültür kullanılarak ve üretim sırasında farklı ısı işlem normları, inkübasyon sıcaklıkları ile inkübasyon sonlandırma pH'ları uygulanarak kefir üretilmiş ve üretilen kefir örneklerinin üretim sonrası ve depolama sırasında fizikokimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşsal özellikleri belirlenmiştir. Bu çalışma ile kefir peptid profilinin dolayısı ile de biyoaktif peptid profilinin belirlenmesinin kefirin sağlıkla ilgili olumlu özelliklerinin anlaşılmasına katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte farklı üretim parametrelerinin kefirde belirlenen biyoaktif peptidler üzerine etkisinin araştırılması ve kefirin söz konusu fonksiyonel özelliği ile kalite karakteristiklerinin bir arada düşünülerek ideal kefir üretim yönteminin belirlenmesi, proje sonuçlarının ticari hayatta daha somut bir şekilde kullanılabilmesini sağlayacaktır. Bu çalışmanın ülkemizdeki fonksiyonel ürün yelpazesinin genişletilmesine, kefirin endüstriyel üretimine ve daha sonra yapılacak olan çalışmalara katkıda bulunacağı umulmaktadır.

Lisanüstü öğrenimim boyunca akademik alanda ve hayata dair pek çok konuda bilgi ve yardımını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN'e ve Almanya'daki analizlerimin gerçekleşmesinde Almanya Friedrich-Alexander Üniversitesi'nde laboratuvarının tüm imkanlarını kullanımına açarak maddi-manevi destek veren Prof. Dr. Monika Pischetsrieder'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmaları sırasında destekleri ile her an yanımda olan arkadaşlarım, doktora öğrencisi Firuze ERGİN ve Aysen Güher GÜNDEŞ ile yüksek lisans öğrencisi Selda YALÇIN'a; desteklerini her zaman hissettiğim arkadaşlarım Öğr. Gör. Emine Mine ÇOMAK GÖÇER'e, Araş. Gör. Fundagül EREM'e ve Araş. Gör. Ülgen İlknur KONAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Almanya Friedrich-Alexander Üniversitesi'ndeki analizlerimin gerçekleşmesinde sürekli maddi-manevi destek aldığım arkadaşlarım doktora öğrencileri Jennifer EBNER ve Yufang LIU'ya; manevi desteğini hep yanımda hissettiğim arkadaşlarım doktora öğrencileri Sümeyye ŞAHİN ve Sevim DALABASMAZ'a ayrıca teşekkür ederim.

Son olarak en büyük teşekkürü ise destekleriyle her zaman yanımda olan, beni cesaretlendiren, çalışmamın tamamlanması sırasında büyük özveri gösteren babam

Mustafa AŞCI, annem Őerife AŞCI ve eŐim Mehmet Talip ARSLAN başta olmak üzere tđm aileme sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
ÖNSÖZ .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xviii
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI .....	5
2.1. Kefir .....	5
2.1.1. Kefirin tanımı .....	5
2.1.2. Kefir danesi .....	5
2.1.3. Kefir danesi ve kefirin mikrobiyolojik özellikleri .....	7
2.1.3.1. Kefir bakterileri .....	10
2.1.3.2. Kefir mayaları .....	11
2.1.3.3. Kefirde bakteri-maya etkileşimi .....	12
2.1.4. Kefir danesinin muhafazası .....	12
2.1.5. Kefir üretim yöntemleri .....	13
2.1.6. Kefirin fiziksel ve kimyasal özellikleri .....	16
2.1.7. Kefirin besleyici değeri ve sağlık açısından önemi .....	19
2.2. Biyoaktif Peptidler .....	23
2.2.1. Biyoaktif peptidlerin işlevselliği .....	25
2.2.1.1. Antihipertansif peptidler .....	26
2.2.1.2. Antitrombotik peptidler .....	30
2.2.1.3. Opioid peptidler .....	32
2.2.1.4. İmmün Sistemi Düzenleyici Peptidler .....	34
2.2.1.5. Antimikrobiyal peptidler .....	35
2.2.1.6. Mineral bağlayıcı peptidler .....	41
2.3. Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon (MALDI) .....	43
3. Materyal ve metot .....	48
3.1. Materyal .....	48
3.2. Metot .....	48
3.2.1. Araştırmanın planlanması .....	48
3.2.2. Kefir danelerinin aktif hale getirilmesi .....	49
3.2.3. Kefir üretimi .....	49
3.2.4. Sütte yapılan fizikokimyasal analizler .....	51
3.2.4.1. Kurumadde tayini .....	51
3.2.4.2. Yağ tayini .....	51
3.2.4.3. Protein tayini .....	51
3.2.4.4. pH tayini .....	51
3.2.4.5. Titrasyon asitliği tayini .....	52
3.2.4.6. Kül tayini .....	52
3.2.4.7. Proteolitik aktivite .....	52
3.2.5. Kefirde yapılan fizikokimyasal analizler .....	52
3.2.5.1. Kurumadde tayini .....	52
3.2.5.2. Kül tayini .....	52
3.2.5.3. pH tayini .....	52

3.2.5.4. Titrasyon asitliği tayini .....	52
3.2.5.5. Proteolitik aktivite .....	53
3.2.5.6. Serum ayrılması.....	53
3.2.5.7. Tekstür .....	53
3.2.6. Kefirin reolojik özelliklerinin belirlenmesi .....	53
3.2.7. Kefirde yapılan mikrobiyolojik analizler.....	53
3.2.7.1. Seri dilüsyonların hazırlanması .....	53
3.2.7.2. Koliform bakteri sayımı.....	54
3.2.7.3. Maya sayımı .....	54
3.2.7.4. Toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı .....	54
3.2.7.5. Laktobasil sayımı.....	54
3.2.7.6. Laktokok sayımı .....	54
3.2.7.7. Lökonostok sayımı .....	54
3.2.7.8. Asetik asit bakteri sayımı.....	54
3.2.8. Kefirin peptid profilinin belirlenmesi amacıyla yapılan analizler .....	55
3.2.8.1. Örnek hazırlama .....	55
3.2.8.2. Peptidlerin StageTip katı-faz mikroekstraksiyon yöntemi ile izolasyonu .....	55
3.2.8.3. HPLC ile peptidlerin fraksiyonlarına ayrılması .....	57
3.2.8.4. MALDI-TOF-MS analizi.....	58
3.2.8.5. Nano-UPLC-nano-ESI-MS/MS .....	59
3.2.8.6. Direkt infüzyon.....	59
3.2.8.7. Peptidlerin tanımlanması .....	60
3.2.9. Duyusal analizler.....	60
3.2.10. İstatistiksel analizler .....	60
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	62
4.1. Kefir Üretiminde Kullanılan Sütlerin Kimyasal Bileşimleri .....	62
4.2. Kefir Örneklerinin Fizikokimyasal Analiz Sonuçları.....	62
4.2.1. Kurumadde ve kül içeriği .....	62
4.2.2. pH ve titrasyon asitliği.....	65
4.2.3. Proteolitik aktivite .....	70
4.2.4. Sertlik, yapışkanlık ve serum ayrılması.....	75
4.3. Kefir Örneklerinin Reolojik Analiz Sonuçları .....	83
4.4. Kefir Örneklerinin Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları.....	100
4.5. Kefirin Peptidomik Profili.....	113
4.5.1. Kefir peptidlerinin biyoaktif potansiyeli .....	131
4.5.2. Kefir örneklerinin peptid profilleri üzerine üretim parametrelerinin etkisi .....	135
4.5.2.1. Üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin kefir örneklerinin peptid profili üzerine etkisi .....	142
4.5.2.2. Üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının kefir örneklerinin peptid profili üzerine etkisi .....	152
4.5.2.3. Üretimde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH'sının kefir örneklerinin peptid profili üzerine etkisi .....	159
4.5.2.4. Üretimde kullanılan ısıl işlem normunun kefir örneklerinin peptid profili üzerine etkisi .....	166
4.6. Kefir Örneklerinin Duyusal Analiz Sonuçları.....	174
5. SONUÇ.....	184

6. KAYNAKLAR.....	189
7. EKLER.....	208
Ek 1. MALDI-TOF kütle spektrometresi ile kefir örneklerinde belirlenen ana peptid sinyalleri.....	208
Ek 2. Amino asitlerin kodlanması.....	210
ÖZGEÇMİŞ	



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

d	Devir
Da	Dalton
dk.	Dakika
g	Gram
gf	Gram kuvvet
K	Kıvam katsayısı
kg	Kilogram
kDa	Kilodalton
kob	Koloni oluşturan birim
kV	Kilovolt
L	Litre
log	Logaritma
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	milimetre
MPa	Megapaskal
mPa	Milipaskal
ms	Milisaniye
n	Akış davranış indeksi
N	Normal
N	Newton
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
nL	Nanolitre
Pa	Paskal
ppm	Milyonda bir
R <sup>2</sup>	Regresyon katsayısı
s	Saniye
V	Volt
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µmol	Mikromol
Å	Angstrom
°C	Santigrat derece
°SH	Soxhlet Henkel derecesi
η	Görünür vikožite
λ	Dalga boyu
τ	Kayma gerilmesi
γ	Kayma (deformasyon) hızı

## **Kısaltmalar**

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ACE	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ACN	Asetonitril
APM	Acetobacter Peroxydans Medium
ARB	Anjiyotensin II reseptör blokörleri
ATCC	Amerikan tipi kültür koleksiyonu
CHCA	$\alpha$ -siyano-4-hidroksisinamik asit
CID	Çarpışma kaynaklı ayrılma (collision induced dissociation)
CMP	Kazeinomakropeptid
CPP	Kazeinofosfopeptid
DHB	2,5-dihidroksi-benzoik asit
DTH	Geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu (delayed type hypersensitivity)
EPS	Ekzopolisakkarit
ESI	Elektrospray iyonizasyon
f	Fraksiyon
FA	Formik asit
FT	Fourier dönüştürücü
HMECs	İnsan meme epitel hücreleri (human mammary epithelial cells)
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografisi
IC <sub>50</sub>	ACE'nin %50'sinin inhibe olması için gerekli peptid konsantrasyonu
IR	İnfrared
KO	Kareler ortalaması
LC	Sıvı kromatografisi
m/z	Kütle/yük
MA	Molekül ağırlığı
MALDI	Matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyon
MCF-7	İnsan meme kanser hücreleri (human mammary cancer cells)
MIC	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MRS	De Man Rogasa Sharp
MS	Kütle spektrometresi
MSE	Mayeux, Sandline and Elliker
OPA	o-fetaldehit
PCA	Plate count agar
QIT	Kuadrupol iyon tuzak
RP	Ters faz
SEM	Taramalı elektron mikroskopu
SD	Serbestlik derecesi
StdH	Standart hata
StdS	Standart sapma
TCA	Trikloroasetik asit
TFA	Trifloroasetik asit
TOF	Uçuş zamanlı
TS	Türk Standartları
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
UPLC	Ultra Performans Sıvı Kromatografisi
VRB	Violet red bile

vWF	von Willebrand faktörü
w/w	Hacim/hacim
X	Ortalama değer
YGC	Yeast Extract Glucose Chloramphenicol

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kefir danesinin makroskobik görünümü .....	6
Şekil 2.2. Kefiranın kimyasal yapısı (Kooiman 1968) .....	7
Şekil 2.3. Türk kefir danesinin SEM görüntüleri. Türk kefir danesinin dış yüzey görüntüleri (a ve c), Türk kefir danesinin iç yüzey görüntüleri (b ve d) (Güzel-Seydim vd 2005).....	8
Şekil 2.4. Süt proteinleri kaynaklı peptidlerin biyoaktiviteleri (Hafeez vd 2014) .....	24
Şekil 2.5. Sığır $\beta$ -kazein proteinin ana yapısındaki stratejik bölgeler (Meisel 1998) ....	25
Şekil 2.6. Renin-anjiyotensin ve Kallikrein-kinin sistemleri (Phelan ve Kerins 2011) ACE: Anjiyotensin dönüştürücü enzim, ARB: Anjiyotensin II reseptör blokörleri, ACE I: Anjiyotensin dönüştürücü enzim I .....	27
Şekil 2.7. Kanın pıhtılaşma safhaları (Vatansever 2006).....	31
Şekil 2.8. Bakteri sitoplazmik membranında meydana gelen olaylar (Nguyen vd 2011).....	41
Şekil 2.9. Kütle spektrometresinin ana kısımları (Cañas vd 2006). .....	43
Şekil 2.10. Elektrosprey iyonizasyonlaştırma kaynağı (Kılıç vd 2000a) .....	45
Şekil 3.1. Kefir üretim akım şeması .....	50
Şekil 3.2. Isıl işlem ünitesi .....	51
Şekil 3.3. Örnek hazırlama .....	55
Şekil 3.4. StageTiplerin hazırlanması .....	56
Şekil 3.5. StageTip katı-faz mikroekstraksiyon yöntemi .....	56
Şekil 3.6. MALDI hedef tablaları.....	58
Şekil 4.1. Kefir örneklerine ait ortalama a) pH b) titrasyon asitliği değerleri.....	67
Şekil 4.2. Kefir örneklerine ait ortalama proteolitik aktivite değerleri.....	72
Şekil 4.3. Depolamanın 1. gününde ticari kefir starter kültürü ve kefir danesi kullanılarak üretilen örneklerin proteolitik aktivite değerlerinin karşılaştırılması .....	72
Şekil 4.4. Kefir örneklerine ait ortalama a) sertlik b) yapışkanlık değerleri.....	77

Şekil 4.5. Kefir örneklerine ait serum ayrılması değerleri .....	78
Şekil 4.6. Kefir örneklerine ait ortalama görünür viskozite değerleri .....	85
Şekil 4.7. Pseudoplastik akış davranışına ait a) kayma gerilimi-kayma hızı b) görünür viskozite-kayma hızı reogramları .....	89
Şekil 4.8. Tikotropi reogramı .....	91
Şekil 4.9a. Depolamanın 1. gününde 20°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerine ait tipik kayma gerilmesi-kayma hızı reogramları .....	93
Şekil 4.9b. Depolamanın 1. gününde 25°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerine ait tipik kayma gerilmesi-kayma hızı reogramları .....	94
Şekil 4.10a. Depolamanın 1. gününde 20°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerine ait tipik görünür viskozite-kayma hızı reogramları .....	95
Şekil 4.10b. Depolamanın 1. gününde 25°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerine ait tipik görünür viskozite-kayma hızı reogramları .....	95
Şekil 4.11. Kefir örneklerinin a) toplam aerobik mezofilik bakteri b) laktobasil sayılarındaki değişim .....	104
Şekil 4.12. Kefir örneklerinin a) laktokok b) asetik asit bakteri sayılarındaki değişim .....	105
Şekil 4.13. Kefir örneklerinin a) lökonostok b) maya sayılarındaki değişim .....	106
Şekil 4.14. a) Ticari kefir starter kültürü b) Kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine ait MALDI-TOF kütle spektrumları .....	114
Şekil 4.15. Tek harf kod sisteminde $\alpha_{s1}$ -kazein, $\alpha_{s2}$ -kazein, $\beta$ -kazein ve $\kappa$ -kazein öncü proteinlerine ait amino asit dizilimleri ( $\blacktriangledown$ : laktokokal proteinazların parçaladığı bölünme noktaları) .....	130
Şekil 4.16. Kefirde tanımlanan biyoaktif peptidlerin insan vücudunda etki ettiği sistemler .....	134
Şekil 4.17a. Ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen peptidler ve bu peptidler üzerine üzerine inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon sonlandırma pH'sı ve ısıl işlem normunun etkisi .....	136
Şekil 4.17b. Ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen peptidler ve bu peptidler üzerine üzerine inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon sonlandırma pH'sı ve ısıl işlem normunun etkisi .....	137

Şekil 4.17c. Ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen peptidler ve bu peptidler üzerine inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon sonlandırma pH'sı ve ısıl işlem normunun etkisi.....	138
Şekil 4.18a. Kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen peptidler ve bu peptidler üzerine inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon sonlandırma pH'sı ve ısıl işlem normunun etkisi.....	139
Şekil 4.18b. Kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen peptidler ve bu peptidler üzerine inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon sonlandırma pH'sı ve ısıl işlem normunun etkisi.....	140
Şekil 4.18c. Kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen peptidler ve bu peptidler üzerine inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon sonlandırma pH'sı ve ısıl işlem normunun etkisi .....	141
Şekil 4.19. Kefir örneklerinde tanımlanan biyoaktif peptidlerin MALDI-TOF kütle spektrumundaki pozisyonları .....	142
Şekil 4.20. Farklı örnek tiplerinde tanımlanan peptidlerin dağılımı.....	143
Şekil 4.21. Kefir starter kültürü (A) ve kefir danesi (B) kullanılarak üretilen kefir örneklerinde tanımlanan peptidlerin $\alpha_{s1}$ -, $\alpha_{s2}$ -, $\beta$ - ve $\kappa$ -kazein protein dizilimlerindeki pozisyonları.....	144
Şekil 4.22a. Kefir örneklerinde belirlenen peptidler üzerine starter kültür çeşidinin etkisi.....	146
Şekil 4.22b. Kefir örneklerinde belirlenen peptidler üzerine starter kültür çeşidinin etkisi.....	147
Şekil 4.23. Üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin 977.5 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi .....	148
Şekil 4.24. Üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin 1329.6 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi .....	149
Şekil 4.25. Üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin 1881.1 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi .....	150
Şekil 4.26. Üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin 1994.1 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi .....	151
Şekil 4.27. Üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin 2107.2 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi .....	152

Şekil 4.28a. Kefir örneklerinde belirlenen peptidler üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi .....	154
Şekil 4.28b. Kefir örneklerinde belirlenen peptidler üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi .....	155
Şekil 4.28c. Kefir örneklerinde belirlenen peptidler üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi .....	156
Şekil 4.29. Üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının 977.5 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi .....	157
Şekil 4.30. Üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının 1329.6 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi .....	157
Şekil 4.31. Üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının 1881.1 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi .....	158
Şekil 4.32. Üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının 1994.1 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi .....	158
Şekil 4.33. Üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının 2107.2 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi .....	159
Şekil 4.34a. Kefir örneklerinde belirlenen peptidler üzerine inkübasyon sonlandırma pH'sının etkisi .....	161
Şekil 4.34b. Kefir örneklerinde belirlenen peptidler üzerine inkübasyon sonlandırma pH'sının etkisi .....	162
Şekil 4.34c. Kefir örneklerinde belirlenen peptidler üzerine inkübasyon sonlandırma pH'sının etkisi .....	163
Şekil 4.35. Üretimde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH'sının 977.5 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi.....	164
Şekil 4.36. Üretimde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH'sının 1329.6 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi.....	164
Şekil 4.37. Üretimde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH'sının 1881.1 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi.....	165
Şekil 4.38. Üretimde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH'sının 1994.1 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi.....	166
Şekil 4.39. Üretimde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH'sının 2107.2 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi.....	166

Şekil 4.40a. Kefir örneklerinde belirlenen peptidler üzerine ısı işlem normunun etkisi .....	168
Şekil 4.40b. Kefir örneklerinde belirlenen peptidler üzerine ısı işlem normunun etkisi .....	169
Şekil 4.40c. Kefir örneklerinde belirlenen peptidler üzerine ısı işlem normunun etkisi .....	170
Şekil 4.41. Üretimde kullanılan ısı işlem normunun 977.5 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi .....	171
Şekil 4.42. Üretimde kullanılan ısı işlem normunun 1329.6 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi .....	171
Şekil 4.43. Üretimde kullanılan ısı işlem normunun 1881.1 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi .....	172
Şekil 4.44. Üretimde kullanılan ısı işlem normunun 1994.1 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi .....	172
Şekil 4.45. Üretimde kullanılan ısı işlem normunun 2107.2 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi .....	173
Şekil 4.46. Kefir örneklerinin depolama süresince a) tat b) yapı ve tekstür puanlarına ait değişim .....	177
Şekil 4.47. Kefir örneklerinin depolama süresince a) görünüş ve renk b) toplam duyuşsal puanlarına ait değişim .....	178



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kefirin ve kefir danelerinin mikroflorası (Ratray ve O'Connell 2011).....	11
Çizelge 2.2. Yaygın olarak kullanılan MALDI matrisleri (Hillenkamp ve Karas 2007) .....	47
Çizelge 3.1. Kefir üretim parametreleri ve kefir örneklerinin kodlanması.....	48
Çizelge 3.2. Peptidlerin C <sub>18</sub> StageTip katı-faz mikroekstraksiyon yöntemi ile izolasyonu.....	57
Çizelge 3.3. Nano-UPLC sisteminde kullanılan dereceli elüsyon profili.....	59
Çizelge 3.4. Kefir örneklerinin duyu niteliklerinin saptanmasında kullanılan puanlama ölçütleri (Bodyfelt vd 1988) .....	61
Çizelge 4.1. Kefir üretiminde kullanılan sütlere ait ortalama toplam kurumadde, kül, yağ, protein, pH, titrasyon asitliği ve proteolitik aktivite değerleri (X±StdS).....	62
Çizelge 4.2. Kefir örneklerine ait ortalama kurumadde ve kül değerleri (X±StdS).....	63
Çizelge 4.3. Kefir örneklerinde üretim parametrelerine bağlı olarak belirlenen kurumadde ve kül değerlerine ait varyans analiz sonuçları.....	63
Çizelge 4.4. Kefir örneklerinde belirlenen kurumadde değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları (X±StdH) .....	64
Çizelge 4.5. Kefir örneklerine ait ortalama pH ve titrasyon asitliği değerleri (X±StdS).....	66
Çizelge 4.6. Kefir örneklerinde üretim parametrelerine bağlı olarak depolama sürecinde belirlenen pH ve titrasyon asitliği değerlerine ait varyans analiz sonuçları .....	68
Çizelge 4.7. Kefir örneklerinde depolama sürecinde belirlenen pH ve titrasyon asitliği değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları (X±StdH) .....	69
Çizelge 4.8. Kefir örneklerine ait ortalama proteolitik aktivite değerleri (X±StdS) .....	71
Çizelge 4.9. Kefir örneklerinde üretim parametrelerine bağlı olarak depolama sürecinde belirlenen proteolitik aktivite değerlerine ait varyans analiz sonuçları .....	73

Çizelge 4.10. Kefir örneklerinde depolama sürecinde belirlenen proteolitik aktivite değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ( $X \pm \text{StdH}$ ).....	74
Çizelge 4.11. Kefir örneklerine ait ortalama sertlik, yapışkanlık ve serum ayrılması değerleri ( $X \pm \text{StdS}$ ).....	76
Çizelge 4.12. Kefir örneklerinde üretim parametrelerine bağlı olarak depolama sürecinde belirlenen sertlik, yapışkanlık ve serum ayrılması değerlerine ait varyans analiz sonuçları .....	80
Çizelge 4.13. Kefir örneklerinde depolama sürecinde belirlenen sertlik, yapışkanlık ve serum ayrılması değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ( $X \pm \text{StdH}$ ).....	81
Çizelge 4.14. Kefir örneklerine ait ortalama görünür viskozite değerleri ( $X \pm \text{StdS}$ ).....	84
Çizelge 4.15. Kefir örneklerinde üretim parametrelerine bağlı olarak depolama sürecinde belirlenen görünür viskozite değerlerine ait varyans analiz sonuçları .....	86
Çizelge 4.16. Kefir örneklerinde depolama sürecinde belirlenen görünür viskozite değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ( $X \pm \text{StdH}$ ).....	87
Çizelge 4.17. Kefir örneklerinin Power Law modeline göre reolojik özellikleri ( $X \pm \text{StdS}$ ).....	90
Çizelge 4.18. Kefir örneklerinde üretim parametrelerine bağlı olarak depolama sürecinde belirlenen kıvam katsayısı, akış davranış indeksi ve tiksotropi değerlerine ait varyans analiz sonuçları.....	97
Çizelge 4.19. Kefir örneklerinde depolama sürecinde belirlenen kıvam katsayısı, akış davranış indeksi ve tiksotropi değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ( $X \pm \text{StdH}$ ) .....	98
Çizelge 4.20. Kefir örneklerindeki toplam aerobik mezofilik bakteri, laktobasil, laktokok, asetik asit bakterisi, lökonostok ve maya sayım sonuçları (log kob/g) ( $X \pm \text{StdS}$ ).....	102
Çizelge 4.21. Kefir örneklerinde üretim parametrelerine bağlı olarak depolama sürecinde belirlenen toplam aerobik mezofilik bakteri, laktobasil, laktokok, asetik asit bakterisi, lökonostok ve maya sayım sonuçlarına ait varyans analiz sonuçları.....	108
Çizelge 4.22. Kefir örneklerinde depolama sürecinde belirlenen toplam aerobik mezofilik bakteri, laktobasil, laktokok, asetik asit bakterisi,	

lökönostok ve maya sayım sonuçlarına ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları (log kob/g) ( $X \pm \text{StdH}$ ) .....	109
Çizelge 4.23. Kefir peptidlerinin profili.....	116
Çizelge 4.24. Kefir örneklerinde tanımlanan biyoaktif peptidler .....	132
Çizelge 4.25. Kefir örneklerinin duyuşal özellikleri ( $X \pm \text{StdS}$ ).....	175
Çizelge 4.26. Kefir örneklerinin duyuşal niteliklerine ait varyans analiz sonuçları.....	180
Çizelge 4.27. Kefir örneklerinin duyuşal niteliklerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ( $X \pm \text{StdH}$ ).....	181

## 1. GİRİŞ

Günümüzde tüketiciler, dengeli bir diyetle beslenebilmek amacıyla sağlıklı, güvenilir ve dengeli beslenme kavramına uygun gıdaları tercih etmektedirler. Bu yüzden gıda üreticileri uygun diyet gıdalar, modifiye gıdalar (katkı içermeyen/organik gıdalar) ve fonksiyonel gıdalar gibi yeni gıda türleri geliştirerek tüketicilerin bu isteklerine cevap vermeye çalışmaktadırlar. Ancak ülkemizde üretilen yukarıda sözü edilen gıdaların çeşitliliği ne yazık ki arzu edilen düzeyde değildir. Süt ve süt ürünlerinin beslenme ve sağlık açısından yararlarının anlaşılmasıyla orantılı olarak tüketimi artmaktadır. Bununla birlikte gelişmiş ülkelerde tüketicilerin bu ürünlere olan ilgisinin daha da arttırılması ve tüketiminin daha cazip hale getirilmesi için süt ürünleri teknolojisinde yeni ürünlerin üretilmesi ve geliştirilmesi faaliyetleri hızla devam etmektedir. Fermantasyon işlemi yeni ürünlerin elde edilmesi amacıyla yararlanılan yöntemlerden biridir. Fermente süt ürünleri, sütün başta laktik asit bakterileri olmak üzere belirli mikroorganizmalar tarafından fermente edilmesi sonucu elde edilen farklı yapı, görünüş, tat ve aromaya sahip ürünlerdir (Sezer 2003).

Fermente süt ürünleri içerisinde en çok bilinenlerden biri olan kefir, özellikle son yıllarda sağlığa yararlı etkilerinin ortaya konulması ile tüketimi artan bir fermente süt ürünüdür. Kefir, kefir daneleri veya kefir danesindeki mikroorganizmalardan üretilen starter kültürler kullanılarak, etil alkol ve laktik asit fermantasyonları sonucu elde edilen, çok eski geçmişe sahip, Kafkas dağları orijinli ve hafif gazlı fermente bir süt ürünüdür (Güzel-Seydim vd 2005).

Kafkasya'da çok uzun yıllardan beri yaygın olarak üretilip tüketilmekte olan kefirin tarihçesi hakkında kesin bir bilgi bulunmamakla beraber Kafkasya'da yaşayan halkın inek ve keçi sütünden starter kültür olarak kefir danesi adı verilen özel bir yapıyı kullanarak kefiri ürettikleri bildirilmektedir. Ancak kefir danelerinin nerede ve nasıl oluştuğu tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, kefir danelerinin Hz. Muhammed tarafından Ortodoks mezhebine mensup insanlara verilerek nasıl kullanılacaklarının anlatıldığı bildirilmektedir. Ayrıca Hz. Muhammed'in kefir yapımının kimseye söylenmemesi gerektiğini, eğer söylenirse sihrinin bozulacağını ifade ettiği belirtilmektedir. Bu nedenle kefir daneleri ve kefirin yapılışının uzun yıllar sır olarak kaldığı düşünülmektedir. Konu ile ilgili bir başka yaklaşım ise kefir danelerinin Kafkasya'da keçi tulumu içinde, inek sütünün dana ve koyun şirdenleri ile pıhtılaştırılması sonucunda elde edildiği şeklindedir. Pıhtılaşmanın gerçekleştiği tulumun iç yüzeyinde birkaç hafta sonra süngerimsi bir kabuk tabakası meydana geldiği, bu kabuk tabakasının alınarak kurutulduğu ve kuruma sonunda oluşan küçük topakların kefir danesi olarak isimlendirildiği ifade edilmektedir (Koroleva 1988).

Ünlü İtalyan gezgin Marco Polo ilk kitabı olan "Marco Polo'nun Seyahatleri" adlı kitabında kefirden söz etmekte; ancak kefiri bir türlü Avrupa'ya getiremediğinden bahsetmektedir. Tibet'te, Budist rahiplerin elde ettikleri kefiri sürekli mayalarak tapınaklarına gelen ziyaretçilere şifa olarak dağıttıkları, hastaları kefirle iyileştirdikleri bildirilmektedir (Yıldız 2009).

Kefirin uzun yıllar boyunca Türk toplulukları tarafından Ruslara karşı korunduğu bildirilmektedir. 19. yüzyılda Moskova'da bir süt işletmesinin sahibi olan Nikolai

Brandov, kefiri endüstriyel düzeyde üretmeyi düşünmüş ve bu düşüncesini gerçekleştirmek amacıyla kefir danesini ele geçirmek için işletmesinde çalışan güzel bir kızı Kafkas prensini etkilemek ve prensi kefir danesini vermesi için ikna etmekle görevlendirmiştir. Ancak olaylar planlandığı gibi gitmemiş ve bu iş için görevlendirilen kız kefir danesini almayı başaramamıştır. Daha sonra, kız ülkesine dönerken Kafkaslar tarafından kaçırılmış ve prensle evlendirilmiştir. İşletme sahibi bu durumu mahkemeye bildirmiş, mahkeme de Moskova'daki süt işletmesine kefir danesi verildiği takdirde prensin affedileceği kararını almıştır. Böylece Moskova süt işletmesi, 1908 yılının Eylül ayında kefir danesini elde etmiş ve küçük partiler halinde kefir yaparak çoğaltmaya başlamıştır (Koroleva 1988, Anonim 1999). Rusya'da 1930'lu yıllarda endüstriyel düzeyde kefir üretimi başlamıştır. 1950'li yılların sonunda ise, Rusya'da bulunan bir araştırma enstitüsü bugünkü anlamda kefir üretim metodunu geliştirmiş ve bu metotla yapılan kefir geleneksel yöntemle yapılan kefirle benzer özellikler göstermiştir (Koroleva 1988).

Rusya'da yayımlanan "Kefir" kitabının 1884 yılında Almanca'ya çevrilmesi ile kefirin Avrupa'da tanındığı belirtilmektedir. Son yıllarda Türkiye, Almanya, Polonya, Slovakya, Finlandiya, Macaristan, Norveç, Danimarka, İsviçre ve Amerika Birleşik Devletleri gibi ülkelerde kefir üretimi yapıldığı belirtilmektedir (Karatepe vd 2012, Anonim 2013).

Kefir, ülkemizde çeşitli firmalar tarafından üretilmekte ve piyasaya satışa sürülmektedir. Kefirin sağlıkla ilgili olumlu özellikleri ve besin değeri hakkında bilinçlenme ve basında çıkan tanıtıcı reklamların artması ile birlikte tüketici nezdinde kefir daha bir önem kazanmıştır. Günümüzde büyük marketlerde kefir sade, light ve meyveli olmak üzere raflarda yerini almaktadır (Yıldız 2009, Anonim 2012).

Kefir üretiminde geleneksel ve endüstriyel üretim metotları kullanılmaktadır (Otlas ve Cagindi 2003). Geleneksel yöntemle kefir üretimi süte doğrudan kefir danesi ilave edilerek yapılmaktadır. Rusya'da endüstriyel boyuttaki kefir üretimi de danelerle gerçekleştirilmektedir. Fakat Batı Avrupa'da kefir yapımında kefir danelerinden izole edilen sıvı veya dondurularak kurutulmuş konsantre starter kültürler kullanılmaktadır (Yıldız 2009). Endüstriyel yöntemle üretilen kefirin, geleneksel yöntemle üretilen kefire göre daha kıvamlı ve maya tadının daha az olduğu, endüstriyel ve geleneksel yöntemle üretilen kefir örneklerinin mikrobiyal ve fizikokimyasal özellikleri açısından farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Hafliger vd 1991). Geleneksel yöntemle üretimin zor olması, ticari starter kültür kullanımının ürün standardizasyonu açısından avantajları, kontaminasyon riski ve artan ihtiyacı karşılamak gibi nedenlerden dolayı endüstriyel yöntemle kefir üretimine olan ilgi artmaktadır (Dinç 2008, Hertzler ve Clancy 2003).

Protein, vitamin ve mineral maddeleri dengeli bir biçimde içermesi, fermantasyon işlemi sırasında bazı vitaminlerin sentezlenmesi, protein ve laktozun kısmen parçalanması ve sindirimini kolay olması gibi faktörler kefirin gıda olarak önemini ortaya koymaktadır. 21. yüzyılın yoğurdu olarak bilinen kefirin sütte bulunan tüm besin öğelerini içermesinin yanı sıra sağlığa olumlu etkilerinin bulunması onun tüketimini dolayısıyla da üretimini arttırmaktadır. Kefirin sağlık üzerine yararlı etkileri; içerdiği protein, vitaminler, antioksidan ve mineral maddeler ile biyoaktif bileşenlere dayandırılmaktadır. Kefirin antihipertansif, antibakteriyel, antikarsinogenik,

hipokolesteromik, antiinflamatuar, antimutajenik, antialerjik, antidiyabetik, temizleyici (scavenging),  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi, bakteriyel kolonizasyon ve bağışıklık sistemini güçlendirme gibi sağlıkla ilgili olumlu etkileri bulunmaktadır (Ahmed vd 2013).

Kefirin sağlıkla ilgili olumlu özelliklerinin kaynağının içerdiği mikroorganizmalardan, kefir danesinde bulunan kefirandan, sütün fermantasyonu sırasında serbest hale geçen peptidlerden ya da tüm bu faktörlerin sinerjik birleşiminden mi kaynaklandığı açık değildir (Vinderola vd 2005). Konu ile ilgili birçok çalışma bulunmasına rağmen, kefirin sağlıkla ilgili olumlu özelliklerinin kaynağını oluşturan fonksiyonel bileşenler tam olarak bilinmemektedir. Fermente süt ürünlerinde bulunan fonksiyonel bileşenlerden biri, bozulmamış süt proteinlerinin dizilimlerinde şifrelenen ve sindirim ya da fermantasyon gibi sütün işlenmesi sırasında enzimatik proteoliz ile serbest hale geçebilen biyoaktif peptidlerdir (Korhonen ve Pihlanto-Leppälä 2001).

Biyoaktif peptidlerden ilk kez 1950 yılında Mellander'in raşitik bebeklerde D vitamininden bağımsız kemik kalsifikasyonunu arttıran kazeinden türemiş fosforlanmış peptidler olarak bahsettiği bildirilmiştir. Protein molekülü içerisinde inaktif halde olan ancak *in vivo* ya da *in vitro* olarak enzimatik aktivite sonucu açığa çıktığında spesifik özellikleriyle önemli fizyolojik etki gösteren amino asit zincirlerine biyoaktif peptidler denilmektedir (Kınık ve Gürsoy 2002). Biyolojik olarak aktif bu peptidler süt proteinlerinden; proteolitik starter kültürlerle sütün fermantasyonu sırasında, sindirim enzimleriyle enzimatik hidrolizle ya da bitki ve mikroorganizmalardaki proteolitik enzimlerle hidroliz sırasında olmak üzere üç yolla üretilebilmektedir (Korhonen ve Pihlanto-Leppälä, 2001). Mevcut diyetle ait çeşitli bitkisel ve hayvansal proteinlerde potansiyel biyoaktif peptidler tanımlanmış olmasına rağmen, süt proteinleri biyoaktif peptidlerin temel kaynağıdır. Başlıca süt proteinleri olan kazein ve peyniraltı suyu proteinleri biyoaktif peptidlerin önemli bir kaynağını oluşturmaktadır (Pihlanto-Leppälä 2001).

Vücut fonksiyonları üzerinde olumlu etkilere sahip olan biyoaktif peptidler; amino asit kompozisyonuna ve dizilimine bağılı olarak kalp-damar sistemi, sindirim sistemi, bağışıklık sistemi ve sinir sistemini etkileyebilmektedir. Biyoaktif peptidlerin opioid, antimikrobiyal, antioksidatif, antihipertansif, antitrombotik, immün düzenleme, mineral bağlayıcı, oligoelement (canlılardaki biyokimyasal olaylarda katalizör rolü oynayan element) nakli, enzim inhibisyonu ya da sindirim fonksiyonu düzenleme gibi etkileri bulunmaktadır (Pihlanto-Leppälä 2001, Bouhallab ve Bouglé 2004, Hafeez vd 2014).

Biyoaktif peptidler gıdaların işlenmesi sırasında fiziksel veya kimyasal olarak, özellikle de enzimlerin etkisi sonucunda üretilmektedir. Bu enzimler, gıda kaynaklı olabildikleri gibi ekzojen ya da mikrobiyal kaynaklı da olabilmektedir (Smacchi ve Gobetti 2000). Süt ürünleri, sütte doğal olarak oluşan enzimlerin proteolitik aktivitesi ya da ekzojen enzimlerin ve mikrobiyal starter enzimlerinin etkisi sonucu oluşan biyoaktif peptidleri içerebilmektedir. Söz konusu peptidler sütün işlenmesi sırasında oluşmaktadır. Biyoaktif peptidlerin mevcudiyeti süt ürünlerine fonksiyonel özellikler kazandırmakta ve bu ürünlerin besleyici değerini arttırmaktadır (Choi vd 2012).

Çoğu peynir çeşidi gibi süt ürünlerinde ve yoğurt, ekşi süt, dahi veya kefir gibi fermente süt ürünlerinde çeşitli biyoaktiviteye sahip peptidler tanımlanmıştır. Ayrıca günümüzde, fermantasyon sırasında oluşan veya katkı olarak eklenen biyoaktif peptidleri içeren çeşitli fermente süt içecekleri pazarlanmaktadır. İnek sütünden izole edilen peptidlerin anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitör, antimikrobiyal ve antitrombotik etkisi ya da bağışıklık sistemini düzenleyici aktivitesi gibi fonksiyonel özelliklerinin tanımlanmasına yönelik birçok çalışma bulunurken, kefirde bulunan biyoaktif peptidlerin tanımlanması ile ilgili yapılan araştırma sayısı yok denecek kadar azdır. Yapılan bu çalışmada, farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerinin peptid ve biyoaktif peptid profili ortaya konulmuş olup, söz konusu peptid profilleri üzerine üretim parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Ayrıca çalışmada; kefir danesi ve ticari kefir starter kültürü kullanılarak ve üretim sırasında farklı ısıl işlem normları, inkübasyon sıcaklıkları ile inkübasyon sonlandırma pH'ları uygulanarak üretilen kefir örneklerinin üretim sonrası ve depolama sırasında fizikokimyasal, mikrobiyolojik ve duyu özellikleri belirlenmiş ve elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışma ile kefir peptid profilinin dolayısı ile de biyoaktif peptid profilinin; farklı üretim parametrelerinin kefirde belirlenen biyoaktif peptidler üzerine etkisinin ve ideal kefir üretim yönteminin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

### 2.1. Kefir

#### 2.1.1. Kefirin tanımı

Süt ve süt ürünlerinin, beslenme ve sağlık açısından yararlarının anlaşılmasına paralel olarak tüketimi artmaktadır. Bununla birlikte gelişmiş ülkelerde tüketicilerin bu ürünlere olan ilgisinin daha da arttırılması ve tüketiminin daha cazip hale getirilmesi için süt ürünleri teknolojisinde yeni ürünlerin geliştirilmesi faaliyetleri hızla devam etmektedir. Fermantasyon işlemi yeni ürünlerin elde edilmesi amacıyla yararlanılan yöntemlerden biridir (Sezer 2003).

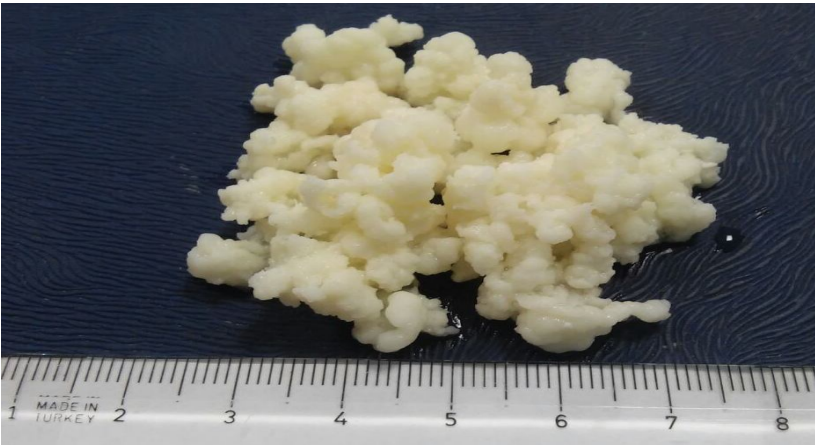
Fermente süt ürünleri; sütün başta laktik asit bakterileri olmak üzere belirli mikroorganizmalar tarafından fermente edilmesi sonucu elde edilen farklı yapı, görünüş, lezzete sahip ürünlerdir (Sezer 2003). Ülkemizde ticari olarak üretilen çeşitli fermente süt ürünleri bulunmaktadır. Bu ürünlerin içerisinde en çok bilinenlerden biri olan kefir, özellikle son yıllarda sağlığa yararlı etkilerinin ortaya konulması ile tüketimi artan bir fermente süt ürünüdür. Kefir; içerdiği uçucu yağ asitleri, karbondioksit ve etil alkol gibi maddelerden kaynaklanan kendine özgü ferahlatıcı tadı ve koyu kıvamı ile bilinen, kefir danelerinden elde edilen, bir polisakkarit matriksi içinde maya ve bakterilerin kompleks ve spesifik karışımda birlikte bulunduğu fermente bir süt ürünüdür (Demir 2001, Anonim 2011). Adı etimolojik olarak Türkçe'de keyif veren, coşturan, mest eden anlamlarındaki "keyf" sözcüğünden geldiği düşünülen kefir; kephir, kiaphur, kefer, knapan, kepi ve kipi gibi birçok şekilde adlandırılmaktadır (Dinç 2008). Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği'nde kefir; fermantasyonda spesifik olarak *Lactobacillus kefiri*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* ve *Acetobacter* cinslerinin değişik suşları ile laktozu fermente eden (*Kluyveromyces marxianus*) ve edemeyen (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces exiguus*) mayaları içeren starter kültürler ya da kefir danelerinin kullanıldığı fermente süt ürünü olarak tanımlanmaktadır (Anonim 2009).

#### 2.1.2. Kefir danesi

Kefir daneleri; beyaz veya sarımsı renkte, yumuşak ve jelatimsi yapıda, çapı 1-2 mm'den 3-6 mm'ye kadar değişen küçük karnabahar veya patlamış mısır görünümünde olan düzensiz partiküllerdir (Şekil 2.1) (Koroleva 1988, Dinç 2008). Kefir üretiminde kefir daneleri doğal starter kültür olarak rol oynamakta ve fermantasyon işleminden sonra fermente edilen süttten süzülerek geri kazanılmaktadır (Leite vd 2013). Kefir fermantasyon işleminden sonra inokülantı, yani kefir daneleri, fermente sütün süzülmesi ya da filtre edilmesi yolu ile geri kazanılan tek fermente süt ürünüdür (Rattray ve O'Connel 2011). Kefir daneleri günlük olarak taze süte aktarılıp yaklaşık 20 saat inkübe edilerek canlı tutulmakta ve inkübasyon işlemi sonucunda danelerin kütlesi inkübasyon koşullarına bağlı olarak yaklaşık olarak %25 oranında artmaktadır. Kefir danelerinin canlılıklarını devam ettirebilmeleri için bu işlemin sürekli olarak yapılması gerekmektedir. Aksi takdirde, eskimiş ya da kurumuş kefir daneleri ya hiç çoğalamamakta ya da çok az düzeyde çoğalabilmektedir (Farnworth 2005).

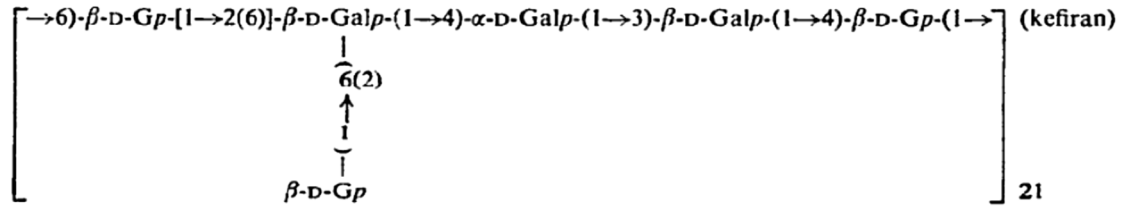


Schoevers ve Britz (2003) üretimde kullanılan sütün yağ oranı (tam yağlı ve yarım yağlı), inkübasyon sıcaklığı (18, 22, 25 ve 30°C), ortamın triptoz (20 g/L) ve maya ekstraktı (20 g/L) kombinasyonları ile zenginleştirilmesi ve inkübasyon sırasında çalkalama olup olmaması gibi farklı inkübasyon koşullarının kefir danesinin kütle artışı üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmada, 10 gün sonunda en yüksek kütle artışının %582 oranında olduğu ve söz konusu ortamın aktifleştirilmiş olan kefir danelerinin sadece triptoz (20 g/L) ilave edilerek zenginleştirilmiş yarım yağlı sütte 25°C'de çalkalamalı bir şekilde inkübasyonu sonucunda elde edildiği saptanmıştır. Aynı koşullar altında tam yağlı süt içinde inkübasyon sonucunda kefir danesinin kütle artışı %522 oranında arttığı tespit edilmiştir. Çalkalamasız yapılan inkübasyon işlemlerinde kefir danesinin kütle artışı tam ve yarım yağlı sütte sırasıyla %175 ve %173 oranında olduğu belirlenmiştir.



Şekil 2.1. Kefir danesinin makroskobik görünümü

Kefir daneleri, bakteri ve mayalardan oluşmakta; bu mikroorganizmaların etrafını glukoz ve galaktozdan oluşan, soğuk suda yavaş, sıcak suda hızlı çözünme özelliği gösteren polisakkarit bir yapı olan "kefiran" adı verilen bir madde çevrelemektedir (Lopitz-Otsoa vd 2006). Kefiran, kefir danesi kurumaddesinin yaklaşık %24'ünü oluşturmaktadır (El-Hayek 2011). Kefir içeceği ise yaklaşık %0.2-0.7 oranında kefiran içermekte ve kefiran ürüne hafif yapışkanimsi bir yapı kazandırmaktadır (Mistry 2004). Kefiranın oluşumuna neden olan metabolik olaylar tam olarak anlaşılamamakla birlikte, başlıca glukoz ve galaktozun dallanmış hekza- ve heptasakkaritlerinin tekrarlayan birimlerinden oluştuğu bildirilmektedir (Şekil 2.2) (Güzel-Seydim vd 2005). Ayrıca süt yağı ve denatüre olmuş süt proteinlerinin bu polisakkarit bileşiminin oluşumunda etkili olduğu belirtilmektedir (Beshkova vd 2002). *Lactobacillus kefiranofaciens* ve *Lactobacillus kefir* gibi çeşitli homofermentatif *Lactobacillus* türleri bu polisakkariti üretebilmektedir (Irigoyen vd 2005). Mikroorganizmalar ve polisakkarit yapının yanı sıra, süt proteinleri ve lipidler kefir danesinin diğer temel bileşenlerini oluşturmaktadır (Ratray ve O'Connell 2011). Kefir danesinin ağırlık oranına (w/w) göre %89-90 su, %0.2 yağ, %3.0 protein, %6.0 karbonhidrat ve %0.7 oranında mineral madde içerdiği bildirilmektedir (Yıldız 2009).



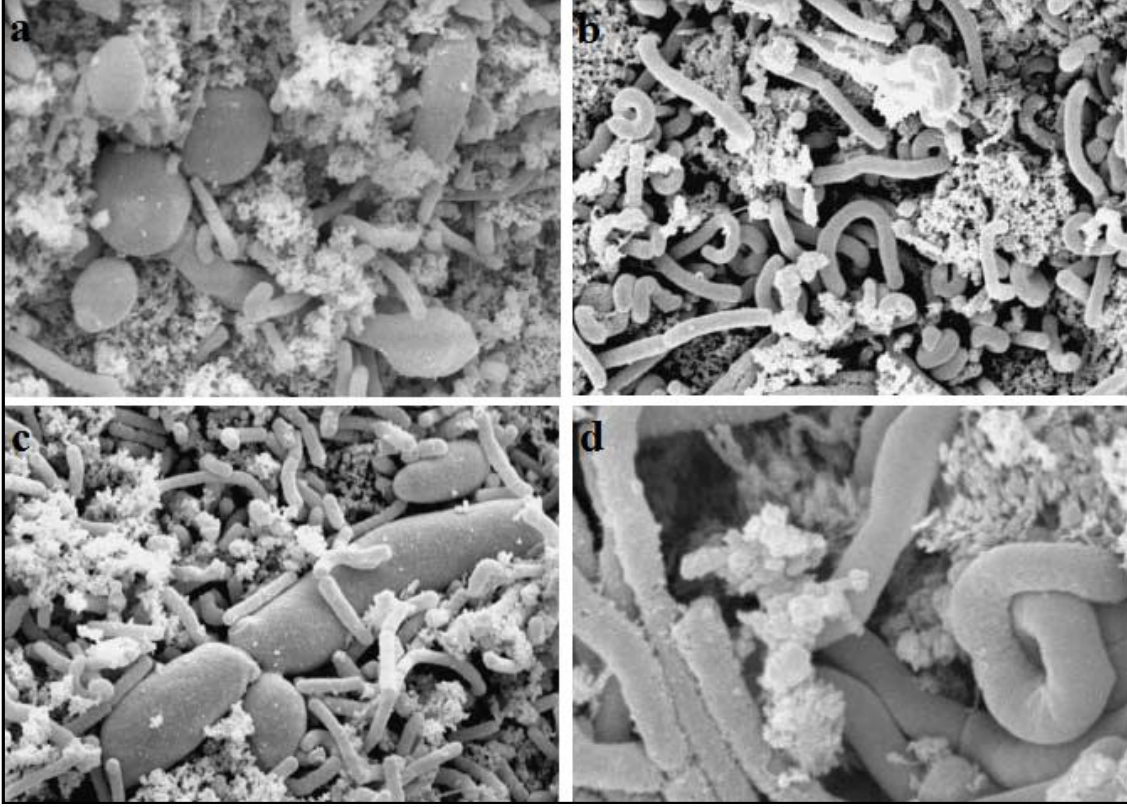
Şekil 2.2. Kefiranın kimyasal yapısı (Kooiman 1968)

### 2.1.3. Kefir danesi ve kefirin mikrobiyolojik özellikleri

Polisakarit ve protein matriksi üzerine immobilize olan mikroorganizmalardan oluşan kefir daneleri, maya ve bakterilerin simbiyotik ilişkisinin en mükemmel örneğidir. Söz konusu simbiyotik ilişki kefir danelerinin gelişimi ve gıda patojenleri ve kontaminantları gibi mikroorganizmaların ise inhibisyonu için gerekli biyoaktif metabolitlerin sentezini sağlamaktadır (Garrote vd 2010, Altay vd 2013, Leite vd 2013). Kefir danesi genel olarak laktik asit oluşturan mezofilik streptokoklar, aroma oluşturan streptokoklar, mezofilik ve termofilik laktik asit bakterileri, laktozu fermente eden ve edemeyen mayalarla asetik asit bakterilerini içeren kompleks bir mikrofloraya sahip olup, bu mikroorganizmaların sayı ve oranları danenin elde edildiği bölgeye göre değişiklik göstermektedir (Sezer 2003). Genel olarak; dane mikroflorasının yaklaşık %65-80'ini laktobasiller, %20'sini streptokoklar ve %5'ini mayalar oluşturmaktadır (Libudzisz ve Piatkiewicz 1990, Wszolek vd 2001). Laktik asit bakterileri; laktik asit, CO<sub>2</sub> ve etanol oluşumuna, asetik asit bakterileri; kefir danelerindeki simbiyoz yaşamın sürdürülmesine ve kefirin viskozitesinin artırılmasına, mayalar ise simbiyoz yaşama, CO<sub>2</sub> oluşumuna ve karakteristik tat ve aroma gelişimine yardımcı olmaktadır (İnal 1990). Fermantasyon sonrasında, kefir danelerinin biyokütlesi yaklaşık olarak %5-7 oranında artış göstermektedir (Ratray ve O'Connell 2011).

Mikroorganizmalar kefir danesi bünyesinde farklı tabakalarda bulunmaktadır. Genel olarak, kefir danesinin dış kısmında laktobasillerin hakim florayı oluşturduğu, dane merkezine doğru ise mikrofloranın büyük bir bölümünü mayaların oluşturduğu belirtilmektedir (Wouters vd 2002). Kefir danesi içerisinde bulunan mikroorganizmaların dağılımı ile ilgili taramalı elektron mikroskopu (SEM) kullanılarak birçok bilimsel çalışma yapılmış olmakla birlikte, çalışmaların sonuçları farklılık göstermektedir. Konu ile ilgili yapılmış bir çalışmada mayaların kefir danesinde genellikle iç ve orta kısımlarda bulunduğu, buna karşın laktobasillerin ve nadir olarak laktokokların danenin dış kısmında yer aldığı tespit edilmiştir (Bottazzi ve Bianchi 1980). Toba vd (1990) ise, kefir danesinin dış kısmında hem laktobasil hem de çok az miktarda mayaların bulunduğunu, ancak danenin merkezinde hakim florayı mayaların oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Brezilya kefir danelerinde de laktobasillerin hem iç hem de dış kısımda, buna karşın mayaların iç kısımda daha yoğun olarak bulunduğu belirlenmiştir (Leite vd 2013). Jianzhong vd'nin (2009) SEM kullanarak Tibet kefir danelerini inceledikleri bir çalışmada; maya ve laktobasillerin kefir danelerinin hem iç hem dış kısmında bulunduğu, ancak Tibet kefir danelerinin iç kısmında bulunan laktobasiller ile dış kısmında bulunanlar arasında morfolojik farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Dış kısımda bulunan laktobasillerin uzun ve kıvrımlı yapıda olduğu, buna karşın iç kısımda bulunanların kısa ve düzgün yapıda olduğu gözlemlenmiştir. Türk kefir danelerinin SEM kullanılarak mikrobiyal dağılımının

incelendiği bir çalışmada ise, kefir danesi içerisinde maya hücreleri ile birlikte 3 farklı tipte (kısa, uzun ve kıvrımlı) laktobasil belirlenmiştir. Danenin iç kısımlarında kısa, uzun ve kıvrımlı laktobasillerin yer aldığı, ancak mayaların bulunmadığı, kısa olan laktobasillerin ise genel olarak danenin dış kısımlarında bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 2.3) (Güzel-Seydim vd 2005). İrlanda kefir danelerinde uzun ve kıvrımlı laktobasillerin danenin iç kısmında yer aldığı tespit edilmiştir (Rea vd 1996).



Şekil 2.3. Türk kefir danesinin SEM görüntüleri. Türk kefir danesinin dış yüzey görüntüleri (a ve c), Türk kefir danesinin iç yüzey görüntüleri (b ve d) (Güzel-Seydim vd 2005)

Kefir daneleri tarafından fermente edilen sütte baskın mikroorganizma gruplarından biri laktokoklar olmasına rağmen, birçok araştırmacı kefir danelerinde yaptıkları SEM analizlerinde kokları tespit edememişlerdir. Söz konusu durumun gelişim sırasında daneye çok zayıf bir şekilde bağlanan laktokokların SEM analizlerinde örnek hazırlama aşamasındaki yıkama işlemi sırasında daneden ayrılmalarından kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir (Rea vd 1996, Güzel-Seydim vd 2005, Jianzhong vd 2009, Magalhães vd 2012). Bu konudaki bir başka görüş ise, yüksek asit üretme yeteneğine sahip olan laktobasillerden dolayı kefir danesinin iç kısmındaki pH'nın düşük olmasının buradaki laktokokların gelişimini engelleyebileceği şeklindedir (Rea vd 1996).

Kefir danelerinin mikrobiyal dağılımı; dane-süt oranı, inkübasyon sıcaklığı ve süresi, kefir danelerinin kefirde ayrılması sırasındaki sanitasyon, danelerin yıkanması ve depolama koşulları, ürün kalitesini ve kefir danelerinin mikroflorasını önemli derecede etkilemektedir (Güzel-Seydim vd 2005). Ayrıca substrat olarak farklı tip süt kullanımının

da kullanılan sütün karbonhidrat, yağ ve protein içeriğine bağlı olarak kefir mikroflorası üzerinde etkisi bulunmaktadır (Wszolek vd 2001). Kefir ve kefir danelerinde *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. ve maya sayılarının sırasıyla  $1.0 \times 10^1$ - $4.8 \times 10^9$  kob/mL,  $1.0 \times 10^5$ - $1.0 \times 10^9$  kob/mL ve  $<1.0 \times 10^2$ - $7.9 \times 10^6$  kob/mL arasında değiştiği belirtilmektedir (Altay vd 2013).

Yüksek kaliteli kefirin mikrobiyal bileşimi şu şekilde verilmektedir:

- Termofilik laktobasil sayısının  $10^7$ - $10^8$  kob/mL
- Homofermantatif mezofilik laktik asit streptokok sayısının  $10^9$  kob/mL
- Heterofermantatif laktik asit streptokok sayısının  $10^7$ - $10^8$  kob/mL
- Maya sayısının  $10^4$ - $10^5$  kob/mL
- Asetik asit bakterilerinin sayısının  $10^4$ - $10^5$  kob/mL arasında değiştiği bildirilmektedir (Koroleva 1988, Kurmann 1992).

Yapılan bir çalışmada, süte farklı oranlarda (%1 ve %5) kefir danesi inoküle edilerek kefir üretilmiş ve kefir örnekleri  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 28 gün boyunca depolanmıştır. Kefir örnekleri inkübasyondan hemen sonra ve depolamanın 2., 7., 14., 21. ve 28. günlerinde mikrobiyolojik özellikleri bakımından incelenmiştir. Çalışma sonucunda, depolama süresince laktobasil ve laktokok sayılarında bir azalış olduğu, buna karşın maya ve asetik asit bakterisi sayılarının sabit kaldığı tespit edilmiştir. Üretimde kullanılan kefir danesi oranı arttıkça kefir örneklerinde laktik asit bakterisi sayısının arttığı, maya ve asetik asit bakterisi sayılarının ise azaldığı belirlenmiştir (Irigoyen vd 2005).

Güzel-Seydim vd (2005) yaptıkları bir çalışmada kefir danesinin ve üretilen kefirin inkübasyon ve depolama süresince mikrobiyal florasını araştırmışlardır. Bu amaçla, sütler inkübasyonun başlangıcı ile 5., 10., 15. ve 22. saatlerinde ve üretilen kefir örnekleri depolamanın başlangıcı ile 7., 14. ve 21. günlerinde mikrobiyolojik özellikleri bakımından incelenmiştir. Çalışma sonucunda kefir danesindeki toplam laktik asit bakterisi, laktokok, laktobasil ve maya sayılarının kefir örneklerindeki kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Toplam laktik asit bakterisi, laktokok, laktobasil ve maya sayılarının inkübasyon süresince arttığı, laktobasil ve laktokok sayılarının depolamanın 14. gününden itibaren azaldığı, buna karşın maya sayısının depolama süresince arttığı belirlenmiştir.

Bir başka çalışmada kefirin fermantasyon ve depolama süresince mikrobiyolojik özellikleri araştırılmıştır. Bu amaçla, sütler fermantasyonun başlangıcı ile 6., 12., 18. ve 24. saatlerinde ve üretilen kefir örnekleri depolamanın 2., 7., 24. ve 28. günlerinde mikrobiyolojik özellikleri bakımından incelenmiştir. Sütün  $25^\circ\text{C}$ 'de 24 saatlik fermantasyonu süresince yapılan mikrobiyolojik analizleri sonucunda, laktik asit bakteri sayısının M17 agarda fermantasyonun 12. saatinde logaritmik olarak 4 birimlik bir artış gösterdiği, buna karşın bu artışın MRS agarda 2 logaritmik birim olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca laktik asit bakterisi sayılarının fermantasyonun 18. saatinde maksimum değere (10 log kob/mL) ulaştığı belirlenmiştir. Asetik asit bakterisi sayılarının fermantasyonun 12. saatinde belirgin bir artış gösterdiği ve fermantasyonun 24. saatinde maksimum değere (7.8 log kob/mL) ulaştığı tespit edilmiştir. Maya sayılarının ise fermantasyonun 12. saatine kadar arttığı ve fermantasyon sonuna kadar bu değerde (6.0 log kob/mL) sabit kaldığı görülmüştür. Depolama süresince kefir örneklerindeki laktik asit bakterisi ve

maya sayılarının sabit kaldığı, buna karşın asetik asit bakteri sayısının 0.6 logaritmik birimlik azalış gösterdiği belirlenmiştir (Leite vd 2013).

### 2.1.3.1. Kefir bakterileri

Kefirde bulunan heterofermantatif laktik asit bakterileri grubunu oluşturan *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefirgranum* ve *Lactobacillus acidophilus* gibi laktobasiller ve *Lactococcus lactis* spp. *lactis* ve *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* ve *Streptococcus thermophilus* gibi laktokoklar laktozu fermente ederek laktik asit üretmektedir. *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus parakefir*, *Lactobacillus fermentum* ve *Lactobacillus brevis* gibi heterofermantatif laktik asit bakterileri ise laktozu fermente edip laktik asit ve CO<sub>2</sub> üretmektedir. Ayrıca kefirde *Leuconostoc mesenteroides* spp. *cremoris* ve *Leuconostoc mesenteroides* spp. *mesenteroides* ve *Lc. lactis*'in sitrat pozitif suşları gibi heterofermantatif laktokoklar ve sitratı fermente eden suşlar da bulunmaktadır. *Lc. lactis*'in sitrat pozitif suşlarının sitratı kullanması sonucunda diasetil, asetaldehit, etanol ve asetat oluşurken, sitratın *Leu. mesenteroides* spp. *cremoris* ya da *Leu. mesenteroides* spp. *mesenteroides* tarafından kullanılması sonucunda diasetil, etanol ve asetat oluşmaktadır. Söz konusu bakteriler tarafından sitratın kullanılması sonucu üretilen tüm bu bileşenler kefirdeki karakteristik lezzetin oluşumunda rol oynamaktadır. Ayrıca kefir danelerinde *Acetobacter aceti* ve *Acetobacter rasens* gibi asetik asit bakterileri de bulunabilmektedir (Ratray ve O'Connell 2011). Çizelge 2.1'de kefirde tanımlanan bakteriler sunulmuştur.

Homofermantatif laktobasiller (*Lactobacillus kefir*) bakteriyel floranın en önemli bölümünü oluşturmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda kefirde *Lactobacillus kefiranofaciens* olarak adlandırılan yeni bir laktobasil türü tanımlanmıştır. Kefir danesinin dış polisakkarit katmanı olan kefiranın daha ziyade bu bakteri tarafından üretildiği bildirilmektedir (Nale 2013). Kefiranın *Lb. kefiranofaciens* tarafından üretimi söz konusu bakterinin *Saccharomyces cerevisiae* ile beraber geliştirilmesi durumunda gerçekleşmektedir (Ratray ve O'Connell 2011). Kefiranın üretiminde rol oynayan *Lb. kefir* kefir danesinin yüzey kısmında küçük bir bölgede yoğunlaşırken, *Lb. kefiranofaciens* kefir danesinin yüzey kısmında ve merkezinde bulunmaktadır (Arihara vd 1990).

Kefir danesi ve kefirin bakteriyel kompozisyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan kefir daneleri ve kefir içeceklerinde laktik asit bakteri mikroflorası kültüre bağımlı ve kültürden bağımsız metotlar kullanılarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda kefir daneleri ve kefir içeceklerindeki toplam laktobasil ve laktokok sayılarının sırasıyla 6.5-8.0 log kob/g, 6.5-8.3 log kob/g arasında değiştiği tespit edilmiştir. Kültürden bağımsız metot kullanılarak yapılan analizlerde kefir danesinin mikrobiyal kompozisyonunun kefir içeceğinden farklı olduğu belirlenmiştir. Bu metotla yapılan analizlerde toplamda 10 farklı bakteri türü belirlenmiş olup bu bakteri türlerinden *Lb. kefiranofaciens* türünün kefir danelerinde, *Lc. lactis*'in ise kefir içeceklerinde daha yaygın olduğu saptanmıştır. Kültüre bağımlı metot kullanılarak yapılan analizlerde kültürden bağımsız olarak yapılanlardan farklı olarak kefir danelerinde *Pseudomonas* spp. ve *Acetobacter syzgiae* tespit edilmiştir. Ayrıca kültürden bağımsız olarak yapılan analizlerde kefir danelerinde tespit edilen *Lb.*

*kefiranofaciens* bakterisi kültüre bağımlı metotla tespit edilememiştir. Kefir daneleri ve içeceklerinde *Lc. lactis*, *Lb. acidophilus* ve *Str. thermophilus* bakterileri her iki yöntemle de tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, kefir danelerinde ve kefir içeceklerinde detaylı ve güvenilir bir şekilde bakteriyel kompozisyonun belirlenmesinde her iki yöntemin beraber kullanılmasının daha sağlıklı olacağı sonucuna varılmıştır (Kesmen ve Kacmaz 2011).

Çizelge 2.1. Kefirin ve kefir danelerinin mikroflorası (Ratray ve O'Connell 2011)

Laktobasiller	Laktokoklar ve Lökönostok türleri	Mayalar	Diğerleri
<b>Homofermantatif</b>	<b>Homofermantatif</b>	<b>Laktozu fermente edebilen</b>	
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lc. lactis</i> spp. <i>lactis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (t)* / <i>Candida kefir</i> (a)	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lc. lactis</i> spp. <i>cremoris</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i> spp. <i>lactis</i>	<i>Acetobacter aceti</i>
<i>Lb. helveticus</i>		<i>Debaryomyces hanseii</i> (t) / <i>Candida famata</i> (a)	<i>Acetobacter rasens</i>
<i>Lb. kefiranofaciens</i>		<i>Dekkera anomala</i> (t) / <i>Brettanomyces anomalus</i> (a)	<i>Enterococcus durans</i>
<i>Lb. kefirgranum</i>			<i>Galactomyces geotrichum</i> (t) / <i>Geotricum candidum</i> (a)
<b>Heterofermantatif</b>	<b>Heterofermantatif</b>	<b>Laktozu fermente edemeyen</b>	
<i>Lb. kefir</i>	<i>Lc. lactis</i> (sitrata pozitif)	<i>Saccharomyces unisporus</i>	
<i>Lb. parakefir</i>	<i>Leu. mesenteroides</i> spp. <i>cremoris</i>	<i>Saccharomyces turicensis</i>	
<i>Lb. brevis</i>	<i>Leu. mesenteroides</i> spp. <i>mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>Lb. plantarum</i>	<i>Leu. mesenteroides</i> spp. <i>dextranicum</i>	<i>Saccharomyces exiguus</i>	
<i>Lb. casei</i> spp. <i>casei</i>		<i>Saccharomyces pastorianus</i>	
<i>Lb. paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>		<i>Pichia fermentans</i> (t) (a) / <i>Candida firmetaria</i>	
<i>Lb. fermentum</i>		<i>Torulaspora delbrueckii</i>	
<i>Lb. rhamnosus</i>		<i>Candida friedrichii</i>	
<i>Lb. fructivorans</i>		<i>Candida humilis</i>	
<i>Lb. hilgardii</i>		<i>Issatchenkia orientalis</i> (t) / <i>Candida krusei</i> (a)	
		<i>Candida maris</i>	
		<i>Debaryomyces occidentalis</i>	
		<i>Yarrowia lipolytica</i> (t)	
		/ <i>Candida lipolytica</i> (a)	

\* (t): telemorf (eşeyli üreme fazı); (a): anamorf (eşeysiz üreme fazı)

### 2.1.3.2. Kefir mayaları

Kefir danesinden izole edilen mayalar laktozu fermente edebilen (*Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* spp. *lactis*, *Debaryomyces hanseii* ve *Dekkera anomala*) ve fermente edemeyen mayalar (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces turicensis*, *Issatchenkia*

*orientalis* ve *Debaryomyces occidentalis*) olarak sınıflandırılmakta olup kefirde hakim maya grubunu laktozu fermente edemeyen mayalar oluşturmaktadır (Çizelge 2.2). Laktozu fermente edemeyen mayalar kefir danesinin iç kısımlarında bulunurken, laktozu fermente edebilen mayalar daha çok danenin dış kısımlarında yer almaktadır. Kefirde etanol ve CO<sub>2</sub> üretiminden mayalar sorumlu olmakla birlikte, *Lb. kefir* gibi heterofermantatif laktobasiller de alkol ve CO<sub>2</sub> üretebilme yeteneğine sahiptir (Ratray ve O'Connell 2011).

### 2.1.3.3. Kefirde bakteri-maya etkileşimi

Kefir danesindeki bakteriler ve mayalar arasındaki etkileşim danede bulunan her bir suşun aktivitesi üzerinde belirgin bir etkiye sahiptir (Garrote vd 2010). Fermantasyon sırasında mayalar tarafından üretilen vitamin ve amino asitler laktik asit bakterilerinin gelişimini hızlandırmakta iken, laktik asit bakterilerinin ürettiği laktik asit mayalar tarafından enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Kefirde bulunan bakteriler ve mayalar arasındaki bu ilişkinin simbiyotik bir ilişki olabileceği düşünülmektedir (Garrote vd 2010). Kefir mayaları ve *Acetobacter* spp. türleri tarafından üretilen vitaminin laktik asit bakterilerinin gelişimini hızlandırdığı bildirilmiştir. Ayrıca *Debaryomyces hansenii* ve *Yarrowia lipolytica* gibi maya türlerinin laktik asit bakterileri tarafından üretilen laktik asidi asimile ederek pH'yı arttırdığı ve böylece laktik asit bakterilerinin gelişimini teşvik ettiği belirtilmektedir. Kefirde bulunan bakterilerin mayalardan ayrıldığı zaman etkili bir gelişim gösteremeyi belirlenmiştir (Ratray ve O'Connell 2011). *Lactobacillus kefir*'in bulunduğu süte *Candida kefir* mayası inoküle edildiğinde söz konusu bakterinin daha iyi geliştiği bildirilmektedir (Farnworth 2005). Kefir bakterilerinin gelişimi için gerekli ortamı sağlayan mayalar tarafından üretilen metabolitler ayrıca kefirin ağızda bıraktığı hisse ve lezzete katkıda bulunmaktadır (Garrote vd 2010).

### 2.1.4. Kefir danesinin muhafazası

Kefir danesini oluşturan mikroorganizmaların canlılığını koruyabilmesi ve çoğalabilmesi için dane içerisinde yeterli oranda bulunması gerekmektedir. Kefir daneleri liyofilize edilerek, kurutularak ya da ıslak bir şekilde muhafaza edilebilmektedir (Garrote vd 2010). Kurutulan kefir daneleri 12-18 hafta boyunca canlılığını korurken, 4°C'de ıslak olarak depolanan kefir daneleri 8-10 gün içinde aktivitelerini kaybetmektedir. Aşırı yıkama ve yanlış kullanım sonucu kefir danesindeki mikrofloranın bozulması son ürün kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Uzun süreli depolama için, kefir danelerinin oda sıcaklığında 36-48 saat süreyle kurutulduktan sonra soğuk ve kuru bir ortamda depolanması veya donmuş bir şekilde muhafaza edilmesi tavsiye edilmektedir. Ayrıca düşük sıcaklıklarda depolamanın kefir danelerinin uzun süreli kullanımını için en iyi yol olduğu belirtilmektedir (Farnworth 2005).

Garrote vd (1997) kefir danesini muhafaza etmede farklı yöntemleri araştırdıkları çalışma sonucunda, -80 ve -20°C'de 120 gün boyunca depolanmış kefir daneleri ile depolanmayan ve 120 gün boyunca 48 saatte bir sütü değiştirilen kefir daneleri arasında fermantasyon özellikleri bakımından herhangi bir farklılık olmadığını tespit etmişlerdir. Ayrıca -80 ve -20°C'de 120 gün boyunca depolanan kefir daneleri kullanılarak üretilen kefir örnekleri ile depolanmayan taze kefir daneleri kullanılarak üretilen kefir örneklerinin titrasyon asitliği değerleri, mikrobiyolojik ve reolojik özellikler bakımından



benzer olduğu saptanmıştır. Buna karşın 4°C’de depolanmış kefir daneleri kullanılarak üretilen kefirin standart kefirin arzu edilen titrasyon asitliği ve viskozite değerine sahip olmadığı tespit edilmiştir. Araştırmada kefir danesini -20°C’de muhafaza etmenin ev tipi kefir üretimi için iyi bir metot olduğu sonucuna varılmıştır.

Ev koşullarında içinde bulunduğu sütün günlük olarak değiştirilmesi ile çoğaltılan kefir daneleri ile 3 ay boyunca oda sıcaklığında (20-25°C) veya 4°C’de depolanan kefir danelerinin mikrobiyal floralarının taze olan kefir danelerine göre oldukça farklı olduğu tespit edilmiştir. Ev şartlarında günlük olarak sütünün değiştirilmesiyle canlılığı korunmaya çalışılan kefir daneleri ile oda sıcaklığında 3 ay boyunca depolanan kefir danelerinde laktobasil, streptokok ve maya sayılarında azalma olduğu, 4°C’de 3 ay boyunca depolanan kefir danelerinde de laktobasil ve streptokok sayılarının azaldığı, maya sayısının ise arttığı belirlenmiştir. Çalışmada 3 ay boyunca 4°C’de depolanan kefir danelerinin mikroflorası ile taze kefir danelerinin mikroflorasının sayı bakımından benzer olması ise genel olarak kabul gören kefir danelerinin 4°C’de depolanmasının daneleri depolamada en iyi yöntem olduğu düşüncesini doğrulamıştır (Pintado vd 1996).

### **2.1.5. Kefir üretim yöntemleri**

Kefir üretimi temel olarak iki şekilde gerçekleşmektedir: (i) kefir daneleri veya kefir danesinden üretilen kefirin ana kültür olarak kullanılması ile üretilen kefir ve (ii) ticari kefir starter kültürlerinin direkt olarak süte inoküle edilmesi yoluyla üretilen kefir (Ratray ve O’Connell 2011).

Geleneksel yöntemle kefir üretiminde çiğ süt genel olarak 85-90°C’de 20 dakika ısıtılma tabii tutulduktan sonra 20-25°C’ye soğutulmaktadır. Soğutulan süte %2-10 (genellikle %5) oranında kefir danesi aşılanıp 20-25°C’de 18-24 saat inkübasyona bırakılmaktadır. Inkübasyon sonunda kefir daneleri steril bir süzgeç yardımıyla pıhtıdan ayrılarak steril saf su ile yıkanmaktadır. Kefir danelerinin ayrılması ile elde edilen kefir, 4°C’de depolanarak tüketime sunulmaktadır. Pıhtıdan ayrılan kefir daneleri ise bir sonraki aşılama işlemine kadar steril süt içerisinde 4°C’de muhafaza edilmektedir (Dinç 2008).

Kefir daneleri kullanılarak üretilen kefir örnekleri, kefir danelerinin mikrofloralarının değişken olmasından dolayı nitelik açısından önemli ölçüde farklılık gösterebilmektedir (Ratray ve O’Connell 2011). Kefir danelerinin fermantasyon başlangıcındaki büyüklüğü son ürünün pH, viskozite ve mikroflorasını etkilemektedir (Farnworth 2005). Bununla birlikte, fermantasyon işlemindeki farklılıklar son ürünün lezzet ve tekstüründe belirgin değişikliklere neden olabilmektedir. Yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen inkübasyon işlemi (>30°C) maya ve mezofilik laktik asit bakterilerinin aksine termofilik laktik asit bakterilerinin gelişimini desteklemekte; benzer şekilde, fermantasyon işlemi sırasında yapılan çalkalama işlemi sonucunda homofermantatif laktik asit bakterilerinin sayısı artarken, asetik asit ve homofermantatif laktik asit bakteri sayısında herhangi bir değişiklik olmamaktadır. Söz konusu tüm faktörler son ürünün duyu özelliklerini etkilemektedir (Ratray ve O’Connell 2011).

Geleneksel yöntemle üretimin zor olması, ticari starter kültür kullanımının ürün standardizasyonu açısından avantajları, kontaminasyon riski ve talep artışını karşılamak



gibi nedenlerden dolayı endüstriyel yöntemle kefir üretimine olan ilgi artmaktadır (Hertzler ve Clancy 2003, Dinç 2008). Endüstriyel yöntemle kefir üretiminde kurumadde miktarı standardize edilen süt homojenize (12.5-17.5 MPa) edilmekte ve 85-87°C'de 5-10 dakika ya da 90-95°C'de 2-3 dakika ısıl işleme tabi tutulmaktadır. Daha sonra inkübasyon sıcaklığına soğutulan süte %1-5 oranında kefir starter kültürü inoküle edilerek 22-25°C'de 8-12 saat süre ile inkübasyona bırakılmaktadır. İnkübasyon sonunda elde edilen kefir ambalajlara doldurularak, aroma ve kıvam oluşumunu sağlamak amacıyla 8-10°C'de 10-12 saat olgunlaştırma işlemine tabi tutulduktan sonra 4°C'de depolanmaktadır (Koroleva 1988).

Endüstriyel yöntemle üretilen kefirin, geleneksel yöntemle üretilen kefire göre daha kıvamlı ve maya tadının daha az olduğu, endüstriyel ve geleneksel yöntemle üretilen kefir örneklerinin mikrobiyal ve fizikokimyasal özellikleri bakımından farklılık gösterdiği bildirilmektedir (Hafliger vd 1991). Konu ile ilgili yapılan bir araştırmanın sonuçlarına göre; kefir danesi kullanılarak üretilen kefirin duyuşsal özelliklerinin kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefire göre daha iyi olduğu belirtilmektedir. Bununla beraber kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefirlerde titrasyon asitliğinin daha düşük ve serum ayrılmasının daha az olduğu tespit edilmiştir (Lopitz-Otsoa vd 2006). Kefir danesi kullanılarak üretilen kefirin raf ömrü 3 ila 12 gün arasında değişmekte iken, ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefirin raf ömrü 28 güne kadar çıkabilmektedir (Rattray ve O'Connell 2011). Geleneksel yöntem kullanılarak üretilen kefir, endüstriyel yöntemle üretilen kefire göre tüketiciler tarafından daha çok beğenildiğinden dolayı bu yöntemle üretilen kefire yakın özelliklere sahip ürün elde etmeye yönelik modern teknikler ve yöntemlerin kullanılması ile ilgili çalışmalar artmaktadır (Karagözlü vd 2007).

Starter kültür çeşidinin kefirin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, tam yağlı ve yağsız sütlere %1 oranında kefir danesi ve ticari kefir starter kültürü inoküle edilmiş ve üretilen kefir örnekleri 4°C'de 28 gün boyunca depolanmıştır. Çalışma sonucunda, kefirin mikrobiyal canlılığı üzerine üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin ve depolama süresinin önemli bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinin pH değerlerinin depolama süresince düştüğü, ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinin pH değerlerinin ise depolama sürecinin başlarında düştüğü daha sonra tekrar yükseldiği tespit edilmiştir. Ayrıca depolamanın 28. gününde kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinin pH değerlerinin, ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerine göre daha düşük, titrasyon asitliği değerlerinin ise daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinin laktoz miktarı ve serum ayrılması değerlerinin kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine kıyasla daha düşük olduğu; buna karşın sertlik değerlerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Depolama süresince örneklerin laktoz miktarında azalış, serum ayrılması ve sertlik değerlerinde ise genel olarak artış olduğu saptanmıştır (Montanuci vd 2012).

Kefir; inek, keçi ve koyun sütleri ile hindistan cevizi sütü, pirinç sütü ve soya sütü gibi farklı sütlerden üretilmesine rağmen kefir üretiminde genel olarak inek sütü kullanılmaktadır (Öner vd 2010). Keçi sütünden üretilen kefirin inek sütünden üretilene göre daha düşük viskoziteye sahip olduğu bildirilmektedir. Ayrıca üretiminde keçi sütü

kullanılan kefirin duyusal olarak tüketiciler tarafından kabul görmediği ve bu nedenle kefir üretiminde kullanımının uygun olmadığı belirtilmiştir. Buna karşın koyun sütü diğer sültere kıyasla yüksek düzeyde linoleik ve linolenik asit içerdiğinden ve orta zincirli doymuş yağ asitlerini bünyesinde düşük seviyelerde bulundurduğundan kefir üretiminde tercih edilmektedir (Yıldız 2009). Yapılan bir çalışmada, kefir danesinde bulunan laktik asit bakterilerinin soya sütünde inek sütüne kıyasla daha yavaş geliştiği belirlenmiştir (Liu ve Lin 2000).

İnek, koyun ve keçi sülteri ile kefir danesi ve ticari kefir starter kültürü kullanımının kefirin kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, üretilen kefir örnekleri 4°C'de 15 gün boyunca depolanmıştır. Keçi sülteninden üretilen kefir örnekleri dışında kefir danesi kullanılarak üretilen tüm kefir örneklerinde toplam kurumadde miktarında depolama süresince azalma olduğu gözlemlenirken, ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde toplam kurumadde miktarında depolama süresince değişme olmadığı görülmüştür. Koyun sülteninden kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örnekleri hariç diğer örneklerde etanol içeriğinde depolama süresince düzenli bir artış tespit edilmiştir. En yüksek etanol içeriği ise inek sülteninden ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde depolamanın 15. gününde belirlenmiştir. Ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde laktokok sayısında depolama süresince artış, kefir danesi ile üretilen kefir örneklerinde ise depolama süresince laktokok sayısında azalış olduğu tespit edilmiştir. Kefir örneklerindeki laktobasil ve maya sayısında depolama süresince önemli bir değişme olmadığı saptanmıştır (Öner vd 2010).

Kefirde laktik asit bakterisi ve maya popülasyonu üzerine farklı tip sülterin kullanımının etkisinin incelendiği bir çalışmada inek, koyun ve keçi sülteri kefir danesi inoküle edilerek 25°C'de 21 saat inkübe edilmiş ve üretilen kefir örnekleri 4°C'de 7 gün boyunca depolanmıştır. İnkübasyon ve depolama süresince kefir örneklerinde *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* + *Leuconostoc* spp. bakterileri ile mayaların canlı kalma durumları incelenmiştir. Çalışmada üretim sonrası kefir örneklerinde kefir danesi aşılana sültere göre *Lactobacillus* spp. ve *Lactococcus* + *Leuconostoc* spp. bakterileri ile maya sayılarında artış olduğu gözlemlenmiştir. *Lactobacillus* spp. bakterilerinin koyun sülteninde, *Lactococcus* + *Leuconostoc* spp. bakterilerinin ise koyun ve inek sülteninde en yüksek popülasyon sayılarına ulaştığı tespit edilmiştir. Kefir örneklerinde ise depolama süresince *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* + *Leuconostoc* spp. bakterileri ile maya sayılarında azalma olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, koyun sültenin *Lactobacillus* spp. ve *Lactococcus* + *Leuconostoc* spp. bakterilerinin gelişmesi için inek ve keçi sültenine göre daha uygun olduğu ve dolayısıyla üretiminde kullanılan sül çeşidinin kefirin mikrobiyolojik özellikleri üzerine etkisinin bulunduğu belirlenmiştir (Yaman vd 2010).

Tratnik vd (2006), inek ve keçi sülteri ile yağsız sültozu, peyniraltı suyu konsantratu ve inülin ilavesinin kefirin kimyasal ve duyusal özellikleri üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla, %2 oranlarında yağsız sültozu, peyniraltı suyu konsantratu ve inülin ilave edilmiş inek ve keçi sülterinden kefir üretilmiş ve üretilen kefir örneklerinde 5°C'de 10 günlük depolama boyunca titrasyon asitliği ve pH değerleri ile duyusal özellikler belirlenmiştir. Kefir örneklerinde titrasyon asitliği değerleri depolama süresince değişmez iken, keçi sülteninden üretilen kefir örneklerine ait titrasyon asitliği

değerleri inek sütünden üretilenlere göre önemli düzeyde düşük bulunmuştur. Peyniraltı suyu konsantratu ilave edilmiş keçi sütünden üretilen kefir örneklerinin pH değerleri peyniraltı suyu konsantratu ilave edilmiş inek sütünden üretilen kefiirlere göre daha yüksek bulunmuştur. İnek sütüne yağsız süttozu, peyniraltı suyu konsantratu ve inülin ilave edilerek üretilen kefir örneklerinin panelistler tarafından diğer örneklere göre daha çok beğenildiği belirtilmiştir.

İnkübasyon süresinin ve süte inoküle edilen kefir danesi oranının keçi sütünden üretilen kefirin kimyasal özellikleri üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada keçi sütüne %3, %5 ve %7 olacak şekilde farklı oranlarda kefir danesi inoküle edilmiş ve sütler 24°C'de sırasıyla 18, 21 ve 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Çalışma sonucunda, keçi sütüne %7 oranında kefir danesi inoküle edilen ve inkübasyon süresi 24 saat olan kefirin 4.4 pH, %0.9 etanol içeriği, %0.8 titrasyon asitliği ve %4.2 laktoz içeriği ile araştırmanın en beğenilen kefirini olduğu tespit edilmiştir (Purnomo ve Muslimin 2012).

### **2.1.6. Kefirin fiziksel ve kimyasal özellikleri**

Kefiri diğer fermente süt ürünlerinden ayıran en önemli özellik, kefir danesinde bulunan bakteri ve mayaların simbiyotik aktivitesi sonucu kefirde laktik asit ve alkol fermantasyonunun bir arada oluşmasıdır (Yılmaz vd 2006). Hem laktik asit bakterileri hem de mayaların fermantasyonu sonucu; kefirde laktik asit, asetik asit, az miktarda karbondioksit ve etil alkol ile yoğurda kıyasla farklı duyuşsal özellikleri olmasını sağlayan aromatik bileşikler ortaya çıkmaktadır (Dinç 2008). Ayrıca fermantasyon ve kefirin muhafazası süresince kefirde bulunan proteolitik bakteriler, sütteki proteinlerin bir kısmını amino asitlere kadar parçalamaktadır. Sonuç olarak; fermantasyon sırasında meydana gelen biyokimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan metabolitler kefirin kendine özgü yapı, tekstür, lezzet ve aroma özelliklerinin oluşumunu ve kimyasal bileşiminin şekillenmesini sağlamaktadır (Metin ve Tavlas 1986).

Sütün çeşidi ve kalitesi, kefir danesinin veya starter kültürün kompozisyonu, üretim tekniği, inkübasyon sıcaklığı ve süresi ile depolama koşulları üretilen kefirin bileşimini etkilemektedir (Otles ve Cagindi 2003, Yıldız 2009). Örneğin, 48°C'de depolamanın üründe etanol, asetaldehit ve asetoın konsantrasyonunu azaltabildiği, ancak söz konusu depolama sıcaklığında diasetil indirgenmesinin gerçekleşmediği belirtilmektedir (Ahmed vd 2013).

Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği'ne göre kefirde; süt proteininin en az %2.7, süt yağı miktarının en fazla %10.0, titrasyon asitliğinin ise en az %0.6 oranında olması gerekmektedir. Bununla beraber söz konusu tebliğde etil alkol içeriği ile ilgili herhangi bir sınırlama bulunmamaktadır (Anonim 2009). Koroleva (1988) kefirin yağsız olabildiği gibi %3.2, %2.0 ve %1.0 oranlarında yağ içerebildiğini, ürünün titrasyon asitliğinin %0.8-0.9 olduğunu, alkol içeriğinin ise %0.1'i geçmemesi gerektiğini bildirmiştir.

Fermantasyon sonucu ortaya çıkan etanol ve karbondioksit miktarı kefir üretim koşullarına bağlı olarak değişmektedir (Koroleva 1982). Kefir danesi kullanılarak üretilen kefirin karbondioksit miktarının 0.85-1.05 g/L, ticari starter kültür kullanılarak üretilen kefirin ise karbondioksit miktarının 1.70-1.98 g/L arasında değiştiği tespit edilmiştir

(Beshkova vd 2002, Simova vd 2002). Fermantasyon süresince oluşan diğer ürünler ise başta laktik asit olmak üzere asetik asit, pürivik asit, hipürük asit, propiyonik asit ve bütirik asittir. Kefir için en önemli aroma bileşenlerinden sayılan asetil grubu bileşiklerin *Str. lactis* spp. ve *Leuconostoc* spp. bakteri türleri tarafından üretildiği belirtilmektedir (Libudzisz ve Piatkiewicz 1990, Ahmed vd 2013). Kefirin fermantasyonu süresince asetaldehit ve asetoin miktarı artarken, muhafazası süresince asetaldehit miktarının arttığı, asetoin miktarının ise azaldığı belirlenmiştir (Güzel-Seydim vd 2000a, 2000b). Kefir; vitaminler ile kalsiyum, potasyum, fosfor ve magnezyum gibi makro elementleri ve çinko, bakır, demir, molibden, manganaz ve kobalt gibi mikro elementleri de içermektedir (Ahmed vd 2013).

İnkübasyon sıcaklığının kefirin fizikokimyasal ve duyuşal özellikleri üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada %3 oranında kefir danesi inoküle edilen sütler 20°C, 25°C ve 30°C'de 16 saat süreyle inkübe edilmiş ve üretilen kefir örnekleri 5±1°C'de 2 gün boyunca olgunlaştırılmıştır. Üretilen örneklerin titrasyon asitliği değerleri üzerine inkübasyon sıcaklığının etkili olduğu ve 30°C'de inkübe edilen örneklerin diğerlerine göre daha yüksek titrasyon asitliği değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın örneklerin pH, viskozite ve serum ayrılması değerleri ile asetaldehit içerikleri üzerine inkübasyon sıcaklığının herhangi bir etkisinin olmadığı; ancak söz konusu özelliklerin olgunlaştırma süresince değiştiği saptanmıştır. Ayrıca kefirin toplam uçucu yağ asitleri ve karbondioksit içeriği üzerine inkübasyon sıcaklığı ve olgunlaştırma süresinin önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Duyusal özellikleri bakımından 25°C'de inkübe edilen kefir örneğinin diğer örneklere kıyasla daha fazla beğenildiği tespit edilmiştir (Kaptan vd 1990).

Irigoyen vd'nin (2005) süte farklı oranlarda (%1 ve %5) kefir danesi inoküle ederek ürettikleri kefir örneklerinin inkübasyondan hemen sonra ve 5°C'de 28 günlük depolama süresince fizikokimyasal ve duyuşal özelliklerinde meydana gelen değişiklikleri inceledikleri bir çalışmada depolama süresince kefir örneklerinin toplam kurumadde ve yağ içeriğinde bir azalış olduğu, buna karşın örneklerin laktoz içeriği ve pH değerlerinin sabit kaldığı tespit edilmiştir. Üretiminde kullanılan kefir danesi miktarı arttıkça kefir örneklerinde laktoz içeriği ve pH değerlerinin arttığı, viskozitenin ise azaldığı belirlenmiştir. Farklı oranlarda kefir danesi kullanımının kefir örneklerinin toplam kurumadde ve yağ içeriği üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmada ayrıca kefir örneklerinin duyuşal puanlarının depolamanın ilk iki gününden sonra azaldığı görülmüştür.

Güzel-Seydim vd (2000a) yaptıkları bir çalışmada, kefir daneleri ile sütün fermantasyonu süresince oluşan organik asitleri ve uçucu lezzet bileşenlerini araştırmışlardır. Bu amaçla, kefir danesi aşılana sütler fermantasyonun başlangıcı ile 5., 10., 15. ve 22. saatlerinde orotik, sitrik, pürivik, ürik, laktik, asetik, bütirik, propiyonik, hippurik asit gibi organik asitler ve asetaldehit, etanol, asetoin ve diasetil gibi uçucu lezzet bileşenleri bakımından incelenmiştir. Çalışma sonucunda, orotik, sitrik ve pürivik asit miktarlarının fermantasyon süresince çok az düzeyde azaldığı, ürik asit miktarının ise fermantasyonun 15. saatinden itibaren belirgin bir şekilde azaldığı saptanmıştır. Bununla birlikte, sütlerde fermantasyonun 15. saatinden itibaren hippurik asit tespit edilememiştir. Fermantasyon süresince kefir bakterileri tarafından üretilen laktik asit miktarının yoğurttan üretilen laktik asit miktarından daha az olduğu tespit edilmiştir. Etanol üretiminin ise

fermantasyonun 5. saatinden itibaren başladığı, asetaldehit ve asetoinin ise fermentasyon süresince arttığı belirlenmiştir. Fermentasyon süresince sütlerde asetik, bütirik, propiyonik asitler ve diasetil tespit edilememiştir.

İnkübasyon süresi ve sıcaklığı, depolama koşulları gibi faktörlerin yanı sıra, süte uygulanan homojenizasyon basıncı ve ısı işlem normları da kefirde tat oluşumu, kıvam, serum ayrılması ve titrasyon asitliği gibi bazı kalite kriterleri üzerinde etkili olmaktadır. Konu ile ilgili yapılan bir araştırmada, kefir üretiminde kullanılacak olan süte 85°C'de 5 ve 15 dakika ile 95°C'de 5 ve 15 dakika olmak üzere 4 farklı ısı işlem normu uygulanmış ve üretilen kefir örnekleri 5°C'de 7 gün depolanmıştır. Çalışma sonucunda, uzun süreli ısı işlem uygulanan (85°C'de 15 dakika ve 95°C'de 15 dakika) sütlerden elde edilen kefir örneklerinde serum ayrılmasının daha az olduğu gözlemlenmiştir. Yüksek sıcaklıkta uzun süreli ısı işlem normunun (95°C'de 15 dakika) kefir örneklerinde oluşan asetaldehit miktarında artışa sebep olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber, uygulanan ısı işlem normlarının kefir örneklerinin viskozite değerleri ve toplam uçucu yağ asidi içerikleri üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Gürsel vd 1990).

Kefirin reolojik davranışı, fermentasyon süresince oluşan metabolitler ile birlikte son ürün kalitesini ve kefirin tüketici tarafından kabul edilebilirliğini etkilediği için ayrı bir önem taşımaktadır. Kefir üretiminde kullanılan sütün çeşidi ve kimyasal bileşimi, starter kültür çeşidi, inkübasyon sıcaklığı ve süresi, ısı işlem normu ve depolama koşulları kefirin reolojik özelliklerini etkilemektedir (Magra vd 2012, Dimitreli vd 2013). Kefirin reolojik özelliklerinin belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda kefirin tiksotropik akışkan gibi davrandığı tespit edilmiştir. Farklı çalışmalar sonucunda elde edilen akış eğrileri, kefirin pseudoplastik özelliklere sahip olduğunu göstermekte olup bu tip reolojik davranışın kesme kuvvetleri sonucu tahrip olan üç boyutlu yapıya sahip örnekler için genel bir özellik olduğu belirtilmektedir (Dimitreli ve Antoniou 2011, Altay vd 2013, Dimitreli vd 2013).

Isı işlem ve peyniraltı suyu konsantratu ilavesinin kefirin fermentasyon süresi ve reolojik özellikleri üzerine etkisinin incelendiği bir başka çalışmada, süte farklı oranlarda (%0, %1, %3 ve %5 (w/w)) peyniraltı suyu konsantratları ısı işleminden önce ve sonra olacak şekilde ilave edilmiştir. Çalışma sonucunda, artan peyniraltı suyu konsantratu konsantrasyonu ile birlikte kefir örneklerinin laktik asit içeriğinin arttığı, fermentasyon süresinin ise kısaldığı tespit edilmiştir. Isı işlemin süte peyniraltı suyu konsantratu ilavesinden önce veya sonra uygulanmasının kefir örneklerinin laktik asit içeriği ve fermentasyon süresini etkilemediği saptanmıştır. Araştırmacılar, kefir örneklerinin reolojik analizleri sonucunda elde ettikleri akış eğrilerini incelediklerinde kefirin pseudoplastik bir akışkan gibi davrandığını tespit etmişlerdir. Ayrıca artan peyniraltı suyu konsantratu konsantrasyonu ile birlikte kefir örneklerinin görünür viskozite ve kıvam indeks değerlerinin arttığı, akış davranış indeks değerlerinin ise azaldığı belirlenmiştir. Peyniraltı suyu konsantratu süte ısı işleminden sonra ilave edildiğinde, ilave edilen peyniraltı suyu proteinleri sütte denatüre olmadan doğal halde kalmaktadır. Peyniraltı suyu konsantratu süte ısı işlem öncesinde ilave edildiğinde ise söz konusu proteinler denatüre olmaktadır. Çalışma sonucunda, denatüre peyniraltı suyu proteinleri içeren kefir örneklerinin, doğal peyniraltı suyu proteinleri içeren kefir örneklerine göre daha yüksek kıvam indeks değerlerine dolayısıyla daha yüksek görünür viskozite değerlerine ve daha düşük akış davranış indeks değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir (Dimitreli vd 2013).

Bensmira vd (2010) süte uygulanan homojenizasyon basıncı (15, 17, 19 ve 21 MPa), inkübasyon sıcaklığı (20, 24 ve 28°C) ve süresinin (18, 24 ve 30 saat) kefirin reolojik özellikleri ve kefirde ekzopolisakkarit (EPS) üretimi üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, inkübasyon sıcaklığının kefirin reolojik özellikleri ve kefirde EPS üretimi üzerinde etkili olduğu, buna karşın inkübasyon süresinin kefirin reolojik özellikleri ve kefirde EPS üretimi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Süte uygulanan homojenizasyon basıncının kefirin reolojik özellikleri üzerinde etkili olduğu, buna karşın kefirde EPS üretimi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı saptanmıştır. Sonuç olarak 19 MPa'lık homojenizasyon basıncı, 24°C'lik inkübasyon sıcaklığı ve 18 saatlik inkübasyon süresi kombinasyonunun kefirin reolojik özellikleri ve kefirde EPS üretimi bakımından diğer kombinasyonlara göre daha iyi sonuçlar verdiği belirlenmiştir.

Dimitreli ve Antoniou'nun (2011) inkübasyon sıcaklığı (20, 25 ve 30°C) ve süte farklı oranlarda (%0, %1, %2 ve %3) kazeinat ilavesinin kefirin reolojik özellikleri üzerine etkisini inceledikleri çalışma sonucunda, kazeinat konsantrasyonunun artması ve inkübasyon sıcaklığının azalması sonucunda kefir örneklerinde inkübasyon süresinin kıaldığı tespit edilmiştir. Örneklerin viskozite değerleri üzerine inkübasyon sıcaklığının etkili olduğu ve 25°C'de inkübe edilen örneklerin en yüksek, 30°C'de inkübe edilen örneklerin ise en düşük viskozite değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Reolojik analizler sonucu elde edilen kefir örneklerine ait akış eğrileri incelendiğinde kefir örneklerinin pseudoplastik akışkan gibi davrandığı görülmüştür. Süte ilave edilen kazeinat konsantrasyonu arttıkça kefir örneklerinin viskozite değerlerinin arttığı, akış davranış indeks değerlerinin ise azaldığı tespit edilmiştir. Örneklerin akış davranış indeks değerleri üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi incelendiğinde, 20 ve 25°C'de inkübe edilen kefir örneklerinin akış davranış indeks değerleri arasında belirgin bir farklılık olmadığı, 30°C'de inkübe edilen örneklerin ise 20 ve 25°C'de inkübe edilen örneklere kıyasla daha yüksek akış davranış indeks değerlerine sahip olduğu saptanmıştır.

### **2.1.7. Kefirin besleyici değeri ve sağlık açısından önemi**

Kefir, süt içindeki tüm besin maddelerini içerdiğinden besin değeri yüksek bir üründür. Protein, vitamin ve mineral maddeleri dengeli biçimde içermesi, fermantasyon işlemi sırasında bazı vitaminlerin sentezlenmesi, protein ve laktozun kısmen parçalanması ile sindirimini kolay olması gibi faktörler kefirin gıda olarak önemini ortaya koymaktadır (Libudzisz ve Piatkiewicz 1990, Ahmed vd 2013). Kefir danesinin içerdiği mikroorganizmaların etkisi ile sütteki laktoz ve proteinlerin bir kısmının parçalanması kefirin vücut tarafından sindirimini kolaylaştırmaktadır. B<sub>1</sub>, B<sub>12</sub> ve K vitaminlerince zengin olan kefir; C vitamini, çeşitli mineral maddeler ve esansiyel amino asitleri içermektedir. Fermantasyon sonucunda oluşan laktik asidin yaklaşık %50'sinin L (+) tipte olması kefirin vücuda yararlılığını daha da artırmaktadır (Alpkent ve Küçükçetin 2000, Khamnaeva vd 2000, Chen vd 2008). Kefir tüketiminin bağışıklık sistemini desteklediği, tümör büyümesini ve patojen bakterilerin çoğalmasını engellediği bildirilmektedir (Lopitz-Otsoa vd 2006, Golowcyc vd 2010).

Kefirin fermantasyonu sırasında yüksek oranda piridoksin (B<sub>6</sub>), biyotin (B<sub>7</sub>), folik asit (B<sub>9</sub>) ve siyanokobalamin (B<sub>12</sub>) vitaminlerinin oluştuğu; tiamin (B<sub>1</sub>) ve riboflavin (B<sub>2</sub>) miktarlarının ise azaldığı belirtilmektedir. Bir grup araştırmacı tarafından ise

fermantasyon işlemi sırasında B<sub>12</sub> vitamin miktarında azalma olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu azalışın kefir üretiminde kullanılan starter kültürün mikroflorasından kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir (Güzel-Seydim vd 2000a, Ahmed vd 2013).

Eski Sovyetler Birliği'nde metabolik bozukluklar, ateroskleroz (arterleri etkileyen bir hastalık) ve alerjik hastalıklar gibi çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde kefir kullanıldığı belirtilmektedir (Koroleva 1988). Kefir ayrıca modern tıp tedavisinin mümkün olmadığı zamanlarda Kafkasya'da tüberküloz, kanser ve gastrointestinal rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmıştır. Kafkasya'da yaşayan insanların uzun ömürlü olmalarının da kefir tüketimine bağlı olduğu birçok araştırmacı tarafından savunulmaktadır (Dinç 2008).

Düzenli olarak kefir tüketimi bağırsak rahatsızlıklarının azalmasına, bağırsak hareketlerinin artmasına ve şişkinliğin azalmasına yardımcı olmaktadır. Yapılan çalışmalarda, kefir tüketiminin domuzlarda laktozun bağırsaklardaki hidrolizini arttırdığı ve yetişkin insanlarda laktoz sindirimi ve toleransını geliştirdiği ortaya konulmuştur (Vinderola vd 2005). Fermentasyon sonunda sütte bulunan laktoz miktarının %75 oranında azalması nedeni ile kefirin laktoza intoleranslı kişiler tarafından rahatlıkla tüketilebileceği bildirilmiştir (Yılmaz vd 2006). Süt, yoğurt, kefir, aromalı yoğurt ve aromalı kefir tüketiminin yetişkinlerde laktoz sindirimi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışma sonucunda kefirdeki  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesinin yoğurda göre yaklaşık %60 daha fazla olduğu belirtilmiştir (Hertzler ve Clancy 2003).

Taze kefirin midenin boşaltma ve motor fonksiyonları üzerine olumlu uyarıcı etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Sukhov vd 1986). Thoreux ve Schmucker (2001) yaptıkları bir çalışmada, kefirin ağız yoluyla alınmasının yetişkin farelerdeki kolera holotoksinine karşı olan spesifik mukozal immün tepkisini arttırdığını; ancak yaşlanan farelerde herhangi bir etkisinin olmadığını göstermişlerdir. Marcela vd (2001), kefirdeki lipidlerden sfingomiyelini izole ederek kefirin *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda bağışıklık sistemini güçlendirdiğini, ayrıca hücrel ve humoral bağışıklığı (vücutta hücrel boyutta değil, vücut sıvılarının içinde oluşan hücre dışı bağışıklık) stimüle ettiğini belirtmişlerdir. Kefirin bakteriyel olmayan kısmının immünomodülatör kapasitesinin incelendiği bir çalışmada, kefirin içerdiği laktatın intestinal epitel hücrelerinde immün düzenleyici özellik gösteren bir bileşen olduğu tespit edilmiştir (Iraporda vd 2014).

Kefirin *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus flavans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus* gibi çeşitli patojen bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmektedir (Morgan vd 2000, Gulmez ve Guven 2003, Czamanski vd 2004, Golowczyc vd 2007, Rattray ve O'Connell 2011). Genel olarak, kefir Gram-negatif bakteriler üzerinde bakteriyostatik etkiye sahip iken Gram-pozitif bakteriler üzerinde bakterisidal etkiye sahiptir (Ahmed vd 2013). Bunun yanısıra çeşitli çalışmalarda kefirin *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* ve diğer fungal türlere karşı inhibitör etkisinin tespit edilmesi kefirin antifungal aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Cevikbas vd 1994, Rodrigues vd 2005).

Kefirin sahip olduğu antimikrobiyal etkinin kefirde genel olarak metabolik aktiviteler sonucunda ortaya çıkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etanol, karbondioksit, diasetil, peptidler

(bakteriyosinler) ve organik asitlerden (laktik ve asetik asit) ileri geldiği düşünülmektedir (Ahmed vd 2013). Kefirin ana bileşeni olan laktik asidin *E. coli* ve *B. cereus*'a karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bildirilmektedir. Kefirde mayalar ve homofermantatif bakteriler tarafından üretilen karbondioksitin ortamdaki oksijenin yerine geçerek zorunlu aerob bakterileri inhibe ettiği, kefirde bulunan asetaldehit ve diasetilin ise *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium* ve bazı maya türlerine karşı antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu bildirilmektedir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin hücre membran etkileşimleri sonucunda antimikrobiyal etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir (El-Hayek 2011).

Kefirde fermantasyon sonucu oluşan ayrıştırılamayan organik asitler, kefirin patojen inhibisyonundaki önemli mekanizmalarından biridir. Kefirin temel organik asitleri olan laktik asit ve asetik asidin asidik koşullarda patojen *E. coli* suşlarını inhibe ettiği, nötral pH'larda ise inhibe edemediği bildirilmektedir. Ancak asidik kefirin bakteriyostatik etkisinin aynı pH ve organik asit konsantrasyonuna sahip süte göre daha uzun süreli olduğunun tespit edilmesi sonucu, kefirin inhibe edici özelliğinin sadece asitlikten değil de asidik şartlarda aktif hale gelebilen inhibe edici bileşenlerin mevcudiyetinden de kaynaklandığı düşünülmüştür (Rattray ve O'Connell 2011). Kefirde laktik asit ve asetik asidin bir arada bulunması kefirin patojen bakterilere karşı antimikrobiyal etkisini arttırmaktadır. Garrote vd (2000) yaptıkları çalışma sonucunda kefir ekstraktlarının *E. coli* 3 suşunu inhibe ettiğini, buna karşın asetik asit içermeyen yoğurt ekstraktlarının bu suşu inhibe edemediğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, kefirdeki laktik asit ve asetik asidin patojenler üzerinde sinerjik inhibitör etki oluşturduğu sonucuna varmışlardır.

Kefirde bakteriler tarafından üretilen ve antimikrobiyal bir bileşen olduğu düşünülen diğer bir metabolit hidrojen peroksittir. Türk kefir içeceğinden izole edilen 21 laktokok suşunun 11'inin hidrojen peroksit üretebildiği bildirilmektedir (Farnworth 2005).

Kefirin *Salmonella enteritidis* üzerine bakterisidal etkisinin incelendiği bir çalışmada, Arjantin'de bulunan Luga nehrinden izole edilen 53 *Salmonella enteritidis* suşu, 4 ve 22°C'deki kefire inoküle edilmiştir. Kontamine kefirdeki *Salmonella enteritidis*'in 4°C'de 24 saatte ve 22°C'de 18 saatte inhibe olduğu belirlenmiştir (Anselmo vd 2001). Yapılan bir başka çalışmada, fare bağırsak mukozasında bulunan laktik asit bakteri popülasyonunun kefir tüketimi ile arttığı, Enterobacteriaceae ve Clostridia popülasyonunun ise azaldığı tespit edilmiştir (Marquina vd 2002).

Kefirin *Bacillus subtilis* spp. *spizizenii* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 bakterileri ve *Candida albicans* ATCC 10231 mayası üzerine antimikrobiyal etkisinin incelendiği bir çalışmada 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonucu üretilen kefirler 4-8°C'de 7 gün boyunca depolanmıştır. Çalışma sonucunda, 24 saat inkübe edilen kefir ile 48 saat inkübe edilen kefirin *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* ve *S. enteritidis* bakterileri üzerine antimikrobiyal etkisinin benzer olduğu ve kefirlerin antimikrobiyal etkisinin 7 günlük depolama süresince değişmediği tespit edilmiştir. Ayrıca kefir örneklerinin *P. aeruginosa*



ve *C. albicans* suşlarına karşı inhibe edici etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir (Chifiriuc vd 2011).

Furuokuwa vd (1991) ve Zacconi vd (1995) yaptıkları çalışmalarda, kefirin hayvanlarda antibakteriyel, immünolojik ve antitümör etkilerinin olduğunu belirtmişlerdir. Güven vd (2003), kefirin antioksidan etkiye sahip olduğunu ve fare dokularındaki CCl<sub>4</sub>'ün neden olduğu lezyonlarda E vitamininden daha koruyucu olduğunu belirtmişlerdir. Güzel-Seydim vd (2006), kefirin aseton ekstraktlarının antimitojenik kapasitesinin süt ve yoğurttaakilere kıyasla daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Shiomi vd (1982) tarafından kefir danesinden izole edilen suda çözünen polisakkaritlerin tümör oluşumunu engelleyici etkisinin olduğu ortaya konulmuştur. Kefir danesinden izole edilen ve kefirin fonksiyonel bileşeni olarak bilinen suda çözünür bir polisakkaritin (KGF-C) ağız yoluyla alındığında tümör gelişimini geciktirdiği belirtilmiştir (Murofushi vd 1986). KGF-C'nin ilaç şeklinde alınımı, tümörlü deney hayvanları kadar sağlıklı deney hayvanlarının da DTH (delayed type hypersensitivity-Geç tip (Tip IV) aşırı duyarlılık reaksiyonu) tepkisinde artış sağlamaktadır. Yüksek DTH tepkisine sahip gruplarda DTH'ın uyarılmasından sonra oluşan tümörlerin gelişimi inhibe olmaktadır. Sağlıklı deney hayvanlarında DTH tepkisi ile antitümör aktivitesi arasında önemli bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir (Murofushi vd 1983). El-Hayek (2011) tarafından kefirin Caco-2 ve HT-29 olarak adlandırılan kolorektal adenokarsinoma hücreleri üzerine *in vitro* olarak proapoptotik (apoptozu indükleyici etki) ve antiproliferatif etkisi (hücre çoğalmasını engelleyici etki) olduğu ortaya koyulmuştur. Ayrıca bu çalışma sonucunda; kefirin Bcl-2 (apoptozisi baskılayıcı) genini baskıladığı, Bax'ın (apoptozisi indükleyici) ekspresyonunu ise indüklediği belirlenmiştir. Bu durumun kefirin kötü huylu hücreleri apoptozise ederken izlediği muhtemel yollardan biri olabileceği düşünülmüştür.

Kefir, yoğurt ve pastörize inek sütü ekstraktlarının insan meme kanseri hücreleri (MCF-7) ve normal insan epitel hücreleri (HMECs) üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, kefir, yoğurt ve pastörize süt ekstraktları %0.31, %0.63, %1.25, %2.5, %5 ve %10 (v/v)'luk konsantrasyonlarda söz konusu hücrelerin bulunduğu ortama konulmuş ve 37°C'de 6 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kefir ekstraktlarının %0.63, yoğurt ekstraktlarının ise %2.5'luk konsantrasyonlarında MCF-7 hücre gelişimini baskılamaya başladığı tespit edilmiştir. Ayrıca %2.5'luk konsantrasyonda kefir ekstraktları MCF-7 hücre sayısında %56'luk, yoğurt ekstraktları ise sadece %14'lük bir azalış sağlamıştır. Kefir ekstraktlarının HMECs üzerinde antiproliferatif etki göstermediği, yoğurt ekstraktlarının ise %5 ve %10'luk konsantrasyonlarında söz konusu hücreler üzerine antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. Pastörize süt ekstraktlarının HMECs ve MCF-7 hücrelerinin çoğalmasını %2.5 ve üzerindeki konsantrasyonlarda stimüle ettiği saptanmıştır. Çalışma sonucunda, hem kefir hem de yoğurt ekstraktlarının MCF-7 hücre gelişimini baskılamasına rağmen kefirin antiproliferatif potansiyelinin yoğurda nazaran daha güçlü olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun yanısıra örnekler steril membrandan geçirilerek elde edildiği için sahip oldukları söz konusu antiproliferatif etkinin örneklerde bulunan mikroorganizmalardan değil de fermantasyon sonucunda oluşan biyoaktif bileşenlerden kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir (Chen vd 2007).

Kefirin antibakteriyel ve antiinflamatuvar özelliklerini incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada sıçanların sırt bölgelerinde 3. derece yanık oluşturulmuş ve 24 saat sonra yanık yaralarına *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) inoküle edilmiştir. Daha sonra, sıçanlarda oluşturulan yaralara içerisinde 24, 48 ve 96 saat boyunca kefir danelerinin kültürlendiği MRS sıvı besiyeri ekstraktlarından elde edilen jeller ve gümüş sülfadiazin merhemi (yanık tedavisinde kullanılan merhem) günde 2 kere olacak şekilde 2 hafta boyunca uygulanmıştır. Çalışma sonucunda, 96 saatlik kefir jeli ile gümüş sülfadiazin merheminin antimikrobiyal etkilerinin benzer olduğu, yaranın iyileşme süresinin ise 96 saatlik kefir jelinde gümüş sülfadiazin merhemine nazaran daha kısa olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 96 saatlik kefir jeliyle yapılan tedavide yanığın iyileşme süresinin 14 gün olduğu tespit edilmiş olup; söz konusu çalışmada gümüş sülfadiazin tedavisinde bu sürenin 24 gün olduğu bildirilmiştir. Kefir jel tedavisinin geleneksel gümüş sülfadiazin tedavisine kıyasla etkili bir terapötik yaklaşım olduğu belirtilmiştir (Huseini vd 2012).

Kefirin sağlıkla ilgili olumlu özelliklerinin kaynağının içerdiği mikroorganizmalardan, kefir danesinde bulunan kefirandan, sütün fermantasyonu sırasında serbest hale geçen peptidlerden ya da tüm bu faktörlerin birleşiminden mi kaynaklandığı açık değildir (Vinderola vd 2005). Konu ile ilgili birçok çalışma bulunmasına rağmen, kefirin sağlıkla ilgili olumlu özelliklerinin kaynağını oluşturan fonksiyonel bileşenler tam olarak bilinmemektedir. Fermente süt ürünlerinde bulunan fonksiyonel bileşenlerden biri, bozulmamış süt proteinlerinin dizilimlerinde şifrelenen ve sindirim ya da fermantasyon gibi sütün işlenmesi sırasında enzimatik proteoliz ile serbest hale geçebilen biyoaktif peptidlerdir (Korhonen ve Pihlanto-Leppälä 2001).

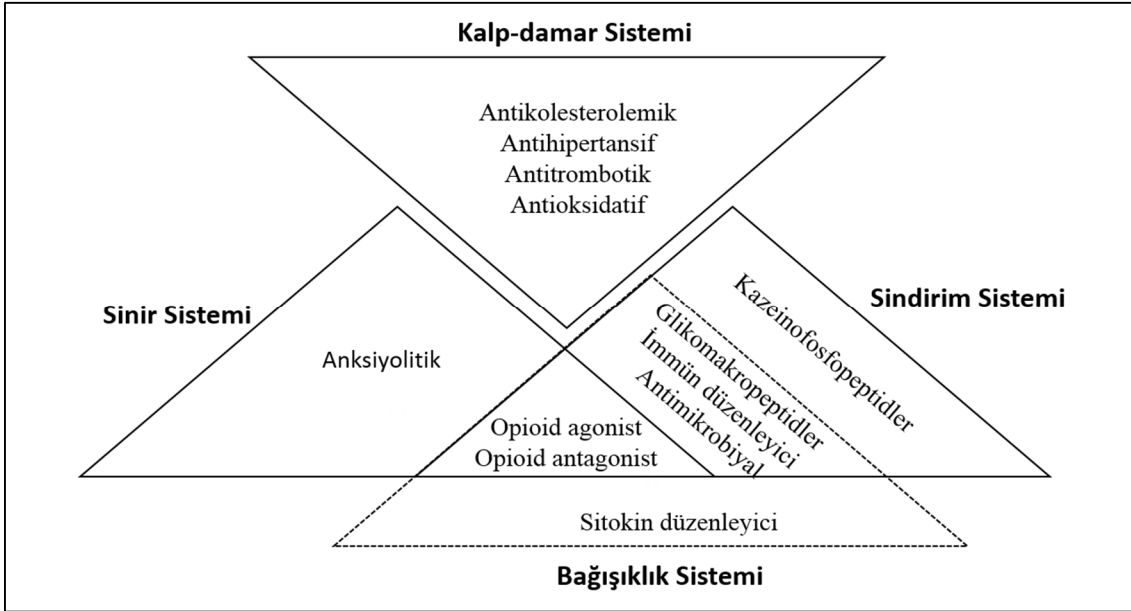
## 2.2. Biyoaktif Peptidler

Biyoaktif peptidlerden ilk kez 1950 yılında Mellander'in raşitik bebeklerde vitamin D'den bağımsız kemik kalsifikasyonunu artıran kazeinden türemiş fosforlanmış peptidler olarak bahsedildiği bildirilmiştir. Biyoaktif peptidlerle ilgili bilgilerin 1979'dan bu yana arttığı ve günümüzde opioid, antitrombotik, antipertansif, mineral bağlayıcı ve immün düzenleme gibi aktivitelere sahip çok sayıda peptid olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, bu peptidlerin sergilediği aktivitelere, amino asit içeriğine ve dizilimine bağlı olduğu gösterilmiştir. Biyoaktif peptidler 64 amino asit içeren kazeinomakropeptid (CMP) dışında genellikle 3 ila 20 amino asit rezidüsünden oluşmaktadır. Bitkisel ve hayvansal proteinler potansiyel biyoaktif diziler içermesine rağmen, süt proteinleri biyolojik aktif peptidler için temel kaynaktır (Pihlanto-Leppälä 2001).

Konu ile ilgili yapılan araştırmalar başlıca süt proteinleri olan kazein ve peyniraltı suyu proteinlerinin biyoaktif peptidlerin önemli bir kaynağı olduğunu göstermiştir. Protein molekülü içerisinde inaktif halde olan peptidler, *in vivo* ya da *in vitro* olarak söz konusu proteinlerin hidrolizi sonucunda aktif hale geçebilmektedir. Biyolojik olarak aktif olan bu peptidler süt proteinlerinden; proteolitik mikroorganizmalarla sütün fermantasyonu sırasında, sindirim enzimleriyle enzimatik hidroliz ya da bitki ve mikroorganizmalardaki proteolitik enzimlerle hidroliz sırasında olmak üzere üç yolla üretilebilmektedir (Korhonen ve Pihlanto-Leppälä 2001). Yapılan çalışmalar, fonksiyonel kısa peptidlerin üretiminde bu üç yöntemin bir arada kullanılmasının etkili

olduğunu göstermektedir (Korhonen ve Pihlanto 2006). Mikrobiyal hücreler aracılığıyla biyoaktif peptidlerin ya da öncülerinin üretilmesi için rekombinant DNA teknolojisinin kullanılması biyoaktif peptid üretimindeki diğer bir yaklaşımdır. Doğal kaynaklardan izolasyon ya da diğer sentez metotları ile kıyaslandığında, rekombinant yaklaşım büyük ölçekli peptid üretimi için oldukça uygun maliyetli bir seçenektir. Ayrıca bu teknolojinin spesifik biyoaktif peptidlerin üretilmesine olanak sağlayacağı da düşünülmektedir (Li 2011, Hafeez vd 2014).

Vücut fonksiyonları üzerinde olumlu etkilere sahip olan biyoaktif peptidler; amino asit kompozisyonuna ve dizilimine bağlı olarak kalp-damar sistemi, sindirim sistemi, bağışıklık sistemi ve sinir sistemini etkileyebilmektedir. Biyoaktif peptidlerin opioid, antimikrobiyal, antioksidatif, antihipertansif, antitrombotik, immün düzenleme, mineral bağlayıcı, oligoelement (canlılardaki biyokimyasal olaylarda katalizör rolü oynayan element) nakli, enzim inhibisyonu ya da sindirim fonksiyonu düzenleme gibi etkileri bulunmaktadır (Şekil 2.4) (Pihlanto-Leppälä 2001, Bouhallab ve Bouglé 2004, Hafeez vd 2014).

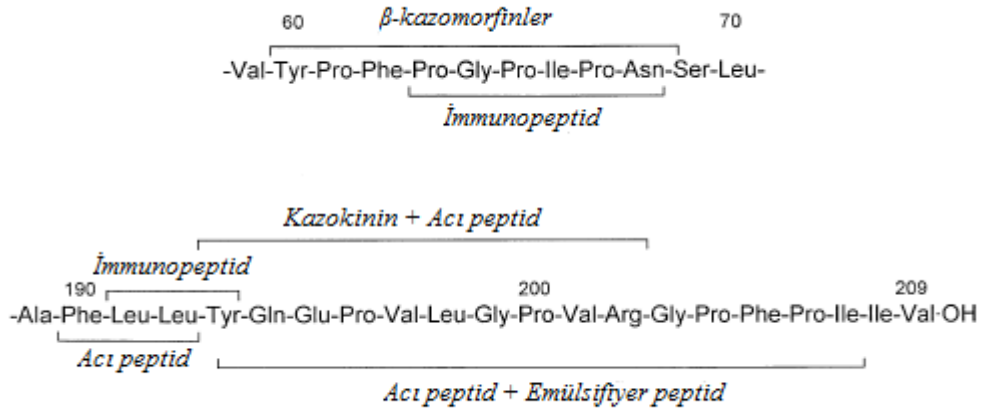


Şekil 2.4. Süt proteinleri kaynaklı peptidlerin biyoaktiviteleri (Hafeez vd 2014)

Birçok süt kaynaklı biyoaktif peptid multifonksiyonel özellik gösterebilmektedir. Örneğin,  $\beta$ -kazeinin ana yapısındaki bazı bölgeler farklı biyolojik etkiler gösteren çakışan peptid dizilimleri içermektedir (Şekil 2.5). Bu bölgeler proteolitik yıkımdan korunmakta ve "stratejik zonlar" olarak düşünülmektedir (Meisel 1998). Peptidlerin multifonksiyonel özellik göstermesi peptid zincirindeki amino asit kompozisyonu ve dizilişine bağlı olup peptidlerin C-terminal veya N-terminal pozisyonundaki amino asit son derece önem taşımaktadır. Örneğin,  $\beta$ -kazeinin mikrobiyal bir enzimle hidrolizi sonucu oluşan antihipertansiyon etkisine sahip bir biyoaktif peptid zinciri 7 amino asitten (KVLVPVQ) oluşmaktadır. Bu peptid kuvvetli ACE (anjyotensin dönüştürücü enzim) inhibitör aktivitesi göstermezken peptid zincirinden glisin amino asidi uzaklaştırıldığında, 6 amino asit (KVLVPV) içeren peptidin antihipertansiyon etkisi yanında kuvvetli ACE inhibitörü

olarak aktivite gösterdiği bildirilmektedir. Yapılan çalışmalar 6 amino asitten oluşan peptidin C-terminal ucundaki prolin amino asidinin ve amino asit zincirinin ACE inhibisyonu için önemli olabileceğini göstermiştir (Kınık ve Gürsoy 2002).

Biyoaktif peptidler gıdaların işlenmesi sırasında fiziksel veya kimyasal olarak, özellikle de enzimlerin etkisi sonucunda üretilmektedir. Bu enzimler, gıda kaynaklı olabildikleri gibi ekzojen ya da mikrobiyal kaynaklı da olabilmektedir (Smacchi ve Gobetti 2000). Süt ürünleri, sütte doğal olarak oluşan enzimlerin proteolitik aktivitesi ya da ekzojen enzimlerin ve mikrobiyal starter enzimlerinin etkisi sonucu oluşan biyoaktif peptidler içerebilmektedir. Söz konusu peptidler sütün işlenmesi sırasında oluşmaktadır. Biyoaktif peptidlerin mevcudiyeti süt ürünlerine fonksiyonel özellikler kazandırmakta ve bu ürünlerin besinsel değerini arttırmaktadır. Ancak süt ürünlerinden elde edilen biyoaktif peptidler, ilgili hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar kadar etkili değildir (Choi vd 2012). Çoğu peynir çeşidi gibi süt ürünlerinde ve yoğurt, ekşi süt, dahi veya kefir gibi fermente süt ürünlerinde çeşitli biyoaktiviteye sahip peptidler tanımlanmıştır. Ayrıca günümüzde, fermantasyon sırasında oluşan veya katkı olarak eklenen biyoaktif peptidleri içeren çeşitli fermente süt içecekleri pazarlanmaktadır. Örneğin, "Calpis" ya da "Ameal S" (Calpis Co., Japan) ve Evolus (Valio Oy., Finland) gibi hipotansif özelliğe sahip ticari fermente içecekler,  $\beta$ -kazein ve  $\kappa$ -kazein orijinli IPP ( $\beta$ -kazein<sub>74-76</sub> ve  $\kappa$ -kazein<sub>108-110</sub>) ve VPP ( $\beta$ -kazein<sub>84-86</sub>) amino asit dizilimlerine sahip antihipertansif tripeptidleri içermektedir (Hafeez vd 2014).



Şekil 2.5. Sığır  $\beta$ -kazein proteininin ana yapısındaki stratejik bölgeler (Meisel 1998)

### 2.2.1. Biyoaktif peptidlerin işlevselliği

Besinsel proteinlerin, gelişim için gerekli olan amino asitleri, enerjiyi ve aynı zamanda çeşitli vücut fonksiyonlarının bakımını sağladığı genel olarak bilinmektedir. Ayrıca bu proteinlerin, proteince zenginleştirilmiş gıdaların duyuşal ve fizikokimyasal özelliklerine katkıda bulunduğu belirtilmektedir. Son yıllarda, gıda proteinlerine karşı artan ilgi, yapılan araştırmalar sonucunda bu proteinlerin yapısında bulunan peptidlerin çeşitli biyoaktivitelere sahip olduğu gerçeğinin ortaya çıkmasından kaynaklanmaktadır. Vücut fonksiyonları üzerinde olumlu etkilere sahip olan bu peptidler, amino asit dizilimlerine bağlı olarak kalp-damar sistemi, sindirim sistemi, bağışıklık sistemi ve sinir

sistemini etkileyebilmektedir (Korhonen ve Pihlanto 2006). Bu peptidlerin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmaların çoğunun hipertansiyonun kontrolü etrafında yoğunlaştığı görülmektedir. Söz konusu durum hipertansiyonun dünya genelinde yaygın oluşuna dayandırılmaktadır. Süt ürünlerinde bulunan biyoaktif peptidlerin antihipertansif etkisi dışında opioid, antimikrobiyal, antioksidatif, antitrombotik, immün düzenleme, oligoelement nakli, enzim inhibisyonu ya da sindirim fonksiyonu düzenleme etkileri bulunmaktadır (Bouhallab ve Bouglé 2004, Choi vd 2012).

### **2.2.1.1. Antihipertansif peptidler**

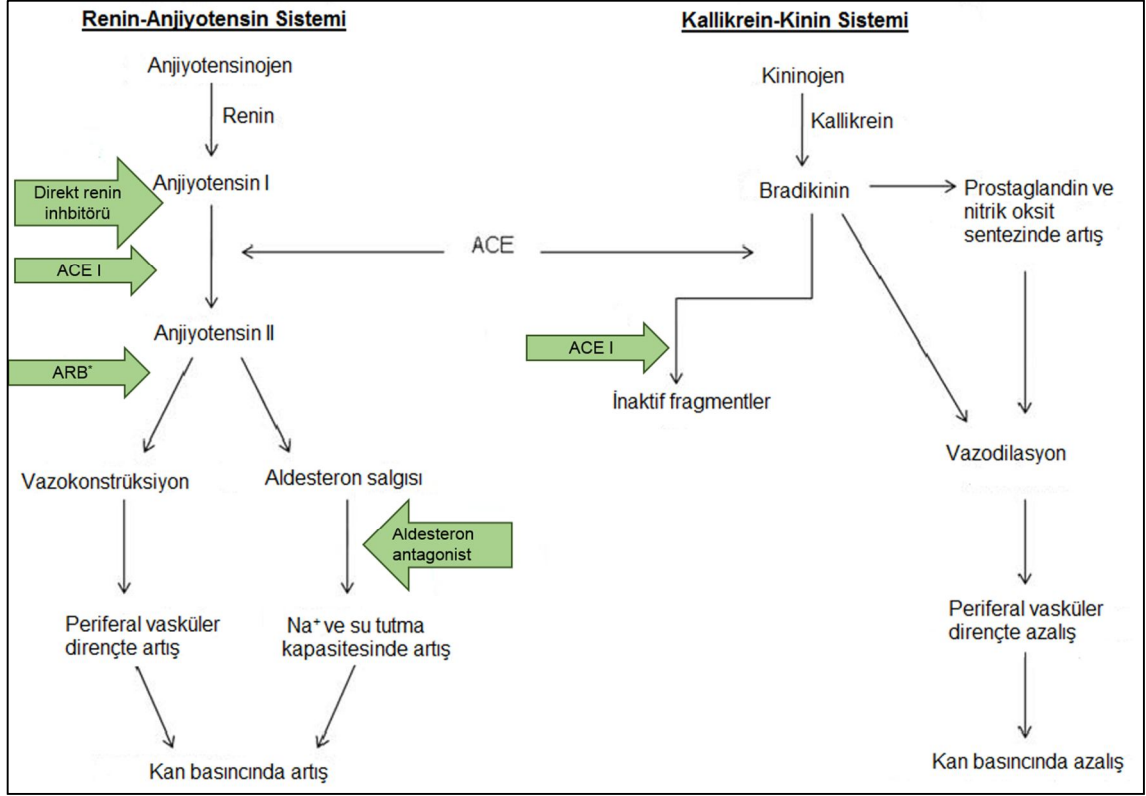
Kardiyovasküler hastalıklar, kalp ve kan damarları hastalıklarını içeren gruba verilen genel bir isimlendirmedir. Kardiyovasküler hastalıkların nedenleri çeşitlilik göstermesine rağmen en sık karşılaşılan nedenler ateroskleroz (damar sertliği) ve hipertansiyon olarak görülmektedir. Hipertansiyon, kardiyovasküler rahatsızlıkların gelişiminde kontrol edilebilir risk faktörlerinden biridir (Phelan ve Kerins 2011, Anonim 2014).

Hipertansiyon; tüm dünyada insan ve dolayısıyla toplum sağlığını ciddi olarak tehdit eden, kalp krizi, felç ve böbrek yetmezliği gibi ölümcül sonuçlara yol açabilen, tehlikeli ve yaygın bir hastalıktır. Damarlarda ateroskleroz, darlık ve tıkanıklıkların gelişmesine, böbreklerde ileride böbrek yetmezliğine kadar giden hasara, kalpte kas kalınlaşmalarına ve kalp yetmezliğine, gözlerde körlüğe kadar giden hipertansif retinopatiye (yüksek kan basıncının gözün retinası üzerinde meydana getirdiği hasar), beyinde ise kanama ve bunun sonucunda inmeye (felç) neden olabilmektedir (Anonim 2010).

Kaptopril, enalapril, lizinopril ve ramipril gibi anjiyotensin dönüştürücü enzimin (hipertansiyona neden olan enzim) güçlü sentetik inhibitörleri hipertansiyonun klinik tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sentetik ACE inhibitörlerinin hipotansiyon, renal fonksiyonu azaltma, öksürük, kaşıntı ve deride kızarıklıklar gibi bir takım yan etkilerinin olmasından dolayı, daha az yan etkisi olan çeşitli gıda proteinlerinde bulunan ACE inhibitörleri önem kazanmaya başlamıştır. Peptidlerin antihipertansif aktivitesi, anjiyotensin I-dönüştürücü enzimi inaktive etmeleri kaynaklıdır. Süt orijinli antihipertansif peptidlerin etkisi çeşitli antihipertansif ilaçlardan daha az olmasına rağmen, bu peptidlerin sindirim sisteminde yüksek oranda sindirilebilmelerinden dolayı önemli fizyolojik aktivitelere sahip olabildikleri bildirilmiştir (Dağdemir vd 2003, Phelan ve Kerins 2011).

Anjiyotensin dönüştürücü enzim vücutta değişik dokularda yer alan ve periferik (çevresel) kan basıncını düzenleyen multifonksiyonel bir dipeptidil karboksipeptidazdır (Pihlanto-Leppälä 2001, Kamau vd 2010, Nagpal vd 2011). Kan basıncı renin-anjiyotensin sistem ve bradikinin sistem tarafından düzenlenmektedir. ACE söz konusu sistemlerde ve dolayısıyla immün sistemde anahtar rol oynamaktadır (Gobbetti vd 2004, Nagpal vd 2011). Renin-anjiyotensin sistem, hipertansiyonun oluşumu ve diğer kardiyovasküler bozuklukların yanı sıra kan basıncı düzenlenmesinde de önemli rol oynayan bir sistemdir (Nurminen 2000). ACE, anjiyotensinojenin renin aracılığı ile salınan anjiyotensin I'in C-terminal bölgesindeki histidin ve lizin amino asitlerini ayırarak vazokonstriktör (damar daraltıcı) etkisi olan anjiyotensin II'yi üretmektedir (Dağdemir

vd 2003). Sistemin etkili molekülü olan anjiyotensin II, doğrudan damar düz kaslarını kasmakta ve bunun sonucunda kan basıncı yükselmektedir (Nurminen 2000). Kallikrein-kinin sistem ise ACE vazodilatörün (damar genişletici) degradasyonunu engellemekte ve böylece kan basıncının kontrolünü sağlamaktadır (Nagpal vd 2011). Şekil 2.6'da Renin-anjiyotensin ve Kallikrein-kinin sistemlerin kan basıncını düzenlemedeki rolleri genel hatlarıyla gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Renin-anjiyotensin ve Kallikrein-kinin sistemleri (Phelan ve Kerins 2011)  
ACE: Anjiyotensin dönüştürücü enzim, ARB: Anjiyotensin II reseptör blokörleri, ACE I: Anjiyotensin dönüştürücü enzim I

Yapılan çalışmalarda, fermente süt ürünlerinin yüksek kan basıncını düşürücü etkiye sahip peptidler içerdiği tespit edilmiştir. ACE inhibitörü olan bu peptidler; kazeinden, peyniraltı suyundan, fermente süttten ve olgunlaştırılmış peynirlerden önemli düzeyde izole edilebilmektedir (Dağdemir vd 2003). Ancak, ACE inhibitörü peptidlerin çoğu, kazein ve peyniraltı suyu proteinlerinin enzimatik hidrolizatlarında tanımlanmıştır. ACE inhibitör peptidleri orta düzeyde etkiye sahip olup, söz konusu peptidlerin IC<sub>50</sub> (ACE'nin %50'sinin inhibe olması için gerekli peptid konsantrasyonu) değerlerinin genellikle 100-500 µmol/L arasında olduğu; buna karşın α<sub>s1</sub>-kazein<sub>23-27</sub> ve β-kazein<sub>177-183</sub> antihipertansif peptidlerinin IC<sub>50</sub> değerlerinin 20 µmol/L'den daha düşük olduğu bildirilmektedir. ACE inhibitörü peptidler genellikle 2 ila 12 amino asit rezidüsü bulundurmakta olup, 27 amino asit rezidüsü bulunduran aktif peptidler de tanımlanmıştır (Phelan ve Kerins 2011). ACE inhibitörü peptidlerin antihipertansif etkisi peptidaz degradasyonuna karşı direncine ve bağırsaklardaki emilimine bağlı olarak değişmektedir. Hidroksiprolin amino asidini içeren peptidlerin genellikle sindirim enzimleri tarafından

degrade edilmeye karşı daha dirençli olduğu belirtilmektedir. Ayrıca prolin amino asidinin sindirim enzimlerinin degradasyonuna karşı dirençli olduğu ve ince bağırsaklardan kısa peptidler şeklinde kan dolaşımına geçebildiği bilinmektedir (Korhonen ve Pihlanto 2006). Hipertansif farelerin VPP ve IPP antihipertansif tripeptidlerini içeren ekşitilmiş süt ile beslenmelerinin ardından bu peptidlerin farelerin abdominal aortlarında tespit edilmesi, prolin içeren peptidlerin sindirim enzimlerinin degradasyonuna karşı dirençli olduğunu göstermektedir (Kamau vd 2010).

İnek sütünde proteinlerin yaklaşık %80'ini oluşturan kazeinin proteolitik olarak parçalanması sonucu, ACE enzimini inhibe eden çeşitli peptidler oluşmaktadır (Dağdemir vd 2003). Kazeinden üretilen ACE inhibitörü peptidler kazokinin olarak adlandırılmakta ve bu peptidler  $\alpha_{s1}$ -kazein'in 23.-24., 23.-27. ve 194.-199. fraksiyonlarına,  $\beta$ -kazeinin ise 177.-183. fraksiyonuna uygunluk göstermektedir. Yüksek ACE inhibitör aktivitesine sahip olan çoğu peptid nispeten daha kısa olup, C-terminalinde prolin amino asidi bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar  $\beta$ -kazomorfin 7 (f60-66) ve  $\beta$ -kazokinin 10'nun (f193-202) gıda kaynaklı ACE inhibitörleri içerisinde en kuvvetli antihipertansif etkiye sahip peptidler olduğunu göstermektedir. Sentetik  $\beta$ -kazein<sub>169-175</sub> peptidi, sürekli olarak hipertansif farelerde güçlü antihipertansif aktivite göstermektedir. Normalde ACE inhibitör aktivitesi düşük olan bu peptidin aktifliği, pankreatik sindirimden sonra artmaktadır.  $\alpha_{s1}$ -kazein<sub>104-109</sub> peptidinin ise güçlü ACE inhibitör aktivitesine sahip olduğu, ancak önemli bir antihipertansif etki göstermediği belirtilmektedir (Pihlanto-Leppälä vd 2002).

Yapılan çalışmalar, peyniraltı suyu proteinlerinin de kazein gibi antihipertansif etkiye sahip peptidler içerdiğini göstermiştir.  $\beta$ -laktoglobulin'den elde edilen peptidler laktokinin olarak adlandırılmaktadır (Dağdemir vd 2003). Peyniraltı suyu proteinlerinden elde edilen bu peptidlerin ACE inhibitör aktiviteleri sınırlıdır. Çünkü peyniraltı suyu temel bileşeni olan  $\beta$ -laktoglobulin, esnek olmayan bir yapıya sahip olup sindirim enzimlerine karşı direnç göstermektedir. Bununla birlikte peyniraltı suyu proteinlerinden enzimatik sindirimle ACE inhibitör peptidlerinin elde edildiği bildirilmiştir (Yamamoto ve Takano 1999).

Sığır  $\alpha$ -laktoalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin ve peyniraltı suyu protein konsantratları düşük ACE inhibisyon etkisi (%10'dan daha az) göstermelerine karşılık, bu proteinlerin pepsin, tripsin ve kimotripsin enzimleriyle hidrolizi sonucu oluşan peptidlerin oldukça yüksek (%73-90) inhibisyon etkisi gösterdikleri belirtilmektedir. Peyniraltı suyu proteinlerinin 7 farklı proteaz enzimiyle (tripsin, proteinaz K, aktinaz E, termoisin, papain, pepsin ve kemotripsin) hidrolize edildiği çalışma sonucunda, proteinaz K ile hidroliz sonucu oluşan hidrolizatların, yüksek tansiyonlu farelere (2 mg/kg) verildikten sonra kan basıncını önemli derecede düşürdüğü bildirilmiştir (Dağdemir vd 2003).

Fermantasyon işlemi sırasında laktik asit bakterileri süt proteinlerini, gelişimleri için gerekli olan azotu karşılamak için kullandıkları peptid ve amino asitlere hidrolize etmektedir. Böylece fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılan starter kültürde yer alan ya da almayan bakteriler tarafından biyoaktif peptidler üretilmiş olmaktadır. Söz konusu peptidlerin serbest hale geçmelerini etkileyen en önemli faktör suş seçimidir. Laktik asit bakterileri arasında *Lactobacillus helveticus*'un süt bazlı ortamlarda güçlü proteolitik aktivite gösterdiği bildirilmektedir (Pihlanto 2013). *Lactobacillus*

*helveticus*'un dışında *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* SS1, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* FT4, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus lactis* spp. *lactis*, *Lactococcus raffinolactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides* spp. *cremoris* ve *Enterococcus faecalis* gibi laktik asit bakterilerinin de ACE inhibitörü peptidleri üretebildikleri bildirilmektedir (Phelan ve Kerins 2011).

Japonya'da üretilen Ameal S adlı ürün, sütün *Lb. helveticus* ve *S. cerevisiae* ile fermantasyonu sonucunda üretilmektedir. ACE inhibitörü peptidler olan VPP ve IPP'yi içeren bu ürünün hipertansif farelerin sistolik kan basınçlarını belirgin bir şekilde düşürdüğü belirtilmiştir (Fitzgerald ve Murray 2006). VPP ve IPP ACE inhibitörü tripeptidlerini içeren diğer bir ürün ise Finlandiya'da üretilen Evolus'tur. Bu ürün sütün *Lb. helveticus* LBK16H suşu ile fermente edilmesi sonucu üretilmektedir. Evolus'un insanlar üzerinde etkilerini belirlemek için yapılan çalışma sonucunda söz konusu ürünün kan basıncını düşürücü etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Seppo vd 2003). VPP ve IPP tripeptidleri dışında LPP kazein orijinli tripeptidin de antihipertansif etki gösterdiği belirlenmiştir (Lehtinen vd 2010). SKVYP ACE inhibitör peptidini içeren Dahi adlı fermente sütün orta yaş hipertansif kişilerde kan basıncını düşürücü etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Ashar ve Chand 2004).

Yapılan farklı bir çalışmada, hipertansif hastaların kan basıncının, antihipertansif özellikte olan VPP ve IPP tripeptidlerini içeren 95 ml fermente sütün günlük sindiriminden sonraki 4. ve 8. haftalarda belirgin bir şekilde azaldığı belirtilmiştir (Yamamoto ve Takano 1999).  $\alpha_{s1}$ - ve  $\beta$ -kazein orijinli söz konusu antihipertansif peptidler *Lb. helveticus* ile fermente edilen sütte de tanımlanmış olup kazein hidrolizatlarının *Lb. helveticus* CP790'nın hücre dışı proteinazları tarafından üretildiği tespit edilmiştir (Yamamoto vd 1994).

Quirós vd (2005) keçi sütünden üretilen kefirin ACE inhibitör aktivitesinin büyük ölçüde kefirin fermantasyonu sırasında kazeinden serbest hale geçen ve güçlü ACE inhibisyon etkisi gösteren PYVRYL ve LVYPFTGPIP amino asit dizilimine sahip peptidlerden kaynaklandığını tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada kefir peptidlerinin ACE inhibisyon aktivitesi üzerine gastrointestinal sistemin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, kefirde izole edilen peptidler, pepsin ve korolaz PP enzimlerinin kullanıldığı simule gastrointestinal sindirime tabi tutulmuştur. Sindirimden sonraki ACE inhibitör aktivitenin hidrolize edilmemiş peptidlerin ACE inhibitör aktivitesi ile hemen hemen aynı ya da biraz daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Ancak kefirde izole edilen DKIHPP ( $\beta$ -kazein<sub>47-52</sub>) peptidinin sindirimi sonucu oluşan DKIHP amino asit dizilimine sahip peptidin ACE inhibitör aktivitesinin DKIHPP'ye göre 8 kat yüksek olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar, sindirimden sonra serbest hale geçen kısa zincirli peptidlerin antihipertansif etki açısından potansiyele sahip olduklarını değerlendirmişlerdir.

Peynirin olgunlaşması sırasında süt proteinleri; hücre içi süt enzimleri, eklenen pıhtılaştırıcılar ve mikrobiyal enzimlerin faaliyetleri sonucunda birçok peptide degrade olmaktadır. Yapılan çalışmalar, ACE inhibitör peptidlerinin peynir yapımı sırasında özellikle de peynirin olgunlaşma işlemi sırasında oluştuğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalarda Gouda, Blue, Edam ve Havarti gibi ticari peynir çeşitlerinde (Saito vd 2000),

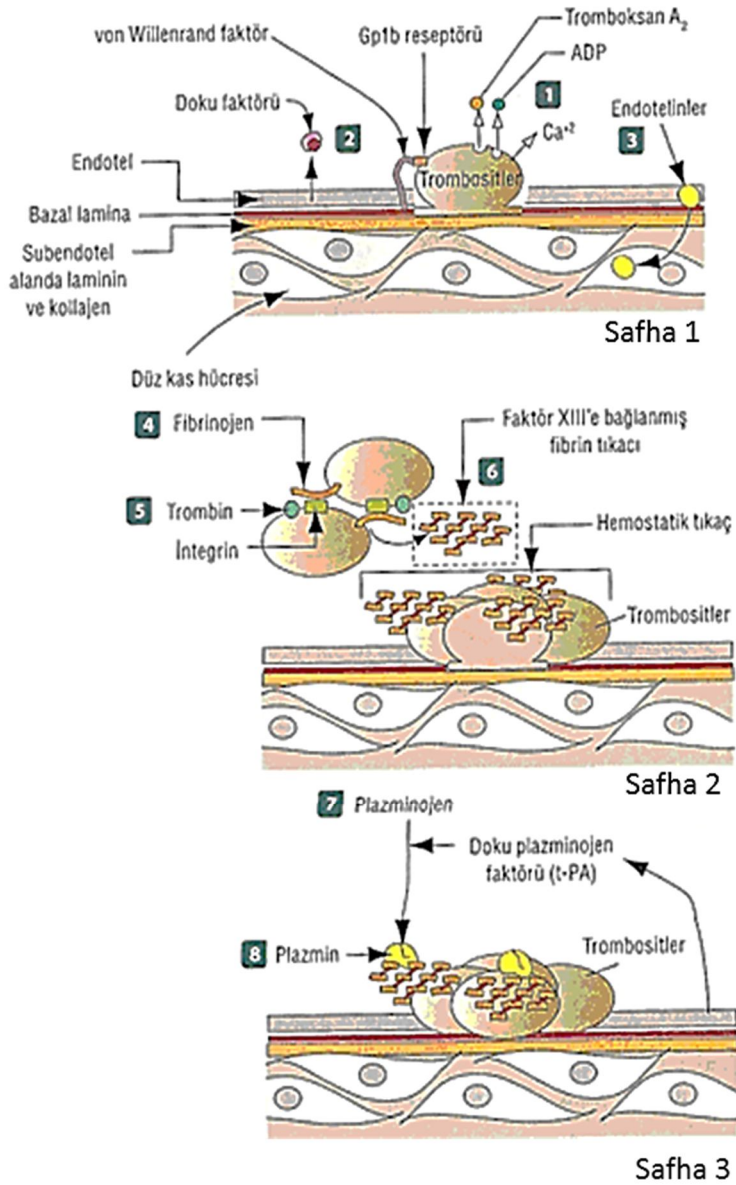


İtalyan ve İspanyol peynirlerinde (Smacchi ve Gobetti 1998, Gómez-Ruiz vd 2004, Gómez-Ruiz vd 2006) ve Asiago peynirlerinde (Lignitto vd 2010) ACE inhibitör peptidleri tanımlanmıştır. Ayrıca Butikofe vd (2007) sert, yarı sert ve yumuşak İsviçre peynir çeşitlerinde VPP ve IPP antihipertansif tripeptidlerini tanımlamışlardır.

### 2.2.1.2. Antitrombotik peptidler

Trombositler, karaciğer ve böbrekte üretilen 35 ile 70 kDa büyüklüğünde bir glikoprotein olan trombopoietin kontrolü altında megakaryositlerden (kemik iliğinin en büyük ve çok loblu hücresi) farklılaşan küçük stoplazma parçacıklarıdır. Bu megakaryosit parçaları, sistemik dolaşıma girince trombosit adını almaktadır. Trombositler hemostazın sağlanmasında yani kanamanın durdurulmasında önemlidir. Yüzeyle yapışma eğiliminde olan trombositler, kan damarlarının içini döşeyen normal endotel hücrelerine yapışmamaktadır. Ancak damarın içindeki endotel bir şekilde hasar görür ve altındaki bağ dokusu (kollajen) açığa çıkarsa, trombositler kollajene bağlanmaktadır. Bu bağlanma, trombositlerin granüllerindeki içeriği ortama boşaltmalarına sebep olmaktadır. Ortama boşalan bu maddelerden biri olan ADP, hasarlı bölgeye diğer trombositlerin göç etmesini sağlarken tromboksan A<sub>2</sub> vazokonstriksiyon (damar daralması) ve trombosit agregasyonunu sağlamaktadır. Granüllerden serbest hale geçen kalsiyum iyonları ise pıhtılaşmanın her safhasında etkilidir. Endotel hücrelerinden doku faktörü salgılanmakta ve pıhtılaşma mekanizması başlamaktadır (Anonim 2006, Vatansever 2006).

Endotel hücreleri tarafından salgılanan bir protein olan von Willebrand faktörü (vWF) endotel alanda trombositlerin kollajen ve laminine (zar şeklinde ince düz tabaka) bağlanmasını kolaylaştırmak üzere Gp1b trombosit reseptörüne bağlanmaktadır. Endotel hücreler tarafından salgılanan endotelinler (damar endotel hücreleri tarafından üretilen peptid yapısındaki lokal hormon) düz kas kontraksiyonunu uyarmakta ve tamir mekanizmasında rol oynayan endotel hücreler ile fibroblastların hızla çoğalmasını sağlamaktadır (Safha 1). Plazmada bulunan fibrinojen, aktifleşmiş integrin reseptörlerine bağlanmakta ve trombositler birbirleri ile köprü oluşturarak kümelenmektedir. Trombosit yüzeyinde bulunan reseptörüne bağlanan trombin, fibrinojene etki ederek fibrinopeptidlerin parçalanmasını ve fibrin monomerlerin oluşmasını sağlamaktadır. Fibrin monomerleri pıhtıyı oluşturmak üzere birleşmektedir (agregasyon). Faktör XIII, fibrin monomerleri ile çapraz bağlantılar kurmaktadır. Trombositler ve fibrin, hemostatik tıkaçı oluşturmaktadır (Safha 2). Plazminojen doku plazminojen aktivatörü tarafından plazmine dönüştürülmektedir. Plazmin, fibrin tıkaçını eritmektedir (Safha 3) (Şekil 2.7) (Vatansever 2006).



Şekil 2.7. Kanın pıhtılaşma safhaları (Vatansever 2006)

Kanın pıhtılaşma mekanizması yaşamsal, ama kanın akışkanlığını korumak ve herhangi bir damar zarar gördüğünde akışı durdurmak için kanın pıhtılaşmasını sağlamak gibi birbirine ters iki işlevi yerine getirmektedir. Bu mekanizmanın işleyişinin bozulması trombozun oluşmasına neden olmaktadır. Tromboz, kanın aterosklerozlu bir atardamar veya toplardamar içinde ya da bir organda pıhtılaşmasıyla meydana gelen bir hastalıktır. Bu pıhtıya trombüs adı verilmektedir. Ateroskleroz, atardamarların iç duvarında plak şeklinde lezyonlar gelişmesine neden olmaktadır. Söz konusu plaklar bütün damar sistemine dağılabilmektedir. Böyle bir plak parçalandığında içerdiği kollajen, dolaşan kanla temasa geçmekte ve trombositler lezyon bölgesine yapışarak bir trombüsün oluşmasına neden olmaktadır. Trombüs genişleyerek damarı tıkayabilmektedir. Bu durumda kanın damar içinden akışı engellenmekte ve dokuda hasar oluşmaktadır. Bunun

sonucunda, inme, akut koroner sendrom gibi ciddi kardiyovasküler olaylar ortaya çıkabilmektedir (Anonim 1998).

Enzim ile  $\kappa$ -kazein etkileşimi olarak tanımlanan süt pıhtılaşması ve trombin ile fibrinojen etkileşimi olarak tanımlanan kanın pıhtılaşma mekanizmaları yapı olarak benzerlik göstermektedir (Silva ve Malcata 2005). Yapılan çalışmalarda, bu iki pıhtılaşmadaki benzerliklerden yararlanılarak trombosit fonksiyonunda etkin olan kazein ve süt proteinlerinden elde edilen peptidler karakterize edilmiştir (Fiat vd 1993). İnsan fibrinojeninin  $\gamma$ -zincirinin C-terminalinde yer alan dodecapeptid (f400-411) ile sığır  $\kappa$ -kazeinin C-terminalindeki undecapeptid ( $\kappa$ -kazein<sub>106-116</sub>) yapısal ve fonksiyonel olarak oldukça benzerlik göstermektedir (Silva ve Malcata 2005).

Sığır  $\kappa$ -kazeinin C-terminalinden türemiş peptidler kazoplatelinler olarak adlandırılmakta olup, antitrombotik etki göstermektedir (Clare ve Swaisgood 2000, Silva ve Malcata 2005).  $\kappa$ -kazeinin triptik sindirimi ile elde edilen daha küçük bir peptid olan kazopiastrin ( $\kappa$ -kazein<sub>106-116</sub>), fibrinojen bağlanmasını inhibe ederek antitrombotik etki göstermektedir (Rutherford-Marwick ve Moughan 2005).  $\kappa$ -kazeinin 106.-112. ve 112.-116. fragmentlerinin, ADP maddesi tarafından aktive olmuş trombositlerin agregasyonunu ve trombosit yüzeyindeki spesifik reseptör bölgesine insan fibrinojenin  $\gamma$ -zincirinin bağlanmasını inhibe ettiği bildirilmektedir (Kamau vd 2010). Aynı şekilde elde edilmiş  $\kappa$ -kazein<sub>103-111</sub> peptidi, trombosit agregasyonunu inhibe etmekte; fakat trombosit reseptöre fibrinojen bağlanmasını engellemektedir (Clare ve Swaisgood 2000).

Anne sütü ve inek sütü içeren bebek mamasıyla beslenen yeni doğmuş 5 günlük bebeklerin plazmasında insan ve sığır  $\kappa$ -kazeinoglikopeptidlerinden türemiş antitrombotik etkiye sahip peptidler tanımlanmıştır (Chabance vd 1995).

Ticari fermente süt içeceği olan Yakult'tan izole edilen *Lb. casei* Shirota ve *St. thermophilus* ile sığır kazeininin fermentasyonu sırasında oluşan peptidlerin antitrombotik özelliklerinin incelendiği bir çalışmada, antitrombotik özellik gösteren peptidlerin sadece *Lb. casei* Shirota suşu ile gerçekleştirilen fermentasyon sırasında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışma sonucunda, daha önce ACE inhibitörü etkisi gösterdiği belirtilen YQEPVLGPVRGPFPIIV ( $\beta$ -kazein<sub>193-209</sub>; Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val) amino asit dizilimine sahip peptidin antitrombotik etkiye de sahip olduğu saptanmıştır (Rojas-Ronquillo vd 2012).

### 2.2.1.3. Opioid peptidler

Opioid peptidler sinir sistemi üzerinde olumlu etkiler gösteren ve morfin benzeri özelliklere sahip peptidler olarak tanımlanabilmektedir (Kınık ve Gürsoy 2002). İntestinal epitel ve diğer hücreler üzerindeki opioid reseptörlere bağlanabilen ve genellikle 5 ila 10 amino asit rezidüsü içeren bu peptidlerin karakteristik özellikleri; yüksek miktarda prolin içermeleri, hidrofobik karakterli olmaları ve agonistik veya antagonistik etki göstermeleridir (Kamau vd 2010, Erkaya vd 2011). Opioid peptidler, ana proteinin pepsin, pepsini takiben tripsin ya da sadece kimotripsin gibi sindirim enzimleriyle hidrolizi sonucu oluşmaktadır (Silva ve Malcata 2005).

Süt proteinlerinden elde edilmiş opioid özelliğe sahip biyoaktif peptidler hem agonist hem de antagonist etki gösterebilmektedir (Fitzgerald ve Meisel 2003). Süt proteinlerinden elde edilen biyoaktif peptidlerin çoğu opioid agonisttir (kazomorfinler, eksorfinler, serum albuminden elde edilen  $\alpha$ -laktorfin,  $\beta$ -laktorfin ve serorfin). Agonist aktiviteye sahip olan peptidler morfin benzeri uyuşturucu etki gösterirken, antagonistik peptidler (laktoferroksinler ve kazoksinler) bu etkiyi giderici özelliğe sahiptir (Silva ve Malcata 2005).

"Tipik" opioid peptidler olarak adlandırılan enkefalin, endorfin ve dinorfinler sırasıyla propiomelanokortin, proenkefalin ve prodinorfin öncü proteinlerinden üretilmektedir (Silva ve Malcata 2005). Tüm tipik opioid peptidler aynı N-terminal diziyeye (YGGF) sahiptir. Opioid peptidler, aktivitelerini hedef hücredeki spesifik reseptörlere bağlanarak ortaya çıkarmaktadır (Pihlanto-Leppälä 2001). Opioid reseptörler ( $\mu$ -,  $\delta$ -,  $\kappa$ -tipleri) sinir endokrin sistem ile immün sistemde ve memelilerin intestinal bölgesinde yer almaktadır (Silva ve Malcata 2005). Bu reseptörler spesifik fizyolojik etkilerden sorumludur. Örneğin emosyonel davranışlar ve intestinal hareketin inhibisyonu için  $\mu$ -reseptörleri, yine emosyonel davranışlar için  $\delta$ -reseptörü ve sedasyon (hastanın sakinleştirilmesi hadisesi) ve yiyecek alımı (yeme davranışı) için  $\kappa$ -reseptörleri etkili olmaktadır. Çeşitli öncü proteinlerden türeyen opioid peptidler "atipik" opioid peptidler olarak adlandırılmakta olup, söz konusu peptidlerin N-terminal dizisi Tyr-X-Phe veya Tyr-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-Phe şeklindedir. N-terminaldeki tirozin rezidüsü ve 3. ya da 4. pozisyonda başka bir aromatik amino asidin bulunması, opioid reseptörlerin bağlanma bölgelerine uyması için önemli yapısal bir motif oluşturmaktadır (Pihlanto-Leppälä 2001).

Opioid peptidler içerisinde en kuvvetli opioid aktivite gösteren grup  $\beta$ -kazomorfinlerdir. (Pihlanto-Leppälä 2001). Bunlar sığır  $\beta$ -kazeinin 60. ve 70. özellikle de 60.-63., 60.-64., 60.-65., 60.-66. ve 60.-70. fragmentleri olup,  $\mu$  tip reseptör ligandları olarak sınıflandırılmaktadır (Silva ve Malcata 2005).Yapılan bazı çalışmalarda,  $\beta$ -kazomorfin 5 (BCM5,  $\beta$ -kazein<sub>60-64</sub>) ve  $\beta$ -kazomorfin 7'nin (BCM7,  $\beta$ -kazein<sub>60-66</sub>) ya da benzer peptidlerin tip I diyabet, otizm, şizofren ve iskemik kalp hastalığı gibi rahatsızlıkların gelişim riskini arttırabileceği bildirilmektedir. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA)  $\beta$ -kazomorfinlerin muhtemel sağlık etkileri ile ilgili mevcut bilimsel literatürü derleyerek hazırladıkları raporda diyetdeki BCM7 alımı ile bulaşıcı olmayan hastalıklar arasında sebep-etki ilişkisi kurulamayacağı değerlendirilmiştir. Ayrıca EFSA tarafından hazırlanan bu raporda, BCM7'nin gastrointestinal hareket, mide ve pankreatik salgılar üzerinde düzenleyici etkilere sahip olduğu belirtilmektedir (De Noni ve Cattaneo 2010).

Yapılan çalışmalarda; sığır sütünde (Cieślińska vd 2007, Cieślińska vd 2012), anne sütünde (Jarmołowska vd 2007), bazı peynir çeşitlerinde (Jarmołowska vd 1999, Norris vd 2003, Sienkiewicz-Szłapka vd 2009, De Noni ve Cattaneo 2010) ve ticari yoğurttta (Jarmołowska 2012) opioid özellik gösteren BCM7 peptidi tespit edilmiştir. Buna karşın De Noni ve Cattaneo (2010) yaptıkları çalışmada ticari yoğurt örneklerinde BCM5 ve BCM7'yi tespit edememiş ve bu durumun üretim sırasında peptidlerin degradasyonundan kaynaklandığı değerlendirilmiştir.

Sığır  $\alpha$ <sub>s1</sub>-kazeini orijinli eksorfinler  $\alpha$ <sub>s1</sub>-kazeinin 90.-95., 90.-96. ve 91.-96. fragmentleri olup  $\delta$ -selektif reseptör liganları olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca  $\gamma$ -

kazeinin triptik hidrolizi sonucu oluşan YPVEPFTE (Tyr-Pro-Val-Glu-Pro-Phe-Thr-Glu) amino asit dizilimine sahip peptidin *in vitro* olarak opioid benzeri aktivite gösterdiği belirtilmektedir (Silva ve Malcata 2005).

Peyniraltı suyu proteinleri, temel yapılarında  $\alpha$ -laktalbumin<sub>50-53</sub> (hem sığır hem insan) ve  $\beta$ -laktoglobulin<sub>102-105</sub> (sığır) olarak adlandırılan opioid benzeri diziler içermektedir. Bu peptidler  $\alpha$ - ve  $\beta$ -laktorfinler olarak adlandırılmaktadır.  $\alpha$ -laktalbuminin pepsin ile proteolizi sonucu  $\alpha$ -laktorfin elde edilirken,  $\beta$ -laktoglobulinin önce pepsin sonra da tripsin ile ya da tripsin ve kimotripsin ile muamelesi sonucu  $\beta$ -laktorfin elde edilmektedir (Pihlanto-Leppälä 2001).

Opioid antagonistler, enkefalinlerin agonist etkisini baskılamakta ve kazoksinler olarak adlandırılmaktadır. Kimyasal olarak sentezlenen kazoksin A ve kazoksin B, insan ve sığır  $\kappa$ -kazeinin amino asit dizilerine benzemektedir. Kazoksin A,  $\kappa$ -kazeinin 35.-41.; kazoksin B ise  $\kappa$ -kazeinin 58.-61. amino asit rezidülerine sahiptir. Kazoksin C, sığır  $\kappa$ -kazeinin triptik sindirimi sonucu elde edilen, YIPIQYVLSR amino asit rezidüsüne uygunluk gösteren ve yüksek biyolojik potansiyele sahip olan opioid antagonist bir peptiddir (Silva ve Malcata 2005). Laktoferrinin pepsin sindirimi ile elde edilen laktoferroksinler, tek başına minimal düzeyde etkin opioid antagonistlerdir (Korhonen vd 1998).

#### 2.2.1.4. İmmün Sistemi Düzenleyici Peptidler

Bilindiği gibi immün sistem, vücudu hastalıklara karşı korumada, patojen (bakteri, virüs vb.) ve tümör hücrelerini tanıyıp yok etmede önemli bir rol oynamaktadır. Kazein ve peyniraltı suyu proteinleri kaynaklı peptidlerin fagositoz, antikör üretimi, makrofaj sitotoksik aktivite, lenfosit çoğalması, T-lenfositlerini düzenleme ve hücre öldürücü aktivite gibi etki ve mekanizmalarla immünomodülatör etki gösterdiği bildirilmiştir (Kınık ve Gürsoy 2002). Ayrıca bu peptidler, atopik (alerjik bir bünyeye sahip olan) insanlarda alerjik reaksiyonları yatıştırabilmekte ve gastrointestinal bölgedeki mukozal bağışıklığı geliştirmektedir (Korhonen ve Pihlanto 2006). Bunun yanı sıra, sütün fermantasyonu sonucunda oluşan peptidler fermente sütün antitümör etkilerine de katkıda bulunmaktadır (Meisel vd 1998).

Yapılan çalışmalarda, kazeinden elde edilen çoğu peptidin immün düzenleyici etkiye sahip olduğu belirtilmiştir.  $\alpha$ <sub>s1</sub>-kazein (f194-199; TTMLPW) ve  $\beta$ -kazein (f63-68; PGPIP N ve f191-193; LLY) fragmentlerini içeren kazein orijinli immün düzenleyici peptidlerin sıçan peritoneal makrofajları tarafından koyun kırmızı kan hücrelerinin fagozitozunu uyardığı bildirilmiştir (Meisel vd 1998). Ayrıca  $\alpha$ <sub>s1</sub>-kazeinden elde edilen biyoaktif peptidler; antikör formasyonunun gelişiminde, *in vitro* olarak fagositozun, lenfosit proliferatif yanıtların, doğal öldürücü hücre aktivitesinin ve nötrofil hücre hareketinin artışında rol oynamaktadır (Rutherford-Marwick ve Moughan 2005). Konsantrasyona bağlı olarak,  $\beta$ -kazein<sub>60-66</sub>, örneğin  $\beta$ -kazokinin 10 ve  $\beta$ -kazomorfin 7, lenfosit çoğalması üzerinde hem baskılayıcı hem de uyarıcı etki göstermektedir.  $\alpha$ -laktalbumin<sub>18-19</sub>,  $\alpha$ -laktalbumin<sub>50-51</sub> ve  $\kappa$ -kazein<sub>38-39</sub> peptidlerinin insan periferik kan lenfositlerinin çoğalmasını arttırdığı bildirilmiştir (Fitzgerald ve Meisel 2003). Ayrıca  $\beta$ -kazeinin pepsin ile hidrolizi sonucu oluşan ve YQEPVLPVIRGPFPIIV ( $\beta$ -kazein<sub>193-209</sub>) amino asit dizilimine sahip olan peptidin immün düzenleyici etkiye sahip olduğu ve

kapsüllü lenf bezi hücreleri ve kapsülsüz sıçan dalak hücreleri üzerinde mitojenik etki gösterdiği belirtilmiştir (Coste vd 1992). Söz konusu peptidin çeşitli peynir tiplerinin yanı sıra yoğurt ve bazı fermente sütlerden izole edilip tanımlandığı bildirilmiştir (Regazzo vd 2010).

İmmün sistemin uyarılmasında yer alabilecek diğer peptid grubu, ACE inhibitörleridir. Daha önce de belirtildiği gibi bu enzim anjiyotensin II'nin aktivasyonunu katalize etmekte ve bu yolla, bradikininin inaktive etmektedir. Bradikinin, makrofajları uyarmakta, lenfosit migrasyonunu ve lenfokinlerin (bağışıklık hücreleri tarafından salgılanan, polipeptid niteliğinde mesaj iletici madde) salgılanmasını arttırmaktadır (Fiat vd 1993). Bu bağlamda örnek gösterilen peptidler olan  $\alpha_{s1}$ -kazein<sub>194-199</sub>,  $\beta$ -kazein<sub>60-66</sub> ve  $\beta$ -kazein<sub>193-202</sub>, hem immün sistemi uyarıcı aktivite hem de ACE aktivitesi göstermektedir (Korhonen ve Pihlanto-Leppälä 2001).  $\beta$ -kazein orijinli ACE inhibitörü peptidlerin fagositozu uyardığı ve fareleri *K. pneumoniae* enfeksiyonuna karşı koruduğu bildirilmiştir (Rutherford-Marwick ve Moughan 2005). Ayrıca opioid peptidler, opiat  $\mu$ -reseptörler yoluyla lenfositlerin immüno reaktivitesini etkilemektedir (Silva ve Malcata 2005).

Süt proteinleri kaynaklı immün düzenleyici peptidlerin yapı-aktivite ilişkileri ve mekanizmaları tam olarak açıklanamamıştır. İmmün düzenleyici peptidlerin ortak yapısal özelliklerinden biri, C-terminal bölgelerinde arjininin mevcut olmasıdır (Clare ve Swaisgood 2000).

#### 2.2.1.5. Antimikrobiyal peptidler

Sütün antimikrobiyal aktivitesi temel olarak immunoglobülinlere ve laktoferrin, laktoperoksidaz ve lizozim gibi (doğal bağışıklıkla ilişkilendirilmeyen) proteinlere dayandırılrsa da antimikrobiyal peptidler doğal bağışıklığın en önemli bileşenleri olarak bilinmektedir. Bu peptidler kısa, katyonik, ampifilik, moleküler ağırlığı  $\leq 5$  kDa olan, 12-50 amino asit içeren, geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip moleküllerdir. Peyniraltı suyu proteinlerinin ( $\alpha$ -laktalbumin ve  $\beta$ -laktoglobulin) ve kazein fraksiyonlarının ( $\alpha_{s1}$ -kazein,  $\alpha_{s2}$ -kazein,  $\beta$ -kazein ve  $\kappa$ -kazein) ana yapısında çok sayıda antimikrobiyal peptid tanımlanmıştır (Akalin 2014).

Kazein antimikrobiyal peptidlerin önemli kaynaklarından biridir. Kazeinin temel yapısı içerisinde şifrelenmiş çok sayıda antibakteriyel peptid tanımlanmıştır. Kazesidinler olarak bilinen yüksek molekül ağırlıklı peptidler, kazeinin kimozin ile muamelesi sonucu serbest hale geçmektedir.  $\alpha_{s1}$ -kazein ve  $\kappa$ -kazein orijinli olmaları muhtemel olan bu peptidler *Staphylococcus aureus* gibi çeşitli patojenik bakterilere karşı bakterisidal etki gösterebilmektedir (Gobetti vd 2004). Ayrıca kazesidinler *Sarcina* spp., *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumonia* ve *Streptococcus pyogenes* gibi mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Silva ve Malcata 2005). Ancak, söz konusu peptidlerin klinik performanslarının ticari antibiyotiklere göre zayıf olduğu ve duyarlı bakterileri *in vitro* olarak inhibe edebilmeleri için oldukça yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir (Benkerroum 2010).

İsrasidin,  $\alpha_{s1}$ -kazeininin kimozinle hidrolizi sonucu elde edilen ve bu protein fraksiyonunun N-terminal fragmentine (fl-23) uygunluk gösteren antibakteriyel bir

peptiddir. Katyonik bir peptid olan israsidin, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin gelişimini yüksek konsantrasyonlarda (0.1-1.0 mg/mL) *in vitro* olarak inhibe edebilmektedir. Şaşırtıcı bir şekilde, israsidin *in vivo* olarak standard antibiyotik tedavisinde olduğu gibi düşük dozlarda uygulandığında *S. aureus*, *S. pyogenes* ve *Listeria monocytogenes* gibi bakterilere karşı güçlü antimikrobiyal etki göstermektedir. İsrasidin fareleri düşük dozlarda (10 µg) ölümcül enfeksiyonlara karşı, koyunları ve inekleri ise mastitise karşı koruduğu bildirilmektedir. İsrasidin antimikrobiyal aktivitesinin *in vitro* olarak zayıf, buna karşın *in vivo* olarak güçlü bulunması, enfekte edici mikroorganizmalara karşı konaktaki spesifik olmayan direncini uarmak için bir immünotetikleyici peptid olarak dolaylı bir aksiyon moduna sahip olduğunu göstermektedir (Gobetti vd 2004, Akalin 2014).

$\alpha_{s1}$ -kazeininin pepsin ile hidrolizi sonucunda oluşan diğer bir katyonik peptid  $\alpha_{s1}$ -kazein<sub>99-109</sub>'dur. Bu peptidin *B. subtilis*, *Listeria innocua*, *Salmonella typhimurium* ve *Salmonella enteridis*'e karşı 125 µg/mL ve *E. coli*'ye karşı ise 250 µg/mL minimum inhibisyon konsantrasyonunda (MIC) antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir (McCann vd 2006). Sodyum kazeinatın *Lactobacillus acidophilus* DPC6026 ile fermantasyonu sırasında üretilen kazeisin A ( $\alpha_{s1}$ -kazein<sub>21-29</sub>; IKHQGLPQE), kazeisin B ( $\alpha_{s1}$ -kazein<sub>30-37</sub>; VLNENLLR) ve kazeisin C ( $\alpha_{s1}$ -kazein<sub>195-208</sub>; SDIPNPIGSENSEK) peptidlerinin *Enterobacter sakazakii* ATCC 12868 and *E. coli* DPC5063 patojen suşlarına karşı antibakteriyel etki gösterdiği saptanmıştır (Hayes vd 2006). Ayrıca kazeisin A ve B'nin *Cronobacter mytjensii*, *S. aureus* ve *Salmonella enterica* serotip *typhimurium* bakterilerine karşı antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Norberg vd 2011).

Kaynatılmış sütten ve fermente sütten izole edilen pozitif yüklü bir peptid olan kazosidin-I,  $\alpha_{s2}$ -kazeininin 150.-188. amino asit rezidülerine karşılık gelmektedir (Gobetti vd 2004). Bu peptidin *E. coli*, *S. carnosus*, *B. subtilis*, *S. epidermis*, *Enterococcus faecium* ve *Rhodotorula rubra* gibi mikroorganizmalara karşı inhibitör etki gösterdiği bildirilmektedir (Akalin 2014).  $\alpha_{s2}$ -kazeininin mide enzimi olan rennin ile hidrolizi sonucu iki önemli antibakteriyel peptid oluşmaktadır. Bunlardan biri kazosidin-I içerisinde yer alan f (164-179), diğeri de  $\alpha_{s2}$ -kazeininin C-terminal bölgesinde bulunan f183-207'dir (Gobetti vd 2004).  $\alpha_{s2}$ -kazeininin C terminal bölgesinin kimozin ile hidrolizi sonucunda serbest hale geçen  $\alpha_{s2}$ -kazeinin 181.-207., 175.-207. ve 164.-207. fragmentlerinin Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı inhibe edici etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Akalin vd 2014).

Sığır, koyun, keçi, domuz, manda ve anne sütünden hazırlanan sodyum kazeinatların *Lb. helveticus*'un PR4 suşunun saflaştırılmış proteinazı ile hidrolizi sonucunda elde edilen peptidlerin antimikrobiyal özelliklerinin incelendiği bir çalışmada, anne sütünden hazırlanan sodyum kazeinat hidrolizatında tanımlanan  $\beta$ -kazein<sub>184-210</sub> peptidinin Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı geniş inhibisyon spektrumuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Diğer sütlerden hazırlanan sodyum kazeinat hidrolizatlarında ise  $\beta$ -kazein orijinli antibakteriyel peptid tanımlanamıştır (Minervini vd 2003).

Sığır kolostrumundan izole edilen 1881.00 Da kütleli kazeisidin 17 ( $\beta$ -kazein<sub>193-209</sub>; YQEPVLQPVRGPFIIIV) ve 1669.06 Da kütleli kazeisidin 15 ( $\beta$ -kazein<sub>193-207</sub>; YQQPVLGPVRGPFPI) peptidlerinin ve 2763.80 Da kütleli israsidin ( $\alpha_{s1}$ -kazein<sub>16-38</sub>;

RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF) peptidinin *E. coli* DH5 $\alpha$  ve *E. coli* DPC6053 suşlarına karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu peptidlerden kazeisidin 17 ve kazeisidin 15'in söz konusu patojen suşlara karşı MIC değerlerinin benzer olduğu ve bu değerlerin *E. coli* DH5 $\alpha$  ve *E. coli* DPC6053 suşları için sırasıyla 0.5 mg/mL ve 0.4 mg/mL olduğu saptanmıştır. İsrasidinin ise hem *E. coli* DH5 $\alpha$  hem de *E. coli* DPC6053 suşlarına karşı MIC değerinin 0.2 mg/mL olduğu belirlenmiştir (Birkemo vd 2009).

$\kappa$ -kazein, antimikrobiyal peptidlerin önemli öncü proteinlerinden biridir. Sığır  $\kappa$ -kazeininin kimozi ile hidrolizi sonucu oluşan kazeinomakropeptid (CMP,  $\kappa$ -kazein<sub>106-169</sub>) temel oral patojenler olan *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, *S. sobruni*, *E. coli* ve *Porphyromonas gingivalis*'e karşı antibakteriyel etki göstermektedir (Malkoski vd 2001, Nagpal vd 2011). CMP çeşitli glikolize ve fosforile formları kapsayan yüksek derecede heterojen bir polipeptiddir (Benkerroum 2010). CMPin glikozillenmemiş ve fosforillenmemiş formu olan ve kapasin olarak adlandırılan peptidin ( $\kappa$ -kazein<sub>106-169</sub>) Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin gelişimini inhibe ettiği belirtilmiştir (Malkoski vd 2001). Ayrıca kapasinin enterotoksinleri bağlama ve viral ve bakteriyel adhezyonu inhibe etme kabiliyetine sahip olduğu bildirilmiştir (Gobetti vd 2004). Kapasin, *S. mutans* ve *P. gingivalis* bakterileri ile ilişkili kronik periodontit ve ağız enfeksiyonları riskini düşürmek için ağız bakım ürünlerinde ve gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılabilir (Malkoski vd 2001).

Kapsinin endoproteinaz Glu-C ile hidrolizi sonucunda oluşan fosforlanmış Ser(P)<sup>149</sup>  $\kappa$ -kazein<sub>138-158</sub> peptidinin *Streptococcus mutans*, *E. coli* ve *Porphyromonas gingivalis* bakterilerine karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bildirilmektedir. Ayrıca  $\kappa$ -kazeinin peptik sindirimiyle oluşan 18.-24., 30.-32. ve 139.-146. peptid fragmentlerinin *L. innocua*, *Salmonella carnosus* ve *E. coli*'yi inhibe edebildiği belirtilmektedir (Akalin 2014).

Peyniraltı suyu proteinlerinin antimikrobiyal aktiviteye sahip olan peptidlerin önemli kaynağı olduğu bilinmektedir. Sığır  $\alpha$ -laktalbumini globular bir protein olup peyniraltı suyunda bulunan ikinci önemli proteindir. Söz konusu proteinin tripsin ve kimotripsin enzimleri ile sindirimi sonucunda oluşan peptidlerin bakterisidal etkiye sahip olduğu; buna karşın pepsin ile sindirimi sonucunda herhangi bir aktif hidrolizat elde edilemediği belirtilmiştir (Nagpal vd 2011). Ancak bu proteinin pepsin ve tripsin ile hidrolizi sonucunda oluşan peptidlerin *E. coli* JM103'ün metabolik aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Pihlanto- Leppälä vd 1999).

$\alpha$ -laktalbumin orijinli peptidlerin Gram-pozitif bakterilere karşı güçlü, Gram-negatif bakterilere karşı ise zayıf antimikrobiyal etkiye sahip oldukları belirtilmiştir (Nagpal vd 2011). Peptidin genel yapısı ve yük dağılımı, gösterdiği antimikrobiyal aktive için kritik bir öneme sahiptir.  $\alpha$ -laktalbumin orijinli antibakteriyel peptidler antibakteriyel denemenin yapıldığı pH'larda negatif yüklüdür. Bu durum,  $\alpha$ -laktalbumin orijinli peptidlerin dış membranları başlıca bileşen olarak negatif yüklü lipopolisakkarit içeren Gram-negatif bakterilere karşı göstermiş oldukları zayıf antibakteriyel etkiyi açıklamaktadır.



Sütte ve peyniraltı suyunda en çok çalışılan antibakteriyel bileşenler olan laktoferrin ve lizozimin enzimatik hidrolizi sonucu oluşan peptidlerin çok sayıda bakteriye karşı güçlü inhibitör etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Almaas vd 2011). Laktoferrin, anne sütünde yüksek konsantrasyonda bulunan iyon bağlayıcı bir glikoproteindir. Doğal laktoferrin, zayıf bir bakterisit etki gösterirken, sığır ve insan laktoferrininin N-terminalinin pepsin ile hidrolizi sonucu ortaya çıkan peptidler (laktoferrisin B ve laktoferrisin H), laktoferrinden 100-1000 kez daha fazla bakterisidal etki gösterebilmektedir. Ortaya çıkan bu bakterisidal etkinin, laktoferrisinlerin güçlü pozitif yük yoğunluğuna sahip olmalarından ve Gram-negatif bakterilerin dış membranlarında bulunan lipopolisakkaritlere bağlanarak, membran bütünlüğünü bozmalarından kaynaklandığı bildirilmiştir (Tunçtürk 2003). Laktoferrisinin *in vitro* olarak *Bacillus*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Streptococcus* ve *Candida* gibi Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Korhonen ve Pihlanto-Leppälä 2001). Ayrıca laktoferrisinin, *E. coli* O157:H7'nin klinik izolatlarına karşı da antimikrobiyal aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (Fitzgerald ve Meisel 2003).

$\beta$ -laktoglobulin geviş getiren hayvanların sütünde bulunan temel peyniraltı suyu proteini olup globüler yapıdadır. Bu peptidin anne sütünde bulunmadığı belirtilmektedir.  $\beta$ -laktoglobulinin proteolitik sindirimi sonucunda çok sayıda antibakteriyel peptid açığa çıkmaktadır (Nagpal vd 2011). Doğal formunda iken herhangi bir antimikrobiyal etki göstermeyen  $\beta$ -laktoglobulinin pepsin ve tripsin enzimleri ile hidrolizi sonucunda oluşan hidrolizatının *E. coli* JM103'ü inhibe ettiği tespit edilmiştir (Pihlanto-Leppälä vd 1999).  $\beta$ -laktoglobulinin tripsin ile hidrolizi sonucu oluşan 15.-20., 25.-40., 78.-83. ve 92.-100. fragmentleri Gram-pozitif bakterilere karşı bakterisidal etki göstermektedir (Gobetti vd 2004).  $\alpha$ -laktalbumin orijinli antibakteriyel peptidlere benzer şekilde  $\beta$ -laktoglobulin fragmentleri de negatif yüklü olup bakterisidal etkileri Gram-pozitif bakterilerle sınırlıdır. Koyun  $\beta$ -laktoglobulininin farklı proteazlarla proteolitik sindirimi sonucunda çeşitli hidrolizatlar elde edildiği ve bu hidrolizatların *E. coli*, *Bacillus subtilis* ve *S. aureus* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmektedir (Akalin 2014).

Peyniraltı suyu izolatları gıdalarda yaygın bir şekilde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Peyniraltı suyu protein izolatının sindirim enzimleri (pepsin, tripsin ve kimotripsin) ile hidrolizi sonucunda oluşan peptidlerin *Listeria ivanovii* HPB28 ve *E. coli* MC4100 gibi gıda kaynaklı patojen suşlara karşı antimikrobiyal potansiyelini incelemek amacıyla yapılan çalışmada, triptik ve kimotriptik hidrolizatların antibakteriyel aktivite göstermediği; buna karşın peyniraltı suyu proteinlerinin pepsin ile 45-90 dakika süresince hidrolizi sonucu oluşan hidrolizatların belirgin aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Pepsin ile hidrolizin 60. dakikasında elde edilen hidrolizatın ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi kullanılarak fraksiyonlarına ayrılması sonucunda elde edilen 5 fraksiyonun antibakteriyel etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu fraksiyonlarda VRT ( $\beta$ -laktoglobulin<sub>123-125</sub>), PEGDL ( $\beta$ -laktoglobulin<sub>50-54</sub>), LPMH ( $\beta$ -laktoglobulin<sub>143-146</sub>), EKF ( $\beta$ -laktoglobulin<sub>134-136</sub>), IRL ( $\beta$ -laktoglobulin<sub>147-149</sub>) ve KVGIN ( $\alpha$ -laktalbumin<sub>117-121</sub>) antimikrobiyal amino asit dizilimleri tanımlanmıştır (Théolier vd 2013).

Rizello vd (2005) yaptıkları bir araştırmada, farklı tip sütlerden, çeşitli starter kültürler ve teknolojiler kullanarak farklı olgunlaşma sürelerinde elde ettikleri 9 çeşit

İtalyan peynirinin (Parmigiano Reggiano, Pecorino Romano, Fossa, Canestrato Pugliese, Caciocavallo, Gorgonzola, Crescenza, Mozzarella ve Caprino del Piemonte) suda çözünen ekstraktlarının antibakteriyel aktivitelerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda; Parmigiano Reggiano, Fossa ve Gorgonzola peynir ekstraktlarının antibakteriyel peptid içermediği, Pecorino Romano, Canestrato Pugliese, Crescenza ve Caprino del Piemonte peynir ekstraktlarının yüksek homoloji derecesine sahip peptid karışımı içerdiği, Pasta Filata (Caciocavallo ve Mozzarella) peynir ekstraktlarının ise antibakteriyel peptidlere sahip olduğu tespit edilmiştir. Antibakteriyel aktiviteye sahip olan peynir ekstraktlarında tanımlanan peptidlerin, literatürde belirtilen antimikrobiyal ve multifonksiyonel peptidlerin C-terminal ve N-terminal ya da bütün fragmentleri ile yüksek derecede benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca söz konusu çalışma sonucunda, farklı tür hayvanlara ait sütlerden (inek, koyun ve keçi) üretilen peynirlerin antimikrobiyal etki gösteren benzer peptidler üretebilme potansiyeline sahip oldukları tespit edilmiştir.

Yapılan diğer bir çalışmada, ticari çedar peynirlerinden izole edilen peptidlerin *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 6538 ve *B. cereus* ATCC 11778 gibi Gram-pozitif ve Gram-negatif suşlara karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Pritchard vd 2010).

Süt kaynaklı antimikrobiyal peptidlerin hidrofobik/hidrofilik özellikleri, ikincil yapıları ve net elektrik yükleri farklı olduğu için duyarlı bakteriler üzerinde farklı şekillerde etki göstermektedir (Benkerroum 2010). Farklı kaynaklardan elde edilen antimikrobiyal peptidler amino asit kompozisyonu, yapı ve fizikokimyasal karakteristikler bakımından birbirlerinden farklı olmalarına rağmen, bu peptidlerin katyonik yük ve hidrofobik rezidülerinin oranı olmak üzere ortak iki özelliği mevcuttur. İlk özellik zwitteriyonik memeli membrana nazaran negatif yüklü stoplazmik membran için seçiciliği teşvik etmekte; ikinci özellik ise yağ acly zincirleri ile etkileşimlerini kolaylaştırmaktadır (Nguyen vd 2011).

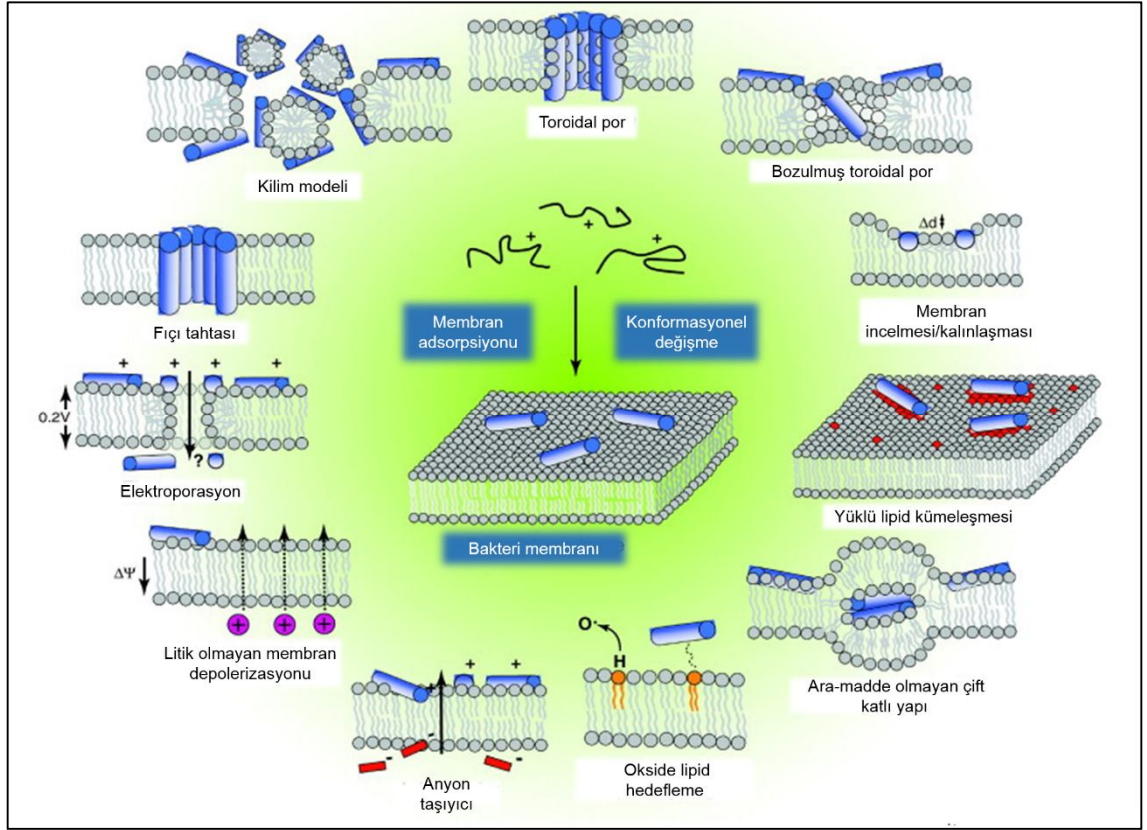
Antimikrobiyal peptidlerin çoğu katyonik amfipatik  $\alpha$ -sarmal ve  $\beta$ -levha ikincil yapılarıdır. Katyonik antimikrobiyal peptidler genellikle 10 ila 50 amino asitten oluşmakta olup asidik amino asitlerden ziyade bazik amino asitleri (arjinin, lisin ve histidin) içerdikleri için pozitif yüklü (+2-(+9)) yapılarıdır. Ayrıca söz konusu peptidler %30 veya daha fazla oranda hidrofobik rezidüler içermektedir. Bu özellikler peptidin çoğu kez membranla bağlantı kurabilecek şekilde üç boyutlu amfifilik yapıya katlanmasını sağlamaktadır. Böylece peptidler pozitif yüklü ve hidrofobik amino asitlerce zengin ayrı bir kısım oluşturmaktadır. Katlanmış peptidler  $\alpha$ -sarmal,  $\beta$ -levha, halka veya uzayan yapılar gibi farklı yapısal gruplara dönüşmektedir (Akalin 2014).

Süt kaynaklı katyonik antimikrobiyal peptidlerin antimikrobiyal aktivite mekanizmalarını açıklamada çeşitli görüşler öne sürülmektedir. Ancak antimikrobiyal peptidlerin etki mekanizmasında genel olarak kabul edilen görüş, tüm antimikrobiyal peptidlerin ilk olarak bakteriyel sitoplazmik membran ile etkileşime geçtiğidir (Brogden 2005). Söz konusu etkileşim katyonik peptid ile bakteriyel membran üzerinde bulunan negatif yüklü bileşenler arasında elektrostatik bağlanma sonucunda oluşmaktadır. Gram-negatif bakterilerin dış membranında bulunan lipopolisakkarit tabakası içindeki fosfat grupları ve Gram-pozitif bakterilerin yüzeyinde bulunan lipoteikoik asit, katyonik peptidlerin bağlanabilmesi için gerekli olan negatif yükü temin etmektedir (Akalin 2014).

Bu gibi bir etkileşim iki temel etkiden biriyle sonuçlanmaktadır. Bu sonuçlar; membran geçirgenliğini değiştiren geçici transmembran kanallarının oluşması ve tüm hücrenin parçalanması ile sonuçlanan plazma membranının bozulmasıdır (Benkerroum 2010). Hidrofobik etkileşimler ile dış membran yapısına peptidlerin girişi dış membran yapısını bozmakta ve diğer peptid molekülleri için söz konusu membranı geçirgen hale getirmektedir. Peptidler elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler ile sürdürülen proses sonucunda sitoplazmik hücre membranına ulaşmış olmaktadır (Akalin 2014).

Antimikrobiyal etkiye sahip katyonik peptidlerin kendi destekledikleri yolla bakterinin dış membranından geçmesi, bu peptidlerin öldürücü etkileri için gerekli fakat yeterli değildir. Hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteriler için asıl öldürücü olan katyonik peptitlerin negatif yüklü sitoplazma membranı ile elektrostatik olarak etkileşmesidir. Bu olay sırasında katyonik peptitlerin hidrofilik grupları ile membran fosfolipitlerinin hidrofobik zincirleri karşı karşıya gelmekte, peptitler membrana paralel bir konum alarak membranın bütünlüğünü bozan kanalların oluşmasına yol açmaktadır. Sitoplazmik membran bütünlüğünün katyonik antimikrobiyal peptidler tarafından bozulmasının açıklanmasında fiçı tahtası, kilim, deterjan, toroidal kanal ve agregat model gibi çok sayıda model tanımlanmıştır (Akalin 2014). Peptidler bu membranı ya membranın iç kısmında yan yana dizilerek fiçı tahtası modelinde, ya membranı misel yapılara parçalayarak kilim modelinde ya da peptid-lipid dizileri oluşturarak toroidal por modelinde geçebilmektedir. Bunların dışında iki katmanlı yapının kalınlığı yüzeyde bulunan peptidlerin mevcudiyetinden etkilenebilmekte ya da membranın kendisi peptidlerin etrafını saran anyonik lipidler bakımından zengin alanlar oluşturmak için şeklini değiştirebilmektedir. Ayrıca membranda iki katmanlı yapının aracı olmadığı durumlar da söz konusudur. Membrana peptid absorpsiyonu; peptidleri okside olmuş fosfolipidlere hedefleyerek artırılabilen, peptidler iki katmanlı yapının diğer tarafındaki anyonlarla etkileşebilmekte, membran potansiyeli farkedilebilir nitelikte bir zarar vermeden yok edilebilmekte, ya da tam tersine moleküler elektroporasyon modelinde olduğu gibi peptidlerin dış kısımda kümeleşmesi membran potansiyelini peptidlerin geçişini sağlayan eşik değerine yükseltebilmektedir (Şekil 2.8) (Nguyen vd 2011).

Antimikrobiyal etkiye sahip katyonik peptidlerin hücre içine girdikten sonra oluşturdukları öldürücü etkilerinin, membran yapısının bozulması dışında farklı şekillerde de olabileceğini göstermeye yönelik çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Söz konusu çalışmalar, yer değiştiren peptidlerin sitoplazmik membran septum formasyonunu değiştirebileceğini, hücre duvarı sentezini inhibe edebileceğini, nükleik asit ve protein sentezini inhibe edebileceğini ya da enzimatik aktiviteyi inhibe edebileceğini ortaya koymuştur (Brogden 2005).



Şekil 2.8. Bakteri sitoplazmik membranında meydana gelen olaylar (Nguyen vd 2011)

### 2.2.1.6. Mineral bağlayıcı peptidler

Kazein ve kazein orijinli peptidler; süt proteinleri ve süt kaynaklı biyoaktif peptidler arasında güçlü mineral bağlama özelliğine sahip olan protein ve peptidlerdir. *In vitro* olarak hidroliz, enzimatik kataliz ya da *in vivo* olarak sindirim sırasındaki hidroliz sonucunda oluşan kazein orijinli peptidlerin spesifik ya da spesifik olmayan bağlama kısımları ile kalsiyum, bakır, demir gibi mineralleri bağlayabilme özelliğine sahip olduğu belirtilmektedir. Bu bağlamda en çok üzerinde durulan peptid kazein orijinli kazeinofosfopeptid(CPP)lerdir (Nagpal vd 2011).

Fosfopeptid terimi, ilk olarak 1950 yılında Mellander tarafından kemik kalsifikasyonundan bağımsız olarak raşidik bebeklerde D vitamini miktarını arttıran kazein kaynaklı fosforlanmış peptidler olarak tanımlanmıştır. Daha sonra, CPPlerin Ca, Mg ve Fe gibi makroelementlerle birlikte Zn, Ba, Cr, Ni, Co ve Se gibi iz elementleri bağlayabilme özelliğine sahip olduğu gösterilmiştir (Fitzgerald 1998). CPPler  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - ve  $\beta$ -kazeinin proteolitik sindirimi sonucu oluşan kazein orijinli fosforile peptidlerdir (Choi vd 2012). Çoğu CPP, iki glutamik asit kalıntısını takiben üç fosforil grubunun yer aldığı dizilimde serin fosfat kümesi ve glutamil kalıntılarını (SerP-SerP-SerP-Glu-Glu) içermektedir. Söz konusu amino asit dizilimi, peptide Ca, P ve diğer mineralleri bağlayabilme kapasitesi kazandırmaktadır. Süt proteinlerinin enzimatik sindirimi sonucu oluşan çok sayıda mineral bağlayıcı özelliğe sahip peptid tanımlanmıştır.  $\alpha_{s1}$ -kazeinin 43.-58., 45.-55., 43.-79., 59.-79., 66.-74. ve 106.-119. fraksiyonları,  $\alpha_{s2}$ -kazeinin 1.-24., 2.-21., 46.-70., 55.-75. ve 106.-119. fraksiyonları ya da  $\beta$ -kazeinin 1.-25., 1.-28., 1.-25.,

2.-28. ve 33.-48. fraksiyonları CPPLere örnek verilebilir (Smacchi ve Gobetti 2000, Nagpal vd 2011).

Fosfat gruplarına özgü amino asitlerin negatif yüklü yan zincirleri, mineraller için bağlanma noktalarını simgelemektedir. Bu peptidlerin anyonik karakterde olması onları başka bir proteoliz olayına karşı dirençli kılmakta, kalsiyumla çözülebilir kompleksler oluşturmasını sağlamakta ve çözünmez kalsiyum fosfatın oluşmasını engellemektedir (Silva ve Malcata 2005). Ayrıca kazeinin farklı fosfopeptid fraksiyonları, kalsiyum bağlama aktivitesinde farklılıklar göstermektedir. Kalsiyum bağlama aktivitesindeki bu belirgin farklılıklar, fosforlanmış bağlanma bölgelerinin etrafındaki başka amino asitlerin etkisiyle ilişkilendirilmektedir (Meisel vd 1997).

Ferraretto vd (2001), CPPLerin, insan intestinal HT-29 tümör hücreleri tarafından kalsiyum alınımını etkilediğini göstermişlerdir. CPPLerle HT-29 hücrelerinin tekrarlanan uyarımının geçici kalsiyum artışını sağladığı ve CPP tarafından uyarılmış sitoplazmada eriyebilen kalsiyum artışının CPP dozuna bağlı olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu çalışmada, CPPLerin hayvanlarda kalsiyum absorpsiyonunu ve kullanılabilirliğini arttırdığı gösterilmiştir. Kimyasal olarak sentezlenmiş olan ve "asit motif" karakteri taşıyan Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu (SpSpSpEE) dizilimindeki CPPLer ( $\beta$ -kazein<sub>1-25</sub>,  $\alpha_{s1}$ -kazein<sub>59-79</sub>) hücre dışı  $Ca^{2+}$ 'nin içeriye girmesini sağlayarak  $Ca^{2+}$ 'nin artışına neden olmaktadır. Bu etkiyi sağlamada  $\beta$ -kazein orijinli peptidlerin  $\alpha_{s1}$ -kazein orijinli olanlara göre daha aktif olduğu tespit edilmiştir.

CPPLer hem diş minesinin rekalsifikasyonunu hem de plak oluşturan bakterilerin adezyonunun inhibisyonunu destekleyerek antikaryojenik etki gösterebilmektedir (Nagpal vd 2011). Ayrıca CPP, amorf kalsiyum fosfatı stabilize ederek ve yüksek derecede lokalize olmuş bu iyonları koruyarak diş minesinin demineralizasyonunu sağlamakta ve böylece koruyucu etki göstermektedir. CPP'in ayrıca *Streptococcus mutans* ajanlı diş çürümelerine karşı antimikrobiyal etki gösterebildiği belirtilmektedir (Warner vd 2001). Bu nedenlerden dolayı diş macunlarına katkı maddesi olarak CPP ilave edilmesi önerilmektedir (Silva ve Malcata 2005).

CPPLer demiri fosfopeptidlere bağlayarak yüksek molekül ağırlıklı çok az absorbe olan ferrik hidroksitlerin oluşumunu önlemektedir. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, demirin CPP'in düşük molekül ağırlıklı fosfoserin rezidülerine ( $\beta$ -kazein<sub>1-25</sub>) bağlanabildiği tespit edilmiştir. Bu durum anemi tedavisinde ve demir depo dokularının onarılmasında önemlidir. Çinko absorpsiyonu, bu metalin  $\beta$ -kazein<sub>1-25</sub> adlı CPP'e bağlanması ile artırılabilir. Pirinç bazlı bebek mamalarına CPP katıldıktan sonra Ca ve Zn absorpsiyonunda artış olduğu belirtilmektedir (Silva ve Malcata 2005).

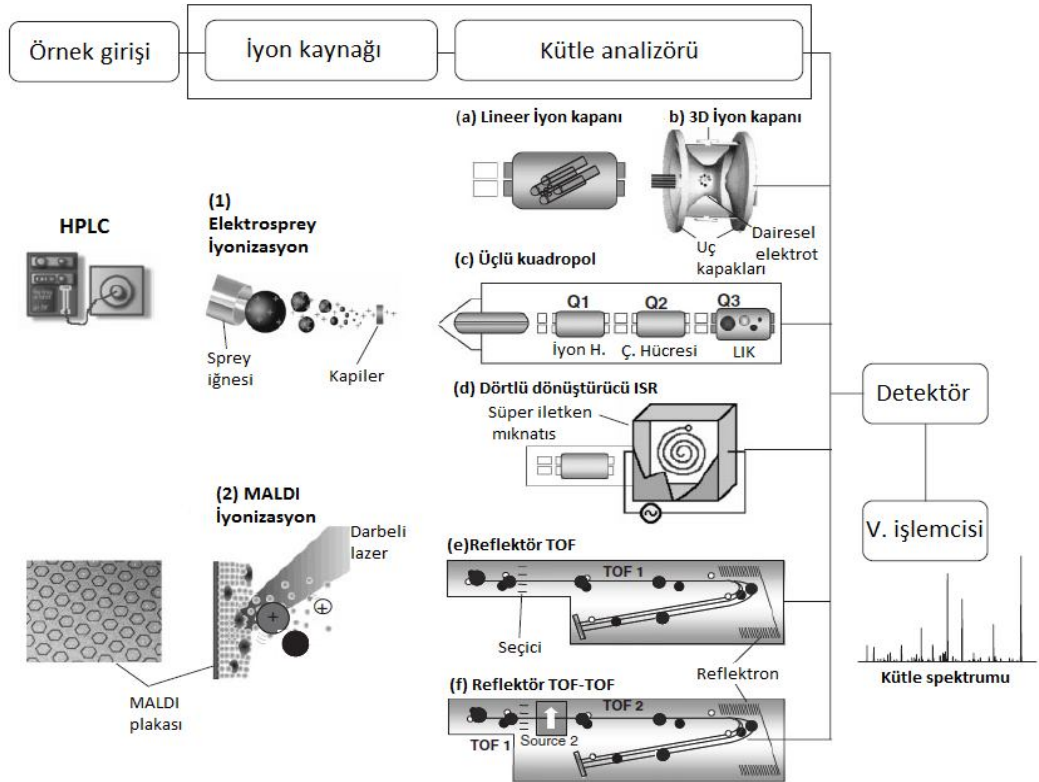
Süt bazlı bebek mamalarının simule gastrointestinal sindirimi sonucunda tanımlanan  $\alpha_{s1}$ - ve  $\alpha_{s2}$ -kazein orijinli toplam 19 adet CPP'in çoğunun SpSpSpEE amino asit dizilimi içerdiği tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada anyon değişim kolonu kullanılarak kalsiyum, demir ve çinko minerallerinin CPPLer içerisindeki dağılımı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar kalsiyumun SpSpSpEE amino asit dizilimi içeren CPPLere bağlanabildiği; buna karşın demir ve çinkonun, fosforlanmış küme ve fosfoserin rezidüleri içeren CPPLere bağlanabildiği belirlenmiştir (Miquel vd 2006).

### 2.3. Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon (MALDI)

Kütle spektrometri şüphesiz halen kullanılan tüm analitik yöntemlerin en geniş uygulama alanına sahip olup maddelerin elementel bileşimlerinin belirlenmesinde, inorganik, organik ve biyolojik moleküllerin yapılarının aydınlatılmasında, karmaşık karışımların kalitatif ve kantitatif analizlerinde, katı yüzeylerinin yapılarının ve bileşimlerinin aydınlatılmasında; bir numunenin izotopik oranlarının bulunmasında oldukça yararlı bir yöntemdir (Kılıç vd 2000a).

Kütle spektrometreleri iyon oluşturma ve bu iyonları kütle/yük ( $m/z$ ) oranlarına göre ayırma yeteneğine sahip cihazlardır. Ayırmanın gerçekleştirilebilmesi için cihaz içinde elektrik ya da manyetik alanlar oluşturulmaktadır. Cihaz içinde oluşturulan söz konusu alanlar iyonların uzaysal yörüngelerini, hızını ve/veya yönünü etkileyerek ayrılmalarını sağlamaktadır. Elektromanyetik alanların iyon hareketi üzerindeki etkileri iyon kütlesi ile ters, iyon yüküyle doğru doğru orantılı olarak değişmektedir. Böylece moleküler kütlelerin tespit edilebildiği, iyon bolluğuna (abundance) karşı  $m/z$  oranını gösteren kütle spektrumları elde edilmektedir (Cañas vd 2006).

İyonizasyon kaynağı, analizör, detektör, veri işlemcisi ve vakum pompası kütle spektrometresindeki ana kısımlardır (Şekil 2.9). İyon üretimi iyonlaştırma kaynağına bağlı olarak atmosferik basınç altında gerçekleştirebilmektedir. Ancak etkili bir ayırmanın gerçekleştirilebilmesi için iyonların hava molekülleri ile çarpışması engellenmeli, yani analizör ve detektör vakum altında olmalıdır (Cañas vd 2006).



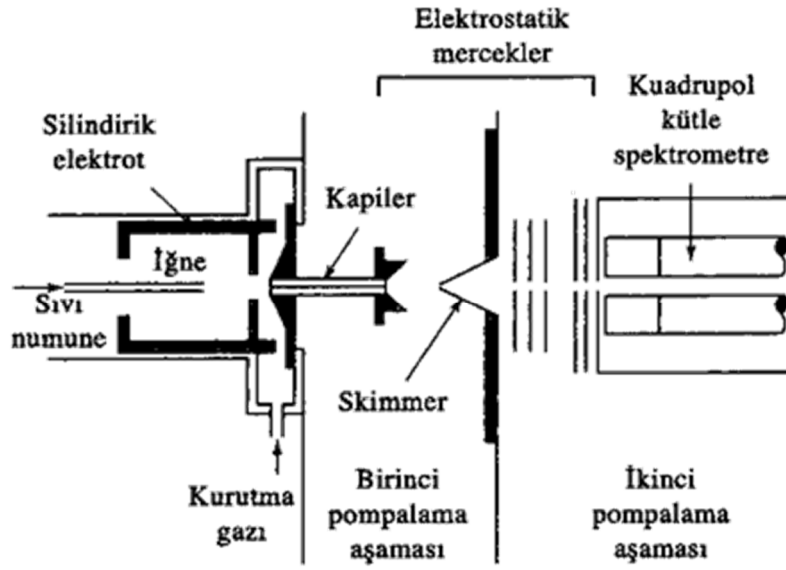
Şekil 2.9. Kütle spektrometresinin ana kısımları (Cañas vd 2006).

Elektromanyetik alanlarda etkili bir ayırmanın sağlanabilmesi için nötral moleküllerin iyonlara dönüştürülmesi ve gerekirse gaz faz haline geçmeleri gerekmektedir. Peptid ve proteinlerin yüksek moleküler ağırlıkları ve polar yapıları göz önüne alındığında, iyonlaştırıcı kaynak protein ya da peptidleri hem iyon haline hem de gaz faza geçirmelidir. Çeşitli iyonlaştırıcı kaynaklar arasında sadece elektrospray iyonizasyon (ESI) ve matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyon (MALDI) proteinlerin analizi için uygundur (Cañas vd 2006).

Kütle spektrometresinin bir diğer kısmı olan analizör, iyonlaştırıcı kaynaktan elde edilen iyonların m/z oranlarına göre ayrılmasını sağlamaktadır. İdeal olarak kütle analizörleri küçük kütle farklarını ayırdedebilecek duyarlılıkta olmalıdır. Kütle analizörlerinde elektrik veya manyetik alanlar kullanılabilir. Tüm analizörler uygun bir iyonlaştırıcı kaynak ile birleştirildiğinde, peptid ve proteinlerle çalışmaya uygun hale gelmektedir. Kullanım kolaylığı ve düşük maliyetleri nedeniyle en yaygın kullanılan kütle analizörleri kuadropol ve uçuş zamanlı (TOF-time of flight) kütle analizörleri ve iyon kapanlı analizörlerdir (Kılıç vd 2000a, Cañas vd 2006).

Kütle spektrometresi yöntemiyle peptid ve proteinlerin tanımlanmasında en çok kullanılan iyonizasyon yöntemleri desorpsiyon kaynaklı elektrospray iyonizasyon (ESI) ve matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyon (MALDI)'dur (De Hoffmann ve Stroobant 2007). Desorpsiyon kaynaklı kütle spektrometrelerinin diğer iyonizasyon yöntemlerine göre avantajı, uçucu olmayan ve termal olarak kararsız numunelere de uygulanabiliyor olmasıdır (Kılıç vd 2000a).

Elektrosprey iyonlaştırma/kütle spektrometresi (ESI/MS), proteinler, polipeptidler ve mol kütlesi  $10^5$  Da'dan büyük oligopeptidler gibi biyomoleküllerin analizi için ilk defa 1984 yılında önemli bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. ESI/MS yöntemi analit ve çözücü molekülleri içeren akışkanın ince kapilerde yüksek voltaj ve atmosferik basınçta iyonlar şeklinde gaz faza dönüştürülmesi ve söz konusu iyonların kütle spektrometresi ile tespit edilmesi prensibine dayanmaktadır (Karataylı ve Bozdayı 2008, Kebarle ve Verkerk 2010). Elektrosprey iyonlaştırma Şekil 2.10'da görülen cihazda atmosfer basıncında ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmektedir. Örneğin içinde bulunduğu çözelti, paslanmaz çelikten iğne şeklinde kapiler ile, dakikada birkaç mikrolitre hız sağlanarak pompalanmaktadır. İğneye, etrafındaki silindirik elektroda göre birkaç kilovolt enerji uygulanmaktadır. Oluşan çok küçük ve elektrik yüklü damlacıklar, daha sonra bir çözücü giderme kapilerinden geçmektedir. Burada çözücü buharlaşmakta ve elektrik yükleri analit moleküllerine tutunmaktadır. Çözücü buharlaşıp damlacıklar küçülürken yük yoğunlukları artmakta ve iyonlar gaz fazına desorbe olmaktadır (Kılıç vd 2000a).



Şekil 2.10. Elektrosprey iyonizasyonlaştırma kaynağı (Kılıç vd 2000a)

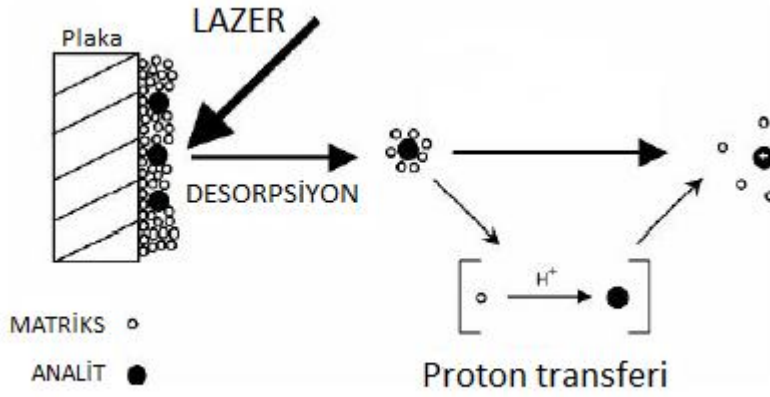
Protein gibi büyük biyomolekülleri oldukça duyarlı biçimde kolayca iyonize edebilen ve kütle spektrometresinde iyon kaynağı olan MALDI metodu ise, ilk olarak 1988 yılında Franz Hillenkamp ve Michael Karas tarafından ortaya konulmuştur (Özen Karataylı ve Bozdayı 2008, Baum 2013). Söz konusu yöntem bulunduğu zamandan bu yana sürekli olarak geliştirilmiş olup; proteinler, oligonükleotidler, sentetik polimerler gibi büyük molekül ağırlıklı, uçucu olmayan ve termal olarak kararsız olan bileşenler ile büyük molekül ağırlıklı inorganik bileşenlerin bozulmamış gaz fazı iyonlarının üretilmesinde kullanılan en önemli teknikler arasında yer almaktadır (De Hoffmann ve Stroobant 2007, Baum 2013).

Proteomik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan MALDI'nin prensibi, ultraviyole ışınları absorblama özelliğine sahip bir matriksin kullanılmasına dayanmaktadır. Hem desorpsiyon hem de iyonizasyonu sağlayan MALDI matriksi, bu metodun başarılı bir şekilde uygulanmasındaki en önemli faktördür. MALDI prosesi iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada, analiz edilecek bileşen (peptid karışımı) ile lazer dalga boyunda güçlü absorblama yeteneğine sahip küçük organik molekülleri ihtiva eden matriks uygun çözücü içinde çözülerek karıştırılmaktadır. Daha sonra söz konusu karışım MALDI örnek yükleme plakalarına aktarılmakta ve çözücünün uzaklaştırılması amacıyla kurutulmaktadır. Söz konusu işlem sonucunda, matriks kristalleri arasına gömülü halde bulunan ve birbirinden tamamen izole hale gelen kokristalizayona uğramış analit molekülleri elde edilmektedir. İkinci aşama ise kütle spektrometresi kaynağının içinde vakum koşulları altında gerçekleşmektedir. Bu amaçla, MALDI örnek plakası cihaza yerleştirilmekte ve örnek plakası yüzeyine yapılan yoğun lazer darbeleri ile plaka üzerinden moleküllerin ayrılması sağlanmaktadır. MALDI prosesinin kesin mekanizması bugüne kadar tam olarak açıklanamamıştır. Ancak matriks moleküllerinin uyarımıyla birlikte kondense fazda büyük miktarda enerji birikimi sonucu lazerle ışınım, kristallerin hızla ısınmasını tetiklediği ve bu hızlı ısınmanın matriks kristallerinin lokal süblimleşmesine, bir kısım kristal yüzeyin aşınmasına ve matriksin genleşen matriks



duman bulutu içerisindeki analitleri de beraberinde taşıyarak gaz faza geçmesine neden olduğu düşünülmektedir (Cañas vd 2006, De Hoffmann ve Stroobant 2007).

İyonlaşma reaksiyonları bu işlem esnasında herhangi bir zamanda vakum koşulları altında gerçekleşebilmektedir. Ancak MALDI'de üretilen iyonların kaynağı henüz tam olarak açıklanamamıştır. MALDI için önerilen kimyasal ve fiziksel iyonizasyon yolları arasında gaz-faz fotoiyonizasyon, uyarılmış hal proton transfer, iyon molekül reaksiyonları, önceden oluşturulmuş iyonların desorpsiyonu ve daha fazlası yer almaktadır. En geniş çapta kabul edilen iyon oluşum mekanizması desorpsiyon öncesi katı fazda protein transferi ya da fotoiyonize matriks moleküllerinden genişleyen matriks dumanı içinde gaz-faz proton transferidir. Daha sonra gaz fazındaki iyonlar analizöre gönderilmek üzere elektrostatik alanda hızlandırılmaktadır. MALDI desorpsiyon iyonizasyon işlemi Şekil 2.11'de şematik olarak gösterilmiştir (De Hoffmann ve Stroobant 2007).



Şekil 2.11. MALDI iyonlaştırma yönteminin şematik görünümü (De Hoffmann ve Stroobant 2007)

MALDI kütle spektrometresinde elde edilen sonuçların kalitesi örnek hazırlama aşamasına bağlı olduğu için matriks seçimi ve örnek hazırlama protokolünün optimizasyonu analizin en önemli aşamalarıdır. Farklı analitler ve analitik problemler için farklı matriksler bulunmakta olup, matriksin seçiminde kullanılan lazerin dalga boyu esas alınmaktadır. MALDI matriksi lazer dalga boyunu güçlü bir şekilde absorblama, vakum kararlılığı, analit iyonizasyonunu destekleme yeteneği, analit ile uygun çözücüler içinde çözünürlük, kimyasal reaksiyona girmeme gibi özelliklere aynı anda sahip olmalıdır. Ancak iyi bir matriks seçimi için söz konusu özellikler her zaman yeterli olamayabilmektedir (De Hoffmann ve Stroobant 2007). Örneğin uçuş zamanlı kütle analizörlerinde çözme gücü örnek yüzeyinin düzgünlüğüne bağlı olarak değiştiği için matriksin düzgün ve büyük kristaller oluşturması arzu edilmektedir. En sık kullanılan matriksler arasında  $\alpha$ -siyano-4-hidroksisiamik asit (CHCA), sinapik asit olarak da bilinen sinapinik asit, 2,5-dihidroksi-benzoik asit (DHB), hidroksi pikolinik asit ve süksinik asit yer almaktadır (O'Connor 2010). Söz konusu matriksler arasında sinapinik asit ve  $\alpha$ -siyano-4-hidroksisiamik asit sırasıyla, protein ve peptid analizleri için en yaygın

olarak kullanılan matrikslerdir (Cañas vd 2006). Çizelge 2.2’de yaygın olarak kullanılan matriksler ve bu matrikslerin genel özellikleri sunulmuştur.

Çizelge 2.2. Yaygın olarak kullanılan MALDI matriksleri (Hillenkamp ve Karas 2007)

<b>Matriks</b>	<b>Dalga boyu</b>	<b>Önemli uygulama alanları</b>
Nikotinic asit	UV 266 nm	Proteinler, peptidler, eklenti oluşumu
2,5-Dihidroksi-benzoik asit (ilave %10 2-hidroksi-5-metoksi-benzoik asit)	UV 337 nm, 353 nm	Proteinler, peptidler, karbonhidratlar, sentetik polimerler
Sinapinic asit	UV 337 nm, 353 nm	Proteinler, peptidler
$\alpha$ -Siyano-4-hidroksisiamik asit	UV 337 nm, 353 nm	Peptidler,
3-Hidroksi-pikolinik asit	UV 337 nm, 353 nm	Nükleik asitler için en uygunu
6-Aza-2-tiyotimin	UV 337 nm, 353 nm	Proteinler, peptidler, kovalent olmayan kompleksler; nötral pH’ya yakın
k,m,n-Di(tri)hidroksi-asetofenon	UV 337 nm, 353 nm	Proteinler, peptidler, kovalent olmayan kompleksler; nötral pH’ya yakın
Süksinik asit	IR 2.94 $\mu$ m, 2.79 $\mu$ m	Proteinler, peptidler
Gliserol	IR 2.94 $\mu$ m, 2.79 $\mu$ m	Proteinler, peptidler, sıvı matriks

UV: ultraviyole, IR: İnfrared

MALDI iyonları oldukça düşük kaliteli spektra üreten düşük maliyetli kuadrupol iyon tuzak kütle spektrometrelerinden (QIT/MS) aşırı yüksek kalitede spektra üreten yüksek maliyetli Fourier dönüştürücü kütle spektrometrelerine (FT/MS) kadar birbirinden farklı çok sayıda kütle spektrometresi kullanılarak analiz edilebilmektedir. Ancak MALDI iyonları için en yaygın kütle analizör tipi uçuş zamanlı kütle spektrometreleridir (TOF/MS). MALDI genellikle birkaç nanosaniye genişliğinde iyon darbeleri oluşturduğu için TOF analizörleri için özellikle uygundur. Ayrıca MALDI 1 MDa’dan çok daha büyük kütleli iyonlar oluşturabilmektedir. Elektrospreyin aksine, tek yüklü iyonlar genellikle baskın olmakla birlikte MALDI iyonları sadece birkaç yük taşımaktadır. Yine TOF prensip olarak sınırsız kütle aralığına sahip olmasından dolayı bu gibi büyük iyonlar için en uygun kütle analizörüdür (O’Connor ve Hillenkamp 2007). Sonuç olarak; MALDI-TOF kütle spektrometresi 400 ile 350 000 Da molekül ağırlığındaki proteinler, peptidler, oligosakkaritler ve oligonükleotidler gibi biyomoleküllerin belirlenmesi ve tanımlanmasında kullanılabilir (Yürüt 2010).

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

Kefir üretiminde kullanılan inek sütü Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi'ne bağlı Sığır Çiftliği'nden, kefir danesi Ege Üniversitesi Süt Teknolojisi Bölümü'nden temin edilmiştir. Kefir üretiminde kullanılan starter kültür (Kefir DC) ise Danisco-Türker Endüstri Teknik Makina ve Ticaret Limited Şirketi'nden (İstanbul) satın alınmıştır.

#### 3.2. Metot

##### 3.2.1. Araştırmanın planlanması

Araştırmada kefirin fizikokimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşsal özellikleri ile peptid içeriği üzerine kefir üretim parametrelerinin etkisini belirlemek amacıyla starter kültür çeşidi, inkübasyon sıcaklığı, ısıl işlem normu ve inkübasyon sonlandırma pH'sı gibi dört farklı üretim parametresi seçilmiştir. Kefir örneklerinin üretiminde kullanılan üretim parametrelerine ait değerler ve örneklerin kodlanması Çizelge 3.1'de sunulmuştur. Çizelgede görüldüğü gibi ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen örnekler **S** harfi, kefir danesi kullanılarak üretilen örnekler **D** harfi ile başlayacak şekilde kodlanmıştır. Bununla birlikte 20°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örnekleri **20**, 25°C inkübasyon sıcaklığında üretilenler ise **25** (örneğin **S2054** ve **S2554**); inkübasyonuna pH 4.4'te son verilen örnekler **4**, pH 4.8'de son verilen örnekler ise **8** (örneğin **S2054** ve **S2058**); üretimlerinde ısıl işlem normu olarak 90°C / 5 dakika kullanılan örnekler **5**, 90°C / 10 dakika kullanılanlar ise **1** (örneğin **S2054** ve **S2014**) şeklinde kodlanmıştır.

Çizelge 3.1. Kefir üretim parametreleri ve kefir örneklerinin kodlanması

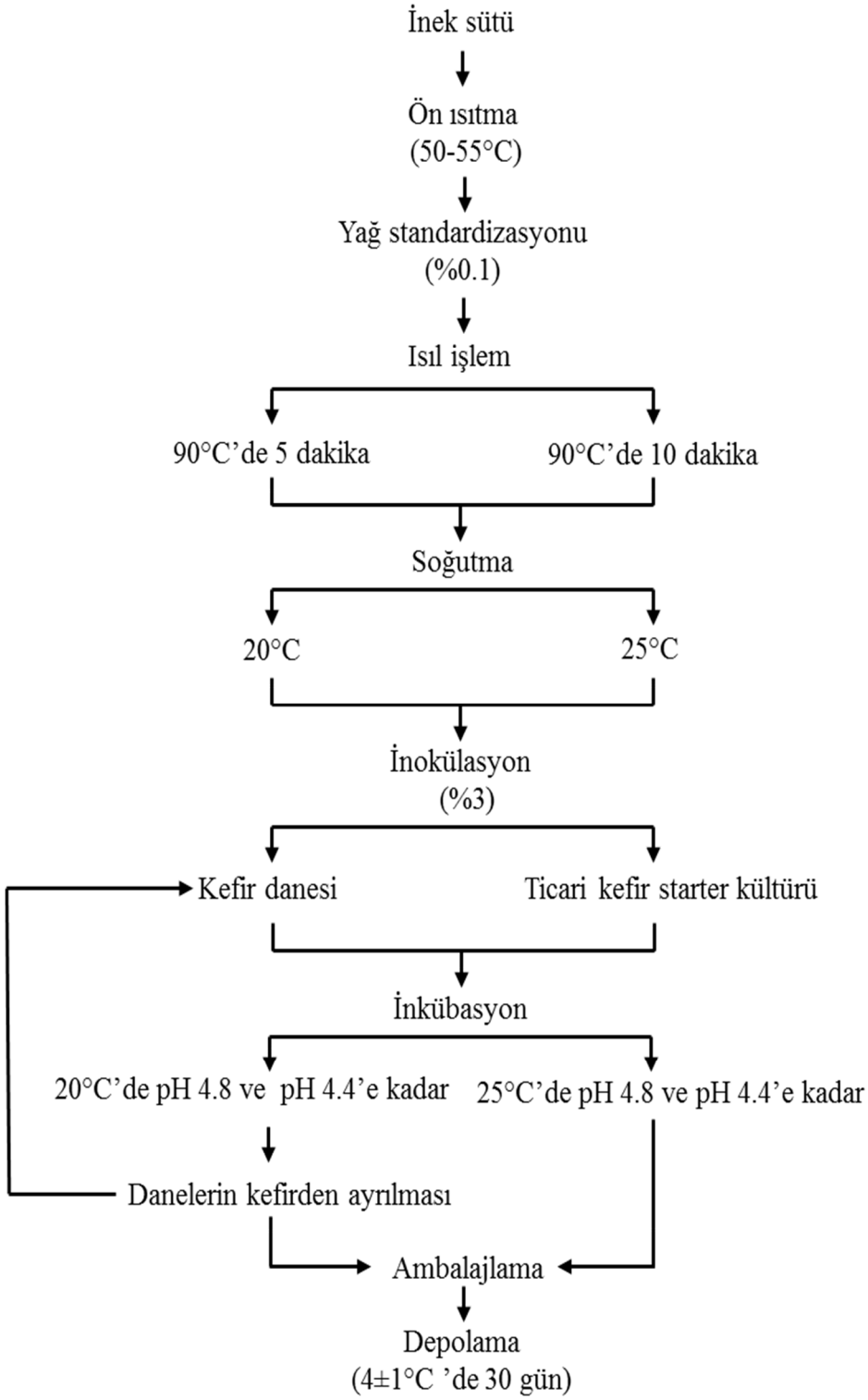
Starter kültür	İnkübasyon sıcaklığı	İnkübasyon sonlandırma pH'sı	Isıl işlem normu	Örnek kodu
Ticari kefir starter	20°C	4.4	90°C / 5 dakika	S2054
			90°C / 10 dakika	S2014
		4.8	90°C / 5 dakika	S2058
			90°C / 10 dakika	S2018
	25°C	4.4	90°C / 5 dakika	S2554
			90°C / 10 dakika	S2514
		4.8	90°C / 5 dakika	S2558
			90°C / 10 dakika	S2518
Kefir danesi	20°C	4.4	90°C / 5 dakika	D2054
			90°C / 10 dakika	D2014
		4.8	90°C / 5 dakika	D2058
			90°C / 10 dakika	D2018
	25°C	4.4	90°C / 5 dakika	D2554
			90°C / 10 dakika	D2514
		4.8	90°C / 5 dakika	D2558
			90°C / 10 dakika	D2518

### 3.2.2. Kefir danelerinin aktif hale getirilmesi

Kefir üretiminde kullanılan kefir daneleri çalışma süresince haftada iki kez olmak üzere steril yağsız süte %3 oranında aşılınmış ve 25°C'de pH'sı 4.6'ya ulaşmaya kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kefir daneleri steril bir süzgeç yardımıyla pıhtıdan ayrılarak steril saf su ile yıkanmıştır. Kefir daneleri herhangi bir aşılama işlemi olmadığında steril süt içerisinde 4±1°C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.3. Kefir üretimi

Kefir üretimine ait akış şeması Şekil 3.1'de verilmiştir. Kefir üretiminde kullanılan inek sütü, viskübatorde 50-55°C'ye ısıtıldıktan sonra yağ oranı separatör (G140 model, SMS Ltd. Şti., Kayseri, Türkiye) yardımıyla %0.1'e ayarlanmıştır. Yağ oranı %0.1'e standardize edilen süt Şekil 3.2'de görülen ısıtma ünitesi kullanılarak 90°C'de 5 dakika veya 90°C'de 10 dakika ısıtma işlemine tabi tutulmuştur. Isıtma işlemi sonrası 20 veya 25°C'ye soğutulan süte %3 oranında kefir danesi ya da %3 oranında ticari kefir starter kültürü inoküle edilmiş ve inokülasyon sonrası süt 20°C veya 25°C'de pH 4.4 ya da 4.8'e gelinceye kadar inkübe edilmiştir. Kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örnekleri inkübasyon sonrasında kefir danelerinin süzülerek ayrılmasının ardından, ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örnekleri ise inkübasyondan hemen sonra 200 mL'lik kapaklı plastik ambalajlara doldurulmuş ve 4±1°C'de 30 gün boyunca depolanmıştır. İnkübasyon süreleri, kullanılan starter kültür ve kefir danesine göre 14-34 saat arasında değişkenlik göstermiştir.



Şekil 3.1. Kefir üretim akım şeması



Şekil 3.2. Isıl işlem ünitesi

### **3.2.4. Sütte yapılan fizikokimyasal analizler**

#### **3.2.4.1. Kurumadde tayini**

TS 1018 Çiğ Süt Standardı'nda verilen metoda göre gravimetrik yöntem kullanılarak tespit edilmiştir (Anonim 1994).

#### **3.2.4.2. Yağ tayini**

Süt bütirometresi kullanılarak Gerber yöntemi ile tespit edilmiştir (Anonim 1995).

#### **3.2.4.3. Protein tayini**

Kefir yapımında kullanılan sütün azot miktarı Kjeldahl yöntemine göre belirlenmiş ve elde edilen değer 6.38 faktörüyle çarpılarak protein miktarı bulunmuştur (Kurt vd 1993).

#### **3.2.4.4. pH tayini**

Sütün pH değeri Orion 2 Star (Thermo Scientific, Singapur) marka pH metre kullanılarak belirlenmiştir.

#### **3.2.4.5. Titrasyon asitliği tayini**

TS 1018 iğ Süt Standardı'nda verilen metoda göre % laktik asit cinsinden belirlenmiştir (Anonim 1994).

#### **3.2.4.6. Kül tayini**

Sütün kül miktarı gravimetrik yöntem kullanılarak belirlenmiştir (Kurt vd 1993).

#### **3.2.4.7. Proteolitik aktivite**

Kefir üretiminde kullanılan sütlerde proteolitik aktivite analizi spektrofotometrik olarak Church vd'nin (1983) belirttiği yöntemle yapılmıştır. Analiz için öncelikli OPA (o-fitalaldehit) çözeltisi hazırlanmıştır. Bu amaçla 50 mL'lik balon jojeye 0.95 g sodyum tetra borat, 0.5 g sodyum deoksil sülfat ve 0.1 mL 2-merkaptolanol eklenerek karıştırılmış ve balon joje çizgisine kadar saf su ile tamamlanmıştır (A). Bir deney tüpünde 40 mg o-fetaldehit, 1 mL metanol içinde çözündürülmüştür (B). A ve B çözeltileri karıştırılmıştır (OPA çözeltisi). Homojen hale getirilmiş 30°C'deki örnekten 1 mL deney tüpüne alınmış ve üzerine 0.68 N TCA (Trikloroasetik asit) çözeltisinden 2.2 mL eklenip karıştırılmış ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 3743 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen filtrattan 50 µL alınarak üzerine 1 mL OPA çözeltisi eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra 340 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır.

#### **3.2.5. Kefirde yapılan fizikokimyasal analizler**

##### **3.2.5.1. Kurumadde tayini**

Kefir örneklerinin kurumadde miktarı TS 1018 iğ Süt Standardı'nda verilen metoda göre gravimetrik yöntem kullanılarak tespit edilmiştir (Anonim 1994).

##### **3.2.5.2. Kül tayini**

Kefir örneklerinin kül miktarı gravimetrik yöntem kullanılarak belirlenmiştir (Kurt vd 1993).

##### **3.2.5.3. pH tayini**

Kefir örneklerinin pH değeri Orion 2 Star (Thermo Scientific, Singapur) marka pH metre kullanılarak belirlenmiştir.

##### **3.2.5.4. Titrasyon asitliği tayini**

100 mL hacmindeki erlen içerisine homojenize edilmiş örnekten 10 g tartılıp üzerine 10 mL saf su eklenmiştir. Üzerine 1 mL %2'lik fenolftalein belirteç çözeltisinden ilave edildikten sonra 0.1 N NaOH çözeltisi ile kaybolmayan hafif pembe renk meydana gelinceye kadar titre edilmiştir. Harcanan alkali miktarından örneklerin % laktik asit değeri hesaplanmıştır (Kurt vd 1993).

### **3.2.5.5. Proteolitik aktivite**

Kefir örneklerinde proteolitik aktivite analizi süt örneklerinde olduğu gibi spektrofotometrik olarak Church vd'nin (1983) belirttiği yöntemle yapılmıştır.

### **3.2.5.6. Serum ayrılması**

Kefir örneklerindeki serum ayrılması, Koksoy ve Kilic'in (2004) metodu kullanılarak belirlenmiştir. Örnekler 50 mL'lik kapaklı cam mezürlerde 4°C'de depolanmış ve yüzeyde biriken serumun hacmi, depolamanın 1., 15. ve 30. günlerinde ölçülmüştür.

### **3.2.5.7. Tekstür**

Örneklerin tekstür analizi TA.XT Plus tekstür analiz cihazı (Stable Microsystems, Godalming, Surrey, İngiltere) kullanılarak Wszolek vd'nin (2001) kullandığı yöntem modifiye edilerek tespit edilmiştir. Analiz SMSP 50 silindir prob kullanılarak ve test hızı 1 mm/s, trigger kuvveti 5 kg, uzaklık ise 20 mm olacak şekilde yapılmıştır. Kefir örneklerine ait sertlik ve yapışkanlık değerleri gf (gram kuvvet) cinsinden belirtilmiştir.

### **3.2.6. Kefirin reolojik özelliklerinin belirlenmesi**

Örneklere ait reolojik parametreler Tratnik vd'nin (2006) belirttiği yöntemle göre Brookfield R/S plus reometre kullanılarak (Brookfield, Middleboro, MA, ABD) yapılmıştır. Ölçümlerde double gap concentric cylinder geometry (DG 3) kullanılmıştır. Ölçüm sırasında su banyosu (Brookfield TC-502) kullanılarak örneklerin sıcaklığı 10°C'de sabit tutulmuştur. Isıl dengenin sağlanabilmesi için örnekler ölçüm kabında yaklaşık 5 dakika bekletildikten sonra ölçümlere başlanılmıştır. Kontrollü artan ve azalan kayma hızında örneklerin kayma gerilimleri ölçülmüştür. Kayma hızı 0.1'den 300 1/s arttırılarak 5 dakika çıkış ve 300'den 0.1 1/s azaltılarak 5 dakika iniş eğrileri belirlenmiştir. Örneklerin reolojik özellikleri, çıkış ve iniş eğrilerine ait veriler kullanılarak, üslü yasa modeline göre Rheo3000 (Rheotec Messtechnik GmbH, Berlin, Almanya) yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. Örneklerdeki tiksotropi iniş ve çıkış eğrilerinin arasında kalan alanın Rheo3000 yazılımı kullanılarak hesaplanması ile tespit edilmiştir. Çıkış viskozite/kayma hızı eğrisindeki 50 1/s kayma hızındaki değer, Koksoy ve Kilic'e (2004) göre örneklerin görünür viskozite değerleri olarak alınmıştır.

### **3.2.7. Kefirde yapılan mikrobiyolojik analizler**

#### **3.2.7.1. Seri dilüsyonların hazırlanması**

Kefir örneklerinde mikrobiyolojik ekimler yapılmadan önce 1/4 kuvvetinde ringer çözeltisi kullanılarak aseptik şartlar altında uygun desimal seri dilüsyonlar hazırlanmıştır (Anonymous 2001).



### **3.2.7.2. Koliform bakteri sayımı**

Koliform grubu bakterilerin sayımında Violet Red Bile (VRB) Agar besi ortamı olarak kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan yayma plak yöntemi ile ekim yapılan petri kutuları aerobik ortamda 37°C'de 2 gün süreyle inkübe edilmiştir (Anonymous 1998).

### **3.2.7.3. Maya sayımı**

Maya sayımında Yeast Extract Glucose Chloramphenicol (YGC) Agar besi ortamı olarak kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan yayma plak yöntemi ile ekim yapılan petri kutuları aerobik ortamda 25°C'de 3-5 gün süreyle inkübe edilmiştir (Witthuhn vd 2005).

### **3.2.7.4. Toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı**

Toplam aerobik mezofilik bakteri sayımında Plate Count Agar (PCA) besi ortamı olarak kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan yayma plak yöntemi ile ekim yapılan petri kutuları aerobik ortamda 30°C'de 2 gün süreyle inkübe edilmiştir (Mainville vd 2001).

### **3.2.7.5. Laktobasil sayımı**

Laktobasil sayımı De Man Rogosa Sharp (MRS) Agar besi ortamından yararlanılarak Iriyogen vd'nin (2005) kullandığı yöntem modifiye edilerek tespit edilmiştir. Analiz dökme plak kültürel sayım yöntemi ile yapılmış olup, inkübasyon anaerobik ortamda (%5 CO<sub>2</sub>) 30°C'de 3 gün süreyle gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.7.6. Laktokok sayımı**

Laktokok sayımı M17 Agar besi ortamından yararlanılarak Iriyogen vd'nin (2005) kullandığı yöntem modifiye edilerek tespit edilmiştir. Analiz dökme plak kültürel sayım yöntemi ile yapılmış olup, inkübasyon anaerobik ortamda (%5 CO<sub>2</sub>) 30°C'de 2 gün süreyle gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.7.7. Lökonostok sayımı**

Lökonostok sayımında Mayeux, Sandline and Elliker (MSE) Agar (10 g/L tripton, 2.5 g/L jelatin, 5 g/L maya ekstraktı, 100 g/L sakaroz, 5 g/L glukoz, 1 g/L sodyum sitrat, 75 mg/L sodyum azit ve 15 g/L agar) selektif besi ortamından yararlanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan yayma plak yöntemi ile ekim yapılan petri kutuları aerobik ortamda 22°C'de 4-5 gün süreyle inkübe edilmiştir (García Fontán vd 2006).

### **3.2.7.8. Asetik asit bakteri sayımı**

Asetik asit bakteri sayımında Acetobacter Peroxydans Medium (APM) Agar selektif besi ortamından yararlanılmıştır. Söz konusu besiyerinin hazırlanmasında 15 g malt ekstrakt, 5 g maya ekstraktı ve 15 g agar 940 mL distile su içinde çözündürüldükten sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika ısı işlem uygulanarak steril edilmiştir. 60 mL %50'lik etanol çözeltisi steril membran filtreden geçirildikten sonra sterilizasyonu takiben dökme sıcaklığına getirilen agara ilave edilmiştir. Analiz dökme plak kültürel

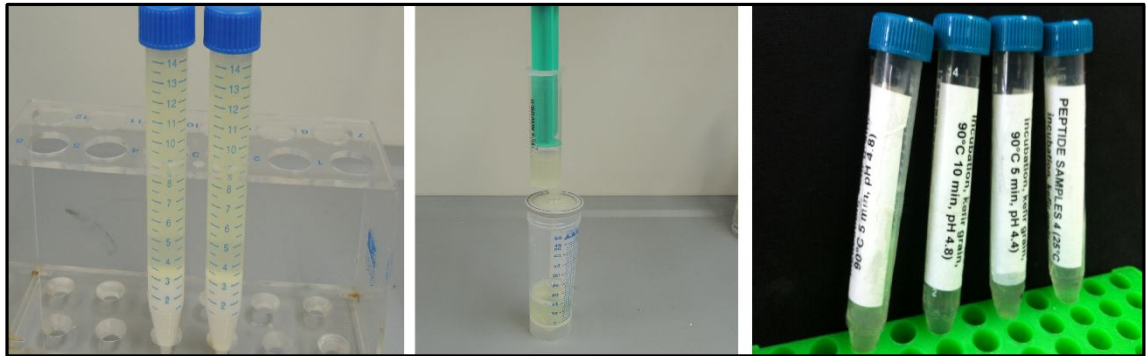
sayım yöntemi ile yapılmış olup, inkübasyon aerobik ortamda 25°C'de 3-5 gün süreyle gerçekleştirilmiştir (Witthuhn vd 2005).

### 3.2.8. Kefirin peptid profilinin belirlenmesi amacıyla yapılan analizler

Kefir örneklerinin peptid profilinin belirlenmesi Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü ile Almanya'da Friedrich-Alexander Üniversitesi Gıda Kimyası Bölümü'nün ortaklaşa yürütmüş olduğu "Geleneksel Türk Gıdaları Odaklı Sağlık Geliştirici Gıdalar Üzerine Bir Araştırma ve Eğitim Ağı Kurulması" başlıklı ve 110 O 797 nolu TÜBİTAK Inten C Programı Projesi kapsamında Friedrich-Alexander Üniversitesi Gıda Kimyası Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2.8.1. Örnek hazırlama

Kefir örnekleri ilk olarak yapısında bulunan pıhtılaşmış kazein proteinlerinin uzaklaştırılması amacıyla 1100 g, 4°C'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant 0.22 µm çaplı membran filtreden (Millipore Co., Bedford, ABD) geçirilmiştir. Filtrasyon sonucu elde edilen suda çözünebilir özellikteki kefir fraksiyonu StageTip katı-faz mikroekstraksiyon yöntemiyle peptidlerin izolasyonu işleminde örnek olarak kullanılmıştır (Şekil 3.3).

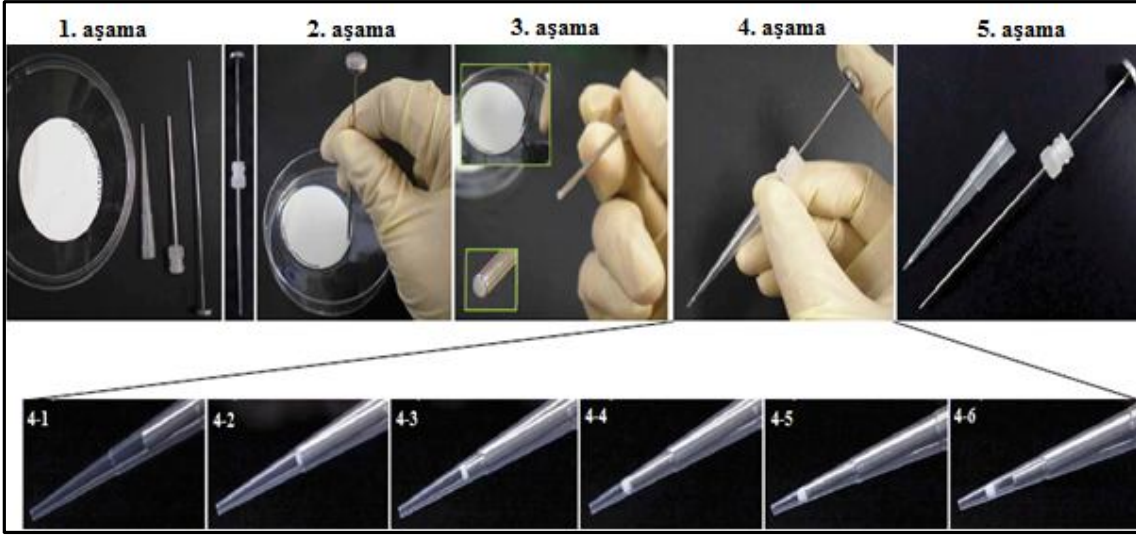


Şekil 3.3. Örnek hazırlama

#### 3.2.8.2. Peptidlerin StageTip katı-faz mikroekstraksiyon yöntemi ile izolasyonu

##### Minyatür StageTip kolonların hazırlanması

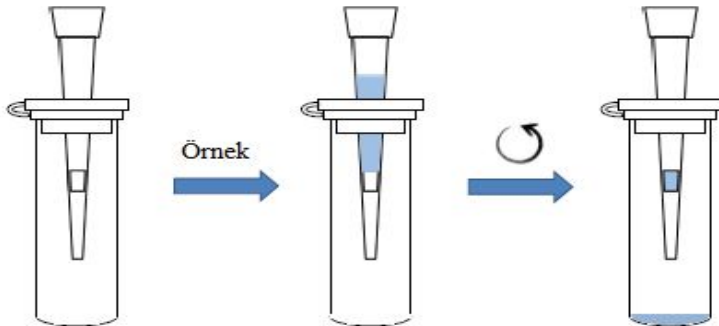
Suda çözünebilir özellikteki kefir fraksiyonlarından peptidlerin izolasyonu C18 StageTip (stop-and-go-extraction tips) katı-faz mikroekstraksiyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Söz konusu StageTiplerin hazırlanmasında, Empore C18 ekstraksiyon diskleri (3M Empore, Oregon, ABD) kullanılmıştır. C18 StageTiplerin hazırlanmasında, C18 ekstraksiyon materyali biyopsi delgecinin empore disk üzerine bastırılması ile küçük parçalar halinde söz konusu diskten çıkarılmış ve bunu takiben biyopsi delgecinin üzerindeki düğmeye basılarak C18 ekstraksiyon materyali pipet içerisine bırakılmıştır. Daha sonra pipet içerisine bırakılan C18 ekstraksiyon materyali doğru pozisyonu alacak şekilde biyopsi delgecinin merkezi kısmının yardımıyla pipetin uç kısmına doğru yerleştirilmiştir. Her bir C18 StageTip'in hazırlanması için bu işlem 3 kere tekrar edilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. StageTiplerin hazırlanması

### Peptidlerin izolasyonu

StageTip katı-faz mikroekstraksiyon yöntemi ile kefir fraksiyonlarından peptidlerin izolasyonunda, daha önce hazırlanmış olan C<sub>18</sub> StageTip kolonları 1.5 mL'lik ependorf tüplerine yerleştirilmiştir (Şekil 3.5). Ependorf tüplerine yerleştirilmiş minyatür kolonlara 50 µL asetonitril (ACN) (LC-MS grade, VWR International, Darmstadt, Almanya) ilave edilip oda sıcaklığında 1840 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra C<sub>18</sub> StageTip kolonlarına %0.1'lik trifloroasetik asit (TFA) (HPLC grade, Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD) çözeltisinden 50 µL ilave edilip oda sıcaklığında 1840 g'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve böylece söz konusu kolonlar şartlandırılmıştır. Şartlandırılmış olan C<sub>18</sub> StageTip kolonlarına 50 µL kefir fraksiyonu örneklerinden yüklenerek oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir (1840 g, 3 dakika) ve ardından söz konusu kolonlara %0.1'lik TFA çözeltisinden 50 µL ilave edilerek oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir (1840 g, 3 dakika). Bu işlemden sonra, C<sub>18</sub> StageTip kolonları yeni ependorf tüplerine yerleştirilmiş ve kolona bağlı halde bulunan peptidler 10 µL asetonitril-trifloroasetik asit (6 kısım %60'lık ACN-4 kısım %0.1'lik TFA çözeltisi) çözeltisinin santrifüj (1840 g, 3 dakika, 25°C) yardımıyla kolondan geçirilmesi ile elüe edilmiştir (Çizelge 3.2).



Şekil 3.5. StageTip katı-faz mikroekstraksiyon yöntemi

Çizelge 3.2. Peptidlerin C<sub>18</sub> StageTip katı-faz mikroekstraksiyon yöntemi ile izolasyonu

Aşamalar	Kolona eklenen	Santrifüj
Şartlandırma	50 µL ACN	1840 g, 1 dakika, 25°C
	50 µL %0.1 TFA	1840 g, 1 dakika, 25°C
Örnek	50 µL Kefir fraksiyonu	1840 g, 3 dakika, 25°C
Yıkama	50 µL %0.1 TFA	1840 g, 3 dakika, 25°C
Elüsyon	10 µL %60 ACN /%0.1 TFA	1840 g, 3 dakika, 25°C

C<sub>18</sub> StageTip katı-faz mikroekstraksiyon yöntemi kullanılarak izole edilen peptid ekstraktları MALDI-TOF-MS analizlerinde doğrudan örnek olarak kullanılmıştır. Nano-UPLC-nano-ESI-MS/MS analizleri için ise peptid ekstraktları -80°C'de bir gün bekletildikten sonra SpeedVac (SPD 121P, Thermo Fischer Scientific, Bremen, Almanya) sistemi ile kurutulmuştur. Daha sonra vakum altında kurutulmuş olan örnekler %0.5 oranında formik asit (FA) içeren %60'lık ACN çözeltisi içinde çözündürülmüş ve örneklerin konsantrasyonları %0.1 oranında FA içeren %5'lik ACN çözeltisi kullanılarak 25 nmol/mL'ye (varsayılan ortalama moleküler ağırlık 1500 Da) ayarlanmıştır. Konsantrasyonları istenilen orana ayarlanan örnekler sisteme verilmeden önce peyniraltı suyu proteinlerinin uzaklaştırılması amacıyla 10 kDa cut-off santrifüj filtre (Merck, Darmstadt, Almanya) yardımıyla ultrafitre edilmiş ve filtrat 1:5 oranında seyreltilmiştir.

### 3.2.8.3. HPLC ile peptidlerin fraksiyonlarına ayrılması

Kefir örneklerinden izole edilen peptidlerin fraksiyonlarına ayrılmasında RP-HPLC (JASCO Deutschland, Groß-Umstadt, Almanya) sistemi kullanılmıştır. Söz konusu sistemde Zorbax Eclipse XDB C8 kolonu (4.6 x 150 mm, partikül çapı 5 µm, gözenek büyüklüğü 80 Å, Agilent, Boeblingen, Almanya), MD-1510 multidalga boylu detektör sistemi ve hareketli faz olarak %0.1 oranında TFA içeren %95'lik ACN (B) ve %0.1 oranında TFA içeren %5'lik ACN (A) çözeltileri kullanılmıştır. Separasyon işlemi kolondan 5 dakika A çözeltilisinin geçirilmesinden sonra 55 dakika %0-45 oranında B çözeltilisinin 60 dakikalık lineer gradiyent kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon hacmi 50 µL ve hareketli faz akış hızı 0.5 mL/dk. olacak şekilde ayarlanmıştır. Sürekli fraksiyonlarına ayırma işlemi fraksiyon toplayıcı tarafından akışın 7.4. ve 59.4. dakikaları arasında gerçekleştirilmiştir. Toplamda 10 fraksiyon toplanmış olup, toplanan fraksiyonlar -80°C'de dondurulmuş ve daha sonra SpeedVac sistemi ile vakum altında kurutulmuştur. MALDI-TOF analizi için vakum altında kurutulmuş örnekler 10 µL MALDI matriksi içinde çözündürülmüş ve "MALDI-TOF kütle spektrometresi analizi" adlı başlık altında açıklandığı şekilde analiz edilmiştir. Direkt infüzyon nano-ESI-MS/MS ölçümleri için fraksiyon 10, 30 µL %0.5 FA içeren %60'lık ACN içerisinde çözündürülmüş ve daha sonra 1:50 oranında %50 ACN, %25 metanol ve %1 FA içeren ESI tamponu kullanılarak seyreltilmiştir.

### 3.2.8.4. MALDI-TOF-MS analizi

#### MALDI analizi için örnek hazırlanması

MALDI matriksi olarak  $\alpha$ -siyano-4-hidroksisinamik asit (CHCA) çözeltisi kullanılmıştır. Söz konusu matriks çözeltisi 5.0 mg CHCA'nın asetonitril-trifloroasetik asit (6 kısım %60'lık ACN-4 kısım %0.1'lik TFA çözeltisi) çözeltisi içerisinde çözündürülmesi ile hazırlanmıştır. Daha sonra StageTip mikroekstraksiyon yöntemi kullanılarak elüe edilen peptid ekstraktından 2.0  $\mu$ L alınıp üzerine 2.0  $\mu$ L matriks çözeltisi ilave edilmiştir. Elde edilen bu karışımdan alınan 0.7  $\mu$ L'lik kısım MALDI hedef tablası (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) (Şekil 3.6) üzerine konulmuş ve oda sıcaklığında 20 dakika bekletilerek kurutulmuştur. Dışsal kalibrasyon için her denemede molekül ağırlığı ve yükü bilinen bradikinin 1-7, anjiyotensin I, anjiyotensin II, madde P, bombesin renin substratı, adrenokortikotropik hormon klip 1-17 ve 18-39 ve somatostatin-28 peptidlerini içeren peptid kalibrasyon standardı kullanılmıştır.



Şekil 3.6. MALDI hedef tablaları

#### MALDI-TOF kütle spektrometresi analizi

MALDI-TOF analizi için nitrojen lazer ( $\lambda=337$  nm) ile donatılmış Bruker Autoflex kütle spektrometresi (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) kullanılmıştır. Ölçümler pozitif refletron modunda ve pozitif iyonların 140 saniye geciktirilmiş ekstraksiyonu ile gerçekleştirilmiş olup kütle aralığı 600-5000 Da olarak ayarlanmıştır. Her bir spot için farklı tarama kısımlarından otomatik olarak elde edilen toplam 300 (6x50) spektrum ortalama alınmış ve dışsal kalibrasyon Bruker peptid kalibrasyon II standardına (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) göre yapılmıştır.

#### Peptidlerin bağıl olarak miktarının belirlenmesi

$C_{18}$  StageTip ekstraksiyonundan önce, son referans peptid konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde 175  $\mu$ L kefir ekstraktına 25  $\mu$ L 8 mM referans peptit (Biotin-XGXLDRQGMFA-NH<sub>2</sub>, X=6-Aminohekzanoik asit, MA=1558.93 g/mol) çözeltisi ilave edilmiştir. Her bir örnek için  $C_{18}$  StageTip ekstraksiyonu ve MALDI-TOF ölçümü 3 kere tekrarlanmıştır. Referans peptidin sinyali örnekler içerisinde bulunan peptidlerin bağıl olarak yoğunluklarının belirlenmesinde referans olarak kullanılmış olup yoğunluğu %100 olarak düşünülmüştür.

### 3.2.8.5. Nano-UPLC-nano-ESI-MS/MS

Peptidlerin ayırımında nano-ESI kaynağı içeren LTQ Orbitrap XL ETD kütle spektrometresi (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Almanya) ile kombine edilmiş nano-Acquity UPLC (Waters, Eschborn, Almanya) sistemi kullanılmıştır. Daha önce söz konusu sistemde kullanılmak üzere hazırlanmış olan peptid örneğinden 10 µL alınıp trap kolonuna (nanoAcquity symmetry C18, 180 µm x 20 mm, partikül çapı 5 µm) yüklenmiş ve akış hızı 10 µL/dk. olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra nanoAcquity UPLC BEH 130 kolonu (C18, 75 µm x 100 mm, partikül çapı 1.7 µm) kullanılarak peptidlerin ayırımı gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak %0.1'lik FA ve %0.1 oranında FA içeren ACN çözeltileri kullanılmıştır. Sistemde uygulanmış olan dereceli elüsyon profili Çizelge 3.3'te verilmiştir. Hareketli faz akış hızı 400 nL/dk., transfer kapiler sıcaklığı ise 200°C olacak şekilde ayarlanmıştır. Tüp lens voltajı 120 V, iyon sprej voltajı ise online silika ceketli nano-ESI emitör (New Objective, Berlin, Almanya) kullanılarak 1.5 kV olacak şekilde ayarlanmıştır. Prekursör iyon taramaları pozitif modda 400-2000 m/z'lik bir kütle aralığında ve 60000 orbitrap çözünürlüğünde gerçekleştirilmiştir. Ürün iyon taramaları için çarpışma kaynaklı ayrılma (CID), her bir MS taramasında minimum +2'lik bir şarj durumunda en bol miktardaki altı iyon için uygulanmıştır (izolasyon genişliği 2.0 Da, aktivasyon Q 0.25, normalize edilmiş çarpışma enerjisi %35, aktivasyon zamanı 30 ms).

Çizelge 3.3. Nano-UPLC sisteminde kullanılan dereceli elüsyon profili

Süre (dk.)	Hareketli Fazlar	
	%A %0.1'lik FA	%B %0.1 oranında FA içeren ACN
0.0-1.0	97.0-97.0	3.0-3.0
1.0-1.1	97.0-91.0	3.0-9.0
1.1-4.0	91.0-90.1	9.0-9.9
4.0-14.0	90.1-82.9	9.9-17.1
14.0-14.5	82.9-82.0	17.1-18.0
14.5-14.6	82.0-79.3	18.0-20.0
14.6-17.7	79.3-77.5	20.7-22.5
17.7-20.7	77.5-74.4	22.5-25.6
20.7-25.7	74.4-69.4	25.6-30.6
25.7-28.5	69.4-62.2	30.6-37.8
28.5-31.5	62.2-19.0	37.8-81.0
31.5-33.5	19.0-19.0	81.0-81.0
33.5-34.0	19.0-97.0	81.0-3.0
34.0-46.0	97.0-97.0	3.0-3.0

### 3.2.8.6. Direkt infüzyon

Araştırmada nano-UPLC-nano-ESI-MS/MS analizlerine ek olarak seçilmiş RP-HPLC fraksiyonları için LTQ Orbitrap XL ETD kütle spektrometresi kullanılarak direkt infüzyon ölçümleri yapılmıştır. Taramalar beş bölümden oluşan çeşitli kütle aralıklarında (m/z 400-551, m/z 549-601, m/z 599-801, m/z 799-1001 ve m/z 999-2000)

gerçekleştirilmiştir. Her bir kütle aralığı kısa ve tam bir taramadan sonra 3 dakika boyunca taranmıştır. Prekursör iyon için çözünürlük 100000 olacak şekilde ayarlanarak yük durumu +2 veya daha yüksek olan ve yoğun olarak bulunan beş iyon CID (izolasyon genişliği 2.0 Da, aktivasyon Q 0.25, standartlaştırılmış çarpışma enerjisi %30, aktivasyon zamanı 30 ms) ile fragmentlerine ayrılmıştır. Diğer MS parametreleri "Nano-UPLC-nano-ESI-MS/MS" adlı başlık altında anlatıldığı şekilde seçilmiştir.

### **3.2.8.7. Peptidlerin tanımlanması**

Peptidlerin tanımlanması için prekürsör ve ürün iyon taramalarından elde edilen veriler SwissProt veri tabanında MASCOT programı ile analiz edilmiştir. Arama alanı memeli hayvanlar ile kısıtlanmıştır. Taramalarda enzimin, cevapsız bölünmelerin ve basit modifikasyonların olmadığı, oksidasyon (metiyonin) ve fosforilasyon (serin, treonin) modifikasyonlarının bulunduğu ve peptidlerin minimum +2 değerlikte olduğu varsayılmıştır. Ayrıca kütle toleransı prekürsör iyonlar için 10 ppm, ürün iyonları için ise 0.8 Da olarak seçilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesi Proteom Discoverer yazılımı (Thermo Fischer Scientific, Dreieich, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir. Ayrılmış peptid dizilimleri, teorik fragment iyonlarının ürün iyon spektrumları ile karşılaştırılmasıyla manuel olarak kontrol edilmiştir. İnek sütü proteinlerinden türemiş peptidler en yüksekte yer aldığı ve bunların dizilimleri manuel olarak onaylandığında tanımlamanın kesin olduğu düşünülmüştür.

### **3.2.9. Duyusal analizler**

Örneklerin duysal yönden değerlendirilmesi, Bodyfelt vd'nin (1988) fermente süt ürünleri için verdiği yöntemin düzenlenmesi ile elde edilen puanlama sistemine göre Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü lisansüstü öğrencilerinden oluşturulan 5 kişilik panelist grubu tarafından Çizelge 3.4'de gösterilen değerlendirme tablosuna göre yapılmıştır.

### **3.2.10. İstatistiksel analizler**

Araştırma tesadüf parselleri deneme desenine göre üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş olup, analizler paralelli olarak yürütülmüştür. Peptid analizleri dışındaki kısımlara ait ortalamalar SAS istatistik programı (SAS Instutue Inc. SAS System 9.0) kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuş ve önemli bulunan varyasyon kaynaklarının etki düzeyleri ise Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile değerlendirilmiştir (Düzgüneş vd 1987). Üretim parametrelerinin örneklerde tanımlanan peptidler üzerine etkisinin karşılaştırılmasında parametrik olmayan bir istatistik yöntemi olan Mann-Whitney U Testi kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. Kefir örneklerinin duysal niteliklerinin saptanmasında kullanılan puanlama ölçütleri (Bodyfelt vd 1988)

ÖZELLİKLER	YOK				HAFİF				BELİRGİN				ÇOK BELİRGİN			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<b>TAT</b>																
Buruk, Kekremsi	10				7				5				3			
Ransit	10				8				5				2			
Pişmiş Tat	10				9				8				6			
Yüksek Asitlik	10				9				8				7			
Ferahlatıcı olmayan	10				8				7				6			
Metalik/okside tat	10				6				4				2			
Yabancı Tat	10				8				7				6			
Mayamsı	10				6				4				2			
Aroması İyi Olmayan	10				9				8				7			
<b>TOPLAM</b>																
<b>YAPI VE TEKSTÜR</b>																
Pıhtılı Yapı	5				4				3				2			
Gazlı Yapı	5				4				3				2			
Kumlu Yapı	5				4				3				2			
Topaklanmış Yapı	5				4				3				2			
Aşırı Viskoz	5				4				3				2			
Sünmüş	5				3				2				1			
<b>TOPLAM</b>																
<b>GÖRÜNÜŞ VE RENK</b>																
Tipik Olmayan renk	5				4				3				2			
Yağlı	5				4				3				2			
Homojen Olmayan	5				4				3				2			
Serum Ayrılması	5				4				3				2			
Yabancı Madde	5				4				3				2			
<b>TOPLAM</b>																



## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Kefir Üretiminde Kullanılan Sütlerin Kimyasal Bileşimleri

Kefir üretiminde kullanılan çiğ sütler ile standardize edilip 90°C’de 5 dakika ve 90°C’de 10 dakika ısıtılmış sütler için ortalama toplam kurumadde, kül, yağ, protein, pH, titrasyon asitliği ve proteolitik aktivite değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kefir üretiminde kullanılan sütler için ortalama toplam kurumadde, kül, yağ, protein, pH, titrasyon asitliği ve proteolitik aktivite değerleri (X±StdS)

	Çiğ süt	Standardize edilip 90°C’de 5 dakika ısıtılmış süt	Standardize edilip 90°C’de 10 dakika ısıtılmış süt
Toplam kurumadde (%)	11.4±0.4	8.3±0.1	8.3±0.0
Kül (%)	0.7±0.0	0.6±0.0	0.6±0.0
Yağ (%)	3.3±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
Protein (%)	3.2±0.0	3.2±0.0	3.2±0.0
pH	6.8±0.4	6.6±0.0	6.5±0.0
Titrasyon asitliği (%laktik asit)	0.2±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
Proteolitik aktivite (340 nm’de absorbans değeri)	0.1±0.1	0.1±0.0	0.1±0.0

### 4.2. Kefir Örneklerinin Fizikokimyasal Analiz Sonuçları

#### 4.2.1. Kurumadde ve kül içeriği

Kefir örneklerine ait ortalama kurumadde ve kül değerleri Çizelge 4.2’de verilmiştir. Örneklerin söz konusu nitelikleri sadece depolamanın ilk gününde belirlenmiştir. Kefir örneklerine ait ortalama toplam kurumadde değerlerinin %7.2-8.2 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Kefir örneklerine ait ortalama kül değerlerinin ise %0.7-0.8 arasında değiştiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Kefir örneklerine ait ortalama kurumadde ve kül değerleri ( $\bar{X} \pm \text{StdS}$ )

Ürün çeşidi	Kurumadde (%)	Kül (%)
S2054	7.5±0.3	0.7±0.1
S2014	7.9±0.2	0.7±0.0
S2058	8.0±0.0	0.7±0.1
S2018	8.2±0.1	0.7±0.0
S2554	7.7±0.4	0.7±0.0
S2514	7.2±0.1	0.7±0.0
S2558	8.2±0.2	0.7±0.0
S2518	8.1±0.3	0.7±0.1
D2054	7.5±0.1	0.7±0.0
D2014	7.8±0.0	0.8±0.0
D2058	8.2±0.2	0.7±0.1
D2018	8.0±0.2	0.7±0.1
D2554	8.0±0.0	0.7±0.0
D2514	7.7±0.1	0.7±0.0
D2558	8.2±0.0	0.7±0.0
D2518	8.0±0.2	0.7±0.1

Kefir örneklerinin kurumadde değerlerinin istatistiksel analizi sonucunda incelenen ana varyasyon kaynaklarından inkübasyon sıcaklığının  $P < 0.001$  düzeyinde örneklerin kurumadde değerleri üzerine etkili olduğu saptanmıştır. Buna karşılık örneklerin kurumadde değerleri üzerine starter kültür çeşidi, inkübasyon sonlandırma pH'sı ve ısıl işlem normunun istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olmadığı ( $P > 0.05$ ) görülmüştür. Bununla birlikte üretimde kullanılan starter kültür çeşidi, inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon sonlandırma pH'sı ve ısıl işlem normunun kefir örneklerinin kül değerleri üzerine önemli bir etkisinin olmadığı ( $P > 0.05$ ) tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Kefir örneklerinde üretim parametrelerine bağlı olarak belirlenen kurumadde ve kül değerlerine ait varyans analiz sonuçları

Ana Varyasyon Kaynakları	SD	Kurumadde		Kül	
		KO	F	KO	F
Starter Kültür	1	0.0098	0.13	0.0000	0.00
İnkübasyon Sıcaklığı	1	0.3448	40.91***	0.0004	0.19
Sonlandırma pH'sı	1	0.0112	0.34	0.0000	0.04
Isıl İşlem normu	1	0.0084	0.26	0.0053	2.58
Hata	27	0.0328		0.0020	

\*\*\* $P < 0.001$  düzeyinde önemli

Kefir örneklerine ait ortalama kurumadde değerlerinin Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir. Çizelge incelendiğinde, farklı

sıcaklıklarda inkübe edilen kefir örneklerinin ortalama kurumadde değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olduğu ( $P<0.05$ ); 25°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerine ait kurumadde değerlerinin, 20°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerine göre yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. Kefir örneklerinde belirlenen kurumadde değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ( $X\pm\text{StdH}$ )

	Kurumadde (%)
<b>Starter Kültür</b>	
Ticari kefir starter kültürü	7.9 <sup>a</sup> ±0.1
Kefir danesi	7.9 <sup>a</sup> ±0.1
<b>İnkübasyon Sıcaklığı</b>	
20°C	7.7 <sup>a</sup> ±0.1
25°C	8.1 <sup>b</sup> ±0.0
<b>Sonlandırma pH'sı</b>	
pH 4.4	7.9 <sup>a</sup> ±0.1
pH 4.8	7.9 <sup>a</sup> ±0.1
<b>Isıl İşlem Normu</b>	
90°C / 5 dakika	7.9 <sup>a</sup> ±0.1
90°C / 10 dakika	7.9 <sup>a</sup> ±0.1

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $P<0.05$ ).

Yapılan bir çalışmada, süte farklı oranlarda (%1 ve %5) kefir danesi inoküle edilerek üretilen kefir örneklerinin kurumadde değerlerinin depolama süresince %11.3-11.7 arasında değiştiği belirlenmiştir (Irigoyen vd 2005). Ender'in (2009) oligofruktozla zenginleştirilmiş süttten üretilen kefirlerin kalitesi üzerine kefir danesi ve ticari kefir starter kültürü kullanımının etkisini incelemek amacıyla yaptığı çalışmada; kefir danesi ve ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinin kurumadde değerlerinin benzer olduğu ve kefir danesi kullanarak üretilen kefir örneklerinin kurumadde değerlerinin depolama süresince %10.2-10.5, ticari kefir starter kültürü kullanarak üretilen kefir örneklerinin ise kurumadde değerlerinin %10.3-10.5 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda kefir örneklerine ait kurumadde değerleri Irigoyen vd (2005) ve Ender (2009) tarafından yapılmış olan çalışmalarda elde edilen değerlerden düşük bulunmuştur. Örneklere ait kurumadde değerlerinin literatürde belirtilen değerlerin altında olmasının kefir üretimlerinde yağsız süt kullanımından kaynaklandığı değerlendirilmiştir.

Farklı fermantasyon parametrelerinin kefirin kalite özellikleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, yağsız süttten kefir danesi ve ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinin ortalama kurumadde değerlerinin depolamanın 1. gününde sırasıyla %8.0 ve 8.2 olduğu tespit edilmiştir (Kök-Taş vd 2013). Bu değerlerin çalışmamızda elde edilen değerler ile uyumlu olduğu görülmektedir. Ayrıca Ender (2009) ve Kök-Taş vd (2013) tarafından yapılan çalışmalarda da çalışmamıza benzer şekilde üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin örneklerin kurumadde değerleri üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

İnkübasyon sıcaklığının kefirin fizikokimyasal ve duyuşal özellikleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, 20°C, 25°C ve 30°C’de üretilen kefir örneklerinin toplam kurumadde değerlerinin sırasıyla %12.2, %12.3 ve 12.3 olduğu saptanmıştır. Söz konusu çalışmada, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde; 25°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerine ait kurumadde değerlerinin, 20°C inkübasyon sıcaklığında üretilenlere göre yüksek olduğu tespit edilmiştir (Kaptan vd 1990).

Irigoyen vd (2005) kefir üretiminde kullanılan fermantasyon koşullarının üretimde kullanılan sütün kurumadde içeriğini değiştirmedini tespit etmişlerdir. Araştırmamızda elde edilen kurumadde değerlerinin ise, genel olarak üretimde kullanılan sütün kurumadde değerlerinden düşük olduğu belirlenmiştir.

Kefir örneklerinin kurumadde içeriklerinde belirlenen farklılıklar üretimde kullanılan sütün kaynağına ve yağ bileşimine dayandırılmaktadır (Ching-Yun ve Ching-Wen 1999). Bununla birlikte literatürde kefir üretiminde kullanılan üretim parametreleri ve depolama süresinin kefir örneklerinin kurumadde değerleri üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını belirleyen alışmalar (Irigoyen vd 2005, Ender 2009, Ertekin ve Guzel-Seydim 2010, Kök-Taş vd 2013) da bulunmaktadır.

#### **4.2.2. pH ve titrasyon asitliği**

Farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerinin pH ve titrasyon asitliği değerleri ile depolama süresince bu değerlerde meydana gelen değişimler izelge 4.5, Şekil 4.1a ve 4.1b’de sunulmuştur.

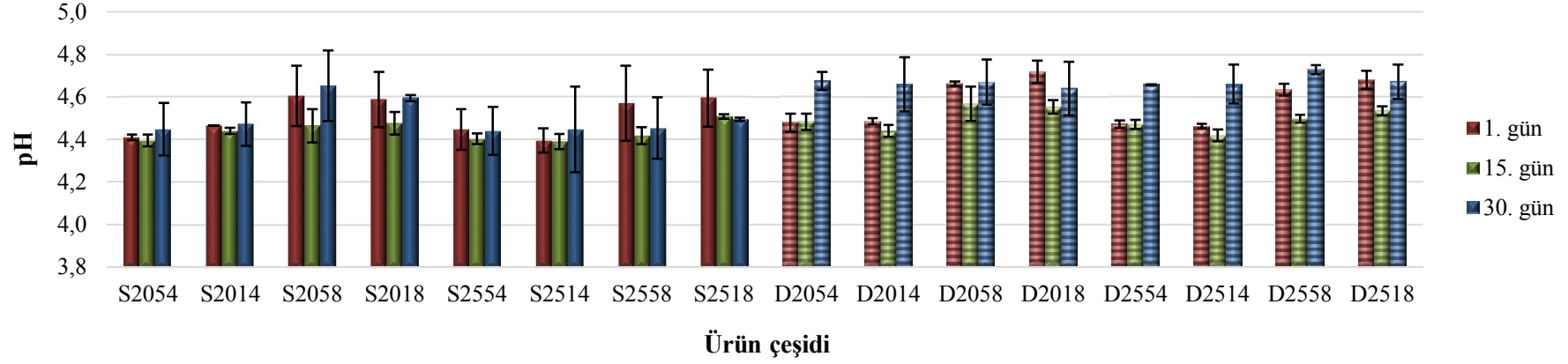
Kefir örneklerinin pH değerleri 4±1°C’de 30 günlük depolama süresince 4.39 ile 4.73 arasında değişkenlik göstermiştir. Depolama süresince kefir örneklerinin pH değerlerinde düzensiz değişimler olduğu dikkat çekmektedir. Genel olarak; depolamanın 15. gününe kadar kefir örneklerinin pH değerlerinin azaldığı, depolamanın 30. gününde ise tekrar arttığı tespit edilmiş ve üretimlerinde ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen örneklere ait pH değerlerinin, kefir danesi kullanılarak üretilen örneklere göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Üretimlerinde inkübasyon sonlandırma pH’sı olarak pH 4.8 seçilen örneklere ait pH değerlerinin depolama süresince üretimlerinde inkübasyon sonlandırma pH’sı olarak pH 4.4 seçilen örneklere göre yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Kefir örneklerinin titrasyon asitliği değerleri %laktik asit cinsinden tespit edilmiş olup, bu değerler depolama süresince %0.65 ile %0.90 arasında değişkenlik göstermiştir. Örneklerin pH değerlerine benzer şekilde, titrasyon asitliği değerlerinin de depolama süresince düzensiz değişimler gösterdiği belirlenmiştir. Genel olarak; depolamanın 15. gününe kadar kefir örneklerinin titrasyon değerlerinin arttığı, depolamanın 30. gününde ise tekrar azaldığı veya değişmediği belirlenmiştir. Üretimlerinde ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen örneklere ait titrasyon asitliği değerlerinin, kefir danesi kullanılarak üretilen örneklere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Genel olarak, 25°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerine ait titrasyon asitliği değerlerinin, 20°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerine göre yüksek olduğu tespit edilmiştir.

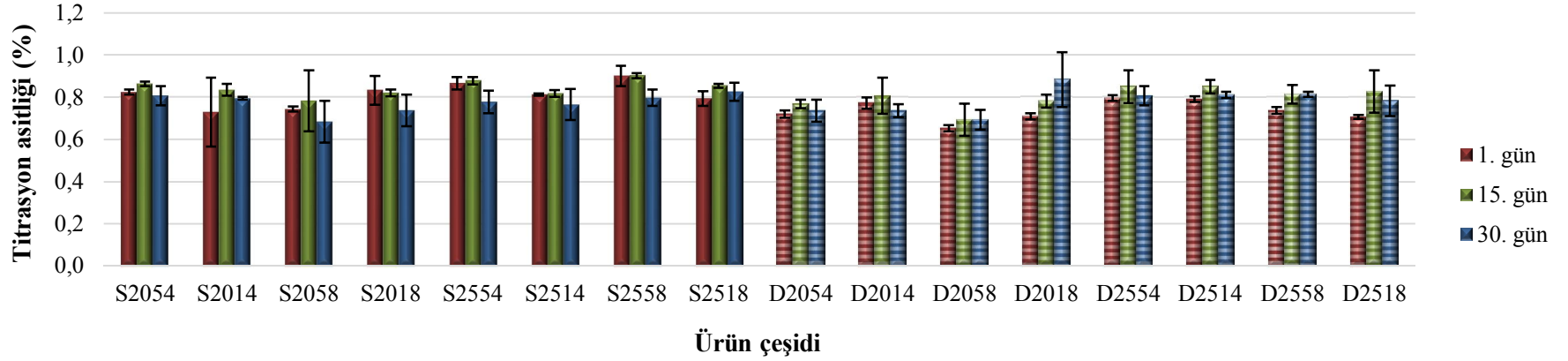
Çizelge 4.5. Kefir örneklerine ait ortalama pH ve titrasyon asitliği değerleri ( $X \pm \text{StdS}$ )

Ürün çeşidi	Depolama süresi (gün)	pH	Titrasyon asitliği (% laktik asit)
S2054	1	4.41±0.01	0.82±0.01
	15	4.40±0.03	0.86±0.01
	30	4.45±0.12	0.81±0.05
S2014	1	4.47±0.00	0.73±0.16
	15	4.44±0.01	0.84±0.03
	30	4.47±0.10	0.80±0.01
S2058	1	4.61±0.14	0.74±0.01
	15	4.47±0.08	0.78±0.14
	30	4.65±0.17	0.69±0.10
S2018	1	4.59±0.13	0.83±0.07
	15	4.48±0.05	0.82±0.02
	30	4.60±0.01	0.74±0.07
S2554	1	4.45±0.10	0.87±0.03
	15	4.40±0.02	0.88±0.02
	30	4.44±0.11	0.78±0.05
S2514	1	4.40±0.06	0.90±0.01
	15	4.39±0.04	0.90±0.02
	30	4.45±0.20	0.80±0.07
S2558	1	4.57±0.18	0.81±0.05
	15	4.42±0.04	0.82±0.01
	30	4.45±0.14	0.77±0.04
S2518	1	4.60±0.13	0.79±0.03
	15	4.51±0.01	0.85±0.01
	30	4.50±0.01	0.83±0.04
D2054	1	4.48±0.04	0.72±0.02
	15	4.48±0.04	0.77±0.02
	30	4.68±0.04	0.74±0.05
D2014	1	4.49±0.01	0.77±0.03
	15	4.44±0.03	0.81±0.09
	30	4.66±0.13	0.74±0.03
D2058	1	4.66±0.01	0.65±0.01
	15	4.57±0.08	0.69±0.08
	30	4.67±0.11	0.69±0.05
D2018	1	4.72±0.05	0.71±0.02
	15	4.55±0.03	0.78±0.03
	30	4.64±0.13	0.88±0.13
D2554	1	4.47±0.02	0.80±0.01
	15	4.47±0.02	0.85±0.08
	30	4.66±0.00	0.81±0.05
D2514	1	4.46±0.01	0.79±0.01
	15	4.42±0.03	0.85±0.03
	30	4.66±0.09	0.81±0.01
D2558	1	4.64±0.03	0.74±0.02
	15	4.50±0.02	0.81±0.04
	30	4.73±0.02	0.81±0.01
D2518	1	4.68±0.04	0.71±0.01
	15	4.54±0.02	0.83±0.10
	30	4.67±0.08	0.78±0.07

a)



b)



Şekil 4.1. Kefir örneklerine ait ortalama a) pH b) titrasyon asitliği değerleri

Kefir örneklerinde üretim parametrelerine bağlı olarak depolama süresince belirlenen pH ve titrasyon asitliği değerleri istatistiksel açıdan değerlendirilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir. Varyans analizi sonuçları incelendiğinde, ana varyasyon kaynaklarından starter kültür çeşidi, inkübasyon sonlandırma pH'sı ve depolama zamanının  $P<0.001$  düzeyinde örneklerin pH değerleri üzerine etkili olduğu saptanmıştır. Buna karşın inkübasyon sıcaklığı ve ısıtma işlem normunun örneklerin pH değerleri üzerinde herhangi bir farklılığa neden olmadığı ( $P>0.05$ ) tespit edilmiştir. Kefir örneklerinin titrasyon asitliği değerlerinin istatistiksel analizi sonucunda, incelenen ana varyasyon kaynaklarından starter kültür çeşidi, inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon sonlandırma pH'sı ve depolama zamanının  $P<0.001$  düzeyinde örneklerin titrasyon asitliği değerleri üzerine etkili olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte örneklerin titrasyon asitliği değerleri üzerine ısıtma işlem normunun önemli bir etkisinin olmadığı ( $P>0.05$ ) görülmüştür.

Çizelge 4.6. Kefir örneklerinde üretim parametrelerine bağlı olarak depolama sürecinde belirlenen pH ve titrasyon asitliği değerlerine ait varyans analiz sonuçları

Ana Varyasyon Kaynakları	SD	pH		Titrasyon asitliği	
		KO	F	KO	F
Starter Kültür	1	0.2501	39.86***	0.0459	11.96***
İnkübasyon Sıcaklığı	1	0.0084	1.34	0.0459	11.96***
Sonlandırma pH'sı	1	0.2301	36.67***	0.0459	11.96***
Isıtma İşlem normu	1	0.0026	0.42	0.0126	3.28
Depolama Zamanı	2	0.1389	22.13***	0.0326	8.49***
Hata	89	0.0063		0.0038	

\*\*\* $P<0.001$  düzeyinde önemli

Kefir örneklerine ait ortalama pH ve titrasyon asitliği değerlerinin Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.7'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde; üretimlerinde ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerine ait pH değerlerinin kefir danesi kullanılarak üretilen örneklere göre düşük olduğu, titrasyon asitliği değerlerinin ise yüksek olduğu saptanmıştır. Literatürde ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinin, kefir danesi kullanılarak üretilenlere göre düşük pH değerlerine sahip olduğunu gösteren araştırmalar (Ender 2009, Montanuci vd 2012) bulunmaktadır. Buna karşın Kök-Taş vd (2013) yaptıkları çalışmada üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin kefirin pH değeri üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını belirlemişlerdir. Çalışmamızda depolama başlangıcında kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinin pH değerlerinin ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilenlere kıyasla yüksek olmasının, danede bulunan mikroorganizmaların polisakkarit matriksten süte geçmesi ve fermantasyon sırasında gelişmesi için zamana ihtiyaç duymasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.7. Kefir örneklerinde depolama sürecinde belirlenen pH ve titrasyon asitliği değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ( $X \pm \text{StdH}$ )

	pH	Titrasyon asitliği (% laktik asit)
<b>Starter Kültür</b>		
Ticari kefir starter kültürü	4.49 <sup>b</sup> ±0.02	0.81 <sup>a</sup> ±0.01
Kefir danesi	4.59 <sup>a</sup> ±0.02	0.77 <sup>b</sup> ±0.01
<b>İnkübasyon Sıcaklığı</b>		
20°C	4.55 <sup>a</sup> ±0.02	0.77 <sup>b</sup> ±0.01
25°C	4.53 <sup>a</sup> ±0.02	0.81 <sup>a</sup> ±0.01
<b>Sonlandırma pH'sı</b>		
pH 4.4	4.49 <sup>b</sup> ±0.01	0.81 <sup>a</sup> ±0.01
pH 4.8	4.59 <sup>a</sup> ±0.02	0.77 <sup>b</sup> ±0.01
<b>Isıl İşlem Normu</b>		
90°C / 5 dakika	4.53 <sup>a</sup> ±0.02	0.78 <sup>a</sup> ±0.01
90°C / 10 dakika	4.54 <sup>a</sup> ±0.02	0.80 <sup>a</sup> ±0.01
<b>Depolama Zamanı</b>		
1. Gün	4.56 <sup>a</sup> ±0.02	0.77 <sup>b</sup> ±0.01
15. Gün	4.47 <sup>b</sup> ±0.01	0.83 <sup>a</sup> ±0.01
30. Gün	4.59 <sup>a</sup> ±0.02	0.78 <sup>b</sup> ±0.01

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $P < 0.05$ ).

Çalışmamızda depolamanın ilk 15 günlük döneminde pH değerlerindeki azalışın ve titrasyon asitliği değerlerindeki artışın istatistiksel olarak önemli olduğu ( $P < 0.05$ ) tespit edilmiştir. Ancak kefir örneklerine ait pH ve titrasyon asitliği değerlerindeki değişimin depolamanın 1. ve 30. günleri arasında istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P > 0.05$ ) görülmüştür. Yoğurt gibi fermente süt ürünlerinde laktozun starter kültürde bulunan bakteriler tarafından parçalanması sonucunda pH değeri azalmaktadır (Abrahamsen ve Holmen 1981, Katsiari vd 2002). Buna karşın birçok çalışmada kefirde depolama süresince pH değerinde önemli bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir (Irigoyen vd 2005, Tratnik vd 2006, Ender 2009). Bazı çalışmalarda ise kefir örneklerinin pH değerlerinin depolamanın ilk haftasında azaldığı, daha sonra depolama süresince değişmediği tespit edilmiştir (Grønnevik vd 2011, Magra vd 2012). Kefir pH'sının depolama süresince değişmemesinin kefirdeki maya mevcudiyetinden kaynaklanması muhtemeldir. Nitekim Collar (1996) kefir pH'sının depolama süresince değişmemesinin laktik asit bakterilerinin mayalarla birlikte olduğunda saf kültürde bulunduğundan daha yavaş olarak çoğalması ve daha az laktik ve asetik asit üretmesi ile ilgili olduğunu tespit etmiştir. Çalışmamızda kefir örneklerinin pH değerlerinin depolamanın ilk 15 gününde azaldığı, depolamanın 15. gününden itibaren tekrar artmaya başladığı ve depolamanın 1. ve 30. gününde elde edilen pH değerlerinin benzer olduğu tespit edilmiştir. Kefir örneklerinin pH değerlerinin depolamanın ilk 15 gününde azalmasının laktozun starter kültürde bulunan bakteriler tarafından parçalanması sonucunda artan laktik asit miktarı, depolamanın 15. gününden sonraki pH artışının ise ortamda bulunan maya sayısının



artması ve dolayısı ile laktik asit bakterilerinin ürettiği laktik asidin mayalar tarafından enerji kaynağı olarak kullanılması ile ilgili olabileceği değerlendirilmiştir.

Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği'nde kefir için belirlenen laktik asit cinsinden % titrasyon asitliği değerinin en az 0.6 olması gerektiği bildirilmektedir (Anonim 2009). Kefir örneklerinin 30 günlük depolama süresince titrasyon asitliği değerlerinin Tebliğ'de belirtilen değerler ile uyumlu olduğu görülmektedir. Ticari kefir starter kültürü ve kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinin titrasyon asitliği değerlerinin birbirinden farklı olmasının üretimde kullanılan ticari kefir starter kültürü ve kefir danesinin mikrobiyal kompozisyonu ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Söz konusu durum kefir örneklerinde yapılan proteolitik aktivite analizi ile de doğrulanmaktadır.

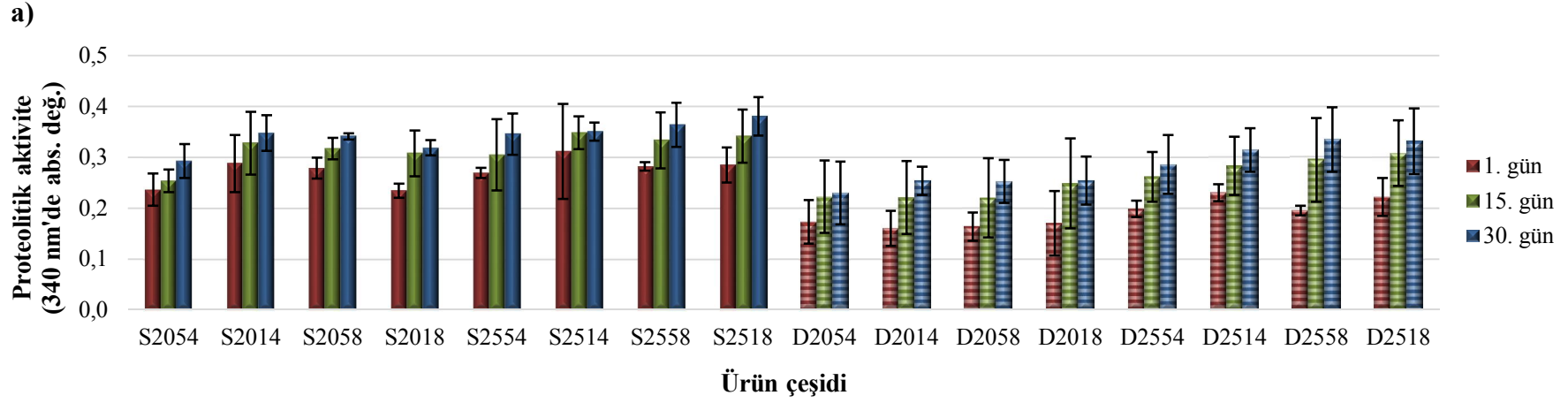
#### **4.2.3. Proteolitik aktivite**

Proteolitik aktivite, kefir starter kültüründe bulunan mikroorganizma faaliyeti sonucunda oluşan proteolitik enzimlerin etkisi ile proteinlerdeki parçalanmayı gösteren bir değerdir. Proteolitik aktivite, hem starter kültürlerin asit oluşturma fonksiyonu hem de ürünün duyuusal nitelikleri açısından önemlidir (Yüksekdağ ve Beyatlı 2003).

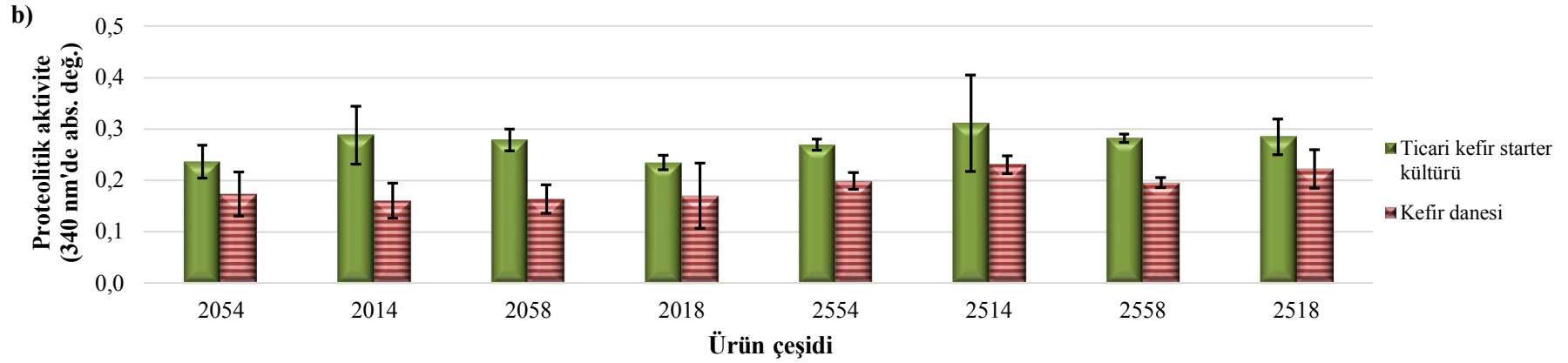
Farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerinin proteolitik aktivite değerleri ile depolama süresince bu değerlerde meydana gelen değişimler Çizelge 4.8 ve Şekil 4.2'de sunulmuştur. Kefir örneklerine ait ortalama proteolitik aktivite değerlerinin (340 nm'de absorbans değeri) depolamanın ilk gününde 0.16 ile 0.31, depolamanın 30. gününde ise 0.23 ile 0.38 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Kefir örneklerinin proteolitik aktivite değerlerinde depolama süresince artış olduğu görülmektedir. Bununla birlikte üretimlerinde ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen örneklere ait proteolitik aktivite değerlerinin, kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine göre daha yüksek olduğu saptanmış ve bu farklılığın daha net bir şekilde gösterilmesi amacıyla Şekil 4.3 hazırlanmıştır.

Çizelge 4.8. Kefir örneklerine ait ortalama proteolitik aktivite değerleri ( $X \pm \text{StdS}$ )

Ürün çeşidi	Depolama süresi (gün)	Proteolitik aktivite değeri (340 nm'de absorbens değeri)
S2054	1	0.24±0.03
	15	0.25±0.02
	30	0.29±0.03
S2014	1	0.29±0.06
	15	0.33±0.06
	30	0.35±0.04
S2058	1	0.28±0.02
	15	0.32±0.02
	30	0.34±0.01
S2018	1	0.23±0.01
	15	0.31±0.05
	30	0.32±0.02
S2554	1	0.27±0.01
	15	0.30±0.07
	30	0.35±0.04
S2514	1	0.31±0.09
	15	0.35±0.03
	30	0.35±0.02
S2558	1	0.28±0.01
	15	0.33±0.06
	30	0.36±0.04
S2518	1	0.29±0.03
	15	0.34±0.05
	30	0.38±0.04
D2054	1	0.17±0.04
	15	0.22±0.07
	30	0.23±0.06
D2014	1	0.16±0.03
	15	0.22±0.07
	30	0.25±0.03
D2058	1	0.16±0.03
	15	0.22±0.08
	30	0.25±0.04
D2018	1	0.17±0.06
	15	0.25±0.09
	30	0.25±0.05
D2554	1	0.20±0.02
	15	0.26±0.05
	30	0.29±0.06
D2514	1	0.23±0.02
	15	0.28±0.06
	30	0.31±0.04
D2558	1	0.20±0.01
	15	0.30±0.08
	30	0.33±0.06
D2518	1	0.22±0.04
	15	0.31±0.06
	30	0.33±0.06



Şekil 4.2. Kefir örneklerine ait ortalama proteolitik aktivite değerleri



Şekil 4.3. Depolamanın 1. gününde ticari kefir starter kültürü ve kefir danesi kullanılarak üretilen örneklerin proteolitik aktivite değerlerinin karşılaştırılması

Kefir örneklerinin proteolitik aktivite değerlerinin istatistiksel analizi sonucunda, incelenen ana varyasyon kaynaklarından starter kültür çeşidi, inkübasyon sıcaklığı ve depolama zamanının örneklerin proteolitik aktivite değerleri üzerine  $P<0.001$ , ısıtma işlem normunun ise  $P<0.05$  düzeyinde etkili olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte inkübasyon sonlandırma pH'sının örneklerin proteolitik aktivite değerleri üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) görülmüştür (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Kefir örneklerinde üretim parametrelerine bağlı olarak depolama sürecinde belirlenen proteolitik aktivite değerlerine ait varyans analiz sonuçları

Ana Varyasyon Kaynakları	Proteolitik aktivite		
	SD	KO	F
Starter Kültür	1	0.1120	71.18***
İnkübasyon Sıcaklığı	1	0.0486	30.87***
Sonlandırma pH'sı	1	0.0033	2.07
Isıtma İşlem normu	1	0.0067	4.23*
Depolama Zamanı	2	0.0545	34.62***
Hata	89	0.0016	

\* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$  düzeyinde önemli

Kefir örneklerine ait ortalama proteolitik aktivite değerlerinin Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.10'da verilmiştir. Çizelge incelendiğinde, üretimlerinde ticari kefir kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerine ait proteolitik aktivite değerlerinin, kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinden daha yüksek olduğu saptanmıştır ( $P<0.05$ ). Ayrıca 25°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerine ait proteolitik aktivite değerlerinin, 20°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerine göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte üretimde kullanılan ısıtma işlem normlarının kefir örneklerinin proteolitik aktivite değerleri üzerine etkisi karşılaştırıldığında; 90°C'de 10 dakika ısıtma işlem normu kullanılarak üretilen kefir örneklerinin proteolitik aktivite değerlerinin, 90°C'de 5 dakika ısıtma işlem normu kullanılarak üretilen kefir örneklerine göre yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.10. Kefir örneklerinde depolama sürecinde belirlenen proteolitik aktivite değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ( $X \pm \text{StdH}$ )

	Proteolitik aktivite değeri (340 nm'de absorbans değeri)
<b>Starter Kültür</b>	
Ticari kefir starter kültürü	0.31 <sup>a</sup> ±0.01
Kefir danesi	0.24 <sup>b</sup> ±0.01
<b>İnkübasyon Sıcaklığı</b>	
20°C	0.25 <sup>b</sup> ±0.01
25°C	0.30 <sup>a</sup> ±0.01
<b>Sonlandırma pH'sı</b>	
pH 4.4	0.27 <sup>a</sup> ±0.01
pH 4.8	0.28 <sup>a</sup> ±0.01
<b>Isıl İşlem Normu</b>	
90°C / 5 dakika	0.27 <sup>b</sup> ±0.01
90°C / 10 dakika	0.29 <sup>a</sup> ±0.01
<b>Depolama Zamanı</b>	
1. Gün	0.23 <sup>c</sup> ±0.01
15. Gün	0.29 <sup>b</sup> ±0.01
30. Gün	0.31 <sup>a</sup> ±0.01

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $P < 0.05$ ).

Çalışmamızda iki farklı starter kültür kullanılarak üretilen kefir örnekleri arasındaki farklılıkların anlaşılması amacıyla söz konusu ürünlerin mikrobiyal kompozisyonu da belirlenmiştir. Kefir örneklerinin proteolitik aktivite değerlerindeki söz konusu farklılığa sadece kefir danesi kullanılarak üretilen örneklerin içerdikleri toplam aerobik mezofilik bakteri sayılarının kefir starter kültürü kullanılarak üretilen örneklere kıyasla daha düşük, maya sayılarının ise daha yüksek olmasının neden olduğu düşünülemez. Bakteri tür ve alt tür kompozisyonunun da kefir örneklerinin proteolitik davranışları üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Yapılan araştırmalarda, laktik asit bakterilerinde laktik asit üretimi ve proteolitik aktivitenin cins, tür ve suşlar arasında farklılık gösterdiği bildirilmektedir (Yüksekdağ ve Beyatlı 2003). Ticari kefir starter kültür karışımındaki bakteriyel suşların büyük bir kısmının daha etkin proteolitik özelliklere sahip olması söz konusu örneklerin kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine göre daha yüksek proteolitik aktivite değerlerine sahip olmasının bir açıklaması olabileceği değerlendirilmektedir. Literatürde kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinin proteolitik aktivite değerlerinin ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilenlere göre yüksek olduğunu belirleyen araştırmalar (Kılıç vd 1999) olduğu gibi kefirde proteolitik aktivite değerlerinin üretimde kullanılan starter kültür çeşidinden bağımsız olduğunu gösteren araştırma (Ender 2009) da bulunmaktadır.

Çalışmamızda depolama süresince kefir örneklerinin proteolitik aktivite değerlerinin arttığı ve bu artışın istatistiksel açıdan önemli olduğu ( $P < 0.05$ ) tespit edilmiştir.

Bu bağlamda çalışmamız, kefir örneklerinin proteolitik aktivite değerlerinin depolama süresince arttığını belirleyen diğer araştırmalar (Kılıç vd 1999, Ender 2009, Yıldız 2009) ile uyumludur.

#### **4.2.4. Sertlik, yapışkanlık ve serum ayrılması**

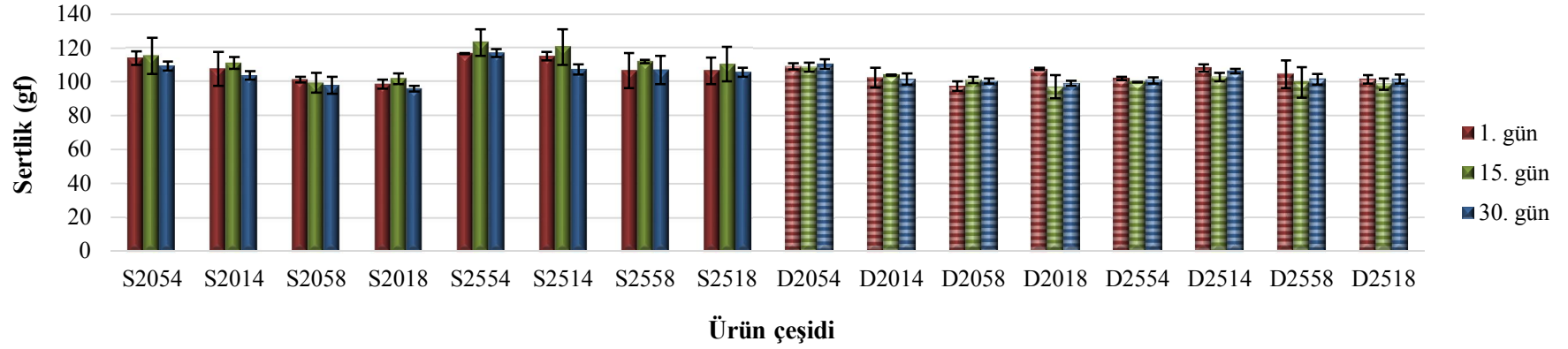
Farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerinin sertlik, yapışkanlık ve serum ayrılması değerleri ile depolama süresince bu değerlerde meydana gelen değişimler Çizelge 4.11 ile Şekil 4.4a, 4.4b ve 4.5'te sunulmuştur.

Kefir örneklerine ait ortalama sertlik, yapışkanlık ve serum ayrılması değerlerinin depolamanın ilk gününde sırasıyla 97.4-116.7 gf, 5.1-16.1 gf ve %0.0-39.8, depolamanın 30. gününde ise sırasıyla 95.9-116.9 gf, 5.8-21.4 gf ve %5.0-60.0 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Kefir örnekleri arasında tüm depolama süresi göz önüne alındığında, sertlik açısından en yüksek değerlere üretimlerinde 90°C'de 5 dakika ısıl işlem normu ve ticari kefir starter kültürü kullanılarak 25°C inkübasyon sıcaklığında ve pH 4.4 inkübasyon sonlandırma pH'sında üretilen kefir örneklerinin, yapışkanlık bakımından ise en yüksek değerlere üretimlerinde 90°C'de 5 ve 10 dakika ısıl işlem normu ve ticari kefir starter kültürü kullanılarak 25°C inkübasyon sıcaklığında ve pH 4.4 inkübasyon sonlandırma pH'sında üretilen kefir örneklerinin sahip olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte ticari kefir starter kültürü kullanılarak 20°C inkübasyon sıcaklığında ve pH 4.8 inkübasyon sonlandırma pH'sında üretilen kefir örneklerinin yapışkanlık bakımından en düşük değerlere sahip oldukları görülmektedir. Genel olarak; üretimlerinde ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen örneklerin sertlik değerlerinin, kefir danesi kullanılarak üretilen örneklere göre yüksek, serum ayrılması değerlerinin ise düşük olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.11).

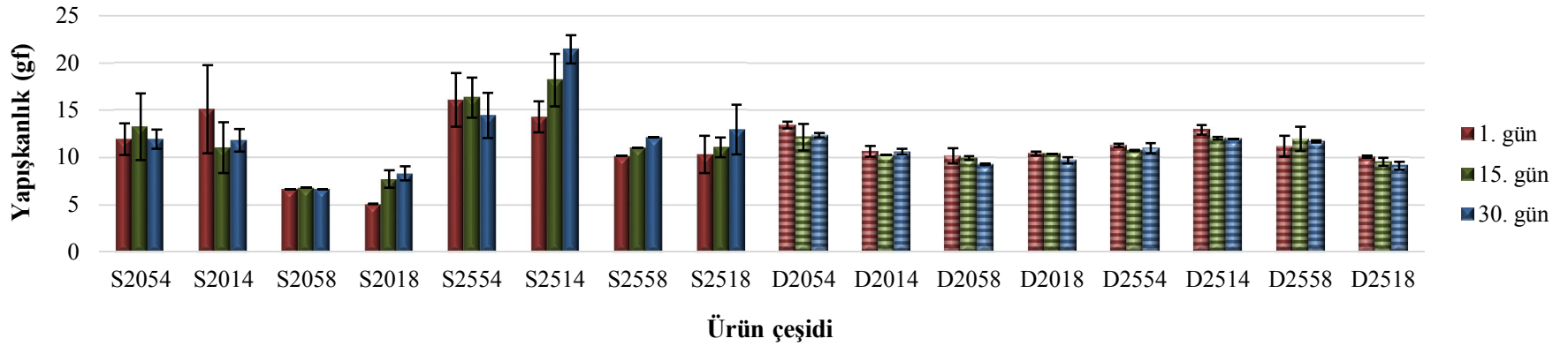
Çizelge 4.11. Kefir örneklerine ait ortalama sertlik, yapışkanlık ve serum ayrılması değerleri ( $X \pm \text{StdS}$ )

Ürün çeşidi	Depolama süresi (gün)	Sertlik değeri (gf)	Yapışkanlık değeri (gf)	Serum ayrılması değeri (%)
S2054	1	114.1±3.9	12.7±1.7	0.0±0.0
	15	115.3±10.6	13.2±3.5	7.8±0.4
	30	109.4±2.7	11.9±1.0	21.0±1.4
S2014	1	107.7±10.0	15.1±4.7	0.0±0.0
	15	111.2±3.7	11.1±2.7	13.0±1.4
	30	103.8±2.5	11.8±1.2	23.0±4.2
S2058	1	101.3±1.5	6.7±0.0	39.8±3.2
	15	99.4±5.8	6.8±0.0	46.3±5.3
	30	97.9±5.0	6.7±0.0	49.5±3.5
S2018	1	98.6±2.7	5.1±0.0	38.3±2.5
	15	101.9±3.2	4.7±5.2	54.8±3.2
	30	95.9±1.7	5.8±4.3	60.0±0.0
S2554	1	116.7±0.5	16.1±2.9	0.0±0.0
	15	123.3±7.8	16.3±2.1	5.3±0.4
	30	116.9±2.3	14.4±2.4	9.3±1.1
S2514	1	115.1±2.5	14.3±1.6	0.0±0.0
	15	120.5±10.4	18.2±2.8	3.5±0.7
	30	107.4±3.0	21.4±1.5	5.0±0.0
S2558	1	106.6±10.4	10.2±0.0	15.8±3.9
	15	112.0±1.0	11.1±0.0	23.3±1.1
	30	106.9±8.3	12.1±0.0	24.5±3.5
S2518	1	106.5±7.8	10.3±2.0	2.0±0.0
	15	110.4±10.2	11.1±1.0	15.5±3.5
	30	105.5±2.7	13.0±2.6	21.0±4.2
D2054	1	109.2±1.9	13.4±0.4	25.0±7.1
	15	108.7±2.7	12.2±1.4	37.0±0.0
	30	110.4±2.8	12.4±0.2	38.5±2.1
D2014	1	102.4±5.8	10.6±0.6	10.5±2.1
	15	104.1±0.3	10.2±0.0	30.0±0.0
	30	101.5±3.4	10.6±0.3	34.5±0.7
D2058	1	97.4±2.8	10.2±0.8	24.0±0.0
	15	101.0±1.8	10.0±0.2	38.5±2.1
	30	100.5±1.6	9.3±0.1	42.5±7.8
D2018	1	107.6±0.6	10.4±0.2	26.5±2.1
	15	97.3±6.9	10.4±0.0	34.0±1.4
	30	99.2±1.5	9.7±0.3	35.0±2.8
D2554	1	101.9±1.1	11.3±0.2	22.0±0.0
	15	99.9±0.2	10.7±0.1	26.5±3.5
	30	100.9±1.9	11.0±0.5	30.5±6.4
D2514	1	108.1±2.1	12.9±0.5	3.5±2.1
	15	102.8±2.5	12.0±0.2	17.0±1.4
	30	106.3±1.4	12.0±0.0	18.5±2.1
D2558	1	104.5±8.2	11.2±1.1	14.0±2.8
	15	99.7±9.1	12.0±1.3	24.5±0.7
	30	101.5±3.2	11.7±0.1	28.5±2.1
D2518	1	101.5±2.6	10.1±0.1	17.0±1.4
	15	98.7±3.4	9.6±0.4	37.5±2.1
	30	101.5±2.7	9.1±0.4	40.5±0.7

a)

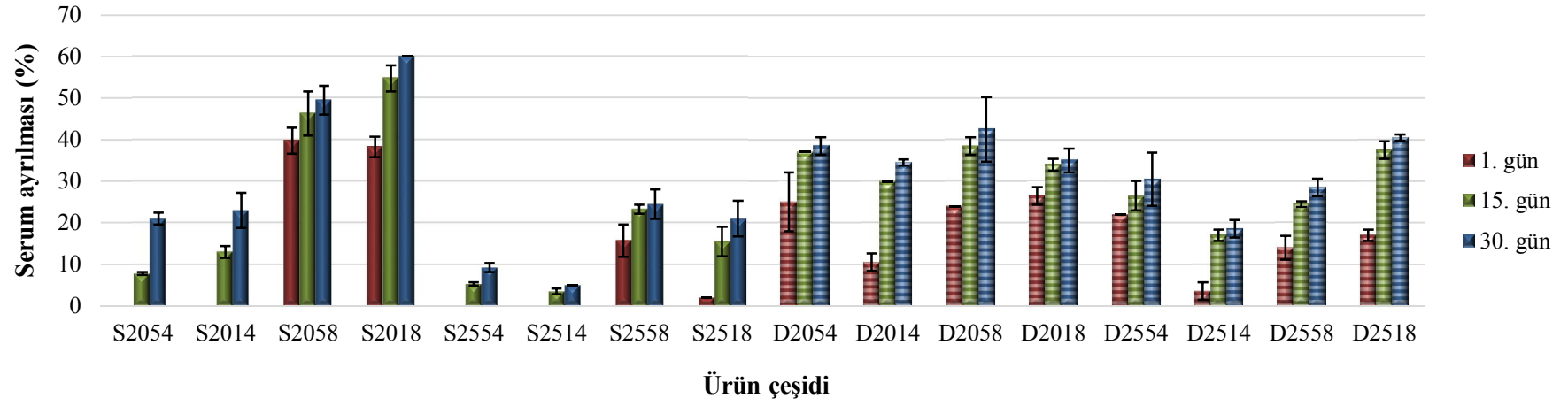


b)



Şekil 4.4. Kefir örneklerine ait ortalama a) sertlik b) yapışkanlık değerleri





Şekil 4.5. Kefir örneklerine ait serum ayrılması değerleri

Kefir örneklerinin sertlik, yapışkanlık ve serum ayrılması değerlerinin istatistiksel analizi sonucunda, incelenen ana varyasyon kaynaklarından starter kültür çeşidi ve inkübasyon sonlandırma pH'sının, sertlik ve serum ayrılması değerleri üzerine  $P<0.001$  düzeyinde etkili olduğu saptanmıştır. Buna karşın üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin örneklerin yapışkanlık değerleri üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür. Üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının örneklerin yapışkanlık ve serum ayrılması değerleri üzerine  $P<0.001$ , sertlik değerleri üzerine ise  $P<0.01$  düzeyinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca ısı işlem normunun kefir örneklerinin sertlik, yapışkanlık ve serum ayrılması değerleri üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) saptanmıştır. Depolama süresince kefir örneklerinin sertlik ve yapışkanlık değerlerinde önemli bir değişim olmadığı ( $P>0.05$ ), depolama süresinin serum ayrılması değerleri üzerine etkisinin  $P<0.001$  düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Kefir örneklerinde üretim parametrelerine bağlı olarak depolama sürecinde belirlenen sertlik, yapışkanlık ve serum ayrılması değerlerine ait varyans analiz sonuçları

Ana Varyasyon Kaynakları	SD	Sertlik		Yapışkanlık		Serum ayrılması	
		KO	F	KO	F	KO	F
Starter Kültür	1	791.43	25.48***	11.13	1.81	1316.46	16.26***
İnkübasyon Sıcaklığı	1	262.42	8.45**	159.11	25.85***	4380.75	54.09***
Sonlandırma pH'sı	1	1122.44	36.14***	324.91	52.78***	5758.25	71.10***
Isıl İşlem normu	1	65.24	2.10	0.38	0.06	118.15	1.46
Depolama Zamanı	2	59.22	1.91	0.46	0.07	1975.51	24.39***
Hata	89	31.06		6.16		80.98	

\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 düzeyinde önemli

Kefir örneklerine ait ortalama sertlik, yapışkanlık ve serum ayrılması değerlerinin Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.13’de verilmiştir.

Çizelge 4.13. Kefir örneklerinde depolama sürecinde belirlenen sertlik, yapışkanlık ve serum ayrılması değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ( $X \pm \text{StdH}$ )

	Sertlik değeri (gf)	Yapışkanlık değeri (gf)	Serum ayrılması değeri (%)
<b>Starter Kültür</b>			
Ticari kefir starter kültürü	108.5 <sup>a</sup> ±1.2	11.6 <sup>a</sup> ±0.7	19.9 <sup>b</sup> ±2.7
Kefir danesi	102.8 <sup>b</sup> ±0.7	11.0 <sup>a</sup> ±0.2	27.3 <sup>a</sup> ±1.5
<b>İnkübasyon Sıcaklığı</b>			
20°C	104.0 <sup>b</sup> ±0.9	10.0 <sup>b</sup> ±0.4	30.4 <sup>a</sup> ±2.3
25°C	107.3 <sup>a</sup> ±1.1	12.6 <sup>a</sup> ±0.4	16.9 <sup>b</sup> ±1.7
<b>Sonlandırma pH’sı</b>			
pH 4.4	109.1 <sup>a</sup> ±1.1	13.1 <sup>a</sup> ±0.4	15.9 <sup>b</sup> ±1.8
pH 4.8	102.2 <sup>b</sup> ±0.8	9.5 <sup>b</sup> ±0.4	31.4 <sup>a</sup> ±2.0
<b>Isıl İşlem Normu</b>			
90°C / 5 dakika	106.5 <sup>a</sup> ±1.2	11.4 <sup>a</sup> ±0.4	24.7 <sup>a</sup> ±2.0
90°C / 10 dakika	104.8 <sup>a</sup> ±1.0	11.2 <sup>a</sup> ±0.6	22.5 <sup>a</sup> ±2.4
<b>Depolama Zamanı</b>			
1. Gün	106.2 <sup>a</sup> ±1.2	11.2 <sup>a</sup> ±0.5	14.9 <sup>b</sup> ±2.4
15. Gün	106.6 <sup>a</sup> ±1.6	11.2 <sup>a</sup> ±0.6	25.9 <sup>a</sup> ±2.6
30. Gün	104.1 <sup>a</sup> ±1.0	11.4 <sup>a</sup> ±0.6	30.1 <sup>a</sup> ±2.5

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $P < 0.05$ ).

Çizelge 4.13 incelendiğinde, üretimlerinde ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerine ait sertlik değerlerinin kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinden daha yüksek olduğu ( $P < 0.05$ ), örneklerin yapışkanlık değerleri arasında önemli bir farklılık olmadığı ( $P > 0.05$ ) saptanmıştır. Montanuci vd (2012) tarafından starter kültür çeşidi ve inülin ilavesinin yağsız ve tam yağlı kefirin sertlik değerleri üzerine etkisinin incelendiği çalışma sonucunda üretimlerinde ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen yağsız kefir örneklerinin sertlik değerlerinin (148.9-173.4 gf) kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine (33.7-72.4 gf) göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu çalışmada kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinin daha düşük sertlik değerlerine sahip olmasının fermantasyon prosesi sonrasında kefir danelerinin süzülerek ayrılmasının kefirin jel yapısına zarar vermesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Farklı süt çeşidi ve starter kültür çeşidinin kefirin sertlik değerleri üzerine etkisinin incelendiği farklı bir çalışmada ise, inek sütünden kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinin sertlik değerlerinin (36.7 gf) ticari kefir starter kültürleri kullanılarak üretilen kefir örneklerine (24.5-25.5 gf) göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Wszolek vd 2001). Çalışmamızda; üretimlerinde ticari kefir starter kültürü

kullanılarak üretilen örneklere ait sertlik değerlerinin Montanuci vd'nin (2012) bulduğu değerlerden düşük, Wszolek vd'nin (2001) bulduğu değerlerden ise yüksek olduğu, üretimlerinde kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine ait sertlik değerlerinin ise her iki çalışmada elde edilen değerlerden düşük olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu durumun kefir örneklerinin üretiminde farklı bileşime sahip süt, farklı üretim yöntemi ve üretimlerinde kullanılan starter kültür ve kefir danesindeki mikroorganizma içeriğindeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kefir gibi fermente süt içecekleri dispers sistemler olup, doğası gereği faz ayrılmasına eğilimlidir. Faz ayrılması, kazein misellerinin agregasyonu ve oluşan protein partiküllerinin yer çekimi kuvvetinin etkisiyle içinde buldukları serumun tabanına doğru çökmesi sonucu oluşmaktadır (Koksoy ve Kilic 2005). Bakteri suşları tarafından üretilen polisakkaritlerin yoğurtta su tutma kapasitesini arttırdığı; bu durumun yüksek molekül ağırlıklı polisakkaritlerin kazein miselleri ile etkileşime girerek misellerin birbirleri ile olan temaslarını sınırlandırmalarından kaynaklandığı bildirilmektedir (Özer 2006). Çalışmamızda ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerine ait serum ayrılması değerlerinin, kefir danesi kullanılarak üretilenlere göre düşük olduğu tespit edilmiş olup, söz konusu durumun ticari kefir starter kültüründe bulunan bakterilerin kefir danesinde bulunan bakterilere göre daha yüksek düzeyde ekzopolisakkarit (EPS) üretebilme özelliğine sahip olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Çalışma sonunda elde edilen veriler, üretimlerinde ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinin serum ayrılması değerlerinin, kefir danesi kullanılarak üretilenlere göre düşük olduğunu gösteren diğer araştırmalar (Ender 2009, Montanuci vd 2012) ile de uyum göstermektedir.

Farklı sıcaklıklarda inkübe edilen kefir örneklerinin ortalama sertlik, yapışkanlık ve serum ayrılması değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olduğu; 25°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerine ait sertlik ve yapışkanlık değerlerinin, 20°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerine göre yüksek, serum ayrılması değerlerinin ise düşük olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.13). Bensmira ve Jiang (2012) tarafından yapılan bir çalışma sonucunda, inkübasyon sıcaklığı arttıkça kefir örneklerinin sertlik değerlerinin arttığı belirlenmiştir. Aynı araştırmacılar tarafından yapılan bir başka çalışmada, kefir üretiminde kullanılan inkübasyon sıcaklığı arttıkça üretilen kefir örneklerine ait EPS değerlerinin de arttığı tespit edilmiştir (Bensmira vd 2010). Kılıç vd (2000b) tarafından yapılan bir çalışmada ise EPS üretebilen starter kültürlerle yapılan yoğurtlarda EPS oluşturmayan starter kültürle yapılan yoğurtlara nazaran daha iyi bir dokunun oluştuğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda, kefir üretiminde kullanılan inkübasyon sıcaklığının artması ile birlikte bakteri suşlarının metabolik aktivitesinin, dolayısı ile de EPS üretebilme yeteneğinin arttığı ve artan EPS miktarı ile kefir örneklerinin sertlik ve yapışkanlık değerlerinin arttığı değerlendirilmiştir.

Bensmira ve Jiang (2012) farklı inkübasyon sıcaklıklarının (20, 24, 28 ve 32°C) kefirin tekstürel ve reolojik özellikleri üzerine etkisini inceledikleri çalışmaları sonucunda; inkübasyon sıcaklığının kefir örneklerinin su tutma kapasitesi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını, ancak 20°C'de inkübe edilen kefir örneklerindeki serum ayrılması değerlerinin 32°C'de inkübe edilenlere göre daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Söz konusu çalışmanın aksine, çalışmamızda yüksek inkübasyon

sıcaklığında üretilen kefir örneklerinde serum ayrılması değerlerinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.13).

İnkübasyon sonlandırma pH'sı son ürünün tekstürel ve reolojik özellikleri üzerinde etkili olan bir diğer parametredir (Özer 2006). Çalışmamızda; üretimlerinde inkübasyon sonlandırma pH'sı olarak pH 4.8 seçilen örneklere ait sertlik ve yapışkanlık değerlerinin, üretimlerinde inkübasyon sonlandırma pH'sı olarak pH 4.4 seçilen örneklere göre düşük, serum ayrılması değerlerinin ise daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.13). Literatürde, yoğurtların pH değeri düştükçe su tutma kapasitesinin arttığı bildirilmektedir (Özer 2006).

Kesenkaş vd (2011) farklı süt (inek, soya ve bu iki sütün farklı oranlardaki karışımları) ve starter kültür çeşidi (kefir danesi ve ticari kefir kültürü) kullanarak ürettikleri kefir örneklerinde depolama süresince serum ayrılması değerlerinin arttığını tespit etmişlerdir. Ender (2009) tarafından yapılan çalışmada ise; depolama süresince serum ayrılması değerlerinin kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde arttığı, ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilenlerde ise değişmediği belirlenmiştir. Ayrıca yapılan bir başka çalışmada serum ayrılması değerlerinin kefir danesi kullanılarak üretilen yağsız kefir örneklerinde depolama süresince arttığı, buna karşın ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilenlerde azaldığı tespit edilmiştir (Montanuci vd 2012). Çalışmamızda ise depolama süresince hem kefir danesi hem de ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde serum ayrılması değerlerinin arttığı, bu artışın depolamanın ilk 15. gününde istatistiksel olarak önemli olduğu ( $P < 0.05$ ); ancak serum ayrılması değerlerinde depolamanın 15. ve 30. günleri arasındaki artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P > 0.05$ ) saptanmıştır (Çizelge 4.13).

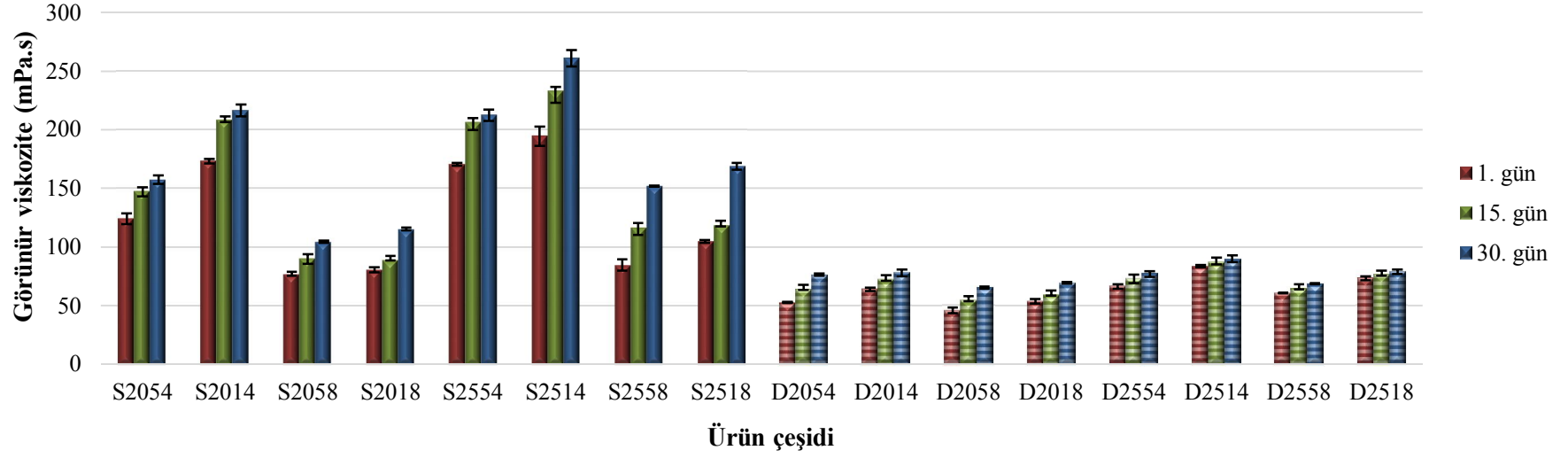
### 4.3. Kefir Örneklerinin Reolojik Analiz Sonuçları

Reolojik özellikler kuvvet ve deformasyonun, zamanın bir fonksiyonu olarak ölçülmesi ile belirlenmektedir. Gıda endüstrisinde reolojik verilere pompa, ekstrüder, karıştırıcı, kaplama makinası, ısı değiştirici ve homojenizatör gibi ekipmanların veya bu ekipmanlarla ilgili proseslerin tasarımı için gerekli olan mühendislik hesaplamalarında, ürün geliştirmede bileşen fonksiyonlarının belirlenmesinde, ara ve son ürün kalite kontrolünde, raf ömrü testlerinde, duyuusal verilerle ilişkili olarak gıda yapısının değerlendirilmesinde ihtiyaç duyulmaktadır (İçier vd 2008).

Farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerinin görünür viskozite değerleri ile depolama süresince bu değerlerde meydana gelen değişimler Çizelge 4.14 ve Şekil 4.6'da sunulmuştur. Kefir örneklerine ait ortalama görünür viskozite değerlerinin depolamanın ilk gününde 46.0 ile 194.4 mPa.s, depolamanın 30. gününde ise 65.3 ile 260.9 mPa.s arasında değiştiği tespit edilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.14 incelendiğinde, görünür viskozite bakımından en yüksek değerlere üretimlerinde 90°C'de 10 dakika ısıl işlem normu ve ticari kefir starter kültürü kullanılarak 25°C inkübasyon sıcaklığında ve pH 4.4 inkübasyon sonlandırma pH'sında üretilen kefir örneklerinin sahip olduğu görülmektedir. Genel olarak; üretimlerinde ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen örneklerin görünür viskozite değerlerinin, kefir danesi kullanılarak üretilenlere kıyasla yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca depolama süresince örneklerin görünür viskozite değerlerinin arttığı saptanmıştır.

Çizelge 4.14. Kefir örneklerine ait ortalama görünür viskozite değerleri ( $X \pm \text{StdS}$ )

Ürün çeşidi	Depolama süresi (gün)	Görünür viskozite değeri (mPa.s)
S2054	1	124.2±4.5
	15	147.5±4.4
	30	157.4±3.6
S2014	1	173.3±1.8
	15	208.0±1.3
	30	216.4±5.0
S2058	1	77.1±1.8
	15	90.4±4.9
	30	104.6±0.9
S2018	1	80.6±2.1
	15	89.0±0.2
	30	115.3±1.3
S2554	1	170.5±1.2
	15	206.3±6.4
	30	212.4±4.7
S2514	1	194.4±8.1
	15	232.9±9.9
	30	260.9±7.1
S2558	1	84.7±4.8
	15	116.9±6.3
	30	151.9±0.5
S2518	1	104.8±1.4
	15	118.7±1.2
	30	168.7±2.8
D2054	1	52.8±0.4
	15	64.1±0.8
	30	76.4±1.0
D2014	1	64.0±1.6
	15	72.2±0.9
	30	78.0±3.0
D2058	1	46.0±2.4
	15	54.6±0.9
	30	65.3±0.8
D2018	1	53.8±1.8
	15	59.4±0.7
	30	69.5±0.8
D2554	1	66.4±1.8
	15	73.1±3.7
	30	77.0±2.3
D2514	1	83.7±1.1
	15	87.3±2.2
	30	90.0±3.0
D2558	1	60.9±0.4
	15	64.6±0.7
	30	68.7±0.4
D2518	1	73.4±1.8
	15	76.1±0.6
	30	78.8±1.8



Şekil 4.6. Kefir örneklerine ait ortalama görünür viskozite değerleri



Kefir örneklerinde üretim parametrelerine bağlı olarak depolama süresince belirlenen görünür viskozite değerleri istatistiksel açıdan değerlendirilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.15'te verilmiştir. Varyans analizi sonuçları incelendiğinde, örneklerin görünür viskozite değerleri üzerine incelenen tüm ana varyasyon kaynaklarının (starter kültür çeşidi, inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon sonlandırma pH'sı, ısıl işlem normu ve depolama zamanı)  $P < 0.001$  düzeyinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.15. Kefir örneklerinde üretim parametrelerine bağlı olarak depolama sürecinde belirlenen görünür viskozite değerlerine ait varyans analiz sonuçları

Ana Varyasyon Kaynakları	Görünür viskozite değeri		
	SD	KO	F
Starter Kültür	1	158551.27	271.08***
İnkübasyon Sıcaklığı	1	14181.48	24.25***
Sonlandırma pH'sı	1	51824.27	88.61***
Isıl İşlem normu	1	7907.96	13.52***
Depolama Zamanı	2	7229.92	12.36***
Hata	89	584.89	

\*\*\*  $P < 0.001$  düzeyinde önemli

Kefir örneklerine ait ortalama görünür viskozite değerlerinin Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.16'da verilmiştir. Üretimlerinde ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerine ait görünür viskozite değerlerinin, kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine göre yüksek olduğu ( $P < 0.05$ ) saptanmıştır. Starter kültürde yer alan bakteri suşları tarafından üretilen polisakkaritlerin yoğurtta viskozite ve su tutma kapasitesini arttırdığı ve bu durumun yüksek molekül ağırlıklı polisakkarit materyallerin kazein miselleri ile olan temaslarını sınırlandırmalarından kaynaklandığı bildirilmektedir (Özer 2006). Çalışmamızda kullanılan ticari kefir starter kültüründeki bakteriyel suşların daha etkin EPS üretebilme özelliğine sahip olması, bu örneklerin kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine göre daha yüksek görünür viskozite değerlerine sahip olmasının bir açıklaması olabileceği değerlendirilmiştir. Literatürde ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinin viskozite değerlerinin kefir danesi kullanılarak üretilenlere kıyasla yüksek olduğunu belirleyen araştırmalar (Beshkova 2002, Ender 2009, Kök-Taş vd 2013) bulunmaktadır.

Farklı sıcaklıklarda inkübe edilen kefir örneklerinin ortalama görünür viskozite değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olduğu ve kefir üretiminde kullanılan inkübasyon sıcaklığı arttıkça üretilen kefir örneklerine ait ortalama görünür viskozite değerlerinin arttığı saptanmıştır (Çizelge 4.16). Fermantasyon sıcaklığının set ve pıhtısı parçalanmış yoğurdun reolojik özellikleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, yüksek sıcaklıklarda yapılan fermantasyonun yoğurtta daha güçlü jel oluşumunu sağladığı ve dolayısıyla da viskoziteyi arttırdığı tespit edilmiştir (Haque vd 2001). Kefir danesi kullanılarak üretilen kefirin reolojik özellikleri üzerine inkübasyon sıcaklığının (20, 25 ve 30°C) etkisinin incelendiği bir çalışma sonucunda; inkübasyon sıcaklığının kefir örneklerinin görünür viskozite değerleri üzerinde etkili olduğu ve 25°C'de inkübe edilen örneklerin görünür viskozite değerlerinin 20°C'de üretilenlere göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu çalışmada, inkübasyon sıcaklığının

örneklerin viskozite değerleri üzerindeki etkisinin, kefirdeki polisakkarit yapı (kefiran) ile ilgili olabileceği değerlendirilmiştir. Araştırmacılar üretimde inkübasyon sıcaklığı olarak 25°C'nin kullanılmasının, diğer inkübasyon sıcaklıklarına nazaran kefiran üretimini dolayısıyla da kefirde görünür viskozite değerlerini arttırdığı sonucuna varmışlardır (Dimitreli ve Antoniou 2011).

Çizelge 4.16. Kefir örneklerinde depolama sürecinde belirlenen görünür viskozite değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ( $\bar{X} \pm \text{StdH}$ )

	Görünür viskozite değeri (mPa.s)
<b>Starter Kültür</b>	
Ticari kefir starter kültürü	150.27 <sup>a</sup> ±7.73
Kefir danesi	68.99 <sup>b</sup> ±1.60
<b>İnkübasyon Sıcaklığı</b>	
20°C	97.47 <sup>b</sup> ±7.02
25°C	121.78 <sup>a</sup> ±8.78
<b>Sonlandırma pH'sı</b>	
pH 4.4	132.86 <sup>a</sup> ±9.50
pH 4.8	86.39 <sup>b</sup> ±4.38
<b>Isıl İşlem Normu</b>	
90°C / 5 dakika	100.55 <sup>b</sup> ±7.01
90°C / 10 dakika	118.70 <sup>a</sup> ±8.94
<b>Depolama Zamanı</b>	
1. Gün	94.38 <sup>c</sup> ±8.13
15. Gün	110.05 <sup>b</sup> ±10.11
30. Gün	124.44 <sup>a</sup> ±10.89

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $P < 0.05$ ).

İnkübasyon sonlandırma pH'sı son ürünün reolojik özellikleri üzerinde etkili olan diğer bir parametredir (Özer 2006). Çalışmamızda farklı inkübasyon sonlandırma pH'larının kefir örneklerinin ortalama görünür viskozite değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık oluşturduğu, kefir üretiminde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH'sı düştükçe üretilen kefir örneklerine ait ortalama görünür viskozite değerlerinin arttığı tespit edilmiştir. Üretimde inkübasyonun pH 4.4-4.2 aralığında sonlandırılması sonucunda yoğurt örneklerinde daha yüksek viskozite elde edildiği, pH 4.8-4.7 aralığında inkübasyonu sonlandırılan yoğurtlarda ise viskozite değerinin önemli ölçüde azaldığı bildirilmektedir (Özer 2006).

Üretimde kullanılan ısıl işlem normlarının kefir örneklerinin görünür viskozite değerleri üzerine etkisi karşılaştırıldığında, 90°C'de 10 dakika ısıl işleme tabi tutulan süttten üretilen kefir örneklerinin görünür viskozite değerlerinin, 90°C'de 5 dakika ısıl işlem uygulanan süttten üretilen kefir örneklerine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kefir örneklerinin ortalama görünür viskozite değerlerinin depolama

süresince arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu ( $P<0.05$ ), 4°C’de 30 gün depolanan kefir örneklerinin ise en yüksek ortalama görünür viskozite değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Literatürde kefir örneklerinde depolama süresince görünür viskozite değerlerinin arttığını gösteren çalışmalar (Beshkova 2002, Ender 2009, Sady vd 2009) olduğu gibi depolama süresince görünür viskozite değerlerinin değişmediğini (Ertekin ve Guzel-Seydim 2010) ya da azaldığını (Garrote vd 1998, Irigoyen vd 2005, Tratnik vd 2006, Magra vd 2012) ortaya koyan çalışmalar da bulunmaktadır. Kefir örneklerinin görünür viskozite değerlerinde ortaya çıkan farklılıkların kefir üretiminde kullanılan sütün bileşiminden ve farklı üretim parametrelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kefirin reolojik davranışı, fermantasyon süresince metabolit oluşumu ile birlikte son ürün kalitesini ve kefirin tüketici tarafından kabul edilebilirliğini etkilediği için önem taşımaktadır. Kefir üretiminde kullanılan sütün çeşidi ve bileşiminin, starter kültür çeşidinin, inkübasyon sıcaklığı ve süresinin, ısıl işlem normunun ve depolama koşullarının kefirin reolojik özelliklerini etkilediği bildirilmektedir (Magra vd 2012, Dimitreli vd 2013).

Çalışmamızda yapılan reolojik ölçümler sonucunda, kefir örneklerinin reolojik özelliklerine ait sonuçlara Herschel-Bulkey modeli uygulandığında elde edilen regresyon katsayılarının (0.62-0.88), Power Law modeli uygulandığında elde edilen regresyon katsayılarına göre düşük olduğu, dolayısı ile verilerin değerlendirilmesinde Power Law modelinin (Eşitlik 3.1) kullanılmasının uygun olacağı değerlendirilmiştir. Power law modeli için elde edilen regresyon katsayıları 0.89 ile 0.99 arasında değişkenlik göstermiştir (Çizelge 4.17). Söz konusu model, literatürde birçok araştırmacı tarafından da kefirin akış karakteristiklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Ertekin ve Guzel-Seydim 2010, Dimitreli ve Antoniou 2011, Magra vd 2012, Dimitreli vd 2013, Kök-Taş vd 2013).

Power Law Model’e göre;

$$\tau = K \cdot \gamma^n \quad (3.1)$$

$\tau$  = Kayma gerilmesi

K = Kıvam katsayısı

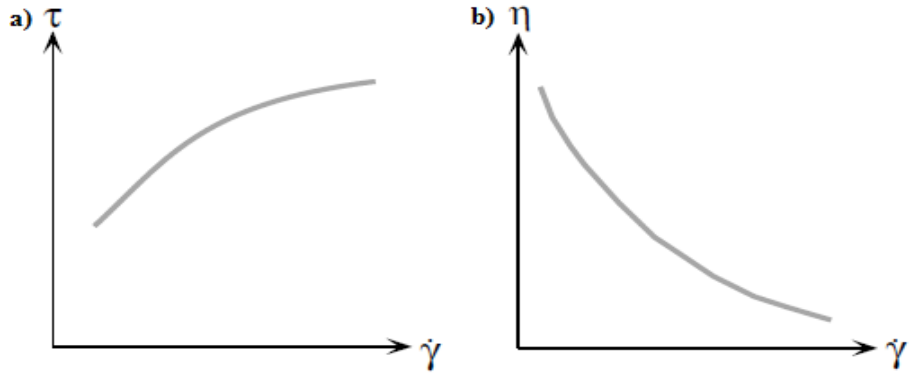
$\gamma$  = Kayma (deformasyon) hızı

n = Akış davranış indeksi

Kefir örneklerinin reolojik ölçümlerine ait çıkış ve iniş eğrilerindeki kayma gerilimi ve kayma hızı değerlerine Power Law modeli uygulanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.17’de sunulmuştur.

Akış davranış indeksi (n); Newton tipi akış tipinde n=1 iken, Newton tipi olmayan akış tipinde n>1 ise dilatant akış tipi, n<1 ise pseudoplastik akış tipi olarak değerlendirilmektedir (Peker ve Helvacı 2003). Çalışmamızda farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerinin akış davranış indeksi (n) değerlerinin 0.25 ile 0.34 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.17). Power Law modeline göre n<1 olduğundan, farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir

örneklerinin depolama süresince Newton tipi olmayan pseudoplastik akış davranışı gösterdiği belirlenmiştir.



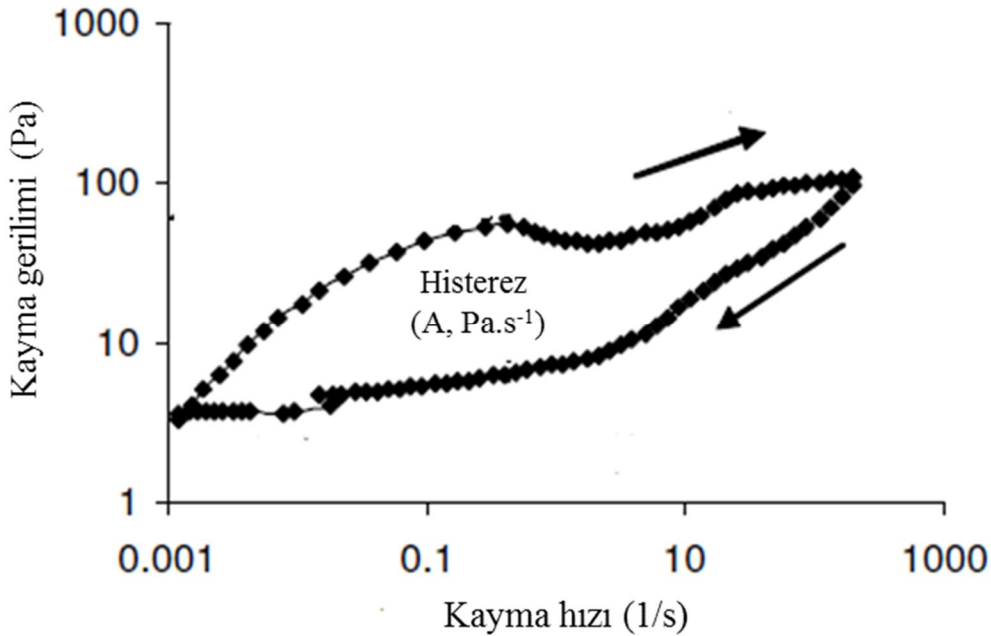
Şekil 4.7. Pseudoplastik akış davranışına ait a) kayma gerilimi-kayma hızı b) görünür viskozite-kayma hızı reogramları

Çizelge 4.17. Kefir örneklerinin Power Law modeline göre reolojik özellikleri ( $X \pm \text{StdS}$ )

Ürün çeşidi	Depolama süresi (gün)	Kıvam katsayısı ( $\text{mPa}\cdot\text{s}^n$ )	Akış davranış indeksi (n)	$R^2$	Tiksotropi ( $\text{Pa}\cdot\text{s}^{-1}$ )
S2054	1	1217.1 $\pm$ 218.9	0.24 $\pm$ 0.00	0.98 $\pm$ 0.00	437.6 $\pm$ 18.2
	15	1571.7 $\pm$ 101.2	0.23 $\pm$ 0.00	0.98 $\pm$ 0.00	509.6 $\pm$ 2.2
	30	1682.8 $\pm$ 17.2	0.21 $\pm$ 0.00	0.98 $\pm$ 0.00	541.6 $\pm$ 1.7
S2014	1	1780.5 $\pm$ 9.4	0.22 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.00	467.5 $\pm$ 15.5
	15	1909.1 $\pm$ 23.3	0.20 $\pm$ 0.00	0.99 $\pm$ 0.00	524.6 $\pm$ 2.2
	30	2090.5 $\pm$ 95.2	0.18 $\pm$ 0.00	0.99 $\pm$ 0.00	552.5 $\pm$ 17.1
S2058	1	1000.0 $\pm$ 0.0	0.29 $\pm$ 0.02	0.90 $\pm$ 0.08	314.6 $\pm$ 4.0
	15	1000.0 $\pm$ 0.0	0.29 $\pm$ 0.02	0.91 $\pm$ 0.04	334.7 $\pm$ 14.5
	30	1000.0 $\pm$ 0.0	0.28 $\pm$ 0.00	0.94 $\pm$ 0.04	375.4 $\pm$ 1.3
S2018	1	1011.7 $\pm$ 16.5	0.20 $\pm$ 0.00	0.97 $\pm$ 0.02	346.8 $\pm$ 40.3
	15	1027.1 $\pm$ 38.3	0.20 $\pm$ 0.01	0.95 $\pm$ 0.01	372.9 $\pm$ 21.9
	30	1034.5 $\pm$ 48.7	0.18 $\pm$ 0.01	0.96 $\pm$ 0.00	388.9 $\pm$ 41.8
S2554	1	1478.9 $\pm$ 43.1	0.19 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.00	564.0 $\pm$ 12.1
	15	1607.1 $\pm$ 67.0	0.17 $\pm$ 0.01	0.98 $\pm$ 0.02	623.9 $\pm$ 4.4
	30	1807.8 $\pm$ 103.6	0.14 $\pm$ 0.02	0.98 $\pm$ 0.01	648.8 $\pm$ 2.5
S2514	1	1637.7 $\pm$ 67.5	0.16 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.00	630.6 $\pm$ 14.2
	15	2157.7 $\pm$ 257.8	0.14 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.00	677.0 $\pm$ 35.0
	30	2484.8 $\pm$ 88.5	0.13 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.00	723.7 $\pm$ 22.5
S2558	1	1011.7 $\pm$ 16.5	0.27 $\pm$ 0.00	0.96 $\pm$ 0.00	432.6 $\pm$ 5.9
	15	1065.2 $\pm$ 49.2	0.23 $\pm$ 0.00	0.97 $\pm$ 0.01	458.5 $\pm$ 18.9
	30	1225.4 $\pm$ 70.9	0.21 $\pm$ 0.01	0.97 $\pm$ 0.01	492.2 $\pm$ 4.0
S2518	1	1067.1 $\pm$ 24.0	0.20 $\pm$ 0.00	0.98 $\pm$ 0.00	490.3 $\pm$ 13.9
	15	1597.2 $\pm$ 136.2	0.18 $\pm$ 0.02	0.98 $\pm$ 0.00	560.8 $\pm$ 36.1
	30	1679.3 $\pm$ 91.4	0.15 $\pm$ 0.00	0.99 $\pm$ 0.00	642.4 $\pm$ 6.2
D2054	1	1000.0 $\pm$ 0.0	0.24 $\pm$ 0.00	0.94 $\pm$ 0.06	312.4 $\pm$ 17.0
	15	1000.0 $\pm$ 0.0	0.23 $\pm$ 0.00	0.94 $\pm$ 0.05	389.7 $\pm$ 15.7
	30	1000.0 $\pm$ 0.0	0.21 $\pm$ 0.00	0.94 $\pm$ 0.06	414.1 $\pm$ 3.2
D2014	1	1000.0 $\pm$ 0.0	0.23 $\pm$ 0.01	0.95 $\pm$ 0.03	454.1 $\pm$ 21.7
	15	1000.0 $\pm$ 0.0	0.21 $\pm$ 0.01	0.93 $\pm$ 0.04	478.6 $\pm$ 11.7
	30	1000.0 $\pm$ 0.0	0.19 $\pm$ 0.01	0.92 $\pm$ 0.05	561.9 $\pm$ 32.0
D2058	1	1000.0 $\pm$ 0.0	0.34 $\pm$ 0.01	0.92 $\pm$ 0.01	266.1 $\pm$ 21.4
	15	1000.0 $\pm$ 0.0	0.33 $\pm$ 0.00	0.92 $\pm$ 0.00	322.4 $\pm$ 9.8
	30	1000.0 $\pm$ 0.0	0.30 $\pm$ 0.01	0.92 $\pm$ 0.01	341.2 $\pm$ 9.0
D2018	1	1000.0 $\pm$ 0.0	0.25 $\pm$ 0.00	0.89 $\pm$ 0.04	392.7 $\pm$ 26.4
	15	1000.0 $\pm$ 0.0	0.22 $\pm$ 0.02	0.91 $\pm$ 0.01	466.2 $\pm$ 3.7
	30	1000.0 $\pm$ 0.0	0.21 $\pm$ 0.01	0.90 $\pm$ 0.02	519.9 $\pm$ 12.1
D2554	1	1000.0 $\pm$ 0.0	0.24 $\pm$ 0.01	0.93 $\pm$ 0.03	352.8 $\pm$ 6.3
	15	1000.0 $\pm$ 0.0	0.20 $\pm$ 0.03	0.90 $\pm$ 0.07	441.5 $\pm$ 17.8
	30	1000.0 $\pm$ 0.0	0.17 $\pm$ 0.05	0.90 $\pm$ 0.06	530.5 $\pm$ 22.2
D2514	1	1000.0 $\pm$ 0.0	0.17 $\pm$ 0.01	0.98 $\pm$ 0.00	460.6 $\pm$ 22.9
	15	1000.0 $\pm$ 0.0	0.15 $\pm$ 0.01	0.98 $\pm$ 0.00	533.1 $\pm$ 10.6
	30	1000.0 $\pm$ 0.0	0.12 $\pm$ 0.01	0.98 $\pm$ 0.01	652.7 $\pm$ 3.9
D2558	1	1000.0 $\pm$ 0.0	0.31 $\pm$ 0.06	0.96 $\pm$ 0.02	318.2 $\pm$ 38.0
	15	1000.0 $\pm$ 0.0	0.26 $\pm$ 0.01	0.96 $\pm$ 0.02	355.1 $\pm$ 44.3
	30	1000.0 $\pm$ 0.0	0.25 $\pm$ 0.01	0.97 $\pm$ 0.02	469.8 $\pm$ 2.8
D2518	1	1000.0 $\pm$ 0.0	0.24 $\pm$ 0.01	0.92 $\pm$ 0.04	405.0 $\pm$ 3.7
	15	1000.0 $\pm$ 0.0	0.20 $\pm$ 0.03	0.92 $\pm$ 0.03	447.9 $\pm$ 1.5
	30	1000.0 $\pm$ 0.0	0.18 $\pm$ 0.03	0.91 $\pm$ 0.04	458.2 $\pm$ 9.2

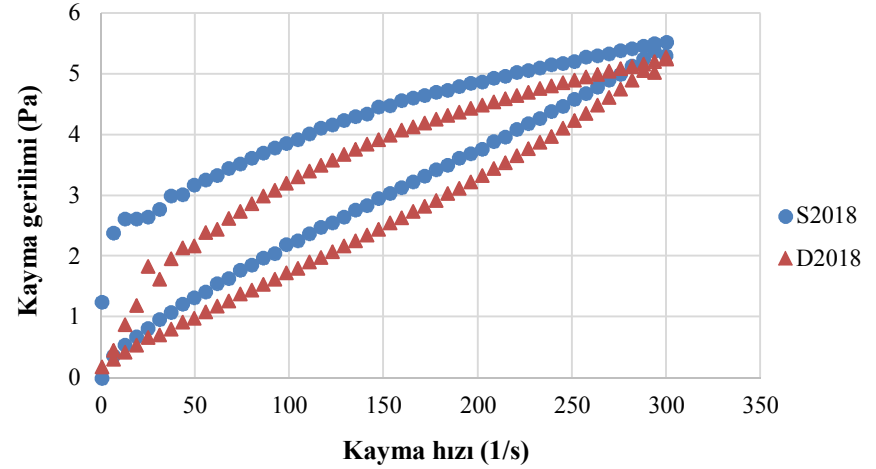
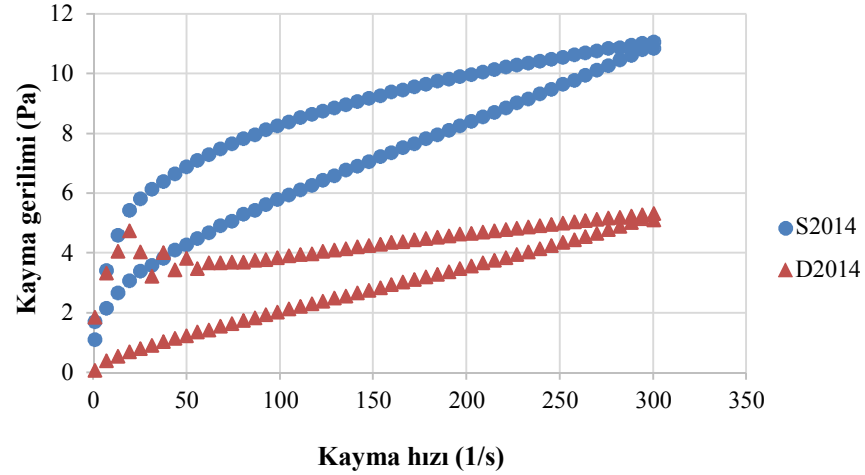
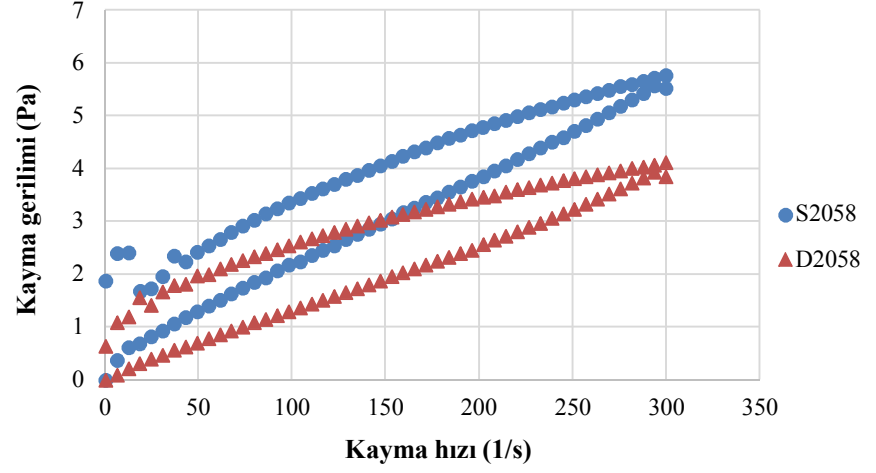
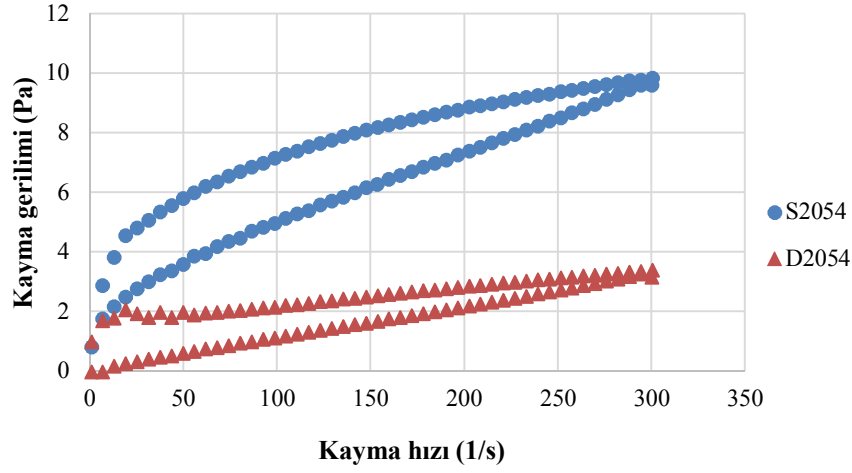
Farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerine ait tipik kayma gerilimi-kayma hızı reogramları Şekil 4.9a ve 4.9b’de sunulmuştur. Söz konusu şekiller incelendiğinde ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinin, kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine göre kayma hızının bir fonksiyonu olarak daha yüksek kayma gerilimi değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Söz konusu şekillerdeki kayma gerilimi-kayma hızı reogramlarına göre örneklerin akış davranışı incelendiğinde ise, kefir örneklerinin Şekil 4.7’de gösterilen pseudoplastik akış tipine benzer akış davranışı gösterdiği belirlenmiştir. Başka bir deyişle, kefir örneklerinde artan kayma hızı ile birlikte partikül deformasyonu artmıştır. Bununla birlikte Şekil 4.10a ve 4.10b’de kayma hızının artışı ile birlikte kefir örneklerinin görünür viskozite ( $\eta$ ) değerlerinin azaldığı görülmektedir. Elde edilen tüm bu verilere dayanarak, çalışmamızda farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerinin Newton tipi olmayan pseudoplastik akış davranışı ve zamana bağlı olarak da tiksotropik akış gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Proses aşamalarında deformasyona maruz kalan gıda materyalinde partikül veya moleküller arasındaki bağların kopması sonucunda moleküller arası dizilimin değişmesi ile akışa karşı gösterilen direnç azalmakta olup gıda materyalinde yapısal değişimler meydana gelmektedir. Akışkanlıkta meydana gelen söz konusu yapısal değişimi açıklayabilmek adına diğer tüm reolojik özelliklerde olduğu kadar tiksotropi terimi de önemlidir. Tiksotropi, akışkanın yapısındaki partikül veya moleküller arasındaki bağların koparılması için birim hacme verilmesi gereken enerjidir (İçier vd 2008). Çalışmamızda kefir örneklerinin tiksotropi değerleri çıkış ve iniş eğrilerinin arasında kalan histerez döngüsü alanının hesaplanması ile bulunmuştur (Şekil 4.8). Çizelge 4.17’de görüldüğü üzere kefir örneklerinin tiksotropi değerleri depolama süresince 266.1-723.7 Pa.s<sup>-1</sup> arasında değişmektedir.



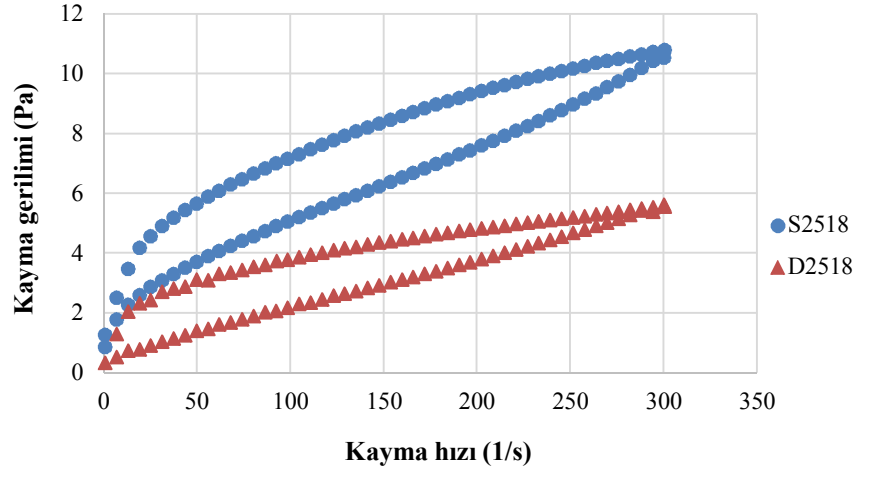
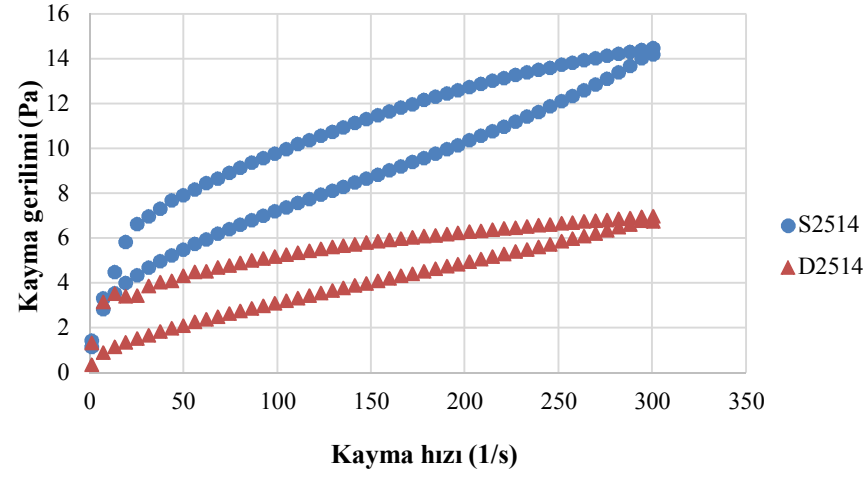
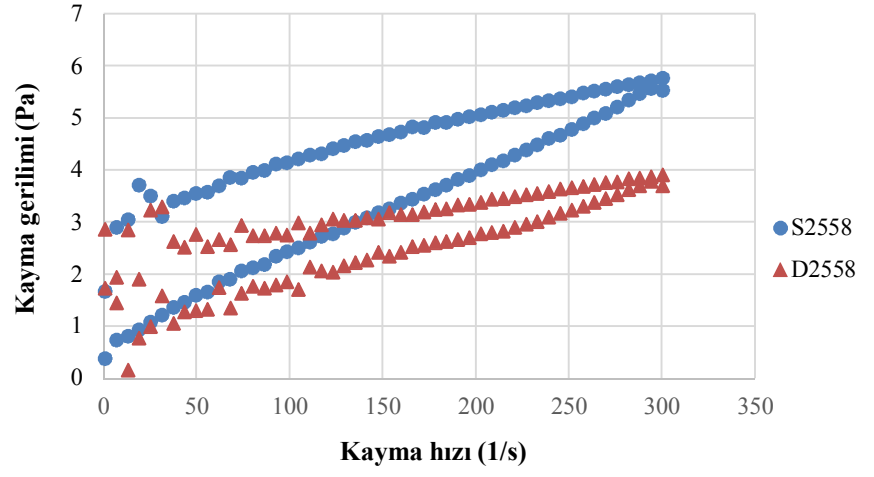
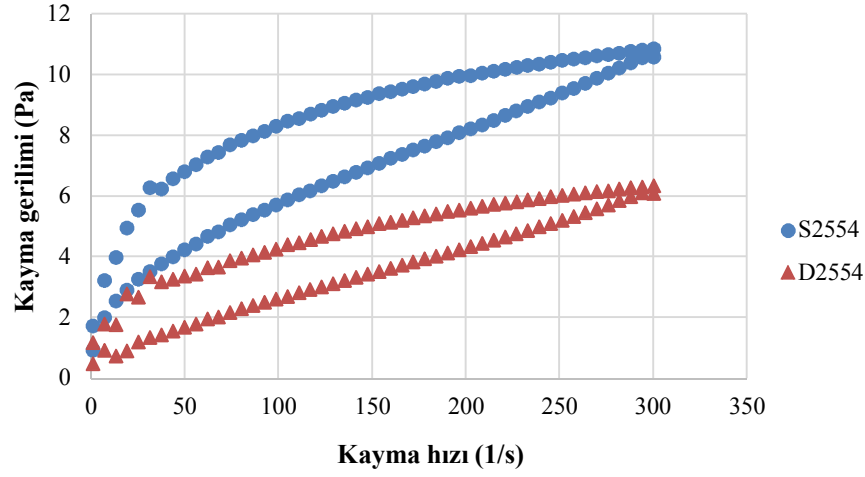
Şekil 4.8. Tiksotropi reogramı

Fermente içeceklerde yüksek konsistens indeksi ve pseudoplastikliğin duyuşal olarak kabul edilebilirliğinin daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Ertekin 2008). rnekların reolojik ölçümlerine ait çıkış ve iniş eğrilerindeki kayma gerilimi ve kayma hızı değerlerine Power Law modeli uygulanması ile elde edilen kıvam katsayısı değerlerinin depolamanın ilk gününde 1000.0 ile 1780.5 mPa.s<sup>n</sup>, depolamanın 30. gününde ise 1000.0 ile 2484.8 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Genel olarak; starter kültür kullanılarak üretilen örneklere ait kıvam katsayısı değerlerinin, ticari kefir kullanılarak üretilen örneklere göre yüksek olduğu belirlenmiştir.

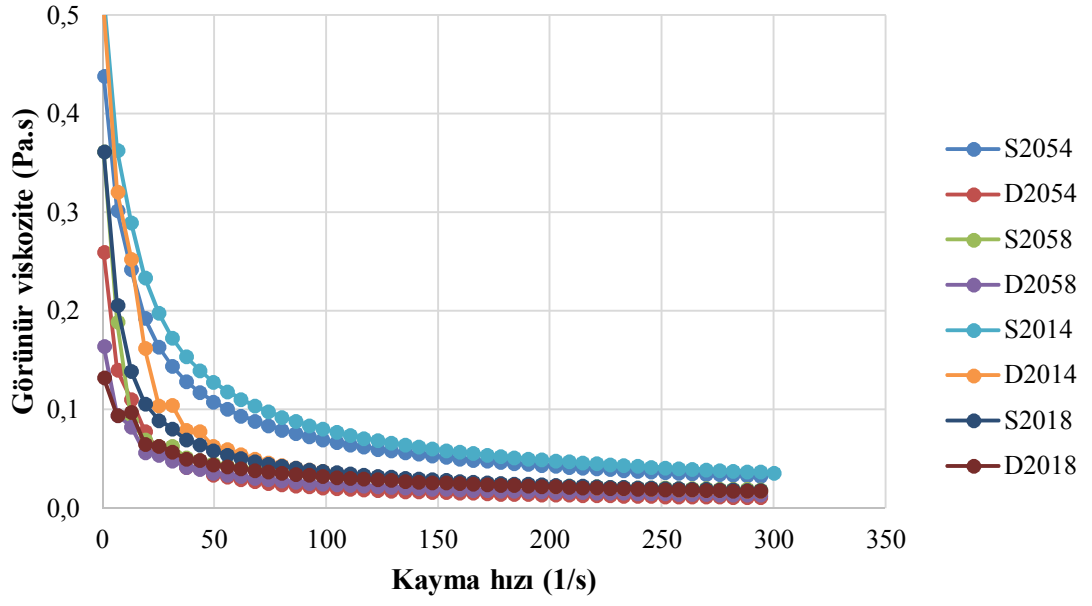


Şekil 4.9a. Depolamanın 1. gününde 20°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerine ait tipik kayma gerilmesi-kayma hızı reogramları

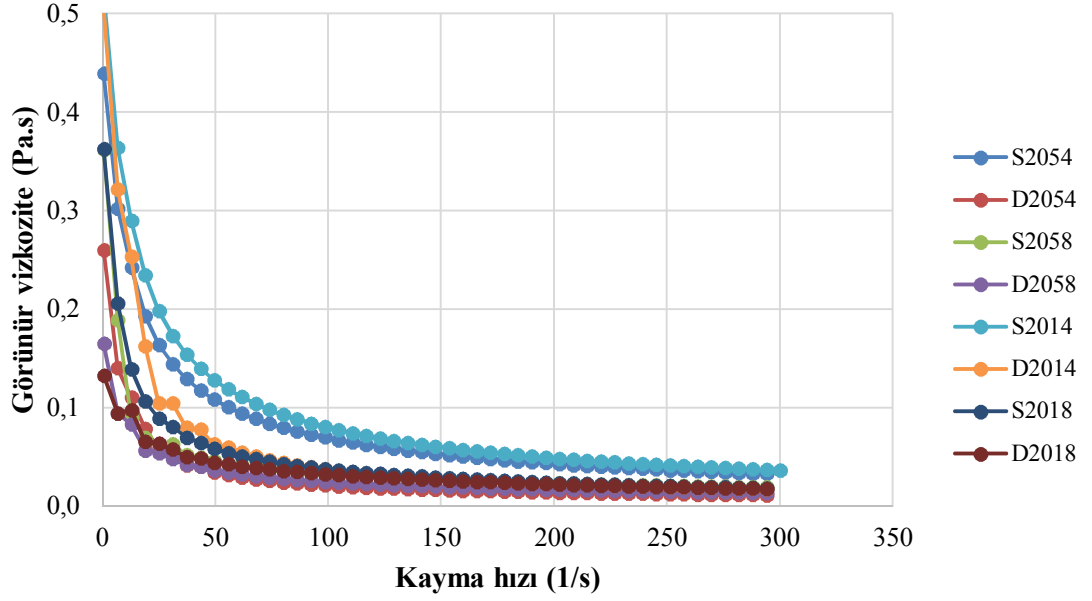




Şekil 4.9b. Depolamanın 1. gününde 25°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerine ait tipik kayma gerilmesi-kayma hızı reogramları



Şekil 4.10a. Depolamanın 1. gününde 20°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerine ait tipik görünür viskozite-kayma hızı reogramları



Şekil 4.10b. Depolamanın 1. gününde 25°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerine ait tipik görünür viskozite-kayma hızı reogramları

Reolojik ölçümlerin istatistiksel olarak değerlendirmesi sonucunda, kefir örneklerinin kıvam katsayısı değerleri üzerine incelenen ana varyasyon kaynaklarından starter kültür çeşidi, inkübasyon sonlandırma pH'sı ve depolamanın  $P<0.001$ , ısıtma işlem normunun  $P<0.01$ , inkübasyon sıcaklığının ise  $P<0.05$  düzeyinde etkili olduğu saptanmıştır. Örneklerin akış davranış indeksi ve tiksotropi değerleri üzerine incelenen tüm ana varyasyon kaynaklarının (starter kültür çeşidi, inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon sonlandırma pH'sı, ısıtma işlem normu ve depolama zamanı)  $P<0.001$  düzeyinde etkili olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18. Kefir örneklerinde üretim parametrelerine bağlı olarak depolama sürecinde belirlenen kıvam katsayısı, akış davranış indeksi ve tiksotropi değerlerine ait varyans analiz sonuçları

Ana Varyasyon Kaynakları	SD	Kıvam katsayısı		Akış davranış indeksi		Tiksotropi	
		KO	F	KO	F	KO	F
Starter Kültür	1	5174786.05	90.15***	0.015	31.75***	130115.25	56.27***
İnkübasyon Sıcaklığı	1	259422.83	4.52*	0.05	98.40***	217531.05	94.07***
Sonlandırma pH'sı	1	2474541.10	43.11***	0.06	130.18***	262651.65	113.58***
Isıl İşlem normu	1	604607.33	10.53**	0.08	159.28***	160356.71	69.34***
Depolama Zamanı	2	249588.13	4.35***	0.01	29.66***	86942.72	37.60***
Hata	89	57399.56		0.00		2312.48	

\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 düzeyinde önemli

Kefir örneklerinde belirlenen kıvam katsayısı, akış davranış indeksi ve tiksotropi değerlerinin Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.19’da verilmiştir.

Çizelge 4.19. Kefir örneklerinde depolama sürecinde belirlenen kıvam katsayısı, akış davranış indeksi ve tiksotropi değerlerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ( $X \pm \text{StdH}$ )

	Kıvam katsayısı (mPa.s <sup>n</sup> )	Akış davranış indeksi	Tiksotropi (Pa.s <sup>-1</sup> )
<b>Starter Kültür</b>			
Ticari kefir starter kültürü	1464.3 <sup>a</sup> ±63.0	0.20 <sup>b</sup> ±0.01	504.7 <sup>a</sup> ±16.7
Kefir danesi	1000.0 <sup>b</sup> ±0.0	0.23 <sup>a</sup> ±0.01	431.0 <sup>b</sup> ±13.2
<b>İnkübasyon Sıcaklığı</b>			
20°C	1180.2 <sup>b</sup> ±49.1	0.24 <sup>a</sup> ±0.01	420.2 <sup>b</sup> ±12.5
25°C	1284.2 <sup>a</sup> ±61.1	0.19 <sup>b</sup> ±0.01	515.4 <sup>a</sup> ±16.0
<b>Sonlandırma pH’sı</b>			
pH 4.4	1392.7 <sup>a</sup> ±66.9	0.19 <sup>b</sup> ±0.01	520.1 <sup>a</sup> ±15.1
pH 4.8	1071.6 <sup>b</sup> ±26.2	0.24 <sup>a</sup> ±0.01	415.5 <sup>b</sup> ±12.9
<b>Isıl İşlem Normu</b>			
90°C / 5 dakika	1152.8 <sup>b</sup> ±38.0	0.24 <sup>a</sup> ±0.01	427.0 <sup>b</sup> ±15.0
90°C / 10 dakika	1311.5 <sup>a</sup> ±67.5	0.19 <sup>b</sup> ±0.01	508.7 <sup>a</sup> ±14.6
<b>Depolama Zamanı</b>			
1. Gün	1137.8 <sup>b</sup> ±45.4	0.24 <sup>a</sup> ±0.01	415.4 <sup>c</sup> ±17.2
15. Gün	1245.9 <sup>ba</sup> ±68.2	0.22 <sup>b</sup> ±0.01	468.5 <sup>b</sup> ±17.8
30. Gün	1312.8 <sup>a</sup> ±83.8	0.19 <sup>c</sup> ±0.01	519.6 <sup>a</sup> ±19.3

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $P < 0.05$ ).

Çizelge 4.19 incelendiğinde ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen kıvam katsayısı ve tiksotropi değerlerinin, kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine göre yüksek olduğu ( $P < 0.05$ ) bulunmuştur. Ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinin kıvam katsayısı değerlerinin, kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine göre yüksek olmasının ticari kefir starter kültüründe bulunan bakterilerin daha fazla EPS üretebilme yeteneğine sahip olması ile ilgili olabileceği değerlendirilmiştir. Ayrıca ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinin kefir danesi ile üretilenlere göre daha yüksek görünür viskozite değerlerine sahip olması, söz konusu örneklerin kefir danesi kullanılarak üretilen örneklere göre daha yüksek kıvam katsayısı değerlerine sahip olmasının bir açıklaması olabilir. Akış davranış indeksi, akışkanların Newton tipi akış davranışa yönelik eğilimini gösteren bir parametredir (Dimitreli vd 2013). Çalışmamızda ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen akış davranış indeksi değerlerinin, kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine kıyasla düşük olduğu ( $P < 0.05$ ) tespit edilmiştir. Bu durum ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinin, kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine göre

Newton tipi davranışa yönelik eğiliminin az olduğu; dolayısıyla da pseudoplastik davranış eğilimi gösterdiği şeklinde değerlendirilmiştir.

İnkübasyon sıcaklığı olarak 20°C seçilen kefir örneklerinin akış davranış indeksi değerlerinin, 25°C inkübasyon sıcaklığında üretilen örneklere göre yüksek; tiksotropi değerlerinin ise düşük olduğu ( $P<0.05$ ) belirlenmiştir (Çizelge 4.19). İnkübasyon sıcaklığı olarak 25°C seçilen örneklerin akış davranış indeksi değerlerinin 20°C inkübasyon sıcaklığında üretilen örneklere göre düşük olması, 25°C inkübasyon sıcaklığında üretilen örneklerin, 20°C'de üretilenlere nazaran pseudoplastik davranışa yönelik eğilimlerinin fazla olduğu şeklinde açıklanabileceği değerlendirilmiştir. İnkübasyon sıcaklığının (20, 25 ve 30°C) kefir danesi kullanılarak üretilen kefirin reolojik özellikleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışma sonucunda, 20 ve 25°C'de inkübe edilen kefir örneklerinin akış davranış indeksi değerleri arasında belirgin bir farklılık olmadığı, 30°C'de inkübe edilen örneklerin ise 20 ve 25°C'de inkübe edilen örneklere kıyasla daha yüksek akış davranış indeksi değerlerine sahip olduğu saptanmıştır (Dimitreli ve Antoniou 2011). Haque vd (2001) inkübasyon sıcaklığındaki artış ile yoğurta reolojik özelliklerin sistematik olarak iyileştiğini belirlemiş olup, bu durumun kazein molekülleri arasındaki hidrofobik etkileşimlerde meydana gelen artıştan kaynaklandığı belirtilmiştir. Çalışmamızda da benzer şekilde inkübasyon sıcaklığının artışı ile birlikte kefir örneklerinde moleküller arası daha güçlü bağların oluştuğu; dolayısıyla söz konusu bağların koparılması için daha yüksek enerjiye gereksinim duyulduğu muhtemeldir.

Üretimlerinde inkübasyon sonlandırma pH'sı olarak pH 4.8 seçilen örneklerin akış davranış indeksi değerlerinin, inkübasyon sonlandırma pH'sı olarak pH 4.4 seçilen örneklere göre yüksek olduğu ( $P<0.05$ ) tespit edilmiştir (Çizelge 4.19). Üretimlerde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH'sı düşüğe örneklere ait tiksotropi değerlerinin arttığı saptanmıştır. Isıl işlem normu olarak 90°C'de 10 dakika seçilerek üretilen kefir örneklerinde belirlenen kıvam katsayısı ve tiksotropi değerlerinin, 90°C'de 5 dakika seçilerek üretilen kefir örneklerine göre yüksek, akış davranış indeksi değerlerinin ise düşük olduğu bulunmuştur. Depolama süresince kefir örneklerinde belirlenen akış davranış indeksi değerlerinin azaldığı, kıvam katsayısı ve tiksotropi değerlerinin ise arttığı tespit edilmiştir. Ancak ortalama kıvam katsayısı değerleri arasındaki farklılığın depolamanın 1. ve 15. günleri ile 15. ve 30. günleri arasında istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) saptanmıştır.

Üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin kefirin reolojik özellikleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, kefir örneklerinin Power Law modele göre depolama süresince Newton tipi olmayan pseudoplastik akış davranışı gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca söz konusu çalışmada kefir örneklerinin zamana bağlı olarak tiksotropik akış gösterdiği belirlenmiştir. Üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin pseudoplastik akış davranışını etkilemediği; ancak ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinin kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine göre kayma hızının bir fonksiyonu olarak daha yüksek kayma gerilimi değerlerine sahip olduğu saptanmıştır. (Kök-Taş vd 2013). Çalışmamızda da benzer şekilde üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin akış davranışını etkilemediği ve ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinin kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine göre kayma hızının bir fonksiyonu olarak daha yüksek kayma gerilimi değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9a ve 4.9b).

Kefirin reolojik özellikleri üzerine ısıl işlem ve peyniraltı suyu konsantrasyonu ilavesinin etkisinin incelendiği bir çalışmada, süte farklı oranlarda (%0, %1, %3 ve %5 (w/w)) peyniraltı suyu konsantratları ısıl işlemde önce ve sonra olacak şekilde ilave edilmiştir. Çalışma sonucunda, kefir örneklerinin Power Law modele göre Newton tipi olmayan pseudoplastik akış davranışı gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca artan peyniraltı suyu konsantrasyonu ile birlikte kefir örneklerinin görünür viskozite ve kıvam indeksi değerlerinin arttığı, akış davranış indeksi değerlerinin ise azaldığı belirlenmiştir. Denatüre peyniraltı suyu proteinleri içeren kefir örneklerinin kıvam indeksi değerlerinin, doğal peyniraltı suyu proteinleri içeren kefir örneklerine göre yüksek; akış davranış indeksi değerlerinin ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Dimitreli vd 2013).

Magra vd (2012) süt yağı (%0, 1.5 ve 3.5 (w/w)) ve süte inoküle edilen kefir danesi oranının (%1, 3 ve 7 (w/w)) ve depolama süresinin (4°C'de 14 gün) kefirin akış özellikleri üzerine etkisini inceledikleri çalışma sonucunda, tüm kefir örneklerinin Power Law modele göre pseudoplastik akış davranışı gösterdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca üretimde kullanılan süt yağı oranı ve süte inoküle edilen kefir danesi oranının, kefir örneklerinin kıvam katsayısı ve akış davranış indeksi değerleri üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu çalışmada, çalışmamızın aksine; depolama süresince kefir örneklerinin kıvam katsayısı değerlerinin azaldığı, akış davranış indeksi değerlerinin ise arttığı tespit edilmiştir.

Kefir kalitesi üzerine yağ ikame maddelerinin etkisinin incelendiği bir çalışmada, kefir örneklerinin Power Law modele göre pseudoplastik akış davranışı gösterdiği tespit edilmiştir. (Ertekin ve Guzel-Seydim 2010).

Çalışmamız sonucunda, Ertekin ve Guzel-Seydim (2010), Magra vd (2012) ve Dimitreli (2013) tarafından yapılan çalışmalara benzer şekilde kefir örneklerinin Power Law modele göre depolama süresince Newton tipi olmayan pseudoplastik akış davranışı gösterdiği tespit edilmiştir.

#### **4.4. Kefir Örneklerinin Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları**

Farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerinde depolama süresince koliform bakteri, toplam aerobik mezofilik bakteri, laktokok, laktobasil, lökonostok, asetik asit bakterisi ve maya sayımları yapılmıştır. Kefir üretiminde, kefir danelerinde veya üretim sırasında meydana gelmesi muhtemel kontaminasyonları belirlemek amacıyla ürünlerin VRB Agarda yapılan mikrobiyolojik ekimlerinde herhangi bir koliform grubu bakteri kolonisine rastlanılmamıştır.

Farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen toplam aerobik mezofilik bakteri, laktobasil, laktokok, lökonostok, asetik asit bakterisi ve maya sayımlarına ait logaritmik değerler ile depolama süresince bu değerlerde meydana gelen değişimler Çizelge 4.20 ve Şekil 4.11a, 4.11b, 4.12a, 4.12b, 4.13a ve 4.13b'de sunulmuştur. Yapılan mikrobiyolojik analizler sonucunda depolamanın ilk gününde kefir örneklerindeki toplam aerobik mezofilik bakteri, laktobasil, laktokok, asetik asit bakterisi, lökonostok ve maya sayılarının sırasıyla 8.8-9.8 log kob/g, 8.8-9.7 log kob/g, 8.8-9.8 log kob/g, 8.8-9.8 log kob/g, 8.3-9.8 log kob/g ve 1.3-5.9 log kob/g arasında değiştiği saptanmıştır. Depolamanın 30. gününde aynı örneklerdeki toplam aerobik mezofilik

bakteri, laktobasil, laktokok, asetik asit bakterisi, lökonostok ve maya sayıları sırasıyla 7.5-8.0 kob/g, 7.2-7.9 log kob/g, 7.4-8.2 log kob/g, 7.2-7.9 log kob/g, 6.9-7.9 log kob/g ve 6.1-7.0 log kob/g arasında değişmiştir.



Çizelge 4.20. Kefir örneklerindeki toplam aerobik mezofilik bakteri, laktobasil, laktokok, asetik asit bakterisi, lökonostok ve maya sayım sonuçları (log kob/g) ( $X \pm \text{StdS}$ )

Ürün çeşidi	Depolama süresi (gün)	TAMB <sup>a</sup> sayısı	Laktobasil sayısı	Laktokok sayısı	AAB <sup>b</sup> sayısı	Lökonostok sayısı	Maya sayısı
S2054	1	9.3±0.0	9.3±0.0	9.8±0.7	9.8±0.7	9.2±0.6	1.4±2.0
	15	8.4±0.1	8.4±0.2	8.7±0.2	8.4±0.3	8.7±0.8	6.1±1.4
	30	7.7±0.6	7.5±0.5	7.5±0.7	7.6±0.4	7.9±0.4	6.2±0.1
S2014	1	9.3±0.3	9.3±0.3	9.3±0.2	9.3±0.2	9.2±0.5	1.5±2.1
	15	8.9±0.2	8.9±0.4	9.0±0.5	8.7±0.3	8.3±0.2	5.9±0.4
	30	8.0±0.1	7.9±0.0	8.0±0.1	7.8±0.0	7.6±0.2	6.2±0.2
S2058	1	9.8±0.9	9.7±0.9	9.1±0.0	9.1±0.1	9.4±1.0	3.9±1.8
	15	8.7±0.2	8.6±0.2	8.8±0.1	8.7±0.0	8.0±0.2	6.5±0.6
	30	7.9±0.2	7.8±0.2	7.8±0.2	7.8±0.2	7.5±0.1	6.4±0.2
S2018	1	9.2±0.1	9.2±0.0	9.2±0.0	9.2±0.0	8.9±0.2	3.1±0.7
	15	8.8±0.1	8.8±0.1	8.9±0.1	8.8±0.1	8.3±0.3	6.5±0.3
	30	8.0±0.1	7.9±0.2	7.9±0.2	7.9±0.2	7.5±0.2	6.1±0.3
S2554	1	9.2±0.0	9.4±0.2	9.5±0.3	9.4±0.3	9.0±0.2	2.9±1.0
	15	8.2±0.2	7.9±0.0	8.6±0.1	8.1±0.2	8.0±0.2	6.5±0.1
	30	7.5±0.3	7.2±0.1	8.2±0.1	7.3±0.2	7.4±0.5	6.4±0.3
S2514	1	9.7±0.6	9.3±0.1	9.3±0.1	9.4±0.4	9.8±1.3	2.0±2.8
	15	8.2±0.1	8.1±0.3	8.8±0.0	7.8±0.5	7.8±0.2	6.0±1.2
	30	7.5±0.4	7.2±0.4	8.2±0.1	7.2±0.4	7.1±0.4	6.6±0.4
S2558	1	9.2±0.1	9.2±0.2	9.3±0.2	9.2±0.2	9.0±0.6	2.7±0.0
	15	8.7±0.5	8.6±0.5	8.8±0.3	8.7±0.4	8.0±0.0	6.2±0.4
	30	8.0±0.2	7.4±1.0	8.2±0.2	7.9±0.3	7.5±0.1	6.3±0.4
S2518	1	9.2±0.1	9.1±0.2	9.2±0.1	9.2±0.1	9.2±0.2	1.3±1.8
	15	8.5±0.0	8.1±0.3	8.6±0.1	8.3±0.0	8.1±0.1	6.3±0.2
	30	7.8±0.0	7.6±0.1	8.1±0.0	7.6±0.0	7.3±0.1	6.4±0.1

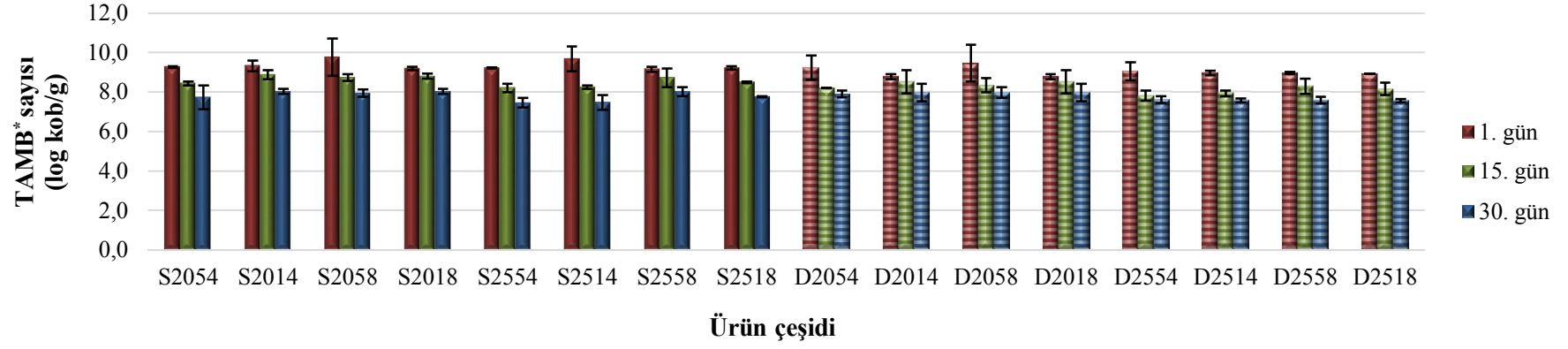
Devamı arkada

Çizelge 4.20'nin devamı

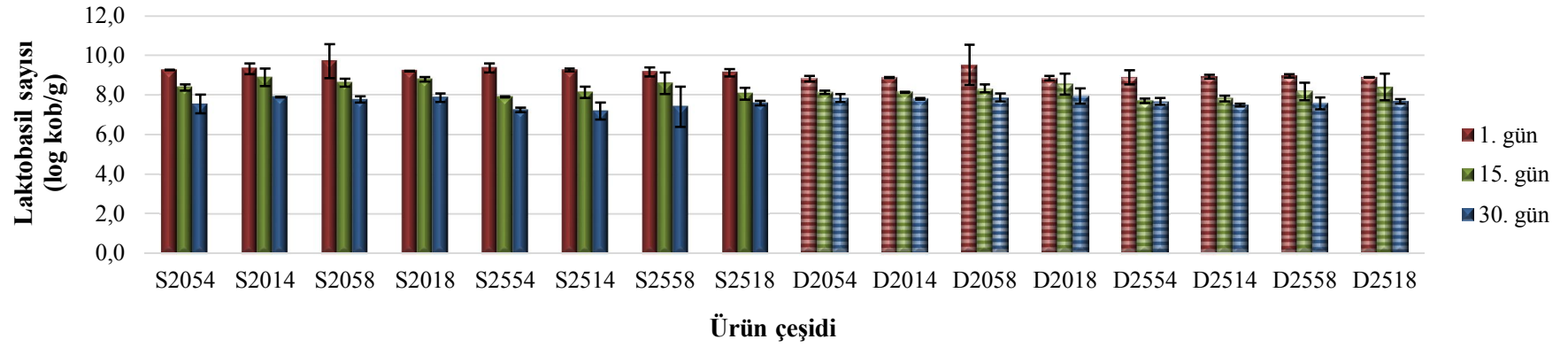
D2054	1	9.2±0.6	8.8±0.1	9.3±0.8	9.1±0.4	9.1±1.5	5.8±0.1
	15	8.2±0.0	8.1±0.1	8.2±0.2	8.3±0.1	7.6±0.7	6.7±0.2
	30	7.9±0.2	7.8±0.2	7.7±0.4	7.8±0.2	7.7±0.4	7.0±0.1
D2014	1	8.8±0.1	8.9±0.0	8.9±0.1	9.5±0.8	8.4±0.4	5.9±0.1
	15	8.2±0.6	8.1±0.0	8.1±0.1	8.3±0.0	8.1±0.1	7.0±0.2
	30	8.0±0.4	7.8±0.0	7.8±0.0	7.9±0.1	7.7±0.1	7.0±0.0
D2058	1	9.5±0.9	9.5±1.0	9.4±1.2	9.5±1.0	9.2±1.5	5.6±0.2
	15	8.3±0.4	8.3±0.2	8.3±0.3	8.3±0.3	7.9±0.5	6.8±0.4
	30	8.0±0.3	7.9±0.2	7.7±0.4	7.9±0.3	7.7±0.3	7.0±0.3
D2018	1	8.8±0.1	8.8±0.1	8.8±0.1	8.8±0.1	8.5±0.4	5.7±0.1
	15	8.2±0.6	8.5±0.5	8.5±0.6	8.3±0.4	8.1±0.1	6.7±0.1
	30	8.0±0.4	7.9±0.4	7.9±0.5	7.9±0.5	7.6±0.6	6.9±0.1
D2554	1	9.0±0.5	8.9±0.4	9.2±0.8	9.1±0.5	8.5±0.7	5.8±0.3
	15	7.8±0.3	7.7±0.1	7.7±0.1	7.8±0.1	7.5±0.6	6.6±0.1
	30	7.6±0.2	7.7±0.2	7.4±0.3	7.5±0.1	7.4±0.6	6.7±0.1
D2514	1	9.0±0.1	8.9±0.1	8.9±0.2	8.9±0.2	8.3±0.5	5.9±0.1
	15	7.9±0.1	7.8±0.1	7.7±0.2	7.9±0.2	7.6±0.3	6.9±0.1
	30	7.6±0.1	7.5±0.1	7.4±0.1	7.6±0.1	7.3±0.1	6.9±0.0
D2558	1	9.0±0.1	9.0±0.1	9.2±0.6	9.0±0.0	8.3±0.3	5.8±0.2
	15	8.3±0.4	8.2±0.4	8.2±0.5	8.2±0.3	7.6±0.7	6.9±0.1
	30	7.6±0.2	7.6±0.3	7.5±0.5	7.5±0.1	7.6±0.8	7.0±0.1
D2518	1	8.9±0.0	8.9±0.0	8.9±0.1	8.8±0.1	8.5±0.5	5.8±0.3
	15	8.2±0.3	8.4±0.7	8.4±0.7	8.2±0.3	7.9±0.6	6.8±0.1
	30	7.6±0.1	7.7±0.1	7.5±0.1	7.6±0.1	6.9±0.3	6.9±0.0

<sup>a</sup> Toplam aerobik mezofilik bakteri<sup>b</sup> Asetik asit bakterisi

a)



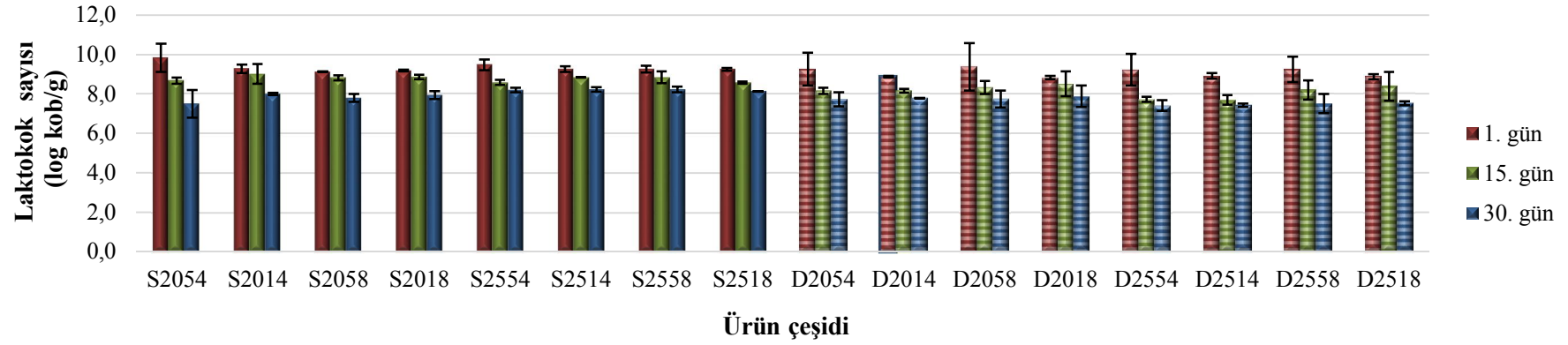
b)



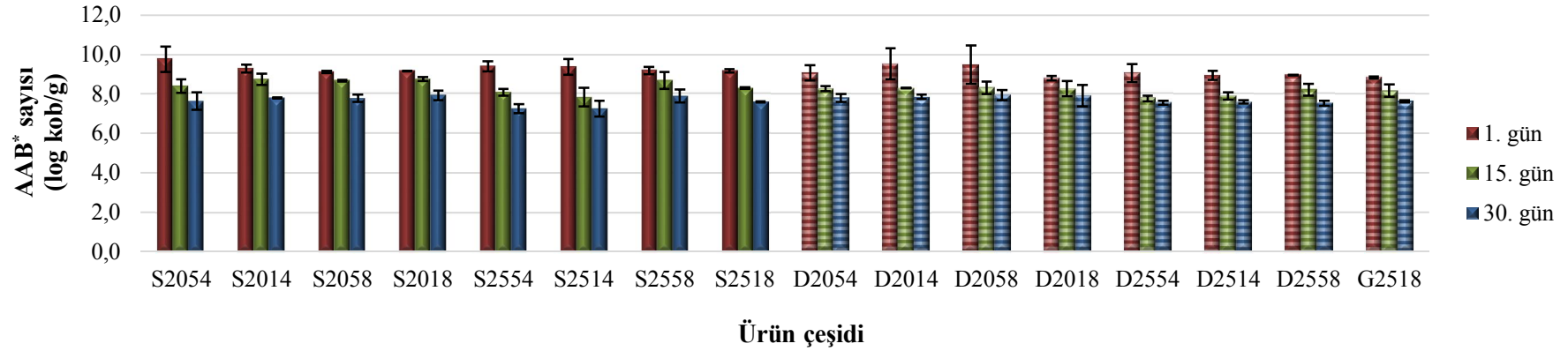
\*TMAB: Toplam aerobik mezofilik bakteri

Şekil 4.11. Kefir örneklerinin a) toplam aerobik mezofilik bakteri b) laktobasil sayılarındaki değişim

a)



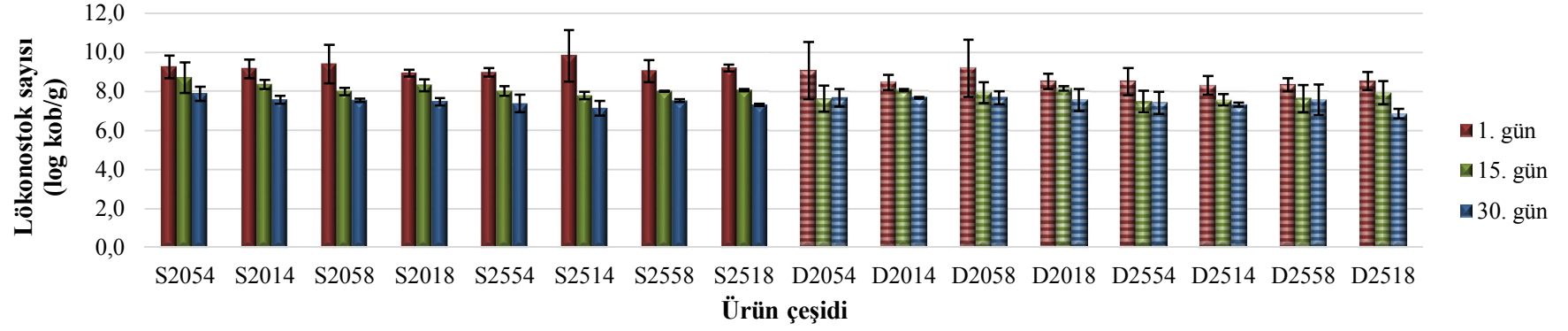
b)



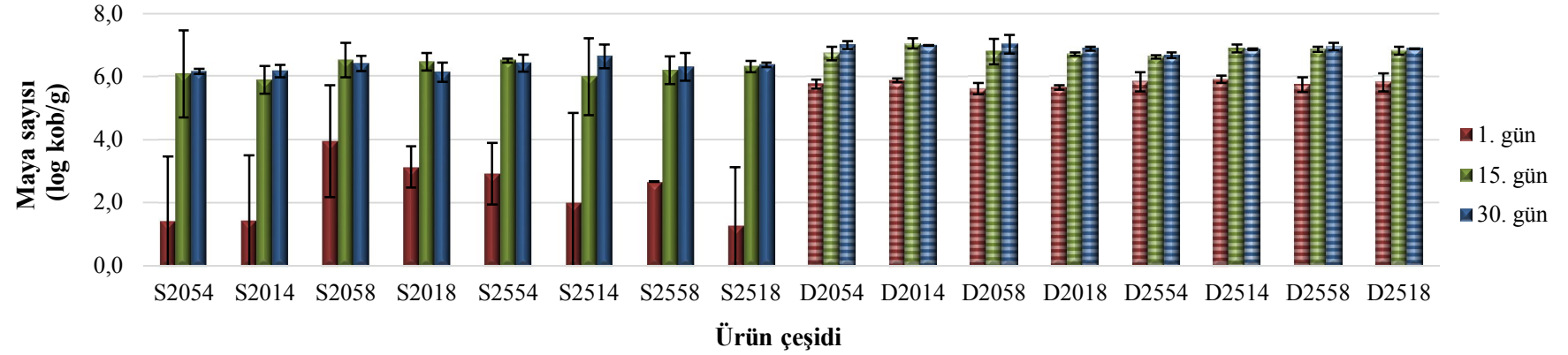
\*AAB: Asetik asit bakterisi

Şekil 4.12. Kefir örneklerinin a) laktokok b) asetik asit bakteri sayılarındaki değişim

a)



b)



Şekil 4.13. Kefir örneklerinin a) lökönostok b) maya sayılarındaki değişim

Mikrobiyolojik analizlerin istatistiksel değerlendirmesi sonucunda, incelenen ana varyasyon kaynaklarından starter kültür çeşidinin kefir örneklerinde belirlenen laktokok ve maya sayıları üzerine  $P<0.001$  düzeyinde, toplam aerobik mezofilik bakteri ve lökonostok sayıları üzerine  $P<0.01$  düzeyinde, laktobasil ve asetik asit bakteri sayıları üzerine ise  $P<0.05$  düzeyinde etkili olduğu tespit edilmiştir. İnkübasyon sıcaklığının kefir örneklerinde belirlenen toplam aerobik mezofilik bakteri, laktobasil ve asetik asit bakteri sayıları üzerine  $P<0.001$  düzeyinde, lökonostok sayısı üzerine  $P<0.01$  düzeyinde etkili olduğu; ancak laktokok ve maya sayıları üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) tespit edilmiştir. Ayrıca inkübasyon sonlandırma pH'sının kefir örneklerinde belirlenen laktobasil sayısı üzerine  $P<0.05$  düzeyinde etkili olduğu; fakat söz konusu üretim parametresinin diğer mikroorganizma sayıları üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) belirlenmiştir. Kefir örneklerinde belirlenen mikroorganizmaların sayım sonuçları üzerine kefir üretiminde kullanılan ısıtma işlem normunun etkisinin önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) görülmüştür. Depolama zamanının kefir örneklerinde belirlenen mikroorganizmaların sayım sonuçları üzerine etkisinin  $P<0.001$  düzeyinde önemli olduğu görülmektedir (Çizelge 4.21).

Kefir örneklerinde belirlenen toplam aerobik mezofilik bakteri, laktobasil, laktokok, asetik asit bakteri, lökonostok ve maya sayılarının Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.22'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde; üretimlerinde ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen toplam aerobik mezofilik bakteri, laktobasil, laktokok, asetik asit bakteri ve lökonostok sayılarının kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinden daha yüksek, maya sayılarının ise daha düşük olduğu saptanmıştır. Ayrıca 25°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerindeki laktobasil, asetik asit bakteri, lökonostok ve maya sayılarının, 20°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerindekiyle göre düşük olduğu tespit edilmiştir. Üretimlerinde inkübasyon sonlandırma pH'sı olarak pH 4.8 seçilen kefir örnekleri ile üretimlerinde inkübasyon sonlandırma pH'sı olarak pH 4.4 seçilen kefir örnekleri arasında toplam aerobik mezofilik bakteri, laktokok, asetik asit bakteri, lökonostok ve maya sayıları bakımından istatistiksel olarak önemli bir farklılık olmadığı ( $P>0.05$ ) belirlenmiştir. Buna karşın üretimlerinde inkübasyon sonlandırma pH'sı olarak pH 4.8 seçilen örneklerde belirlenen laktobasil sayısının üretimlerinde inkübasyon sonlandırma pH'sı olarak pH 4.4 seçilen örneklere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Depolama süresince kefir örneklerinde belirlenen toplam aerobik mezofilik bakteri, laktokok, laktobasil, asetik asit bakteri ve lökonostok sayılarının azaldığı, maya sayılarının ise arttığı saptanmıştır. Ancak örneklerdeki ortalama maya sayıları arasındaki farklılığın depolamanın 15. ve 30. günleri arasında istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.21. Kefir örneklerinde üretim parametrelerine bağlı olarak depolama sürecinde belirlenen toplam aerobik mezofilik bakteri, laktobasil, laktokok, asetik asit bakterisi, lökonostok ve maya sayım sonuçlarına ait varyans analiz sonuçları

Ana Varyasyon Kaynakları	SD	TAMB <sup>a</sup> bakteri sayısı		Laktobasil sayısı		Laktokok sayısı	
		KO	F	KO	F	KO	F
Starter Kültür	1	1.2173	11.53 <sup>**</sup>	0.5003	4.47 <sup>*</sup>	4.0508	30.55 <sup>***</sup>
İnkübasyon Sıcaklığı	1	1.5683	14.85 <sup>***</sup>	1.8732	16.73 <sup>***</sup>	0.1520	1.15
Sonlandırma pH'sı	1	0.2594	2.46	0.7193	6.42 <sup>*</sup>	0.0840	0.63
Isıl İşlem normu	1	0.0002	0.00	0.0021	0.02	0.0477	0.36
Depolama Zamanı	2	17.0843	161.79 <sup>***</sup>	17.8150	159.07 <sup>***</sup>	15.6155	117.76 <sup>***</sup>
Hata	89	0.1056				0.1326	
Ana Varyasyon Kaynakları	SD	AAB <sup>b</sup> sayısı		Lökonostok sayısı		Maya sayısı	
		KO	F	KO	F	KO	F
Starter Kültür	1	0.4732	4.68 <sup>*</sup>	2.5091	10.94 <sup>**</sup>	55.7083	56.96 <sup>***</sup>
İnkübasyon Sıcaklığı	1	1.7334	17.14 <sup>***</sup>	1.7442	7.61 <sup>**</sup>	0.0059	0.01
Sonlandırma pH'sı	1	0.1504	1.49	0.0077	0.03	0.5266	0.54
Isıl İşlem normu	1	0.0345	0.34	0.1305	0.57	0.3788	0.39
Depolama Zamanı	2	18.5648	183.61 <sup>***</sup>	17.2442	75.19 <sup>***</sup>	67.1479	68.66 <sup>***</sup>
Hata	89	0.1011		0.2293		0.9780	

\*P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001 düzeyinde önemli

<sup>a</sup> Toplam aerobik mezofilik bakteri

<sup>b</sup> Asetik asit bakterisi

Çizelge 4.22. Kefir örneklerinde depolama sürecinde belirlenen toplam aerobik mezofilik bakteri, laktobasil, laktokok, asetik asit bakterisi, lökonostok ve maya sayım sonuçlarına ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları (log kob/g) ( $X \pm \text{StdH}$ )

	TAMB <sup>a</sup> bakteri sayısı	Laktobasil	Laktokok sayısı	AAB <sup>b</sup> sayısı	Lökonostok sayısı	Maya sayısı
<b>Starter Kültür</b>						
Ticari kefir starter kültürü	8.6 <sup>a</sup> ±0.1	8.4 <sup>a</sup> ±0.1	8.7 <sup>a</sup> ±0.1	8.5 <sup>a</sup> ±0.1	8.3 <sup>a</sup> ±0.1	5.0 <sup>b</sup> ±0.3
Kefir danesi	8.4 <sup>b</sup> ±0.1	8.3 <sup>b</sup> ±0.1	8.3 <sup>b</sup> ±0.1	8.3 <sup>b</sup> ±0.1	8.0 <sup>b</sup> ±0.1	6.5 <sup>a</sup> ±0.1
<b>İnkübasyon Sıcaklığı</b>						
20°C	8.6 <sup>a</sup> ±0.1	8.5 <sup>a</sup> ±0.1	8.5 <sup>a</sup> ±0.1	8.5 <sup>a</sup> ±0.1	8.3 <sup>a</sup> ±0.1	5.8 <sup>a</sup> ±0.2
25°C	8.3 <sup>b</sup> ±0.1	8.2 <sup>b</sup> ±0.1	8.4 <sup>a</sup> ±0.1	8.3 <sup>b</sup> ±0.1	8.0 <sup>b</sup> ±0.1	5.7 <sup>a</sup> ±0.3
<b>Sonlandırma pH'sı</b>						
pH 4.4	8.4 <sup>a</sup> ±0.1	8.3 <sup>b</sup> ±0.1	8.5 <sup>a</sup> ±0.1	8.4 <sup>a</sup> ±0.1	8.1 <sup>a</sup> ±0.1	5.7 <sup>a</sup> ±0.3
pH 4.8	8.5 <sup>a</sup> ±0.1	8.4 <sup>a</sup> ±0.1	8.5 <sup>a</sup> ±0.1	8.4 <sup>a</sup> ±0.1	8.1 <sup>a</sup> ±0.1	5.8 <sup>a</sup> ±0.2
<b>Isıl İşlem Normu</b>						
90°C / 5 dakika	8.5 <sup>a</sup> ±0.1	8.4 <sup>a</sup> ±0.1	8.5 <sup>a</sup> ±0.1	8.4 <sup>a</sup> ±0.1	8.2 <sup>a</sup> ±0.1	5.8 <sup>a</sup> ±0.2
90°C / 10 dakika	8.5 <sup>a</sup> ±0.1	8.4 <sup>a</sup> ±0.1	8.5 <sup>a</sup> ±0.1	8.4 <sup>a</sup> ±0.1	8.1 <sup>a</sup> ±0.1	5.7 <sup>a</sup> ±0.3
<b>Depolama Zamanı</b>						
1. Gün	9.2 <sup>a</sup> ±0.1	9.1 <sup>a</sup> ±0.1	9.2 <sup>a</sup> ±0.1	9.2 <sup>a</sup> ±0.1	8.9 <sup>a</sup> ±0.1	4.1 <sup>b</sup> ±0.4
15. Gün	8.4 <sup>b</sup> ±0.1	8.3 <sup>b</sup> ±0.1	8.5 <sup>b</sup> ±0.1	8.3 <sup>b</sup> ±0.1	8.0 <sup>b</sup> ±0.1	6.5 <sup>a</sup> ±0.1
30. Gün	7.8 <sup>c</sup> ±0.1	7.7 <sup>c</sup> ±0.1	7.8 <sup>c</sup> ±0.1	7.7 <sup>c</sup> ±0.1	7.5 <sup>c</sup> ±0.1	6.6 <sup>a</sup> ±0.1

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $P < 0.05$ ).

<sup>a</sup> Toplam aerobik mezofilik bakteri

<sup>b</sup> Asetik asit bakterisi



Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği'nde kefirin toplam aerobik mezofilik bakteri sayısının en az  $10^7$  kob/mL düzeyinde olması gerektiği belirtilmektedir (Anonim 2009). Çalışmamızda farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerinin 30 günlük depolama süresince toplam aerobik mezofilik bakteri sayım sonuçlarının Tebliğ'de belirtilen değerler ile uyumlu olduğu görülmektedir. Alpkent ve Küçükçetin (2000) farklı sıcaklıklarda muhafaza ettikleri kefir örneklerinde toplam aerobik mezofilik bakteri sayımın depolamanın ilk gününde 8.7 log kob/mL olduğunu, depolamanın 21. gününde ise 7.4 ile 7.7 log kob/mL arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Ankara piyasasında satılan kefir örneklerinin mikrobiyolojik özelliklerinin incelendiği bir çalışmada ise, toplam aerobik mezofilik bakteri sayımın sade kefir örneklerinde 6.1-9.8 log kob/mL, meyveli kefir örneklerinde 7.4-9.2 log kob/mL, light kefir örneklerinde ise 8.0-9.0 log kob/mL arasında değiştiği belirtilmiştir (Dinç 2008). Araştırmamızda elde edilen toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı söz konusu çalışmalardaki değerlerle benzerlik göstermiştir.

Kefir danesi ve kefirin bakteriyel kompozisyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, kefir daneleri ve içeceklerindeki toplam laktobasil ve laktokok sayılarının sırasıyla 6.5-8.0 log kob/g, 6.5-8.3 log kob/g arasında değiştiği tespit edilmiştir (Kesmen ve Kacmaz 2011).

Süte farklı oranlarda (%1 ve %5) kefir danesi inoküle edilerek üretilen kefir örneklerinin mikrobiyolojik özelliklerinin incelendiği bir çalışmada, başlangıçta  $10^8$  kob/mL olan laktobasil ve laktokok sayılarının depolamanın 14. gününe kadar 1.5 logaritmik birim azalma gösterdiği ve sonrasında 28 günlük depolama süresince sabit kaldığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte çalışmada kefir örneklerinde belirlenen asetik asit bakteri ve maya sayılarının depolamanın başlangıcında sırasıyla  $10^6$  ve  $10^5$  kob/mL düzeyinde olduğu ve bu bakterilerin sayılarında depolama süresince belirgin bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir (Irigoyen vd 2005).

Yağ ikame maddelerinin kefirin kalite özellikleri üzerine etkisinin incelendiği bir başka çalışmada ise; kefir örneklerinde belirlenen laktobasil ve maya sayılarının depolamanın başlangıcında sırasıyla 9.1-9.4 log kob/mL ve 5.3-5.6 log kob/mL arasında değiştiği, 7 günlük depolamanın sonunda aynı örneklerdeki laktobasil ve maya sayılarının sırasıyla 9.7-9.9 log kob/mL ve 5.2-5.5 log kob/mL arasında değiştiği belirlenmiştir (Ertekin ve Guzel-Seydim 2010).

Norveç kefirinin 8 haftalık depolama süresince mikrobiyolojik özelliklerinin incelendiği bir çalışmada, depolamanın başlangıcında 8.0 log kob/mL olan laktobasil ve laktokok sayılarının depolamanın ilk 4 haftalık periyodunda sırasıyla 2 ve 3 logaritmik birim azaldığı ve devam eden depolama süresince sabit kaldığı tespit edilmiştir. Söz konusu örneklerde depolama başlangıcında 7.0 log kob/mL olan lökonostok sayımın ise 8 haftalık depolama sonunda 5.6 log kob/mL olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte kefir örneklerinde depolamanın başlangıcında 3.3 log kob/mL olan maya sayımın depolama süresince arttığı ve depolama sonunda 5 log kob/mL olduğu tespit edilmiştir (Grønnevik vd 2011).

Farklı yağ oranı ve starter kültür çeşidinin kefirin nitelikleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışma sonucunda; hem dane hem ticari kefir starter kültürü kullanılarak

üretileen kefir örneklelerinde laktobasil, laktokok, lökonostok ve maya sayılarının sırasıyla 6.4-9.8 log kob/mL, 5.9-9.6 log kob/mL, 6.7-9.9 log kob/mL ve 6.5-10.2 log kob/mL arasında değiştii belirlenmiştir. Söz konusu çalışmada kefir örneklelerinin mikroorganizma sayılarının genel olarak depolama süresince azalma gösterdiği tespit edilmiştir (Yıldız 2009).

Kök-Taş vd (2013) kefirin kalite karakteristikleri üzerine fermantasyon parametrelerinin etkisini inceledikleri çalışmaları sonucunda, 21 günlük depolama süresince kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklelerindeki laktobasil, laktokok ve maya sayılarının sırasıyla 8.0-9.2 log kob/mL, 8.0-9.2 log kob/mL ve 5.1-5.3 log kob/mL; ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklelerindeki laktobasil, laktokok ve maya sayılarının ise sırasıyla 8.9-9.3 log kob/mL, 8.9-9.3 log kob/mL, 4.8-5.0 log kob/mL arasında değiştii saptanmıştır.

Sütten ve oligofruktoz ilaveli süttten kefir starter kültürü ve kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklelerinin 30 günlük depolama süresince laktobasil, laktokok lökonostok ve asetik asit bakteri sayılarının sırasıyla  $0.3-1.7 \times 10^8$  kob/mL,  $0.4-3.1 \times 10^8$  kob/mL,  $0.3-2.1 \times 10^8$  kob/mL ve  $0.4-3.0 \times 10^8$  kob/mL arasında değiştii tespit edilmiştir. Bununla birlikte maya sayısının kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklelerinde  $3.3 \text{ kob/mL}-6.3 \times 10^5 \text{ kob/mL}$ , kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklelerinde ise  $3 \times 10^5-2.1 \times 10^7 \text{ kob/mL}$  arasında değiştii belirlenmiştir. Depolamanın 10. gününe kadar artış gösteren laktobasil, laktokok ve lökonostok sayılarının 20. gün itibariyle azaldığı, maya sayısının ise 30 günlük depolama süresince artış gösterdiği tespit edilmiştir (Ender 2009).

Montanuci vd (2012) tarafından starter kültür çeşidi ve inülin ilavesinin yağsız ve tam yağlı kefirin mikrobiyal canlılığı üzerine etkisinin incelendiği çalışma sonucunda, 28 günlük depolama süresince kefir örneklelerindeki laktik asit bakterisi, laktokok, lökonostok, asetik asit bakteri ve maya sayılarının sırasıyla 10.8-12.8 log kob/mL, 10.9-13.5 log kob/mL, 9.7 -11.51 log kob/mL, 9.5-12.1 log kob/mL ve 7.5-10.1 log kob/mL arasında değiştii belirlenmiştir. Bununla birlikte bu çalışmada depolama süresince genel olarak asetik asit bakteri, maya ve lökonostok sayılarının arttığı ya da değişmediği, laktik asit bakteri ve laktokok sayılarının ise azaldığı ya da değişmediği saptanmıştır.

Çalışmamızda; üretimlerinde ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklelerine ait laktobasil ve laktokok sayılarının Yıldız (2009) ve Ender (2009) tarafından yapılmış olan çalışmalar ile uyumlu, Montanuci vd (2012) ve Kök-Taş vd'nin (2013) bulduğu değerlerden ise düşük olduğu belirlenmiştir. Kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklelerine ait laktokok ve laktobasil sayılarının ise Irigoyen vd (2005), Ender (2009), Yıldız (2009), Grønnevik vd (2011), Kesmen ve Kacmaz (2011) ve Kök-Taş vd (2013) tarafından yapılan çalışmalarda belirtilen değerlerle benzerlik gösterdiği, Ertekin ve Guzel-Seydim (2010) ve Montanuci vd'nin (2012) bulduğu değerlerden ise düşük olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda kefir örneklelerinde belirlenen asetik asit bakteri sayılarının Ender (2009) tarafından belirlenen değerler ile benzerlik gösterdiği, Irigoyen vd'nin (2005) değerlerinden yüksek, Montanuci vd'nin (2012) değerlerinden ise düşük olduğu belirlenmiştir. Lökonostok sayılarının ise Ender (2009) ve Yıldız (2009) tarafından belirtilen değerler ile uyumlu olduğu, Montanuci vd'nin (2012) bulduğu değerlerden ise düşük olduğu saptanmıştır. Kefir örneklelerinde belirlenen bakteri

sayılarındaki farklılıkların kefir üretiminde kullanılan farklı süt bileşimleri, üretim yöntemleri ve üretimde kullanılan kefir danesi ve kefir starter kültürünün içerdiği mikroorganizma farklılığından kaynaklandığı değerlendirilmiştir. Nitekim Wszolek vd (2001) tarafından yapılan bir çalışmada substrat olarak farklı tip süt kullanımının, kullanılan sütün karbonhidrat, yağ ve protein içeriğine bağlı olarak kefirin mikroflorasını etkilediği tespit edilmiştir.

Çalışmamızdaki kefir örnekleri maya sayısı bakımından incelendiğinde, depolamanın ilk gününde ticari kefir starter kültürü ve kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde maya sayısının sırasıyla 1.3-3.9 log kob/g ve 5.6-5.9 log kob/g arasında değiştiği tespit edilmiştir. Depolamanın 30. gününde ise aynı örneklerdeki maya sayısının sırasıyla 6.2-6.6 log kob/g ve 6.7-7.0 log kob/g arasında değiştiği saptanmıştır (Çizelge 4.20). Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği'nde kefirin maya sayısının en az  $10^4$  kob/mL düzeyinde olması gerektiği bildirilmektedir (Anonim 2009). Çalışmamızda 30 günlük depolama süresince kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerindeki maya sayım sonuçlarının Tebliğ'de belirtilen değerler ile uyumlu olduğu görülmektedir. Ancak ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinin maya sayılarının depolamanın ilk gününde Tebliğ'de belirtilen değerlerden düşük olduğu, depolamanın 30. gününde ise Tebliğ'de belirtilen değerlerle benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte çalışmamızda farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen maya sayılarının, Ender'in (2009) tespit ettiği değerlerle benzerlik gösterdiği, Irigoyen vd (2005), Yıldız (2009), Ertekin ve Guzel-Seydim (2010), Grønnevik vd (2011) ve Kök-Taş vd (2013) tarafından yapılan çalışmalarda elde edilen değerlerden yüksek, Montanuci vd'nin (2012) elde ettiği değerlerden ise düşük olduğu saptanmıştır.

Ender (2009) üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin kefir örneklerinde belirlenen laktokok, asetik asit bakterisi ve maya sayıları üzerine etkisinin önemli olduğunu, laktobasil ve lökonostok sayıları üzerine ise herhangi bir etkisinin olmadığını belirlemiştir. Wszolek vd (2001) kefir üretiminde kullanılan starter kültür çeşidinin mikrobiyolojik sayımlar üzerine etkisinin önemli olduğunu tespit etmiş olup, bu durumu her bir kültürün farklı bakteri tür ve alt tür kompozisyonlarına sahip olmasına dayandırmışlardır. Bununla birlikte Kesenkaş vd (2011), Montanuci vd (2012) ve Kök-Taş vd (2013) kefir üretiminde kullanılan starter kültür çeşidinin kefirin bakterisi ve maya sayıları üzerine önemli bir etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir. Çalışmamızda ise, üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin kefir örneklerinde belirlenen toplam aerobik mezofilik bakterisi, laktobasil, laktokok, asetik asit bakterisi, lökonostok ve maya sayıları üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

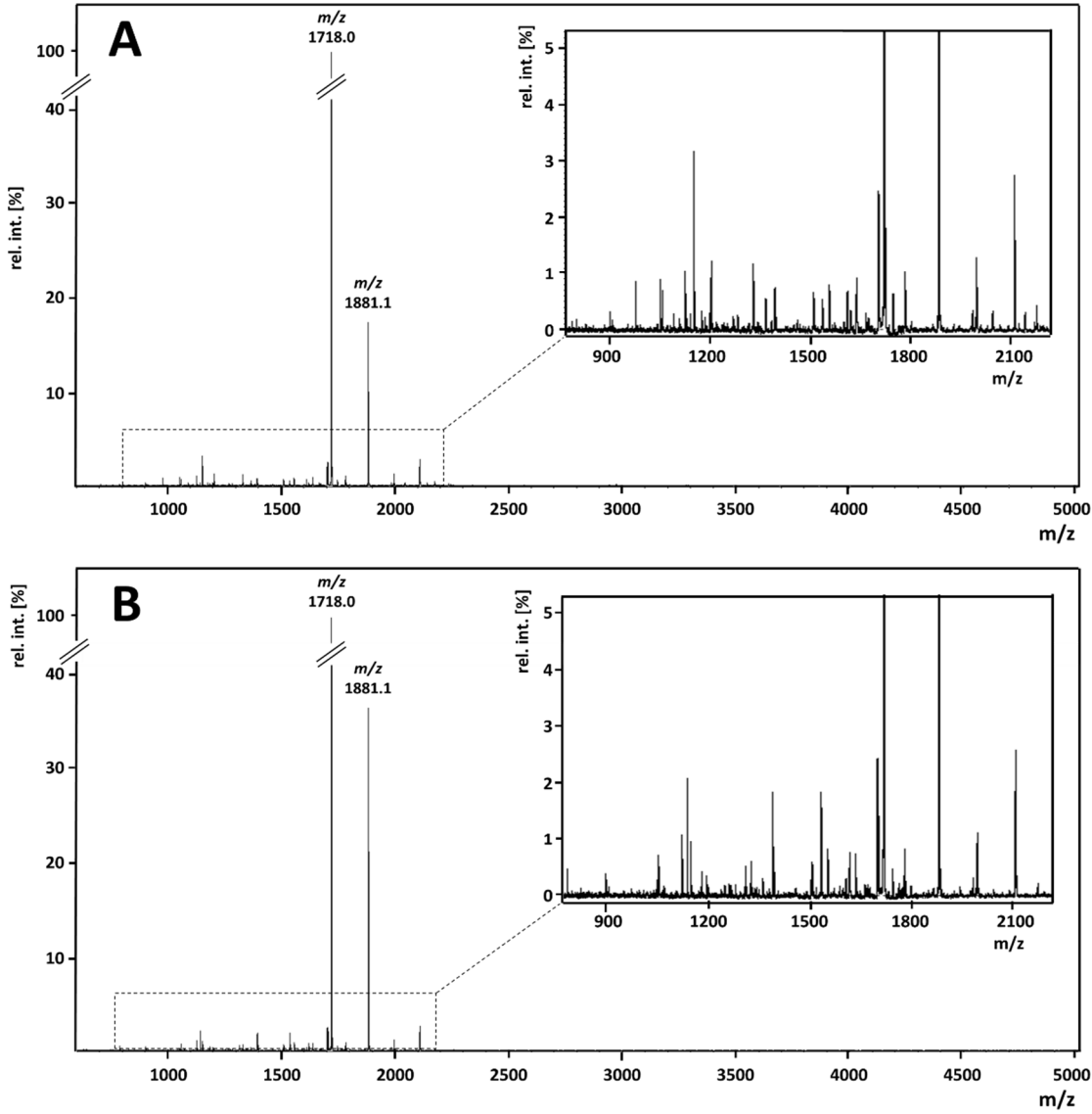
Literatürde kefir örneklerinde depolama süresince laktobasil ve laktokok sayılarının, çalışmamıza benzer şekilde azaldığını gösteren araştırmalar (Irigoyen vd 2005, Ender 2009, Yıldız 2009, Grønnevik vd 2011, Magra vd 2012, Kök-Taş vd 2013) olduğu gibi azaldığını ya da değişmediğini belirten çalışmalar (Ertekin ve Guzel-Seydim 2010, Montanuci vd 2012) da bulunmaktadır. Çalışmamız kefir örneklerinde belirlenen lökonostok sayısının depolama süresince azalması bağlamında Ender (2009), Yıldız (2009) ve Grønnevik vd (2011) tarafından yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte çalışmamızda depolama süresince asetik asit bakterilerinin azaldığı tespit edilmiş olup, elde edilen bu sonucun Ender (2009) tarafından

yapılan çalışmada elde edilen sonuçla uyumlu olduğu belirlenmiştir. Ancak Irigoyen vd (2005) kefir örneklerinde belirlenen asetik asit bakteri sayısının depolama süresince değişmediğini, Montanuci vd (2012) ise değişmediğini ya da arttığını savunmaktadır. Çalışmamızda depolama süresince kefir örneklerinde belirlenen maya sayılarının arttığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda çalışmamız, kefir örneklerinin maya içeriklerinin depolama süresince arttığını belirleyen araştırmacılar tarafından (Guzel-Seydim vd 2005, Ender 2009, Grønnevik vd 2011, Magra vd 2012) desteklenmektedir. Laktik asit bakterilerinin optimum gelişme pH'sının 5.0 ile 9.0 arasında değiştiği ve 4.5'in altındaki pH değerlerinin laktik asit bakteri gelişimini olumsuz yönde etkilediği bildirilmektedir (Montanuci vd 2012). Bununla birlikte Guzel-Seydim vd (2005) tarafından yapılan bir çalışmada depolamanın 14. gününde kefirde pH'nın düşmesi ile birlikte laktik asit bakteri ve laktokok sayılarının azaldığı, depolamanın 14. gününden itibaren ise pH'nın artmaya başladığını tespit edilmiştir. Araştırmacılar depolamanın 14. gününden sonraki pH artışının hücre proteolizi ile ilgili olabileceğini düşünmüşlerdir. Çalışmamızda depolamanın ilk 15 gününde kefir örneklerindeki pH düşüşü ile birlikte bakteri sayısının azalması muhtemeldir.

#### 4.5. Kefirin Peptidomik Profili

Kefir örneklerinde MALDI-TOF kütle spektrometresi ile 600-5000 Da kütle aralığındaki peptidler detaylı bir şekilde analiz edilmiş olup, hem ticari kefir starter kültürü hem de kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine ait tipik MALDI-TOF kütle spektrumları Şekil 4.14'te sunulmuştur. Şekilde verilen MALDI-TOF kütle spektrumları incelendiğinde, peptid sinyallerinin yoğun olarak bulunduğu kütle aralığının 800-2200 Da olduğu görülmektedir. Kefir örneklerine ait MALDI-TOF kütle spektrumlarında en yoğun bulunan sinyal, spektrumların standardizasyonunda kullanılmıştır. MALDI-TOF-MS analizleri sonucunda, ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde 49 peptid sinyali, kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde ise 34 peptid sinyali tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, her iki kefir örneğine ait peptid sinyalleri incelendiğinde, söz konusu sinyallerin yarısından çoğunun her iki kefir örneğinde de bulunduğu ve her iki kefir örneğinin de kütlesi 1718.0 ve 1881.1 Da olan peptidleri yoğun olarak içerdiği belirlenmiştir. Peptidlerin tanımlanmasında MALDI-TOF-MS; peptid fraksiyonasyonu yapılmadan direkt olarak uygulandığında, iyonizasyon işlemi sırasında iyon baskılamasından negatif ayırım meydana gelmektedir. Bu olumsuz duruma rağmen, MALDI-TOF-MS ile yapılan peptid profil analizi baskın peptidler ile ilgili genel bakış açısı kazandırmaktadır.

Kefirde bulunan peptidlerin belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda kefirin çok sayıda peptid içerdiği ve kefirde bulunan peptidlerin çoğunun moleküler ağırlıklarının  $\leq 5000$  Da olduğu bildirilmektedir (Farnworth 2005). Çalışmamızda tespit edilen peptid molekül ağırlığı değerlerinin literatürde belirtilen değerlerle uyumlu olduğu görülmüştür.



Şekil 4.14. a) Ticari kefir starter kültürü b) Kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine ait MALDI-TOF kütle spektrumları

Kefirin peptidomik profilinin belirlenmesi ile ilişkili olarak literatürde sadece kefirin üretimi sırasında oluşan peptidleri inceleyen birkaç çalışmaya rastlamak mümkündür. Yapılan çalışmalarda kefirdeki peptidlerin çoğunun 5000 Da'a eşit veya daha küçük moleküler ağırlığa sahip olduğu bildirilmektedir (Farnworth 2005). Keçi sütüyle yapılmış kefirin ACE inhibitör özelliklerinin incelendiği bir çalışmada ise kefirde RP-HPLC-MS/MS ile 16 peptid tanımlanmıştır (Quiros vd 2005). Ancak söz konusu çalışmalarda kefirin detaylı bir peptidom analizi yapılmamıştır. Bu nedenle araştırmamız proteolitik proseslerin daha iyi anlaşılması ve biyoaktif bileşenlerin keşfi için bir temel olarak kefir üretimi sırasında salınan peptidlerin tümünün analiz edildiği ilk çalışmadır.

Kefir örneklerinde daha fazla peptidin belirlenmesi ve tanımlanması amacıyla nano-ESI kaynağı içeren LTQ Orbitrap XL ETD kütle spektrometresi ile kombine edilmiş nano-UPLC sistemi kullanılmıştır. Nano-UPLC-nano-ESI-MS/MS analizleri sonucunda

elde edilen kütle spektrumlarındaki peptid sinyallerinin tanımlama işlemleri MASCOT yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda elde edilen kütle spektrumları Mascot programı ile aynı parametreler kullanılarak analiz edilmiş olup SwissProt veri tabanında eşleşen peptidler arasından 253 tanesinin anlamlı sonuçlar verdiği ve söz konusu peptidlerin kazein proteinlerinin belli amino asit dizilimlerini temsil ettiği tespit edilmiştir. Tanımlanan 253 peptidin 107'sinin  $\beta$ -kazein, 56'sının  $\alpha_{s1}$ -kazein, 53'ünün  $\kappa$ -kazein ve 37'sinin  $\alpha_{s2}$ -kazein orijinli peptidler olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, söz konusu peptidlerin 62'sinin mono- ve difosforile peptidler olduğu saptanmıştır. Nano-UPLC-nano-ESI-MS/MS ile kütle spektrumlarında elde edilen peptid kütlelerinin, teorik  $\beta$ -kazein,  $\kappa$ -kazein,  $\alpha_{s1}$ -kazein ve  $\alpha_{s2}$ -kazein peptid kütleleriyle eşleşme yüzdesi (coverage) sırasıyla %98, %83, %72 ve %60'dır. Eşleşme yüzdesinin yüksek olması, peptid tanımlamasının daha kesin olduğu ve daha fazla dizilimin deneysel veri ile eşleştiği anlamına gelmektedir.

MALDI-TOF kütle spektrumlarında belirlenen ve yoğunlukları yüksek olan iki sinyalin (1718.0 ve 1881.1 m/z) amino asit dizilimleri ürün iyon spektrumunun yetersiz kalitesinden dolayı MASCOT programı ile analiz edilememiştir. Bu nedenle, yapılan MALDI-TOF analizi sonucunda bu iki sinyali yoğun olarak içerdiği tespit edilen 10 numaralı RP-HPLC fraksiyonu LTQ Orbitrap XL ETD kütle spektrometresi ile direkt infüzyon ölçümüne tabi tutulmuştur. Analiz sonunda, söz konusu sinyallerin  $\beta$ -kazein'in C-terminal bölgesindeki QEPVLGPVRGPFPIIV (f194-209) ve YQEPVLGPVRGPFPIIV (f193-209) amino asit dizilimlerine sahip peptidler olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan direkt infüzyon analizi ile aynı bölgeye ait iki peptid (f192-209 ve f191-209) daha tanımlanmıştır. Kefir örneklerinde direkt infüzyon analizi sonucu elde edilen bu dört peptid de dahil olmak üzere toplam 257 adet peptid tanımlanmıştır. Bu peptidlerin tümü peptid dizilimleri, öncü proteinleri ve pozisyonları ile beraber Çizelge 4.23'de verilmiştir.

Çizelge 4.23. Kefir peptidlerinin profili

No	Gözlemlenen <sup>a</sup> [M + H] <sup>+</sup>	Hesaplanan <sup>b</sup> [M + H] <sup>+</sup>	Prekursör iyon yükü	Prekursör protein	Amino asit	Dizilim <sup>c</sup>	Ticari starter kültür	Kefir danesi	Çiğ süt (B/D) <sup>d</sup>
1	806.40	806.41	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	24-30	FVAPFPE	•		
2	876.46	876.46	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	193-199	KTTMPLW	•	•	
3	905.48	905.48	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	17-23	NENLLRF		•	•/–
4	916.51	916.51	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	33-40	GKEKVNEL	•		
5	920.48	920.48	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	86-93	VPSERYLG		•	
6	940.47	940.47	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	182-190	IPNPIGSEN		•	
7	963.44	963.45	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	56-63	DIKQMEAE	•		
8	970.56	970.57	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	15-22	VLNENLLR	•		•/–
9	991.52	991.52	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	26-34	APFPEVFGK		•	•/–
10	1015.52	1015.52	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	131-139	QKEPMIGVN	•	•	
11	1052.55	1052.55	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	17-24	NENLLRFF	•	•	•/–
12	1055.49	1055.50	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	181-190	DIPNPIGSEN	•	•	
13	1063.57	1063.58	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	32-40	FGKEKVNEL	•	•	
14	1092.48	1092.49	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	55-63	EDIKQMEAE	•	•	
15	1092.54	1092.54	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	191-199	SEKTTMPLW		•	•/–
16	1093.50	1093.50	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	52-60	QAMEDIKQM	•		
17	1100.57	1100.58	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	129-138	AQQKEPMIGV	•		
18	1108.53	1108.53	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	191-199	SEKTTMPLW M6(Oksidasyon)		•	
19	1120.56	1120.57	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	26-35	APFPEVFGKE	•	•	•/•
20	1132.47	1132.48	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	113-121	PNSAEERLH S3(Fosfo)	•		

Devamı arkada

Çizelge 4.23'ün devamı

21	1136.66	1136.67	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	105-114	KVPQLEIVPN	•	•	
22	1139.45	1139.46	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	115-123	SAEERLHSM S1(Fosfo)	•	•	
23	1142.53	1142.53	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	180-190	SDIPNPIGSEN		•	
24	1142.60	1142.61	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	70-79	EIVPNSVEQK	•		
25	1143.58	1143.58	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	131-140	QKEPMIGVNQ	•	•	
26	1162.64	1162.65	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	31-40	VFGKEKVNEL	•	•	
27	1198.57	1198.57	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	85-94	DVPSEYLYG	•	•	
28	1206.58	1206.58	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	190-199	NSEKTTMPLW	•	•	
29	1207.57	1207.57	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	111-120	IVPNSAEERL S5(Fosfo)	•		
30	1208.52	1208.53	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	51-60	DQAMEDIKQM	•	•	
31	1214.62	1214.62	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	129-139	AQQKEPMIGVN	•	•	
32	1219.63	1219.64	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	25-35	VAPFPEVFGKE	•		•/-
33	1222.57	1222.57	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	70-79	EIVPNSVEQK S6(Fosfo)	•		
34	1223.53	1223.53	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	110-119	EIVPNSAEER S6(Fosfo)		•	
35	1230.61	1230.61	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	129-139	AQQKEPMIGVN M7(Oksidasyon)	•	•	
36	1235.62	1235.63	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	83-92	KEDVPSEYLY	•	•	
37	1249.68	1249.68	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	31-41	VFGKEKVNELS	•		
38	1271.57	1271.58	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	181-192	DIPNPIGSENSE	•	•	
39	1272.62	1272.63	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	131-141	QKEPMIGVNQE	•	•	
40	1288.62	1288.62	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	131-141	QKEPMIGVNQE M5(Oksidasyon)	•		
41	1344.63	1344.63	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	111-121	IVPNSAEERLH S5(Fosfo)	•	•	

Devamı arkada



Çizelge 4.23'ün devamı

42	1385.70	1385.71	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	131-142	QKEPMIGVNQEL	•	•	
43	1401.70	1401.70	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	131-142	QKEPMIGVNQEL M5(Oksidasyon)	•	•	
44	1478.61	1478.62	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	36-47	KVNELSKDIGSE S6(Fosfo) S11(Fosfo)	•		
45	1577.60	1577.60	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	41-54	SKDIGSESTEDQAM S8(Fosfo)	•		
46	1619.81	1619.81	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	131-144	QKEPMIGVNQELAY	•		
47	1657.57	1657.57	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	41-54	SKDIGSESTEDQAM S6(Fosfo) S8(Fosfo)	•	•	
48	1673.56	1673.56	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	41-54	SKDIGSESTEDQAM S6(Fosfo) S8(Fosfo) M14(Oksidasyon)	•		
49	1706.64	1706.65	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	41-55	SKDIGSESTEDQAME S8(Fosfo)	•		
50	1786.61	1786.61	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	41-55	SKDIGSESTEDQAME S6(Fosfo) S8(Fosfo)	•		
51	1795.74	1795.74	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	36-50	KVNELSKDIGSESTE S11(Fosfo) S13(Fosfo)	•		
52	1802.61	1802.61	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	41-55	SKDIGSESTEDQAME S6(Fosfo) S8(Fosfo) M14(Oksidasyon)	•		
53	1832.84	1832.84	+2	$\alpha_{s1}$ -kazein	75-89	SVEQKHIQKEDVPSE S1(Fosfo)	•		
54	1877.08	1877.09	+3	$\alpha_{s1}$ -kazein	1-16	RPKHPIKHQGLPQEVN	•		
55	2120.17	2120.17	+3	$\alpha_{s1}$ -kazein	1-18	RPKHPIKHQGLPQEVNNE	•		
56	2234.21	2234.22	+3	$\alpha_{s1}$ -kazein	1-19	RPKHPIKHQGLPQEVNNE	•		•/•
57	932.49	932.49	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	67-74	EEVKITVD	•	•	
58	933.54	933.54	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	175-182	ALPQYLKT	•		
59	973.47	973.48	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	89-95	YQKFPQY	•		

Devamı arkada

Çizelge 4.23'ün devamı

60	975.60	975.60	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	198-205	TKVIPYVR		•	•/-
61	989.55	989.55	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	64-72	VATEEVKIT		•	
62	1020.42	1020.43	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	13-20	SIISQETY S4(Fosfo)	•		
63	1061.49	1061.49	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	14-21	IISQETYK S3(Fosfo)	•	•	
64	1068.55	1068.56	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	13-21	SIISQETYK	•		
65	1076.57	1076.57	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	80-88	KALNEINQF	•		
66	1083.45	1083.45	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	25-33	NMAINPSKE S7(Fosfo)	•		
67	1128.62	1128.62	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	190-198	MKPWIQPKT	•		
68	1148.52	1148.52	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	13-21	SIISQETYK S4(Fosfo)	•	•	
69	1151.46	1151.47	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	141-149	MESTEVFTK S3(Fosfo)	•	•	
70	1167.46	1167.46	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	141-149	MESTEVFTK M1(Oksidasyon) S3(Fosfo)	•	•	
71	1186.71	1186.72	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	194-203	IQPKTKVIPY	•	•	
72	1195.67	1195.67	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	175-184	ALPQYLKTVY	•		
73	1195.67	1195.68	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	114-124	RNAVPIPTLN	•	•	
74	1210.67	1210.68	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	116-126	AVPITPTLNRE	•		
75	1238.43	1238.43	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	125-133	REQLSTSEE S5(Fosfo) S7(Fosfo)	•	•	
76	1251.74	1251.75	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	198-207	TKVIPYVRYL	•		•/•
77	1276.58	1276.58	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	13-22	SIISQETYKQ S4(Fosfo)	•		
78	1277.56	1277.57	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	12-21	ESIISQETYK S5(Fosfo)	•	•	

Devamı arkada

Çizelge 4.23'ün devamı

79	1279.56	1279.56	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	141-150	MESTEVFTKK S3(Fosfo)	•	•	
80	1318.59	1318.59	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	14-23	IISQETYKQE S3(Fosfo)		•	•/–
81	1324.72	1324.72	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	115-126	NAVPITPTLNRE	•	•	
82	1352.47	1352.48	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	124-133	NREQLSTSEE S6(Fosfo) S8(Fosfo)		•	
83	1385.59	1385.59	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	123-133	LNREQLSTSEE S9(Fosfo)	•	•	
84	1405.62	1405.62	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	13-23	SIISQETYKQE S4(Fosfo)	•		
85	1406.60	1406.61	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	11-21	EESIISQETYK S6(Fosfo)		•	
86	1465.56	1465.56	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	123-133	LNREQLSTSEE S7(Fosfo) S9(Fosfo)	•	•	
87	1474.75	1474.75	+3	$\alpha_{s2}$ -kazein	68-79	EVKITVDDKHYQ		•	
88	1533.71	1533.72	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	13-24	SIISQETYKQEK S4(Fosfo)		•	
89	1565.86	1565.86	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	115-128	NAVPITPTLNREQL		•	
90	1580.69	1580.69	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	135-147	SKKTVDMESTEVF S9(Fosfo)	•		
91	1694.73	1694.73	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	134-147	NSKKTVDMESTEVF S10(Fosfo)	•	•	
92	1710.72	1710.73	+2	$\alpha_{s2}$ -kazein	134-147	NSKKTVDMESTEVF M8(Oksidasyon) S10(Fosfo)	•	•	
93	1718.03	1718.04	+3	$\alpha_{s2}$ -kazein	194-207	IQPKTKVIPVRYL	•		
94	802.44	802.45	+2	$\beta$ - kazein	176-182	KAVPYPQ	•	•	
95	803.47	803.48	+2	$\beta$ - kazein	132-138	NLHLPLP	•		
96	820.44	820.44	+2	$\beta$ - kazein	161-168	SVLSLSQS	•	•	
97	830.42	830.42	+2	$\beta$ - kazein	183-189	RDMP IQA		•	
98	867.53	867.53	+2	$\beta$ - kazein	168-175	SKVLPVPQ	•	•	

Devamı arkada

Çizelge 4.23'ün devamı

99	930.57	930.58	+2	$\beta$ - kazein	134-141	HLPLPLLQ		•	
100	948.53	948.54	+2	$\beta$ - kazein	161-169	SVLSLSQSK		•	
101	969.52	969.53	+2	$\beta$ - kazein	6-14	LNVPGEIVE	•		
102	977.48	977.49	+2	$\beta$ - kazein	183-190	RDMPIQAF	•		
103	979.49	979.49	+2	$\beta$ - kazein	120-128	TESQSLTLT	•		
104	991.49	991.49	+2	$\beta$ - kazein	124-132	SLTLTDVEN	•	•	
105	993.48	993.48	+2	$\beta$ - kazein	183-190	RDMPIQAF M3(Oksidasyon)		•	
106	995.58	995.59	+2	$\beta$ - kazein	167-175	QSKVLPVPQ	•	•	
107	997.54	997.55	+2	$\beta$ - kazein	45-52	LQDKIHPF	•		
108	1017.54	1017.54	+2	$\beta$ - kazein	155-163	VMFPPQSVL	•		
109	1017.60	1017.61	+2	$\beta$ - kazein	134-142	HLPLPLLQS	•		
110	1025.56	1025.57	+2	$\beta$ - kazein	83-91	VVPPFLQPE	•		
111	1028.51	1028.52	+2	$\beta$ - kazein	49-57	IHPFAQTQS	•		
112	1043.66	1043.66	+2	$\beta$ - kazein	133-141	LHLPLPLLQ	•		
113	1056.54	1056.55	+2	$\beta$ - kazein	47-55	DKIHPFAQT		•	
114	1079.60	1079.61	+2	$\beta$ - kazein	73-82	NIPPLTQTPV	•	•	
115	1082.62	1082.62	+2	$\beta$ - kazein	166-175	SQSKVLPVPQ	•	•	
116	1088.50	1088.50	+2	$\beta$ - kazein	29-36	KIEKFQSE S7(Fosfo)	•		
117	1089.45	1089.45	+2	$\beta$ - kazein	30-37	IEKFQSEE S6(Fosfo)	•	•	
118	1090.57	1090.57	+2	$\beta$ - kazein	183-191	RDMPIQAFL	•		
119	1094.54	1094.55	+2	$\beta$ - kazein	43-51	DELQDKIHP	•		
120	1100.57	1100.58	+2	$\beta$ - kazein	59-68	VYPFPGPIP	•	•	
121	1118.49	1118.50	+2	$\beta$ - kazein	38-46	QQQTEDELQ	•	•	
122	1119.48	1119.48	+2	$\beta$ - kazein	37-45	EQQQTEDEL	•	•	

Devamı arkada

Çizelge 4.23'ün devamı

123	1119.55	1119.55	+2	$\beta$ - kazein	123-132	QSLTLTDVEN	•	•	
124	1126.58	1126.59	+2	$\beta$ - kazein	44-52	ELQDKIHPF	•	•	
125	1126.62	1126.63	+2	$\beta$ - kazein	173-182	VPQKAVPYPQ	•		•/–
126	1130.69	1130.69	+2	$\beta$ - kazein	133-142	LHLPLPLLQS	•		
127	1135.56	1135.56	+2	$\beta$ - kazein	18-27	SSEESITRIN		•	
128	1151.69	1151.69	+2	$\beta$ - kazein	199-209	GPVRGPFPIIV	•		
129	1155.59	1155.60	+2	$\beta$ - kazein	1-10	RELEELNVPG	•	•	
130	1163.54	1163.54	+2	$\beta$ - kazein	140-148	LQSWMHQPH	•		
131	1178.62	1178.63	+2	$\beta$ - kazein	92-102	VMGVSKVKEAM	•		
132	1184.60	1184.61	+2	$\beta$ - kazein	47-56	DKIHPFAQTQ	•	•	
133	1195.70	1195.70	+2	$\beta$ - kazein	165-175	LSQSKVLPVPQ	•	•	
134	1201.72	1201.73	+3	$\beta$ - kazein	22-31	SITRINKKIE	•		
135	1203.65	1203.66	+2	$\beta$ - kazein	183-192	RDMPIQAFLL	•		
136	1216.60	1216.60	+2	$\beta$ - kazein	28-36	KKIEKFQSE S8(Fosfo)	•		
137	1217.54	1217.55	+2	$\beta$ - kazein	29-37	KIEKFQSEE S7(Fosfo)	•	•	
138	1219.65	1219.65	+2	$\beta$ - kazein	183-192	RDMPIQAFLL M3(Oksidasyon)	•		
139	1241.61	1241.62	+2	$\beta$ - kazein	43-52	DELQDKIHPF	•	•	
140	1244.73	1244.74	+2	$\beta$ - kazein	132-142	NLHLPLPLLQS	•		
141	1247.53	1247.54	+2	$\beta$ - kazein	37-46	EQQTEDELQ	•	•	
142	1271.64	1271.64	+2	$\beta$ - kazein	47-57	DKIHPFAQTQS	•	•	
143	1273.64	1273.64	+3	$\beta$ - kazein	106-115	HKEMPFKYP	•		
144	1276.77	1276.77	+3	$\beta$ - kazein	24-33	TRINKKIEKF	•		
145	1282.63	1282.64	+2	$\beta$ - kazein	144-154	MHQPHQLPPT	•	•	
146	1282.73	1282.74	+2	$\beta$ - kazein	164-175	SLSQSKVLPVPQ	•	•	

Devamı arkada

Çizelge 4.23'ün devamı

147	1284.64	1284.64	+2	$\beta$ - kazein	1-11	RELEELNVPGE	•	•	•/–
148	1300.69	1300.69	+2	$\beta$ - kazein	57-68	SLVYPFPGPIP	•		
149	1301.66	1301.67	+2	$\beta$ - kazein	176-186	KAVPYPQRDMP	•		
150	1312.66	1312.66	+2	$\beta$ - kazein	46-56	QDKIHPFAQTQ		•	
151	1322.63	1322.63	+2	$\beta$ - kazein	120-131	TESQSLTLTDVE	•	•	
152	1325.68	1325.68	+2	$\beta$ - kazein	44-54	ELQDKIHPFAQ	•	•	
153	1345.56	1345.57	+2	$\beta$ - kazein	30-39	IEKFQSEEQQ S6(Fosfo)	•	•	
154	1345.64	1345.64	+2	$\beta$ - kazein	28-37	KKIEKFQSEE S8(Fosfo)	•		
155	1355.51	1355.51	+2	$\beta$ - kazein	15-25	SLSSSEESITR 2 x Fosforilize		•	
156	1362.56	1362.57	+2	$\beta$ - kazein	37-47	EQQTTEDELQD	•		
157	1370.65	1370.66	+2	$\beta$ - kazein	42-52	EDELQDKIHPF	•		
158	1384.72	1384.72	+2	$\beta$ - kazein	47-58	DKIHPFAQTQSL	•	•	
159	1392.76	1392.76	+2	$\beta$ - kazein	194-206	QEPVLGPVRGPPF	•	•	•/–
160	1399.69	1399.70	+2	$\beta$ - kazein	46-57	QDKIHPFAQTQS	•	•	
161	1410.83	1410.83	+2	$\beta$ - kazein	164-176	SLSQSKVLPVPQK	•		•/–
162	1412.61	1412.62	+2	$\beta$ - kazein	8-20	VPGEIVESLSSSE S11(Fosfo)	•		
163	1426.73	1426.73	+2	$\beta$ - kazein	44-55	ELQDKIHPFAQT	•	•	
164	1436.67	1436.68	+2	$\beta$ - kazein	120-132	TESQSLTLTDVEN	•	•	
165	1448.52	1448.52	+2	$\beta$ - kazein	33-43	FQSEEQQTED S3(Fosfo)		•	
166	1461.59	1461.59	+2	$\beta$ - kazein	32-42	KFQSEEQQTE S4(Fosfo)	•	•	
167	1468.71	1468.72	+2	$\beta$ - kazein	143-154	WMHQHPQLPPT	•		

Devamı arkada

Çizelge 4.23'ün devamı

168	1473.62	1473.63	+2	$\beta$ - kazein	30-40	IEKFAQSEEQQ S6(Fosfo)	•		
169	1473.66	1473.66	+2	$\beta$ - kazein	29-39	KIEKFAQSEEQQ S7(Fosfo)	•		
170	1476.89	1476.89	+2	$\beta$ - kazein	22-33	SITRINKKIEKF	•		
171	1543.58	1543.58	+2	$\beta$ - kazein	35-46	SEEQQQTEDELQ S1(Fosfo)		•	
172	1554.79	1554.79	+2	$\beta$ - kazein	44-56	ELQDKIHPFAQTQ	•	•	
173	1555.74	1555.75	+2	$\beta$ - kazein	142-154	SWMHQPHQPLPPT	•		
174	1555.82	1555.83	+2	$\beta$ - kazein	193-206	YQEPVLGPVRGPF	•		•/–
175	1563.92	1563.93	+2	$\beta$ - kazein	169-182	KVLPVPQKAVPYPQ	•		
176	1574.67	1574.67	+2	$\beta$ - kazein	30-41	IEKFAQSEEQQT S6(Fosfo)	•		
177	1576.61	1576.62	+2	$\beta$ - kazein	32-43	KFAQSEEQQTED S4(Fosfo)		•	
178	1601.72	1601.72	+2	$\beta$ - kazein	29-40	KIEKFAQSEEQQ S7(Fosfo)	•		
179	1625.83	1625.84	+2	$\beta$ - kazein	1-14	RELEELNVPGEIVE	•		
180	1641.82	1641.82	+2	$\beta$ - kazein	44-57	ELQDKIHPFAQTQS	•	•	
181	1650.95	1650.96	+2	$\beta$ - kazein	168-182	SKVLPVPQKAVPYPQ	•		
182	1669.81	1669.82	+2	$\beta$ - kazein	43-56	DELQDKIHPFAQTQ	•		
183	1702.77	1702.77	+2	$\beta$ - kazein	29-41	KIEKFAQSEEQQT S7(Fosfo)	•		
184	1703.71	1703.72	+2	$\beta$ - kazein	30-42	IEKFAQSEEQQTE S6(Fosfo)	•		
185	1708.81	1708.81	+3	$\beta$ - kazein	38-51	QQQTEDELQDKIHP	•	•	
186	1718.00	1718.00	+2	$\beta$ - kazein	194-209	QEPVLGPVRGPFPIIV	•	•	•/–
187	1728.86	1728.87	+3	$\beta$ - kazein	25-37	RINKKIEKFAQSEE S11(Fosfo)	•		
188	1745.87	1745.87	+2	$\beta$ - kazein	106-119	HKEMFPKYPVEPF	•		

Devamı arkada

Çizelge 4.23'ün devamı

189	1818.74	1818.74	+2	$\beta$ - kazein	30-43	IEKFQSEEQQTED S6(Fosfo)	•	•	
190	1831.81	1831.81	+2	$\beta$ - kazein	29-42	KIEKFQSEEQQTE S7(Fosfo)	•		
191	1866.04	1866.05	+3	$\beta$ - kazein	166-182	SQSKVLPVPQKAVPYPQ	•		
192	1881.06	1881.06	+2	$\beta$ - kazein	193-209	YQEPVLGPVRGPFPIIV	•	•	•/–
193	1946.84	1946.84	+2	$\beta$ - kazein	29-43	KIEKFQSEEQQTED S7(Fosfo)	•	•	
194	1975.95	1975.96	+3	$\beta$ - kazein	106-121	HKEMPFKYPVEPFTE	•		
195	1981.97	1981.98	+3	$\beta$ - kazein	144-160	MHQPHQPLPPTVMFPPQ	•		
196	1994.15	1994.15	+2	$\beta$ - kazein	192-209	LYQEPVLGPVRGPFPIIV	•	•	•/–
197	2042.05	2042.06	+3	$\beta$ - kazein	103-119	APKHKEMPFKYPVEPF	•		
198	2062.99	2062.99	+3	$\beta$ - kazein	106-122	HKEMPFKYPVEPFTE	•		
199	2066.16	2066.16	+2	$\beta$ - kazein	164-182	SLSQSKVLPVPQKAVPYPQ	•		
200	2107.24	2107.23	+2	$\beta$ - kazein	191-209	LLYQEPVLGPVRGPFPIIV	•	•	•/–
201	2173.09	2173.10	+3	$\beta$ - kazein	102-119	MAPKHKEMPFKYPVEPF	•		
202	2191.05	2191.05	+3	$\beta$ - kazein	106-123	HKEMPFKYPVEPFTE	•		
203	2286.14	2286.15	+3	$\beta$ - kazein	22-39	SITRINKKIEKFQSEEQ S14(Fosfo)	•		
204	2359.17	2359.18	+3	$\beta$ - kazein	103-122	APKHKEMPFKYPVEPFTE	•		
205	815.44	815.44	+2	$\kappa$ -kazein	72-77	QILQWQ	•		
206	898.45	898.45	+2	$\kappa$ -kazein	153-160	IESPPEIN	•	•	
207	905.49	905.49	+2	$\kappa$ -kazein	161-169	TVQVTSTAV	•	•	–/•
208	915.51	915.51	+2	$\kappa$ -kazein	116-123	KTEIPTIN	•		
209	924.51	924.52	+2	$\kappa$ -kazein	24-30	KYIPIQY	•		
210	946.53	946.54	+2	$\kappa$ -kazein	43-50	YQQKPVAl	•	•	
211	954.57	954.57	+2	$\kappa$ -kazein	66-74	AVRSPAQIL	•		

Devamı arkada



Çizelge 4.23'ün devamı

212	984.50	984.50	+2	κ-kazein	155-163	SPPEINTVQ	•		
213	984.51	984.51	+2	κ-kazein	31-38	VLSRYPY	•		
214	996.58	996.58	+2	κ-kazein	45-53	QKPVALINN	•	•	
215	997.52	997.52	+2	κ-kazein	152-160	VIESPPEIN	•	•	
216	1002.51	1002.51	+2	κ-kazein	122-131	INTIASGEPT	•		
217	1010.60	1010.60	+2	κ-kazein	44-52	QQKPVALIN	•	•	
218	1027.59	1027.59	+2	κ-kazein	72-79	QILQWQVL	•		
219	1030.54	1030.54	+2	κ-kazein	115-123	DKTEIPTIN	•		
220	1039.52	1039.52	+2	κ-kazein	41-48	NYYQQKPV	•		
221	1040.42	1040.42	+2	κ-kazein	143-151	VATLEDSPE S7(Fosfo)	•	•	
222	1041.53	1041.54	+2	κ-kazein	31-39	VLSRYPYSG	•		
223	1058.57	1058.57	+2	κ-kazein	118-127	EIPTINTIAS	•		
224	1082.63	1082.63	+2	κ-kazein	66-75	AVRSPAQLQ	•	•	
225	1098.56	1098.57	+2	κ-kazein	152-161	VIESPPEINT	•	•	
226	1108.64	1108.64	+2	κ-kazein	22-30	IAKYIPIQY	•		
227	1109.59	1109.60	+2	κ-kazein	42-50	YYQQKPVAL	•	•	
228	1122.51	1122.52	+2	κ-kazein	132-142	STPTTEAVEST	•		
229	1124.64	1124.64	+2	κ-kazein	45-54	QKPVALINNQ	•		
230	1124.64	1124.64	+2	κ-kazein	44-53	QQKPVALINN	•		
231	1130.63	1130.63	+2	κ-kazein	61-71	YAKPAAVRSPA	•		
232	1136.67	1136.67	+2	κ-kazein	24-32	KYIPIQYVL	•		
233	1141.46	1141.46	+2	κ-kazein	142-151	TVATLEDSPE S8(Fosfo)	•	•	
234	1158.60	1158.60	+2	κ-kazein	114-123	QDKTEIPTIN	•		
235	1172.52	1172.52	+2	κ-kazein	12-20	EKDERFFSD	•		
236	1173.66	1173.66	+2	κ-kazein	43-52	YQQKPVALIN	•	•	

Devamı arkada

Çizelge 4.23'ün devamı

237	1182.61	1182.62	+2	κ-kazein	56-65	LPYPYAKPA	•	•	
238	1228.49	1228.50	+2	κ-kazein	141-151	STVATLEDSPE S9(Fosfo)	•	•	
239	1236.73	1236.74	+2	κ-kazein	21-30	KIAKYIPIQY	•		
240	1252.70	1252.70	+2	κ-kazein	44-54	QQKPVALINNQ	•		
241	1268.71	1268.71	+2	κ-kazein	66-76	AVRSPAQILQW	•		
242	1287.70	1287.71	+2	κ-kazein	43-53	YQQKPVALINN	•	•	
243	1290.60	1290.61	+2	κ-kazein	125-137	IASGEPTSTPTTE	•		
244	1318.60	1318.60	+2	κ-kazein	128-140	GEPTSTPTTEAVE	•		
245	1325.69	1325.69	+2	κ-kazein	152-163	VIESPPEINTVQ	•		
246	1329.66	1329.66	+2	κ-kazein	96-106	ARHPHPLSFM	•		
247	1336.72	1336.73	+2	κ-kazein	42-52	YYQQKPVALIN	•	•	
248	1391.65	1391.65	+2	κ-kazein	124-137	TIASGEPTSTPTTE	•		
249	1396.76	1396.77	+2	κ-kazein	66-77	AVRSPAQILQWQ	•		
250	1448.88	1448.89	+2	κ-kazein	21-32	KIAKYIPIQYVL	•		
251	1450.76	1450.77	+2	κ-kazein	42-53	YYQQKPVALINN	•	•	
252	1457.74	1457.75	+2	κ-kazein	54-65	QFLPYPYAKPA	•	•	
253	1527.64	1527.65	+2	κ-kazein	138-151	AVESTVATLEDSPE S12(Fosfo)	•		
254	1535.92	1535.92	+2	κ-kazein	21-33	KIAKYIPIQYVLS	•		
255	1564.81	1564.81	+2	κ-kazein	41-53	NYYQQKPVALINN	•		
256	1578.82	1578.83	+2	κ-kazein	42-54	YYQQKPVALINNQ	•		
257	2663.42	2663.43	+3	κ-kazein	107-131	AIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPT	•		

<sup>a, b</sup> Gözlemlenen ve hesaplanan peptid kütleleri Da olarak verilmiştir.

<sup>c</sup> Peptid dizilimleri tek harf sistemi kullanılarak gösterilmiştir.

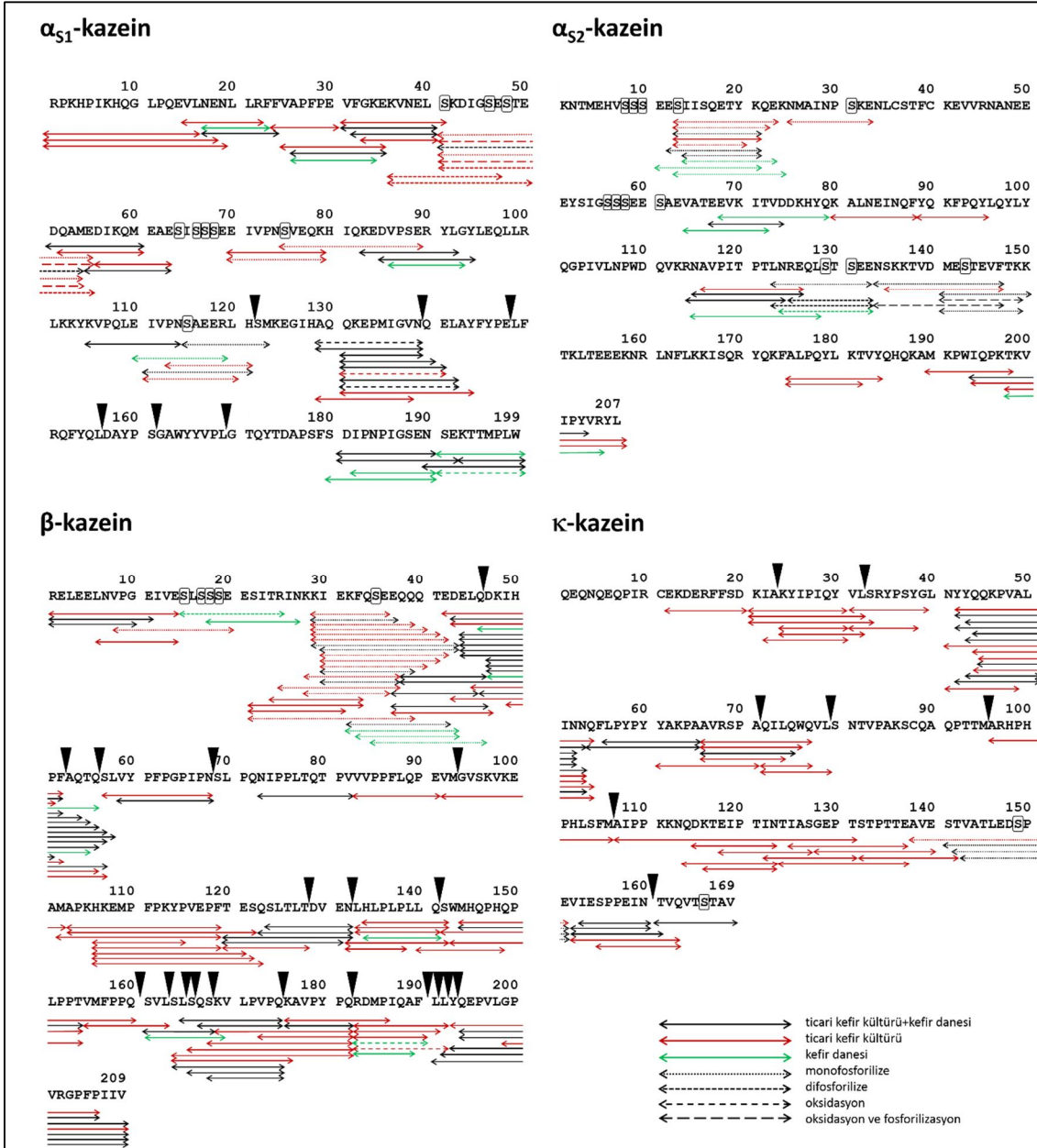
<sup>d</sup> B: Baum vd (2013a), D: Dallas vd (2014) tarafından yapılan çalışmada tanımlanan peptidler

Şekil 4.15'te ticari kefir starter kültürü ve kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde tanımlanan peptidlerin öncü protein ( $\beta$ -kazein,  $\kappa$ -kazein,  $\alpha_{s1}$ -kazein ve  $\alpha_{s2}$ -kazein) dizilimleri içerisindeki pozisyonları gösterilmiştir. Şekildeki oklar kefir örneklerinde belirlenen serbest haldeki peptidleri, işaretlenen serin kalıntıları ise muhtemel fosforilasyon bölgelerini belirtmektedir. Şekilden de anlaşılacağı üzere peptidler protein dizilimleri içinde homojen bir dağılım göstermemekte ve her bir protein dizilimi içinde proteinin diğer kısımlarına nazaran daha yüksek oranda peptidin serbest hale geçtiği bölgeler bulunmaktadır. Ayrıca her bir protein içinde bazı bölünme noktaları diğerlerine kıyasla daha çok tercih edilmiştir.  $\beta$ -kazein proteininde özellikle K<sub>28</sub>-K<sub>29</sub>, K<sub>29</sub>-I<sub>30</sub>, Q<sub>175</sub>-K<sub>176</sub> ve Q<sub>182</sub>-R<sub>183</sub> amino asitleri arasındaki peptid bağlarının kefir mikroflorası tarafından degradasyona eğilimli bölgeler olduğu tespit edilmiştir.  $\alpha_{s1}$ -kazeininde ise L<sub>40</sub>-S<sub>41</sub> ve Q<sub>130</sub>-Q<sub>131</sub> amino asitleri arasındaki peptid bağlarının yüksek hassasiyete sahip bölgeler olduğu belirlenmiştir. N<sub>53</sub>-Q<sub>54</sub>, A<sub>65</sub>-A<sub>66</sub> ve E<sub>151</sub>-V<sub>152</sub> amino asitleri arasındaki peptid bağlarının  $\kappa$ -kazein, E<sub>12</sub>-S<sub>13</sub>, K<sub>21</sub>-Q<sub>22</sub> ve E<sub>133</sub>-N<sub>134</sub> amino asitleri arasındaki peptid bağlarının ise  $\alpha_{s2}$ -kazein için kefir mikroflorası tarafından tercih edilen bölünme yerleri olduğu saptanmıştır. Kefir peptidleri için gözlemlenen bölünme kısımları ile laktokokal proteinazların parçaladığı bölünme noktaları (Şekil 4.15'teki siyah üçgen sembolü ile gösterilen kısımlar) karşılaştırıldığında, kefir peptidleri için gözlemlenen bölünme kısımlarının yaklaşık %17'sinin laktokokal enzimlerin etki ettiği bölgeler ile uyum gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla beraber, söz konusu kefir peptidlerinin bu enzimin etkisi ile, diğer kefir peptidlerinin ise kefirde bulunan ve kazeinin degradasyonunda rol oynayan diğer mikroorganizmaların proteinazları etkisi ile serbest hale geçtiğinin muhtemel olduğu değerlendirilmiştir. Ancak proteolitik enzimlerin spesifikliği hakkındaki veri, bu durumda yetersiz kalmaktadır.

Toplam süt proteomunun yaklaşık %80'ini oluşturan kazeinin  $\alpha_{s1}$ -kazein (yaklaşık %34),  $\beta$ -kazein (yaklaşık %25),  $\kappa$ -kazein (yaklaşık %9) ve  $\alpha_{s2}$ -kazein (yaklaşık %8) olmak üzere başlıca dört fraksiyonu bulunmaktadır. Minör kazeinler olarak bilinen diğer kazein fraksiyonları, çeşitli kimyasal tepkimeler veya proteoliz sonucu meydana gelmektedir. Süt proteinlerinin yaklaşık %20'sini oluşturan peyniraltı suyu proteinleri ise  $\beta$ -laktoglobulin (yaklaşık %9) ve  $\alpha$ -laktalbumin (yaklaşık %4) olmak üzere 2 fraksiyondan oluşmaktadır (Metin 2005, Belitz vd 2009). Mikrobiyolojik protein degradasyonu bütün süt proteinlerinde aynı derecede gerçekleşmiş olsaydı, fraksiyonlar arasında eşit bir dağılım olması beklenirdi. Ancak böyle bir şeyin gerçekleşmesi olası değildir. Özellikle  $\beta$ -kazein kefir mikroflorası tarafından degrade edilmeye daha yatkındır. Araştırmamızda kefir örneklerinde peyniraltı suyu proteinleri orijinli hiçbir peptid tanımlanamamıştır. Bu durum söz konusu proteinlerin sahip oldukları globüler yapılarından dolayı proteazlara karşı daha dirençli olabileceği şeklinde açıklanabilmektedir. Buna karşın, kazeinler kısmen yüksek prolin içeriğinden kaynaklanan elastikiyetleri nedeniyle mikroorganizmalar için daha kabul edilebilirdir (Swaisgood 1982).

Süt proteinlerinin büyük bir kısmını oluşturan kazeinler fosfoproteinlerdir.  $\alpha_{s1}$ -kazeinin büyük varyantı, sekizden dokuza fosforilasyon bölgesine sahiptir.  $\alpha_{s2}$ -kazein dizisi 11 fosfat grubu taşımaktadır. Fosfoserin kalıntısı sayısı açısından farklılık gösteren bazı alt gruplar oluşsa da,  $\beta$ -kazein genellikle beş serin bağlı fosfat barındırırken,  $\kappa$ -kazein sadece monofosforiledir (Belitz vd 2009). Araştırmamızda, 62 adet fosfopeptid tanımlanmıştır. Söz konusu peptidlerin 52'sinin monofosforile peptidler olduğu ve

10'unun iki fosfat grubu içerdiği ortaya konulmuştur. Tüm fosforilizasyon bölgelerinin UniProt veri tabanında (<http://www.uniprot.org>) tanımlanan fosforilizasyon bölgeleri ile uyum içinde olduğu belirlenmiştir. Kefir örneklerinde tanımlanan multifosforile peptidlerin olması gereken miktardan daha az olması negatif yüklü fosfat gruplarından dolayı pozitif modda gerçekleşen daha düşük iyonizasyon etkinliği ile açıklanabilmektedir (Choi vd 2008). Bu durumun örneklerde bulunan multifosforile peptidlerin belirlenmesini zorlaştırdığı ve dolayısıyla tanımlamanın başarılı bir şekilde yapılmasını engellediği düşünülmektedir. UPLC öncesinde uygulanacak fosfopeptid zenginleştirme işleminin sorunun çözümünde alternatif bir yaklaşım olabileceği değerlendirilmiştir. Fosfopeptidler için seçici kütle spektrometrik yöntemlerin uygulanması sonucunda çiğ sütte 11 (multi-) fosforile peptidin tanımlandığı, geleneksel metodların kullanılması ile ise söz konusu 11 fosforile peptidden sadece birinin tanımlanabildiği tespit edilmiştir (Baum vd 2013b).



Şekil 4.15. Tek harf kod sisteminde α<sub>1</sub>-kazein, α<sub>2</sub>-kazein, β-kazein ve κ-kazein öncü proteinlerine ait amino asit dizilimleri (▼: laktokokal proteinazların parçaladığı bölünme noktaları)

Araştırmada, kefir örneklerinde multifosforile peptidler de dahil olmak üzere toplamda 257 peptid tanımlanmıştır. Kefir örneğinin içerdiği peptid sayısının kesinlikle 257'den daha fazla, kefir peptidomunun ise gerçekte daha kompleks bir yapıya sahip olduğu düşünülmektedir. Fakat buna rağmen, araştırmamızda kullanılan yöntemlerin kefirde temel olarak ya da yoğun olarak bulunan peptidlerin tanımlanmasında başarılı olabileceği görülmüştür. Kefir örneklerinde bulunan diğer protein fragmentlerinin ise iyonizasyon kapasitesi düşüklüğü ya da ürün iyon spektrum kalitesi yetersizliğinden dolayı tanımlanamadığı değerlendirilmiştir. Ancak çalışmada kullanılan metodlar

(MALDI-TOF-MS ve Nano-UPLC-nano-ESI-MS/MS) kefirde yoğun olarak bulunan peptidlerin tanımlanmasında başarılı olmuştur.

Baum vd (2013a) çiğ sütte tanımladıkları endojen peptidlerin 129'unun  $\alpha_{s1}$ -kazein, 63'ünün  $\beta$ -kazein, 54'ünün  $\alpha_{s2}$ -kazein orijinli peptidler, birinin ise  $\kappa$ -kazein orijinli bir peptid olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca söz konusu çalışmada  $\beta$ -laktoglobulin orijinli bir peptid tanımlanmıştır. Dallas vd (2014) tarafından yapılan çalışmada endojen peptidlerin altı farklı çiğ süt örneğinde de benzer şekilde dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Söz konusu peptidlerin çoğunun  $\alpha_{s1}$ -kazein (%40) orijinli peptidler olduğu, bunu  $\beta$ -kazein,  $\alpha_{s2}$ -kazein orijinli peptidlerin ve diğer süt proteinleri orijinli bazı peptidlerin takip ettiği belirlenmiştir. Kefir örneklerinde tanımlanan peptid sayısının (257) Baum vd (2013a) ve Dallas vd (2014) tarafından çiğ sütte tanımlanan peptid sayılarından fazla olması çiğ sütte tanımlanamayıp sadece kefirde tanımlanan peptidlerin sütün fermantasyonu sırasında oluştuğunu göstermektedir (Çizelge 4.23). Kefir peptidlerinin oluşumunda fermantasyonun yanı sıra ısıl işleminde etkili olduğu düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, söz konusu proseslerin peptid profili üzerinde etkili olduğu, önemli kısmını  $\alpha_{s1}$ -kazein orijinli peptidlerin oluşturduğu çiğ süt peptid profilinin ısıl işlem ve fermantasyon sonrasında çoğunluğunu  $\beta$ - ve  $\kappa$ -kazein fragmentlerinin oluşturduğu kefir profiline dönüştüğü tespit edilmiştir.  $\alpha_{s1}$ -,  $\beta$ - ve  $\kappa$ -kazeinlerin degradasyon motiflerine dayanarak laktokoklar için  $P_I$  ve  $P_{III}$  olmak üzere iki temel proteinaz spesiflik sınıfı olduğu bildirilmektedir.  $P_I$  tip enzimlerin temel substratını  $\beta$ - ve  $\kappa$ -kazeinler oluştururken,  $P_{III}$  tip enzimler  $\beta$ - ve  $\kappa$ -kazeinlerinin yanı sıra  $\alpha_{s1}$ -kazeinleri de degrade edebilmektedir (Kunji vd 1996).  $\beta$ - ve  $\kappa$ -kazeinlerin bu iki sınıf enzim tarafından substrat olarak kullanılması laktik asit bakterilerinin gerçekleştirdiği fermantasyon sırasında özellikle  $\beta$ - ve  $\kappa$ -kazein orijinli peptidlerin açığa çıkması durumunu açıklayabilmektedir.

#### 4.5.1. Kefir peptidlerinin biyoaktif potansiyeli

Çalışma sonunda, oluşturulan kefir peptid veritabanında (Bkz. Çizelge 4.23) yer alan biyoaktif dizilimlerin tanımlanması amacıyla detaylı literatür taraması yapılmıştır. Kefir örneklerinde tanımlanan biyoaktif peptidlerin tümü kütleleri, öncü proteinleri, öncü proteinlerindeki pozisyonları ve biyolojik fonksiyonları ile birlikte Çizelge 4.24'te sunulmuştur.

Çizelge 4.24. Kefir örneklerinde tanımlanan biyoaktif peptidler

[M + H] <sup>+</sup> (Da)	Amino asit dizilimi	Protein	Pozisyon	Biyoaktivite	Literatür
802.44	KAVPYPQ	β-kazein	176-182		Yamamoto vd (1994)
803.47	NLHLPLP	β-kazein	132-138		Kohmura vd (1989)
969.52	LNVPGEIVE	β-kazein	6-14		Gobetti vd (2000)
977.48	RDMPIQAF	β-kazein	183-190		Yamamoto vd (1994)
1079.60	NIPPLTQTPV	β-kazein	73-82		Gobetti vd (2000)
1082.61	SQSKVLPVPQ	β-kazein	166-175	ACE-inhibitörü	Hayes vd (2007)
1100.57	VYFPFGPIPN	β-kazein	59-68		Eisele vd (2013)
1745.87	HKEMPFKYPVEPF	β-kazein	106-119		Yamamoto vd (1994)
1881.06	YQEPVLGPVRGPFPIIV	β-kazein	193-209		Yamamoto vd (1994)
2107.24	LLYQEPVLGPVRGPFPIIV	β-kazein	191-209		Rojas-Ronquillo vd (2012) Yamamoto vd (1994)
867.53	SKVLPVPQ	β-kazein	168-175	ACE-inhibitorü	Yamamoto vd (1994)
973.47	YQKFPQY	α <sub>s2</sub> -kazein	89-95	Antihipertansif	Contreras vd (2009)
970.56	VLNENLLR	α <sub>s1</sub> -kazein	15-22		Hayes vd (2006)
1881.06	YQEPVLGPVRGPFPIIV	β-kazein	193-209	Antimikrobiyal	Birkemo vd (2009)
1100.57	VYFPFGPIPN	β-kazein	59-68		Eisele vd (2013)
1329.66	ARHHPHLSFM	κ-kazein	96-106	Antioksidatif	Kudoh vd (2001)
1881.06	YQEPVLGPVRGPFPIIV	β-kazein	193-209		Eisele vd (2013)
1881.06	YQEPVLGPVRGPFPIIV	β-kazein	193-209	Antitrombotik	Rojas-Ronquillo vd (2012)
1994.15	LYQEPVLGPVRGPFPIIV	β-kazein	192-209		Coste vd (1992)
1881.06	YQEPVLGPVRGPFPIIV	β-kazein	193-209	İmmün düzenleyici	Coste vd (1992) Sandré vd (2001)
1702.77	KIEKFQsEEQQQT	β-kazein	29-41	Mineral bağlayıcı	Caroli vd (2010)
1100.57	VYFPFGPIPN	β-kazein	59-68	Opioid	Jinsmaa ve Yoshikawa (1999)

Süt proteinleri kaynaklı peptidlerin büyük bir kısmını anjiyotensin I'in damar daraltıcı anjiyotensin II'ye dönüşümünü inhibe ederek ve damarların genişlemesini sağlayan bradikini inaktif fragmentlerine degrade ederek kan basıncını düzenleyen ACE inhibitörlerinin oluşturduğu bildirilmektedir (Hayes vd 2007). Söz konusu peptidler ACE'yi inaktive ederek antihipertansif etki göstermektedir (Kınık ve Gürsoy 2002). Mevcut çalışmada tanımlanan kefir peptidleri arasında yer alan KAVPYYPQ ( $\beta$ -kazein<sub>176-182</sub>) (Yamamoto vd 1994), NLHLPLP ( $\beta$ -kazein<sub>132-138</sub>) (Kohmura vd 1989), SKVLPVPQ ( $\beta$ -kazein<sub>168-175</sub>) (Yamamoto vd 1994), LNVPGEIVE ( $\beta$ -kazein<sub>6-14</sub>) (Gobbetti vd 2000), YQKFPQY ( $\alpha_{S2}$ -kazein<sub>89-95</sub>) (Contreras vd 2009), RDMPIQAF ( $\beta$ -kazein<sub>183-190</sub>) (Yamamoto vd 1994), NIPPLTQTPV ( $\beta$ -kazein<sub>73-82</sub>) (Gobbetti vd 2000), SQSKVLPVPQ ( $\beta$ -kazein<sub>166-175</sub>) (Hayes vd 2007), VYFPFGPIPN ( $\beta$ -kazein<sub>59-68</sub>) (Eisele vd 2013), HKEMPFKYPVEPF ( $\beta$ -kazein<sub>106-119</sub>) (Yamamoto vd 1994), YQEPVLGPVRGPFPIIV ( $\beta$ -kazein<sub>193-209</sub>) (Yamamoto vd 1994) ve LYQEPVLGPVRGPFPIIV ( $\beta$ -kazein<sub>191-209</sub>) (Yamamoto vd 1994) peptid dizilimlerinin ACE inhibitörü oldukları farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, ACE inhibitörü olarak tanımlanan SKVLPVPQ ve YQKFPQY peptid dizilimlerinin hipertansif fareler üzerinde antihipertansif etki gösterdikleri belirtilmektedir (Contreras vd 2009).

Antimikrobiyal peptidler, kefirde bulunan diğer bir biyoaktif peptid grubunu oluşturmaktadır. Çalışma sonunda, kefir örneklerinde tanımlanan VLNENLLR ( $\alpha_{S1}$ -kazein<sub>15-22</sub>) ve YQEPVLGPVRGPFPIIV ( $\beta$ -kazein<sub>193-209</sub>) peptidlerinin amino asit dizilimlerinin literatürde kazeisin B ve kazeisidin 17 olarak bilinen antimikrobiyal peptidlerin amino asit dizilimleri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalarda kazeisin B'nin 0.22 mM minimum inhibisyon konsantrasyonunda *E. coli* DPC6053 suşunun gelişimini, kazeisidin 17'nin ise 0.4 mg/mL ve 0.5 mg/mL minimum inhibisyon konsantrasyonlarında sırasıyla *E. coli* DPC6053 ve *E. coli* DH5 $\alpha$  şuşlarının gelişimini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Hayes vd 2006, Birkemo vd 2009).

İmmün düzenleyici peptidlerin etki mekanizmaları hakkında literatürde çok fazla bilgiye rastlanılmamakla birlikte söz konusu peptidlerin ACE inhibisyonu ile yakın bir ilişkisinin olduğu söylenilmektedir. Bu konudaki görüş ise ACE inhibisyonunun immün sistemi uyarıcı bradikinin peptidinin inaktivasyonunu inhibe ettiği şeklindedir (Clare ve Swaisgood 2000). Çalışma sonunda tanımlanan YQEPVLGPVRGPFPIIV ( $\beta$ -kazein<sub>193-209</sub>) (Coste vd 1992, Sandré vd 2001) ve LYQEPVLGPVRGPFPIIV ( $\beta$ -kazein<sub>192-209</sub>) (Coste vd 1992) peptidlerinin immün düzenleyici etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. YQEPVLGPVRGPFPIIV ( $\beta$ -kazein<sub>193-209</sub>) protein fragmentinin ACE inhibitörü olmasının yanı sıra immün düzenleyici etkiye de sahip olması immün düzenleyici peptidlerin ACE inhibisyonu ile ilişkisi olduğu görüşünü desteklemektedir.

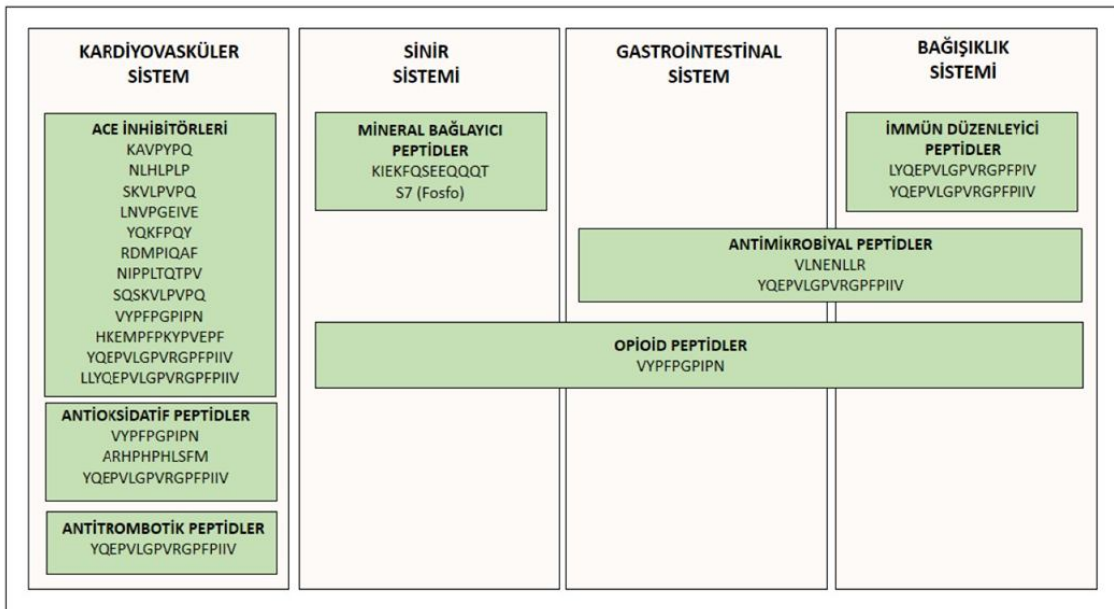
Süt proteinleri tarafından sağlanan önemli biyoaktif etkilerden biri de opioid peptidler ve antagonistlerinin muhtemel aktiviteleridir. Opioid peptidler, sinir sisteminde ve intestinal sistemde bulunan opioid reseptörlere bağlanabilen 5-10 amino asit içeren kısa peptidlerdir. Süt proteinlerinden elde edilen opioid peptidler hem agonist hem de antagonist etki gösterebilmektedir (Kınık ve Gürsoy 2002, Fitzgerald ve Meisel 2003). Çalışma sonunda oluşturulan kefir peptid profilindeki  $\beta$ -kazein orijinli VYFPFGPIPN (f59-68) (Jinsmaa ve Yoshikawa 1999) peptidinin opioid etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.



Süt proteinleri kaynaklı biyoaktif peptidlerden kazeinofosfopeptidlerin fosforlanmış serin gruplarından dolayı mineral bağlama özelliğine sahip olduğu bildirilmektedir (Hartmann ve Meisel 2007). Kefir örneklerinde tanımlanan peptidlerden KIEKFQSEEQQT ( $\beta$ -kazein<sub>29-41</sub>, 7. serinde fosfat) peptidinin kalsiyum bağlama özelliğine sahip olduğu belirlenmiştir (Caroli vd 2010). Kefir örneklerinde tanımlanan fosfopeptidlerin de mineral bağlama özelliğine sahip olabileceği düşünülmektedir.

Çalışma sonunda kefir örneklerinde tanımlanan diğer biyoaktif peptidler ise antioksidatif özelliğe sahip VYPPFGPIP ( $\beta$ -kazein<sub>59-68</sub>) (Eisele vd 2013), ARHPHLSFM ( $\kappa$ -kazein<sub>96-106</sub>) (Kudoh vd 2001) ve YQEPVLGPVRGPFPIIV ( $\beta$ -kazein<sub>193-209</sub>) (Eisele vd 2013) peptidleri ile antitrombotik etki gösteren YQEPVLGPVRGPFPIIV ( $\beta$ -kazein<sub>193-209</sub>) peptididir (Rojas-Ronquillo vd 2012).

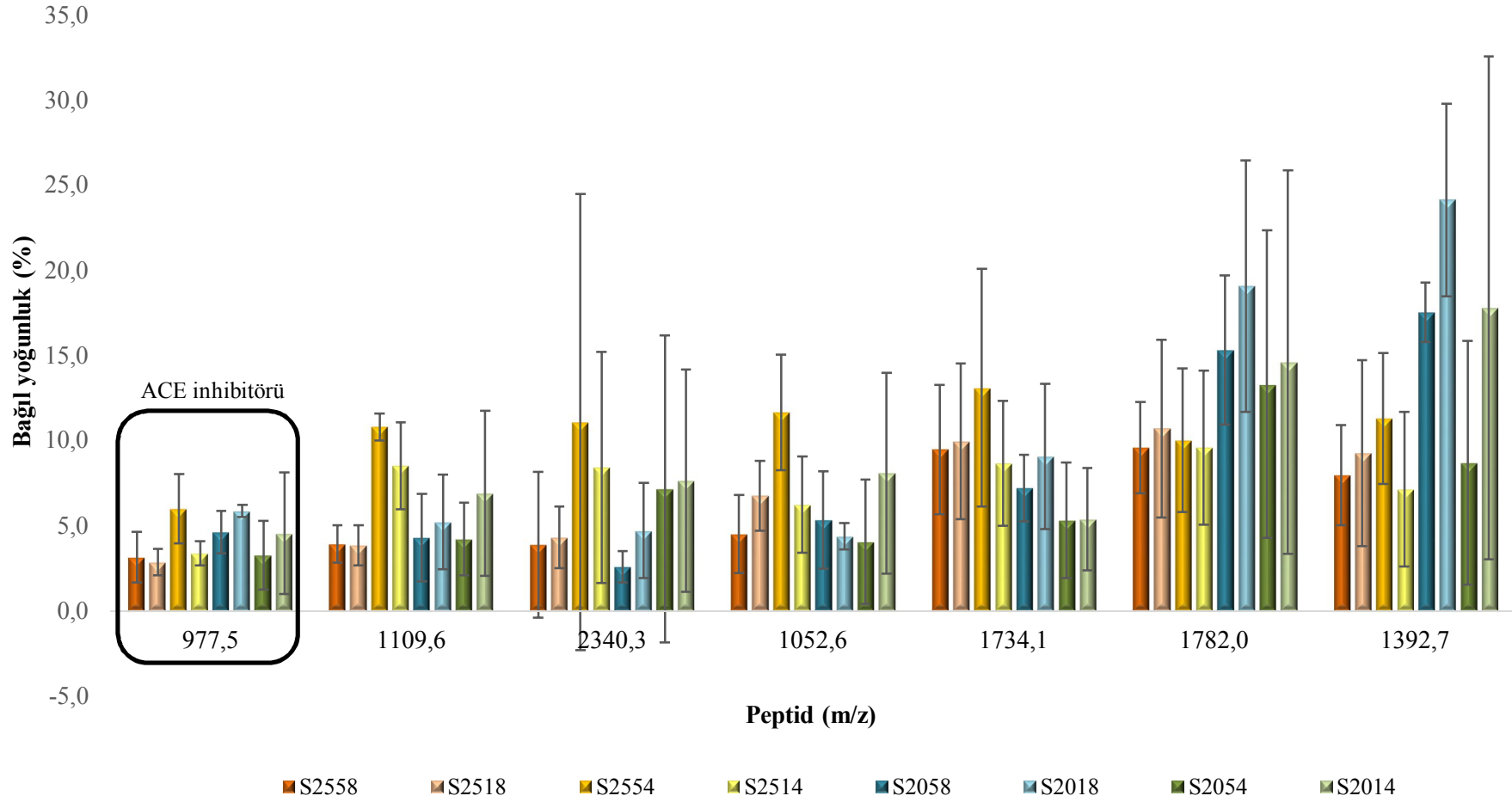
Kefir örneklerinde tanımlanan biyoaktif peptidlerin biyolojik işlevsellikleri ve insan vücudundaki sistemler üzerine etkileri Şekil 4.16'da gösterilmiştir. Şekilden de görüleceği üzere kefirde tanımlanan YQEPVLGPVRGPFPIIV ( $\beta$ -kazein<sub>193-209</sub>) ve VYPPFGPIP ( $\beta$ -kazein<sub>59-68</sub>), peptidlerinin birden fazla işlevselliği bulunmaktadır. Kazeinin 17 olarak da bilinen YQEPVLGPVRGPFPIIV ( $\beta$ -kazein<sub>193-209</sub>) amino asit dizilimine sahip olan peptidin ACE inhibisyonu, antimikrobiyal, antioksidatif ve antitrombotik etki ve immün sistemin düzenlenmesi gibi farklı biyoaktivitelere sahip olduğu bildirilmektedir (Coste vd 1992, Yamamoto vd 1994, Birkemo vd 2009, Rojas-Ronquillo vd 2012, Eisele vd 2013). Söz konusu multifonksiyonel peptid 1881.1 Da kütle ile MALDI-TOF kütle spektrumunda sinyal yoğunluğu yüksek olan peptidlerden biridir (Bkz. Şekil 4.13). Kefir örneklerinde tanımlanan diğer bir multifonksiyonel peptid ise V- $\beta$ -kazomorfin-9 olarak da bilinen VYPPFGPIP ( $\beta$ -kazein<sub>59-68</sub>) peptididir. Söz konusu peptidin ACE-inhibitörü olmasının yanı sıra antioksidan ve opioid reseptörleri bağlama özelliklerine sahip olduğu bildirilmektedir (Jinsmaa ve Yoshikawa 1999, Eisele vd 2013).



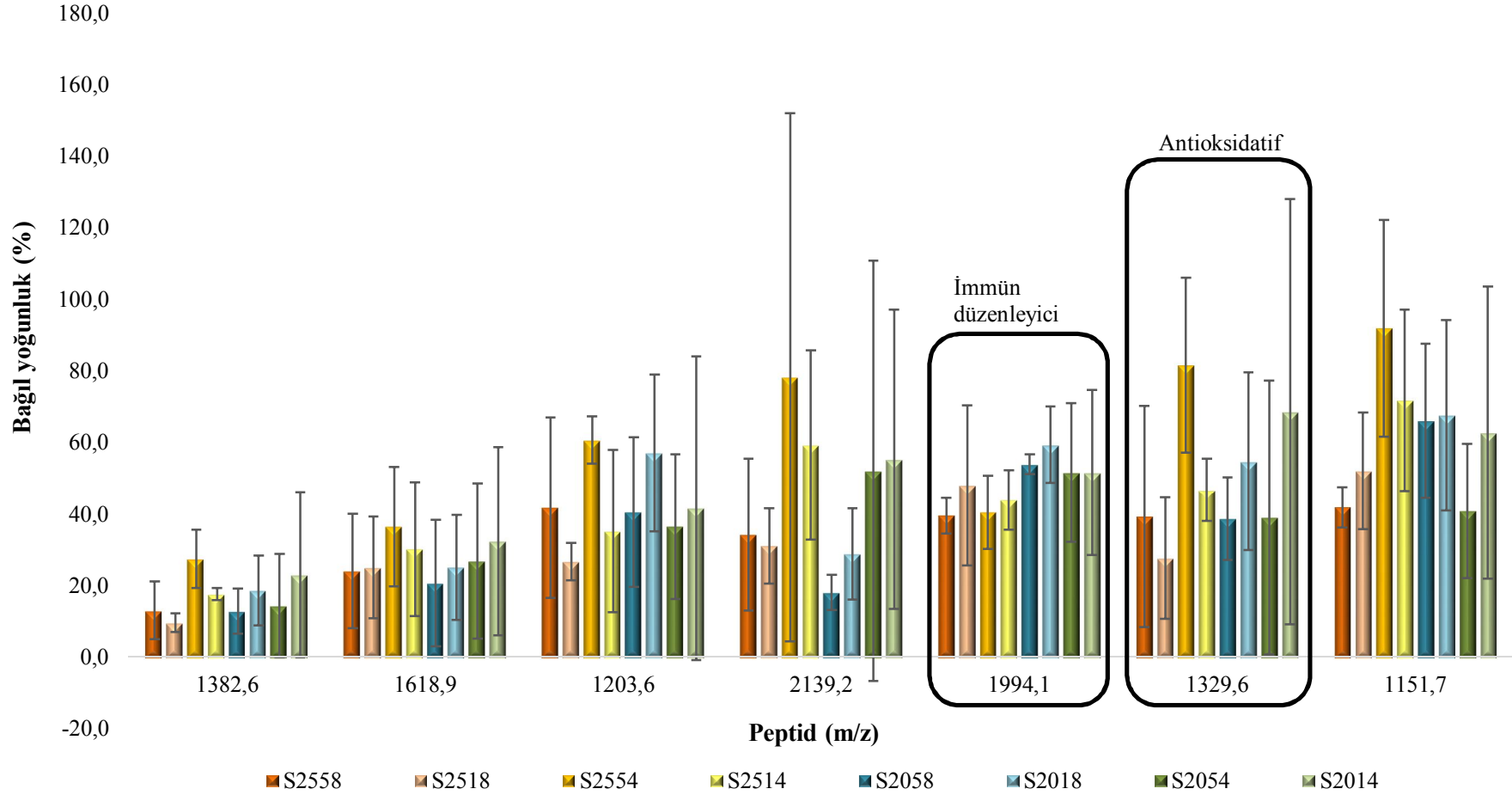
Şekil 4.16. Kefirde tanımlanan biyoaktif peptidlerin insan vücudunda etki ettiği sistemler

#### 4.5.2. Kefir örneklerinin peptid profilleri üzerine üretim parametrelerinin etkisi

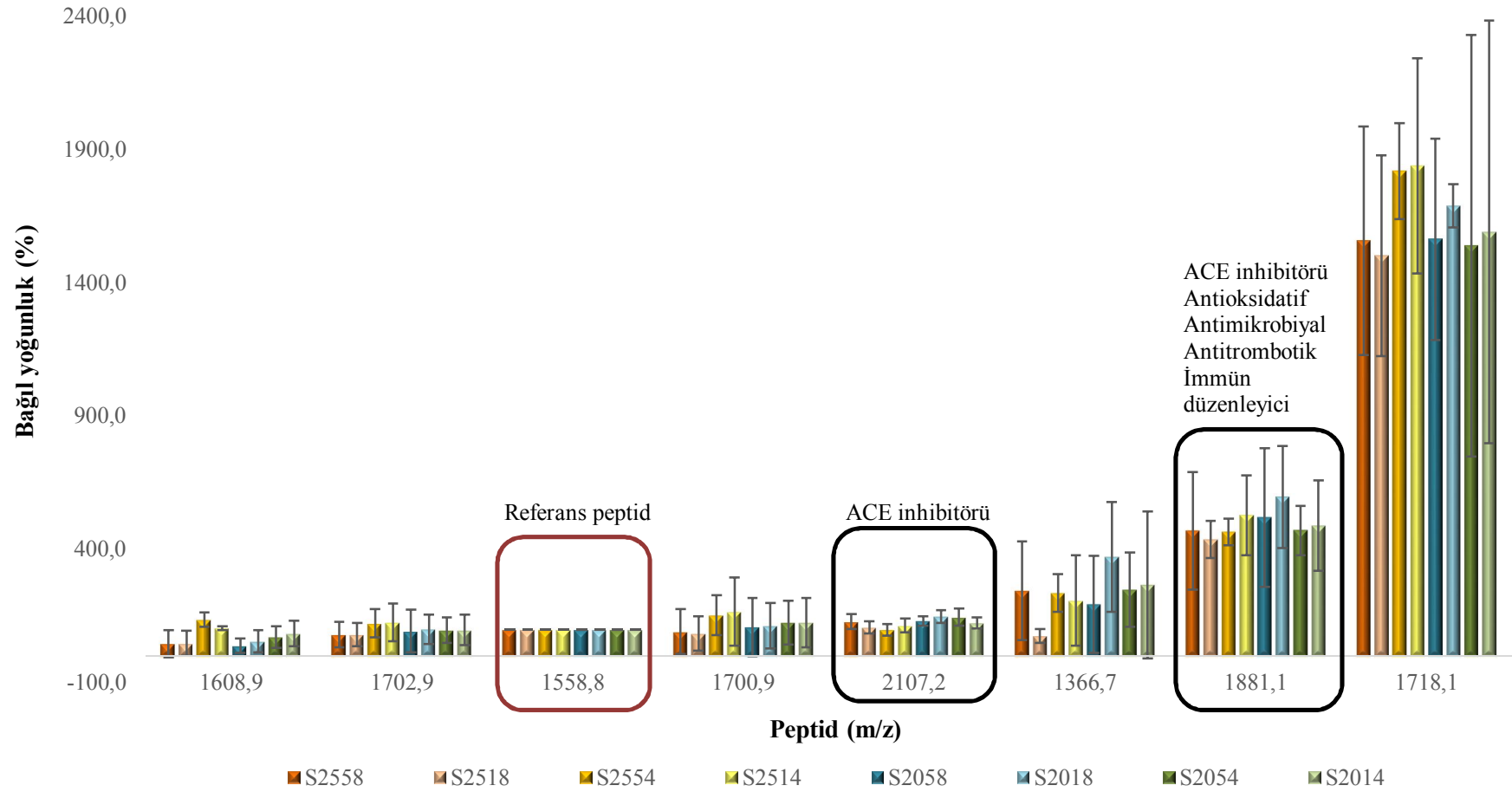
Kefir örneklerinin peptid profili üzerine starter kültür çeşidi, inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon sonlandırma pH'sı ve ısıl işlem normu gibi üretim parametrelerinin etkisi MALDI-TOF kütle spektrometresinden yararlanılarak belirlenmiştir. Araştırmamızda üretim parametrelerinin kefirin peptid profili üzerine etkisinin incelenmesinde, ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen tüm kefir örneklerinde belirlenen ve bağlı kuantifikasyonu yapılan 21 ana peptid sinyali ile kefir danesi kullanılarak üretilen tüm kefir örneklerinde belirlenen ve bağlı kuantifikasyonu yapılan 20 ana peptid sinyali kullanılmıştır (Ek 1). Ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen söz konusu peptidlere ait bağlı yoğunluk değerlerinin üretimde kullanılan parametrelere göre değişimi Şekil 4.17a, 4.17b ve 4.17c'de, kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen peptidlere ait değişimler ise Şekil 4.18a, 4.18b ve 4.18c'de sunulmuştur. Şekillerde görülen 1558.8 m/z oranına sahip peptid referans peptidi olup relatif yoğunluğu %100 olarak kabul edilmiştir. Ayrıca söz konusu şekillerde kefir örneklerinde tanımlanan biyoaktif peptidler ve bu peptidler üzerine üretim parametrelerinin etkisi de görülmektedir. Şekil 4.17a ve 4.18a'da görülen 977.5 m/z oranına sahip peptid ile Şekil 4.17c ve 4.18c'de görülen 2107.3 m/z oranına sahip peptidin literatürde ACE inhibitörleri olduğu bildirilmektedir (Yamamoto vd 1994). Şekil 4.17b ve 4.18b'deki 1329.6 ve 1994.2 m/z oranına sahip peptidlerin sırasıyla immün düzenleyici ve antoksidatif olarak aktivite gösterdiği belirtilmektedir. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda Şekil 4.17c ve 4.18c'de görülen 1881.1 m/z oranına sahip peptidin ACE inhibisyonu, antimikrobiyal, antioksidatif ve antitrombotik etki ve immün sistemin düzenlenmesi gibi farklı biyoaktivitelere sahip olduğu tespit edilmiştir (Coste vd 1992, Yamamoto vd 1994, Sandré vd 2001, Birkemo vd 2009, Rojas-Ronquillo vd 2012). Kefir örneklerinde belirlenen biyoaktif peptidlerin MALDI-TOF kütle spektrumlarındaki pozisyonları Şekil 4.19'da sunulmuştur. Söz konusu şekil incelendiğinde biyoaktif peptidler arasında en yüksek bağlı yoğunluk değerine 1881.1, en düşük bağlı yoğunluk değerine ise 977.5 m/z oranına sahip peptidin sahip olduğu görülmektedir.



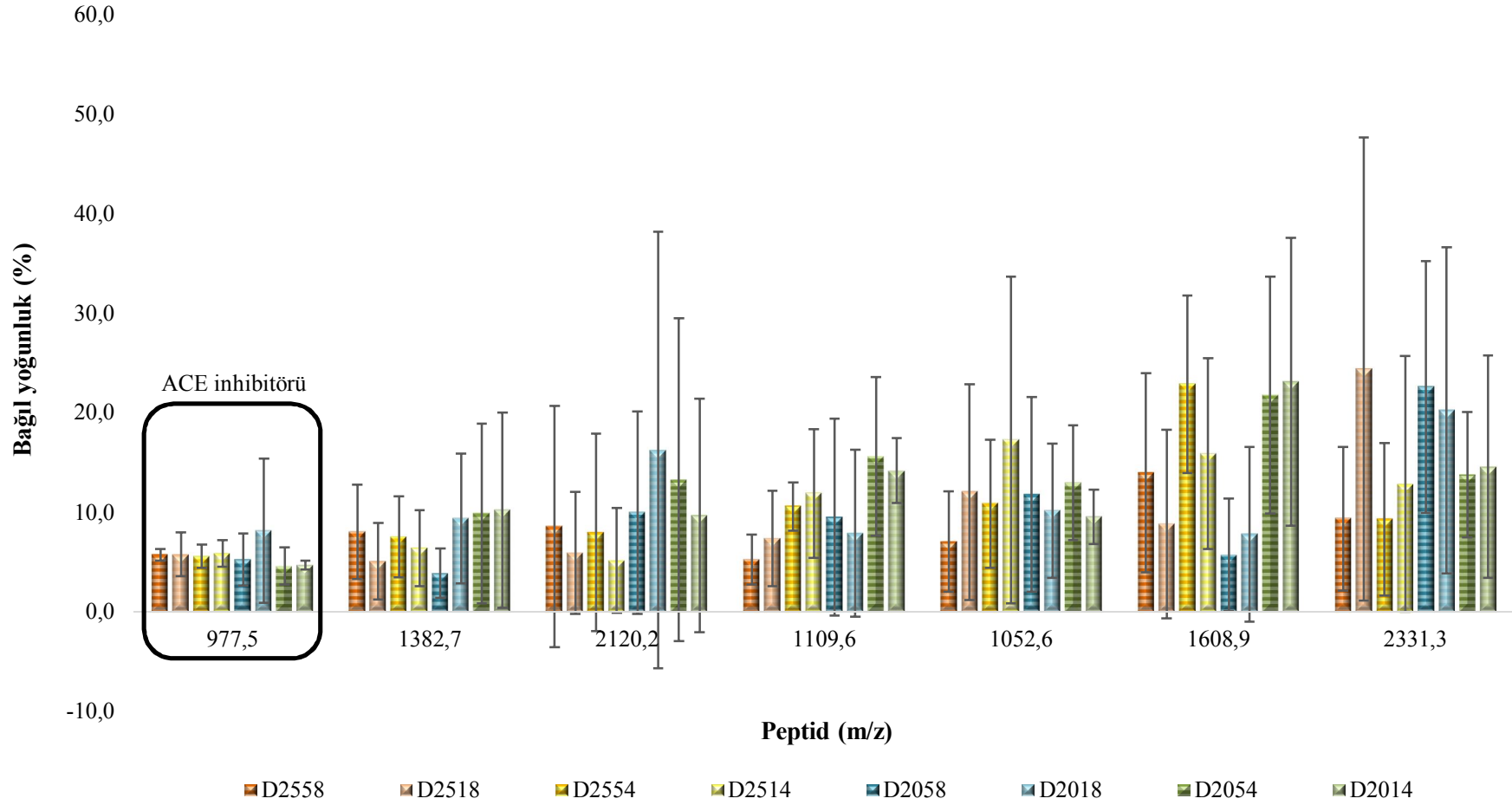
Şekil 4.17a. Ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen peptidler ve bu peptidler üzerine üzerine inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon sonlandırma pH'sı ve ısıl işlem normunun etkisi



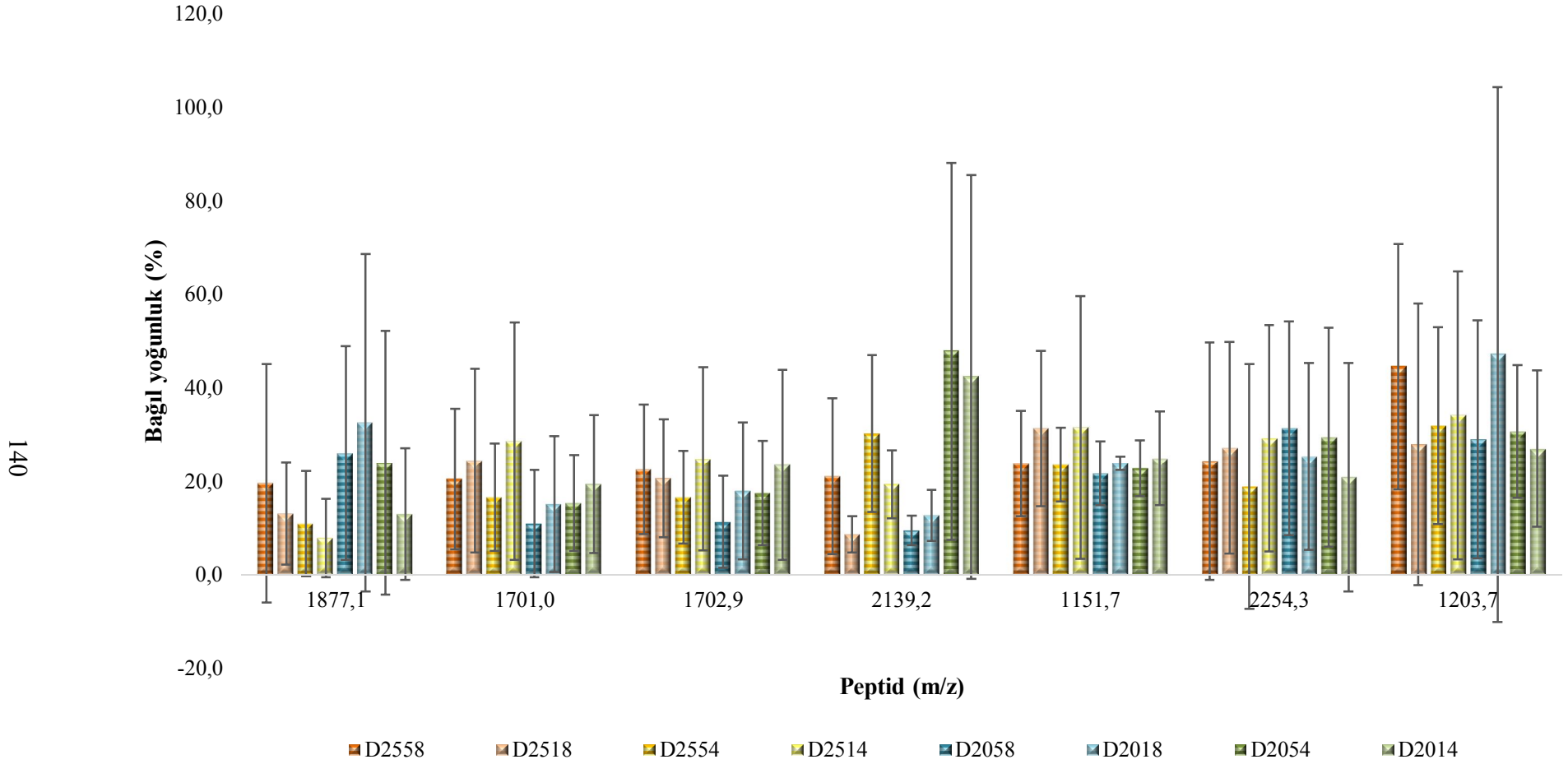
Şekil 4.17b. Ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen peptidler ve bu peptidler üzerine üzerine inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon sonlandırma pH'sı ve ısıl işlem normunun etkisi



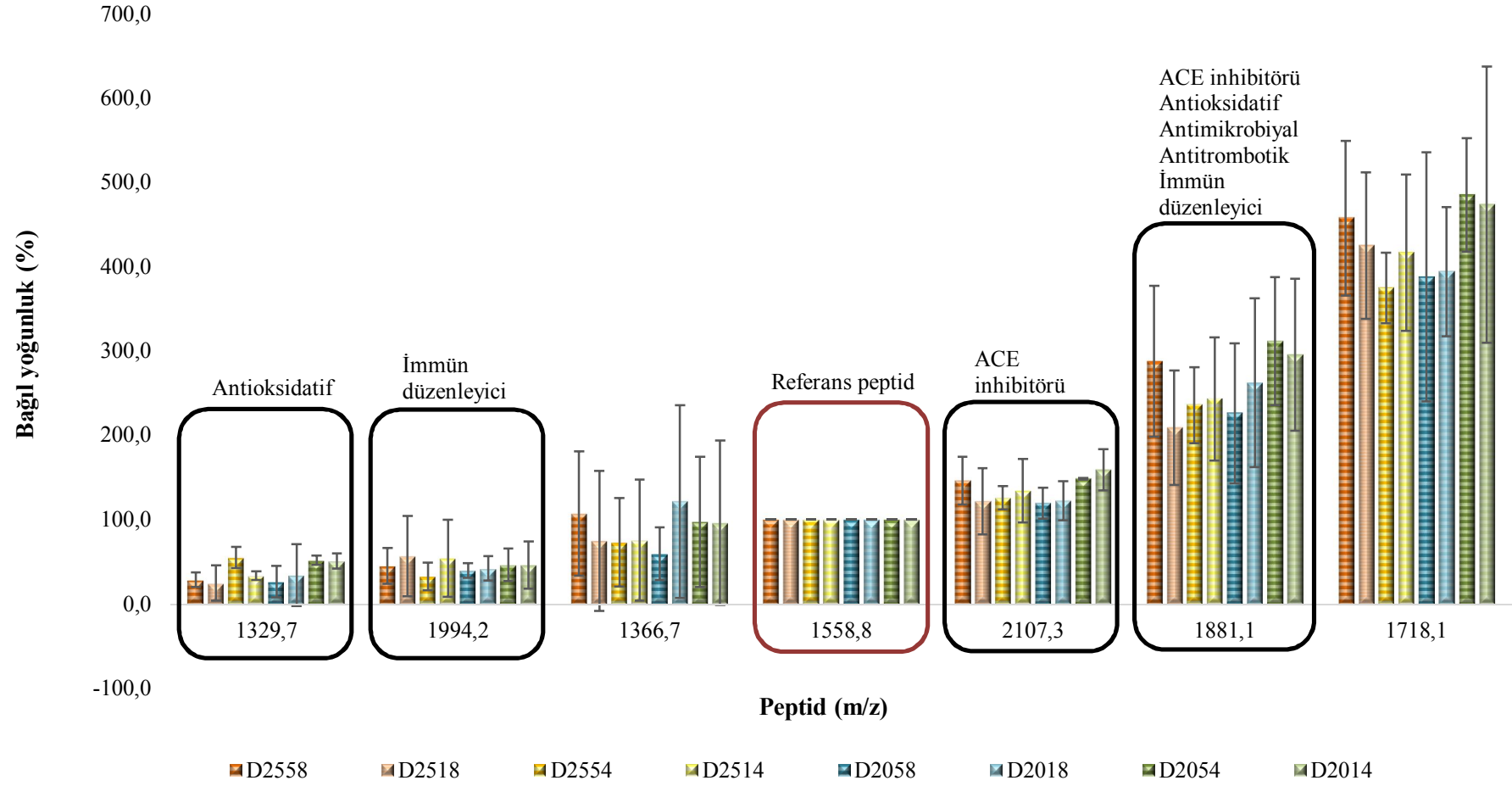
Şekil 4.17c. Ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen peptidler ve bu peptidler üzerine üzerine inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon sonlandırma pH'sı ve ısıl işlem normunun etkisi



Şekil 4.18a. Kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen peptidler ve bu peptidler üzerine üzerine inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon sonlandırma pH'sı ve ısıl işlem normunun etkisi

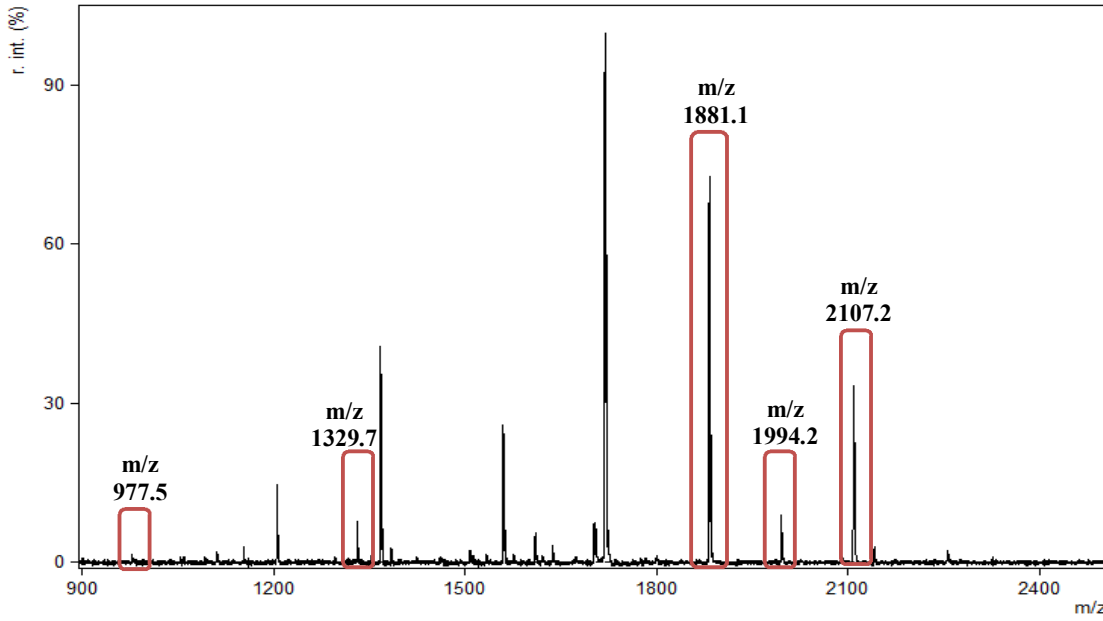


Şekil 4.18b. Kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen peptidler ve bu peptidler üzerine üzerine inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon sonlandırma pH'sı ve ısıl işlem normunun etkisi



Şekil 4.18c. Kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen peptidler ve bu peptidler üzerine inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon sonlandırma pH'sı ve ısıl işlem normunun etkisi



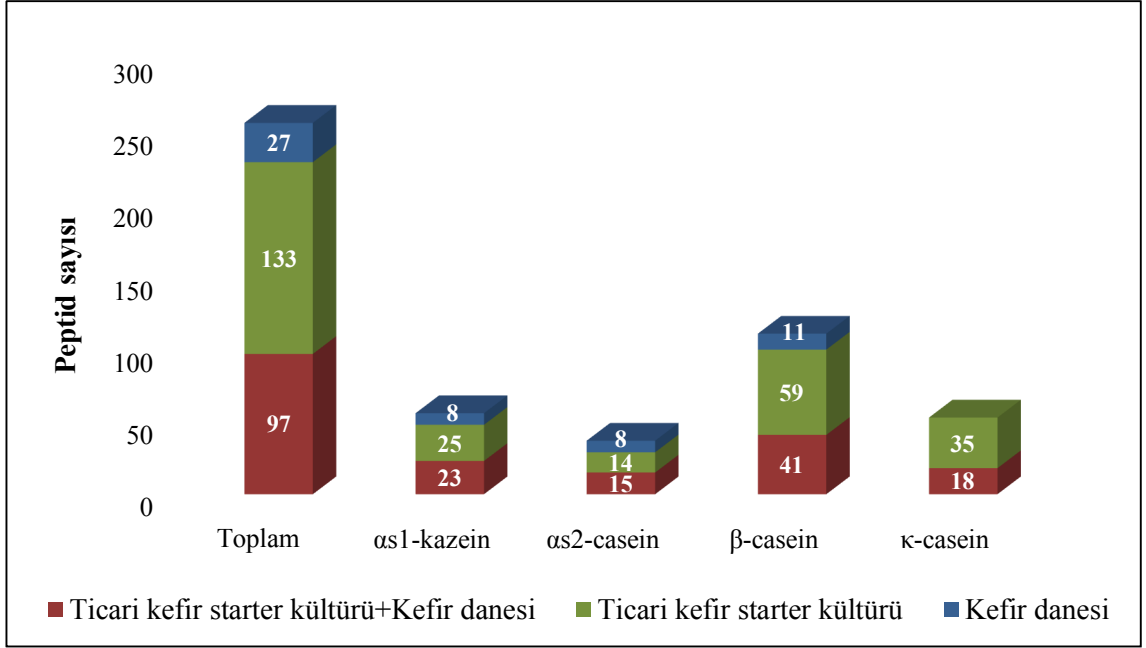


Şekil 4.19. Kefir örneklerinde tanımlanan biyoaktif peptidlerin MALDI-TOF kütle spektrumundaki pozisyonları

#### 4.5.2.1. Üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin kefir örneklerinin peptid profili üzerine etkisi

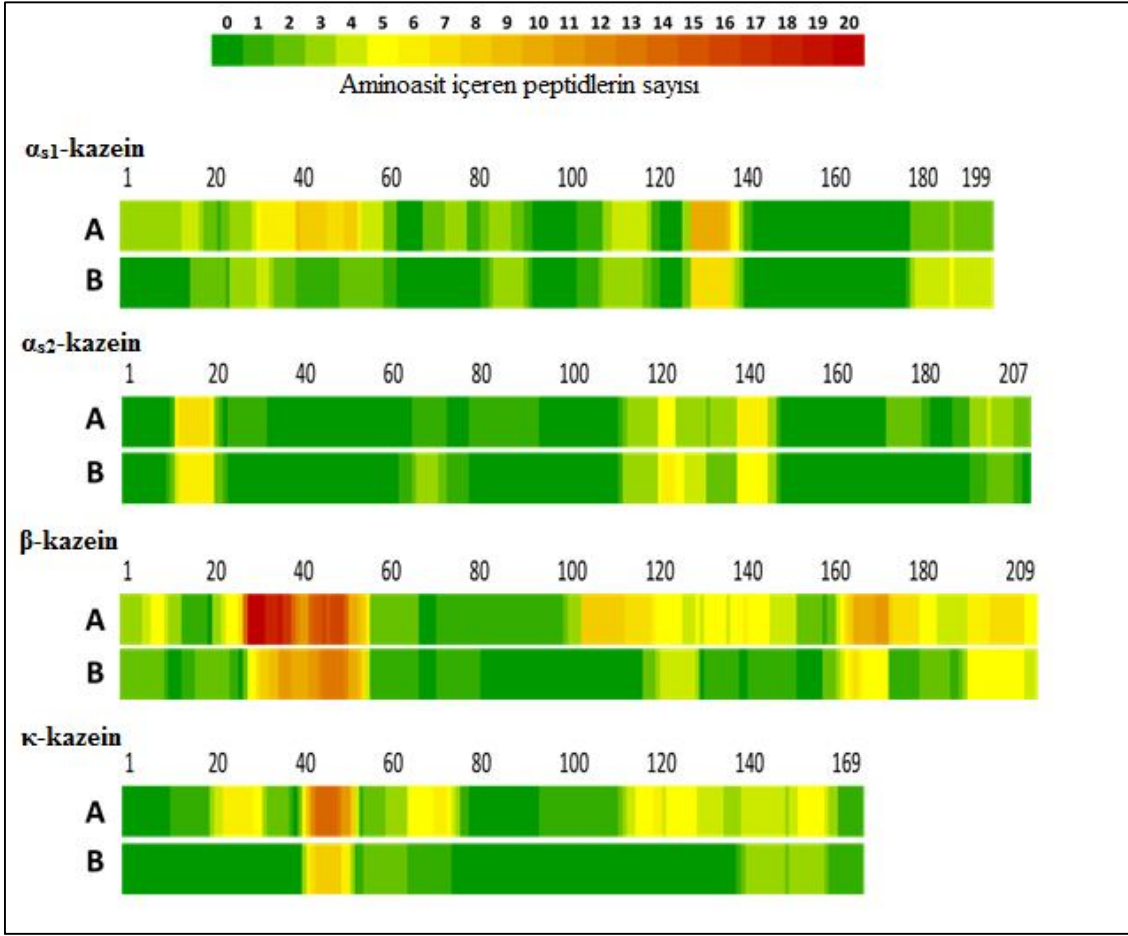
Araştırmamızda kefir örneklerinin üretiminde ticari kefir starter kültürü ve kefir danesi olmak üzere iki farklı starter kültür kullanılmıştır. Kefir örneklerinin peptid profili üzerine üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin etkisi Nano-UPLC-nano-ESI-MS/MS ve MALDI-TOF-MS metotları kullanılarak belirlenmiştir.

Nano-UPLC-nano-ESI-MS/MS ve MALDI-TOF-MS analizleri sonucunda kefir örneklerinde tanımlanan peptidlerin üretimde kullanılan starter kültür çeşidine göre genel dağılımı ve her birinin dört ana protein içindeki dağılımı Şekil 4.20’de verilmiştir. Şekilde yüksek sayıda peptidin (97) her iki kefir örneğinde de bulunduğu görülmektedir. Ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen ve toplamda 230 farklı peptid içeren kefir örneklerinin, kefir danesi kullanılarak üretilen ve toplamda 124 farklı peptid içeren kefir örneklerine göre daha kompleks bir kompozisyona sahip olduğu tespit edilmiştir. Kazein fraksiyonlarındaki peptid dağılımı incelendiğinde ise, peptidlerin büyük kısmının ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde tanımlandığı (133/257), diğer büyük kısmın her iki kefir çeşidi tarafından paylaşıldığı (97/257) ve sadece çok küçük bir kısmın kefir danesi kullanılarak üretilen örneklere ait olduğu (27/257) görülmektedir.



Şekil 4.20. Farklı örnek tiplerinde tanımlanan peptidlerin dağılımı

Şekil 4.21’de verilen ısı haritalarında kefir örneklerinde tanımlanan peptidlerin öncü proteinleri olan  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ - ve  $\kappa$ -kazein dizilimleri içerisindeki konumları verilmiştir. Kırmızı renk, kefir örneklerinde söz konusu proteinin bu kısmından yüksek oranda peptidin serbest hale geçtiğini; koyu yeşil renk ise proteinin bu kısmında tanımlanan herhangi bir peptidin olmadığını göstermektedir. Her iki kefir örneği için, peptidlerin büyük bir kısmının  $\beta$ -kazeinin 28.-56. fraksiyonları arasında kalan bölgeden serbest hale geçtiği tespit edilmiştir. Kefir örneklerinde ortak olan diğer sıcak bölgelerin ise  $\beta$ -kazein’in 164.-175. fraksiyonları ve C-terminal bölgesi,  $\alpha_{s1}$ -kazein diziliminde 129.-142.,  $\alpha_{s2}$ -kazein diziliminde 13.-21. ve 123.-147. ve  $\kappa$ -kazein diziliminde 42.-53. fraksiyonlarının olduğu görülmektedir (Şekil 4.21’de kırmızı ve sarı kısımlar). Ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örnekleri ile kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örnekleri arasında  $\beta$ -kazein diziliminde 106.-119.,  $\alpha_{s1}$ -kazein diziliminde 41.-55.,  $\kappa$ -kazeinde ise 21-33. ve 106.-119. pozisyonlarda büyük farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen örneklerde söz konusu bölgelerden yüksek oranda peptid serbest hale geçerken, kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde ise bu bölgelerin bazılarında serbest hale geçen çok az sayıda peptid olduğu, bazılarında ise hiç olmadığı saptanmıştır. Her iki kefir örneğinde de  $\alpha_{s1}$ -kazeinin 64.-69., 95.-104., 124.-128. ve 145.-179. fraksiyonlarından,  $\alpha_{s2}$ -kazeinin N-terminal bölgesinden ve 34.-63., 96.-113., 161.-174. ve 185.-189. fraksiyonlarından,  $\beta$ -kazeinin 69.-72. fraksiyonundan ve  $\kappa$ -kazeinin ise N-terminal bölgesinden ve 80.-95. fraksiyonundan serbest hale geçen herhangi bir peptid tanımlanamamıştır (Şekil 4.21’de koyu yeşil bölgeler). Özetlemek gerekirse, fermantasyonda ticari kefir starter kültürü kullanıldığında peptidomik desen daha kompleks olmasına rağmen, her iki kefir örneğine ait peptid profilinin genel olarak benzer olduğu açıktır.



Şekil 4.21. Kefir starter kültürü (A) ve kefir danesi (B) kullanılarak üretilen kefir örneklerinde tanımlanan peptidlerin  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - ve  $\kappa$ -kazein protein dizilimlerindeki pozisyonları

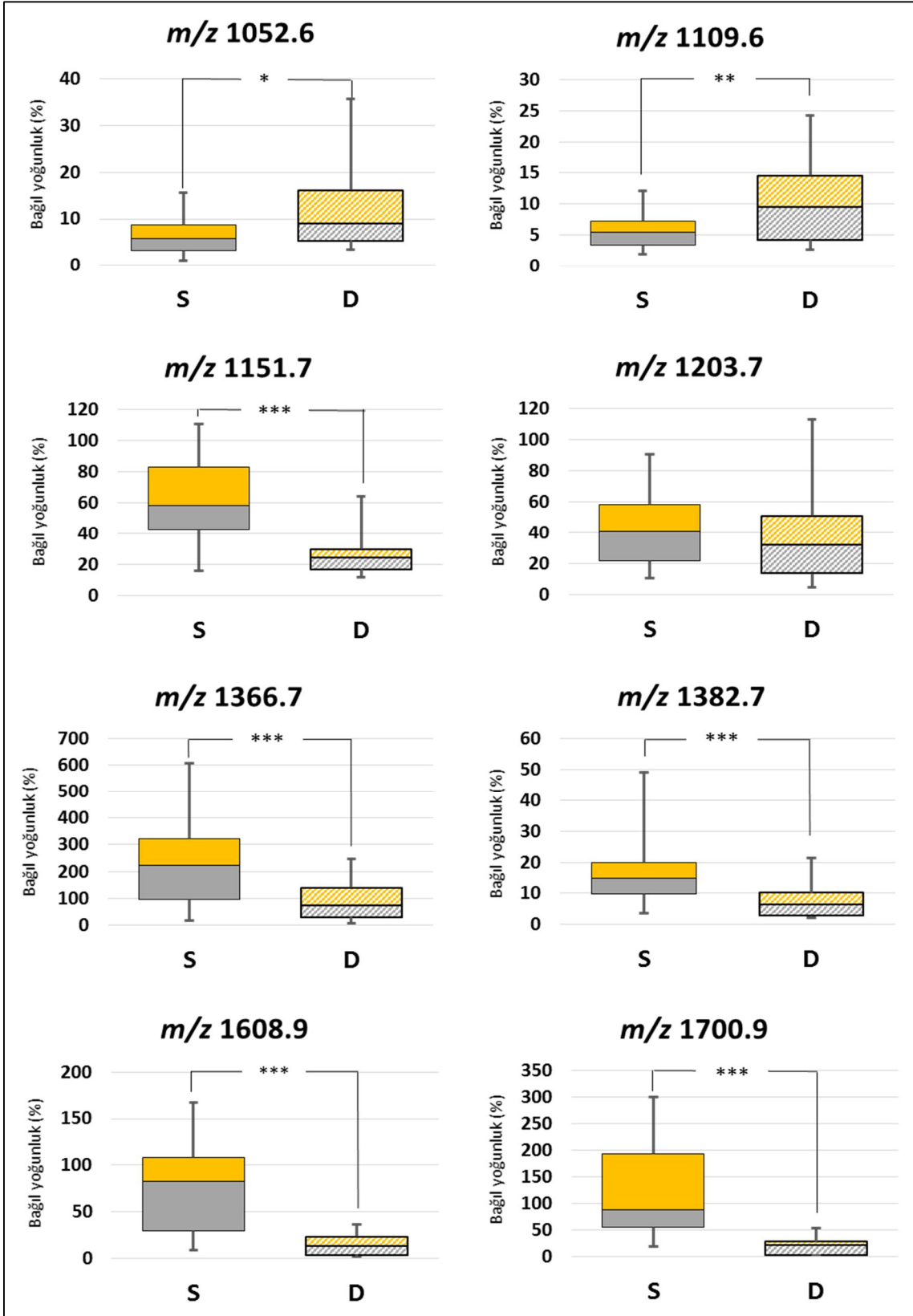
Fermantasyon sonucu elde edilen ürünler fermantasyon işleminde kullanılan mikroorganizmalara göre büyük ölçüde farklılık gösterebildiği için araştırmamızda iki farklı starter kültür çeşidi kullanılarak üretilen kefir örnekleri analiz edilip karşılaştırılmıştır. Örneklerimizin fermantasyon işlemlerinde ticari kefir starter kültürü ve geleneksel kefir daneleri kullanılmıştır. Araştırmada iki farklı starter kültür kullanılarak üretilen kefir örnekleri arasındaki farklılıkların anlaşılması amacıyla söz konusu ürünlerin mikrobiyal kompozisyonu da belirlenmiştir. Kefir örneklerindeki toplam aerobik mezofilik bakteri sayısında belirgin bir farklılık olmadığı, buna karşın kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerindeki maya sayısının ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen örneklere göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu örnekler proteolitik aktivite değerleri bakımından kıyaslandığında ise, ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinin proteolitik aktivite değerlerinin, kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine göre 1.3 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Kefir örneklerinin proteolitik aktivite değerlerindeki söz konusu farklılığa sadece kefir danesi kullanılarak üretilen örneklerin içerdikleri toplam aerobik mezofilik bakteri sayılarının kefir starter kültürü kullanılarak üretilen örneklere kıyasla daha düşük olmasının neden olduğu düşünülemez. Bakterilerin tür ve alt tür kompozisyonunun kefir örneklerinin proteolitik davranışlarındaki farklılığa neden olabileceği de muhtemeldir.

Ticari kefir starter kültüründeki bakteri suşlarının büyük bir kısmının daha etkin proteolitik özelliklere sahip olması, söz konusu örneklerin kefir danesi kullanılarak üretilen örneklere göre daha yüksek proteolitik aktivite değerlerine sahip olmasının bir açıklaması olabilir.

Fermantasyon işleminde ticari kefir starter kültürü kullanıldığı zaman serbest hale geçen amino asit ve peptid sayılarında artış olduğu gibi fermantasyon sonucu oluşan ürünün peptid kompozisyonun da daha kompleks olduğu belirlenmiştir. Söz konusu durum ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde yapılan proteolitik aktivite analiz sonuçları ile de doğrulanmaktadır.

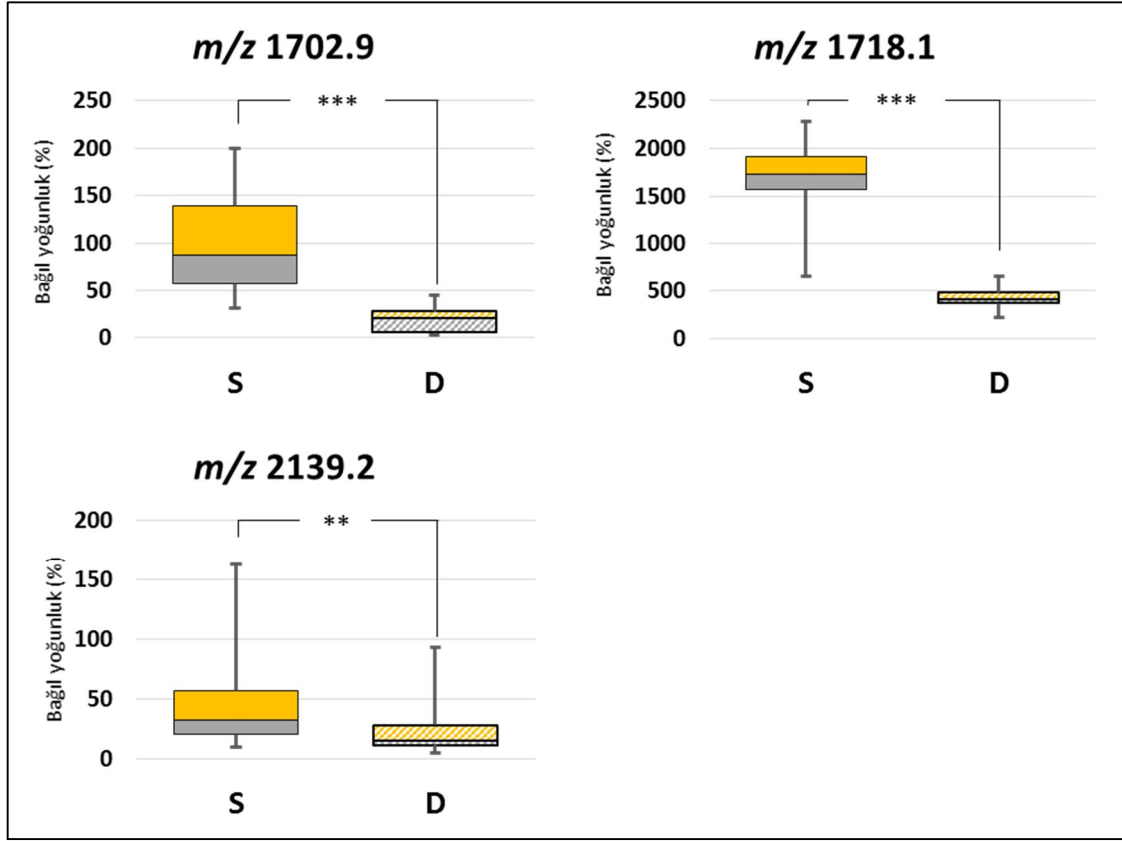
Ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde tanımlanan peptidlerin %42'lik, kefir danesi kullanılarak üretilen örneklerde tanımlanan peptidlerin ise %78'lik kısmının her iki kefir örneği tarafından paylaşıldığı tespit edilmiştir. Peptidlerin büyük bir kısmının her iki kefir örneğinde de bulunması üretim için kullanılan özgün mikrofloradan bağımsız tipik kefir peptid profilinin var olduğunu göstermektedir. Buradan kefir peptid profilinin daimi kısım bileşenlerinin kefir için, kefir profilinin değişken kısım bileşenlerinin ise farklı kefir ürünlerini ve üretim parametrelerini ayırtmek için belirleyici olarak kullanılabilceği hipotezi çıkarılabilir.

Üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin kefir örneklerinde belirlenen ana peptidler üzerine etkisinin değerlendirilmesi, hem ticari kefir starter kültürü hem de kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 5'ini biyoaktif peptidlerin oluşturduğu 16 peptidin karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Söz konusu peptidler üzerine starter kültür çeşidinin etkisini gösteren kutu grafikleri ve Mann-Whitney U Testi sonuçları Şekil 4.22a ve 4.22b'de sunulmuştur. Çalışma sonucunda 1151.7, 1366.7, 1382.7, 1608.9, 1700.9, 1702.9, 1718.1 ve 2139.2 m/z oranına sahip olan 8 peptidin bağıl yoğunluk değerlerinin ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde, kefir danesi kullanılarak üretilenlere kıyasla yüksek olduğu ( $P<0.05$ ) belirlenmiştir. Kütle/yük oranları 1052.6 ve 1109.6 olan peptidlere ait bağıl yoğunluk değerlerinin ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde, ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilenlere göre yüksek ( $P<0.05$ ) olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte 1203.7 m/z oranına sahip peptidin bağıl yoğunluk değerleri üzerine üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin istatistiksel olarak herhangi bir etkisinin olmadığı ( $P>0.05$ ) tespit edilmiştir.



S: Ticari kefir starter kültürü, D: Kefir danesi

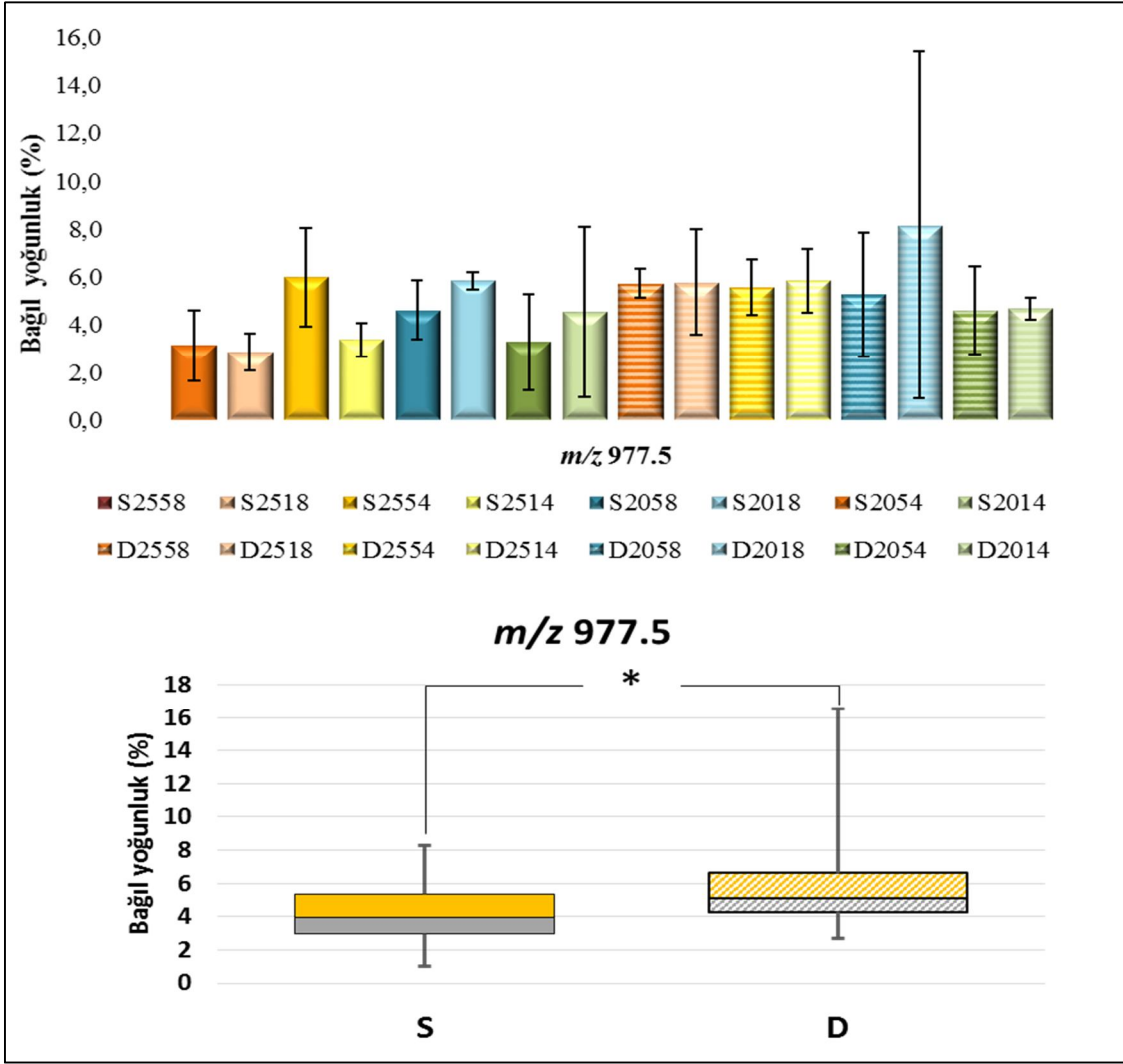
Şekil 4.22a. Kefir örneklerinde belirlenen peptidler üzerine starter kültür çeşidinin etkisi



S: Ticari kefir starter kültürü, D: Kefir danesi

Şekil 4.22b. Kefir örneklerinde belirlenen peptidler üzerine starter kültür çeşidinin etkisi

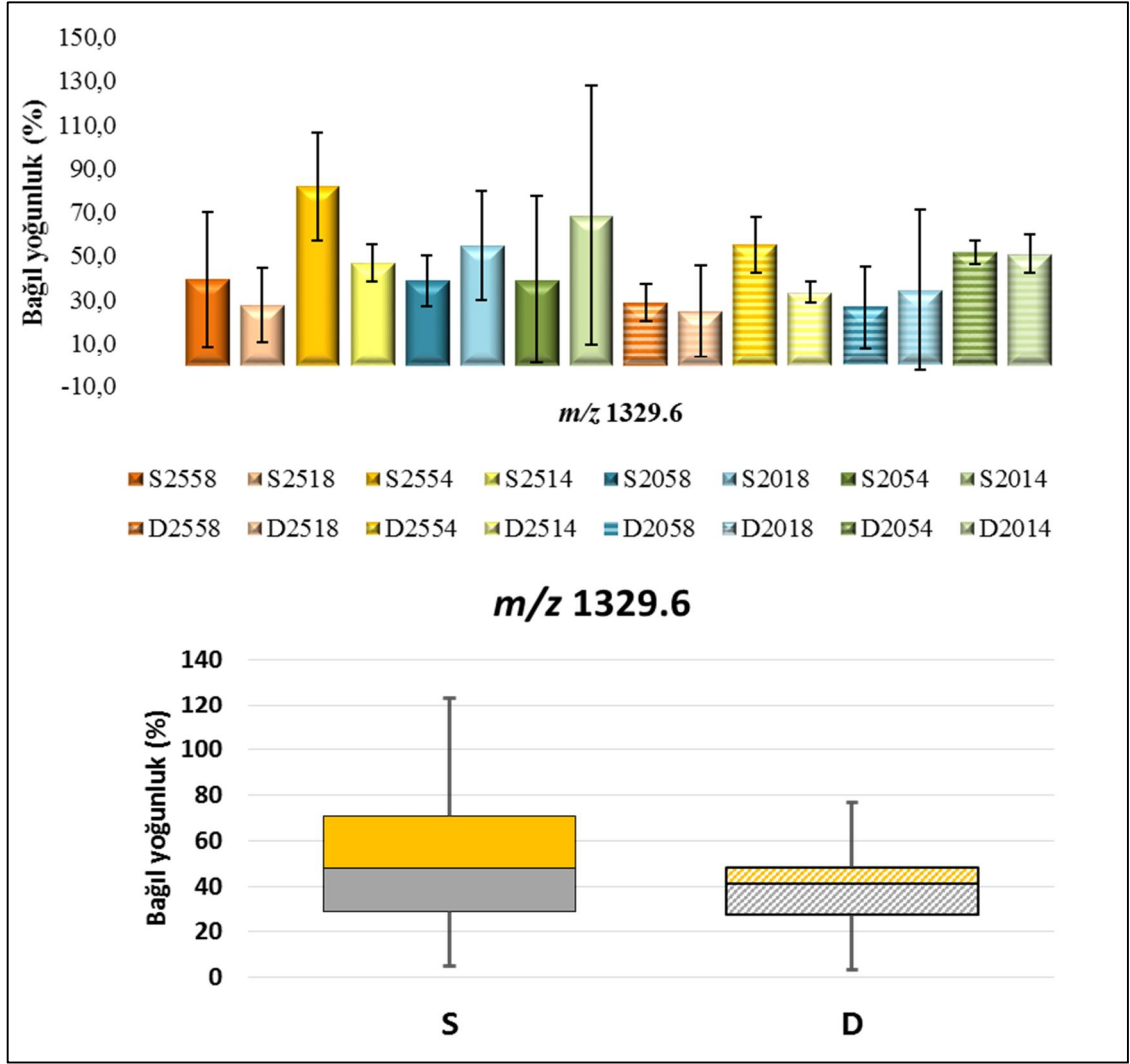
Üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin kefir örneklerinde belirlenen biyoaktif peptidler üzerine etkisi incelendiğinde, üretimlerinde kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde tanımlanan litetatürde ACE inhibitörü olduğu bildirilen m/z oranı 977.5 olan peptide ait bağıl yoğunluk değerlerinin, ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen örneklere göre yüksek olduğu ( $P < 0.05$ ) belirlenmiştir (Şekil 4.23).



S: Ticari kefir starter kültürü, D: Kefir danesi

Şekil 4.23. Üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin 977.5 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi

Üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin kefir örneklerinde tanımlanan ve literatürde antioksidatif olduğu bildirilen 1329.6 m/z oranına sahip peptidin bağıl yoğunluk değerleri üzerine etkisi Şekil 4.24'te sunulmuştur. Genel olarak; üretimlerinde kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde tanımlanan söz konusu peptide ait relatif yoğunluk değerlerinin, ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen örneklere göre düşük olduğu; fakat meydana gelen bu farklılıkların istatistiksel açıdan önemli olmadığı ( $P > 0.05$ ) tespit edilmiştir.

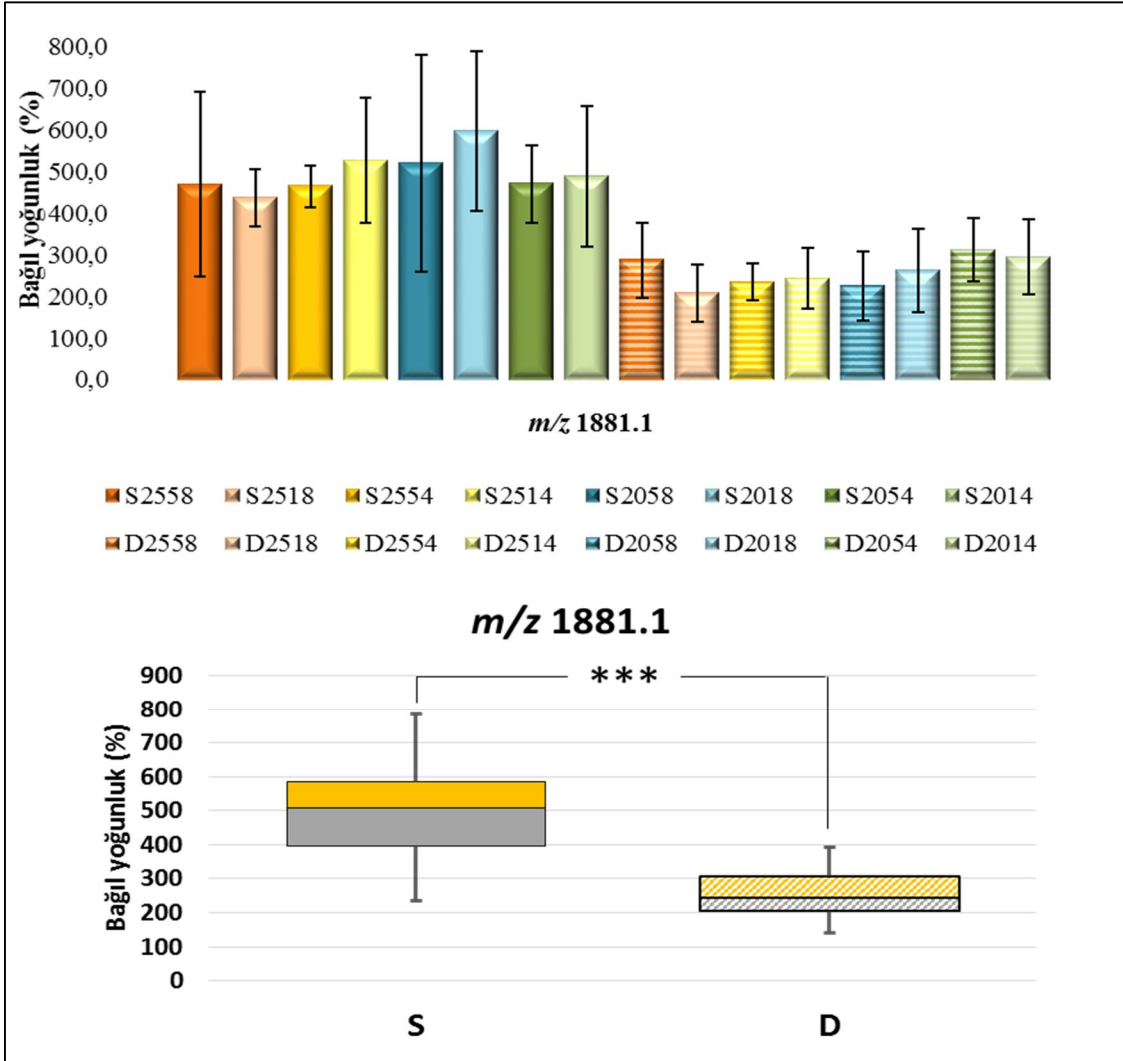


S: Ticari kefir starter kültürü, D: Kefir danesi

Şekil 4.24. Üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin 1329.6 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi

ACE inhibisyonu, antimikrobiyal, antioksidatif ve antitrombotik etki ve immün sistemin düzenlenmesi gibi farklı biyoaktivitelere sahip olduğu bildirilen 1881.1 m/z oranına sahip peptidin bağıl yoğunluk değerleri üzerine üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin etkisi Şekil 4.25'te sunulmuştur. Söz konusu peptid üzerine starter kültür çeşidinin etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak; üretimlerinde kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde tanımlanan söz konusu peptide ait bağıl yoğunluk değerlerinin, ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen örneklere göre düşük olduğu belirlenmiştir.

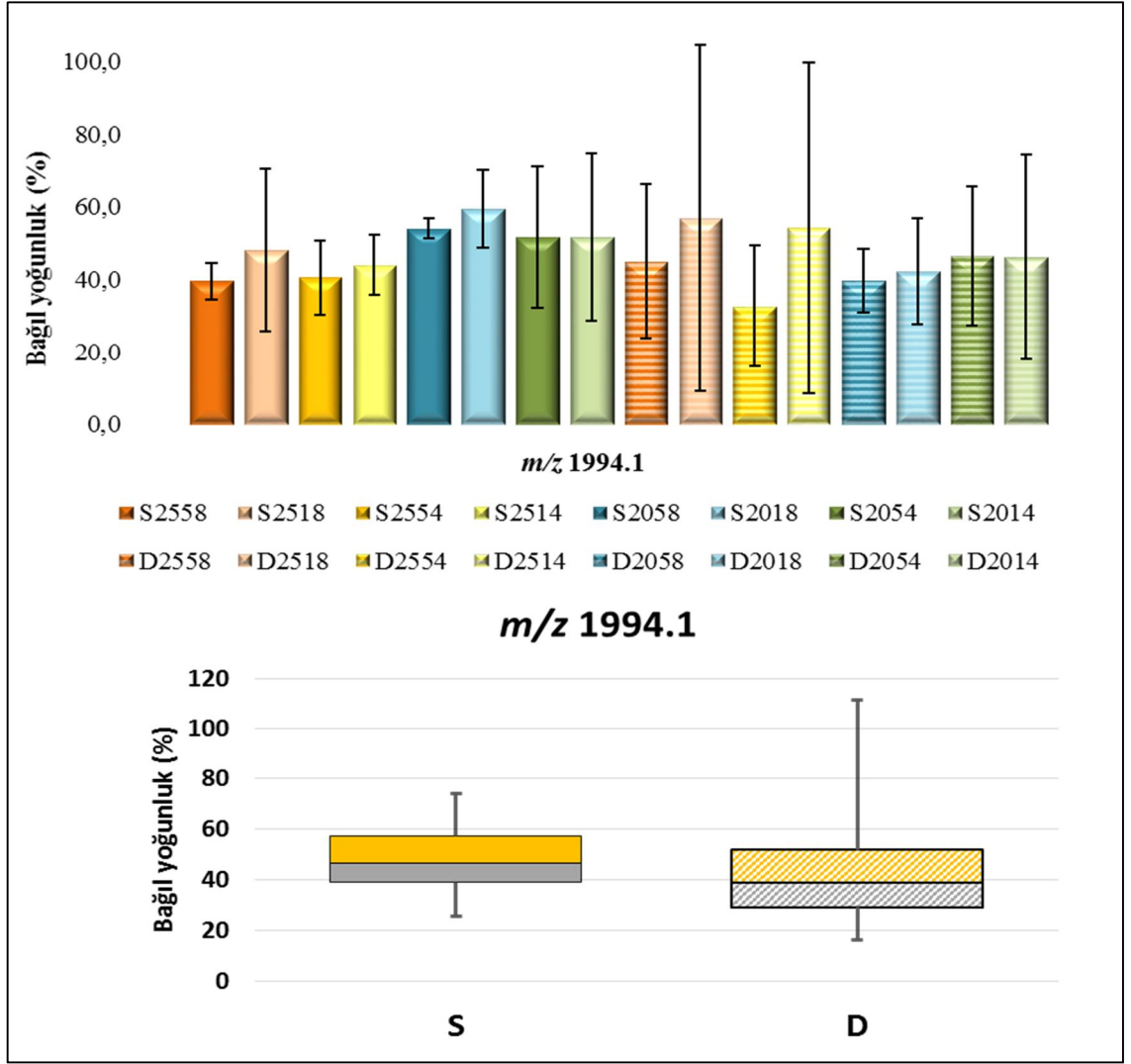




S: Ticari kefir starter kültürü, D: Kefir danesi

Şekil 4.25. Üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin 1881.1 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi

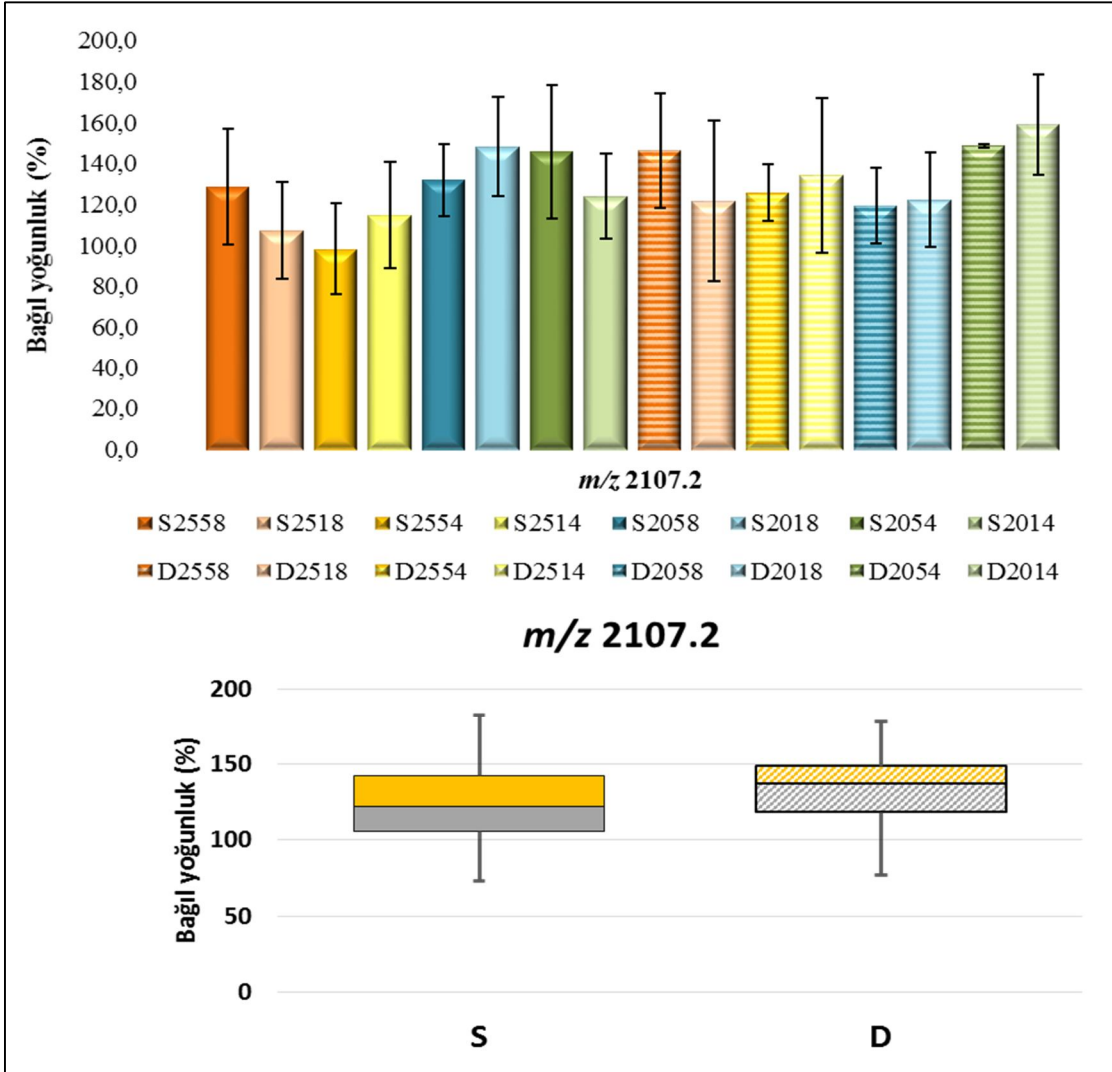
Üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin kefir örneklerinde tanımlanan ve literatürde immün düzenleyici olduğu bildirilen 1994.1 m/z oranına sahip peptidin bağıl yoğunlukları üzerinde farklılıklara yol açtığı; fakat meydana gelen bu farklılıkların istatistiksel açıdan önemli olmadığı ( $P > 0.05$ ) tespit edilmiştir (Şekil 4.26).



S: Ticari kefir starter kültürü, D: Kefir danesi

Şekil 4.26. Üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin 1994.1 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi

Üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin kefir örneklerinde tanımlanan ve literatürde ACE inhibitörü olduğu bildirilen 2107.2 m/z oranına sahip peptidin relatif yoğunlukları üzerinde farklılıklara yol açtığı; fakat meydana gelen bu farklılıkların istatistiksel açıdan önemli olmadığı ( $P > 0.05$ ) tespit edilmiştir (Şekil 4.27).



S: Ticari kefir starter kültürü, D: Kefir danesi

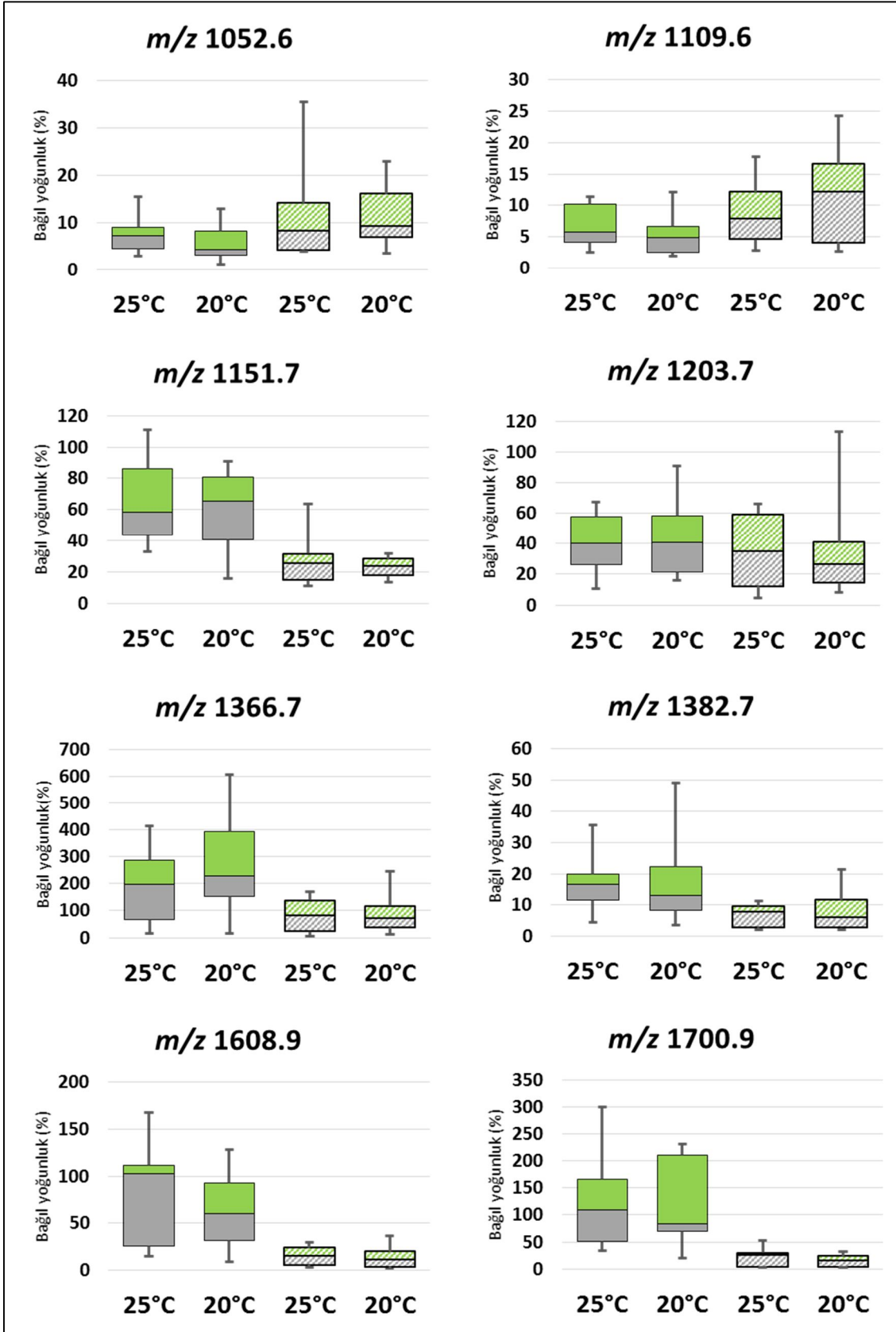
Şekil 4.27. Üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin 2107.2 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi

#### 4.5.2.2. Üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının kefir örneklerinin peptid profili üzerine etkisi

Araştırmamızda kefir örneklerinin üretiminde 20 ve 25°C olmak üzere iki farklı inkübasyon sıcaklığı kullanılmıştır. Kefir örneklerinin peptid profili üzerine üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının etkisi MALDI-TOF-MS metodu kullanılarak belirlenmiştir.

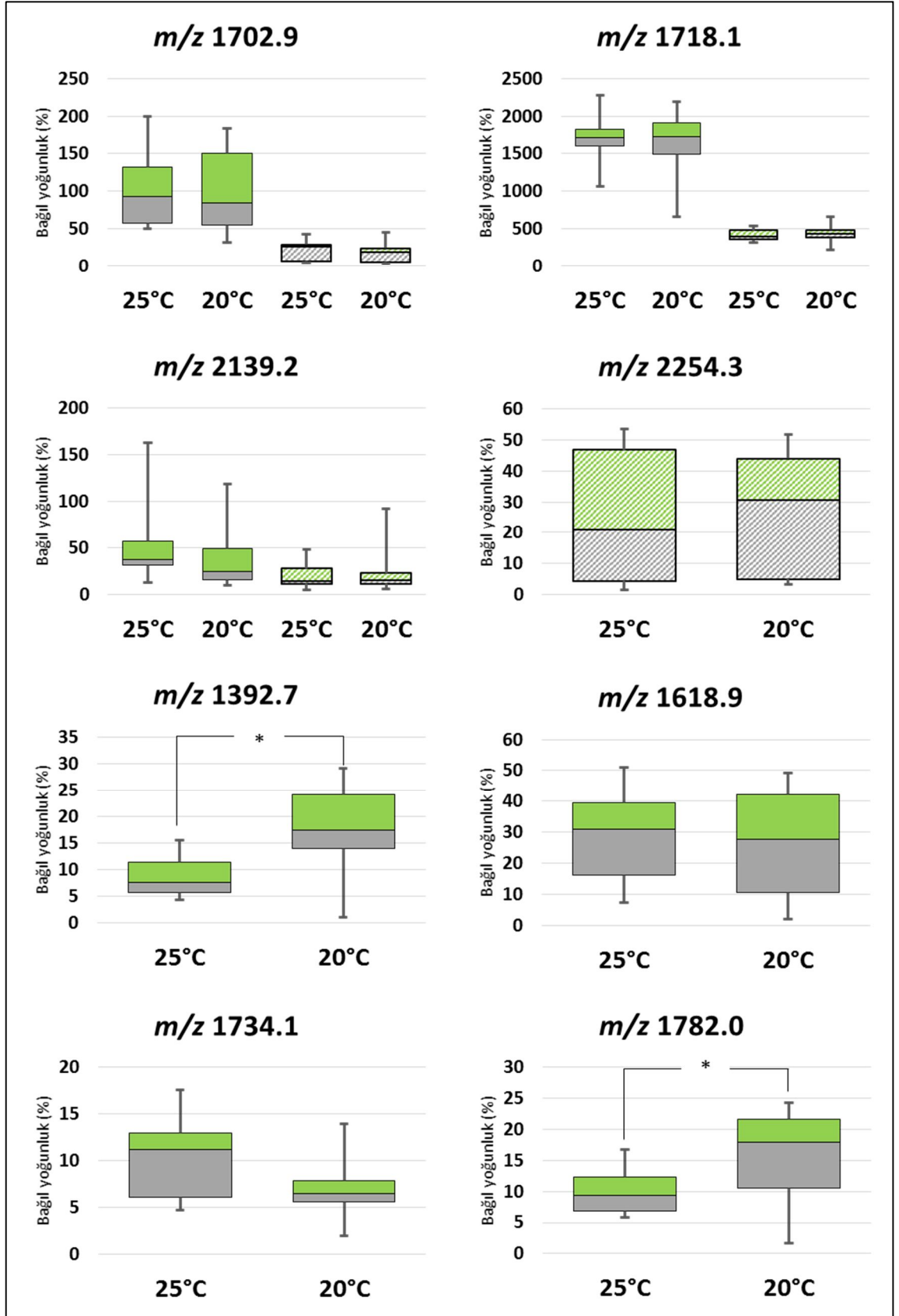
Ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 5 biyoaktif peptid haricindeki 16 peptid ile kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 5 biyoaktif peptid haricindeki 15 peptid üzerine üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının etkisini gösteren kutu grafikleri ve Mann-Whitney U Testi sonuçları Şekil 4.28a, 4.28b ve 4.28c'de sunulmuştur. Çalışma sonucunda üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının hem ticari kefir starter kültürü hem de kefir danesi

kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 1052.6, 1109.6, 1151.7, 1203.7, 1366.7, 1382.7, 1608.9, 1700.9, 1702.9, 1718.1, 2139.2 ve 2254.3 m/z oranına sahip peptidlerin bağıl yoğunluk değerleri üzerinde farklılıklara yol açtığı; fakat meydana gelen bu farklılıkların istatistiksel açıdan önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) tespit edilmiştir. Kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 1877.1, 2254.3 ve 2331.3 m/z oranına sahip peptidler ile ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilenlerde belirlenen 1618.9, 1734.1 ve 2340.3 m/z oranına sahip peptidler üzerine inkübasyon sıcaklığının istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olmadığı ( $P>0.05$ ) belirlenmiştir. Bununla birlikte ticari kefir starter kültürü kullanılarak 20°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerinde belirlenen 1392.7 ve 1782.0 m/z oranına sahip peptidlerin bağıl yoğunluk değerlerinin, 25°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerinde belirlenenlere göre yüksek olduğu ( $P<0.05$ ) tespit edilmiştir.



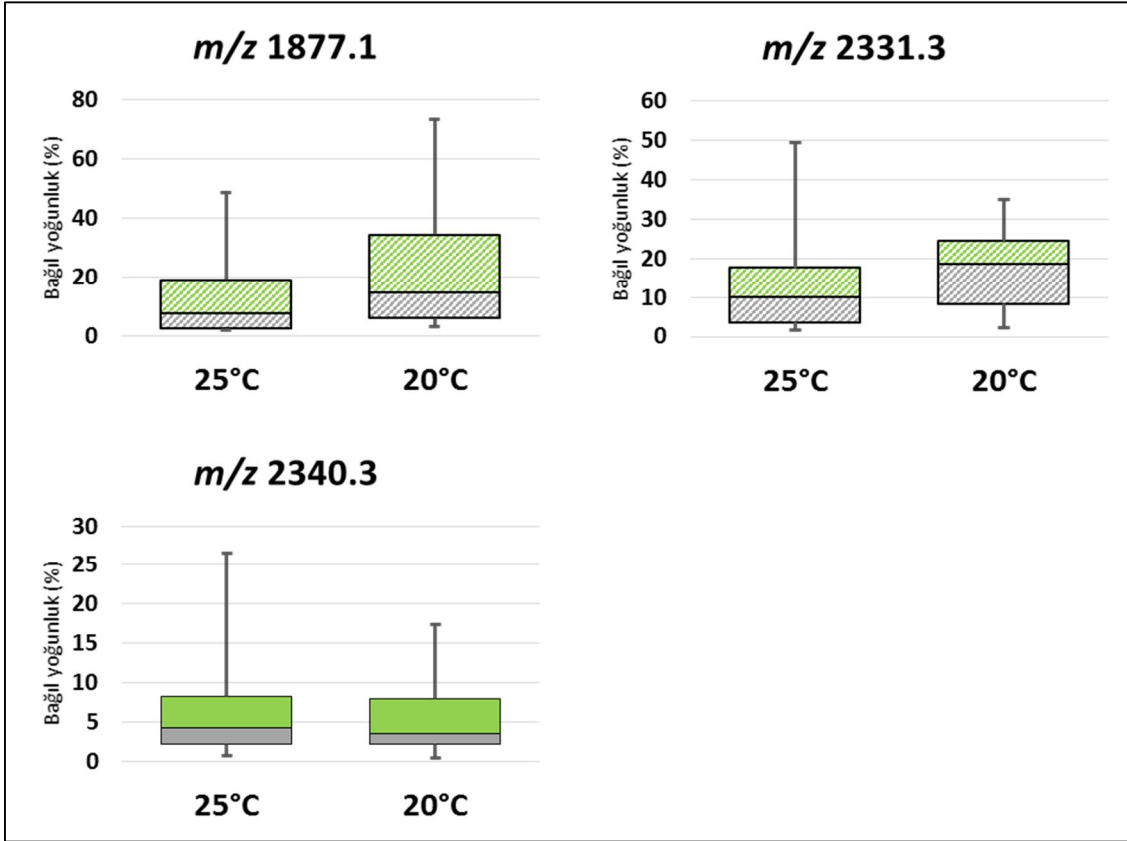
Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

Şekil 4.28a. Kefir örneklerinde belirlenen peptidler üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi



Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

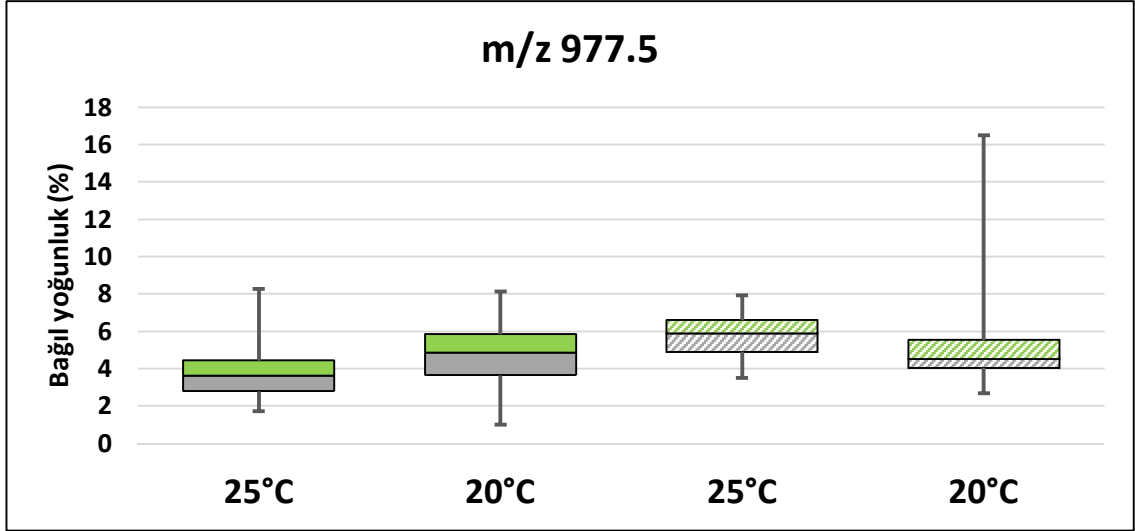
Şekil 4.28b. Kefir örneklerinde belirlenen peptidler üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi



Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

Şekil 4.28c. Kefir örneklerinde belirlenen peptidler üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi

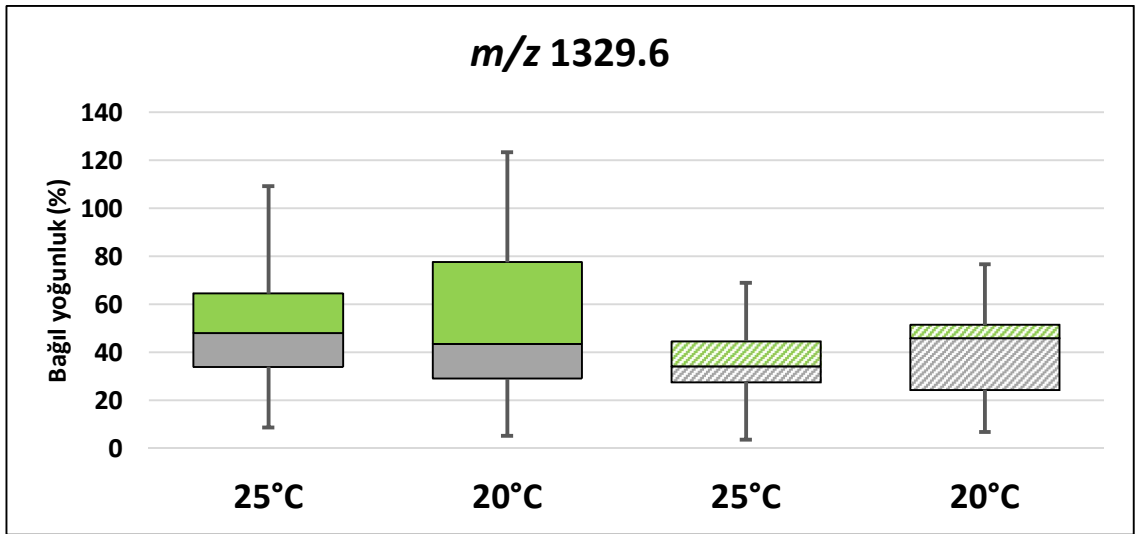
Araştırmamızda inkübasyon sıcaklığının kefir örneklerinde belirlenen biyoaktif peptidler üzerine etkisi incelendiğinde, kefir danesi kullanılarak 25°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerinde belirlenen m/z oranı 977.5 olan ve literatürde ACE inhibitörü olduğu bildirilen peptide ait bağıl yoğunluk değerlerinin, 20°C inkübasyon sıcaklığında üretilenlerde belirlenenlere göre yüksek olduğu; fakat meydana gelen bu farklılığın istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P > 0.05$ ) belirlenmiştir. Bununla birlikte inkübasyon sıcaklığının ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen söz konusu biyoaktif peptidin bağıl yoğunluk değerleri üzerinde önemli bir farklılığa neden olmadığı ( $P > 0.05$ ) görülmüştür (Şekil 4.29).



Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

Şekil 4.29. Üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının 977.5 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi

Üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının kefir örneklerinde tanımlanan ve literatürde antioksidatif olduğu bildirilen 1329.6 m/z oranına sahip peptidin bağlı yoğunluk değerleri üzerinde farklılıklara yol açtığı; fakat meydana gelen bu farklılıkların istatistiksel açıdan önemli olmadığı ( $P > 0.05$ ) tespit edilmiştir (Şekil 4.30).

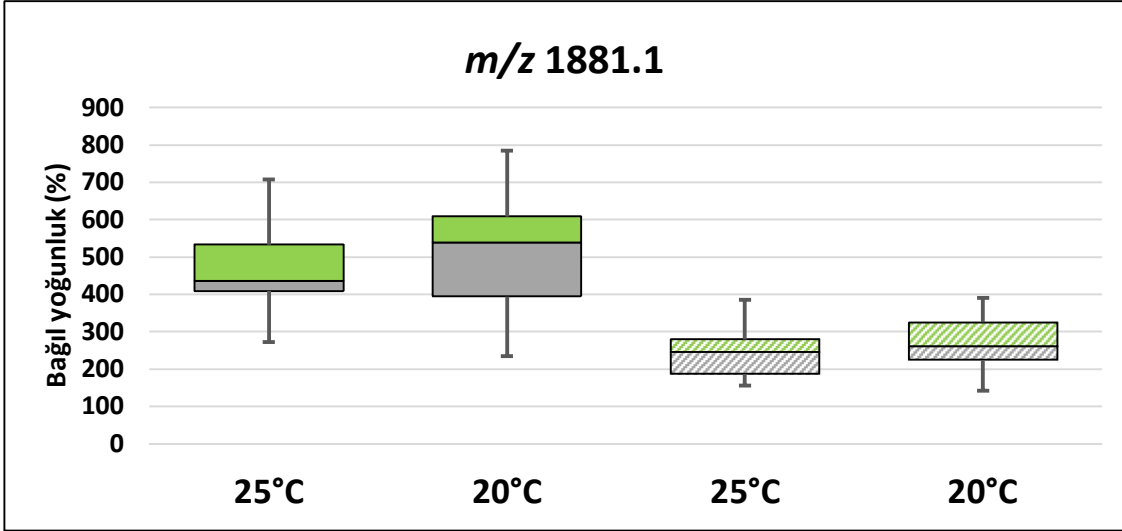


Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

Şekil 4.30. Üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının 1329.6 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi

ACE inhibisyonu, antimikrobiyal, antioksidatif ve antitrombotik etki ve immün sistemin düzenlenmesi gibi farklı biyoaktivitelere sahip olduğu bildirilen 1881.1 m/z oranına sahip peptid üzerine üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının etkisi Şekil 4.31'de görülmektedir. Kefir üretimindeki inkübasyon sıcaklığının söz konusu biyoaktif peptid üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P > 0.05$ ) tespit edilmiştir.

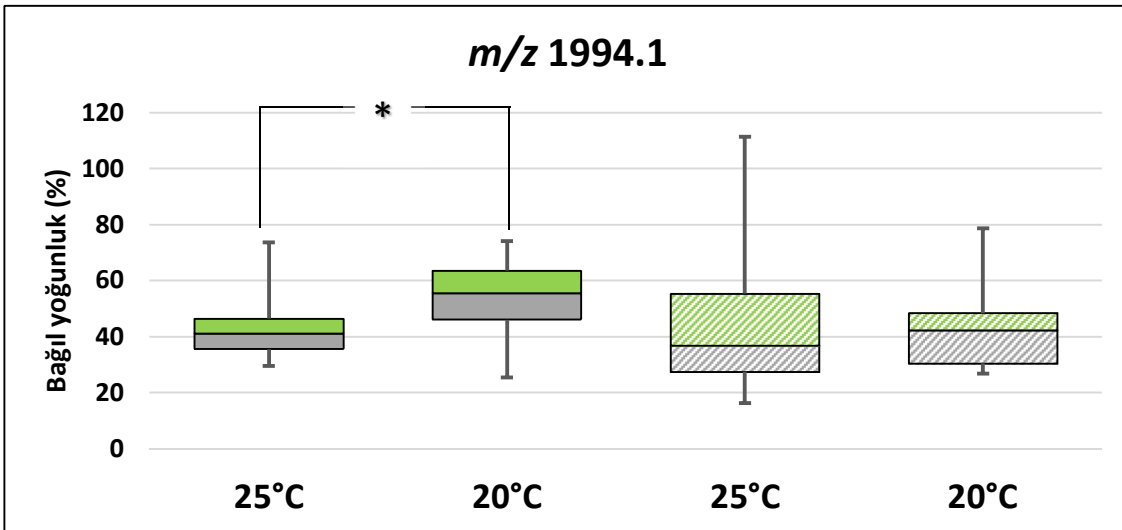




Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

Şekil 4.31. Üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının 1881.1 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi

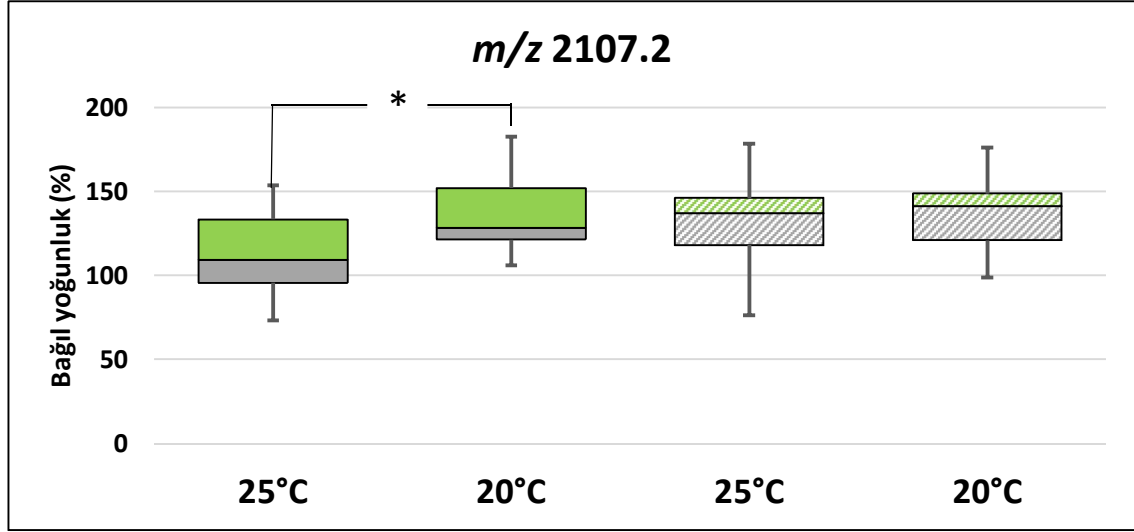
Üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının kefir örneklerinde tanımlanan ve literatürde immün düzenleyici olduğu bildirilen 1994.1 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi Şekil 4.32’de görülmektedir. Ticari kefir starter kültürü kullanılarak 20°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerinde tanımlanan söz konusu peptide ait bağıl yoğunluk değerlerinin, 25°C inkübasyon sıcaklığında üretilenlerde belirlenenlere göre yüksek olduğu ( $P < 0.05$ ) görülmüştür. Bununla birlikte kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 1994.1 m/z oranına sahip biyoaktif peptidin bağıl yoğunluk değerleri üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisinin önemli olmadığı ( $P > 0.05$ ) tespit edilmiştir.



Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

Şekil 4.32. Üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının 1994.1 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi

Üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının kefir örneklerinde tanımlanan ve literatürde ACE inhibitörü olduğu bildirilen 2107.2 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi Şekil 4.33’de görülmektedir. Ticari kefir starter kültürü kullanılarak 20°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerinde tanımlanan söz konusu peptide ait bağıl yoğunluk değerlerinin, 25°C inkübasyon sıcaklığında üretilenlerde belirlenenlere göre yüksek olduğu ( $P<0.05$ ) görülmüştür. Bununla birlikte kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 2107.2 m/z oranına sahip biyoaktif peptidin bağıl yoğunluk değerleri üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisinin önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) tespit edilmiştir.



Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

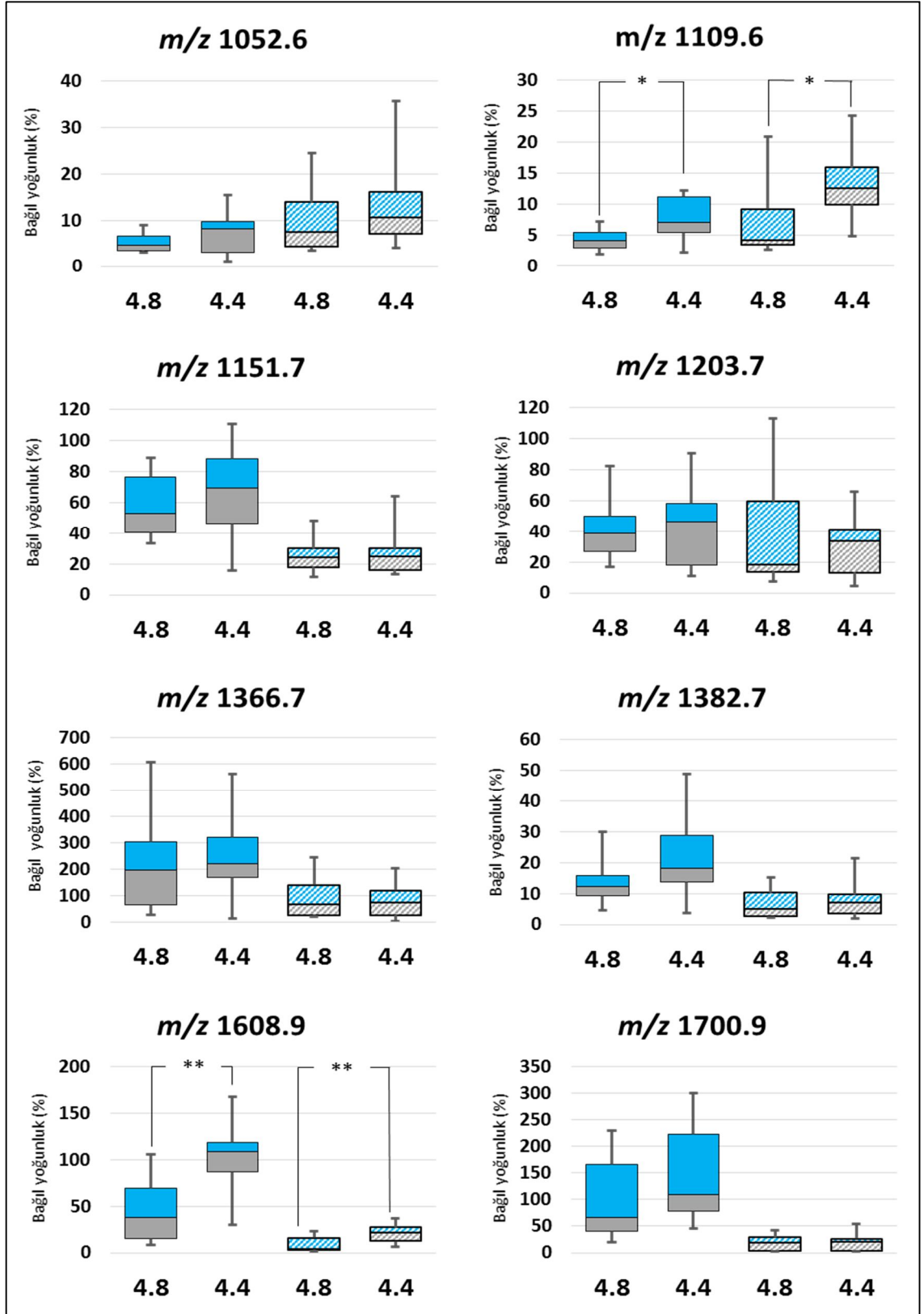
Şekil 4.33. Üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının 2107.2 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi

#### 4.5.2.3. Üretimde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH’sının kefir örneklerinin peptid profili üzerine etkisi

Araştırmamızda kefir örneklerinin üretiminde pH 4.4 ve pH 4.8 olmak üzere iki farklı inkübasyon sonlandırma pH’sı kullanılmıştır. Kefir örneklerinin peptid profili üzerine üretimde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH’sının etkisi MALDI-TOF-MS metodu kullanılarak belirlenmiştir.

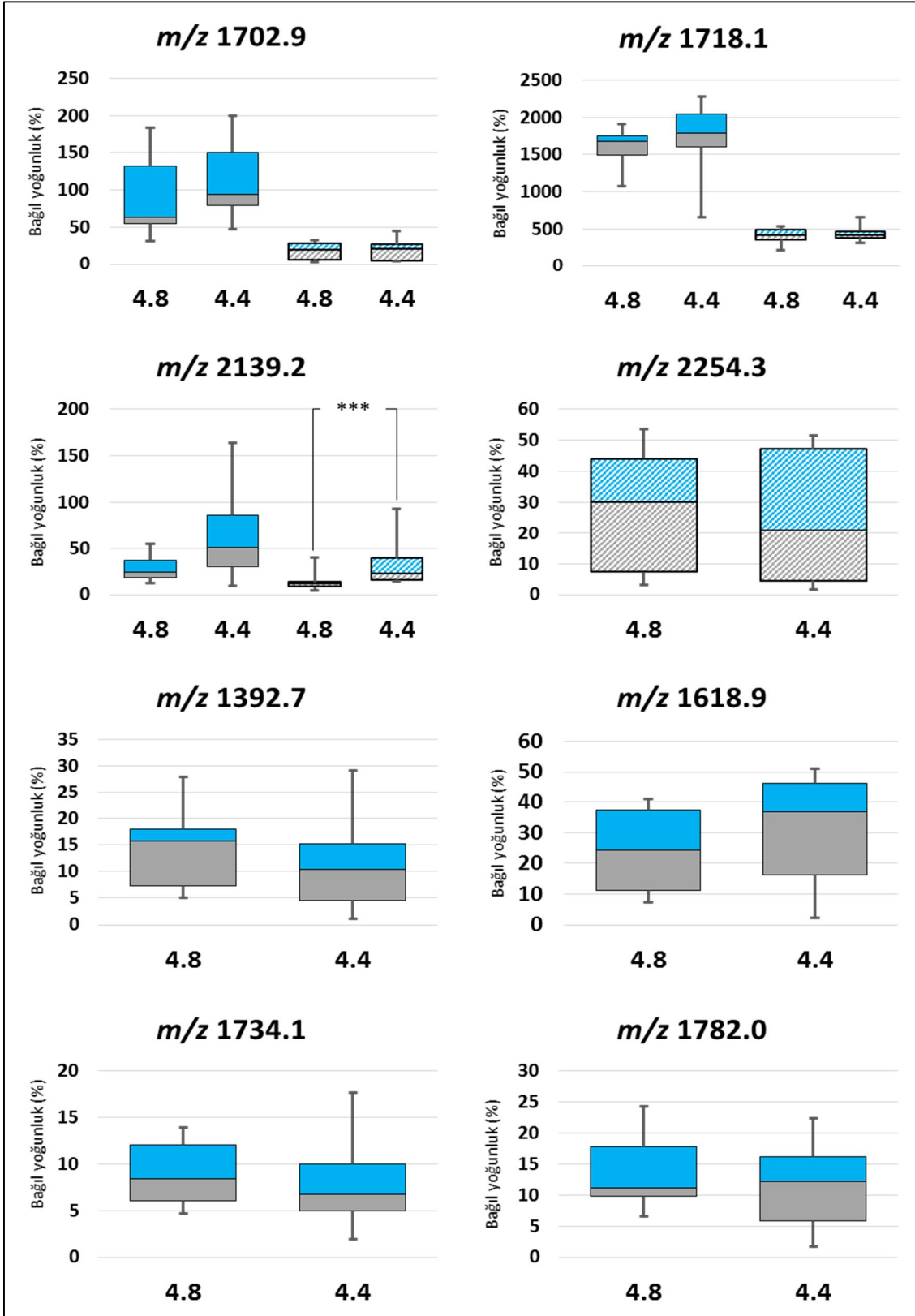
Ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 5 biyoaktif peptid haricindeki 16 peptid ile kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 5 biyoaktif peptid haricindeki 15 peptid üzerine üretimde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH’sının etkisini gösteren kutu grafikleri ve Mann-Whitney U Testi sonuçları Şekil 4.34a, 4.34b ve 4.34c’de sunulmuştur. Çalışma sonucunda üretimde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH’sının hem ticari kefir starter kültürü hem de kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 1052.6, 1151.7, 1203.7, 1366.7, 1382.7, 1608.9, 1700.9, 1702.9, 1718.1 m/z oranına sahip peptidlerin bağıl yoğunluk değerleri üzerinde farklılıklara yol açtığı; fakat meydana gelen bu farklılıkların istatistiksel açıdan önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) tespit edilmiştir. Ticari kefir starter kültürü ve kefir danesi kullanılarak inkübasyonuna pH 4.4’te son verilerek

üretilen kefir örneklerinde belirlenen 1109.5 ve 1608.9 m/z oranına sahip peptidlerin bağıl yoğunluk değerlerinin, inkübasyonuna pH 4.8'de son verilen örneklerde belirlenenlere göre yüksek olduğu ve bu farklılığın sırasıyla  $P<0.05$  ve  $P<0.01$  düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte kefir danesi kullanılarak inkübasyonuna pH 4.4'te son verilerek üretilen kefir örneklerinde belirlenen 2139.2 m/z oranına sahip peptidin bağıl yoğunluk değerlerinin, inkübasyonuna pH 4.8'de son verilen kefir örneklerine göre yüksek olduğu ( $P<0.001$ ) belirlenmiştir. Ayrıca kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 1877.1, 2254.3 ve 2331.3 m/z oranına sahip peptidler ile ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 1392.7, 1618.9, 1734.1, 2139.2 ve 2340.3 m/z oranına sahip peptidler üzerine inkübasyon sonlandırma pH'sının istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olmadığı ( $P>0.05$ ) tespit edilmiştir.



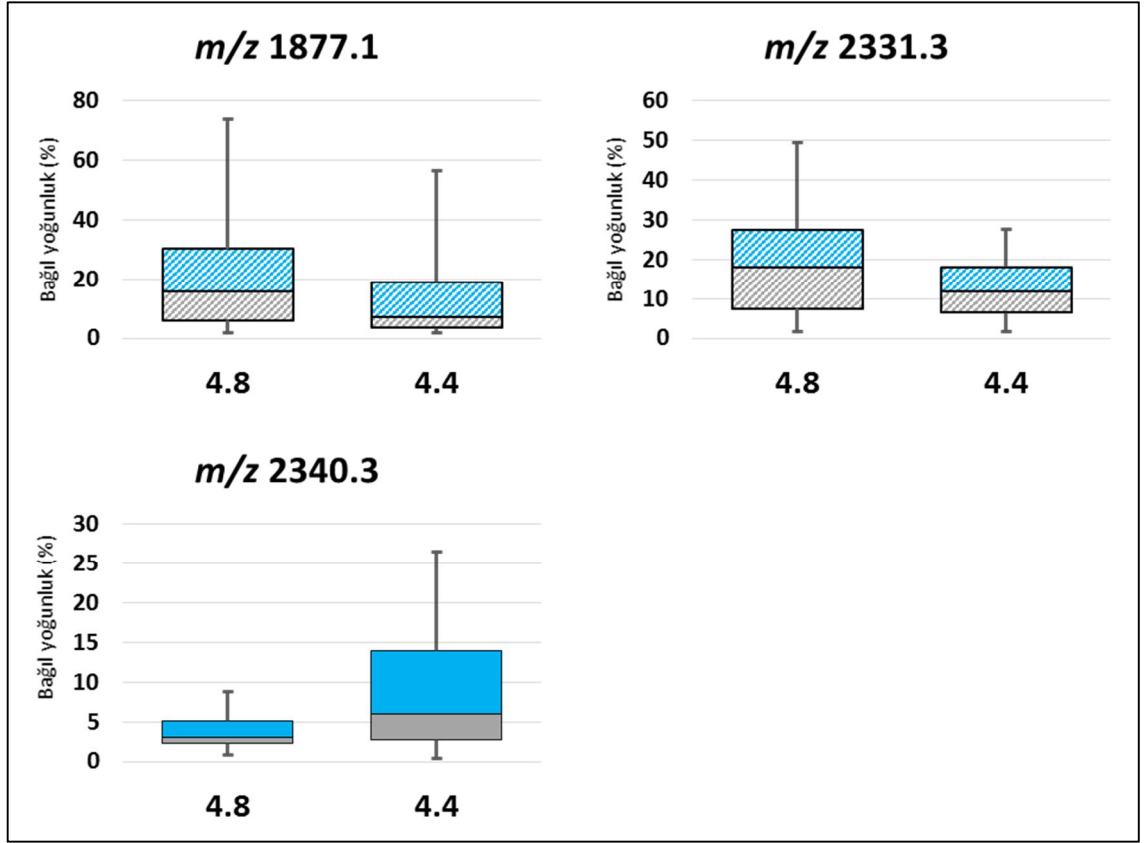
Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

Şekil 4.34a. Kefir örneklerinde belirlenen peptidler üzerine inkübasyon sonlandırma pH'sının etkisi



Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

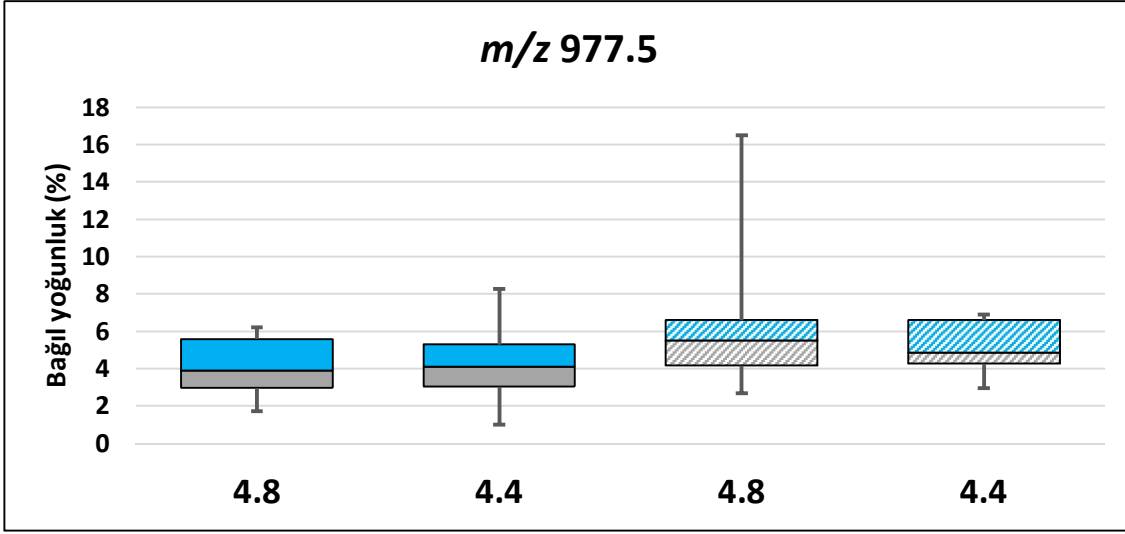
Şekil 4.34b. Kefir örneklerinde belirlenen peptidler üzerine inkübasyon sonlandırma pH'sının etkisi



Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

Şekil 4.34c. Kefir örneklerinde belirlenen peptidler üzerine inkübasyon sonlandırma pH'sının etkisi

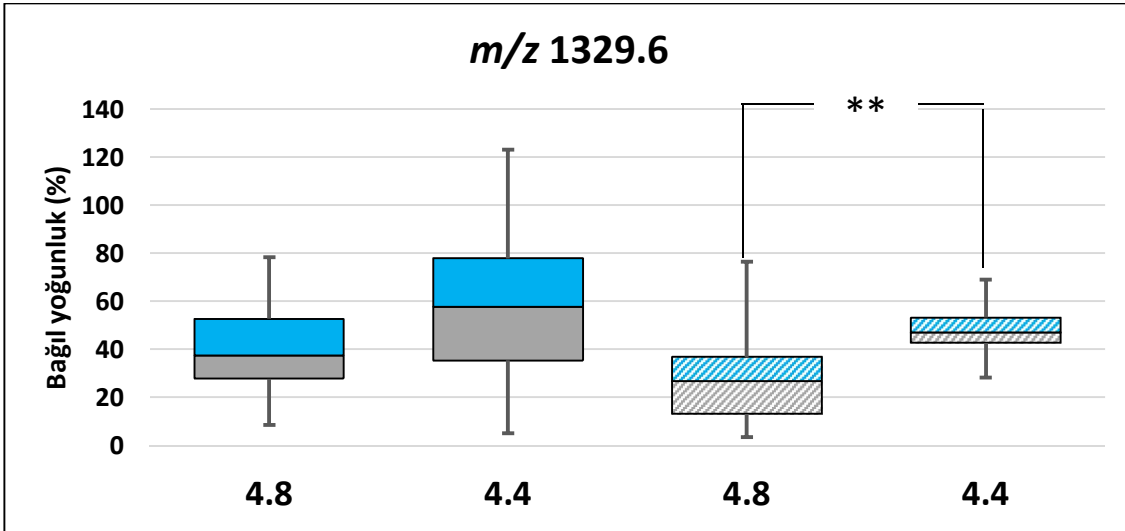
Araştırmamızda inkübasyon sonlandırma pH'sının kefir örneklerinde belirlenen biyoaktif peptidler üzerine etkisi incelendiğinde, kefir örneklerinde tanımlanan ve literatürde ACE inhibitörü olduğu bildirilen 977.5 m/z oranına sahip peptidin bağıl yoğunluk değerleri üzerine üretimde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH'sının etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P > 0.05$ ) tespit edilmiştir (Şekil 4.35).



Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

Şekil 4.35. Üretimde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH'sının 977.5 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi

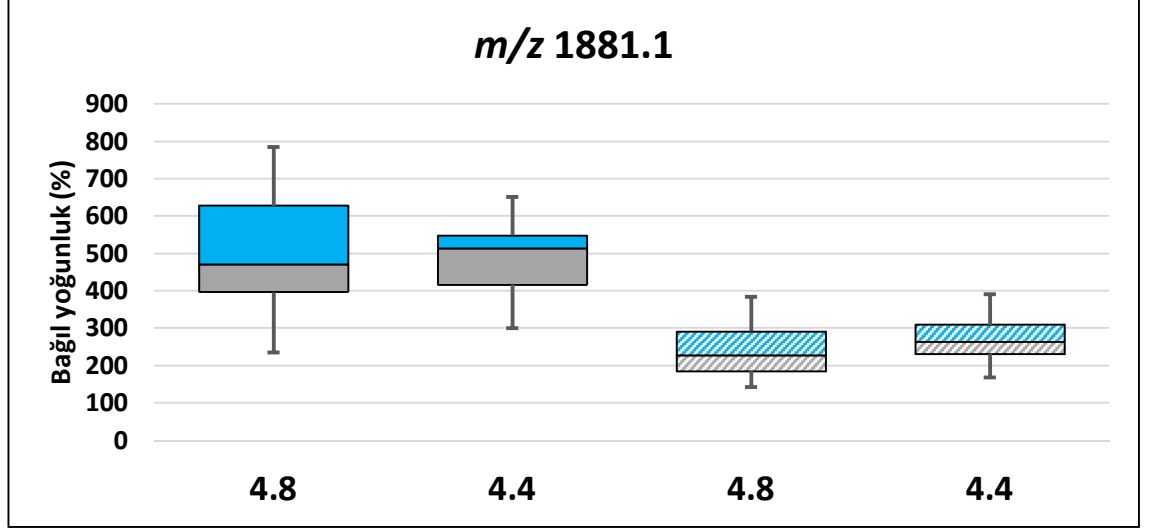
Üretimde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH'sının kefir örneklerinde tanımlanan ve literatürde antioksidatif olduğu bildirilen 1329.6 m/z oranına sahip peptidin bağıl yoğunluk değerleri üzerinde farklılıklara yol açtığı; fakat meydana gelen bu farklılıkların ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde istatistiksel açıdan önemli olmadığı ( $P > 0.05$ ) tespit edilmiştir. Kefir danesi kullanılarak inkübasyonuna pH 4.4'te son verilerek üretilen kefir örneklerinde belirlenen söz konusu peptidin bağıl yoğunluk değerlerinin, inkübasyonuna pH 4.8'de son verilen örneklerde belirlenenlere göre yüksek olduğu ( $P < 0.01$ ) belirlenmiştir (Şekil 4.36).



Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

Şekil 4.36. Üretimde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH'sının 1329.6 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi

ACE inhibisyonu, antimikrobiyal, antioksidatif ve antitrombotik etki ve immün sistemin düzenlenmesi gibi farklı biyoaktivitelere sahip olduğu bildirilen 1881.1 m/z oranına sahip peptid üzerine üretimde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH'sının etkisi Şekil 4.37'de görülmektedir. Söz konusu biyoaktif peptid üzerine inkübasyon sonlandırma pH'sının etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) tespit edilmiştir.

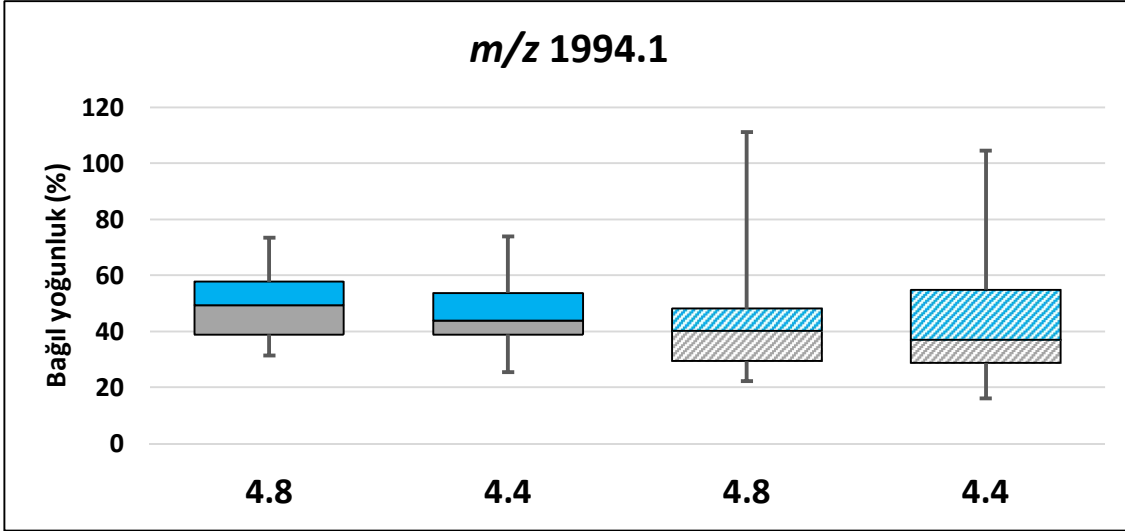


Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

Şekil 4.37. Üretimde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH'sının 1881.1 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi

Üretimde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH'sının kefir örneklerinde tanımlanan ve literatürde immün düzenleyici olduğu bildirilen 1994.1 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi Şekil 4.38'de görülmektedir. Söz konusu biyoaktif peptid üzerine inkübasyon sonlandırma pH'sının etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) tespit edilmiştir.

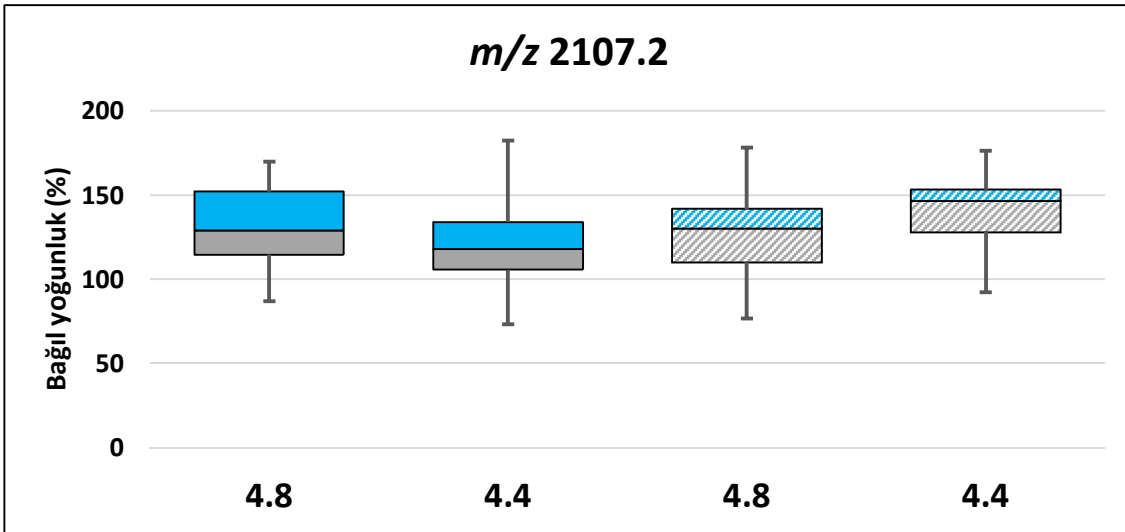




Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

Şekil 4.38. Üretimde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH'sının 1994.1 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi

Üretimde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH'sının kefir örneklerinde tanımlanan ve literatürde ACE inhibitörü olduğu bildirilen 2107.2 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P > 0.05$ ) görülmüştür (Şekil 4.39).



Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

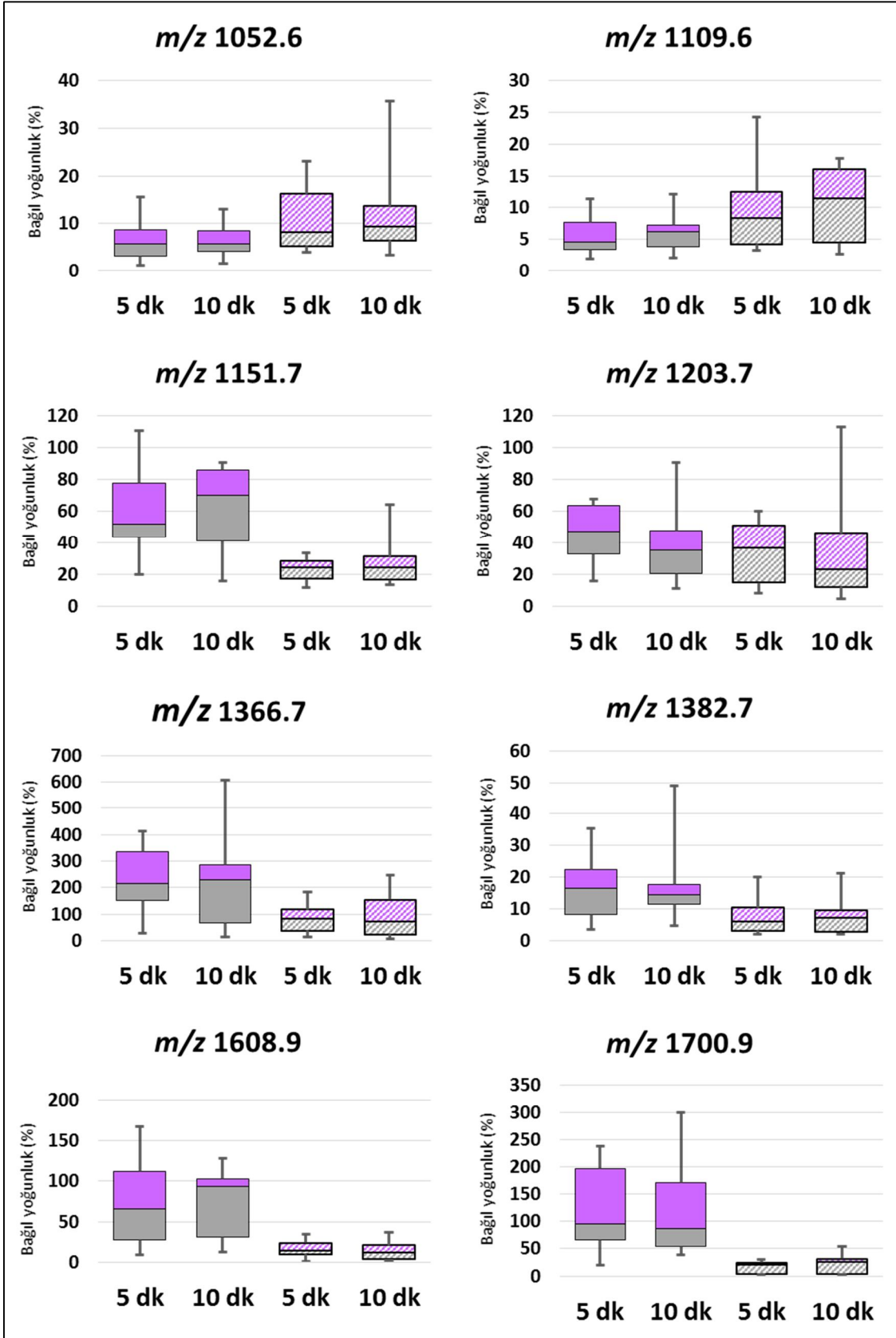
Şekil 4.39. Üretimde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH'sının 2107.2 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi

#### 4.5.2.4. Üretimde kullanılan ısı işlem normunun kefir örneklerinin peptid profili üzerine etkisi

Araştırmamızda kefir örneklerinin üretiminde 90°C'de 5 dakika ve 90°C'de 10 dakika olmak üzere iki farklı ısı işlem normu kullanılmıştır. Kefir örneklerinin peptid

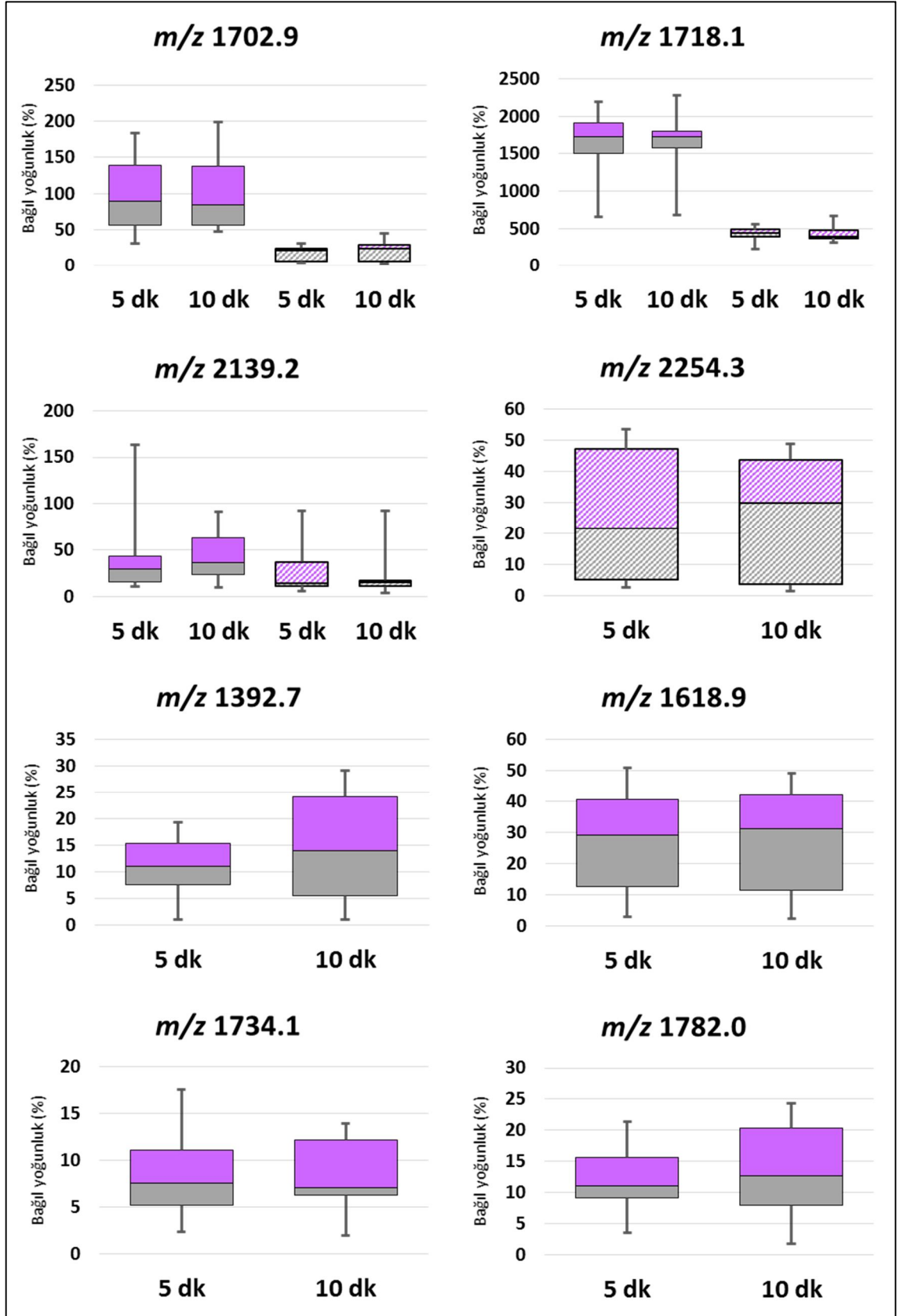
profili üzerine üretimde kullanılan ısıl işlem normunun etkisi MALDI-TOF-MS metodu kullanılarak belirlenmiştir.

Ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 5 biyoaktif peptid haricindeki 16 peptid ile kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 5 biyoaktif peptid haricindeki 15 peptid üzerine üretimde kullanılan ısıl işlem normunun etkisini gösteren kutu grafikleri ve Mann-Whitney U Testi sonuçları Şekil 4.40a, 4.40b ve 4.40c'de sunulmuştur. Çalışma sonucunda üretimde kullanılan ısıl işlem normunun hem ticari kefir starter kültürü hem de kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 1052.6, 1109.6, 1151.7, 1203.7, 1366.7, 1382.7, 1608.9, 1700.9, 1702.9, 1718.1 ve 2139.2 m/z oranına sahip peptidlerin bağıl yoğunluk değerleri üzerinde farklılıklara yol açtığı; fakat meydana gelen bu farklılıkların istatistiksel açıdan önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) tespit edilmiştir. Bununla birlikte kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 1877.1, 2254.3 ve 2331.3 m/z oranına sahip peptidler ile ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 1392.7, 1618.9, 1734.1, 1782.0 ve 2340.3 m/z oranına sahip peptidler üzerine ısıl işlem normunun istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olmadığı ( $P>0.05$ ) belirlenmiştir.



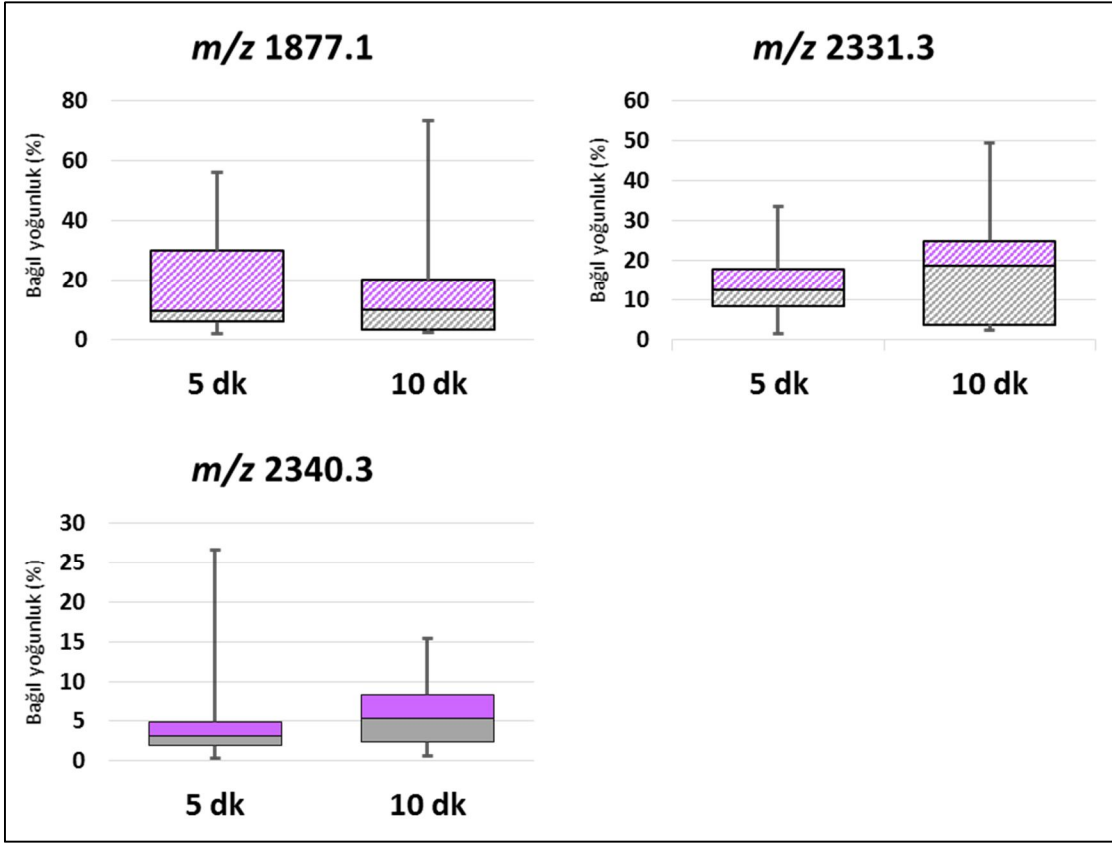
Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

Şekil 4.40a. Kefir örneklerinde belirlenen peptidler üzerine ısı işlem normunun etkisi



Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

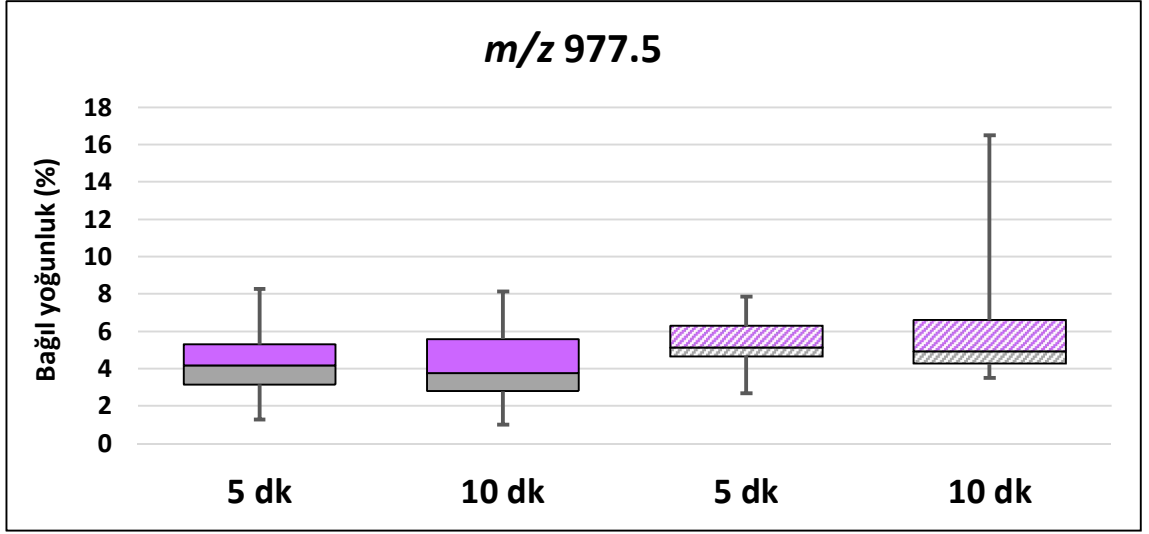
Şekil 4.40b. Kefir örneklerinde belirlenen peptidler üzerine ısıl işlem normunun etkisi



Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

Şekil 4.40c. Kefir örneklerinde belirlenen peptidler üzerine ısıl işlem normunun etkisi

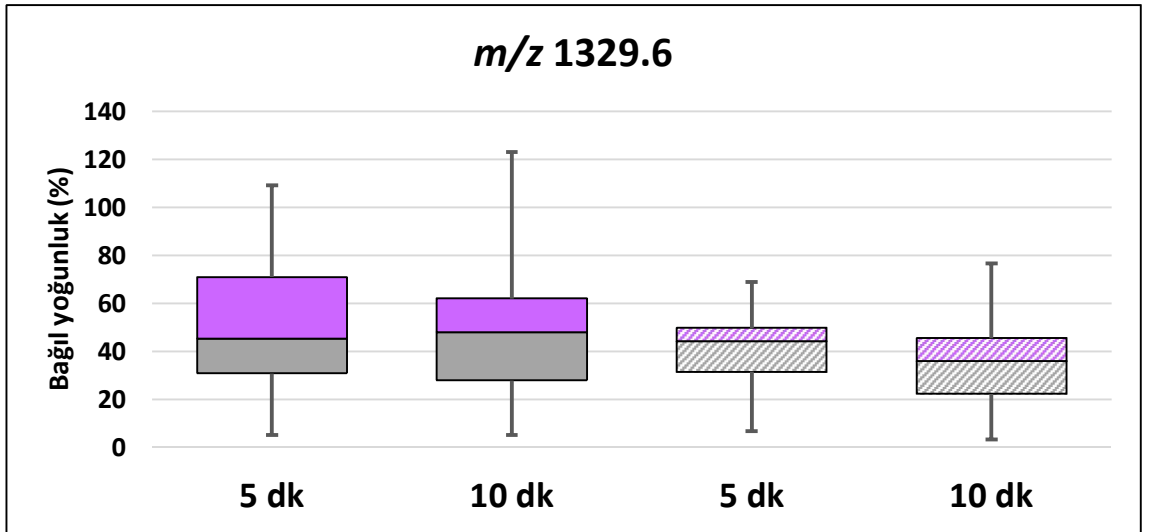
Araştırmamızda ısıl işlem normunun kefir örneklerinde belirlenen biyoaktif peptidler üzerine etkisi incelendiğinde, kefir örneklerinde tanımlanan ve literatürde ACE inhibitörü olduğu bildirilen 977.5 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine ısıl işlem normunun etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P > 0.05$ ) tespit edilmiştir (Şekil 4.41).



Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

Şekil 4.41. Üretimde kullanılan ısı işlem normunun 977.5 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi

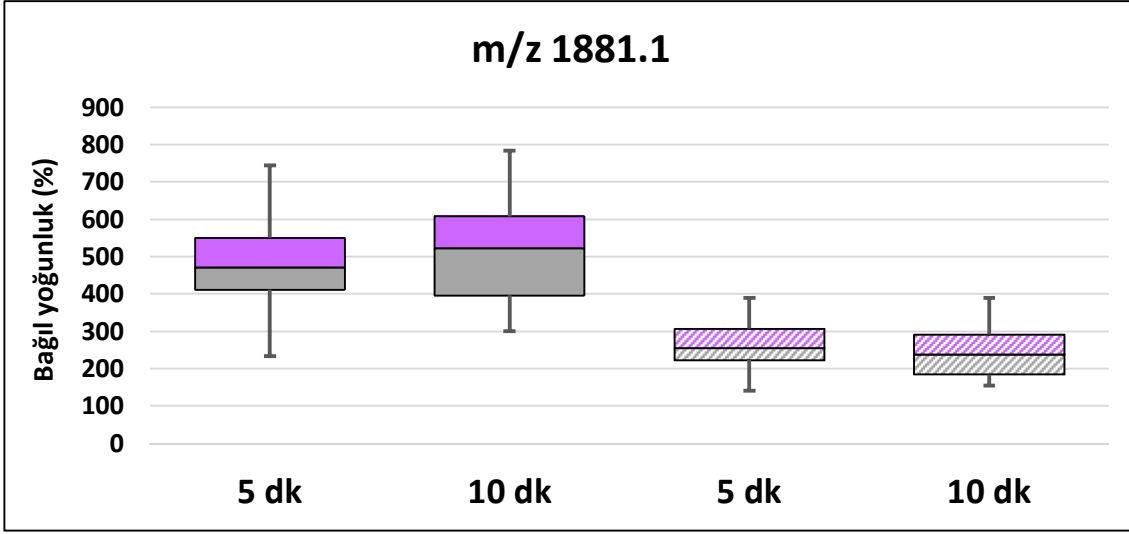
Üretimde kullanılan ısı işlem normunun kefir örneklerinde tanımlanan ve literatürde antioksidatif olduğu bildirilen 1329.6 m/z oranına sahip peptidin bağlı yoğunluk değerleri üzerinde farklılıklara yol açtığı; fakat meydana gelen bu farklılıkların istatistiksel açıdan önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) tespit edilmiştir (Şekil 4.42).



Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

Şekil 4.42. Üretimde kullanılan ısı işlem normunun 1329.6 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi

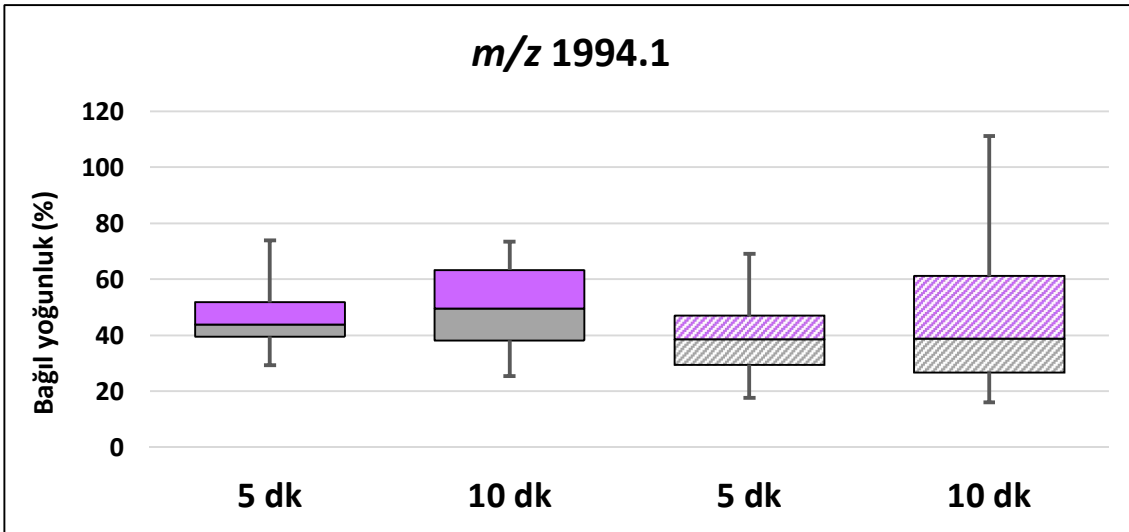
ACE inhibisyonu, antimikrobiyal, antioksidatif ve antitrombotik etki ve immün sistemin düzenlenmesi gibi farklı biyoaktivitelere sahip olduğu bildirilen 1881.1 m/z oranına sahip peptid üzerine üretimde kullanılan ısı işlem normunun etkisi Şekil 4.43'de görülmektedir. Söz konusu biyoaktif peptid üzerine ısı işlem normunun etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) tespit edilmiştir.



Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

Şekil 4.43. Üretimde kullanılan ısı işlem normunun 1881.1 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi

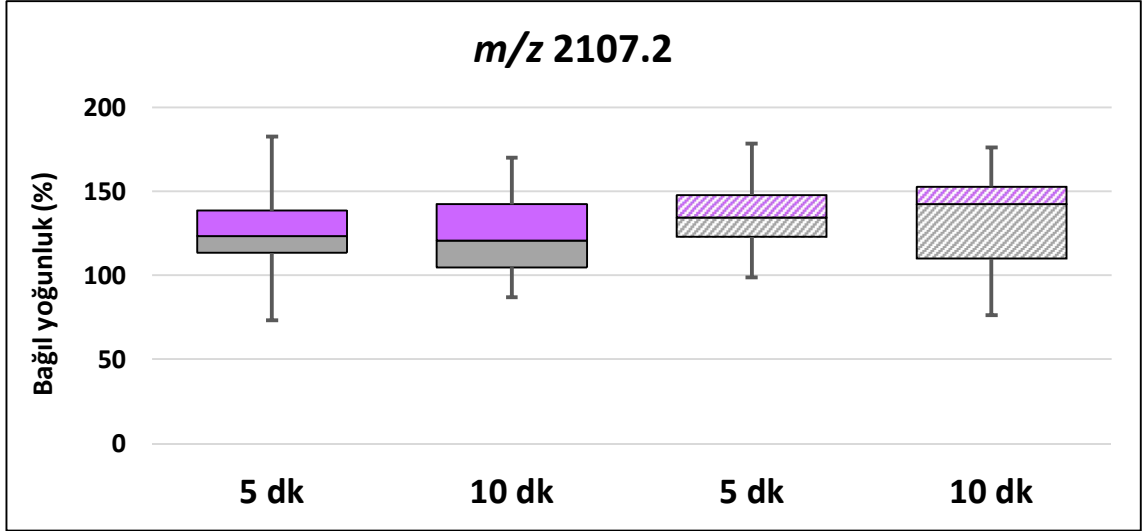
Üretimde kullanılan ısı işlem normunun kefir örneklerinde tanımlanan ve literatürde immün düzenleyici olduğu bildirilen 1994.1 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi Şekil 4.44'de görülmektedir. Söz konusu biyoaktif peptid üzerine ısı işlem normunun etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P > 0.05$ ) tespit edilmiştir.



Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

Şekil 4.44. Üretimde kullanılan ısı işlem normunun 1994.1 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi

Üretimde kullanılan ısı işlem normunun kefir örneklerinde tanımlanan ve literatürde ACE inhibitörü olduğu bildirilen 2107.2 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P > 0.05$ ) görülmüştür (Şekil 4.45).



Düz kutular ticari kefir starter kültürü kullanılarak, çizgili kutular ise kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerini göstermektedir.

Şekil 4.45. Üretimde kullanılan ısı işlem normunun 2107.2 m/z oranına sahip biyoaktif peptid üzerine etkisi

Süt; genellikle uzun raf ömrüne sahip güvenilir bir ürün elde etmek ve süt tozu veya hipoalerjenik ürünler hazırlamak amacıyla ısı işleme tabi tutulmaktadır (Meltretter vd 2008). Isıl işlemin yoğunluğuna bağlı olarak proteinlerde yapısal modifikasyonlar meydana gelerek hem teknolojik açıdan önemli olan fonksiyonel özelliklerde hem de proteinlerin biyolojik değerini etkileyen besin özelliklerinde pozitif veya negatif yönde değişimlerin ortaya çıkabildiği belirtilmektedir (Otağ ve Hayta 2013). Ayrıca ısı işlem sırasında tüm kazein fraksiyonlarının farklı yollarla degradasyonu sonucunda yüksek ve düşük molekül ağırlıklı peptidlerin oluştuğu bildirilmektedir (Morales ve Jiménes-Pérez 1998).

Isıl işlem ve depolama süresince sütün peptid profilinde meydana gelen değişimleri incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada; çiğ süt, süt endüstrisinde yaygın olarak uygulanan üç farklı sıcaklık derecesinde (72, 85 ve 120°C) ve süresinde (10, 20 ve 30 dakika) ısı işleme tabi tutulmuştur. Isıl işlemi süresince çiğ sütte mevcut olmayan 5 yeni peptidin oluştuğu tespit edilmiştir. Çiğ süte uygulanan tüm sıcaklıklarda söz konusu 5 peptid tanımlanmış olup, sadece peptid sinyal yoğunluklarında uygulanan ısı işlem sıcaklığına bağlı olarak farklılıklar oluştuğu görülmüştür. Ayrıca bu peptidlerin sinyal yoğunluklarının 30 dakikalık ısı işlem süresince arttığı belirlenmiştir. Çalışma sonucunda yeni peptidlerin oluşumunun hem ısı işlem süresine hem de uygulanan sıcaklık derecesine bağlı olduğu değerlendirilmiştir. Bununla birlikte bu çalışmada ısı işlem süresince oluşan 5 peptidin kazein fragmentasyonu sonucu oluştuğu saptanmıştır (Meltretter vd 2008). Benzer şekilde Morales ve Jiménes-Pérez (1998) tarafından yapılan bir çalışmada sütün ısı işlemi sonucunda iki yeni peptidin oluştuğu ve bu peptidlerin kazein orijinli peptidler olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda kefirde tanımlanan peptidlerin oluşumunda fermantasyonun yanı sıra ısı işleminde etkili olduğu; fakat üretimde kullanılan ısı işlem normlarının birbirine çok yakın seçilmesinden dolayı söz konusu ısı işlem normlarının kefir peptid profili üzerinde önemli bir farklılığa neden olmadığı değerlendirilmiştir.



#### 4.6. Kefir Örneklerinin Duyusal Analiz Sonuçları

Depolama süresince duyusal analizlerde elde edilen puanlar değerlendirmeye alınan nitelikler ile birlikte Çizelge 4.25’de, bu değerlere göre hazırlanan tat ve yapı ve tekstür puanlarına ait grafikler sırasıyla Şekil 4.46a ve 4.46’de, görünüş ve renk ve toplam duyusal puanlara ait grafikler ise sırasıyla Şekil 4.47a ve 4.47b’de verilmiştir. Çalışmamızda farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerinin duyusal özelliklerinin 30 günlük depolama süresince analiz edilmesi planlanmıştır. Ancak depolamanın 15. gününden itibaren kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinin yüzeyinde gelişen küf nedeni ile örneklerin panelistler tarafından kabul edilebilirliği azalmış olup, söz konusu örneklerin duyusal analizleri depolamanın 15. gününde sonlandırılmıştır. Bununla birlikte ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinin yüzeyinde herhangi bir küf gelişimi gözlenmemiş olup, söz konusu örneklerin duyusal özellikleri depolama süresince analiz edilebilmiştir.

Çizelge 4.25’de 30 günlük depolama süresince yapılan duyusal analizlerde ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinin tat bakımından 10 tam puan üzerinden 8.1 ile 10.0, yapı ve tekstür bakımından 5 tam puan üzerinden 4.1 ile 4.9, görünüş ve renk bakımından 5 tam puan üzerinden 3.8 ile 5.0 ve toplamda 20 tam puan üzerinden 16.0 ile 19.7 arasında değişen puanlarla değerlendirildikleri görülmektedir. Bununla birlikte 15 günlük depolama periyodu süresince kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinin tat puanlarının 8.1 ile 9.8 arasında, yapı ve tekstür puanlarının 4.5 ile 4.9 arasında, görünüş ve renk puanlarının 4.2 ile 4.7 arasında ve toplam puanlarının 16.9 ile 19.2 arasında değiştiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.25. Kefir örneklerinin duyuşal özellikleri (X±StdS)

Ürün çeşidi	Depolama süresi (gün)	Tat (Tam puan 10)	Yapı ve tekstür (Tam puan 5)	Görünüş ve renk (Tam puan 5)	Toplam (Tam puan 20)
S2054	1	9.9±0.0	4.9±0.1	5.0±0.0	19.7±0.1
	15	9.5±0.4	4.5±0.0	4.5±0.1	18.6±0.5
	30	8.5±0.4	4.4±0.1	4.4±0.2	17.2±0.8
S2014	1	9.7±0.1	4.8±0.0	4.8±0.0	19.3±0.1
	15	9.8±0.2	4.5±0.0	4.4±0.2	18.7±0.1
	30	8.5±0.1	4.3±0.0	4.1±0.0	17.0±0.1
S2058	1	9.7±0.1	4.4±0.5	4.6±0.5	18.7±0.9
	15	9.3±0.5	4.1±0.0	4.0±0.2	17.3±0.8
	30	8.1±0.0	4.1±0.0	3.8±0.0	16.0±0.0
S2018	1	9.6±0.4	4.5±0.1	4.6±0.4	18.7±0.6
	15	9.6±0.2	4.4±0.1	4.5±0.4	18.4±0.5
	30	8.7±0.1	4.3±0.4	4.2±0.1	17.3±0.4
S2554	1	9.7±0.1	4.9±0.1	4.9±0.1	19.5±0.1
	15	9.4±0.1	4.5±0.2	4.4±0.4	18.3±0.0
	30	8.2±0.2	4.6±0.0	3.9±0.3	16.6±0.1
S2514	1	9.6±0.3	4.7±0.3	5.0±0.1	19.3±0.5
	15	9.4±0.6	4.5±0.2	4.6±0.5	18.4±1.3
	30	8.3±0.7	4.6±0.2	4.2±0.2	17.1±0.3
S2558	1	9.6±0.4	4.6±0.2	4.5±0.1	18.7±0.7
	15	9.1±0.3	4.3±0.1	4.2±0.2	17.6±0.4
	30	8.5±0.8	4.3±0.3	4.1±0.3	16.9±1.4
S2518	1	10.0±0.0	4.8±0.1	4.9±0.1	19.6±0.0
	15	9.7±0.0	4.6±0.2	4.6±0.4	18.9±0.5
	30	8.5±0.1	4.6±0.4	4.0±0.7	17.1±0.9

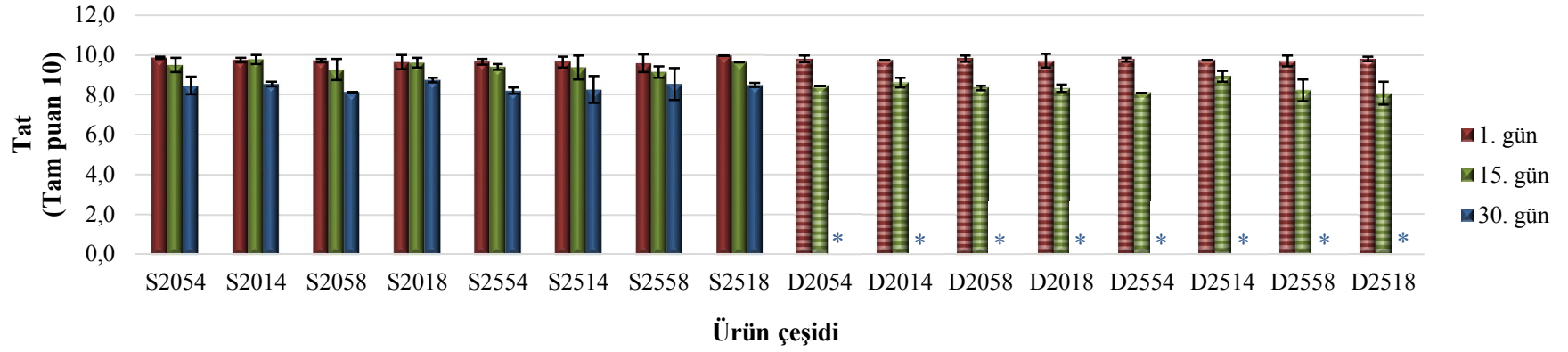
Devamı arkada

Çizelge 4.25'in devamı

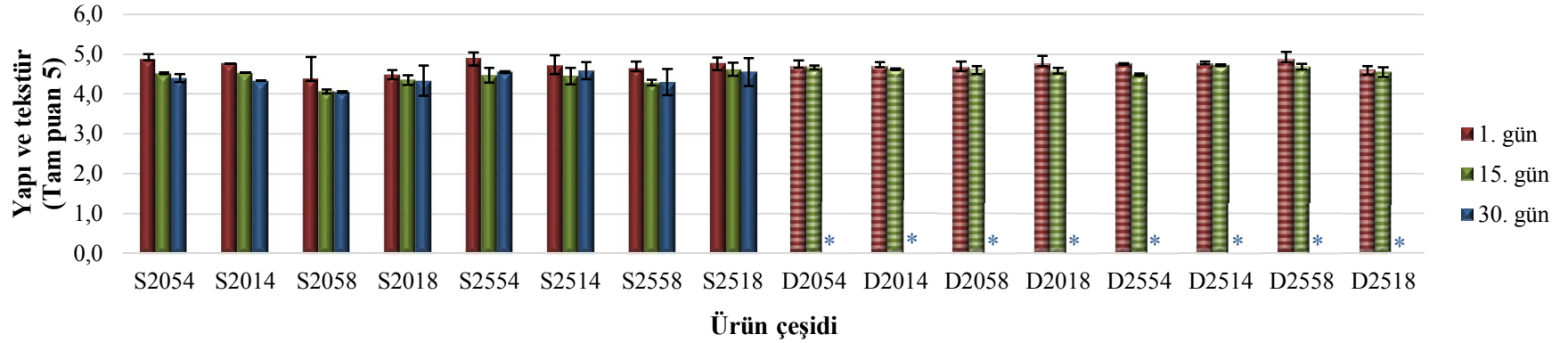
D2054	1	9.8±0.2	4.7±0.1	4.6±0.4	19.1±0.7
	15	8.5±0.0	4.7±0.0	4.4±0.2	17.5±0.3
	30	*	-	-	-
D2014	1	9.7±0.0	4.7±0.1	4.5±0.3	18.9±0.2
	15	8.6±0.2	4.6±0.0	4.3±0.0	17.5±0.2
	30	-	-	-	-
D2058	1	9.8±0.2	4.7±0.1	4.4±0.2	18.9±0.5
	15	8.3±0.1	4.6±0.1	4.3±0.0	17.3±0.0
	30	-	-	-	-
D2018	1	9.7±0.3	4.8±0.2	4.5±0.2	18.9±0.7
	15	8.3±0.2	4.6±0.1	4.2±0.1	17.1±0.4
	30	-	-	-	-
D2554	1	9.8±0.1	4.8±0.0	4.6±0.4	19.1±0.5
	15	8.1±0.0	4.5±0.0	4.4±0.1	17.0±0.1
	30	-	-	-	-
D2514	1	9.7±0.0	4.8±0.0	4.7±0.1	19.2±0.2
	15	8.9±0.3	4.7±0.0	4.5±0.2	18.2±0.0
	30	-	-	-	-
D2558	1	9.7±0.3	4.9±0.2	4.6±0.1	19.2±0.5
	15	8.2±0.5	4.7±0.1	4.5±0.1	17.4±0.6
	30	-	-	-	-
D2518	1	9.8±0.1	4.6±0.1	4.5±0.2	18.9±0.2
	15	8.1±0.6	4.6±0.1	4.3±0.1	16.9±0.6
	30	-	-	-	-

\*tespit edilemedi

a)



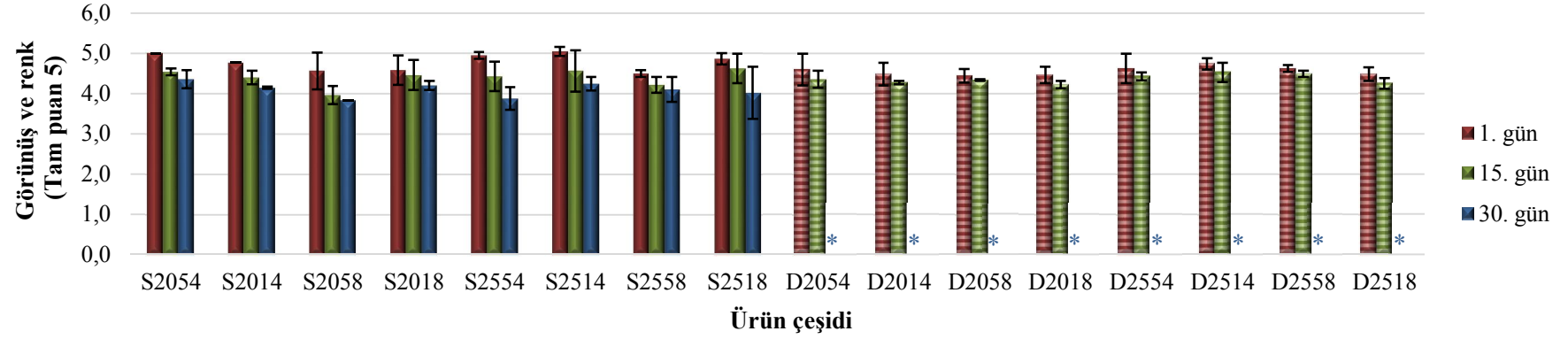
b)



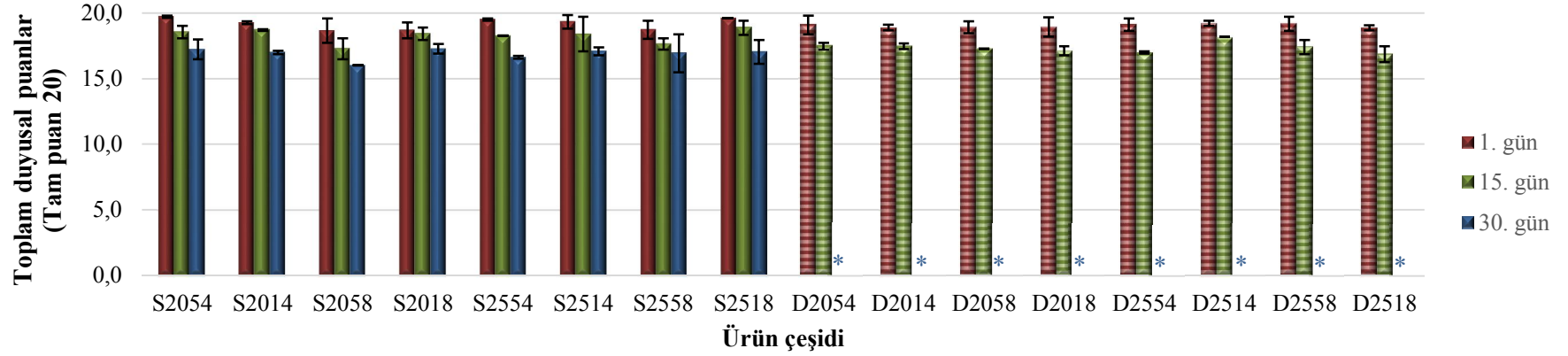
\*tespit edilemedi

Şekil 4.46. Kefir örneklerinin depolama süresince a) tat b) yapı ve tekstür puanlarına ait değişim

a)



b)



\*tespit edilemedi

Şekil 4.47. Kefir örneklerinin depolama süresince a) görünüş ve renk b) toplam duyuşsal puanlarına ait değişim

Kefir örneklerinin tat, yapı, görünüş ve toplam duyuşal puanlarının istatistiksel analizi sonucunda, incelenen ana varyasyon kaynaklarından starter kültür çeşidinin  $P<0.001$  düzeyinde örneklerin tat ve toplam duyuşal puanları üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir. Kefir örneklerinin yapı ve tekstür ile görünüş ve renk puanları üzerine ise starter kültür çeşidinin etkisinin sırasıyla  $P<0.01$  ve  $P<0.05$  düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının  $P<0.05$  düzeyinde örneklerin görünüş ve renk değerleri üzerine etkili olduğu; fakat örneklerin tat, yapı ve tekstür ve toplam duyuşal puanları üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) görülmüştür. Inkübasyon sonlandırma pH'sının örneklerin görünüş ve renk puanları üzerine  $P<0.01$ , örneklerin yapı ve tekstür ve toplam duyuşal puanları üzerine ise  $P<0.05$  düzeyinde etkili olduğu; fakat örneklerin tat puanları üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) saptanmıştır. Bununla birlikte kefir örneklerinin tat, yapı ve tekstür, görünüş ve renk ve toplam duyuşal puanları üzerine depolama süresinin etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu ( $P<0.001$ ), ısıl işlem normunun etkisinin ise istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) tespit edilmiştir (Çizelge 4.26).

Çizelge 4.26. Kefir örneklerinin duyuasal niteliklerine ait varyans analiz sonuçları

Ana Varyasyon Kaynakları	SD	Tat puanı		Yapı ve tekstür puanı		Görünüş ve renk puanı		Toplam duyuasal puan	
		KO	F	KO	F	KO	F	KO	F
Starter Kültür	1	4.4521	28.88***	0.2233	7.75**	0.2601	5.29*	4.5850	15.78***
İnkübasyon Sıcaklığı	1	0.0885	0.57	0.0613	2.13	0.2162	4.40*	0.1754	0.60
Sonlandırma pH'sı	1	0.1225	0.79	0.1806	6.27*	0.4096	8.33**	2.0200	6.95*
Isıl İşlem normu	1	0.2500	1.62	0.0116	0.40	0.0240	0.49	0.5795	1.99
Depolama Zamanı	1	10.6276	68.95***	0.6400	22.22***	1.2996	26.42***	26.9231	92.64***
Hata	58	0.1541		0.0288		0.0492		0.2906	

\*P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001 düzeyinde önemli

Kefir örneklerine ait ortalama tat, yapı ve tekstür, görünüş ve renk ve toplam duyuşsal puanlarının Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Tablo 4.27'de verilmiştir.

Çizelge 4.27. Kefir örneklerinin duyuşsal niteliklerine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ( $\bar{X} \pm \text{StdH}$ )

	Tat (Tam puan 10)	Yapı ve tekstür (Tam puan 5)	Görünüş ve renk (Tam puan 5)	Toplam (Tam puan 20)
<b>Starter Kültür</b>				
Ticari kefir starter kültürü	9.6 <sup>a</sup> ±0.1	4.6 <sup>b</sup> ±0.1	4.6 <sup>a</sup> ±0.1	18.7 <sup>a</sup> ±0.1
Kefir danesi	9.1 <sup>b</sup> ±0.1	4.7 <sup>a</sup> ±0.0	4.5 <sup>b</sup> ±0.0	18.2 <sup>b</sup> ±0.2
<b>İnkübasyon Sıcaklığı</b>				
20°C	9.4 <sup>a</sup> ±0.1	4.6 <sup>a</sup> ±0.0	4.5 <sup>b</sup> ±0.1	18.4 <sup>a</sup> ±0.2
25°C	9.3 <sup>a</sup> ±0.1	4.6 <sup>a</sup> ±0.0	4.6 <sup>a</sup> ±0.1	18.5 <sup>a</sup> ±0.2
<b>Sonlandırma pH'sı</b>				
pH 4.4	9.4 <sup>a</sup> ±0.1	4.7 <sup>a</sup> ±0.0	4.6 <sup>a</sup> ±0.1	18.6 <sup>a</sup> ±0.2
pH 4.8	9.3 <sup>a</sup> ±0.1	4.6 <sup>b</sup> ±0.0	4.4 <sup>b</sup> ±0.1	18.3 <sup>b</sup> ±0.2
<b>Isıl İşlem Normu</b>				
90°C / 5 dakika	9.3 <sup>a</sup> ±0.1	4.6 <sup>a</sup> ±0.0	4.5 <sup>a</sup> ±0.1	18.4 <sup>a</sup> ±0.2
90°C / 10 dakika	9.4 <sup>a</sup> ±0.1	4.6 <sup>a</sup> ±0.0	4.5 <sup>a</sup> ±0.1	18.6 <sup>a</sup> ±0.2
<b>Depolama Zamanı</b>				
1. Gün	9.7 <sup>a</sup> ±0.0	4.7 <sup>a</sup> ±0.0	4.7 <sup>a</sup> ±0.0	19.1 <sup>a</sup> ±0.1
15. Gün	8.9 <sup>b</sup> ±0.1	4.5 <sup>b</sup> ±0.0	4.4 <sup>b</sup> ±0.0	17.8 <sup>b</sup> ±0.1

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $P < 0.05$ ).

Kefir örneklerinin tat özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla yapılan değerlendirmede üretimlerinde örneklerin tat puanları depolama süresince azalmış olup, söz konusu azalmaların istatistiksel olarak önemli ( $P < 0.05$ ) olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.27). Depolama sırasında örneklere verilmiş olan tat puanlarındaki azalmanın sebebi, depolama süresi uzadıkça ortamda bulunan maya sayısının artması ve dolayısı ile kefir örneklerinde oluşan keskin maya tadının hissedilmiş olmasıdır.

Farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerine verilen yapı ve tekstür puanları incelendiğinde, ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinin yapı ve tekstür puanlarının kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinden daha düşük olduğu ( $P < 0.05$ ) olduğu tespit edilmiştir. Üretimlerinde inkübasyon sonlandırma pH'sı olarak pH 4.4 seçilen örneklere ait yapı puanlarının üretimlerinde inkübasyon sonlandırma pH'sı olarak pH 4.8 seçilen örneklere göre yüksek olduğu saptanmıştır. Kefir örneklerinin yapı ve tekstür puanlarının depolama boyunca azaldığı ve meydana gelen bu azalma istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $P < 0.05$ ) (Çizelge 4.27).



Duyusal değerlendirmede dikkate alınan diğer bir nitelik olan örneklere görünüş ve renk bakımından verilmiş olan puanlar değerlendirildiğinde ise, ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinin görünüş puanlarının kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine göre yüksek olduğu ( $P<0.05$ ) tespit edilmiştir. İnkübasyon sıcaklığı olarak 20°C seçilen kefir örneklerinin görünüş ve tekstür puanlarının 25°C inkübasyon sıcaklığında üretilen örneklere göre düşük olduğu ( $P<0.05$ ) belirlenmiştir. Ayrıca üretimlerinde inkübasyon sonlandırma pH'sı olarak pH 4.4 seçilen örneklere ait görünüş ve tekstür puanlarının üretimlerinde inkübasyon sonlandırma pH'sı olarak pH 4.8 seçilen örneklere göre yüksek olduğu saptanmıştır. Örneklerin görünüş ve tekstür puanları depolama süresince azalmış olup, söz konusu azalmaların istatistiksel olarak önemli ( $P<0.05$ ) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.27).

Kefir örneklerine panelist grup tarafından verilmiş olan toplam duyusal puanların istatistiki olarak değerlendirilmesi amacıyla yapılan çalışmada, ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerine verilen toplam duyusal puanların kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine verilen puanlara göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca üretimlerinde inkübasyon sonlandırma pH'sı olarak pH 4.4 seçilen örneklere ait toplam duyusal puanların üretimlerinde inkübasyon sonlandırma pH'sı olarak pH 4.8 seçilen örneklere ait olanlara göre yüksek olduğu görülmüştür. Örneklere panelistler tarafından verilen toplam duyusal puanlar depolama süresince azalmış olup, söz konusu azalmaların istatistiksel olarak önemli ( $P<0.05$ ) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.27).

Kefir örneklerinin duyusal değerlendirilmesinde, panelistler tarafından ticari kefir starter kültürü kullanılarak ve üretim sırasında inkübasyon sonlandırma pH'sı olarak pH 4.4 seçilerek üretilen örneklerin diğer örneklere göre daha fazla beğenildiği belirlenmiştir. İçermiş olduğu mikroorganizmaların çeşitliliği ve değişkenliğinden dolayı kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinin, seçilmiş mikroorganizmalar içeren kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerine göre panelistlerce daha az beğenildiği düşünülmektedir. Bu bağlamda çalışmamız ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen örneklerinin kefir danesi kullanılarak üretilenlere kıyasla daha fazla beğenildiğini tespit eden çalışmalar (Ender 2009, Kök-Taş vd 2013) ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerinin depolanması sırasında zamana bağlı olarak verilen toplam puanlarda düşme meydana gelmiştir. En yüksek duyusal puanlar, depolamanın 1. gününde yapılan duyusal analizlerde; en düşük puanlar ise ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde depolamanın 30. gününde, kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde ise depolamanın 15. gününde belirlenmiştir. Kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinin 30. gün duyusal analizleri ise yapılamamıştır. Literatürde kefir danesi kullanılarak üretilen kefirin raf ömrünün 3 ile 12 gün arasında değiştiğini, ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefirin ise raf ömrünün 28 güne kadar çıkabildiği bildirilmektedir (Karagözlü vd 2007). Irigoyen vd (2005) tarafından yapılan çalışmada da kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinin duyusal analizlerinin 28 günlük depolama süresince yapılması planlanmış, ancak örneklerin yüzeyinde gelişen küf nedeni ile duyusal analizlere depolamanın 14. gününde son verilmiştir. Farklı fermantasyon parametrelerinin kefirin kalite karakteristikleri üzerine etkisinin incelendiği bir başka çalışmada ise kefir danesi kullanılarak üretilen örneklerin duyusal kabul edilebilirliğinin azalması nedeni ile 21

günlük depolama süresince yapılması planlanmış olan duyuşal analizlere depolamanın 14. gününde son verilmiştir (Kök-Taş 2010).

## 5. SONUÇ

Bu çalışmada, kefir danesi ve ticari kefir starter kültürü kullanılarak ve üretim sırasında farklı ısı işlem normları (90°C'de 5 dakika ve 90°C'de 10 dakika), inkübasyon sıcaklıkları (20 ve 25°C) ile inkübasyon sonlandırma pH'ları (pH 4.4 ve pH 4.8) uygulanarak kefir üretilmiş ve üretilen kefir örneklerinin üretim sonrası ve 4°C'de depolama sırasında fizikokimyasal, reolojik, mikrobiyolojik ve duyu özellikleri belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada, farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerinin peptid ve biyoaktif peptid profili ortaya konulmuş ve kefir üretim parametrelerinin söz konusu peptid profilleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonunda elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

1. Farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerine ait kurumadde ve kül değerleri sadece depolamanın ilk gününde belirlenmiş olup, 25°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerine ait kurumadde değerlerinin, 20°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerine göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Üretimde kullanılan starter kültür çeşidi, inkübasyon sonlandırma pH'sı ve ısı işlem normunun örneklerin kurumadde değerleri üzerine etkisinin önemli olmadığı saptanmıştır. Benzer şekilde üretimde incelenen üretim parametrelerinin kefir örneklerinin kül değerleri üzerine önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

2. Farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerinin pH ve titrasyon asitliği değerleri depolama süresince belirlenmiş olup, üretimlerinde ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerine ait pH değerlerinin kefir danesi kullanılarak üretilen örneklere göre düşük olduğu, titrasyon asitliği değerlerinin ise yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca incelenen üretim parametrelerinden inkübasyon sonlandırma pH'sının kefir örneklerinin pH ve titrasyon asitliği değerleri üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Kefir örneklerinin pH değerlerinin, depolamanın ilk 15 gününde titrasyon asitliği değerlerinin artmasına paralel olarak azaldığı; depolamanın 15. gününden itibaren ise pH değerlerinin tekrar artmaya, titrasyon asitliği değerlerinin ise azalmaya başladığı ve depolamanın 1. ve 30. gününde elde edilen pH ve titrasyon asitliği değerlerinin benzer olduğu belirlenmiştir. İncelenen üretim parametrelerinden ısı işlem normunun örneklerin pH ve titrasyon asitliği değerleri üzerinde herhangi bir farklılığa neden olmadığı saptanmıştır. Bununla birlikte farklı inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerinin pH değerlerinin benzer olduğu saptanmıştır.

3. Proteinlerdeki parçalanmanın bir göstergesi olan proteolitik aktivite değeri, tüm örneklerde depolama süresince artmıştır. Depolama süresince ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen proteolitik aktivite değerleri kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerine göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığı ve ısı işlem süresi arttıkça üretilen kefir örneklerine ait proteolitik aktivite değerlerinin arttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte farklı inkübasyon sonlandırma pH'sı kullanılarak üretilen kefir örneklerine ait proteolitik aktivite değerleri arasında ise bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir.

4. Kefir örnekleri arasında tüm depolama süresi göz önüne alındığında sertlik açısından en yüksek değerlere üretimlerinde 90°C'de 5 dakika ısı işlem normu ve ticari kefir starter kültürü kullanılarak 25°C inkübasyon sıcaklığında ve pH 4.4 inkübasyon

sonlandırma pH'sında üretilen kefir örneklerinin, yapışkanlık bakımından ise en yüksek değerlere üretimlerinde 90°C'de 5 ve 10 dakika ısı işlem normu ve ticari kefir starter kültürü kullanılarak 25°C inkübasyon sıcaklığında ve pH 4.4 inkübasyon sonlandırma pH'sında üretilen kefir örneklerinin sahip olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte ticari kefir starter kültürü kullanılarak 20°C inkübasyon sıcaklığında ve pH 4.8 inkübasyon sonlandırma pH'sında üretilen kefir örneklerinin yapışkanlık bakımından en düşük değerlere sahip olduğu saptanmıştır. Üretimlerinde ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerine ait sertlik değerlerinin kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinden daha yüksek; serum ayrılması değerlerinin daha düşük olduğu ve yapışkanlık değerleri arasında herhangi bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca 25°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerine ait sertlik ve yapışkanlık değerlerinin, 20°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerine göre yüksek, serum ayrılması değerlerinin ise düşük olduğu tespit edilmiştir. Üretimlerinde inkübasyon sonlandırma pH'sı olarak pH 4.8 seçilen örneklere ait sertlik ve yapışkanlık değerlerinin, üretimlerinde inkübasyon sonlandırma pH'sı olarak pH 4.4 seçilen örneklere göre düşük, serum ayrılması değerlerinin ise yüksek olduğu belirlenmiştir. Depolama süresince kefir örneklerinin sertlik ve yapışkanlık değerlerinde önemli bir değişim olmadığı, serum ayrılması değerlerinin ise arttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte ısı işlem normunun kefir örneklerinin sertlik, yapışkanlık ve serum ayrılması değerleri üzerinde herhangi bir farklılığa yol açmadığı belirlenmiştir.

5. Kefir örneklerinde üretim parametrelerine bağlı olarak depolama süresince belirlenen görünür viskozite değerleri incelendiğinde, görünür viskozite bakımından en yüksek değerlere üretimlerinde 90°C'de 10 dakika ısı işlem normu ve ticari kefir starter kültürü kullanılarak 25°C inkübasyon sıcaklığında ve pH 4.4 inkübasyon sonlandırma pH'sında üretilen kefir örneklerinin sahip olduğu tespit edilmiştir. Üretimlerinde ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen örneklerin görünür viskozite değerlerinin, kefir danesi kullanılarak üretilenlere kıyasla yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte uygulanan ısı işlemin süresi ve inkübasyon sıcaklığı arttıkça; inkübasyon sonlandırma pH'sı ise düşüğe üretilen kefir örneklerine ait görünür viskozite değerlerinin arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca depolama süresince örneklerin görünür viskozite değerlerinin arttığı saptanmıştır.

6. Farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerinin Power Law modeline göre reolojik özelliklerinin incelenmesi sonucunda, örneklerin depolama süresince Newton tipi olmayan pseudoplastik akış davranışı ve zamana bağlı olarak da tiksotropik akış gösterdiği tespit edilmiştir. Kefir örneklerinin reolojik özellikleri üzerine, incelenen üretim parametrelerinin tamamının değişen düzeylerde etkisinin olduğu belirlenmiştir.

7. Kefir örneklerinin mikrobiyolojik özelliklerinin tespiti için depolama süresince kefir örneklerinde, toplam aerobik mezofilik bakteri, laktokok, laktobasil, asetik asit bakteri, lökonostok ve maya sayımı yapılmıştır. Üretimlerinde ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen toplam aerobik mezofilik bakteri, laktobasil, laktokok, asetik asit bakteri ve lökonostok sayılarının kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinden daha yüksek, maya sayılarının ise daha düşük olduğu saptanmıştır. Ayrıca 25°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerindeki laktobasil, asetik asit bakteri, lökonostok ve maya sayılarının, 20°C inkübasyon

sıcaklığında üretilen kefir örneklerindeki gibi düşük olduğu tespit edilmiştir. İnkübasyon sonlandırma pH'sının kefir örneklerinde belirlenen laktobasil sayısı üzerinde etkisinin olduğu; fakat söz konusu üretim parametresinin diğer mikroorganizma sayılarında herhangi bir farklılığa neden olmadığı belirlenmiştir. Kefir örneklerinde belirlenen mikroorganizmaların sayım sonuçları üzerine kefir üretiminde kullanılan ısıtma işlem normunun etkisinin olmadığı görülmüştür. Depolama süresince kefir örneklerinde belirlenen toplam aerobik mezofilik bakteri, laktokok, laktobasil, asetik asit bakteri ve lökonostok sayılarının azaldığı, maya sayılarının ise arttığı saptanmıştır. Bununla birlikte kefir polisakkarit ve protein matriks içerisine hapsedilmiş, laktik asit bakterileri ve mayaların aktiviteleri ile fermente edilmiş, probiyotik özelliği olan bir süt ürünüdür. Depolama sonunda farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneklerinin mikroorganizma içeriğinin önemli düzeyde azalmaması söz konusu örneklerin probiyotik özelliğinin raf ömrü süresince korunması açısından önemli bulunmuştur.

8. Kefir örneklerinin duyuşal değeriendirilmesinde, panelistler tarafından ticari kefir starter kültürü kullanılarak ve üretim sırasında inkübasyon sonlandırma pH'sı olarak pH 4.4 seçilerek üretilen kefir örneklerinin diğer örneklere göre daha fazla beğenildiği belirlenmiştir. Ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneğine verilen toplam duyuşal puanların kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneğine verilen puanlara göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. İçermiş olduğu mikroorganizmaların çeşitliliği ve değerişkenliğinden dolayı kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneğinin, seçilmiş mikroorganizmalar içeren kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneğine göre panelistlerce daha az beğenildiği değeriendirilmiştir. Ayrıca farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneğinin depolanması sırasında zamana bağılı olarak verilen toplam puanlarda düşme meydana gelmiştir. En yüksek duyuşal puanlar, depolamanın 1. gününde yapılan duyuşal analizlerde; en düşük puanlar ise ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneğinde depolamanın 30. gününde, kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneğinde ise depolamanın 15. gününde belirlenmiştir. Duyuşal özellikler açısından değeriendirildiğinde kefir danesi kullanılarak kullanılan kefir örneğinin en geç 15 gün içerisinde tüketilmesinin uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

9. Araştırmada, farklı üretim parametreleri kullanılarak üretilen kefir örneğinde bulunan peptidlerin tanımlanmasında MALDI-TOF-MS ve Nano-UPLC-nano-ESI-MS/MS metotları kullanılmıştır. Kefir örneğinde multifosforile peptidlerde dahil olmak üzere toplamda 257 peptid tanımlanmıştır. Nano-UPLC-nano-ESI-MS/MS metotları Tanımlanan 257 peptidin  $\beta$ -kazein,  $\alpha_{s1}$ -kazein,  $\kappa$ -kazein ve 3  $\alpha_{s2}$ -kazein orijinli peptidler olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, söz konusu peptidlerin 62'sinin mono- ve difosforile peptidler olduğu saptanmıştır. Kefir örneğinin içerdiği peptid sayısının kesinlikle 257'den daha fazla, kefir peptidomunun ise gerçekte daha kompleks bir yapıya sahip olduğu düşünölmektedir. Fakat buna rağmen, araştırmamızda kullanılan yöntemlerin kefirde temel olarak ya da yoğun olarak bulunan peptidlerin tanımlanmasında başarılı olduğu görölmüştür. Kefir örneğinde bulunan diğer protein fragmentlerinin ise iyonizasyon kapasitesi düşüklüğü ya da ürün iyon spektrum kalitesi yetersizliğinden dolayı tanımlanamadığı değeriendirilmiştir. Bununla birlikte kefirde tanımlanan 257 peptidin 236'sının çiiğ sütte tespit edilemeyip sadece kefirde tespit edilmesi, söz konusu peptidlerin sütün fermantasyonu sırasında oluştuğunu ve kefire özgü peptidler olduğunu göstermektedir.

10. Kefir örnekleri biyoaktif peptid profili bakımından değerlendirildiğinde, kefir örneklerinde, ACE inhibitörü oldukları bilinen KAVPYYPQ ( $\beta$ -casein<sub>176-182</sub>), NLHLPLP ( $\beta$ -casein<sub>132-138</sub>), SKVLPVPQ ( $\beta$ -casein<sub>168-175</sub>), LNVPGGEIVE ( $\beta$ -casein<sub>6-14</sub>), YQKFPQY ( $\alpha_{s2}$ -casein<sub>89-95</sub>), RDMPIQAF ( $\beta$ -casein<sub>183-190</sub>), NIPPLTQTPV ( $\beta$ -casein<sub>73-82</sub>), SQSKVLPVPQ ( $\beta$ -casein<sub>166-175</sub>), VYFPFGPIPN ( $\beta$ -casein<sub>59-68</sub>), HKEMPFKYPVEPF ( $\beta$ -casein<sub>106-119</sub>), YQEPVLGPVRGPFPIIV ( $\beta$ -casein<sub>193-209</sub>) ve LLYQEPVLGPVRGPFPIIV ( $\beta$ -Casein<sub>191-209</sub>) peptid dizilimleri belirlenmiştir.

11. Kefir örneklerinde tanımlanan VLNENLLR ( $\alpha_{s1}$ -casein<sub>15-22</sub>) ve YQEPVLGPVRGPFPIIV ( $\beta$ -casein<sub>193-209</sub>) peptidlerinin amino asit dizilimlerinin literatürde Kazeisin B ve Kazeisidin 17 olarak belirtilen antimikrobiyal peptidlerin amino asit dizilimleri ile uyumlu olduğu görülmüştür.

12. Çalışma sonunda, kefir örneklerinde immün düzenleyici etkiye sahip olduğu bilinen YQEPVLGPVRGPFPIIV ( $\beta$ -casein<sub>193-209</sub>) ve LYQEPVLGPVRGPFPIIV ( $\beta$ -casein<sub>192-209</sub>) peptidleri tanımlanmıştır.

13. Çalışma sonunda elde edilen kefir örneklerine ait peptid profilindeki  $\beta$ -kazein orijinli VYFPFGPIPN (f 59-68) peptidinin literatürde opioid etkiye sahip olduğu belirtilmiştir.

14. Çalışma sonunda kefir örneklerinde tanımlanan diğer biyoaktif peptidler ise antioksidatif özelliğe sahip olduğu bilinen VYFPFGPIPN ( $\beta$ -casein<sub>59-68</sub>), ARHPHPLSFM ( $\kappa$ -casein<sub>96-106</sub>) ve YQEPVLGPVRGPFPIIV ( $\beta$ -casein<sub>193-209</sub>) peptidleri, antitrombotik etki gösterdiği bilinen YQEPVLGPVRGPFPIIV ( $\beta$ -casein<sub>193-209</sub>) peptidi ile kalsiyum bağlama özelliğine sahip olduğu bilinen KIEKFQSEEQQQT ( $\beta$ -casein<sub>29-41</sub>, 7.serinde fosfat) peptididir.

15. Kefir örneklerinin peptid profili üzerine üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin etkisinin değerlendirilmesinde, ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen ve toplamda 230 farklı peptid içeren kefir örneklerinin, kefir danesi kullanılarak üretilen ve toplamda 124 farklı peptid içeren kefir örneklerine göre daha kompleks bir kompozisyona sahip olduğu tespit edilmiştir. Kazein fraksiyonlarındaki peptid dağılımı bakımından ise, peptidlerin büyük kısmının ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde tanımlandığı (133/257), diğer büyük kısmın her iki kefir çeşidi tarafından paylaşıldığı (97/257) ve görece daha küçük bir kısmın kefir danesi kullanılarak üretilen örneklerle ait olduğu (27/257) belirlenmiştir. Bununla birlikte peptidlerin büyük bir kısmının her iki kefir örneğinde de bulunması üretim için kullanılan özgün mikrofloradan bağımsız tipik kefir peptid profilinin var olduğunu göstermektedir. Buradan kefir peptid profilinin daimi kısım bileşenlerinin kefir ürünleri için, kefir profilinin değişken kısım bileşenlerinin ise farklı kefir ürünlerini ve üretim parametrelerini ayırtetmek için belirleyici olarak kullanılabilmesi değerlendirilmiştir.

16. Üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin kefir örneklerinde belirlenen ana peptidler üzerine etkisinin değerlendirilmesi, hem ticari kefir starter kültürü hem de kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 5'ini biyoaktif peptidlerin oluşturduğu toplamda 16 peptidin karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda aralarında 1881.1 m/z oranına sahip biyoaktif peptidin de olduğu 9 peptidin

bağıl yoğunluk değerlerinin ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde, aralarında 977.5 m/z oranına sahip biyoaktif peptidin de olduğu 3 peptide ait bağıl yoğunluk değerlerinin ise kefir danesi kullanılarak üretilenlerde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte örneklerde belirlenen 3'ünü 1329.6, 1994.1 ve 2107.2 m/z oranına sahip peptidlerin oluşturduğu 4 peptidin bağıl yoğunluk değerleri üzerine üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

17. Ticari kefir starter kültürü ve kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 5'ini biyoaktif peptidlerin oluşturduğu toplam 24 peptid üzerine üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının etkisinin değerlendirilmesi sonucunda, ticari kefir starter kültürü kullanılarak 20°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerinde belirlenen aralarında m/z oranı 1994.1 ve 2107.2 olan biyoaktif peptidlerin de bulunduğu 4 peptidin bağıl yoğunluk değerlerinin, 25°C inkübasyon sıcaklığında üretilen kefir örneklerinde belirlenenlere göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 20 peptidin, kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 24 peptidin bağıl yoğunluk değerleri üzerine üretimde kullanılan inkübasyon sıcaklığının herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

18. Ticari kefir starter kültürü ve kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 5'ini biyoaktif peptidlerin oluşturduğu toplam 24 peptid üzerine üretimde kullanılan inkübasyon sonlandırma pH'sının etkisinin değerlendirilmesi sonucunda, ticari kefir starter kültürü kullanılarak inkübasyonuna pH 4.4'te son verilerek üretilen kefir örneklerinde belirlenen 2 peptidin bağıl yoğunluk değerlerinin, inkübasyonuna pH 4.8'de son verilen örneklerde belirlenenlere göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte kefir danesi kullanılarak inkübasyonuna pH 4.4'te son verilerek üretilen kefir örneklerinde belirlenen aralarında 1329.6 m/z oranına sahip biyoaktif peptidin de bulunduğu 4 peptidin bağıl yoğunluk değerlerinin, inkübasyonuna pH 4.8'de son verilen kefir örneklerine göre yüksek olduğu belirlenmiştir. Ticari kefir starter kültürü ve kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 20 peptidin bağıl yoğunluk değerleri üzerine inkübasyon sonlandırma pH'sının herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

19. Çalışma sonunda, üretimde kullanılan ısıl işlem normunun ticari kefir starter kültürü ve kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen 5'ini biyoaktif peptidlerin oluşturduğu toplam 24 peptidin bağıl yoğunluk değerleri üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı saptanmıştır.

20. Çalışma sonunda üretimde kullanılan starter kültür çeşidinin kefirin peptid profili üzerine en yüksek düzeyde etkisinin olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte peptid profilinin önemli bir kısmının kefir için karakteristik olduğu ve üretim parametrelerinden bağımsız olduğu değerlendirilmiştir.

## 6. KAYNAKLAR

- ABRAHAMSEN, R.K. and HOLMEN, T.B. 1981. Goat's milk yoghurt made from non-homogenized and homogenized milks, concentrated by different methods. *Journal of Dairy Science*, 48: 457-463.
- AHMED, Z., WANG, Y. P., AHMAD, A., KHAN, S.T., NISA, M., AHMAD, H. and AFREEN, A. 2013. Kefir and health: A contemporary perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53: 422-434.
- AKALIN, A.S. 2014. Dairy-derived antimicrobial peptides: Action mechanisms, pharmaceutical uses and production proposals. *Trends in Food Science and Technology*, 36: 79-95.
- ALMAAS, H., ERIKSEN, E., SEKSE, C., COMI, I., FLENGSRUD, R., HOLM, H. JENSEN, E., JACOBSEN, M., LANGSRUD, T. and VEGARUD, G. E. 2011. Antibacterial peptides derived from caprine whey proteins, by digestion with human gastrointestinal juice. *British Journal of Nutrition*, 106: 896-905.
- ALPKENT, Z. ve KÜÇÜKÇETİN, A. 2000. Farklı sıcaklıklarda muhafaza edilen kefirlerin duyusal, fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinde meydana gelen değişimler. Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri, VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı, 363-373 ss., Tekirdağ.
- ALTAY, F., KARBANCIOĞLU GÜLER, F., DASKAYA DIKMEN, C. and HEPERKAN, D. 2013. A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. *International Journal of Food Microbiology*, 167: 44-56.
- ANONİM. 1994. TS 1018 Çiğ İnek Sütü Standardı. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, 14 s.
- ANONİM. 1995. TS 8189 Sütte Yağ Tayini-Gerber Metodu (Rutin Metod) Standardı. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, 10 s.
- ANONİM. 1998. Tromboz. <http://www.sanofi.com.tr/l/tr/tr/layout.jsp?scat=3E72362E-F3D3-4AF9-967A-8A8B5C30F79B>.
- ANONİM. 1999. <http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/gida/moduller/kefir.pdf>
- ANONİM. 2006. Kan Fizyolojisi. <http://www.forumex.net/sitemap/f-259.html>.
- ANONİM. 2009. Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği. Sayı: 27143, Tebliğ No: 2009/25.
- ANONİM. 2010. Hipertansiyon. <http://www.ahmetalpman.com/defkonuoku.asp?id=162&konuindex=10>



- ANONİM. 2011. Kefir. <http://cemkaragozlu.blogspot.com/2011/02/kefir.html>
- ANONİM. 2012. Türkiye’de endüstriyel kefir tüketiminin arttırılması. <http://www.gidateknolojisi.com.tr/haber/2012/10/turkiyede-endustriyel-kefir-tuketiminin-arttirilmesi>.
- ANONİM. 2013. Kefir ve özellikleri. [http://www.altinkilic.com/saglik\\_rehberi\\_prof-dr-hasan-yaygin\\_70.html](http://www.altinkilic.com/saglik_rehberi_prof-dr-hasan-yaygin_70.html)
- ANONYMOUS. 1998. Milk and milk products-enumeration of coliforms. *International Dairy Federation Standard 73B*, Belgium, 41: 10 p.
- ANONYMOUS. 2001. Milk and milk products-general guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination. *International Dairy Federation Standard*, Belgium, 122: 12 p.
- ANSELMO, R.J., VIORA, S.S. and LAUSADA, L.I. 2001. Effect of kefir bactericide on *Salmonella* spp. *Informacion Tecnologica*, 12: 91-95.
- ARIHARA, K., TOBA, T. and ADACHI, S. 1990. Immunofluorescence microspic studies on distribution of *L. kefiranofaciens* and *L. kefir* in kefir grains. *International Journal of Food Microbiology*, 11: 127-134.
- ASHAR, M.N. and CHAND, R. 2004. Fermented milk containing ACE-inhibitory peptides reduces blood pressure in middle aged hypertensive subjects. *Milchwissenschaft*, 59 (7/8): 363-366.
- BAUM, F. 2013. Analyse des Peptidprofils von Milch und Milchprodukten zur Identifizierung bioaktiver Komponenten. Ph. D. Thesis. Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg, 164 p.
- BAUM, F., FEDOROVA, M., EBNER, J., HOFFMANN, R. and PISCHETSRIEDER, M. 2013a. Analysis of the endogenous peptide profile of milk: identification of 248 mainly casein-derived peptides. *Journal of Proteome Research*, 12: 5447-5462.
- BAUM, F., EBNER, J. and PISCHETSRIEDER, M. 2013b. Identification of multiphosphorylated peptides in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 9110-9117.
- BELITZ, H.D., GROSCH, W. and SCHIEBERLE, P. 2009. Milk and dairy products. Food Chemistry, Springer-Verlag, pp. 501-511, Berlin.
- BENKERROUM, N. 2010. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. *International Journal of Dairy Technology*, 63 (3): 320-338.

- BENSMIRA, M., NSABIMANA, C. and JIANG, B. 2010. Effects of fermentation conditions and homogenization pressure on the rheological properties of Kefir. *Food Science and Technology*, 43: 1180-1184.
- BENSMIRA, M. and JIANG, B. 2012. Effect of some operating variables on the microstructure and physical properties of a novel Kefir formulation. *Journal of Food Engineering*, 108: 579-584.
- BESHKOVA, D.M., SIMOVA, E.D., SIMOV, Z.I., FRENGOVA, G.I. and SPASOV, Z.N. 2002. Pure cultures for making kefir. *Food Microbiology*, 19 (5): 537-544.
- BIRKEMO, G.A., O'SULLIVAN, O., ROSS, R.P. and HILL, C. 2009. Antimicrobial activity of two peptides casecidin 15 and 17, found naturally in bovine colostrum. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 233-240.
- BODYFELT, F.W., TOBIAS, J. and TROUT, G.M. 1988. The sensory evaluation of dairy products. Van Nostrand Reinhold, New York, USA, 598 p.
- BOUHALLAB, S. and BOUGLÉ, D. 2004. Biopeptides of milk: caseinophosphopeptides and mineral bioavailability. *Reproduction Nutrition Development*, 44: 493-498.
- BOTTAZZI, V. and BIANCHI, F.A. 1980. Note on scanning electron microscopy of micro-organisms associated with the kefir granule. *Journal of Applied Microbiology*, 48: 265-268.
- BROGDEN, 2005. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3: 320-338.
- BUTIKOFER, U., MEYER, J., SIEBER, R. and WECHSLER, D. 2007. Quantification of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in hard, semi-hard and soft cheeses. *International Dairy Journal*, 17: 968-975.
- CAÑAS, B., LÓPEZ-FERRER, D., RAMOS-FERNÁNDEZ, A., CAMAFEITA, E. and CALVO, E. 2006. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 4 (4): 295-320.
- CAROLI, A., BULGARI, O., CHESSA, S., COCCHI, D. and TULIPANO, G. 2010. In vitro evaluation of caseinophosphopeptides from different genetic variants on bone mineralization. *Italian Journal of Animal Science*, 8 (2): 42-44.
- CEVIKBAS, A., YEMNI, E., EZZEDENN, F.W., YARDIMICI, T., CEVIKBAS, U. and STOHS, S.J. 1994. Antitumoural antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. *Phytotherapy Research*, 8, 78-82.
- CHABANCE, B., JOLLÈS, P., IZQUIERDO, C., MAZOYER, E., FRANCOUAL, C., DROUET, L. and FIAT, A.M. 1995. Characterization of an antithrombotic

- peptide from kappa-casein in newborn plasma after milk ingestion. *British Journal of Nutrition*, 73: 583-590.
- CHEN, C., CHAN, H.M. and KUBOW, S. 2007. Kefir extracts suppress *in vitro* proliferation of estrogen-dependent human breast cancer cells but not normal mammary epithelial cells. *Journal of Medicinal Food*, 10 (3): 416-422.
- CHEN, H.C., WANG, S.Y. and CHEN, M.J. 2008. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology*, 25: 492-502.
- CHIFIRIUC, M.C., CIOACA, A.B., and LAZAR, V. 2011. In vitro assay of the antimicrobial activity of kefir against bacterial and fungal strains. *Anaerobe*, 17: 433-435.
- CHING-YUN, K. and CHING-WEN, L. 1999. Taiwanese kefir grains: Their growth, microbial and chemical composition of fermented milk. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 54: 19-23.
- CHOI, H., LEE, H.S. and PARK, Z.Y. 2008. Detection of multiphosphorylated peptides in LC-MS/MS analysis under low pH conditions. *Analytical Chemistry*, 80: 3007-3015.
- CHOI, J., SABIKHI, L., HASSAN, A. and ANAND, S. 2012. Bioactive peptides in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 65 (1): 1-12.
- CHURCH, F.C., SWAISGOOD, H.E., PORTER, D.H., CATIGNANAI, G.L. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66: 1219-1227.
- CIEŚLIŃSKA, A., KAMINSKI, S., KOSTYRA, E. and SIENKIEWICZ-SZŁAPKA, E. 2007. Beta-casomorphin 7 in raw and hydrolyzed milk derived from cows of alternative  $\beta$ -casein genotypes. *Milchwissenschaft*, 62 (2): 125-127.
- CIEŚLIŃSKA, A., KOSTYRA, E., KOSTYRA, H., OLEŃSKI, K., FIEDOROWICZ, E. and KAMIŃSKI, S. 2012. Milk from cows of different  $\beta$ -casein genotypes as a source of  $\beta$ -casomorphin-7. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63 (4): 426-430.
- CLARE, D.A. and SWAISGOOD, H.E. 2000. Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83: 1187-1195.
- COLLAR, C. 1996. Biochemical and technological assessment of the metabolism of pure and mixed cultures of yeast and lactic acid bacteria in breadmaking application's. *Food Science and Technology International*, 2: 349-367.

- CONTRERAS, M.D.M., CARRÓN, R., MONTERO, M.J., RAMOS, M. and RECIO, I. 2009. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19: 566-573.
- COSTE, M., ROCHET, V., LÉONIL, J., MOLLÉ, D., BOUHALLAB, S. and TOMÉ, D. 1992. Identification of C-terminal peptides of bovine  $\beta$ -casein that enhance proliferation of rat lymphocytes. *Immunology Letters*, 33: 41-46.
- CZAMANSKI, R.T., GRECO, D.P. and WIEST, J.M. 2004. Evaluation of antibiotic activity in filtrates of traditional kefir. *Higiene Alimentar*, 18: 75-77.
- DAĞDEMİR, E., ÖZDEMİR, C. ve ÖZDEMİR, S. 2003. Süt ürünlerinde bulunan antihipertansif peptidler ve etki mekanizmaları. SEYES Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu Tebliğler Kitabı, 181-186 ss., İzmir.
- DALLAS, D.C., GUERRERO, A., PARKER, E. A., GARAY, L.A., BHANDARI, A., LEBRILLA, C.B., BARILE, D. and GERMAN, J.B. 2014. Peptidomic profile of milk of Holstein Cows at peak lactation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 58-65.
- DEMİR, M. 2001. Kefir dondurması üretimi ve üretilen dondurmaların duyuşal, fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri. Yüksek Lisans Tezi. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya, 88 s.
- DE HOFFMANN, E. and STROOBANT, V. 2007. Mass Spectrometry: Principles and Applications. Wiley Publishing, 489 p., England.
- DE NONI, I. and CATTANEO, S. 2010. Occurrence of  $\beta$ -casomorphins 5 and 7 in commercial dairy products and in their digests following *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 119: 560-566.
- DIMITRELI, G. and ANTANIOU, K.D. 2011. Effect of incubation temperature and caseinates on the rheological behaviour of kefir. *Procedia Food Science*, 1: 583-588.
- DIMITRELI, G., GREGORIOU, E.A., KALANTZIDIS, G. and ANTANIOU, K.D. 2013. Rheological properties of kefir as affected by heat treatment and whey protein addition. *Journal of Texture Studies*, 1-6.
- DİNÇ, A. 2008. Kefirin bazı mikrobiyolojik ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 59 s.
- DÜZGÜNEŞ, O., KESİCİ, T. KAVUNCU, O. ve GÜRBÜZ, F. 1987. Araştırma ve Deneme Metodları (İstatistik metodları-II). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Yayın No: 1021, 381 s., Ankara.
- EISELE, T., STRESSLER, T., KRANZ, B. and FISCHER, L. 2013. Bioactive peptides generated in an enzyme membrane reactor using *Bacillus lentus* alkaline peptidase. *European Food Research and Technology*, 236: 483-490.

- EL-HAYEK, S.E. 2011. Kefir inhibits proliferation and induces apoptosis of epithelial colorectal adenocarcinoma cells. Master Thesis, Lebanese American University, Lebanon, 57 p.
- ENDER, G. 2009. Oligofruktozla zenginleştirilmiş süttten üretilen kefirlerin kalitesi üzerine tane ve kültür kullanımının etkileri. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 236 s.
- ERKAYA, T., ŞENGÜL, M. and ÜRKEK, B. 2011. Sütte bulunan opioid peptidler ve sağlık üzerine etkileri. 7. Gıda Mühendisliği Kongresi, 24-26 Kasım, 187 ss., Ankara.
- ERTEKİN, B. 2008. Yağ İkame Maddelerinin Kullanımının kefirin kalite kriterleri üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demiral Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 89 s.
- ERTEKİN, B. and GUZEL-SEYDIM, Z. 2010. Effect of fat replacers on kefir quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 543-548.
- FARNWORTH, E.R. 2005. Kefir-a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 2 (1): 1-17.
- FERRARETTO, A., SIGNORILE, A., CLAUDIA, G., FIORILLI, A. and TETTAMANTI, G. 2001. Casein phosphopeptides influence calcium uptake by cultured human intestinal HT-29 tumor cells. *The Journal of Nutrition*, 131 (6): 1655-1661.
- FIAT, A.M., MIGLIORE-SAMOUR, D. and JOLLES, P. 1993. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning Kumys aus Kuhmitch. *Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung*, 7: 23-32.
- FITZGERALD, R.J. 1998. Potential uses of caseinophosphopeptides. *International Dairy Journal*, 8: 451-457.
- FITZGERALD, R.J. and MEISEL, H. 2003. Milk Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides. In: P.F. Fox, P.L.H. Mc Sweeney (Editors), *Advanced Dairy Chemistry 1*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 675-698, Newyork.
- FITZGERALD, R.J. and MURRAY, B.A. 2006. Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 59 (2): 118-125.
- FURUKUWA, N., MATSUOKA, A., TAKASHI, T. and YAMANAKA, Y. 1991. Effects of fermented milk on the delayed-type hypersensitivity response and survival in mice bearing Meth-A. *Animal Science and Technology*, 62: 579-585.
- GARCÍA FONTÁN, M.C., MARTÍNEZ, S., FRANCO, I. and CARBOLLA, J. 2006. Microbiological and chemical changes during the manufacture of kefir made from

- cows' milk, using a commercial starter culture. *International Dairy Journal*, 16: 762-767.
- GARROTE, G.L., ABRAHAM, A.G. and DE ANTONI, G.L. 1997. Preservation of kefir grains, a comparative study. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 30 (1): 77-84.
- GARROTE, G.L., ABRAHAM, A. G. and DE ANTONI, G. 2000. Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. *Journal of Food Protection*, 63 (3): 364-369.
- GARROTE, G.L., ABRAHAM, A. G. and DE ANTONI, G. 2010. Microbial interactions in kefir: A natural probiotic drink. In: F. Mozzi R.R. Raya G.M. Vignolo (Editors), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria-Novel Applications*, Blackwell Publishing, pp. 327-340, Iowa.
- GOBBETTI, M., FERRANTI, P., SMACCHI, E., GOFFREDI, F. and ADDEO, F. 2000. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3898-3904.
- GOBBETTI, M., MINERVINI, F. and RIZZELLO, C.G. 2004. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57 (2/3): 173-188.
- GOLOWCZYC, M.A., MOBILI, P., GARROTE, G.L., ABRAHAM, A.G., and DE ANTONI, G.L. 2007. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*, 118: 264-273.
- GOLOWCZYC, M.A., SILVA, J., ABRAHAM, A.G., DE ANTONI, G.L. and TEIXEIRA, P. 2010. Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. *Letters in Applied Microbiology*, 50: 7-12.
- GÓMEZ-RUIZ, J.A., RAMOS, M. and RECIO, I. 2004. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal*, 14: 1075-1080.
- GÓMEZ-RUIZ, J.A., TABORDA, G., AMIGO, L., RECIO, I. and RAMOS, M. 2006. Identification of ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 223: 595-601.
- GRØNNEVİK, H., FALSTAD, M. and NARVHUS, J.A. 2011. Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*, 21: 601-606.
- GULMEZ, M. and GUVEN, A. 2003. Survival of *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes* 4b and *Yersinia enterocolitica* 03 in different yoghurt and kefir

combinations as prefermentation contaminant. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 631-636.

- GUZEL-SEYDİM, Z.B., SEYDİM, A.C., GREENE, A.K. and BODINE, A.B. 2000a. Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13: 35-43.
- GUZEL-SEYDİM, Z.B., SEYDİM, A.C. and GREENE, A.K. 2000b. Organic acids and volatile flavor components evolved during refrigerated storage of kefir. *Journal of Dairy Science*, 83: 275-277.
- GUZEL-SEYDİM, Z.B., WYFFELS, J.T., SEYDİM, A.C. and GREENE, A.K. 2005. Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscobic observation. *International Journal of Dairy Technology*, 58 (1): 25-29.
- GUZEL-SEYDİM, Z.B., SEYDİM, A.C., GRENE, A.K. and TAŞ, T. 2006. Determination of antimutagenic properties of acetone extracted fermented milks and changes in their total fatty acid profiles including conjugated linoleic acids. *International Journal of Dairy Technology*, 59: 209-215.
- GÜRSEL, A., GÜRSOY, A., ERGÜL, E. ve ERDOĞDU, N.G. 1990. Sütlere uygulanan farklı ısı işlem koşullarının kefir kalitesi üzerine araştırmalar. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 14 (1): 166-177.
- GÜVEN, A., GÜVEN, A. and GULMEZ, M. 2003. The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. *Journal Veterinary Medicine B*, 50: 412-416.
- HAFEEZ, Z., ÇAKIR-KIEFER, C., ROUX, E., PERRIN, C., MICLO, L. and DARY-MOUROT, A. 2014. Strategies of producing bioactive peptides from milk Proteins to functionalize fermented milk products. *Food Research International*, 63: 71-80.
- HAFLIGER, M., SPILLMAN, H., and PUHAN, Z. 1991. Kefir-a fascinating cultured milk product. *Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft*, 112 (13): 370-375.
- HAQUE, A., RICHARDSON, R.K. and MORRIS, E.R. 2001. Effect of fermentation temperature on the rheology of set and stirred yogurt. *Food Hydrocolloids*, 15: 593-602.
- HARTMANN, R. and MEISEL, H. 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 163-169.
- HAYES, M., ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F., HILL, C. and STANTON, C. 2006. Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 2260-2264.

- HAYES, M., STANTON, C., SLATTERY, H., O'SULLIVAN, O., HILL, C., FITZGERALD, G.F. and ROSS, R.P. 2007. Casein Fermentate of *Lactobacillus animalis* DPC6134 contains a range of novel propeptide angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 4658-4667.
- HERTZLER, S.R. and CLANCY, S.M. 2003. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of American Dietetic Association*, 103 (5): 582-587.
- HILLENKAMP, F. and KARAS, M. 2007. The MALDI process and method. In: F. Hillenkamp J. Peter-Katalinic (Editors), MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications, Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 29-82, Weinheim.
- HUSEINI, H.F, RAHIMZZADEH, G., FAZELI, M.R., MEHRAZMA, M. and SALEHI, M. 2012. Evaluation of wound healing activities of kefir products. *Burns*, 38: 719-723.
- IRAPORDA, C., ROMANIN, D.E., RUMBO, M., GARROTE, G.L. and ABRAHAM, A.G. 2014. The role of lactate on the immunomodulatory properties of the nonbacterial fraction of kefir. *Food Research International*, 62: 247-253.
- IRIYOGEN, A., ARANA, I., CASTIELLA, M., TORRE, P., IBAÑEZ, F.C. 2005. Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry*, 90: 613-620.
- İNAL, T. 1990. Süt ve Süt Ürünleri Teknolojisi. Final Ofset, 558-566 ss., İstanbul.
- İÇİER, F., BOZKURT, H. and GÜRBÜZ, S. 2008. Kefir ve akıcı yoğurdun reolojik davranışlarının krakterizasyonu. *Akademik Gıda*, 6 (5): 6-11.
- JARMOŁOWSKA, B., KOSTYRA, E., KRAWCZUK, S. and KOSTYRA, H. 1999.  $\beta$ -casomorphin-7 isolated from Brie cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79: 1788-1792.
- JARMOŁOWSKA, B., SZLAPKA-SIENKIEWICZ, E., KOSTYRA, E., KOSTYRA, H., MIERZEJEWSKA, D. and MARCINKIEWICZ-DARMOCHWAL, K. 2007. Opioid activity of Humana formula for newborns. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 2247-2250.
- JARMOŁOWSKA, B. 2012. The influence of storage on contents of selected antagonist and agonist opioid peptides in fermented milk drinks. *Milchwissenschaft*, 67 (2): 130.
- JIANZHONG, Z., XIAOLI, L., HANHU, J. and MINGSHENG, D. 2009. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*, 26: 770-775.



- JINSMAA, Y. and YOSHIKAWA, M. 1999. Enzymatic release of neocasomorphin and  $\beta$ -casomorphin from bovine  $\beta$ -casein. *Peptides*, 20: 957-962.
- KAMAU, S.M., LU, R.R., CHEN, W., LIU, X.M., TIAN, F.W., SHEN, Y. and GAO, T. 2010. Functional significance of bioactive peptides derived from milk proteins. *Food Reviews International*, 26: 386-401.
- KAPTAN, N., GÜRSEL, A. ve GÜRSOY, A. 1990. İnkübasyon sıcaklığının kefirin bazı nitelikleri üzerine etkisi. *Gıda*, 15 (5): 291-298.
- KARAGÖZLÜ, N., KARAGÖZLÜ, C. and ERGÖNÜL, B. 2007. Survival characteristic of *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* and *S. aureus* during kefir fermentation. *Czech Journal of Food Science*, 25 (4): 202-207.
- KARATEPE, P., YALÇIN, H., PATIR, B. ve AYDIN, I. 2012. Kefir ve Kefirin Mikrobiyolojisi. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 10 (1): 1-10.
- KATSIARI, M.C., VOUTSINAS, L.P. and KONDYLI, E. 2002. Manufacture of yogurt from stored frozen sheep's milk. *Food Chemistry*, 77: 413-420.
- KEBARLE, P. and VERKERK, U.H. 2010. On the mechanism of electrospray ionization mass spectrometry. In: R. B. Cole (Editor), *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*, Wiley Publishing, pp. 3-48, New Jersey.
- KESENKAŞ, H., DİNKÇİ, N., SEÇKİN, K., KINIK, Ö., GÖNÇ, S., ERGÖNÜL, P.G. and KAVAS, G. 2011. Physicochemical, microbiological and sensory characteristics of soymilk kefir. *African Journal of Microbiology Research*, 5 (22): 3737-3746.
- KESMEN, Z. and KACMAZ, N. 2011. Determination of lactic microflora of kefir grains and kefir beverage by using culture-dependent and culture-independent methods. *Journal of Food Science*, 76 (5): 276- 283.
- KHAMNAEVA, N.I., TSYRENOV, V.Z., GONGOROVA, V.S. and SHALYGINA, A.M. 2000. Biosynthesis of biologically active substances in Kefir grains. *Molochnaya Promyslennost*, 4: 49.
- KILIÇ, S., UYSAL, H., AKBULUT, N., KAVAS, G. and KESENKAŞ, H., 1999. Chemical, microbiological and sensory changes in ripening kefirs produced from starters and grains. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 36 (1): 111-118.
- KILIÇ, E., KÖSEOĞLU, F. ve YILMAZ, H. 2000a. Moleküler kütle spektrometri. *Enstrümantal Analiz İlkeleri* (Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., Çeviri), Bilim Yayıncılık, 493-534 ss., Ankara.
- KILIÇ, S., KARAGÖZLÜ, C. ve AKBULUT, N. 2000b. Eksopolisakkarit üreten yoğurt bakterilerinin meyveli yoğurt yapımında kullanımı üzerine bir araştırma. *Süt*

Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri, VI: Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı, 57-69 ss., Tekirdağ.

- KINIK, Ö. ve GÜRSOY, O. 2002. Süt kaynaklı biyoaktif peptidler. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8 (2): 195-203.
- KOJMURA, M., NIO, N., KUBO, K., MINOSHIMA, Y., MUNEKATA, E. and ARIYOSHI, Y. 1989. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptides of human  $\beta$ -casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53: 2107-2114.
- KOKSOY, A. and KILIC, M. 2004. Use of hydrocolloids in textural stabilization of a yoghurt drink, ayran. *Food Hydrocolloids*, 18: 593-600.
- KOOIMAN, P. 1968. The chemical structure of kefiran, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain. *Carbohydrate Research*, 7: 200-211.
- KORHONEN, H., PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A., RANTAMÄKI, P. and TUPASELA, T. 1998. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 9: 307-319.
- KORHONEN, H. and PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. 2001. Milk protein-derived bioactive peptides-novel opportunities for health promotion. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 363: 17-25.
- KORHONEN, H. and PIHLANTO, A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16: 945-960.
- KOROLEVA, N.S. 1982. Special products (kefir, koumyss, etc.). Proceedings XXI International Dairy Congress, 2: 146-151, Moscow.
- KOROLEVA, N.S. 1988. Starters for fermented milks. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 227: 35-40.
- KÖK-TAŞ, T. 2010. Kontrollü atmosfer uygulamasının kefir danesi ve kefir üzerine etkilerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 122 s.
- KÖK-TAŞ, T., SEYDİM, A.C., OZER, B. and GUZEL-SEYDİM, Z.B. 2013. Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kefir. *Journal of Dairy Science*, 96 (2): 780-789.
- KUDOH, Y., MATSUDA, S., IGOSHI, K. and OKI, T. 2001. Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO13953, *Nippon Shokuhin Kagaku Kogakukai*, 48: 44-45.

- KUNJI, E.R.S., MIERAU, I., HAGTING, A., POOLMAN, B. and KONINGS, W.N. 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 187–221.
- KURMANN, I.A., RASIC, J.L. and KROGER, M. 1992. Encyclopedia of fermented fresh milk products. AVIBooks Van Nostrand Reinhold, 368 p., New York, USA.
- KURT, A., ÇAKMAKÇI, S. ve ÇAĞLAR, A. 1993. Süt ve Mamulleri Muayene ve Analiz Metotları Rehberi. Atatürk Üniversitesi Yayınları. No: 252, 238 s., Erzurum.
- LEHTINEN, R., JAUHAINEN, T., KANKURI, E., LINDSTEDT, K., KOVANEN, P.T., KEROJOKI, O., KORPELA, R. and VAPAATALO, H. 2010. Effects of milk casein-derived tripeptides Ile-Pro-Pro, Val-Pro-Pro, and Leu-Pro-Pro on enzymes processing vasoactive precursors in vitro. *Arzneimittelforschung*, 60 (4): 182-185.
- LEITE, A.M.O., LEITE, D.C.A., DEL AGUILA, E.M., ALVARES, T.S., PEIXOTO, R.S., MIGUEL, M.A.L., SILVA, J.T. and PASCHOALIN, V.M.F. 2013. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. *Journal of Dairy Science*, 96 (7): 4149-4159.
- LI, Y. 2011. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: A review. *Protein Expression and Purification*, 80: 260-267.
- LIBUDZISZ, Z. and PIATKIEWICZ, A. 1990. Kefir production in Poland. *International Dairy Journal*, (55): 31-33.
- LIGNITTO, L., CAVATORTA, V., BALZAN, S. GABAI, G., GALAVERNA, G., NOVELLI, E., SFORZA, S. and SEGATO, S. 2010. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of water-soluble extracts of Asiago d'allevo cheese. *International Dairy Journal*, 20: 11-17.
- LIU, J.R. and LIN, C.W. 2000. Production of kefir from soymilk with or without added glucose, lactose or sucrose. *Journal of Food Science*, 65: 716-719.
- LOPITZ-OTSOA, F., REMENTERIA, A., ELZEGUEZABAL, N. and GARAIZAR, J. 2006. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23: 67-74.
- MAGALHÃES, K.T., DE MELO PEREIRA, G.V., CAMPOS, C.R., DRAGONE, G. and SWAN, R.F. 2012. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 693-702.
- MAGRA, T.I., ANTONIOU, K.D. and PSOMAS, E.I. 2012. Effect of milk fat, kefir grain inoculum and storage time on the flow properties and microbiological characteristics of kefir. *Journal of Texture Studies*, 43: 299-308.

- MAINVILLE, I., MONTPETIT, D., DURAND, N. and FARNWORTH, E.R. 2001. Deactivating the bacteria and yeast in kefir using heat treatment, irradiation and high pressure. *International Dairy Journal*, 11, 45-49.
- MALKOSKI, M., DASHPER, S.G., O'BRIEN-SIMPSON, N.M., TALBO, G.H., MACRI, M., CROSS, K.J. and REYNOLDS, E.C. 2001. Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45 (8): 2309-2315.
- MARCELA, Z., RICARDO, W.E., ERIC, P., CINTHIA, G.B., RICARDO, C. and JOSE, B.B. 2001. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutrition Research*, 21: 69-579.
- MARQUINA, D., SANTOS, A., CORPAS, I., MUNOZ, J., ZAZO, J. and PEINADO, J.M. 2002. Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel. *Letters in Applied Microbiology*, 35: 136-140.
- McCANN, K.B., SHIEL, B.J., MICHALSKI, W.P., LEE, A., WAN, J., ROGINSKI, H. and COVENTRY, M.J. 2006. Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine  $\alpha_{s1}$ -casein. *International Dairy Journal*, 16: 316-323.
- MEISEL, H., GOEPFERT, A. and GUNTHER, S. 1997. ACE-inhibitory activities in milk products. *Milchwissenschaft*, 52 (2): 307-311.
- MEISEL, H. 1998. Overview on Milk Protein-derived Peptides. *International Dairy Journal*, 8: 363-373.
- MELTRETTER, J., SCHMIDT, A., HUMENY, A., BECKER, C.M. and 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: 2899-2906.
- METİN, M. ve TAVLAS, B. 1986. Kefir tanesi ve kefir kültürü kullanılarak üretilen kefirlerin kalitesi üzerine olgunlaşma koşullarının etkisi. *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, 4 (1): 51-68.
- METİN, M. 2005. Süt Teknolojisi: Sütün Bileşimi ve Teknolojisi. Ege Üniversitesi Basımevi, 802 s., İzmir.
- MIQUEL, E., ALEGRÍA, A., BARBERÁ, R. and FARRÉ, R. 2006. Casein phosphopeptides released by simulated gastrointestinal digestion of infant formulas and their potential role in mineral binding. *International Dairy Journal*, 16: 992-1000.
- MINERVINI, F., ALGARON, F., RIZZELLO, C.G., MONNET, V. and GOBBETTI, M. 2003. Angiotensin I-Converting-Enzyme-Inhibitory and Antibacterial Peptides

from *Lactobacillus helveticus* PR4 Proteinase-Hydrolyzed Caseins of Milk from Six Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (9): 5297-5305.

- MISTRY, V.V. 2004. Fermented liquid milk products. In: Y.H. Hui L. Meunier-Goddik Å.S. Hansen J. Josephsen W. Nip P.S. Stanfield F. Toldrá (editors), Handbook of food and beverage fermentation technology, Marcel Dekker, Inc. New York, U.S.A.
- MONTANUCI, F.D., PIMENTEL, T.C., GARCIA, S. and PRUDENCIO, S.H. 2012. Effect of starter culture and inulin addition on microbial viability, texture, and chemical characteristics of whole or skim milk Kefir. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 32 (4): 850-861.
- MORALES, F.J. and JIMÉNEZ-PÉREZ, S. 1998. Monitoring of heat-induced proteolysis in milk and milk-resembling systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (10): 4391-4397.
- MORGAN, S.M., HICKEY, R., ROSS, R.P. and HILL, C. 2000. Efficient method for the detection of microbially produced antibacterial substances from food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 56-62.
- MUROFUSHI, M., SHIOMI, M. and AIBARA, K. 1983. Effect of orally administered polysaccharide from kefir on delayed-type hypersensitivity and tumor growth in mice. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 36: 49-53.
- MUROFUSHI, M., MIZUGUCHI, J., AIBARA, K. and MATUHASI, T. 1986. Immunopotentiative effect of polysaccharide from kefir grain, KGF-C, administered orally in mice. *Immunopharmacology*, 12: 29-35.
- NAGPAL, R., BEHARE, P., RANA, R., KUMAR, A., KUMAR, M., ARORA, S., MOROTTA, F., JAIN, S. and YADAV, H. 2011. Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. *Food & Function*, 2: 18-27.
- NALE, Z. 2013. Prebiyotik eklenmiş kefirin püskürterek kurutulması ve ürünün kalite özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya, 117 s.
- NGUYEN, L.T., HANEY, E.F. and VOGEL, H.J. 2011. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29 (9): 464-472.
- NORBERG, S., O'CONNOR, P.M., STANTON, C., ROSS, R.P., HILL, C., FITZGERALD, G.F. and COTTER, P.D. 2011. Altering the composition of caseicins A and B as a means of determining the contribution of specific residues to antimicrobial activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 2496-2501.

- NURMINEN, L.M. 2000. Milk-derived peptides and blood pressure. *Bulletin of the IDF*, 353: 11-15.
- NORRIS, C.S., COKER, C.J., BOLAND, M.J. and HILL, J.P. 2003. Analysis of the water-soluble fraction of a selection of cheeses for beta-casomorphin, its precursors and its analogues. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 58: 201.
- O'CONNOR, P.B. and HILLENKAMP, F. 2007. MALDI mass spectrometry instrumentation. In: F. Hillenkamp J. Peter-Katalinic (Editors), *MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 29-82, Weinheim.
- O'CONNOR, P.B. 2010. The development of matrix-assisted laser desorption/ionization sources. In: R.B. Cole (Editor), *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*, Wiley Publishing, pp. 184-213, New Jersey.
- OTAĞ, F.B. ve HAYTA, M. 2013. Gıdalarda biyoaktif peptit oluşumu ve aktivitesi üzerine ısı işlem ve fermantasyonun etkileri. *Gıda*, 38 (5): 307-314.
- OTLES, S. and CAGINDI, O. 2003. Kefir: a probiotic dairy composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2 (2): 54-59.
- ÖNER, Z., KARAHAN, A.G. and ÇAKMAKÇI, M.L. 2010. Effects of different milk types and starter cultures on Kefir. *Gıda*, 35 (3): 177-182.
- ÖZEN KARATAYLI, S. C. ve BOZDAYI, A. M. 2008. Proteomiks ve Gastroenteroloji. *Güncel Gastroenteroloji*, 12 (2): 72-76.
- ÖZER, B. 2006. Yoğurt Bilimi ve Teknolojisi. Sidas yayımları, 486 s., Şanlıurfa.
- PEKER, S. ve HELVACI, Ş.Ş. 2003. Akışkanlar Mekaniği: Kavramlar, Problemler, Uygulamalar. Literatür Yayıncılık, 767 s., İstanbul.
- PHELAN, M. and KERINS, D. 2011. The potential role of milk-derived peptides in cardiovascular disease. *Food & Function*, 2: 153-167.
- PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A., MARNILA, P., HUBERT, L., ROKKA, T., KORHONEN, H.J.T. and KARP, M. 1999. The effect of a-lactalbumin and b-lactoglobulin hydrolysates on the metabolic activity of *E. coli* JM103. *Journal of Applied Microbiology*, 87: 540-545.
- PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. 2001. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory. *Trends in Food Science and Technology*, 1: 347-356.

- PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A., ANTILA, P., PAAKKARI, I. and KORHONEN, H. 2002. Biologically active peptides derived from milk proteins. In: Z. Zee Hague (Editor), *Web-Complications on Food System Functionality 1*, Starkville, 15 p., Helsinki.
- PIHLANTO, A. 2013. Lactic fermentation and bioactive peptides. In: M. Kongo (Editor), *Lactic Acid Bacteria-R&D For Food, Health and Livestock Purposes*, InTech, pp. 309-332, Croatia.
- PINTADO, M.E., LOPES DA SILVA, J.A., FERNANDES, P.B., MALCATA, F.X. and HOGG, T.A. 1996. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. *International Journal of Food Science and Technology*, 31: 15-26.
- PRITCHARD, S.R., PHILLIPS, M. and KAILASAPATHY, K. 2010. Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, 43: 1545-1548.
- PURNOMO, H. and MUSLIMIN, L.D. 2012. Chemical characteristics of pasteurised goat milk and goat milk kefir prepared using different amount of indonesian kefir grains and incubation times. *International Food Research Journal*, 19 (2): 791-794.
- QUIRÓS, A., HERNÁNDEZ-LEDESMA, B., RAMOS, M., AMIGO, L. and RECIO, I. 2005. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity peptides derived from caprine kefir. *Journal of Dairy Science*, 88 (10): 3480-3487.
- RATTRAY, F.P. and O'CONNELL, O. 2011. Fermented Milks Kefir. In: J.W. Fukay (Editor), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, pp. 518-524, San Diego, USA.
- REA, M.C., LENNARTSSON, T., DILLON, P., DRINAN, F.D., REVILLE, W.J., HEAPES, M. and COGAN, T.M. 1996. Irish kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. *Journal of Applied Bacteriology*, 81: 83-84.
- REGAZZO, D., MOLLE, D., GABAI, G., TOMÉ, D., DUPONT, D., LEONIL, J. and BOUTROU, R. 2010. The (193–209) 17-residues peptide of bovine  $\beta$ -casein is transported through Caco-2 monolayer. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54: 1-8.
- RIZZELLO, C.G., LOSITO, I., GOBBETTI, M., CARBONARA, T., DE BARI, M. D. and ZAMBONIN, P.G. 2005. Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 88 (7): 2348-2360.
- RODRIGUES, K.L., GAUDINO CAPUTO, L.R., TAVARES CARVALHO, J.C., EVANGELISTA, J. and SCHNEEDORF, J.M. 2005. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25: 404-408.

- ROJAS-RONQUILLO, R., CRUZ-GUERRERO, A., FLORES-NÁJERA, A., RODRÍGUEZ-SERRANO, G., GÓMEZ-RUIZ, L., REYES-GRAJEDA, J.P., JIMÉNEZ-GUZMÁN, J. and GARCÍA-GARIBAY, M. 2012. Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *International Dairy Journal*, 26: 147-154.
- RUTHERFURD-MARWICK, K.J. and MOUGHAN, P.J. 2005. Bioactive peptides derived from food. *Journal of AOAC International*, (3): 955-966.
- SADY, M., DOMAGAŁA, J., NAJGEBÄUNER-LEJKO, D. and GREGA, T. 2009. Effect of whey protein concentrate addition on texture and rheological properties of kefir produced from skimmed milk. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25: (5-6): 763-771.
- SANDRÉ, C., GLEIZES, A., FORESTIER, F., GORGES-KERGOT, R., CHILMONCYK, S., LÉONIL, J., MOREAU, M.C. and LABARRE, C. 2001. A Peptide Derived from Bovine b-Casein Modulates Functional Properties of Bone Marrow-Derived Macrophages from Germfree and Human Flora-Associated Mice. *Journal of Nutrition*, 31 (11): 2936-2942.
- SAITO, T., NAKAMURA, T., KITAZAWA, H., KAWAI, Y. and ITOH, T. 2000. Isolation and structural analysis antihypertensive peptides that exist naturally in gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, 83: 1434-1440.
- SCHOEVERS, A. and BRITZ, T.J. 2003. Influence of different culturing conditions on kefir grain increase. *International Journal of Dairy Technology*, 56 (3): 183-187.
- SEPPO, L., JAUHAINEN, T., POUSSA, T. and KORPELA, R. 2003. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77: 326-330.
- SEYDIM, Z.B. 2001. Studies on fermentative, microbiological and biochemical properties of kefir and kefir grains. Ph. D. Thesis. Clemson University, Clemson, SC.
- SEZER, Ç. 2003. Kefirde laktik asit bakterilerinin tür düzeyinde araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars, 85 s.
- SHIOMI, M., SASAKI, K., MUROFUSHI, M. and AIBARA, K. 1982. Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain. *Japanese Journal Medicine Science & Biology*, 35: 75-80.
- SIENKIEWICZ-SZŁAPKA, E., JARMOŁOWSKA, B., KRAWCZUK, S., KOSTYRA, E., KOSTYRA, H. and IWAN, M. 2009. Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. *International Dairy Journal*, 19: 258-263.



- SILVA, S.V. and MALCATA, F.X. 2005. Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15: 1-15.
- SIMOVA, E., BESHKOVA, D., ANGELOV, A., HRISTOZOVA, T., FRENGOVA, G. and SPASOV, Z. 2002. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28: 1-6.
- SMACCHI, E. and GOBETTI, M. 1998. Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 22: 687-694.
- SMACCHI, E. and GOBETTI, M. 2000. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology*, 17: 129-141
- SUKHOV, S.V., KALAMKAROVA, L.I., ILCHENKO, L.A. and ZHANGABYLOV, A.K. 1986. Microfloral changes in the small and large intestines of chronic enteritis patients on diet therapy including sour milk products. *Voprosii Pitania*, 7: 14-17.
- SWAISGOOD, H.E. 1982. Chemistry of milk proteins. In: P.F. Fox (Editor), *Developments in Dairy Chemistry I: Proteins*. Applied Science Publishers, pp. 1-59, London.
- THÉOLIER, J., HAMMAMI, R., LABELLE, P., FLISS, I. and JEAN, J. 2013. Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *Journal of Functional Foods*, 5: 706-714.
- THOREUX, K. and SCHMUCKER, D.L. 2001. Kefir milk enhances intestinal immunity in young and but not old rats. *Nutrition and Aging*, 131: 807-812.
- TOBA, T., ARIHARA, K. and ADACHI, S. 1990. Distribution of microorganisms with particular reference to encapsulated bacteria in kefir grains. *International Journal of Food Microbiology*, 10: 219-224.
- TRATNIK, L., BOZANIC, R., HERCEG, Z. and DRGALIC, I. 2006. The quality of plain and supplemented kefir from goat's and cow's milk. *International Journal of Dairy Technology*, 59: 40-46.
- TUNÇTÜRK, Y. 2003. Sütte bulunan biyoaktif proteinler ve peptidler. SEYES Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu Tebliğler Kitabı, 355-340 ss., İzmir.
- VATANSEVER, S. 2006. Kan ve Hematopoez. In: R. Demir (Editör), *Histoloji ve Hücre Biyoloji: Patolojiye Giriş*. Palme Yayıncılık, 147-174 ss., Ankara.
- VINDEROLA, C.G, DUARTE, J., THANGAVEL, D., PERDIGÓN, G., FARNWORTH, E. and MATAR, C. 2005. Immunomodulating capacity of kefir. *Journal of Dairy Research*, 17: 195-202.

- WARNER, E.A., KENEKANIAN, A.D. and ANDREWS, A.T. 2001. Bioactivity of milk proteins: 1. anticariogenicity of whey proteins. *International Journal of Dairy Technology*, 54 (4): 151-153.
- WITTHUHN, R.C., SCHOEMAN, T., CILLIERS, A. and BRITZ, T.J. 2005. Impact of preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of kefir grains. *Food Microbiology*, 22: 337-344.
- WOUTERS, J.T.M., AYAD, E.H.E., HUGENHOLTZ, J. and SMIT, G., 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12: 91-109.
- WSZOLEK, M., TAMIME, A.Y., MUIR, D.D. and BARCLAY, M.N.I. 2001. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 34: 251-261.
- YAMAMOTO, N., AKINO, A. and TAKANO, T. 1994. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 77: 917-922.
- YAMAMOTO, N. and TAKANO, T. 1999. Antihypertensive peptides derived from milk proteins. *Nahrung*, 43 (3): 159-164.
- YAMAN, H., ELMALI, M. and KAMBER, U. 2010. Observation of lactic acid bacteria and yeast populations during fermentation and cold storage in cow's, ewe's and goat's milk kefirs. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16: 113-118.
- YILDIZ, F. 2009. Farklı yağ oranlarının ve farklı starter kültürlerin kefirin nitelikleri üzerine etkisi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 200 s.
- YILMAZ, L., YILSAY, T.O. and BAYAZIT, A.A. 2006. The sensory characteristics of berry-flavoured kefir. *Czech Journal Food Science*, 24: 26-32.
- YÜKSEKDAĞ, Z.N. ve BEYATLI, Y. 2003. Kefir mikroflorası ile laktik asit bakterilerinin metabolik, antimikrobiyal ve genetik özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1 (2): 49-69.
- YÜRÜT, D.D. 2010. Farklı stres koşullarında *debaryomyces hansenii*' den hücre dışı protein üretiminin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, 149 s.
- ZACCONI, C., PARISI, M.G., SARRA, P.G., DALLAVELLA, P. and BOTTAZZI, V. 1995. Competitive exclusion of *Salmonella kedougou* in kefir fed chicks. *Microbiologie, Aliments, Nutrition*, 12: 387-390.

## 7. EKLER

### Ek 1. MALDI-TOF kütle spektrometresi ile kefir örneklerinde belirlenen ana peptid sinyalleri

- Ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen ve bağlı kuantifikasyonu yapılan 21 ana peptid sinyali

Peptid sinyali (m/z)	Bağlı yoğunluk (%)							
	S2558	S2518	S2554	S2514	S2058	S2018	S2054	S2014
977.5	3.14	2.85	5.99	3.38	4.63	5.85	3.28	4.55
1052.6	4.50	6.75	11.66	6.24	5.34	4.38	4.06	8.09
1109.6	3.94	3.85	10.80	8.53	4.31	5.22	4.22	6.90
1151.7	41.94	52.08	91.98	71.85	66.17	67.63	40.91	62.80
1203.6	41.89	26.76	60.69	35.26	40.63	57.17	36.53	41.69
1329.6	39.40	27.74	81.71	46.78	38.78	54.81	39.05	68.65
1366.7	245.51	75.14	236.23	207.68	193.85	370.83	249.02	267.05
1382.6	13.14	9.70	27.53	17.64	12.88	18.71	14.45	23.01
1392.7	7.96	9.25	11.29	7.14	17.53	24.12	8.69	17.79
1558.8 <sup>a</sup>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
1608.9	46.49	47.96	136.74	104.66	38.56	55.74	71.33	83.98
1618.9	24.14	25.10	36.53	30.24	20.76	25.15	26.92	32.45
1700.9	91.43	84.50	152.80	166.19	108.44	113.46	125.51	125.46
1702.9	80.99	80.89	122.85	125.92	93.79	100.24	97.02	97.80
1718.1	1557.80	1502.17	1819.21	1838.34	1562.96	1688.73	1538.67	1590.78
1734.1	9.48	9.94	13.10	8.66	7.21	9.07	5.32	5.38
1782.0	9.59	10.70	10.01	9.59	15.33	19.07	13.31	14.61
1877.1					<sup>b</sup>			
1881.1	469.22	436.75	464.68	527.03	519.49	596.82	470.63	488.53
1994.1	39.59	48.11	40.56	43.98	53.99	59.38	51.67	51.68
2107.2	128.67	107.37	98.29	114.65	132.08	148.36	145.68	124.17
2120.0					-			
2139.2	34.27	31.17	78.24	59.35	18.21	28.91	52.13	55.38
2254.3					-			
2331.3					-			
2340.3	3.88	4.31	11.07	8.42	2.58	4.71	7.15	7.63

<sup>a</sup> Referans peptidi olup relatif yoğunluğu %100 olarak kabul edilmiştir.

<sup>b</sup> Kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenip ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilenlerde belirlenemeyen peptid sinyalleri

- Kefir danesi kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenen ve bağlı kuantifikasyonu yapılan 20 ana peptid sinyali

Peptid sinyali (m/z)	Bağıl yoğunluk (%)							
	D2558	D2518	D2554	D2514	D2058	D2018	D2054	D2014
977.5	5.74	5.78	5.57	5.84	5.26	8.16	4.61	4.70
1052.6	7.06	12.05	10.87	17.27	11.79	10.16	12.98	9.53
1109.6	5.25	7.37	10.60	11.88	9.51	7.89	15.63	14.19
1151.7	23.78	31.30	23.54	31.52	21.69	23.87	22.79	24.91
1203.6	44.49	27.92	31.89	34.12	29.01	47.10	30.68	26.97
1329.6	28.71	24.78	55.07	33.45	26.49	34.35	51.78	50.97
1366.7	107.19	74.88	73.09	75.71	59.56	121.50	97.23	96.05
1382.6	8.04	5.07	7.53	6.41	3.87	9.36	9.86	10.20
1392.7								
1558.8 <sup>a</sup>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
1608.9	13.98	8.83	22.86	15.90	5.71	7.82	21.76	23.10
1618.9								
1700.9	20.48	24.43	16.58	28.60	10.95	15.07	15.38	19.38
1702.9	22.58	20.61	16.61	24.81	11.32	17.90	17.52	23.53
1718.1	457.52	425.00	374.59	416.84	387.94	394.25	484.95	473.47
1734.1								
1782.0								
1877.1	19.58	13.10	10.95	7.90	26.05	32.54	23.96	12.96
1881.1	287.84	208.94	235.59	243.29	226.10	262.23	311.90	295.51
1994.1	44.97	56.85	32.65	54.00	39.75	42.26	46.41	46.25
2107.2	146.26	121.71	125.69	134.32	119.54	122.34	148.60	159.00
2120.0	8.58	5.92	8.01	5.17	9.97	16.25	13.27	9.68
2139.2	21.06	8.66	30.20	19.36	9.52	12.70	47.81	42.35
2254.3	24.32	27.20	18.87	29.23	31.36	25.32	29.41	20.86
2331.3	9.35	24.38	9.31	12.85	22.57	20.25	13.77	14.57
2340.3								

<sup>a</sup> Referans peptidi olup relatif yoğunluğu %100 olarak kabul edilmiştir.

<sup>b</sup> Ticari kefir starter kültürü kullanılarak üretilen kefir örneklerinde belirlenip kefir danesi kullanılarak üretilenlerde belirlenemeyen peptid sinyalleri

## Ek 2. Amino asitlerin kodlanması

<b>Amino asit</b>	<b>Üç harf</b>	<b>Tek harf</b>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparajin	Asn	N
Aspartik asit	Asp	D
Sistein	Cys	C
Glutamik asit	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glisin	Gly	G
Histidin	His	H
İzolösin	Ile	I
Lösin	Leu	L
Lisin	Lys	K
Metiyonin	Met	M
Fenilalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Treonin	Thr	T
Triptofan	Trp	W
Tirozin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## ÖZGEÇMİŞ

Ayşe AŞCI ARSLAN 1983 yılında Beyşehir’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İzmir’de tamamladı. 2002 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nden 2006 yılında mezun oldu.

2006 yılı Güz Dönemi’nde Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda başladığı yüksek lisans öğrenimini 2008 yılında tamamladı. Aynı bölümde 2009 Bahar Dönemi’nde doktora programına başlamış olup halen Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü kadrosunda Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.