



Fermentasyon ve Enzimatik Hidroliz Uygulanan Peynir Altı Sularının Bazı Biyoaktif Özellikleri^A

Atilla TAŞ¹, Onur GÜNEŞER^{2*}

Öz: Bu çalışmada, peynir altı suyunun hem farklı tür probiyotik laktik asit bakterileri ile fermente edilerek, hem de çeşitli bitkisel ham enzim ekstraktları (%4) ile hidroliz edilerek biyoaktif peptitler yönünden zenginleştirilmiş peynir altı suyunun üretilmesi amaçlanmıştır. Fermente ve hidroliz edilmiş peynir altı suyu örneklerinin fizikokimyasal, mikrobiyolojik ve bazı biyoaktif özellikleri araştırılmıştır. Araştırmada elde edilen bulgulara göre, ananas, kavun ve enginar kabuklarından elde edilen ham enzim ekstraktlarının proteolitik enzim aktiviteleri sırasıyla 5.066, 4.921 ve 5.514 UI/mL olarak belirlenmiştir. Fermente edilen peynir altı suyu örneklerinin anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitör aktiviteleri 2.02-6.48 kat arasında artarken, hidrolize peynir altı suyu örneklerinde ise 1.85 ile 3.29 kat arasında artış göstermiştir. Bitkisel ham enzim ekstraktlarıyla hidroliz edilmiş peynir altı suyu örneklerinde %35 ile %53 arasında değişen antioksidan aktivite artışının meydana geldiği tespit edilmiştir. Elektroforetik analizler sonucunda; β -laktoglobulin ve α -laktalbumin'in fermentasyon ve hidroliz sonucunda parçalanmaları farklı düzeyde olduğu belirlenmiştir. Fermente edilen peynir altı suyu örneklerinde yapılan *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus rhamnosus* sayımında sırasıyla 0.39 log kob/mL ve 1.09 log kob/mL düzeyinde bir artışın olduğu belirlenmiştir. Fermente ve hidroliz edilmiş peynir altı sularının *Escherichia coli* ATTC 25922, *Staphylococcus aureus* ATTC 6538, *Listeria monocytogenes* 4c RSKK 476 ve *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* ATCC 700408 bakterileri üzerine herhangi bir mikrobiyel inhibisyon sağlamadığı da tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörü, antioksidan etki, biyoaktif peptitler, fermentasyon, enzimatik hidroliz, peynir altı suyu.

^A Bu çalışma Atilla TAŞ tarafından hazırlanan "Fermentasyon ve Enzimatik Hidroliz Uygulanan Peynir Altı Suyunun Bazı Biyoaktif Özelliklerinin İncelenmesi" başlıklı yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

* **Sorumlu yazar/Corresponding Author:** ² Onur GÜNEŞER, Uşak Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Uşak, Türkiye, onur.guneser@usak.edu.tr [OrcID 0000-0002-3927-4469](https://orcid.org/0000-0002-3927-4469)

¹ Atilla TAŞ, Uşak Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı ve Uşak Süt A.Ş., 64000, Uşak, Türkiye, atas@enkasut.com.tr [OrcID 0000-0001-7162-6762](https://orcid.org/0000-0001-7162-6762)

Some Bioactive Properties of Whey Applied Fermentation and Enzymatic Hydrolysis

Abstract: In this study, it was aimed to produce whey enriched with bioactive peptides by both fermentation of probiotic lactic acid bacteria and hydrolyzation of certain crude plant protease extracts (4%). Physico-chemical, microbiological and some bioactive properties of the fermented and hydrolyzed whey samples were investigated. According to the findings of the study, proteolytic activities of the crude enzyme extracts obtained from the peels of pineapple, watermelon and artichoke were determined as 5.066, 4.921 ve 5.514 UI/mL, respectively. Angiotensin converting enzyme inhibitor activities of the fermented whey samples increased between 2.02 and 6.48 fold, while these inhibitor activity values of the whey samples hydrolyzed by the crude enzyme extracts increased between 1.85 and 3.29 fold. It was determined that an increase from 35 to 53 % in the antioxidant activities of the whey samples hydrolyzed by the crude enzyme extracts. As a result of electrophoretic analysis; it was determined that the degradations of β -lactoglobulin and α -lactalbumin were occurred by hydrolysis and fermentation at the different levels. An increase in cell of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus* in fermented whey samples were found as 0.39 log cfu/mL and 1.09 log cfu/mL, respectively. It was determined that the fermented and hydrolyzed whey samples had no antimicrobial activity on *Escherichia coli* ATTC 25922, *Staphylococcus aureus* ATTC 6538, *Listeria monocytogenes* 4c RSKK 476, ve *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* ATCC 700408.

Keywords: Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor, antioxidant effect, bioactive peptit, enzymatic hydrolysis, whey.

Giriş

Günümüzde insan metabolizması üzerinde birçok fizyolojik etkiye sahip biyolojik aktif bileşenlerin rolü giderek önem kazanmaktadır. Söz konusu bu biyoaktif bileşenlerin bir grubunu da gıda proteinlerinden ortaya çıkan biyoaktif peptitler oluşturmaktadır. Hayvansal ve bitkisel proteinler potansiyel biyoaktif bileşenler içermelerine rağmen biyoaktif peptitler açısından en önemli kaynaklar süt ve süt ürünleridir. Süt kaynaklı biyoaktif peptitlerin büyük bir kısmı sütte bulunan kazein ve serum proteinlerinden oluşmaktadır. Farklı yollarla açığa çıkan süt kaynaklı biyoaktif peptitler ilaç veya hormon benzeri bir aktivite gösterip insan vücudunda fizyolojik tepkimelere cevap veren hedef hücre reseptörlerine bağlanmakta ve onlarla etkileşimde bulunmaktadır. Biyoaktif peptitlerin insan sağlığı üzerine; antihipertansif, antitrombik, opioid, antioksidatif ve antimikrobiyel, bağışıklık sistemini düzenleyici ve biyotransformasyon etkileri bulunmaktadır (Meisel, 1997; Chabance ve ark., 1998; Meisel ve Bockelmann, 1999; Korhonen ve Pihlanto-Leppälä, 2000).

Biyoaktif peptitlerin biyoyararlılığı ve insan metabolizmasındaki etkileri uzun süreden beri çalışılmakta olup üzerindeki tartışmalar halen devam etmektedir. Ayrıca, fonksiyonel gıdaların biyoaktif peptitlerle zenginleştirilmesi, bu peptitleri içeren fonksiyonel gıda ürünlerinin satışa sunulması veya farmakolojik

preparatlarda kullanımlarıyla ilgili değişik yaklaşımlar bulunmaktadır. Bu nedenle süttten veya peynir altı suyundan (PAS) enzimatik hidrolizasyon (bitkisel ve mikrobiyal kaynaklı) veya proteolitik aktiviteye sahip starter kültürlerin faaliyetleri sonucu üretilmesiyle elde edilen biyoaktif peptitler, katma değeri yüksek ürün elde etme açısından büyük bir potansiyel olarak görülmektedir (Korhonen ve Pihlanto-Leppälä, 2006; Korhonen, 2009). Konu ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde; insan metabolizmasında etkili olan tripsin, kimotripsin gibi enzimler kullanılarak süt ve süt ürünlerindeki bileşenlerden biyoaktif peptitlerin açığa çıkarılması ve tanımlanması üzerine ilginin giderek arttığı görülmektedir (Meisel ve Bockelmann, 1999; Hernández-Ledesma ve ark., 2007). Bu nedenle, farklı tür hayvan sütlerinin doğrudan kullanımıyla veya bu sütlerden üretilen peynirlerden elde edilen PAS'ların laktik asit bakterileri veya farklı enzimlerle muamelesi sonucunda üretilen biyoaktif peptitlerin eldesi üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Tsai ve ark., 2008; Abdel-Hamid ve ark., 2017; Aguilar-Toalá ve ark., 2017; Welsh ve ark., 2017). Konu ile ilgili bir çalışmada, ananasdan elde edilen bromelain enzimi kullanılarak hidrolize inek sütü formülasyonu geliştirilmiştir (Mederios ve ark., 2014). Araştırmacılar elde edilen üründe 3-10 kg/mol ağırlığında biyoaktif peptitlerin olduğunu, ürünün yağ oranına göre anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitör aktivitesinin değişebildiğini ve 100:1 (süt:enzim) oranında kullanılan enzim miktarında yağsız ve yarım yağlı üründeki ACE inhibitör aktivitesinin sırasıyla % 35.67 ve % 43.94 düzeyinde olduğunu belirlemiştirler. Yabani enginardan elde edilen enzimlerden biyoaktif peptit üretiminin incelendiği diğer bir çalışmada (Tavares ve ark., 2011), bitkiden elde edilen proteolitik enzim ekstraktının PAS proteinlerinin hidrolizini gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Çalışmada PAS'dan enzimatik hidrolizi ile ülser etkisine karşı koruyucu özellik gösteren biyoaktif peptitlerin üretilebileceği tespit edilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada (Barros ve ark., 2011), yabani enginar çiçeklerinden elde edilen aspartik proteazın α -laktalbumin'i büyük ölçüde parçaladığı, β -laktoglobulin'i ise çok düşük oranda hidrolize ettiği belirlenmiştir. Enzimin, her iki proteini parçalaması sonucunda düşük molekül ağırlıklı peptitlerin oluştuğu belirlenmesine rağmen, biyoaktif özellikleri hakkında detaylı bir bilgi bulunmamaktadır.

Laktik asit bakterileri artisanal ve geneksel gıdalardan veya insanların farklı organlarından izole edilebilmektedir. Laktik asit bakterileri insan metabolizmasından olumlu etkilere sahip yararlı metabolitleri üretmekte ve bazı türleri probiyotik özellik göstermektedir (Masood ve ark., 2011). Günümüzde laktik asit bakterileri üzerine birçok çalışma yürütülmektedir. Laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak kullanıldığı gıdaların başında fermente süt ürünleri gelmektedir. Laktik fermentasyon sonucu, sütte bulunan proteinler (ör; kazein, serum proteinleri) daha küçük peptitlere parçalanarak, opioid, mineral bağlayıcı, ACE inhibitör, antioksidan, antimikrobiyel ve hücre düzenleyici özellikler göstermektedir (Korhonen ve Pihlanto-Leppälä, 2006; Venegas-Ortega ve ark., 2019). Le Blanc ve ark. (2002) *Lactobacillus helveticus* R389 ile fermente ettikleri yağsız sütte bağışıklık sistemi düzenleyici peptitlerin oluşumunu incelemiştirler. Çalışmada sonucunda fermente sütün bileşiminde üç farklı biyoaktif peptit fraksiyonunun oluştuğu ve söz konusu fraksiyonların *in vivo* ortamda bağ dokusunda oluşan fibrokarsom tümörüne karşı karşı antitümör etki gösterdiği, IgA+B hücrelerini artışı sağlayarak da bağışıklık sistemi güçlendirici etkilerinin olduğunu belirlemiştirler. Yapılan diğer bir çalışmada farklı türde mikrobiyel kültürler kullanarak ACE inhibitör aktivitesi yüksek fermente sütü üretimi incelenmiştir (Chaves-López ve ark., 2014), *P. kudriavzevii* KL84A, *Lactobacillus plantarum* LAT3,

Enterococcus faecalis KE06 birlikte kullanılmasıyla yüksek ACE inhibitör aktivitesine sahip fermente süt üretiminin gerçekleştirilebileceği belirlenmiştir. Buna göre, söz konusu fermente sütün peptit içeriğinin 2 mg/mL düzeyinde olduğu ve 6°C'de 7 gün depolama süresince fermente sütteki ACE inhibitör aktivitesinin başlangıç ACE inhibitör aktiviteye göre 2 kat, peptit içeriğinin ise 1.7 kat artış gösterdiği saptanmıştır. Hamme ve ark. (2009) ise asit ile pıhtılaştırılmış keçi sütünden elde edilen peynir altı suyunun *Lactobacillus rhamnosus* ve *Kluyveromyces marxianus* ile fermentasyonu sonucunda sırasıyla % 52 ve % 45 oranında ACE inhibitör aktivitesine sahip fermente peynir altı suyunun üretilebileceğini belirlemiştir.

Literatür verileri değerlendirildiğinde, farklı proteolitik enzimler ve/veya laktik asit bakterileri kullanılarak PAS'dan farklı fizyolojik etkilere sahip biyoaktif peptitlerin üretim potansiyelinin bulunduğu açıkça görülmektedir. Bu çalışmada, probiyotik özellik gösteren *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus rhamnosus* saf kültürleri ile fermente edilmiş PAS'ın yanısıra ananas, enginar ve kavun kabuklarından elde edilen ve sırasıyla bromelain, cardoon ve cucumis proteolitik enzimlerini içerdiği bilinen ham enzim ekstraktları ile hidrolize PAS üretimi gerçekleştirilmiş ve elde edilen ürünlerin bazı kimyasal ve biyolojik özellikleri incelenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Çalışmada kullanılan PAS, Uşak'da PAS tozu üretimi yapan Uşak Süt A. Ş. (Uşak) firmasından pastörize şekilde temin edilmiştir. İşletmeye getirilen PAS, peynir işletmelerinde üretilen beyaz peynir, kaşar peyniri ve lor peyniri yapımından arta kalan PAS'ların karışımından oluşmaktadır. Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar ve standart maddeler analitik /kromatografik saflıkta olup Merck (Darmstadt, Almanya) ve Sigma-Aldrich (St Louis, ABD)'den satın alınmıştır. Mikrobiyel fermentasyon için kullanılan *L. acidophilus* (nu-trish® LA-5®, Chr Hansen) ve *L. rhamnosus* (LGG® Grade G, Chr Hansen) saf kültürleri dondurularak kurutulmuş (freeze dry) olarak Chr. Hansen (İstanbul, Türkiye) firmasından temin edilmiş ve soğuk zincir muhafaza edilerek laboratuvara getirilmiştir. Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan besiyerleri LabM (Lancashire-İngiltere) ve Sigma-Aldrich (St Louis, ABD) firmalarından satın alınmıştır.

Yöntem

Peynir Altı Suyunun Pastörizasyonu: Çalışmada kullanılan PAS'ın pastörizasyonu temin edilen işletmede (Uşak Süt, A.Ş., Uşak) bulunan plakalı ısı değiştirici sistem (EDM-PAST -1500, Edelmak Mak. San Tic. Konya) ile 85°C'de 15-30 sn şeklinde olarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra aseptik şekilde 2 L'lik şişelere konularak hızlıca mikrobiyel fermentasyon ve enzimatik hidroliz işlemleri için hazırlanmıştır.

Peynir Altı Suyunun Probiyotik Bakteriler ile Fermentasyonu: Fermentasyon işlemi için, pastörize PAS'ın pH'sı 6.68'e 0.1 N steril NaOH ile ayarlanmış ve aseptik koşullarda fermentasyon şişelerine 500 mL'lik 6 eşit kısma ayrılmıştır. Daha sonra PAS örneklerine yaklaşık 6 log düzeyinde *L. acidophilus* ve *L. rhamnosus*

bakteri solüsyonları inoküle edilmiştir. İnokülasyondan sonra PAS'ların son pH'ları 4.7-4.6 olacak şekilde 37°C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılarak fermente edilmiştir. Fermentasyon, *L. acidophilus* için mikroaerobik olarak 150 rpm karıştırma hızında, *L. rhamnosus* ise anaerobik olarak inkübatörde gerçekleştirilmiştir (DAIHAN, IS-30, Güney Kore). Fermentasyonun 6., 12. ve 24. saatlerinde PAS örneklerinden alınarak biyokimyasal ve mikrobiyolojik analizler gerçekleştirilmiştir.

Bitkisel Ham Enzim Ekstraktlarının Hazırlanması: PAS'ların enzimatik hidrolizi için ananas, enginar ve kavun kabuklarından ultra saf su ile elde edilen ham enzim ekstraktları kullanılmıştır. Söz konusu ham enzim ekstraktlarının elde edilmesinde Konrad ve ark. (2014)'nın önerdiği metot modifiye edilmiştir. Bu amaçla, ananas, enginar ve kavun kabukları etüvde 50°C'de 3-5 gün kurutularak laboratuvar tipi blendardan geçirilmiştir. Daha sonra, toz haline gelen kabuklardan 25 g tartılmış ve cam şişelere aktarılmıştır. Örneklerin üzerine 250 mL ultra saf su ilave edilerek oda sıcaklığında 150 rpm'de 24 saat çalkalanmış ve ham ekstraktlar bir tülbentten süzülerek 250 mL'lik beherlere alınmıştır. Beher içerisinde bulunan ekstraktlara % 30 doygunluğa ulaşana kadar amonyum sülfat +4°C'de eklenerek karıştırılmıştır. Daha sonra ekstraktlar 4000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj (Lab 312, Türkiye) edilmiştir. Santrifüj sonunda berrak supernatant süzülmüş ve kalıntı kısma tekrar 30 mL ultra saf su eklenmiştir. Saf su eklenen ekstraktlar diyaliz membranına (Spectrum, Spectra/Por 1 Dialysis Tubing, 6-8 kD MWCO) alınarak saf suya karşı +4°C'de 24 saat boyunca diyalizi gerçekleştirilmiştir.

Peynir Altı Suyunun Enzimatik Hidrolizi: PAS'ın enzimatik hidrolizi için ananas, kavun ve enginardan elde edilen ham enzim ekstraktları kullanılmıştır. Hidroliz işlemi için PAS mikrobiyolojik fermentasyonda olduğu gibi hazırlanmıştır. Daha sonra PAS örneklerine ham enzim ekstraktlarından 10 mL ilave edilerek hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Hidrolizasyon 37°C'de, 150 rpm karıştırma hızında 24 saat sürdürülmüştür. Hidroliz süresince 6., 12. ve 24. saatlerde PAS örneklerinden numuneler alınarak hızlıca enzim aktivitesini yavaşlatmak için 5°C'ye soğutulmuştur. Daha sonra örnekler hızlıca -30°C'ye dondurulmuştur.

Kimyasal Analizler

Genel Kompozisyon: Çalışmada kullanılan PAS'ın pH, kurumadde ve kül miktarının belirlenmesi Bradley ve ark. (1992)'a göre yapılmıştır. Örneklerin protein miktarı Kjeldahl yöntemi ile belirlenmiştir (Bradley ve ark., 1992).

Ham Enzim Ekstraktların Proteolitik Aktivitesi: Ananas, kavun ve enginar kabuklarından elde edilen ham enzim ekstraktlarının proteolitik aktiviteleri spektrofometrik olarak Konrad ve ark. (2014)'e göre yapılmıştır. Bu metotta spesifik olmayan proteaz aktivitesi, kazein'in substrat olarak kullanılmasıyla belirlenmektedir. Bitkisel ham enzim ekstraktlarının proteolitik aktivitesi daha önceden oluşturulmuş tirozin grafiği yardımıyla UI/mL enzim ekstraktı olarak belirlenmiştir.

Jel Elektroferez Yöntemiyle Hidroliz Düzeyinin Belirlenmesi: Fermente ve hidrolize PAS proteinlerinin hidroliz düzeylerinin belirlenmesi amacıyla SDS-PAGE jel elektroferez yöntemi kullanılmıştır. Bu amaç için Biorad firmasından Tris-Tricine Precast Gel (16.5% 1.5-30 kD, Biorad, ABD) temin edilmiştir. Fermentasyon ve enzimatik yollarla hidroliz edilen peynir altı suları öncelikle 15 mL'lik falkon tüplerine alınarak 4000 rpm'de

20 dk santrifüj edilmiş ve santrifüj edilen numunelerin orta kısmından 50 µL örnek eppendorf tüplerine alınarak 50 µL ultra saf su ile seyreltilmiştir. Daha sonra, eppendorf tüpünün içerisine 25 µL tricine örnek tamponu (200 mM Tris-HCl, pH 6.8, % 2 sodyum dodesil sulfat - SDS, %40 gliserol, %0.04 Coomassie Brilliant Blue G-250, 2% β-mercaptoethanol, Biorad, ABD) eklenerek 15 dk vorteks uygulanmıştır. Hazırlanan örnekler 95°C'deki su banyosunda 6.5 dk. bekletilerek protein denatürasyonu gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE elektroforez ünitesine yerleştirilen jel kuyucuğuna her biri 14 µL olacak şekilde numuneler ve protein standardı (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (2-250 kD, Biorad-ABD) yüklenmiştir. Numuneler, 60 V'da 10 dk., 80 V'da 125 dk. buffer ortamında (10xTris/Tricine/SDS buffer, Biorad-ABD) jelde yürütülmüştür. Elde edilen jellerin asetik asitte 20-30 dk. fiksasyonu, %0.1'lik Coomassie Blue R250 boya çözeltisi içerisinde 24 saat boyaması ve çalkalayıcı üzerinde 24 saat süreyle metanol:asetik asit çözeltisinde (1:1) yıkaması yapılarak protein bantlarının görünür hale gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra, jellerin görüntüleri UV Transilluminatör'e alınarak fotoğrafları çekilmiştir. Jel fotoğraflarının Gel Analyser 2010 (Freeware, from Dr. Istvan Lazar) jel görüntüleme paket programıyla protein bantlarının yoğunlukları belirlenmiştir.

Peynir Altı Suyunun Biyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Antioksidan Aktivite: Fermente ve hidrolize PAS örneklerinde antioksidan aktivite iki farklı yöntem ile belirlenmiştir. Bunlar; Benvenuti ve ark. (2004) tarafından önerilen DPPH (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil) yöntemi ve Apak ve ark. (2004) tarafından önerilen CUPRAC (Bakır İndirgeyici Antioksidan Kapasite) yöntemidir. Her iki yöntemde de fermentasyon ve enzimatik yolla hidroliz edilen PAS örnekleri seyreltme yapılmadan kullanılmıştır.

Anjiyotensin-Dönüştürücü Enzim (ACE) İnhibitör Aktivitesi: PAS örneklerinde ACE inhibitör aktiviteleri Cushman ve Cheung (1971) tarafından geliştirilen yöntemine göre yapılmıştır. ACE inhibitör aktivitesinin ölçülmesinde fermente ve hidrolize PAS örnekleri doğrudan kullanılmış olup Şanlı ve ark. (2018) metod koşulları takip edilmiştir.

Antimikrobiyel Aktivite: PAS örneklerinde antimikrobiyel aktivite disk difüzyon yöntemiyle Cherrat ve ark. (2013)'e göre gerçekleştirilmiştir. Fermente ve hidrolize PAS örneklerinin patojenler üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için *Escherichia coli* ATTC 25922, *Staphylococcus aureus* ATTC 6538, *Listeria monocytogenes* 4c RSKK 476, ve *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* ATCC 700408 bakterisi suşları kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak spiramisin (100 µg) ve eritromisin (100 µg) antibiyotiklerinin solüsyonları kullanılmıştır.

Mikrobiyolojik Analizler

Probiyotik Bakterilerin Sayımı: PAS'ın fermentasyonu sırasında probiyotik mikroorganizmaların mikrobiyel gelişimlerini izlemek için mikrobiyolojik sayımları gerçekleştirilmiştir. *L. acidophilus* sayımı için modifiye MRS-Agar besiyeri (1.5 g/L safra tuzları içeren), *L. rhamnosus* sayımı için modifiye MRS-Agar (%0.04 g bromkresol yeşil) kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlar hazırlanarak söz konusu bakterilerin dökme plak yöntemiyle

ekimleri yapılmıştır. Ekim yapılan petriyer *L. acidophilus* için mikroaerofilik, *L. rhamnosus* ise anaerobik kavanozda (Anaerocult® A, Merck) ve Anaerocult® A (Merck) anaerobik kit varlığında anaerobik koşullarda 37°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmış ve bu süre sonunda gelişen koloniler sayılmıştır. Probiyotik bakterilerin sayıları log kob/mL olarak ifade edilmiştir (Dave ve Shah, 1996; Kailasapathy ve ark., 2008).

İstatistiksel Analizler

Çalışmada, PAS örneklerinin kimyasal ve biyokimyasal özelliklerindeki farklılıkları belirlemek amacıyla çift yönlü (two-way ANOVA) varyans analizi tekniği kullanılmıştır. Fermantasyon süresince probiyotik bakterilerin sayılarında meydana gelen değişimler tek yönlü varyans (One-way ANOVA) tekniği ile analiz edilmiştir. İstatistiksel olarak önemli olan farklılıkların karşılaştırılması için TUKEY çoklu karşılaştırma testinden yararlanılmıştır. (Sheskin, 2004). Tüm istatistiksel analizlerin yapılmasında SPSS for Windows (version 20.0) ve Minitab (version 16) paket programları kullanılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Genel Kompozisyon

Çalışmada kullanılan PAS'ın kurumadde ve protein miktarı, temin edildiği işletmede ultrafiltrasyon yoluyla % süt bileşimine yakın olacak şekilde ultrafiltrasyon sistemi ile (~10 °Bx, ve ~% 3 protein) ayarlanmıştır. Genel bileşimin belirlenmesi için yapılan analizlerde, PAS örneğinde kurumadde, asitlik (pH), protein ve kül miktarı sırasıyla % 8.06, 7.1 pH, % 2.10 ve % 1.16 olarak tespit edilmiştir. Blaschek ve ark. (2007) yaptıkları bir çalışmada Cheddar peyniri üretiminden arta kalan tatlı PAS'da ortalama % 6.6 toplam kurumadde, % 0.2 yağ, % 0.8 protein ve % 0.2 tuz miktarı olduğu belirlenmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada (Lievore ve ark., 2015), Brazilya'nın Paraná ilinde toplanan asit PAS örneklerinin ortalama % 5.57 toplam kuru madde, % 0.84 protein, % 0.61 kül ve % 1.18 laktoz içerdiği bildirilmiştir. Buna göre, çalışmada ultrafiltrasyon yoluyla bileşimi ayarlanan PAS örneğinin bileşiminin hiçbir işlem görmemiş tatlı veya asit PAS örneklerine göre biraz daha yüksek olduğu görülmektedir.

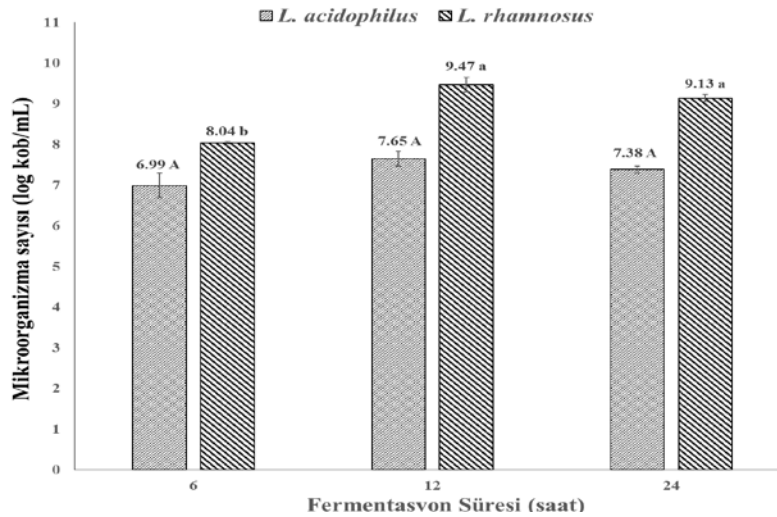
Bitkisel Ham Enzim Ekstraktlarının Proteolitik Aktiviteleri

Yapılan spesifik olmayan proteaz aktivitesi analizi sonucunda, ananas, kavun ve enginar kabuklarından elde edilen enzim ekstraktlarının proteolitik enzim aktiviteleri sırasıyla 5.066, 4.921 ve 5.514 UI/mL enzim ekstraktı olarak belirlenmiştir. Enginardan elde edilen ham enzim ekstraktının proteolitik aktivitesinin diğer ekstraktlara göre daha yüksek olduğu söylenebilir. Ancak, SDS-PAGE analizlerinde kavundan elde edilen ham enzim ekstraktının PAS proteinlerini parçalaması daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durumun, analizde substrat olarak kazein proteininin kullanımından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü, proteinlerin yapısal düzeninden ve protein-enzim arasındaki etkileşimlerden enzim aktivitesinin etkilendiği bilinmektedir. Literatürde, bitkisel

kaynaklardan elde edilen enzimlerin aktiviteleri farklı yöntemlerle belirlenmiş ve sonuçlar çok fazla değişkenlik göstermektedir. Lestari ve Suayta (2019) yaptıkları bir çalışmada ananas kabuklarından elde ettikleri bromelain ham ekstraktının proteolitik aktivitesini 55°C'de 8.333 UI/mL enzim ekstratı olarak belirlemişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada (Esposito ve ark., 2016), enginar kabukları ve alp devedikeni çiçeğinden elde edilen aspartik proteaz enzim ekstraktlarının toplam enzim pıhtılaştırma aktivitelerini (enzyme clotting activity) 9.26 U ve 320.24 U olarak belirlemişlerdir.

Fermente ve Hidrolize Peynir Altı Sularında Probiyotik Bakterilerin Gelişimleri

Fermente PAS örneğinde *L. acidophilus* ve *L. rhamnosus*'un mikrobiyel gelişimleri Şekil 1'de gösterilmiştir. Fermentasyon süresince her iki probiyotik bakterinin sayısının 6 log kob/mL düzeyinden olduğu, *L. acidophilus* sayısında ortalama 0.39 log kob/mL düzeyinde ve *L. rhamnosus*'da ise 1.09 log kob/mL düzeyinde bir artış meydana geldiği belirlenmiştir. Fermentasyon süresince *L.rhamnosus* sayısındaki artış önemli bulunurken ($p<0.05$), *L. acidophilus* sayısındaki artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p<0.05$).



Şekil 1. Fermentasyon süresince probiyotik bakterilerin peynir altı suyundaki mikrobiyel gelişimleri

^{A-B} Farklı büyük harflerle gösterilen *L. acidophilus*'a ait ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p<0.05$).

^{a-b} Farklı küçük harflerle gösterilen *L. rhamnosus*'a ait ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p<0.05$).

Probiyotik bakterilerin fermente PAS'daki mikrobiyel gelişimlerinden elde ettiğimiz bulgular yapılan bazı çalışmalarla benzerdir (Virtanen ve ark., 2007; Pescuma ve ark., 2008). Pescuma ve ark. (2018) yaptıkları bir çalışmada, *Streptococcus thermophilus* CRL 804, *Lactobacillus acidophilus* CRL 636 ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 454 kullanılarak fermente edilen rekonstitüye PAS tozunun fonksiyonel içecek üretim potansiyelini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, *L. acidophilus* CRL 636'nın hem 37°C hem de 42°C'de 24 saat fermentasyon süresince mikrobiyel gelişiminin ortalama 2.5 log kob/mL olduğu ve fermentasyon süresince PAS'daki α -laktalbumin'in parçalanmasının β -laktoglobulin'den (2.3–3.4 kat) daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Süt endüstrisinde kullanılan çeşitli starter kültürlerle fermente edilen sütlerdeki

mikrobiyel gelişim ve antioksidan aktivitenin incelendiği bir çalışmada (Virtanen ve ark., 2007), yağsız sütün *L. acidophilus* ile 24 saatlik fermentasyonu süresince *L. acidophilus*'un hücre sayısında 4 log kob/mL'luk bir artışın meydana geldiği belirlenmiştir.

Fermente ve Hidrolize Peynir Altı Sularının Antioksidan Aktiviteleri

Oksidatif stress, oksijen ve azot reaktiflerinin üretim miktarının artması ve vücudumuzdaki endojen antioksidan mekanizmasının yetersiz kalması ile oluşmaktadır. Oksidatif stress, vücudumuzda yaşam boyunca meydana gelebilecek hastalıkların başlamasına ve ilerlemesine neden olan önemli bir faktördür. Antioksidan maddelerin günlük diyetimizde bulunması vücudumuzdaki endojen antioksidan mekanizmasını güçlendirmektedir (Usta ve Yılmaz Ersan, 2013; Mann ve ark., 2019). Süt ve süt ürünlerinde bulunan antioksidan özellikteki biyoaktif peptitlerin serum proteinlerinden salındığı/oluştugu ve özellikle metiyonin, sistein gibi kükürt içeren amino asitler, tirozin, triptofan, histidin gibi aromatik özelliğe sahip aminoasitler ile lizin içeren peptitlerin antioksidan özelliklerinin olduğu belirtilmektedir. Söz konusu amino asitlerden kükürt içerenler, aktif SH grupları bulundukları için doğrudan radikaller ile etkileşime girebilmektedir. Aromatik yapıdaki aminoasitler ise yapılarındaki hidrojen atomlarını elektron eksikliği bulunan radikallere vererek antioksidan özellik göstermektedirler (Gür ve ark., 2010; Mann ve ark., 2019). Temel olarak antioksidan maddelerin serbest radikaller ile kimyasal reaksiyona girme mekanizmaları çok farklı olabilmektedir (Örn; hidrojen atomu verme, tek elektron verme, metal iyonlarının şelatlanması). Bu nedenle, antioksidan özellikteki bir maddenin antioksidan aktivitesi en az iki farklı metot ile belirlenmelidir (Kırca ve Özkan, 2010; Büyüktuncel, 2013; Santos-Sánchez ve ark., 2019). Bu çerçevede, yapılan bu çalışmada CUPRAC ve DPPH yöntemleri ile PAS örneklerinin antioksidan aktivitesi ölçülmüştür. Fermente ve hidrolize PAS örneklerinin antioksidan aktiviteleri Çizelge 1'de gösterilmiştir.

PAS örneklerinin DPPH yöntemine göre belirlenen antioksidan değerleri incelendiğinde, kontrol grubu ve *L. rhamnosus* ile fermente olan PAS örneği hariç diğer tüm peynir altı sularının EC₅₀ değerlerinin 24 saatlik fermentasyon süresince önemli derecede azaldığı ($p<0.05$), diğer bir deyişle antioksidan aktivite değerlerinin artış gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle ananas, enginar ve kavun kabuklarından elde edilen ham bitkisel enzim ekstraktlarıyla hidroliz edilmiş PAS örneklerinin ortalama EC₅₀ değerinde % 35-53 arasında bir azalmanın meydana geldiği belirlenmiştir. *L. acidophilus* ile fermente edilmiş ve edilmemiş (kontrol) PAS örneklerinde ise bu değer sırasıyla % 16.20 ve % 8.74 oranında bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen verilere göre, PAS'ın proteolitik aktiviteye sahip bitkisel ham enzim ekstraktlarıyla hidroliz edilmesiyle antioksidan biyoaktiviteye sahip biyoaktif peptitlerin oluşumunun *Lactobacillus* cinsi probiyotik bakteriler ile fermente edilen PAS'da daha yüksek olduğu söylenebilir. Nitekim, çalışmamızdaki sonuçlara benzer olarak proteolitik aktiviteye sahip bitkisel enzim ekstraktlarıyla PAS proteinlerinin hidrolize edildiği çalışmalarda antioksidan aktivitenin arttığı saptanmıştır (Tavares ve ark., 2011; Rocha ve ark., 2017). Kontrol grubundaki antioksidan aktivite artışının ise SH gruplarının moleküler etkileşimlerine ve kompleks reaksiyonlarına bağlanabilir (Owusu-Apenten, 2005).

Peynir altı sularının CUPRAC yöntemine göre belirlenen antioksidan değerleri incelendiğinde, DPPH yöntemiyle elde edilen bulgulara benzer olarak fermente ve hidrolize PAS örneklerin antioksidan aktivite miktarlarında önemli bir artışın meydana geldiği belirlenmiştir. Özellikle *L. acidophilus* ile fermente edilen PAS örneğinin 24 saatlik fermentasyon sonunda CUPRAC değerinin dolayısıyla antioksidan aktivite değerinin yaklaşık 4.5 kat artış gösterdiği belirlenmiştir. Diğer taraftan, kavun kabuklarından elde edilen ham enzim ekstraktı ile hidrolize PAS örneklerinin diğer enzim ekstraktları ile hidrolize peynir altı sularına göre daha yüksek antioksidan özellik gösterdiği tespit edilmiştir.

Yirmi dört saatlik uygulama süresince fermente ve hidrolize PAS örneklerindeki antioksidan aktivite artışı hem CUPRAC hem de DPPH yöntemi ile belirlenmiştir. Peynir altı sularında meydana gelen antioksidan aktivite artışlarının kullanılan yöntemlere göre farklılık göstermesi daha öncede ifade edildiği gibi antioksidan aktivite belirleme yöntemlerinin farklı prensiplere dayanması ve oluşan antioksidan maddelerin, bu yöntemlerde kullanılan sentetik radikallerle farklı şekillerde etkileşime girmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Rocha ve ark. (2017) yaptıkları bir çalışmada, *Salpichroa organifolia* (vadi zambağı) bitkisinin meyvelerinden elde ettikleri aspartik proteazı serbest ve glutaraldehit agoroz ile immobilize ederek PAS protein konsantrantını hidroliz etmişlerdir. Daha sonra elde edilen PAS hidrolizatı ultrafiltrasyon işlemiyle 10 kDa'dan büyük, 3-10 kDa arasında ve 3 kDa'dan küçük fraksiyonlarına ayırıp antioksidan aktivitelerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, 3 kDa'dan küçük fraksiyonların yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu, PAS konsantrantının (hidrolize olmamış) ise en düşük antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Buna göre, araştırmacılar PAS proteinlerinin hidroliz derecesinin artması ile antioksidan aktivitenin arttığını belirlemişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada (Neto ve ark., 2019), *Eupenicillium javanicum* ve *Myceliophthora thermophile* küflerinden elde edilen fungal enzimlerin PAS'ın hidrolizinde kullanılabileceği belirlenmiştir. Çalışmada, her iki küften elde edilen enzimin PAS proteinlerini hidroliz etme miktarının % 15-20 arasında olduğu ve DPPH radikalini en yüksek inhibe oranının % 16.21 olarak *M. thermophile*'den elde edilen enzim ile gerçekleşebildiği saptanmıştır. Correa ve ark. (2014) ise koyun sütünde elde edilen peynirden arta kalan PAS'ın *Bacillus* sp. P7 suşundan elde edilen proteaz ile hidroliz ederek antioksidan ve ACE-inhibitör aktivite özelliklerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, koyun sütü PAS'ının *Bacillus* sp. P7 suşundan elde edilen proteaz ile 6 saat boyunca hidroliz edilmesi ile ABTS radikalinin inhibisyonunu % 51.30, Fe²⁺ şelatlama aktivitesini ise % 38.28 oranında sağladığı belirlenmiştir. Ledesma ve ark. (2005) ise ticari olarak satılan pepsin, tripsin, kimotripsin, termolisin, Corolas PP enzimleri ile saf α -laktalbumin ve β -laktoglobulin proteinlerinin hidroliz edilmesi ile oluşan protein hidrolizatları ve bu hidrolizatların 3kDa'dan küçük fraksiyonlarının antioksidan özelliklerini incelemişlerdir. Araştırmacılar, Corolas PP enziminin her iki serum proteininden antioksidan özellikteki biyoaktif peptit üretiminin daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

Sonuç olarak araştırmada elde edilen bulgular ile literatürdeki bulgular birlikte değerlendirildiğinde, mikrobiyel enzimler ve bitkisel enzim ekstraktlarıyla elde edilen PAS hidrolizatlarının antioksidan aktivite sonuçlarının enzimin çeşidi, enzim/substrat oranı ve uygulama süresine bağlı olarak çok değişken olduğu görülmüştür. Ayrıca, antioksidan aktivitenin belirlenmesinde kullanılan metodların farklı olması da sonuçları etkileyen önemli bir parametredir.

Çizelge 1. Fermente ve hidrolize PAS örneklerinin antioksidan aktiviteleri

Örnek	EC ₅₀ değeri (µL PAS)±S.S		
	Fermentasyon/Hidroliz süresi (saat)		
	6	12	24
Kontrol	1293.44±0.01 ^{Ba}	1496.40±0.01 ^{Aa}	1183.82±0.01 ^{ABa}
<i>L. acidophilus</i>	1171.05±195.93 ^{Ba}	1164.13±148.22 ^{Aa}	980.93±88.36 ^{Ba}
<i>L. rhamnosus</i>	1543.50±0.01 ^{ABa}	1465.99±0.01 ^{Aa}	1567.63±0.01 ^{Aa}
Kavun	1425.57±125.27 ^{ABa}	1218.58±0.01 ^{Aab}	841.30±147.90 ^{Bb}
Ananas	1607.67±105.46 ^{ABa}	1494.99±31.505 ^{Aa}	740.08±6.97 ^{Bb}
Enginar	1780.26±0.01 ^{Aa}	1612.32±0.01 ^{Aab}	1157.01±0.01 ^{ABb}
<i>p</i> değeri : 0.01			
Örnek	CUPRAC (mg Troloks/L PAS)±S.S		
	Fermentasyon/Hidroliz süresi (saat)		
	6	12	24
Kontrol	112.72±16.94 ^{Aa}	103.27±4.16 ^{Ba}	99.66±6.66 ^{Ca}
<i>L. acidophilus</i>	108±10.55 ^{Ac}	228±5.0 ^{Ab}	487.44±47.22 ^{Aa}
<i>L. rhamnosus</i>	136.88±1.66 ^{Aa}	165.50±1.94 ^{ABa}	152.72±10.27 ^{Ca}
Kavun	155.50±5.27 ^{Ab}	229.11±3.88 ^{Ab}	332.16±15.27 ^{Ba}
Ananas	108±4.44 ^{Ab}	195.50±14.72 ^{Aa}	166.33±9.44 ^{Cab}
Enginar	85.22±0.1 ^{Aa}	108.27±2.50 ^{Ba}	128±1.11 ^{Ca}
<i>p</i> değeri : 0.01			

^{A-D}Aynı fermentasyon/hidroliz süresinde farklı büyük harflerle gösterilen uygulamalara ait ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($p<0.05$). ^{a-c}Aynı uygulamaya ait farklı küçük harflerle gösterilen fermentasyon/hidroliz ortalamaları arasında farklar önemlidir ($p<0.05$). S.S: standart sapma

Fermente ve Hidrolize Peynir Altı Sularının ACE İnhibitör Aktiviteleri

ACE inhibitör peptitler ACE'yi inaktif hale getirerek kan basıncını/tansiyon düşürücü etki gösterirler. Gıda ürünleri içerisinde, süt ve süt ürünleri kaynaklı biyoaktif peptitlerin özellikle ACE inhibitör etkisinin olduğu yapılan birçok çalışma ile kanıtlanmıştır (Guo ve ark., 2019; Pereira de Souza ve ark., 2019; Pérez ve ark., 2019). Süt ve süt ürünlerinde ACE inhibitör aktivitesine sahip biyoaktif peptitlerin oluşumunun kazein proteini ve serum fazında bulunan β-laktoglobulin ve α-laktalbumin proteinlerinden kaynaklandığı ifade edilmektedir (Pihlanto-Leppälä, 2001). Çizelge 2'de fermente ve hidrolize PAS örneklerinin ACE inhibitör aktiviteleri gösterilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda fermente ve hidrolize edilmiş PAS örneklerinin ACE inhibitör aktivitelerinin yapılan uygulamanın çeşidine ve süresine bağlı olarak değişim gösterdiği bulunmuştur ($p<0.05$). Buna göre; kontrol grubu (fermente/hidroliz olmayan PAS) hariç hem probiyotik mikroorganizmalarla fermente edilen hem de enzimatik olarak hidroliz edilmiş PAS örneklerinin ACE inhibitör aktivitelerinde önemli bir artışın meydana geldiği tespit edilmiştir.

Fermentasyon uygulaması ele alındığında; 24 saatlik fermentasyon sonunda, *L. acidophilus* ile fermente olan PAS'ın ACE inhibitör aktivitesinin *L. rhamnosus* ile fermente olan PAS'dan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Enzimatik hidroliz uygulaması incelendiğinde ise 24 saat sonunda kavundan elde edilen ham enzim ekstraktı ile

hidroliz edilmiş PAS örneklerinin ACE inhibitör aktivitesi ananas ve kavundan elde edilen ham enzim ekstraktlarıyla hidroliz edilmiş PAS örneklerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 2). Tüm PAS örnekleri birlikte değerlendirildiğinde, ACE inhibitör aktivitesindeki artışın en yüksek 6.48 kat ve 3.29 kat olarak sırasıyla *L. rhamnosus* ile fermente edilen ve enginardan elde edilen ham enzim ekstraktı ile hidroliz edilmiş PAS örneklerinde olduğu belirlenmiştir. PAS örneklerindeki ACE inhibitör aktivitesi artışının hem probiyotik bakterilerle fermentasyon hem de bitkisel ham enzim ekstraktları ile hidroliz sonucunda oluşan biyoaktif peptitler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 2. Fermente ve hidrolize PAS örneklerinin ACE inhibitör aktiviteleri

Örnek	ACE İnhibitör Aktivitesi (%) ± S.S			ACE İnhibitör Aktivitesindeki Değişim (kat)
	Fermentasyon/Hidroliz süresi (saat)			
	6	12	24	
Kontrol	24.07±0.01 ^{Db}	43.05±0.01 ^{Ba}	28.70±0.01 ^{Db}	1.19
<i>L. acidophilus</i>	48.18±0.01 ^{Ab}	31.48±0.46 ^{Cc}	97.22±0.01 ^{Aa}	2.02
<i>L. rhamnosus</i>	10.64±0.01 ^{Ec}	17.12±0.01 ^{Db}	68.98±0.01 ^{Ca}	6.48
Kavun	40.24±3.74 ^{Bb}	34.49±1.62 ^{Cc}	85.18±0.01 ^{Ba}	2.11
Ananas	37.50±0.01 ^{Bb}	65.74±0.01 ^{Aa}	69.44±0.01 ^{Ca}	1.85
Enginar	22.22±0.01 ^{Cb}	14.81±0.01 ^{Dc}	73.14±0.01 ^{Ca}	3.29

p değeri: 0.01

^{A-D}Aynı fermentasyon/hidroliz süresinde farklı büyük harflerle gösterilen uygulamalara ait ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($p<0.05$). ^{a-c}Aynı uygulamaya ait farklı küçük harflerle gösterilen fermentasyon/hidroliz ortalamaları arasında farklar önemlidir ($p<0.05$). S.S: standart sapma

Çalışmamızda elde edilen bulgulara benzer olarak, literatürde PAS proteinlerinin enzimatik hidroliz, mikrobiyel fermentasyon, ısı işlem gibi farklı uygulamalar sonucunda ACE inhibitör aktivitesinin yükseldiği veya ACE inhibitör özelliğine sahip biyoaktif peptitlerin salındığına/oluştığına ilişkin birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çerçevede, Pérez ve ark., (2019) yaptıkları bir çalışmada enkapsüle *Bacillus subtilis* ile inek sütünden üretilen peynirlerden arta kalan PAS hidrolize edilmiş ve hidrolize PAS konsantratında bulunan antihipertansif ve antioksidan özellikteki peptitler incelenmiştir. PAS konsantratının 6 saat boyunca 50°C'de enkapsüle *Bacillus subtilis* ile hidrolizasyon işlemi sonucunda PAS proteinlerinin yaklaşık % 40'nın hidroliz olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar, enkapsüle *Bacillus subtilis* ile hidrolize edilmiş PAS konsantratında bulunan 3-11 kDA arası ve 3 kDA'dan küçük molekül ağırlığındaki peptit fraksiyonlarının ACE inhibitör aktivitelerini sırasıyla % 82.33 ve % 63.37 bulurken, serbest hücrelerle hidrolize edilmiş PAS konsantratının aynı molekül ağırlığına sahip peptit fraksiyonlarında ise ACE inhibitör aktivitelerini sırasıyla % 68.89 ve % 23.75 olarak belirlemişlerdir. Farklı süt ve süt ürünlerinden izole edilen mikrobiyel flora ile fermente edilen keçi sütünün asitlendirilmesiyle elde edilmiş PAS'ın proteoliz ve ACE inhibitör aktivitesinin değerlendirildiği diğer bir çalışmada (Hamme ve ark., 2009), Bamalou des Pyrenées peynirinden ekstrakte edilen mikroflora ile PAS'ın fermentasyonu sonucunda α -laktalbumin'in % 99.6'sının, β -laktoglobulin'in ise % 7.6'sının hidrolize olduğu ve hidroliz işlemi sonucunda ACE inhibitör aktivitesinin % 61.2 olduğu saptanmıştır. Çalışmada Bamalou des

Pyrenees peynirinden ekstrakte edilen mikrofloranın ise taksonomik olarak *Kluyveromyces marxianus* ve *Lactobacillus rhamnosus* olduğu tanımlanmıştır. Lacroix ve ark., (2016) yaptıkları bir çalışmada ticari Thermoase PC10F, Peptidase R, and ProteAX ve Accelerzyme® enzimlerini kullanarak PAS izolatından elde edilen hidrolizatların ACE ile *Dipeptil-Peptidaz IV (DPP-IV)* inhibitör aktivitesini incelemişlerdir. Araştırmacılar, öncelikle PAS izolatını Thermoase PC10F enzimi ile hidrolize etmişler ve hidrolize olan PAS izolatının supernant kısmını Peptidase R, ProteAX ve Accelerzyme® enzimleri ile her bir enzim için optimum çalışma koşullarında yeniden hidrolize etmişlerdir. ACE inhibitör aktivite gösteren PAS hidrolizatlarının sıralaması en yüksekten en düşüğe doğru Thermoase PC10F > Accelerzyme®, Peptidase R > ProteAX şeklinde belirlenmiştir. Literatürde, ACE inhibitör aktivitesi seviyesinin % 70-90 arasında olmasının genellikle yüksek olarak kabul edildiği bildirilmektedir (Pérez ve ark., 2019). Buna göre; 24 saat fermente veya hidrolize edilen PAS'ın ACE inhibitör aktivitesinin yüksek olduğu söylenebilir. Özellikle *L. acidophilus* ile fermente edilmiş PAS örneklerinin % 97 gibi yüksek oranda ACE inhibitor aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu örneği, % 85 ile kavundan elde edilen ham enzim ekstraktı ile hidrolize edilmiş PAS örneği takip etmiştir. Örnekler arasındaki ACE inhibitör aktivite farklılıklarının proteoliz seviyelerin farklı olmasından ve kullanılan enzim ve mikroorganizma çeşidinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, çalışmadan elde edilen ACE inhibitör aktivitelere ait bulguların literatürdeki bulgularla uyumlu olduğu görülmektedir.

Fermente ve Hidrolize Peynir Altı Sularının Antimikrobiyel Aktiviteleri

Hidroliz sonucu oluşan peptitlerin antimikrobiyel etki mekanizmaları tam aydınlatılmamış olmakla beraber bakteriyel membrandaki anyonik lipidlerin pozitif yüklerin etkisiyle stabilizasyonunun bozulduğu ve membran yapısının parçalanmamasına neden olduğu düşünülmektedir. Diğer taraftan, katyonik peptitlerin, hücre dışındaki potasyum (K⁺) geçirgenliğini artıracak şekilde membranın polarize olduğunu veya geçirgenliğini değiştirdiği ifade edilmektedir. Söz konusu hipoteze karşı α -laktalbuminden salınan hem anyonik ve katyonik peptitlerin sadece gram pozitif bakterilere etki ettiği ifade edilmektedir. Bu nedenle, peptitlerin yük ve hidrofobite özelliklerinin yanında bilinmeyen fizikokimyasal etkilerinin olduğu da bildirilmektedir (Yeaman ve Yount, 2003; Elbarbary ve ark., 2019). Çizelge 3'de fermente ve hidrolize PAS örneklerinin antimikrobiyel aktiviteleri gösterilmiştir. Yapılan antimikrobiyel testler sonucunda hem probiyotik bakteriler ile fermente edilmiş hem de ham bitkisel enzim ekstratları ile hidrolize edilmiş PAS örneklerinin test edilen patojen bakterilere karşı mikrobiyel inhibisyonun sağlanmadığı belirlenmiştir. Ancak, pozitif kontroller olan spiramisin ve eritromisin antibiyotiklerinin patojen mikroorganizmalara karşı mikrobiyel inhibisyon gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Buna göre, spiramisin'in gram pozitif bakterilere etkisinin daha fazla olduğu, eritromisin'in ise en fazla inhibisyon gösterdiği patojen bakterinin gram pozitif olan *S. aureus* olduğu, *S. enterica* ve *L. monocytogenes* şuşlarına ise benzer inhibisyon etki gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen bulgulardan farklı olarak literatürde PAS proteinlerinden olan α -laktalbumin, β -laktoglobulin ve laktoferrin'in pepsin, tripsin, proteinaz K gibi proteolitik enzimlerle hidrolizi sonucunda antibakteriyel ve antiviral özellikte peptitlerin oluştuğu belirtilmiştir (Salami ve ark., 2010; Brandelli ve ark., 2015; Mohanty ve ark., 2016).

Salami ve ark., (2010) yaptıkları bir çalışmada tripsin, kimotripsin, proteinaz K ve *Bacillus thermoproteolyticus rokko* kaynaklı termolysin ile sınırlı düzeyde hidrolize edilmiş deve ve inek sütü kaynaklı PAS örneklerinin antimikrobiyel ve antioksidan aktivitelerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, araştırmacılar özellikle deve sütünden elde edilen PAS hidrolizatı ve hidrolizatın 3-10 kDa arasındaki fraksiyonlarının inek sütü PAS hidrolizatına göre *Escherichia coli* üzerine daha yüksek antimikrobiyel aktivite gösterdiği belirlemişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada (Osman ve ark., 2016), keçi sütünün rennet enzimi ile muamelesi ile elde edilen PAS'ın *Bacillus licheniformis*'den elde edilen alkalaz ile hidrolizi sonucu oluşan peptitlerin antimikrobiyel aktiviteleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda, PAS örneğinin pH 7.8'de ve 55°C'de 240 dakika hidroliz edilmesiyle elde edilen peptitlerin *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 33018, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ve *Escherichia coli* ATCC 8739 üzerinde antimikrobiyel etkisinin olduğu belirlenmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada (Elbarbary ve ark., 2019) ise farklı pH'larda buzağı ve mikrobiyel kaynaklı rennetlerin ve domuz pepsini enzimlerinin hidrolizi ile ham PAS örneklerinden antimikrobiyel peptitlerin hazırlanması araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, pH 3'te ve buzağı renneti ile hidrolize edilen Pas örneğinin *Bacillus subtilis* ve *E. coli*'ye karşı en yüksek antimikrobiyel etkiyi gösterdiği belirlenmiştir. PAS'ın her üç enzim ile hidrolizi sonucunda oluşan antimikrobiyel peptit fraksiyonlarının laktoferrin f(20–30) ile β -laktoglobulin f(14–22) ve f(92–103) olduğu saptanmıştır.

Çizelge 3. Fermente ve hidrolize PAS örneklerinin antimikrobiyel aktiviteleri

Örnek	İnhibisyon Zonu (mm)± S.S			
	Patojen Mikroorganizmalar			
	<i>E. coli</i> ATTC 25922	<i>S. enterica</i> subsp. <i>Enterica serovar</i> <i>Typhimurium</i> ATCC 700408	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>L.monocytogenes</i> 4c RSKK 476
Spiramisin	11.40±0.15	8.92±0.04	35.66±0.77	34.62±0.39
Eritromisin	20.75±1.62	15.21±0.64	37.37±1.08	13.36±0.28
Kontrol	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
<i>L. acidophilus</i>	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
<i>L.rhamnosus</i>	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Kavun	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Ananas	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Enginar	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif

S.S: standard sapma

Çalışmada elde edilen bulgular ile literatürdeki bulgular birlikte değerlendirildiğinde, fermente ve hidrolize ettiğimiz PAS örneklerinde antimikrobiyel aktivitenin saptanmamasının nedeni; ham enzim ekstraktlarındaki enzimlerin serum proteinleri ile etkileşimlerinin farklı olması ve fermente ve hidroliz edilen peynir altı suyunun protein fraksiyonlarının tam olarak saflaştırılmamasından kaynaklı olabilir. Nitekim, konu ile ilgili önceki

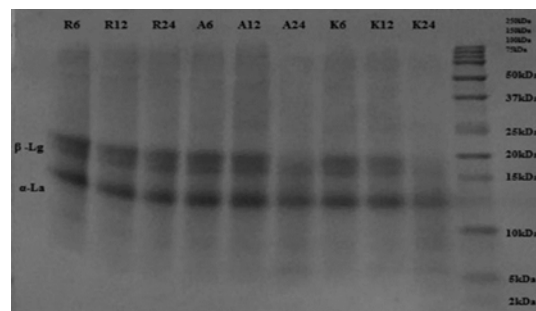
çalışmalarda hidroliz edilen PAS'ın çoğunlukla jel filtrasyon ve boyut geçirim kromatografisiyle fraksiyonlarına ayrıldığı ve ayrılan bu fraksiyonların yüksek antimikrobiyel etki gösterdiği görülmüştür. Oluşan antimikrobiyel peptitlerin ortamda bulunan diğer bileşenlerle moleküler düzeyde etkileşime girmeleri de antimikrobiyel etkinin görülmemesine neden olmuş olabilir.

Fermente ve Hidrolize Peynir Altı Sularının SDS-PAGE Sonuçları

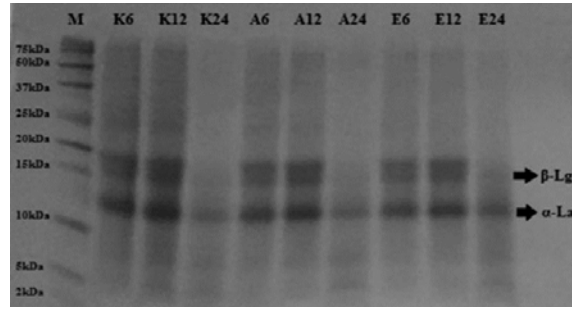
Fermente ve hidrolize PAS örneklerinin SDS-PAGE jellerine ait görüntüler Şekil 2 ve Şekil 3'de verilmiştir. Elektroforez jelleri incelendiğinde, örneklerin tümünde 10-20 kDa arasında olan iki ana bantın olduğu görülmektedir. Söz konusu bantlardan birincisi ~18.4 kDa molekül büyüklüğüne sahip olan β -laktoglobulin, ikincisi ~14.3 kDa molekül büyüklüğüne sahip olan α -laktalbumin'dir. Fermentasyon ve enzimatik hidroliz işleminin proteolize etkisi değerlendirildiğinde, bitkisel ham enzim ekstraktları ile hidrolizasyon işleminin probiyotik bakteriler ile fermentasyon işleminden daha yüksek protein parçalanması gerçekleştirdiği saptanmıştır.

Probiyotik mikroorganizmaların serum proteinleri üzerine etkisi değerlendirildiğinde, fermentasyon süresince β -laktoglobulin ve α -laktalbumin bantlarının yoğunluklarının azaldığı, özellikle β -laktoglobulin'in bant yoğunluğu azalmasının α -laktalbumin'dekinden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Jellerde yapılan görüntü analizi sonucunda, *L. acidophilus* ve *L. rhamnosus* ile fermentasyon işlemi peynir altı suyundaki β -laktoglobulin'in bant yoğunluğunun azalma miktarının sırasıyla ortalama % 13.16 ve 34.16 olduğu, α -laktalbumin'in bant yoğunluğunun azalma miktarının ise sırasıyla ortalama % 7.27 ve % 13.52 olduğu saptanmıştır (Şekil 2).

Hidroliz işleminin serum proteinleri üzerine etkisi değerlendirildiğinde ise β -laktoglobulin ve α -laktalbumin bandlarına ait yoğunlukların her ikisinde azalmanın meydana geldiği tespit edilmiştir. Nitekim; kavun, ananas ve enginar'dan elde edilen enzim ekstraktının peynir altı suyundaki α -laktalbumin bant yoğunluğunun azalma miktarı sırasıyla ortalama %37.68, %54.7 ve %16.34 bulunurken β -laktoglobulin'in bant yoğunluğundaki azalma miktarının ise ~ % 80 olduğu belirlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 2. Fermentasyon işlemi gerçekleştirilmiş peynir altı suyunun elektroforez görüntüsü (R6: 6 saat *L. rhamnosus* ile fermente olmuş peynir altı suyu; R12: 12 saat *L. rhamnosus* ile fermente olmuş peynir altı suyu; R24: 24 saat *L. rhamnosus* ile fermente olmuş peynir altı suyu; A6: 6 saat *L. acidophilus* ile fermente olmuş peynir altı suyu; A12: 12 saat *L. acidophilus* ile fermente olmuş peynir altı suyu; A24: 24 saat *L. acidophilus* ile fermente olmuş peynir altı suyu; K6: 6 saat kontrol grubu; K12: 12 saat kontrol grubu; K24: 24 saat kontrol grubu)



Şekil 3. Hidroliz işlemi gerçekleştirilmiş peynir altı sularının elektroforez görüntüsü (M: 250-2kDA protein standardı; K6: 6 saat boyunca kavundan elde edilen enzim ekstraktı ile hidroliz olmuş peynir altı suyu; K12: 12 saat boyunca kavundan elde edilen enzim ekstraktı ile hidroliz olmuş peynir altı suyu; K24: 24 saat boyunca kavundan elde edilen enzim ekstraktı ile hidroliz olmuş peynir altı suyu; A6: 6 saat boyunca ananasdan elde edilen enzim ekstraktı ile hidroliz olmuş peynir altı suyu; A12: 12 saat boyunca ananasdan elde edilen enzim ekstraktı ile hidroliz olmuş peynir altı suyu; A24: 24 saat boyunca ananasdan elde edilen enzim ekstraktı ile hidroliz olmuş peynir altı suyu; E6: 6 saat boyunca enginardan elde edilen enzim ekstraktı ile hidroliz olmuş peynir altı suyu; E12: 12 saat boyunca enginardan elde edilen enzim ekstraktı ile hidroliz olmuş peynir altı suyu; E24: 24 saat boyunca enginardan elde edilen enzim ekstraktı ile hidroliz olmuş peynir altı suyu).

Çalışmada elde edilen β -laktoglobulin ve α -laktalbumin parçalanma miktarları yapılan diğer çalışmalarla bazı benzerlik ve farklıklar göstermektedir. Neto ve ark. (2019) yaptıkları bir çalışmada *Eupenicillium javanicum* ve *Myceliophthora thermophile* ile elde ettikleri proteazların PAS proteinlerini hidrolize miktarlarını sırasıyla % 20.85 ve % 20.26 olarak belirlemişlerdir. Bununla birlikte, Tavares ve ark. (2011) yabani enginar ekstraktının farklı enzim/substrat oranları kullanıldığında α -laktalbumin'i hidrolize etme miktarının %1.3-7.9 arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Benzer şekilde, Wróblewska ve Troszyńska (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, inek sütü kaynaklı ticari peynir altı suyu protein izolatının alkalaz ve papain enzimleriyle iki aşamalı hidroliz edilmesiyle oluşan protein hidroliz miktarının % 15.9 olduğu belirlenmiştir.

Sonuç

Çalışmada, PAS'ın hem probiyotik bakterilerle fermente edilerek hem de bitkisel enzimlerle hidroliz edilmiş biyoaktif özellikleri zenginleştirilmiş PAS'ın üretilmesi ve antioksidan özelliklerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Hem enzimatik hidroliz hem de probiyotik starter kültürler kullanılarak PAS'ın antioksidan ve ACE inhibitör aktivitesi gibi terapötik özelliklerinin artırılacağı görülmüştür. Buna göre; enginar ve kavun kabuklarından elde edilen ham bitkisel enzim ekstraktlarıyla hidroliz edilmiş PAS örneklerinde ortalama %35-53 arasında değişen antioksidan aktivite artışının meydana geldiği tespit edilmiştir. Probiyotik starter kültürlerle fermente edilen PAS örneklerin ACE inhibitör aktiviteleri ortalama 2.02-6.48 kat, bitkisel enzim ekstraktları ile hidroliz edilmiş PAS örneklerinde ise ortalama 1.85 ile 3.29 kat arasında artış gösterdiği belirlenmiştir.

Biyoaktif özellikleri artırılmış hidrolize veya fermente PAS üretiminin farklı parametreler (sıcaklık, süre, enzim/substrat miktarı vb.) göz önünde bulundurularak pilot ve endüstriyel düzeyde üretiminin optimize

edilmesi ve fonksiyonel özellikler açısından daha detaylı araştırılması gerekmektedir. Hidroliz veya fermentasyon yoluyla üretilen fonksiyonel özellikleri artırılmış PAS ürünlerinin hayvan besleme çalışmalarlarıyla *in vivo* olarak hücresel düzeydeki etkilerinin gelecekte yapılacak çalışmalarda ele alınmasının önemli olduğu düşünülmektedir.

Teşekkür Bilgi Notu

Çalışmada hammadde olarak kullanılan PAS'ın ve bazı kimyasal maddelerin temininde yardımcı olan Uşak Süt A.Ş'ye, starter kültürlerin temin edilmesinde yardımcı olan CHR HANSEN (Türkiye) firmasına ve Antimikrobiyel etki çalışması için patojen kültürlerin temin edilmesinde yardımcı olan Doç. Dr. Sine ÖZMEN TOĞAY ve Doç. Dr. Abdullah DİKİCİ'ye teşekkür ederiz. Yapılan bu çalışma etik kurul izni gerektirmemektedir. Makale araştırma ve yayın etiğine uygun olarak hazırlanmıştır. Yazarlar çalışmaya ortak katkı sağlamış ve yazarlar arasında herhangi bir kişisel ve finansal çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Kaynakça

- Abdel-Hamid, M., Otte, J., De Gobba, C., Osman, A. and Hamad, E. 2017. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. *International Dairy Journal*, 66: 91-98.
- Aguilar-Toalá, J.E., Santiago-López, L., Peres, C.M., Peres, C., Garcia, H.S., Vallejo-Cordoba, B. and Hernández-Mendoza, A. 2017. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, 100(1): 65-75.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. and Karademir, S.E. 2004. A novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols, vitamin C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: The CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:7970-7981.
- Barros, R.M., Ferreira, C.A., Silva, S.V. and Malcata, F.X. 2001. Quantitative studies on the enzymatic hydrolysis of milk proteins brought about by cardosins precipitated by ammonium sulfate. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(8-9): 541-547.
- Benvenuti, S., Pellati F., Melegari, M., Bertelli, D., 2004. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of Rubus, Ribes, and Aronia. *Journal of Food Science*, 69: 164–169.
- Blaschek, K. M., Wendorff, W. L. and Rankin, S. A. 2007. Survey of salty and sweet whey composition from various cheese plants in Wisconsin. *Journal of Dairy Science*, 90(4): 2029-2034.
- Bradley, J.R.L, Arnold, J.E, Barbano, D.M, Semerad, R.G, Smith, D.E and Vines, B.K. 1992. Chemical and physical methods: Standard Methods for the Examination of Dairy Products, Ed .: Marshal R.T, American Public Health Association, Washington, DC, 433–531.

- Büyüktuncel, E. 2013. Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 17: 93-103.
- Brandelli, A., Daroit, D.J. and Correa, A.P.F. 2015. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Research International*, 73:149-161.
- Chabance, B., Marteau P., Rambaud J.C., Migliore Samour, D., Boynard M., Perrotin P., Guillet R., Jollès, P. and Fait A.M. 1998. Casein peptide release and passage to the in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie*, 80: 155-65.
- Chaves-López, C., Serio, A., Paparella, A., Martuscelli, M., Corsetti, A., Tofalo, R. and Suzzi, G. 2014. Impact of microbial cultures on proteolysis and release of bioactive peptides in fermented milk. *Food microbiology*, 42: 117-121.
- Cherrat, L., Espina, L., Bakkali, M., Garcia-Gonzalo, D., Pagan, R. and Laglaoui, A. 2013. Chemical composition and antioxidant properties of *Laurus nobilis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils from Morocco and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(6):1197-1204.
- Correa, A.P.F, Daroit, D.J., Fontoura, R., Meira, S.M.M., Segalin, J. and Brandelli, A. 2014. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Peptides*, 61: 48-55.
- Cushman, D.W. and Cheung, H.S. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 7 (20): 1637-1648.
- Dave, R.I. and Shah, N.P. 1996. Evaluation of Media for Selective Enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. bulgaricus, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacteria*. *Journal of Dairy Science*, 79(9): 1529-1536.
- Elbarbary, H.A., Ejima, A. and Sato, K. 2019. Generation of antibacterial peptides from crude cheese whey using pepsin and rennet enzymes at various pH conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99:555-563.
- Esposito, M., Di Pierro, P., Dejonghe, W., Mariniello, L. and Porta, R. 2016. Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease. *Food Chemistry*, 204:115-121.
- Guo, Y., Jiang, X., Xiong, B., Zhang, T., Zeng, X., Wu, Z., Sun, Y. and Pan, D. 2019. Production and transepithelial transportation of Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides from whey protein hydrolyzed by immobilized *Lactobacillus helveticus* proteinase. *Journal Dairy Science*, 102:1–15.
- Gür, F., Güzel, M., Öncül, N., Yıldırım, Z. ve Yıldırım, M. 2010. Süt serum proteinleri ve türevlerinin biyolojik ve fizyolojik aktiviteleri. *Akademik Gıda*, 8(1): 23-31.

- Hamme, V., Sannier, F., Piot, J.M., Didelot, S. and Juchereau, S.B. 2009. Crude goat whey fermentation by *Kluyveromyces marxianus* and *Lactobacillus rhamnosus*: contribution to proteolysis and ACE inhibitory activity. *Journal of Dairy Research*, 76:152–157.
- Hernández-Ledesma, B., Quirós, A., Amigo, L. and Recio, I. 2007. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal*, 17(1): 42-49.
- Kailasapathy, K., Harmstorf, L. and Phillips, M. 2008. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium anamalis* spp. lactics in stirred fruit yogurts. *LWT Food Science and Technology*, 41(7):1317-1322.
- Kırca, A. ve Özkan, Ö. 2010. Değişik amaçlı bazı test ve analiz yöntemleri: Gıda analizleri, Ed.:Bekir Cemeroglu, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Yayın No: 34, bizim Grup Basımevi, Ankara.
- Konrad, B., Anna, D., Marek, S., Marta, P., Aleksandra, Z. and Jożefa, C. 2014. The evaluation of dipeptidyl Peptidase (DPP)-IV, α -Glucosidase and angiotensin converting enzyme (ACE) Inhibitory activities of whey proteins hydrolyzed with serine protease isolated from Asian pumpkin (*Cucurbita ficifolia*). *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 20:483–491.
- Korhonen, H. 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications *Journal of Functional Foods*, 1(2): 177-187.
- Korhonen, H. and Pihlanto-Leppälä, A. 2000. Milk protein-derived bioactive peptides-novel opportunities for health promotion. *Bulletin of IDF*, 363: 17-26.
- Korhonen, H. and Pihlanto-Leppälä, A. 2006. Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*. 16(9): 945-960.
- Lacroix, I.M.E., Meng, G., Cheung, I.W.Y. and Li-Chan, E.C.Y. 2016. Do whey protein-derived peptides have dual dipeptidyl-peptidase IV and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities? *Journal of Functional Foods*, 21: 87–96
- Le Blanc, J. G., Matar, C., Valdez, J. C., LeBlanc, J. and Perdigon, G. 2002. Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science*, 85(11): 2733-2742.
- Ledesma, B.H., Davalos, A., Bartolome, B. and Amigo, L. 2005. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-Lactalbumin and beta-Lactoglobulin identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53:588-593.
- Lestari, P. and Suyata, S. 2019. Antibacterial activity of hydrolysate protein from Etawa goat milk hydrolysed by crude extract bromelain. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 509 (1):012111. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/509/1/012111/pdf> (Erişim tarihi: 15/03/2019)

- Lievore, P., Simões, D.R., Silva, K.M., Drunkler, N.L., Barana, A.C., Nogueira, A. and Demiate, I.M. (2015). Chemical characterisation and application of acid whey in fermented milk. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4): 2083-2092.
- Mann, B., Athira, S., Sharma, R., Kumar, R. and Sarkar, P. 2019. Bioactive peptides from whey proteins: Whey proteins. Ed.: Deeth, H.C, Bansal, N., Academic Press, Lonodon, United Kindom, pp: 519-547.
- Masood, M.I., Qadir, M.I., Shirazi, J.H. and Khan, I.U. 2011. Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(1), 91-98.
- Medeiros, V., Rainha, N., Paiva, L., Lima, E. and Baptista, J. 2014. Bovine milk formula based on partial hydrolysis of caseins by bromelain enzyme: Better digestibility and angiotensin-converting enzyme-inhibitory properties. *International journal of food properties*, 17(4), 806-817.
- Meisel, H. 1997. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers*, 43(2): 119-128.
- Meisel, H. and Bockelmann, W.1999. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76(1-4): 207-215.
- Mohanty, D., Jena, R., Choudhury, P.K., Pattnaik, R., Mohapatra, S. and Saini, M.R., 2016. Milk derived antimicrobial bioactive peptides: a review. *International Journal of Food Properties*, 19 (4):837-846.
- Neto, Y.A.A.H., Rosa, J.C. and Cabral, H. 2019. Peptides with antioxidant properties identified from casein, whey, and egg albumin hydrolysates generated by two novel fungal proteases. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 49(7):639-648.
- Osman, A., Goda, H.A., Abdel-Hamid, M., Badran, S.M. and Otte, J. 2016. Antibacterial peptides generated by alcalase hydrolysis of goat whey. *Food Science and Technology*, 65:480-486.
- Owusu-Apenten, R. 2005. Colorimetric analysis of protein sulfhydryl groups in milk: applications and processing effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(1): 1-23.
- Pereira de Souza, A.M., Bezerra de Farias, D.R., Brito de Queiroz, B., Suelleny de Caldas Nobre, M., Cavalcanti, M.T., Salles, H.O., Olbrich dos Santos, K.M., Dantas de Medeiros, A.C., Florentino, E.R. and Burity, F.C.A. 2019. Influence of a co-culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus casei* on the proteolysis and ACE-inhibitory activity of a beverage based on reconstituted goat whey powder. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11:273–282.
- Pérez, Y.A., Urista, C.M., Cerda, A.M., Sánchez, J.Á. and Rodríguez, F.R. 2019. Antihypertensive and antioxidant properties from whey protein hydrolysates produced by encapsulated *Bacillus subtilis* cells. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 25:681–689.
- Pescuma, M., Hébert, E.M., Mozzi, F. and de Valdez, G.F. 2008. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. *Food Microbiology*, 3(25): 442-451.
- Pihlanto-Leppälä, A. 2001. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 11: 347-356.

- Rocha, G.F., Kise, F., Rosso, A.M. and Parisi, M.G. 2017. Potential antioxidant peptides produced from whey hydrolysis with an immobilized aspartic protease from *Salpichroa organifolia* fruits. Food Chemistry, 237:350-355.
- Salami, M., Moosavi-Movahedi, A.A., Ehsani, M.R., Yousefi, R., Haertle, T., Chobert, J.M., Razavi, S.H., Henrich, R., Balalaie, S., Ebadi, S.A., Pourtakdoost, S. and Naslaji, A.N. 2010. Improvement of the antimicrobial and antioxidant activities of camel and bovine whey proteins by limited proteolysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58:3297–3302.
- Santos-Sánchez, N.F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C. and Hernández-Carlos, B. 2019. Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism: Antioxidants, Ed.: Shlaby, E. IntechOpen Book, p1-20. <https://www.intechopen.com/books/antioxidants/antioxidant-compounds-and-their-antioxidant-mechanism>
- Sheskin, D.J. 2004. Handbook of Parametric and Nonparametric Statistical Procedures. (No. Ed 3.). Chapman and Hall/CRC press, New York, 1193p.
- Şanlı, T., Akal, H.C., Yetişemiyen, A., and Hayaloglu, A.A. 2018. Influence of adjunct cultures on angiotensin-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity, organic acid content and peptide profile of kefir. International Journal of Dairy Technology, 71(1): 131-139.
- Tavares, T.G., Monteiro, K.M., Possenti, A., Pintado, M.E., Carvalho, J.E. and Malcata, F.X. 2011. Antiulcerogenic activity of peptide concentrates obtained from hydrolysis of whey proteins by proteases from *Cynara cardunculus*. International Dairy Journal, 21(12): 934-939.
- Tsai, J.S., Chen, T.J., Pan, B.S., Gong, S.D. and Chung, M. Y. 2008. Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk. Food Chemistry, 106(2): 552-558.
- Usta, B. ve Yılmaz Ersan, L. (2013). Sütün antioksidan enzimleri ve biyolojik etkileri. Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 27(2):123-130.
- Venegas-Ortega, M.G., Flores-Gallegos, A.C., Martínez-Hernández, J.L., Aguilar, C.N. and Nevárez-Moorillón, G.V. 2019. Production of bioactive peptides from lactic acid bacteria: a sustainable approach for healthier foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 18(4):1039-1051.
- Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S. and Korhonen, H. 2007. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. Journal of Applied Microbiology, 1(102): 1364-5072.
- Welsh, G., Ryder, K., Brewster, J., Walker, C., Mros, S., Bekhit, A.E.D.A., McConnell, M. and Carne, A. 2017. Comparison of bioactive peptides prepared from sheep cheese whey using a food-grade bacterial and a fungal protease preparation. International Journal of Food Science and Technology, 52(5):1252-1259.
- Wróblewska, B. and Troszyńska, A. (2005). Enzymatic hydrolysis of cow's whey milk proteins in the aspect of their utilization for the production of hypoallergenic formulas. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 14(4):349-357.
- Yeaman, M.R. and Yount, N.Y. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacological reviews, 55(1): 27-55.

